



ulm university

universität
uulm

Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie

Fermentative Acetatproduktion durch Homoacetat-Gärung bzw. Acetacetatbildung

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat.
der Fakultät für Naturwissenschaften
der Universität Ulm

vorgelegt von

Melanie Straub

aus

Tettnang

Ulm, Mai 2012

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie der Universität Ulm unter der Leitung von Prof. Dr. Peter Dürre durchgeführt.

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Axel Groß

Erstgutachter: Prof. Dr. Peter Dürre

Zweitgutachter: Prof. Dr. Bernhard J. Eikmanns

Tag der Promotion: 20. Juli 2012

„Misserfolg ist lediglich eine Gelegenheit, mit neuen Ansichten noch einmal anzufangen.“

Henry Ford (1863-1947)

Inhalt

INHALT	IV
ABKÜRZUNGEN	VIII
1. EINLEITUNG	1
2. MATERIAL UND METHODEN	8
2.1 Bakterienstämme	8
2.2 Plasmide	11
2.3 Oligodesoxynukleotide	13
2.4 Zellanzucht	15
2.4.1 Nährmedien und Kultivierungsbedingungen	15
2.4.2 Medienzusätze	27
2.4.3 Kultivierungsbedingungen	28
2.4.4 Stammhaltung	29
2.5 Bestimmung von Wachstums- und Stoffwechselfparametern	29
2.5.1 Bestimmung der optischen Dichte	29
2.5.2 Bestimmung des pH-Werts	30
2.5.3 Glucosebestimmung	30
2.5.4 Fructosebestimmung	32
2.5.5 Gaschromatographische Analysen	33
2.5.6 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High-performance liquid chromatography (HPLC))	34
2.5.7 Bestimmung der Acetat-Kinase-Aktivität	35
2.5.8 Proteinkonzentrationsbestimmung	37
2.6 Arbeiten mit Nukleinsäuren	38
2.6.1 Behandlung von Geräten und Lösungen	38
2.6.2 Isolierung von Nukleinsäuren	38

2.6.3 Reinigung von Nukleinsäuren	42
2.6.4 Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten.....	44
2.6.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen.....	45
2.6.6 Sequenzierung	46
2.6.7 Enzymatische Modifikation von DNA	46
2.6.8 Amplifikation der DNA durch die Polymerasekettenreaktion (PCR)	48
2.6.9 Herstellung kompetenter Zellen und DNA-Transfer	50
2.7 „ClosTron™ Gene Knockout System“	56
2.7.1 Ein-Schritt-SOE-PCR	56
2.7.2 Restriktionsspaltung von DNA-Fragment und dem Vektor pMTL007.....	57
2.7.3 Ligation von DNA-Fragment und Vektor pMTL007	58
2.7.4 Transformation von pMTL007 in <i>C. acetobutylicum</i>	58
2.7.5 Induktion der Integration in <i>C. acetobutylicum</i>	59
2.7.6 Nachweis der Induktion mittels PCR	59
2.8 Chemikalien, Enzyme, Gase, Materialien und Geräte.....	60
2.8.1 Chemikalien	60
2.8.2 Enzyme	60
2.8.3 Gase	62
2.8.4 Molekularbiologische Hilfsmittel	62
2.8.5 Geräte und Materialien.....	63
3. EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE.....	66
3.1 Screening verschiedener Acetatbildner	66
3.2 Etablierung bzw. Verbesserung der Elektrotransformation von <i>A. woodii</i>, <i>C. aceticum</i> und <i>C. ljungdahlii</i>	68
3.3 Konstruktion von Überexpressionsplasmiden für die Erhöhung der Acetatproduktion in acetogenen Stämmen.....	69
3.3.1 Charakterisierung rekombinanter <i>C. aceticum</i> -Stämme bei Wachstum auf Fructose	73
3.3.2 Charakterisierung rekombinanter <i>A. woodii</i> -Stämme bei Wachstum auf Fructose	76

3.3.3 Charakterisierung rekombinanter <i>A. woodii</i> -Stämme bei Wachstum auf Fructose („fed-batch“)	80
3.3.4 Charakterisierung rekombinanter <i>A. woodii</i> -Stämme bei Wachstum auf CO ₂ /H ₂	82
3.4 Konstruktion von Überexpressionsplasmiden für die Erhöhung der Acetatproduktion durch verbesserten Formiatabbau in <i>A. woodii</i>	86
3.4.1 Charakterisierung rekombinanter <i>A. woodii</i> -Stämme bei Wachstum auf Fructose	91
3.4.2 Charakterisierung rekombinanter <i>A. woodii</i> -Stämme bei Wachstum auf Fructose („fed-batch“)	94
3.4.3 Charakterisierung rekombinanter <i>A. woodii</i> -Stämme bei Wachstum auf CO ₂ /H ₂	96
3.5 Fermentation der rekombinanten <i>A. woodii</i>-Stämme	100
3.6 Bestimmung der Acetat-Kinase-Aktivität in dem Stamm <i>A. woodii</i> WT und den rekombinanten <i>A. woodii</i>-Stämmen	103
3.7 Erhöhung der Acetatproduktion in <i>C. acetobutylicum</i> durch Eliminierung der Nebenprodukte Butanol und Butyrat	105
3.7.1 Charakterisierung der Mutanten <i>C. acetobutylicum</i> <i>hbd332s::intron</i> und <i>C. acetobutylicum</i> <i>crt383s::intron</i> bei Wachstum auf CG-Medium	107
3.7.2 Charakterisierung der Mutanten <i>C. acetobutylicum</i> <i>hbd332s::intron</i> und <i>C. acetobutylicum</i> <i>crt383s::intron</i> bei Wachstum auf MES-Medium	109
3.8 Verbesserung der Acetatproduktion in <i>C. acetobutylicum</i> über die verstärkte Bildung von Acetacetat	112
3.9 2,3-Butandiolproduktion mit den Stämmen <i>C. acetobutylicum</i> WT und <i>C. acetobutylicum</i> <i>hbd332s::intron</i>	119
4. DISKUSSION	125
4.1 Optimierung der Acetatproduktion in acetogenen Bakterien	125
4.2 Erhöhung der Acetatproduktion in <i>C. acetobutylicum</i> durch Eliminierung der Nebenprodukte Butanol und Butyrat	139

4.3 Verbesserung der Acetatproduktion in <i>C. acetobutylicum</i> über die verstärkte Bildung von Acetacetat.....	143
4.4 Erhöhung der Acetatausbeute über die 2,3-Butandiolproduktion in <i>C. acetobutylicum</i>	145
5. A) ZUSAMMENFASSUNG.....	148
5. B) SUMMARY	150
6. LITERATUR	152
7. ANHANG	168
7.1 Informationsquellen	168
7.2 Wachstumskurven und Produktspektren.....	169
DANKSAGUNG	172
AKADEMISCHER LEBENSLAUF	174

Abkürzungen

A	Adenin, eine der vier Basen der DNA; Ampere, Einheit der elektrischen Stromstärke; Absorption
A.	<i>Acetobacterium</i>
Abb.	Abbildung
ad	bis
ADP	Adenosindiphosphat
AG	Aktiengesellschaft
Ap^R	Ampicillin-Resistenz
ATCC	„American Type Culture Collection“
ATP	Adenosintriphosphat
B.	<i>Bacillus</i>
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin, eine der vier Basen der DNA
C.	<i>Clostridium</i>
°C	Grad Celsius, Einheit der Temperatur
ca.	circa
CGM	Clostridial Growth Medium
Cla	Clarithromycin
Cm^R	Chloramphenicol- Resistenz
CO	Kohlenmonoxid
CO₂	Kohlendioxid
d	Desoxy-; Schichtdicke der Küvette
DAD	Diodenarraydetektor
DEPC	Diethyldicarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotid-5'-triphosphat
Dr.	Doktor
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; Braunschweig
DTT	1,4-Dithio-DL-Threit
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
ε	Extinktionskoeffizient
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Em ^R	Erythromycin-Resistenz
Erm ^R	Erythromycin-Resistenz
<i>et al.</i>	und andere (<i>et alii</i>)
F	Farad, Einheit der elektrischen Kapazität
FID	Flammenionisationsdetektor
fw	vorwärts (<i>forward</i>)
g	Gramm; Erdbeschleunigung (9,81 m/s) (<i>gravity</i>)
G	Guanin, eine der vier Basen der DNA
GC	Gaschromatograph
G + C	Guanin und Cytosin
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
H	Wasserstoff
h	Stunde(n) (<i>hour</i>)
H ₂ O	Wasser
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranosid
k	kilo (10 ³)

Kan ^R	Kanamycin-Resistenz
KG	Kommanditgesellschaft
KGaA	Kommanditgesellschaft auf Aktien
Km ^R	Kanamycin-Resistenz
I	Liter
λ	lambda
LB	<i>Luria Broth</i> , ein Komplexmedium
M	Mega (10^6); Molar
μ	mikro (10^{-6})
m	milli (10^{-3})
max.	maximal
MES	2-Morpholinopropansulfonsäure
mesh	Maschengröße
min	Minute(n)
mind.	mindestens
mod.	modifiziert
mol	Mol ($6,023 \times 10^{23}$ Teilchen)
N	Stickstoff
n	nano (10^{-9})
NAD ⁺	β -Nicotinamidadenindinukleotid
NADH+H ⁺	β -Nicotinamidadenindinukleotid, reduzierte Form
NADP ⁺	β -Nicotinamidadenindinukleotid-2'-phosphat
NADPH+H ⁺	β -Nicotinamidadenindinukleotid-2'-phosphat, reduzierte Form
nat.	naturwissenschaftlich
Ni	Nickel
NTA	Nitrilo-Trichlor-Essigsäure
nt	Nukleotide

O	Sauerstoff
OD _x	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
Ω	Ohm, Einheit des elektrischen Widerstandes
orf	„Open Reading Frame“ (Offener Leserahmen)
ori	„Origin of Replication“ (Replikationsursprung)
Pa	Pascal
P	Phosphat, Promoter
p	Plasmid
Pa	Pascal, Einheit des Drucks
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration (<i>potentia Hydrogenii</i>)
Prof.	Professor
PVBS	Polysterol-divinylbenzol Copolymer
®	eingetragenes Warenzeichen (<i>registered</i>)
rer.	rerum
rev	rückwärts (<i>reverse</i>)
RID	Brechungsindexdetektor (<i>refractive index detector</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
S.	Seite
s	Sekunde (<i>second</i>)
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
Sp ^R	Spectinomycin-Resistenz

T	Thymin, eine der vier Basen der DNA
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Tc ^R	Tetracyclin-Resistenz
TE	Tris-HCl-EDTA-Puffer
Tet ^R	Tetracyclin-Resistenz
THF	Tetrahydrofolsäure
Thi	Thiamphenicol
™	Warenzeichen (<i>trademark</i>)
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Einheit (<i>unit</i>), Aktivitätsangabe bei Enzymen
	Uracil, eine der vier Basen der RNA
ÜN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt, Einheit der elektrischen Spannung
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt, Einheit der elektrischen Leistung
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactosid
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

Essigsäure ist eine klare, farblose Flüssigkeit mit stechendem Geruch und aufgrund ihrer Polarität in Wasser und den meisten organischen Lösungsmitteln löslich. Essigsäure findet in vielen Bereichen ihre Anwendung. Zum einen wird sie in Speiseessig (5 % Essigsäure) oder auch in Essigessenzen (25 % Essigsäure) eingesetzt. Zum anderen wird sie aufgrund ihrer keimtötenden Wirkung auch als Konservierungstoff in Lebensmitteln (E260) genutzt.

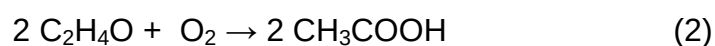
Mehr als 65 % der produzierten Essigsäure werden für Polymere auf Basis von Vinylacetat und Celluloseacetat genutzt. Vinylacetat dient als Grundlage für Polyvinylacetat (PVA), welches in Klebstoffen und Farben seine Anwendung findet. Celluloseacetat wird für die Produktion von Zigarettenfiltern, Folien- und Kunststoffprodukten verwendet. Außerdem ist Essigsäure ein wichtiges, chemisches Intermediat bei der Herstellung von Estern, welche in Kosmetika und Parfums enthalten sind. Aluminiumacetat wird z.B. als Imprägniermittel in der Textil- und Lederindustrie eingesetzt.

Die weltweiten Produktionskapazitäten von Essigsäure lagen 2001 bei etwa 7,5 Mio. Tonnen pro Jahr, welche jedoch zwischen 1998 und 2006 um etwa vier Prozent angestiegen sind (Hosea *et al.*, 2005).

Der wichtigste Prozess der chemischen Essigsäure-Synthese ist die Carbonylierung von Methanol (1). Dabei werden Methanol und Kohlenmonoxid bei ca. 150 °C und einem Druck von 30-60 bar über Metall-Katalysatoren und Iod zu Essigsäure umgesetzt (Monsanto-Prozess; BASF, 1960).



Eine weitere Methode stellt die Acetaldehyd-Oxidation dar, welche jedoch nach der Entdeckung der Methanol-Carbonylierung immer mehr in den Hintergrund rückte. Die Acetaldehyd-Oxidation (2) beruht auf der Oxidation von Acetaldehyd mit z.B. Mangan-Katalysatoren zu Essigsäure.



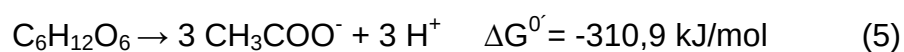
Diese Reaktion kann sich auch an eine Ethylen-Oxidation anschließen, bei welcher zunächst Ethen zu Ethanal (Acetaldehyd) umgesetzt wird und die Essigsäure anschließend über die Acetaldehyd-Oxidation gebildet wird (Wacker-Prozess; Wacker Chemie AG und Farbwerke Hoechst, Patent: Smidt *et al.*, 1957; Smidt *et al.*, 1959; Jira, 2009).

2×10^6 Tonnen Essigsäure werden bis heute über ein biotechnologisches Verfahren, die oxidative Fermentation, hergestellt (Steinborn, 2007). Hierbei wird Ethanol durch Bakterien, z.B. *Acetobacter* oder *Gluconobacter*, zu Essigsäure veratmet. Als Ausgangsmaterialien dienen Wein, Bier oder Malz. Ethanol wird durch die Bakterien mittels einer sog. terminalen Oxidation, d.h. unter Freisetzung sekundärer Alkohole und Ketone, über Acetaldehyd zu Essigsäure umgesetzt (3)+(4).



Die Produktion von Essigsäure auf diesem Wege geht in Europa bis in die Antike zurück. Zu dieser Zeit wurde die Essigsäure durch Vergärung von Wein in offenen Flaschen erhalten. Damals war noch nicht bekannt, warum es zu dieser Vergärung kam. Erst im 19. Jahrhundert erbrachte Louis Pasteur den Nachweis von kleinen Lebewesen, den Essigsäurebakterien, welche für den Umwandlungsprozess von Wein zu Essigsäure verantwortlich sind (Pasteur, 1868). Im sog. Orléans-Verfahren wurden seither Essigsäurebakterien direkt in die wein- bzw. alkoholhaltige Lösung in Oberflächenfermenter gegeben, welche geöffnet an der Luft standen, bis die Vergärung zur Essigsäure abgeschlossen war. Durch die Entwicklung von sog. Generatorverfahren, bei welchen die wein- bzw. alkoholhaltigen Lösungen durch Holzgeneratoren geleitet wurden, welche beispielsweise mit Buchenspänen befüllt wurden und so als schwimmendes Trägermaterial für die Ansiedlung der Essigsäurebakterien dienten, konnte dieser Prozess weiter verbessert werden. Durch ein Belüftungssystem am Boden wurde der Sauerstoff durch die steigende Hitze der Generatoren noch oben getragen. Ähnliche Verfahren, z.B. das Submersverfahren, sind bis heute noch im Einsatz, wobei jedoch keine Trägermaterialien verwendet werden. Die Essigsäurebakterien befinden sich direkt in der Flüssigkeit, welche durch Turbinen ständig durchmischt wird. Da der Vergärungsprozess durch dieses System innerhalb von 24 h abgeschlossen ist, ist eine hohe Wirtschaftlichkeit gegeben.

Fischer *et al.* entdeckten 1932, dass acetogene Bakterien in der Lage sind, verschiedene Zucker direkt, ohne Ethanol als Intermediat, über die Fixierung von CO₂, zu Acetat zu verstoffwechseln. Über die sog. Homoacetatgärung (Abbildung 1) ist eine Steigerung der Rohstoffausbeute von bis zu 50 % gegenüber der Essigsäuregärung aus Ethanol möglich. Es wird geschätzt, dass die Acetogenen global jährlich über 10¹³ kg Essigsäure produzieren, was die weltweite Gesamtproduktion der chemischen Industrie weit in den Schatten stellt (Ragsdale, 2008). Acetogene Bakterien verstoffwechseln Hexosen über den Embden-Meyerhof-Parnas-Weg (Glykolyse) zu zwei Molekülen Pyruvat, welche über die Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase zu zwei Molekülen Acetyl-CoA und CO₂ umgesetzt werden. Das Acetyl-CoA wird mittels der Phosphotransacetylase zu Acetyl-Phosphat und weiter über die Acetat-Kinase zu Acetat verstoffwechselt. Bei diesem Weg der Acetatbildung werden über die Substratkettenphosphorylierung vier Moleküle ATP gebildet. Dabei handelt es sich um die höchste Ausbeute an ATP bei fermentierenden Bakterien. Im Gegensatz zu anderen Bakterien können acetogene Bakterien das in der Glykolyse entstandene CO₂ über den reduktiven Acetyl-CoA-Weg, auch Wood-Ljungdahl-Weg genannt, zu einem weiteren Mol Acetat umsetzen (Barker *et al.*, 1945; Ljungdahl, 1986; Drake *et al.*, 2006). Dabei werden die in der Glykolyse und von der Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase gebildeten Reduktionsäquivalente wieder in den Stoffwechsel eingeschleust. Somit werden durch die Homoacetatgärung, im Gegensatz zur Ethanoloxidation, drei Mol anstatt nur zwei Mol Acetat aus einem Mol Hexose gebildet (5).



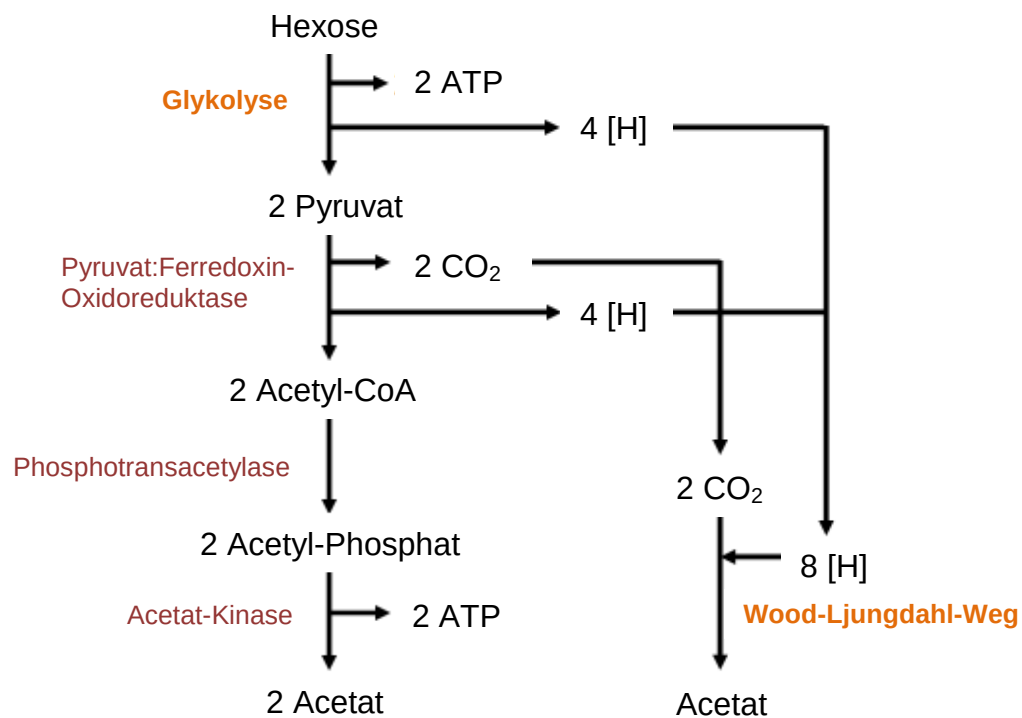


Abbildung 1: Homoacetatgärung (Drake *et al.*, 2006, mod.)

Im Wood-Ljungdahl-Weg (Ragsdale und Wood, 1985) wird eines der beiden während der Glykolyse entstandenen CO₂-Moleküle enzymatisch über die CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthase (ACS) zu Kohlenmonoxid reduziert (Carbonyl-Ast), wobei das zweite Molekül CO₂ im Methyl-Ast stufenweise zu einer Methylgruppe reduziert wird (Ragsdale, 1991; Abb. 2). Im ersten Schritt des Methyl-Asts wird das CO₂ mittels der Formiat-Dehydrogenase zu Formiat reduziert. Über die Formyl-THF-Synthetase wird das Formiat an ein Tetrahydrofolat (THF) gebunden und so aktiviert. Weitere THF-abhängige Enzyme reduzieren die Formylgruppe anschließend zu einer Methylgruppe. Die Methyl-Gruppe wird mittels der Methyltransferase auf das Enzym ACS übertragen, wobei ein Corrinoideisen-Schwefel-Protein (CoFeS-P) als Methyl-Gruppen-Akzeptor fungiert. ACS katalysiert anschließend die Bildung von Acetyl-CoA aus CoA, dem methylierten CoFeS-P und dem über den Carbonyl-Ast gebildeten CO. Bei ACS handelt es sich um ein $\alpha_2\beta_2$ -Tetramer. Die α -Untereinheit katalysiert die Acetyl-CoA-Synthase aus der gebundenen Methylgruppe und dem CO, wohingegen die β -Untereinheit die Reduktion von CO₂ katalysiert (Ragsdale *et al.*, 1983; Pezacka und Wood, 1984; Raybuck *et al.*, 1988; Grahame, 2003). Acetyl-CoA wird über die

Phosphotransacetylase und der Acetat-Kinase zu Acetat verstoffwechselt oder dient dem Organismus für anabole Prozesse (Imkamp und Müller, 2007).

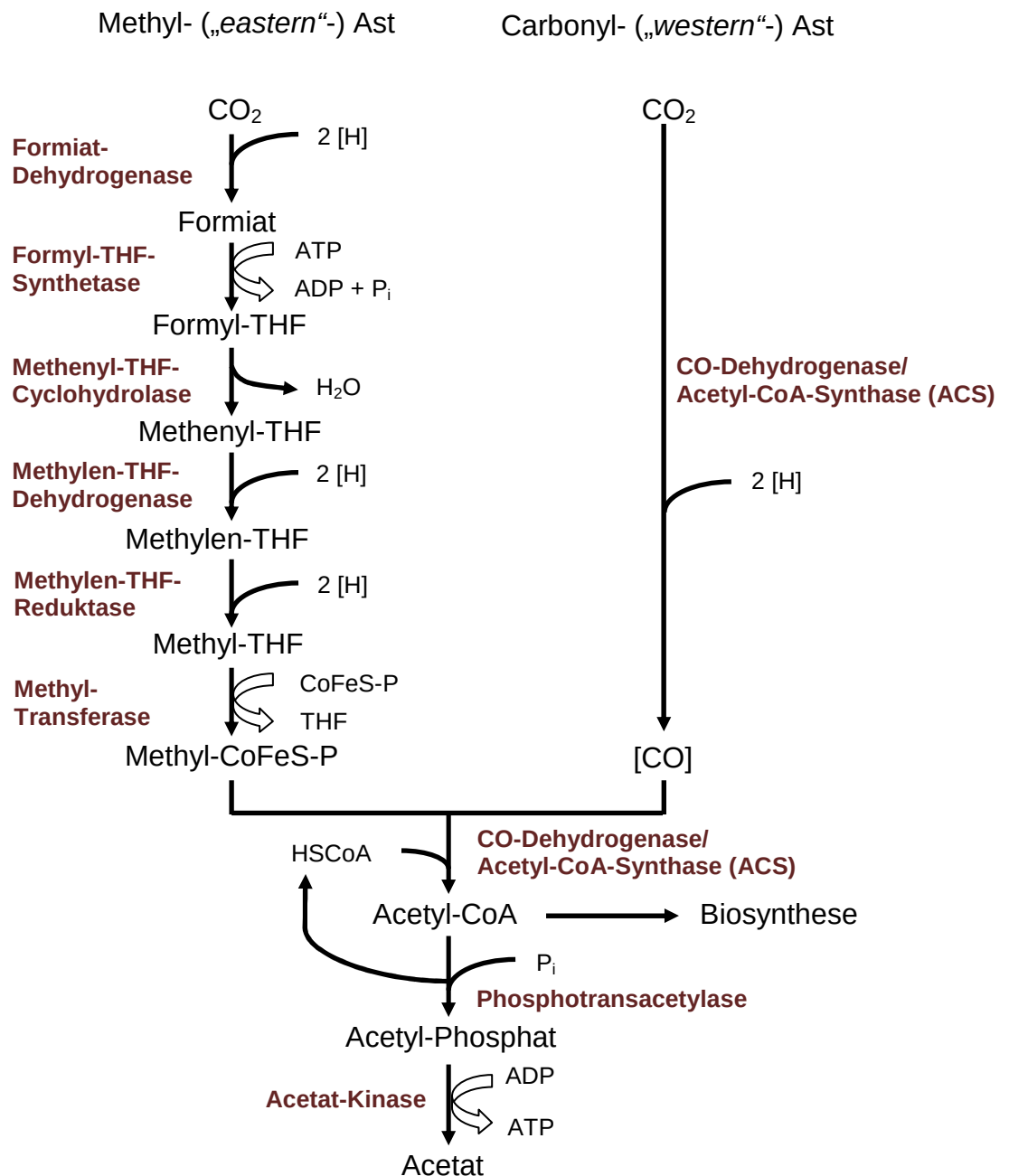
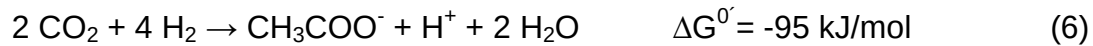


Abbildung 2: Wood-Ljungdahl-Weg (Imkamp und Müller, 2007, mod.), THF: Tetrahydrofolat; HSCoA: Coenzym A; P_i : anorganisches Phosphat; CoFeS-P: Corrinoid/Eisen-Schwefel-Protein

Einige acetogene Bakterien, welche eine Hydrogenase besitzen, können den Wood-Ljungdahl-Weg auch zur autotrophen Energiegewinnung aus der Umsetzung von CO₂ und H₂ zu Acetat (6) nutzen (Ragsdale, 2008).



Bei der autotrophen Acetatproduktion wird jedoch kein ATP direkt über den reduktiven Acetyl-CoA-Weg gewonnen. Acetogene sind beim Wachstum auf CO₂ und H₂ auf Protonen- oder Natriumgradienten und somit die Bildung von ATP über ATPasen angewiesen.

1932 wurden die ersten Organismen entdeckt, welche CO₂ und H₂ zu Essigsäure umsetzen können (Fischer *et al.*, 1932). *Clostridium aceticum*, ein anaerober, Gram-positiver, mesophiler Sporenbildner, wurde als erstes acetogenes Bakterium im Jahre 1936 von Wieringa isoliert und charakterisiert (Wieringa, 1936; 1940), ging jedoch verloren und erneute Reisolierungen dieses Stammes schlugen fehl. *Moorella thermoacetica*, früher *Clostridium thermoaceticum* (Collins *et al.*, 1994), wurde als zweites acetogenes Bakterium entdeckt und diente seitdem als Modellorganismus der Acetogenen (Fontaine *et al.*, 1942). 1977 wurde *Acetobacterium woodii*, ein anaerobes, nicht-sporenbildendes, Gram-positives Bakterium als ein weiteres acetogenes Bakterium von Balch *et al.* isoliert, bevor im Jahr 1980 ein Röhrchen mit Sporen des Originalstammes *C. aceticum* von Gottschalk entdeckt und reaktiviert werden konnte (Adamse, 1980). Bis heute sind 22 Gattungen von acetogenen Bakterien bekannt, wobei es sich bei den Gattungen *Acetobacterium* und *Clostridium* um die artenreichsten handelt. Viele Acetogene wurden als Bodenbakterien identifiziert, sie wurden aber auch aus Klärschlamm, dem Verdauungstrakt und Kot von vielen Tieren, Menschen und Termiten isoliert.

Da Acetogene in der Lage sind, CO₂ als Substrat verwerten zu können, rücken diese immer weiter in das Interesse der weißen Biotechnologie. Viele Acetogene können auch CO als Kohlenstoffquelle nutzen (Wood, 1991). CO ist ein Bestandteil von Synthesegas, welches z. B. durch das Recycling von Plastik oder die Verschwelung von Hausabfällen produziert wird (Weißermel und Arpe, 2003). Durch die Fähigkeit, Abfallprodukte, insbesondere CO₂ oder auch CO, zu wichtigen chemischen Verbindungen umsetzen zu können, rücken die Acetogenen in der heutigen Klimadiskussion immer weiter in den Vordergrund.

Ein weiterer Organismus, *Clostridium acetobutylicum*, der zur Gruppe der Clostridien zählt und eigentlich als ABE-Produzent bekannt ist, produziert in geringeren Mengen Acetat. *C. acetobutylicum* ist ein Gram-positiver, anaerober Sporenbildner und zeichnet sich durch seinen biphasischen Stoffwechsel aus (Dürre und Bahl, 1996; Dürre, 2005), der sich in die acidogene und die solventogene Phase gliedert. In der acidogenen Phase beginnt der Aufbau der Biomasse und die Säuren Acetat und Butyrat werden gebildet, wodurch es zum Absinken des pH-Werts im Medium kommt. Um einen Zusammenbruch des Protonengradienten und somit das Absterben des Organismus zu verhindern, erfolgt ein sog. „shift“ am Ende des logarithmischen Wachstums. In der sich anschließenden solventogenen Phase werden die gebildeten Säuren teilweise wieder aufgenommen und hauptsächlich zu den Lösungsmitteln Butanol und Aceton, aber auch zu Ethanol und Acetoin umgesetzt.

In dieser Arbeit sollte u. a. der Stoffwechsel von *C. acetobutylicum* gentechnisch verändert werden. Durch die Inaktivierung von Genen, welche eine Eliminierung der Nebenprodukte Butanol und Butyrat zur Folge haben, bzw. durch die Überexpression ausgewählter Gene, sollte der metabolische Fluss in Richtung der Acetatproduktion gelenkt werden, um die maximale Acetatkonzentration zu steigern. Des Weiteren sollten acetogene Stämme gefunden werden, welche sich durch eine hohe Acetatproduktion auszeichnen und die Konzentrationen an gebildeten Nebenprodukten hingegen gering ausfallen. Durch „metabolic engineering“ sollten diese Stämme anschließend gentechnisch so verändert werden, dass die maximale Produktion an Acetat noch weiter gesteigert werden kann. Dies kann durch die Überexpression von Genen, welche für spezielle Enzyme des Acetatstoffwechsels kodieren, erreicht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Bakterienstämme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Relevanter Phäno- oder Genotyp	Referenz/Herkunft
<i>Escherichia coli</i>		
XL1-Blue MRF'	$\Delta(\text{mcrA}) 183 \Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac (F' proAB lacI}^q \text{ Z}\Delta\text{M15 Tn10 (Tet}^R\text{))}$	Stratagene; La Jolla, USA
JM109	$\text{endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 recA1 mcrB}^+ \Delta(\text{lac-proAB}) \text{ e14- [F' traD36 proAB}^+ \text{ lacI}^q \text{ lacZ}\Delta\text{M15}] \text{ hsdR17(r}_K^- \text{m}_K^+)$	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
ER2275	$\text{trp31 his1 tonA2 rpsL104 supE44 xyl-7 mtl-2 metB1 e14}^- \Delta\text{lac U169 endA1 recA1 R(zbgZ10::Tn10) TC}^s \Delta(\text{mcr-hsd-mrr})114::1510 \text{ (F' proAB traD36 lacI}^q \Delta\text{M15 zzf::mini Tn10 (Kan}^R\text{))}$	Mermelstein und Papoutsakis, 1993

Fortsetzung Tabelle 1: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Relevanter Phäno- oder Genotyp	Referenz/Herkunft
<i>Clostridium</i>		
<i>acetobutylicum</i>		
ATCC824	Typstamm	DSMZ, Braunschweig
<i>hbd332s::intron</i>	Typstamm mit Integration eines Introns in <i>ca_ c2708 (hbd)</i> an Position 332 des codogenen Stranges, Erm ^R	diese Arbeit
<i>crt383s::intron</i>	Typstamm mit Integration eines Introns in <i>ca_ c2712 (crt)</i> an Position 383 des codogenen Stranges, Erm ^R	diese Arbeit
<i>Clostridium aceticum</i> DSM1496	Typstamm	DSMZ, Braunschweig
<i>Clostridium carboxidivorans</i> DSM15243	Typstamm	DSMZ, Braunschweig
<i>Clostridium drakei</i> DSM14770	Typstamm	DSMZ, Braunschweig
<i>Clostridium ljungdahlii</i> DSM13583	Typstamm	DSMZ, Braunschweig
<i>Clostridium mayombei</i> DSM6538	Typstamm	DSMZ, Braunschweig
<i>Acetobacterium woodii</i> DSM1030	Typstamm	DSMZ, Braunschweig

Fortsetzung Tabelle 1: Verwendete Bakterien

Stamm	Relevanter Phäno- oder Genotyp	Referenz/Herkunft
<i>Blautia coccoides</i> DSM935	Typstamm	DSMZ, Braunschweig
<i>Blautia producta</i> DSM3507	Typstamm	DSMZ, Braunschweig
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> DSM3071	Typstamm	DSMZ, Braunschweig

2.2 Plasmide

Die in dieser Arbeit konstruierten und verwendeten Plasmide sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Verwendete Plasmide

Plasmid	Größe [kBp]*	Eigenschaften/ Charakteristika	Referenz/Herkunft
pDrive	3,9	pMB1/ColE1 <i>ori (rep)</i> f1 <i>ori</i> , Ap ^R , Km ^R	Qiagen GmbH, Hilden
pANS1	6,2	pACYC148/p15A <i>ori (rep)</i> , Sp ^R , Methyltransferase-Gen des Phagen 3T	Böhringer, 2002
pIMP1	4,7	Ap ^R , MLS ^R , ColE1 <i>oriR</i> pIMP13 <i>oriR</i> ⁺	Mermelstein <i>et al.</i> , 1992
pIMP1_catP	6,0	Ap ^R , MLS ^R , ColE1 <i>oriR</i> pIMP13 <i>oriR</i> ⁺ , Cm ^R	Linder, unveröffentlicht
pJIR750	6,6	Cm ^R , pMB1 (rep), <i>oriCP</i> , <i>oriEC</i> , <i>lacZ</i> , pIP404 (rep)	Bannam <i>et al.</i> , 1993
pMTL007	11,8	Cm ^R (<i>catP</i>), <i>lacI</i> , LtrA, <i>oriT</i> , ColE1 <i>ori</i>	Minton, Nottingham University, Großbritannien
pIMP_ptb	4,8	Ap ^R , MLS ^R , ColE1 <i>oriR</i> pIMP13 <i>oriR</i> ⁺ , P _{ptb} aus <i>C. acetobutylicum</i>	Hoffmeister, unveröffentlicht
pACYC184	4,2	p15A, Tc ^R , Cm ^R	DSMZ, Braunschweig

* gerundet

Fortsetzung Tabelle 2: Vewendete Plasmide

Plasmid	Größe [kBp]*	Eigenschaften/ Charakteristika	Referenz/Herkunft
pMClj	7,2	pACYC184, Methyltransferase-Gen aus <i>C. ljungdahlii</i> , Cm ^R	diese Arbeit; Wensche, unveröffentlicht
pMCljS	7,6	pACYC184, Methyltransferase-Gen aus <i>C. ljungdahlii</i> , Sp ^R	diese Arbeit; Wensche, unveröffentlicht
pIMP1_pta-ack	7,4	<i>pta-ack</i> aus <i>C. ljungdahlii</i> in pIMP1	diese Arbeit
pIMP1_THF	9,8	Formyl-THF-Synthetase, Methenyl-THF- Cyclohydrolase, Methylen- THF-Dehydrogenase und Methylen-THF-Reduktase aus <i>C. ljungdahlii</i> in pIMP1	diese Arbeit
pIMP_ptb_pta-ack	7,2	<i>pta-ack</i> aus <i>C. ljungdahlii</i> in pIMP_ptb	diese Arbeit
pIMP_ptb_THF	9,8	Formyl-THF-Synthetase, Methenyl-THF- Cyclohydrolase, Methylen- THF-Dehydrogenase und Methylen-THF-Reduktase aus <i>C. ljungdahlii</i> in pIMP_ptb	diese Arbeit
pJIR750_pta-ack_ermC	10,6	<i>pta-ack</i> aus <i>C. ljungdahlii</i> in pJIR750, Em ^R	diese Arbeit

* gerundet

Fortsetzung Tabelle 2: Vewendete Plasmide

Plasmid	Größe [kBp]*	Eigenschaften/ Charakteristika	Referenz/Herkunft
pIMP_ctfAB_thlA_catP	9,0	<i>ctfAB</i> und <i>thlA</i> aus <i>C. acetobutylicum</i> in pIMP1, Cm ^R	diese Arbeit; Lederle, 2010, mod.
pIMP_ptb_cbe1464	7,2	<i>cbe1464</i> aus <i>C. beijerinckii</i> in pIMP1_catP, P _{ptb} , Cm ^R	diese Arbeit

* gerundet

2.3 Oligodesoxynukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligodesoxynukleotide wurden von der biomers.net GmbH, Ulm bezogen und sind in Tabelle 3 aufgelistet. Eingefügte Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen sind fett und unterstrichen hervorgehoben. Die Oligodesoxynukleotide wurden mit sterilem Wasser auf eine Konzentration von 100 pmol/μl eingestellt und bei -20 °C gelagert.

Tabelle 3: Oligodesoxynukleotide

Oligodesoxynukleotid	Sequenz (5'→3')	Enzym
catP_EcoRI_fw	GCTAT GAATTC ATTACGAATTGTACCCGGAA	<i>EcoRI</i>
catP_EcoRI_rev	GC AGAATTC AACACAAGGTCTTTGTACTAA	<i>EcoRI</i>
ermC_EcoRI_fw	GC AGAATTC AAACCGTGTGCTCTAC	<i>EcoRI</i>
ermC_EcoRI_rev	GCT GAATTC ACGCTTATTCGCTTCG	<i>EcoRI</i>
hbd_kon_fw	TATAGGTGCAGGTACTATG	
hbd_kon_rev	GCTTCATAACAGGAGCTGG	
IBS_hbd_332	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTATTTGCCGCTA AAGTGCGCCCAGATAGGGTG	

Fortsetzung Tabelle 3: Oligodesoxynukleotide

Oligodesoxynukleotid	Sequenz (5'→3')	Enzym
EBS1d_hbd_332	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCGC AAGAATTAACCTTACCTTTCTTTGT	
EBS2_hbd_332	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGGTTTCAAATCGATA GAGGAAAGTGTCT	
crt_kon_fw	GGTAAAGTTGCTGTAGTTACC	
crt_kon_rev	CTGGTTGACCAAATCTTGC	
IBS_crt_383	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTATTGCGCTGCTTGG TGCGCCCAGATAGGGTG	
EBS1d_crt_383	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCTG CTTGAATAACTTACCTTTCTTTGT	
EBS2_crt_383	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGGTTCGCAATCGATA GAGGAAAGTGTCT	
fD1 ¹	CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTC AG	
rP2 ¹	CCCGGGATCCAAGCTTACGGCTACCTTGTTACGAC TT	
pta-ack_Sall_fw	GCAG TCGAC GTACAAAGTATAGGGCATTGA	<i>Sall</i>
pta-ack_Sall_rev	GCAG TCGAC CCCCTTTTCTTCTACTGTAACAT	<i>Sall</i>
pta-ack_EcoRI_fw	GCAG AATT CATGAACATGAAATTGATGG	<i>EcoRI</i>
pta-ack_EcoRI_rev	GCAG AATT CCCCTTTTCTTCTACTGTAACAT	<i>EcoRI</i>
THF_kompl1_fw	GC ACCCCGGGG <u>GGATCC</u> GCTTCACCTTCAACATTAAT TC	<i>SmaI</i> , <u><i>Bam</i>H</u>
THF_kompl1_rev	GCAG GTAC <u>CGGATCC</u> CATCGAAATAGCTCAAGAAT G	<i>KpnI</i> <u><i>Bam</i>H</u>
THF_EcoRI_fw	GCAG AATT CCAGTGCAGCTACATATCCTC	<i>EcoRI</i>
THF_EcoRI_rev	GAATT CCAAGAATGCACAATGAAGGAC	<i>EcoRI</i>
SP2-THF	GAAATACAGGTTCTAATCC	
SP3-THF	CAAGTAGTTGCGCATAAAG	
SP4-THF	GGAGTAATACCCTTTACC	
SP5THF	CCAAGACCTGGCATCTTC	
pta-ack-Zwistk1	CAGGTGCGGTTCATACTAC	
pta-ack-Zwistk2	GTTACAGAGCAAACAATGG	
cbe_Sall_fw	ACAG TCGAC ATGAAAGCAGCATTATGG	<i>Sall</i>
cbe_BamHI_rev	ACAG GATCC TTAAGATTTAGATACAAGTTC	<i>Bam</i> HI

¹ Weisburg *et al.*, 1991

Fortsetzung Tabelle 3: Oligodesoxynukleotide

Oligodesoxynukleotid	Sequenz (5'→3')	Enzym
ptb_PstI_fw	ACACTGCAGGCAGGTCGACGGATCCCTTG	<i>PstI</i>
ptb_rev	TGTCGACACTCCCTTTTACT	
pIMP1_Kontr_fw	CACGTAGTTATTGGGAGGTC	
pIMP1_Kontr_rev	GATGTGCTGCAAGGCG	
pJIR750_Kontr_fw	GTGTGGAATTGTGAGCGG	
pJIR750_Kontr_rev	GCGATTAAGTTGGGTAACGC	

2.4 Zellanzucht

2.4.1 Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

Für die Herstellung von aeroben Medien wurden die Substanzen abgewogen und in demineralisiertem Wasser gelöst. Nach Einstellen des pH-Werts wurden die Medien bei 121 °C, 1,2 bar für mind. 15 min autoklaviert. Für die Herstellung fester Nährmedien wurde dem Medium vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar zugegeben.

Thermolabile Substanzen wurden sterilfiltriert und nach dem Autoklavieren den Medien zugegeben.

Für die Herstellung von anaerobem Medium musste zunächst der gelöste Sauerstoff entfernt werden. Dazu wurde demineralisiertes Wasser für mind. 20 min aufgekocht, unter Begasung mit Stickstoff abgekühlt und anschließend luftdicht verschlossen. Die Medienzusätze wurden in einer Anaerobenkammer zugegeben. Das Medium wurde in Volumina von 5 ml in Schraubdeckelröhrchen (Bellco Glass Inc., Vineland (USA)) mit Butylgummistopfen (Ochs GmbH, Bovenden) und Schraubdeckeln oder in Volumina von 50 ml in 125-ml-Müller & Krempel-Flaschen (Müller & Krempel AG, Bülach (Schweiz)) mit Naturgummistopfen (Maag Technic GmbH, Göppingen) und Edelstahldeckeln gefüllt. Anschließend wurde das Medium bei 121 °C und einem Druck von 1,2 bar für mind. 15 min autoklaviert. Um zu überprüfen, ob sich noch Sauerstoff nach dem Abfüllen im Medium befand, wurde Resazurin vor dem Autoklavieren dem Medium als Redoxindikator zugegeben, welches sich bei Anwesenheit von Sauerstoff pink verfärbte. Für die Herstellung von anaeroben Agarplatten wurden dem Medium in der Anaerobenkammer 1,5 % Agar zugegeben,

anschließend autoklaviert und danach in der Anaerobenkammer in Petrischalen gegossen. Bis zur Verwendung wurden diese im Kühlschrank der Anaerobenkammer bei 4 °C gelagert.

LB-Medium (Sambrook und Russell, 2001)

Trypton	10 g	1,0 % (w/v)
Hefeextrakt	5 g	0,5 % (w/v)
NaCl	10 g	172,0 mM
H ₂ O	ad 1 000 ml	

SOB-Medium („Super Optimal Broth“) (Sambrook und Russell, 2001; mod.)

Trypton	5,00 g	2,0 % (w/v)
Hefeextrakt	1,00 g	0,6 % (w/v)
NaCl	0,14 g	9,6 mM
KCl	0,48 g	25,8 mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,51 g	10,0 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,61 g	9,9 mM
H ₂ O	ad 250 ml	

Die Magnesiumsalze wurden separat gelöst und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurden diese dem Grundmedium zugegeben.

CG-Medium („Clostridial Growth Medium“) (Hartmanis und Gatenbeck, 1984; mod.)

Glucose x H ₂ O	50,00 g	252,3 mM
KH ₂ PO ₄	0,75 g	5,5 mM
K ₂ HPO ₄	0,75 g	4,3 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,00 g	17,5 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,71 g	2,9 mM
MnSO ₄ x H ₂ O	0,01 g	5,9 µM
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,01 g	3,5 µM
NaCl	1,00 g	15,1 µM
Asparagin x H ₂ O	2,25 g	15,0 mM
Hefeextrakt	5,00 g	0,5 % (w/v)
Resazurin	1,00 mg	4,0 µM
H ₂ O	ad 1 000 ml	

Alle Komponenten wurden abgewogen, in der Anaerobenkammer in anaerobem H₂O gelöst, abgefüllt und autoklaviert.

Phosphatlimitiertes Minimalmedium, MES-gepuffert (Bertram *et al.*, 1989; mod.)

Glucose x H ₂ O	40,0 g	201,80 mM
MES	21,3 g	109,10 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0 g	17,50 mM
KH ₂ PO ₄	0,1 g	0,70 mM
NaCl	10,0 mg	0,17 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,1 g	0,40 mM
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	15,0 mg	0,06 mM
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	10,0 mg	0,40 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	10,0 mg	0,07 mM
MnSO ₄ x H ₂ O	15,0 mg	0,09 mM
Thiamin-HCl	2,0 mg	54,00 µM
p-Aminobenzoessäure	2,0 mg	5,90 µM
Biotin	0,1 mg	14,50 µM
Resazurin	1,0 mg	4,00 µM
H ₂ O	ad 1 000 ml	

Die Medienbestandteile wurden in demineralisiertem Wasser gelöst und der pH-Wert mit NaOH auf 7,3 eingestellt. Anschließend wurde das Medium für 20 min gekocht, unter Stickstoffbegasung abgekühlt, luftdicht verschlossen, in der Anaerobenkammer abgefüllt und autoklaviert. Vor Gebrauch wurden zu 1 l Medium 400 µl des Reduktionsmittels Titan(III)-NTA-Lösung zugegeben.

Titan(III)-NTA-Lösung

Zur Herstellung einer 5 M NaOH-Lösung wurden 5 g NaOH in anaerobem Wasser gelöst. Außerdem wurden 4,24 g Na₂CO₃ in 10 ml anaerobem Wasser gelöst, um eine 2 M Na₂CO₃-Lösung zu erhalten. 5,73 g NTA wurden anschließend in 30 ml anaerobem Wasser gelöst und mit der 5 M NaOH-Lösung auf einen pH-Wert von 9,0 eingestellt. Unter ständigem Rühren wurden danach 6,4 ml einer 15 %igen TiCl₃-Lösung und gleichzeitig 10 ml der 2 M Na₂CO₃-Lösung zugegeben. Diese Lösung wurde mit anaerobem Wasser auf ein Endvolumen von 75 ml eingestellt, sterilfiltriert und in einer Müller & Krempel-Flasche dunkel bei 4 °C aufbewahrt.

Sporulationsmedium (Monot *et al.*, 1982; mod.)

CaCO ₃	1 g	11,35 mM
KH ₂ PO ₄	1 g	8,35 mM
K ₂ HPO ₄	1 g	6,52 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g	19,90 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	100 mg	0,46 mM
Resazurin	1 mg	4,00 µM
H ₂ O	ad 880 ml	

Alle Komponenten wurden in der Anaerobenkammer in anaerobem Wasser gelöst und zu je 4,4 ml in Hungate-Röhrchen abgefüllt und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurde zu 10 ml Glucose (20 %) 1 ml einer Butyratlösung (0,1 M) und 1 ml der Vitaminstammlösung gegeben. Von diesem Gemisch wurden jeweils 600 µl zu den 4,4 ml Grundmedium gegeben.

Vitaminstammlösung

NaCl	10 mg	171,0 µM
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	10 mg	41,3 µM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	10 mg	68,0 µM
MnSO ₄ x H ₂ O	15 mg	88,7 µM
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	15 mg	54,0 µM
Thiamin-HCl	2 mg	5,9 µM
p-Aminobenzoessäure	2 mg	14,5 µM
Biotin	100 µg	0,4 µM
H ₂ O	ad 1 000 ml	

Alle Komponenten wurden in anaerobem Wasser gelöst und sterilfiltriert.

Acetobacterium-Medium (für *A. woodii* und *C. aceticum*; ATCC-Medium 1612)

NH ₄ Cl	1,00 g	18,7 mM
KH ₂ PO ₄	0,33 g	2,4 mM
K ₂ HPO ₄	0,45 g	2,6 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,10 g	0,4 mM
Minerallösung 141	20,00 ml	2,0 % (v/v)
Vitaminlösung 141	20,00 ml	2,0 % (v/v)
Hefeextrakt	2,00 g	0,2 % (w/v)
Fructose	10,00 g	55,0 mM
NaHCO ₃	10,00 g	0,1 mM
Cystein-HCl x H ₂ O	0,50 g	2,8 mM
Na ₂ S x 9 H ₂ O	0,50 g	2,1 mM
H ₂ O	ad 1 000 ml	

Alle Komponenten, außer die Fructose, wurden eingewogen, in H₂O gelöst und in Müller & Krempel-Flaschen bzw. Hungate-Röhrchen abgefüllt. Anschließend wurde der pH-Wert des Mediums durch Begasung mit 80 % N₂ und 20 % CO₂ auf 7,4 eingestellt und anaerobisiert. Nach dem Autoklavieren wurden 25 ml/l einer 5 %igen Na₂CO₃-Lösung zugegeben. Für heterotrophes Wachstum der Kulturen wurde eine sterile Fructoselösung mit einer Endkonzentration von 1 % zugegeben. Für das Wachstum auf CO₂/H₂ wurde eine Gasatmosphäre von 67 % H₂ und 33 % CO₂ verwendet.

Minerallösung 141

Nitrilotriessigsäure	1,50 g	10,50 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	3,00 g	12,00 mM
MnSO ₄ x H ₂ O	0,50 g	3,00 mM
NaCl	1,00 g	17,00 mM
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,10 g	0,35 mM
CoSO ₄ x 7 H ₂ O	0,10 g	0,50 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,10 g	0,75 mM
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,10 g	0,40 mM
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,01 g	0,04 mM
KAl(SO ₄) ₂ x 12 H ₂ O	0,01 g	0,02 mM
H ₃ BO ₃	0,01 g	0,16 mM
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,01 g	0,04 mM
H ₂ O	ad 1 000 ml	

Die Nitrilotriessigsäure wurde durch Einstellen des pH-Werts mit KOH auf 6,5 in 500 ml Wasser gelöst. Anschließend wurden die anderen Komponenten zugefügt und mit H₂O auf einen Liter aufgefüllt.

Vitaminlösung 141

Biotin (Vitamin H)	2,0 mg	8,0 µM
Folsäure (Vitamin B ₉)	2,0 mg	4,5 µM
Pyridoxin-HCl (Vitamin B ₆)	10,0 mg	49,0 µM
Thiamin-HCl (Vitamin B ₁)	5,0 mg	15,0 µM
Riboflavin (Vitamin B ₂)	5,0 mg	13,0 µM
Nicotinsäureamid (Vitamin PP)	5,0 mg	41,0 µM
D-Calcium-Pantothenat	5,0 mg	10,5 µM
Cyanocobalamin (Vitamin B ₁₂)	0,1 mg	74,0 µM
p-Aminobenzoessäure	5,0 mg	36,0 µM
Liponsäure	5,0 mg	24,0 µM
H ₂ O	ad 1 000 ml	

Acetone-ma-Medium (für *C. mayombei*, DSMZ-Medium 515)

K ₂ HPO ₄	0,35 g	2,00 mM
KH ₂ PO ₄	0,23 g	1,70 mM
NH ₄ Cl	0,50 g	9,30 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,50 g	2,00 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,25 g	1,70 mM
NaCl	2,25 g	38,50 mM
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	2,00 mg	13,00 µM
Vitaminlösung 141	10,00 ml	1,00 % (v/v)
Minerallösung SL-10	1,00 ml	0,10 % (v/v)
NaHSeO ₃	0,02 mg	0,10 µM
Hefeextrakt	2,00 g	0,20 % (w/v)
Casiton	2,00 g	0,20 % (w/v)
Glucose	2,00 g	11,10 mM
NaHCO ₃	4,00 g	47,61 mM
Resazurin	1,00 mg	4,00 µM
Dithiothreit	0,15 g	1,00 mM
H ₂ O	ad 1 000 ml	

Alle Komponenten, bis auf das Bicarbonat und die Phosphate, wurden in Wasser gelöst und unter Begasung mit 80 % N₂ und 20 % CO₂ anaerobisiert. Die Phosphate und das Bicarbonat wurden dem Medium steril nach dem Autoklavieren zugegeben und der pH-Wert des Mediums auf 7,0 eingestellt.

Minerallösung SL-10

HCl (25 %; 7,7 M)	10,0 ml	0,10 % (v/v)
FeCl ₂ x 4 H ₂ O	1,5 g	7,50 mM
ZnCl ₂	70,0 mg	0,50 mM
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	100,0 mg	0,50 mM
H ₃ BO ₃	6,0 mg	0,10 mM
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	190,0 mg	0,90 mM
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	2,0 mg	0,07 mM
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	24,0 mg	0,10 mM
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	36,0 mg	0,15 mM
H ₂ O	ad 990 ml	

Das FeCl₂ wurde in HCl gelöst und mit Wasser verdünnt. Anschließend wurden alle anderen Komponenten zugegeben.

Chopped Meat Medium (für *B. coccooides*, DSMZ-Medium 78, mod.)

Cooked Meat (Medium Oxoid CM)	500 g	50,0 % (w/v)
Glucose	4 g	22,0 mM
Cellobiose	1 g	2,9 mM
Maltose	1 g	2,9 mM
lösliche Stärke	1 g	6,0 mM
H ₂ O	ad 1 000 ml	

Alle Komponenten wurden in Wasser gelöst, gekocht, unter Stickstoffbegasung abgekühlt, luftdicht verschlossen und in der Anaerobenkammer abgefüllt. Nach dem Autoklavieren wurden steril 0,5 g/l Cystein zugeben und der pH-Wert auf 7,0 eingestellt.

***Clostridium ljungdahlii*-Medium (DSMZ-Medium 879)**

NH ₄ Cl	1,00 g	19,0 mM
KCl	0,10 g	1,35 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,20 g	0,80 mM
NaCl	0,80 g	14,00 mM
KH ₂ PO ₄	0,10 g	0,70 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,02 g	0,15 mM
Hefeextrakt	1,00 g	0,10 % (w/v)
Minerallösung 141	10,00 ml	1,00 % (v/v)
Na ₂ WO ₄ x 2 H ₂ O	0,20 mg	0,60 µM
Vitaminlösung 141	10,00 ml	1,00 % (v/v)
NaHCO ₃	1,00 g	11,90 mM
Fructose	5,00 g	27,75 mM
H ₂ O	ad 1 000 ml	

Es wurden alle Komponenten, bis auf die Fructose, in Wasser gelöst, für 20 min gekocht, unter N₂-Begasung abgekühlt, luftdicht verschlossen und in der Anaerobenkammer abgefüllt. Nach dem Autoklavieren wurde dem Medium steril Fructose zugegeben. Außerdem wurde der pH-Wert des Mediums mit Hilfe der Reduktionsmittel auf 7,4 eingestellt.

Reduktionsmittel**Cystein-HCl-Stammlösung**

Cystein-HCl x H ₂ O	4 g	228 mM
H ₂ O	ad 100 ml	

Cystein-HCl x H₂O wurde in anaerobem Wasser gelöst und autoklaviert.

Natriumsulfid/Cystein-HCl-Stammlösung

Cystein-HCl x H ₂ O	4,0 g	228,0 mM
Na ₂ S x 9 H ₂ O	4,0 g	166,5 mM
NaOH	0,9 g	22,5 mM
H ₂ O	ad 100 ml	

NaOH wurde in anaerobem Wasser gelöst. Zuerst wurde Cystein-HCl x H₂O, dann Na₂S x 9 H₂O zugegeben und gelöst. Diese Lösung wurde anschließend autoklaviert.

PYX-Medium (für *C. drakei*, DSMZ-Medium 104b)

Trypticase Pepton	5,0 g	0,5 % (w/v)
Pepton vom Fleisch	5,0 g	0,5 % (w/v)
Hefeextrakt	10,0 g	1,0 % (w/v)
Glucose	5,0 g	27,8 mM
Salzlösung 104	40,0 ml	4,0 % (v/v)
Cystein-HCl x H ₂ O	0,5 g	3,0 mM
Resazurin	1,0 mg	4,0 µM
H ₂ O	ad 1 000 ml	

Es wurden alle Komponenten in Wasser gelöst, aufgekocht und durch Abkühlen unter N₂-Begasung anaerobisiert und in der Anaerobenkammer abgefüllt. Nach dem Autoklavieren wurde der pH-Wert des Mediums steril mit Cystein-HCl auf 7,0 eingestellt.

Salzlösung 104

CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,25 g	1,7 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,50 g	2,0 mM
K ₂ HPO ₄	1,00 g	5,7 mM
KH ₂ PO ₄	1,00 g	7,4 mM
NaHCO ₃	10,00 g	119,0 mM
NaCl	2,00 g	34,2 mM
H ₂ O	ad 1 000 ml	

Rumen Bacteria-Medium (für *B. fibrisolvens*, DSMZ-Medium 330)

Minerallösung	38,00 ml	3,80 % (v/v)
K ₂ HPO ₄	0,30 g	1,70 mM
Trypticase Pepton (BBL)	2,00 g	0,20 % (w/v)
Hefeextrakt	0,50 g	0,05 % (w/v)
Fettsäurelösung	3,10 ml	0,31 % (v/v)
Haemin	1,00 mg	15,0 µM
Glucose	0,50 g	2,80 mM
Maltose	0,50 g	1,50 mM
Cellobiose	0,50 g	1,50 mM
lösliche Stärke	0,50 g	3,10 mM
Glycerin	0,50 g	5,40 mM
Na ₂ CO ₃	4,00 g	37,8 mM
Cystein-HCl x H ₂ O	0,25 g	1,50 mM
Na ₂ S x 9 H ₂ O	0,25 g	1,00 mM
H ₂ O	ad 960 ml	

Alle Komponenten, außer die Kohlenhydrate, Na₂CO₃, Cystein-HCl und Na₂S x 9 H₂O, wurden in Wasser gelöst, gekocht, anschließend unter N₂-Begasung abgekühlt, luftdicht verschlossen und das Medium in der Anaerobenkammer abgefüllt. Nach dem Autoklavieren wurde der pH-Wert mit Na₂CO₃ auf 6,8 eingestellt und die anderen Komponenten dem Medium steril zugegeben.

Minerallösung

KH ₂ PO ₄	6,0 g	44,1 mM
NaCl	12,0 g	205,0 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	6,0 g	45,5 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1,6 g	11,0 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	2,5 g	10,1 mM
H ₂ O	ad 1 000 ml	

Fettsäurelösung

Essigsäure	4,25 ml	0,42 % (v/v)
Propionsäure	1,50 ml	0,15 % (v/v)
Buttersäure	1,00 ml	0,10 % (v/v)
n-Valeriansäure	0,25 ml	0,02 % (v/v)
iso-Buttersäure	0,25 ml	0,02 % (v/v)
DL-2-Methyl-Buttersäure	0,25 ml	0,02 % (v/v)
iso-Valeriansäure	0,25 ml	0,02 % (v/v)
H ₂ O	ad 1 000 ml	

Wilkins-Chalgren-Medium (für *B. producta* und *B. carboxidivorans*, DSMZ-Medium 339)

Wilkins-Chalgren (Oxoid Cm 643)	33 g	3,3 % (w/v)
NaHCO ₃	1 g	12,0 mM
Resazurin	1 mg	4,0 µM
H ₂ O	ad 1 000 ml	

Es wurden alle Komponenten in Wasser gelöst, der pH-Wert auf 5,6 eingestellt, das Medium für 20 min gekocht, unter N₂-Begasung abgekühlt und luftdicht verschlossen. Anschließend wurde das Medium in der Anaerobenkammer abgefüllt und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurden 10 ml/l der Natriumsulfid/Cystein-HCl-Lösung (siehe oben) zugegeben.

2.4.2 Medienzusätze

In Tabelle 4 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Medienzusätze und deren jeweilige Lösungsmittel aufgelistet. Alle Antibiotika wurden als 1.000-fach konzentrierte Stammlösungen hergestellt und dem abgekühlten Medium in den entsprechenden Konzentrationen zugegeben.

Alle Medienzusätze wurden sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert. Lichtempfindliche Medienzusätze wurden im Dunkeln aufbewahrt.

Tabelle 4: Medienzusätze

Medienzusatz	Lösungsmittel	Stammkonzentration	Endkonzentration
		(mg/ml)	(µg/ml)
IPTG	H ₂ O	30	30
X-Gal ¹	Dimethylformamid	20	20
Ampicillin	H ₂ O	100	100
Chloramphenicol	96 % Ethanol	30	30
Thiamphenicol ¹	Dimethylformamid	20	15
Clarithromycin ²	H ₂ O	5	2,5-5
Spectinomycin	H ₂ O	50	50

¹ lichtempfindlich

² Clarithromycin wurde in 20 ml Wasser gegeben, mit 2 M HCl auf einen pH-Wert von ca. 2,6 titriert, um eine Löslichkeit des Clarythromycin zu erreichen. Anschließend wurde der pH-Wert mit 2 M NaOH auf 6,5-7 eingestellt.

2.4.3 Kultivierungsbedingungen

Die Anzucht von aeroben Kulturen erfolgte bis zu einem Volumen von 5 ml in Reagenzgläsern. Bei größerem Volumen wurden Erlenmeyerkolben mit Schikanen verwendet. Um eine optimale Versorgung der Kulturen mit Sauerstoff zu gewährleisten, erfolgte die Inkubation auf Rundschüttlern. Das Wachstum von *E. coli* in flüssigen Kulturen erfolgte bei 37 °C und 150 Upm, auf Agarplatten erfolgte die Inkubation im Brutschrank.

Die Anzucht von anaeroben Kulturen erfolgte bei einem Volumen bis 5 ml in Hungate-Röhrchen (Bellco Glass Inc., Vineland (USA)) mit Butylgummistopfen (Ochs GmbH, Bovenden) und Schraubdeckeln. Bei größeren Volumina wurden Müller & Krempel-Flaschen (Müller & Krempel AG, Bülach (Schweiz)) mit Naturgummistopfen (Maag Technic GmbH, Göppingen) und Edelstahlschraubkappen verwendet.

Die Inkubation von *C. acetobutylicum*, *C. ljungdahlii*, *C. carboxidivorans*, *B. fibrisolvens*, *B. producta* und *B. coccoides* erfolgte stehend bei 37 °C im Brutschrank.

Bei *C. aceticum*, *A. woodii*, *C. drakei* und *C. mayombeii* liegt die optimale Wachstumstemperatur bei 30 °C. Die Inkubation aller Stämme auf anaeroben Agarplatten erfolgte in einem Brutschrank in der Anaerobenkammer.

2.4.4 Stammhaltung

2.4.4.1 Stammhaltung von *Escherichia coli*

Zur Stammhaltung von *E. coli* wurden Glycerinkulturen verwendet (Gherna, 1994). Hierfür wurden 500 µl einer über Nacht gewachsenen Kultur in 500 µl steriles, 50 %iges (v/v) Glycerin in 2-ml-Schraubdeckelröhrchen gegeben und bei -80 °C aufbewahrt.

2.4.4.2 Stammhaltung von Clostridien, Acetobakterien, *Blautia coccoides*, *Blautia producta* und *Butyrivibrio fibrisolvens*

Zur Stammhaltung von *C. acetobutylicum* wurden Sporensuspensionen hergestellt. Hierzu wurden 500 µl einer über Nacht gewachsenen Kultur in Sporulationsmedium überführt. Diese Kultur wurde über 3-6 Tage inkubiert und die Sporenbildung unter dem Mikroskop beobachtet. Nach guter Sporenbildung wurde die Kultur sedimentiert, das Sediment in 500 µl frischem CG-Medium suspendiert und in 2-ml-Schraubdeckelröhrchen aerob bei -20 °C aufbewahrt.

Für alle anderen anaeroben Stämme wurden Glycerinkulturen angelegt. Hierfür wurden 10 ml einer Zweitageskultur anaerob sedimentiert, das Sediment in 500 µl frischem Medium suspendiert und 500 µl steriles, anaerobes 50 %iges (v/v) Glycerin zugegeben. Die Stammkulturen wurden anaerob in Hungate-Röhrchen bei -80 °C aufbewahrt.

2.5 Bestimmung von Wachstums- und Stoffwechselfparametern

2.5.1 Bestimmung der optischen Dichte

Die Bestimmung der optischen Dichte (OD) erfolgte in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 600 nm. Für die Messung wurde jeweils 1 ml der Bakterienkultur in 1-ml-Halbmikroküvetten (VWR Internatioanl GmbH, Darmstadt) gegeben, um den Wachstumsverlauf einer Kultur beobachten zu können. Um die

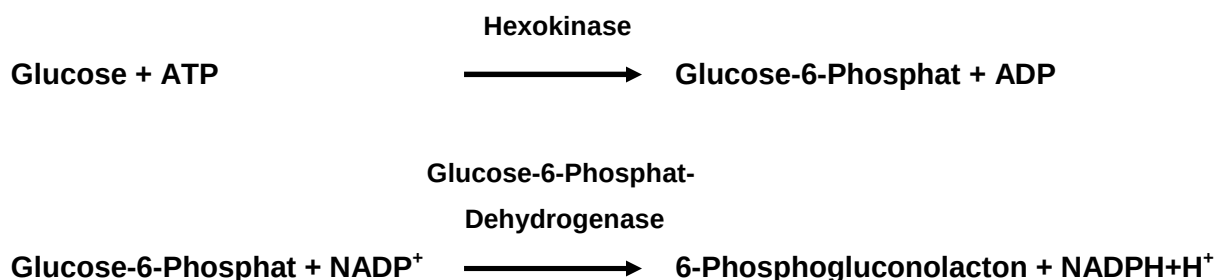
Linearität der Messwerte zu gewährleisten, wurden die Proben ab einer OD_{600} von 0,3 mit dem jeweiligen Medium verdünnt. Als Leerwert diente das entsprechende Medium.

2.5.2 Bestimmung des pH-Werts

Um den pH-Wert einer Bakterienkultur zu bestimmen, wurden rund 2 ml Kultur zentrifugiert, der Überstand in ein Reagenzglas überführt und mit Hilfe eines pH-Messgerätes der pH-Wert bestimmt.

2.5.3 Glucosebestimmung

Die Bestimmung der Glucosekonzentration erfolgte über eine gekoppelte Enzymreaktion (Bergmeyer, 1974; mod.). Hierbei werden Glucose und ATP mittels der Hexokinase zu Glucose-6-Phosphat und ADP umgesetzt. Anschließend wird Glucose-6-Phosphat zusammen mit $NADP^+$ über die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase zu 6-Phosphogluconolacton und $NADPH+H^+$ umgesetzt. Das gebildete $NADPH+H^+$, welches äquivalent zur vorhandenen Glucose ist, wurde photometrisch bei 365 nm gemessen.



Zusammensetzung für die Bestimmung der Glucosekonzentration:

Tris-HCl (0,4 M); MgSO ₄ (0,004 M); pH 7,6	500 µl
NADP ⁺ (44 mg/10 ml)	100 µl
ATP (96 mg/10 ml)	100 µl
H ₂ O	200 µl
Probe	100 µl

Es wurden 1 ml Probe bei 10.000 g für 10 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5-ml-Eppendorfgefäß überführt. Die Probe wurde entsprechend der erwarteten Konzentration verdünnt, dem Reaktionsgemisch zugeben und im Photometer bei 365 nm gemessen (E_1). Durch die Zugabe von 10 µl Hexokinase/Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (3 mg/ml) wurde die Reaktion gestartet. Der Ansatz wurde gemischt und die Extinktion nach einer Inkubation von 10 min erneut im Photometer bei 365 nm bestimmt. (E_2). Dieser Extinktionswert ($E_2 - E_1$) entspricht dem gebildeten NADPH+H⁺, mit welchem mit folgender Formel die Glucosekonzentration ermittelt werden kann.

$$c(\text{Glucose}) = \frac{V_{\text{ges}} \times \Delta E}{\epsilon \times d \times V_{\text{Probe}}}$$

$$V_{\text{ges}} = 1,01 \text{ ml}$$

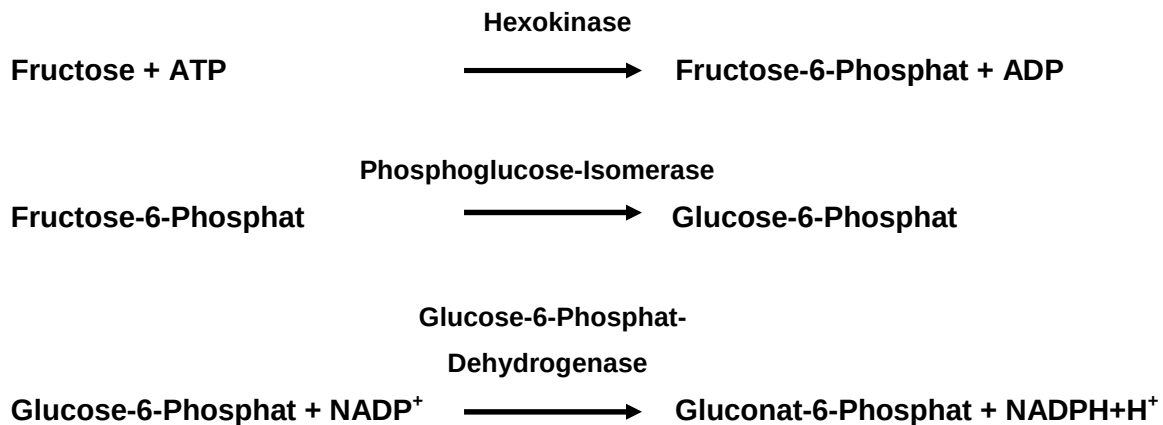
$$\Delta E = E_2 - E_1$$

$$d = 1 \text{ cm}$$

$$\epsilon = 3,4 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$$

2.5.4 Fructosebestimmung

Die Bestimmung der Fructosekonzentration erfolgte über eine gekoppelte Enzymreaktion. Hierfür wurde der „Testkit“ für die D-Glucose/D-Fructose-Bestimmung von r-biopharm (Mannheim) verwendet. Im ersten Schritt der Reaktion wird D-Fructose mittels der Hexokinase und ATP zu D-Fructose-6-Phosphat unter der gleichzeitigen Bildung von ADP phosphoryliert. Fructose-6-Phosphat wird durch die Phosphoglucose-Isomerase zu Glucose-6-Phosphat umgewandelt. Dieses wird mit NADP^+ mittels der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase zu D-Gluconat-6-Phosphat und $\text{NADPH} + \text{H}^+$ umgesetzt. Die während der Reaktion gebildete Menge an $\text{NADPH} + \text{H}^+$ ist äquivalent der Fructosekonzentration.



Zusammensetzung für die Bestimmung der Fructosekonzentration:

	<u>Leerwert</u>	<u>Probe</u>
Lösung 1	500 μl	500 μl
Probe	-	50 μl
H_2O	1000 μl	950 μl
Lösung 2	10 μl	10 μl

Es wurde 1 ml der Probe für 10 min bei 10.000 g zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5-ml-Eppendorfgefäß überführt. Die Probe wurde vor dem Test entsprechend der erwarteten Konzentration mit H_2O verdünnt. Alle Komponenten wurden gut durchmischt und für 10-15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die

Extinktion bei 340 nm bestimmt (E_1). Jedem Ansatz wurden 10 μ l der Lösung 3 zugeben, erneut gemischt, 10-15 min bei RT inkubiert und ein weiteres Mal die Extinktion bei 340 nm bestimmt (E_2). Die Differenz der ermittelten Extinktionswerte ($E_2 - E_1$) entspricht der gebildeten Menge an $\text{NADPH} + \text{H}^+$, welche äquivalent zur Fructosekonzentration ist. Diese kann mit folgender Formel bestimmt werden.

$$c(\text{Fructose}) = \frac{V_{\text{ges}} \times \text{MG}}{\varepsilon \times d \times V_{\text{Probe}} \times 1000} \times \Delta E [\text{g l}^{-1}]$$

$$V_{\text{ges}} = 1,52 \text{ ml}$$

$$\text{MG} = \text{Molekulargewicht der Fructose (180,16 g x mol}^{-1}\text{)}$$

$$\Delta E = E_2 - E_1$$

$$d = 1 \text{ cm}$$

$$\varepsilon = 6,3 \text{ l x mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

2.5.5 Gaschromatographische Analysen

Zur Quantifizierung und Analyse von Alkoholen und Säuren wurde der Gaschromatograph „Clarus 600“ (PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau) mit Flammenionisationsdetektor verwendet. Die hier verwendete Säule erlaubt die Detektion der Säuren Acetat und Butyrat und der Lösungsmittel Ethanol, Aceton, Butanol, 2,3-Butandiol und Acetoin. Hierfür wurde mind. 1 ml einer Bakterienkultur für 10 min bei 10.000 g zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5-ml-Eppendorfgefäß überführt. Die Probe wurde so verdünnt, dass eine Konzentration von 5 mM der erwartenden Mengen an Alkoholen bzw. Säuren nicht überschritten wurde. Für die Messung wurde 1 ml der Probe oder eine entsprechende Verdünnung und 100 μ l eines Internen Standards (110 mM Isobutanol in 2 M HCl) in ein Rollrandgefäß (Chromatographie Service GmbH, Langerwehe) gegeben und dieses mittels einer Bördelkappe (Chromatographie Service GmbH, Langerwehe) gasdicht verschlossen. Die Probenahme von 1 μ l erfolgte über einen automatisierten Probengeber mittels einer Hamilton-Spritze (Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz (Schweiz)). Die Analyse der Substanzen unterlag folgenden Bedingungen:

Säule:	Glas, gepackt (iØ 2 mm x 2 m)
Säulenpackung:	Chromosorb 101 (80/100 mesh)
Trärgas:	N ₂ (33,5 ml min ⁻¹)
Injektortemperatur:	200 °C
Detektortemperatur:	FID, 300 °C
Temperaturprofil:	130 °C für 1 min von 130 °C auf 200 °C in 4 °C min ⁻¹ 200 °C für 3 min

Die Auswertung erfolgte mittels der Computersoftware „TotalChrom Version 6.3.1“ (PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau). Für die Quantifizierung der Substanzen erfolgten Kalibrierläufe, welche je 5 mM der einzelnen Substanzen und 10 mM des Internen Standards enthielten.

2.5.6 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High-performance liquid chromatography (HPLC))

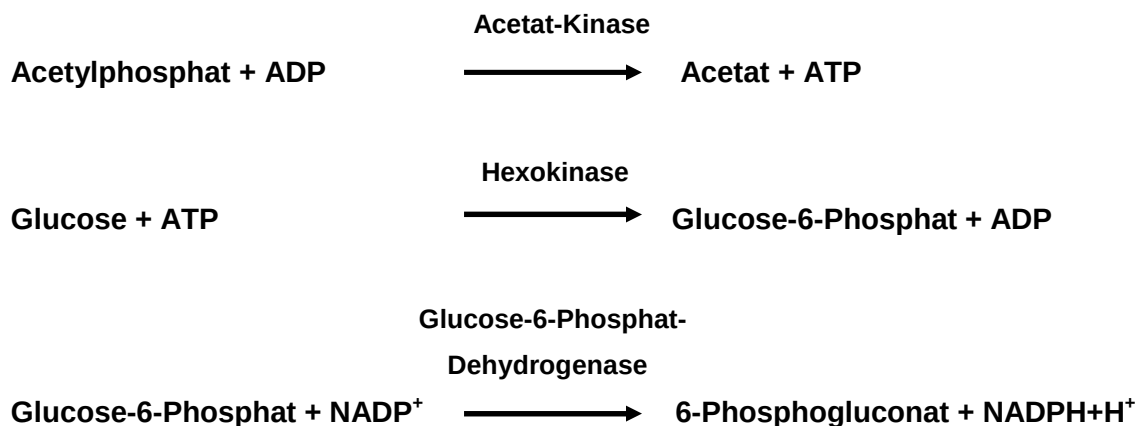
Zur Quantifizierung von Säuren, Alkoholen und der Glucosekonzentration wurde die HPLC „Infinity 1260“ mit RID und DAD Detektor (Agilent Technologies, Waldbronn) verwendet. Hierfür wurde 1 ml einer Bakterienkultur für 10 min bei 10.000 g zentrifugiert und der Überstand für die Analyse verwendet. Für die Messung wurden 0,5 ml der Probe oder eine entsprechende Verdünnung in ein Rollrandgefäß (Chromatographie Service GmbH, Langerwehe) gegeben und dieses mittels einer Bördelecke (Chromatographie Service GmbH, Langerwehe) verschlossen. Die Analyse der Substanzen unterlag folgenden Bedingungen:

Vorsäule:	CS-Organic-Acid Vorsäule
Säule:	CS-Organic-Acid Säule, Länge 300 mm, Ø 8 mm, Säulentemperatur 40 °C, Füllung: PVBS
Injektionsvolumen:	20 µl bei 15 °C, Autosampler
Flussmittel:	5 mM H ₂ SO ₄
Fluss:	0,6 ml min ⁻¹
Detektoren:	RID, 40 °C, für Detektion der Lösungsmittel und der Zucker; DAD/UV für Detektion der Säuren bei 210 nm

Die Auswertung erfolgte mittels der Computersoftware „Agilent OPEN-Lab CDS (ChemStation Edition) Version A.01.03“ (Agilent Technologies, Waldbronn). Für die Quantifizierung der Substanzen erfolgten Kalibrierläufe, welche je 0,5 mM, 1 mM, 10 mM und 100 mM der einzelnen Substanzen enthielten.

2.5.7 Bestimmung der Acetat-Kinase-Aktivität

Die Bestimmung der Acetat-Kinase-Aktivität erfolgte mit einem modifizierten Protokoll nach Nakajima *et al.* (1978). Der Test macht sich zu nutze, dass Acetylphosphat durch die Acetat-Kinase zu Acetat umgewandelt wird. Dabei wird ADP zu ATP phosphoryliert. Die Hexokinase phosphoryliert mit dem ATP die Glucose zu Glucose-6-Phosphat. Die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase oxidiert das Glucose-6-Phosphat zu 6-Phosphogluconat, wobei NADP^+ zu $\text{NADPH} + \text{H}^+$ reduziert wird. Die Extinktion der gebildeten Menge an $\text{NADPH} + \text{H}^+$ wird bei 340 nm im Photometer bestimmt.



Für die Bestimmung der Acetat-Kinase-Aktivität wurden 200 ml Medium mit einer über Nacht gewachsenen Kultur inokuliert und über Nacht bis zu einer OD_{600} von 1,2-1,5 inkubiert. Anschließend erfolgte die Ernte der Zellen bei 5.000 g für 10 min bei 4 °C. Das Sediment wurde zweimal mit Testpuffer gewaschen und in 1 ml Testpuffer aufgenommen. Dieser Ansatz wurde in ein 2,5-ml-Schraubdeckelröhrchen mit 250 mg „glass beads“ (0,1 mm, Carl Roth, Karlsruhe) überführt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte fünfmal mit dem „RiboLyser“ für 30 s auf Stufe 6,5, wobei zwischen jedem Schritt eine Inkubation auf Eis für 5 min durchgeführt wurde. Die

Sedimentierung der Zelltrümmer erfolgte bei 8.000 g für 10 min bei 4 °C, der Überstand wurde in ein neues 1,5-ml-Eppendorfgefäß überführt. Für die Messung der Acetat-Kinase-Aktivität wurde der Überstand 1:100 mit Testpuffer verdünnt.

Testpuffer

Tris-HCl; pH 7,2	12,10 g	0,1 M
MgCl ₂ x 7 H ₂ O	1,02 g	5,0 mM
H ₂ O	ad 1 000 ml	

Reaktionsmix

Stammlösungen wurden immer frisch in Testpuffer hergestellt.

<u>Komponente</u>	<u>Endkonzentration</u>	<u>Stammlösung</u>	<u>Zugabe</u>
Testpuffer			10 ml
NADP ⁺	0,5 mM	20 mM	250 µl
ADP	3,0 mM	100 mM	303 µl
Glucose	2,0 mM	40 % (2,2 M)	10 µl

Im Folgenden ist ein Reaktionsansatz aufgezeigt:

Reaktionsmix	850 µl
Hexokinase/Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (3 mg ml ⁻¹)	10 µl
Rohextrakt der Probe (1:100 verdünnt)	50 µl

Alle Komponenten wurden in eine Küvette gegeben und es folgte ein „AutoZero“ des Photometers. Durch die Zugabe von 100 µl Acetyl-CoA (50 mM; Endkonzentration im Test 5 mM) wurde die Reaktion gestartet. Es wurde die Extinktionszunahme bei 340 nm bis zu einer Extinktion von 0,7-0,8 gemessen und $\Delta E \text{ min}^{-1}$ bestimmt.

Aufgrund der ermittelten $\Delta E \text{ min}^{-1}$ kann die enzymatische Aktivität (U) wie folgt berechnet werden:

$$\text{enzymatische Aktivität (U)} = \frac{\Delta E \text{ min}^{-1} \times V_{\text{ges}} \times \text{Verdünnung}}{\epsilon \times d \times V_{\text{Probe}}}$$

$\Delta E \text{ min}^{-1}$ = Änderung der Extinktion pro Minute

$V_{\text{ges}} = 1 \text{ ml}$

$\epsilon = 6,3 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

$d = 1 \text{ cm}$

$V_{\text{Probe}} = 0,05 \text{ ml}$

Für die Bestimmung der spezifischen Aktivität (U mg^{-1}) wurde die Proteinkonzentration (2.5.8) des Rohextraktes bestimmt und wie folgt berechnet:

$$\text{spezifische Aktivität (U mg}^{-1}\text{)} = \frac{\Delta E \text{ min}^{-1} \times V_{\text{ges}} \times \text{Verdünnung}}{\epsilon \times d \times V_{\text{Probe}} \times \text{Proteinkonzentration}}$$

2.5.8 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem „BCATM Protein Assay Kit“ (Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn). Hierbei erfolgt die Quantifizierung des Gesamtproteins über colorimetrische Messungen, wobei zweiwertige Kupferionen durch das Protein zu einwertigen Kupferionen reduziert werden (Lowry *et al.*, 1951), welche mit Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Farbstoff ausbilden (Smith *et al.*, 1985). Dieser kann bei einer Wellenlänge von 562 nm bestimmt werden.

Zur Messung der Proteinkonzentrationen wurde eine Kalibrierreihe von 2.000-0 $\mu\text{g/ml}$ BSA erstellt und je 25 μl in eine 96-„well“-Platte (Labware Ltd., Weinheim) pipettiert. Der zu messende Rohextrakt wurde entsprechend mit H_2O verdünnt, und es wurden ebenfalls 25 μl in die 96-„well“-Platte pipettiert. Anschließend wurden zu jedem Ansatz 200 μl einer BCATM-Reagenz-A/B-Mischung (50:1) zugegeben. Die Platte

wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert und mittels des Mikroplatten-Lesegeräts ANTHOS HTIII bei 562 nm ausgewertet.

2.6 Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.6.1 Behandlung von Geräten und Lösungen

Vor den Arbeiten mit DNA wurden die verwendeten Lösungen und hitzestabilen Geräte bei 121 °C und einem Druck von 1,2 bar autoklaviert. Dadurch wurden Nukleasen inaktiviert und Kontaminationen verhindert. Bei hitzeinstabilen Lösungen erfolgte eine Sterilfiltration.

Vor den Arbeiten mit RNA wurden die Lösungen und Geräte zweimal autoklaviert. Alle verwendeten Lösungen wurden mit DEPC-Wasser angesetzt. Durch DEPC-Wasser werden RNasen, welche die RNA abbauen, inaktiviert. Zur Herstellung von DEPC-Wasser wurde dem demineralisierten Wasser 1/200 Volumen DEPC zugegeben und gelöst. Anschließend wurde das DEPC-Wasser autoklaviert. Um die RNasen von den Arbeitsflächen und Arbeitsmaterialien zu entfernen, wurden diese mit 1 %iger (w/v) SDS-Lösung und 1 %iger (w/v) NaOH-Lösung bzw. RNase-AWAY (Molecular Bioproducts Inc., San Diego (USA)) behandelt. Da sich auf der Haut ebenfalls RNasen befinden, wurden bei den Arbeiten mit RNA stets Einweghandschuhe getragen.

2.6.2 Isolierung von Nukleinsäuren

2.6.2.1 Isolierung chromosomaler DNA aus *C. aceticum*, *A. woodii* und *C. ljungdahlii*

Für die Isolierung von chromosomaler DNA wurden 5 ml einer Bakterienkultur für 15 min bei 4 °C und 6.000 g sedimentiert. Das Sediment wurde mit 1 ml Kaliumphosphatpuffer (10 mM; pH 7,5) gewaschen. Anschließend wurde das Sediment in 400 µl STE-Puffer suspendiert. Es folgten die Zugabe von 60 µl Lysozym (20 mg/ml (w/v)) und eine Inkubation über 30 min bei 37 °C. Danach wurden 56 µl einer 10 %igen SDS-Lösung zugeben und die Proben für 10 min bei

37 °C inkubiert. Darauf folgte die Zugabe von 48 µl einer EDTA-Lösung (0,5 M) und 20 µl einer Tris-HCl-Lösung (1 M; pH 7,5). Nach vorsichtigem Mischen wurden 20 µl RNase (20 mg/ml, Fermentas GmbH, St. Leon Rot) zugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach dem Hinzufügen von 20 µl einer Proteinase K-Lösung (20 mg/ml (w/v)) erfolgte eine Inkubation von 1-3 h bei 37 °C. Anschließend wurden 120 µl einer Natrium-Perchlorat-Lösung (5 M) zugeben, gemischt und eine Phenol-Chloroform-Extraktion (2.6.3.1) durchgeführt. Die Fällung der DNA erfolgte durch eine Isopropanolfällung (2.6.3.3). Die DNA wurde durch Zentrifugation sedimentiert, mit 70 %igem Ethanol gewaschen und anschließend in sterilem H₂O aufgenommen und bei 4 °C aufbewahrt.

STE-Puffer

Tris-HCl (1 M; pH 7,5)	5,0 ml	50 mM
EDTA	38,0 mg	1 mM
Saccharose	6,9 g	200 mM
H ₂ O	ad 100 ml	

2.6.2.2 Isolierung chromosomaler DNA aus *C. acetobutylicum*

Für die Isolierung von chromosomaler DNA aus *C. acetobutylicum* wurde nach einem modifizierten Protokoll von Bertram und Dürre (1989) verfahren. Hierfür wurden 5 ml einer über Nacht in CG-Medium-gewachsenen Bakterienkultur bei 4.300 g für 10 min und 4 °C zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 1 ml Kaliumphosphatpuffer (10 mM; pH 7,5) gewaschen (4.300 g, 10 min, 4 °C) und erneut in 0,5 ml Kaliumphosphatpuffer aufgenommen. Es wurden 50 µl Lysozym (20 mg/ml (w/v)) und 5 µl RNase (20 mg/ml, Fermentas GmbH, St. Leon Rot) zugeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 50 µl Proteinase K (20 mg/ml) und 30 µl einer 10 %igen SDS-Lösung zugegeben und eine weitere Stunde bei 55 °C inkubiert. An diese Inkubationszeit schloss sich eine Phenol-Chloroform-Extraktion (2.6.3.1) und eine Ethanol-fällung (2.6.3.2) an. Das DNA-Sediment wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen und in einer Vakuumzentrifuge (2.6.3.4) getrocknet. Anschließend wurde die DNA in sterilem H₂O aufgenommen und bei 4 °C aufbewahrt.

2.6.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *C. aceticum*, *A. woodii* und *C. ljungdahlii*

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *C. aceticum*, *A. woodii* und *C. ljungdahlii* wurde nach einem modifizierten Protokoll von Eikmanns *et al.* (1994) vorgegangen. Hierzu wurden 5 ml einer Dreitages-Kultur für 10 min bei 4.500 g zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 1 ml TE-Puffer (10 mM Tris-HCl; pH 7,5; 1 mM EDTA) gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das Sediment in 200 µl Lösung A mit 15 mg/ml Lysozym und 1 µl RNase (20 mg/ml, Fermentas GmbH, ST. Leon Rot) gelöst und schüttelnd bei 37 °C für 20 min inkubiert. Es wurden 400 µl Lösung B zugegeben und so lange gemischt, bis die Lösung klar wurde. Daraufhin wurden 350 µl Lösung C zugeben und gemischt, bis eine Flockenbildung zu beobachten war. Es wurde für 5 min und 10.000 g zentrifugiert und mit dem Überstand eine Säulenaufreinigung (2.6.2.4) durchgeführt.

Lösung A

Glucose x H ₂ O	1,0 g	50 mM
Tris-HCl; pH 8	0,3 g	25 mM
EDTA Na-Salz x 2 H ₂ O	0,4 g	10 mM
H ₂ O	ad 100 ml	

Lösung B (immer frisch angesetzt)

NaOH (10 N)	0,2 ml	0,2 M
SDS (10 % (w/v))	1,0 ml	35,0 mM
H ₂ O	ad 10 ml	

Lösung C

Kalium-Acetat (5 M)	60,0 ml	3 M
Eisessig	11,5 ml	2 M
H ₂ O	ad 100 ml	

2.6.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Isolierung der Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde der „Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit“ verwendet. Dieser beruht auf einer Methode der enzymatischen Lyse von Birnboim und Doly (1979) mit der reversiblen und selektiven Bindung an eine Silicamembran. Es wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren.

2.6.2.5 Isolierung von RNA aus *C. aceticum*, *A. woodii* und *C. ljungdahlii*

Für die Isolierung von RNA wurden 50 ml Kultur für 5 min bei 5.000 g und 4 °C aerob zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in 200 µl Lysispuffer (20 mg/ml Lysozym in SET-Puffer) gelöst und für 5 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde 1 ml eiskaltes TRIzol® (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) zugegeben und durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren gemischt. Ab diesem Schritt konnten die Ansätze bei -80 °C eingefroren oder sofort weiterverarbeitet werden. Den Proben wurde 0,3 ml Chloroform zugegeben, 15 s gemischt und anschließend 15 min bei 10.000 g und 4 °C zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase, welche die RNA enthielt, wurde in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und 0,5 ml Isopropanol zugegeben. Der Ansatz wurde gemischt und erneut für 10 min bei 10.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen. Daran schloss sich eine weitere Zentrifugation für 4 min bei 8.000 g und 4 °C an. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in einer Vakuumzentrifuge (2.6.3.4) ohne Hitze getrocknet. Anschließend wurde das Sediment in 22 µl H₂O aufgenommen.

SET-Puffer

Saccharose	62,50 g	730 mM
Tris	1,51 g	50 mM
EDTA Na-Salz x 2 H ₂ O	4,65 g	50 mM
H ₂ O	ad 250 ml	

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,6 eingestellt.

2.6.3 Reinigung von Nukleinsäuren

2.6.3.1 Phenol-Chloroform-Extraktion

Um Verunreinigungen wie Proteine und Salze aus der Nukleinsäurelösung zu entfernen, wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Dazu wurde der Nukleinsäurelösung ein Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1 (v/v/v)) zugegeben und gemischt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation von 5 min bei 5.000 g und 4 °C. Danach bildete sich eine wässrige und eine organische Phase. Es wurde die obere, wässrige Phase, in welcher sich die Nukleinsäuren befanden, vorsichtig abgenommen und in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Die organische Phase, in welcher sich die Verunreinigungen wie Salze und Proteine befanden, wurde verworfen. Zu der wässrigen Phase wurde ein Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1 (v/v)) gegeben und gemischt. Danach erfolgte eine Zentrifugation von 5 min bei 13.000 g und 4 °C. Wieder ergaben sich nach der Zentrifugation zwei Phasen, wobei wieder die obere, wässrige Phase vorsichtig abgenommen und in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt wurde. Dieser Schritt wurde so lange durchgeführt, bis keine Interphase mehr zu erkennen war. Anschließend erfolgte eine Alkoholfällung (2.6.3.2 oder 2.6.3.3), bei der die Phenolreste aus der Nukleinsäurelösung entfernt wurden.

2.6.3.2 Ethanolfällung

Nach Isolierung der Nukleinsäuren und Phenol-Chloroform-Extraktion (2.6.3.1) erfolgte eine Alkoholfällung. Dafür wurde der wässrigen Nukleinsäurelösung 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 3,2) und 2,5 Volumen absoluter, eiskalter Ethanol zugegeben. Es erfolgte eine Inkubation von 30 min bei -20 °C, wodurch die Nukleinsäuren präzipitieren. Nach der Inkubation erfolgte eine Zentrifugation für 30 min bei 13.000 g und 4 °C, um Ethanol vom Sediment zu trennen. Ethanol wurde abgenommen und das Sediment mit 70 %igem Ethanol gewaschen, ohne das Sediment zu lösen. Daraufhin erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 13.000 g und 4 °C. Ethanol wurde abgenommen, das Sediment in einer Vakuumzentrifuge (2.6.3.4) getrocknet und anschließend in H₂O aufgenommen.

2.6.3.3 Isopropanolfällung

Für die Isopropanolfällung wurde dem Ansatz 1 Volumen Isopropanol zugeben und vorsichtig gemischt. Dabei fällt die DNA als sichtbares „Knäuel“ aus, welches mit einer Pasteurpipette aufgefangen werden kann. Anschließend wurde die DNA in 70 %igen Ethanol getaucht und vor der Bunsenbrennerflamme getrocknet. Die DNA wurde in Wasser aufgenommen und bei 4 °C aufbewahrt.

2.6.3.4 Trocknen von Sedimenten in einer Vakuumzentrifuge

Um die Sedimente nach der Ethanolfällung zu trocknen und die restliche Flüssigkeit zu entfernen, erfolgte eine Trocknung mit der Vakuumzentrifuge. Durch das Vakuum wird der Siedepunkt einer Flüssigkeit verringert und kann somit schneller verdampfen. Durch das Beheizen des Gerätes wird ein Einfrieren der Probe aufgrund der Verdunstungskälte verhindert. Durch das Zentrifugieren wird verhindert, dass es zur Blasenbildung und somit zum Aufschäumen der Probe kommt. Da RNA sehr hitzeinstabil ist, wurde diese ohne Hitze in der Vakuumzentrifuge getrocknet.

2.6.3.5 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Lösungen

Die Reinigung von DNA aus Lösungen erfolgte durch den „DNA Clean & ConcentratorTM-5 Kit“ nach den Angaben des Herstellers. Dieser beruht auf der Bindung der DNA an eine Silicamatrix unter Einfluss hochmolarer, chaotropher Salze.

2.6.3.6 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Sollten nach einer Restriktionsspaltung (2.6.7.1) und darauf folgender Gelelektrophorese (2.6.4.1) bestimmte DNA-Fragmente aus dem Gel geschnitten werden, wurden die in Ethidiumbromid-gefärbten Gele mittels UV-Licht bei 365 nm beleuchtet, um die DNA-Fragmente sichtbar zu machen. Die gewünschte Bande

wurde mit einem Skalpell aus dem Agarosegel geschnitten und das Gelstück in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß gegeben und gewogen. Die weitere Reinigung erfolgte mit dem „ZymocleanTM Gel DNA Recovery Kit“ nach den Angaben des Herstellers.

2.6.4 Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten

2.6.4.1 Nicht-denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

Um die DNA ihrer Größe entsprechend im elektrischen Feld aufzutrennen, wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Aufgrund der negativ geladenen Phosphat-Gruppen der DNA wandert diese im elektrischen Feld zur Anode. Durch die Siebstruktur des Agarose-Gels wandern die Nukleinsäuren entsprechend ihrer Größe schneller oder langsamer. Daher wurden 0,8 %ige Agarose-Gele für größere Fragmente (1.000-10.000 Bp) und 2,0 %ige Agarose-Gele für kleinere Fragmente (50-1.000 Bp) verwendet. Für die Herstellung von Agarose-Gelen wurde 0,8 bzw. 2 % (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer (40 mM Tris-HCl; pH 7,5; 20 mM Essigsäure; 1 mM EDTA) gelöst, aufgeköcht und in eine Gelkammer mit Kamm gegossen. Nach dem Erhärten des Gels wurde dieses mit 1x TAE-Puffer beschichtet, wonach die DNA-Proben aufgetragen werden konnten. Zuvor wurden die Proben mit 0,2 Volumen 6x DNA Loading Dye (Fermentas GmbH, St. Leon Rot) versetzt, um die Proben zu beschweren. Um die Größe der DNA anschließend bestimmen zu können, wurde zusätzlich ein DNA-Größenstandard (2.6.4.2) aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei 130 V für rund 35 min. Um die DNA anzufärben, wurde das Gel in eine Ethidiumbromid-Lösung (1 mg/ml Ethidiumbromid in 1x TAE-Puffer) gelegt und die DNA anschließend mit Hilfe einer Photodokumentationsanlage sichtbar gemacht.

2.6.4.2 Größenbestimmung von Nukleinsäuren

Für die Größenbestimmung von DNA-Fragmenten wurde der Größenstandard „Gene Ruler™ DNA Ladder Mix“ (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot; Abbildung 3) verwendet.



Abbildung 3: "Gene Ruler™ DNA Ladder Mix", Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
(http://www.fermentas.de/product_info.php?info=p1108)

2.6.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen erfolgte durch die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm in einem Spektralphotometer (Wilfinger *et al.*, 1997). Dazu wurden die Proben entsprechend verdünnt und in eine Quarzküvette gegeben. Danach erfolgte die Messung der Absorption bei den entsprechenden Wellenlängen.

Eine Absorption von 1 entspricht bei doppelsträngiger DNA 50 µg/ml und bei RNA 33 µg/ml (Sambrook und Russell, 2001). Die Reinheit der Nukleinsäurelösung wird durch das Verhältnis der Absorptionen (A_{260}/A_{280}) angegeben und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

2.6.6 Sequenzierung

Um die 16S rDNA der verschiedenen Organismen zu überprüfen und somit die Reinheit der Stämme zu kontrollieren, erfolgte eine Standard-PCR (2.6.8.1) mit den Oligodesoxynukleotiden „fD1“ und „rP2“ (Tabelle 3). Als Matrize wurde chromosomale DNA des jeweiligen Stammes verwendet. Der PCR-Ansatz wurde mit dem „DNA Clean & ConcentratorTM-5 Kit“ (2.6.3.5) laut Angaben des Herstellers aufgereinigt. Diese PCR-Produkte oder auch DNA-Plasmide, welche auf Mutationen hin untersucht werden sollten, wurden für die Sequenzierung an die Firma GATC Biotech AG, Konstanz, geschickt. Die erhaltenen Sequenzen wurden anschließend über die Computer-Software „Clone Manager 7.11“ (Scientific & Educational Software, Cary (USA)) ausgewertet. Um DNA-Sequenzen, wie z.B. die 16S rDNA, mit anderen Sequenzen zu vergleichen, erfolgte eine Blast-Analyse (Basic Local Alignment Search Tool; Altschul *et al.*, 1990).

2.6.7 Enzymatische Modifikation von DNA

2.6.7.1 Restriktionsspaltung von DNA

Für den Restriktionsverdau von PCR-Produkten oder Plasmiden wurden in dieser Arbeit Restriktionsendonukleasen des Typs II verwendet. Alle in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, bezogen. Der analytische oder präparative Restriktionsverdau erfolgte laut Angaben des Herstellers in 10-100- μ l-Ansätzen für 1 h bei 37 °C. Pro μ g DNA wurden etwa 10 U des Restriktionsenzym eingesetzt. Um die optimale Aktivität des Enzyms zu erreichen, wurden die spezifischen Puffer der Fermentas GmbH verwendet. Für die Analyse der analytischen Restriktionsspaltung wurde eine Agarose-Gel-Elektrophorese (2.6.4.1) durchgeführt. Bei einem präparativen Verdau erfolgte das Abstoppen der Reaktion durch Erhitzen des Ansatzes auf die jeweilige empfohlene Temperatur des Herstellers oder durch die Reinigung des Ansatzes über den „DNA Clean & ConcentratorTM-5 Kit“ (2.6.3.5). Wurde dem Restriktionsverdau direkt eine Dephosphorylierung (2.6.7.2) angeschlossen, folgte die Reinigung des Ansatzes erst nach der Dephosphorylierung. Beim Restriktionsverdau von PCR-Produkten muss berücksichtigt werden, dass für ein optimales Schneiden des

Enzyms ein Nukleotidüberhang vorhanden sein muss. Informationen über die benötigten Überhänge können auf der Internetseite der Fermentas GmbH nachgelesen werden (<http://www.fermentas.com/en/support/technical-reference/restriction-enzymes/cleavage-efficiency>). Musste ein Restriktionsverdau mit zwei verschiedenen Enzymen durchgeführt werden, sollte ein Puffersystem verwendet werden, in welchem die Enzyme eine Aktivität von mindestens 50-100 % aufweisen. Auch hierfür konnte die Internetseite des Herstellers herangezogen werden (<http://www.fermentas.com/en/tools/doubledigest>).

2.6.7.2 Dephosphorylierung von linearer Plasmid-DNA

Um bei Ligationen die Religation von Vektor-DNA zu unterbinden, wurde die „shrimp alkaline phosphatase“ (SAP, 1U/μl) verwendet, welche den 5'-Phosphatrest der DNA entfernt. Diese Phosphatase weist einen sehr hohen Aktivitätsbereich auf, wodurch es möglich ist, diese direkt nach dem Restriktionsverdau (2.6.7.1) ohne vorherige Reinigung dem Ansatz zuzugeben. Es wurde eine Konzentration von 1 U/20 μl DNA eingesetzt. Die Dephosphorylierung erfolgte bei 37 °C für 30 min. Es schloss sich eine Inaktivierung der Phosphatase von 15 min bei 65 °C an. Um die Dephosphorylierung zu überprüfen, wurde bei der Ligation (2.6.7.3) ein Ansatz erstellt, welchem kein Insert zugegeben wurde. Nach einer Transformation (2.6.9.1 oder 2.6.9.2) konnte die Anzahl der Religanten bestimmt werden.

2.6.7.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde die T4-DNA-Ligase (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) verwendet. Diese katalysiert ATP-abhängig die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen freien 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxyl-Gruppen doppelsträngiger DNA. Die Ligation erfolgte in 20-μl-Ansätzen, wobei das Verhältnis von Insert zu Plasmid-DNA zwischen 3:1-7:1 lag. Außerdem wurden 1 μl der T4-DNA-Ligase (1 U/μl) und 2 μl 10x T4-Ligasepuffer eingesetzt. Die Ligation erfolgte bei 22 °C für 1 h. Daran schloss sich eine Inaktivierung bei 65 °C für 10 min an. Dieser Ansatz wurde anschließend in eine Transformation eingesetzt (2.6.9.1 oder 2.6.9.2).

2.6.7.4 TA-Klonierung von PCR-Fragmenten

Einige Polymerasen erzeugen bei einer PCR (2.6.8.1) einen 5'-Adenosinnukleotid-Überhang. Diese PCR-Produkte können mit Hilfe des „Qiagen® PCR Cloning Kits“ in den „pDrive Cloning Vector“ ligiert werden, da dieser am 3'-Ende einen Thymidinnukleotid-Überhang besitzt. Dieser befindet sich in einem *lacZ*-Gen. Durch die Ligation des PCR-Fragments in das *lacZ*-Gen können durch eine Blau-Weiß-Selektion (2.6.9.6) positive Klone identifiziert werden.

2.6.8 Amplifikation der DNA durch die Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.6.8.1 Standard-Polymerasekettenreaktion

Für die Amplifikation von DNA wurde die Standardreaktion der Polymerasekettenreaktion (PCR) (Saiki *et al.*, 1985) verwendet, eine schnelle Methode zur effektiven Amplifikation von DNA-Fragmenten. Für eine PCR werden Oligodesoxynukleotide benötigt, die komplementär zu einem der beiden 3'-Einzelsträngen sind. Bei dem Design der „primer“ ist darauf zu achten, dass eine Länge von 18-22 Nukleotiden nicht überschritten wird. Für eine optimale Bindung der „primer“ an den Zielstrang sollte der (G+C)-Gehalt bei 40-60 % liegen und somit eine Hybridisierungstemperatur zwischen 50 und 60 °C besitzen. Außerdem sollte sich am 3'-Ende ein Guanin oder Cytosin befinden. Um das Ausbilden von Sekundärstrukturen zu vermeiden, sollten die „primer“ nicht mehr als vier gleiche Basen hintereinander besitzen. Ein typischer Reaktionsansatz von 50 µl setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen: 1 µg chromosomale DNA, 5 µl 10x Reaktionspuffer (200 mM Tris-HCl; pH 8,4; 500 mM KCl), 1,5 mM MgCl₂, 5 mM dNTPs, 25 pmol „forward“ Oligodesoxynukleotid, 25 pmol „reverse“ Oligodesoxynukleotid und 1 U *Taq*-DNA-Polymerase. Mit Wasser wurde ein Volumen von 50 µl eingestellt.

Die Amplifikation der DNA gliederte sich in verschiedene Schritte.

1. Initiale Denaturierung	95 °C	5 min
2. Denaturierung	95 °C	30 s
3. Annealing	variabel	45 s
4. Elongation	72 °C	variabel (1.000 nt/min)
5. Finale Elongation	72 °C	10 min

Die Schritte 2-4 wurden 32-mal wiederholt.

Die PCR gliedert sich in 3 Schritte. Im ersten Schritt denaturieren der DNA-Strang und die „primer“. Im zweiten Schritt lagern sich die „primer“ entsprechend ihrer homologen Sequenzen an die einzelsträngige DNA an. An diesen kurzen, doppelsträngigen Abschnitten kann die DNA-Polymerase mit ihrem Temperaturoptimum von 72 °C ansetzen und den DNA-Strang mit den im PCR-Ansatz enthaltenen vier Desoxynukleosidtriphosphaten in 3'-Richtung verlängern.

Die „Annealing“-Temperatur verändert sich je nach den verwendeten Oligodesoxynukleotiden. Sie wurde wie folgt berechnet:

$$T_m = 69,3 + 0,41 \left(G + C \left[\% \right] \right) - \frac{650}{\text{Länge des Oligodesoxynukleotides in Basen}} \left[^\circ \text{C} \right]$$

Die PCR-Produkte wurden anschließend mittels eines 0,8 %igen (w/v) Agarosegels elektrophoretisch (2.6.4.1) aufgetrennt.

2.6.8.2 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR (Woodman, 2008; mod.) wurde verwendet, um positive Klone nach einer Transformation zu identifizieren. Hierfür wurden Kolonien von einer Agar-Platte in ca. 50 µl Wasser gelöst oder 2 ml Kulturmedium für 10 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 10 min bei 10.000 g zentrifugiert und 10 µl des Überstands in eine Standard-PCR (2.6.8.1) als Matrize eingesetzt.

2.6.9 Herstellung kompetenter Zellen und DNA-Transfer

2.6.9.1 Transformation elektrokompeter *E. coli*-Zellen

Für die Herstellung von elektrokompenten *E. coli*-Zellen (Dower *et al.*, 1988) wurden mit einer 5-ml-Übernachtskultur 250 ml LB-Medium in einem 1-l-Erlenmeyerkolben mit Schikanen auf eine OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert. Die Inkubation erfolgte auf dem Schüttler bei 37 °C. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5-0,8 wurden die Zellen geerntet und auf Eis für 20 min abgekühlt. Danach erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 4.000 g und 4 °C. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und zweimal mit 250 ml eiskaltem, sterilem Wasser gewaschen, wobei sich nach jedem Waschschrift eine Zentrifugation für 10 min bei 4.000 g und 4 °C anschloss. Nach jedem Waschschrift wurde der Überstand verworfen. Danach wurden die Zellen mit 50 ml 10 %igem (v/v) Glycerin gewaschen und für 10 min bei 4.000 g und 4 °C zentrifugiert. Es schloss sich ein weiterer Waschschrift mit 30 ml eiskaltem 10 %igen (v/v) Glycerin an. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml 10 %igem (v/v) Glycerin aufgenommen, jeweils 50 µl der Zellsuspension in 1,5-ml-Reaktionsgefäße gegeben und in flüssigem Stickstoff schockgefroren (Chung *et al.*, 1989). Bis zur Verwendung wurden die Zellen bei -80 °C aufbewahrt.

Für die Transformation von elektrokompenten *E. coli*-Zellen wurde nach einem modifizierten Protokoll von Dower *et al.* (1988) vorgegangen. Hierzu wurden die elektrokompenten *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut und in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 2 mm, Biozym Scientific GmbH, Oldendorf), welche 1 µg Plasmid-DNA enthielt, gegeben. Es erfolgte die Elektroporation mit einem GenePulser Xcell™ bei einem Widerstand von 200 Ω, einer Kapazität von 25 µF und einer Spannung von 2,5 kV. Es ergab sich eine Zeitkonstante zwischen 4,5 und 5 ms. Nach dem Stromimpuls wurden dem Ansatz 800 µl frisches LB-Medium zugegeben und in ein 1,5-ml-Eppendorfgefäß überführt. Daran schloss sich eine Regeneration für 45 min schüttelnd bei 37 °C an. Anschließend wurden 100 µl auf selektiven Agar-Platten ausplattiert.

2.6.9.2 Transformation kaltkompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Transformation von Ligationen wurden kaltkompetente *E. coli*-Zellen verwendet, da diese Art der Transformation auch bei hohen Salzkonzentrationen möglich ist.

Zur Herstellung von kaltkompetenten *E. coli*-Zellen wurde nach einem modifizierten Protokoll von Inoue *et al.* (1990) vorgegangen. Hierfür wurden 250 ml SOB-Medium in einem 1-l-Erlenmeyerkolben mit Schikanen mit einer 5-ml-Übernachtskultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 100 Upm und 18 °C über Nacht, bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8. Die Bakterienkultur wurde in einen Zentrifugenbecher überführt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Kultur für 10 min bei 4.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit 40 ml TB-Puffer gewaschen und 10 min auf Eis inkubiert. Es schloss sich ein weiterer Zentrifugationsschritt an. Die Zellen wurden in 10 ml TB-Puffer gelöst und langsam 1,5 ml steriles DMSO zugegeben. Es wurden jeweils 200 µl Zellsuspension in 1,5-ml-Eppendorfgefäße gegeben, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zum Gebrauch bei -80 °C aufbewahrt.

Für die Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und ein kompletter Ligationsansatz (2.6.7.3) oder 1 µg Plasmid-DNA zugegeben und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 1 min und eine weitere Inkubation auf Eis für 10 min. Danach wurde den Zellen 800 µl vorgewärmtes (42 °C), frisches LB-Medium zugegeben und für 45 min bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden 100 µl der Zellsuspension auf selektiven Agar-Platten ausgestrichen.

TB-Puffer

Lösung 1

PIPES	0,756 g	8,3 mM
CaCl ₂	0,420 g	15,2 mM
H ₂ O	ad 125 ml	

mit KOH auf pH 6,7 einstellen

Lösung 2

KCl	4,66 g	0,3 M
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	1,72 g	34,8 M
H ₂ O	ad 125 ml	

Lösung 1 und 2 wurden getrennt autoklaviert und nach dem Autoklavieren zusammen gegeben.

2.6.9.3 Transformation von *C. aceticum*, *A. woodii* und *C. ljungdahlii*

Für die Transformation von *A. woodii*, *C. aceticum* und *C. ljungdahlii* wurde nach einem modifizierten Protokoll nach Köpke (2009) vorgegangen (Becker *et al.*, 2010). 200 ml Medium wurden mit einer über Nacht gewachsenen Kultur angeimpft und über Nacht bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,6 inkubiert. Für die Transformation von *A. woodii* wurde dem Medium 8 ml DL-Threonin (0,5 M) zugegeben. Alle weiteren Schritte erfolgten in der Anaerobenkammer unter Ausschluss von Sauerstoff. Hier wurde die Bakterienkultur auf vier 50-ml-Falcons aufgeteilt und bei 6.000 g für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand danach verworfen. Anschließend wurden die Sedimente je zweimal mit 20 ml SMP-Puffer gewaschen. Jedes Sediment wurde in 600 µl SMP-Puffer aufgenommen und in eine Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 4 mm, Biozym Scientific GmbH, Oldendorf), in welcher 1-2 µg Plasmid vorgelegt wurden, gegeben. Die Elektroporation erfolgte mit einem GenePulser Xcell™ bei einer Spannung von 2,5 kV, einer Kapazität von 25 µF und einem Widerstand von 600 Ω. Der Transformationsansatz wurde sofort in 5 ml frisches Medium überführt und für drei Tage bei der optimalen Wachstumstemperatur des jeweiligen Bakteriums regeneriert. Anschließend wurde 1 ml der Bakterienkultur in 5 ml frisches Selektiv-Medium gegeben und das Wachstum verfolgt.

SMP-Puffer

Saccharose	92,4 g	270 mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,2 g	1 mM
NaH ₂ PO ₄	0,8 g	7 mM
H ₂ O	ad 1 000 ml	

Der pH-Wert des SMP-Puffers wurde dem jeweiligen pH-Optimum des Bakteriums angepasst. Hierzu wurde der pH-Wert mit 1 M NaOH auf pH 5,9 für *C. ljungdahlii*, auf pH 7,0 für *A. woodii* und auf pH 8,0 für *C. aceticum* eingestellt.

2.6.9.4 Transformation von *C. acetobutylicum*

5 ml CG-Medium wurden mit einer Sporensuspension angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Damit wurden 50 ml vorgewärmtes CG-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert. Die weiteren Schritte erfolgten in einer Anaerobenkammer. Hier wurden die Zellen bei 2.200 g, 4 °C für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde anschließend mit 1 Volumen ETM-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 3 ml ET-Puffer aufgenommen. Es wurden je 600 µl in vorgekühlte Elektroporationsküvetten (Elektrodenabstand 4 mm, Biozym Scientific GmbH, Oldendorf), in welchen 2 µg Plasmid vorgelegt wurde, gegeben. Die Elektroporation erfolgte mit einem GenePulser Xcell™ bei einer Spannung von 1,8 kV, einer Kapazität von 50 µF und einem Widerstand von 600 Ω. Der Transformationsansatz wurde sofort in 1,4 ml vorgekühltes CG-Medium zur Regeneration gegeben, welche für 4 h bei 37 °C oder über Nacht erfolgte. Anschließend wurden 300 µl der Zellsuspension auf selektiven, anaeroben Agar-Platten (CG-Medium) ausplattiert und für mind. drei Tage anaerob bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

ETM-Puffer

Saccharose	27,70 g	270,0 mM
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	32,00 mg	0,6 mM
NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	0,18 g	4,4 mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	12,80 g	0,2 M
H ₂ O	ad 300 ml	

ET-Puffer

Saccharose	27,70 g	270,0 mM
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	32,00 mg	0,6 mM
NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	0,18 g	4,4 mM
H ₂ O	ad 300 ml	

2.6.9.5 Methylierung von Plasmid-DNA für die Transformation von *C. acetobutylicum*, *A. woodii*, *C. aceticum* und *C. ljungdahlii*

Clostridien besitzen ein sequenzspezifisches Restriktionssystem, wodurch Fremd-DNA erkannt und abgebaut werden kann. In *C. acetobutylicum* ist dies die Restriktionsendonuklease Cac824I. Die Methyltransferase aus dem *Bacillus subtilis* Phagen Φ 3T (Tran-Betcke *et al.*, 1986; Noyer-Weidner *et al.*, 1985; Noyer-Weidner *et al.*, 1983) kann eingebrachte Plasmid-DNA vor einer Degradierung in z.B. *C. acetobutylicum* schützen. Diese Methyltransferase methyliert das innenliegende Cytosin der Basenfolge 5'-GGCC-3' und 5'-GCNGC-3' (Balganesh *et al.*, 1987). Für die Methylierung von Plasmid-DNA wurde das Plasmid pANS1 (Böhringer, 2002) verwendet, welches die Methyltransferase kodiert.

Für die Methylierung wurde *E. coli* XL1-Blue MRF⁻ oder *E. coli* ER2275 verwendet, da diese die Restriktionsenzyme McrA, McrBC und Mrr nicht besitzen, welche DNA schneiden würden, bei der das Cytosin an der Stelle 5'-CG-3' methyliert ist (Kelleher und Raleigh, 1991).

Die zu methylierenden Plasmide wurden in *E. coli* XL1-Blue MRF⁻pANS1 oder *E. coli* ER2275 pANS1 transformiert. Dabei ist der Replikationsursprung p15A von pANS1 kompatibel mit dem Replikationsursprung ColE1, welcher auf allen verwendeten Plasmiden vorhanden ist. Anschließend wurde eine Plasmidpräparation durchgeführt und die Methylierung durch einen Restriktionsverdau mit *Sat*I (Erkennungssequenz

5'-GC*NGC-3'), einem methylierungssensiblen Isoschizomer von *Cac824I*, kontrolliert. Das Methylierungsplasmid pANS1 musste nicht entfernt werden, da dieses in *C. acetobutylicum* nicht replizieren kann.

Vor der Transformation von Plasmid-DNA in *A. woodii*, *C. aceticum* oder *C. ljungdahlii* wurde diese mit der Methylase aus *C. ljungdahlii* methyliert. Das Gen (CLJU_c03310) für diese Methylase liegt im Vektor pACYC184 vor. Dieses Plasmid trägt den Namen pMClj und wurde ebenfalls in *E. coli* XL1-Blue MRF⁻ oder *E. coli* ER2275 transformiert (siehe 3.2).

2.6.9.6 Blau-Weiß-Selektion

Um rekombinante *E. coli*-Stämme auf eine erfolgreiche Insertion in den Vektor pDrive (2.6.7.4) zu untersuchen, wurde eine Blau-Weiß-Selektion durchgeführt. Manche *E. coli*-Zellen weisen eine chromosomale Deletion in *laqI*^qΔM15 auf und sind nicht mehr in der Lage, β-Galactosidase zu bilden. Der Vektor pDrive besitzt lacPOZ' in der multiplen Klonierungsstelle, wodurch *E. coli* wieder eine funktionelle β-Galactosidase bilden kann. Wird nun ein Insert erfolgreich in diese multiple Klonierungsstelle ligiert, kann keine β-Galactosidase mehr gebildet werden. X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galactosid) wird durch die β-Galactosidase in Galactose und 5-Brom-4-Chlor-Indoxyl hydrolysiert und bildet in Verbindung mit Sauerstoff einen blauen Farbstoff. Wurden auf Agar-Platten mit X-Gal und IPTG nach einer Transformation *E. coli*-Zellen ausplattiert, erschienen weiße Kolonien, wenn das Insert erfolgreich in pDrive ligiert wurde und blaue Kolonien, wenn es sich um Religanten handelte.

Es wurden 20 µl IPTG (30 mg/ml) und 40 µl X-Gal (20 mg/ml) (Tabelle 4) auf Agar-Platten ausplattiert und 30 min getrocknet, bevor ein Transformationsansatz ausplattiert wurde.

2.7 „ClosTron™ Gene Knockout System“

Bei dem „ClosTron™ Gene Knockout System“ (Heap *et al.*, 2007) handelt es sich um eine sehr spezifische Methode zur gezielten Geninaktivierung mittels eines sogenannten Gruppe-II-Introns (Frazier *et al.*, 2003). Induzierbare, plasmidkodierte Gruppe-II-Introns erkennen eine spezifische, chromosomale Sequenz und inserieren dort autokatalytisch (Zhong *et al.*, 2003). Bei erfolgreicher Integration der Gruppe-II-Introns in das Zielgen wird eine Antibiotikaresistenz aktiviert, wodurch eine effektive Selektion von Integrationsmutanten möglich wird.

Die Erkennungssequenz des Introns wird durch eine Ein-Schritt-SOE-PCR (2.7.1) an das Zielgen angepasst. Hierfür wird eine Internetseite der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (<http://www.sigma-genosys.com/tragetron/>) für die automatische „primer“-Generierung verwendet.

Für die spezifische Geninaktivierung in Clostridien wurde der Vektor pMTL007 verwendet. Dieser besitzt einen IPTG-induzierbaren *fac*-Promoter, welcher die Induktion des Gruppe-II-Introns auslöst (Heap *et al.*, 2007).

2.7.1 Ein-Schritt-SOE-PCR

Um die Erkennungssequenz des Introns an das Zielgen anzupassen, wurde das Prinzip einer „splicing by overlap extension“-PCR verwendet (Ho *et al.*, 1989). Jedoch wurden die eigentlich drei Reaktionen auf einen einzigen Schritt vereint („one-step SOE-PCR“).

Zunächst wurde die Sequenz des Zielgens mit Hilfe eines computergeschützten Algorithmus der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH auf mögliche Insertionsstellen überprüft. Für zwei mögliche Insertionsstellen wurden die „primer“ IBS, EBS2 und EBS1d von der Firma biomers.net GmbH (Ulm) synthetisiert. Die „primer“ IBS und EBS1d wurden auf 100 µM und der „primer“ EBS2 auf 20 µM mit H₂O verdünnt und zusammen mit dem Universal-„primer“ EBS ein „primer“-Mix hergestellt. Bei der Auswahl der Insertionsstellen wurde darauf geachtet, möglichst Insertionsstellen am Anfang und Ende des Zielgens mit einem geringen e-Value zu finden, da dieser Wert die Wahrscheinlichkeit einer positiven Integration angibt.

„primer“-Mix

IBS	2 µl	100 µM
EBS1d	2 µl	100 µM
EBS2	2 µl	20 µM
EBS universal	2 µl	20 µM
H ₂ O	ad 20 µl	

PCR-Ansatz

„primer“-Mix	1,0 µl
Intron-PCR-Matrize (1:10 verdünnt)	1,0 µl
Failsafe TM Polymerase	0,5 µl
Failsafe TM Premix E	25,0 µl
H ₂ O	ad 50 µl

Verwendetes PCR-Programm

1. Initiale Denaturierung	95 °C	30 s
2. Denaturierung	95 °C	15 s
3. Anlagerung	55 °C	30 s
4. Elongation	72 °C	30 s
5. Finale Elongation	72 °C	2 min

Die Schritte 2-4 wurden 30-mal wiederholt und das PCR-Produkt über eine 2 %ige Agarose-Gel-Elektrophorese (2.6.4.1) überprüft und das 350-Bp-Fragment aufgereinigt (2.6.3.6).

2.7.2 Restriktionsspaltung von DNA-Fragment und dem Vektor pMTL007

Es wurden sowohl das in 2.7.1 amplifizierte PCR-Produkt als auch der Vektor pMTL007 einem doppelten Restriktionsverdau mit *Hind*III und *Bsr*GI unterzogen, um für die anschließende Ligation kompatible Enden zu generieren. Dazu wurden etwa 200 ng PCR-Produkt und 2 µg des Vektors pMTL007, 20 U *Hind*III und 10 U *Bsr*GI in einen 20-µl-Ansatz eingesetzt. Der Restriktionsverdau erfolgte für 30 min bei 37 °C und weitere 30 min bei 60 °C. Daran schloss sich eine Inaktivierung von 10 min bei

80 °C an. Das PCR-Fragment wurde anschließend direkt aus der Lösung aufgereinigt (2.6.3.5). Der Restriktionsverdau von pMTL007 wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt (2.6.4.1) und der linearisierte Vektor aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt (2.6.3.6). Der linearisierte Vektor pMTL007 wurde nachfolgend, wie in 2.6.7.2 beschrieben, dephosphoryliert.

2.7.3 Ligation von DNA-Fragment und Vektor pMTL007

Für die Ligation wurden 15 ng Fragment, 100 ng Vektor, 2 µl T4-DNA-Ligase (5 U/µl) und 2 µl Ligase-Puffer eingesetzt und für 1 h bei 22 °C inkubiert. Es folgte eine Inaktivierung für 10 min bei 65 °C. Anschließend wurde der Ligationsansatz in kaltkompetente *E. coli* XL1-Blue MRF⁺ transformiert (2.6.9.2) und auf selektiven LB-Agarplatten mit Chloramphenicol ausplattiert. Die Inkubation der Agar-Platten erfolgte über Nacht, es wurden Klone gepickt, eine Plasmidpräparation (2.6.2.4) durchgeführt und durch einen präparativen Restriktionsverdau (2.6.7.1) mit *Hind*III und *Bsr*GI auf positive Klone untersucht. Die potentiell positiven Klone wurden an die Firma GATC (Konstanz) geschickt und sequenziert (2.6.6).

2.7.4 Transformation von pMTL007 in *C. acetobutylicum*

Der Vektor pMTL007 mit der an das Zielgen angepassten Erkennungssequenz wurde *in vivo* in *E. coli* XL1-Blue MRF⁺pANS1 methyliert (2.6.9.5) und anschließend das methylierte Plasmid in *C. acetobutylicum* transformiert (2.6.9.4). Der Transformationsansatz wurde auf selektiven CG-Agarplatten mit Thiamphenicol (15 µg/µl) ausplattiert. Die Agar-Platten wurden für 3-4 Tage bei 37 °C inkubiert und danach Klone gepickt, welche in die Stammhaltung aufgenommen wurden.

2.7.5 Induktion der Integration in *C. acetobutylicum*

Für die Induktion wurden 900 µl CG-Medium mit Thiamphenicol (7,5 µg/µl) mit 100 µl der Vorkultur angeimpft und für 3 h bei 37 °C inkubiert. Die Induktion des *fac*-Promoters erfolgte mit 1 mM IPTG, es folgte eine Inkubation für 1 h bei 37 °C. Anschließend wurde dieser Ansatz für 1 min bei 4.300 g und RT zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Sediment mit 500 µl PBS-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Sediment wurde in 1 ml CG-Medium gelöst und für weitere 3 h bei 37 °C inkubiert. Dieser Ansatz wurde auf selektiven CG-Agar-Platten mit Clarithromycin (2,5 µg/µl) ausplattiert und für ca. 3 Tage bei 37 °C inkubiert.

PBS-Puffer

Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	12,50 g	70,21 µM
NaH ₂ PO ₄	1,10 g	9,17 µM
NaCl	5,84 g	100,00 µM
H ₂ O	ad 1 000 ml	

2.7.6 Nachweis der Induktion mittels PCR

Um eine positive Integration nachzuweisen, wurden „primer“ generiert, welche stromaufwärts und stromabwärts der jeweiligen Insertionstellen lagen. Die „primer“ wurden so generiert, dass sich ein Fragment von 300-400 Bp ergibt, wenn keine Integration ins Zielgen erfolgte. Bei einer erfolgreichen Integration dagegen wird ein Fragment erwartet, welches um 1.800 Bp größer ist. Die möglichen positiven Integrationsmutanten wurden gepickt und eine Präparation der chromosomalen DNA (2.6.2.2) durchgeführt. Die chromosomale DNA diente als Matrize für eine Standard-PCR (2.6.8.1). Das PCR-Produkt wurde mittels einer Gelelektrophorese überprüft (2.6.4.1).

2.8 Chemikalien, Enzyme, Gase, Materialien und Geräte

2.8.1 Chemikalien

Die Chemikalien, welche in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden von folgenden Firmen bezogen:

- Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden
- Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- Difco Laboratories, Augsburg
- Fluka-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
- GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
- Gibco BRL Life Technologies Inc., Eggenstein
- Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze
- Merck KGaA, Darmstadt
- Otto Nordwald GmbH, Hamburg
- Riedel-de Haen AG, Seelze
- Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- SERVA Elektrophoresis GmbH, Heidelberg

2.8.2 Enzyme

Weitere spezielle Chemikalien und Enzyme stammten von folgenden Firmen:

Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe

Roti®-Phenol

Biozym Scientific GmbH, Oldendorf

FailSafe Polymerase™ PCR Enzyme Mix (2,5 U/μl)

Genaxxon Bioscience GmbH, Biberach

ReproFast Polymerase (5 U/μl)

Taq-Polymerase (5 U/μl), 10x Puffer S, MgCl₂ (25 mM)

Gerbu Biotechnik GmbH, GailbergNADP⁺Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

DNase I (1 U/μl)

dNTPs

RNase A (5 U/μl)

Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)

T4-DNA-Ligase (1 U/μl)

Merck KGaA, Darmstadt

Ampicillin

Chloroform

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

ADP

ATP

Hexokinase/Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase (Hexokin.: 340 U/ml; G.-6-P-Deh.: 170 U/ml)

Proteinase K (2,5 U/mg)

Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim

Acetyl-Phosphat

Erythromycin

Lysozym (84.468 U/mg)

Spectinomycin

Thiampenicol

2.8.3 Gase

Alle Gase bzw. Gasgemische, welche für die Begasung der Kulturmedien verwendet wurden, wurden von der MTI Industriegase AG (Elchingen) bezogen. In Tabelle 5 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Gase/Gasgemische aufgelistet.

Tabelle 5: Gase und Gasgemische

Gas / Gasgemische	Zusammensetzung	Verwendung
CO ₂ + H ₂	67 % Wasserstoff 33 % Kohlenstoff	Substrat für Bakterien
N ₂ + CO ₂	80 % Stickstoff 20 % Kohlenstoff	Medienzubereitung
Formiergas	95 % Stickstoff 5 % Wasserstoff	Anaerobenkammer
Stickstoff (5.0)	100 % Stickstoff	Anaerobes Arbeiten Trärgas GC
Synthetische Luft	79 % Stickstoff 21 % Sauerstoff	FID GC
Wasserstoff	100 % Wasserstoff	FID GC

2.8.4 Molekularbiologische Hilfsmittel

Bei den Arbeiten wurden folgende molekularbiologischen „Kits“ verwendet:

- „BCATM Protein Assay Kit“, Thermo Scientific, Rockford (USA)
- „D-Glucose/D-Fructose“, r-Biopharm AG, Darmstadt
- „DNA Clean & ConcentratorTM – 5 Kit“, Hiss Diagnostics GmbH, Freiburg
- „Qiagen[®] PCR Cloning Kit“, Qiagen GmbH, Hilden
- „ZymocleanTM Gel DNA Recovery Kit“, Hiss Diagnostics GmbH, Freiburg
- „ZyppyTM Plasmid Miniprep Kit“, Hiss Diagnostics GmbH, Freiburg

2.8.5 Geräte und Materialien

Die in dieser Arbeit am häufigsten verwendeten Geräte und Materialien sind in folgender Liste aufgeführt:

AGFA CRONEX 5 100 NIF-Film	Agfa-Gevaert AG, Köln
Agarose-Gelelektrophorese-Kammer	Werkstatt Universität Ulm
Anaerobenkammer	Werkstatt Universität Ulm
Brutschrank „B 5050 T“	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Eismaschine „Scotsman AF-200“	Scotsman Ice Systems, Mailand (Italien)
Elektrophorese „Power Supply ST 606“	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Elektroporationsgerät „GenePulser Xcell TM “	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Elektroporationsküvetten: 2 mm und 4 mm Lückenweite	Biozym Scientific GmbH, Oldenburg
Feinwaage „AE 163“	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Filmentwickler „VCURIX 60V“	Agfa Graphics Germany GmbH & Co. KG, Düsseldorf
Fotodokumentationsanlage „Gelprint 2000i“	MWG Biotech AG, Ebersberg
Gaschromatograph „Clarus 600“	PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau
Heizblock Thermoblock 1.0	Störk GmbH & CoKG, Stuttgart
Heizpilz (2 L)	Isopad GmbH, Heidelberg
Heizpilz (4 L)	Heraeus Holding GmbH, Hanau
HPLC „Infinity 1260“	Agilent Technologies, Waldbronn
Inkubationsschüttler (37 °C) „HT“	Infors GmbH, Einsbach

Kühlzentrifuge „5402“	Eppendorf AG, Hamburg
Kühlzentrifuge „5804 R“	Eppendorf AG, Hamburg
Kühlzentrifuge „ZK 401“	HERMLE Labortechnik GmbH, Wehingen
Magnetrührer „IKAMAG® RCT“	IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Mikroplatten-Lesegerät „anthos HTIII“	Anthos Labtec Instruments GmbH, Wals (Österreich)
PCR-Gerät „PTC 200“	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
pH-Messgerät „WTW pH 521“	Wissenschaftliche-Technische Werkstätten, Weilheim
Photodokumentationsanlage	MWG Biotech GmbH, Ebersberg
Photometer „Ultrospec® 3100 pro“	GE Healthcare Europe GmbH, München
Photometer für Röhrchen „GENESYS 10vis“	Thermo Fischer Scientific, Dreieich
Reagenzglasschüttler „REAX 2000“	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach
Reinstwasseranlage „Elgastat Maxima“	USF Deutschland GmbH, Ransbach-Baumbach
„RiboLyser™“	Hybaid GmbH, Heidelberg
Tischzentrifuge „Mini Spin®“	Eppendorf AG, Hamburg
Ultraschallbad	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin
UV-Schirm „TFP-M/WL“ (312 nm)	biostep GmbH, Jahnsdorf
UV-Schirm „UST-30L-8E“ (365 nm)	biostep GmbH, Jahnsdorf
Vakuumzentrifuge „SpeedVac Concentrator SVC 100H“	Bachhofer GmbH, Reutlingen
Vortexer „REAX 2000“	Heidolf Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach

Waagen	„Sartorius BP 8100“	Sartorius AG, Göttingen
	„Sartorius BP 2100 S“	Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad	„HAAKE FIOSIONS SWB 20“	Thermo Fischer Scientific, Dreieich
Zentrifuge	Hungate-Röhrchen „EBA 20“	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen

3. Experimente und Ergebnisse

Essigsäure (Acetat) spielt in der chemischen wie auch in der Lebensmittelindustrie eine bedeutende Rolle. Durch die Produktion von Essig, Klebstoffen, Folien und anderen Kunststoffprodukten steigt der jährliche Bedarf an Essigsäure stetig an. Dabei ist die synthetische Herstellung von Essigsäure meist mit höheren Kosten verbunden als die biotechnologische Essigsäureproduktion durch den Einsatz von Bakterien.

In der Industrie findet bis heute die Essigsäureproduktion durch oxidative Fermentation mit Essigsäurebakterien seine Anwendung. Durch den Einsatz von acetogenen Bakterien dagegen, welche durch CO_2 -Fixierung Acetat produzieren, kann die Ausbeute an Acetat pro eingesetztem Mol Glucose gegenüber der oxidativen Fermentation um 50 % gesteigert werden. Durch die Optimierung der Acetatproduktion mit Acetogenen soll ein neuer Prozess in der Acetatherstellung entwickelt werden. Außerdem ist die Acetatproduktion durch Acetogene interessant, da diese Bakterien die Abgas- bzw. Abfallprodukte CO_2 und CO als Kohlenstoffquelle für die Energiegewinnung und Acetatproduktion nutzen können.

3.1 Screening verschiedener Acetatbildner

Zunächst erfolgte die Charakterisierung geeigneter Bakterien zur Acetatproduktion. Diese sollten sich durch eine möglichst hohe natürliche Acetatproduktion auszeichnen. Außerdem sollte das Produktspektrum dieser Bakterien möglichst keine weiteren Produkte neben Acetat aufweisen, damit eine spätere Abtrennung des Acetats aus dem Medium nicht zu erhöhten Kosten führt. Die in Tabelle 6 aufgeführten Bakterien wurden bei der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig bestellt und auf ihrem jeweiligen Medium angezogen. Die Kultivierung erfolgte in Volumina von 50 ml in 125-ml-Müller & Krempel-Flaschen, bei der optimalen Wachstumstemperatur der einzelnen Bakterien (2.4.3). Tabelle 6 zeigt die maximal erreichte optische Dichte, die maximale Acetatproduktion und die Menge an produzierten Nebenprodukten.

Tabelle 6: Wachstum und Produktspektrum Acetat-produzierender Organismen

	maximale OD ₆₀₀	max. Acetat- konzentration [mM]	Nebenprodukte ab 2 mM
<i>A. woodii</i> (DSM1030)	4	80	-
<i>B. coccooides</i> (DSM935)	2,5	100	-
<i>B. fibrisolvens</i> (DSM3071)	0,75	33	Butanol: 4 mM Butyrat: 18 mM
<i>B. producta</i> (DSM3507)	1,5	30	-
<i>C. aceticum</i> (DSM1496)	2,35	60	-
<i>C. carboxidivorans</i> (DSM15243)	2,5	15	Ethanol: 6 mM Butyrat: 6 mM
<i>C. drakei</i> (DSM14770)	1,6	14	Acetoin: 3 mM Butyrat: 3 mM
<i>C. ljungdahlii</i> (DSM13583)	1,2	60	-
<i>C. mayombeii</i> (DSM6539)	0,35	16	-

Aus Tabelle 6 geht hervor, dass es sich bei *A. woodii*, *C. aceticum*, *C. ljungdahlii* und *B. coccooides* um sehr gute Acetatproduzenten handelt. Außerdem weist das Produktspektrum dieser Organismen auf dem hier verwendeten Medium keine weiteren Nebenprodukte in signifikanten Mengen auf. Mit *A. woodii*, *C. ljungdahlii* und *C. aceticum* wurden anschließend weitere Versuche durchgeführt, da diese im Gegensatz zu *B. coccooides* auf CO und CO₂/H₂ ohne die Zugabe von Formiat wachsen können.

3.2 Etablierung bzw. Verbesserung der Elektrotransformation von *A. woodii*, *C. aceticum* und *C. ljungdahlii*

Um *A. woodii*, *C. aceticum* und *C. ljungdahlii* genetisch zugänglich zu machen, wurde die Elektrotransformation dieser Organismen etabliert bzw. verbessert. Dazu wurde ein Protokoll von Köpke (2009) herangezogen und dieses entsprechend modifiziert. Wie in 2.6.9.3 beschrieben wurde eine über Nacht gewachsene Kultur in 200 ml Medium für eine Transformation verwendet, da die Kulturen hier ein langsames Wachstum zeigten und somit die Kompetenz gesteigert werden konnte. Für die Transformation von *A. woodii* wurden dem Medium 40 mM D-/L-Threonin zugegeben, um die Zellwand zu destabilisieren. Alle Zentrifugationschritte während der Ernte und dem Waschen der Zellen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Zum Waschen der Zellen wurde SMP-Puffer verwendet, bei welchem der pH-Wert dem Optimum des jeweiligen Organismus angepasst wurde. Außerdem wurde ein Methylierungssystem entwickelt, da viele Organismen ein sequenzspezifisches Restriktionssystem besitzen, wodurch Fremd-DNA erkannt und degradiert werden kann. Für die Entwicklung eines Methylierungssystems sollte eine Methyltransferase eines acetogenen Organismus eingesetzt werden. Da das Genom von *C. ljungdahlii* 2010 vollständig sequenziert wurde (Köpke *et al.*, 2010), wurde die Methylase (CLJU_c03310) aus *C. ljungdahlii* verwendet. Die Methylase von *C. ljungdahlii* wurde synthetisch hergestellt, in den Vektor pACYC184 (Chang und Cohen, 1978) kloniert und in *E. coli* JM109 transformiert. Dieser Stamm (*E. coli* JM109 pMClj) wurde anschließend als Methylierungsstamm verwendet. Außerdem wurde die Chloramphenicol-Resistenzkassette auf dem Plasmid pMClj durch eine Spectinomycin-Resistenzkassette über die Schnittstellen *KpnII* ausgetauscht (Wensche, unveröffentlicht), um die Selektion für weitere Plasmide, welche eine Chloramphenicolresistenz tragen, ebenfalls zu ermöglichen. Das so konstruierte Plasmid pMCljS wurde in den Stamm *E. coli* XL1-Blue MRF' transformiert, woraus der Methylierungsstamm *E. coli* XL1 pMCljS resultierte.

3.3 Konstruktion von Überexpressionsplasmiden für die Erhöhung der Acetatproduktion in acetogenen Stämmen

Die acetogenen Organismen sollten gentechnisch so verändert werden, dass sie sich durch eine erhöhte Acetatproduktion auszeichnen. Hierfür wurden Überexpressionsplasmide konstruiert, mit den Genen für die Acetat-Kinase (*ack*) und die Phosphotransacetylase (*pta*) aus *C. ljungdahlii*. Diese Enzyme katalysieren den Übergang von Acetyl-CoA zu Acetyl-Phosphat (Pta) und weiter zu Acetat (Ack) (Abbildung 4).

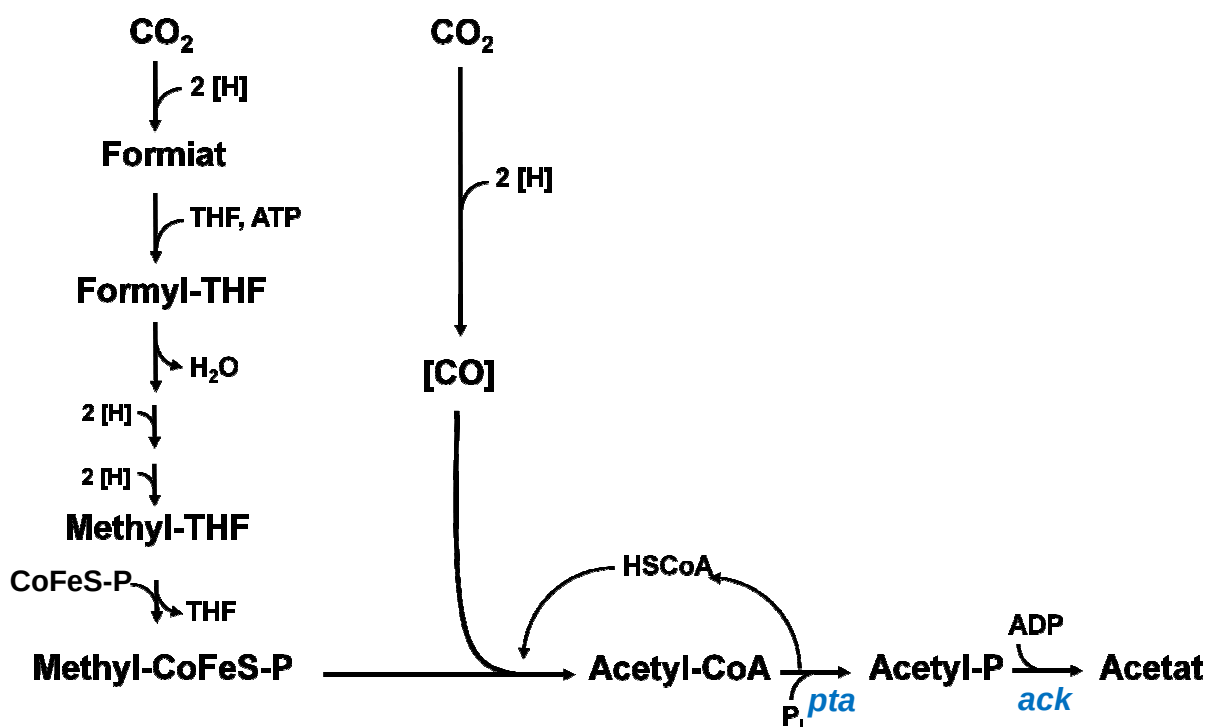


Abbildung 4: Wood-Ljungdahl-Weg und die zu überexprimierenden Gene *pta* = Phosphotransacetylase und *ack* = Acetat-Kinase

Zur Konstruktion der Überexpressionsplasmide wurde das *pta-ack*-Operon aus der chromosomalen DNA von *C. ljungdahlii* amplifiziert und in die „shuttle“-Vektoren pIMP1 und pJIR750 kloniert. Diese „shuttle“-Vektoren besitzen jeweils einen anderen Replikationsursprung für Gram-positive Bakterien. Unterschiedliche Replikationsursprünge können unterschiedliche Transformationseffizienzen zur Folge haben.

Für die Konstruktion der Plasmide pIMP1_*pta-ack* und pJIR750_*pta-ack* wurde das *pta-ack*-Operon von *C. ljungdahlii* mit den Oligodesoxynukleotiden „pta-ack_Sall_fw“

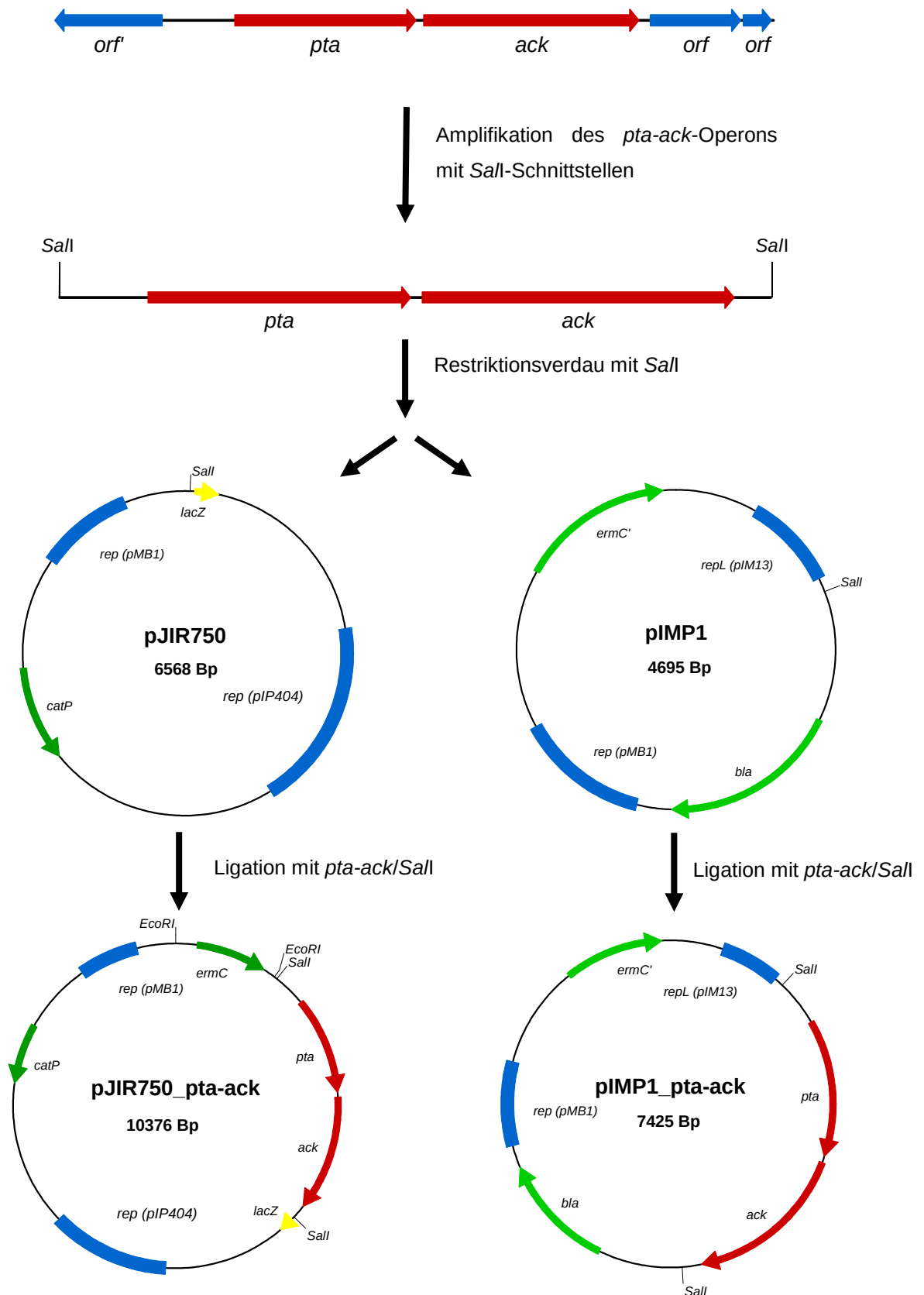
und pta-ack_Sall_rev“ amplifiziert und über die Schnittstelle Sall in die Vektoren pIMP1 und pJIR750 kloniert (Abbildung 5). Bei der Standard-PCR fand eine Polymerase Anwendung, welche Adenosinüberhänge bildet, wodurch eine Zwischenklonierung über den Vektor pDrive erfolgen konnte. Die „primer“ wurden so gewählt, dass der native Promoter des *pta-ack*-Operons aus *C. ljungdahlii* ebenfalls amplifiziert wurde.

Das Plasmid pJIR750_pta-ack wurde zusätzlich mit einer Erythromycin-Resistenzkassette ausgestattet, um eine Selektion mit Clarythromycin in anaeroben Organismen zu ermöglichen. Hierfür wurde das Gen *ermC*, welches für eine Erythromycin-Kassette kodiert, mittels den Oligodesoxynukleotiden „ermC_EcoRI_fw“ und „ermC_EcoRI_rev“ amplifiziert und über die generierte Restriktionsschnittstelle EcoRI in das Plasmid pJIR750_pta-ack ligiert.

Um die Acetatproduktion in den verschiedenen Organismen weiter zu erhöhen, wurde der Promoter der Phosphotransbutyrylase (P_{ptb}) aus *C. acetobutylicum* vor das Operon *pta-ack* kloniert. Hierfür wurde das *pta-ack*-Operon aus *C. ljungdahlii* mit den Oligodesoxynukleotiden „pta-ack_EcoRI_fw“ und pta-ack_EcoRI_rev“ amplifiziert. Durch die Amplifikation mit diesen „primern“ wurden EcoRI-Restriktionsstellen an das Fragment angebracht, über welche das *pta-ack*-Operon in den Vektor pIMP_ptb ligiert wurde (Abbildung 6). Zuvor erfolgte eine Zwischenklonierung in den Vektor pDrive. Da diese Klonierung ungerichtet war, wurde durch einen analytischen Verdau (2.6.7.1) sichergestellt, dass sich das *pta-ack*-Operon in der richtigen Orientierung im Plasmid befand, d.h. Startcodon des *pta-ack*-Operons hinter dem Promoter P_{ptb} .

Erfolgreich klonierte Plasmide, welche mittels eines analytischen Verdaus (2.6.7.1) identifiziert wurden, wurden mit den obengenannten Oligodesoxynukleotiden und „pta-ack-Zwistk1“ und „pta-ack-Zwistk2“ von der Firma GATC Biotech AG, Konstanz sequenziert, um Mutationen auszuschließen.

Vor der Transformation in *A. woodii* und *C. aceticum* wurden die Plasmide pIMP1_pta-ack und pIMP_ptb_pta-ack in *E. coli* JM109 pMCllj und pJIR750_pta-ack aufgrund der vorhandenen Chloramphenicolresistenz in *E. coli* XL1 pMClljS transfomiert und somit *in vivo* methyliert.

**Abbildung 5:** Konstruktion der Überexpressionsplasmide pIMP1_pta-ack und pJIR750_pta-ack

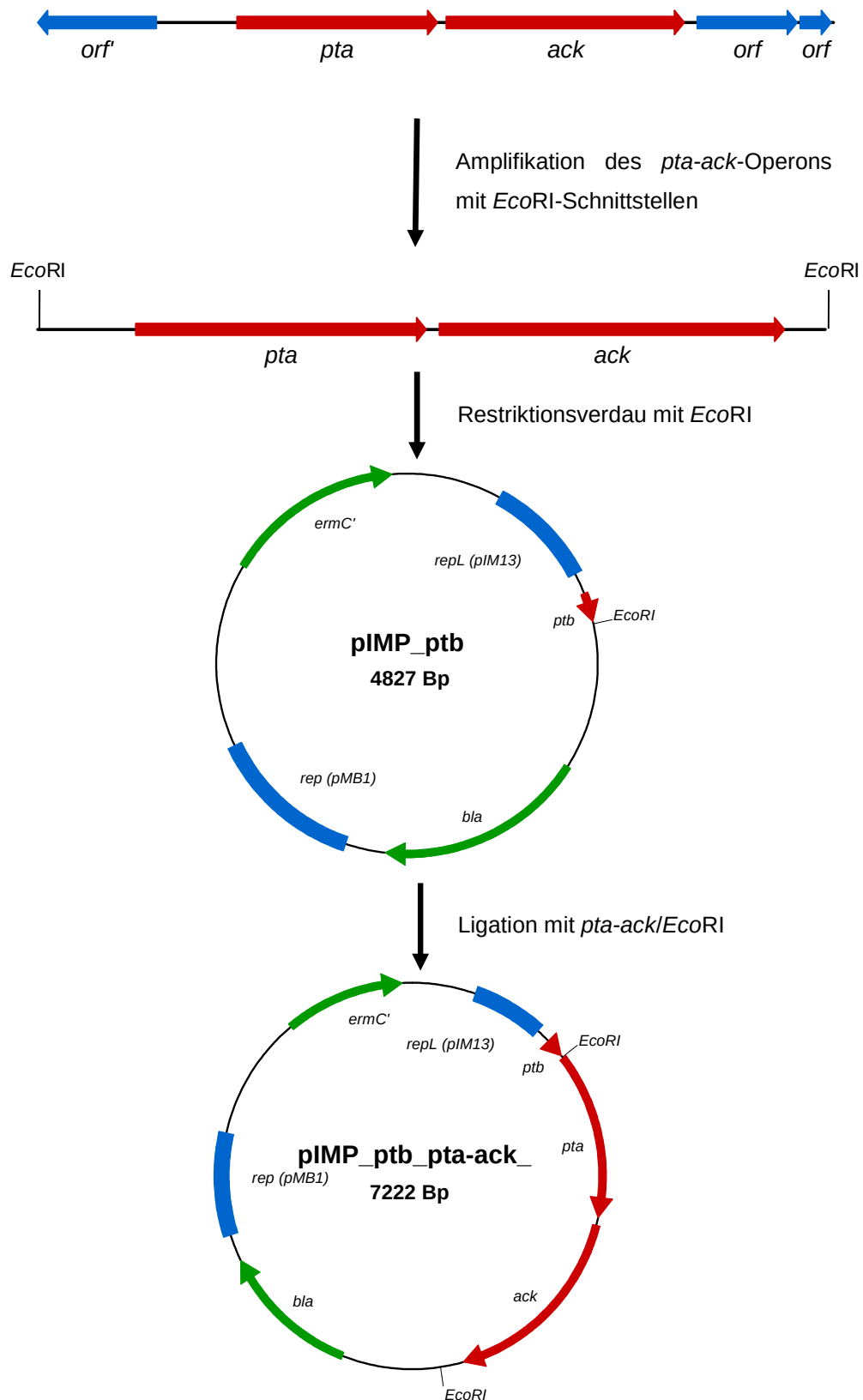


Abbildung 6: Konstruktion des Überexpressionsplasmids pIMP_ptb_pta-ack

3.3.1 Charakterisierung rekombinanter *C. aceticum*-Stämme bei Wachstum auf Fructose

Das Leerplasmid pIMP1 und die Überexpressionsplasmide pIMP1_pta-ack, pJIR750_pta-ack und pIMP_ptb_pta-ack wurden in den Stamm *C. aceticum* WT transformiert. Der Nachweis der Plasmide erfolgte durch eine Plasmidpräparation und eine anschließende Standard-PCR mit den „primern“ „pta-ack_Sall_fw“ und „pta-ack_Sall_rev“ auf das *pta-ack*-Operon.

Nach einer erfolgreichen Transformation wurden 50 ml selektives Medium mit den entsprechenden Stämmen inokuliert und für drei Tage bei 30 °C inkubiert. Für den Wachstumsversuch wurden 50 ml Medium in 125-ml-Müller & Krempel-Flaschen mit Clarithromycin (5 µg/ml) auf eine OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert und das Wachstum photometrisch verfolgt. Um eine Analyse des Produktspektrums durchzuführen, wurden zusätzlich Proben für die gaschromatographische Messung genommen. Das heterotrophe Wachstum der rekombinanten *C. aceticum*-Stämme erfolgte auf Fructose (Abb. 7-9).

Abbildung 7 zeigt das Wachstum der Stämme *C. aceticum* WT, *C. aceticum* pIMP1, *C. aceticum* pIMP1_pta-ack und *C. aceticum* pJIR750_pta-ack. Alle Stämme erreichten eine maximale OD₆₀₀ von 1,1-1,4. Der Kontrollstamm *C. aceticum* pIMP1 und der Stamm *C. aceticum* pJIR750_pta-ack wiesen eine längere „lag“-Phase auf und zeigten erst nach ca. 50 h exponentielles Wachstum, wohingegen die Stämme *C. aceticum* WT und *C. aceticum* pIMP1_pta-ack nach 50 h schon die stationäre Wachstumsphase erreichten.

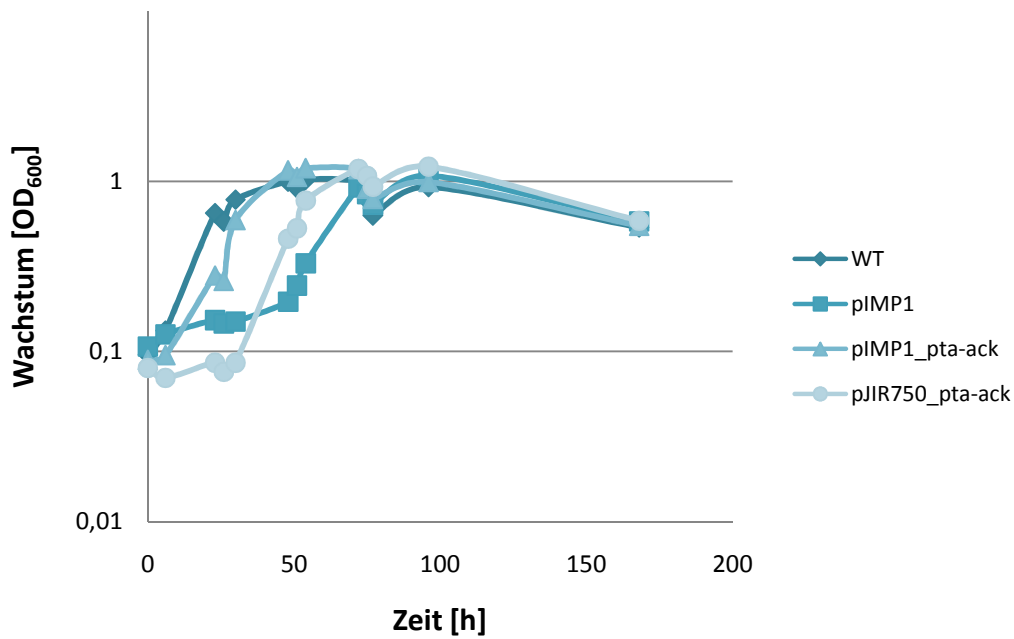


Abbildung 7: Wachstum der Stämme *C. aceticum* WT, *C. aceticum* pIMP1, *C. aceticum* pIMP1_pta-ack und *C. aceticum* pJIR750_pta-ack auf Fructose

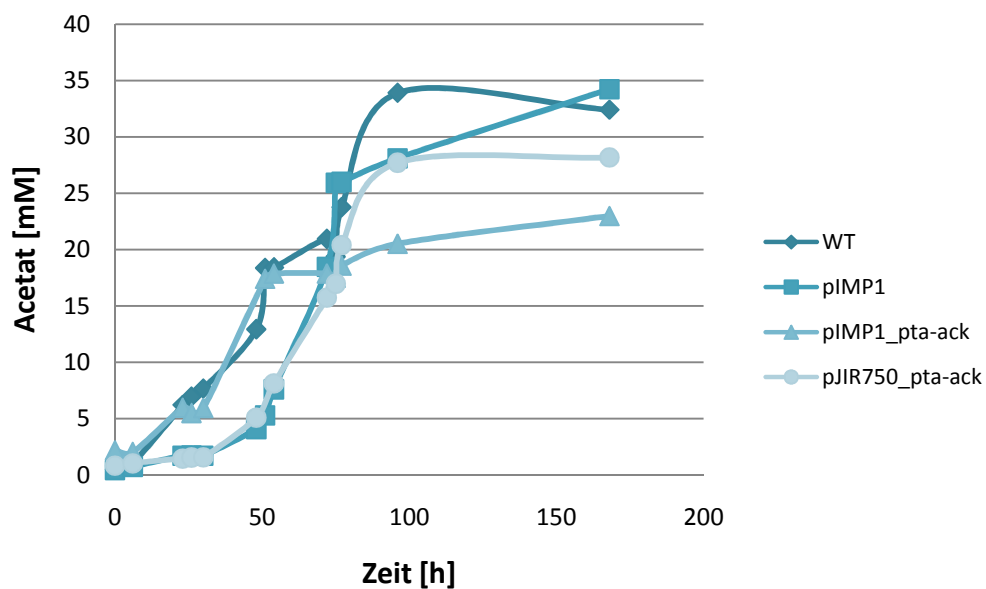


Abbildung 8: Acetatproduktion der Stämme *C. aceticum* WT, *C. aceticum* pIMP1, *C. aceticum* pIMP1_pta-ack und *C. aceticum* pJIR750_pta-ack auf Fructose

In Abbildung 8 ist die Acetatproduktion der einzelnen Stämme zu sehen. Die Stämme *C. aceticum* WT und *C. aceticum* pIMP1 produzierten maximal ca. 34 mM Acetat. Die

beiden Überexpressionsstämmen produzierten weniger Acetat, wobei *C. aceticum* pIMP1_pta-ack maximal 23 mM Acetat und *C. aceticum* pJIR750_pta-ack maximal 28 mM Acetat produzierte. Die „lag“-Phase des Wachstums der Stämme *C. aceticum* pIMP1 und *C. aceticum* pJIR750_pta-ack spiegelte sich auch in der Acetatproduktion wieder, welche ebenfalls versetzt zu den anderen Stämmen einsetzte.

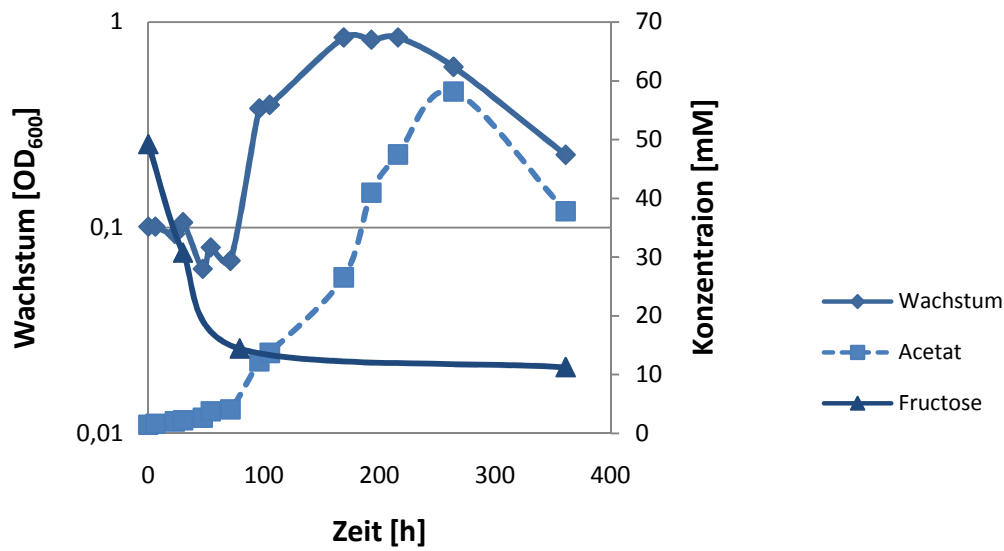


Abbildung 9: Wachstum, Acetatproduktion und Fructoseverbrauch des Stammes *C. aceticum* pIMP_ptb_pta-ack

Abbildung 9 zeigt das Wachstum und Produktspektrum des Überexpressionsstammes *C. aceticum* pIMP_ptb_pta-ack. Dieser Stamm erreichte eine maximale OD₆₀₀ von 0,9 und eine maximale Acetatkonzentration von ca. 58 mM. Die Fructose wurde nicht vollständig verstoffwechselt. Nach 360 h konnten noch rund 10 mM Fructose im Medium nachgewiesen werden.

Zur besseren Anschauung sind die Ergebnisse des Wachstums der rekombinanten *C. aceticum*-Stämme in Tabelle 7 zusammengefasst. Hier ist deutlich zu erkennen, dass der Stamm *C. aceticum* WT mit 1,41 die höchste OD₆₀₀ erreichte. Bei den anderen Stämmen waren durch das Einbringen der Plasmide Wachstumsdefizite zu erkennen. Außerdem ist zu sehen, dass sich die Acetatproduktion des Stammes *C. aceticum* WT und des Stammes *C. aceticum* pIMP1 nicht voneinander unterscheidet und bei ca. 34 mM liegt. Die Stämme mit den

Überexpressionsplasmiden hingegen produzierten mit 23 und 28 mM weniger Acetat, was mit dem Wachstumsdefizit korreliert. Allerdings erreichte der Stamm *C. aceticum* pIMP_ptb_pta-ack Acetatkonzentrationen von 58 mM, trotz der niedrigen OD₆₀₀ von nur 0,9.

Tabelle 7: Zusammenfassung max. OD₆₀₀ und Acetatproduktion der rekombinanten *C. aceticum*-Stämme beim Wachstum auf Fructose im Vergleich zum WT

Stamm	max. OD ₆₀₀	Acetatproduktion [mM]
<i>C. aceticum</i> WT	1,41	33,89
<i>C. aceticum</i> pIMP1	1,08	34,22
<i>C. aceticum</i> pIMP1_pta-ack	1,19	22,97
<i>C. aceticum</i> pJIR750_pta-ack	1,22	28,16
<i>C. aceticum</i> pIMP_ptb_pta-ack	0,90	58,15

3.3.2 Charakterisierung rekombinanter *A. woodii*-Stämme bei Wachstum auf Fructose

Die Leerplasmide pIMP1 und pJIR750 sowie die Überexpressionsplasmide pIMP1_pta-ack, pIMP_ptb_pta-ack und pJIR750_pta-ack wurden in den Stamm *A. woodii* WT transformiert. Nach der Transformation erfolgte eine Plasmidpräparation mit anschließendem Plasmidnachweis über eine Standard-PCR auf das *pta-ack*-Operon.

Zunächst wurden die entsprechenden Kulturen in 50 ml Medium für drei Tage bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden 50 ml selektives Medium mit Fructose in 125-ml-Müller & Krempel-Flaschen mit den entsprechenden Kulturen auf eine OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert. Das Wachstum wurde photometrisch verfolgt und das Produktspektrum gaschromatographisch analysiert. Abbildung 10 zeigt das Wachstum und Produktspektrum der Stämme *A. woodii* WT, *A. woodii* pIMP1, *A. woodii* pIMP1_pta-ack und *A. woodii* pIMP_ptb_pta-ack.

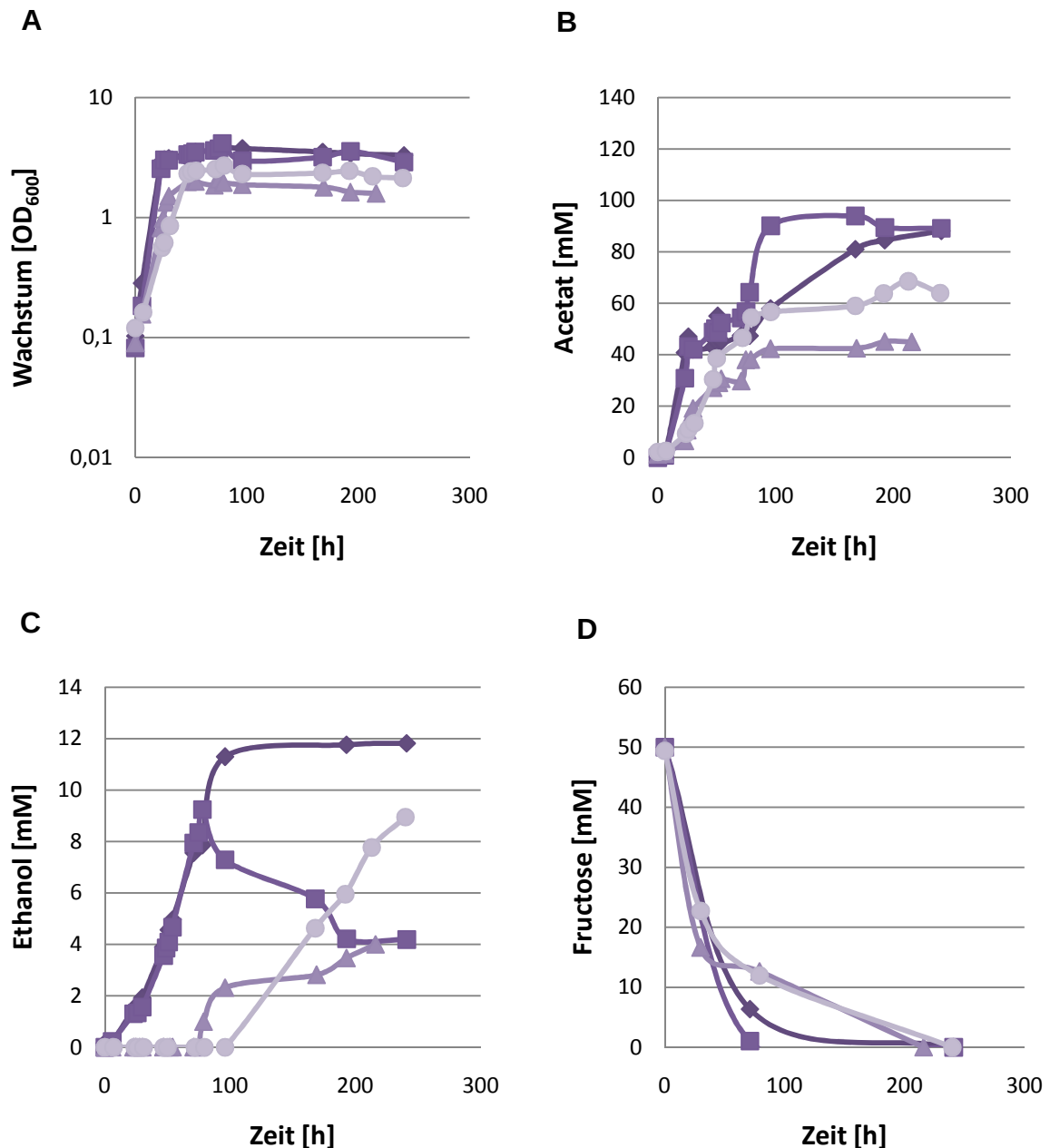


Abbildung 10: A Wachstum, B Acetatproduktion, C Ethanolproduktion und D Fructoseverbrauch der Stämme *A. woodii* WT (—●—), *A. woodii* pIMP1 (—■—), *A. woodii* pIMP1_pta-ack (—▲—) und *A. woodii* pIMP_ptb_pta-ack (—○—)

Abbildung 10A zeigt das Wachstum des Stammes *A. woodii* WT, des Kontrollstammes *A. woodii* pIMP1 und der Überexpressionsstämme *A. woodii* pIMP1_pta-ack und *A. woodii* pIMP_ptb_pta-ack. Durch das Einbringen der Überexpressionplasmide in *A. woodii* WT war ein Wachstumsdefizit von *A. woodii* pIMP1_pta-ack (OD₆₀₀ 2,14) und *A. woodii* pIMP_ptb_pta-ack (OD₆₀₀ 2,49) zu beobachten. Die Stämme *A. woodii* WT und *A. woodii* mit dem Leerplasmid pIMP1

erreichten eine maximale OD₆₀₀ von 3,86. Die maximale Acetatkonzentration der Überexpressionsstämme lag mit ca. 45 mM (*A. woodii* pIMP1_pta-ack) und ca. 75 mM (*A. woodii* pIMP_ptb_pta-ack) unter der max. Acetatkonzentration des Wildtyps (ca. 90 mM) und des Kontrollstammes *A. woodii* pIMP1 (ca. 94 mM). Auch setzte die Acetatproduktion bei den Überexpressionsstämmen leicht verzögert ein (Abbildung 10B). Der Stamm *A. woodii* WT produzierte jedoch mit 12 mM am meisten Ethanol, gefolgt von dem Stamm *A. woodii* pIMP1 mit ca. 9 mM Ethanol. Die Ethanolkonzentrationen der Überexpressionsstämme lagen zwischen 4-8 mM (Abbildung 10C). Auch bei der Fructoseverwertung war ein Unterschied zu erkennen. Die Fructose im Medium der Überexpressionsstämme wurde langsamer verwertet als die Fructose im Medium des Stammes *A. woodii* WT und des Stammes *A. woodii* mit dem Leerplasmid pIMP1, was jedoch mit der längeren „lag“-Phase dieser Stämme korreliert. Bis zum Ende des Wachstums wurde die Fructose von allen Stämmen vollständig verstoffwechselt (Abbildung 10D).

Abbildung 11 zeigt das Wachstum und Produktspektrum der Stämme *A. woodii* WT, *A. woodii* pJIR750 und *A. woodii* pJIR750_pta-ack. Beim Wachstum der einzelnen Stämme ist zu sehen, dass der Kontrollstamm mit dem Leerplasmid pJIR750 eine höhere maximale optische Dichte von 4,78 im Vergleich zu den Stämmen *A. woodii* WT (OD₆₀₀ 3,86) und *A. woodii* pJIR750_pta-ack (OD₆₀₀ 3,85) erreichte. Durch die pJIR750-basierten Plasmide wurde somit kein Wachstumsdefizit ausgelöst (Abbildung 11A). Der Stamm *A. woodii* pJIR750 erreichte mit etwa 124 mM Acetat die höchste Acetatkonzentration. Der Stamm *A. woodii* WT produzierte lediglich 89 mM, der Überexpressionsstamm *A. woodii* pJIR750_pta-ack ca. 95 mM Acetat (Abbildung 11B). Die maximale Ethanolkonzentration lag bei dem Stamm *A. woodii* WT bei etwa 12 mM, beim Kontrollstamm *A. woodii* pJIR750 bei ca. 9 mM und beim Überexpressionsstamm bei 13 mM (Abbildung 11C). Bei der Verwertung der Fructose konnten keine Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen festgestellt werden. Bis zum Ende des Wachstums wurde die Fructose von allen Stämmen vollständig verstoffwechselt (Abbildung 11D).

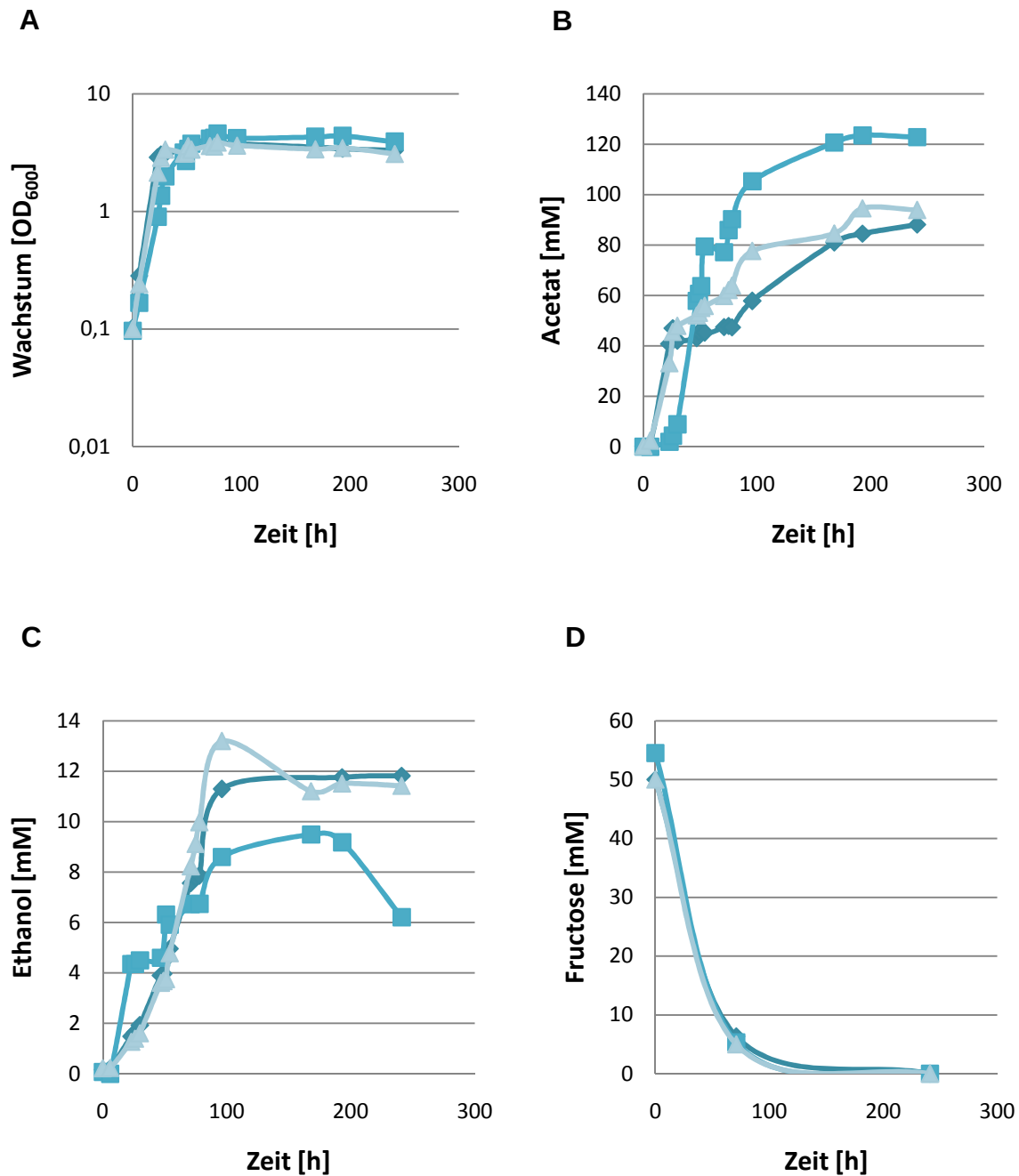


Abbildung 11: **A** Wachstum, **B** Acetatproduktion, **C** Ethanolproduktion und **D** Fructoseverbrauch der Stämme *A. woodii* WT (—◆—), *A. woodii* pJIR750 (—■—) und *A. woodii* pJIR750_pta-ack (—▲—)

Zur besseren Übersicht sind die Ergebnisse des Wachstums auf Fructose und die Acetatkonzentration aller rekombinanter *A. woodii*-Stämme in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8: Zusammenfassung von max. OD₆₀₀ und Acetatproduktion der rekombinanten *A. woodii*-Stämme beim Wachstum auf Fructose im Vergleich zum WT

Stamm	max. OD ₆₀₀	Acetatproduktion [mM]
<i>A. woodii</i> WT	3,86	89,52
<i>A. woodii</i> pIMP1	3,86	93,95
<i>A. woodii</i> pJIR750	4,78	123,51
<i>A. woodii</i> pIMP1_pta-ack	2,14	45,12
<i>A. woodii</i> pJIR750_pta-ack	3,85	94,55
<i>A. woodii</i> pIMP_ptb_pta-ack	2,49	74,73

In Tabelle 8 ist deutlich zu sehen, dass durch das Einbringen der beiden pIMP1-basierten Plasmide in den Stamm *A. woodii* WT sowohl Wachstumsdefizite als auch eine geringere Acetatproduktion zu beobachten waren. *A. woodii* mit dem Leerplasmid pJIR750 erreichte die höchste optische Dichte (OD₆₀₀ 4,78) und die höchste maximale Acetatkonzentration von 123 mM.

3.3.3 Charakterisierung rekombinanter *A. woodii*-Stämme bei Wachstum auf Fructose („fed-batch“)

Um zu überprüfen, ob die Acetatproduktion bzw. die maximale Acetatkonzentration der einzelnen *A. woodii*-Stämme durch die Fructosekonzentration im Medium begrenzt wird, wurde ein „fed-batch“-Versuch durchgeführt, bei welchem in regelmäßigen Abständen frische Fructose (50 mM) dem Medium zugegeben wurde. Abbildung 12 zeigt Wachstum, Acetat- bzw. Ethanolproduktion und Fructoseverwertung der Stämme *A. woodii* WT, *A. woodii* pIMP1, *A. woodii* pJIR750, *A. woodii* pIMP1_pta-ack und *A. woodii* pJIR750_pta-ack.

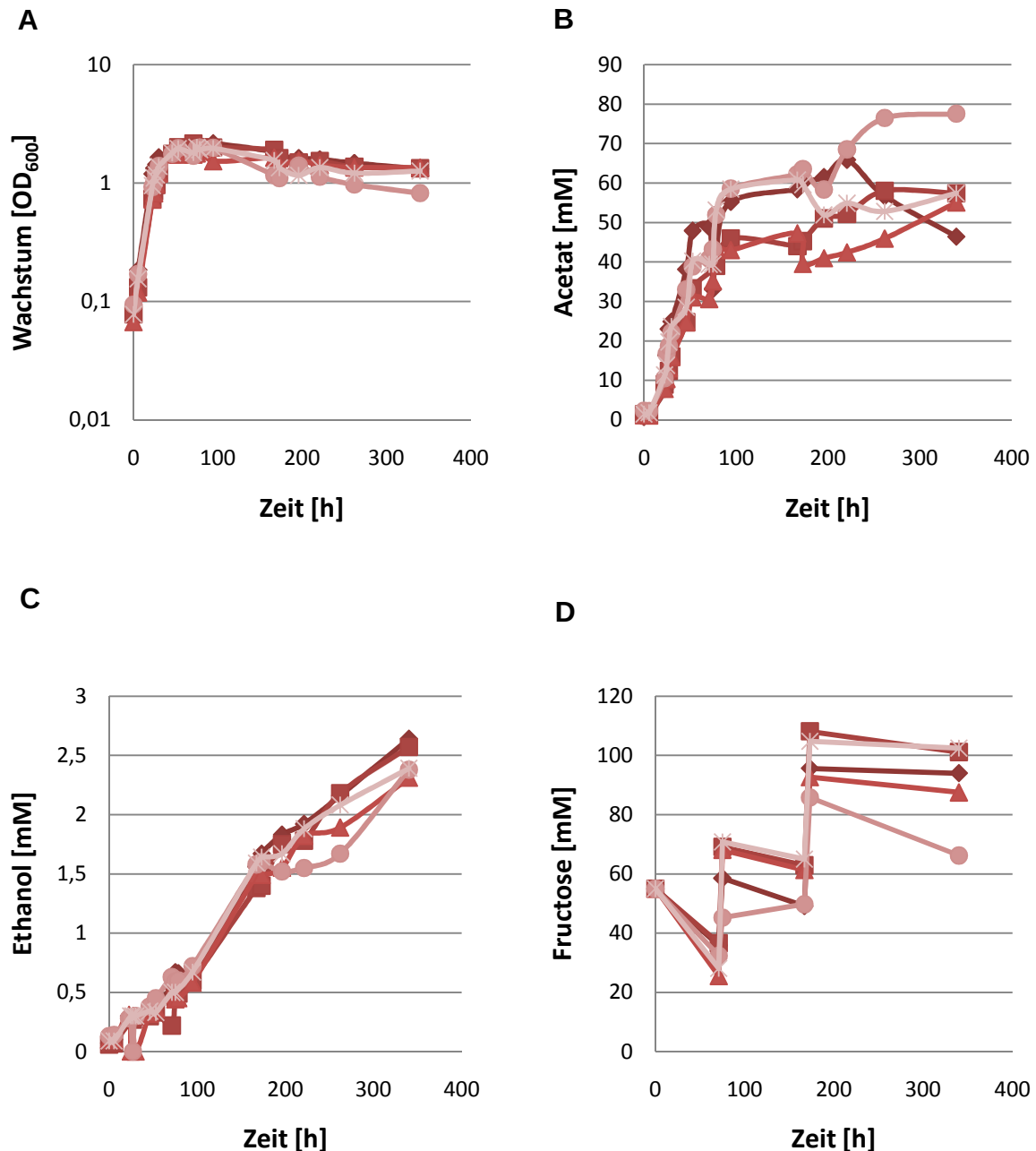


Abbildung 12: A Wachstum, B Acetatproduktion, C Ethanolproduktion und D Fructoseverbrauch der Stämme *A. woodii* WT (—●—), *A. woodii* pIMP1 (—■—), *A. woodii* pIMP1_ata-ack (—▲—), *A. woodii* pJIR750 (—○—) und *A. woodii* pJIR750_ata-ack (—✱—)

Beim Wachstum der rekombinanten *A. woodii*-Stämme im „fed-batch“-Versuch waren keine signifikanten Unterschiede untereinander zu erkennen. Alle Stämme erreichten eine maximale OD₆₀₀ von ca. 2,0 (Abbildung 12A). Diese maximale OD₆₀₀ lag jedoch deutlich unter der maximalen OD₆₀₀, welche die Stämme beim Wachstum ohne weitere Fructosezugabe erreichten (OD₆₀₀ 2,2-4,8; siehe Kapitel 3.3.2). Somit trat bei allen Stämmen durch die zusätzliche Zugabe von Fructose eine Hemmung des

Wachstums auf. Außerdem ist zu erkennen, dass die Stämme im „fed-batch“-Versuch weniger Acetat produzierten (Abbildung 12B) als beim Wachstum ohne weiterer Fructosezugabe. Hier lag z.B. die maximale Acetatkonzentration des Stammes *A. woodii* pJIR750 bei ca. 123 mM. Im Vergleich dazu lag diese im „fed-batch“-Versuch bei nur 78 mM. Ab der ersten Fructosezugabe stoppte die Fructoseaufnahme fast vollständig und die Fructose wurde nicht mehr weiter verstoffwechselt (Abbildung 12D). Die Ethanolkonzentration lag am Ende des Wachstums bei allen Stämmen bei ca. 2,5 mM (Abbildung 12C).

In Tabelle 9 sind die Ergebnisse des „fed-batch“-Experimentes zusammengefasst.

Tabelle 9: Zusammenfassung max. OD₆₀₀ und Acetatproduktion der rekombinanten *A. woodii*-Stämme beim „fed-batch“-Wachstum auf Fructose im Vergleich zum WT

Stamm	max. OD ₆₀₀	Acetatproduktion
		[mM]
<i>A. woodii</i> WT	2,16	65,83
<i>A. woodii</i> pIMP1	1,99	58,02
<i>A. woodii</i> pJIR750	1,99	77,52
<i>A. woodii</i> pIMP1_pta-ack	2,03	55,03
<i>A. woodii</i> pJIR750_pta-ack	1,96	60,80

3.3.4 Charakterisierung rekombinanter *A. woodii*-Stämme bei Wachstum auf CO₂/H₂

Da *A. woodii* in der Lage ist, CO₂/H₂ als Kohlenstoffquelle zu verwerten (Balch *et al.*, 1977), wurden Wachstumsversuche der rekombinanten *A. woodii*-Stämme auf CO₂/H₂ durchgeführt. Als Referenz diente der Stamm *A. woodii* WT. Hierzu wurden 50 ml selektives Medium ohne Fructose in 500-ml-Müller & Krempel-Flaschen mit den Kulturen auf eine OD₆₀₀ von etwa 0,02-0,04 inokuliert. Zuvor wurden die 500-ml-Müller & Krempel-Flaschen mit der CO₂/H₂-Gas Mischung (33 %:67 %) befüllt, bis ein Überdruck durch die Wölbung des Gummistopfens zu erkennen war.

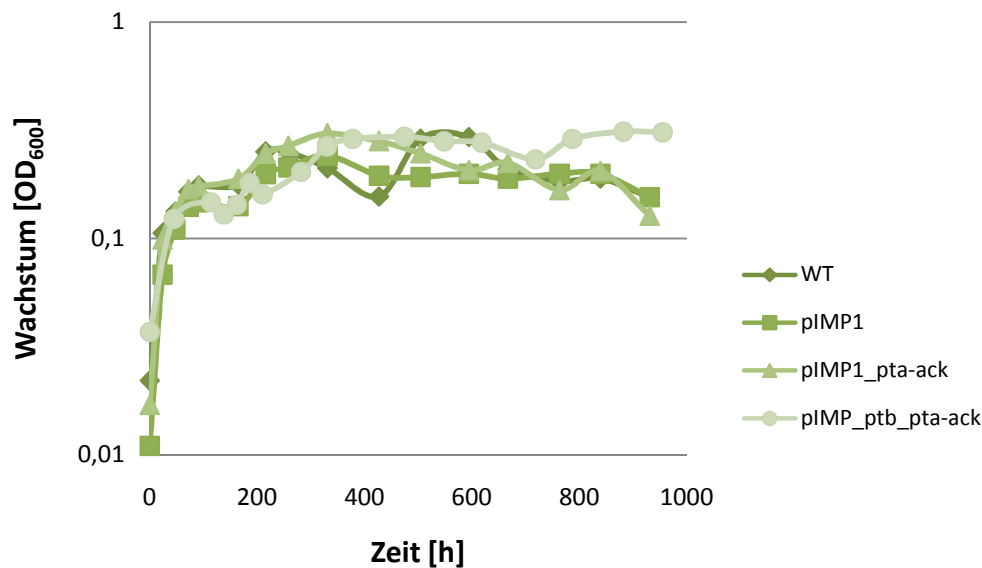


Abbildung 13: Wachstum der Stämme *A. woodii* WT, *A. woodii* pIMP1, *A. woodii* pIMP1_pta-ack und *A. woodii* pIMP_ptb_pta-ack auf CO₂/H₂

Abbildung 13 zeigt das Wachstum der Stämme *A. woodii* WT, *A. woodii* pIMP1, *A. woodii* pIMP1_pta-ack und *A. woodii* pIMP_ptb_pta-ack auf CO₂/H₂. Beim Wachstum des Stammes *A. woodii* WT und der Stämme mit den eingebrachten pIMP1-basierten Plasmiden war kein signifikanter Unterschied zu erkennen. Alle Stämme erreichten eine maximale OD₆₀₀ von etwa 0,3.

Abbildung 14 zeigt jedoch Unterschiede in der Acetatproduktion. Der Stamm *A. woodii* WT produzierte maximal 116 mM Acetat. Der Kontrollstamm *A. woodii* pIMP1 produzierte maximal 103 mM Acetat, somit reduzierte sich die Acetatproduktion um 13 mM durch das Einbringen des Plasmids pIMP1 in den Wildtyp-Stamm. Der Überexpressionsstamm *A. woodii* pIMP1_pta-ack produzierte maximal 126 mM Acetat, somit 10 mM mehr Acetat im Vergleich zum Wildtyp. Der Überexpressionsstamm *A. woodii* pIMP_ptb_pta-ack produzierte nur 79 mM, was deutlich unter den maximalen Acetatkonzentrationen der anderen Stämme lag. Somit konnte keine Steigerung der Acetatproduktion durch den Promoter P_{ptb} erreicht werden.

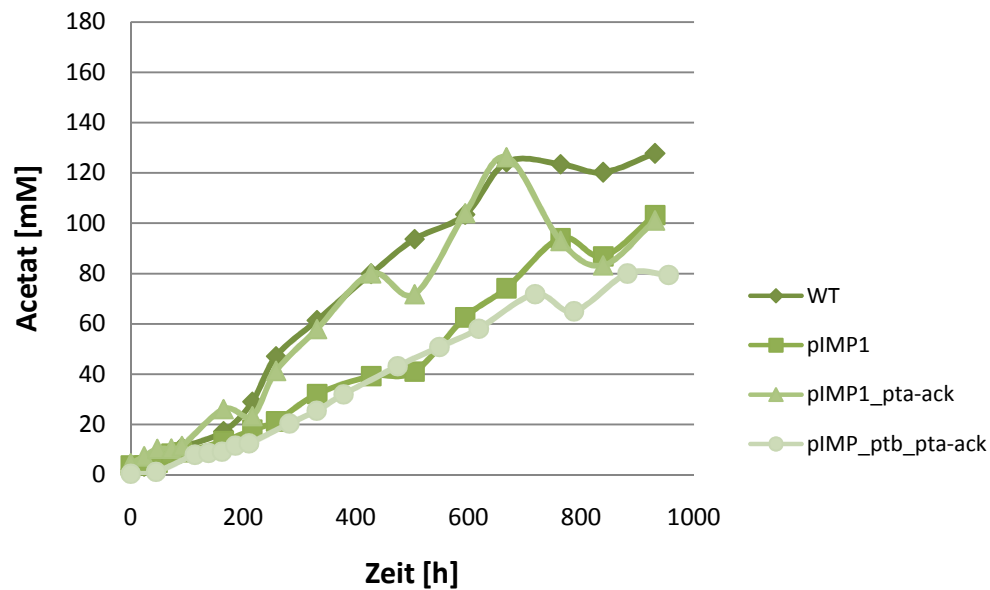


Abbildung 14: Acetatproduktion der Stämme *A. woodii* WT, *A. woodii* pIMP1, *A. woodii* pIMP1_pta-ack und *A. woodii* pIMP_ptb_pta-ack beim Wachstum auf CO₂/H₂

In Abbildung 15 ist das Wachstum des Stammes *A. woodii* WT, des Kontrollstammes *A. woodii* mit dem Leerplasmid pJIR750 und des Überexpressionsstammes *A. woodii* pJIR750_pta-ack zu sehen. Sowohl der Überexpressionsstamm *A. woodii* pJIR750_pta-ack als auch der Kontrollstamm erreichten höhere maximale optische Dichten verglichen mit dem Wildtyp. Beide Stämme erreichten eine maximale OD₆₀₀ von 0,37-0,38 im Vergleich zum Wildtyp mit einer maximalen OD₆₀₀ von 0,29.

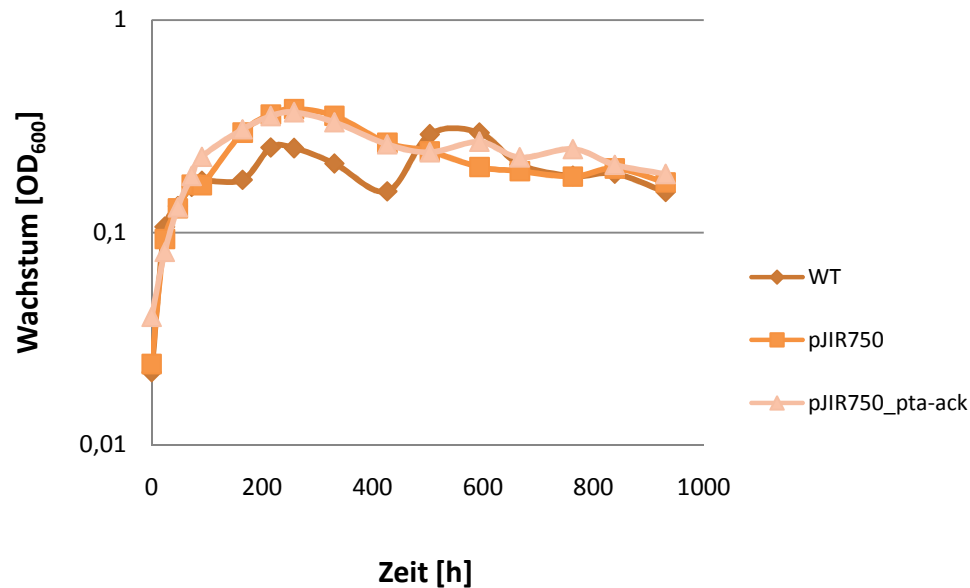


Abbildung 15: Wachstum der Stämme *A. woodii* WT, *A. woodii* pJIR750 und *A. woodii* pJIR750_pta-ack auf CO₂/H₂

Die höhere optische Dichte der Stämme *A. woodii* pJIR750 und *A. woodii* pJIR750_pta-ack spiegelte sich auch in der Acetatproduktion wieder. So produzierte der Stamm *A. woodii* pJIR750 maximal 136 mM Acetat und der Überexpressionstamm *A. woodii* pJIR750_pta-ack 160 mM, somit 44 mM mehr Acetat als der Wildtyp mit 116 mM (Abbildung 16).

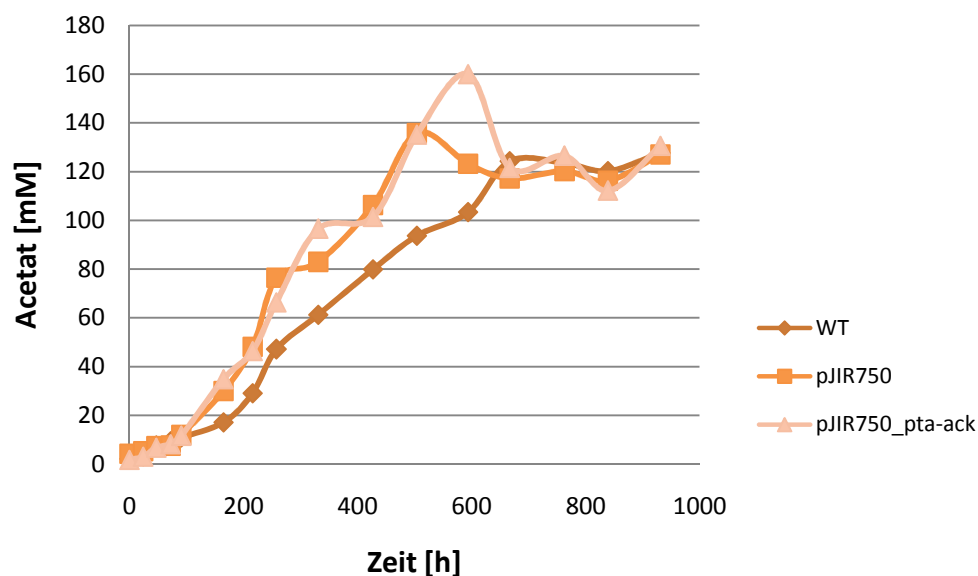


Abbildung 16: Acetatproduktion der Stämme *A. woodii* WT, *A. woodii* pJIR750 und *A. woodii* pJIR750_pta-ack beim Wachstum auf CO₂/H₂

In Tabelle 10 sind die Ergebnisse aller Stämme beim Wachstum auf CO_2/H_2 zusammengefasst. Die Stämme, welche pJIR750-basierte Plasmide besitzen, erreichten deutlich höhere optische Dichten und somit auch höhere maximale Acetatkonzentrationen. Außerdem wurde die Acetatproduktion durch das Entfernen des nativen Promoters verschlechtert, wie der Stamm *A. woodii* pIMP_ptb_pta-ack deutlich zeigte.

Tabelle 10: Zusammenfassung max. OD_{600} und Acetatproduktion der rekombinanten *A. woodii*-Stämme beim Wachstum auf CO_2/H_2 im Vergleich zum WT

Stamm	max. OD_{600}	Acetatproduktion
		[mM]
<i>A. woodii</i> WT	0,294	116,50
<i>A. woodii</i> pIMP1	0,241	103,23
<i>A. woodii</i> pJIR750	0,381	135,86
<i>A. woodii</i> pIMP1_pta-ack	0,305	126,28
<i>A. woodii</i> pJIR750_pta-ack	0,367	160,00
<i>A. woodii</i> pIMP_ptb_pta-ack	0,311	79,47

3.4 Konstruktion von Überexpressionsplasmiden für die Erhöhung der Acetatproduktion durch verbesserten Formiatabbau in *A. woodii*

Die Kooperationspartner der Technischen Universität, München konnten zeigen, dass es bei der Fermentation des Stammes *A. woodii* WT auf CO_2/H_2 zu einer Akkumulation von Formiat im Medium kommt. Aus diesem Grund sollten die Gene, welche für die Formyl-THF-Synthetase, die Methenyl-THF-Cyclohydrolase, die Methylen-THF-Dehydrogenase und die Methylen-THF-Reduktase kodieren, überexprimiert werden, um somit den Formiatabbau und letztendlich die Acetatproduktion zu beschleunigen bzw. zu verbessern. Diese THF-abhängigen Enzyme (rot) katalysieren den Abbau von Formiat zu Acetyl-CoA im Wood-Ljungdahl-Weg (Abbildung 17, Ljungdahl, 1986).

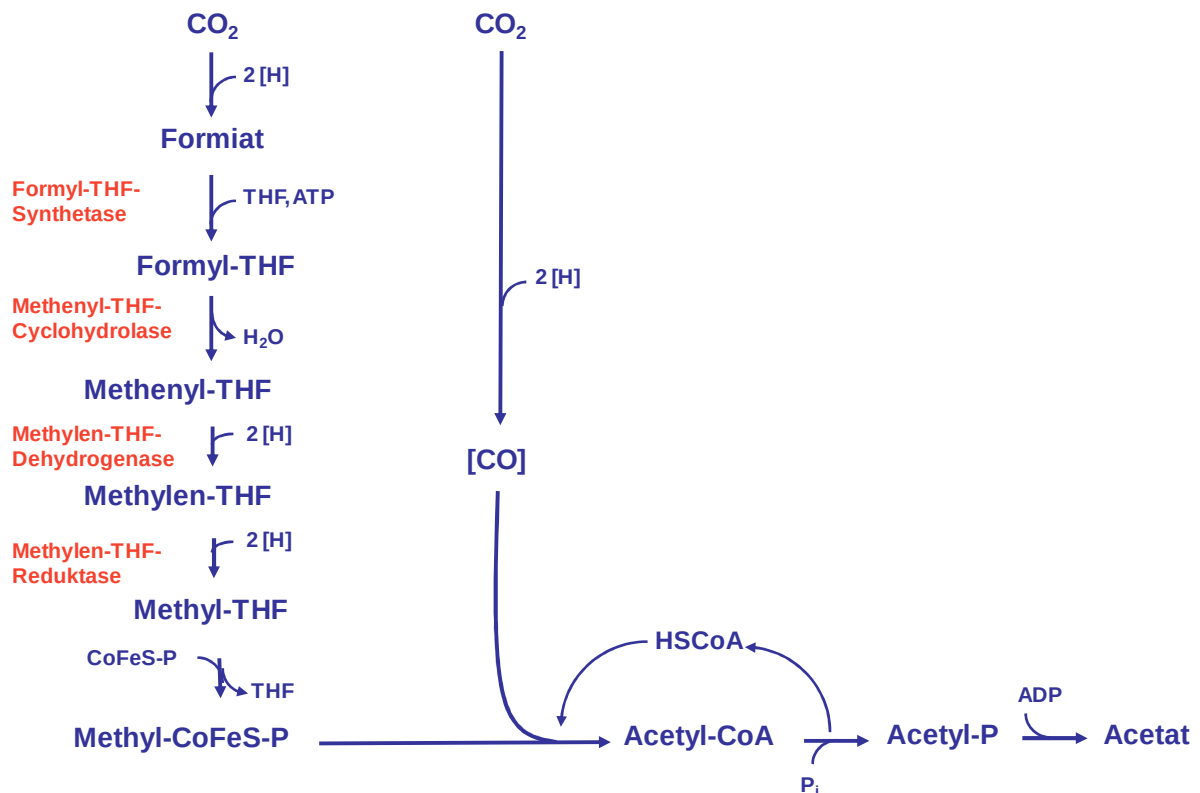


Abbildung 17: Wood-Ljungdahl-Weg, Überproduktion der Enzyme (rot) zur Verbesserung des Formiatabbaus

Da zum Zeitpunkt dieser Arbeit das Genom des Stammes *A. woodii* zwar entschlüsselt (Schmidt, 2011) jedoch nicht veröffentlicht war, wurde mit den entsprechenden Gensequenzen aus dem Genom des Stammes *C. ljungdahlii* gearbeitet. Die Gene, welche für die oben genannten Enzyme kodieren, wurden mittels der Oligodesoxynukleotide „THF_kompl1_fw“ und „THF_kompl1_rev“ über eine Standard-PCR mit chromosomaler DNA von *C. ljungdahlii* als Matrize amplifiziert und *Bam*HI-Schnittstellen an das Fragment angefügt. Anschließend erfolgte die Ligation des *Bam*HI-geschnittenen Fragments in die ebenfalls durch einen *Bam*HI-Restriktionsverdau erhaltenen, linearisierten Vektoren pIMP1 und pJIR750 (Abbildung 18).

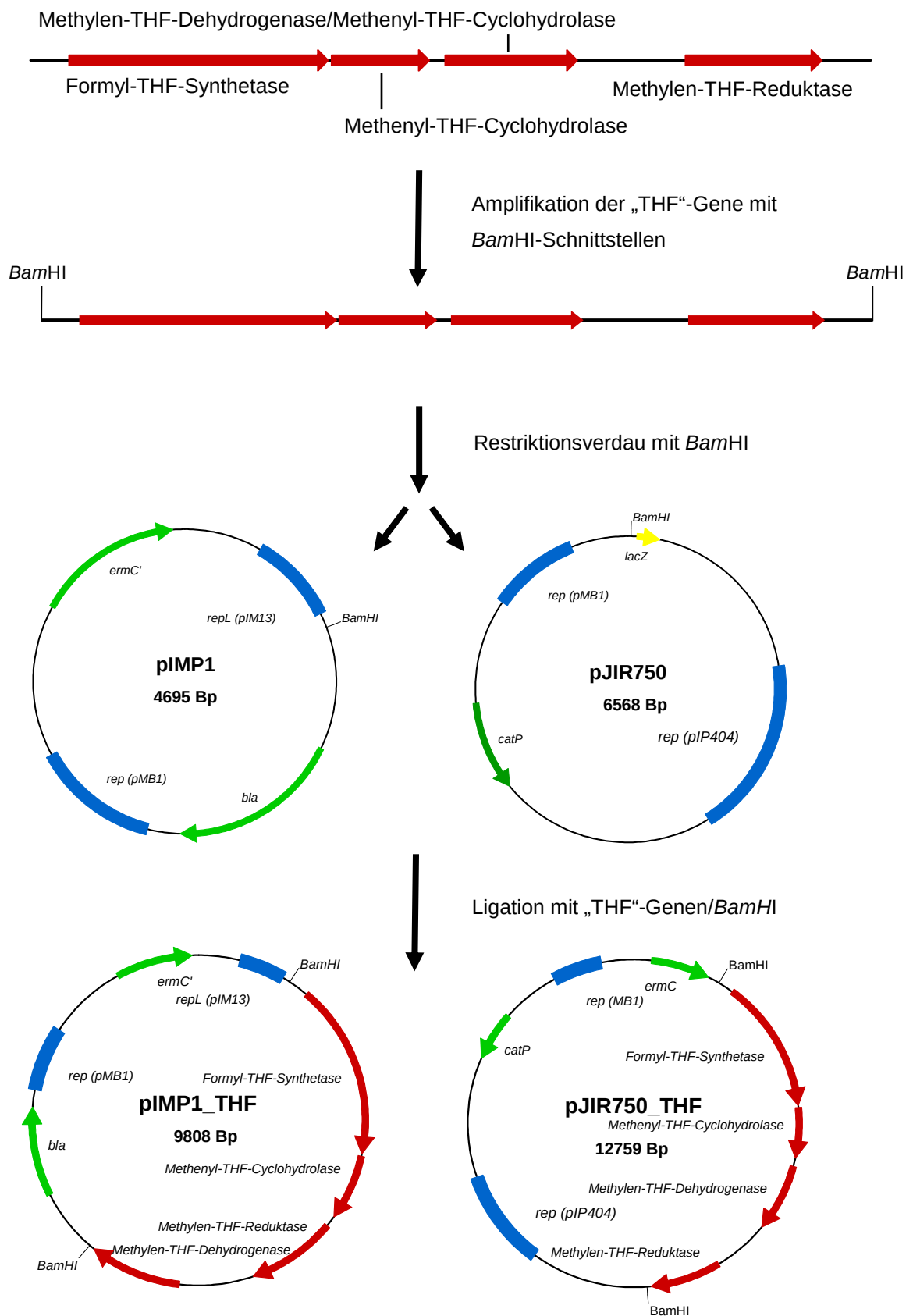


Abbildung 18: Konstruktion der Überexpressionsplasmide pIMP1_THF und pJIR750_THF

Um eine eventuelle Steigerung des Formiatabbaus bzw. der Acetatproduktion zu erreichen, wurde der native Promoter durch den Promoter der Phosphotransbutyrylase (P_{ptb}) aus *C. acetobutylicum* ausgetauscht. Hierzu wurden die Gene, welche für die Formyl-THF-Synthetase, die Methenyl-THF-Cyclohydrolase, die Methylen-THF-Dehydrogenase und die Methylen-THF-Reduktase kodieren, mittels der Oligodesoxynukleotide „THF_EcoRI_fw“ und „THF_EcoRI_rev“ über einen PCR-Ansatz amplifiziert und das Fragment mit *EcoRI*-Schnittstellen versehen. Das *EcoRI*-geschnittene Fragment wurde anschließend in den ebenfalls *EcoRI*-geschnittenen Vektor pIMP_ptb ligiert (Abbildung 19).

Nach erfolgreicher Klonierung wurden die Plasmide durch die Firma GATC Biotech AG, Konstanz mit den obengenannten „primern“ und den „primern“ „SP2_THF“, „SP3_THF“, „SP4_THF“ und „SP5_THF“ sequenziert, um Mutationen auszuschließen. Vor der Transformation der Plasmide erfolgte eine *in vivo* Methylierung in *E. coli* XL1 pMC1j oder *E. coli* XL1 pMC1jS.

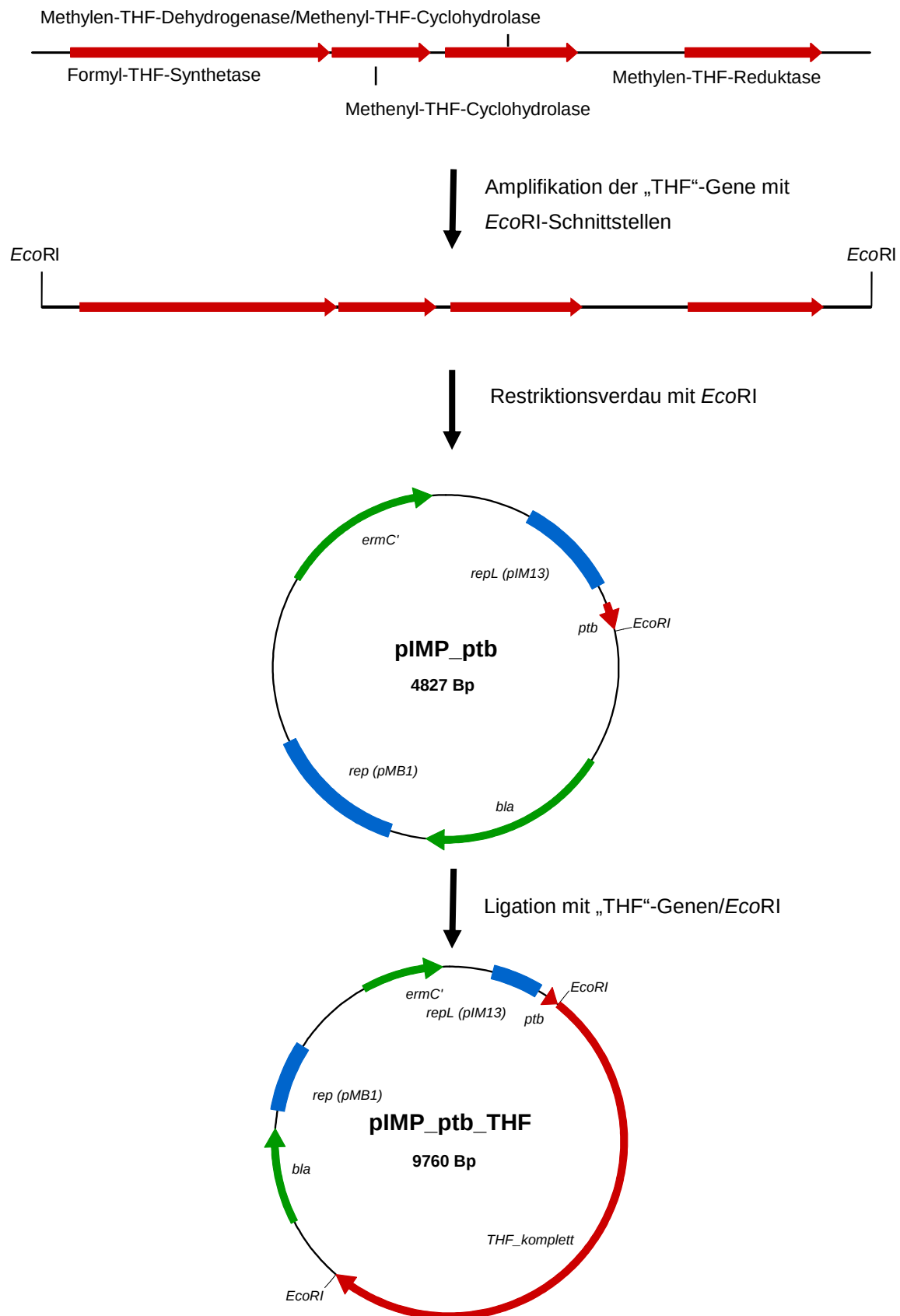


Abbildung 19: Konstruktion des Überexpressionsplasmids pIMP_ptb_THF

3.4.1 Charakterisierung rekombinanter *A.woodii*-Stämme bei Wachstum auf Fructose

Die Leerplasmide pIMP1 und pJIR750 sowie die Überexpressionsplasmide pIMP1_THF, pJIR750_THF und pIMP_ptb_THF wurden in den Stamm *A. woodii* WT transformiert. Der Nachweis der Plasmide erfolgte durch eine Plasmidpräparation und eine anschließende Kontroll-PCR mit den Oligodesoxynukleotiden „THF_EcoRI_fw“ und „THF_EcoRI_rev“.

Anschließend erfolgten Wachstumsversuche, wofür die entsprechenden Stämme zunächst in 50 ml selektivem Medium für drei Tage bei 30 °C inkubiert wurden und anschließend in 50 ml selektivem Medium mit Fructose in 125-ml-Müller & Krempel-Flaschen auf eine OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert wurden. Das Wachstum wurde photometrisch verfolgt und zusätzlich Proben für die gaschromatographische Analyse genommen.

In Abbildung 20 sind das Wachstum, die Acetat- und Ethanolproduktion sowie der Fructoseverbrauch zu sehen.

Die maximale OD₆₀₀ der Stämme *A. woodii* WT, *A. woodii* pIMP1 und *A. woodii* pIMP1_THF lag bei etwa 3,6-3,8. Nur der Stamm *A. woodii* pIMP_ptb_THF zeigte ein Wachstumsdefizit. Dieser Stamm erreichte eine maximale OD₆₀₀ von nur 2,7 (Abbildung 20A). Dieses Wachstumsdefizit spiegelte sich auch in der Acetatproduktion wieder. So produzierte dieser Stamm lediglich ca. 54 mM Acetat. Die maximale Acetatkonzentration des Wildtyps lag bei ca. 90 mM. Ebenso lag die maximale Acetatproduktion des Stammes *A. woodii* pIMP1 bei ca. 94 mM. Auch der Stamm *A. woodii* pIMP1_THF lag mit maximal 78 mM Acetat unter der Acetatproduktion des Wildtyps und des Kontrollstammes mit dem Leerplasmid pIMP1 (Abbildung 20B). Der Stamm *A. woodii* pIMP_ptb_THF produzierte jedoch am meisten Ethanol. Am Ende des Wachstums wurden 17 mM Ethanol gemessen, was deutlich über der maximalen Ethanolkonzentration des Wildtyps (12 mM) und des Kontrollstammes mit dem Leerplasmid pIMP1 (9 mM) lag (Abbildung 20C). Bei der Fructoseverwertung waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen zu erkennen. Am Ende des Wachstums ist die Fructose von allen Stämmen vollständig verstoffwechselt worden (Abbildung 20D).

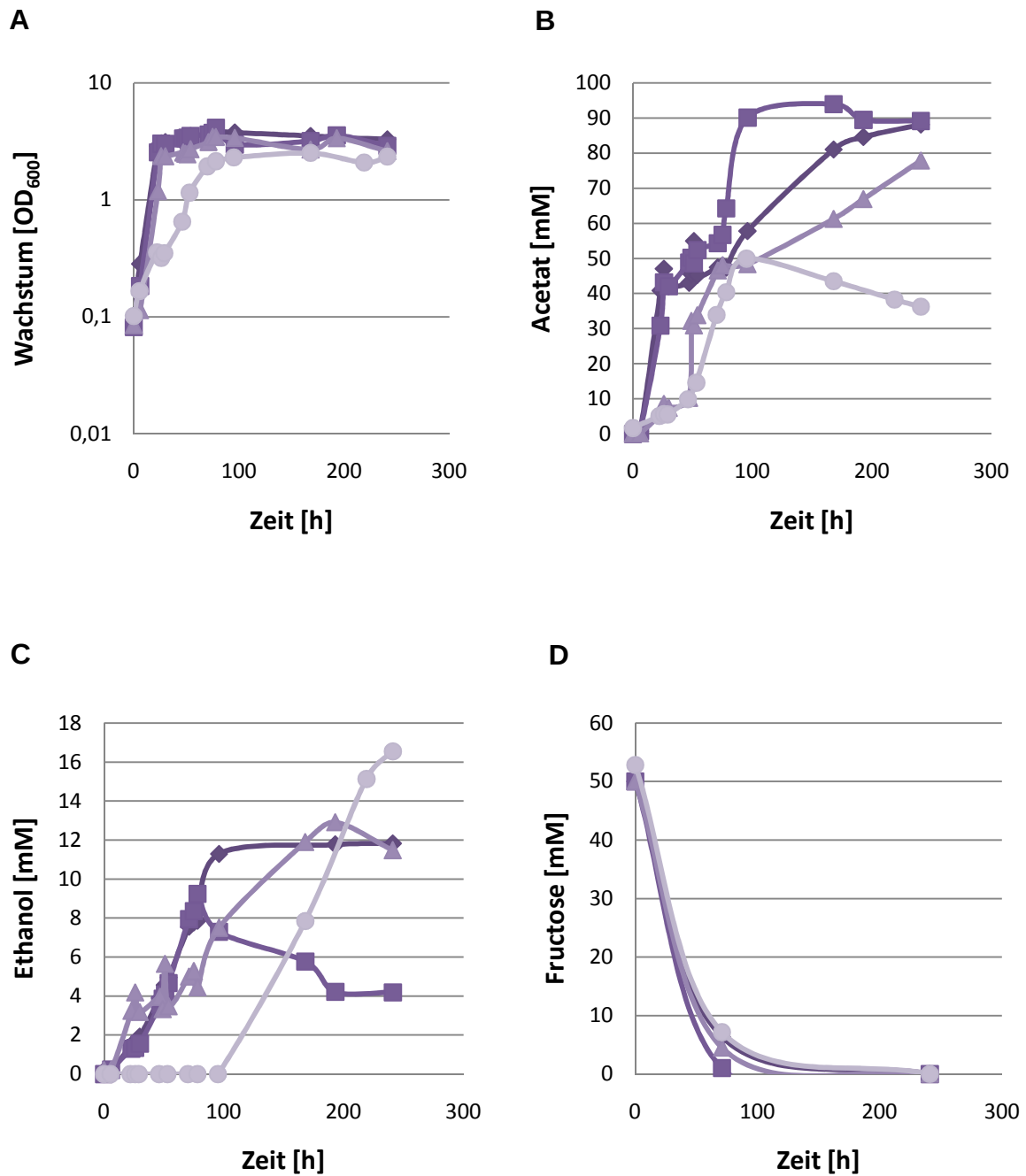


Abbildung 20: **A** Wachstum, **B** Acetatproduktion, **C** Ethanolproduktion und **D** Fructoseverbrauch der Stämme *A. woodii* WT (—◆—), *A. woodii* pIMP1 (—■—), *A. woodii* pIMP1_THF (—▲—) und *A. woodii* pIMP_ptb_THF (—●—)

In Abbildung 21 sind das Wachstum, die Acetat-, die Ethanolproduktion und der Fructoseverbrauch der Stämme *A. woodii* WT, *A. woodii* pJIR750 und *A. woodii* pJIR750_THF zu sehen.

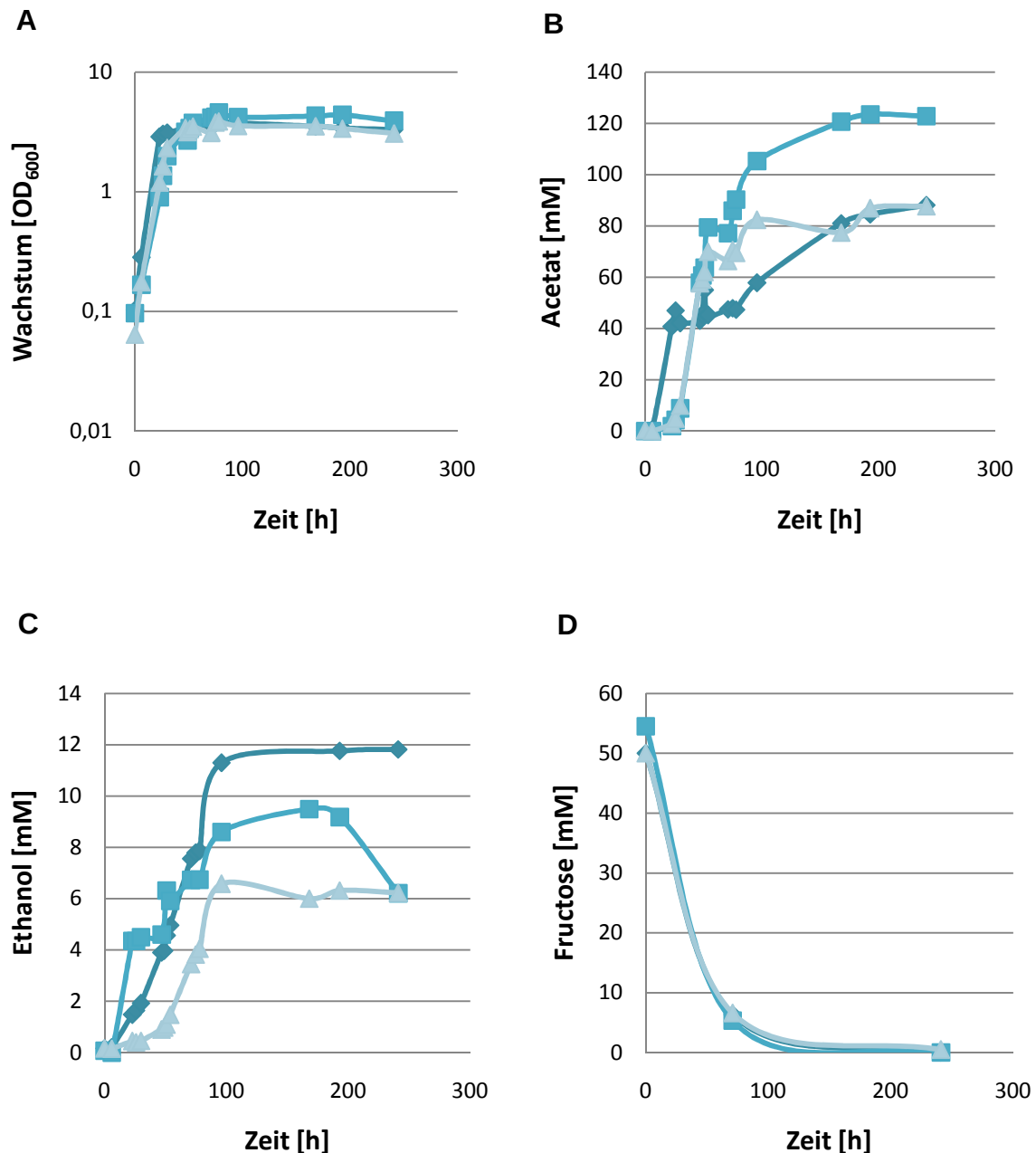


Abbildung 21: **A** Wachstum, **B** Acetatproduktion, **C** Ethanolproduktion und **D** Fructoseverbrauch der Stämme *A. woodii* WT (—◆—), *A. woodii* pJIR750 (—■—) und *A. woodii* pJIR750_THF (—▲—)

Alle drei Stämme zeigten ein ähnliches Wachstumsverhalten und erreichten eine maximale OD₆₀₀ von 3,8-3,9 (Abbildung 21A). Der Kontrollstamm *A. woodii* pJIR750 produzierte jedoch mit knapp 124 mM am meisten Acetat, verglichen mit dem Wildtyp (89 mM) und dem Überexpressionsstamm *A. woodii* pJIR750_THF (88 mM) (Abbildung 21B). Auch produzierte der Stamm *A. woodii* pJIR750_THF im Vergleich zu den anderen Stämmen mit ca. 7 mM am wenigsten Ethanol (Abbildung 21C). Bei der Verwertung der Fructose waren keine Unterschiede zu erkennen. Am Ende des

Wachstums ist die Fructose von allen Stämmen vollständig verstoffwechselt worden (Abbildung 21D).

Zur besseren Anschauung sind die Ergebnisse aller Stämme in Tabelle 11 zusammengefasst. Hier ist nun deutlich zu sehen, dass durch die Überexpression der formiatabbauenden Gene keine Erhöhung der Acetatproduktion erreicht werden konnte. Der Stamm *A. woodii* pIMP_ptb_THF, welcher den Promoter P_{ptb} besitzt, produzierte nur noch 54 mM Acetat.

Tabelle 11: Zusammenfassung max. OD₆₀₀ und Acetatproduktion der rekombinanten *A. woodii*-Stämme beim Wachstum auf Fructose im Vergleich zum WT

Stamm	max. OD ₆₀₀	Acetatproduktion [mM]
<i>A. woodii</i> WT	3,86	89,52
<i>A. woodii</i> pIMP1	3,86	93,95
<i>A. woodii</i> pJIR750	4,78	123,51
<i>A. woodii</i> pIMP1_THF	3,65	77,85
<i>A. woodii</i> pJIR750_THF	3,95	87,67
<i>A. woodii</i> pIMP_ptb_THF	2,66	54,17

3.4.2 Charakterisierung rekombinanter *A. woodii*-Stämme bei Wachstum auf Fructose („fed-batch“)

Auch mit den Stämmen *A. woodii* pIMP1_THF und *A. woodii* pJIR750_THF wurde ein „fed-batch“-Versuch durchgeführt, um zu überprüfen, ob es sich bei der Fructose um den limitierenden Faktor in der Acetatproduktion handelt. Bei diesem Wachstumsversuch wurde dem Medium in regelmäßigen Abständen frische Fructose (50 mM) zugeführt.

Abbildung 22 zeigt das Wachstum, die Acetat-, die Ethanolproduktion und die Fructoseverwertung der Stämme *A. woodii* WT, *A. woodii* pIMP1, *A. woodii* pJIR750, *A. woodii* pIMP1_THF und *A. woodii* pJIR750_THF.

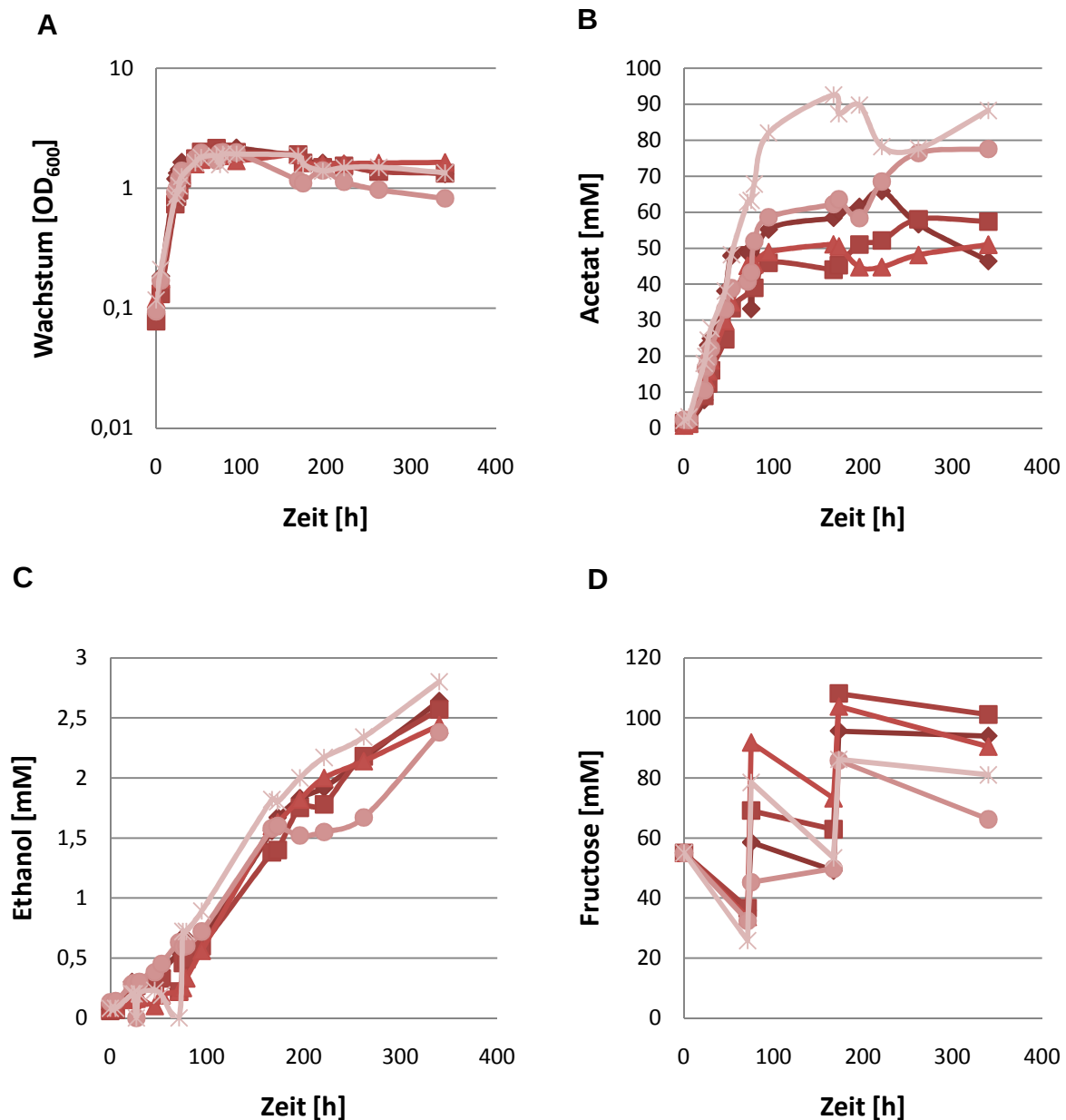


Abbildung 22: **A** Wachstum, **B** Acetatproduktion, **C** Ethanolproduktion und **D** Fructoseverbrauch der Stämme *A. woodii* WT (—◆—), *A. woodii* pIMP1 (—■—), *A. woodii* pIMP1_THF (—▲—), *A. woodii* pJIR750 (—●—) und *A. woodii* pJIR750_THF (—✱—)

Beim Wachstum im „fed-batch“-Experiment waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen zu erkennen. Alle Stämme erreichten eine maximale OD_{600} von ca. 2, welche jedoch deutlich unter den maximalen optischen Dichten lag, welche die Stämme beim Versuch mit einmaliger Fructosezugabe erreichten (OD_{600} 2,7-4,7). Der Stamm *A. woodii* pJIR750_THF produzierte mit knapp 93 mM am meisten Acetat. Die anderen Stämmen produzierten maximal zwischen

51-77 mM Acetat, somit deutlich weniger im Vergleich zum Wachstum mit nur einmalig 50 mM Fructose (2.4.1).

In Tabelle 12 sind die Ergebnisse des „fed-batch“-Versuchs zusammengefasst. Alle Stämme zeigten ein Wachstumsdefizit (max. OD₆₀₀ 2) und eine verminderte Acetatproduktion von maximal 92 mM Acetat. Auffallend ist jedoch, dass die Stämme, welche ein pJIR750-basierendes Plasmid tragen, eine höhere Acetatproduktion aufwiesen.

Tabelle 12: Zusammenfassung max. OD₆₀₀ und Acetatproduktion der rekombinanten *A. woodii*-Stämme beim „fed-batch“-Wachstum auf Fructose im Vergleich zum WT

Stamm	max. OD ₆₀₀	Acetatproduktion
		[mM]
<i>A. woodii</i> WT	2,16	65,83
<i>A. woodii</i> pIMP1	1,99	58,02
<i>A. woodii</i> pJIR750	1,99	77,52
<i>A. woodii</i> pIMP1_THF	1,92	51,08
<i>A. woodii</i> pJIR750_THF	1,92	92,54

3.4.3 Charakterisierung rekombinanter *A. woodii*-Stämme bei Wachstum auf CO₂/H₂

Auch mit den Stämmen, welche die Überexpressionsplamide für den verbesserten Formiatabbau tragen, wurden Wachstumsversuche auf CO₂/H₂ durchgeführt. Hierzu wurden 50 ml Medium in 500-ml-Müller & Krempel-Flaschen, welche mit einem CO₂/H₂-Gemisch (33 %:67 %) so befüllt wurden, dass ein Überdruck zu erkennen war (Wölbung des Gummistopfens), mit den verschiedenen Kulturen auf eine OD₆₀₀ von 0,02-0,04 beimpft und das Wachstum photometrisch verfolgt. Für die Analyse des Produktspektrums wurden Proben gaschromatographisch analysiert.

Abbildung 23 zeigt das Wachstum der Stämme *A. woodii* WT, *A. woodii* pIMP1, *A. woodii* pIMP1_THF und *A. woodii* pIMP_ptb_THF.

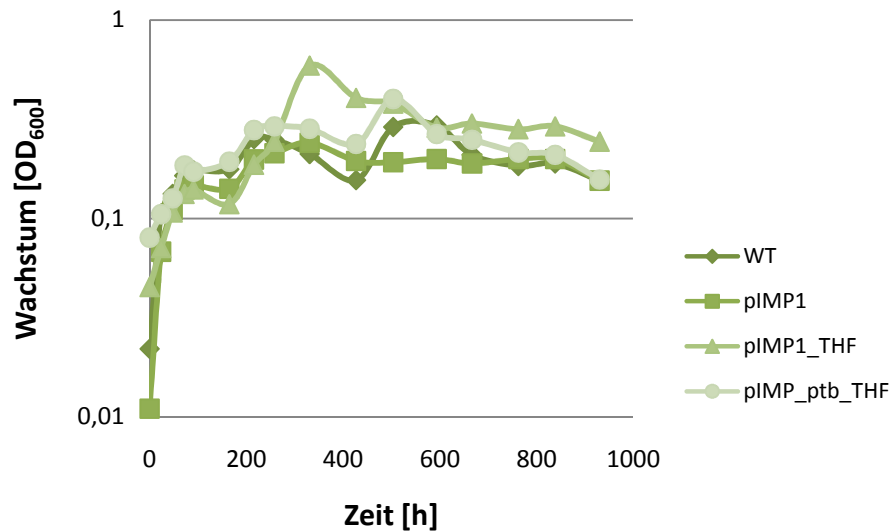


Abbildung 23: Wachstum der Stämme *A. woodii* WT, *A. woodii* pIMP1, *A. woodii* pIMP1_THF und *A. woodii* pIMP_ptb_THF auf CO₂/H₂

Der Stamm *A. woodii* WT und der Kontrollstamm mit dem Leerplasmid pIMP1 erreichten ähnliche optische Dichten von 0,24-0,29. Die Überexpressionstämme *A. woodii* pIMP1_THF und *A. woodii* pIMP_ptb_THF erreichten jedoch höhere maximale optische Dichten von 0,4.

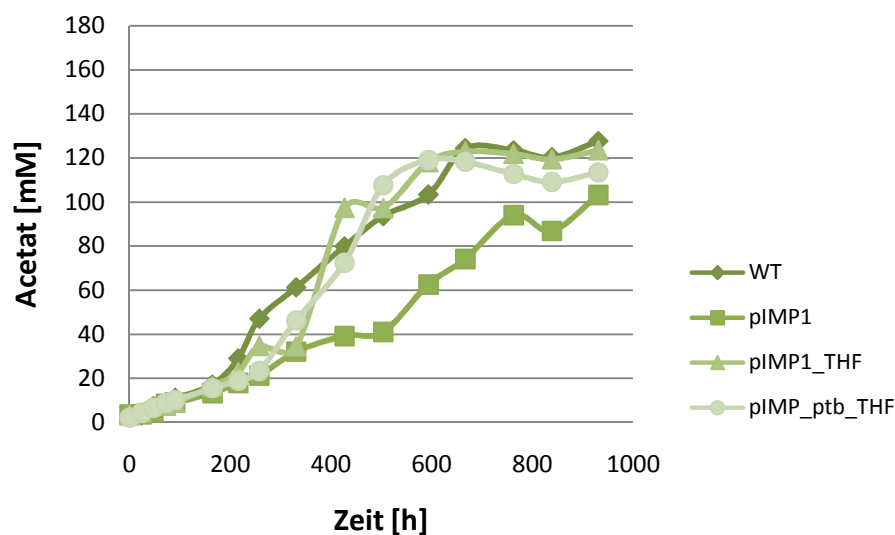


Abbildung 24: Acetatproduktion der Stämme *A. woodii* WT, *A. woodii* pIMP1, *A. woodii* pIMP1_THF und *A. woodii* pIMP_ptb_THF beim Wachstum auf CO₂/H₂

Die Acetatproduktion des Kontrollstammes *A. woodii* pIMP1 lag mit nur 103 mM Acetat deutlich unter der Acetatproduktion des Wildtyps mit 116 mM. Auch setzte die Acetatproduktion beim Kontrollstamm erst verzögert ein. Der Überexpressionsstamm *A. woodii* pIMP1_THF produzierte mit 123 mM am meisten Acetat. Die Acetatproduktion des Stammes *A. woodii* pIMP_ptb_THF war mit 119 mM Acetat vergleichbar mit der Acetatproduktion des Wildtyps (Abbildung 24).

Abbildung 25 zeigt das Wachstum der Stämme *A. woodii* WT, *A. woodii* pJIR750 und *A. woodii* pJIR750_THF auf CO₂/H₂.

Sowohl der Stamm *A. woodii* pJIR750 als auch der Stamm *A. woodii* pJIR750_THF erreichten eine höhere OD₆₀₀ von 0,36-0,39, verglichen mit der OD₆₀₀ des Wildtyps mit nur 0,29.

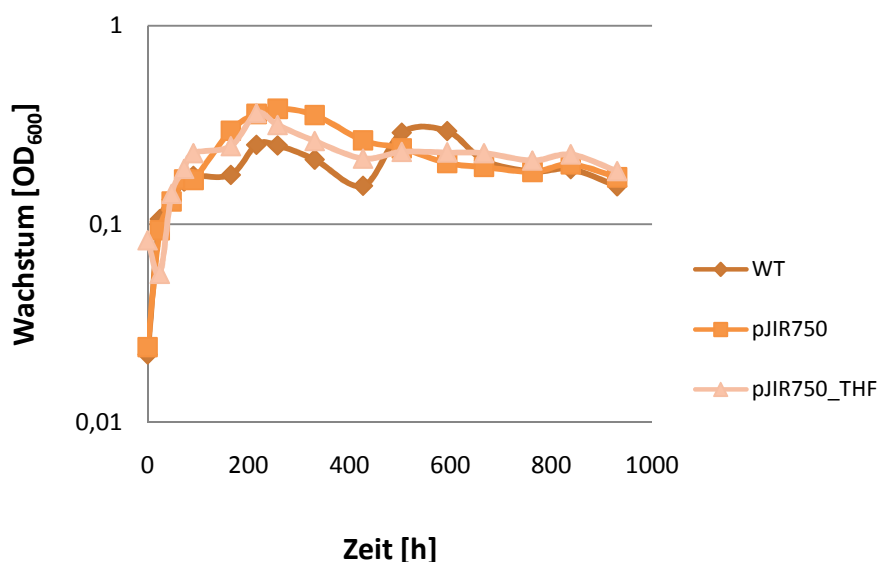


Abbildung 25: Wachstum der Stämme *A. woodii* WT, *A. woodii* pJIR750 und *A. woodii* pJIR750_THF auf CO₂/H₂

Die höheren optischen Dichten des Kontrollstammes *A. woodii* pJIR750 und des Überexpressionsstammes *A. woodii* pJIR750_THF spiegeln sich in der Höhe der maximalen Acetatkonzentrationen wieder. So produzierte der Kontrollstamm *A. woodii* pJIR750 maximal 136 mM Acetat und der Überexpressionsstamm maximal 159 mM Acetat. Diese maximalen Acetatkonzentrationen lagen 20 bzw. 43 mM über der Acetatkonzentration des Wildtyps mit nur maximal 116 mM Acetat (Abbildung 26).

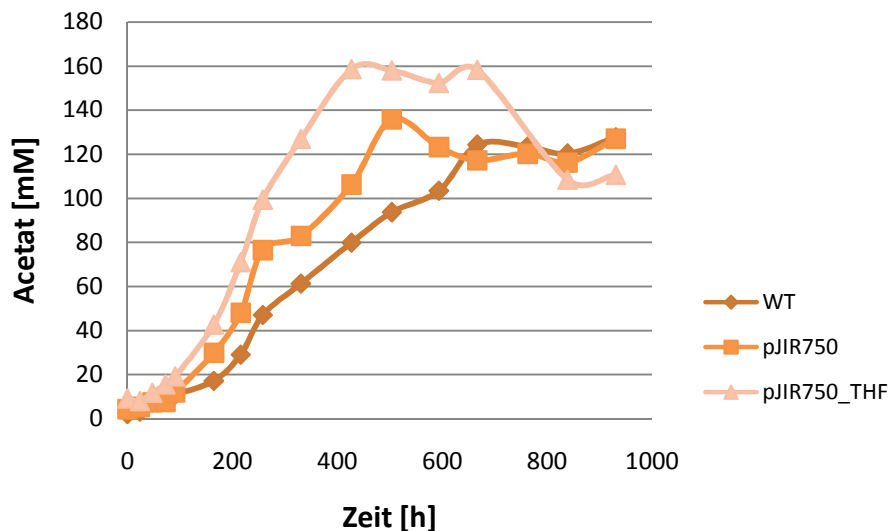


Abbildung 26: Acetatproduktion der Stämme *A. woodii* WT, *A. woodii* pJIR750 und *A. woodii* pJIR750_THF beim Wachstum auf CO₂/H₂

Tabelle 13 zeigt eine Zusammenfassung der maximalen optischen Dichte und der maximalen Acetatproduktion dieser Stämme auf CO₂/H₂. Die maximale OD₆₀₀ aller Überexpressionsstämme und des Kontrollstammes *A. woodii* pJIR750 lag deutlich über der maximalen OD₆₀₀ des Wildtyps und des Kontrollstammes *A. woodii* pIMP1. Auch lagen die maximalen Acetatkonzentrationen aller Überexpressionsstämme und des Kontrollstammes mit dem Leerplasmid pJIR750 deutlich über der maximalen Acetatkonzentration des Wildtyps. Bei den Stämmen, welche pJIR750-basierte Plasmide tragen, konnte die beste Acetatproduktion nachgewiesen werden. *A. woodii* pJIR750_THF produzierte mit 159 mM am meisten Acetat.

Tabelle 13: Zusammenfassung max. OD₆₀₀ und Acetatproduktion der rekombinanten *A. woodii*-Stämme beim Wachstum auf CO₂/H₂ im Vergleich zum WT

Stamm	max. OD ₆₀₀	Acetatproduktion
		[mM]
<i>A. woodii</i> WT	0,294	116,50
<i>A. woodii</i> pIMP1	0,241	103,23
<i>A. woodii</i> pJIR750	0,381	135,86
<i>A. woodii</i> pIMP1_THF	0,405	123,38
<i>A. woodii</i> pJIR750_THF	0,362	158,57
<i>A. woodii</i> pIMP_ptb_THF	0,400	119,04

3.5 Fermentation der rekombinanten *A. woodii*-Stämme

Aufgrund einer gegenüber dem Wildtyp *A. woodii* deutlich erhöhten Acetatproduktion wurden die Stämme *A. woodii* pJIR750, *A. woodii* pJIR750_pta-ack und *A. woodii* pJIR750_THF zum Kooperationspartner Lehrstuhl der Bioverfahrenstechnik, TU München, geschickt und dort in einem 1-l-Fermenter unter optimierten Bedingungen fermentiert (Demler, 2012). Es erfolgte eine autotrophe Kultivierung unter pH-geregelten Bedingungen in einem Laborrührkesselreaktor. Demler beschäftigte sich in seiner Doktorarbeit mit der Optimierung der autotrophen Kultivierung des Stammes *A. woodii* WT, so dass die Fermentation der rekombinanten *A. woodii*-Stämme nach seinem aktuellen Kenntnisstand ohne Limitierung des Stofftransportes oder Limitierung durch das Medium erfolgte.

Abbildung 27 zeigt Wachstum (A), Acetatproduktion (B) und Formiatproduktion (C) der Stämme *A. woodii* pJIR750, *A. woodii* pJIR750_pta-ack und *A. woodii* pJIR750_THF der autotrophen Fermentation durch Demler (Demler, 2012).

Die Anwesenheit des Plasmids pJIR750 wirkte sich stabilisierend auf das Wachstum des Kontrollstammes aus. So erreichte der Kontrollstamm *A. woodii* pJIR750 eine höhere Biotrockenmasse von 1,7 g/l und eine höhere Wachstumsrate $0,052 \text{ h}^{-1}$ verglichen mit dem Wildtyp, welcher eine maximale Biotrockenmasse von 1,5 g/l (Daten nicht gezeigt) und eine Wachstumsrate von nur $0,035 \text{ h}^{-1}$ erreichte (Tabelle 14). Beide Überexpressionsstämme erreichten jedoch höhere Biotrockenmassen im Vergleich zum Kontrollstamm. Diese lag bei dem Stamm *A. woodii* pJIR750_pta-ack bei 1,9 g/l und bei dem Stamm *A. woodii* pJIR750_THF bei 2,0 g/l. Dieser Unterschied ist jedoch in den Wachstumsraten nicht zu sehen, welche mit $0,050 \text{ h}^{-1}$ und $0,056 \text{ h}^{-1}$ ähnlich der des Kontrollstammes waren. Bei allen Stämmen wurde nach etwa einem halben Tag die maximale Produktbildungsrate von Acetat erreicht. Hier lagen die maximalen zellspezifischen Produktbildungsrate des Kontrollstammes *A. woodii* pJIR750 und des Überexpressionsstammes *A. woodii* pJIR750_THF bei etwa 343 mM d^{-1} ($20,5 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$), welches in etwa der zellspezifischen Produktionsrate des Wildtyps mit 350 mM d^{-1} ($20,99 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$) entsprach (Tabelle 14). Nur der Überexpressionsstamm *A. woodii* pJIR750_pta-ack wich mit einer leicht höheren zellspezifischen Produktionsrate von 362 mM d^{-1} ($21,7 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$) von den anderen Stämmen ab. Die volumetrische Produktionsrate des Wildtyps und des Kontrollstammes unterschied sich kaum voneinander, sie lag bei

416 mM d⁻¹ und 421 mM d⁻¹ (24,96 und 25,31 g l⁻¹ d⁻¹). Aufgrund der schnelleren Zunahme an Biotrockenmasse der Überexpressionsstämme wurden auch höhere volumetrische Produktionsraten erreicht. Diese lag bei dem Stamm *A. woodii* pJIR750_pta-ack bei 480 mM d⁻¹ (28,81 g l⁻¹ d⁻¹) und bei dem Stamm *A. woodii* pJIR750_THF bei 479 mM d⁻¹ (28,75 g l⁻¹ d⁻¹). Die maximalen Acetatkonzentrationen am Ende des Wachstums spiegelten sich in der Höhe der Biotrockenmasse wieder. So produzierte der Kontrollstamm nach 3,7 Tagen maximal 744 mM (44,7 g l⁻¹), *A. woodii* pJIR750_pta-ack 841 mM (50,5 g l⁻¹) und *A. woodii* pJIR750_THF 849 mM (51,0 g l⁻¹) Acetat. Wie in Abbildung 27 C zu sehen ist, akkumulierte Formiat bei allen Stämmen im Medium. Bei dem Überexpressionsstamm *A. woodii* pJIR750_THF setzte die Formiatbildung früher und stärker ein, im Vergleich zum Kontrollstamm und dem Überexpressionsstamm *A. woodii* pJIR750_pta-ack. Der Überexpressionsstamm *A. woodii* pJIR750_THF erreichte die höchste maximale Formiatkonzentration von 0,4 g l⁻¹. Der Kontrollstamm und der Überexpressionsstamm *A. woodii* pJIR750_pta-ack produzierten maximal 0,3 g l⁻¹ Formiat.

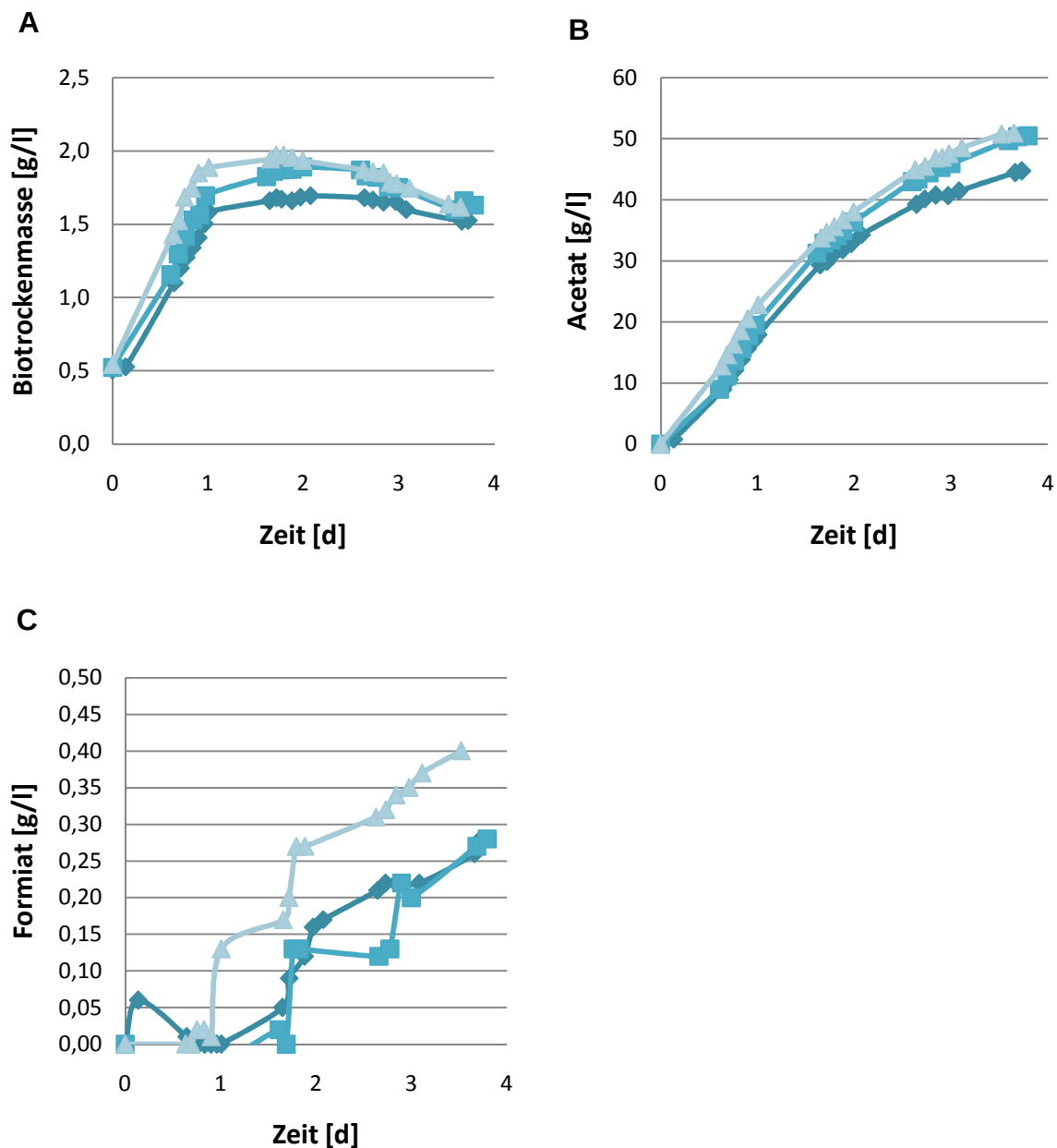


Abbildung 27: **A** Wachstum, **B** Acetatproduktion und **C** Formiatproduktion der Stämme *A. woodii* pJIR750 (—◆—), *A. woodii* pJIR750_pta-ack (—■—) und *A. woodii* pJIR750_THF (—▲—) auf CO₂/H₂. Autotrophe Kultivierung unter pH-geregelten Bedingungen im Laborrührkesselreaktor ($V_0 = 1,0$ l, pH 7,0, $T = 30$ °C, Titrationsmittel NaOH (10 mol/l), $n = 1200$ min⁻¹, $V_g = 30$ l/h (0,5 vvm), $pH_2^{\text{Eingang}} = 400$ mbar, $pCO_2^{\text{Eingang}} = 100$ mbar, $p_{\text{tot}} = 1,0$ bar) (Demler, 2012)

In Tabelle 14 ist die Wachstumsrate, die volumetrische Produktionsrate und die zellspezifische Produktionsrate der Stämme *A. woodii* WT, *A. woodii* pJIR750, *A. woodii* pJIR750_pta-ack und *A. woodii* pJIR750_THF zusammengefasst.

Tabelle 14: Zusammenfassung der Fermentation der Stämme *A. woodii* WT, *A. woodii* pJIR750, *A. woodii* pJIR750_pta-ack und *A. woodii* pJIR750_THF (Demler, 2012)

Stamm	Wachstumsrate $\mu_{\max}$, h ⁻¹	vol.	zellspez.
		Produktionsrate Q_P , g l ⁻¹ d ⁻¹	Produktionsrate q_P , g g ⁻¹ d ⁻¹
<i>A. woodii</i> WT	0,035	24,96 (416 mM d ⁻¹)	20,99 (350 mM d ⁻¹)
<i>A. woodii</i> pJIR750	0,052	25,31 (421 mM d ⁻¹)	20,54 (342 mM d ⁻¹)
<i>A. woodii</i> pJIR750_pta-ack	0,050	28,81 (480 mM d ⁻¹)	21,74 (362 mM d ⁻¹)
<i>A. woodii</i> pJIR750_THF	0,056	28,75 (479 mM d ⁻¹)	20,59 (343 mM d ⁻¹)

3.6 Bestimmung der Acetat-Kinase-Aktivität in dem Stamm *A. woodii* WT und den rekombinanten *A. woodii*-Stämmen

Um zu untersuchen, ob die Acetat-Kinase im Wildtyp und den rekombinanten *A. woodii*-Stämmen unterschiedlich stark exprimiert wird, wurde die Acetat-Kinase-Aktivität der einzelnen *A. woodii*-Stämme bestimmt. Hierzu wurden 200 ml selektives Medium mit Fructose in 500-ml-Müller & Krempel-Flaschen mit einer über Nacht gewachsenen Kultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert und die Zellen bis zu einer OD₆₀₀ von 1,2-1,4 bei 30 °C inkubiert. Nach der Ernte der Zellen erfolgte ein Aufschluss mit dem Ribolyser und die anschließende photometrische Messung zur Bestimmung der Acetat-Kinase-Aktivität.

Tabelle 15 zeigt die spezifischen Acetat-Kinase-Aktivitäten der einzelnen *A. woodii*-Stämme.

Tabelle 15: Spezifische Acetat-Kinase-Aktivitäten des Stammes *A. woodii* WT und aller rekombinanten *A. woodii*-Stämme

Stamm	Spezifische Acetat-Kinase-Aktivität U/mg
<i>A. woodii</i> WT	7,64 ± 0,47
<i>A. woodii</i> pIMP1	8,07 ± 0,26
<i>A. woodii</i> pIMP1_pta-ack	5,92 ± 0,07
<i>A. woodii</i> pIMP_ptb_pta-ack	8,02 ± 0,19
<i>A. woodii</i> pIMP1_THF	7,93 ± 0,12
<i>A. woodii</i> pIMP_ptb_THF	6,57 ± 0,28
<i>A. woodii</i> pJIR750	6,41 ± 0,08
<i>A. woodii</i> pJIR750_pta-ack	7,79 ± 0,22
<i>A. woodii</i> pJIR750_THF	9,98 ± 0,24

Die spezifischen Acetat-Kinase-Aktivitäten lagen zwischen 5,9 und 10,2 U/mg. Für den Wildtyp wurde eine maximale spezifische Acetat-Kinase-Aktivität von $7,64 \pm 0,47$ U/mg berechnet. Eine vergleichbare Aktivität wurde auch für den Kontrollstamm *A. woodii* mit dem Leerplasmid pIMP1 ($8,07 \pm 0,26$ U/mg), den Überexpressionsstamm *A. woodii* pJIR750_pta-ack ($7,79 \pm 0,22$ U/mg), *A. woodii* pIMP1_THF ($7,93 \pm 0,12$ U/mg) und *A. woodii* pIMP_ptb_pta-ack ($8,02 \pm 0,19$ U/mg) bestimmt. Für den Kontrollstamm *A. woodii* pJIR750 ($6,41 \pm 0,08$ U/mg) und den Überexpressionsstamm *A. woodii* pIMP_ptb_THF ($6,57 \pm 0,28$ U/mg) wurden niedrigere spezifische Acetat-Kinase-Aktivitäten ermittelt. Für den Überexpressionsstamm *A. woodii* pJIR750_THF wurde die höchste spezifische Acetat-Kinase-Aktivität von $9,98 \pm 0,24$ U/mg bestimmt.

3.7 Erhöhung der Acetatproduktion in *C. acetobutylicum* durch Eliminierung der Nebenprodukte Butanol und Butyrat

Clostridium acetobutylicum sollte gentechnisch so verändert werden, dass es sich durch eine hohe Acetatproduktion auszeichnet. Durch Ausschalten des Crotonase- (*crt*) oder 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase-Gens (*hbd*) könnte der metabolische Fluss in Richtung der Acetatproduktion gelenkt werden. Außerdem wird durch diese Inaktivierung die Produktion der Nebenprodukte Butanol und Butyrat eliminiert.

Für das Erstellen von sogenannten Integrationsmutanten wurde das „ClosTron™ Gene Knockout System“ (Heap *et al.*, 2007) verwendet. Hierbei handelt es sich um eine abgewandelte Form des TargeTron® Systems, welches von der Firma Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim) speziell für *Escherichia coli* entwickelt wurde. Anstelle des Vektors pACD4K-C wird beim ClosTron™ System der Vektor pMTL007 verwendet. Dieser besitzt ein Erythromycinresistenzgen, welches durch ein Gruppe-I-Intron inaktiviert ist und erst nach erfolgreicher Integration des Gruppe-II-Introns aktiviert wird. Durch die Induktion des *fac*-Promoters mit IPTG wird die Transkription des Gruppe-II-Introns und des LtrA-Proteins aktiviert. Das LtrA-Protein, auch IEP („intron encoded protein“) genannt, ist im Gegensatz zum Vektor pACD4-C außerhalb des Gruppe-II-Introns lokalisiert, wodurch eine erfolgreiche Integration ins Zielgen stabil bleibt, da das Herausschneiden des Introns verhindert wird. Das Gruppe-II-Intron besitzt spezifische und zueinander komplementäre Sequenzen, welche für das Spleißen der Intron-RNA durch das LtrA-Protein wichtig sind. Diese gespleißte Intron-RNA und das LtrA-Protein bilden daraufhin einen sog. Ribonukleoproteinkomplex (RNP), welcher spezifisch chromosomale Sequenzelemente erkennt und ins Chromosom integrieren kann. Nach einer erfolgreichen Integration und durch die Induktion der Transkription des Gruppe-II-Introns mit IPTG wird auch das Gruppe-I-Intron abgelesen, worauf dieses sich aus dem Resistenzgen herausschneidet und die Erythromycinresistenz aktiviert wird. Somit wird die Selektion positiver Integrationsmutanten effizienter erzielt.

In dieser Arbeit wurden zwei Integrationsmutanten erstellt. Die Mutante *C. acetobutylicum hbd332s::intron* besitzt eine Integration im Gen *hbd* an der Stelle 332-333, die Mutante *C. acetobutylicum crt383s::intron* im Gen *crt* an der Stelle 383-384. Zunächst wurde jeweils mit den drei vom Computeralgorithmus der Firma

Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim) vorgeschlagenen „primern“ IBS, IBS1d und EBS2 (Tabelle 3) und dem „primer“ „IBS universal“ eine SOE-PCR durchgeführt. Dabei wurde ein 350-Bp-Fragment generiert, welches in den Vektor pMTL007 kloniert wurde und durch Sequenzierung des 350-Bp-Fragments Mutationen ausgeschlossen wurden. Vor der Transformation des Plasmids in *C. acetobutylicum* WT wurde dieses in *E. coli* XL1-Blue pANS1 *in vivo* methyliert. Nach erfolgreicher Transformation des Plasmids in *C. acetobutylicum* WT erfolgte die Induktion des *fac*-Promoters und somit die Integration eines etwa 1800-Bp-großen Fragments in das Genom.

Um eine erfolgreiche Integration ins Genom von *C. acetobutylicum* nachzuweisen, wurde die chromosomale DNA isoliert und diese als „template“ für eine Standard-PCR eingesetzt. Hierfür wurden die „primer“ so gewählt, dass diese jeweils links und rechts der Insertionsstelle in einem Abstand von etwa 500 Bp liegen, um sowohl eine negative als auch eine positive Integration nachweisen zu können. Somit wurde bei einer erfolgreichen Integration ins Genom ein etwa 2300-Bp-großes Fragment erwartet, bei erfolgloser Integration ein Fragment mit einer Größe von etwa 500 Bp. Für die Kontrolle einer erfolgreichen Integration in das Gen *hbd* wurden für die Standard-PCR die „primer“ „hbd_kon_fw“ und „hbd_kon_rev“, für das Gen *crt* die „primer“ „crt_kon_fw“ und „crt_kon_rev“ verwendet.

Wie in Abbildung 28 zu sehen ist, war die Integration sowohl in das Gen *hbd* als auch *crt* erfolgreich.

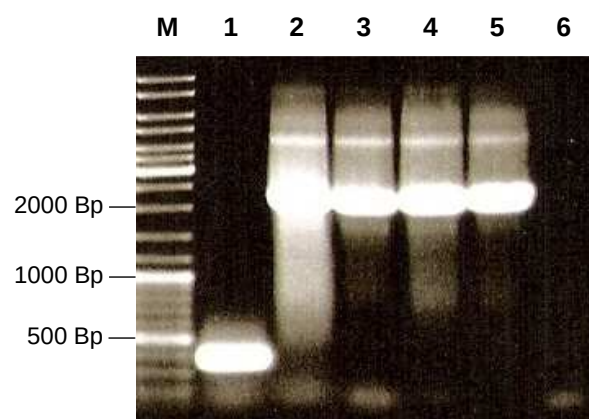


Abbildung 28: Kontroll-PCR zum Nachweis der Integrationsmutanten (Agarosegel, 2 %), **M** Marker, **1** *C. acetobutylicum* WT, **2** *C. acetobutylicum* *hbd332s::intron* (Probe 1), **3** *C. acetobutylicum* *hbd332s::intron* (Probe 2), **4** *C. acetobutylicum* *crt383s::intron* (Probe 1), **5** *C. acetobutylicum* *crt383s::intron* (Probe 2), **6** Negativkontrolle (H₂O als „template“)

3.7.1 Charakterisierung der Mutanten *C. acetobutylicum hbd332s::intron* und *C. acetobutylicum crt383s::intron* bei Wachstum auf CG-Medium

Für das Wachstum der Stämme *C. acetobutylicum hbd332s::intron* und *C. acetobutylicum crt383s::intron* wurden 5 ml selektives CG-Medium ausgehend von einer Glycerinkultur inokuliert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 50 ml selektives CG-Medium in 125-ml-Müller & Krempel-Flaschen auf eine OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert und das Wachstum photometrisch verfolgt. Für die spätere Analyse des Produktspektrums wurden die Proben gaschromatographisch analysiert. Als Referenz diente der Stamm *C. acetobutylicum* WT, welcher ebenfalls in 50 ml Medium kultiviert wurde.

Abbildung 29 zeigt Wachstum, Ethanol-, Acetatproduktion und Glucoseverbrauch der Stämme *C. acetobutylicum* WT, *C. acetobutylicum hbd332s::intron* und *C. acetobutylicum crt383s::intron* beim Wachstum auf CG-Medium.

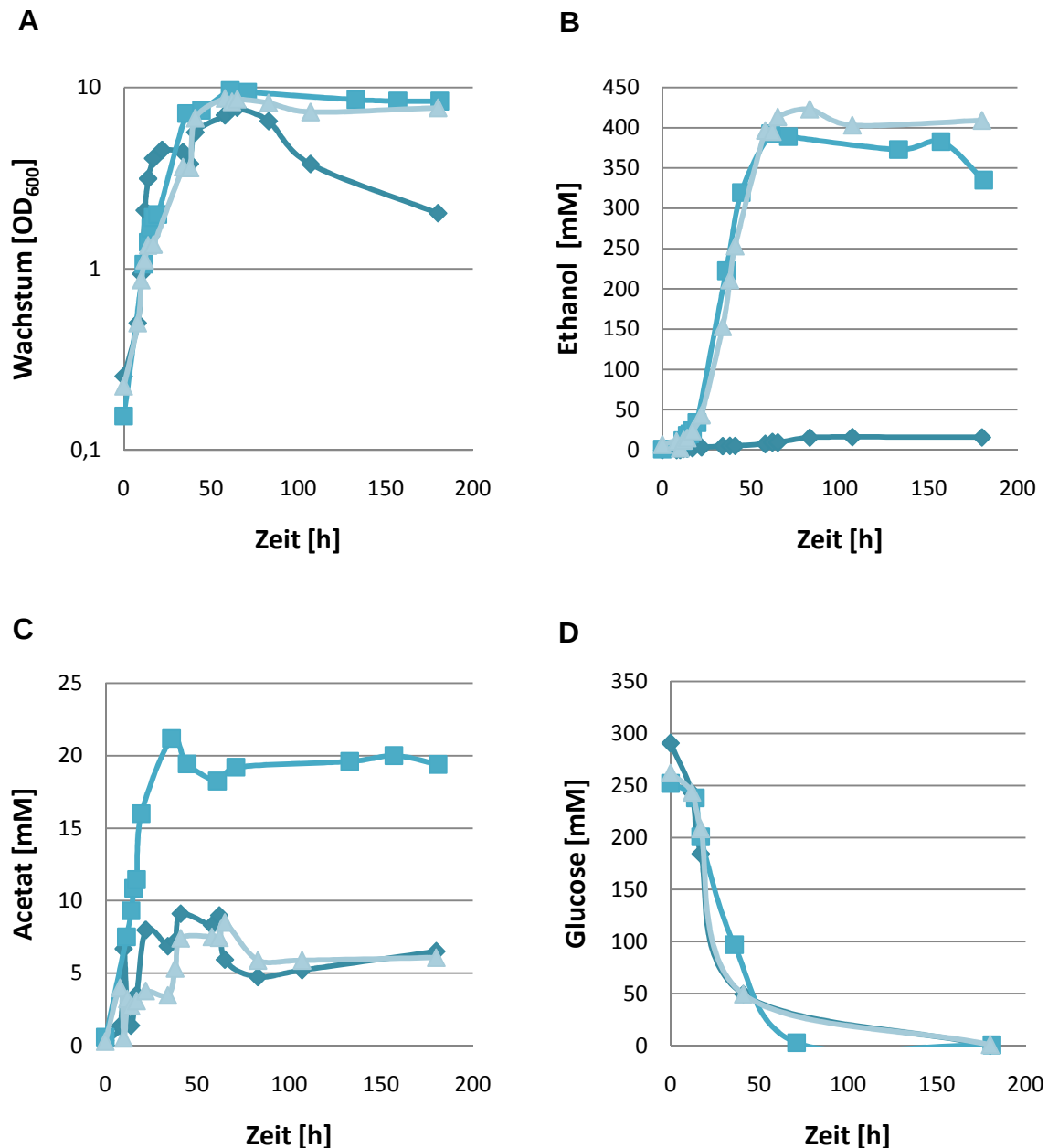


Abbildung 29: A Wachstum, B Ethanolproduktion, C Acetatproduktion und D Glucoseverbrauch der Stämme *C. acetobutylicum* WT (—◆—), *C. acetobutylicum hbd332s::intron* (—■—) und *C. acetobutylicum crt383s::intron* (—▲—) auf CG-Medium

Beide Integrationsmutanten erreichten eine maximale OD₆₀₀ von 9,6, welche deutlich über der des Wildtyps lag. Dieser erreichte lediglich eine maximale OD₆₀₀ von 7,7. Außerdem fiel die OD₆₀₀ des Wildtyps nach ca. 70 h wieder ab, wohingegen die optische Dichte der Integrationsmutanten konstant blieb (Abbildung 29A). Durch das Ausschalten des Gens *hbd* bzw. *crt* stieg die Konzentration von Ethanol signifikant auf bis zu 423 mM an. Die maximale Ethanolkonzentration des Wildtyps lag bei ca. 23 mM, was einer Steigerung der Ethanolkonzentration der Mutanten um das 18-

fache entspricht (Abbildung 29B). Die maximale Acetatkonzentration des Wildtyps lag bei ca. 10 mM, die der Integrationsmutante *C. acetobutylicum crt383s::intron* bei rund 8 mM. Die Integrationsmutante *C. acetobutylicum hbd332s::intron* zeigte jedoch eine verbesserte Acetatproduktion, die Acetatkonzentration erreichte ein Maximum von 22 mM. Somit konnte eine Steigerung der Acetatproduktion mit dem Stamm *C. acetobutylicum hbd332s::intron* erreicht werden (Abbildung 29C). Neben den Produkten Acetat und Ethanol konnten bei den Integrationsmutanten keine weiteren Nebenprodukte detektiert werden, was bedeutet, dass die Mutationen der Gene *crt* und *hbd* erfolgreich waren, da diese Stämme weder Butanol noch Butyrat produzierten. Der Wildtyp hingegen produzierte zusätzlich maximal 94 mM Aceton, 169 mM Butanol und ca. 25 mM Butyrat beim Wachstum auf CG-Medium (Tabelle 16; Abbildung 40 im Anhang). Bei der Verwertung der Glucose waren keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Wildtyp und den Integrationsmutanten zu sehen (Abbildung 29D).

Tabelle 16: Zusammenfassung des Wachstums und des Produktspektrums der *C. acetobutylicum*-Stämme auf CG-Medium

Stamm	max. OD ₆₀₀	Aceton [mM]	Acetat [mM]	Ethanol [mM]	Butanol [mM]	Butyrat [mM]
<i>C. acetobutylicum</i> WT	7,71	93,89	10,32	22,81	168,84	24,48
<i>C. acetobutylicum hbd332s::intron</i>	9,62	-	21,18	392,5	-	-
<i>C. acetobutylicum crt383s::intron</i>	9,69	-	7,51	422,8	-	-

rot: signifikante Abweichungen im Vergleich zum Wildtyp

3.7.2 Charakterisierung der Mutanten *C. acetobutylicum hbd332s::intron* und *C. acetobutylicum crt383s::intron* bei Wachstum auf MES-Medium

Im Weiteren erfolgte ein Versuch auf phosphatlimitierten MES-Medium, da schon in früheren Versuchen gezeigt werden konnte, dass sich hier das Produktspektrum zum Wachstum auf CG-Medium unterscheidet. Hierzu wurden zunächst 5 ml selektives CG-Medium ausgehend von Glycerinkulturen mit den Integrationsmutanten inokuliert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 5 ml selektives MES-Medium ausgehend von der in CG-Medium gewachsenen Kultur beimpft und ebenfalls über Nacht bei 37 °C inkubiert, um die Kulturen an das neue Medium

anzupassen. Ausgehend von diesen Kulturen wurden 50 ml selektives MES-Medium in 125-ml-Müller & Krempel-Flaschen auf eine OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert. Das Wachstum wurde photometrisch verfolgt und das Produktspektrum gaschromatographisch analysiert.

Abbildung 30 zeigt Wachstum, Ethanol-, Acetat-, Acetoinproduktion und Glucoseverbrauch des *C. acetobutylicum* Wildtyps und der Integrationsmutanten *C. acetobutylicum hbd332s::intron* und *C. acetobutylicum crt383s::intron*.

Beim Wachstum auf MES-Medium wurden niedrigere optische Dichten erreicht als beim Wachstum auf CG-Medium. Der Wildtyp erreichte eine maximale OD₆₀₀ von 5,32, die Mutante *C. acetobutylicum hbd332s::intron* erreichte eine OD₆₀₀ von 4,64. Die Integrationsmutante *C. acetobutylicum crt383s::intron* zeigte beim Wachstum auf MES-Medium ein Wachstumsdefizit mit einer maximalen OD₆₀₀ von 3,51. Auch beim Wachstum auf MES-Medium fiel die optische Dichte des Wildtyps nach dem Erreichen der stationären Phase wieder deutlich ab. Dieses Phänomen war aber auch bei der Integrationsmutante *C. acetobutylicum hbd332s::intron* zu sehen (Abbildung 30A). Wieder war eine erhöhte Ethanolproduktion der beiden Mutanten zu erkennen. Diese lag bei maximal 174 mM (*crt383s::intron*) bzw. 267 mM (*hbd332s::intron*). Der Wildtyp produzierte maximal 14 mM Ethanol (Abbildung 30B). Die Acetatproduktion war bei allen Stämmen im Vergleich zum Wachstum auf CG-Medium erhöht. Hier produzierte der Wildtyp maximal 45 mM Acetat. Die Mutante *C. acetobutylicum crt383s::intron* lag mit einer maximalen Acetatproduktion von 36 mM unter der des Wildtyps. Die Mutante *C. acetobutylicum hbd332s::intron* produzierte jedoch 74 mM Acetat (Abbildung 30C). Somit konnte auch beim Wachstum auf MES-Medium eine Steigerung der Acetatproduktion um etwa das zweifache beobachtet werden. Beim Wachstum auf MES-Medium produzierten alle Stämme Acetoin. Der Wildtyp produzierte maximal 15 mM Acetoin, der Stamm *C. acetobutylicum crt383s::intron* maximal 10 mM Acetoin. Die Mutante *C. acetobutylicum hbd332s::intron* produzierte mit maximal 21 mM am meisten Acetoin. Bei beiden Mutanten wurden keine weiteren Nebenprodukte gebildet. Der Wildtyp produzierte jedoch neben Acetat, Ethanol und Acetoin noch max. 22 mM Aceton, 97 mM Butanol und 67 mM Butyrat (Tabelle 17; Abbildung 43 im Anhang). Glucose wurde von allen Stämmen bis zum Ende des Wachstums vollständig verstoffwechselt (Abbildung 30E).

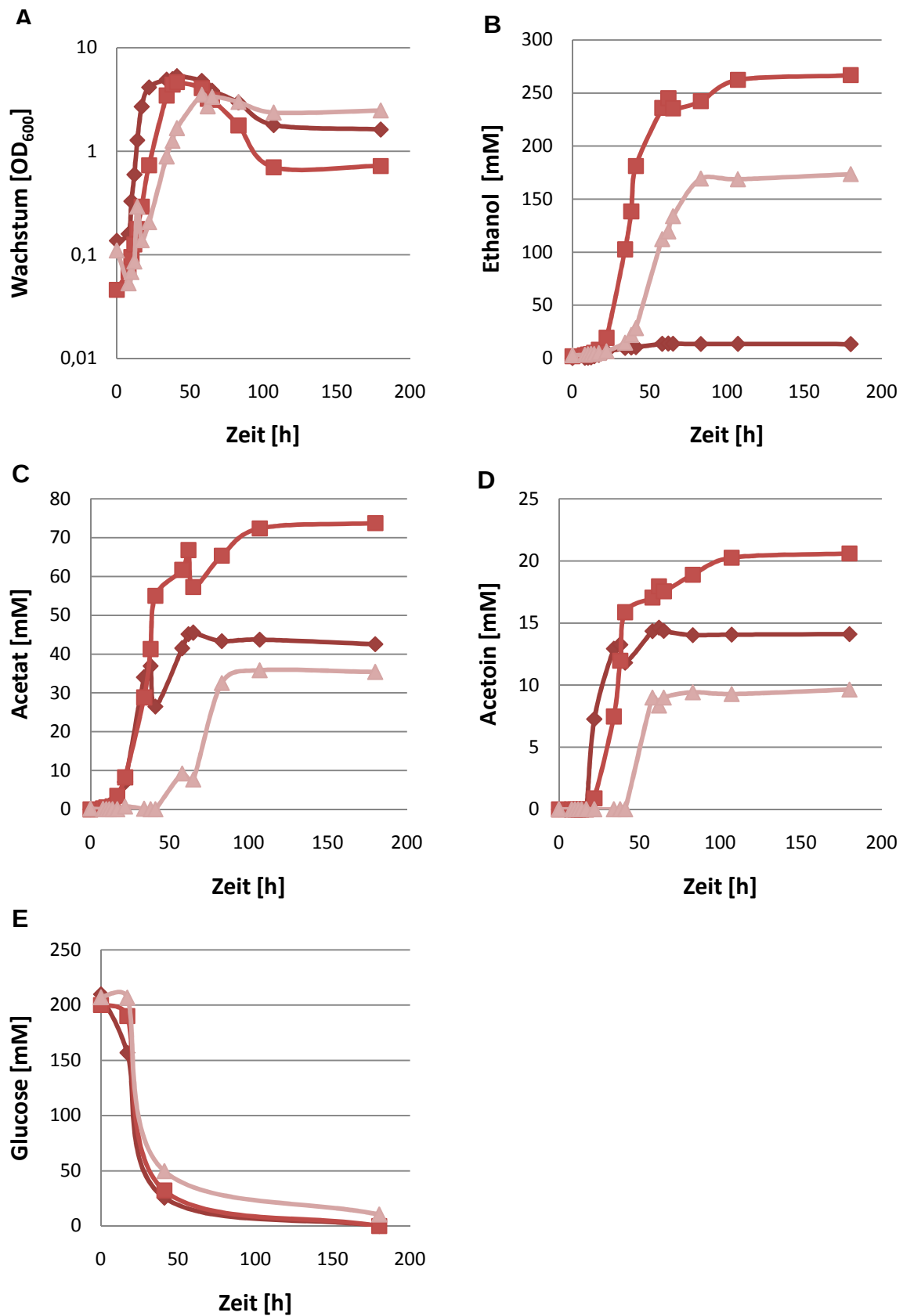


Abbildung 30: A Wachstum, B Ethanol-, C Acetat-, D Acetoinproduktion und E Glucoseverbrauch der Stämme *C. acetobutylicum* WT (—◆—), *C. acetobutylicum* *hbd332s::intron* (—■—) und *C. acetobutylicum* *crt383s::intron* (—▲—) auf MES-Medium

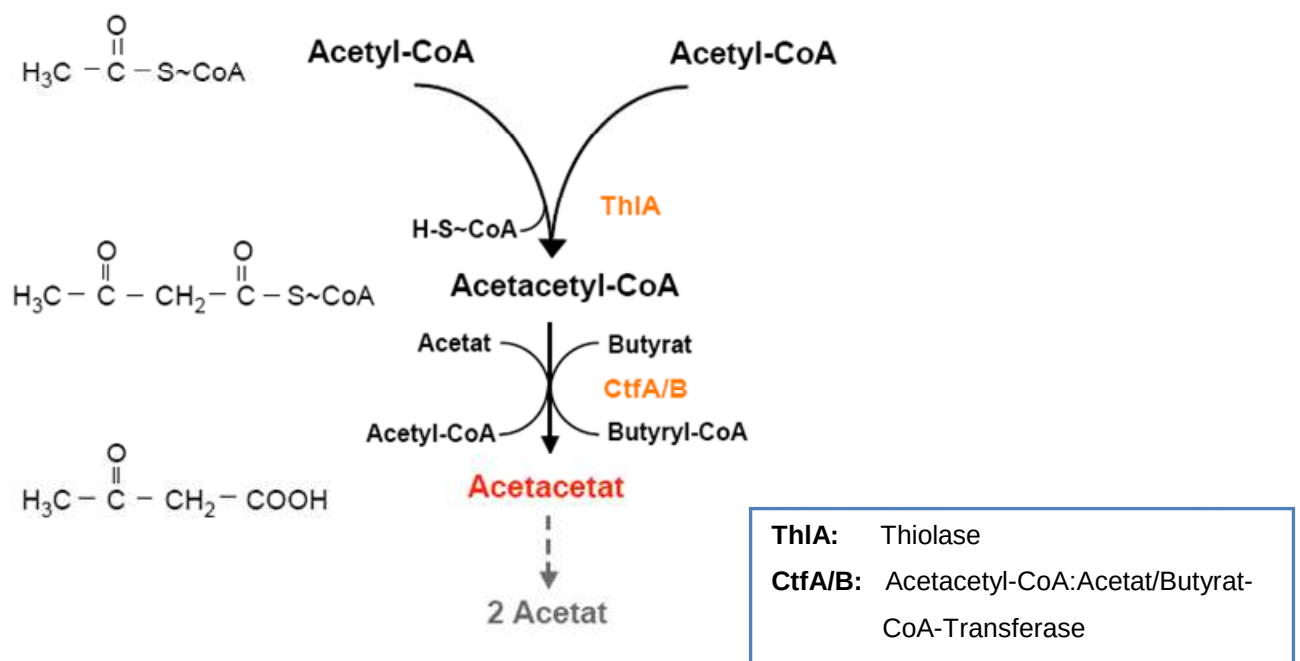
Tabelle 17: Übersicht des Wachstums und des Produktspektrums der *C. acetobutylicum*-Stämme auf MES-Medium

Stamm	OD ₆₀₀	Aceton [mM]	Acetat [mM]	Ethanol [mM]	Butanol [mM]	Butyrat [mM]	Acetoin [mM]
<i>C. acetobutylicum</i> WT	5,32	22,19	45,48	13,93	96,98	66,52	14,63
<i>C. acetobutylicum</i> <i>hbd332s::intron</i>	4,64	-	73,72	266,70	-	-	20,60
<i>C. acetobutylicum</i> <i>crt383s::intron</i>	3,51	-	35,85	173,45	-	-	9,65

rot: signifikante Abweichungen im Vergleich zum Wildtyp

3.8 Verbesserung der Acetatproduktion in *C. acetobutylicum* über die verstärkte Bildung von Acetacetat

Bei Acetacetat handelt es sich um ein Intermediat der Aceton-Butanol-Gärung in *C. acetobutylicum*. Durch die Verknüpfung zweier Moleküle Acetyl-Phosphat entsteht Acetacetyl-Phosphat. Dieser Schritt wird durch die Thiolase A (Wiesenborn *et al.*, 1988; Winzer *et al.*, 2000) katalysiert. Acetacetyl-Phosphat wird mittels der Acetacetyl-CoA:Acetat/Butyrat-CoA-Transferase weiter zu Acetacetat verstoffwechselt. Acetacetat kann daraufhin in zwei Moleküle Acetat umgesetzt werden (Abbildung 31).

**Abbildung 31:** Bildung von Acetat über Acetacetat in *C. acetobutylicum*

Lederle (2010) konstruierte das Plasmid pIMP_ctfAB_thlA, auf welchem die Gene *thlA* und *ctfA/B* aus *C. acetobutylicum* lokalisiert sind und für die Thiolase A bzw. die Acetacetyl-CoA:Acetat/Butyrat-CoA-Transferase kodieren. Da in vorherigen Versuchen gezeigt werden konnte, dass die Integrationsmutante *C. acetobutylicum* *hbd332s::intron* sowohl beim Wachstum auf CG-Medium, jedoch signifikanter beim Wachstum auf MES-Medium höhere Acetatproduktionen aufwies, sollten diese durch die Überexpression der Gene *thlA* und *ctfA/B* noch weiter gesteigert werden. Um eine Selektion des Plasmids in der Integrationsmutante *C. acetobutylicum* *hbds332s::intron* zu ermöglichen, wurde zusätzlich eine Chloramphenicolresistenzkassette in das Plasmid pIMP_ctfAB_thlA eingebracht. Hierzu wurde das Gen der Resistenzkassette mit den „primern“ „catP_EcoRI_fw“ und „catP_EcoRI_rev“ aus dem Plamid pJIR750 amplifiziert und über die Restriktionsschnittstelle *EcoRI* in das ebenfalls mit *EcoRI*-linearisierte Plasmid pIMP_ctfAB_thlA kloniert (Abbildung 32). Das neukonstruierte Plasmid trägt den Namen pIMP_ctfA/B_thlA_catP. Vor der Transformation des Plasmids in den Stamm *C. acetobutylicum* *hbd332s::intron* erfolgte die *in vivo*-Methylierung in *E. coli* ER2275 pANS1.

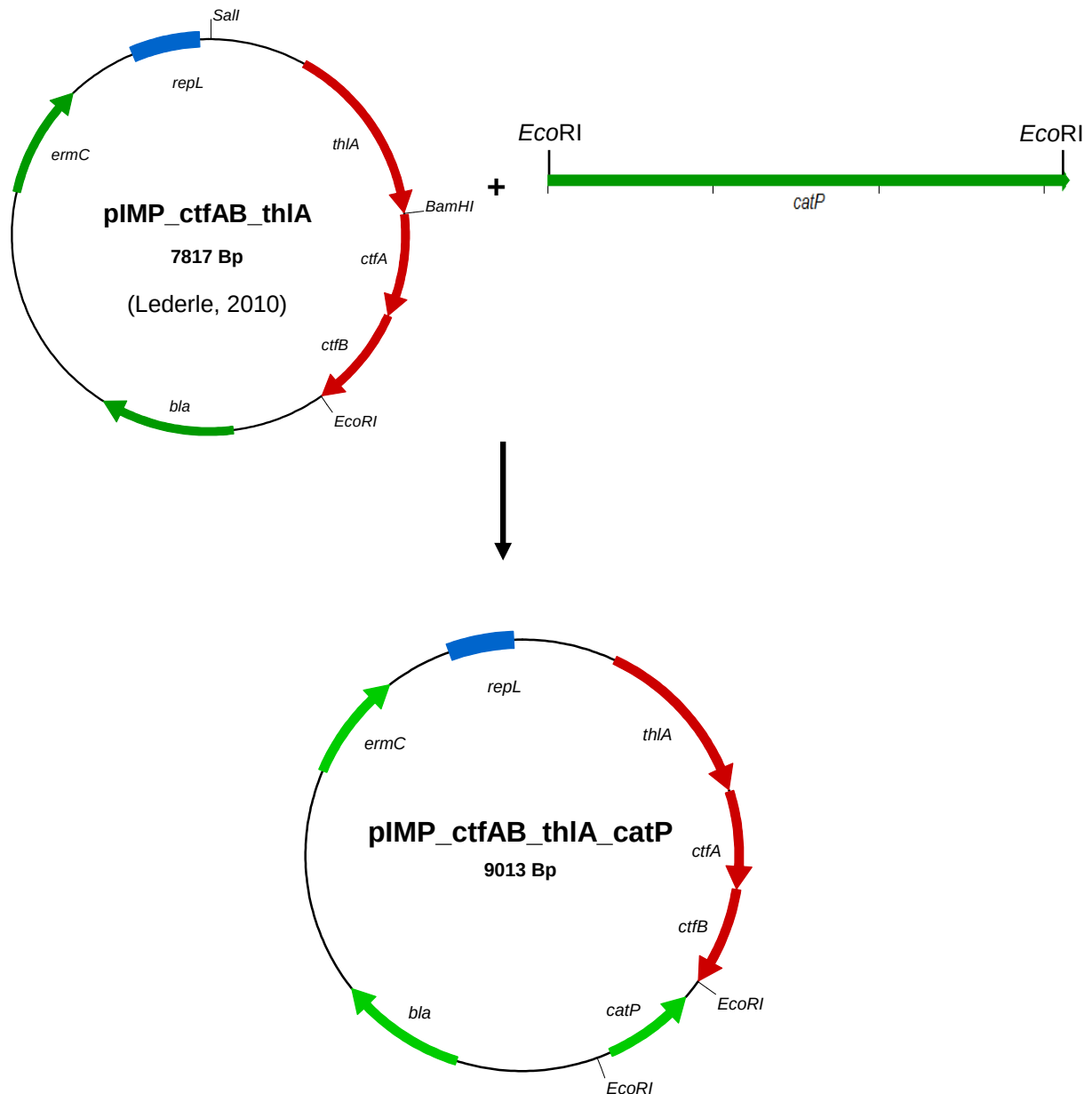


Abbildung 32: Konstruktion des Plasmids **pIMP_ctfAB_thIA_catP**

Für den Wachstumsversuch wurden die Stämme *C. acetobutylicum* WT, *C. acetobutylicum* *hbd332s::intron* und *C. acetobutylicum* *hbd332s::intron* **pIMP_ctfAB_thIA_catP** in 5 ml selektivem CG-Medium über Nacht inkubiert. Ausgehend von diesen Kulturen wurden jeweils 50 ml selektives CG-Medium in 125-ml-Müller & Krempel-Flaschen auf eine OD_{600} von 0,1 inokuliert. Das Wachstum wurde photometrisch verfolgt und das Produktspektrum gaschromatographisch analysiert. Abbildung 33 zeigt Wachstum, Ethanol-, Acetatproduktion und Glucoseverbrauch der Stämme in CG-Medium.

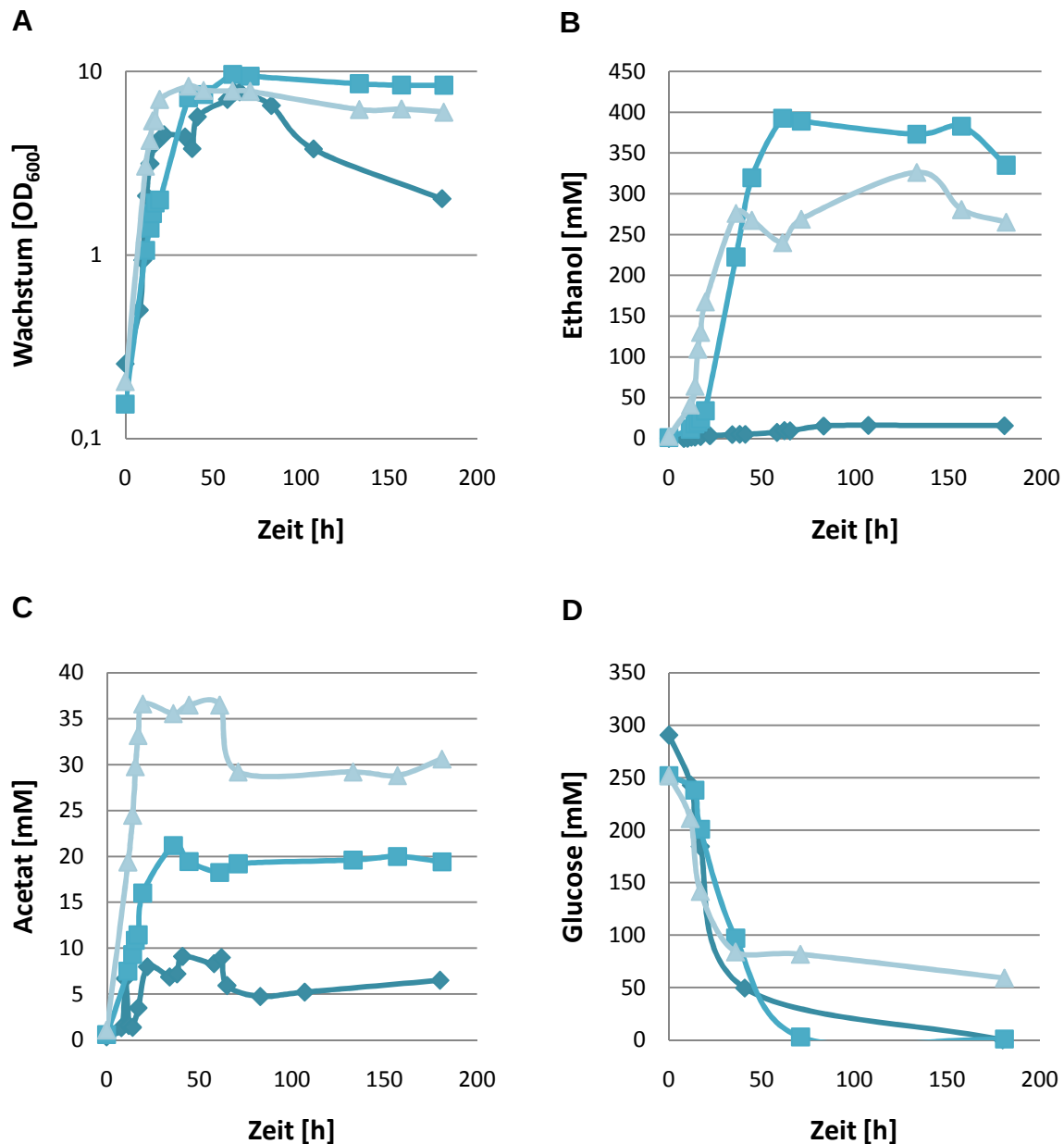


Abbildung 33: **A** Wachstum, **B** Ethanol-, **C** Acetatproduktion und **D** Glucoseverbrauch der Stämme *C. acetobutylicum* WT (—◆—), *C. acetobutylicum* *hbd332s::intron* (—■—) und *C. acetobutylicum* *hbd332s::intron* pIMP_ctfAB_thIA_catP (—▲—) auf CG-Medium

Durch das Einbringen des Überexpressionsplamids pIMP_ctfAB_thIA_catP in die Mutante *C. acetobutylicum* *hbd332s::intron* wurde eine maximale OD₆₀₀ von 8,3 erreicht, welche unter der maximalen OD₆₀₀ des Stammes *C. acetobutylicum* *hbd332s::intron* (9,62), jedoch über der maximalen OD₆₀₀ des Wildtyps lag (Abbildung 33A). Der Überexpressionsstamm *C. acetobutylicum* *hbd332s::intron* pIMP_ctfAB_thIA_catP produzierte mit 326,11 mM Ethanol zwar noch immer sigifikant mehr Ethanol als der Wildtyp, jedoch verringerte sich die Ethanolproduktion

um 66 mM gegenüber der Integrationsmutante *C. acetobutylicum hbd332s::intron* (Abbildung 33B). Durch das Einbringen des Überexpressionsplasmids in die Mutante konnte die maximale Acetatkonzentration auf 36,5 mM gesteigert werden. Dies entspricht einer Steigerung um 15 mM gegenüber der Integrationsmutante *C. acetobutylicum hbd332s::intron*. Außerdem stieg die Acetatproduktion des Überexpressionsstammes direkt nach Beginn des Wachstums stark an, wohingegen die Acetatproduktion des Wildtyps und der Integrationsmutante erst verzögert einsetzte (Abbildung 33C). Nach Ende des Wachstums war beim Überexpressionsstamm *C. acetobutylicum hbd332s::intron* pIMP_ctfAB_thlA_catP noch etwa 50 mM Glucose im Medium vorhanden, der Wildtyp und die Integrationsmutante *C. acetobutylicum hbd332s::intron* verstoffwechselten diese jedoch komplett (Abbildung 33D). Es wurden weiterhin kein Butanol, Butyrat und Aceton von der Integrationsmutante oder dem Überexpressionstamm produziert (Tabelle 18).

Tabelle 18: Zusammenfassung des Wachstums und des Produktspektrums der *C. acetobutylicum*-Stämme auf CG-Medium

Stamm	max. OD ₆₀₀	Aceton [mM]	Acetat [mM]	Ethanol [mM]	Butanol [mM]	Butyrat [mM]
<i>C. acetobutylicum</i> WT	7,71	93,89	10,32	22,81	168,84	24,48
<i>C. acetobutylicum hbd332s::intron</i>	9,62	-	21,18	392,50	-	-
<i>C. acetobutylicum hbd332s::intron</i> pIMP_ctfAB_thlA_catP	8,30	-	36,48	326,11	-	-

rot: signifikante Abweichungen im Vergleich zum Wildtyp

Des Weiteren erfolgten Wachstumsversuche dieser Stämme in phosphatlimitiertem MES-Medium. Hierfür wurden die Stämme zunächst in 5 ml CG-Medium inokuliert und anschließend in 5 ml MES-Medium überführt. 50 ml MES-Medium in 125-ml-Müller & Krempel-Flaschen wurden daraufhin mit den entsprechenden Kulturen auf eine OD₆₀₀ von 0,1 beimpft. Das Wachstum wurde photometrisch verfolgt und die Proben gaschromatographisch analysiert.

Abbildung 34 zeigt das Wachstum und Produktspektrum der Stämme *C. acetobutylicum* WT, *C. acetobutylicum hbd332s::intron* und *C. acetobutylicum hbd332s::intron* pIMP_ctfAB_thlA_catP auf MES-Medium.

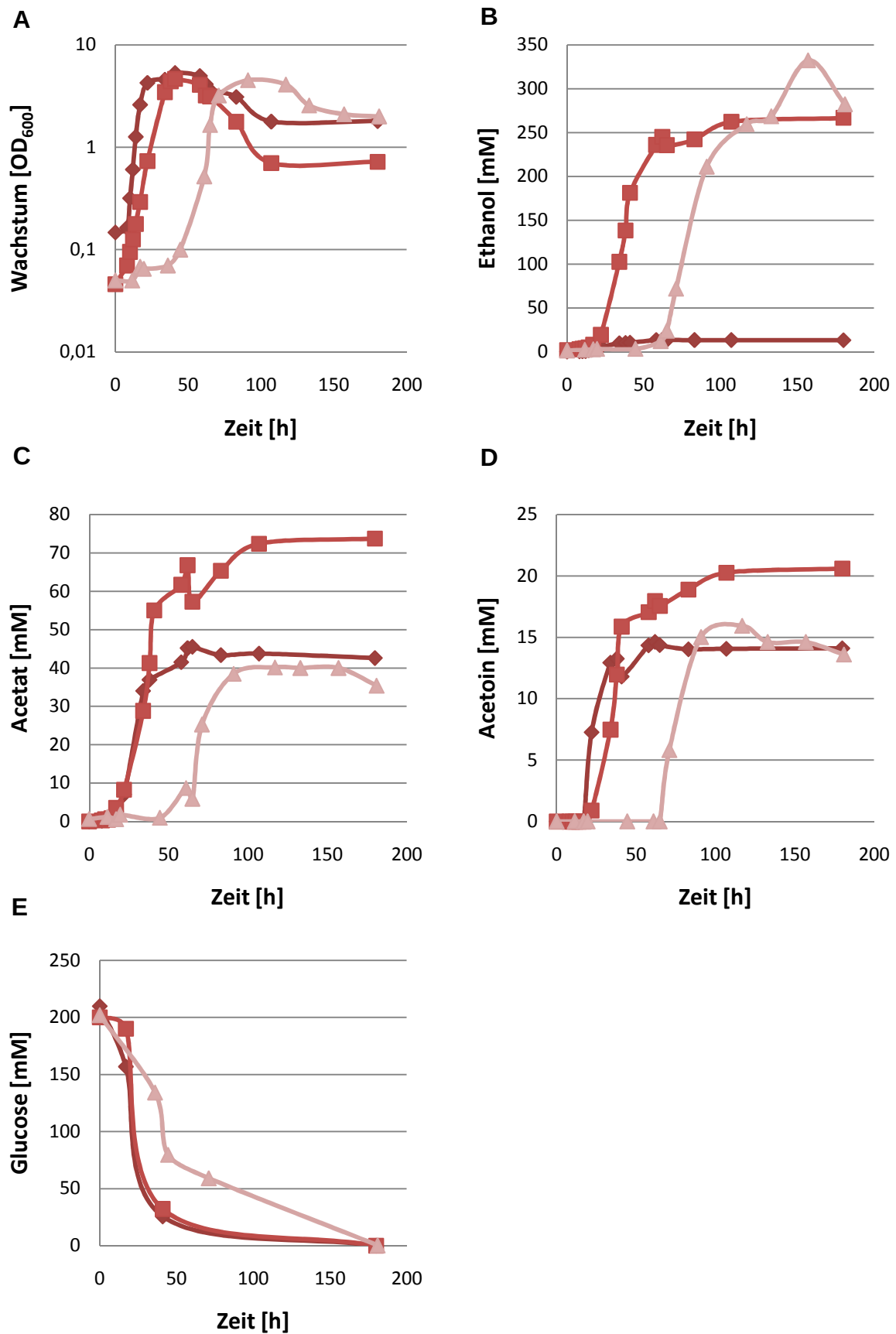


Abbildung 34: A Wachstum, B Ethanol-, C Acetat-, D Acetoinproduktion und E Glucoseverbrauch der Stämme *C. acetobutylicum* WT (◆), *C. acetobutylicum* hbd332s::intron (■) und *C. acetobutylicum* hbd332s::intron pIMP_ctfAB_thIA_catP (▲) auf MES-Medium

Der Überexpressionsstamm zeigte beim Wachstum auf MES-Medium eine sehr lange „lag“-Phase von etwa 35 h. Diese „lag“-Phase war ebenfalls in der Acetat-, Ethanol- und auch der Acetoinproduktion zu sehen. Trotz der langen „lag“-Phase erreichte der Überexpressionsstamm eine maximale OD₆₀₀ von 4,5, welche in etwa der OD₆₀₀ der Integrationsmutante entsprach (4,6) (Abbildung 34A). Der Überexpressionsstamm produzierte mit 332 mM Ethanol über 65 mM mehr Ethanol als die Integrationsmutante mit 266 mM (Abbildung 34B). Jedoch schlug sich diese erhöhte Ethanolproduktion in einer Hemmung der Acetatproduktion wieder. So produzierte der Überexpressionstamm beim Wachstum auf MES-Medium nur noch 40 mM Acetat, somit über 33 mM weniger Acetat als die Integrationsmutante *C. acetobutylicum* *hbd332s::intron*. Die maximale Acetatkonzentration des Überexpressionsstammes lag sogar unter der maximalen Acetatkonzentration des Wildtyps, welcher maximal 45 mM Acetat produzierte (Abbildung 34C). Die Produktion von Acetoin des Überexpressionstammes glich mit maximal 16 mM der des Wildtyps (15 mM Acetoin) und lag somit unter der maximalen Acetoinkonzentration der Integrationsmutante (21 mM) (Abbildung 34D). Glucose wurde von allen Stämmen bis zum Ende des Wachstum vollständig verstoffwechselt (Abbildung 34E). Neben Ethanol, Acetat und Acetoin produzierte nur der Wildtyp zusätzlich Butanol, Butyrat und Aceton (Abbildung 43; Tabelle 19).

Tabelle 19: Zusammenfassung des Wachstums und des Produktspektrums der *C. acetobutylicum*-Stämme auf MES-Medium

Stamm	max. OD ₆₀₀	Aceton [mM]	Acetat [mM]	Ethanol [mM]	Butanol [mM]	Butyrat [mM]	Acetoin [mM]
<i>C. acetobutylicum</i> WT	5,32	22,19	45,48	13,93	96,98	66,52	14,63
<i>C. acetobutylicum</i> <i>hbd332s::intron</i>	4,64	-	73,72	266,70	-	-	20,60
<i>C. acetobutylicum</i> <i>hbd332s::intron</i> pIMP_ctfAB_thIA_catP	4,52	-	40,16	332,23	-	-	15,94

rot: signifikante Abweichungen im Vergleich zum Wildtyp

3.9 2,3-Butandiolproduktion mit den Stämmen *C. acetobutylicum* WT und *C. acetobutylicum* *hbd332s::intron*

Die Integrationsmutante *C. acetobutylicum* *hbd332s::intron* produzierte bis zu 400 mM Ethanol. Da es sich bei Ethanol, wie auch bei 2,3-Butandiol, um reduzierte Verbindungen handelt, war es das Ziel, die hohe Ethanolproduktion in eine erhöhte 2,3-Butandiolproduktion umzulenken. *C. acetobutylicum* ist in der Lage, zwei Moleküle Pyruvat zu L-Acetylactat und weiter zu Acetoin zu verstoffwechseln. Acetoin könnte über eine Acetoinreduktase weiter zu 2,3-Butandiol reduziert werden (Abbildung 35). 2,3-Butandiol kann in einem chemischen Prozess, der Gasphasenoxidation, weiter zu Acetat verarbeitet werden. Somit besteht mit der 2,3-Butandiolproduktion eine weitere Möglichkeit, die Acetatausbeute indirekt in *C. acetobutylicum* *hbd332s::intron* zu erhöhen.

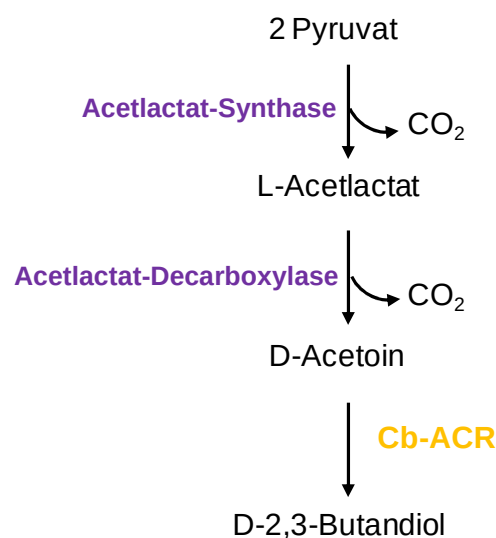


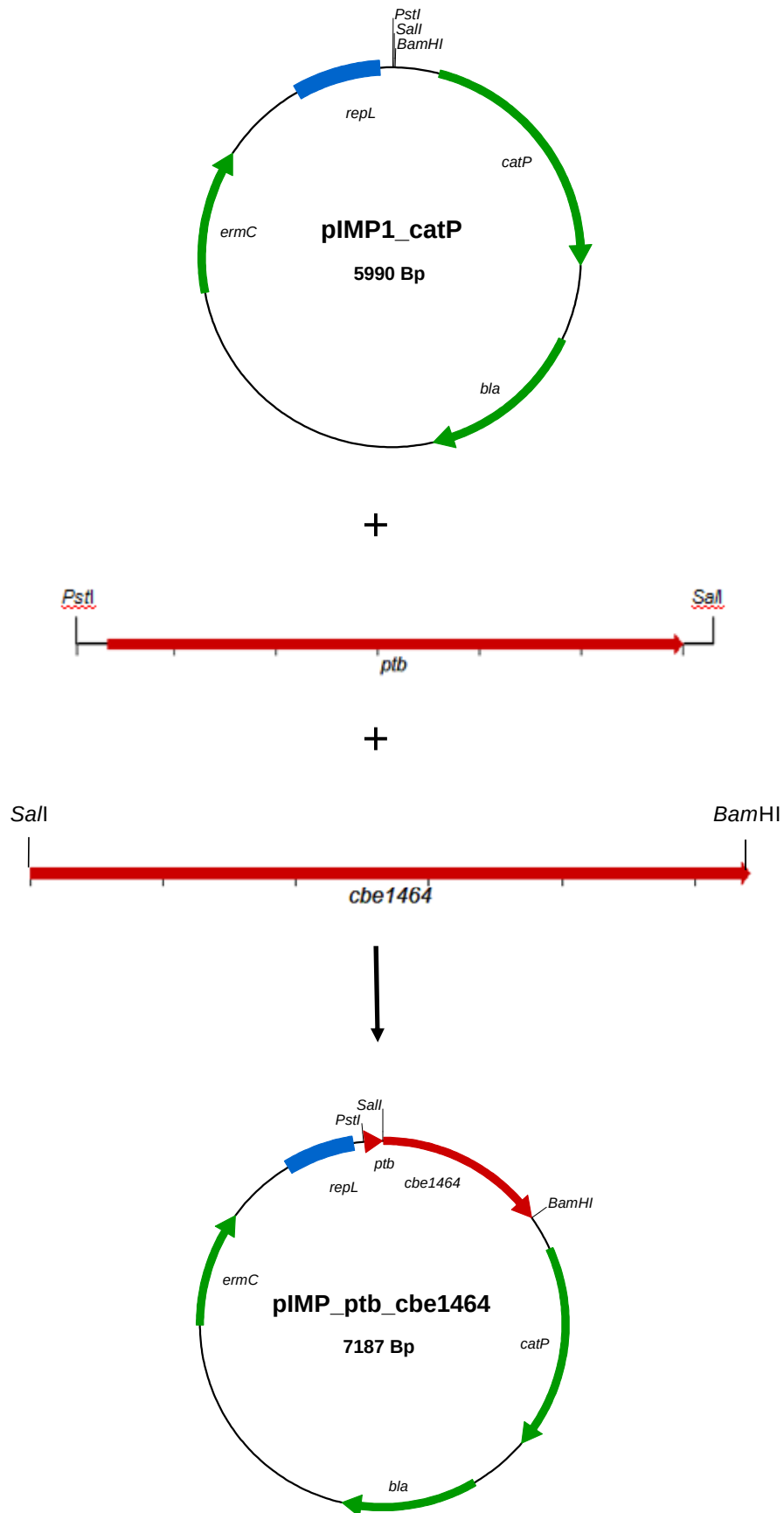
Abbildung 35: 2,3-Butandiol-Bildung in *C. acetobutylicum*; Cb-ACR: Acetoinreduktase aus *C. beijerinckii*

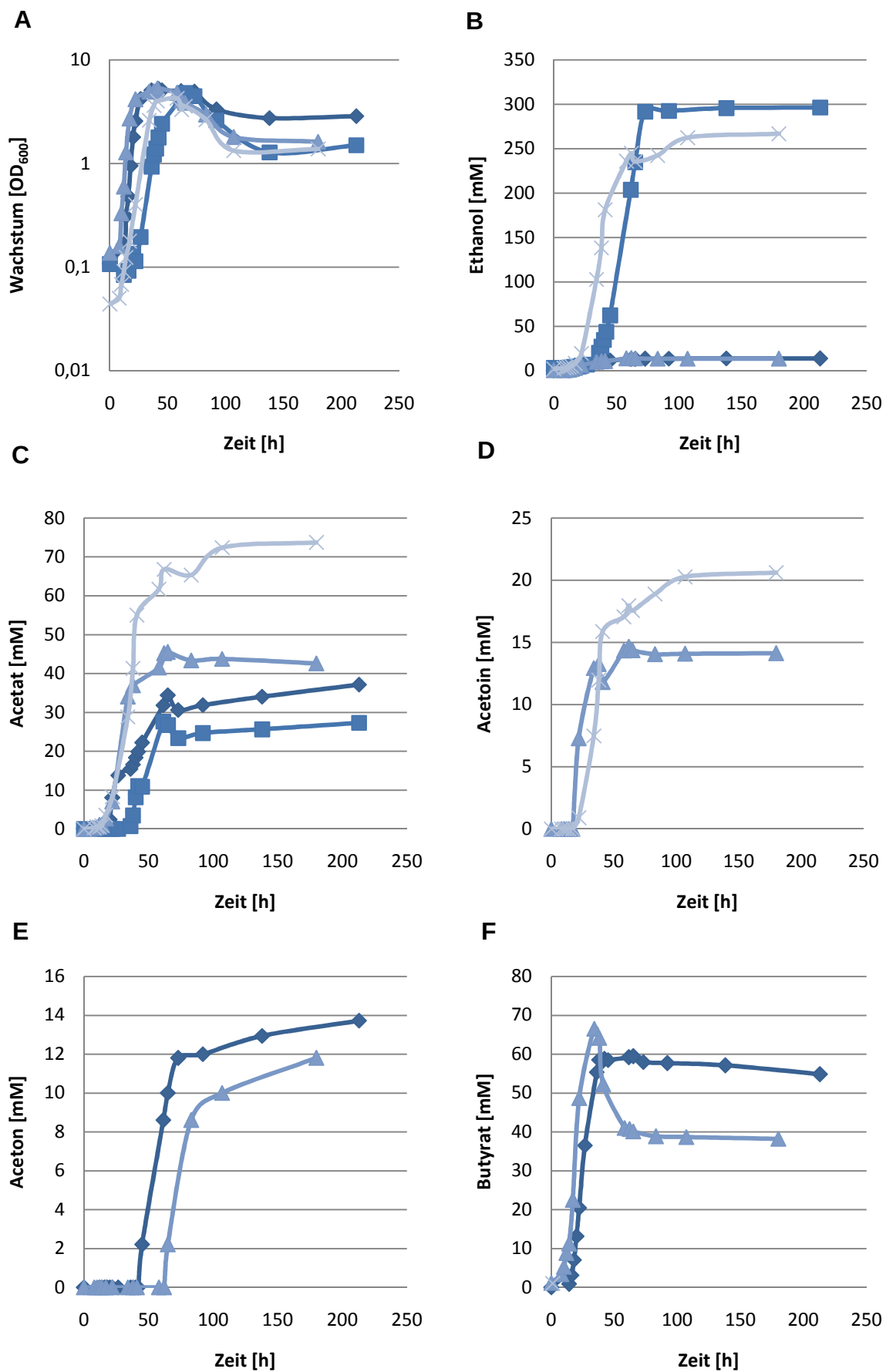
Im Genom von *C. acetobutylicum* ist jedoch kein Gen vorhanden, das für eine Acetoinreduktase kodiert. Im Gegensatz hierzu besitzt *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 ein solches Gen, das Gen *cbe1464*. Dieses Gen wurde, ebenso wie der Promoter P_{ptb}, aus *C. acetobutylicum* in den „shuttle“-Vektor pIMP1_catP kloniert. Hierzu wurde die chromosomale DNA von *C. beijerinckii* isoliert und diese als Matrize für eine Standard-PCR auf das Gen *cbe1464* mit den „primern“ „cbe_Sall_fw“ und „cbe_BamHI_rev“ eingesetzt. Durch diese PCR wurde am 5'-Ende des Gens eine

SaI-Schnittstelle und am 3'-Ende eine *Bam*HI-Schnittstelle generiert. Der Promoter P_{ptb} wurde aus dem Plasmid pIMP_ptb mit den „primern“ „ptb_PstI_fw“ und „ptb_rev“ amplifiziert und mit der Schnittstelle *Pst*I am 5'-Ende versehen. Eine *SaI*-Schnittstelle war am 3'-Ende der Promotersequenz vorhanden. Es erfolgte zunächst eine gerichtete Klonierung des Promoters P_{ptb} in den *Pst*I- und *SaI*-geschnittenen Vektor pIMP1_catP. Es resultierte das Plasmid pIMP1_catP_ptb. Dieses Plasmid wurde ein weiteres Mal einem Restriktionsverdau mit *SaI* und *Bam*HI unterzogen und mit dem gleichgeschnittenen Gen *cbe_1464* ligiert. Das so konstruierte Plasmid trägt den Namen pIMP_ptb_cbe1464 (Abbildung 36). Um Mutationen auszuschließen, erfolgte eine Sequenzierung des Plasmids durch die Firma GATC Biotech AG, Konstanz. Vor der Transformation des Plasmids pIMP_ptb_cbe1464 in die Stämme *C. acetobutylicum* WT und *C. acetobutylicum* *hbd332s::intron* erfolgte die *in-vivo*-Methylierung im Stamm *E. coli* ER2275 pANS1.

Für den Wachstumsversuch wurden die Stämme *C. acetobutylicum* pIMP_ptb_cbe1464 und *C. acetobutylicum* *hbd332s::intron* pIMP_ptb_cbe1464 zunächst in 5 ml selektivem CG-Medium inokuliert und bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurden 5 ml selektives MES-Medium mit diesen Stämmen inokuliert, um die Stämme an dieses Medium zu adaptieren. Anschließend wurden 50 ml selektives MES-Medium in 125-ml-Müller & Krempel-Flaschen mit den Stämmen auf eine OD₆₀₀ von 0,1 beimpft. Das Wachstum wurde photometrisch verfolgt und das Produktspektrum und der Glucoseverbrauch mittels einer HPLC ausgewertet. Die Konzentration des 2,3-Butandiols wurde gaschromatographisch ermittelt.

In Abbildung 37 sind Wachstum und Produktspektren der Stämme *C. acetobutylicum* pIMP_ptb_cbe1464, *C. acetobutylicum* *hbd332s::intron* pIMP_ptb_cbe1464, *C. acetobutylicum* WT und *C. acetobutylicum* *hbd332s::intron* abgebildet.

**Abbildung 36:** Konstruktion des Plasmids pIMP_ptb_cbe1464



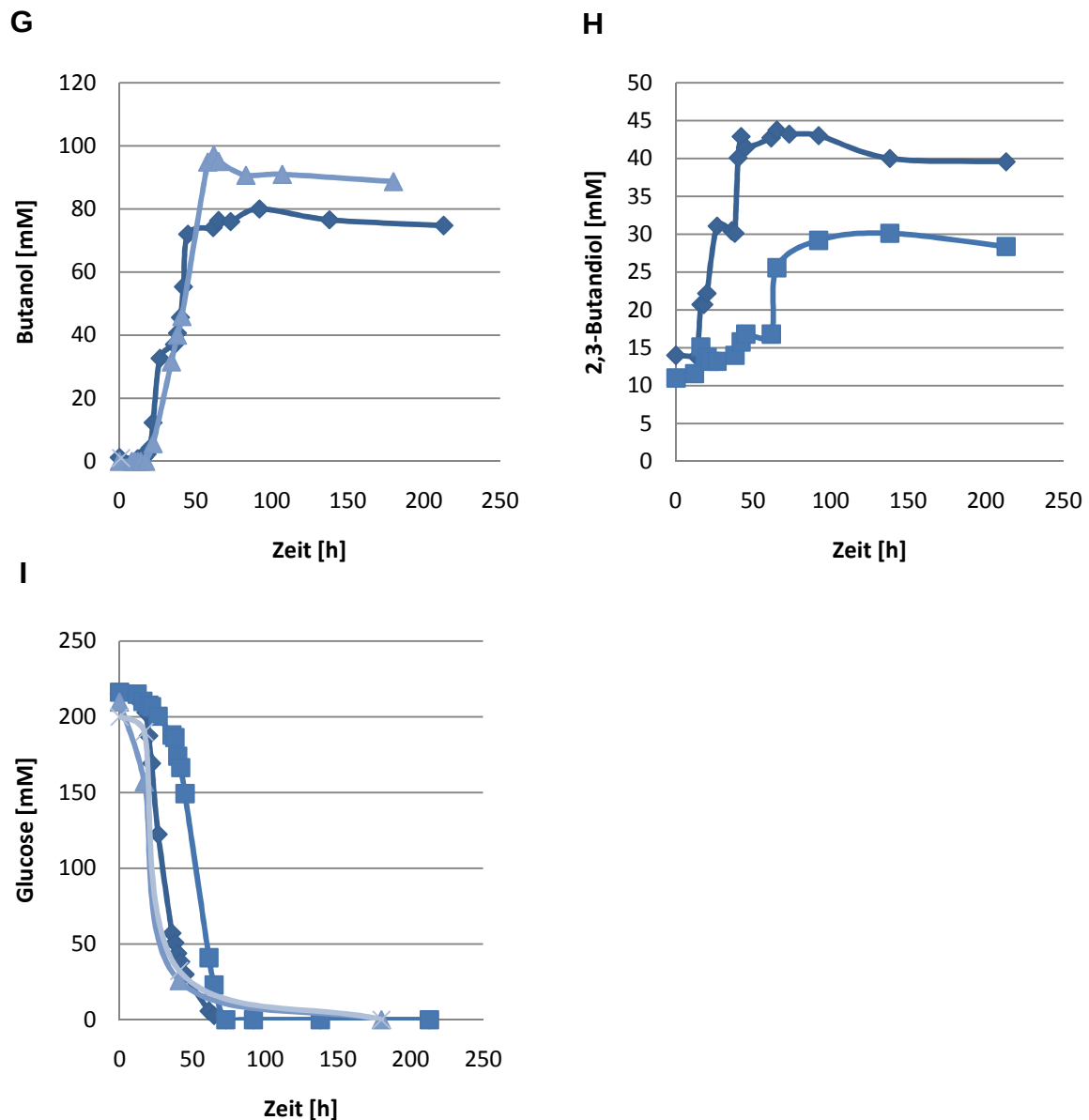


Abbildung 37: A Wachstum, B Ethanol-, C Acetat-, D Acetoin-, E Aceton-, F Butyrat-, G Butanol-, H 2,3-Butandiolproduktion und I Glucoseverbrauch der Stämme *C. acetobutylicum* pIMP_ptb_cbe1464 (◆), *C. acetobutylicum* hbd332s::intron pIMP_ptb_cbe1464 (■), *C. acetobutylicum* WT (▲) und *C. acetobutylicum* hbd332s::intron (×) auf MES-Medium

Das Wachstum der einzelnen Stämme unterscheidet sich nicht signifikant voneinander (Abb. 37A). Durch Einbringen des Plasmids pIMP_ptb_cbe1464 in die Integrationsmutante *C. acetobutylicum* hbd332s::intron stieg die Ethanolproduktion, verglichen mit der Ethanolkonzentration der Integrationsmutante, welche das Plasmid nicht trägt, um weitere 30 mM auf 296 mM an (Abb. 37B). Im Gegensatz dazu produzierte der Stamm *C. acetobutylicum* hbd332s::intron pIMP_ptb_cbe1464 nur noch rund 27 mM Acetat, also rund 46 mM weniger als die Integrationsmutante

C. acetobutylicum *hbd332s::intron* und auch weniger als der Wildtyp, welcher mit 45 mM noch deutlich mehr Acetat produzierte (Abb. 37C). Beide Stämme, *C. acetobutylicum* pIMP_ptb_cbe1464 und *C. acetobutylicum* *hbd332s::intron* pIMP_ptb_cbe1464, waren in der Lage, mit der Acetoinreduktase aus *C. beijerinckii* 2,3-Butandiol zu produzieren (Abb. 37H). So produzierte der Stamm *C. acetobutylicum* pIMP_ptb_cbe1464 mit rund 30 mM mehr 2,3-Butandiol als der Stamm *C. acetobutylicum* *hbd332s::intron* pIMP_ptb_cbe1464, welcher rund 20 mM 2,3-Butandiol produzierte. Außerdem konnte in diesen Stämmen wie erwartet keine Acetoinproduktion mehr nachgewiesen werden (Abb. 37D). *C. acetobutylicum* WT und der Stamm *C. acetobutylicum* pIMP_ptb_cbe1464 unterschieden sich, ausgenommen von der 2,3-Butandiol- und Acetoinproduktion, nur leicht voneinander. Lediglich die Butanol-, Butyrat- und die Acetonkonzentrationen waren im Stamm *C. acetobutylicum* pIMP_ptb_cbe1464 im Vergleich zum Wildtyp reduziert (Abb. 37E, F, G). Bis zum Ende des Wachstum wurde die Glucose von allen Stämmen vollständig verstoffwechselt (Abb. 37I).

In Tabelle 20 sind das Wachstum und die Produktspektren der einzelnen Stämme zusammengefasst.

Tabelle 20: Zusammenfassung des Wachstums und des Produktspektrums der *C. acetobutylicum* Stämme auf MES-Medium

Stamm	max. OD ₆₀₀	2,3- Butandiol [mM]	Aceton [mM]	Acetat [mM]	Ethanol [mM]	Butanol [mM]	Butyrat [mM]	Acetoin [mM]
<i>C. acetobutylicum</i> WT	5,32	-	22,19	45,48	13,93	96,98	66,52	14,63
<i>C. acetobutylicum</i> <i>hbd332s::intron</i>	4,64	-	-	73,72	266,70	-	-	20,60
<i>C. acetobutylicum</i> pIMP_ptb_cbe1464	5,21	43,70	13,40	44,08	13,74	80,01	59,44	-
<i>C. acetobutylicum</i> <i>hbd332s::intron</i> pIMP_ptb_cbe1464	4,78	30,12	-	27,27	296,30	-	-	-

rot: signifikante Abweichungen im Vergleich zum Wildtyp

4. Diskussion

4.1 Optimierung der Acetatproduktion in acetogenen Bakterien

In der chemischen Industrie wird Acetat heute hauptsächlich über die Methanol-Carbonylierung hergestellt. Hierbei werden Methanol und Kohlenmonoxid über Metallkatalysatoren und Iod zu Essigsäure umgesetzt (Monsanto-Prozess; BASF, 1960). 10 % der weltweit, industriell produzierten Essigsäure werden jedoch biotechnologisch über die oxidative Fermentation mit Hilfe von Essigsäurebakterien synthetisiert. Dabei werden alkohol- oder weinhaltige Lösungen über Acetaldehyd zu Essigsäure umgesetzt. Fischer *et al.* entdeckten 1932 die sog. acetogenen Bakterien, welche CO₂ als terminalen Elektronenakzeptor nutzen können und dabei Acetat als Stoffwechselendprodukt über den Wood-Ljungdahl-Weg produzieren. Über diesen Weg der Acetatsynthese ist eine Steigerung der Acetatausbeute um bis zu 50 % möglich, da Acetogene im Gegensatz zu anderen Bakterien das über die Glykolyse gebildete CO₂ über den Wood-Ljungdahl-Weg zu einem weiteren Mol Acetat umsetzen können. Bis heute sind 22 Gattungen acetogener Organismen bekannt. Neben den Acetobakterien und Clostridien, bei welchen es sich um die artenreichsten Gattungen handelt, wurden *Acetitomaculum*, *Acetoanaerobium*, *Acetohalobium*, *Acetonema*, *Bryantella*, *Butyribacterium*, *Caloramator*, *Eubacterium*, *Holophaga*, *Moorella*, *Natroniella*, *Natronincola*, *Oxobacter*, *Ruminococcus*, *Sporomusa*, *Synthrophococcus*, *Tundallia*, *Thermoacetogenium*, *Thermoanaerobacter* und *Treponemo* den Acetogenen zugeordnet. Im Allgemeinen sind acetogene Bakterien in der Lage, neben Hexosen eine Vielzahl weiterer Substrate als Kohlenstoffquelle zu nutzen. Neben Einkohlenstoffverbindungen, wie Formiat, CO₂ oder auch CO, nutzen sie sowohl Alkohole (z.B. Methanol, Ethanol oder Glycerin), Carbonsäuren (Pyruvat, Lactat), Aldehyde (Benzaldehyd, Glyoxylat) oder auch Methylgruppen methoxylierter, aromatischer Verbindungen (z.B. Sinapat, Ferulat) als Substrate (Drake *et al.*, 2008).

In dieser Arbeit wurde zunächst die Acetatproduktion verschiedener acetogener Organismen untersucht. Das Ziel war es, Stämme zu finden, die sich durch eine hohe Acetatproduktion auszeichnen und bei denen die Produktion an unerwünschten Nebenprodukten gleichzeitig gering ausfiel, um weitere Kosten der Abtrennung des Acetats von den Nebenprodukten zu umgehen. Außerdem sollten diese Stämme

eine pH-Toleranz im sauren Medium besitzen, um die Gewinnung von Acetat aus dem Medium zu erleichtern. In der Literatur wurden bereits hohe Acetatproduktionen von ca. 100 g/l beschrieben, jedoch nicht im sauren pH-Bereich von ca. 3,8-4 (Schwartz *et al.*, 1982; Busche, 1991).

In Tabelle 6 sind alle in dieser Arbeit getesteten Acetatproduzenten aufgelistet. Vier der neun Organismen erwiesen sich als sehr gute Acetatbildner, wobei gleichzeitig die Nebenprodukte nur in nicht signifikanten Mengen, geringer als 2 mM, produziert wurden. Sowohl *Acetobacterium woodii*, *Blautia coccoides*, *Clostridium aceticum* als auch *Clostridium ljungdahlii* produzierten beim Wachstum auf ihrem jeweiligen DSMZ-Medium als einziges Endprodukt Acetat in Konzentrationen zwischen 60 und 100 mM.

Clostridium aceticum wurde von Wieringa *et al.* (1936) als erstes acetogenes Bakterium aus dem Erdboden isoliert. Nach ersten Studien ging dieser Organismus jedoch über 30 Jahre verloren, konnte aber aus Sporen wiedergefundener Kulturen reaktiviert werden. *C. aceticum* ist ein Gram-variables, sporenbildendes, bewegliches, anaerobes Bakterium mit einem (G+C)-Gehalt von 33 mol % (Braun *et al.*, 1981), welches H_2/CO_2 , CO, Fructose, Glutamat, Fumarat, Pyruvat, Aldehydgruppen aromatischer Verbindungen und methoxylierte, aromatische Komponenten verwerten kann. Im Jahr 1977 wurde *Acetobacterium woodii* von Balch *et al.* aus schwarzem Sediment der See isoliert. *A. woodii* ist ein Gram-positives, nicht sporenbildendes, bewegliches, anaerobes Bakterium mit einem (G+C)-Gehalt von 39 mol %, welches neben CO_2/H_2 und CO auch Formiat, Methanol, 2,3-Butandiol, Ethylenglykol, Acetoin, Glycerin, verschiedene Zucker, Betain und mehrere methoxylierte, aromatische Säuren verwerten kann. *A. woodii* ist in der Lage, mixotroph auf CO_2/H_2 und organischen Verbindungen wie Fructose zu wachsen (Braun und Gottschalk, 1981). *Clostridium ljungdahlii* wurde 1988 von Barik *et al.* aus dem Abfall eines Hühnerzuchtbetriebes isoliert. *C. ljungdahlii* ist ebenfalls ein Gram-positives, sporenbildendes, bewegliches, anaerobes Bakterium mit einem (G+C)-Gehalt von 31 mol %, welches sowohl autotroph CO_2/H_2 und CO, als auch heterotroph Formiat, Ethanol, Pyruvat, Fumarat und Zucker wie Fructose und Xylose verwerten kann (Tanner *et al.*, 1993). Beim Wachstum auf CO_2/H_2 und Fructose wird als einziges Endprodukt Acetat gebildet, wohingegen beim Wachstum auf Synthesegas, welches hauptsächlich aus den Komponenten H_2 , CO und CO_2 besteht, zusätzlich Ethanol produziert wird (Tanner *et al.*, 1993; Phillips *et al.*, 1993).

Blautia coccoides (ehemals: *Clostridium coccoides*) wurde im Jahr 1976 von Kaneuchi *et al.* aus dem Kot von Mäusen isoliert. *B. coccoides* ist ein Gram-positives, sporenbildendes, unbewegliches, anareobes Bakterium, welches eine Reihe von Zuckern wie Glucose, Fructose, Laktose, Trehalose verwerten kann und autotroph auf CO₂/H₂, jedoch nur unter der gleichzeitigen Zugabe von Formiat, wachsen kann. Aufgrund der Tatsache, dass *B. coccoides* CO nicht verwertet und autotroph auf CO₂/H₂ nur unter Zugabe von Formiat wachsen kann, wurden die weiteren Arbeiten mit *A. woodii*, *C. aceticum* und *C. ljungdahlii* durchgeführt (Abb. 38).

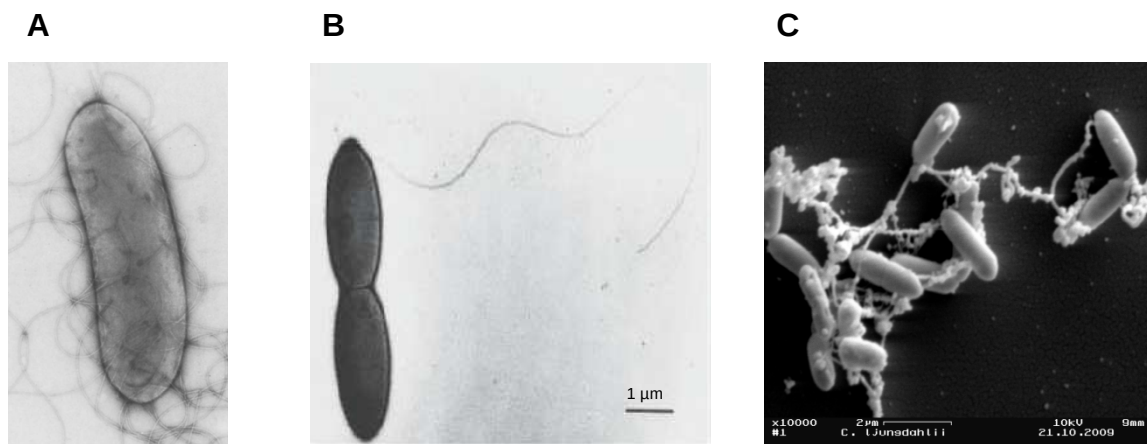


Abbildung 38: A *C. aceticum* (Braun *et al.*, 1981), B *A. woodii* (Balch *et al.*, 1977), C *C. ljungdahlii* (Elektronenmikroskopie Universität Ulm, 2011)

Um diese drei Stämme gentechnisch so verändern zu können, dass sie sich durch eine verbesserte Acetatproduktion auszeichnen, wurde zunächst ein Transformationprotokoll etabliert bzw. verbessert. Für *A. woodii* wurden bereits Protokolle zur Elektrotransformation und Konjugation beschrieben (Strätz *et al.*, 1993). Köpke beschrieb 2010 eine erfolgreiche Transformation eines Butanolsynthese-Plasmids in *C. ljungdahlii*. In dieser Arbeit wurden die Transformationsprotokolle optimiert und ein Methylierungssystem für die in dieser Arbeit verwendeten, acetogenen Bakterien entwickelt. Durch die Modifikation des Transformationsprotokolls von Köpke (2010) konnten *A. woodii*, *C. aceticum* und *C. ljungdahlii* erfolgreich mit Plasmid-DNA transformiert werden. Die Erhöhung des Volumens des Inkubationsmediums von 50 auf 200 ml führte zu einer Steigerung der Transformationseffizienz. Dies ist vermutlich auf das langsamere Wachstum der Zellen aufgrund des Volumeneffektes zurückzuführen, wodurch die Zellmembran der

Zellen möglicherweise durchlässiger für die Aufnahme von DNA geworden ist. Des Weiteren wurden alle Zentrifugationsschritte bei Raumtemperatur durchgeführt, um Kälteschocks der Zellen zu verhindern. Für die Transformation von *A. woodii* wurden dem Medium vor der Inokulierung der Zellen 40 mM DL-Threonin zugeben, welchem eine Destabilisierung der Zellmembran zugesagt wird.

Viele Bakterien besitzen ein sequenzspezifisches Restriktionssystem, wodurch Fremd-DNA erkannt und abgebaut wird. Um dieses Phänomen zu unterdrücken, wurde eine Methylase aus einem acetogenen Bakterium zur Methylierung der zu transformierenden DNA verwendet. Da zum Zeitpunkt dieser Arbeit nur das Genom von *C. ljungdahlii* vollständig sequenziert war (Köpke *et al.*, 2010), wurde eine Methylase aus *C. ljungdahlii* (CLJU_c03310) für die Methylierung von Plasmid-DNA eingesetzt. Die Sequenz dieser Methylase liegt nun in den Plasmiden pMClj bzw. pMCljS vor, welche in *E. coli*-Stämme transformiert wurden und diese so zur *in-vivo*-Methylierung herangezogen werden können.

Durch die Überexpression der Gene *pta* und *ack*, die für die Phosphotransacetylase und die Acetat-Kinase kodieren, sollte eine Steigerung der Acetatproduktion in den Stämmen *A. woodii*, *C. aceticum* und *C. ljungdahlii* erreicht werden. Die Phosphotransacetylase (Pta) katalysiert die Bildung von Acetyl-Phosphat aus Acetyl-CoA, welches weiter über die Acetat-Kinase (Ack) zu Acetat verstoffwechselt wird (Abb. 1 und 2). Die Überexpression dieser Gene könnte zum einen die Acetatproduktion nach der Glykolyse sowie während des Wood-Ljungdahl-Wegs steigern und zum anderen durch die Generierung von zusätzlichem ATP, welches bei der Bildung von Acetat entsteht, die Energiegewinnung erhöhen. Da nur das Genom von *C. ljungdahlii* zum Zeitpunkt dieser Arbeit sequenziert war, stammen alle in dieser Arbeit verwendeten Gensequenzen aus diesem Organismus. Das *pta-ack*-Operon aus *C. ljungdahlii* wurde mit dem nativen Promoter in die Vektoren pIMP1 und pJIR750 kloniert, welche sich jeweils durch einen anderen Replikationsursprung für Gram-positive Bakterien auszeichnen, wodurch unterschiedliche Transformationswahrscheinlichkeiten und Replikationseigenschaften erwartet wurden. Um die Transkription der Gene unter Umständen noch weiter zu erhöhen, wurde der Promoter P_{ptb} der Phosphotransbutyrylase aus *C. acetobutylicum*, mit welchem schon in früheren Experimenten Erfolge nachgewiesen werden konnten (Köpke, 2009), vor das *pta-ack*-Operon im Plasmid pIMP1 kloniert. Nach Transformation dieser Plasmide in *A. woodii*, *C. aceticum* und *C. ljungdahlii* wurden

anhand von Wachstumsversuchen Charakterisierungen, in Bezug auf das Produktspektrum und den Substratverbrauch, der rekombinanten Stämme im Vergleich zum Wildtypstamm vorgenommen. Die Transformation der Plasmide war in den Stamm *C. ljungdahlii* erfolgreich, jedoch konnten keine Wachstumsversuche durchgeführt werden, da Reaktivierungen dieser Stämme aus den bei - 80 °C gelagerten Stammkulturen fehlschlagen und weitere Transformationen erfolglos blieben.

Bei Wachstum der rekombinanten *C. aceticum*-Stämme, *C. aceticum* pIMP1_pta-ack und *C. aceticum* pJIR750_pta-ack, auf Fructose konnte eine Inhibierung der Acetatproduktion beobachtet werden. So produzierten diese Überexpressionstämme um bis zu 12 mM weniger Acetat im Vergleich zum Wildtyp oder auch dem Kontrollstamm mit dem Leerplasmid pIMP1, die maximal 34 mM Acetat produzierten. Durch die Klonierung des Promoters P_{ptb} vor das *pta-ack*-Operon konnte jedoch eine Steigerung der Acetatkonzentration des Stammes *C. aceticum* pIMP_ptb_pta-ack von ca. 24 mM auf 58 mM beobachtet werden.

Auch beim Wachstum der rekombinanten *A. woodii*-Stämme auf Fructose konnte eine Inhibierung der Acetatproduktion beobachtet werden, welche sich jedoch nur auf die Stämme, welche ein pIMP-basiertes Konstrukt trugen, beschränkte. Der Kontrollstamm *A. woodii* mit dem Leerplasmid pJIR750 produzierte beim Wachstum auf Fructose mit 123 mM am meisten Acetat. Auch der Überexpressionsstamm *A. woodii* pJIR750_pta-ack produzierte mit fast 94 mM mehr Acetat als der Wildtyp, welcher rund 90 mM Acetat produzierte. Diese Steigerung der Acetatproduktion ist vermutlich auf die Stabilisierung der Zellen und der damit verbundenen, erhöhten OD_{600} der pJIR750-tragenden Stämme zurückzuführen. Der Überexpressionsstamm *A. woodii* pJIR750_pta-ack und der Kontrollstamm mit dem Leerplasmid pJIR750 erreichten optische Dichten von bis zu 4,8 im Vergleich zum Wildtyp, welcher eine maximale OD_{600} von 3,8 erreichte.

Um für weitere Versuche auszuschließen, dass es sich bei der Fructose, welche jeweils bis zum Ende des Wachstums vollständig verbraucht wurde, um den limitierenden Faktor der Acetatproduktion handelte, wurde ein „fed-batch“-Experiment durchgeführt, bei welchem in regelmäßigen Abständen dem Medium Fructose zugegeben wurde. In diesem Versuch zeigte sich jedoch neben der niedrigeren OD_{600} von nur noch ca. 2 auch eine verminderte Acetatkonzentration. Nach der Analyse der Fructoseverwertung wurde eine Limitierung der Fructoseaufnahme

nachgewiesen. So wurde die nachgefütterte Fructose nur noch in sehr geringen Mengen verwertet. Nach der ersten weiteren Zugabe von Fructose ins Medium stoppte sowohl das Wachstum als auch die Acetatproduktion. Dies könnte auf das Sinken des pH-Werts durch die Zugabe von Fructose zurückzuführen sein, da die Fructoselösung einen sauren pH-Wert aufweist. Außerdem ist aus der Literatur bekannt, dass Zucker von Acetogenen oft nicht optimal genutzt bzw. komplett verwertet werden können, wenn kein zusätzliches CO₂ vorhanden ist (Drake *et al.*, 2008). Dieses Phänomen der besseren Fructoseverwertung durch die Zugabe von CO₂/H₂ konnte auch von Demler (2012) bei *A. woodii* gezeigt werden.

Um die Acetogenen in der heutigen Klimadiskussion interessanter zu machen, ist es von großer Bedeutung, die Acetatproduktion auf dem Substrat CO₂/H₂ oder auch auf Synthesegas stattfinden zu lassen, da es sich bei diesen Substraten um Abfallprodukte der Industrie handelt, welche so für die Produktion neuer Verbindungen genutzt werden könnten. In dieser Arbeit wurde das Wachstum der rekombinanten *A. woodii*-Stämme auf CO₂/H₂ untersucht. Bei Wachstum des Stammes *A. woodii* WT und der rekombinanten *A. woodii*-Stämme auf CO₂/H₂ konnte die maximale Acetatkonzentration im Vergleich zum Wachstum auf Fructose jeweils weiter gesteigert werden, wobei in diesem Versuch aufgrund fehlender Analytik keine exakte Aussage über die zur Verfügung stehende Kohlenstoffkonzentration gemacht werden kann. Der Wildtyp-Stamm produzierte bei Wachstum auf CO₂/H₂ 117 mM Acetat, fast 20 mM mehr Acetat als bei Wachstum auf Fructose (90 mM). Wieder konnte auch bei Wachstum auf CO₂/H₂ eine Inhibierung der Acetatproduktion in den Überexpressionsstämmen, welche ein pIMP-basiertes Konstrukt trugen, beobachtet werden. Vor allem beim Überexpressionsstamm *A. woodii* pIMP_ptb_pta-ack, welcher auch schon bei Wachstum auf Fructose die geringste Acetatproduktion zeigte, sank die Acetatkonzentration im Vergleich zum Wildtyp um fast 30 mM auf 80 mM Acetat ab. Der Kontrollstamm *A. woodii* pJIR750 erreichte mit maximal 136 mM Acetat eine höhere Acetatkonzentration als der Wildtyp (117 mM). Der Überexpressionsstamm *A. woodii* pJIR750_pta-ack erreichte mit 160 mM die höchste Acetatkonzentration. Kooperationspartner vom Lehrstuhl der Bioverfahrenstechnik, TU München, stellten bei der Fermentation des Wildtyp-Stammes von *A. woodii* eine Akkumulation von Formiat während des Wachstums auf CO₂/H₂ fest. Auch Peters *et al.* (1999) konnten die vorübergehende Akkumulation von Formiat während des Wachstums auf CO₂/H₂

beobachten. Sie begründeten dies mit der ATP-abhängigen Bildung von Formyl-THF aus Formiat, welche möglicherweise zu einem kurzzeitigen Energie-Engpass im Stoffwechsel führen könnte. Um eine Akkumulation von Formiat während des Wachstums auf CO_2/H_2 zu umgehen, wurden die THF-abhängigen Gene, welche an der Reduktion von Formiat zu einer Methylgruppe im Methyl-Ast des Wood-Ljungdahl-Wegs beteiligt sind, in *A. woodii* überexprimiert (Abbildung 17). Hierzu wurden die Gene aus *C. ljungdahlii*, welche für die Formyl-THF-Synthetase, die Methenyl-THF-Cyclohydrolase, die Methylen-THF-Dehydrogenase und die Methylen-THF-Reduktase kodieren, jeweils in die Vektoren pIMP1 und pJIR750 kloniert. Um auch hier den Abbau von Formiat bzw. die damit verbundene Steigerung der Acetatbildung zu optimieren, wurde der Promoter P_{ptb} vor die Gene kloniert. Bei der Überproduktion der THF-abhängigen Enzyme in *A. woodii* konnte eine ähnliche Acetatproduktion beim Wachstum auf Fructose beobachtet werden, wie es schon bei der Überexpression des *pta-ack*-Operons aufgetreten ist. Wieder zeigte sich eine Hemmung der Acetatproduktion im Falle der pIMP-basierten Konstrukte, was vor allem durch den Überexpressionstamm *A. woodii* pIMP_ptb_THF mit nur maximal 54 mM Acetat verdeutlicht wurde, wobei die Acetatkonzentrationen des Wildtyps, der Kontrollstämme und der Überexpressionsstämme zwischen 78 und 124 mM lagen. Bei Wachstum auf Fructose zeichnete sich auch hier der Kontrollstamm mit dem Leerplasmid pJIR750 mit maximal 124 mM als bester Acetatproduzent aus. „fed-batch“-Experimente zeigten auch hier die Hemmung des Wachstums und die damit verbundene Limitierung der Acetatproduktion. Bei Wachstum auf CO_2/H_2 konnte jedoch eine weitere Steigerung der maximalen Acetatkonzentration beobachtet werden. So produzierte der Überexpressionstamm *A. woodii* pJIR750_THF fast 160 mM Acetat, was einer Steigerung um ein Drittel im Vergleich zum Wildtyp (117 mM) entspricht.

In den „batch“-Versuchen konnte gezeigt werden, dass es sich bei *A. woodii* mit dem Leerplasmid pJIR750 mit rund 124 mM Acetat bei Wachstum auf Fructose und bei den Überexpressionsstämmen *A. woodii* pJIR750_pta-ack und *A. woodii* pJIR750_THF mit rund 160 mM bei Wachstum auf CO_2/H_2 um die besten Acetatproduzenten handelt. Somit kann davon ausgegangen werden, dass das Plasmid pJIR750 die Stabilität der Zellen erhöht, was in einer Steigerung der Acetatproduktion resultiert. Durch die Überexpression des *pta-ack*-Operons im Stamm *A. woodii* pJIR750_pta-ack konnte die maximale Acetatkonzentration bei

Wachstum auf Fructose auf 94 mM im Vergleich zum Wildtyp mit rund 90 mM zwar gesteigert werden, jedoch lag diese am Ende des Wachstums unter der Acetatkonzentration des Kontrollstammes *A. woodii* pJIR750 (124 mM). Bei Wachstum auf CO₂/H₂ lag die maximale Acetatkonzentration des Kontrollstammes *A. woodii* pJIR750 jedoch unter den maximalen Acetatkonzentrationen der Überexpressionsstämme *A. woodii* pJIR750_pta-ack und *A. woodii* pJIR750_THF, die jeweils rund 160 mM Acetat produzierten. Somit konnte durch die Gene *pta* und *ack*, bzw. durch die Gene für den Formiatabbau die Acetatproduktion weiter gesteigert werden.

Durch den Einsatz des Promoters P_{ptb} konnte nur in *C. aceticum* eine Steigerung der Acetatkonzentration beobachtet werden, welche jedoch weit unter den maximalen Acetatkonzentrationen der rekombinanten *A. woodii*-Stämme lag, weswegen sich das Hauptaugenmerk in allen weiteren Versuchen hauptsächlich auf *A. woodii* beschränkte. Im rekombinanten Stamm *A. woodii* pIMP_ptb_pta-ack oder *A. woodii* pIMP_ptb_THF war durch den Einsatz dieses Promoters keine Steigerung der Acetatproduktion zu erkennen. Eine weitere Erhöhung der Produktivität könnte vermutlich durch den Einsatz anderer Promotoren im Plasmid pJIR750 erfolgen, welche in den hier verwendeten Organismen bessere Aktivitäten zeigen könnten. Der größte Erfolg in der Steigerung der Acetatproduktion könnte durch die Verwendung nativer Gene erfolgen, da eine heterologe Expression meist zu Genprodukten führt, welche mit stammeigenen Genprodukten Fehlbindungen eingehen könnten. Da das Genom von *A. woodii* gegen Ende dieser Arbeit veröffentlicht wurde (Poehlein *et al.*, 2012), können nun neue Konstrukte für eine homologe Expression in *A. woodii* generiert werden, wodurch evtl. weitere Erfolge in der Steigerung der Acetatproduktion zu verzeichnen wären. Eine mögliche Begründung, warum die Verwendung pIMP-basierter Konstrukte und vor allem in Kombination mit dem Promoter P_{ptb} zu einer Hemmung der Acetatproduktion führt, könnte die erhöhte Anzahl an gebildetem Genprodukt sein. Zu hohe Konzentrationen eines Enzyms in einer Zelle könnten Hemmungen in dessen Aktivität hervorrufen. Durch die Aktivitätsbestimmung der Acetat-Kinase im Rohextrakt sollte dieser Vermutung nachgegangen werden. In Tabelle 15 sind die spezifischen Acetat-Kinase-Aktivitäten sowohl des Stammes *A. woodii* WT als auch der rekombinanten *A. woodii*-Stämme aufgezeigt. Hier ergab sich eine spezifische Aktivität der Acetat-Kinase des Wildtyps von $7,64 \pm 0,47$ U/mg. Diese stimmt mit einer in der Literatur bereits beschriebenen

spezifischen Aktivität von 7,6 U/mg für den Wildtypstamm *A. woodii* überein (Winzer, 1992). Die spezifischen Aktivitäten der Acetat-Kinase der rekombinanten Kontrollstämme und der Überexpressionsstämme lagen auch zwischen 7 und 8 U/mg. Nur der Überexpressionsstamm *A. woodii* pJIR750_THF, für welchen beim Wachstum auf CO₂/H₂ die höchste Acetatkonzentration bestimmt wurde, zeigte eine spezifische Aktivität der Acetat-Kinase von $9,98 \pm 0,24$. Auch der Überexpressionsstamm *A. woodii* pIMP_ptb_THF, welcher sowohl bei Wachstum auf Fructose als auch bei Wachstum auf CO₂/H₂ gravierende Einbußen der Acetatkonzentration verzeichnete, wies eine spezifische Aktivität der Acetat-Kinase von nur $6,57 \pm 0,28$ U/mg auf. Dies zeigt, dass eine höhere bzw. niedrigere spezifische Aktivität durchaus Auswirkungen auf die Endacetatkonzentration haben kann. Winzer (1992) konnte zeigen, dass sich die spezifische Aktivität der Acetat-Kinase aus *A. woodii* WT bei Wachstum auf verschiedenen Substraten deutlich unterschied. So zeigte die Acetat-Kinase eine um den Faktor 6 höhere spezifische Aktivität beim Wachstum auf Glucose im Vergleich zum Wachstum auf Laktat, wobei die spezifische Aktivität während des Wachstums nur geringen Schwankungen unterlag. Somit unterscheidet sich die spezifische Aktivität der Acetat-Kinase bei Wachstum auf CO₂/H₂ vermutlich auch von der spezifischen Aktivität bei Wachstum auf Fructose. Die spezifische Aktivität bei Wachstum auf CO₂/H₂ wurde jedoch nicht bestimmt, da mit den maximal erreichten OD₆₀₀-Werten von ca. 0,3 nicht genug Zellen für einen Aufschluss gewonnen werden konnten. Weiter beschrieb Winzer, dass die Acetat-Kinase aus *A. woodii* WT höchstwahrscheinlich eine tetramere Struktur besitzt. Neben mono-, di-, tri- und tetrameren Strukturen von Acetat-Kinasen konnten auch native Acetat-Kinasen identifiziert werden, bei welchen es sich um Oligomere, d.h. Monomer/Dimer- oder Dimer/Tetramer-Strukturen handelt. Bei den Acetat-Kinasen aus *Clostridium acetobutylicum* und *Clostridium thermocellum* handelt es sich zum Beispiel um Dimere (Winzer *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 1998). Da die Struktur der Acetat-Kinase aus *C. ljungdahlii* noch nicht untersucht wurde, kann nicht davon ausgegangen werden, dass diese eine identische oder ähnliche Struktur besitzt, wie die Acetat-Kinase aus *A. woodii*. Unterschiede in der Struktur der beiden Acetat-Kinasen der beiden Stämme könnten dafür verantwortlich sein, dass die Acetat-Kinase aus *C. ljungdahlii* in *A. woodii* keine oder nur geringfügige Aktivität aufweist. Denkbar wäre z. B. die Inaktivierung der Acetat-Kinase von *A. woodii* durch die Bindung nativer und „fremder“ Proteine.

Da das Genom von *A. woodii* nun auch veröffentlicht wurde (Poehlein *et al.*, 2012), konnte durch einen Sequenzvergleich der Gene *ack*, *pta* und der Gene, welche für die THF-abhängigen Enzyme der Stämme *C. ljungdahlii* und *A. woodii* kodieren, gezeigt werden, dass sich diese in ihrer Basenabfolge auffallend voneinander unterscheiden. Dieser lokale Sequenzvergleich wurde mit dem Programm „Water (EMBOSS)“ (<http://www.ebi.ac.uk>, Stand 30.04.2012) durchgeführt.

In Tabelle 21 sind die Ergebnisse des paarweisen Abgleichs der Gene, welche für die Acetat-Kinase, die Phosphotransacetylase, die Formyl-THF-Synthetase, die Methenyl-THF-Cyclohydrolase, die Methylen-THF-Dehydrogenase und die Methylen-THF Reduktase aus *A. woodii* und *C. ljungdahlii* kodieren, zu sehen.

Tabelle 21: Sequenzanalyse in *A. woodii* und *C. ljungdahlii*

Enzym	Anzahl Basenpaare <i>A. woodii</i> / <i>C.ljungdahlii</i>	Sequenzvergleich <i>A. woodii</i> / <i>C. ljungdahlii</i>
Acetat-Kinase	<u><i>A. woodii</i></u> : 1191 Bp <u><i>C. ljungdahlii</i></u> : 1197 Bp	Identität: 822 / 1266 (64,9 %) Lücken: 148 / 1266 (11,7 %)
Phosphotransacetylase	<u><i>A. woodii</i></u> : 972 Bp <u><i>C. ljungdahlii</i></u> : 1008 Bp	Identität: 562 / 1247 (45,1 %) Lücken: 518 / 1247 (41,5 %)
Formyl-THF-Synthetase (Formiat-THF-Ligase)	<u><i>A. woodii</i></u> : <i>fhs1</i> 1677 Bp <i>fhs2</i> 1680 Bp <u><i>C. ljungdahlii</i></u> : 1677 Bp	Identität ¹ : 1219 / 1753 (69,5 %) Lücken ¹ : 154 / 1753 (8,8 %) Identität ² : 1213 / 1760 (68,9 %) Lücken ² : 165 / 1760 (9,4 %)
Methenyl-THF- Cyclohydrolase	<u><i>A. woodii</i></u> : 660 Bp <u><i>C. ljungdahlii</i></u> : Bifunktionale Methylen-THF- Dehydrogenase/Methenyl- THF-Cyclohydrolase: 855 Bp	Identität: 401 / 917 (43,7 %) Lücken: 408 / 917 (44,5 %)

Fortsetzung Tabelle 21: Sequenzanalyse in *A. woodii* und *C. ljungdahlii*

Enzym	Anzahl Basenpaare	Sequenzvergleich
	<i>A. woodii</i> / <i>C. ljungdahlii</i>	<i>A. woodii</i> / <i>C. ljungdahlii</i>
Methylen-THF-Dehydrogenase	<u><i>A. woodii</i></u> : 906 Bp	Identität ¹ : 415 / 925 (44,9 %)
	<u><i>C. ljungdahlii</i></u> : Bifunktionale Methylen-THF-Dehydrogenase/Methenyl-THF-Cyclohydrolase: 855 Bp	Lücken ¹ : 411 / 925 (44,4 %)
Methylen-THF-Reduktase	<u><i>A. woodii</i></u> : kleine Untereinheit	Identität ³ : 388 / 879 (44,1 %)
	(<i>metV</i>): 618 Bp	Lücken ³ : 379 / 879 (43,1 %)
	große Untereinheit	
	(<i>metF</i>): 897 Bp	Identität ⁴ : 570 / 995 (57,3 %)
	<u><i>C. ljungdahlii</i></u> : 882 Bp	Lücken ⁴ : 211 / 995 (21,2 %)

Vergleich mit ¹ *fhs1*, ² *fhs2*, ³ *metV*, ⁴ *metF*

Wie in Tabelle 21 zu sehen ist, weisen die Gene von *A. woodii* und *C. ljungdahlii* nur geringe Identitäten zueinander auf. Außerdem besitzt *A. woodii* eine Formyl-THF-Synthetase, welche von zwei Genen kodiert wird, wohingegen die Formyl-THF-Synthetase aus *C. ljungdahlii* nur von einem Gen kodiert wird. *C. ljungdahlii* besitzt eine bifunktionale Methylen-THF-Dehydrogenase/Methenyl-THF-Cyclohydrolase, *A. woodii* dagegen jeweils ein Gen, welches für die Methenyl-THF-Cyclohydrolase und ein Gen, welches für die Methylen-THF-Dehydrogenase kodiert. Ein weiterer Unterschied ist bei der Methylen-THF-Reduktase zu erkennen. Diese besteht bei *A. woodii* aus einer großen und einer kleinen Unterheit, was bei *C. ljungdahlii* nicht der Fall ist. Somit weichen nicht nur die Gensequenzen in ihrer Abfolge voneinander ab, was eine Änderung der Aminosäuresequenz und somit eine Änderung der Proteinstruktur zur Folge hat, sondern es bestehen auch Unterschiede in der Anzahl der kodierenden Gene, bzw. der Untereinheiten für die Enzyme. Dies war schon aufgrund des Unterschiedes im (G+C)-Gehalt, welcher bei *A. woodii* 39 mol % und bei *C. ljungdahlii* 31 mol % beträgt, zu erwarten. Somit liegt keine optimale „codon usage“ für die effektive Expression der Gene im Zielorganismus vor. Dies bestätigt die Vermutung, dass eine homologe Überexpression zu noch besseren Erfolgen einer gesteigerten Acetatproduktion führen könnten.

Da mit den rekombinanten Stämmen *A. woodii* pJIR750, *A. woodii* pJIR750_pta-ack und *A. woodii* pJIR750_THF bei Wachstum auf CO₂/H₂ Steigerungen der Acetatkonzentration um bis zu 50 mM im direkten Vergleich zum Wildtypstamm erreicht werden konnten, wurden diese Stämme zur Fermentation zum Kooperationspartner vom Lehrstuhl der Bioverfahrenstechnik, TU München, geschickt. M. Demler beschäftigte sich während seiner Promotion mit der Optimierung einer Fermentation für den Stamm *A. woodii* WT auf CO₂/H₂ (Demler, 2012). Dabei konnte er u.a. durch Erhöhung des H₂-Partialdruckes die Acetatausbeute auf bis zu 44 g/l Acetat innerhalb von 11 Tagen steigern (Demler, 2011). Zuvor waren volumetrische Produktivitäten von maximal 2,7 g Acetat/l/Tag bekannt (Suzuki *et al.*, 1993), welche Demler durch die Erhöhung des H₂-Partialdruckes von 400 mbar auf 1.700 mbar auf 7,4 g Acetat pro Liter und Tag steigern konnte.

Das Einbringen des Plasmids pJIR750 zeigte erneut eine Stabilisierung der Zellen der rekombinanten *A. woodii*-Stämme bei der Fermentation auf CO₂/H₂ im Vergleich mit dem Wildtyp (Demler, 2012). So erreichten die rekombinanten Stämme eine Wachstumsrate von 0,052-0,056 h⁻¹, wohingegen diese beim Wildtyp bei nur 0,035 h⁻¹ lag. Das Erreichen einer höheren und konstanten optischen Dichte konnte auch schon bei Wachstum auf Fructose und bei Wachstum auf CO₂/H₂ im „batch“-Versuch beobachtet werden. Da dieser Effekt schon beim Kontrollstamm mit dem Leerplasmid pJIR750 auftritt, ist dieser Effekt demzufolge auf das Plasmid pJIR750 zurückzuführen. Unterschiede zum Plasmid pIMP1, welches einen solchen Effekt nicht hervorruft, liegen im Vorhandensein des Gens *lacZ*, des Chloramphenicol-Resistenzgens (*catP*) und des Replikationsursprunges *rep* (pIP404) im Gegensatz zu *repL* vor. Das *lacZ*-Gen kodiert für eine β -Galactosidase. β -Galactosidasen sind an der Hydrolyse endständiger β -Galactosereste von β -Galactosiden beteiligt, wodurch eine Stabilisierungseigenschaft auf die Zellen eher unwahrscheinlich ist. Vermutlich ist die gesteigerte Stabilität der Zellen auf den Replikationsursprung *rep* (pIP404) zurückzuführen. In der Literatur wurden schon des öfteren Effekte der Replikons auf die Höhe der Kopienzahl und die genetische Stabilität, welche drastische Effekte auf die Genexpression, den Wirtsmetabolismus und die Endproduktbildung haben können, beschrieben (Carrier *et al.*, 1998; Jain *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 2000). Bei den Replikons handelt es sich um die Schlüssel-Elemente in der Replikation von Plasmiden. Yu *et al.* (2012) untersuchten die Einflüsse verschiedener Replikons, u.a.

den Einfluss des Replikons pIP404 (*rep* aus dem Plasmid pJIR750 in dieser Arbeit) aus *Clostridium perfringens* und des Replikons pIM13 (*repL* aus dem Plasmid pIMP1 in dieser Arbeit) aus *Bacillus subtilis* auf die Transformationseffizienz, Plasmidstabilität und das Expressionsniveau in *Clostridium tyrobutyricum*. Es zeigten sich nach der Transformation Unterschiede in der Transformationseffizienz, Ausbeute des Endprodukts und im Wachstum der Zellen. Mit dem Replikon pIP404 aus *C. perfringens* im Plasmid pJIR konnten schon in früheren Studien Erfolge in der homologen Überexpression einer nativen Hydrogenase in *C. tyrobutyricum* nachgewiesen werden (Lee *et al.*, 2010). Allerdings unterscheiden sich die Effekte der Replikons im jeweiligen Zielorganismus, so dass ein Replikon in einem Organismus gute Ergebnisse liefern kann, wohingegen dieses Replikon in einem anderem Organismus Hemmungen in der Endproduktbildung oder Stabilitätseinbußen, welche mit Wachstumsdefiziten verbunden sind, auslösen kann.

Die volumetrische Produktionsrate bei der Fermentation auf CO₂/H₂ lag bei dem Stamm *A. woodii* WT bei 416 mM d⁻¹ (24,96 g l⁻¹ d⁻¹) (Demler, 2012). Diese konnte durch das Einbringen des Leerplasids pJIR750 auf 421 mM d⁻¹ (25,31 g l⁻¹ d⁻¹) gesteigert werden und lag beim den Überexpressionstämmen *A. woodii* pJIR750_pta-ack und *A. woodii* pJIR750_THF bei fast 480 mM d⁻¹ (29 g l⁻¹ d⁻¹) (Demler, 2012). Da sich die zellspezifischen Produktionsraten der rekombinanten Stämme jedoch kaum vom Wildtyp unterschieden, ist die höhere volumetrische Produktionsrate auf die höhere Zellmasse zurückzuführen. Die zellspezifische Produktionsrate, d.h. die Produktionseffizienz der einzelnen Zellen, konnte somit durch die Überexpression der Gene für die Phosphotransacetylase und die Acetat-Kinase und auch durch die THF-abhängigen Enzyme nicht gesteigert werden. Nach 3,8 Tagen erreichte der Überexpressionsstamm *A. woodii* pJIR750_THF, wie schon in den „batch“-Experimenten beim Wachstum auf CO₂/H₂ gezeigt werden konnte, mit 849 mM (51,0 g l⁻¹) die höchste Acetatkonzentration. Auch der Überexpressionsstamm *A. woodii* pJIR750_pta-ack erreichte mit 841 mM (50,5 g l⁻¹) eine höhere Acetatkonzentration als der Kontrollstamm *A. woodii* pJIR750 mit 744 mM (44,7 g l⁻¹) (Demler, 2012). Zusammenfassend kann für den Fermenterversuch gesagt werden, dass zwar eine Steigerung der Acetatproduktion in rekombinanten *A. woodii*-Stämmen beobachtet werden konnte, diese jedoch auf eine erhöhte Biotrockenmasse zurückzuführen ist.

Des Weiteren stellt sich die Frage, inwieweit sich eine hohe Acetatkonzentration im Medium auf die Aktivität der Acetat-Kinase in Acetogenen auswirkt. So beschrieben Klemps *et al.* (1987), dass die Acetat-Kinase in *Thermoanaerobacter kivui* ab Acetatkonzentrationen von 48 g l^{-1} gehemmt wurde. Auch Drake *et al.* (2008) beschrieben die Acetogenen als sensitiv gegenüber Acetat und sauren Bedingungen. Hohe Konzentrationen an Acetat und Protonen hemmen das Wachstum acetogener Bakterien, da die Protonenantriebskraft und das elektrische Transmembranpotential unter diesen Bedingungen nicht aufrechterhalten werden können (Baronofsky *et al.*, 1984). Jedoch sind neben *Clostridium drakei* viele andere Acetogene bekannt, welche in sauren Habitaten leben und sich somit durch eine höhere Acetattoleranz auszeichnen. Außerdem wurden in der Literatur Stämme von *Moorella thermoacetica* beschrieben, welche durch chemische Mutationen eine verbesserte Säuretoleranz aufweisen (Schwartz und Keller, 1982; Brumm, 1988; Parekh und Cheryan, 1991). Durch das parallele Entfernen des Acetats aus dem Medium kann eine Anhäufung des Acetats im Medium und damit eine Ansäuerung des Mediums durch Acetat vermieden werden, so dass Acetat theoretisch unbegrenzt durch die Organismen produziert werden könnte. Eggeman und Verser (2005, 2006) konnten bereits einige Erfolge in der Gewinnung bzw. in der Abtrennung des Acetats aus dem Medium verzeichnen.

Neben der Verwertung der Abfallprodukte CO_2/H_2 und des Synthesegases aus der Industrie, sind einige Cellulose- und Ligninverwerter unter den Vertretern der Acetogenen bekannt. So könnte die Acetatproduktion auch aus Cellulose erfolgen. In der Literatur ist beschrieben, dass die Kokultivierung des cellulolytischen, thermophilen *Clostridium thermocellum* und des thermophilen, acetogenen *Thermoanaerobacter kivui* die Produktion von Acetat aus Cellulose ermöglicht (Le Ruyet *et al.*, 1984). Auch *Clostridium lentocellum* Stamm SG6 ist in der Lage, große Mengen an Acetat aus Cellulose zu bilden (Ravinder *et al.*, 2001; Tammali *et al.*, 2003). Durch die Fähigkeit der Acetogenen, Cellulose als Kohlenstoffquelle verwerten zu können, kann aus Abfallprodukten wie z.B. Grünschnitt Acetat produziert werden. Da der Preis für Zucker aus z.B. Melassen oder Stärke aus Getreide in den letzten Jahre stetig gestiegen ist und somit die Produktion von Acetat aus Zuckern wirtschaftlich unrentabel ist, wäre die Verwertung von Cellulose, neben den Abfallprodukten CO_2/H_2 und Synthesegas, eine gute Alternative.

4.2 Erhöhung der Acetatproduktion in *C. acetobutylicum* durch Eliminierung der Nebenprodukte Butanol und Butyrat

C. acetobutylicum ist eines der am besten untersuchten Clostridien. Das Genom wurde bereits 2001 vollständig sequenziert (Nölling *et al.*, 2001). Die steigende Nachfrage nach Biokraftstoffen und biotechnologisch produzierten Chemikalien hat die ABE-Fermentation von *C. acetobutylicum* in das Interesse der weißen Biotechnologie gerückt (Dürre, 2008; Lütke-Eversloh und Bahl, 2011). *C. acetobutylicum* ist in der Lage, die für die Industrie bedeutenden Lösungsmittel Aceton, Butanol und Ethanol (ABE) in einem Verhältnis 3:6:1 zu produzieren. Neben diesen Lösungsmitteln synthetisiert es die Säuren Acetat und Butyrat. Die Bildung dieser Produkte obliegt einem biphasischem Stoffwechsel (Abbildung 39; Jones und Woods, 1986; Dürre und Bahl, 1996; Dürre, 2005; Köpke *et al.*, 2011). Zu Beginn des Wachstum werden in der sog. acidogenen Phase oder auch Säurephase die Säuren Acetat und Butyrat gebildet, welche in das umliegende Medium abgegeben werden, wodurch eine Absenkung des pH-Wertes außerhalb der Zelle resultiert. Da anaerobe Bakterien nicht in der Lage sind, ihren internen pH-Wert konstant zu halten, nimmt dieser parallel zum externen pH-Wert ab, wobei ein Unterschied um etwa eine pH-Einheit bestehen bleibt (Gottwald und Gottschalk, 1985; Huang *et al.*, 1985). Ab einem pH-Wert von 4,5 bricht der Protonengradient zusammen, welcher für die Energiekonservierung und für Transportvorgänge verantwortlich ist. Um dies zu verhindern, erfolgt am Ende des logarithmischen Wachstums ein sog. „Shift“ in die solventogene Phase oder auch Lösungsmittelphase. Hier werden die Säuren Acetat und Butyrat zum Teil wieder aufgenommen und die Lösungsmittel Aceton, Ethanol und Butanol gebildet. Diese Lösungsmittel können in höheren Konzentrationen für den Organismus toxisch sein, in dem sie zum einen die Fluidität der Zellmembran erhöhen (Ingram, 1976; Vollherbst-Schneck *et al.*, 1984; Baer *et al.*, 1987; Baer *et al.*, 1989) und zum anderen Membranproteine wie Transporter (Bowles und Ellefons, 1985; Ounine *et al.*, 1985; Moreira *et al.*, 1981) oder auch ATPasen (Terracciano und Kashket, 1986) inhibieren. Durch das Einsetzen der Endosporenbildung kann die Zelle jedoch ihr Überleben gewährleisten, da es sich bei den Endosporen um Überdauerungsformen handelt, welche unter schlechten Lebensbedingungen gebildet werden.

produzierten beide Mutanten im Vergleich zum Wildtyp-Stamm, welcher beim Wachstum auf CG-Medium ca. 94 mM und beim Wachstum auf MES-Medium ca. 23 mM Aceton produzierte, kein Aceton mehr. Sowohl bei Wachstum auf CG-Medium als auch bei Wachstum auf MES-Medium konnte mit der Integrationsmutante *C. acetobutylicum hbd332s::intron* eine Steigerung der Acetatproduktion beobachtet werden. So produzierte dieser Stamm ca. 21 mM Acetat bei Wachstum auf CG-Medium, somit 10 mM mehr Acetat als der Wildtyp. Beim Wachstum auf MES-Medium produzierte diese Mutante ca. 74 mM Acetat, was rund 30 mM über der Produktion des Wildtyps lag. Bei der Integrationsmutante *C. acetobutylicum crt383s::intron* trat eine Hemmung der Acetatproduktion auf. Diese Mutante produzierte im Vergleich zum Wildtyp-Stamm zwischen 3 und 10 mM weniger Acetat.

Auffallend ist die signifikant erhöhte Ethanolproduktion beider Mutanten im Vergleich zum Wildtyp. Diese lag bei der Integrationsmutante *C. acetobutylicum hbd332s::intron* bei Wachstum auf CG-Medium bei ca. 393 mM Ethanol und beim Wachstum auf MES-Medium bei ca. 267 mM. Auch die Integrationsmutante *C. acetobutylicum crt383s::intron* lag mit 423 mM Ethanol bei Wachstum auf CG-Medium und mit 174 mM bei Wachstum auf MES-Medium weit über den Ethanolkonzentrationen des Wildtypstammes mit 23 mM Ethanol bei Wachstum auf CG-Medium und 14 mM bei Wachstum auf MES-Medium. Da Acetyl-CoA für die Produktion von Ethanol benötigt wird, dessen Konzentrationen in den Integrationsmutanten deutlich gesteigert wurde, liegt kein oder nur wenig Acetyl-CoA für die Synthese von Acetacetyl-CoA vor, welches die Vorstufe von Aceton darstellt und somit das Ausbleiben der Acetonproduktion erklären könnte. Das Ausschalten der Gene *crt* und *hbd* hätte eine Akkumulation der Reduktionsäquivalente zur Folge, da bei der Produktion von Butanol oder Butyrat NADH verbraucht wird, welches nun aufgrund des Redox-Gleichgewichts in andere Reaktion eingeschleust werden muss. Da für die Produktion von Ethanol ebenfalls Reduktionsäquivalente benötigt werden, wird der metabolische Fluss aufgrund des Überschusses an NADH in Richtung der Ethanolproduktion gelenkt, wodurch die Ethanolproduktion um das 18-fache gesteigert wurde. Eine Produktion von Aceton hätte das Redoxpotential nicht aufrechterhalten können, da während der Acetonproduktion keine Regeneration der Reduktionsäquivalente erfolgt. Ein weiterer Grund für die Eliminierung des Lösungsmittels Aceton könnte das Einschlagen des alkohologenen Stoffwechsels

der Mutanten sein. Alkohologene Kulturen produzieren nur noch Ethanol und Butanol, jedoch kein Aceton mehr (Fontaine *et al.*, 2002). Dieser Weg kann unter bestimmten Bedingungen, bei neutralem pH-Wert und gleichzeitigem Überschuss an NAD(P)H, eingeschlagen werden. Auch das Wachstum auf Glucose und Glycerin oder die Zugabe von Reduktionsmitteln, wie z.B. Methylviologen, kann zu diesen Bedingungen führen. Unter alkohologenen Bedingungen wird nur noch das Gen *adhE2* exprimiert, wohingegen die Gene *adhE*, *bdhA* und *bdhB* nicht mehr aktiv sind. Bei *adhE2* handelt es sich, wie bei *adhE*, um eine NADH-abhängige, bifunktionale Aldehyd/Alkoholdehydrogenase, welche wie *adhE* auf dem Megaplasmid pSOL1 lokalisiert ist. Da die Reduktionsäquivalente durch das Ausschalten der Butanol- und Butyratproduktion vermutlich im Überschuss vorliegen, wäre es denkbar, dass die Integrationsmutanten *C. acetobutylicum hbd332s::intron* und *C. acetobutylicum crt383s::intron* einem alkohologenen Stoffwechsel unterliegen, in welchem kein Aceton mehr gebildet wird.

Zeitgleich zu dieser Arbeit generierten Lehmann und Lütke-Eversloh (2011) ebenfalls eine *hbd*-Integrationsmutante von *C. acetobutylicum*. Im Vergleich zur Integrationsmutante in dieser Arbeit erfolgte die Integration jedoch an Position 69/70 (*C. acetobutylicum hbd::int(69)*), wohingegen die Integration in dieser Arbeit an Position 332/333 erfolgte. Bis zu diesem Zeitpunkt waren keine Mutanten bekannt, bei welchen das Ausschalten der Butyratproduktion erfolgreich nachgewiesen werden konnte. Es wurde zwar versucht, über Antisense-RNA oder auch über homologe Rekombination das Gen für die Butyratkinase (*buk*) auszuschalten und somit die Butyratproduktion zu eliminieren, jedoch konnte nur eine teilweise Reduktion der Butyratproduktion erreicht werden (Green *et al.*, 1996; Desai und Papoutsakis, 1999).

Lehmann und Lütke-Eversloh (2011) zeigten, dass die Integrationsmutante *C. acetobutylicum hbd::int(69)* im „fed-batch“-Versuch im Vergleich zum Wildtyp eine niedrigere Wachstumsrate aufwies. Butanol und Butyrat wurden auch in diesem Fall nicht produziert. Eine Steigerung der Acetatproduktion konnte auch mit dieser Mutante beobachtet werden. So lag die Endkonzentration hier bei etwa 58 mM Acetat. Die signifikant erhöhte Produktion an Ethanol trat auch bei dieser Mutante auf, es wurde während der kontinuierlichen Fermentation eine maximale Ethanolkonzentration von etwa 700 mM erreicht. Der einzige Unterschied der Integrationsmutante *C. acetobutylicum hbd::int(69)* zu der in dieser Arbeit generierten

Mutante *C. acetobutylicum* *hbd332s::intron* zeigte sich in der Acetonproduktion. Die komplette Inhibierung der Acetonproduktion in der Integrationsmutante *C. acetobutylicum* *hbd332s::intron* zeigte sich in der Integrationsmutante *C. acetobutylicum* *hbd::int(69)* nur in einer teilweisen Abschwächung der Acetonproduktion. So produzierte diese Mutante mit etwa 30 mM Aceton 40 mM weniger Aceton als der Wildtyp, der maximal 80 mM Aceton produzierte. Dieser Unterschied in der Acetonproduktion der beiden Mutanten könnte evtl. auf die unterschiedliche Zusammensetzung des MES-Mediums oder auf die Position der Integrationsstelle zurückgeführt werden. So lag die verwendete Phosphatkonzentration im MES-Medium dieser Arbeit bei 0,1 g, wohingegen diese bei Lehmann und Lütke-Eversloh (2011) bei 1,1 g lag.

4.3 Verbesserung der Acetatproduktion in *C. acetobutylicum* über die verstärkte Bildung von Acetacetat

Bei der Acetessigsäure bzw. ihrem Salz, dem Acetacetat, handelt es sich um ein Intermediat in der Aceton-Butanol-Gärung des strikt anaroben Bakteriums *C. acetobutylicum*. Bei der Verknüpfung von zwei Molekülen Acetyl-CoA wird unter der Freisetzung eines Coenzym A Acetacetyl-CoA gebildet. Dieses kann daraufhin über unterschiedliche Wege weiter verstoffwechselt werden. Zum einen kann es über 3-Hydroxybutyryl-CoA, Crotonyl-CoA, Butyryl-CoA und Butyraldehyd zu Butanol reduziert werden, zum anderen aber über eine CoA-Transferase, welche den CoA-Rest auf Butyrat oder Acetat überträgt, zu Acetacetat umgewandelt werden. *C. acetobutylicum* verstoffwechselt dieses anschließend über eine Acetacetat-Decarboxylase zu Aceton. Da es sich bei Acetacetat um eine chemisch-instabile Verbindung handelt und auch die Decarboxylierung zu Aceton spontan erfolgen kann, kann Acetacetat auch zu Acetat umgesetzt werden. Durch die Überexpression des Gens *thlA*, welches für eine Thiolase kodiert, die die Bildung von Acetacetyl-CoA katalysiert, und der Gene *ctfA/B*, welche für die Acetacetyl-CoA: Acetat/Butyrat-CoA-Transferase kodieren, die an der Bildung von Acetacetat aus Acetacetyl-CoA beteiligt ist, aus *C. acetobutylicum* soll die Endkonzentration an Acetat über eine Acetacetatbildung erhöht werden.

Diese Gene wurden unter der Kontrolle des starken Promoters P_{ThIA} in den Vektor pIMP1 kloniert (Lederle, 2010). Um eine Selektion dieses Plasmids auch in der Integrationsmutante *C. acetobutylicum hbd332s::intron*, welche eine Erythromycinresistenz-Kassette trägt, zu ermöglichen, erfolgte die Klonierung einer Chloramphenicolresistenz-Kassette in das Plasmid pIMP_ctfAB_thIA. Das resultierende Plasmid pIMP_ctfAB_thIA_catP wurde in *C. acetobutylicum* WT und die Integrationsmutante *C. acetobutylicum hbd332s::intron*, welche die höchste Steigerung in der Acetatkonzentration zeigte, transformiert, um die Ausbeute an Acetat weiter zu verbessern. Bei Wachstum auf CG-Medium zeigte sich durch das Einbringen des Plasmids pIMP_ctfAB_thIA_catP in die Integrationsmutante *C. acetobutylicum hbd332s::intron* eine Steigerung der Acetatkonzentration um 15 mM gegenüber der Integrationsmutante, ohne das Plasmid pIMP_ctfAB_thIA_catP, auf über maximal 36 mM Acetat. Dabei lag die Ethanolkonzentration mit rund 326 mM im Stamm *C. acetobutylicum hbd332s::intron* pIMP_ctfAB_thIA_catP 60 mM unter der Ethanolkonzentration der Integrationsmutante *C. acetobutylicum hbd332s::intron* (393 mM Ethanol). Auch Lederle (2010) konnte durch Einbringen dieses Plasmids in den Wildtypstamm *C. acetobutylicum*, welcher bei Wachstum auf CG-Medium maximal 10 mM Acetat produzierte, eine leichte Steigerung der Acetatkonzentration auf ca. 26 mM beobachten. Auffallend ist, dass durch das Plasmid Wachstumseinbußen im Überexpressionsstamm *C. acetobutylicum hbd332s::intron* pIMP_ctfAB_thIA_catP zu beobachten waren. Zwar lag die maximale OD_{600} mit 8,3 über der maximalen OD_{600} des Wildtyps (7,7), jedoch unter der maximalen OD_{600} der Integrationsmutante *C. acetobutylicum hbd332s::intron* mit 9,6. Bei Wachstum auf MES-Medium reduzierte sich die maximale Acetatkonzentration des Überexpressionstammes *C. acetobutylicum hbd332s::intron* pIMP_ctfAB_thIA_catP um fast 34 mM gegenüber der Integrationsmutante *C. acetobutylicum hbd332s::intron*, die maximal 74 mM Acetat produzierte. Dagegen stieg die Ethanolkonzentration im Stamm *C. acetobutylicum hbd332s::intron* pIMP_ctfAB_thIA_catP um weitere 66 mM auf 332 mM Ethanol an. Die Expression der Gene *ctfA/B* und *thIA* zeigte nur bei Wachstum auf CG-Medium eine Steigerung der Acetatkonzentration, welche jedoch mit maximal 36 mM Acetat deutlich unter der maximalen Acetatkonzentration bei Wachstum der Integrationsmutante *C. acetobutylicum hbd332s::intron* auf MES-Medium, mit maximal 74 mM Acetat, lag.

Durch eine Inaktivierung der Acetacetat-Decarboxylase in *C. acetobutylicum*, welche die Spaltung von Acetacetat in Aceton und CO₂ katalysiert und eine Akkumulation von Acetacetat zu Folge hat, konnte ebenfalls eine Steigerung in der Acetatkonzentration beobachtet werden (Jiang *et al.*, 2010). Die Autoren begründen dies durch die Hemmung der CoA-Transferase-Aktivität durch den Überschuss an Acetacetat, wodurch die Wiederaufnahme des Acetats unterbleibt, da kein Coenzym A auf Acetat übertragen werden kann. In der Literatur ist die nicht-enzymatische Spaltung von Acetacetat in Aceton und CO₂ bei Acetacetat-Decarboxylase-negativen Mutanten weit verbreitet (Han *et al.*, 2011; Lehmann *et al.*, 2012). Da es sich bei Acetacetat jedoch um eine sehr instabile Verbindung handelt, kann die Umsetzung von Acetacetat zu Acetat durchaus erfolgen.

4.4 Erhöhung der Acetatausbeute über die 2,3-Butandiolproduktion in *C. acetobutylicum*

2,3-Butandiol ist ein aliphatischer, chiraler Alkohol, welcher zwei gleichsubstituierte, stereogene Zentren besitzt, aus welchen demnach drei Stereoisomere resultieren können: (R,R)-2,3-Butandiol, (S,S)-2,3-Butandiol und meso-2,3-Butandiol.

In der Industrie wird 2,3-Butandiol hauptsächlich aus Öl hergestellt und wird häufig als Vorstufe für die Produktion vieler bedeutender chemischer Verbindungen und für die Herstellung von Flugkraftstoff, Druckerfarbe, Räuchermittel, Elastan und Parfums genutzt. Außerdem dient 2,3-Butandiol als Ausgangsprodukt für die Produktion von Acetat. 2,3-Butandiol kann über die sog. Gasphasenoxidation zu Acetat umgesetzt werden. *Serratia marcescens*, *Bacillus polymyxa*, *Klebsiella oxytoca* und *K. pneumoniae* sind in der Lage, große Mengen an 2,3-Butandiol zu produzieren. Ein großer Nachteil dieser Stämme ist ihre Pathogenität, weshalb sie nicht gerne für die biotechnologische Produktion von 2,3-Butandiol verwendet werden. 2011 wurden in der Literatur acetogene, nicht pathogene Bakterien beschrieben, die die Gene für die 2,3-Butandiolproduktion besitzen und bei Wachstum auf industriellem Abgas 2,3-Butandiol produzierten (Köpke *et al.*, 2011). Auch *Bacillus subtilis* besitzt ein Gen, *bdhA*, das eine Acetoinreduktase kodiert, welche Acetoin zu 2,3-Butandiol reduziert (Nicholson, 2008). Durch die Inaktivierung des Gens *bdhA* in *B. subtilis* wurde der Beweis erbracht, dass es sich hierbei tatsächlich um eine

Acetoinreduktase handelte, da bei dieser Mutante (*B. subtilis* WN1075) das Acetoin im Medium akkumulierte und die Produktion von 2,3-Butandiol unterblieb.

In dieser Arbeit sollte die hohe Ethanolproduktion der Integrationsmutante *C. acetobutylicum* *hbd332s::intron* genutzt und in eine 2,3-Butandiolproduktion umgelenkt werden. Da es sich bei 2,3-Butandiol, wie auch bei Ethanol, um eine reduzierte Verbindung handelt, könnte 2,3-Butandiol bevorzugt gebildet werden. *C. acetobutylicum* ist zwar in der Lage, geringe Mengen an Acetoin zu produzieren, jedoch besitzt *C. acetobutylicum* kein Gen, das für eine Acetoinreduktase kodiert, welches Acetoin weiter zu 2,3-Butandiol reduziert. Um *C. acetobutylicum* zur 2,3-Butandiolproduktion zu befähigen, wurde das Gen *cbe1464* aus *C. beijerinckii*, das für eine Acetoinreduktase kodiert, unter der Kontrolle des Promotors P_{ptb} im Stamm *C. acetobutylicum* WT und der Integrationsmutante *C. acetobutylicum* *hbd332s::intron* exprimiert. Da der (G+C)-Gehalt von *C. beijerinckii* (35 mol %) vergleichbar mit dem von *C. acetobutylicum* (31 mol %) ist und diese Stämme eine ähnliche „codon usage“ besitzen, wurde dem Gen *cbe1464* aus *C. beijerinckii*, gegenüber dem Gen *bdhA* aus *B. subtilis*, der größere Erfolg zugesprochen.

Beide Stämme, sowohl der Wildtypstamm als auch die Integrationsmutante mit dem Plasmid pIMP_ptb_cbe1464, waren in der Lage, 2,3-Butandiol zu produzieren. Der Stamm *C. acetobutylicum* pIMP_ptb_cbe1464 produzierte mit rund 30 mM mehr 2,3-Butandiol als der Stamm *C. acetobutylicum* *hbd332s::intron* pIMP_ptb_cbe1464, welcher maximal ca. 20 mM produzierte. Wie erwartet, konnte während des Wachstums kein Acetoin mehr detektiert werden, da es vollständig zu 2,3-Butandiol reduziert wurde. Verglichen mit dem Industriestamm *Klebsiella pneumoniae* SDM, welcher 2,3-Butandiolkonzentrationen von bis zu 1,7 M erreicht (Ma et al., 2009), sind die mit den *C. acetobutylicum*-Stämmen erreichten Konzentrationen hingegen gering. Jedoch handelt es sich in *K. pneumoniae* bei 2,3-Butandiol um das Hauptprodukt, während es in *C. acetobutylicum* neben Ethanol, Butanol, Butyrat und Aceton produziert wird. Auch Siemerink et al. (2011) konnten durch die Überexpression von *cbe1464* in *C. acetobutylicum* eine 2,3-Butandiolproduktion nachweisen. Hier stand das Gen *cbe1464* unter der Kontrolle des Promotors P_{Thl} , dem Promoter der Thiolase, bzw. P_{Adc} , dem Promoter der Acetacetat-Decarboxylase, aus *C. acetobutylicum*. Die maximalen 2,3-Butandiolkonzentrationen von 20-23 mM sind mit den Ergebnissen dieser Arbeit vergleichbar. Siemerink et al. (2011) konnten

zeigen, dass es sich bei dem gebildeten 2,3-Butandiol hauptsächlich um das Stereoisomer D-(2R,3R)-2,3-Butandiol handelt.

Der Stamm *C. acetobutylicum* *hbd332s::intron* pIMP_ptb_cbe1464 produzierte zwar rund 20 mM 2,3-Butandiol, jedoch auch 30 mM mehr Ethanol und über 46 mM weniger Acetat verglichen mit der Integrationsmutante *C. acetobutylicum* *hbd332s::intron*. Der Stamm *C. acetobutylicum* pIMP_ptb_cbe1464 zeigte ein ähnliches Produktspektrum wie der Stamm *C. acetobutylicum* WT. Neben der Produktion von rund 30 mM 2,3-Butandiol in *C. acetobutylicum* pIMP_ptb_cbe1464 verringerte sich jedoch die Butanolproduktion um 18 mM.

Durch die Expression der Acetoinreduktase von *C. beijerinckii* konnte eine 2,3-Butandiolproduktion in *C. acetobutylicum* erreicht werden. 2,3-Butandiol wurde jedoch gegenüber Ethanol in der Integrationsmutante *C. acetobutylicum* *hbd332s::intron* nicht bevorzugt gebildet. Um nun die 2,3-Butandiolproduktion in den Stämmen weiter zu erhöhen, müsste die Produktion von Ethanol und im Wildtypstamm zusätzlich auch die Produktion von Butanol oder auch Butyrat durch Inaktivierung der entsprechenden Gene ausgeschaltet werden.

Die Produktion von 2,3-Butandiol könnte auch zur Produktion von 1-Butanol verwendet werden. Da es sich bei 1-Butanol aufgrund seiner hydrophoben Ketten und polaren Gruppen, welche die Zellen schädigen, um eine für Organismen toxische Verbindung handelt, könnte die 1-Butanolproduktion über die Produktion des nichttoxischen 2,3-Butandiols verlaufen. 2,3-Butandiol ist die Vorstufe von 2-Butanol, welches weiter zu 1-Butanol umgesetzt werden könnte. 1-Butanol kann als Gemisch oder auch unverdünnt als alternativer Kraftstoff genutzt werden. Neben dem Kraftstoff Bioethanol ist Biobutanol günstiger und umweltschonender als Rohöl und wird somit bevorzugt als Biokraftstoff verwendet. Außerdem weist Biobutanol eine höhere Energiedichte (29 MJ/l) gegenüber Bioethanol (20 MJ/l) und somit eine längere Laufleistung auf, worauf Biobutanol energetisch besser genutzt werden kann.

5. a) Zusammenfassung

1. Bei der Selektion geeigneter Acetatproduzenten stellten sich *A. woodii*, *C. aceticum* und *C. ljungdahlii* als geeignete Kandidaten auf Grund ihrer hohen Acetatproduktion ohne die Produktion von Nebenprodukten heraus. Alle drei Organismen sind in der Lage, Acetat sowohl heterotroph (z.B. auf Fructose) als auch autotroph bei Wachstum auf CO_2/H_2 und CO zu produzieren.
2. Durch die Etablierung bzw. Verbesserung des Transformationsprotokolls für acetogene Bakterien konnte die Transformationseffizienz weiter gesteigert werden. Dabei wirkte sich der Einsatz eines in dieser Arbeit entwickelten Methylierungssystems positiv aus.
3. Es wurden Überexpressionsplasmide, basierend auf den Vektoren pIMP1 und pJIR750, konstruiert, die die Gene *ack* und *pta* aus *C. ljungdahlii* tragen, die für die Acetat-Kinase und die Phosphotransacetylase kodieren. Zusätzlich erfolgte die Klonierung des Promoters P_{ptb} vor das *pta-ack*-Operon.
4. Es wurden Überexpressionsplasmide, basierend auf den Vektoren pIMP1 und pJIR750, für einen verbesserten Formiat-Abbau und die damit verbundene Steigerung der Acetatproduktion konstruiert. Diese Plasmide tragen die Gene, die für die Formyl-THF-Synthetase, die Methenyl-THF-Cyclohydrolase, die Methylen-THF-Dehydrogenase und die Methylen-THF-Reduktase aus *C. ljungdahlii* kodieren. Zusätzlich wurde ein Plasmid konstruiert, bei welchem die Gene unter der Kontrolle des Promoters P_{ptb} stehen.
5. Die Überexpression des *pta-ack*-Operons in *C. aceticum* verringerte die maximale Acetatkonzentration um bis zu 12 mM gegenüber dem Wildtyp, der maximal 34 mM Acetat produzierte. Die Verwendung des Promoters P_{ptb} anstelle des nativen Promoters führte jedoch zu einer Steigerung der Acetatproduktion. Verglichen mit dem Wildtyp wurden rund 25 mM mehr Acetat produziert.

6. Bei Wachstum auf Fructose erreichte der Kontrollstamm *A. woodii* pJIR750 mit rund 124 mM Acetat die höchste Acetatkonzentration, demgegenüber erreichte der Überexpressionsstamm *A. woodii* pJIR750_THF bei autotrophem Wachstum auf CO₂/H₂ die höchste Acetatkonzentration mit fast 160 mM.
7. „fed-batch“-Experimente, bei welchen in regelmäßigen Abständen Fructose zugefüttert wurde, resultierten in einem Wachstumsdefizit aller *A. woodii*-Stämme. Das Wachstumsdefizit spiegelte sich in einer Hemmung der Acetatproduktion wieder.
8. Bei der Fermentation auf CO₂/H₂ unter optimierten Bedingungen erreichte der Überexpressionsstamm *A. woodii* pJIR750_THF innerhalb von 3,8 Tagen die höchste Acetatkonzentration von 849 mM (51 g l⁻¹).
9. Es wurden Integrationsmutanten der Gene *hbd* (3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase) und *crt* (Crotonase) in *C. acetobutylicum* generiert.
10. Die Integrationsmutante *C. acetobutylicum* *hbd332s::intron* zeichnet sich neben einer erhöhten Ethanolproduktion durch eine gesteigerte Acetatproduktion gegenüber dem Wildtyp aus.
11. Die Überexpression der Gene *thlA* und *ctfA/B* in der Integrationsmutante *C. acetobutylicum* *hbd332s::intron* führte nur bei Wachstum auf CG-Medium zu einer Steigerung der Acetatproduktion, wobei 15 mM mehr Acetat produziert wurde.
12. Mit dem Plasmid pIMP_ptb_cbe1464, das das Gen für die Acetoinreduktase aus *C. beijerinckii* trägt, produzierte der Stamm *C. acetobutylicum* pIMP_ptb_cbe1464 rund 30 mM 2,3-Butandiol und der Stamm *C. acetobutylicum* *hbd332s::intron* pIMP_ptb_cbe1464 rund 20 mM 2,3-Butandiol.

5. b) Summary

1. The strains *A. woodii*, *C. aceticum* and *C. ljundahlii* were found to be good acetate producers, with no additional production of any by-products. They are able to produce acetate under heterotrophic (e.g. fructose) and autotrophic conditions (e.g. CO₂/H₂ or CO).
2. The establishment and improvement of transformation protocols for acetogenic bacteria resulted in a higher transformation efficiency. Also, the development and adoption of a methylation system for acetogenic bacteria showed positive effects on transformation efficiency.
3. Overexpression plasmids, based on the vectors pIMP1 and pJIR750, were constructed containing the genes for the acetate kinase (*ack*) and the phosphotransacetylase (*pta*) of *C. ljundahlii*. One plasmid was constructed with the promoter P_{ptb} in front of the *pta-ack* operon.
4. For an increased formate degradation and an associated increased acetate production, overexpression plasmids, based on the vectors pIMP1 and pJIR750, were constructed, containing the genes for formyl-THF-synthetase, methenyl-THF-cyclohydrolase, methylene-THF-dehydrogenase, and methylene-THF-reductase of *C. ljundahlii*. One plasmid was constructed with the promoter P_{ptb} in front of these genes.
5. Overexpression of the *pta-ack* operon in *C. aceticum* resulted in a reduced acetate production of about 12 mM compared to the wildtype strain, which produced about 34 mM acetate. 25 mM more acetate was produced by the strain containing the plasmid with the promoter P_{ptb} in front of the *pta-ack* operon.
6. Grown on fructose, the control strain *A. woodii* pJIR750 achieved with 124 mM the highest maximal acetate concentration. Grown autotrophically on CO₂/H₂, *A. woodii* pJIR750_THF was the best acetate producer with nearly 160 mM acetate.

-
7. „fed-batch“-experiments with additional feeding of fresh fructose resulted in all *A. woodii* strains in growth inhibition and in inhibition of acetate production.
 8. Grown autotrophically under optimized conditions on CO₂/H₂, *A. woodii* pJIR750_THF was identified as best acetate producer with a maximum of about 849 mM (51 g l⁻¹) acetate in 3.8 days.
 9. Integration mutants of the genes *hbd* (3-hydroxybutyryl-CoA-dehydrogenase) and *crt* (crotonase) in *C. acetobutylicum* were generated.
 10. The integration mutant *C. acetobutylicum hbd332s::intron* showed a significant higher ethanol production, but also an increased acetate production compared to the wildtype.
 11. Overexpression of the genes *thlA* and *ctfA/B* in the integration mutant *C. acetobutylicum hbd332s::intron* grown on CG-medium resulted in an increased acetate production of about 15 mM.
 12. 30 or 20 mM 2,3-butanediol, respectively, were produced by expressing the gene *cbe1464*, encoding for the acetoin reductase of *C. beijerinckii*, in *C. acetobutylicum* WT or *C. acetobutylicum hbd332s::intron*, respectively.

6. Literatur

Adamse, A. D. 1980. New isolation of *Clostridium aceticum* (Wieringa). *Antonie van Leeuwenhoek* 46: 523-531

Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers und D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410

Baer, S. H., H. P. Blaschek und T. L. Smith. 1987. Effect of butanol challenge and temperature on lipid composition and membrane fluidity of butanol-tolerant *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 2854-2861

Baer, S. H., D. L. Bryant und H. P. Blaschek. 1989. Electron spin resonance analysis of the effect of butanol on the membrane fluidity of intact cells of *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 2729-2731

Balch, W. E., S. Schoberth, R. S. Tanner und R. S. Wolfe. 1977. *Acetobacterium*, a new genus of hydrogen-oxidizing, carbon dioxide-reducing anaerobic bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* 27: 355-361

Balganesh, T. S., L. Reiners, R. Lauster, M. Noyer-Weidner, K. Wilke und T. A. Trautner. 1987. Construction and use of chimeric SPR/Φ3T DNA methyltransferases in the definition of sequence recognizing enzyme regions. *EMBO Journal Online* 6: 3543-3549

Bannan, T. L., und J. I. Rood. 1993. *Clostridium perfringens*-*Escherichia coli* shuttle vectors that carry single antibiotic resistance determinants. *Plasmid* 29: 233-235

Barik, S., S. Prieto, S. B. Harrison, E. C. Clausen und J. L. Gaddy. 1988. Biological production of alcohols from coal through indirect liquefaction. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 18: 363-378

Barker, H. A., und M. D. Kamen. 1945. Carbon dioxide utilization in the synthesis of acetic acid by *Clostridium thermoaceticum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 31: 219-225

Baronofsky, J. J., W. J. A. Schreurs und E. R. Kashket. 1984. Uncoupling by acetic acid limits growth of and acetogenesis by *Clostridium thermoaceticum*. *Applied and Environmental Microbiology* 48: 1134-1139

Becker, U., G. Grund, M. Orschel, K. Doderer, G. Löhden, G. Brand, P. Dürre, S. Lederle, H. J. Bahl, R. J. Fischer und A. May. 2010. Zellen und Verfahren zur Herstellung von Aceton. Patent DE 10 2009 002 583 A1

Bergmeyer, H. U. 1974. Methoden der enzymatischen Analyse. 3. Aufl. Verlag Chemie, Weinheim

Bernheimer, A. W., R. Linder und L. S. Avigad. 1979. Nature and mechanism of action of the CAMP protein of group B streptococci. *Infection and Immunity* 23: 838-844

Bertram, J., und P. Dürre. 1989. Conjugal transfer and expression of streptococcal transposons in *Clostridium acetobutylicum*. *Archives of Microbiology* 142: 1273-1279

Birnboim, H. C., und J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7: 1513-1523

Böhringer, M. 2002. Molekularbiologische und enzymatische Untersuchungen zur Regulation des Gens der Acetacetat-Decarboxylase von *Clostridium acetobutylicum*. Dissertation, Universität Ulm

Bowles, L. K., und W. I. Ellefson. 1985. Effects of butanol on *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology* 50: 1165-1170

- Braun, M., F. Mayer und G. Gottschalk.** 1981. *Clostridium aceticum* (Wieringa), a microorganism producing acetic acid from molecular hydrogen and carbon dioxide. *Archives of Microbiology* 128: 288-293
- Braun, K., und G. Gottschalk.** 1981. Effect of molecular hydrogen and carbon dioxide on chemo-organotrophic growth of *Acetobacterium woodii* and *Clostridium aceticum*. *Archives of Microbiology* 128: 294-298
- Brumm, P. J.** 1988. Fermentation of single and mixed substrates by the parent and an acid-tolerant, mutant strain of *Clostridium thermoaceticum*. *Biotechnology and Bioengineering* 32: 444-450
- Busche, R. M.** 1991. Extractive fermentation of acetic acid: economic tradeoff between yield of *Clostridium thermoaceticum* and concentration of *Acetobacter*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 28/29: 605-621
- Carrier, T., K. L. Jones und J. D. Keasling.** 1998. mRNA stability and plasmid copy number effects on gene expression from an inducible promoter system. *Biotechnology and Bioengineering* 59: 666-672
- Chang, A. C. Y., und S. N. Cohen.** 1978. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *Journal of Bacteriology* 134: 1141-1156
- Chou, M. Y., S. C. Li und Y. T. Li.** 1996. Cloning and expression of sialidase L, a NeuAc α 2 $\rightarrow$ 3Gal-specific sialidase from the leech, *Macrobdella decora*. *Journal of Biological Chemistry* 271: 19219-19224
- Chung, C. T., S. L. Niemela und R. H. Miller.** 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Biochemistry* 86: 2172-2175

- Collins, M. D., P. A. Lawson und A. Willems.** 1994. The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44: 812-826
- Demler, M., und D. Weuster-Botz.** 2011. Reaction engineering analysis of hydrogenotrophic production of acetic acid by *Acetobacterium woodii*. *Biotechnology and Bioengineering* 108: 470-474
- Demler, M.** 2012. Reaktionstechnische Untersuchungen zur autotrophen Herstellung von Acetat mit *Acetobacterium woodii*. Dissertation, TU München
- Desai, R. P., und E. T. Papoutsakis.** 1999. Antisense RNA strategies for metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 936-945
- Drake, H. L., S. L. Daniel, C. Matthies und K. Küsel.** 1994. Acetogenesis, acetogenic bacteria, and the acetyl-CoA pathway: past and current perspectives. In: H. L. Drake (Hrsg.), *Acetogenesis*, Chapman und Hall, New York (USA): 3-60
- Drake, H. L., K. Küsel und C. Matthies.** 2006. Acetogenic Prokaryotes. *Prokaryotes* 2: 354-420
- Drake, H. L., A. S. Gößner und S. L. Daniel.** 2008. Old acetogens, new lights. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1125: 100-128
- Dower, W. J., J. F. Miller und C. W. Ragsdale.** 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research* 16: 6127-6145
- Dürre, P., und H. Bahl.** 1996. Microbial production of acetone/butanol/isopropanol. In: M. Roehr (Hrsg.), *Biotechnology*. 2. Ausg., Vol. 6. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim: 229-268
- Dürre, P.** 2005. Formation of solvents in Clostridia. In: P. Dürre (Hrsg.), *Handbook on Clostridia*. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton (USA): 673-695

Dürre, P. 2008. Fermentative butanol production: bulk chemical and biofuel. *Annals of the New York Academy of Science* 1125: 353-362

Eggeman, T., und D. Verser. 2005. Recovery of organic acids from fermentation broths. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 121-124: 605-618

Eggeman, T., und D. Verser. 2006. The importance of utility systems in today's biorefineries and a vision for tomorrow. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 129-132: 361-381

Eikmanns, B. J., N. Thum-Schmitz, L. Eggeling, K. Lüdtke und H. Sahm. 1994. Nucleotide sequence, expression, and transcriptional analysis of the *Corynebacterium glutamicum* *gltA* gene encoding citrate synthase. *Microbiology* 140: 1817-1828

Fischer, F., R. Lieske und K. Winzer. 1932. Biologische Gasreaktionen. II. Über die Bildung von Essigsäure bei der biologischen Umsetzung von Kohlenoxyd und Kohlensäure zu Methan. *Biochemica* 245: 2-12

Fontaine, F. E., W. H. Peterson, E. McCoy, M. J. Johnson und G. J. Ritter. 1942. A new type of glucose fermentation by *Clostridium thermoaceticum*. *Journal of Bacteriology* 43: 701-715

Fontaine, L., I. Meynial-Salles, L. Girbal, X. Yang, C. Croux und P. Soucaille. 2002. Molecular characterization and transcriptional analysis of *adhE2*, the gene encoding the NADH-dependent aldehyde/alcohol dehydrogenase responsible for butanol production in alcohologenic cultures of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Journal of Bacteriology* 184: 821-830

Frazier, C. L., J. S. Filippo, A. M. Lambowitz und D. A. Mills. 2003. Genetic manipulation of *Lactococcus lactis* by using targeted group II introns: generation of stable insertions without selection. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 1121-1128

Funke, G., A. Grävenitz, J. E. Clarridge und K. A. Bernard. 1997. Clinical microbiology of coryneform bacteria. *Clinical Microbiology Reviews* 10: 125-159

Gherna, R. L. 1994. Culture preservation. In: P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood und N. R. Krieg (Hrsg.), *Methods for general and molecular bacteriology*. American Society for Microbiology. Washington DC (USA): 278-292

Gottwald, M., und G. Gottschalk. 1985. The internal pH of *Clostridium acetobutylicum* and its effect on the shift from acid to solvent formation. *Archives of Microbiology* 143: 42-46

Green, E. M., Z. L. Boynton, L. M. Harris, F. B. Rudolph, E. T. Papoutsakis und G. N. Bennett. 1996. Genetic manipulation of acid formation pathways by gene inactivation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Microbiology* 142: 2079-2086

Grahame, D. A. 2003. Acetate C-C bond formation and decomposition in the anaerobic world: the structure of a central enzyme and its key active-site metal cluster. *Trends in Biochemical Sciences* 28: 221-224

Han, B., V. Gopalan und T. C. Ezeji. 2011. Acetone production in solventogenic *Clostridium* species: new insights from non-enzymatic decarboxylation of acetoacetate. *Applied Microbiology and Biotechnology* 91: 565-576

Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166: 557-580

Hartmanis, M. G. N., und S. Gatenbeck. 1984. Intermediary metabolism in *Clostridium acetobutylicum*: levels of enzymes involved in the formation of acetate and butyrate. *Applied and Environmental Microbiology* 47: 1277-1283

Heap, J. T., O. J. Pennington, S. T. Cartman, G. P. Carter und N. P. Minton. 2007. The CloStron: a universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*. *Journal of Microbiology Methods* 70: 452-464

Ho, S. N., H. D. Hunt, R. M. Morton, J. K. Pullen und L. R. Pease. 1989. Site directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77: 51-59

Hosea, C., R. S. Tanke und G. P. Torrence. 2005. Acetic Acid. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim

Huang, L., L. N. Gibbins und C. W. Forsberg. 1985. Transmembrane pH gradient and membrane potential in *Clostridium acetobutylicum* during growth under acetogenic and solventogenic conditions. *Applied Environmental Microbiology* 50: 1043-1047

Imkamp, F., und V. Müller. 2007 Acetogenic Bacteria. In: *Encyclopedia of Life Science*. www.els.net

Inoue, H., H. Nojima und H. Okayama. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-28

Ingram, L. O. 1976. Adaptation of membrane lipids to alcohols. *Journal of Bacteriology* 125: 670-678

Jain, R. K., S. K. Samanta und M. Rani. 1998. Segregational and structural instability of recombinant plasmid carrying genes for naphthalene degrading pathway. *Letters of Applied Microbiology* 26: 265-269

Jiang, Y., C. Xu, F. Dong, Y. Yang und S. Yang. 2010 Disruption of the acetoacetate decarboxylase gene in solvent-producing *Clostridium acetobutylicum* increases the butanol ratio. *Metabolic Engineering* 11: 284-291

Jira, R. 2009. Acetaldehyde from ethylene-A retrospective on the discovery of the Wacker prozess. *Angewandte Chemie* (International Edition) 48: 9034-9037

Jones, D. T., und D. R. Woods. 1986. Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiological Reviews* 50: 484-525

Jones, K. L., S. W. Kim und J. D. Keasling. 2000. Low-copy plasmids can perform as well as or better than high-copy plasmids for metabolic engineering of bacteria. *Metabolic Engineering* 2: 328-338

Jore, J. P. M., N. van Luijk, R. G. M. Luiten, M. J. van der Werf und P. H. Pouwels. 2001. Efficient transformation system for *Propionibacterium freudenreichii* based on a novel vector. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 499-503

Kaneuchi, C., Y. Benno und T. Mitsuoka. 1976. *Clostridium coccoides*, a new species from the feces of mice. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 26: 482-486

Kelleher, J. E., und E. A. Raleigh. 1991. A novel activity in *Escherichia coli* K-12 that directs restriction of DNA modified at CG dinucleotides. *Journal of Bacteriology* 173: 5220-5223

Klemps, R., S. M. Schoberth und H. Sahm. 1987. Production of acetic acid by *Acetogenium kivui*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 27: 229-234

Köpke, M. 2009. Genetische Veränderung von *Clostridium ljungdahlii* zur Produktion von 1-Butanol aus Synthesegas. Dissertation, Universität Ulm

Köpke, M., C. Held, S. Hujer, H. Liesegang, A. Wiezer, A. Wollherr, A. Ehrenreich, W. Liebl, G. Gottschalk und P. Dürre. 2010. *Clostridium ljungdahlii* represents a microbial production platform based on syngas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 13087-13092

Köpke, M., C. Mihalcea, F. Liew, J. H. Tizard, M. S. Ali, J. J. Conolly, B. Al-Sinawi und S. D. Simpson. 2011. 2,3-butanediol production by acetogenic bacteria, an alternative route to chemical synthesis, using industrial waste gas. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 5467-5475

Köpke, M., S. Noack und P. Dürre. 2011. The past, present, and future of biofuels-biobutanol as promising alternative. In: Biofuel production-recent developments and prospects. M. A. dos Santos Bernardes MA, ed. Intech, Rijeka, Kroatien. S. 451-486

Lederle, S. 2010. Heterofermentative Acetonproduktion. Dissertation, Universität Ulm

Lee, D. S., J. H. Jo, C. O. Jeon, S. Y. Lee und J. M. Park. 2010. Molecular characterization and homologous overexpression of [FeFe]- hydrogenase in *Clostridium tyrobutyricum* JM1. *International Journal of Hydrogen Energy* 35: 1065-1073

Lehmann, D., und T. Lütke-Eversloh. 2011. Switching *Clostridium acetobutylicum* to an ethanol producer by disruption of the butyrate/butanol fermentative pathway. *Metabolic Engineering* 13: 464-473

Lehmann, D., D. Hönicke, A. Ehrenreich, M. Schmidt, D. Weuster-Botz, H. Bahl und T. Lütke-Eversloh. 2012. Modifying the product pattern of *Clostridium acetobutylicum*. Physiological effects of disrupting the acetate and acetone formation pathways. *Applied Microbiology and Biotechnology* 94: 743-754

Le Ruyet, P., H. C. Dubourguier und G. Albagnac. 1984. Homoacetogenic fermentation of cellulose by a coculture of *Clostridium thermocellum* and *Acetogenium kivui*. *Applied and Environmental Microbiology* 48: 893-894

Lin, W. R., Y. Peng, S. Lew, C. C. Lee, J. J. Hsu, J.-F. Hamel und A. L. Demain. 1998. Purification and characterization of acetate kinase from *Clostridium thermocellum*. *Tetrahedron* 54: 15915-15925

Ljungdahl, L. G. 1986. The autotrophic pathway of acetate synthesis in acetogenic bacteria. *Annual Review of Microbiology* 40: 415-450

- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr und R. J. Randall.** 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275
- Lütke-Eversloh, T., und H. Bahl.** 2011. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum*: recent advances to improve butanol production. *Current Opinion in Biotechnology* 22: 1-14
- Ma, C., A. Wang, J. Qin, L. Li, X. Ai, T. Jiang, H. Tang und P. Xu.** 2009. Enhanced 2,3-butanediol production by *Klebsiella pneumoniae* SDM. *Applied and Environmental Microbiology* 82: 49-57
- Mermelstein, L. D., N. E. Welker, G. N. Bennett und E. T. Papoutsakis.** 1992. Expression of cloned homologous fermentative genes in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Biotechnology (NY)* 10: 190-195
- Mermelstein, L. D., E. T. Papoutsakis, D. J. Petersen und G. N. Bennet.** 1993. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 for increased solvent production by enhancement of acetone formation enzyme activities using a synthetic acetone operon. *Biotechnology and Bioengineering* 42: 1053-1060
- Miyoshi, A., L. G. Bermudez-Humaran, L. A. Ribeiro, Y. le Loir, S. C. Oliveira, P. Langella und V. Azevedo.** 2006. Heterologous expression of *Brucella abortus* GroEL heat-shock protein in *Lactococcus lactis*. *Microbial Cell Factories* 5: 1-8
- Monot, F., J. R. Martin, H. Petitdemange und R. Gay.** 1982. Acetone and butanol production by *Clostridium acetobutylicum* in a synthetic medium. *Applied and Environmental Microbiology* 44: 1318-1324
- Moreira, A. R., D. C. Ulmer und J. C. Linden.** 1981. Butanol toxicity in the butylic fermentation. *Biotechnology & Bioengineering Symposium* 11: 567-579
- Nakajima, H., K. Suzuki und K. Imahori.** 1978. Purification and properties of acetate kinase from *Bacillus stearothermophilus*. *Journal of Biochemistry* 84: 193-203

Nicholson, W. L. 2008. The *Bacillus subtilis* *ydlL* (*bdhA*) gene encodes acetoin reductase/2,3-butanediol dehydrogenase. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 6832-6838

Nölling, J., G. Breton, M. V. Omelchenko, K. S. Makarova, Q. Zeng, R. Gibson, H. M. Lee, J. Dubois, D. Qiu, J. Hitti, GTC Sequencing Center Production, Finishing and Bioinformatics Teams, Y. I. Wolf, R. L. Tatusov, F. Sabathe, L. Doucette-Stamm, P. Soucaille, M. J. Daly, G. N. Bennett, E. V. Koonin und D. R. Smith. 2001. Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of Bacteriology* 183: 4823-4838

Noyer-Weidner, M., S. Jentsch, B. Pawlek, U. Günthert und T. A. Trautner. 1983. Restriction and modification in *Bacillus subtilis*: DNA methylation potential of the related bacteriophages Z, SPR, SPβ, Φ3T, and p11. *Journal of Virology* 46: 446-453

Noyer-Weidner, M., S. Jentsch, J. Kupsch, M. Bergbauer und T. A. Trautner. 1985. DNA methyltransferase genes of *Bacillus subtilis* phages: structural relatedness and gene expression. *Gene* 35: 143-150

Ounine, K., H. Petitdemange, G. Raval und R. Gay 1985. Regulation and butanol inhibition of D-xylose and D-glucose uptake in *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology* 49: 874-878

Pasteur, L. 1868. Etudes sur le vinaigre: sa fabrication, ses maladies, moyens de les prevenir. Nouvelles observations. Conservation des vins par la chaleur. Gauthier-Villars und Victor Masson et fils (Hrsg.), Paris (Frankreich)

Parekh, S. R., und M. Cheryan. 1991. Production of acetate by mutant strains of *Clostridium thermoaceticum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 36: 384-387

Peters, V., P. H. Janssen und R. Conrad. 1999. Transient production of formate during chemolithotrophic growth of anaerobic microorganisms on hydrogen. *Current Microbiology* 38: 285-289

- Pezacka, E., und H. G. Wood.** 1984. Role of carbon monoxide dehydrogenase in the autotrophic pathway used by acetogenic bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81: 6261-6265
- Phillips, J. R., K. T. Klasson, E. C. Clausen und J. L. Gaddy.** 1993. Biological production of ethanol from coal synthesis gas-medium development studies. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 39/40: 559-571
- Poehlein, A., S. Schmidt, A.-C. Kaster, M. Goenrich, J. Vollmers, A. Thürmer, J. Bertsch, K. Schuchmann, B. Voigt, M. Hecker, R. Daniel, R. K. Thauer, G. Gottschalk und V. Müller.** 2012. An ancient pathway combining carbon dioxide fixation with the generation and utilization of a sodium ion gradient for ATP synthesis. *PLoS ONE* 7(3): e33439. doi:10.1371/journal.pone.0033439
- Ragsdale, S. W., L. G. Ljungdahl und D. V. DerVartanian.** 1983. Isolation of carbon monoxide dehydrogenase from *Acetobacterium woodii* and comparison of its properties with those of the *Clostridium thermoaceticum* enzyme. *Journal of Bacteriology* 155: 1224-1237
- Ragsdale, S. W., und H. G. Wood.** 1985. Acetate biosynthesis by acetogenic bacteria. *The Journal of Biological Chemistry* 260: 3970-3977
- Ragsdale, S. W.** 1991. Enzymology of the acetyl-CoA pathway of autotrophic CO₂ fixation. *CRC Critical Reviews Biochemistry and Molecular Biology* 26: 261-300
- Ragsdale, S. W.** 2008. Enzymology of the Wood-Ljungdahl pathway of acetogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1125: 129-136
- Raybuck, S. A., N. R. Bastian, W. H. Orme-Johnson und C. T. Walsh.** 1988. Kinetic characterization of the carbon monoxide-acetyl-CoA (carbonyl group) exchange activity of the acetyl-CoA synthesizing CO dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum*. *Biochemistry* 27: 2698-2702

Ravinder, T., M. V. Swamy, G. Seenayya und G. Reddy. 2001. *Clostridium lentocellum* SG6-A potential organism for fermentation of cellulose to acetic acid. *Bioresource Technology* 80: 171-177

Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich und N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of β -globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354

Sambrook, J., und D. W. Russell. 2001. Molecular cloning. A laboratory manual. 3. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (USA)

Schmidt, S. 2012. Die Entschlüsselung des Genoms von *Acetobacterium woodii*: Neue Einblicke in die Lebensweise und Bioenergetik eines acetogenen Bakteriums. Dissertation, Universität Frankfurt

Schwartz, R. D., und F. A. Keller (JR). 1982. Isolation of a strain of *Clostridium thermoaceticum* capable of growth and acetic acid production at pH 4.5. *Applied and Environmental Microbiology* 43: 117-123

Siemerink, M. A., W. Kuit, A. M. López Contreras, G. Eggink, J. van der Oost und S. W. M. Kengen. 2011. D-2,3-butanediol production due to heterologous expression of an acetoin reductase in *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 2582-2588

Smidt, J., W. Hafner, R. Jira, J. Sedlmeier, R. Sieber, H. Kojer und R. Rüttinger. 1959. Katalytische Umsetzungen von Olefinen an Platinmetall-Verbindungen Das Consortium-Verfahren zur Herstellung von Acetaldehyd. *Angewandte Chemie* 71: 176-182

Smidt, J., W. Hafner, J. Sedlmeier, R. Jira und R. Rüttinger. 1959. Direktoxidation von Ethylen zu Acetaldehyd. (Cons. f. elektrochem Ind.). Patent DE 1 0490 845, Anm. 04.01.1957

Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson und D. C. Klenk. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150: 76-85

Steinborn, D. 2007. Carbonylierung von Methanol und Kohlenmonoxid-Konvertierung. In: *Grundlagen der metallorganischen Komplexkatalyse* 6: 85-99; Teubner B.G. GmbH; Aufl. 1

Strätz, M., U. Sauer, A. Kuhn und P. Dürre. 1993 Plasmid transfer into the homoacetogen *Acetobacterium woodii* by electroporation and conjugation. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 1033-1037

Suzuki, T., T. Matsua, K. Ohtaguchi und K. Koide. 1993. Continuous production of acetic acid from CO₂ in repeated-batch cultures using flocculated cells of *Acetobacterium woodii*. *Journal of Chemical Engineering of Japan* 26: 459-462

Tammali, R., G. Seenayya und G. Reddy. 2003. Fermentation of cellulose to acetic acid by *Clostridium lentocellum* SG6: induction of sporulation and effect of buffering agent on acetic acid production. *Letters in Applied Microbiology* 37: 304-308

Tanner, R. S., L. M. Miller und D. Yang. 1993. *Clostridium ljungdahlii* sp. nov., an acetogenic species in clostridial rRNA homology group I. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 43: 232-236

Tanner, R. S., und C. R. Woese. 1994. A phylogenetic assessment of the acetogens. In: H. L. Drake (Hrsg.), *Acetogenesis*. Chapman & Hall, New York, NY (USA): 254-269

Terracciano, J. S., und E. R. Kashket. 1986. Intracellular conditions required for initiation of solvent production by *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology* 52: 86-91

- Tran-Betcke, A., B. Behrens, M. Noyer-Weidner und T. A. Trautner.** 1986. DNA methyltransferase genes of *Bacillus subtilis* phages: comparison of their nucleotide sequences. *Gene* 42: 89-96
- Vollherbst-Schneck, K., J. A. Sands und B. S. Montenecourt.** 1984. Effect of butanol on lipid composition and fluidity of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Applied and Environmental Microbiology* 47: 193-194
- Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier und D. J. Lane.** 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173: 697-703
- Weißermel, K., und H. J. Arpe.** 2003. Industrial organic chemistry, 4. Aufl. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
- Wieringa, K. T.** 1936. Over het verdwijnen van waterstof en koolzuur onder anaerobe voorwaarden. *Antonie van Leeuwenhoek* 3: 263-273
- Wieringa, K. T.** 1940. The formation of acetic acid from carbon dioxide and hydrogen by anaerobic spore-forming bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 6: 251-262
- Wiesenborn, D. P., F. B. Rudolph und E. T. Papoutsakis.** 1988. Coenzyme A transferase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and its role in the uptake of acids. *Applied and Environmental Microbiology* 54: 2717-2722
- Wilfinger, W. W., K. Mackey und P. Chomczynski.** 1997. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques* 22: 474-481
- Winzer, K.** 1992. Reinigung und Charakterisierung der Acetat-Kinase aus *Acetobacterium woodii*. Diplomarbeit, Universität Göttingen
- Winzer, K., K. Lorenz und P. Dürre.** 1997. Acetate kinase from *Clostridium acetobutylicum*: a highly specific enzyme that is actively transcribed during acidogenesis and solventogenesis. *Microbiology* 143: 3279-3286

Winzer, K., K. Lorenz, B. Zickner und P. Dürre. 2000. Differential regulation of two thiolase genes from *Clostridium acetobutylicum* DSM 792. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 2: 531-541

Wood, H. G. 1991. Life with CO or CO₂ and H₂ as a source of carbon and energy. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 5: 156-163

Woodman, M. E. 2008. Direct PCR of intact bacteria (Colony PCR). In: R. Coico, T. Kowalik, J. Quarles, B. Stevenson und R. Taylor (Hrsg.), *Current Protocols in Microbiology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken (USA). A.3D.1 - A.3D.6

Yanisch-Perron, C., J. Vieira und J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 103-119

Yu, M., Y. Du, W. Jiang, W.-L. Chang, S.-T. Yang und I.-C. Tang. 2012. Effects of different replicons in conjugative plasmids on transformation efficiency, plasmid stability, gene expression and n-butanol biosynthesis in *Clostridium tyrobutyricum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 93: 881-889

Zhong, J., M. Karberg und A. M. Lambowitz. 2003. Targeted and random bacterial gene disruption using a group II intron (targetron) vector containing a retrotransposition-activated selectable marker. *Nucleic Acids Research* 31: 1656-1664

7. Anhang

7.1 Informationsquellen

In folgender Liste sind die verwendeten Informationsquellen¹ und Computerprogramme aufgeführt.

Internetadressen:

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes: <http://www.genome.jp/>
National Center for Biotechnological Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
Prokaryotic Database of Gene Regulation: <http://www.prodoric.de/>
EMBL-EBI European Bioinformatics Institute <http://www.ebi.ac.uk/>

¹Stand: 30. April 2012

Programme:

„Clone Manager 7“	Scientifical Educational Software; Cary, USA
„Enhance Map Draw“	Scientifical Educational Software; Cary, USA
„TotalChrom Version 6.3.1“	PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau
„Agilent OPEN-Lab CDS Version A.01.03“	Agilent Technologies, Waldbronn

7.2 Wachstumskurven und Produktspektren

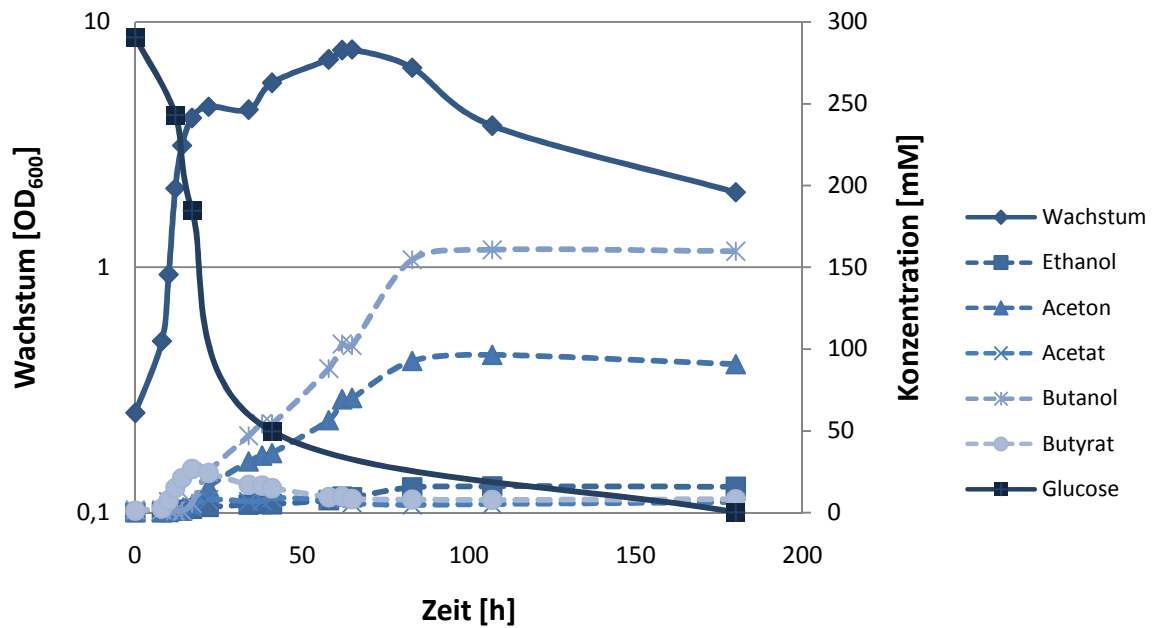


Abbildung 40: Wachstum und Produktspektrum von *C. acetobutylicum* WT auf CG-Medium

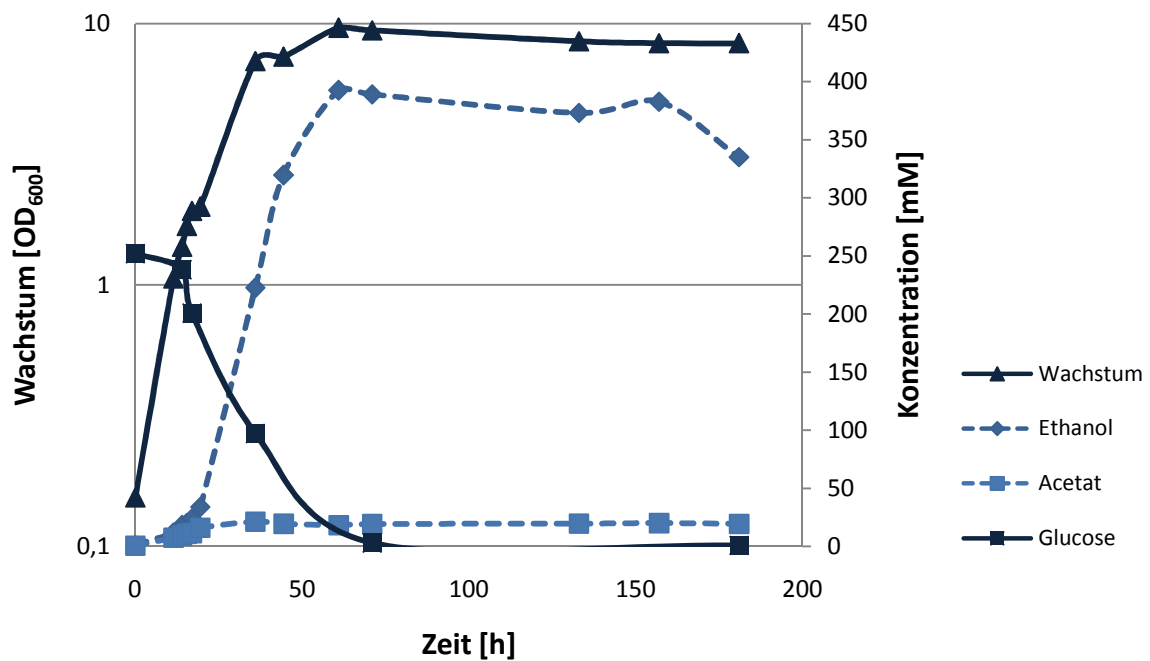


Abbildung 41: Wachstum und Produktspektrum von *C. acetobutylicum* *hbd332s::intron* auf CG-Medium

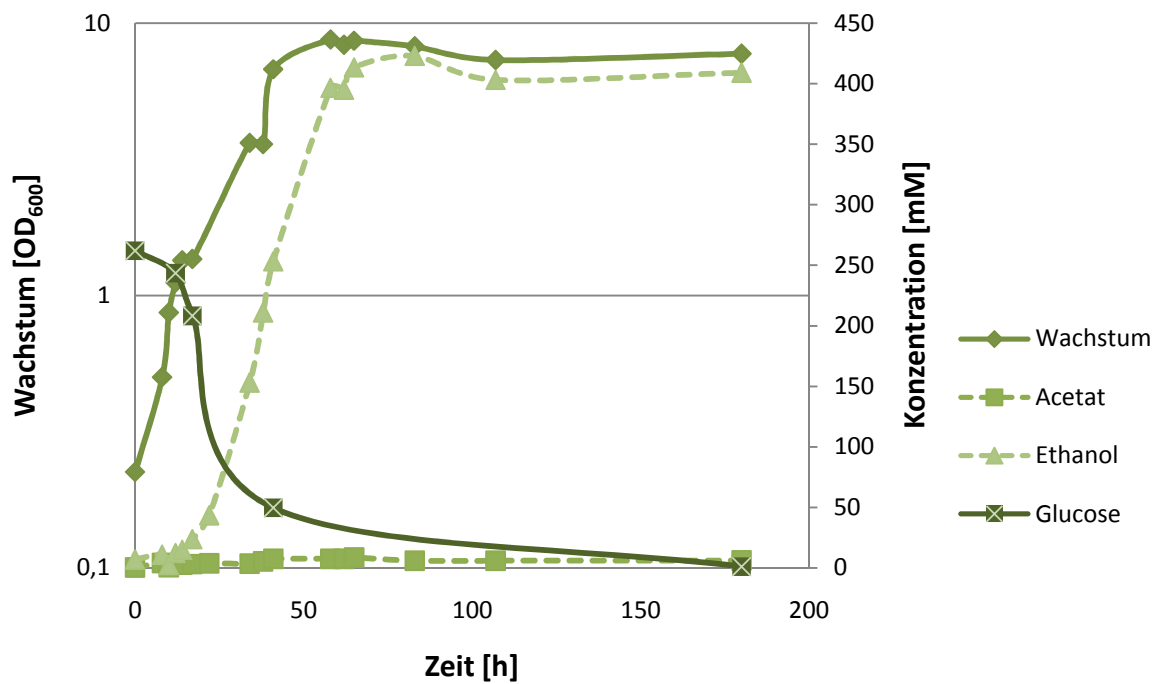


Abbildung 42: Wachstum und Produktspektrum von *C. acetobutylicum crt383s::intron* auf CG-Medium

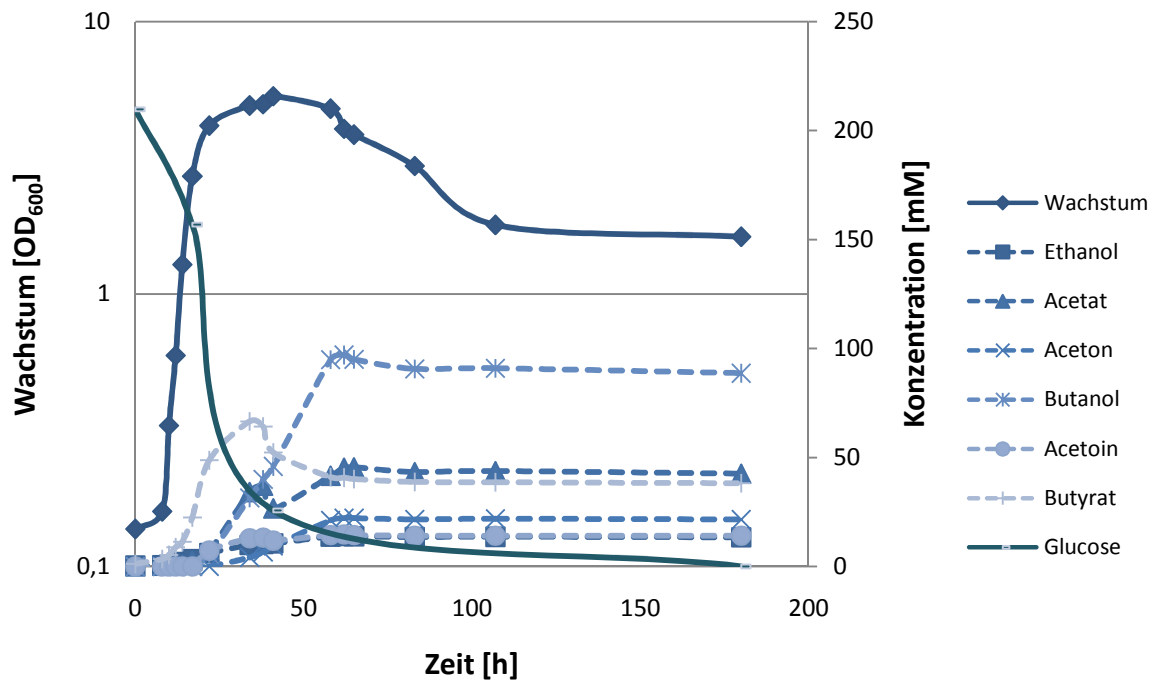


Abbildung 43: Wachstum und Produktspektrum von *C. acetobutylicum* WT auf MES-Medium

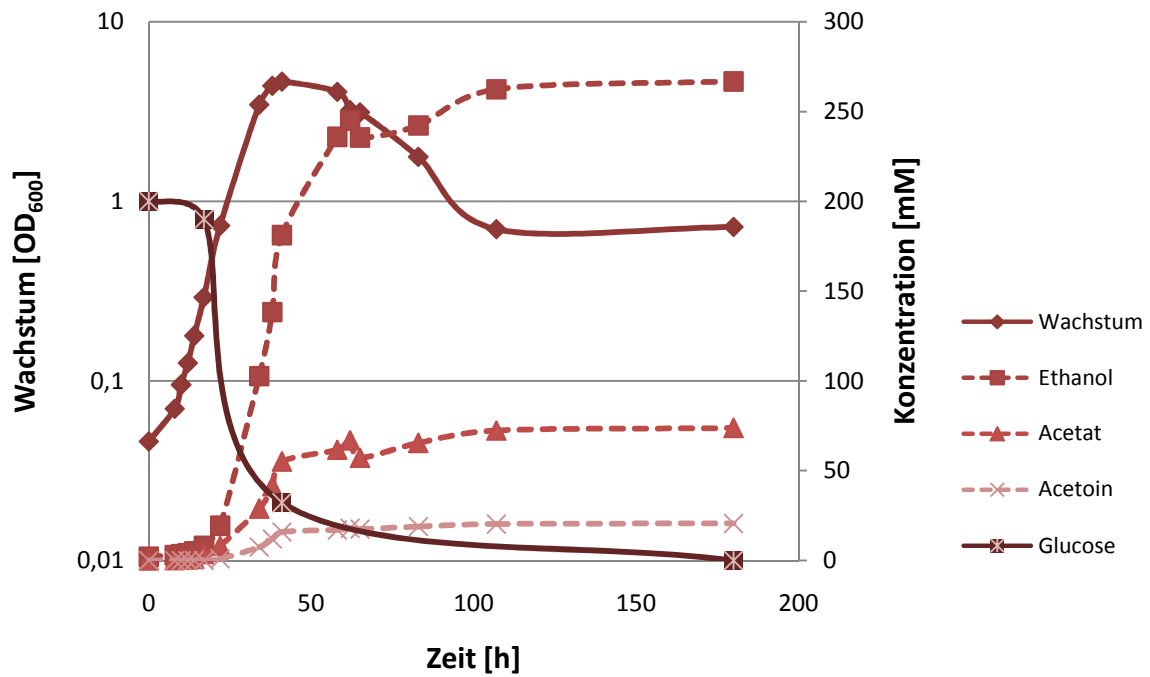


Abbildung 44: Wachstum und Produktspektrum von *C. acetobutylicum* hbd332s::intron auf MES-Medium

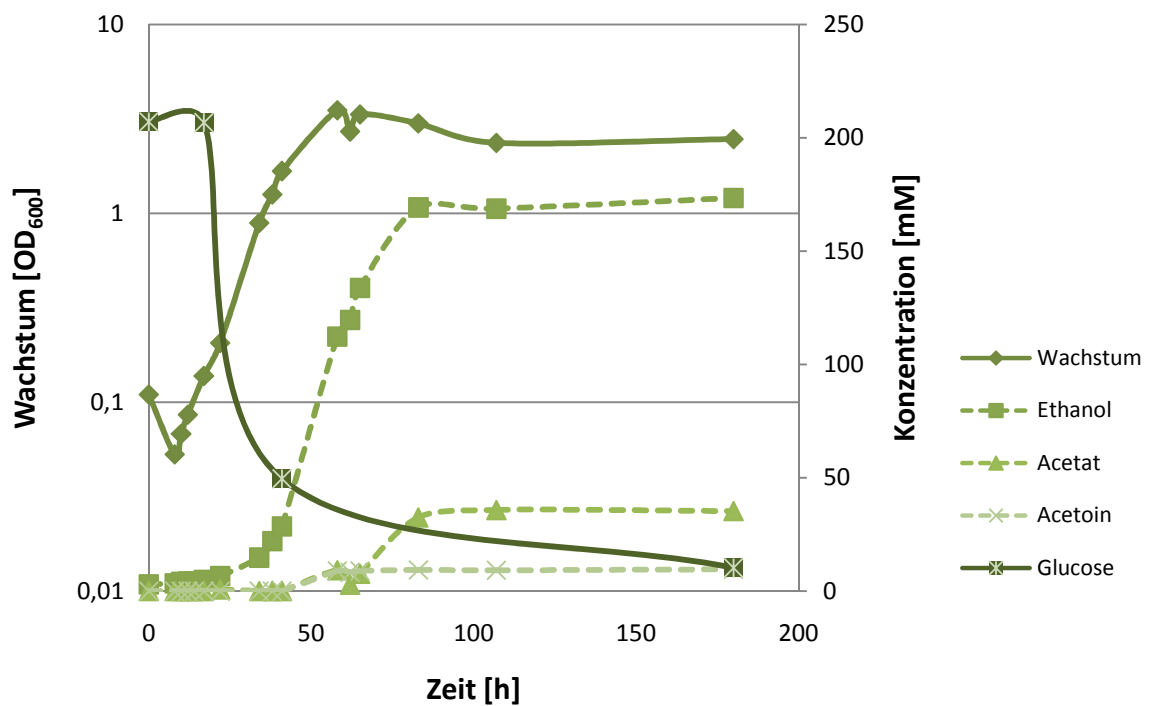


Abbildung 45: Wachstum und Produktspektrum von *C. acetobutylicum* crt383s::intron auf MES-Medium

Danksagung

„Keine Schuld ist dringender, als die, Dank zu sagen.“ Marcus Tullius Cicero

Ein besonderer Dank gilt an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. Peter Dürre für die Überlassung des interessanten Themas und die Ermöglichung eines eigenverantwortlichen und selbstständigen Arbeitens. Vielen Dank auch für die daraus resultierenden, zahlreichen, fachlichen Diskussionen, die guten Ratschläge und Hilfestellungen bei Problemfällen.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. Bernhard Eikmanns für die Übernahme des Korreferates dieser Arbeit.

Vielen Dank auch an Bettina Schiel-Bengelsdorf für die Korrektur und die Hilfestellung beim Verfassen dieser Arbeit.

Ein ganz großer Dank gilt Mandy Wensche, die schon während der Studienzeit zu meiner besten Freundin geworden ist. Auch während unserer Doktorandenzeit wurde es mit dir nie langweilig im Labor. Ohne dich wären die Rückschläge oder Frustrationen während den Arbeiten nicht zu ertragen gewesen ;-).

Lieben Dank auch an das damalige „Chicken“-Labor 337 mit Mandy, Thiemo, Sonja und Simone. Ihr habt dazu beigetragen, dass der Laboralltag immer wieder durch gute Stimmung und Spaß untermalt wurde. Natürlich auch lieben Dank an Cata, die Neue im Labor 337.

Ein ganz großer Dank an dich, Simone, für das Korrekturlesen meiner Arbeit und die sehr hilfreichen Diskussionen während unseren wöchentlichen „Walking“-Stunden. Auch du bist während der Doktorandenzeit zu einer sehr guten Freundin geworden.

Lieben Dank auch an Thomas Rimpf für das mühselige Korrigieren dieser Arbeit.

Ein weiterer Dank gilt den „Insassen“ des Labors 336-338 (Brigitte, Tobi, Stefanie, Sandy, Karin, Mone, Dominik, Knuspi und Hatice) für die Unterstützung bei aufgetretenen Fragen und Problemen. Und natürlich auch an den Rest der AG „Dürre“ (Iris, José, Ben, Frank, Basti, Stefan und Sabrina).

Lieben Dank natürlich auch an den Rest des Instituts.

Vielen Dank auch an alle meine Freunde außerhalb der Uni, die ich des Öfteren mit meinen Problemen während der Arbeiten für diese Diss genervt habe, auch wenn sie nur die Hälfte davon verstanden haben ☺!

Lieben Dank an Diana und Ela, die immer ein offenes Ohr für mich hatten, wenn mal wieder Frustrationen während der Arbeiten auftauchten.

Des Weiteren danke ich meinem Freund Fabian für das Aushalten von einigen schlechten Launen meinerseits und für die Aufmunterung bei so manchen Tiefschlägen während dieser Arbeit. Vielen Dank für die Begleitung in das „Stinki“-Labor an so manchen Wochenenden!!

Der größte Dank gilt jedoch meinen Eltern für die Ermöglichung meines Studiums und für die langjährige Unterstützung bis zur Erlangung meines Dokortitels. Ohne euch wäre all dies nicht möglich gewesen. Danke, dass ihr immer zu mir gestanden und an mich geglaubt habt!

Akademischer Lebenslauf

14. Okt. 1984 Geburt in Tettnang

Schulbildung

1991 – 1995 Besuch der Grundschule Grünkraut

1995 – 2001 Besuch der Realschule, Bildungszentrum Bodnegg

2001 Mittlere Reife

2001 – 2004 Besuch des Ernährungswissenschaftlichen Gymnasiums
in Ravensburg

2004 Allgemeine Hochschulreife

Studium

Okt. 2004 Immatrikulation an der Universität Ulm, Biologie

Nov. 2006 Vordiplom im Studienfach Biologie

Dez. 2007 – Juli 2008 Diplomprüfungen in Mikrobiologie (Hauptfach),
Pharmakologie und Toxikologie, Genetik und Chemie

Aug. 2008 – Apr. 2009 Diplomarbeit zum Thema „Identifikation der
Pathogenitätsfaktoren in *Propionibacterium acnes* sowie
der Einfluss aktiver Inhaltsstoffe auf das Wachstum
weiterer Hautkeime“ am Institut für Mikrobiologie und
Biotechnologie der Universität Ulm

April 2009 Erlangen des akademischen Grades „Diplom-Biologin“

Juni 2009 Beginn der Arbeiten zur vorliegenden Dissertation am
Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie der
Universität Ulm

Hiermit erkläre ich, die eingereichte Dissertation selbständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel und Quellen als die angegebenen benutzt zu haben. Alle Zitate sind gekennzeichnet, und alle Abbildungen enthalten nur die originalen Daten und sind in keinem Fall inhaltsverändernder Bildarbeiten unterzogen worden. Alle existierenden Exemplare der vorliegenden Dissertation sind in Wort und Bild übereinstimmend.

Ulm, Mai 2012

(Melanie Straub)