

Herstellung von Butanol, Hexanol und Capronsäure
auf Basis CO und CO₂ mittels Fermentation von
acetogenen Bakterien zusammen mit *C. kluyveri* und
Untersuchung der beteiligten Faktoren

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat.

der Fakultät für Naturwissenschaften

der Universität Ulm

vorgelegt von

Swen Bielzer

aus Augsburg

2019

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

Amtierender Dekan:

Prof. Dr. Peter Dürre

Erstgutachter:

Prof. Dr. Peter Dürre

Zweitgutachter:

Prof. Dr. Bernhard Eikmanns

Tag der Promotion: 8.8.2019

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
1 Einleitung.....	1
2 Material und Methoden	13
2.1 Bakterienstämme, Plasmide und Oligodesoxynukleotide	13
2.1.1 Bakterienstämme.....	13
2.1.2 Plasmide.....	14
2.1.3 Oligodesoxynukleotide	16
2.2 Materialien	18
2.2.1 Gase	18
2.3 Zellanzucht.....	19
2.3.1 Nährmedien	19
2.3.1.1 Nährmedien für die Kultivierung von <i>E. coli</i>	19
2.3.1.2 Nährmedien für die Kultivierung von <i>C. autoethanogenum</i> , <i>C. carboxidivorans</i> , <i>C. kluyveri</i> und <i>C. ljungdahlii</i>	21
2.3.2 Medienzusätze	27
2.4 Stammhaltung.....	28
2.5 Kultivierungsbedingungen.....	28
2.5.1 Kultivierung von <i>E. coli</i>	28
2.5.2 Kultivierung anaerober Bakterien.....	29
2.5.2.1 Kultivierung von <i>C. autoethanogenum</i> , <i>C. carboxidivorans</i> und <i>C. ljungdahlii</i>	29
2.5.2.2 Kultivierung von <i>C. kluyveri</i>	29
2.5.2.3 Methodik der simultanen Cofermentationen.....	29
2.5.2.4 Methodik der sequentiellen Cofermentationen mit einem Wechsel der Gasphase während der Kultivierung	30
2.5.2.5 Methodik der sequentiellen Cofermentationen ohne Wechsel der Gasphase während der Kultivierung.....	31
2.5.2.6 Methodik der separaten biphasischen Fermentationen	31
2.5.2.7 Untersuchung des Einflusses verschiedener Substratkonzentrationen auf das Wachstum und das Produktspektrum von <i>C. kluyveri</i>	32
2.5.2.8 Untersuchung des Einflusses von Kohlenmonoxid auf das Wachstum und den Stoffwechsel von <i>C. kluyveri</i>	32

Inhaltsverzeichnis

2.5.2.9	Untersuchung der Fähigkeit von <i>C. carboxidivorans</i> und <i>C. ljungdahlii</i> zur Umwandlung von Butyrat und Capronat in die entsprechenden Alkohole	32
2.5.2.10	Untersuchung des Einflusses des pH-Wertes auf das Wachstum und das Produktspektrum bei Kultivierung von <i>C. kluyveri</i>	33
2.5.2.11	Untersuchung der Auswirkung der Übertragung von Ethanol und Acetat aus Vorkulturen von <i>C. kluyveri</i> bei Inokulation neuer Kulturen.....	33
2.6	Bestimmung von Wachstums- und Stoffwechselfparameter	33
2.6.1	Bestimmung der optischen Dichte.....	33
2.6.2	Messung des pH-Wertes	34
2.6.3	Bestimmung der Stoffwechselfparameter mittels Gaschromatographie	34
2.6.3.1	Gaschromatographie mit gepackter Säule	34
2.6.3.2	Gaschromatographie mit Kapillarsäule.....	35
2.7	Arbeiten mit Nukleinsäuren	37
2.7.1	Isolierung von genomischer DNA aus Gram-positiven Bakterien	37
2.7.2	Isolierung von Plasmid DNA mittels „Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit“	37
2.7.3	Reinigung und Konzentrierung von DNA aus Lösungen mittels des "DNA Clean & Concentrator™-5 Kit"	37
2.7.4	Reinigung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen mittels des "Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit“	38
2.7.5	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	38
2.7.6	Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten.....	38
2.7.6.1	Nichtdenaturierende Agarosegelelektrophorese	38
2.7.6.2	Färbung von Nukleinsäuren in Agarosegelen	40
2.7.7	Amplifikation von DNA.....	40
2.7.7.1	Auswahl und Herstellung synthetischer Oligodesoxynukleotide.....	40
2.7.7.2	Standard-PCR.....	41
2.7.7.3	Einfügen von Restriktionsschnittstellen mittels PCR	43
2.7.8	Enzymatische Modifikation von DNA.....	43
2.7.8.1	Restriktionsverdau von DNA.....	43
2.7.8.2	Modifikation von DNA („blunten“)	44
2.7.8.3	Ligation von DNA	45
2.7.8.4	Sequenzierung von DNA	46
2.8	DNA-Transfer in Bakterien.....	46
2.8.1	Herstellung kaltkompetenter <i>E. coli</i> XL1-Blue MRF ¹ -Zellen.....	46
2.8.2	Transformation kaltkompetenter <i>E. coli</i> XL1-Blue MRF ¹ -Zellen	47
2.8.3	Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> BL21 (DE3) und <i>E. coli</i> DH5α-Zellen	48

Inhaltsverzeichnis

2.8.4	Transformation elektrokompenter <i>E. coli</i> BL21 (DE3) und <i>E. coli</i> DH5 α -Zellen.....	48
2.8.5	Blau-Weiß-Selektion rekombinanter <i>E. coli</i> -Klone.....	49
2.9	Elektronenmikroskopie	50
3	Experimente und Ergebnisse	51
3.1	Konstruktion eines Biosyntheseweges zur Produktion von Capronat mittels rekombinanter acetogener Stämme	51
3.1.1	Test der Funktionalität des Plasmid pMW 2.1 in <i>E. coli</i> XL1-Blue MRF'	54
3.2	Produktion von Capronat ausgehend von Synthesegas mittels (Co-) Fermentationen 58	
3.2.1	Simultane Cofermentation.....	59
3.2.1.1	Simultane Cofermentation von <i>C. autoethanogenum</i> und <i>C. kluyveri</i>	60
3.2.1.2	Simultane Cofermentation von <i>C. carboxidivorans</i> und <i>C. kluyveri</i>	63
3.2.1.3	Simultane Cofermentation von <i>C. ljungdahlii</i> und <i>C. kluyveri</i>	68
3.2.1.4	Zusammenfassung der simultanen Cofermentation	74
3.2.2	Sequentielle Cofermentation mit einem Wechsel der Gasphase während der Kultivierung	75
3.2.2.1	Sequentielle Cofermentation (mit einem Wechsel der Gasphase) von <i>C. autoethanogenum</i> und <i>C. kluyveri</i>	76
3.2.2.2	Sequentielle Cofermentation (mit einem Wechsel der Gasphase) von <i>C. carboxidivorans</i> und <i>C. kluyveri</i>	79
3.2.2.3	Sequentielle Cofermentation (mit einem Wechsel der Gasphase) von <i>C. ljungdahlii</i> und <i>C. kluyveri</i>	82
3.2.2.4	Zusammenfassung der sequentiellen Cofermentation mit einem Wechsel der Gasphase während der Kultivierung.....	85
3.2.3	Sequentielle Cofermentation ohne Wechsel der Gasphase während der Kultivierung	86
3.2.3.1	Sequentielle Cofermentation (ohne Wechsel der Gasphase während der Kultivierung) von <i>C. autoethanogenum</i> und <i>C. kluyveri</i>	87
3.2.3.2	Sequentielle Cofermentation (ohne Wechsel der Gasphase während der Kultivierung) von <i>C. carboxidivorans</i> und <i>C. kluyveri</i>	90
3.2.3.3	Sequentielle Cofermentation (ohne Wechsel der Gasphase während der Kultivierung) von <i>C. ljungdahlii</i> und <i>C. kluyveri</i>	95
3.2.3.4	Zusammenfassung der sequentiellen Cofermentation ohne Wechsel der Gasphase während der Kultivierung.....	101
3.2.4	Separate biphasische Fermentation	102
3.2.4.1	Separate biphasische Fermentation von <i>C. carboxidivorans</i> und <i>C. kluyveri</i>	103
3.2.4.1.1	Resultate der Kultivierung der acetogenen Kulturen	103
3.2.4.1.2	Kultivierung von <i>C. kluyveri</i> in einem Medium präpariert aus einer acetogenen Kultur (<i>C. carboxidivorans</i>)	109

Inhaltsverzeichnis

3.2.4.2	Separate biphasische Fermentation von <i>C. ljungdahlii</i> und <i>C. kluyveri</i>	114
3.2.4.2.1	Resultate der Kultivierung der acetogenen Kulturen	114
3.2.4.2.2	Kultivierung von <i>C. kluyveri</i> in Medium präpariert aus einer acetogenen Kultur (<i>C. ljungdahlii</i>)	117
3.2.4.3	Zusammenfassung der separaten biphasischen Fermentation	122
3.3	Untersuchung des Einflusses verschiedener Substratkonzentrationen auf das Wachstum und das Produktspektrum von <i>C. kluyveri</i>	123
3.3.1	Zusammenfassung der Resultate bei der Untersuchung des Einflusses verschiedener Substratkonzentrationen auf das Wachstum und das Produktspektrum von <i>C. kluyveri</i> ...	128
3.4	Untersuchung des Einflusses von Kohlenmonoxid auf das Wachstum und den Stoffwechsel von <i>C. kluyveri</i>	130
3.5	Untersuchung der Fähigkeit von <i>C. carboxidivorans</i> und <i>C. ljungdahlii</i> zur Umwandlung von Butyrat und Capronat in die entsprechenden Alkohole	135
3.5.1	Umwandlung von Butyrat und Capronat durch <i>C. carboxidivorans</i>	137
3.5.2	Umwandlung von Butyrat und Capronat durch <i>C. ljungdahlii</i>	142
3.5.3	Zusammenfassung der Versuche zur Untersuchung der Fähigkeit von <i>C. carboxidivorans</i> und <i>C. ljungdahlii</i> zur Umwandlung von Butyrat und Capronat in die entsprechenden Alkohole	146
3.6	Untersuchung des Einflusses des pH-Wertes auf das Wachstum und das Produktspektrum bei Kultivierung von <i>C. kluyveri</i>	147
3.6.1	Zusammenfassung der Resultate zur Untersuchung des Einflusses des pH-Wertes auf das Wachstum und das Produktspektrum von <i>C. kluyveri</i>	150
3.7	Untersuchung der Auswirkung der Verschleppung von Ethanol und Acetat aus Vorkulturen von <i>C. kluyveri</i> bei Inokulation neuer Kulturen.....	151
3.7.1	Zusammenfassung der Untersuchung der Verschleppung von Ethanol und Acetat aus Vorkulturen von <i>C. kluyveri</i> bei Inokulation neuer Kulturen.....	156
3.8	Elektronenmikroskopische Betrachtung von simultanen Cofermentationen	157
4	Diskussion.....	163
4.1	Konstruktion eines Biosyntheseweges zur Produktion von Capronat mittels rekombinanter acetogener Stämme	163
4.1.1	Test der Funktionalität des Plasmid pMW 2.1 in <i>E. coli</i> XL1-Blue MRF ¹	166
4.2	Produktion von Capronat ausgehend von Synthesegas mittels (Co-) Fermentationen	168

Inhaltsverzeichnis

4.2.1	Simultane Cofermentation.....	168
4.2.2	Sequentielle Cofermentation mit einem Wechsel der Gasphase während der Kultivierung	174
4.2.3	Sequentielle Cofermentation ohne Wechsel der Gasphase während der Kultivierung	177
4.2.4	Separate biphasische Fermentation	180
4.3	Untersuchung des Einflusses verschiedener Substratkonzentrationen auf das Wachstum und das Produktspektrum von <i>C. kluyveri</i>	184
4.4	Untersuchung des Einflusses von Kohlenmonoxid auf das Wachstum und den Stoffwechsel von <i>C. kluyveri</i>	188
4.5	Untersuchung der Fähigkeit von <i>C. carboxidivorans</i> und <i>C. ljungdahlii</i> zur Umwandlung von Butyrat und Capronat in die entsprechenden Alkohole	191
4.6	Untersuchung des Einflusses des pH-Wertes auf das Wachstum und das Produktspektrum bei Kultivierung von <i>C. kluyveri</i>	194
4.7	Untersuchung der Auswirkung der Verschleppung von Ethanol und Acetat aus Vorkulturen von <i>C. kluyveri</i> bei Inokulation neuer Kulturen	197
4.8	Elektronenmikroskopische Betrachtung von simultanen Cofermentationen	201
4.9	Generelle Aspekte zur Thematik der Cofermentation	205
5	Zusammenfassung	211
6	Summary.....	214
7	Referenzen.....	217

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AG	Aktiengesellschaft
ATCC	„American Type Culture Collection“
ATP	Adenosintriphosphat
B.	<i>Bacillus</i>
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin; Kohlenstoff
C.	<i>Clostridium</i>
°C	Grad Celsius
CA	„California“
ca.	circa
CO	Kohlenmonoxid
CO ₂	Kohlendioxid
Co.	Compagnie
CoA	Coenzym A
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
d.h.	das heisst
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	„deoxyribonucleic acid“
Dr.	Doktor
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
dTTP	Desoxythymidintriphosphat

E.	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	„ <i>et alii</i> “ (und andere)
F	Farad
FID	Flammenionisationsdetektor
G	Guanin
g	Gramm; Erdbeschleunigung
GC	Gaschromatographie
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde(n)
<i>H.</i>	<i>Hämophilus</i>
H ₂	Wasserstoff
Inc.	Incorporated
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
L	L-Isomer
l	Liter
LB	„lysogeny broth“
M	Molar
MA	„Massachusetts“
min	Minuten
MWK	Ministerium für Wissenschaft, Forschung und Kunst Baden-Württemberg

N₂	Stickstoff
NAD ⁺	oxidiertes Nicotinamadenindinukleotid
NADH	reduziertes Nicotinamadenindinukleotid
NJ	„New Jersey“
NY	„New York“
O₂	Sauerstoff
OD _{600nm}	optische Dichte bei 600 nm
Ω	Ohm
P	Phosphor
Pa	Pascal
PBS	„phosphate buffered saline“
PCR	„polymerase chain reaction“ (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Hydronium-Ionen
PIPES	Piperazine-N,N'-bis(2-Ethansulfonsäure)
Prof.	Professor
SOB	„super optimal broth“
SOE	„splice by overlap extension“
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
THF	Tetrahydrofolat
™	„Trademark“
U	„Unit“ (Aktivitätsangabe bei Enzymen)
u.a.	unter anderem
Upm	Umdrehungen pro Minute
USA	„United States of America“
UV	Ultraviolett

V	Volt
v	„Volume“
v.a.	vor allem
Vol.-%	Volumenprozent
w	“Weight”
WA	Washington
WI	„Wisconsin“
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel

Einheitenpräfixe

k	kilo 10^3
c	centi 10^{-2}
m	milli 10^{-3}
μ	mikro 10^{-6}
n	nano 10^{-9}
p	piko 10^{-12}

1 Einleitung

In Zeiten von globaler Erwärmung, der Begrenztheit fossiler Brennstoffe und des stetig steigenden Energiebedarfes, auch aufgrund der immer weiter zunehmenden Weltbevölkerung, sucht die Wissenschaft nach neuen Möglichkeiten, diese Herausforderungen zu bewältigen. Eine Sparte, die an Lösungen dieser Probleme arbeitet, ist die Biotechnologie. Die Biotechnologie ist eine interdisziplinäre Sparte mit Einflüssen und Methoden, die u.a. aus der Biochemie, Mikrobiologie, Molekularbiologie und Verfahrenstechnik stammen (Soetaert und Vandamme, 2006). Die Biotechnologie kann wiederum in verschiedene Sektoren aufgeteilt werden. Die bedeutendsten Sektoren sind die sogenannte rote Biotechnologie (medizinischer Bereich, Herstellung von Biopharmazeutika), die grüne Biotechnologie (Landwirtschaft, gentechnische Modifikation von Nutzpflanzen) und die weiße Biotechnologie, die auch als industrielle Biotechnologie bezeichnet wird (Soetaert und Vandamme, 2006). Manche Autoren nehmen noch weitere Einteilungen mittels der Erweiterung des Farbcodes vor und sprechen gar vom Regenbogencode der Biotechnologie (Kafarski, 2012). So ist neuerdings auch die Rede von der blauen (verknüpft mit marinen Gegenden), der braunen (verknüpft mit Wüsten oder trockenen Regionen), der goldenen (Bioinformatik und Computertechnologie), der violetten (beschäftigt sich mit ethischen und juristischen Fragestellungen) und sogar der dunklen Biotechnologie (Bioterrorismus und biologische Waffen) die Rede (Kafarski, 2012). Die Thematik und die Arbeiten dieser Dissertation sind eindeutig der weißen, also der industriellen Biotechnologie, zuzuordnen. Die industrielle Biotechnologie definiert sich durch eine nachhaltige Produktion (geringer Energiebedarf und weniger Produktion von Abfallstoffen) von Chemikalien, Materialien und Treibstoffen aus erneuerbaren Ressourcen, indem lebende Zellen (Hefe, Schimmelpilze, Bakterien und Pflanzen) und/oder deren Enzyme genutzt werden (Frazzetto, 2003; Tang und Zhao, 2009).

In dieser Arbeit wurden speziell Bakterien genutzt, um durch Fermentationsprozesse hochwertige Feinchemikalien zu produzieren. Die ausgewählte Bakteriengattung war die der Clostridien. Clostridien sind Gram-positive, anaerobe, endosporen-bildende Bakterien, deren Physiologie zumeist mit der Produktion von Säuren verbunden ist (Dürre,

finden, die befähigt sind, Acetyl-CoA, ausgehend von zwei Molekülen Kohlendioxid (bzw. Kohlenmonoxid), mittels des nach dessen Entdeckern benannten Wood-Ljungdahl-Weges zu bilden (Schuchmann und Müller, 2014). Bakterien, die diese Fähigkeit besitzen, werden als Acetogene bezeichnet (Schuchmann und Müller, 2014). Diese acetogenen Bakterien sind somit auch in der Lage, sogenanntes Synthesegas (=Syngas) als Substrat zu nutzen, ein Gas, dessen Bestandteile u.a. auch Kohlendioxid und Kohlenmonoxid sind. Somit kann das Treibhausgas Kohlendioxid und das toxische Kohlenmonoxid für Fermentationen mit acetogenen Bakterien verwendet werden, um eine nachhaltige Produktion (ohne Nutzung fossiler Brennstoffe) von Feinchemikalien zu erreichen. Eine Übersicht des Modells der Fixierung von Kohlendioxid und Kohlenmonoxid mittels des Wood-Ljungdahl-Weges ist in Abbildung 1 sehen. Der Wood-Ljungdahl-Weg wird auch als reduktiver Acetyl-CoA Weg bezeichnet und dessen Funktionsweise wurde bereits in einigen Publikationen aufgeschlüsselt (Ljungdahl, 1986; Wood *et al.*, 1986; Ragsdale und Pierce, 2008; Schuchmann und Müller, 2014). Der Wood-Ljungdahl-Weg wird in zwei Zweige eingeteilt, zum einen in den Carbonyl- (Reduktion von Kohlendioxid zu einer Carbonylgruppe) und zum anderen in den Methyl-Zweig (Reduktion von Kohlendioxid zu einer Methylgruppe). Im Carbonyl-Zweig wird extrazelluläres Kohlendioxid aufgenommen und zu Kohlenmonoxid reduziert. Der Methyl-Zweig stellt sich im Vergleich dazu komplizierter dar. Hier wird aufgenommenes Kohlendioxid mittels der Formiat-Dehydrogenase zu Formiat reduziert. Im nächsten Schritt wird Tetrahydrofolat (=THF) mittels der Formyl-THF-Synthase unter ATP-Verbrauch an Formiat gebunden und es entsteht Formyl-THF. Formyl-THF wird durch die Formyl-THF-Cyclohydrolase unter der Abspaltung von Wasser zu Methenyl-THF umgewandelt. Die Methenyl-THF-Dehydrogenase reduziert Methenyl-THF zu Methylen-THF, welches wiederum durch die Methylen-THF-Reduktase zu Methyl-THF reduziert wird. Eine Methyltransferase überträgt im letzten Schritt des Methyl-Zweiges die Methylgruppe auf ein Corrinoid-Eisen-Schwefel-Protein. Das Corrinoid-Eisen-Schwefel-Protein lagert sich an eine Untereinheit der CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthase an. An diesem Enzym laufen beide Zweige des Wood-Ljungdahl-Weges zusammen. So wird mittels der Methylgruppe aus dem Methyl-Zweig und mittels des Kohlenmonoxids aus dem Carbonyl-Zweig durch die CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthase das Acetyl-CoA gebildet. Acetyl-CoA ist Ausgangsstoff für weitere Produkte. In

einer Mehrheit der acetogenen Bakterien wird Acetyl-CoA weiter zu Acetat umgewandelt, was die Generierung von ATP ermöglicht (Schuchmann und Müller, 2016). Im Rahmen der Energierkonservierung ist eine in acetogenen Bakterien zusätzliche beschriebene Möglichkeit erwähnenswert (Bengelsdorf *et al.*, 2013; Schuchmann und Müller, 2014). Im Falle der Anwesenheit von molekularem Wasserstoff werden in einem Prozess, der als Elektronenbifurkation bezeichnet wird, die Elektronen durch eine Hydrogenase auf Ferredoxin übertragen und dieses damit reduziert. Das reduzierte Ferredoxin wird wiederum vom sogenannten RNF-Komplex (Enzymkomplex mit mehreren Untereinheiten, welcher sich in der Zellmembran befindet) genutzt, um einen Protonengradienten zwischen intra- und extrazellulärem Raum zu erstellen. Im Falle von Clostridien wird dieser Protonengradient mittels Wasserstoffionen gebildet. Möglich ist aber auch ein Gradient gebildet mittels Natriumionen, wie im Falle von *Acetobacterium woodii* (Schuchmann und Müller, 2014). Der (Protonen-)Gradient ist die Grundlage für die Aktivität einer ATPase, welche sich ebenfalls in der Membran verankert befindet, um ATP zu generieren und damit Energie zu konservieren.

Das zuvor genannte Acetyl-CoA ist Ausgangsstoff für weitere Produkte. In einer Mehrheit der acetogenen Bakterien wird Acetyl-CoA weiter zu Acetat umgewandelt (Schuchmann und Müller, 2016). Ein weiteres natürliches Produkt einiger acetogener Bakterien ist Ethanol. Die Bildung von Ethanol ist im Rahmen der Clostridien für *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium ragsdalei* und *Clostridium drakei* beschrieben (Abrini *et al.*, 1994; Liou *et al.*, 2005; Köpke *et al.*, 2010; Kundiyana *et al.*, 2011). Die Produktion von Ethanol mittels acetogener Bakterien hat eine biotechnologische Relevanz, da es somit möglich ist, Ethanol auf einem nachhaltigen Weg ausgehend von Kohlendioxid zu produzieren. Ein Teil der oben genannten ethanolproduzierenden Clostridien ist ebenfalls in der Lage, länger-kettige Kohlenwasserstoffverbindungen zu synthetisieren. Im Falle von *C. carboxidivorans* und *C. drakei* ist auch eine Bildung von Butyrat und Butanol vorzufinden (Liou *et al.*, 2005). *C. carboxidivorans* ist sogar in der Lage, diese aus vier Kohlenstoffatomen bestehenden Substanzen weiter zu verlängern und bildet davon ausgehend die aus sechs Kohlenstoffatomen bestehenden Substanzen Hexanol und Capronat (Phillips *et al.*, 2015). Die industrielle Bedeutung und Nutzbarkeit von Butanol, Hexanol und Capronat wird im

weiteren noch erörtert. Ein anderes bedeutsames natürliches Produkt bestimmter acetogener Bakterien ist 2,3-Butandiol. Bedeutsam ist 2,3-Butandiol vor allem als Vorläufersubstanz für die Synthese vieler weiterer Chemikalien (Celińska und Grajek, 2009). Eine Produktion von 2,3-Butandiol konnte in stationären Wachstumsphasen bei Kultivierungen von *C. autoethanogenum*, *C. ljungdahlii* und *C. ragsdalei* gezeigt werden (Köpke *et al.*, 2011b).

Mittels gentechnischer Modifikation (neudeutsch auch bezeichnet als „metabolic engineering“) acetogener Bakterien wurden in den letzten Jahren Versuche unternommen, diese Produktpalette um weitere, für die Industrie nutzbare Substanzen zu erweitern. Im Folgenden wird nur auf gentechnische Modifikationen acetogener Clostridienstämme eingegangen. In einer der ersten in diesem Bereich durchgeführten Arbeiten gelang es, *Clostridium aceticum* (einziges Hauptprodukt Acetat) gentechnisch so zu modifizieren, dass Aceton ausgehend von Synthesegas produziert werden konnte (Lederle, 2010). Erreicht wurde diese Produktion, indem *C. aceticum* mit einem Plasmid transformiert wurde, welches die Gene enthielt, die an der Acetonsynthese im solventogenen (Lösungsmittelbildenden) Bakterium *C. acetobutylicum* beteiligt sind. Weitere acetogene Clostridien, deren Produktspektrum mittels gentechnischer Modifikationen erweitert werden konnte, sind die miteinander nah verwandten Arten *C. autoethanogenum* und *C. ljungdahlii*. Im Falle von *C. ljungdahlii* wurde ähnlich vorgegangen wie zuvor für *C. aceticum* beschrieben. Somit wurde mittels Transformation ein Plasmid eingebracht, welches wiederum Gene aus *C. acetobutylicum* enthielt und zwar in diesem Fall Gene, die beteiligt sind an der Butanolsynthese (Köpke *et al.*, 2010). In Wachstumsversuchen, in denen Synthesegas als Substrat genutzt wurde, konnte eine Bildung von Butanol (ca. 2 mM) in *C. ljungdahlii* nachgewiesen werden (Köpke *et al.*, 2010). Wie bereits zuvor erwähnt wurden auch bei *C. autoethanogenum* gentechnische Modifikationen unternommen. Diese Arbeiten wurden von der Firma LanzaTech durchgeführt (Chicago, Illinois, USA). LanzaTech ist eine Firma, die sich auf die Produktion von Feinchemikalien mittels acetogener Bakterien ausgehend von Synthesegas, welches direkt aus dem Herstellungsprozess von Stahl stammt, spezialisiert hat (Köpke *et al.*, 2011a). Von besonderem Interesse hat sich hierbei die kommerzielle Produktion von Ethanol und 2,3-Butandiol erwiesen (Köpke *et al.*, 2011b). Neben der Herstellung dieser

Alkohole wird auch an der Etablierung der nachhaltigen Produktion weiterer wertvoller Plattformchemikalien (=grundlegende Chemikalie für den Aufbau bzw. die Synthese weiterer Substanzen) gearbeitet. So wurden von dieser Firma zwei Patente beantragt, in denen mittels „metabolic engineering“ das Produktspektrum von *C. autoethanogenum* erweitert werden konnte. Somit war es möglich, dass *C. autoethanogenum*, ausgehend von Synthesegas, zum einen Butanol (Köpke und Liew, 2012) und zum anderen Aceton und Isopropanol (Köpke und Chen, 2013) bilden konnte. Noch befindet sich die gentechnische Modifikation von acetogenen Clostridien im Anfangsstadium, sodass zu erwarten ist, dass in den nächsten Jahrzehnten noch viele weitere Substanzen dazukommen werden. Zum Teil auch, weil deren Biosynthese auf bereits etablierten und funktionellen Synthesewegen aufbauen wird. Auch die Weiterentwicklung gentechnischer Werkzeuge und ein besseres molekularbiologisches Verständnis acetogener Bakterien (z.B. über Restriktionsmechanismen, die die Transformationen verhindern) wird diese Entwicklung positiv beeinflussen.

Wie gezeigt wurde, können mittels acetogener Bakterien einige dieser sogenannten industriell interessanten Plattformchemikalien synthetisiert werden. Anhand von Stoffwechselendprodukten, welche mittels der Versuche dieser Arbeit produziert wurden, soll nun dargestellt werden, was genau gemeint ist, wenn von wertvollen Feinchemikalien gesprochen wird. Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Etablierung der Synthese der aus sechs Kohlenstoffatomen bestehenden Hexansäure bzw. deren Salz Hexanoat (Trivialname: Capronsäure bzw. Capronat; Summenformel: $C_6H_{12}O_2$ bzw. $C_6H_{11}O_2^-$) ausgehend von Synthesegas, also hauptsächlich ausgehend von den C1-Körpern Kohlenmonoxid und Kohlendioxid. Hexansäure ist eine ölige, farblose oder schwach gelbliche Flüssigkeit und besitzt als hochkonzentrierter Reinstoff einen unangenehmen ziegenartigen Geruch. Dem ziegenartigen Geruch hat diese Substanz auch seinen Trivialnamen Capronsäure zu verdanken („Caper“; lateinisches Wort für Ziege). Capronsäure ist in der Natur oft in Ölen oder tierischen Fetten zu finden (Yin *et al.*, 2017) und hat ein breit gefächertes Spektrum möglicher Anwendungen. Eine hohe Bedeutung hat Capronsäure als Grundchemikalie, welche mittels industrieller Synthesen zu wertvollen Biotreibstoff oder anderen wertvollen Feinchemikalien weiter prozessiert werden kann (Van Eerten-Jansen *et al.*, 2013). Ein häufiges Anwendungsgebiet ist die

Veresterung von Capronsäure, um dann den entstandenen Ester als Duftstoff z.B. in Parfümen einzusetzen (Kenealy *et al.*, 1995; Jeon *et al.*, 2013). Capronsäure besitzt antimikrobielle Eigenschaften und ist daher auch für die pharmazeutische Industrie von Interesse (Huang *et al.*, 2011). Die antimikrobielle Wirkung gegenüber Salmonellen kann man sich zunutze machen, indem Capronsäure den Futtermitteln für Geflügel und Schweinen beigefügt wird (Immerseel *et al.*, 2004; Zentek *et al.*, 2011). Auf indirekten Wegen spielt Capronsäure auch bei der Produktion von Lebensmitteln als geschmacksgebender Nahrungsmittelzusatz eine Rolle. So ist sie Zusatz des im arabischen Raum weit verbreiteten „Labneh“, einer Art eingedickter und konzentrierter Joghurt, für dessen Produktion auch Ziegenmilch verwendet wird, die eben unter anderem Capronsäure enthält (Serhan *et al.*, 2016). Auch die in China sehr populäre Spirituose, „Luzhou Laojiao“ enthält aufgrund der durchgeführten Fermentationsprozesse ebenfalls Capronsäure, welche dem Getränk sein spezifisches Aroma verleiht (Hu *et al.*, 2015; Yan *et al.*, 2015).

Im Rahmen der Fermentationsprozesse dieser Arbeit wurde in mehreren Fällen auch eine Bildung von 1-Hexanol (im Weiteren nur noch als Hexanol bezeichnet) und 1-Butanol (im Weiteren nur noch als Butanol bezeichnet) nachgewiesen. Daher soll auch die Bedeutung dieser Substanzen noch aufgeführt werden. Hexanol ist der zur Hexansäure korrespondierende Alkohol und besteht daher ebenfalls aus sechs Kohlenstoffatomen (Summenformel: $C_6H_{14}O$). Es handelt sich um eine klare Flüssigkeit mit einem angenehmen, als leicht süßlich beschriebenen Duft. Hexanol findet unter anderem in der pharmazeutischen Industrie, der Kosmetik- und Parfümindustrie, der Textilindustrie, als Lösungsmittel und in Pestiziden Verwendung (Fernández-Naveira *et al.*, 2017b).

Die letzte Substanz, deren Relevanz erörtert werden soll, ist Butanol. Es handelt sich wiederum um eine farblose Flüssigkeit, deren Geruch als ethanolartig bzw. bananenartig empfunden wird. Butanol und daraus hergestellte Derivate besitzen sehr vielfältige Anwendungsmöglichkeiten, von denen nur stichpunktartig einige wichtige aufgeführt werden sollen. Genutzt wird Butanol bei der Produktion von Oberflächenbeschichtungen, Fasern, Plastik, Harzen, Farbstoffen, Farbstoffverdünnern und als Fruchtaroma in der Kosmetik und Parfümindustrie (Dürre, 2008). Butanol ist ebenfalls ein Kandidat für die

zukünftige Herstellung von Biotreibstoff, welcher aus erneuerbaren Ressourcen biotechnologisch gewonnen werden könnte (Dürre, 2008).

Wie bereits zuvor erwähnt, lag der Fokus dieser Arbeit vor allem in der biotechnologischen Produktion von Capronsäure. Aktuell sind nur wenige Organismen beschrieben, die Capronsäure bilden können. Die bisher beschriebenen und publizierten

Tabelle 1: Bakterienarten, die natürlicherweise Capronsäure bilden. Mit aufgeführt die taxonomische Einordnung, die benötigten Substrate und die entsprechenden Referenzen.

	Phylum und Klasse	Substrat(e)	Referenzen
<i>Clostridium carboxidivorans</i>	Firmicutes Clostridia	Fructose und CO/CO ₂ /H ₂	(Liou <i>et al.</i> , 2005; Phillips <i>et al.</i> , 2015)
<i>Caproiciproducens galactitolivorans</i> (ehemals <i>Clostridium</i> BS-1)	Firmicutes Clostridia	Galactitol	(Jeon <i>et al.</i> , 2013; Kim <i>et al.</i> , 2015)
<i>Clostridium kluyveri</i>	Firmicutes Clostridia	Ethanol und Acetat	(Barker und Taha, 1942; Yin <i>et al.</i> , 2017)
<i>Eubacterium limosum</i>	Firmicutes Clostridia	Methanol	(Genthner <i>et al.</i> , 1981; Chen <i>et al.</i> , 2016)
<i>Eubacterium pyruvativorans</i>	Firmicutes Clostridia	Aminosäuren und Pyruvat	(Wallace <i>et al.</i> , 2003, 2004)
<i>Megasphaera elsdenii</i>	Firmicutes Clostridia (ehemals Negativicutes)	Lactat und verschiedene Zucker	(Elsden <i>et al.</i> , 1956; Weimer und Moen, 2013)
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Proteobacteria Alpha- proteobacteria	Pyruvat	(Kohlmiller and Gest, 1951; Gest, 1995)
<i>Ruminococcaceae</i> CPB6	Firmicutes Clostridia	Lactat	(Zhu <i>et al.</i> , 2017; Wang <i>et al.</i> , 2018)

nativen mikrobiellen Capronsäureproduzenten sind in Tabelle 1 aufgeführt. Es ist ersichtlich, dass die aufgezählten Mikroorganismen erneuerbare Substanzen als Substrat verwenden, wie z.B. Zucker, Zuckerderivate oder Alkohole. Diese Substanzen können zwar aus nachwachsenden Ressourcen gewonnen werden, dennoch stellen deren Produktion bzw. die für deren Produktion benötigten landwirtschaftlichen Nutzflächen ein großes Problem dar. Die für die Produktion dieser Substanzen benötigten landwirtschaftlichen Nutzflächen stehen in direkter Konkurrenz zu landwirtschaftlichen Nutzflächen, die für die Produktion von Lebensmitteln wie z.B. Getreide oder Tierproduktion benötigt werden (Weideflächen für die Viehzucht). Eine Möglichkeit, diese Problematik zu umgehen, ist es, eine biotechnologische Produktion von Capronsäure ausgehend von Kohlenmonoxid und Kohlendioxid zu etablieren. Kohlenmonoxid und Kohlendioxid sind Schadstoffe, welche in chemischen Produktionsprozessen anfallen, erneuerbar sind und deren Bildung in keinerlei Konkurrenz zur Nahrungsmittelsproduktion steht. Wie aber nun ersichtlich ist, ist fast keiner der aufgelisteten Capronsäureproduzenten in der Lage, diese Gase als Substrat zu verwenden. Nur *C. carboxidivorans* ist dazu in der Lage, aber die mit diesem Bakterium möglichen Capronatkonzentrationen sind relativ gering. Um nun eine Produktion von Capronsäure auf Basis von Synthesegas zu etablieren, wurde der Fokus auf den Stoffwechsel und auf die an der Capronatsynthese beteiligten Gene von *Clostridium kluyveri* gelegt. *C. kluyveri* wurde aus allen Capronsäureproduzenten ausgewählt, weil mit dieser Bakterienart hohe Capronatkonzentrationen erzielt werden können und weil es am nächsten zu den acetogenen Bakterien *C. autoethanogenum*, *C. ljungdahlii* und *C. carboxidivorans* verwandt ist, welche ebenfalls zur Anwendung kommen sollten (siehe Ziel der Arbeit). *C. kluyveri* ist der am besten beschriebene und erforschte Organismus aller capronsäureproduzierenden Bakterien. *C. kluyveri* wurde 1937 aus dem Sediment eines Kanals in Delft (Niederlande) isoliert und diente in den 1950er Jahren als Modellorganismus für die Studie der Fettsäuresynthese und Fettsäureoxidation (Barker, 1937; Seedorf *et al.*, 2008). Von besonderer Bedeutung ist die sogenannte Ethanol-Acetat-Fermentation von *C. kluyveri*, deren Endprodukt neben Butyrat auch Capronat ist. Eine Übersicht der Ethanol-Acetat-Fermentation ist in Abbildung 2 zu sehen. Die an dieser Fermentation beteiligten Gene bzw. Enzyme wurden bereits zuvor beschrieben (Seedorf *et al.*, 2008; Jeon *et al.*, 2016; Cavalcante *et al.*, 2017).

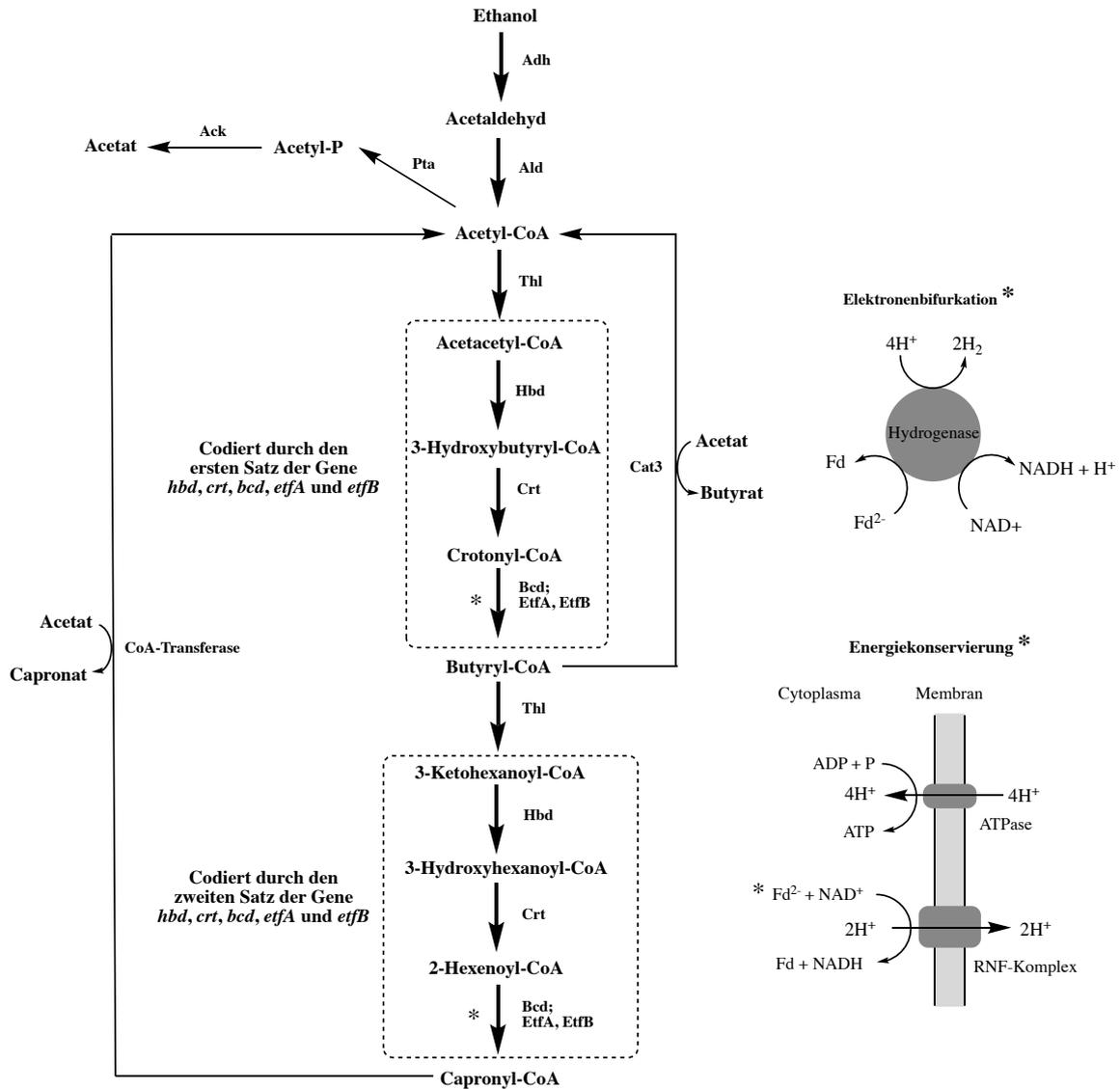


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Ethanol-Acetat-Fermentation von *C. kluyveri*. Die in dieser Fermentation involvierten Enzyme sind: Ethanol-Dehydrogenase (Adh); Acetaldehyd-Dehydrogenase (Ald); Phosphotransacetylase (Pta); Acetat-Kinase (Ack); Thiolase (Thl); 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase (Hbd); 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase (Crt); Butyryl-CoA-Dehydrogenase (Bcd); elektronentransferierendes Flavoprotein Untereinheit α (EtfA); elektronentransferierendes Flavoprotein Untereinheit β (EtfB); Butyryl-CoA: Acetat-CoA-Transferase (Cat3); Fd, Ferredoxin; * Reaktionen sind miteinander gekoppelt, siehe Text.

Das Substrat Ethanol wird mittels einer Alkohol-Dehydrogenase zu Acetaldehyd umgesetzt, welches wiederum durch die Acetaldehyd-Dehydrogenase zu Acetyl-CoA umgewandelt wird. Acetyl-CoA ist Ausgangspunkt für mehrere verschiedene Wege. Die erste Möglichkeit ist, dass Acetyl-CoA mittels der Phosphotransacetylase zu Acetylphosphat und dann mit einer Acetat-Kinase zu Acetat umgewandelt wird. Das

Acetat dient im späteren Verlauf als weiteres Substrat für *C. kluyveri*. Im zweiten Fall wird aus zwei Molekülen Acetyl-CoA durch eine Thiolase Acetacetyl-CoA gebildet. Die weiteren folgenden Syntheseschritte, ausgehend von diesem Intermediat, bedürfen noch weiterer Erklärung. In *C. kluyveri* gibt es zwei Sätze der Gene *hbd*, *crt*, *bcd*, *etfA* und *etfB* (entsprechende Enzyme Hbd, Crt, Bcd, EtfA und EtfB). Der erste Satz der Gene liegt als Gencluster im Genom vor und die codierten Enzyme sind verantwortlich für die Bildung von Butyryl-CoA ausgehend von Acetacetyl-CoA über die Zwischenprodukte 3-Hydroxybutyryl-CoA und Crotonyl-CoA. Butyryl-CoA kann nun zum einen mittels der Butyryl-CoA:Acetat-CoA-Transferase zusammen mit Acetat zu Butyrat reagieren, bei dessen Reaktion auch wiederum Acetyl-CoA entsteht. In der weiteren Möglichkeit wird Butyryl-CoA zusammen mit einem Molekül Acetyl-CoA durch die Thiolase zu 3-Ketohexanoyl-CoA umgesetzt. Für die weitere Umwandlung dieses Intermediats sind nun der zweite Satz der Gene *hbd*, *crt*, *bcd*, *etfA* und *etfB* (in diesem Fall kein Gencluster) und die codierten Enzyme verantwortlich. Ausgehend von 3-Ketohexanoyl-CoA wird durch diese Enzyme über die Zwischenschritte 3-Hydroxyhexanoyl-CoA und 2-Hexenoyl-CoA Capronyl-CoA gebildet. Capronyl-CoA wird mittels des gleichen Prinzips wie Butyryl-CoA mit Acetat und einer CoA-Transferase zu Capronat umgewandelt. Wie zu sehen ist, bilden Ethanol und auch Acetat die Grundlage für die Capronatsynthese und nicht das aus ökologischer und ökonomischer Sicht sinnvollere Synthesegas.

Die Energiekonservierung in *C. kluyveri* ist im Prinzip ähnlich zu der in acetogenen Bakterien, jedoch mit entscheidenden Unterschieden (Seedorf *et al.*, 2008; Cavalcante *et al.*, 2017). Auch in *C. kluyveri* findet eine Elektronenbifurkation statt. In diesem Falle stammen die Elektronen für die Aktivität der Hydrogenase aber nicht von molekularem Wasserstoff, sondern vom reduzierten Ferredoxin. Das reduzierte Ferredoxin wird gebildet von Enzymkomplexen, welche aus der Butyryl-CoA-Dehydrogenase und den entsprechenden Untereinheiten der elektronentransferierenden Flavoproteine bestehen. Somit sind diese Prozesse und damit auch die Elektronenbifurkation einerseits gekoppelt an die Umwandlung von Crotonyl-CoA zu Butyryl-CoA und zum anderen gekoppelt an die Umwandlung von 2-Hexenoyl-CoA zu Capronyl-CoA. Die Hydrogenase in *C. kluyveri* regeneriert zum Teil die Reduktionsäquivalente Ferredoxin wieder und überträgt dabei die Elektronen auf Wasserstoffionen, um somit molekularem Wasserstoff zu bilden, ein

weiteres beschriebenes Produkt von *C. kluyveri*. Um nun eine Energiekonservierung zu erreichen, wird ein Teil des zuvor gebildeten reduzierten Ferredoxins nun wie zuvor in acetogenen Bakterien beschrieben genutzt, um durch den RNF-Komplex einen Protonengradienten zu bilden und dann mittels einer ATPase Energie zu konservieren mittels Generierung von ATP. Somit ist auch die Energiekonservierung des RNF-Komplexes direkt gekoppelt an die Aktivität des Komplexes aus Butyryl-CoA-Dehydrogenase und den entsprechenden Untereinheiten der elektronentransferierenden Flavoproteine.

Ziel dieser Arbeit:

In dieser Dissertation wurde an der Etablierung einer biotechnologischen Capronatsynthese gearbeitet, deren Ausgangssubstrat und Kohlenstoffquelle Synthesegas ist. Die Arbeiten daran lassen sich in zwei Kategorien unterteilen. Zum einen wurde versucht, acetogene Bakterien, genauer acetogene Clostridien, zu befähigen, Capronat zu synthetisieren, indem Gene aus nicht acetogenen Clostridien wie *C. acetobutylicum* und *C. kluyveri* mittels Plasmiden eingebracht werden (rekombinanter Ansatz). Neben diesem Ansatz des „metabolic engineering“ wurde auch ein Ansatz verfolgt, in welchem ohne gentechnische Modifikation der genutzten Organismen eine Capronatsynthese ausgehend von Synthesegas erreicht werden sollte (nicht rekombinanter Ansatz). Es wurden acetogene Clostridien gewählt, deren Endprodukte v.a. Ethanol und Acetat sind, welche dann als Substrat für die native Capronatsynthese durch *C. kluyveri* nutzbar gemacht werden sollten. Auf indirektem Wege wäre somit auch eine Capronatsynthese ausgehend von Synthesegas möglich.

2 Material und Methoden

2.1 Bakterienstämme, Plasmide und Oligodesoxynukleotide

2.1.1 Bakterienstämme

Eine Auflistung aller in dieser Arbeit genutzten Bakterienstämme liegt in Tabelle 2 vor.

Tabelle 2: Bakterienstämme

Bakterienstamm	Geno- oder Phänotyp	Herkunft/Referenz
<i>Clostridium autoethanogenum</i> DSM 10061	Typstamm	DSMZ*GmbH, Braunschweig
<i>Clostridium carboxidivorans</i> DSM 15243	Typstamm	DSMZ GmbH, Braunschweig
<i>Clostridium kluyveri</i> DSM 555	Typstamm	DSMZ GmbH, Braunschweig Barker und Taha, 1942
<i>Clostridium ljungdahlii</i> DSM 13528	Typstamm	DSMZ GmbH, Braunschweig
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ , lon-11, Δ(<i>ompT-nfrA</i>)885, Δ(<i>galM-ybhJ</i>)884, λDE3 [<i>lacI, lacUV5-T7 gene 1, ind1, sam7, nin5</i>], Δ46, [<i>mal</i> ⁺] _{K-12} (λ ^S), <i>hsdS10</i>	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
<i>Escherichia coli</i> DH5α	F- φ80d <i>lacIqZΔM15</i> Δ(<i>lacZYAargF</i>) U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17(rK-, mK+)</i> <i>phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1</i>	Hanahan, 1983

Tabelle 2: Bakterienstämme (fortgesetzt)

Bakterienstamm	Geno- oder Phänotyp	Herkunft/Referenz
<i>Escherichia coli</i> ER2275	<i>trp-31 his-1 tonA2 rpsL104</i> <i>supE44 xyl-7 mtl-2 metB1</i> <i>e14- (lac)U169 endA1</i> <i>recA1 R(zbgZ10::Tn10)Tcs</i> <i>(mcr-hsdmrr) 114::1510 [F'</i> <i>proAB laqlqZM15zzd::mini</i> <i>Tn10(Km^r)]</i>	Mermelstein und Papoutsakis, 1993
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue MRF ¹	<i>(mrcA)183 (mrcCB-</i> <i>hsdSMR-mrr) 173 endA1</i> <i>supE44 thi-1 recA1gyrA96</i> <i>relA1 [F' proAB laqlqZ</i> <i>M15m Tn10(Tc^r)]</i>	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA

*Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen

2.1.2 Plasmide

In Tabelle 3 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide aufgeführt.

Tabelle 3: Plasmide

Plasmid	Größe [Bp]	Eigenschaften	Herkunft/Referenz
pDrive	3850	Km ^R , Ap ^R , <i>lacZ</i> , pUC-origin	Qiagen GmbH, Hilden
pDrive_CKL2527	4650	pDrive mit Gen <i>crt2</i> aus <i>C. kluyveri</i>	Bielzer, 2013
pDrive_CKL0633	5587	pDrive mit Gen <i>bcd2</i> aus <i>C. kluyveri</i>	Bielzer, 2013

Tabelle 3: Plasmide (fortgesetzt)

Plasmid	Größe [Bp]	Eigenschaften	Herkunft/Referenz
pDrive_CKL3517/CKL3516	5695	pDrive mit Genen <i>etfA2</i> und <i>etfB2</i> aus <i>C. kluyveri</i>	Bielzer, 2013
pDrive_CKL2795	4650	pDrive mit Gen <i>hbd2</i> aus <i>C. kluyveri</i>	Bielzer, 2013
pIMP1	4700	Em ^R (<i>ermC</i>), Ap ^R , pMB1 oriR, pIM13 oriR(+)	Mermelstein <i>et al.</i> , 1992
pIMP_adc_tell_thIA _{pro}	8004	pIMP1 mit Genen <i>adc</i> und <i>thIA</i> aus <i>C. acetobutylicum</i> sowie <i>tell</i> aus <i>B. subtilis</i>	Lederle, 2010
pIMP_adc_ybgC_thIA _{pro}	7693	pIMP1 mit Genen <i>adc</i> und <i>thIA</i> aus <i>C. acetobutylicum</i> sowie <i>ybgC</i> aus <i>H. influenzae</i>	Lederle, 2010
pJIR750_ptb_ack	7874	pJIR750 mit <i>ptb</i> aus <i>C. acetobutylicum</i> und <i>ack</i> aus <i>C. ljungdahlii</i>	Straub, 2012
pMTL82151	5596	Cm ^R , ColE1 ori, pB1ori, <i>traJ</i>	Heap <i>et al.</i> , 2009

Tabelle 3: Plasmide (fortgesetzt)

Plasmid	Größe [Bp]	Eigenschaften	Herkunft/Referenz
pMTL82151_ crt2_ bcd2_ etfA2_ etfB2_ hbd2	10857	pMTL82151 mit den Genen <i>hbd2</i> , <i>etfA2</i> , <i>etfB2</i> und <i>bcd2</i> aus <i>C. kluyveri</i>	Bielzer, 2013
pMW 2	14517	pSB3C5-UUMKS2 ori <i>repL</i> , Em ^R	Wensche, 2012
pMW 2.1	11818	pMW 2 ohne Gen <i>adhE</i> , herausgeschnitten mittels <i>XhoI</i> - und <i>EcoRI</i> -Restriktionsverdau	Bielzer, 2013

2.1.3 Oligodesoxynukleotide

Eine Darstellung aller in dieser Arbeit genutzter Oligodesoxynukleotide ist in Tabelle 4 zu sehen. Die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen sind rot markiert. Die Oligodesoxynukleotide wurden von der Firma biomers.net GmbH (Ulm) synthetisiert.

Tabelle 4: Oligodesoxynukleotide

Benennung	Sequenz (5' → 3')	Enzym
16S-27f	ATAAGCTTGGATCCAGAGTTTGATCC TGGCTCAG	
16S-1492f	ACTCGAGGATATCGGTTACCTTGTTA CGACTT	
CKL_0633_ <i>SmaI</i> _ fwd	ACA CCCGGG GTTGAAAATTATATTTAG	<i>SmaI</i>
CKL_2527_ fwd	GTAAAAGGGAGTCTAGAATGACG TATAAAAC	
CKL_2527_ <i>SmaI</i> _ rev	ACA CCCGGG TACTTAAAGACTG	<i>SmaI</i>
CKL_2795_ <i>StuI</i> _ fwd	ACA AGGCCT AATTCAGGAGGATG	<i>StuI</i>
CKL_2795_ <i>NheI</i> _ rev	ACA GCTAGC TTATATATTCCTTTC	<i>NheI</i>

Tabelle 4: Oligodesoxynukleotide (Fortsetzung)

Benennung	Sequenz (5' → 3')	Enzym
CKL_2795_Stul_fwd_(Neu)	ACAAGGCCTCAGGAGGATGTTATGG	<i>Stul</i>
CKL_2795_NheI_rev_(Neu)	ACAGCTAGCTTATATATTCCT TTCA	<i>NheI</i>
CKL_3517-3516_AatII_fwd	ACAGACGTCGAGAGAAAGGAAAGAAGC	<i>AatII</i>
CKL_3517-3516_Stul_rev	ACAAGGCCTTTAACAATTTATAGTTT CTAAACTG	<i>Stul</i>
M13-FP	TGTA AACGACGGCCAGT	
M13-RP	CAGGAAACAGCTATGACC	
Primer_fwd_Nested_PCR_Promoter	GCGTTGGCCGATTCATTAATGCAG	
Primer_rev_Nested_PCR_Promoter	CTTGACCAGGAGCTTCATGAAC	
Primer_fwd_NheI_Terminator_2	GACCCATGGCTGTTTAGGCTAGCAAA	<i>NheI</i>
Primer_rev_NheI_Terminator_2	TGATTATCTTAAGTAAGCTAGCTAAAA	<i>NheI</i>
Primer_fwd_Test_pMW2.1_in_C.ac	CCAAGTATCCCGAATTTTCTACC	
Primer_pimp1_fwd	TGCGCGTAATTGCTTG	
Primer_pimp1_rev	GCTTGCGTAATGGTC	
Primer_Seq_pMTL82151_(3)	GCCCAGGGTGCATATGAGAAAGC	
Primer_Seq_pMTL82151_(4)	TGTGCCGCTGCTTATTGAG	
Primer_Seq_pMTL82151_(5)	TGCTCCGGTGTACAGTGTGTG	
Primer_Seq_pMTL82151_(6)	AGGCCTAATCAGGAGGATG	
Promoter_SacII_fwd	ACACCGCGGGTACCGCAGGTCG	<i>SacII</i>
Promoter_rev	GTTTTATACGTCATTCTAGACTCCCTTTTAC	
Promoter_SacII_fwd_(Neu)	ACACCGCGGGTACCGCAGGTCGACG	<i>SacII</i>
Seq_Primer_R	CTCACTCAAAGGCGGTAATCAG	

2.2 Materialien

2.2.1 Gase

Die in dieser Arbeit verwendeten Gase und Gasgemische sind in Tabelle 5 aufgelistet. Alle benötigten Gase und Gasgemische, mit Ausnahme von Synthesegas, wurden von der Firma MTI Industriegase AG (Neu-Ulm) bezogen. Synthesegas wurde von der Firma Westfalen AG (Münster) in der angegebenen Zusammensetzung befüllt und bereitgestellt.

Tabelle 5: Verwendete Gase und Gasgemische

Gas	Gaszusammensetzung	Reinheit	Anwendung
Formiergas	95,0 % N ₂	3,0	Atmosphäre der
	5,0 % H ₂	3,0	Anaerobenkammer
CO	100 % CO	3,0	Gasphase eines Wachstumsversuches mit <i>C. kluyveri</i>
N ₂	100 % N ₂	5,0	Herstellung von anaerobem Wasser und Gaschromatographie (Trägergas)
N ₂ /CO ₂	80,0 % N ₂	5,0	Gasphase für
	20,0 % CO ₂	3,0	anaerobes Medium

Tabelle 5: Verwendete Gase und Gasgemische (fortgesetzt)

Gas	Gaszusammensetzung	Reinheit	Anwendung
Synthesegas (Syngas)	40,0 % CO 40,0 % H ₂ 10,0 % CO ₂ 10,0 % N ₂		Gasphase in autotrophen Wachstumsversuchen
synthetische Luft	20,5 % O ₂ 79,5 % N ₂	5,0 5,0	Gaschromatographie (Detektorgas)
H ₂	100 % H ₂	5,0	Gaschromatographie (Detektorgas und Trägergas)

2.3 Zellanzucht

2.3.1 Nährmedien

2.3.1.1 Nährmedien für die Kultivierung von *E. coli*

Die Anzucht von *E. coli* als Vorkultur für Wachstums- und Transformationsversuche sowie für Klonierungen erfolgte in LB-Medium. Im Falle von *E. coli*-Wachstumsversuchen zur Überprüfung einer möglichen Butyratproduktion wurde zur Anzucht TY- und SD-8-Medium verwendet. Für die Erstellung kaltkompetenter *E. coli*-Zellen wurde das SOB-Medium genutzt. Die einzelnen Bestandteile der Nährmedien wurden mittels Feinwaagen abgewogen und mit Wasser aus der Reinstwasseranlage der Universität Ulm gelöst. Festes Nährmedium wurde durch Zugabe von 1,5 % (w/v) Agar erstellt. Die Nährmedien wurden für 15-20 min bei einer Temperatur von 121 °C und einem Druck von 1,2 bar autoklaviert. Hitzeempfindliche Substanzen wie z.B. Antibiotika wurden nach dem Abkühlen des Mediums auf ca. 50 °C zugegeben.

LB („lysogeny broth“) Medium (Bertani, 1951)

Trypton	10	g	1,0	% (w/v)
NaCl	10	g	171,1	mM
Hefeextrakt	5	g	0,5	% (w/v)
H ₂ O	<i>ad</i> 1000 ml			

SOB-Medium (Green und Sambrook, 2012)

Trypton	20	g	2	%
Hefeextrakt	5	g	0,5	% (w/v)
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	2,44	g	9,9	mM
KCl	1,92	g	25,8	mM
NaCl	0,56	g	9,6	mM
	<i>ad</i> 1000 ml			

Das Magnesiumsalz wurde getrennt autoklaviert und danach den restlichen Bestandteilen zugeführt.

TY-Medium (Green und Sambrook, 2012)

Trypton	16	g	1,6	% (w/v)
Hefeextrakt	10	g	1	% (w/v)
NaCl	5	g	86	mM
H ₂ O	<i>ad</i> 1000 ml			

SD-8-Medium (Luli und Strohl, 1990)

NH ₄ Cl	7	g	131,6	mM
KH ₂ PO ₄	7,5	g	55,2	mM
Na ₂ HPO ₄ × H ₂ O	7,5	g	42,2	mM

K ₂ SO ₄	0,85 g	4,9	mM
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	0,17 g	0,7	mM
Spurenelementlösung	0,8 ml	0,08	% (v/v)
Hefeextrakt	10 g	1	% (w/v)
D-(+)-Glucose × H ₂ O	20 g	101	mM
H ₂ O	ad 1000 ml		

Der pH-Wert wurde mit 5 M Ammoniumhydroxid auf 7,0 eingestellt.

Es wurde eine 50 %-ige Glucosestammlösung erstellt, welche kurz vor Gebrauch den restlichen Bestandteilen durch Sterilfiltration zugegeben wurde.

Zusammensetzung der Spurenelementlösung für das SD-8-Medium

FeSO ₄ × 7 H ₂ O	4 g	14,4	mM
MnSO ₄ × H ₂ O	1 g	5,9	mM
Al ₂ (SO ₄) ₃ × 12 H ₂ O	5,5 g	8,3	mM
CoCl ₂ × 6 H ₂ O	0,4 g	1,7	mM
ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	0,2 g	0,7	mM
Na ₂ MoO ₄ × 2 H ₂ O	0,2 g	0,8	mM
CuCl ₂ × 2 H ₂ O	0,1 g	0,6	mM
Borsäure	0,05 g	0,8	mM
5 M HCl	ad 100 ml		

2.3.1.2 Nährmedien für die Kultivierung von *C. autoethanogenum*, *C. carboxidivorans*, *C. kluyveri* und *C. ljungdahlii*

Vorkulturen von *C. kluyveri* wurden in ATCC Medium 1120 oder Tanner-Medium „modified“ 2 angezogen. Tanner-Medium „modified“ wurde für die Kultivierung von *C. autoethanogenum*, *C. carboxidivorans*, *C. ljungdahlii* und für alle autotrophen Wachstumsversuche bzw. Cofermentationen verwendet. Die einzelnen Bestandteile der Nährmedien wurden mittels Feinwaage abgewogen und mit Wasser aus der

Reinstwasseranlage der Universität Ulm gelöst. Das Flüssigmedium wurde in spezielle Kulturflaschen aliquotiert und anschließend gasdicht verschlossen (siehe Kultivierung anaerober Bakterien 2.5.2). Unter Zuhilfenahme einer Kanüle wurde ein Vakuum angelegt und gleich darauf die Kulturflaschen mit N₂/CO₂ befüllt. Dieser Schritt wurde insgesamt siebenmal durchgeführt und mit einer letztmaligen Befüllung mit N₂/CO₂ beendet. Darauffolgend wurden sterile Bedingungen durch das Autoklavieren der Medien für 15 min bei 121 °C und bei 1,2 bar Druck erzeugt. Im Falle von autotrophen Wachstumsversuchen wurde nach dem Autoklavieren wiederum mittels Kanüle die Gasphase von N₂/CO₂ auf Synthesegas gewechselt.

Alle für diese Medien benötigten Vitamin-, Mineral- und Spurenelementlösungen wurden in 50-ml-Schraubdeckelröhrchen aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Bei Bedarf wurden diese aufgetaut und bei 2-8 °C im Kühlschrank gelagert. Um anaerobes Wasser herzustellen, wurde Wasser aus der Reinstwasseranlage der Universität Ulm für mindestens 20 min gekocht und dann unter gleichzeitiger Begasung mit N₂ auf Eis gekühlt.

ATCC Medium 1120 für *C. kluyveri* (Barker und Taha, 1942)

Lösung A

Hefeextrakt	2,0 g	0,2 % (w/v)
Natriumacetat × 3 H ₂ O	7,5 g	91,4 mM
K ₃ PO ₄ -Puffer (2 M; pH 7,0)	10,0 ml	1 % (v/v)
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,63 g	19,9 mM
Natriumthioglycolat	0,5 g	4,3 mM
Salzlösung	10,0 ml	1 % (v/v)
p-Aminobenzoesäure	100,0 µg	0,72 µM
Biotin	5,0 µg	0,02 µM
Resazurin (0,025 %)	4 ml	0,4 % (v/v)
Agar	2,0 g	0,2 % (w/v)
H ₂ O	ad 965 ml	

Lösung B

Ethanol (sterilfiltriert)	15,0 ml	1,5 % (v/v)
K ₂ CO ₃ (1 M; sterilfiltriert)	20,0 ml	2,0 % (v/v)

Lösung A wurde angesetzt und dann bei 121 °C autoklaviert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde Lösung B zugegeben und der pH mit HCl auf 7,0 eingestellt.

Zusammensetzung der Salzlösung für das ATCC Medium 1120

MgSO ₄	2,5 g	208 mM
CaCl ₂	0,15 g	13,5 mM
FeSO ₄ × 2 H ₂ O	0,15 g	8,0 mM
Na ₂ MoO ₄ × 2 H ₂ O	0,02 g	0,8 mM
MnSO ₄ × 2 H ₂ O	0,02 g	1,1 mM
H ₂ O	ad 100 ml	

Tanner-Medium "modified" für *C. autoethanogenum*, *C. carboxidivorans* und *C. ljungdahlii* (Tanner, 2007)

MES	20,0 g	102,0 mM
Hefeextrakt	0,5 g	0,05 % (w/v)
Minerallösung	25,0 ml	2,5 % (v/v)
Spurenelementlösung	10,0 ml	1,0 % (v/v)
Vitaminlösung	10,0 ml	1,0 % (v/v)
Resazurin (Stammlösung 1 g/L)	1,0 ml	0,1 % (v/v)
L-Cystein-HCl × H ₂ O	1,0 g	5,7 mM
H ₂ O	ad 1000 ml	

Alle Substanzen wurden zusammengegeben und der pH-Wert mit NaOH auf 6,1 eingestellt. Für heterotrophes Wachstum wurde Fructose aus einer anaeroben und sterilen Stammlösung (1,11 M) nach dem Autoklavieren hinzugeben.

Minerallösung des Tanner-Medium „modified“

NaCl	80	g	1,4	M
NH ₄ Cl	100	g	1,9	M
KCl	10	g	134,1	mM
KH ₂ PO ₄	10	g	73,5	mM
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	20	g	81,1	mM
CaCl ₂ × 2 H ₂ O	2	g	27,2	mM
H ₂ O	<i>ad</i> 1000 ml			

Vitaminlösung des Tanner-Medium „modified“

Pyridoxin-HCl	10	mg	48,6	μM
Thiamin-HCl	5	mg	14,8	μM
Riboflavin	5	mg	13,3	μM
Calcium Pantothenat	5	mg	21,0	μM
Liponsäure	5	mg	24,2	μM
p-Aminobenzoessäure	5	mg	36,4	μM
Nikotinsäure	5	mg	40,6	μM
Vitamin B ₁₂	5	mg	3,7	μM
Biotin	2	mg	8,2	μM
Folsäure	2	mg	4,5	μM
2-Mercaptoethansulfonat	2	mg	12,2	μM
H ₂ O	<i>ad</i> 1000 ml			

Spurenelementlösung des Tanner-Medium „modified“

Nitrilotriessigsäure	2	g	10,5 mM
MnSO ₄ × H ₂ O	1	g	5,9 mM
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ × 6 H ₂ O	0,8	g	2,0 mM
CoCl ₂	0,2	g	1,5 mM
ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	1	µg	3,5 µM
CuCl ₂ × 2 H ₂ O	0,02	g	117,0 µM
NiCl ₂ × 6 H ₂ O	0,02	g	84,1 µM
Na ₂ MoO ₄ × 2 H ₂ O	0,02	g	82,7 µM
Na ₂ SeO ₃ × 5 H ₂ O	0,02	g	76,0 µM
Na ₂ WO ₄ × 2 H ₂ O	0,02	g	60,6 µM
H ₂ O	ad 1000 ml		

Es wurden Stammlösungen der Mineral-, Vitamin- und Spurenelementlösung hergestellt, welche aliquotiert und dann bei -20 °C bis zum Bedarf gelagert wurden.

Tanner-Medium „modified“ 2 für *C. kluyveri* (diese Arbeit)

Die Zusammensetzung und Herstellung des Tanner-Medium „modified“ 2 war bis inklusive des Schrittes des Autoklavierens identisch zu der von Tanner-Medium „modified“ (siehe zuvor).

Der Grund für die Bezeichnung Tanner-Medium „modified“ 2 ist, dass vor Inokulation mit *C. kluyveri* noch die entsprechenden Substrate für dessen Wachstum zugegeben wurden und es so zu einer weiteren Modifikation des Mediums kam. Zum einen wurde dem Medium Ethanol (Ethanol absolut) je nach benötigter Konzentration hinzugegeben. Konzentrationen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, waren 500 mM, 250 mM, 100 mM, 50 mM, 25 mM und 15 mM. Zum anderen wurde Kaliumacetat (1 M Stammlösung) als Substrat für *C. kluyveri* dem Medium hinzugegeben. In dieser Arbeit verwendete Konzentrationen waren 100 mM, 70 mM, 50 mM, 40 mM, 20 mM und 10 mM.

Ausgehend von acetogenen Kulturen präpariertes Medium für ein Wachstum von *C. kluyveri*, genutzt in den separaten biphasischen Fermentationskulturen (diese Arbeit)

Für die Versuche der separaten biphasischen Fermentationen wurden zunächst *C. carboxidivorans* und *C. ljungdahlii* in jeweils 100 ml Tanner-Medium „modified“ (siehe zuvor) kultiviert. Nach ausreichender Kultivierungsdauer (Zeit für die Produktion von Ethanol und Acetat) wurden die Kulturen in eine Anaerobenkammer (Gasatmosphäre bestehend aus Formiergas) überführt und erst dort geöffnet. Daraufhin wurden die Kulturen in 50 ml Schraubdeckelröhrchen (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) überführt und bei 7700 x g für 30 min zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde mittels einer Spritze abgenommen, wiederum in ein Schraubdeckelröhrchen überführt und nochmal bei identischen Einstellungen zentrifugiert. Der Überstand dieser Zentrifugation wurde dann in bereits zuvor autoklavierte Messzylinder sterilfiltriert (Porengröße 0,2 µm; Sarstedt AG & Co., Nümbrecht). Es wurden Mengen von ca. 70 ml Kulturüberstand gewonnen. Zu Beginn des Wachstums der acetogenen Organismen waren zwar jeweils 100 ml Medium in den Kulturflaschen vorhanden, jedoch ging ein Teil durch die mehrmalige Probennahme (3 ml je Messpunkt) während des Wachstums und durch die Präparation verloren. Zur weiteren Aufbereitung wurden 4,8 ml einer Supplementlösung (siehe unten) hinzugegeben. Ziel war es, hierbei in 100 ml präpariertem Medium dieselben Konzentrationen zu erzielen, wie in der entsprechenden Menge Tanner-Medium „modified“. Um das gewünschte Volumen zu erreichen, wurde mit anaeroben Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Zuvor wurde noch der pH-Wert mit 5 M NaOH auf ca. 6,8 eingestellt. Das präparierte Medium wurde in sterile Kulturflaschen überführt und innerhalb der Anaerobenkammer gasdicht verschlossen. Danach wurde das sich in den Flaschen befindliche Formiergas mittels Kanüle und dem Anlegen von Vakuum sowie anschließender Begasung mit N₂/CO₂ ausgetauscht. Dieser Schritt wurde siebenmal durchgeführt. Danach war die Präparation abgeschlossen und die Flaschen wurden bis zur Inokulation mit *C. kluyveri* bei 2-8 °C gelagert.

Supplementlösung der separaten biphasischen Fermentation (diese Arbeit)

Minerallösung des Tanner-Medium „modified“	50	ml	52	% (v/v)
--	----	----	----	---------

Vitaminlösung des Tanner-Medium „modified“	20	ml	21	% (v/v)
Spurenelementlösung des Tanner-Medium „modified“	20	ml	21	% (v/v)
Cystein-HCl-Lösung (Stammlösung 50 g/l)	4	ml	4,2	% (v/v)
Hefeextraktlösung (Stammlösung 50 g/l)	2	ml	2,1	% (v/v)
Resazurin (Stammlösung 1 g/l)	0,1	ml	0,1	% (v/v)

Die Supplementlösung wurde autoklaviert und bis zum Gebrauch bei 2-8 °C gelagert. In jeden der zu präparierenden Ansätze wurden 4,8 ml der Supplementlösung hinzugegeben.

2.3.2 Medienzusätze

Alle genutzten Antibiotika mit ihren jeweiligen Lösungsmitteln sind in Tabelle 6 dargestellt. Ebenfalls aufgeführt sind die entsprechenden Stamm- und Arbeitskonzentrationen. Die gelösten Antibiotika wurden sterilfiltriert und bei -20 °C nach Aliquotierung gelagert. Für die Zugabe von Antibiotika in Festmedien wurden diese nach dem Autoklavieren erst auf ca. 50 °C abgekühlt.

Tabelle 6: Antibiotika

Antibiotikum	Lösungsmittel	Stamm- konzentration [mg/ml]	Arbeitskonzentration [µg/ml]	Hersteller
Ampicillin	H ₂ O	100	100	
Chloramphenicol	Ethanol absolut	30	30	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Erythromycin	Ethanol absolut	100	100	
Kanamycinsulfat	H ₂ O	50	50	

Die Medienzusätze IPTG und X-Gal für die Durchführung der Blau-Weiß- Selektion (2.8.5) sind in Tabelle 7 mit ihren Stamm- und Arbeitskonzentrationen aufgelistet. Vor dem Ausplattieren von rekombinanten Stämmen wurden 20 µl der IPTG-Stammlösung und 40 µl der X-Gal Stammlösung auf ausgehärteten Agarplatten ausplattiert. Anschließend

wurden die Platten für 60 min bei 37 °C inkubiert, um die verwendeten Lösungsmittel durch Verdampfung zu entfernen. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit von X-Gal wurde dessen Stammlösung im Dunklen gelagert. Die Lagerung beider Stammlösungen erfolgte bei -20°C.

Tabelle 7: Zusätze der Blau-Weiß-Selektion

Substanz	Lösungsmittel	Stamm- konzentration [ng/ml]	Arbeitskonzentration [µg/ml]	Hersteller
IPTG	Ethanol absolut	30	24	Carl-Roth
X-Gal	Dimethylformamid	20	40	GmbH & Co. KG, Karlsruhe

2.4 Stammhaltung

Zur Stammhaltung wurden von rekombinanten *E. coli*-Kulturen 500 µl einer 5-ml-Übernachtskultur zu 500 µl sterilem Glycerin in einem Schraubdeckelröhrchen hinzugegeben, gemischt und bei -80 °C gelagert.

2.5 Kultivierungsbedingungen

2.5.1 Kultivierung von *E. coli*

Die Anzucht von *E. coli*-Kulturen erfolgte in 5 ml LB-Medium und wurde in Reagenzgläsern durchgeführt. Im Falle größerer Volumina wurden Erlenmeyerkolben mit Schikanen verwendet. Die Kultivierung der *E. coli*-Kulturen erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37 °C auf einem Rundschtüttler (New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen) bei 120-200 Upm. Agarplatten wurden in einem Brutschrank (Heraeus Holding GmbH, Hanau) ebenfalls bei 37 °C inkubiert.

Zur Herstellung kaltkompetenter Zellen wurden die *E. coli*-Kulturen in einem Erlenmeyerkolben mit Schikanen in SOB-Medium angezüchtet. Auf die genauere Durchführung der Herstellung kaltkompetenter Zellen wird unter Punkt 2.8.1 eingegangen.

2.5.2 Kultivierung anaerober Bakterien

2.5.2.1 Kultivierung von *C. autoethanogenum*, *C. carboxidivorans* und *C. ljungdahlii*

C. autoethanogenum, *C. carboxidivorans* und *C. ljungdahlii* wurden ausgehend von einem Lyophilisat in 5 ml Tanner-Medium „modified“ mit zusätzlich 40 mM Fructose in Hungate-Röhrchen (Bellco Glass Inc., Vineland, NJ, USA), verschlossen mit Butylstopfen (Ochs GmbH, Bovenden) und Plastiksraubdeckeln, angezogen. Die Gasphase in den Hungate-Röhrchen bestand hierbei aus N₂/CO₂. Die weitere Kultivierung und Anpassung der Organismen an autotrophe Bedingungen erfolgte in 50 ml Medium in 500-ml-Müller-Krempel-Flaschen (Müller & Krempel AG, Bülach, Schweiz) mit Synthesegas als Gasphase. Die Flaschen wurden zuvor mit Naturgummistopfen (Maag Technic GmbH, Göppingen) und Edelstahlschraubdeckeln verschlossen. Die Organismen wurden nach jeweils einwöchiger Inkubation in frisches Medium mit frischem Synthesegas überführt. Dieser Schritt wurde mindestens zweimal wiederholt, um eine ausreichende Adaption der Organismen an autotrophe Bedingungen zu gewährleisten. Alle Kulturen von *C. autoethanogenum*, *C. carboxidivorans* und *C. ljungdahlii* wurden bei 37 °C inkubiert.

2.5.2.2 Kultivierung von *C. kluyveri*

C. kluyveri wurde ausgehend von einem Lyophilisat in 50 ml Tanner-Medium „modified“ 2 in einer 125-ml-Müller-Krempel-Flasche mit Naturgummistopfen und Edelstahlschraubverschluss angezogen. Als Gasphase wurde in Reinkulturen stets N₂/CO₂ genutzt. Die Inkubation wurde bei 37 °C durchgeführt.

2.5.2.3 Methodik der simultanen Cofermentationen

Für die Wachstumsversuche der simultanen Cofermentation wurden 1000-ml-Müller-Krempel-Flaschen benutzt, welche 100 ml Tanner-Medium „modified“ enthielten und deren Gasphase aus Synthesegas bestand. Begonnen wurde die Fermentation durch Inokulieren mit *C. kluyveri* und einem der acetogenen Stämme zum gleichen Zeitpunkt (simultan) in einem Volumenverhältnis von 1:1. Im Detail wurden hierfür von beiden Stämmen jeweils 2 ml von den weiter oben (2.5.2.1; 2.5.2.2) beschriebenen Reinkulturen genutzt, welche sich in der stationären Wachstumsphase befanden. Die Inokulation

erfolgte nicht wie sonst üblich auf einen gewünschte OD_{600nm} -Wert, da die acetogenen Vorkulturen nur verhältnismäßig geringe OD_{600nm} -Werte (ca. 0,8-1,2) erreichten.

Die simultane Cofermentation wurde unter nicht schüttelnden Bedingungen durchgeführt, um zu vermeiden, dass Kohlenmonoxid, welches Bestandteil des Synthesegases ist, in das Medium vermehrt diffundiert. Die Inkubationstemperatur der simultanen Cofermentation lag bei 37 °C. Nach einer Inkubationsdauer von drei Tagen wurde die bestehende Gasphase mit frischem Synthesegas über die Verwendung von Kanülen ausgetauscht. Ab diesem Zeitpunkt wurde dann weiterhin alle sieben Tage das Synthesegas aufgefüllt.

2.5.2.4 Methodik der sequentiellen Cofermentationen mit einem Wechsel der Gasphase während der Kultivierung

Ähnlich der simultanen Cofermentation wurden 1000-ml-Müller-Krempel-Flaschen benutzt, welche 100 ml Tanner-Medium „modified“ enthielten und deren Gasphase aus Synthesegas bestand. Hauptunterschied war, dass in diesem Versuch erst mit dem acetogenen Stamm inokuliert wurde und dann zu einem späteren Zeitpunkt (sequentiell) nach 1-2 Wochen Kultivierung mit *C. kluyveri*. Die Inokulationsvolumina waren wieder im Verhältnis 1:1 gewählt worden und bestanden aus 2 ml der jeweils stationären Cofermentationsvorkulturen. Der Zeitraum von 1-2 Wochen vor Inokulation mit *C. kluyveri* sollte den acetogenen Stämmen genügend Zeit geben, um die für *C. kluyveri* benötigten Substrate Ethanol und Acetat zu bilden. Das Synthesegas wurde einmal nach drei Tagen Inkubation und dann noch einmal nach sieben weiteren Tagen aufgefüllt. Nach diesem Zeitraum wurden die sequentiellen Cofermentationen in zwei Varianten unterschieden. In der hier beschriebenen Variante wurden zum Zeitpunkt der Inokulation mit *C. kluyveri* mittels Zuhilfenahme von an eine Vakuumpumpe angeschlossenen Kanülen ein Vakuum angelegt und gleich darauf die Kulturflaschen mit N_2/CO_2 befüllt (sequentielle Cofermentation mit Wechsel der Gasphase). Dieser Schritt wurde insgesamt siebenmal durchgeführt und mit einer letztmaligen Befüllung mit N_2/CO_2 beendet. Hintergrund dieses Schrittes war es, *C. kluyveri* optimale Bedingungen zu bieten, indem vor allem das toxische Kohlenmonoxid des Synthesegases entfernt wurde. Die Inkubationstemperatur lag bei 37 °C über den ganzen Zeitraum der Cofermentation.

2.5.2.5 Methodik der sequentiellen Cofermentationen ohne Wechsel der Gasphase während der Kultivierung

Im Rahmen der sequentiellen Cofermentation wurde eine zweite Variante der Methodik durchgeführt. Die Durchführung dieses Versuches war identisch zu dem in 2.5.2.4 beschriebenen bis einschließlich der Inokulation der Fermentationskulturen mit *C. kluyveri*. Charakteristikum dieser Variante war, dass nach Inokulation mit *C. kluyveri* nicht die Gasphase auf N₂/CO₂ gewechselt, sondern weiterhin Synthesegas als Gasphase beibehalten (sequentielle Cofermentation ohne Wechsel der Gasphase) wurde. Das Synthesegas wurde erstmals drei Tage nach Inokulation aufgefüllt und dann wiederum bis zum Ende der Fermentation in einem siebentägigen Zyklus. Inkubationstemperatur war wie bei den vorangegangenen Cofermentationen 37 °C unter nicht schüttelnden Bedingungen.

2.5.2.6 Methodik der separaten biphasischen Fermentationen

Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Cofermentationen wurde in diesem Falle eine Fermentation durchgeführt, in der beide Stämme zeitlich und räumlich getrennt, aber aufeinander aufbauend kultiviert wurden (separate biphasische Fermentation). Ziel dieser Versuche war es, ausgehend von acetogenen Kulturen, welche im Laufe ihrer Kultivierung Ethanol und Acetat produzieren, ein Medium zu präparieren, welches dann für das Wachstum von *C. kluyveri* genutzt werden sollte. Hierfür wurden 1000-ml-Müller-Krempel-Flaschen, welche 100 ml Tanner-Medium „modified“ enthielten und deren Gasphase aus Synthesegas bestanden, mit jeweils *C. carboxidivorans* und *C. ljungdahlii* inokuliert. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und bei 140 Upm auf einem Rundtischschüttler (Infors AG, Bottmingen, Schweiz), um eine optimale Verwertung des Synthesegases zu erreichen. Das Synthesegas wurde drei Tage nach Inokulation und dann wiederum im siebentägigen Zyklus aufgefüllt. Nach Beendigung der Kultivierung wurde aus diesen acetogenen Kulturen das Nährmedium für *C. kluyveri* präpariert, wie es in 2.3.1.2 (ausgehend von acetogenen Kulturen präpariertes Medium für ein Wachstum von *C. kluyveri*) beschrieben ist. Diese präparierten Medien wurden mit 1 ml einer stationären *C. kluyveri*-Kultur inokuliert und bei 37 °C unter nicht schüttelnden Bedingungen inkubiert.

2.5.2.7 Untersuchung des Einflusses verschiedener Substratkonzentrationen auf das Wachstum und das Produktspektrum von *C. kluyveri*

In den durchgeführten Fermentationen wurden ausgehend von den acetogenen Stämmen unterschiedliche Substratmengen für *C. kluyveri* gebildet und konsequenterweise auch ausgehend von den zur Verfügung stehenden Substratmengen unterschiedliche Produktmengen durch *C. kluyveri*. Um nun eine Vorstellung zu bekommen, welche Produktmengen überhaupt, ausgehend von bestimmten Substratkonzentrationen, zu erwarten waren, wurde *C. kluyveri* auf verschiedenen Substratmengen kultiviert. Die Substratkonzentrationen orientierten sich an Ethanol- und Acetatkonzentrationen, welche in den verschiedenen Fermentationen zu gewählten Zeitpunkten erzielt wurden. Die entsprechenden Konzentrationen an Ethanol und Acetat wurden dem Tanner-Medium „modified“ hinzugegeben und dieses mit 1 ml einer stationären Kultur von *C. kluyveri* inokuliert. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C in 125-ml-Müller-Krempel-Flaschen mit 50 ml Tanner-Medium „modified“ unter nicht schüttelnden Bedingungen.

2.5.2.8 Untersuchung des Einflusses von Kohlenmonoxid auf das Wachstum und den Stoffwechsel von *C. kluyveri*

Um den Einfluss von Kohlenmonoxid auf das Wachstum von *C. kluyveri* zu untersuchen, wurden Kultivierungen mit verschiedenen Gasphasen durchgeführt. Verglichen wurde das Wachstum von *C. kluyveri* mit Kohlenmonoxid, Synthesegas und N₂/CO₂ als Gasphase. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C in 125-ml-Müller-Krempel-Flaschen mit 50 ml Tanner-Medium „modified“ unter nicht schüttelnden Bedingungen.

2.5.2.9 Untersuchung der Fähigkeit von *C. carboxidivorans* und *C. ljungdahlii* zur Umwandlung von Butyrat und Capronat in die entsprechenden Alkohole

Im Rahmen von Cofermentationen war es notwendig zu untersuchen, inwiefern *C. carboxidivorans* und *C. ljungdahlii* das entstehende Butyrat und Capronat weiter verstoffwechseln und es somit zu Auswirkungen auf die Produktmengen kommt. Es wurden 500-ml-Müller-Krempel-Flaschen mit 50 ml Tanner-Medium „modified“ und Synthesegas als Gasphase verwendet. Es wurden bestimmte Mengen Butyrat und

Capronat dem Medium beigefügt, und die Kulturen bei 37 °C unter nicht schüttelnden Bedingungen inkubiert.

2.5.2.10 Untersuchung des Einflusses des pH-Wertes auf das Wachstum und das Produktspektrum bei Kultivierung von *C. kluyveri*

Um den Einfluss des pH-Wertes auf das Wachstum von *C. kluyveri* zu untersuchen, wurden Kultivierungen unter Verwendung verschiedener pH-Werte durchgeführt. Die Versuche wurden in 125-ml-Müller-Krempel-Flaschen mit 50 ml Tanner-Medium „modified“ 2 durchgeführt, in welchen pH-Werte von 5-8 eingestellt wurden. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C unter nicht schüttelnden Bedingungen.

2.5.2.11 Untersuchung der Auswirkung der Übertragung von Ethanol und Acetat aus Vorkulturen von *C. kluyveri* bei Inokulation neuer Kulturen

Zur Untersuchung der Übertragung von Substraten aus Vorkulturen wurde *C. kluyveri* in 125-ml-Müller-Krempel-Flaschen, welche 50 ml Tanner-Medium „modified“ (keine Zugabe von Ethanol und Acetat) enthielten, mit N₂/CO₂ als Gasphase kultiviert. Zielsetzung war es zu untersuchen, welche Produktmengen allein aus den von Vorkulturen eingebrachten (übertragenden) Substratmengen gebildet werden können.

2.6 Bestimmung von Wachstums- und Stoffwechsellparameter

In allen in dieser Arbeit durchgeführten Wachstumsversuchen wurden zur Bestimmung von Wachstums- und Stoffwechsellparametern zu den jeweiligen Zeitpunkten 3 ml Kultur entnommen, wovon 1 ml der Bestimmung der optischen Dichte sowie des pH-Wertes diente und die restlichen 2 ml für die gaschromatographischen Analysen verwendet wurden.

2.6.1 Bestimmung der optischen Dichte

Um den Verlauf eines bakteriellen Wachstums zu dokumentieren, wurde mittels eines Spektralphotometers („Ultraspec™ 3100 pro“, Amersham Bioscience Europe GmbH, Freiburg) bei einer Wellenlänge von 600 nm und mittels Einmalküvetten (VWR International GmbH, Darmstadt) mit einer Schichtdicke von 1 cm die optische Dichte

(OD_{600nm}) bestimmt. Hierfür wurde den Bakterienkulturen jeweils ein Volumen von 1 ml entnommen (Probenmaterial auch verwendet zur Bestimmung des pH-Wertes; siehe 2.6.2). Zur Sicherstellung der Linearität zwischen Extinktion und Zellzahl wurden die Kulturen ab OD_{600nm} -Werten von 0,4 entsprechend mit Medium verdünnt. Als Referenzwert (Leerwert) diente nicht beimpftes Medium des gleichen Mediumansatzes. Im Falle des Wachstums von *C. kluyveri* in ausgehend von acetogenen Kulturen selbst präpariertem Medium wurde gegen eine frei gelassene Position der Photometerküvettenhalterung (sogenannte „Messung gegen Luft“) als Referenz gemessen.

2.6.2 Messung des pH-Wertes

Zur Bestimmung des pH-Wertes von Kulturüberständen wurden während der Wachstumsversuche den Bakterienkulturen jeweils 1 ml entnommen und in Eppendorfgefäße (Eppendorf AG, Hamburg) überführt. Der pH-Wert wurde mittels eines pH-Meters (WTW, Weilheim) und einer daran angebrachten Kapillarelektrode (VWR International GmbH, Darmstadt) gemessen.

2.6.3 Bestimmung der Stoffwechselfparameter mittels Gaschromatographie

Um in den in dieser Arbeit durchgeführten Wachstumsversuchen die Stoffwechselfparameter zu bestimmen, wurden jeweils 2 ml Probe aus Bakterienkulturen entnommen und in Eppendorfgefäße überführt. Diese Proben wurden bei 17000 x g für mindestens 30 min zentrifugiert und anschließend bis zur Analyse bei -20 °C gelagert. Die Analyse der Substrate bzw. Produkte erfolgte in dieser Arbeit stets durch Gaschromatographie (GC), aber mittels zweier verschiedener Analysegeräte und deren dazugehörige Parameter, welche im Folgenden aufgeführt sind.

2.6.3.1 Gaschromatographie mit gepackter Säule

Im Rahmen des Wachstumsversuches zur Überprüfung der Funktionalität des Plasmids pMW 2.1 wurde der Gaschromatograph Clarus 600 (PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau) ausgestattet mit einer gepackten Säule (siehe unten) verwendet. Überstände von Wachstumsversuchsproben wurden nach dem Auftauen in 2-ml-Rollrandflaschen (CS-

Chromatographie Service GmbH, Langerwehe) transferiert und mittels Aluminiumkappen (CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe) verschlossen.

Zur Verifikation der korrekten Analyse wurde als interner Standard eine Isopropanollösung (110 mM in 2 M HCL) verwendet und jeder Probe beigemischt (100 µl in 1 ml Probe). Die Kalibrierung erfolgte mittels Standards, welche die zu quantifizierenden Analyten in einer Konzentration von 5 mM sowie den internen Standard enthielten. Analysiert wurden die Konzentrationen von Buttersäure und Aceton bei Wachstumsversuchen mit *E. coli*.

Die genauen Parameter dieser GC-Analyse sind im Folgenden aufgeführt:

Säule:	Metall, gepackt (ID 2 mm x 2,000 mm)
Säulenmaterial:	Poropak P (80/100 mesh)
Trärgas:	N ₂ (27,9 ml/min)
Injektortemperatur:	200 °C
Injektionsvolumen:	1 µl
Detektortemperatur:	300 °C
Detektor:	Flammenionisationsdetektor (FID)
Detektorgase:	H ₂ (45 ml/min) synthetische Luft (450 ml/min)
Temperaturprofil:	130 °C 130 °C bis 140 °C bei 5 °C/min 140 °C für 12 min
Datenprozessierung:	TotalChrom Version 6.3.1 PerkinElmer, LAS GmbH, Rodgau

2.6.3.2 Gaschromatographie mit Kapillarsäule

Alle Wachstumsversuche, außer des in 2.6.3.1 genannten, wurden mittels des Gaschromatographen Clarus 680 (PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau) ausgestattet mit einer Kapillarsäule (siehe unten) analysiert. Wie bereits oben genannt, wurden auch hier die Überstände von Wachstumsversuchsproben nach dem Auftauen in 2-ml-Rollrandflaschen

transferiert und dann mittels Aluminiumkappen verschlossen. Die Quantifizierung der Stoffwechselprodukte erfolgte durch die Erstellung einer Kalibriergeraden für jeden einzelnen Analyten mittels einer Standardreihe. Für die Gewährleistung einer linearen Korrelation zwischen Konzentration und Detektorsignal bei der Analyse organischer Säuren wurden sowohl die zu analysierenden Kulturüberstände als auch die Standards mit 2 M HCL angesäuert (10 µl in 1 ml Probe). Bestimmt wurden mittels dieser Methodik die Alkansäuren Essigsäure (Acetat), Buttersäure (Butyrat) und Hexansäure (Trivialname Capronsäure; Capronat) sowie die Alkohole Ethanol, 1-Butanol und 1-Hexanol.

Die genauen Parameter dieser GC-Analyse sind im Folgenden aufgeführt:

Säule:	Elite-FFAP (30 m x 0,32 mm; 0,25 µm)
Säulenmaterial:	mit 2-Nitroterephthalsäure modifiziertes Polyethylenglycol
Trägergas:	H ₂ (2,25 ml/min)
Split:	1:20
Injektortemperatur:	225 °C
Injektionsvolumen:	1 µl
Detektortemperatur:	300 °C
Detektor:	FID
Detektorgase:	H ₂ (45 ml/min) Synthetische Luft (450 ml/min)
Temperaturprofil:	90 °C für 2 min 40 °C/min bis 250 °C 250 °C für 1 min
Datenprozessierung:	TotalChrom Version 6.3.2 PerkinElmer, LAS GmbH, Rodgau

2.7 Arbeiten mit Nukleinsäuren

Die Sterilisation von Arbeitsmaterialien und die dabei stattfindende Inaktivierung von Nukleasen erfolgte durch 20-minütiges Autoklavieren bei 121 °C und 1,2 bar. Alle hitzelablen Substanzen (wie z.B. Antibiotika) wurden sterilfiltriert. Arbeitsflächen sowie Geräte wurden mit 80 % (v/v) Ethanol gereinigt und desinfiziert. Für die Inokulation genutzte Impfösen wurden mittels längerem „Ausglühen“ in der Bunsenbrennerflamme sterilisiert.

2.7.1 Isolierung von genomischer DNA aus Gram-positiven Bakterien

Die Isolierung genomischer DNA aus *C. autoethanogenum*, *C. carboxidivorans*, *C. kluyveri* und *C. ljungdahlii* wurde mittels des „MasterPure™ Gram Positive DNA Purification Kit“ (Epicentre, Madison WI, USA) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Lagerung isolierter genomischer DNA erfolgte bei -20 °C.

2.7.2 Isolierung von Plasmid DNA mittels „Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit“

Die Isolierung und Aufreinigung von Plasmid-DNA aus rekombinanten *E. coli*-Kulturen wurde mittels „Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit“ (ZYMO Research Europe GmbH, Freiburg) durchgeführt. Für die Präparation wurden aus 5-ml-Übernachtskultur jeweils zweimal 2 ml entnommen, in ein Eppendorfgefäß pipettiert und 2 min bei 17000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 600 µl demineralisiertem Wasser suspendiert. Die weitere Bearbeitung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Isolierte Plasmide wurden bei -20 °C gelagert.

2.7.3 Reinigung und Konzentrierung von DNA aus Lösungen mittels des "DNA Clean & Concentrator™-5 Kit"

Zur Eliminierung weiterer in den DNA-Lösungen vorhandener Proteinverunreinigungen wurde eine zusätzliche Aufreinigung mittels "DNA Clean & Concentrator™-5 Kit" (ZYMO Research Europe GmbH, Freiburg) durchgeführt. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

2.7.4 Reinigung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen mittels des "Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit"

Um eine Separierung einzelner DNA-Fragmente aus einem Gemisch von DNA-Molekülen, wie es z.B. bei einem Plasmidverdau vorzufinden ist, zu vollziehen, wurde zunächst eine Agarosegelelektrophorese (2.7.6) mit anschließender Anfärbung der DNA mittels Ethidiumbromid durchgeführt. Durch die Exposition der Gele mit UV-Strahlung auf dem Schirm eines Transilluminators (Nippon Genetics Europe GmbH, Düren) konnte durch Abgleich mit den mitgeführten Längenstandards das zu isolierende Fragment identifiziert, unter Zuhilfenahme eines Skalpells aus dem Gel herausgeschnitten und dann in ein Eppendorfgefäß überführt werden. Das eigentliche Herauslösen der DNA-Fragmente aus der Agarose erfolgte mit dem „Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit“ (ZYMO Research Europe GmbH, Freiburg). Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die isolierten Fragmente wurden in 15 µl demineralisiertem Wasser aufgenommen.

2.7.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Konzentrationsbestimmungen von DNA-Lösungen wurden an einem Spektralphotometer (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot) durchgeführt. Die Messung erfolgte zum einen bei einer Wellenlänge von 260 nm (Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren) und zum anderen bei einer Wellenlänge von 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen). Der Reinheitsgrad der DNA-Lösungen wurde mittels des Quotienten dieser beiden Absorptionen determiniert. Der Quotient soll dabei Werte zwischen 1,8 und 2,0 annehmen (Green und Sambrook, 2012). Im Falle der Messung doppelsträngiger DNA entspricht eine Absorption von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml (Green und Sambrook, 2012).

2.7.6 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten

2.7.6.1 Nichtdenaturierende Agarosegelelektrophorese

Die größen- bzw. längenspezifische Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten erfolgte mit der molekularbiologischen Standardmethode der Agarosegelelektrophorese. DNA-Moleküle besitzen eine elektrische Ladung, deren Ursprung in den Phosphatgruppen des Zucker-Phosphat-Rückgrats zu finden ist. Diese negative Ladung der Phosphatgruppen

verursacht eine Fortbewegung der DNA-Moleküle in Richtung einer positiv geladenen Elektrode (Anode) in einem elektrischen Feld. Die Ladungsdichte der Nukleinsäurefragmente ist hierbei immer konstant, das heißt die Anzahl der Ladungen bezogen auf die Molekülgröße sind immer gleich. Die durch Vernetzung entstehenden Agarosepolymere bilden in den Gelen Poren, die für die DNA-Moleküle wie ein Sieb wirken (Green und Sambrook, 2012). Durch die Kombination der Fortbewegung von Fragmenten im elektrischen Feld und dem unterschiedlichen Widerstand bei der Wanderung der DNA-Fragmente, aufgrund der unterschiedlichen Größe, ist eine Auftrennung der DNA-Fragmente möglich. Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente wurden Gele mit unterschiedlichem Agarosegehalt verwendet. Auftrennungen von Fragmenten mit einer Größe von über 1000 Bp wurden in 0,8 %-iger Agarose durchgeführt, während die Auftrennungen von Fragmenten kleiner als 1000 Bp in 2 %-iger Agarose durchgeführt wurden. Die Elektrophoresegele wurden angefertigt, indem die Agarose in 1 x TAE Puffer (siehe unten) durch Erhitzen bis zum Klarwerden der Lösung suspendiert wurde. Falls die Gele nicht sofort benötigt wurden, konnte nach diesem Schritt die gelöste Agarose bei 65 °C gelagert werden (Verhinderung des Erstarrens). Für die eigentliche Herstellung der Gele wurde die Agarose in eine Gelkammer mit Kamm (Bildung der Pipettiertaschen) gegossen und bei Raumtemperatur auspolymerisiert. Als Laufpuffer für die Elektrophorese fungierte 1 x TAE Puffer, welcher soweit aufgefüllt wurde, dass das erstarrte Gel gerade mit diesem vollständig bedeckt war. Die Beschwerung der Proben erfolgte durch Versetzung mit 0,2 Vol.-% des Ladepuffers "6x DNA Gel loading dye" (Thermo Scientific GmbH, St. Leon-Rot) und für die eigentliche Elektrophorese wurde mit einer angelegten Spannung von 110-130 Volt gearbeitet. Die Laufzeit der Elektrophoresen betrug 20 bis 40 min. Die Gele wurden anschließend in ein Ethidiumbromidbad zur Anfärbung der DNA gelegt (2.7.6.2). Die Nukleotidbasenlänge der aufgetrennten Fragmente wurde mittels Abgleich gegenüber den mitgeführten Größenstandards „GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder“ (Thermo Scientific GmbH, St. Leon-Rot) und „GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder“ (Thermo Scientific GmbH, St. Leon-Rot) bestimmt. Die Zusammensetzung der TAE-Stammlösung ist im Folgenden dargestellt.

50 x TAE-Stammlösung (Green und Sambrook, 2012)

Tris	242 g	2 M
Eisessig (Essigsäure 99%)	57 ml	5,7 % (v/v)
EDTA	18,7 g	50 mM
H ₂ O	<i>ad</i> 1000 ml	

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,5 eingestellt.

2.7.6.2 Färbung von Nukleinsäuren in Agarosegelen

Die Visualisierung von Nukleinsäurefragmenten in Agarosegelen erfolgte durch die Anfärbung mit Ethidiumbromid. Ethidiumbromid ist ein Farbstoff, welcher in doppelsträngige Nukleinsäuren interkaliert und dabei sein eigenes Anregungsspektrum verändert (somit fluoresziert nur Ethidiumbromid, welches an DNA gebunden hat). Die Fluoreszenz kann durch Exposition mit UV-Strahlung ausgelöst werden, wodurch auch die Nukleinsäuren sichtbar gemacht werden.

Die Auswertung der ca. 5-10 min gefärbten Gele erfolgte mittels einer Fotodokumentationsanlage, in der sowohl die Gele mit ultraviolettem Licht (Wellenlänge 312 nm) bestrahlt und zugleich auch fotografisch festgehalten werden konnten.

2.7.7 Amplifikation von DNA**2.7.7.1 Auswahl und Herstellung synthetischer Oligodesoxynukleotide**

Die Synthese der für die in dieser Arbeit getätigten Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) benötigten Oligodesoxynukleotide wurden nach gewünschter Sequenz von der Firma biomers.net GmbH (Ulm) synthetisiert. Die theoretische Zusammensetzung sowie die Berechnung bzw. Simulation der Eigenschaften der Oligodesoxynukleotide wurde mit den Computerprogrammen „CloneManager 7.11“ (Scientific & Educational Software, Cary, NJ, USA) und „CLC Main Workbench 8.0.1“ (Qiagen Bioinformatics, Aarhus, Dänemark) durchgeführt.

Die geforderten Kriterien an die Oligodesoxynukleotide waren, falls möglich, eine Länge von ca. 18-22 Nukleotiden, ein GC-Gehalt von 40-60 % und eine dadurch bedingte Schmelztemperatur von 50-60 °C. Bei Festlegung der Basenabfolge wurde darauf

geachtet, sich wiederholende Teilsequenzen zu vermeiden, um mögliche Selbsthybridisierungen und Ausbildungen von Sekundärstrukturen zu vermeiden.

2.7.7.2 Standard-PCR

Die Standard-PCR-Methode wurde angewandt, um einzelne Genabschnitte zu amplifizieren, konstruierte Vektoren zu kontrollieren oder Bakterienstämme zu identifizieren. Hierbei wurde die PCR nach Kary B. Mullis (Saiki *et al.*, 1985) durchgeführt. Eine PCR ist eingeteilt in drei Teilschritte, die sich während eines Laufs in mehreren Zyklen wiederholen. In der anfänglichen Denaturierung werden mittels einer Temperatur von 95 °C die Wasserstoffbrückenbindungen der DNA-Doppelstränge gespalten und dadurch die Einzelstränge frei gegeben. Im zweitem Teilschritt, betitelt als „Primer annealing“, erfolgt die Anlagerung der zuvor ausgewählten Oligodesoxynukleotide (2.1.3, 2.7.7.1) an die komplementären Bereiche der Ziel-DNA. Die „Annealing“-Temperatur wurde ca. 5-10 °C unter der Schmelztemperatur der Oligodesoxynukleotide gewählt. Im finalen Schritt, der Elongation, werden durch die eingesetzte DNA-Polymerase ausgehend von den 3'-Enden der Oligodesoxynukleotide die komplementären Stränge synthetisiert. Die Temperatur dieses Schrittes richtet sich dabei nach dem Optimum der eingesetzten DNA-Polymerase. Die Wiederholung dieser Schritte wurde in Zyklen durchgeführt, bis eine ausreichende Menge an DNA vorhanden war. Für die Durchführung der PCR mussten mehrere Biochemikalien bezogen werden. Als DNA-Polymerase wurde die ReproFast-Polymerase (Genaxxon Bioscience GmbH, Ulm) verwendet. Weiterhin wurde ein dNTP-Mix erstellt, indem jeweils 10 µl der vier einzelnen dNTPs (Genaxxon Bioscience GmbH, Ulm) und 60 µl demineralisiertes Wasser zusammengefügt wurden. Um eine Erhöhung der PCR-Effizienz zu erzielen, konnte auch der sogenannte „PCR 2X PreMix E“ (Epicentre, Madison, WI, USA) verwendet werden, welcher neben der Pufferlösung auch die benötigten dNTPs enthielt. Die unterschiedlichen Ansätze sind detailliert im Folgenden zu sehen.

Standard-PCR-Ansatz ohne die Nutzung des „PCR 2X PreMix E“ (Volumen 50 µl)

10 x Puffer	5	µl
DNA-Polymerase (5 U / µl)	0,5	µl
DNA-„Template“	1	µl
dNTP-Mix (10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	2	µl
Primer 1 (100 pmol)	1	µl
Primer 2 (100 pmol)	1	µl
Steriles H ₂ O	39,5	µl

Standard-PCR-Ansatz mit der Nutzung des „PCR 2X PreMix E“ (Volumen 50 µl)

DNA-Polymerase (5 U / µl)	0,5	µl
DNA-„Template“	1	µl
Primer 1 (100 pmol)	1	µl
Primer 2 (100 pmol)	1	µl
„Puffer E“	25	µl
Steriles H ₂ O	21,5	µl

Exemplarisch aufgezeigt ist im Folgenden das Protokoll der Standard-PCR

Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	
Denaturierung	95 °C	45 s	} x 32 Zyklen
Hybridisierung („Annealing“)	variabel	45 s	
Elongation	72 °C	variabel	
Finale Elongation	72 °C	15 min	
Kühlung	12 °C	∞	

Die „Annealing“-Temperatur ist als variabel gekennzeichnet, da sie abhängig von der Schmelztemperatur der Primer war und ca. 5-10 °C unter dieser gewählt wurde. Die

Elongationszeit war ebenfalls variabel und wurde nach den Längen der zu erstellenden Fragmente und der Synthesegeschwindigkeit der DNA-Polymerase bestimmt.

2.7.7.3 Einfügen von Restriktionsschnittstellen mittels PCR

Um DNA-Abschnitte untereinander verbinden zu können, war es möglich bzw. nötig, mittels PCR am 5'-Ende von zu amplifizierenden Fragmenten spezifische Erkennungssquenzen für Restriktionsendonukleasen einzubauen. Somit war es zum einen möglich, DNA-Fragmente aus Klonierungsvektoren mittels Restriktionsverdau zu isolieren und zum anderen in Plasmide zu transferieren (siehe Ligation 2.7.8.3), welche mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten wurden. Zur Erhöhung der Bindungseffizienz der Restriktionsendonukleasen wurden zusätzlich an den 5'-Enden die Nukleotidbasensequenz ACA miteingefügt.

2.7.8 Enzymatische Modifikation von DNA

2.7.8.1 Restriktionsverdau von DNA

In dieser Arbeit wurden ausschließlich Restriktionsendonukleasen des Typ II genutzt. Charakteristisch für den Typ II ist, dass sich die Schnittstellen in den palindromischen Erkennungssequenzen befinden (Pingoud und Jeltsch, 2001). Unterschieden wurde in zwei verschiedene Kategorien des Restriktionsverdaus, je nach Art der Zielsetzung. So wurden zum einen präparative Restriktionsverdaue durchgeführt mit dem Fokus, ein Fragment aus einem DNA-Konstrukt herauszuschneiden, und zum anderen wurden analytische Restriktionsverdaue durchgeführt, bei denen es alleiniges Ziel war, dieses Fragment z.B. in einem Plasmid nachzuweisen. Die Restriktionsverdaue wurden mittels der Agarosegelelektrophorese (2.7.6.1) und der Färbung mit Ethidiumbromid (2.7.6.2) kontrolliert und beurteilt. Die Isolierung, im Falle eines präparativen Restriktionsverdaus, wurde wie bereits zuvor beschrieben mit dem „Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit“ (2.7.4) und die Aufreinigung mit dem "DNA Clean & Concentrator™-5 Kit“ (2.7.3) praktiziert. Die zwei unterschiedlichen Ansätze der Restriktionsverdaue sind im Folgenden aufgelistet.

Ansatz eines analytischen Restriktionsverdau (Volumen 20 µl)

10 x Puffer	2	µl
DNA (1 µg)	3	µl
Restriktionsenzym (8-10 U)	0,5	µl
Steriles H ₂ O	14,5	µl

Pro Enzym wurde für eine Stunde bei 37 °C inkubiert mit anschließender Inaktivierung bei 65 °C oder 80 °C für 15 min je nach gewähltem Restriktionsenzym(en).

Ansatz eines präparativen Restriktionsverdau (Volumen 20 µl)

10 x Puffer	2	µl
DNA (3 µg)	10	µl
Restriktionsenzym (8-10 U)	1	µl
Steriles H ₂ O	7	µl

Pro Restriktionsenzym wurde für eine Stunde bei 30 °C oder 37 °C inkubiert mit anschließender Inaktivierung bei 65 °C oder 80 °C für 15 min je nach gewähltem Restriktionsenzym(en).

2.7.8.2 Modifikation von DNA („blunten“)

Im Falle von Restriktionsverdauen mit zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen bilden sich an den 3'- und 5'-Enden überstehende Nukleotidsequenzen, welche nicht komplementär zueinander sind. Diese Enden werden als „sticky ends“ bezeichnet. Um eine Religation des Vektors zu ermöglichen, ist es nötig, diese überstehenden Nukleotidsequenzen zu entfernen. Dieser Vorgang wird als „blunten“ bezeichnet und die daraus entstehenden Enden als glatte Enden, bzw. als „blunt ends“. Diese DNA-Modifikation wurde durch die Verwendung der T4-DNA-Polymerase (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot) vollzogen. Diese DNA-Polymerase zeichnet sich dadurch aus, dass

sie die Überhänge am 3'-Ende entfernt und am 5'-Ende die komplementären Basen ergänzt, woraus die glatten Enden resultieren.

Ansatz für das „blunten“ von Plasmid-DNA (Volumen 20 µl)

5 x Puffer	4	µl
DNA	5	µl
dNTP-Mix (10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	1	µl
T4-DNA-Polymerase (1 U)	0,5	µl
Steriles H ₂ O	9,5	µl

Die Inkubation erfolgte für 10 min bei Raumtemperatur und die Inaktivierung für 10 min bei 75 °C.

2.7.8.3 Ligation von DNA

Um präparierte und isolierte DNA-Fragmente in Vektoren einzufügen, wurde eine Ligation mittels T4-DNA-Ligase (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot) durchgeführt. Dieses Enzym fand auch Verwendung bei der Religation von geschnittenen und „geblunteten“ Vektoren. Es wurden zwei unterschiedliche Ligationsansätze verwendet, welche im Folgenden aufgelistet sind.

Ansatz einer Ligation (Volumen 10 µl)

10 x Ligationspuffer	2	µl
„Insert“	5	µl
T4-DNA-Ligase (1 U)	1	µl
Vektor	1	µl
Steriles H ₂ O	1	µl

Ansatz einer Religation (Volumen 20 µl)

10 x Ligationspuffer	2	µl
T4-DNA-Ligase (1 U)	1	µl
Vektor	5	µl
Steriles H ₂ O	12	µl

Die Inkubation erfolgte für 90 min bei Raumtemperatur und die Inaktivierung für 15 min bei 65 °C.

2.7.8.4 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) wurde extern von der Firma GATC Biotech AG (Konstanz) durchgeführt. Benötigt wurde ein Gesamtvolumen von 20 µl und eine Konzentration der Proben von 30–100 ng/µl.

2.8 DNA-Transfer in Bakterien**2.8.1 Herstellung kaltkompetenter *E. coli* XL1-Blue MRF'-Zellen**

Im ersten Schritt der Herstellung kaltkompetenter *E. coli* XL1-Blue MRF' Zellen wurden als Vorkulturen jeweils 5 ml LB-Medium mit *E. coli* XL1-Blue MRF' beimpft und über Nacht bei 37 °C und bei 200 Upm auf einem Tischrundschtüttler (New Brunswick Scientific GmbH, Edison, NJ, USA) inkubiert. Mittels dieser Vorkulturen wurden 250 ml SOB-Medium in einem 1000-ml-Erlenmeyerkolben mit Schikane inokuliert und dabei auf einen OD_{600nm}-Wert von 0,1 eingestellt. Aufgrund der vorhandenen Resistenz von *E. coli* XL1-Blue MRF' gegenüber Tetracyclin wurde dieses als Antibiotikum verwendet. Inkubation dieser Kulturen erfolgte bei 18 °C und 40 Upm auf einem Tischrundschtüttler (Sartorius AG, Göttingen) bis zum Erreichen einer OD_{600nm} von 0,6 bis 0,8. Nach Erreichen dieser OD_{600nm} wurden die kompletten Kulturen jeweils in sterile Zentrifugenbecher überführt und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 3900 x g. Der gebildete Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in 10 ml eisgekühltem TB-Puffer (siehe unten) suspendiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 3900 x g und eine weitere Aufnahme des Zellsediments in

eisgekühltem TB-Puffer. Den Zellsuspensionen wurden 1,5 ml DMSO zugegeben, jeweils 200 µl aliquotiert und mittels flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kaltkompetenten Zellen konnten bis zum Gebrauch bei -80 °C aufbewahrt werden.

Ansatz des TB-Puffers

Lösung 1

PIPES	0,76 g	10 mM
CaCl ₂	0,42 g	15 mM
H ₂ O	ad 125 ml	

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

Lösung 2

KCl	4,66 g	250 mM
MnCl ₂ × 4 H ₂ O	1,72 g	34,7 mM
H ₂ O	ad 125 ml	

Beide Lösungen wurden getrennt autoklaviert und danach zusammengegeben. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

2.8.2 Transformation kaltkompetenter *E. coli* XL1-Blue MRF'-Zellen

Die kaltkompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 10 µl eines Ligationsansatzes mit der zu transformierenden DNA hinzugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Durch einen einminütigen Hitzeschock bei einer Temperatur von 42 °C wurde die Permeabilität der Zellmembran ermöglicht, gefolgt von einer weiteren Inkubation bei 30 min auf Eis. Die Zellen wurden regeneriert, indem jedem Ansatz 800 µl vorgewärmtes LB-Medium hinzugefügt und dann für 60 min auf einem Tischrührschüttler bei 37 °C und 200 Upm inkubiert wurde. Es wurden 200 µl der Transformationsansätze einmal

unverdünnt und einmal in einer Verdünnung von 1:10 mittels Glaskugeln auf Agarplatten, welche die entsprechenden Antibiotika enthielten, aufgetragen.

Die Inkubation der Agarplatten wurde über Nacht bei 37 °C in einem Brutschrank durchgeführt.

2.8.3 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* BL21 (DE3) und *E. coli* DH5 α -Zellen

Die Herstellung elektrokompetenter Zellen wurde nach der Methode von Dower (Dower *et al.*, 1988) in einer modifizierten Form durchgeführt. Begonnen wurde mit der Inokulation von 5 ml LB-Medium mit *E. coli* BL21 (DE3)- oder *E. coli* DH5 α -Zellen, welche über Nacht bei 37 °C auf einem Rundtischschüttler bei 200 Upm inkubiert wurden. Mittels dieser Vorkulturen wurden 250 ml LB-Medium in einem 1000-ml-Erlenmeyerkolben mit Schikanen inokuliert und dabei auf eine OD_{600nm} von 0,1 eingestellt. Das Wachstum dieser Kulturen wurde bei 37 °C wiederum auf einem Schüttler (200 Upm), bis eine OD_{600nm} von 0,5 bis 0,8 erzielt wurde, durchgeführt. Die Erlenmeyerkolben mit den Kulturen wurden dann für 30 min auf Eis gestellt, der Inhalt in Zentrifugenbecher überführt und diese für 10 min bei 7700 x g bei 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Zellsedimente in 125 ml eiskaltem Wasser gelöst. Der Arbeitsschritt der Zentrifugation und des Suspendierens in eiskaltem Wasser wurde noch einmal wiederholt. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden dann die Zellsedimente in 50 ml eiskaltem 10 %-igen (v/v) Glycerin aufgenommen. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Zellsedimente in 15 ml 10 %-igem (v/v) Glycerin gelöst und nach einer weiteren abschließenden Zentrifugation in 500 μ l 10 %-igem (v/v) Glycerin gelöst. Die Zellsedimente wurden in Aliquote zu je 50 μ l aufgeteilt und mittels flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Zellen konnten dann bei -80 °C bis zum Gebrauch gelagert werden.

2.8.4 Transformation elektrokompetenter *E. coli* BL21 (DE3) und *E. coli* DH5 α -Zellen

Die Transformation elektrokompetenter *E. coli* BL21 (DE3)- oder *E. coli* DH5 α -Zellen (2.8.3) wurde begonnen, indem die Zellen auf Eis schonend aufgetaut wurden. Im nächsten Schritt wurden 2 μ l der zu transformierenden DNA (Plasmid-DNA) in eine bereits vorgekühlte Elektroporationsküvette (Biozym Scientific GmbH, Oldendorf) mit einem Elektrodenabstand von 2 mm pipettiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Die eigentliche

Transformation wurde mit dem Elektroporator „Gene Pulser Xcell™“ (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) mit den folgenden Spezifikationen vorgenommen: Spannung von 2,5 kV, Kapazität von 25 μ F und ein Widerstand von 200 Ω . Zur Regeneration der Zellen nach dem Elektroschock wurde den Ansätzen jeweils 800 μ l vorgewärmtes (37 °C) LB-Medium hinzugefügt und für 60 min bei 37 °C auf einem Rundtischschüttler inkubiert. Das Ausplattieren der Transformationsansätze erfolgte einerseits unverdünnt und andererseits in einer Verdünnung von 1:10, indem 200 μ l der Ansätze mittels Glaskugeln auf Agarplatten, welche die entsprechenden Antibiotika enthielten, verteilt wurden. Die Inkubation der Agarplatten erfolgte über Nacht bei 37 °C im Brutschrank.

2.8.5 Blau-Weiß-Selektion rekombinanter *E. coli*-Klone

Die Methode, welche genutzt wurde, um die nach einer Transformation auf eine Agarplatte aufgetragenen Bakterienzellen auf erfolgreich transformierte, rekombinante Bakterienzellen zu untersuchen, wird als der Blau-Weiß-Test bezeichnet. Grundlage dieses Testes sind die Eigenschaften des in diesem Falle genutzten pDrive-Klonierungsvektors. Dieser Vektor enthält das β -Galactosidase-Gen (*lacZ*) des *lac*-Operons, welches die Region des Polylinkers, der Stelle im Vektor, an der die gewünschten „Inserts“ eingebaut werden, flankiert. Dieses Gen liegt nur in einem funktionalen Zustand vor, wenn kein „Insert“ in den Polylinker eingefügt wird. Die von einem funktionalen Gen translatierte β -Galactosidase kann das Substrat 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal) in einen blauen Farbstoff namens 5-Brom-4-Chlor-Indigo hydrolysieren. Die Induktion des Gens erfolgte durch die Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG; 40 μ l je Agarplatte), welches genauso wie das X-Gal (20 μ l pro Agarplatte) vorher auf die Agarplatten mit Glaskugeln aufgetragen wurde. Bakterienzellen bzw. die entsprechenden Kolonien, welche noch ein Plasmid mit funktionalem *lacZ* Gen enthielten, färbten sich blau und Kolonien ohne funktionales *lacZ*-Gen färbten sich nicht bzw. erschienen farblos. Die weißen Kolonien wurden von den Agarplatten „gepickt“, in neues Flüssigmedium überführt und dieses bei 37 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden Plasmidpräparationen und die Restriktionsverdau durchgeführt.

2.9 Elektronenmikroskopie

Es wurden von *C. carboxidivorans*, *C. kluyveri*, *C. ljungdahlii* und von ausgewählten Cofermentationskulturen elektronenmikroskopische Bilder erstellt. Dafür wurden aus den entsprechenden Kulturen 2 ml entnommen und für 5 min bei 17000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Proben mittels einer Fixierlösung (siehe unten) konserviert. Die weitere Bearbeitung erfolgte durch die Zentrale Einrichtung der Elektronenmikroskopie der Universität Ulm. Die Zellen wurden fünfmal mit 0,01 M PBS gewaschen und mit 2 %-iger (v/v) Osmiumsäure final fixiert. Den Proben wurde das noch enthaltene Wasser mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (Propanol) entzogen. Für eine Verbesserung der Auflösung wurden die Zellen mit Platin beschichtet, und die Betrachtung erfolgte mit dem Rasterelektronenmikroskop Hitachi S-5200 UltraHigh Resolution FE (Hitachi Ltd. Corp., Chiyoda, Japan).

Ansatz der Fixierlösung

Glutaraldehyd (25 %)	0,5	ml	2,5	% (v/v)
Phosphatpuffer (0,2 M)	2,5	ml	0,1	M
Saccharose	50	mg	1	% (v/v)
Steriles H ₂ O	<i>ad</i> 2 ml			

3 Experimente und Ergebnisse

3.1 Konstruktion eines Biosyntheseweges zur Produktion von Capronat mittels rekombinanter acetogener Stämme

Im Rahmen einer Masterarbeit an der Universität Ulm (Bielzer, 2013) und darauf aufbauend in dieser Arbeit wurde an der Konstruktion eines Biosyntheseweges gearbeitet, welcher die Produktion von Capronat, ausgehend von Acetyl-CoA, dem Endprodukt des Wood-Ljungdahl-Weges (Ljungdahl, 1986), ermöglichen sollte. Dieser Syntheseweg ist in zwei Teilschritte unterteilt worden. Der erste Teil dieses Syntheseweges sollte die Umwandlung von Acetyl-CoA über mehrere Zwischenschritte zu Butyryl-CoA sein (Abbildung 3). Zu Beginn sollte eine Thiolase zwei Moleküle Acetyl-CoA zu Acetacetyl-CoA umwandeln, welches dann wiederum durch die 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase zu 3-Hydroxybutyryl-CoA reduziert werden sollte. Ausgehend davon

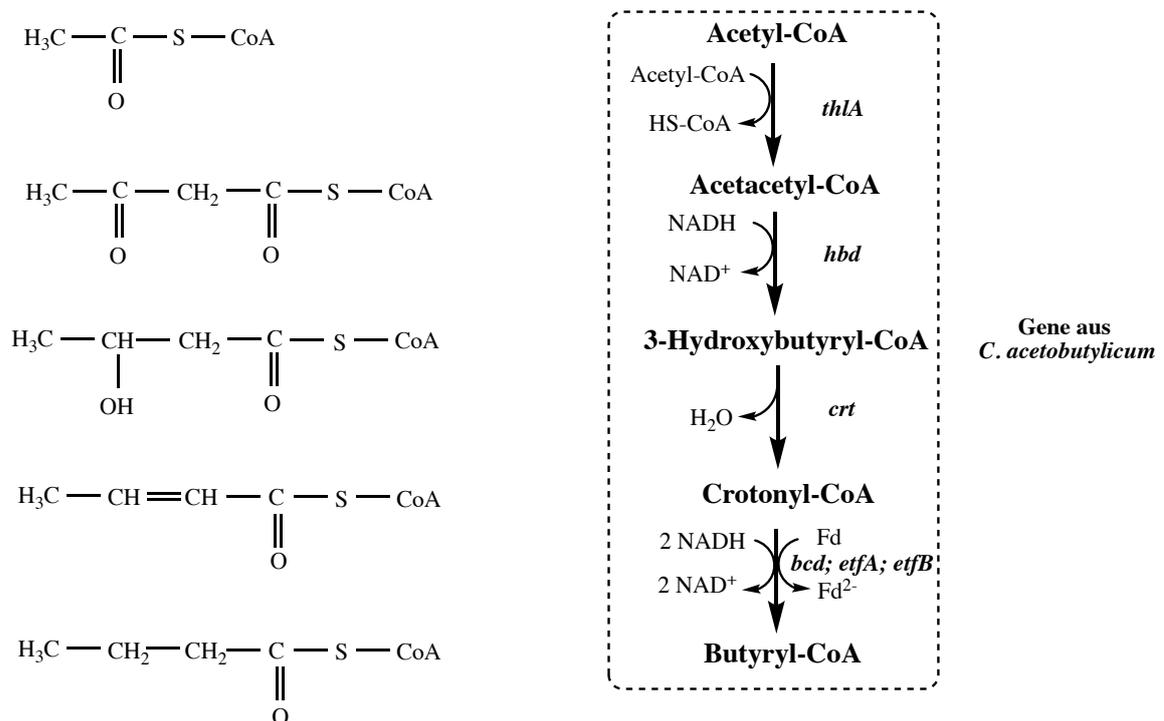


Abbildung 3: Synthese von Butyryl-CoA ausgehend von Acetyl-CoA mittels der Enzyme Thiolase (*thlA*), 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase (*hbd*), Crotonase (*crt*) und des Komplexes aus elektronentransferierenden Flavoproteinen (*etfA* und *etfB*) sowie der Butyryl-CoA-Dehydrogenase (*bcd*). Die entsprechenden Gene stammten aus *C. acetobutylicum*. Auf der linken Seite sind die Strukturformeln der jeweiligen Edukte bzw. Produkte abgebildet.

sollte durch eine Crotonase Crotonyl-CoA gebildet werden. Die finale Substanz des ersten Teilschrittes, das Butyryl-CoA, sollte aus einem Enzymkomplex bestehend aus elektronentransferierenden Flavoproteinen und der Butyryl-CoA-Dehydrogenase gebildet werden. Dieser Stoffwechselweg und die entsprechenden Gene sind in *C. acetobutylicum* beschrieben (Dürre, 2016) und in dieser Arbeit verwendet worden. Das Plasmid, benannt pMW 2.1 (Abbildung 4), mit den entsprechenden Genen wurde im Rahmen einer Masterarbeit der Universität Ulm konstruiert (Bielzer, 2013).

Im zweiten Teil des Syntheseweges sollte dieser Stoffwechselweg verlängert werden, um Butyryl-CoA zu Capronyl-CoA bzw. in das gewünschte Endprodukt Capronat umzuwandeln (Abbildung 5). Dieser Stoffwechselweg beruht auf dem in *C. kluyveri* beschriebenen Weg der Capronatsynthese (Seedorf *et al.*, 2008; Jeon *et al.*, 2016), ausgehend von Butyryl-CoA. Zu Beginn sollte das Butyryl-CoA mit einer Thiolase zu 3-Ketohexanoyl-CoA umgewandelt werden. Diese Umwandlung sollte durch dieselbe Thiolase aus *C. acetobutylicum*, die bereits schon im ersten Teilschritt zur Anwendung kam, katalysiert werden. Die nächsten Reaktionen sollten durch Enzyme katalysiert werden, deren Gene aus *C. kluyveri* stammen. Das 3-Ketohexanoyl-CoA wird durch die 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase zu 3-Hydroxyhexanoyl-CoA reduziert, welches wiederum durch die

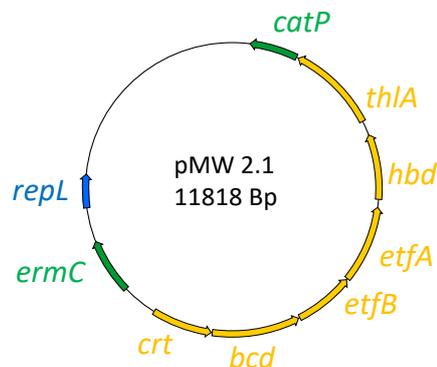


Abbildung 4: Schematische Plasmidkarte des Plasmids pMW 2.1. *thlA*, kodiert Thiolase (*C. acetobutylicum*); *hbd*, kodiert 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase (*C. acetobutylicum*); *etfA*, kodiert elektronentransferierendes Flavoprotein Untereinheit α (*C. acetobutylicum*); *etfB*, kodiert elektronentransferierendes Flavoprotein Untereinheit β (*C. acetobutylicum*); *bcd*, kodiert Butyryl-CoA-Dehydrogenase (*C. acetobutylicum*); *crt*, kodiert Crotonase (*C. acetobutylicum*); *ermC*, Gen für die Resistenz gegenüber Erythromycin; *catP*, Gen für die Resistenz gegenüber Chloramphenicol; *repl*, Replikationsursprung für Gram-positive Bakterien (*B. subtilis*).

Crotonase weiter zu 2-Hexenoyl-CoA umgesetzt wird. Mittels des elektronenbifurkierenden Komplexes der Butyryl-CoA-Dehydrogenase wird Capronyl-CoA gebildet. Die Umwandlung von Capronyl-CoA und die damit verbundene Bildung des Capronats sollte durch eine endogene Acetyl-CoA-Transferase des Zielorganismus von statten gehen. Falls sich dieser Schritt als nicht möglich oder nicht effizient genug dargestellt hätte, wäre es möglich gewesen, eine Thioesterase aus einem anderen Organismus einzubringen, um die Bildung von Capronat aus Capronyl-CoA zu ermöglichen. Die entsprechenden Gene sollten in ein Plasmid der pMTL80000-Reihe, genauer in das Plasmid pMTL82151, kloniert werden (Abbildung 6). Diese Arbeiten

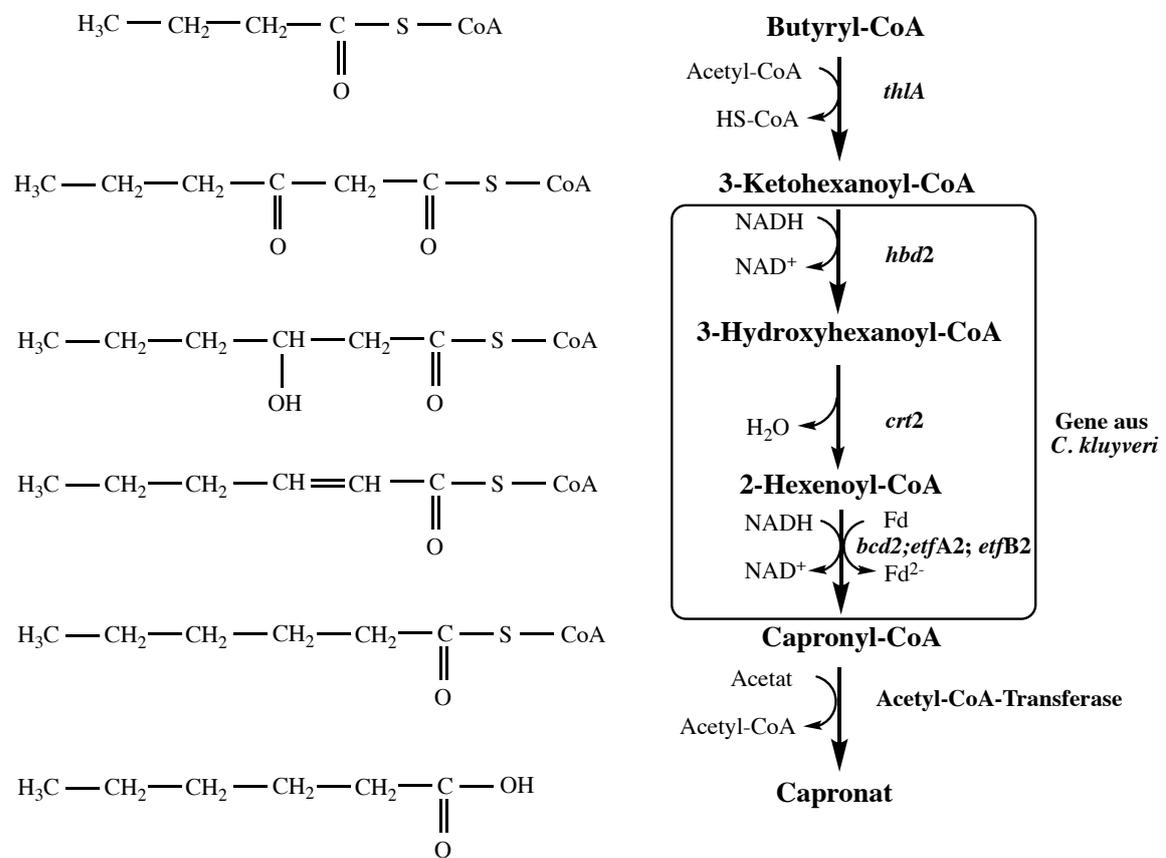


Abbildung 5: Synthese von Capronyl-CoA ausgehend von Butyryl-CoA mittels der Enzyme Thiolase (kodiert durch *thlA*), 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase (kodiert durch *hbd2*), Crotonase (kodiert durch *crt2*) und des Komplexes aus elektronentransferierenden Flavoproteinen (kodiert durch *etfA2* und *etfB2*) sowie der Butyryl-CoA-Dehydrogenase (kodiert durch *bcd2*). Die entsprechenden Gene stammen aus *C. kluyveri*. Der Schritt der Umwandlung von Capronyl-CoA zu Capronat sollte durch eine Acetyl-CoA-Transferase des Zielorganismus erfolgen. Linke Seite: Strukturformeln der jeweiligen Edukte bzw. Produkte.

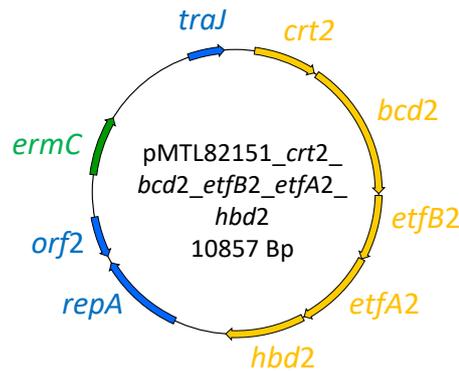


Abbildung 6: Schematische Plasmidkarte des Plasmids pMTL82151_crt2_bcd2_etfB2_etfA2_hbd2. *crt2*, kodiert Crotonase (*C. kluyveri*); *bcd2*, kodiert Butyryl-CoA-Dehydrogenase (*C. kluyveri*); *etfA2*, kodiert elektronentransferierendes Flavoprotein Untereinheit α (*C. kluyveri*); *etfB2*, kodiert elektronentransferierendes Flavoprotein Untereinheit β (*C. kluyveri*); *hbd2*, kodiert 3- Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase (*C. kluyveri*); *ermC*, Gen für die Resistenz gegenüber Erythromycin; *repA/orf2*, Replikationsursprung für Gram-positive Bakterien (*C. botulinum*).

wurden im Rahmen einer Masterarbeit an der Universität Ulm begonnen (Bielzer, 2013) und anfänglich in dieser Arbeit weitergeführt. Es konnten die Gene *bcd2*, *etfB2*, *etfA2* und *hbd2* in dieses Plasmid kloniert werden. Die Insertion des noch fehlenden Genes *crt2* scheiterte. Jenes Gen sollte zuvor mit dem *ptb*-Promoter aus *C. acetobutylicum* ligiert und dann in das Zielplasmid eingebaut werden. Diese Ligation sollte vorgenommen werden, weil keine weiteren Schnittstellen im Plasmid für den einzelnen Einbau der Fragmente vorhanden gewesen wären. Die Ligation beider Fragmente sollte über eine „splice by overlap extension“-PCR (SOE-PCR) erfolgen. Die entsprechenden Fragmente konnten ligiert werden, jedoch konnten in den durchgeführten Sequenzierungen immer nur Teile und nie der komplette Promoterbereich nachgewiesen werden. Da in der Konstruktion dieses rekombinanten Stoffwechselweges keine Fortschritte mehr erzielt wurden und die generellen Erfolgsaussichten als nicht zu hoch bewertet wurden, wurde mit den Arbeiten an den Cofermentationen (3.2 ff.) eine Alternative geschaffen.

3.1.1 Test der Funktionalität des Plasmid pMW 2.1 in *E. coli* XL1-Blue MRF'

Vor dem thematischen Wechsel in Richtung der Cofermentation wurde noch im Rahmen der Konstruktion des Biosynthesestoffwechselweges (3.1) das Plasmid pMW 2.1 auf seine Funktionalität getestet. Als Organismus für diesen Versuch wurde *E. coli* XL1-Blue MRF'

gewählt. Ausschlaggebend hierfür war dessen genetische Zugänglichkeit, dessen einfache Handhabung und die Tatsache, dass er auf natürlichem Weg kein Butyryl-CoA bzw. Butyrat bildet, was im Folgenden noch von Bedeutung ist und erläutert wird. Die Gene, welche sich auf dem Plasmid pMW 2.1 befanden, sollten, wie bereits zuvor beschrieben, die Synthese von Butyryl-CoA ausgehend von Acetyl-CoA ermöglichen, also den ersten Teilschritt des Syntheseweges. Im Falle der Funktionalität dieses Stoffwechselweges sollte es somit zur Bildung von Butyryl-CoA kommen. Die Problematik, welche sich hierbei ergab war, dass das entstandene Butyryl-CoA nicht mit den vorhandenen Analysemöglichkeiten hätte nachgewiesen werden können (Gaschromatograph mit gepackter Säule). Somit musste Butyryl-CoA weiter zum, mittels der vorhandenen analytischen Möglichkeiten nachweisbaren, Butyrat umgewandelt werden. Dieser Schritt sollte durch eine Thioesterase katalysiert werden (Abbildung 7). Als zwei mögliche Kandidaten für diesen Schritt wurden die Thioesterasen Ybgc aus *Hämophilus Influenzae* und TEII aus *Bacillus subtilis* ausgewählt, welche schon in einer Dissertation an der Universität Ulm zur Anwendung kamen (Lederle, 2010). In dieser Dissertation wurde ein Aceton-Synthese-Operon u.a. in *E. coli* konstruiert. Das Protein YbgC besitzt eine hohe Spezifität gegenüber kurzkettigen Acyl-CoA Molekülen und kann u.a. Butyryl-CoA als Substrat verwenden (Zhuang *et al.*, 2002). Die Thioesterase TEII ist bedeutsam bei der nicht-ribosomalen Synthese des Antibiotikums Surfactin in *B. subtilis* und es wurde zudem eine hydrolytische

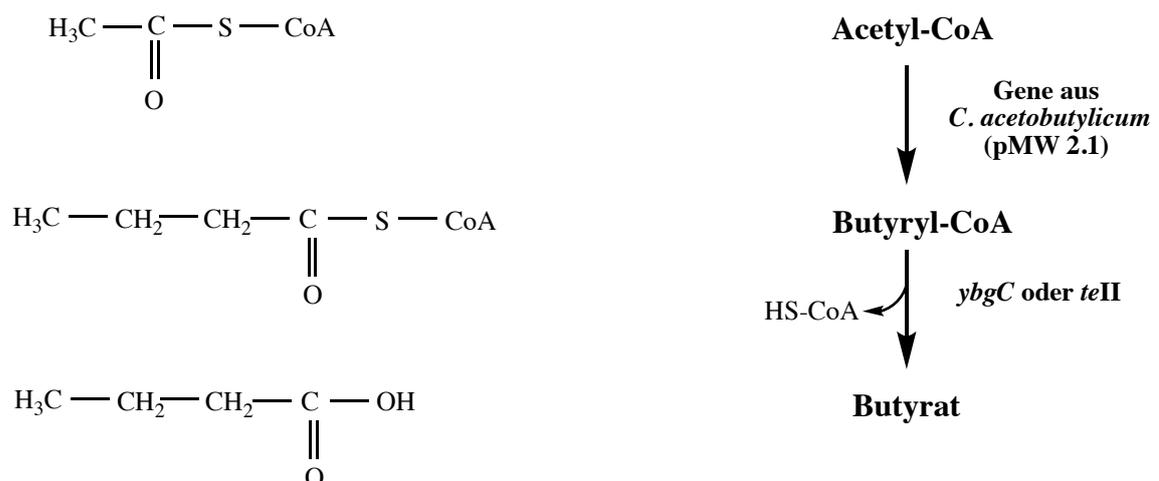


Abbildung 7: Synthese von Butyrat ausgehend von Acetyl-CoA mittels Enzymen, deren Gene auf dem Plasmid pMW 2.1 codiert sind und zusätzlich mit dem Gen einer der Thioesterasen YbgC (*H. Influenzae*) oder TEII (*B. subtilis*). Acetyl-CoA stammt aus der Glykolyse von *E. coli*. Linke Seite: Strukturformeln der jeweiligen Edukte bzw. Produkte.

Aktivität bei Verwendung der Substrate Acetyl-CoA und Propionyl-CoA nachgewiesen (Schwarzer *et al.*, 2002). Um den Nachweis der Funktionalität zu erbringen, wurden die Plasmide pIMP_adc_ybgC_thIA und pIMP_adc_tell_thIA (Abbildung 8), welche in der oben genannten Dissertation angefertigt wurden (Lederle, 2010), in *E. coli* XL1-Blue MRF'-Zellen transformiert, in die zuvor bereits das Plasmid pMW 2.1 transformiert worden war. Der zugehörige Wachstumsversuch wurde in 500-ml-Erlenmeyerkolben in 100 ml TY-Medium durchgeführt, welches 2 % Glucose enthält. Kultiviert wurden *E. coli* XL1-Blue MRF' Wildtyp, *E. coli* XL1-Blue MRF' mit Plasmid pMW 2.1, *E. coli* XL1-Blue MRF' mit Plasmid pMW 2.1 und Plasmid pIMP_adc_tell_thIA sowie *E. coli* XL1-Blue MRF' mit Plasmid pMW 2.1 und pIMP_adc_ybgC_thIA. Der Wachstumsversuch erfolgte unter aeroben Bedingungen (auf einem Schüttler) bei 37 °C. Den Medien, in denen *E. coli*-Zellen mit zwei Plasmiden kultiviert wurden, wurden zu Beginn jeweils beide entsprechenden Antibiotika zur Aufrechterhaltung des Selektionsdruckes zugegeben. Während dieses Wachstumsversuchs wurden nur drei Probennahmen durchgeführt, da die Hauptfragestellung nur in der möglichen Produktion von Butyrat nach dem Erreichen der stationären Wachstumsphase zu finden war. Der Verlauf des Wachstums und die Produktkonzentrationen von Butyrat und Aceton sind in Abbildung 9 zu sehen. Im Falle des Wachstums waren keine Unterschiede zwischen den verwendeten Stämmen zu erkennen (OD_{600nm} von ca. 5 nach 48 h). Eine Bildung von Butyrat konnte nur für den Stamm *E. coli* XL1-Blue MRF' festgestellt werden, in welchen die beiden Plasmide pMW

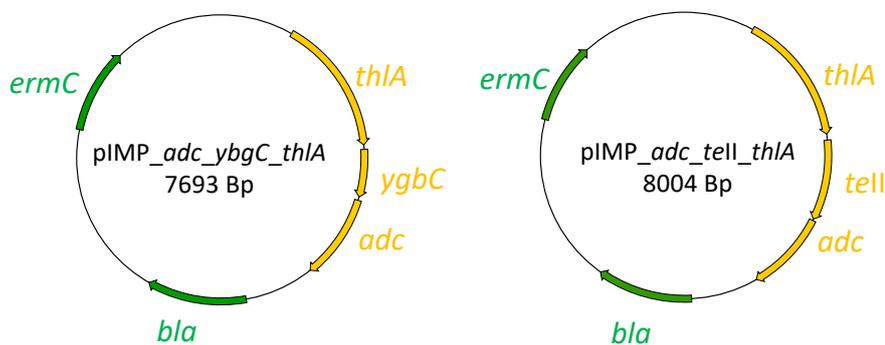


Abbildung 8: Schematische Plasmidkarten der Plasmide pIMP_adc_ybgC_thIA und pIMP_adc_tell_thIA. thIA, kodiert Thiolase (*C. acetobutylicum*); adc, kodiert Acetacetat-Decarboxylase (*C. acetobutylicum*); ybgC, kodiert Thioesterase (*H. Influenzae*); tell, kodiert Thioesterase (*B. subtilis*); ermC, Gen für die Resistenz gegenüber Erythromycin; bla, Gen für die Resistenz gegenüber Ampicillin.

2.1 und *pIMP_adc_ybgC_thIA* transformiert wurden (1,2 mM nach 48 h). Eine Acetonproduktion konnte in zwei Stämmen nachgewiesen werden. So bildete der Stamm *E. coli* XL1-Blue MRF' [*pMW 2.1*; *pIMP_adc_tell_thIA*] ca. 0,9 mM nach 48 h und der Stamm *E. coli* XL1-Blue MRF' [*pMW 2.1*; *pIMP_adc_ybgC_thIA*] ca. 3,2 mM nach 48 h. Der Nachweis der Bildung von Aceton war kein primäres Ziel dieses Versuches. Auf den Plasmiden, die die Thiosterasen codierten, befand sich noch zusätzlich das Gen *adc*, welches für eine Acetacetat-Carboxylase codiert. Durch dieses Enzym kann ausgehend von Acetacetat das Aceton hergestellt werden (Gerischer und Dürre, 1990). Die Bildung des Acetons war somit auch ein Zeichen der Funktionalität dieser Plasmide. Die Hauptaussage war, dass zumindest im Falle der Verwendung der Plasmide *pMW 2.1* und *pIMP_adc_ybgC_thIA* eine Butyratbildung nachgewiesen wurde und somit galt die Funktionalität des Plasmides *pMW 2.1* als erwiesen.

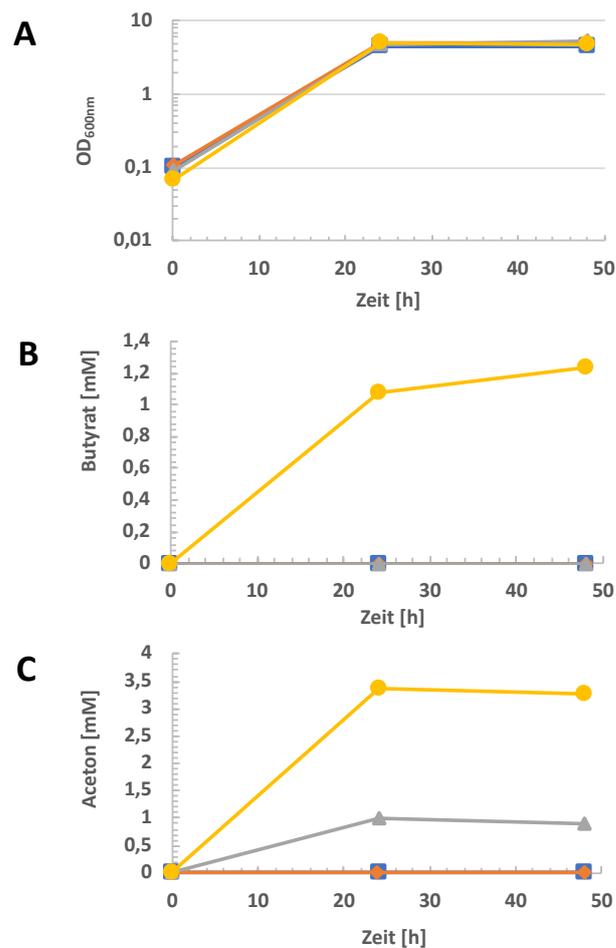


Abbildung 9: A: Wachstum, B: Butyrat-, C: Acetonkonzentrationen von ■ *E. coli* XL1-Blue MRF' Wildtyp, ◆ *E. coli* XL1-Blue MRF' [*pMW 2.1*], ▲ *E. coli* XL1-Blue MRF' [*pMW 2.1*; *pIMP_adc_tell_thIA*], ● *E. coli* XL1-Blue MRF' [*pMW 2.1*; *pIMP_adc_ybgC_thIA*] in TY-Medium.

3.2 Produktion von Capronat ausgehend von Synthesegas mittels (Co-) Fermentationen

Wie bereits zuvor beschrieben, wurde bei der Konstruktion des rekombinanten Biosyntheseweges zur Capronatproduktion kein weiterer Fortschritt erzielt und somit wurde nach einem alternativen Weg der Produktion von Capronat ausgehend von Synthesegas gesucht. Dieser alternative Ansatz war zu Beginn als Nebenprojekt geplant und entwickelte sich über die Dauer der Arbeit zum Hauptprojekt und Hauptinteressengebiet. Ziel war es, die nativen Stoffwechseleigenschaften zweier Clostridienarten zu nutzen bzw. zu kombinieren. Somit sollte von acetogenen Bakterien der Gattung *Clostridium*, ausgehend von Synthesegas, autotroph das dieser Gruppe namensgebende Acetat sowie zusätzlich noch Ethanol produziert werden, welches dann *C. kluyveri* als Substrat für die Capronatsynthese dient (Barker und Taha, 1942). Somit kann auf indirektem Wege auch eine autotrophe Produktion von Capronat erzielt werden (Abbildung 10). Diese Art der Kultivierung mit den damit verbundenen parallel bzw. hintereinander ablaufenden Fermentationsprozessen wurde als Cofermentation bzw. als separate biphasische Fermentation bezeichnet. Voraussetzung dieser (Co-)Fermentation ist die Kultivierungsmöglichkeit aller genutzten Mikroorganismen in einem gemeinsamen Nährmedium. Die Kultivierung von *C. autoethanogenum*, *C. carboxidivorans* und

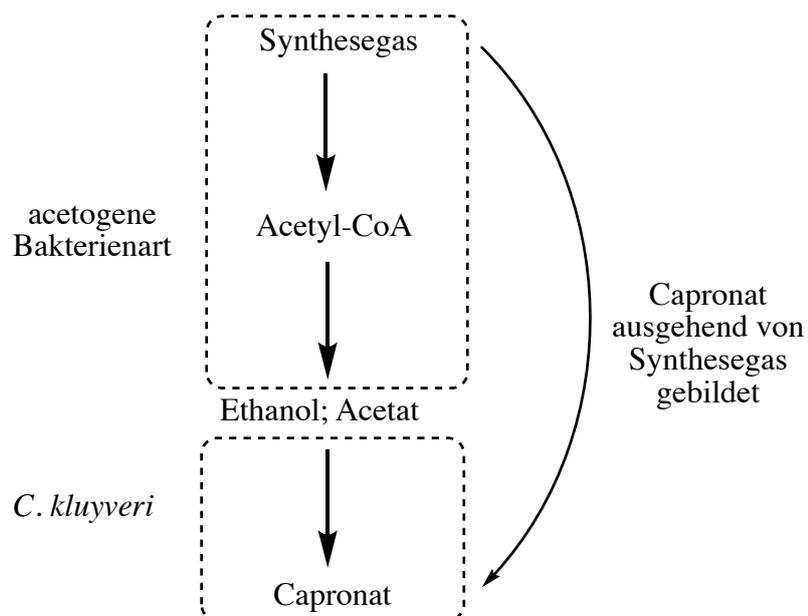


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Grundgedankens der (Co-)Fermentationen und der damit ermöglichten autotrophen Synthese von Capronat.

C. ljungdahlii, in dem auch in dieser Arbeit genutzten modifizierten Tanner-Medium, wurde bereits zuvor publiziert (Bengelsdorf *et al.*, 2016; Fernández-Naveira *et al.*, 2016). Der Nachweis, dass *C. kluyveri* ebenfalls in modifizierten Tanner-Medium kultiviert werden kann, wurde erst im Rahmen dieser Arbeit erbracht. Voraussetzung für dessen Wachstum ist jedoch die Zugabe von Ethanol und Acetat in dieses Medium (2.3.1.2). Es wurden in dieser Arbeit mehrere Ansätze der Cofermentationen mit unterschiedlicher Methodik durchgeführt. Die Cofermentationskulturen der jeweiligen Methodiken wie auch andere Wachstumsexperimente wurden in Dreifachbestimmung (Triplikate) durchgeführt. In den Verlaufsgrafiken der Ergebnisse der jeweiligen Versuche wird jedoch repräsentativ nur eine Kultur dieser Triplikate gezeigt. Dieses ist zum einen begründet in einer besseren Sichtbarkeit in den Grafiken selbst (keine Überlagerungen) und in der Tatsache, dass nicht alle Cofermentationen zu jedem Zeitpunkt komplett identisch verliefen (komplexes System mit verschiedenen Einflussfaktoren) und es an einzelnen Messpunkten zu hohen Abweichungen v.a. bei den Produkt- bzw. Substratkonzentrationen kommen konnte. Um die Differenzen und die dennoch vorhandene Reproduzierbarkeit der einzelnen Ansätze aufzuweisen, werden jeweils die Abweichungen der einzelnen Parameter zum Zeitpunkt der letztmaligen Messung bei Beendigung der Versuche gezeigt. Diese Handhabung der Ergebnisdarstellung wurde in der ganzen Arbeit vollzogen.

3.2.1 Simultane Cofermentation

Bei der ersten Cofermentation wurde die acetogene Bakterienart sowie *C. kluyveri* zeitgleich dem Nährmedium zugegeben und somit auch vom Zeitpunkt der Inokulation an zeitgleich inkubiert. Dieser Ansatz wurde als **simultane** Cofermentation bezeichnet. Ein schematischer Überblick über den Versuchsaufbau ist in Abbildung 11 zu sehen. Die simultanen Cofermentationen wurden mit mehreren acetogenen Bakterienarten durchgeführt. Verwendet wurden jeweils *C. autoethanogenum*, *C. carboxidivorans* oder *C. ljungdahlii*. Die einzelnen Versuchsansätze der simultanen Cofermentationen und deren Ergebnisse werden in den folgenden Unterpunkten dargestellt.

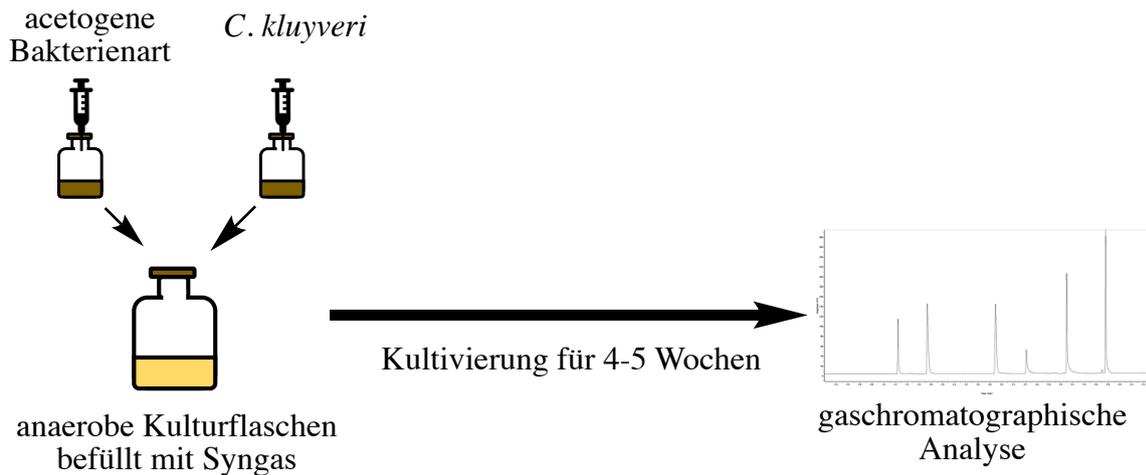


Abbildung 11: Schematische Darstellung einer simultanen Cofermentation. Die Inokulation erfolgt simultan und die gaschromatographische Analyse nach vier bis fünf Wochen Kultivierung.

3.2.1.1 Simultane Cofermentation von *C. autoethanogenum* und *C. kluyveri*

Bereits in der Erstbeschreibung von *C. autoethanogenum* wurde gezeigt, dass diese Bakterienart in der Lage ist, Ethanol und Acetat ausgehend von Kohlenmonoxid zu bilden (Abrini *et al.*, 1994). Daher wurde dieses Bakterium auch als für die Cofermentation geeignet befunden. Der entsprechende Wachstumsversuch der simultanen Cofermentation mit *C. autoethanogenum* und *C. kluyveri* wurde in 100 ml Tanner-Medium in 1000-ml-Müller-Krempel Flaschen in einer Dreifachbestimmung durchgeführt (Triplikate). In einer zusätzlichen Einfachbestimmung wurden die jeweiligen einzelnen Organismen als Kontrolle mitgeführt. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C unter nicht schüttelnden Bedingungen. Das Synthesegas wurde erstmals nach drei Tagen Inkubation und anschließend alle sieben Tage aufgefüllt. In Abbildung 12 (A und B) ist das Wachstum der Kulturen dargestellt. Gezeigt sind die Messungen der optischen Dichte (OD_{600nm}) sowie der Verlauf des pH-Wertes über die Zeit. Das Wachstum der Kultur des Cofermentationsansatzes (*C. autoethanogenum* und *C. kluyveri*) und das der Kultur, in der ausschließlich *C. autoethanogenum* inokuliert wurde, verhielten sich sehr ähnlich und erreichten nach mehr als 700 h Inkubation eine OD_{600nm} von knapp unter 1. Die Kultur mit nur *C. kluyveri* erreichte nach derselben Inkubationsdauer eine geringere OD_{600nm} von 0,2 nach einem zwischenzeitlichen Höchstwert von 0,3 nach 71 h. Im Falle des pH-Wertes ist wieder ein ähnlicher Verlauf bei der Cofermentationskultur und der Kultur mit *C. autoethanogenum* zu sehen. Nach mehr als 700 h Inkubation fiel der pH-Wert von

einem anfänglichen Wert von 6 auf Werte von 4,5-4,6. Der pH-Wert der *C. kluyveri*-Kultur sank während der Inkubation nur gering von 6,3 auf einen Wert von ungefähr 5,9. Während in Abbildung 12 (A und B) nur eine repräsentative Cofermentationskultur zu sehen ist, sind in Abbildung 12 (C und D) die Wachstumsparameter aller Cofermentationskulturen zusammengefasst, dargestellt mit ihren entsprechenden Standardabweichungen. Ebenfalls mit aufgetragen wurden die Ergebnisse der Kulturen, in denen jeweils nur ein einzelner Stamm inkubiert wurde, als Vergleichskontrolle. Die Grundlagen dieser Darstellung sind die Werte, welche am letzten Zeitpunkt des Wachstumsversuches und damit bei der Beendigung desselben detektiert wurden. Es ist zu sehen, dass alle Cofermentationskulturen ähnliche OD_{600nm} bzw. pH-Werte am Ende

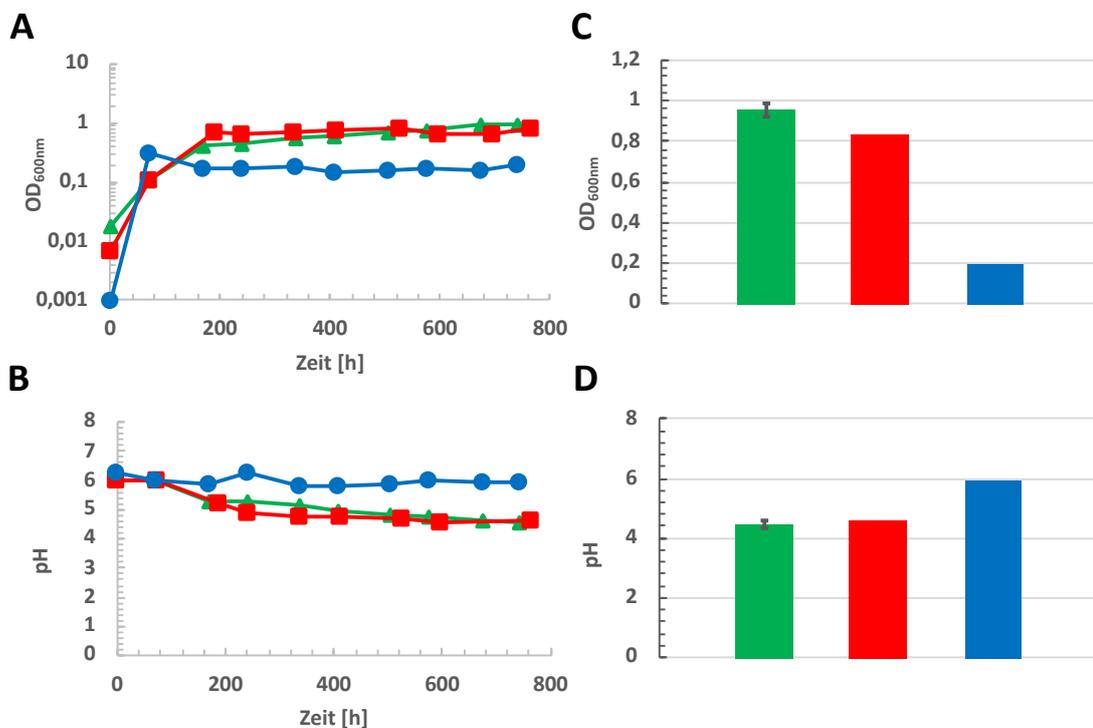


Abbildung 12: A: Wachstum, B: pH von \blacktriangle *C. autoethanogenum* und *C. kluyveri* (Cofermentationskultur) in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas, \blacksquare *C. autoethanogenum* in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas, \bullet *C. kluyveri* in Tanner-Medium „modified“ 2 mit der Gasphase N_2/CO_2 . Synthesegas wurde bei der Cofermentationskultur nach 71, 239, 407, 575 und 741 h und bei der *C. autoethanogenum*-Kultur nach 72, 240, 410, 596 und 764 h aufgefüllt. C: OD_{600nm} -Werte, D: pH der \blacksquare drei Cofermentationskulturen (*C. autoethanogenum* und *C. kluyveri*) - Mittelwert mit eingezeichneter Standardabweichung, von \blacksquare *C. autoethanogenum*, von \blacksquare *C. kluyveri* am Zeitpunkt der letzten Messung.

des Versuches erzielt hatten. Alle Cofermentationskulturen verhielten sich zusammengefasst wie die gezeigte repräsentative Kultur. Die Quantifizierung der Stoffwechselprodukte erfolgte ab diesem Zeitpunkt bzw. Versuch (sowie bei allen weiteren Experimenten) mittels des Gaschromatographen mit Kapillarsäule (2.6.3.2.). In

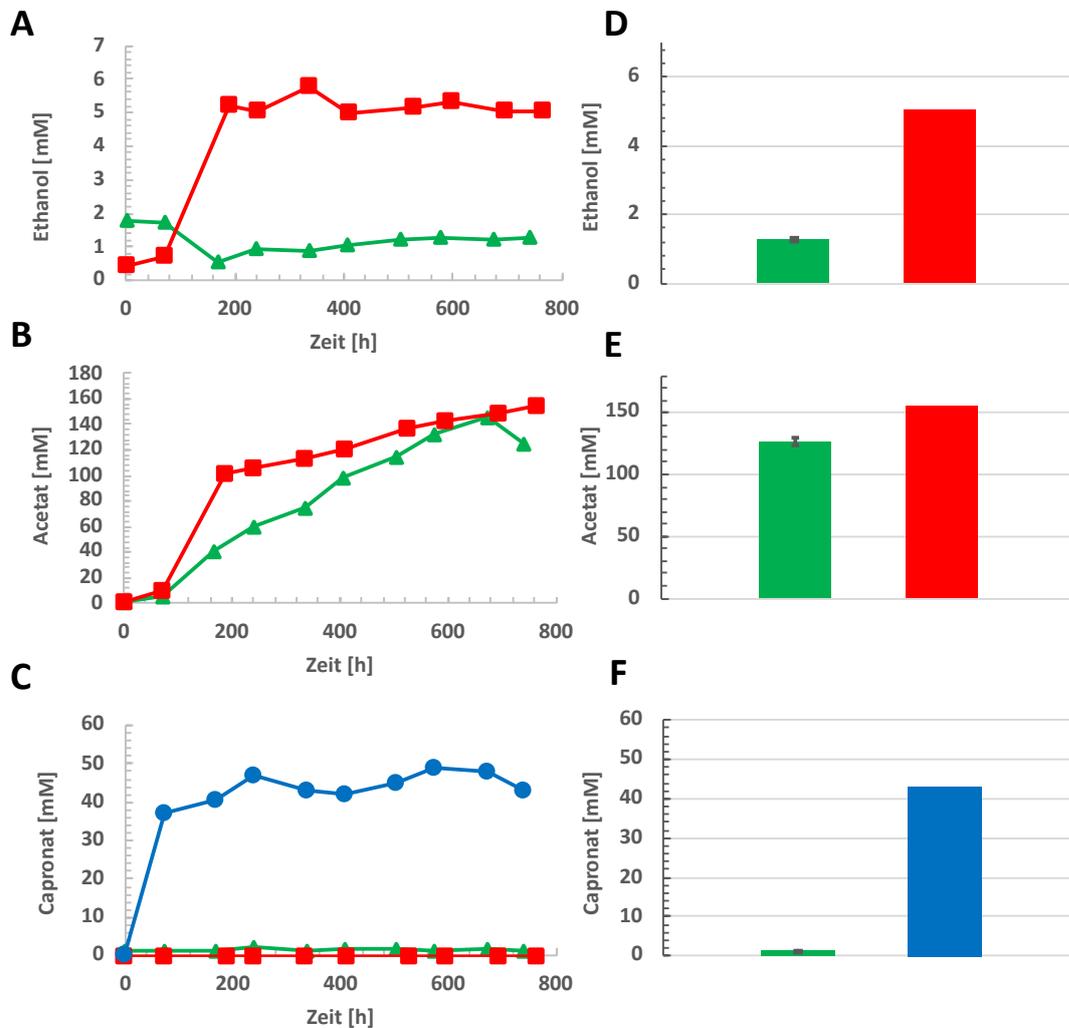


Abbildung 13: A: Ethanol-, B: Acetat-, C: Capronatkonzentrationen von ▲ *C. autoethanogenum* und *C. kluuyveri* (Cofermentationskultur) in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas, ■ *C. autoethanogenum* in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas, ● *C. kluuyveri* in Tanner-Medium „modified“ 2 mit der Gasphase N₂/CO₂. Synthesegas wurde bei der Cofermentationskultur aufgefüllt nach 71, 239, 407, 575 und 741 h und bei der *C. autoethanogenum*-Kultur nach 72, 240, 410, 596 und 764 h. D: Ethanol-, E: Acetat, F: Capronatkonzentrationen der ■ drei Cofermentationskulturen (*C. autoethanogenum* und *C. kluuyveri*) - Mittelwert mit eingezeichneter Standardabweichung, von ■ *C. autoethanogenum*, von ■ *C. kluuyveri* zum Zeitpunkt der letzten Messung.

Abbildung 13 (A, B und C) sind die Ergebnisse dieser Analyse zu sehen. Es ist zu erkennen, dass nach einer Inkubationsdauer von 764 h in der Cofermentationskultur eine Konzentration von 1,2 mM Ethanol detektiert wurde. Im Gegensatz dazu hatte die *C. autoethanogenum*-Kultur in dem selben Zeitraum 5,0 mM Ethanol gebildet. Im Vergleich zur *C. autoethanogenum*-Kultur verlief die Produktion von Acetat in der Cofermentationskultur deutlich verlangsamt. Die Endkonzentrationen an Acetat lagen im Falle der Cofermentationskultur bei 125 mM und bei der *C. autoethanogenum*-Kultur bei 155 mM. Die Bildung von Capronat konnte sowohl in der Cofermentationskultur als auch in der *C. autoethanogenum*-Kultur nicht nachgewiesen werden. In der Cofermentationskultur blieb die Konzentration durchgehend zwischen 1-2 mM. Bei *C. autoethanogenum* konnte hingegen kein Capronat nachgewiesen werden. Eine Produktion von Capronat war nur in der Positivkontrollkultur, in der ausschließlich *C. kluyveri* inkubiert wurde, zu sehen. In keiner der Kulturen konnte Butanol oder Hexanol nachgewiesen werden. Butyrat konnte nur im Falle der *C. kluyveri*-Kultur nachgewiesen werden (37,3 mM), wird aber nicht dargestellt. In Abbildung 13 (D, E und F) sind die Ethanol-, Acetat- und Capronatkonzentrationen aller Cofermentationskulturen in Bezug zu den jeweiligen Reinkulturen nach Beendigung des Experimentes zu sehen. Zusammenfassend ist zu sagen, dass in allen Kulturen der Cofermentationen geringere Konzentrationen an Ethanol und Acetat im Vergleich zur Kultur mit nur *C. autoethanogenum* detektiert wurden. Darüber hinaus konnte in keiner der Cofermentationskulturen eine gesteigerte Menge an Capronat (im Vergleich zur Konzentration zu Beginn des Experiments) detektiert werden.

3.2.1.2 Simultane Cofermentation von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri*

Ein weiterer für die Machbarkeit einer Capronatproduktion mittels simultaner Cofermentation geeigneter Kandidat war *C. carboxidivorans*. Dieses Bakterium wurde zu Beginn dieses Jahrhunderts aus einer landwirtschaftlichen Absetzlagune isoliert, auf der Suche nach Mikroorganismen, welche Ethanol ausgehend von CO bzw. Synthesegas bilden, können (Liou *et al.*, 2005). Als weitere Endprodukte des Metabolismus dieses Organismus werden in dieser Publikation noch das für die Cofermentation notwendige Acetat sowie zusätzlich Butyrat als auch Butanol angegeben. In einer weiteren Publikation

wurde im Rahmen einer Mediumoptimierung auch die Produktion von Hexanol und Capronsäure nachgewiesen (Phillips *et al.*, 2015). Die maximal detektierte Konzentration an Capronsäure war mit einem Wert von ca. 3 mM jedoch niedriger als sie mit *C. kluyveri* erreicht werden kann. Zusätzlich waren alle weiteren in dieser Publikation gezeigten Capronsäurekonzentrationen deutlich niedriger.

Die praktische Durchführung und die Bedingungen der Inkubation der simultanen Cofermentation von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* waren identisch zum vorhergehenden Versuch mit *C. autoethanogenum* und *C. kluyveri* (3.2.1.1). In Abbildung 14 (A und B) sind das Wachstum und der Verlauf des pH-Wertes einer repräsentativ gewählten Cofermentationskultur sowie die jeweiligen einzelnen Stämme zu sehen. Die höchste OD_{600nm} wurde mit einem Wert von 1,4 nach 835 h Inkubation von der

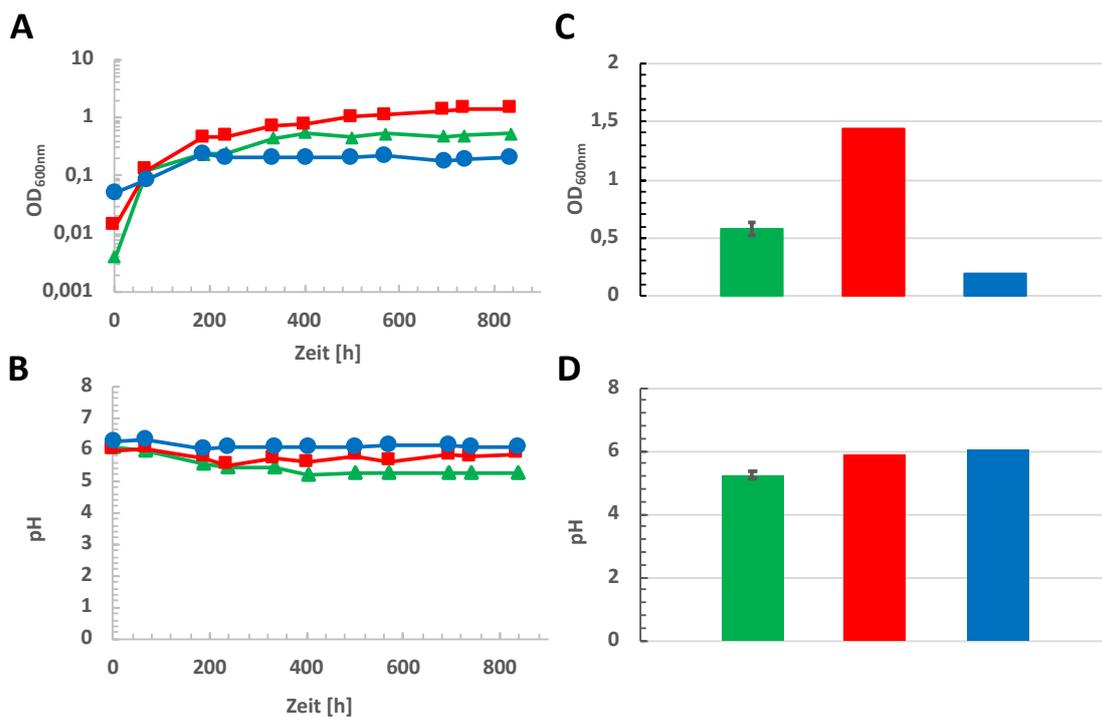


Abbildung 14: A: Wachstum, B: pH von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* (Cofermentationskultur) in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas, *C. carboxidivorans* in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas, *C. kluyveri* in Tanner-Medium „modified“ 2 mit der Gasphase N₂/CO₂, Synthesegas wurde aufgefüllt nach 67, 236, 403, 570 und 738 h. C: OD_{600nm}-Werte, D: pH der drei Cofermentationskulturen (*C. carboxidivorans* und *C. kluyveri*) - Mittelwert mit eingezeichneter Standardabweichung, von *C. carboxidivorans*, von *C. kluyveri* zum Zeitpunkt der letzten Messung.

C. carboxidivorans-Kultur erreicht. Die Cofermentationskultur erreichte lediglich eine OD_{600nm} von 0,5 nach der gleichen Inkubationsdauer. Die Positivkontrolle bestehend aus der einzelnen *C. kluyveri*-Kultur erreichte nach 835 h eine OD_{600nm} von 0,2. Die pH-Werte zeigten eine andere Tendenz. Die Cofermentationskultur erreichte in diesem Fall den niedrigsten pH-Wert mit einem Wert von 5,2 zum letzten Messpunkt des Versuches. Die *C. carboxidivorans*-Kultur lag im Gegensatz dazu bei einem höherem pH-Wert von 5,9. Der pH-Wert der *C. kluyveri*-Kultur sank nur gering von einem anfänglichen pH-Wert von 6,2

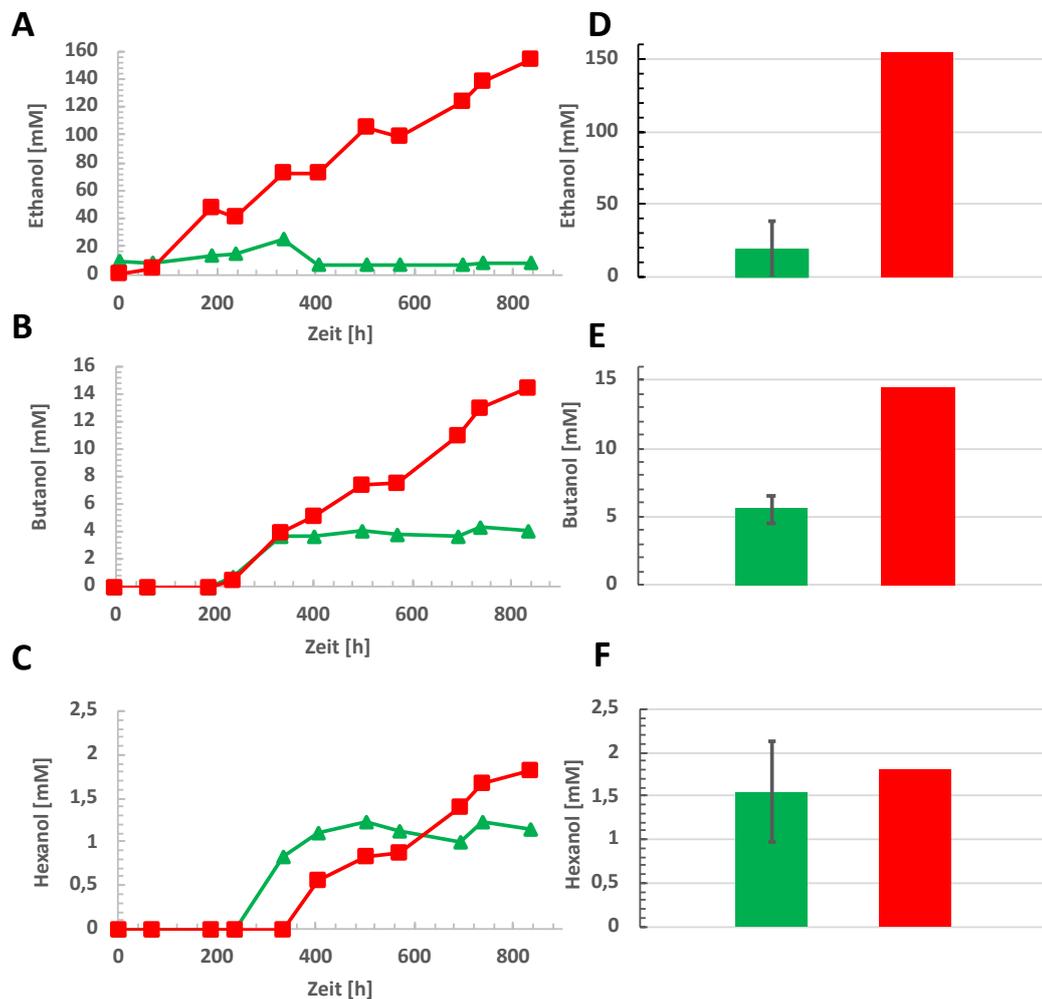


Abbildung 15: A: Ethanol-, B: Butanol-, C: Hexanolkonzentrationen von \blacktriangle *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* (Cofermentationskultur) in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas, \blacksquare *C. carboxidivorans* in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas, Synthesegas wurde aufgefüllt nach 67, 236, 403, 570 und 738 h. D: Ethanol-, E: Butanol-, F: Hexanolkonzentrationen der \blacksquare drei Cofermentationskulturen (*C. carboxidivorans* und *C. kluyveri*) - Mittelwert mit eingezeichneter Standardabweichung, von \blacksquare *C. carboxidivorans* zum Zeitpunkt der letzten Messung.

auf 6,0. In Abbildung 14 (C und D) ist zu sehen, dass bei Beendigung des Versuches alle Cofermentationskulturen sich nahezu identisch verhielten und ungefähr die gleichen OD_{600nm} - und pH-Werte erreichten. Die Produktion der C2-, C4- und C6 Alkohole Ethanol, Butanol und Hexanol der repräsentativen Kultur und der *C. carboxidivorans*-Kultur sind in Abbildung 15 (A, B und C) zu sehen. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Ethanolkonzentration der *C. carboxidivorans*-Kultur stetig zunahm und schon nach 188 h über der der Cofermentationskultur lag. In der *C. carboxidivorans*-Kultur wurden 153 mM Ethanol detektiert, während es bei der Cofermentationskultur nach 835 h Inkubation nur 7,5 mM waren. In der Cofermentationskultur war zwischenzeitlich nach 333 h Inkubation ein Höchstwert von 25 mM Ethanol festzustellen, welcher im weiteren Verlauf aber wieder fiel. Die Butanolkonzentrationen begannen erst nach 188 h Inkubation zu steigen. Nach 333 h stagnierte die Butanolkonzentration in der Cofermentationskultur und erreichte nach 835 h einen Wert von 4 mM. Die Butanolkonzentration in der *C. carboxidivorans*-Kultur stieg weiter an bis zu einem mehr als dreimal so hohen Endwert von 15 mM. Im Falle der Hexanolkonzentrationen fiel der Unterschied zwischen beiden Kulturen nicht so deutlich aus. Zwar wurde in der *C. carboxidivorans*-Kultur mit 1,8 mM die höchste Konzentration detektiert, diese lag aber nur knapp über der Menge der Cofermentationskultur mit einem Wert von 1,1 mM nach 835 h. In Abbildung 15 (D, E und F) sind vergleichend alle Konzentrationen am letzten Messpunkt im Vergleich zur *C. carboxidivorans*-Kultur zu sehen. Vergleichend konnte nur im Falle der Ethanolkonzentration der Cofermentationskultur ein größerer Unterschied festgestellt werden, da in einem der drei Kulturen bei Beendigung des Wachstums immer noch eine Restmenge an Ethanol von 42 mM festzustellen war. In Abbildung 16 (A, B und C) ist der Konzentrationsverlauf der zugehörigen Fettsäuren Acetat, Butyrat und Capronat dargestellt. Die Acetatkonzentration erreichte in der Cofermentationskultur einen Wert von 62 mM nach 835 h, während in der *C. carboxidivorans*-Kultur die Konzentration stufenweise auf einen Endwert von 12 mM fiel (zwischenzeitlicher Höchstwert 48 mM nach 236 h). Während in der *C. carboxidivorans*-Reinkultur nur eine geringe Butyratmenge detektiert wurde (1-3 mM), war diese in der Cofermentationskultur bereits deutlich gesteigert mit einer Konzentration von 14 mM nach 835 h. Mit aufgetragen ist die Butyratproduktion der *C. kluyveri*-Kultur, welche mit der ebenfalls gezeigten

Capronatproduktion nachweisen soll, dass das für diesen Versuch genutzte *C. kluveri* funktional war. Bei Betrachtung der Capronatkonzentrationen ist zu erkennen, dass neben der Positivkontrollkultur auch die Cofermentationskultur in der Lage war, Capronat zu produzieren. Es wurde am letzten Messpunkt des Versuches eine Konzentration von 5 mM in der Cofermentationskultur detektiert. Die Konzentrationen der Fettsäuren aller Cofermentationskulturen in Bezug zur *C. carboxidivorans*-Kultur sind in Abbildung 16 (D, E und F) zu sehen. Butyrat und Capronat waren in allen Kulturen der Cofermentation in

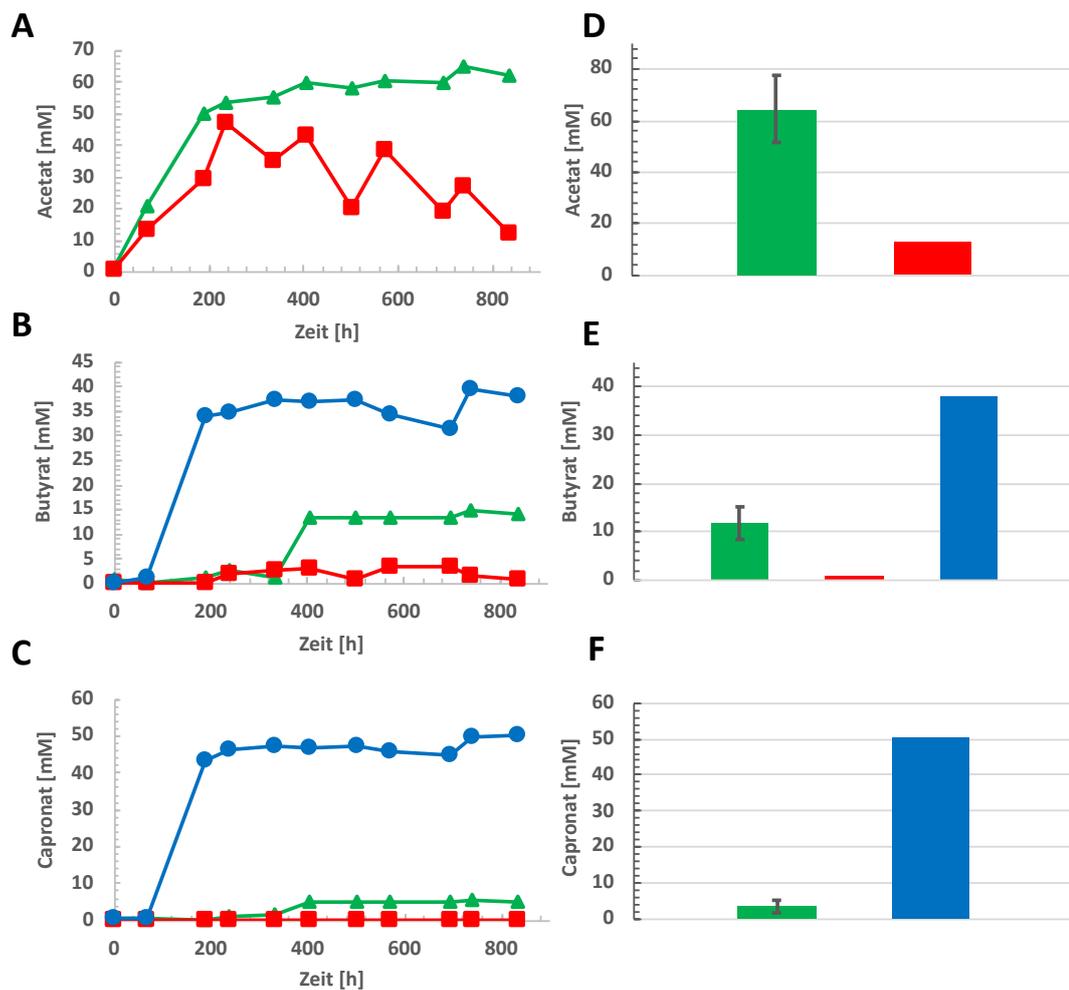


Abbildung 16: A: Acetat-, B: Butyrat-, C: Capronatkonzentrationen von ▲ *C. carboxidivorans* und *C. kluveri* (Cofermentationskultur) in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas, ■ *C. carboxidivorans* in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas, ● *C. kluveri* in Tanner-Medium „modified“ 2 mit der Gasphase N₂/CO₂. Synthesegas wurde aufgefüllt nach 67, 236, 403, 570 und 738 h. D: Acetat-, E: Butyrat-, F: Capronatkonzentrationen der ■ drei Cofermentationskulturen (*C. carboxidivorans* und *C. kluveri*) - Mittelwert mit eingezeichneter Standardabweichung, von ■ *C. carboxidivorans*, von ■ *C. kluveri* zum Zeitpunkt der letzten Messung.

vergleichbaren Konzentrationen nachweisbar. Die Acetatkonzentration aller Cofermentationskulturen lag höher als in der *C. carboxidivorans*-Reinkultur. Zur besseren Übersicht und als Zusammenfassung sind alle bestimmten Parameter (abgesehen vom pH-Wert) der repräsentativen Cofermentationskultur und der *C. carboxidivorans*-Reinkultur in Abbildung 17 dargestellt.

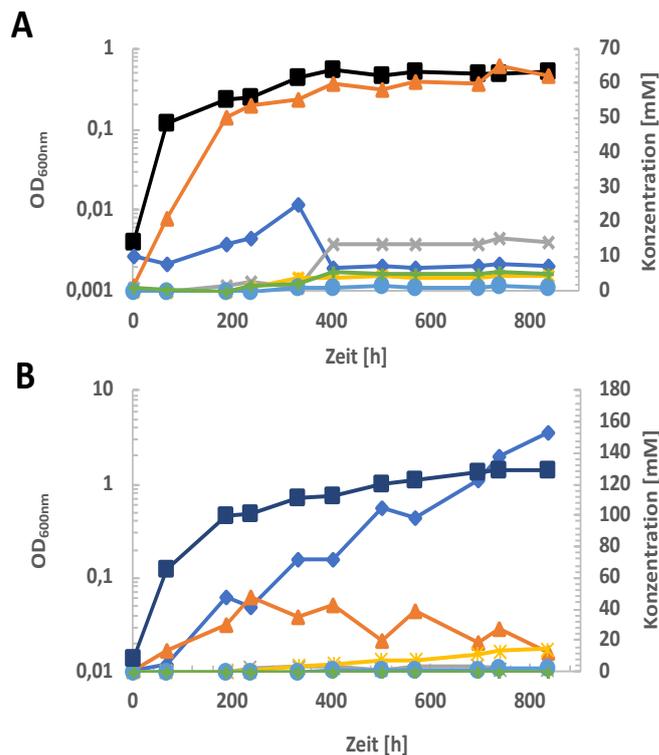


Abbildung 17: ■ OD_{600nm}, ◆ Ethanol-, ▲ Acetat-, × Butyrat-, * Butanol-, ● Hexanol- und + Capronatkonzentrationen der A: Cofermentationskultur, B: *C. carboxidivorans*-Kultur.

3.2.1.3 Simultane Cofermentation von *C. ljungdahlii* und *C. kluyveri*

Bei dem dritten acetogenen Mikroorganismus, der für die Cofermentationen im Allgemeinen und für die simultane Cofermentation im Genaueren ausgewählt wurde, handelte es sich um *C. ljungdahlii*. *C. ljungdahlii* wurde aus den Abfällen eines Hühnerhofes isoliert und als acetogenes Bakterium klassifiziert, welches ausgehend von Synthesegas als Hauptprodukt Acetat bildet (Tanner *et al.*, 1993). Eine Bildung von Ethanol (geringe Mengen zwischen 0 und 2 mM) wurde in der Erstbeschreibung nur vermutet und letztendlich in weiteren Folgepublikationen auch tatsächlich nachgewiesen. Gleichzeitig wurden die Bedingungen der Produktion aufgeklärt (Cotter *et al.*, 2009; Köpke

et al., 2010). Die Bedingungen und die praktische Durchführung einer simultanen Cofermentation mit *C. ljungdahlii* und *C. kluyveri* waren identisch zu den zuvor aufgezeigten simultanen Cofermentationen (3.2.1.1, 3.2.1.2). In Abbildung 18 (A und B) ist das Wachstum einer repräsentativ ausgewählten Kultur (aus einem dreifachen Ansatz) anhand des Verlaufs des OD_{600nm} - und des pH-Wertes zu sehen. Es ist zu erkennen, dass die Cofermentationskultur gegenüber der *C. ljungdahlii*-Reinkultur eine erhöhte OD_{600nm} erreichte, mit einem Wert von 1,6 gegenüber einem Wert von 1,2. Die *C. kluyveri*-Kultur erzielte eine OD_{600nm} nach einem Maximalwert von 0,32 nach 71 h Inkubation von 0,16 nach 693 h. Der pH-Verlauf war bei beiden Kulturen nahezu identisch und der pH-Wert fiel bei beiden Kulturen auf einen Wert von 4,7. Die Mittelwerte der Wachstumsparameter aller drei Cofermentationskulturen im Vergleich zu den

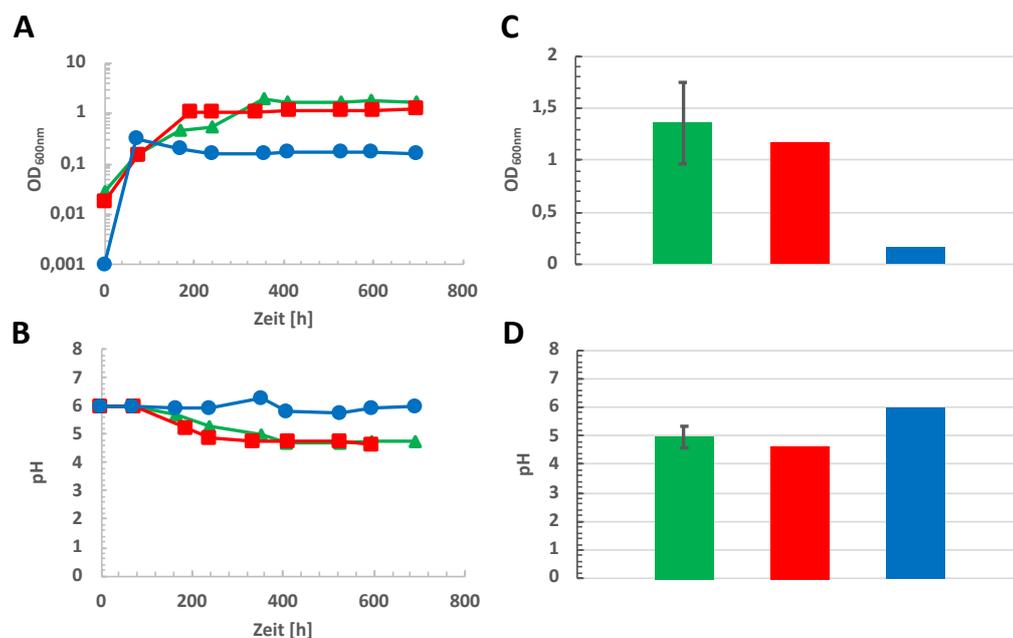


Abbildung 18: A: Wachstum, B: pH von \blacktriangle *C. ljungdahlii* und *C. kluyveri* (Cofermentationskultur) in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas, \blacksquare *C. ljungdahlii* in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas, \bullet *C. kluyveri* in Tanner-Medium „modified“ 2 mit der Gasphase N_2/CO_2 , Synthesegas wurde bei der Cofermentationskultur aufgefüllt nach 71, 239, 407 und 594 h und bei der *C. ljungdahlii*-Kultur nach 72, 240, 410, 596 und 764 h. C: OD_{600nm} -Werte, D: pH der \blacksquare drei Cofermentationskulturen (*C. ljungdahlii* und *C. kluyveri*) - Mittelwert mit eingezeichneter Standardabweichung, von \blacksquare *C. ljungdahlii*, von \blacksquare *C. kluyveri* zum Zeitpunkt der letzten Messung.

Die Bildung von Ethanol erfolgte in der *C. ljungdahlii*-Kultur früher als in der Cofermentationskultur und erreichte mit einem Wert von 50 mM gegenüber 40 mM nach fast 700 h Inkubation auch mehr als die Cofermentationskultur. Im Falle von Butanol und Hexanol lässt sich feststellen, dass diese Alkohole nur entstanden sind, wenn beide Stämme gleichzeitig in den Kulturen vorlagen. Infolgedessen konnte in beiden einzelnen

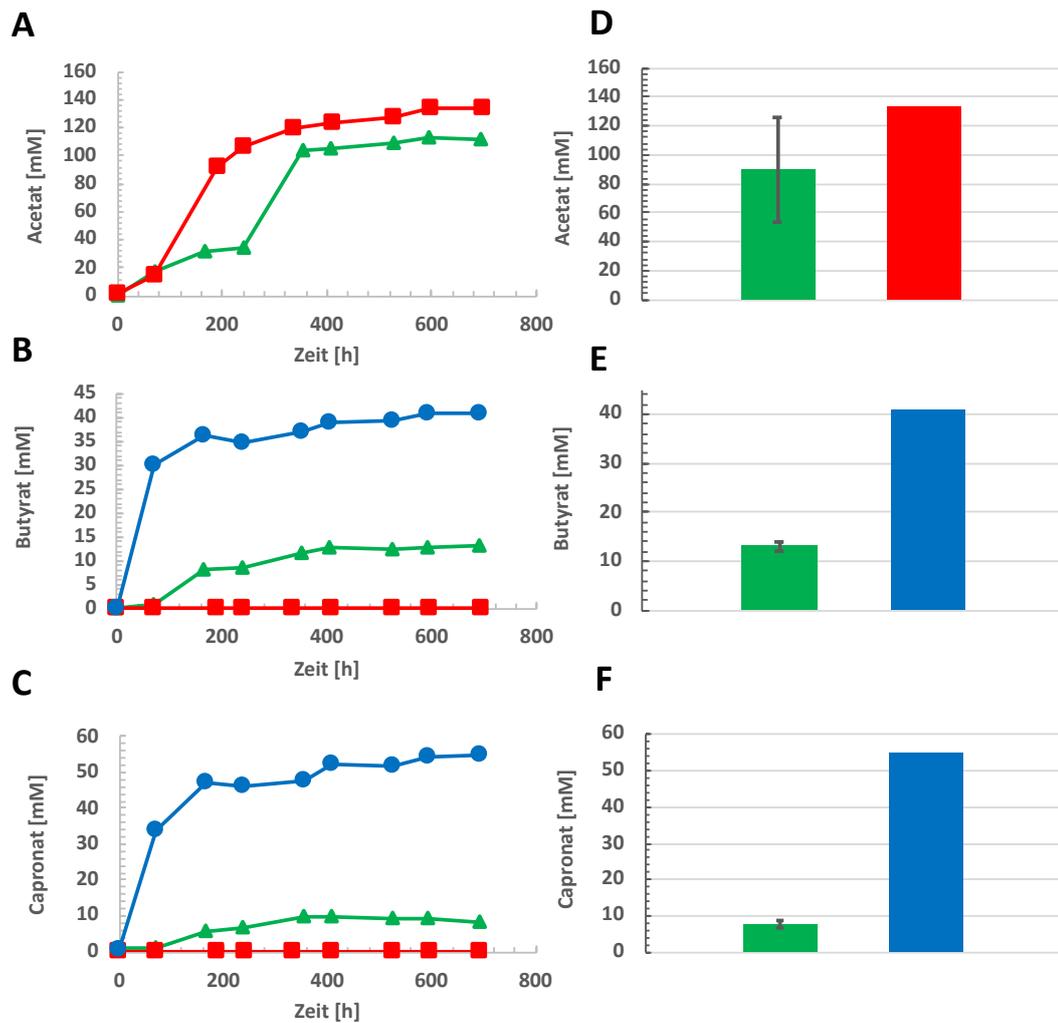


Abbildung 20: A: Acetat-, B: Butyrat-, C: Capronatkonzentrationen von ▲ *C. ljungdahlii* und *C. kluyveri* (Cofermentationskultur) in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas, ■ *C. ljungdahlii* in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas, ● *C. kluyveri* in Tanner-Medium „modified“ 2 mit der Gasphase N₂/CO₂. Synthesegas wurde bei der Cofermentationskultur aufgefüllt nach 71, 239, 407 und 594 h und bei der *C. ljungdahlii*-Kultur nach 72, 240, 410, 596 und 764 h. D: Acetat-, E: Butyrat-, F: Capronatkonzentrationen der ■ drei Cofermentationskulturen (*C. ljungdahlii* und *C. kluyveri*) - Mittelwert mit eingezeichneter Standardabweichung, von ■ *C. ljungdahlii*, von ■ *C. kluyveri* zum Zeitpunkt der letzten Messung.

Reinkulturen kein Butanol und auch kein Hexanol detektiert werden. Im Gegensatz dazu konnten in der Cofermentationskultur 8,5 mM Butanol und 4,1 mM Hexanol nach 693 h Inkubation detektiert werden. Dasselbe Bild ergab sich für alle drei Cofermentationskulturen (Abbildung 19 D, E und F). Die Ethanolkonzentrationen waren in allen Cofermentationskulturen niedriger als in der *C. ljungdahlii*-Kultur und Butanol und Hexanol wurde ausschließlich in den Cofermentationskulturen detektiert. Der Verlauf über die Zeit von Acetat-, Butyrat- und Capronatbildung der ausgewählten Cofermentationskultur ist in Abbildung 20 (A, B und C) zu sehen. Die Acetatkonzentration war nach 72 h in der *C. ljungdahlii*-Kultur stets höher als in der Cofermentationskultur. Einem Endwert von 135 mM steht ein Wert von 111 mM bei Beendigung des Versuchs gegenüber. Die zwei weiteren Fettsäuren konnten wie ihre zugehörigen Alkohole nur in der Cofermentationskultur und nicht in der *C. ljungdahlii*-Kultur nachgewiesen werden. Erzielt wurden nach 693 h Inkubation 13 mM Butyrat und 8,4 mM Capronat. Die Produktion von Butyrat und Capronat durch die *C. kluyveri*-Kultur steht wiederum für den erfolgreich erbrachten Nachweis der Funktionalität der verwendeten *C. kluyveri*-Kultur. Der Blick auf die Endwerte der einzelnen Cofermentationskulturen zeigt das gleiche Bild

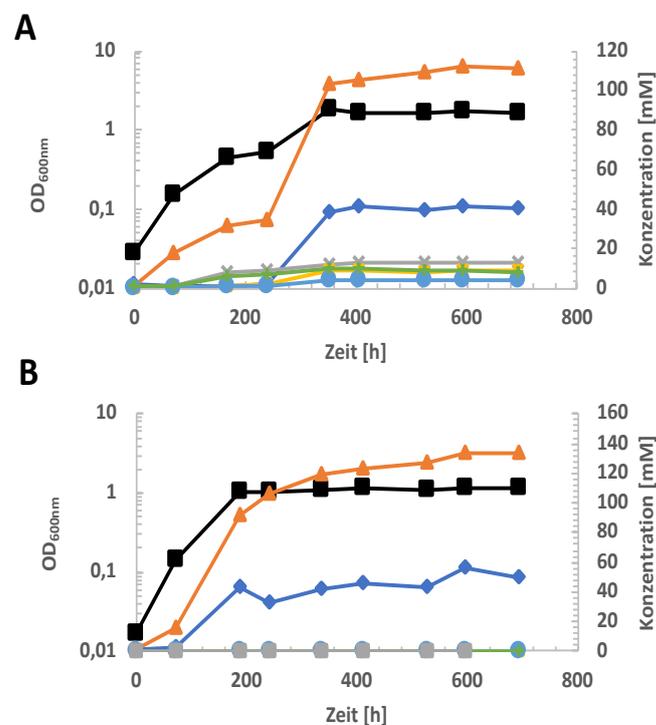


Abbildung 21: ■ OD_{600nm} , ◆ Ethanol-, ▲ Acetat-, × Butyrat-, * Butanol-, ● Hexanol- und + Capronatkonzentration der A: Cofermentationskultur, B: *C. ljungdahlii*-Kultur.

(Abbildung 20 D, E und F). Die Acetatkonzentrationen lagen in allen Cofermentationskulturen unterhalb der Konzentration der *C. ljungdahlii*-Kultur. Die Butanol- und Hexanolkonzentrationen der Cofermentationskulturen lagen in vergleichbaren Rahmen und beide Substanzen konnten in allen Kulturen nachgewiesen werden. In Abbildung 21 sind zusammenfassend mehrere Parameter der ausgewählten Cofermentationskultur und der *C. ljungdahlii*-Kultur in Bezug zur OD_{600nm} aufgetragen. Es ist im Falle der Cofermentationskultur ersichtlich, dass ein deutlicher Konzentrationsanstieg von Acetat und Ethanol in der spätexponentiellen Phase erfolgte, in der auch die OD_{600nm} von 0,5 auf 1,8 anstieg (zwischen 239 und 354 h). Die Produktion von Butyrat, Butanol, Capronat und Hexanol stieg in der Cofermentationskultur bereits nach 71 h Inkubation an.

3.2.1.4 Zusammenfassung der simultanen Cofermentation

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Methodik der simultanen Cofermentation bei den Kulturen, in denen jeweils *C. carboxidivorans* und *C. ljungdahlii* zusammen mit *C. kluyveri* kultiviert wurden, eine Capronatproduktion zeigten. Zusätzlich zum Capronat waren die ebenfalls interessanten Grundchemikalien Butanol und Hexanol entstanden. In der simultanen Cofermentation, welche mit *C. autoethanogenum* durchgeführt wurde, konnte keine Produktion (keine deutliche Steigerung der Konzentration über die Zeit) dieser Substanzen festgestellt werden. In Tabelle 8 sind die Ergebnisse der simultanen Cofermentation nochmals zusammengefasst. Gezeigt werden die maximalen Konzentrationen der Substanzen Butanol, Hexanol und Capronat, welche im Laufe der Wachstumsversuche detektiert werden konnten.

Tabelle 8: Maximal gebildete Konzentrationen von Butanol, Hexanol und Capronat in den simultanen Cofermentationen

	Butanol [mM]	Hexanol [mM]	Capronat [mM]
<i>C. autoethanogenum</i> + <i>C. kluyveri</i>	0	0	2,3
<i>C. carboxidivorans</i> + <i>C. kluyveri</i>	6,5	2,2	5,3
<i>C. ljungdahlii</i> + <i>C. kluyveri</i>	11,5	7,1	9,9

3.2.2 Sequentielle Cofermentation mit einem Wechsel der Gasphase während der Kultivierung

Für die weiteren Versuche einer Cofermentation wurde nun eine, zur simultanen Cofermentation abgewandelte, Methodik verwendet. Während bei der simultanen Cofermentation beide Stämme zu Beginn inokuliert wurden, erfolgte nun eine Inokulation nacheinander, also **sequentiell**. Zuerst wurde in dieser Cofermentation mit einem der acetogenen Bakterienstämmen inokuliert und diese Kulturen für ca. 1-2 Wochen kultiviert. In diesem Zeitraum sollte genug Ethanol und Acetat gebildet worden sein, welches später als Nährstoffquelle für *C. kluyveri* dienen sollte. Die Zugabe von *C. kluyveri* erfolgte nach den genannten 1-2 Wochen. Zum Zeitpunkt der Inokulation mit *C. kluyveri* wurde in dieser sequentiellen Cofermentationsvariante die Gasphase von Synthesegas (enthält für *C. kluyveri* toxisches CO) auf die präferierte Gasphase N₂/CO₂ getauscht. Der schematische Überblick über den Versuchsaufbau ist in Abbildung 22 zu sehen. Die einzelnen Versuchsansätze und die Resultate dieser sequentiellen Cofermentationen mit einem Wechsel der Gasphase während der Kultivierung werden im Folgenden dargestellt.

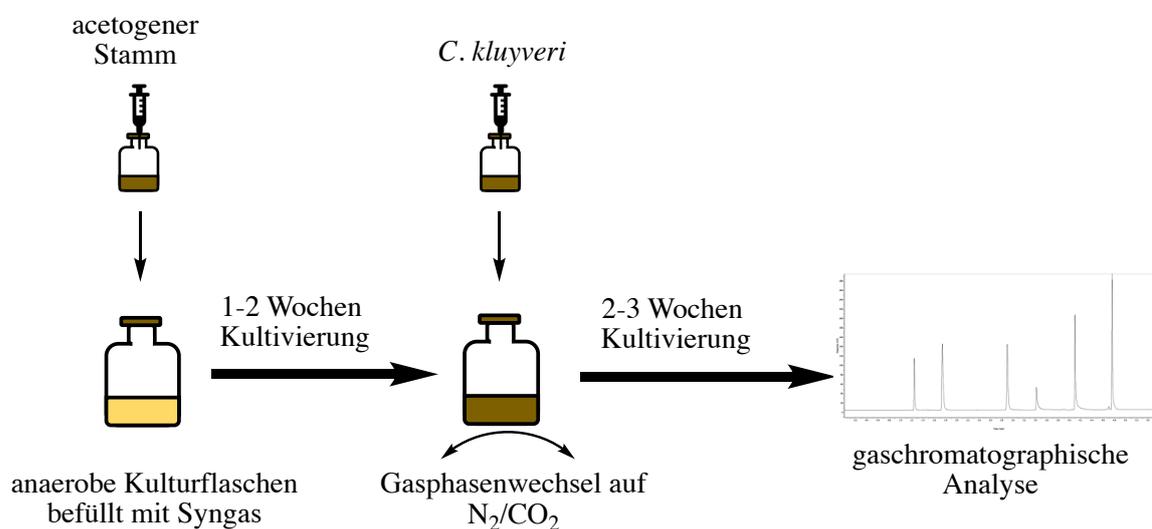


Abbildung 22: Schematische Darstellung einer sequentiellen Cofermentation mit einem Wechsel der Gasphase während der Kultivierung. Die Inokulation erfolgte sequentiell mit gaschromatographischer Analyse nach insgesamt drei bis fünf Wochen Kultivierung.

3.2.2.1 Sequentielle Cofermentation (mit einem Wechsel der Gasphase) von *C. autoethanogenum* und *C. kluyveri*

Die erste sequentielle Cofermentation wurde mit *C. autoethanogenum* und *C. kluyveri* durchgeführt. Dieser Wachstumsversuch wurde in 100 ml Tanner-Medium in 1000-ml-Müller-Krempel-Flaschen in einer Dreifachbestimmung durchgeführt. In einzelnen Ansätzen wurden die jeweiligen einzelnen Organismen als Kontrolle wieder mitgeführt. Die Kultivierungstemperatur war wie bereits zuvor 37 °C und die Kulturen wurden nicht geschüttelt. Die bedeutende Abweichung zur simultanen Cofermentation war nun, dass in dieser Methodik zuerst mit dem acetogenen Stamm inokuliert wurde. Zu Beginn wurde Synthesegas als Gasphase genutzt, welches nach drei Tagen Kultivierung einmalig aufgefüllt wurde. Nach eineinhalb wöchiger Inkubation wurde in die drei Müller-Krempel-Flaschen der Cofermentationskulturen das gleiche Inokulationsvolumen einer stationären *C. kluyveri*-Kultur hinzugegeben. Das Synthesegas wurde nach Inokulation durch N₂/CO₂ ersetzt und die Kulturen bei den bisherigen Bedingungen weiter inkubiert. Die Positivkontrolle (Kultur mit nur *C. kluyveri*) wurde erst zu diesem Zeitpunkt begonnen und ist somit bei den Auswertungen immer erst ab einem Zeitpunkt von 236 h aufgeführt. Die Wachstumsparameter einer ausgewählten Cofermentationskultur und der Reinkulturen sind in Abbildung 23 (A und B) aufgezeigt. Die Cofermentationskultur und die *C. autoethanogenum*-Kultur zeigten einen nahezu identischen OD_{600nm} Verlauf. Nach 669 h Kultivierung lagen beide OD_{600nm}-Werte bei 0,8. Die *C. kluyveri*-Kultur erreichte nach 433 h eine OD_{600nm} von 0,18 nach einem zwischenzeitlichen Maximalwert von 0,47 nach 100 h Kultivierung. Die Cofermentationskultur und die *C. autoethanogenum*-Kultur zeigten ebenfalls einen identischen Verlauf der pH-Werte. In beiden Kulturen fiel der pH-Wert bis zur Beendigung auf einen Wert von 4,8. Bei der *C. kluyveri*-Kultur war, wie bereits zuvor, nur ein geringes Abfallen der pH-Werte festzustellen, da der pH-Wert nur von 6,3 auf 6,1 sank. In Abbildung 23 (C und D) sind zusammenfassend die Mittelwerte (mit Standardabweichung) der OD_{600nm}- und die pH-Werte aller Cofermentationskulturen im Vergleich zu den Reinkulturen zu sehen. Es ist zu keinen bedeutenden Unterschieden innerhalb der Cofermentationskulturen gekommen. Erwähnenswert ist die leicht erhöhte OD_{600nm} einer der Cofermentationskulturen mit einem Wert von 1,0. Die Darstellung der Stoffwechselprodukte beschränkt sich zunächst auf Ethanol, Acetat und Capronat, zu

sehen in Abbildung 24 (A, B und C). Die Ethanolkonzentration der Cofermentationskultur überschreitet die der *C. autoethanogenum*-Kultur um das fast dreifache. Einer Menge von 9,5 mM stehen 3,3 mM nach 669 h in der Reinkultur gegenüber. Die umgekehrte Situation liegt vor im Falle der Acetatkonzentrationen. Im Fall der *C. autoethanogenum*-Kultur war die Acetatkonzentration mit einem Endwert von 88 mM nach 669 h höher als die der Cofermentationskultur (73 mM nach 669 h). Capronat war nur, mit Ausnahme der *C. kluyveri*-Kultur (Positivkontrolle), in der Cofermentationskultur und dort in sehr geringen Konzentrationen nachweisbar. So stieg der Wert nach 500 h Inkubation auf eine erstmals detektierbare Konzentration von 0,6 mM, welche bis zur Beendigung des

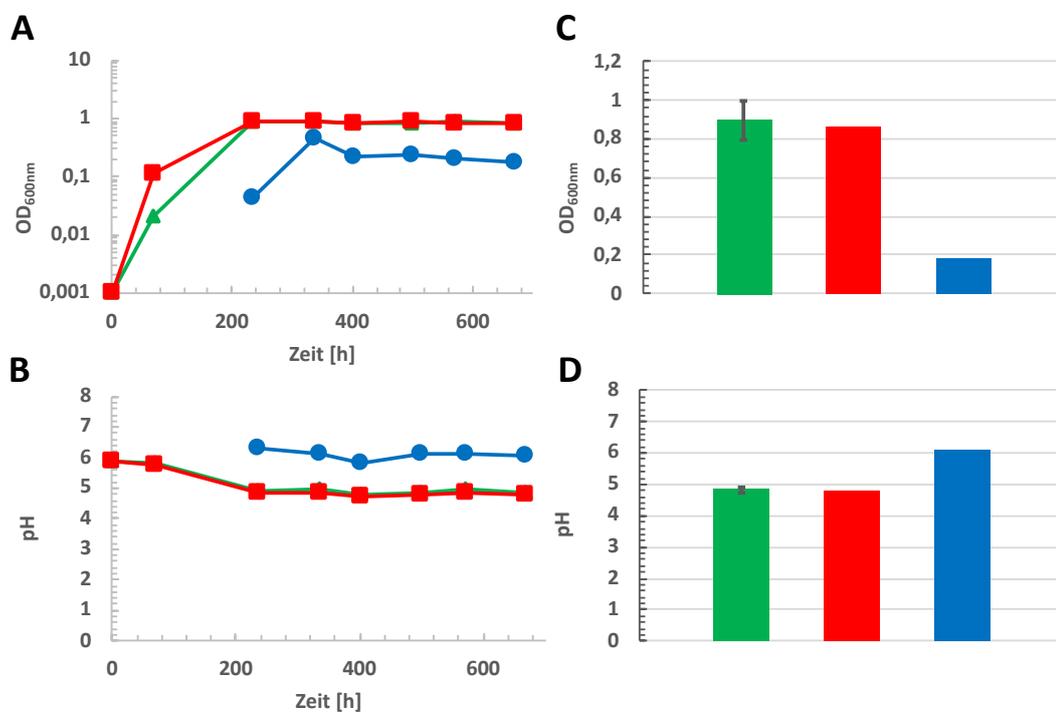


Abbildung 23: A: Wachstum, B: pH von ▲ *C. autoethanogenum* und *C. kluyveri* (Cofermentationskultur) in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas, ■ *C. autoethanogenum* in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas, ● *C. kluyveri* in Tanner-Medium „modified“ 2 mit der Gasphase N₂/CO₂. Synthesegas wurde bei der Cofermentationskultur einmalig nach 69 h aufgefüllt, Zugabe von *C. kluyveri* in die Cofermentationskulturen erfolgte nach 236 h (dritter Messpunkt von links). C: OD_{600nm}-Werte, D: pH der ■ drei Cofermentationskulturen (*C. autoethanogenum* und *C. kluyveri*) - Mittelwert mit eingezeichneter Standardabweichung, von ■ *C. autoethanogenum*, von ■ *C. kluyveri* zum Zeitpunkt der letzten Messung.

Versuches nachweisbar war. In Abbildung 24 (D, E und F) ist zu sehen, dass in allen Kulturen der Cofermentation die Situation wie bei der repräsentativ gewählten Kultur war. So waren in den Cofermentationskulturen die Ethanolkonzentrationen höher und die Acetatkonzentrationen niedriger als in der *C. autoethanogenum*-Kultur. Capronat konnte in allen Cofermentationskulturen am Ende des Versuchs nachgewiesen werden, jedoch

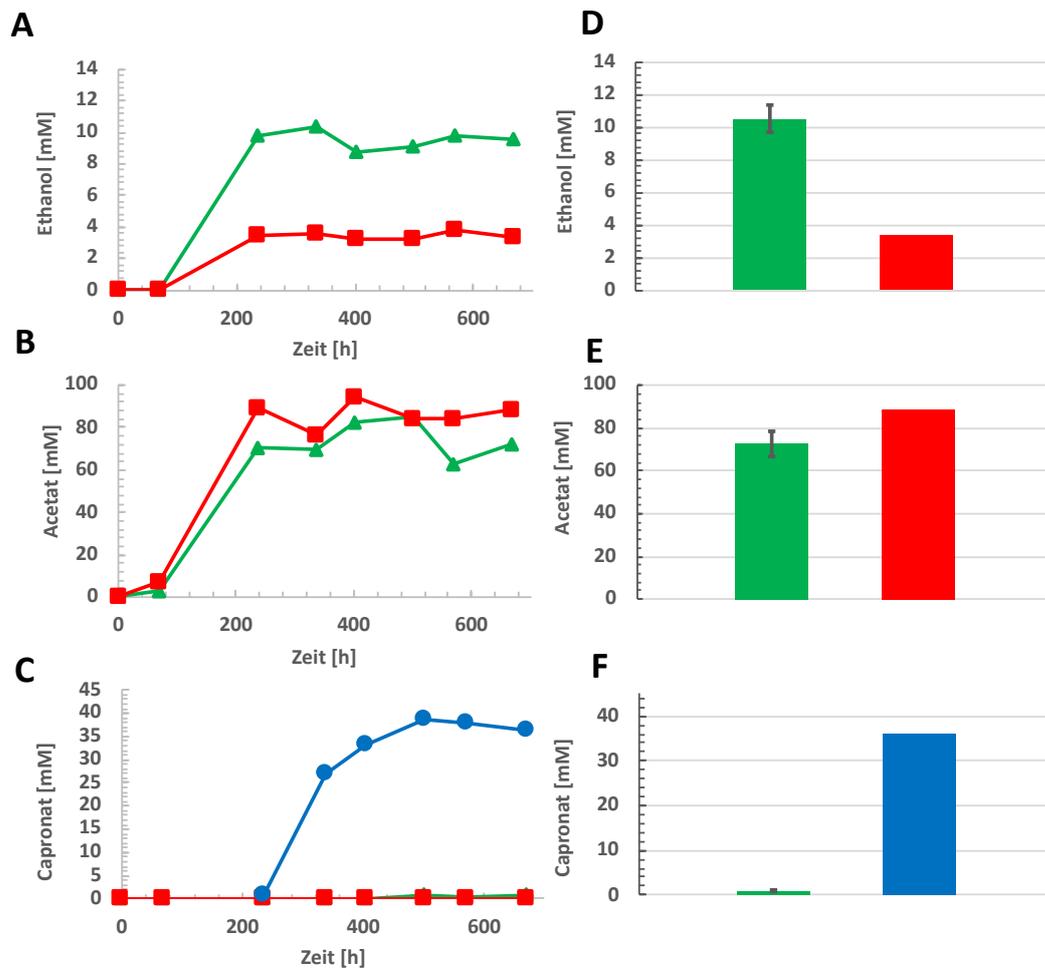


Abbildung 24: A: Ethanol-, B: Acetat-, C: Capronatkonzentrationen von \blacktriangle *C. autoethanogenum* und *C. kluveri* (Cofermentationskultur) in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas, \blacksquare *C. autoethanogenum* in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas, \bullet *C. kluveri* in Tanner-Medium „modified“ 2 mit der Gasphase N_2/CO_2 . Synthesegas wurde bei der Cofermentationskultur einmalig nach 69 h aufgefüllt, Die Zugabe von *C. kluveri* in die Cofermentationskulturen erfolgte nach 236 h (dritter Messpunkt). D: Ethanol-, E: Acetat-, F: Capronatkonzentrationen der \blacksquare drei Cofermentationskulturen (*C. autoethanogenum* und *C. kluveri*) - Mittelwert mit eingezeichneter Standardabweichung, von \blacksquare *C. autoethanogenum*, von \blacksquare *C. kluveri* zum Zeitpunkt der letzten Messung.

immer in geringen Konzentrationen, die 0,6-1,3 mM nicht überstiegen. In keiner einzigen Kultur konnte in diesem Versuch Butanol oder Hexanol nachgewiesen werden.

3.2.2.2 Sequentielle Cofermentation (mit einem Wechsel der Gasphase) von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri*

Die sequentiellen Cofermentationen mit einem Wechsel der Gasphase wurden nun als zweites mit *C. carboxidivorans* durchgeführt. Die Methodik und die Durchführung war nahezu identisch zum zuvor beschriebenen Versuch mit *C. autoethanogenum* (3.2.2.1). Der Verlauf der OD_{600nm}- und des pH-Wertes der ausgewählten Cofermentationskultur über die Dauer der Inkubation ist in Abbildung 25 (A und B) zu sehen. Der Verlauf dieser beiden Parameter in beiden Kulturen war nahezu identisch. Die OD_{600nm} nach 672 h Inkubation lag in der Cofermentationskultur und in der *C. carboxidivorans*-Kultur bei 0,8 und der pH-Wert lag in beiden Kulturen nach der gleichen Dauer bei einem Wert von 4,8. Die *C. kluyveri*-Kultur erreichte eine OD_{600nm} von 0,22 nach 436 h nach einem Maximalwert von 0,4 nach 169 h Inkubation. Der pH-Wert der *C. kluyveri*-Kultur verblieb nahezu unverändert bei ca. 6 über den gesamten Zeitraum des Versuchs. Beim Vergleich aller drei Cofermentationskulturen untereinander ist zu sehen, dass alle drei Kulturen die nahezu gleichen OD_{600nm}- und pH-Werte bei Beendigung des Versuches erreicht hatten (Abbildung 25 C und D). Die Werte der OD_{600nm} waren in allen Cofermentationskulturen höher als in der Reinkultur von *C. carboxidivorans*, und die pH-Werte waren nahezu identisch. Die Darstellung der Stoffwechselfparameter beschränkt sich auf Ethanol, Acetat und Capronat (Abbildung 26 A, B und C). Die Ethanolkonzentration war in der repräsentativ gewählten Cofermentationskultur höher als in der Vergleichskultur, die nur *C. carboxidivorans* enthielt. Erreicht wurde eine Konzentration von 17,5 mM, welcher eine Konzentration von 12,3 mM in der *C. carboxidivorans*-Kultur entgegen stand. Die Acetatkonzentrationen waren und verliefen in beiden Kulturen über die Zeit nahezu gleich. In beiden Kulturen wurden ca. 110 mM nach 692 h detektiert. Capronat wurde zwar in geringen Konzentrationen in den Cofermentationskulturen detektiert, aber es wurde kein Anstieg dieser Konzentration festgestellt. In der Cofermentationskultur konnte bereits beim ersten Messpunkt des Versuches eine Capronatkonzentration von 2,6 mM festgestellt werden, welche sich bis zur Beendigung des Versuches nicht mehr

veränderte. Auch in der *C. carboxidivorans*-Kultur wurde Capronat nachgewiesen. Die anfängliche Konzentration war hier 0,7 mM, welche ebenso bis zum letzten Messpunkt unverändert blieb. Butanol (nicht dargestellt) konnte nur in geringen Mengen detektiert werden. Nachgewiesen wurden 0,8 mM in der ausgewählten Cofermentationskultur und 0,6 mM in der *C. carboxidivorans*-Kultur. Hexanol (ebenfalls nicht dargestellt) konnte in keiner der Kulturen nachgewiesen werden. Die detektierten Ethanol-, Acetat- und Capronatkonzentrationen waren in allen Cofermentationskulturen ähnlich vorzufinden (Abbildung 26 D, E und F). Die Ethanolkonzentrationen der Cofermentationskulturen waren im Vergleich zur *C. carboxidivorans*-Kultur immer höher. Die

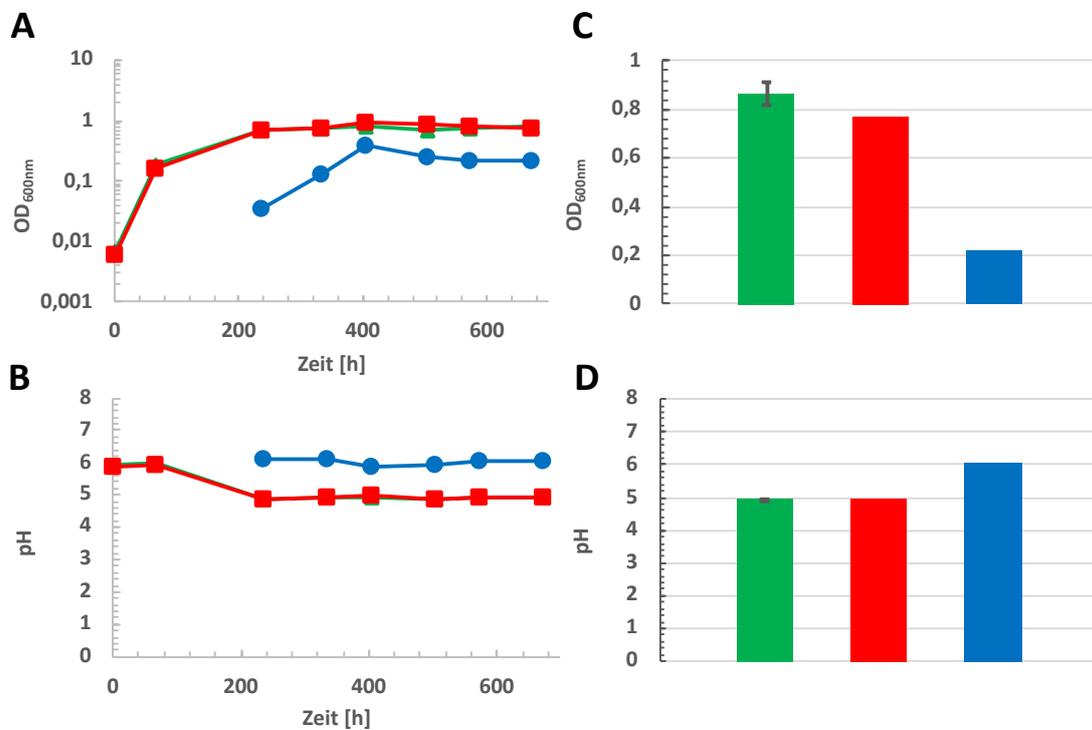


Abbildung 25: A: Wachstum, B: pH von ▲ *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* (Cofermentationskultur) in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas, ■ *C. carboxidivorans* in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas, ● *C. kluyveri* in Tanner-Medium „modified“ 2 mit der Gasphase N₂/CO₂. Synthesegas wurde bei der Cofermentationskultur einmalig nach 67 h aufgefüllt, Zugabe von *C. kluyveri* in die Cofermentationskulturen erfolgte nach 236 h (dritter Messpunkt von links). C: OD_{600nm}-Werte, D: pH der ■ drei Cofermentationskulturen (*C. carboxidivorans* und *C. kluyveri*) - Mittelwert mit eingezeichneter Standardabweichung, von ■ *C. carboxidivorans*, von ■ *C. kluyveri* zum Zeitpunkt der letzten Messung.

Acetatkonzentrationen lagen in allen Kulturen in dem Bereich, wie er in der *C. carboxidivorans*-Kultur zu finden war. Capronat wurde in allen Cofermentationskulturen nach Beendigung des Versuchs nachgewiesen, jedoch war in keiner der Kulturen eine Produktion zu verzeichnen.

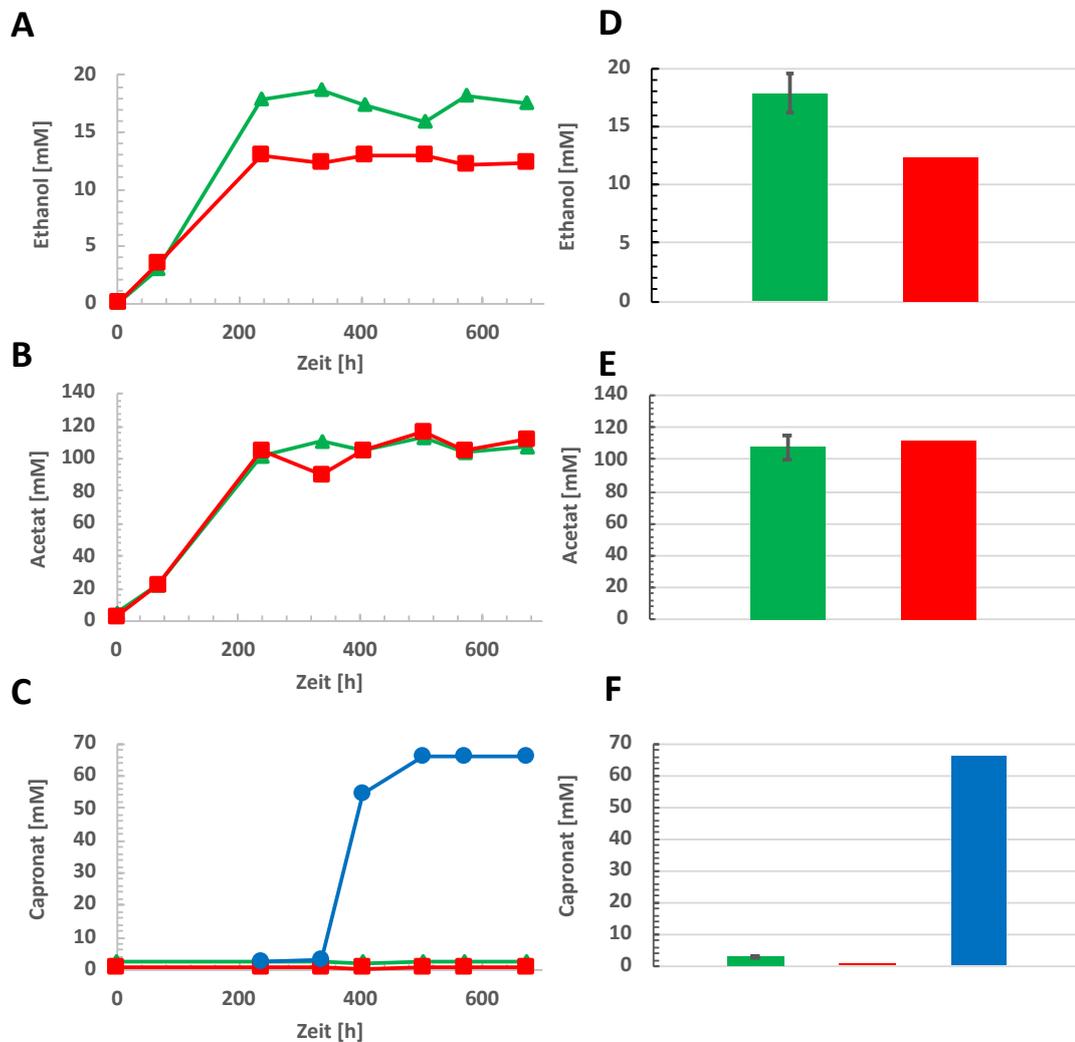


Abbildung 26: A: Ethanol-, B: Acetat-, C: Capronatkonzentrationen von ▲ *C. carboxidivorans* und *C. kluveri* (Cofermentationskultur) in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas, ■ *C. carboxidivorans* in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas, *C. kluveri* in Tanner-Medium „modified“ 2 mit der Gasphase N₂/CO₂. Synthesegas wurde bei der Cofermentationskultur einmalig nach 67 h aufgefüllt, Zugabe von ● *C. kluveri* in die Cofermentationskulturen erfolgte nach 236 h (zweiter bzw. dritter Messpunkt von links). D: Ethanol-, E: Acetat-, F: Capronatkonzentrationen der ■ drei Cofermentationskulturen (*C. carboxidivorans* und *C. kluveri*) - Mittelwert mit eingezeichneter Standardabweichung, von ■ *C. carboxidivorans*, von ■ *C. kluveri* zum Zeitpunkt der letzten Messung.

3.2.2.3 Sequentielle Cofermentation (mit einem Wechsel der Gasphase) von *C. ljungdahlii* und *C. kluyveri*

Die letzte sequentielle Cofermentation mit einem Wechsel der Gasphase während der Kultivierung wurde wiederum mit *C. ljungdahlii* und *C. kluyveri* durchgeführt. Die Durchführung war identisch zu den bisherigen sequentiellen Cofermentationen. Die Wachstumsparameter einer ausgewählten Cofermentationskultur und der *C. ljungdahlii*- und *C. kluyveri*-Kultur sind in Abbildung 27 (A und B) zu sehen. Die OD_{600nm} der Cofermentationskultur blieb unter dem Wert der *C. ljungdahlii*-Kultur. Einer OD_{600nm} von 0,6 nach 741 h Inkubation in der *C. ljungdahlii*-Kultur steht eine OD_{600nm} von 0,4 in der Cofermentationskultur gegenüber. *C. kluyveri* erreichte eine OD_{600nm} nach 433 h von 0,18

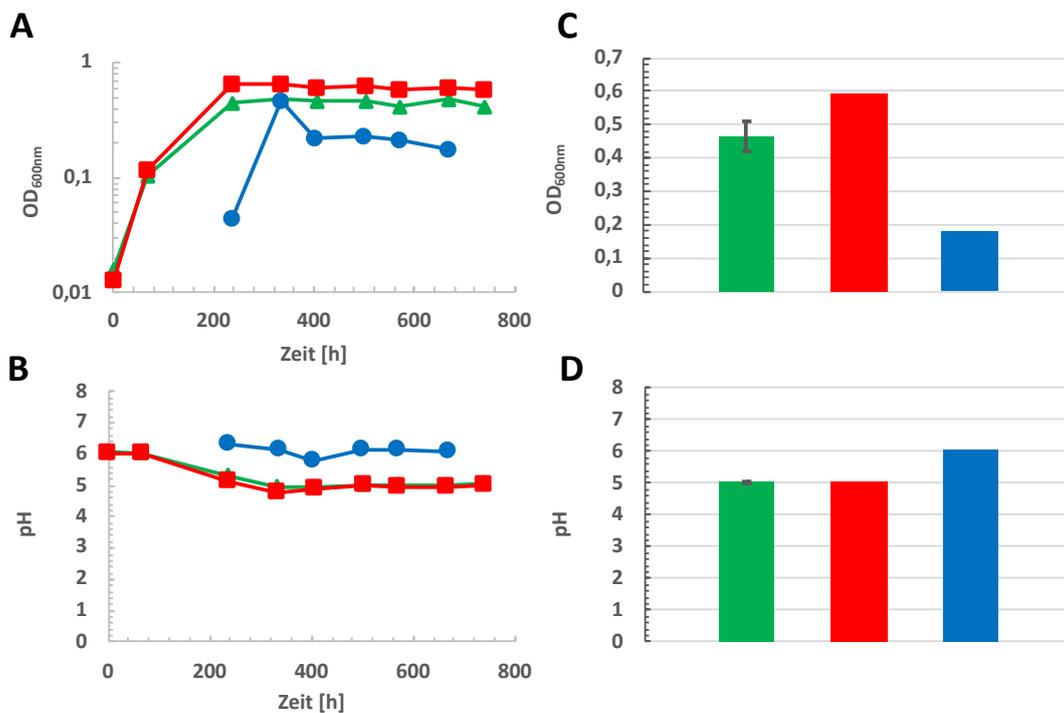


Abbildung 27: A: Wachstum, B: pH von \blacktriangle *C. ljungdahlii* und *C. kluyveri* (Cofermentationskultur) in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas, \blacksquare *C. ljungdahlii* in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas, \bullet *C. kluyveri* in Tanner-Medium „modified“ 2 mit der Gasphase N_2/CO_2 . Synthesegas wurde bei der Cofermentationskultur einmalig nach 68 h aufgefüllt, Zugabe von *C. kluyveri* in die Cofermentationskulturen erfolgte nach 236 h (dritter Messpunkt von links). C: OD_{600nm} -Werte, D: pH der \blacksquare drei Cofermentationskulturen (*C. ljungdahlii* und *C. kluyveri*) - Mittelwert mit eingezeichneter Standardabweichung, von \blacksquare *C. ljungdahlii*, von \bullet *C. kluyveri* zum Zeitpunkt der letzten Messung.

nach einem zwischenzeitlichen Maximalwert von 0,47 nach 100 h Inkubation. Alle Cofermentationskulturen zeigten vergleichbare Wachstumsparameter bei Beendigung des Versuchs (Abbildung 27 C und D). Die OD_{600nm} lag bei allen Cofermentationskulturen niedriger als bei der mitgeführten Vergleichskultur von *C. ljungdahlii*. Die pH-Werte lagen allesamt auf demselben Niveau wie bei der *C. ljungdahlii*-Kultur. Die entsprechenden Stoffwechselfparameter sind in Abbildung 28 (A, B und C) zu sehen. Die Darstellung beschränkt sich auf die Parameter Ethanol, Acetat und Capronat wie bei den bisherigen Versuchen auch. Es ist ersichtlich, dass in der *C. ljungdahlii*-Kultur mehr Ethanol gebildet wurde, als in der ausgesuchten Cofermentationskultur. In der *C. ljungdahlii*-Kultur entstanden 13,3 mM nach 741 h Kultivierung und in der Cofermentationskultur 7 mM im selben Zeitraum. Erwähnenswert ist, dass nach 236 h Inkubation deutlich höhere Werte von ca. 25 mM in beiden Kulturen festgestellt wurden, welche dann in beiden Fällen wieder abfielen. Der Verlauf der Acetatkonzentration war in der Cofermentationskultur und in der *C. ljungdahlii*-Kultur ähnlich. Bei der letzten Messung wurden in der *C. ljungdahlii*-Kultur 81,3 mM und in der Cofermentationskultur 65,7 mM Acetat detektiert. In beiden Kulturen waren während des Wachstumes noch deutlich höhere Werte mit über 100 mM festgestellt worden, welche aber nach 500 h wieder absanken. Anhand der Capronatproduktion im Falle der *C. kluyveri*-Kultur war wiederum erkennbar, dass dieser Stamm funktional war. In der gezeigten Cofermentationskultur konnte ein Anstieg der Konzentration auf 0,8 mM Capronat detektiert werden. In der *C. ljungdahlii*-Kultur konnte kein Capronat nachgewiesen werden. Abbildung 28 (D, E und F) zeigt die detektierten Konzentrationen aller Cofermentationen nach Beendigung des Versuchs. Die Ethanolkonzentration war in allen Cofermentationen am letzten Messpunkt niedriger als in der *C. ljungdahlii*-Kultur. Die Acetatkonzentration war ähnlich hoch wie bei der *C. ljungdahlii*-Kultur. In zwei von drei Kulturen war diese sogar gegenüber der Vergleichskultur leicht erhöht. Capronat konnte in allen Cofermentationen detektiert werden. Die gemessenen Konzentrationen nach 741 h waren 0,6, 0,8 und 1,2 mM. Der Konzentrationsanstieg war immer nur zum Zeitpunkt der Zugabe von *C. kluyveri* (Zeitpunkt 236 h) festzustellen.

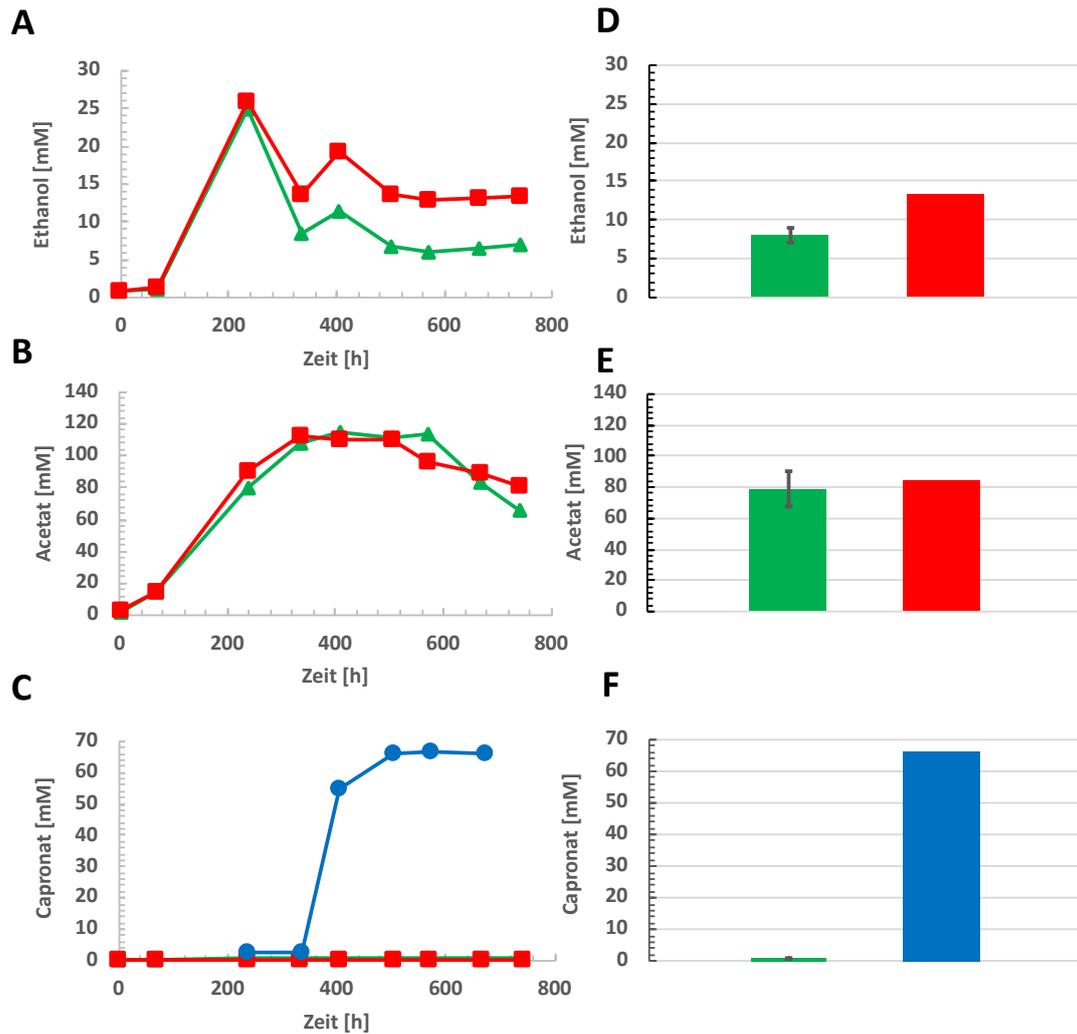


Abbildung 28: A: Ethanol-, B: Acetat-, C: Capronatkonzentrationen von \blacktriangle *C. ljungdahlii* und *C. kluyveri* (Cofermentationskultur) in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas, \blacksquare *C. ljungdahlii* in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas, *C. kluyveri* in Tanner-Medium „modified“ 2 mit der Gasphase N_2/CO_2 . Synthesegas wurde bei der Cofermentationskultur einmalig nach 67 h aufgefüllt, Zugabe von \bullet *C. kluyveri* in die Cofermentationskulturen erfolgte nach 236 h (dritter Messpunkt von links). D: Ethanol-, E: Acetat-, F: Capronatkonzentrationen der \blacksquare drei Cofermentationskulturen (*C. ljungdahlii* und *C. kluyveri*) - Mittelwert mit eingezeichneter Standardabweichung, von \blacksquare *C. ljungdahlii*, von \blacksquare *C. kluyveri* zum Zeitpunkt der letzten Messung.

3.2.2.4 Zusammenfassung der sequentiellen Cofermentation mit einem Wechsel der Gasphase während der Kultivierung

Mittels dieser sequentiellen Cofermentationen, in welchen ein Wechsel der Gasphase während der Kultivierung stattfand, konnte keine bzw. keine deutliche Produktion von Capronat festgestellt werden. Im Falle der Cofermentationen von *C. autoethanogenum* und *C. kluyveri* wurde eine geringe Menge Capronat produziert. Bei den sequentiellen Cofermentationen von *C. carboxidivorans* und *C. ljungdahlii* mit *C. kluyveri* fand nur ein Anstieg der Capronatproduktion genau zu dem Zeitpunkt, als *C. kluyveri* zugegeben wurde, statt. Die im Laufe dieser sequentiellen Cofermentationen maximal detektierten Konzentrationen an Butanol, Hexanol und Capronat sind in Tabelle 9 zu sehen.

Tabelle 9: Maximal gebildete Konzentrationen von Butanol, Hexanol und Capronat in den sequentiellen Cofermentationen mit einem Wechsel der Gasphase während der Kultivierung

	Butanol [mM]	Hexanol [mM]	Capronat [mM]
<i>C. autoethanogenum</i> + <i>C. kluyveri</i>	0	0	1,3
<i>C. carboxidivorans</i> + <i>C. kluyveri</i>	0,9	0	3,6
<i>C. ljungdahlii</i> + <i>C. kluyveri</i>	0	0	1,1

3.2.3 Sequentielle Cofermentation ohne Wechsel der Gasphase während der Kultivierung

Wie in 3.2.2 zu erkennen wurde in keiner der bisher durchgeführten sequentiellen Cofermentationen eine signifikante Produktion von Butanol, Hexanol und Capronat erzielt. Aufgrund der positiv verlaufenen simultanen Cofermentationen von *C. carboxidivorans* bzw. *C. ljungdahlii* mit *C. kluyveri* wurde auch von einer möglichen Produktion von Capronat mittels einer sequentiellen Cofermentation ausgegangen. Somit wurde diese wiederholt, aber mit einer entscheidenden Abweichung zum vorherigen sequentiellen Versuch. In den bisherigen sequentiellen Cofermentationen wurde die Gasphase nach ca. 1 ½ Wochen von Synthesegas auf N₂/CO₂ gewechselt. Da somit aber eventuell nicht die notwendige Menge an Ethanol und Acetat produziert werden konnte, wurde die Substratversorgung der acetogenen Bakterien aufrechterhalten und die Gasphase während der Kultivierung nicht gewechselt. Ein schematischer Überblick über die Fermentationsdurchführung ist in Abbildung 29 zu sehen. Die Resultate der entsprechenden Versuche werden im Folgenden dargestellt.

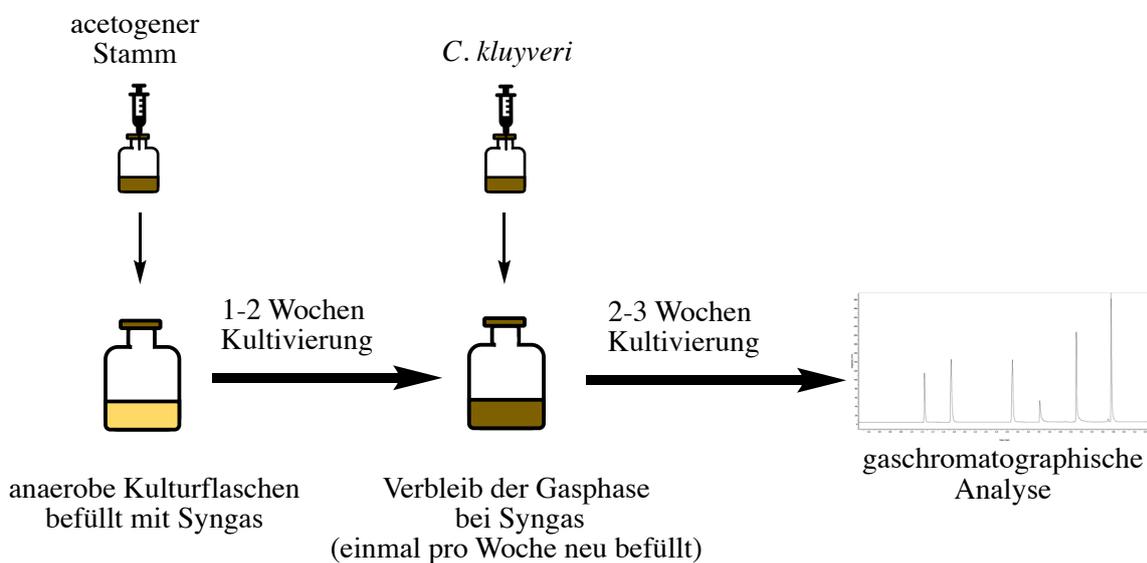


Abbildung 29: Schematische Darstellung einer sequentiellen Cofermentation ohne Wechsel der Gasphase während der Kultivierung. Die Inokulation erfolgte sequentiell mit gaschromatographischer Analyse nach insgesamt drei bis fünf Wochen Kultivierung.

3.2.3.1 Sequentielle Cofermentation (ohne Wechsel der Gasphase während der Kultivierung) von *C. autoethanogenum* und *C. kluyveri*

Die erste sequentielle Cofermentation mit abgeänderter Durchführung wurde mit *C. autoethanogenum* und *C. kluyveri* praktiziert. Die Durchführung entsprach größtenteils der sequentiellen Cofermentation mit dem Wechsel der Gasphase während der Kultivierung. Eine wichtige Abweichung war, wie bereits erwähnt, dass die Gasphase hier nicht gewechselt wurde. Das Synthesegas wurde nach drei Tagen Kultivierung (nur beim acetogenen Stamm) und dann ab dem Zeitpunkt der Zugabe von *C. kluyveri* im siebentägigen Zyklus immer wieder aufgefüllt. Der Verlauf des Wachstumsparameters OD_{600nm} und des pH-Wertes einer ausgewählten repräsentativen Cofermentationskultur ist im Vergleich zu den jeweiligen *C. autoethanogenum*- und *C. kluyveri*-Reinkulturen in Abbildung 30 (A und B) zu sehen. Die Cofermentations- und die *C. autoethanogenum*-Kultur erreichten beide eine OD_{600nm} von 0,6 nach 714 h Kultivierung. Das gleiche Bild zeigte sich beim Verlauf des pH-Wertes, da auch hier in beiden Kulturen kein Unterschied festzustellen war. Der pH-Wert sank im Laufe der Kultivierung auf einen Wert von 4,9. *C. kluyveri* erreichte eine OD_{600nm} von 0,21 bei Beendigung des Versuches. Zwischenzeitlicher Höchstwert der OD_{600nm} war 0,33 nach 143 h Inkubation. Der pH-Wert bei der Kultivierung von *C. kluyveri* zeigte zum wiederholten Male nur eine geringe Veränderung über die Zeit und fiel von 6,1 auf 6,0. Im Vergleich aller durchgeführten Cofermentationskulturen waren keine bedeutenden Unterschiede festzustellen (Abbildung 30 C und D). Lediglich eine Cofermentationskultur hatte mit einem Wert von 0,57 eine leicht niedrigere OD_{600nm} als die *C. autoethanogenum*-Kultur, während die pH-Werte alle nahezu gleich waren. Die Darstellung und Beschreibung des Verlaufes der Produktparameter beschränkt sich auf Ethanol, Acetat und Capronat zu sehen in Abbildung 31 (A, B und C). Die Ethanolkonzentration der *C. autoethanogenum*-Kultur war nur bis zu einer Kultivierungsdauer von 236 h höher als in der Cofermentationskultur und war bei Beendigung des Versuchs deutlich niedriger. Einer Konzentration von 4,4 mM in der *C. autoethanogenum*-Kultur steht eine Konzentration von 0,7 mM in der Cofermentationskultur gegenüber. Die Acetatkonzentrationen lagen in der Cofermentationskultur und der *C. autoethanogenum*-Kultur bei ca. 140 mM nach 714 h Kultivierung. Capronat wurde in höheren Mengen von 48 mM nur in der *C. kluyveri*-Kultur

nachgewiesen (Positivkontrolle). In der Cofermentationskultur war eine im Vergleich dazu deutlich geringere Menge an Capronat nachzuweisen. Es wurden 0,7 mM Capronat nach 714 h Inkubation nachgewiesen. Der Anstieg an Capronat war aber nur zu dem Zeitpunkt festzustellen, an dem *C. kluyveri* der Cofermentationskultur zugefügt wurde. Die Auswertung aller Cofermentationskulturen zeigte das gleiche Bild wie die ausgewählte Cofermentationskultur (Abbildung 31 D, E und F). Die Ethanolkonzentration war in allen Cofermentationskulturen niedriger als in der *C. autoethanogenum*-Kultur, untereinander aber ähnlich. Die Acetatkonzentrationen waren in allen Cofermentationskulturen vergleichbar zur reinen *C. autoethanogenum*-Kultur und ebenfalls in vergleichbaren

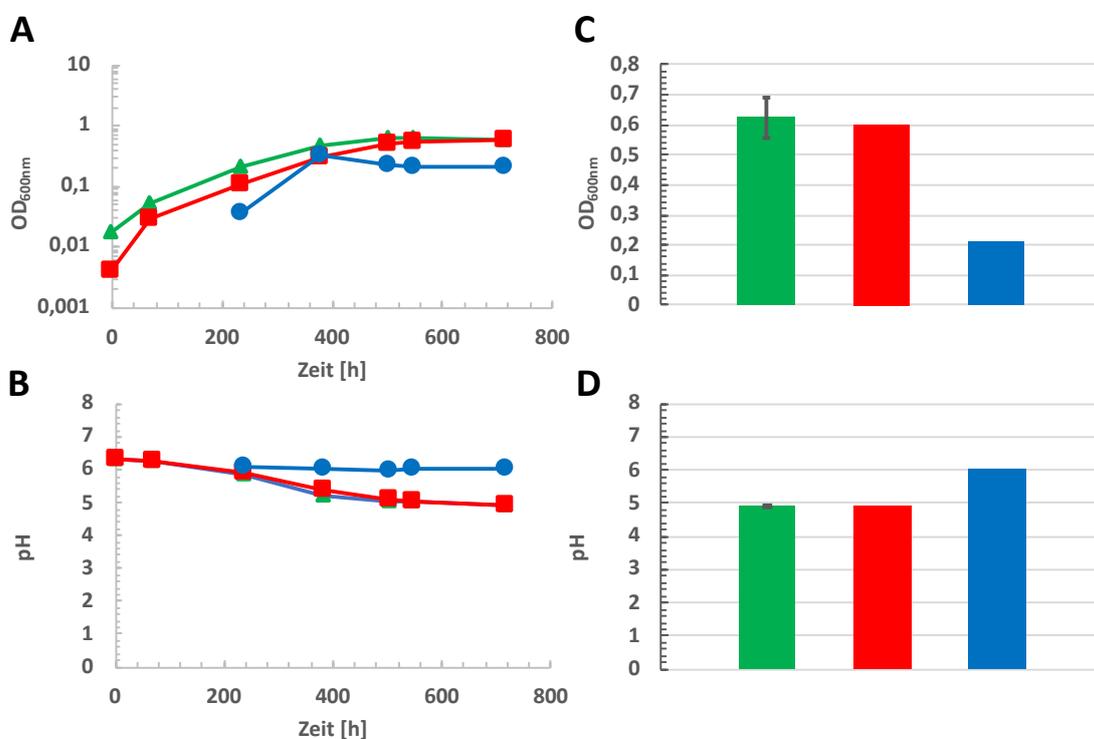


Abbildung 30: A: Wachstum, B: pH von ▲ *C. autoethanogenum* und *C. kluyveri* (Cofermentationskultur) in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas, ■ *C. autoethanogenum* in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas, ● *C. kluyveri* in Tanner-Medium „modified“ 2 mit der Gasphase N₂/CO₂. Synthesegas wurde bei der Cofermentationskultur nach 68, 236, 379 und 546 h aufgefüllt, Zugabe von *C. kluyveri* in die Cofermentationskulturen erfolgte nach 236 h (dritter Messpunkt von links). C: OD_{600nm}-Werte, D: pH der ■ drei Cofermentationskulturen (*C. autoethanogenum* und *C. kluyveri*) - Mittelwert mit eingezeichneter Standardabweichung, von ■ *C. autoethanogenum*, von ■ *C. kluyveri* zum Zeitpunkt der letzten Messung.

Konzentrationen untereinander. Capronat war in allen Cofermentationskulturen vorzufinden, aber ein Anstieg der Konzentration war immer nur beim Zeitpunkt der Zugabe von *C. kluveri* sichtbar.

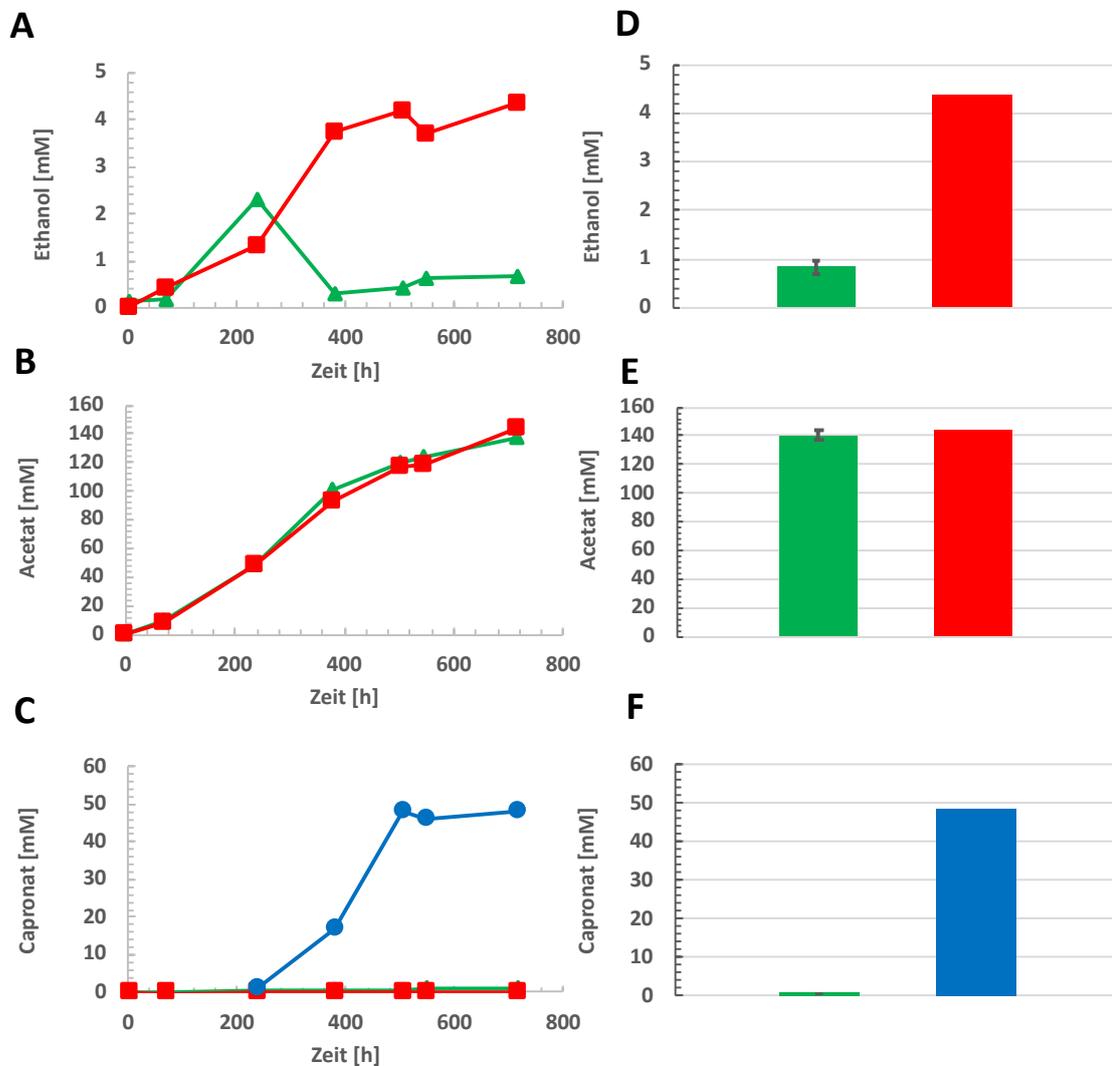


Abbildung 31: A: Ethanol-, B: Acetat-, C: Capronatkonzentrationen von ▲ *C. autoethanogenum* und *C. kluveri* (Cofermentationskultur) in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas, ■ *C. autoethanogenum* in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas, ● *C. kluveri* in Tanner-Medium „modified“ 2 mit der Gasphase N₂/CO₂. Synthesegas wurde bei der Cofermentationskultur nach 68, 236, 379 und 546 h aufgefüllt, Zugabe von *C. kluveri* in die Cofermentationskulturen erfolgte nach 236 h (dritter Messpunkt von links). D: Ethanol-, E: Acetat-, F: Capronatkonzentrationen der ■ drei durchgeführten Cofermentationskulturen (*C. autoethanogenum* und *C. kluveri*) - Mittelwert mit eingezeichneter Standardabweichung, von ■ *C. autoethanogenum*, von ■ *C. kluveri* zum Zeitpunkt der letzten Messung.

3.2.3.2 Sequentielle Cofermentation (ohne Wechsel der Gasphase während der Kultivierung) von *C. carboxidivorans* und *C. kluveri*

Der zweite Ansatz der sequentiellen Cofermentation ohne Wechsel der Gasphase während der Kultivierung wurde mit *C. carboxidivorans* und *C. kluveri* durchgeführt. Die generelle Methodik und Handhabung der Kultivierung war identisch zum vorangegangenen Versuch mit *C. autoethanogenum* (3.2.3.1). Der Verlauf der OD_{600nm} und des pH-Wertes über die Zeit einer repräsentativ gewählten Cofermentationskultur und der jeweiligen Reinkulturen von *C. carboxidivorans* und *C. kluveri* sind in Abbildung 32 (A und B) dargestellt. Die *C. carboxidivorans*-Kultur erreichte zum letzten Messpunkt

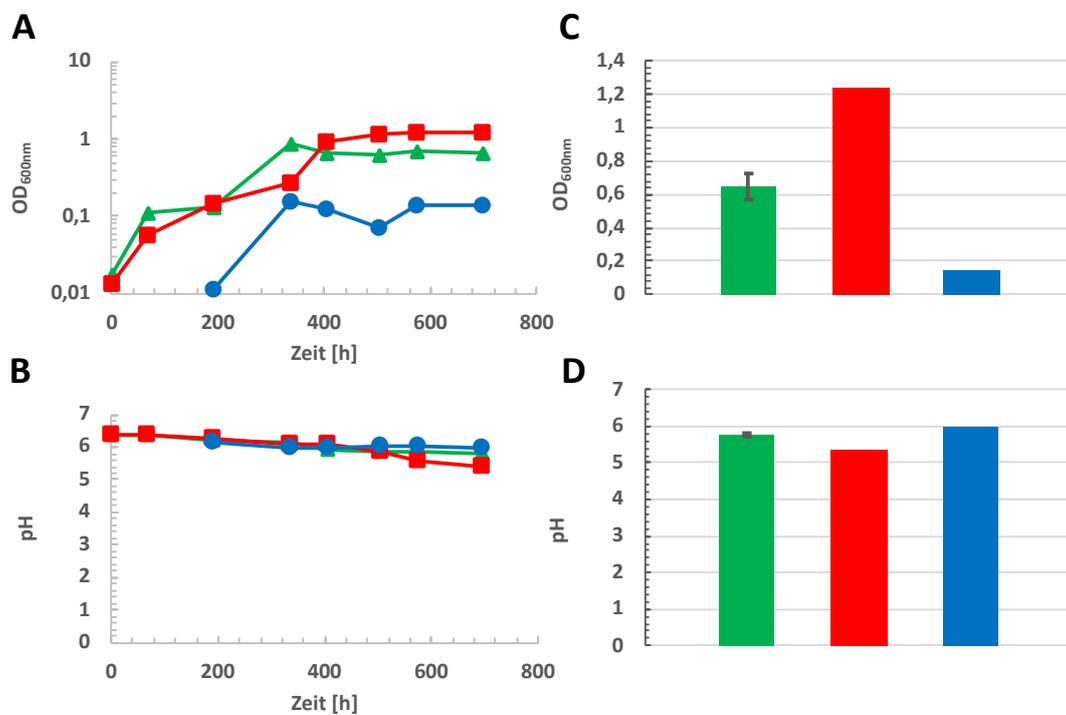


Abbildung 32: A: Wachstum, B: pH von *C. carboxidivorans* und *C. kluveri* (Cofermentationskultur) in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas, *C. carboxidivorans* in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas, *C. kluveri* in Tanner-Medium „modified“ 2 mit der Gasphase N₂/CO₂. Synthesegas wurde bei der Cofermentationskultur nach 67, 191, 405 und 574 h aufgefüllt. Zugabe von *C. kluveri* in die Cofermentationskulturen erfolgte nach 191 h (dritter Messpunkt von links). C: OD_{600nm}-Werte, D: pH der drei Cofermentationskulturen (*C. carboxidivorans* und *C. kluveri*) - Mittelwert mit eingezeichneter Standardabweichung, von *C. carboxidivorans*, von *C. kluveri* zum Zeitpunkt der letzten Messung.

eine doppelt so hohe OD_{600nm} mit 1,24 als die Cofermentationskultur mit einer OD_{600nm} von 0,67. Komplementär zum Verlauf der OD_{600nm} zeigte sich der Verlauf der pH-Werte. Der pH-Wert der *C. carboxidivorans*-Kultur fiel im Laufe des Versuches auf 5,4, während er in der Cofermentationskultur auf 5,8 sank. Im Vergleich aller Cofermentationskulturen ist zu sehen, dass die OD_{600nm} in allen Kulturen deutlich niedriger war als in der *C. carboxidivorans*-Kultur (Abbildung 32 C und D). Der pH-Wert war ebenso in allen Cofermentationskulturen höher als im Vergleich zur *C. carboxidivorans*-Kultur. Die Unterschiede dieser beiden Parameter sind, alle Cofermentationskulturen betrachtet, gering ausgefallen. Im Rahmen der Auswertung der Produkte ist der Fokus zuerst auf die Bildung der Alkohole Ethanol, Butanol und Hexanol (Abbildung 33 A, B und C) gerichtet. Die detektierten Ethanolkonzentrationen unterschieden sich stark zwischen der repräsentativen Cofermentationskultur und der *C. carboxidivorans*-Kultur. Die *C. carboxidivorans*-Kultur produzierte 75,3 mM Ethanol nach fast 700 h Kultivierung. In der Cofermentationskultur war diese Konzentration mit 2,8 mM um mehr als 25-fach geringer. In der Cofermentationskultur war zum selben Zeitpunkt wie in der *C. carboxidivorans*-Kultur ein Anstieg der Ethanolkonzentration festzustellen. Zu diesem Zeitpunkt (335 h) konnten noch 8,1 mM Ethanol detektiert werden. Diese Konzentration fiel danach immer weiter ab. Im Falle der Butanolkonzentration zeigte sich eine zur Ethanolkonzentration umgekehrte Situation. Mit 2,5 mM war die Konzentration an Butanol doppelt so hoch als in der *C. carboxidivorans*-Kultur, die nur eine Konzentration von 1,4 mM erreichte. Erwähnenswert ist, dass die Butanolkonzentration in der Cofermentationskultur nach 335 h einen Maximalwert von 5,9 mM erreichte und abschließend wieder sank. Ähnlich verhält es sich bei der Hexanolkonzentration. Hexanol war nur in der Cofermentationskultur detektierbar und erreichte eine Konzentration von 2,6 mM zum letzten Messpunkt. Wie im Falle der Butanolanalyse wurde auch hier mit einem Wert von 3,1 mM nach 335 h Inkubation eine höhere Konzentration detektiert. Diese Konzentration fiel ebenfalls und stieg gegen Ende des Versuchs wieder langsam an. Alle drei Cofermentationskulturen zeigten vergleichbare Resultate, wie in Abbildung 33 (D, E und F) zu sehen ist. Die Ethanolkonzentration war in allen Cofermentationskulturen deutlich niedriger als in der *C. carboxidivorans*-Kultur. Die Butanolkonzentration war jeweils höher als in der *C. carboxidivorans*-Kultur und Hexanol wurde in zueinander

ähnlichen Mengen immer nur in den Cofermentationskulturen detektiert. In Abbildung 34 (A, B und C) ist der Verlauf der Acetatkonzentrationen zu sehen, welche ähnlich zum Verlauf der vorher beschriebenen Ethanolkonzentration war. Die Acetatkonzentration in der *C. carboxidivorans*-Kultur war mit einer Konzentration von 65,3 mM doppelt so hoch wie in der Cofermentationskultur mit 32,3 mM. Die höchsten Butyratkonzentrationen konnten in der Cofermentationskultur mit einem Wert von 12,7 mM nach 696 h

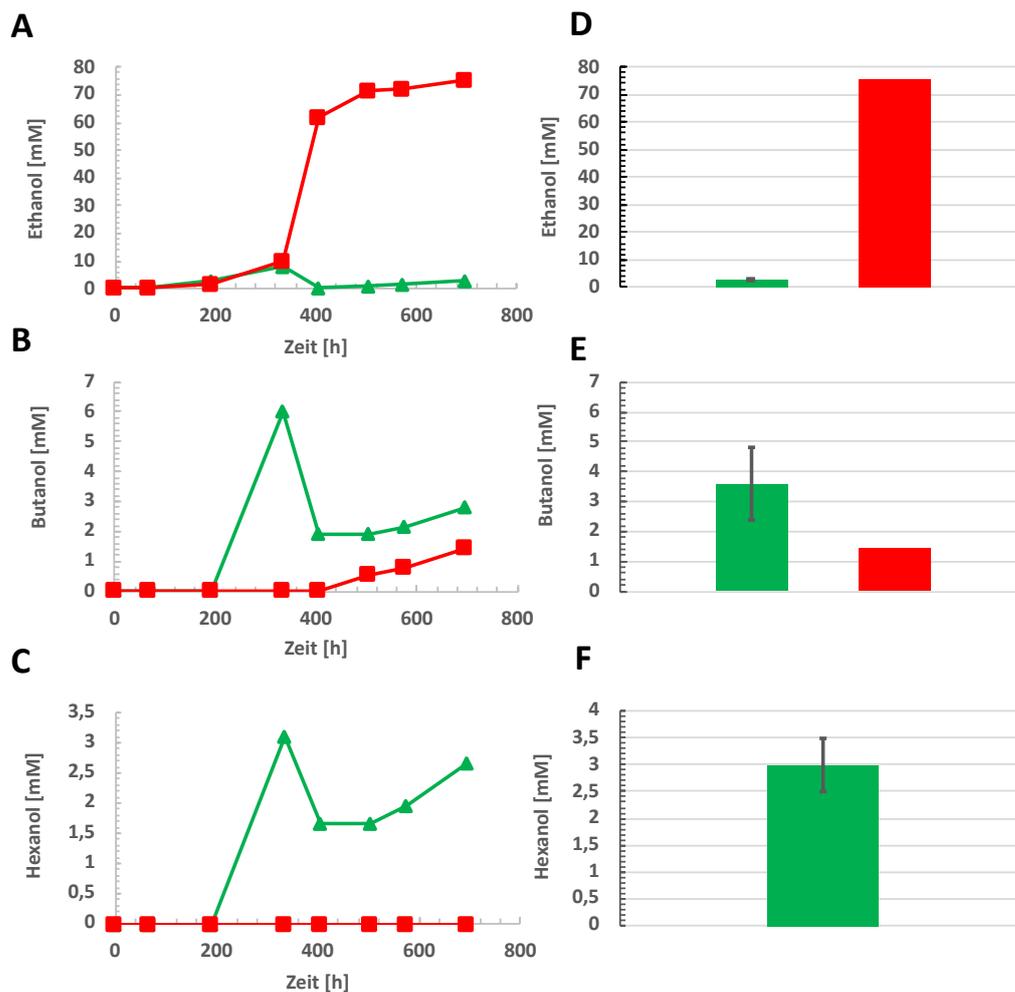


Abbildung 33: A: Ethanol-, B: Butanol-, C: Hexanolkonzentrationen von \blacktriangle *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* (Cofermentationskultur) in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas, \blacksquare *C. carboxidivorans* in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas. Synthesegas wurde aufgefüllt nach 67, 191, 405 und 574 h; Zugabe von *C. kluyveri* in die Cofermentationskulturen erfolgte nach 191 h (dritter Messpunkt von links). D: Ethanol-, E: Butanol-, F: Hexanolkonzentrationen der \blacksquare drei durchgeführten Cofermentationskulturen (*C. carboxidivorans* und *C. kluyveri*) - Mittelwert mit eingezeichneter Standardabweichung, von \blacksquare *C. carboxidivorans* zum Zeitpunkt der letzten Messung.

Kultivierung erzielt werden. Butyrat wurde auch in der *C. kluyveri*-Kultur detektiert und diese Produktion (Konzentration von 5,9 mM) zeigte erneut zusammen mit der erbrachten Capronatproduktion die Funktionalität der *C. kluyveri*-Kultur. Des Weiteren

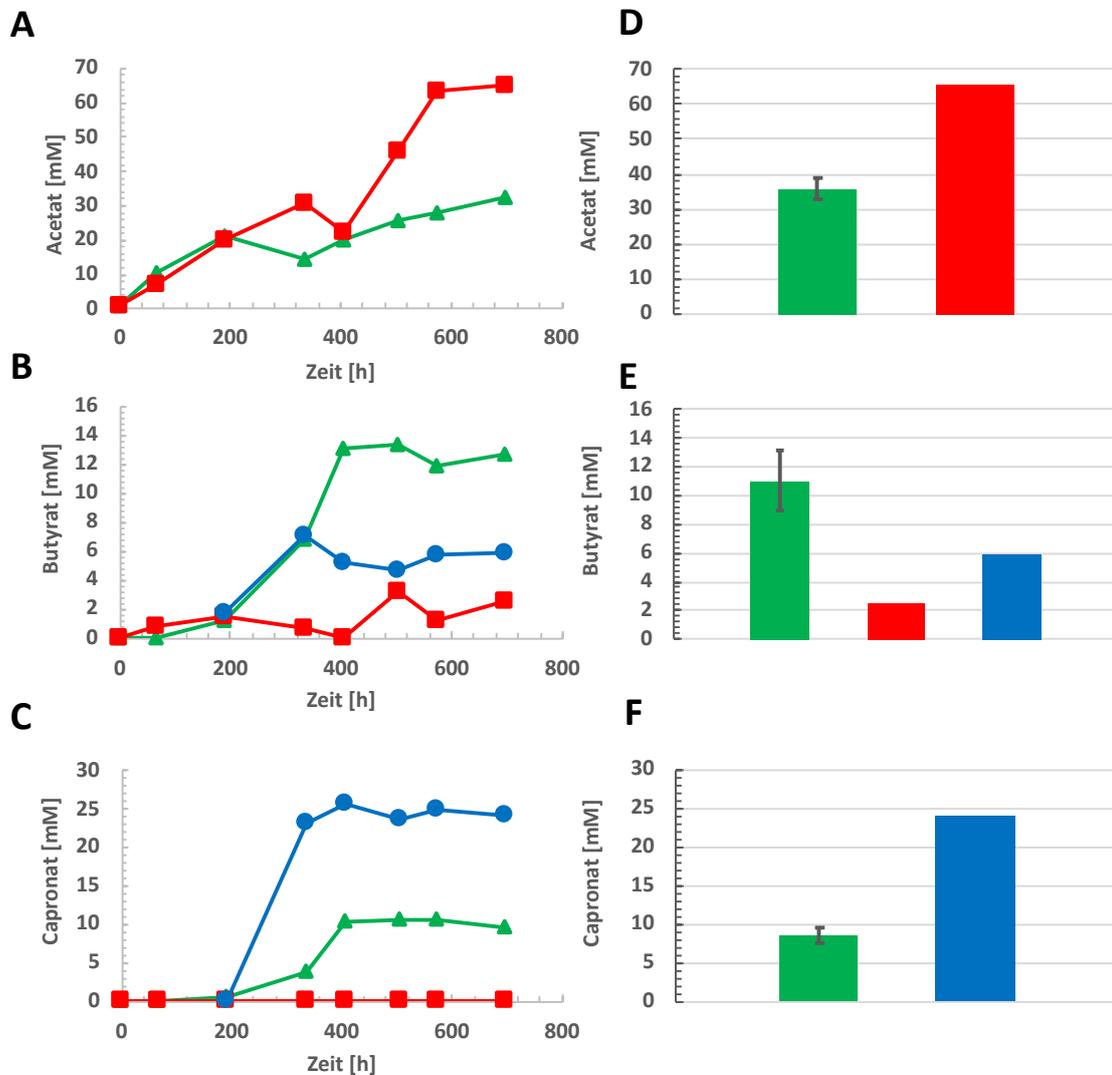


Abbildung 34: A: Acetat-, B: Butyrat-, C: Capronatkonzentrationen von ▲ *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* (Cofermentationskultur) in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas, ■ *C. carboxidivorans* in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas, ● *C. kluyveri* in Tanner-Medium „modified“ 2 mit der Gasphase N₂/CO₂. Synthesegas wurde aufgefüllt nach 67, 191, 405 und 574 h; Zugabe von *C. kluyveri* in die Cofermentationskulturen erfolgte nach 191 h (dritter Messpunkt von links). D: Acetat-, E: Butyrat-, F: Capronatkonzentrationen der ■ drei Cofermentationskulturen (*C. carboxidivorans* und *C. kluyveri*) - Mittelwert mit eingezeichneter Standardabweichung, von ■ *C. carboxidivorans*, von ■ *C. kluyveri* zum Zeitpunkt der letzten Messung.

wurde Butyrat auch in der *C. carboxidivorans*-Kultur detektiert. Mit einer Konzentration von 2,5 mM war diese jedoch fünfmal geringer als in der Cofermentationskultur. Capronat konnte wiederum beim Vergleich der *C. carboxidivorans*- und Cofermentationskultur nur in dieser nachgewiesen werden. Insgesamt konnte eine Konzentration von 9,7 mM zum letzten Messpunkt des Versuches detektiert werden. Die Auswertung der Fettsäurekonzentrationen aller Kulturen zeigte die Reproduzierbarkeit der Ansätze (Abbildung 34 D, E und F). Die Acetatkonzentration war in allen Cofermentationskulturen niedriger als in der *C. carboxidivorans*-Kultur, während Butyrat in allen Cofermentationskulturen deutlich erhöht gegenüber der *C. carboxidivorans*-Kultur war. Capronat war in vergleichbaren Konzentrationen in allen drei Kulturen detektierbar (8,0-9,6 mM). Zur besseren Übersichtlichkeit und als Zusammenfassung sind alle analysierten Stoffwechselfparameter der ausgewählten Cofermentationskultur und der *C. carboxidivorans*-Kultur in Bezug zur OD_{600nm} in Abbildung 35 zu sehen. Daraus ersichtlich ist, dass nach 379 h Inkubation die Konzentrationen von Ethanol, Butanol und Hexanol ihr Maximum erreichten, darauf jedoch wieder abfielen, während die Fettsäuren

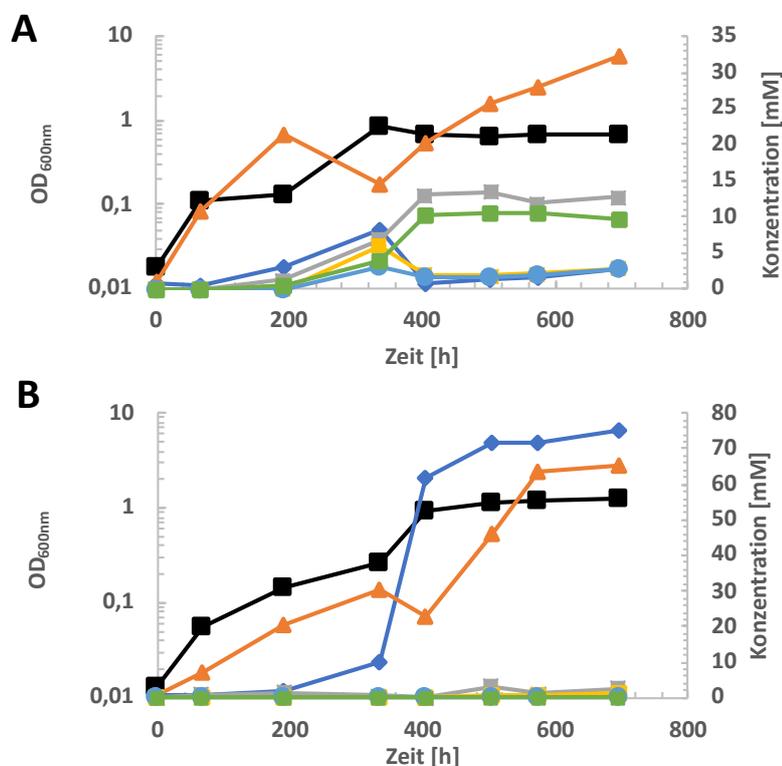


Abbildung 35: ■ OD_{600nm} , ◆ Ethanol-, ▲ Acetat-, ■ Butyrat-, ■ Butanol-, ● Hexanol-, und ■ Capronatkonzentration der A: Cofermentationskultur, B: *C. carboxidivorans*-Kultur.

Acetat, Butyrat und Capronat ab demselben Zeitpunkt deutlich anstiegen. In der *C. carboxidivorans*-Kultur war zu erkennen, dass nach 379 h Kultivierung die Ethanolkonzentration stark anstieg, während sie genau zu diesem Zeitpunkt in der Cofermentationskultur wieder abfiel.

3.2.3.3 Sequentielle Cofermentation (ohne Wechsel der Gasphase während der Kultivierung) von *C. ljungdahlii* und *C. kluyveri*

Für den dritten Ansatz der sequentiellen Cofermentationen ohne Wechsel der Gasphase während der Kultivierung wurden *C. ljungdahlii* und *C. kluyveri* verwendet. Die Durchführung war identisch zu den bisherigen sequentiellen Cofermentationen ohne Wechsel der Gasphase (3.2.3.1, 3.2.3.2). Der Verlauf der OD_{600nm} und der Verlauf des pH-Wertes einer repräsentativen Cofermentationskultur sowie der Reinkulturen von *C. ljungdahlii* und *C. kluyveri* sind in Abbildung 36 (A und B) zu sehen. Die Cofermentationskultur erreichte mit einem Wert von 0,93 erst zum letzten Messpunkt eine höhere OD_{600nm} als die *C. ljungdahlii*-Kultur mit einem Wert von 0,75. Die Cofermentationskultur hatte eine deutliche längere „Lag“-Phase als die *C. ljungdahlii*-Kultur. Die *C. kluyveri*-Kultur erreichte eine OD_{600nm} von 0,21 nach 478 h Inkubation. Der temporäre Maximalwert lag bei 0,39 nach 166 h Kultivierung. Der pH-Wert der *C. ljungdahlii*-Kultur sank am weitesten ab auf einen Wert von 4,8 bei Beendigung des Versuchs. Die Cofermentationskultur hatte einen abschließenden pH-Wert von 5,4. In der *C. kluyveri*-Kultur fiel der pH-Wert leicht von 6,2 auf 6,0 über die Kultivierungsdauer. Die OD_{600nm} und der pH-Wert aller Cofermentationskulturen werden untereinander in Abbildung 36 (C und D) verglichen. Es ist zu sehen, dass in allen Kulturen eine höhere OD_{600nm} erreicht wurde als in der entsprechenden Reinkultur mit *C. ljungdahlii*. Ein wichtiger Aspekt ist, dass der pH-Wert zweier der drei Cofermentationskulturen nach der vollständigen Inkubationsdauer auf denselben pH-Wert fiel wie der der *C. ljungdahlii*-Kultur (pH-Wert 4,8) und nur der pH-Wert der zuvor gezeigten ausgewählten Cofermentationskultur noch bei einem Wert von 5,4 lag. In der Auswertung der Stoffwechselfparameter werden zuerst die Konzentrationen von Ethanol, Butanol und Hexanol betrachtet (Abbildung 37 A, B und C). In all diesen Fällen waren deutliche Unterschiede zwischen der Cofermentationskultur und der *C. ljungdahlii*-Kultur

festzustellen. Die Ethanolkonzentration der *C. ljungdahlii*-Kultur war am Ende des Versuches mit einem Wert von 25,8 mM mehr als dreimal so hoch wie in der Cofermentationskultur mit einem Wert von 8,0 mM. Die Ethanolkonzentration sank nach 330 h Kultivierung ausgehend von einer Konzentration von 3,7, auf eine Konzentration von 1,6 mM zum nächsten Messpunkt ab und erreichte erst gegen Ende des Wachstumsversuches den vorher dargestellten Maximalwert von fast 8 mM. Butanol und Hexanol konnten nur in der ausgewählten Cofermentationskultur nachgewiesen werden. Es wurde zum Ende des Wachstumsversuches eine Butanolkonzentration von 6,7 mM und eine Hexanolkonzentration von 4,0 mM erreicht. Der Vergleich der gemessenen

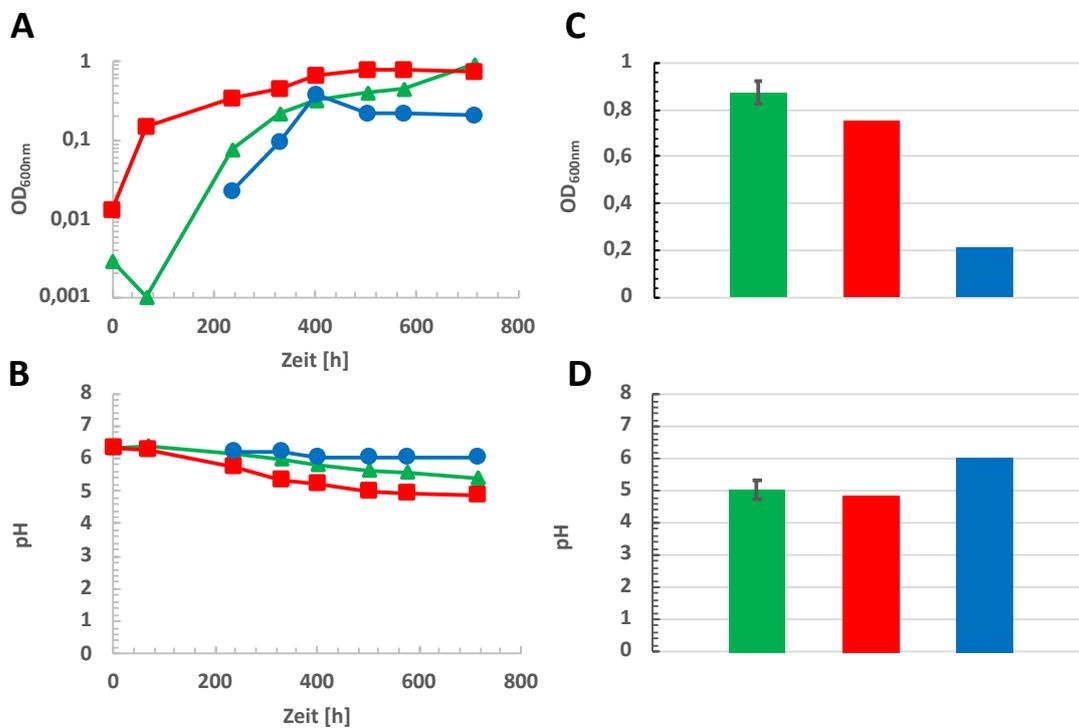


Abbildung 36: A: Wachstum, B: pH von ▲ *C. ljungdahlii* und *C. kluyveri* (Cofermentationskultur) in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas, ■ *C. ljungdahlii* in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas, ● *C. kluyveri* in Tanner-Medium „modified“ 2 mit der Gasphase N₂/CO₂. Synthesegas wurde bei der Cofermentationskultur nach 68, 236, 402 und 576 h aufgefüllt, Zugabe von *C. kluyveri* in die Cofermentationskulturen erfolgte nach 236 h (dritter Messpunkt von links). C: OD_{600nm}-Werte, D: pH der ■ drei Cofermentationskulturen (*C. ljungdahlii* und *C. kluyveri*) - Mittelwert mit eingezeichneter Standardabweichung, von ■ *C. ljungdahlii*, von ■ *C. kluyveri* zum Zeitpunkt der letzten Messung.

Konzentrationen in allen drei Cofermentationskulturen zeigte zum ersten Mal im Rahmen der Cofermentation bedeutende Abweichungen (Abbildung 37 D, E und F). Die Ethanolkonzentration war am niedrigsten in der zuvor gezeigten Cofermentationskultur. Die anderen Kulturen hatten im Vergleich dazu eine noch erhöhte Ethanolkonzentration von 23,3 mM bzw. 16,4 mM bei Beendigung des Versuches. Butanol wurde in größeren Konzentrationen nur in der gezeigten Cofermentationskultur detektiert. In einer weiteren

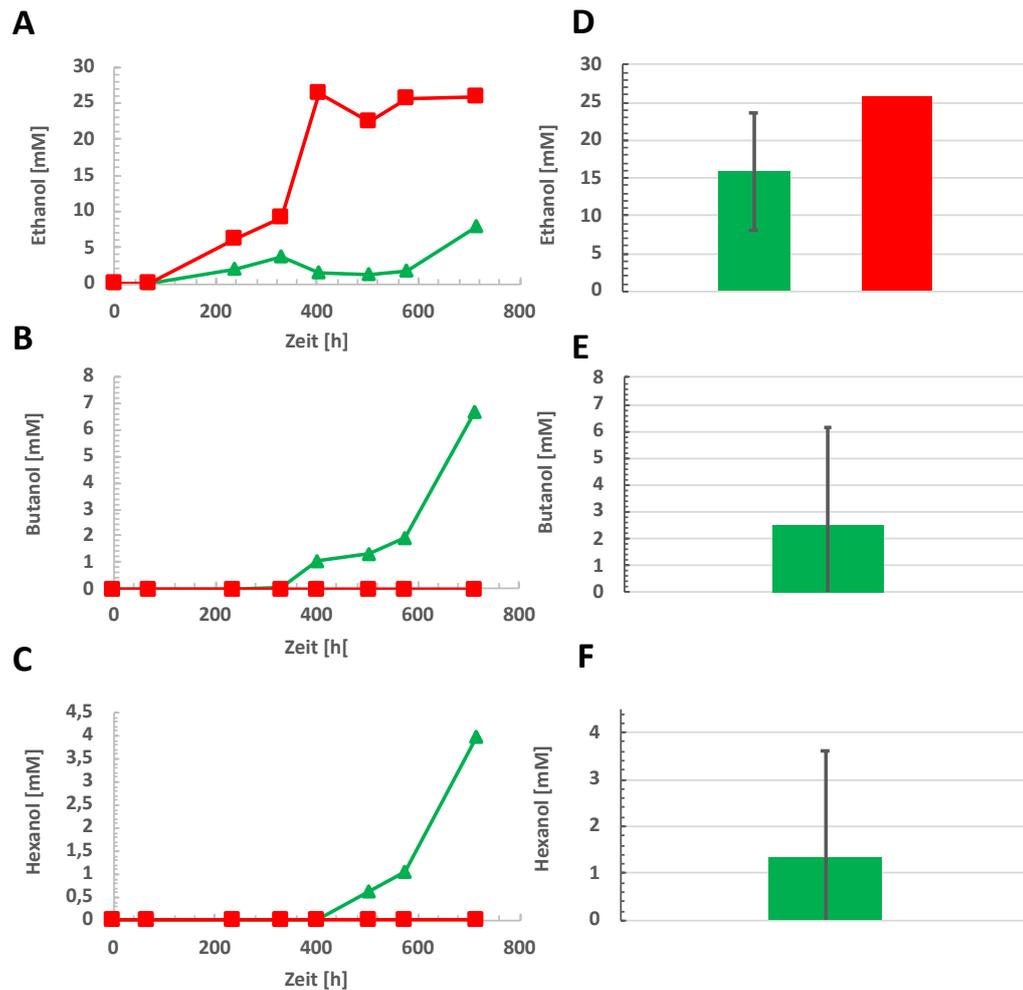


Abbildung 37: A: Ethanol-, B: Butanol-, C: Hexanolkonzentrationen von \blacktriangle *C. ljungdahlii* und \blacktriangle *C. kluyveri* (Cofermentationskultur) in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas, \blacksquare *C. ljungdahlii* in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas. Synthesegas wurde aufgefüllt nach 68, 236, 402 und 576 h; Zugabe von *C. kluyveri* in die Cofermentationskulturen erfolgte nach 236 h (dritter Messpunkt von links). D: Ethanol-, E: Butanol-, F: Hexanolkonzentrationen der \blacksquare drei Cofermentationskulturen (*C. ljungdahlii* und *C. kluyveri*) - Mittelwert mit eingezeichneter Standardabweichung, von \blacksquare *C. ljungdahlii* zum Zeitpunkt der letzten Messung.

Cofermentationskultur konnte noch eine Konzentration von 0,8 mM gemessen werden. Hexanol konnte dagegen nur in der gezeigten Cofermentationskultur detektiert werden (4,0 mM) und in keiner der zwei anderen Kulturen. Die weitere Auswertung zeigt nun den Verlauf der Konzentrationen der Fettsäuren Acetat, Butyrat und Capronat der ausgewählten Cofermentationskultur (Abbildung 38 A, B und C). Die Acetatkonzentration

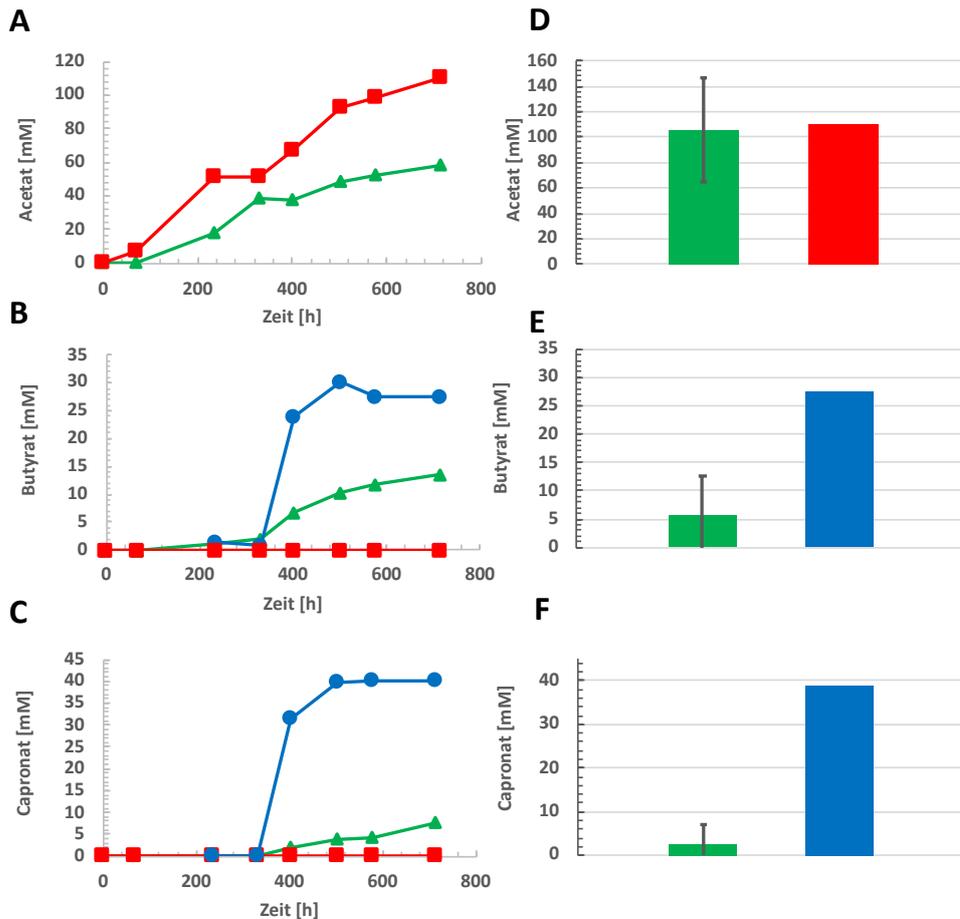


Abbildung 38: A: Acetat-, B: Butyrat-, C: Capronatkonzentrationen von ▲ *C. ljungdahlii* und *C. kluyveri* (Cofermentationskultur) in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas, ■ *C. ljungdahlii* in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas, ● *C. kluyveri* in Tanner-Medium „modified“ 2 mit der Gasphase N₂/CO₂. Synthesegas wurde aufgefüllt nach 68, 236, 402 und 576 h; Zugabe von *C. kluyveri* in die Cofermentationskulturen erfolgte nach 236 h (dritter Messpunkt von links). D: Acetat-, E: Butyrat-, F: Capronatkonzentrationen der ■ drei Cofermentationskulturen (*C. ljungdahlii* und *C. kluyveri*) - Mittelwert mit eingezeichneter Standardabweichung, von ■ *C. ljungdahlii*, von ■ *C. kluyveri* zum Zeitpunkt der letzten Messung.

der *C. ljungdahlii*-Kultur war mit einer Konzentration von 110,1 mM nach 714 h fast doppelt so hoch wie in der Cofermentationskultur mit 58,4 mM. Butyrat wurde in der *C. ljungdahlii*-Kultur nicht nachgewiesen. In der Cofermentationskultur konnte hingegen Butyrat nachgewiesen werden. Produziert wurden 13,6 mM Butyrat gegen Ende des Versuchs. Die Butyratproduktion begann 94 h nach der Zugabe von *C. kluyveri*. Neben Butyrat wurde auch Capronat in der gezeigten Cofermentationskultur gebildet. Zum letzten Messpunkt war eine Konzentration von 7,6 mM Capronat feststellbar, während in der *C. ljungdahlii*-Kultur kein Capronat nachzuweisen war. Die *C. kluyveri*-Kultur war funktional, da von ihr sowohl Butyrat als auch Capronat gebildet wurde (27,5 mM Butyrat und 40,1 mM Capronat). Der Vergleich aller Cofermentationskulturen untereinander zeigte dieselben starken Abweichungen der Triplikate wie die Analysen zuvor (Abbildung 38 D, E und F). Acetat war zwar in allen Cofermentationskulturen nachweisbar, die detektierten Konzentrationen unterschieden sich aber deutlich. Die ausgewählte Cofermentationskultur bildete, wie bereits gezeigt, 58,4 mM Acetat. Die anderen Kulturen hatten im Vergleich dazu deutlich erhöhte Konzentrationen von 130,3 bzw. 127,2 mM Acetat und waren damit so hoch wie in der Vergleichskultur von *C. ljungdahlii*. Butyrat war nur in zwei von drei Kulturen nachweisbar. Davon einmal die gezeigte Konzentration

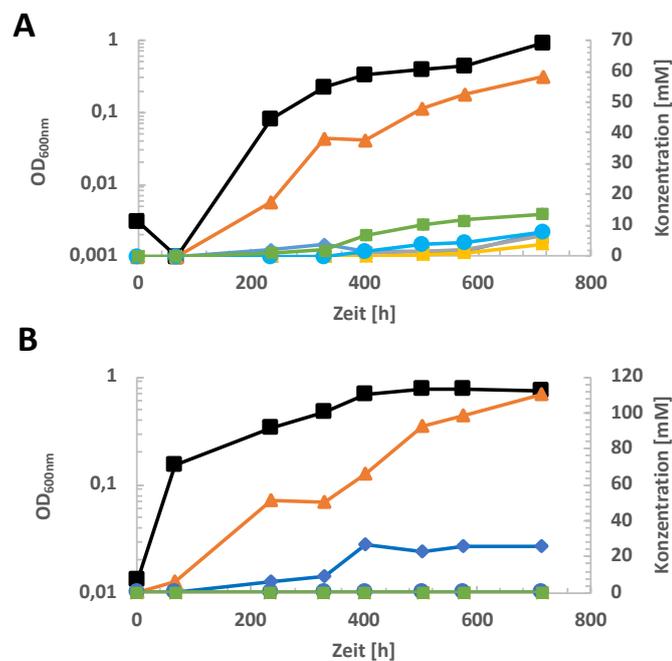


Abbildung 39: ■ OD_{600nm}, ◆ Ethanol-, ▲ Acetat-, ■ Butyrat-, ■ Butanol-, ● Hexanol-, und ■ Capronatkonzentration der A: Cofermentationskultur, B: *C. ljungdahlii*-Kultur.

von 13,6 mM der ausgewählten Kultur und in einer weiteren Kultur eine Konzentration von 3,3 mM am Ende des Versuches. Capronat konnte nur in einer der Cofermentationskulturen nachgewiesen werden, in der gezeigten Konzentration von 7,6 mM nach 714 h. Die gemessenen Produktkonzentrationen der capronatproduzierenden Cofermentationskultur sind zusammenfassend in Abbildung 39 gegen die OD_{600nm} aufgetragen. Ebenfalls mit aufgeführt ist die *C. ljungdahlii*-Reinkultur.

3.2.3.4 Zusammenfassung der sequentiellen Cofermentation ohne Wechsel der Gasphase während der Kultivierung

Die im Laufe dieser sequentiellen Cofermentationen (ohne Wechsel der Gasphase während der Kultivierung) maximal produzierten Konzentrationen an Butanol, Hexanol und Capronat sind in Tabelle 10 zu sehen. Die sequentielle Cofermentation mit *C. autoethanogenum* erbrachte die niedrigste Capronatkonzentration mit 0,9 mM. Wie in 3.2.3.1 dargestellt wurde diese Capronatproduktion nur bei der Zugabe von *C. kluyveri* festgestellt. Butanol und Hexanol wurden in diesen Versuchen nicht nachgewiesen. Die höchsten Konzentrationen an Butanol, Hexanol und Capronat wurden im Ansatz mit *C. carboxidivorans* erzielt. Alle drei Substanzen wurden ebenfalls in den Versuchen mit *C. ljungdahlii* produziert. Es ist hier aber anzumerken, dass diese Konzentrationen nur von einer der drei Cofermentationskulturen produziert wurden (siehe 3.2.3.3).

Tabelle 10: Maximal gebildete Konzentrationen an Butanol, Hexanol und Capronat in den sequentiellen Cofermentationen ohne Wechsel der Gasphase während der Kultivierung

	Butanol [mM]	Hexanol [mM]	Capronat [mM]
<i>C. autoethanogenum</i> + <i>C. kluyveri</i>	0	0	0,9
<i>C. carboxidivorans</i> + <i>C. kluyveri</i>	6,0	3,9	10,5
<i>C. ljungdahlii</i> + <i>C. kluyveri</i>	6,7	4,0	7,6

3.2.4 Separate biphasische Fermentation

Die grundlegende Eigenschaft der bisher gezeigten Versuche war, dass sich in jeder Cofermentation beide Stämme, also der acetogene Stamm und der *C. kluyveri*-Stamm, sich gleichzeitig ab einem bestimmten Zeitpunkt der Kultivierung in den Kulturflaschen befanden. Im Gegensatz dazu wurde nun eine Methodik angewandt, in der sich beide Stämme zu keinem Zeitpunkt der Kultivierung gleichzeitig in den Kulturflaschen befanden. Die Kultivierung erfolgte somit getrennt voneinander, im weiteren bezeichnet als **separat**. Ein schematischer Überblick des Versuchsaufbaus ist in Abbildung 40 dargestellt. Da in bisherigen Versuchen keine zufriedenstellenden Resultate bei den Cofermentationen mit *C. autoethanogenum* erzielt wurden, wurden mit diesem Stamm keine weiteren Versuche durchgeführt. Für die separate biphasische Fermentation wurde mit der Kultivierung der

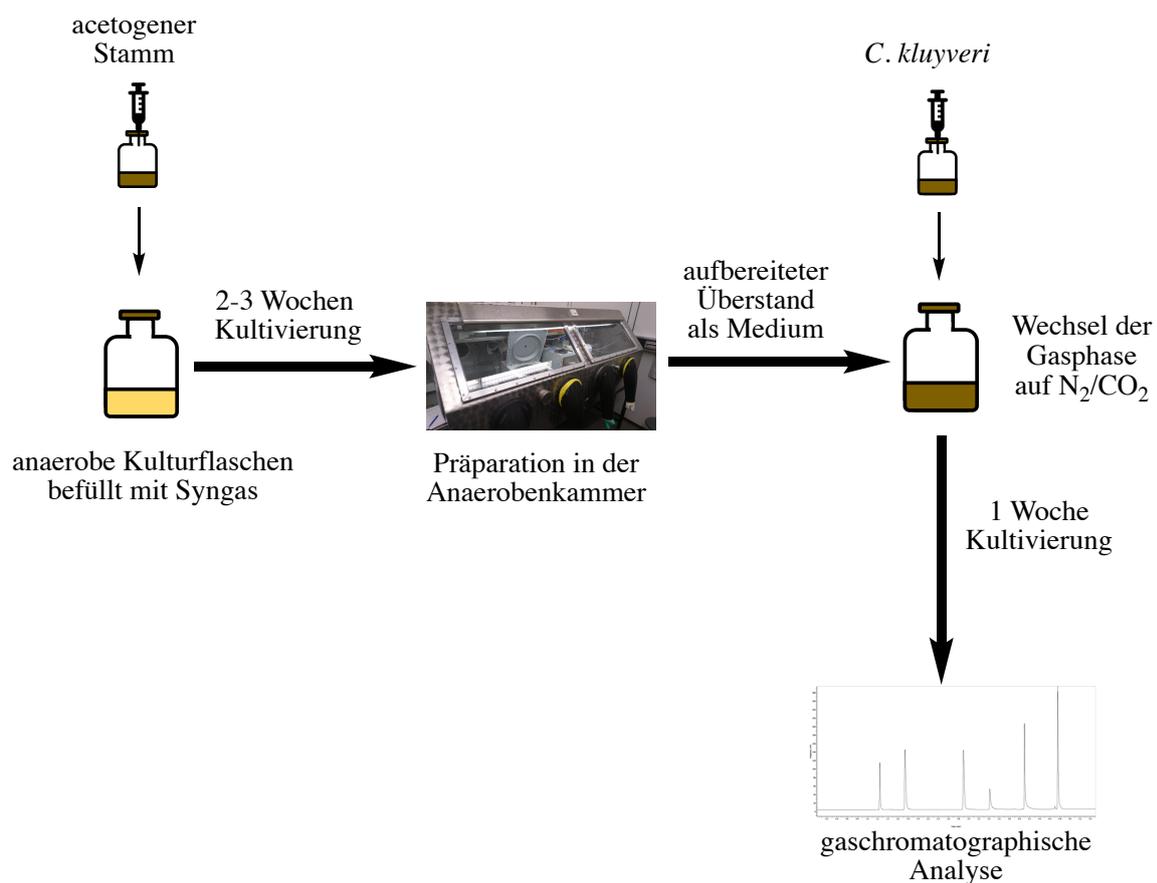


Abbildung 40: Schematische Darstellung einer separaten biphasischen Fermentation. Die acetogene Kultur wurde zwei bis drei Wochen kultiviert und dann aus dieser ein Medium für die anschließende Kultivierung von *C. kluyveri* präpariert. *C. kluyveri* wurde eine Woche in diesem Medium kultiviert mit gaschromatographischer Analyse nach Beendigung.

acetogenen Stämme in 1000-ml-Müller-Krempel-Flaschen befüllt mit Synthesegas begonnen. Diese Kulturen, im Weiteren auch immer wieder als acetogene Kultur bezeichnet, wurden wie bisher bei 37 °C inkubiert, aber dieses Mal zusätzlich unter schüttelnden Bedingungen. Das Schütteln von Kulturen wurde bisher vermieden, da wie bereits zuvor beschrieben (2.5.2.3) verhindert werden sollte, dass Kohlenmonoxid durch das Medium diffundiert. Da in diesen Kulturen aber zu keinem Zeitpunkt *C. kluyveri* enthalten war, welcher negativ auf die Anwesenheit von Kohlenmonoxid reagiert (Inhibition des Wachstums), wurden zur besseren Substratversorgung der acetogenen Stämme die Kulturen geschüttelt. Nach mehrwöchiger Kultivierung wurde aus diesen Kulturen, wie in 2.3.1.2 beschrieben, ein Nährmedium für *C. kluyveri* präpariert. *C. kluyveri* wurde dann in diesem präparierten Medium unter der Verwendung von N₂/CO₂ als Gasphase kultiviert. In der folgenden Darstellung der Resultate dieser Versuche werden immer zuerst die acetogenen Kulturen beschrieben und dann die Resultate, welche bei der Kultivierung von *C. kluyveri* in dem Medium, welches aus diesen acetogenen Kulturen präpariert wurde, erzielt wurden.

3.2.4.1 Separate biphasische Fermentation von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri*

Die erste separate biphasische Fermentation wurde mit *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* durchgeführt. Die Resultate der Kultivierung der acetogenen Kulturen sind in 3.2.4.1.1 und die Resultate der Kultivierung von *C. kluyveri* in diesen ausgehend von acetogenen Kulturen präpariertem Medium in 3.2.4.1.2 zu sehen.

3.2.4.1.1 Resultate der Kultivierung der acetogenen Kulturen

Für die separate biphasische Fermentation wurden zunächst vier 1000-ml-Müller-Krempel-Flaschen, welche 100 ml Tanner-Medium „modified“ enthielten, mit einer stationär gewachsenen *C. carboxidivorans*-Kultur inokuliert. Die Gasphase bestand aus Synthesegas, welches erstmals nach drei Tagen und dann in einem siebentägigen Zyklus aufgefüllt wurde. Aus drei von vier Kulturflaschen wurde jeweils ein Nährmedium präpariert (2.3.1.2), welches dann zu einem späteren Zeitpunkt mit *C. kluyveri* inokuliert werden sollte. Die vierte Kulturflasche diente als (spätere) Negativkontrolle bzw. Sterilitätskontrolle (im weiteren auch als Kontrollkultur bezeichnet). Aus dieser Kultur wurde ebenfalls ein Nährmedium präpariert, aber dieses wurde im Folgeversuch nicht mit

C. kluyveri inokuliert, sondern ohne Inokulation mitgeführt. Somit sollte überprüft bzw. kontrolliert werden, dass es zu keinem Wachstum in diesem Medium aufgrund von eventuellen Rückständen (vegetative Zellen oder Sporen) nach Präparation kommen konnte. Der Wachstumsparameter OD_{600nm} und der Verlauf des pH-Wertes über die Zeit einer ausgewählten *C. carboxidivorans*-Kultur und der *C. carboxidivorans*-Kultur, welche später als Sterilitätskontrolle fungierte, sind in Abbildung 41 (A und B) zu sehen. Die ausgewählte *C. carboxidivorans*-Kultur und die Kontrollkultur zeigten bei beiden Parametern ähnliche Endresultate. So erreichte die *C. carboxidivorans*-Kultur eine OD_{600nm} von 1,54 und die Kontrollkultur eine OD_{600nm} von 1,74 nach 549 h Inkubation. Auffallend ist ein biphasisches Wachstum beider Kulturen. Zu Beginn des Wachstumsversuches stieg die OD_{600nm} nach 69 h auf ca. 0,45 bzw. 0,48 und verblieb zunächst bei diesen Werten bzw.

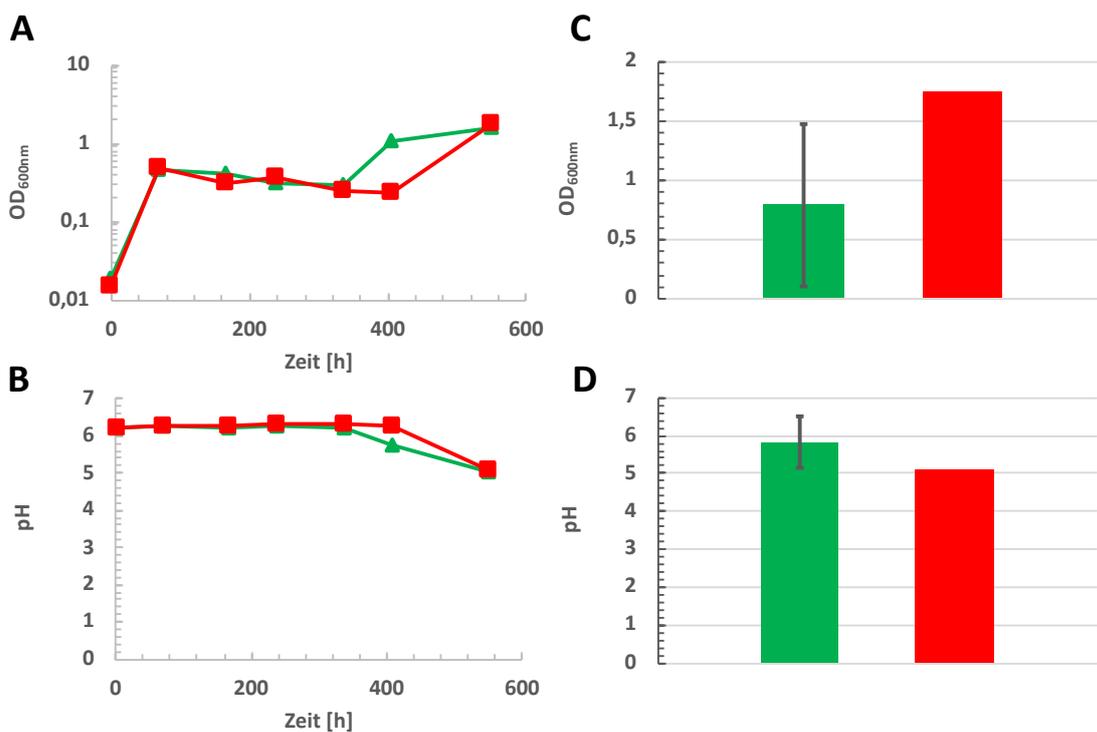


Abbildung 41: A: Wachstum, B: pH von ▲ *C. carboxidivorans* (acetogene Kultur) in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas, ■ *C. carboxidivorans* (spätere Negativkontrolle bzw. Sterilitätskontrolle) in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas. Synthesegas wurde in allen Kulturen nach 69, 237 und 406 h aufgefüllt. C: OD_{600nm} -Werte, D: pH der ■ drei *C. carboxidivorans*-Kulturen (acetogene Kulturen) - Mittelwert mit eingezeichneter Standardabweichung, von ■ *C. carboxidivorans* (spätere Negativkontrolle bzw. Sterilitätskontrolle) zum letzten Zeitpunkt der Messung.

die OD_{600nm} fiel sogar wieder ab. Erst nach insgesamt 335 h Kultivierung stieg in beiden Kulturen die OD_{600nm} wieder deutlich an. Der pH-Wert beider Kulturen verblieb bis zu einer Inkubationsdauer von 335 h bei 6,2 - 6,3 und fiel erst zeitgleich zum zweiten Anstieg der OD_{600nm} auf Endwerte von 5,0 (*C. carboxidivorans*-Kultur) bzw. 5,1 (Kontrollkultur). Im Vergleich aller drei *C. carboxidivorans*-Kulturen sind deutliche Abweichungen im Bezug auf die OD_{600nm} zu sehen (Abbildung 41 C und D). Diese Abweichung kam zustande, da von allen drei *C. carboxidivorans*-Kulturen sehr unterschiedliche OD_{600nm} -Werte am Ende des Versuchs erreicht wurden. Während in der ausgewählten *C. carboxidivorans*-Kultur eine OD_{600nm} von 1,54 vorlag, wurde von einer Kultur der Triplikate nur eine OD_{600nm} von 0,19 zum letzten Messpunkt erzielt. Die zweite Kultur lag mit einer OD_{600nm} von 0,65 nach 549 h zwischen diesen Werten. Die Abweichungen im Wachstumsverhalten spiegelten sich auch in den pH-Werten wieder. Nur in der ausgewählten Kultur fiel der pH-Wert auf 5,0, während in den anderen Kulturen dieser bei Werten von knapp über pH 6 verblieb. Die repräsentativ gezeigte *C. carboxidivorans*-Kultur und die Kontrollkultur (ebenfalls eine *C. carboxidivorans*-Kultur) hatten die größte Ähnlichkeit in Bezug auf OD_{600nm} und pH-Wert. Die Darstellung der Stoffwechselfparameter wird mit dem Verlauf der Konzentrationen an Ethanol, Butanol und Hexanol über die Zeit der ausgewählten *C. carboxidivorans*- und Kontrollkultur begonnen (Abbildung 42 A, B und C). Bis zu einer Inkubationsdauer von 335 h verliefen die Ethanolkonzentrationen identisch. Danach stieg die Ethanolkonzentration in der *C. carboxidivorans*-Kultur auf einen Maximalwert von 43,1 mM an, um dann wieder auf 38,2 mM am Ende des Versuchs abzufallen. In der Kontrollkultur war ebenfalls die höchste Ethanolkonzentration nach 335 h Kultivierung mit einer Konzentration von 30,2 mM festzustellen, welche bis zum letzten Messpunkt auf 24,0 mM abfiel. Butanol und Hexanol wurden als weitere Produkte bereits in der *C. carboxidivorans*- und der Kontrollkultur detektiert. Die Produktion startete nach einer Inkubationsdauer von 335 bzw. 406 h. Die *C. carboxidivorans*-Kultur produzierte 9,1 mM Butanol und 2,7 mM Hexanol, während die Kontrollkultur im Vergleich dazu 5,2 mM Butanol und 1,2 mM Hexanol produzierte. Es ist anzumerken, dass die Konzentrationen dieser beiden Substanzen sich noch im Anstieg befanden, als die Kultivierung beendet wurde und somit möglicherweise noch höhere Konzentrationen möglich gewesen wären. Die Konzentrationsabweichungen von Ethanol, Butanol und Hexanol innerhalb der drei

C. carboxidivorans-Kulturen sind in Abbildung 42 (D, E und F) zu sehen. Wie zuvor gezeigt konnten in der ausgewählten *C. carboxidivorans*-Kultur am Ende des Versuches 38,2 mM Ethanol bestimmt werden. Während die zweite der drei Kulturen eine vergleichbare Konzentration gebildet hatte (33,0 mM), produzierte eines der Triplikate eine mehr als doppelt so hohe Konzentration an Ethanol in derselben Zeit (82,2 mM). Diese Kultur

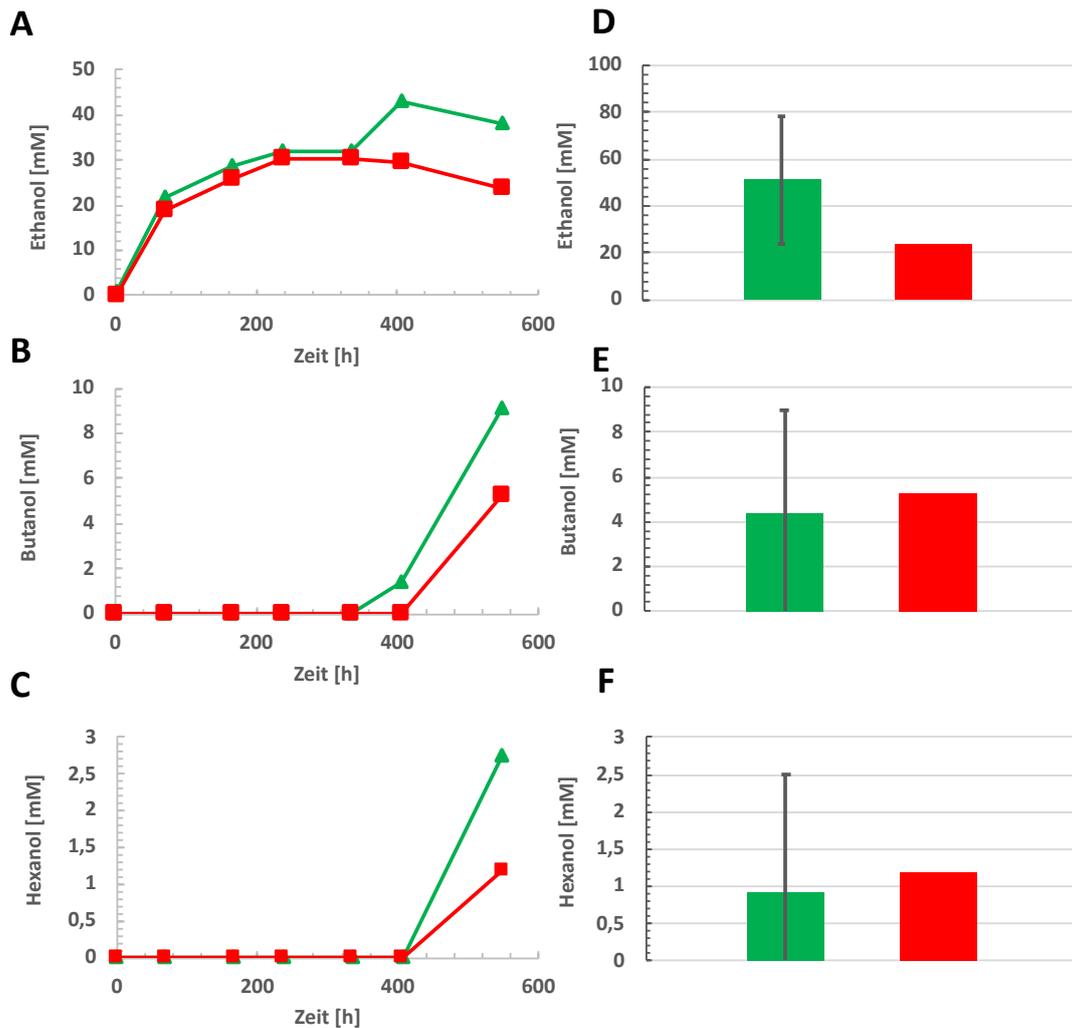


Abbildung 42: A: Ethanol-, B: Butanol-, C: Hexanolkonzentrationen von ▲ *C. carboxidivorans* (acetogene Kultur) in Tanner-Medium „modified“ mit der Gaspase Synthesegas, ■ *C. carboxidivorans* (spätere Negativkontrolle bzw. Sterilitätskontrolle) in Tanner-Medium „modified“ mit der Gaspase Synthesegas. Synthesegas wurde in allen Kulturen nach 69, 237 und 406 h aufgefüllt. D: Ethanol-, E: Butanol-, F: Hexanolkonzentrationen der ■ drei *C. carboxidivorans*-Kulturen (acetogene Kulturen) - Mittelwert mit eingezeichneter Standardabweichung, von ■ *C. carboxidivorans* (spätere Negativkontrolle bzw. Sterilitätskontrolle) zum letzten Zeitpunkt der Messung.

produzierte auch zusätzlich 4,0 mM Butanol, jedoch kein Hexanol. In der Kultur, in welcher 33,0 mM Ethanol gebildet wurde, konnte weder Butanol noch Hexanol detektiert werden. Somit kam es bei diesen Parametern zu deutlichen Unterschieden zwischen den einzelnen Kulturen. Die weitere Darstellung der Resultate zeigt nun den Verlauf der

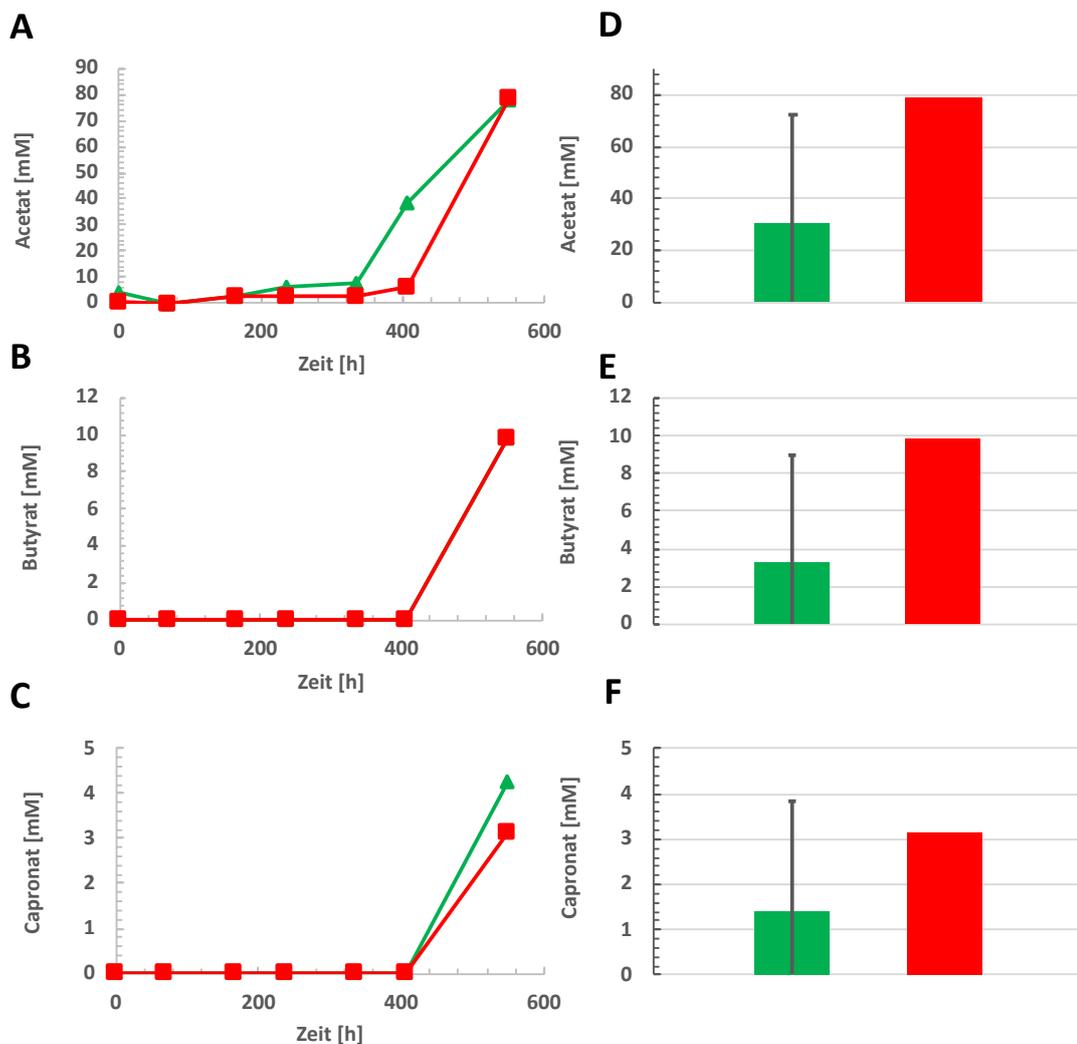


Abbildung 43: A: Acetat-, B: Butyrat-, C: Capronatkonzentrationen von ▲ *C. carboxidivorans* (acetogene Vorkultur) in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas, ■ *C. carboxidivorans* (spätere Negativkontrolle bzw. Sterilitätskontrolle) in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas. Synthesegas wurde in allen Kulturen nach 69, 237 und 406 h aufgefüllt. D: Acetat-, E: Butyrat-, F: Capronatkonzentrationen der ■ drei *C. carboxidivorans*-Kulturen (acetogene Kulturen) - Mittelwert mit eingezeichneter Standardabweichung, von ■ *C. carboxidivorans* (spätere Negativkontrolle bzw. Sterilitätskontrolle) zum letzten Zeitpunkt der Messung.

Konzentrationen an Acetat, Butyrat und Capronat über die Zeit (Abbildung 43 A, B und C). Hier ist ein ähnliches Bild wie bei der Produktion der zugehörigen Alkohole zu erkennen. Die eigentliche Acetatproduktion begann in der *C. carboxidivorans*- und Kontrollkultur erst nach 335 h Inkubation. Zuvor lagen zu keinem Zeitpunkt höhere Konzentrationen als 8 mM vor. Die ausgewählte *C. carboxidivorans*-Kultur bildete bis zum Ende des Versuchs 78,4 mM, während die Kontrollkultur 78,7 mM Acetat bildete. Butyrat und Capronat wurden wie ihre entsprechenden Alkohole erst nach 406 h Kultivierung produziert. Der Verlauf der Butyratkonzentration war in beiden Kulturen annähernd identisch. Es wurden in beiden Fällen 9,8 mM Butyrat zum letzten Messpunkt des Versuchs detektiert. Die Konzentration an Capronat war in der *C. carboxidivorans*-Kultur mit 4,2 mM gegenüber der Kontrollkultur mit 3,1 mM erhöht. Der Vergleich der drei *C. carboxidivorans*-Kulturen untereinander zeigte, wie bereits zuvor, deutliche Unterschiede (Abbildung 43 D, E und F). In der gezeigten *C. carboxidivorans*-Kultur war die Acetatkonzentration mit einem Wert von 78,4 mM am höchsten. In den beiden anderen Kulturen wurden im Gegensatz dazu nur 7,5 mM und 6,1 mM produziert (mehr als Faktor zehn niedrigere

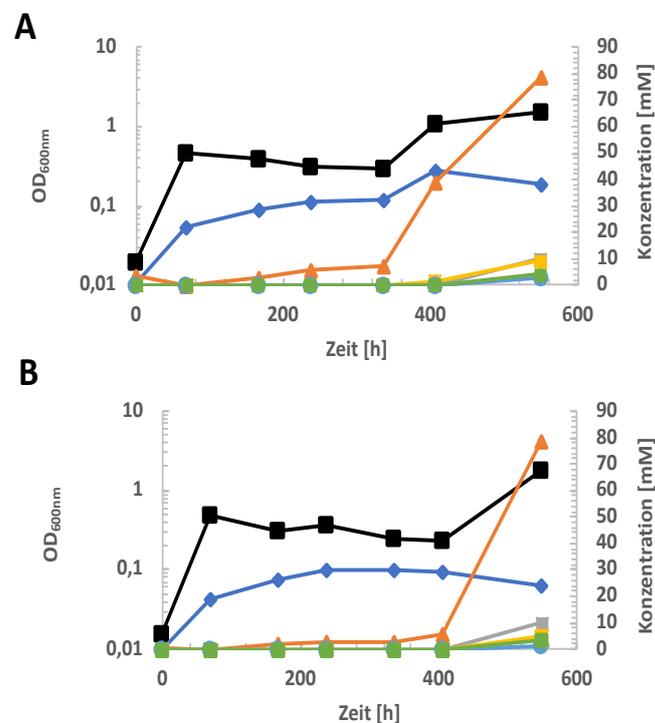


Abbildung 44: ■ OD_{600nm}, ◆ Ethanol-, ▲ Acetat-, ■ Butyrat-, ■ Butanol-, ● Hexanol-, und ■ Capronatkonzentration der A: *C. carboxidivorans*-Kultur (acetogene Kultur), B: *C. carboxidivorans*-Kontrollkultur (spätere Negativkontrolle bzw. Sterilitätskontrolle).

Konzentrationen). Butyrat und Capronat wurden nur in der ausgewählten Kultur gebildet bzw. nachgewiesen, nicht aber in den restlichen zwei Kulturen. Die Capronatproduktion der gezeigten Kultur und der Kontrollkultur war im Rahmen dieser Arbeit die erste nachgewiesene Capronatproduktion von *C. carboxidivorans*, da dieses bei anderen Kultivierungen bisher nie detektiert werden konnte. In Abbildung 44 werden alle Stoffwechselfparameter der *C. carboxidivorans*- und der Kontrollkultur zusammenfassend aufgetragen gegen die OD_{600nm} gezeigt. Es ist deutlich zu erkennen, dass es beim zweiten Anstieg der OD_{600nm} zur erhöhten Bildung von Acetat, Butyrat, Capronat, Butanol und Hexanol kam.

3.2.4.1.2 Kultivierung von *C. kluyveri* in einem Medium präpariert aus einer acetogenen Kultur (*C. carboxidivorans*)

Ausgehend von den acetogenen Kulturen 3.2.4.1.1. wurde ein Nährmedium für die Kultivierung von *C. kluyveri* präpariert. Es konnte pro acetogener Vorkultur 100 ml präpariertes Medium erhalten werden, welches in 500-ml-Müller-Krempel-Flaschen (Gasphase N₂/CO₂) überführt wurde. Diese wurden mit einer stationären Kultur von *C. kluyveri* inokuliert und unter nicht schüttelnden Bedingungen inkubiert. Der zuvor als Kontrollkultur bezeichnete Ansatz ist in dieser Kultivierung nun die Negativ- bzw. Sterilitätskontrolle. Diese Kontrollflasche wurde ebenfalls inkubiert, aber nicht inokuliert. Unter sterilen Bedingungen, besser gesagt bei einer sterilen Präparation des Mediums, sollte es zu keinem Wachstum oder Stoffwechselaktivitäten von oder durch Mikroorganismen kommen. Die in diesem Versuch gezeigte repräsentativ gewählte Kultur wuchs in dem Medium, welches aus der repräsentativen Kultur in Kapitel 3.2.4.1.1 präpariert wurde. In Abbildung 45 (A und B) ist die OD_{600nm} und der Verlauf des pH-Wertes über die Zeit zu sehen. Die ausgewählte *C. kluyveri*-Kultur erreichte in dem präparierten Medium eine OD_{600nm} von 0,23 (Messung der OD_{600nm} in diesem Versuch „gegen Luft“; siehe 2.6.1) nach einem zwischenzeitlichen Höchstwert von 0,35 nach 46 h Inkubation. Die *C. kluyveri*-Kultur der Positivkontrolle erreichte eine OD_{600nm} von 0,32 zum Ende nach einem Maximalwert von 0,64 nach 70 h. In der Negativ- bzw. Sterilitätskontrolle war kein Anstieg der OD_{600nm} festzustellen. Die OD_{600nm} verblieb nahezu unverändert bei 0,13 über die Dauer der Inkubation. Die pH-Werte verblieben in allen Kulturen auf ihren Ausgangswerten. Somit blieb der pH-Wert der *C. kluyveri*-Kultur in präpariertem Medium

bei 6,6, der pH-Wert der Sterilitätskontrolle bei 6,7 und der pH-Wert der Positivkontrolle bei 6,0. Im Vergleich aller Kultivierungen von *C. kluyveri* in präpariertem Medium untereinander und in Bezug zur Positiv- und Negativkontrolle zeigten sich sehr geringe Abweichungen (Abbildung 45 C und D). Somit lag in allen drei *C. kluyveri*-Kulturen die OD_{600nm} bei ca. 0,2 und die pH-Werte in allen drei Kulturen bei ca. 6,6. Für die Auswertung der Stoffwechselprodukte wurden zunächst die für die Kultivierung von *C. kluyveri* benötigten Substrate Ethanol und Acetat betrachtet. In Abbildung 46 (A und B) sind die entsprechenden Konzentrationen der ausgewählten Kultur und der Sterilitätskontrolle zu sehen. Die anfängliche Ethanolkonzentration der *C. kluyveri*-Kultur lag bei 26,2 mM. Ethanol wurde innerhalb von 70 h komplett aufgebraucht und war somit nach diesem Zeitraum nicht mehr nachweisbar. Acetat wurde in dieser *C. kluyveri*-Kultur zwar nicht

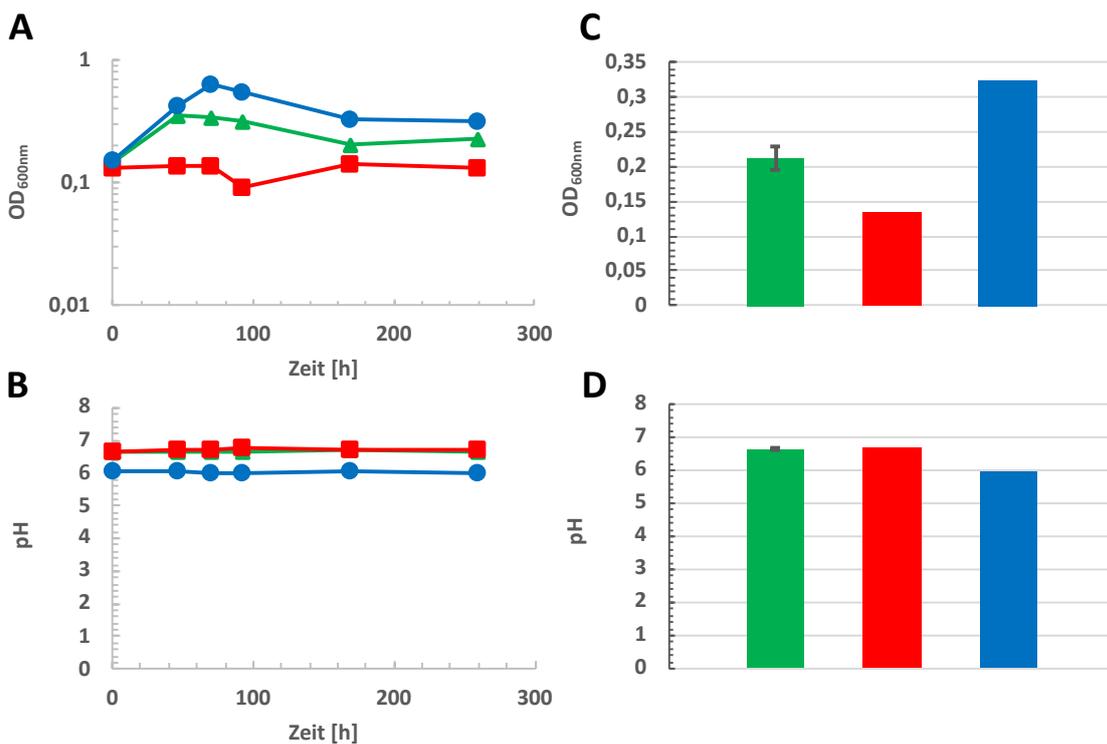


Abbildung 45: A: Wachstum, B: pH von \blacktriangle *C. kluyveri* in einem Medium präpariert aus einer *C. carboxidivorans*-Kultur mit der Gasphase N_2/CO_2 , \blacksquare nicht inokuliertes präpariertes Medium (Sterilitätskontrolle) mit der Gasphase N_2/CO_2 , \bullet *C. kluyveri* in Tanner-Medium „modified“ 2 mit der Gasphase N_2/CO_2 . C: OD_{600nm} -Werte, D: pH der \blacksquare drei Kultivierungen von *C. kluyveri* in einem Medium präpariert aus *C. carboxidivorans*-Kulturen - Mittelwert mit eingezeichneter Standardabweichung, von \blacksquare nicht inokuliertem präpariertem Medium (Sterilitätskontrolle), von \blacksquare *C. kluyveri* zum Zeitpunkt der letzten Messung.

komplett aufgebraucht, aber es kam ebenfalls zu einem Absinken der Konzentration von anfangs 41,4 mM auf eine Konzentration von 29,0 mM. Diese Konzentration blieb bis zum Ende unverändert. In der Sterilitätskontrolle war keine Ab- oder Zunahme der Konzentration von Ethanol oder Acetat festzustellen. Die Konzentrationen an Ethanol und Acetat zeigten bei Beendigung des Wachstumsversuchs bei der Kultivierung von *C. kluyveri* im präparierten Medium größere Abweichungen (Abbildung 46 C und D). Ethanol wurde nur in der zuvor gezeigten Kultur vollständig verbraucht. In den zwei anderen Kulturen waren bei Beendigung der Kultivierung zum einem noch 10,3 mM (Konzentration bei Versuchsbeginn: 23,0 mM) und zum anderen noch 37,0 mM (Konzentration bei Versuchsbeginn: 58,1 mM) Ethanol vorhanden. In allen Kulturen wurde Ethanol verbraucht, aber in zwei von drei Kulturen nicht vollständig. Wie in 3.2.4.1.1 gezeigt, wurden in zwei von drei *C. carboxidivorans*-Kulturen nur etwa 6 - 7 mM Acetat gebildet. Somit war auch in diesen Kulturen weniger Acetat als Substrat für

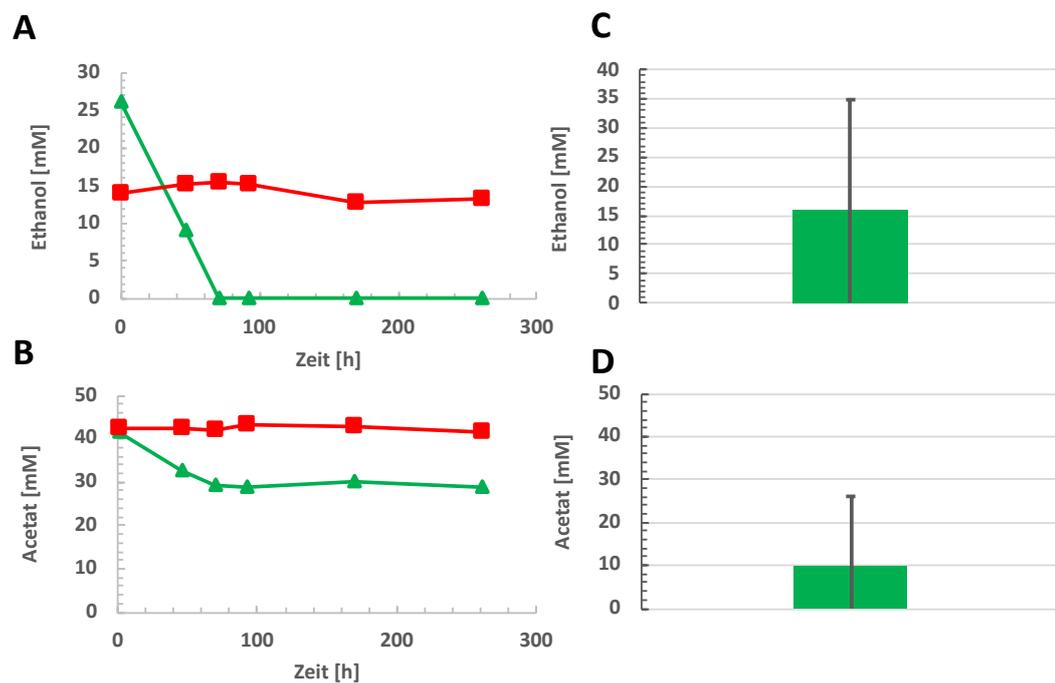


Abbildung 46: A: Ethanol-, B: Acetatkonzentrationen von \blacktriangle *C. kluyveri* in einem Medium präpariert aus einer *C. carboxidivorans*-Kultur mit der Gasphase N_2/CO_2 , \blacksquare nicht inokuliertes präpariertes Medium (Sterilitätskontrolle) mit der Gasphase N_2/CO_2 . C: Ethanol-, D: Acetatkonzentrationen der \blacksquare drei Kultivierungen von *C. kluyveri* in einem Medium präpariert aus *C. carboxidivorans*-Kulturen - Mittelwert mit eingezeichneter Standardabweichung zum Zeitpunkt der letzten Messung.

C. kluveri vorhanden. Die Acetatkonzentrationen dieser beiden Kulturen fielen auf Endwerte von ca. 1 mM, während in der gezeigten ausgewählten Kultur die Konzentration zum Ende des Versuchs bei 28,6 mM lag (Konzentration bei Versuchsbeginn: 41,4 mM). Es wurden zwar hohe Abweichungen bei den letzten Messpunkten des Versuchs festgestellt, jedoch konnte in allen Ansätzen eine Abnahme der Substrate Ethanol und Acetat festgestellt werden. Nach der Darstellung der Substratkonzentrationen folgt nun die Betrachtung der Produktkonzentrationen der ausgewählten *C. kluveri*-Kultur und der Kontrollkulturen (Abbildung 47 A und B). In der ausgewählten *C. kluveri*-Kultur wurden 16,7 mM Butyrat nach 260 h nachgewiesen. Es ist aber zu beachten, dass bereits zu Beginn der Kultivierung 7,0 mM Butyrat in der Kulturflasche vorhanden waren, welche ausgehend von der *C. carboxidivorans*-Kultur produziert wurden. Diese repräsentative Kultur

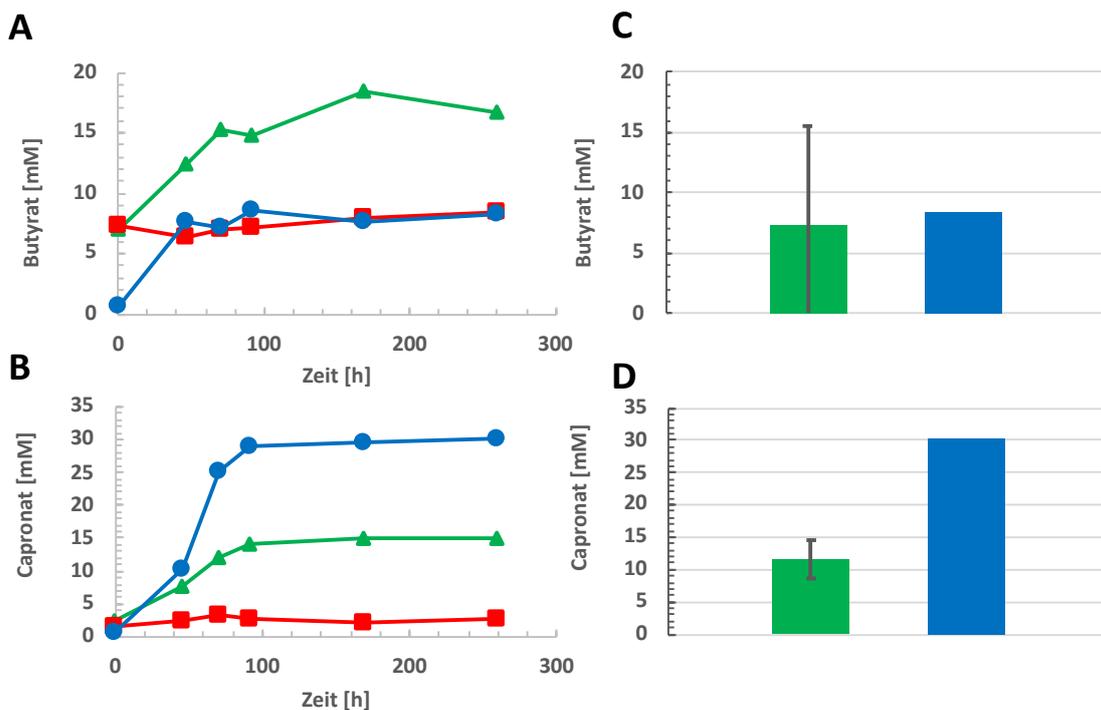


Abbildung 47: A: Butyrat-, B: Capronatkonzentrationen von ▲ *C. kluveri* in einem Medium präpariert aus einer *C. carboxidivorans*-Kultur mit der Gasphase N_2/CO_2 , ■ nicht inokuliertes präpariertes Medium (Sterilitätskontrolle) mit der Gasphase N_2/CO_2 , ● *C. kluveri* in Tanner-Medium „modified“ 2 mit der Gasphase N_2/CO_2 . C: Butyrat-, D: Capronatkonzentrationen der ■ drei Kultivierungen von *C. kluveri* in einem Medium präpariert aus *C. carboxidivorans*-Kulturen - Mittelwert mit eingezeichneter Standardabweichung, von ■ *C. kluveri* zum Zeitpunkt der letzten Messung.

produzierte auch 15,1 mM Capronat im selben Zeitraum. Auch hier befanden sich bereits 2,5 mM Capronat zu Beginn des Versuchs im Nährmedium, welches zuvor von der *C. carboxidivorans*-Kultur gebildet wurde. Die Positivkontrolle zeigte durch die nachgewiesene Produktion von Butyrat und Capronat die Funktionalität der verwendeten *C. kluyveri*-Kultur. In der Sterilitätskontrolle konnte keine Veränderung der Butyrat- und Capronatkonzentration über die Zeit festgestellt werden. Im Vergleich der drei Kultivierungen von *C. kluyveri* in Medium präpariert aus acetogenen Kulturen zeigten sich zwar Abweichungen, jedoch sind in allen Kulturen klare Tendenzen zu erkennen (Abbildung 47 C und D). Butyrat wurde, wie bereits zuvor dargestellt, in einer Konzentration von 16,7 mM in der ausgewählten Kultur zum Ende des Versuchs nachgewiesen. In den zwei verbliebenen Kulturen wurde ebenfalls Butyrat gebildet, jedoch deutlich weniger mit Konzentrationen von 2,4 mM und 2,5 mM. Höchste Relevanz in diesem Versuch hatte jedoch die Feststellung, dass in allen Ansätzen der Kultivierung von *C. kluyveri* in Medium präpariert aus acetogenen Kulturen eine Produktion von Capronat festgestellt werden konnte. Neben den gezeigten 15,1 mM der repräsentativen Kultur wurden auch 10,7 mM bzw. 9,0 mM Capronat in den restlichen zwei Kulturen des Triplikats detektiert (Capronat zu Beginn der Inkubation nicht in den Kulturen nachweisbar). Analysiert wurden in allen Kulturen auch die Butanol- und Hexanolkonzentrationen. In keiner dieser Kulturen konnte eine Veränderung der entsprechenden Konzentrationen und somit auch keine Produktion festgestellt werden. Daher wurde dieser Verlauf nicht als Grafik dargestellt. In Abbildung 48 sind die Stoffwechselfparameter der ausgewählten *C. kluyveri*-Kultur zu sehen, welche in präpariertem Medium kultiviert wurde, aufgetragen gegen die OD_{600nm} . Es ist ersichtlich, dass der Substratverbrauch und die Produktbildung bereits nach 79 h abgeschlossen

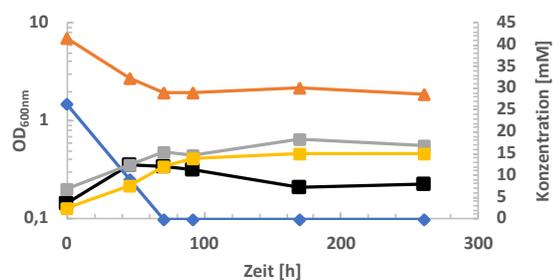


Abbildung 48: ■ OD_{600nm} , ◆ Ethanol-, ▲ Acetat-, ■ Butyrat-, und ■ Capronatkonzentration der *C. kluyveri*-Kultur kultiviert in Medium präpariert aus einer *C. carboxidivorans*-Kultur.

waren. Es wurde kein weiteres Ethanol bzw. Acetat mehr verbraucht und Butyrat und Capronat haben zu diesem Zeitpunkt schon fast ihre Maximalkonzentrationen erreicht.

3.2.4.2 Separate biphasische Fermentation von *C. ljungdahlii* und *C. kluyveri*

Die zweite separate biphasische Fermentation wurde mit *C. ljungdahlii* und *C. kluyveri* durchgeführt. Die Resultate der Kultivierung der acetogenen Vorkulturen sind in Kapitel 3.2.4.2.1 und die Resultate der Kultivierung von *C. kluyveri* in Medium präpariert aus diesen acetogenen Kulturen sind in Kapitel 3.2.4.2.2 zu sehen.

3.2.4.2.1 Resultate der Kultivierung der acetogenen Kulturen

Die separate biphasische Fermentation wurde begonnen, indem zuerst die acetogenen Kulturen, in diesem Falle die *C. ljungdahlii*-Kulturen, inokuliert und inkubiert wurden. Die Inkubationsbedingungen waren identisch zur Kultivierung der acetogenen Kulturen in der

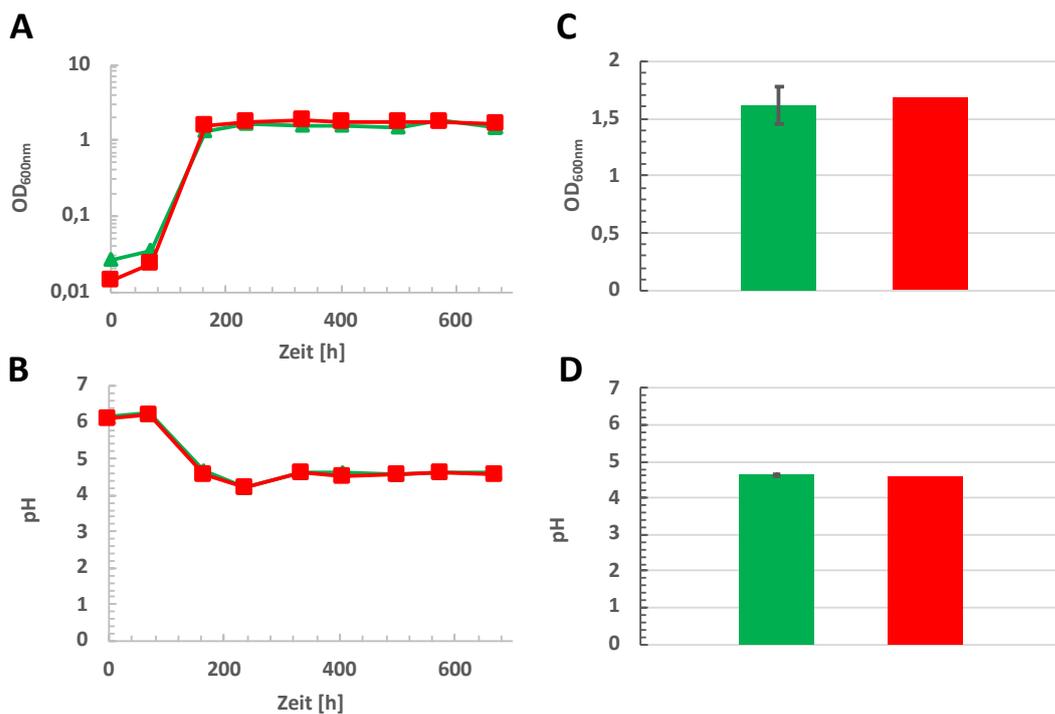


Abbildung 49: A: Wachstum, B: pH von ▲ *C. ljungdahlii* (acetogene Kultur) in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas, ■ *C. ljungdahlii* (spätere Negativkontrolle bzw. Sterilitätskontrolle) in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas. Synthesegas wurde in allen Kulturen nach 70, 236, 404 und 573 h aufgefüllt. C: OD_{600nm}-Werte, D: pH der ■ drei *C. ljungdahlii*-Kulturen (acetogene Kulturen) - Mittelwert mit eingezeichneter Standardabweichung, von ■ *C. ljungdahlii* (spätere Negativkontrolle bzw. Sterilitätskontrolle) zum letzten Zeitpunkt der Messung.

zuvor gezeigten separaten biphasischen Fermentation (3.2.4.1.1). In Abbildung 49 (A und B) sind der Verlauf der OD_{600nm} -Werte und der pH-Werte dieser Kultivierung zu sehen. Dargestellt sind zwei Kulturen von *C. ljungdahlii*. Die erste stellt eine repräsentativ gewählte Kultur (von dreien) dar, aus der im Anschluss, wie im Versuch zuvor, das Medium für *C. kluyveri* präpariert wurde, und die zweite Kultur diente als Negativ- bzw. Sterilitätskontrolle im Folgeversuch. Zwischen diesen beiden Kulturen konnten bezüglich der OD_{600nm} -Werte und der pH-Werte keine Unterschiede festgestellt werden. Beide Parameter hatten einen fast identischen Verlauf und gleiche Endwerte. So wurden nach 670 h Inkubation in der ausgewählten *C. ljungdahlii*-Kultur eine OD_{600nm} von 1,45 und in der Negativkontrolle eine OD_{600nm} von 1,67 gemessen. Die pH-Werte beider Kulturen fielen im Laufe der Inkubation auf einen Wert von 4,6 nach einem Anfangswert von 6,1.

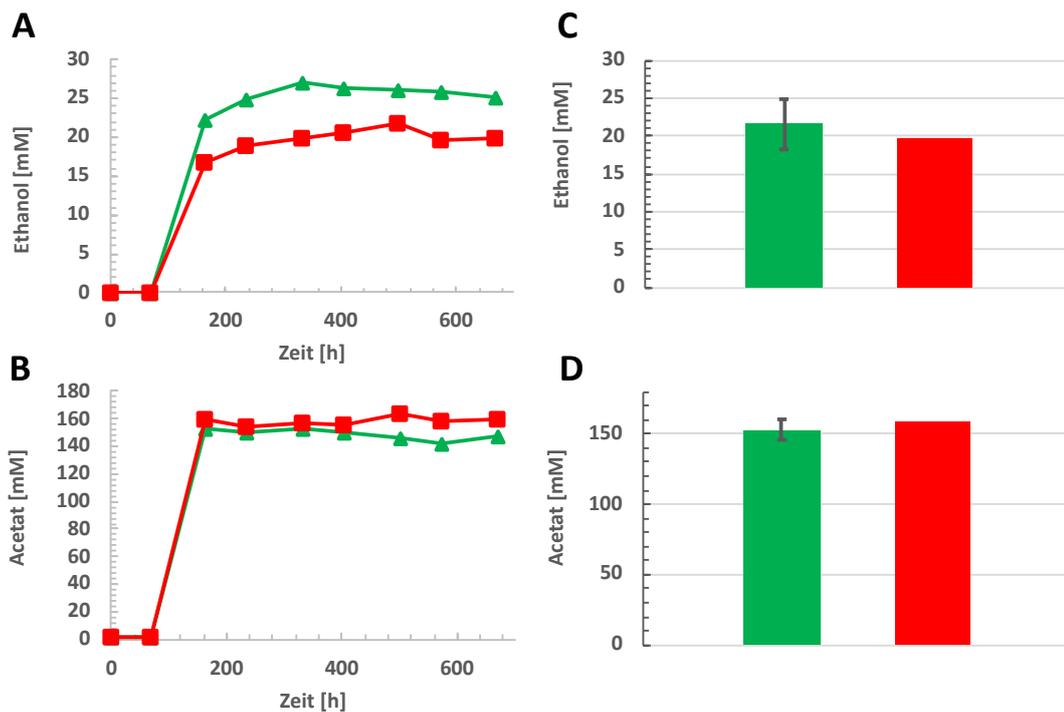


Abbildung 50: A: Ethanol-, B: Acetatkonzentrationen von ▲ *C. ljungdahlii* (acetogene Kultur) in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas, ■ *C. ljungdahlii* (spätere Negativkontrolle bzw. Sterilitätskontrolle) in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas. Synthesegas wurde in allen Kulturen nach 70, 236, 404 und 573 h aufgefüllt. C: Ethanol-, D: Acetatkonzentrationen der ■ drei *C. ljungdahlii*-Kulturen (acetogene Kulturen) - Mittelwert mit eingezeichneter Standardabweichung, von ■ *C. ljungdahlii* (spätere Negativkontrolle bzw. Sterilitätskontrolle) zum letzten Zeitpunkt der Messung.

Alle drei acetogenen Kulturen zeigten ähnliche Resultate am Ende des Versuchs (Abbildung 49 C und D) und auch ähnliche Resultate im Vergleich zur Kontrollkultur. Eine der acetogenen Kulturen hatte eine zur ausgewählten Kultur erhöhte OD_{600nm} von 1,77 und eine weitere Kultur eine leicht niedrigere OD_{600nm} von 1,45. Die pH-Werte aller Kulturen erreichten einen Wert von 4,6 zum letzten Messpunkt. In der Auswertung der Stoffwechselprodukte sind nur die Ethanol- und Acetatkonzentrationen dargestellt (Abbildung 50 A und B), da nur diese Substanzen detektiert werden konnten. Die ausgewählte *C. ljungdahlii*-Kultur erreichte über die komplette Inkubationsdauer eine höhere Ethanolkonzentration (25,1 mM) als die Kontrollkultur (19,8 mM). In beiden Kulturen begann die Ethanolproduktion nach 70 h Inkubation. Die Acetatkonzentrationen beider Kulturen waren mit 147,8 mM in der ausgewählten *C. ljungdahlii*-Kultur vergleichbar hoch wie in der Kontrollkultur mit 159,1 mM Acetat. Der Anstieg der Acetatkonzentration begann, wie im Falle der Ethanolproduktion, nach 70 h Inkubation. Die Abweichungen der Ethanol- und Acetatkonzentrationen aller drei acetogener Kulturen sind in Abbildung 50 (C und D) zu sehen. Es wurde in keiner der acetogenen Kulturen deutlich mehr oder weniger Ethanol gebildet als in der Kontrollkultur (Ethanolkonzentrationen der nicht gezeigten Kulturen 21,2 mM und 18,4 mM). Das gleiche Bild zeigt sich bei den Acetatkonzentrationen, welche sich mit Werten von 148 –

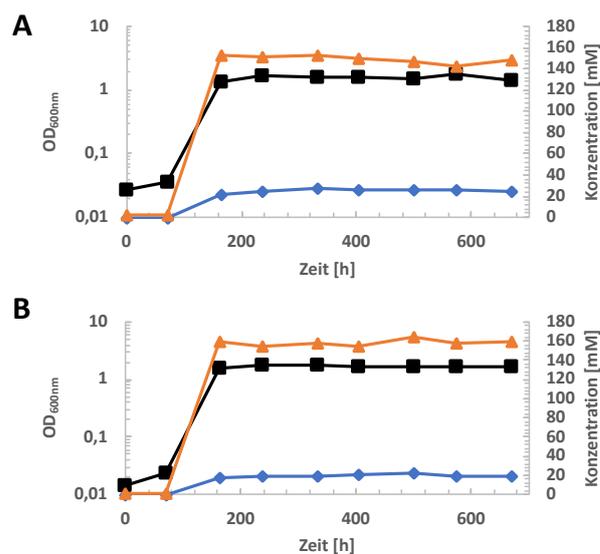


Abbildung 51: ■ OD_{600nm} , ◆ Ethanol-, ▲ Acetatkonzentrationen der A: *C. ljungdahlii*-Kultur (acetogene Kultur), B: *C. ljungdahlii*-Kontrollkultur (spätere Negativkontrolle bzw. Sterilitätskontrolle)

161 mM nahe der Konzentration befanden, welche auch bei der Kontrollkultur detektiert wurde. In Abbildung 51 werden zusammenfassend und für einen besseren Überblick die von der repräsentativen *C. ljungdahlii*-Kultur produzierten Konzentrationen an Ethanol und Acetat gegenüber der OD_{600nm} aufgetragen. Es ist deutlich zu erkennen, dass in der exponentiellen Wachstumsphase, welche zwischen einer Inkubationsdauer von 70 bis 164 h zu finden ist, auch der Großteil der Ethanol- und Acetatproduktion stattfand. Nach 164 h waren bereits die maximalen Konzentrationen an Ethanol und Acetat erreicht und die OD_{600nm} stagnierte (stationäre Phase).

3.2.4.2.2 Kultivierung von *C. kluyveri* in Medium präpariert aus einer acetogenen Kultur (*C. ljungdahlii*)

Ausgehend von den acetogenen Kulturen (3.2.4.2.1) wurde ein Nährmedium für die Kultivierung von *C. kluyveri* präpariert. Der modus operandi war identisch wie im Abschnitt 3.2.4.1.2 beschrieben. Die in diesem Versuch gezeigte repräsentativ gewählte Kultur wuchs in dem Medium, welches aus der repräsentativen Kultur aus Kapitel 3.2.4.2.1 präpariert wurde. In Abbildung 52 (A und B) ist der Verlauf der OD_{600nm} -Werte und der pH-Werte der ausgewählten *C. kluyveri*-Kultur, der Positiv- und Negativkontrolle (nicht inokuliertes präpariertes Medium) über die Zeit zu sehen. Die ausgewählte *C. kluyveri*-Kultur erreichte nach 70 h Inkubation eine maximale OD_{600nm} von 0,26 (Messung gegen Luft). Gegen Ende des Versuchs fiel die OD_{600nm} auf 0,15. Die Positivkontrolle hatte ebenfalls ihren maximalen Wert nach 70 h Inkubation mit einer OD_{600nm} von 0,64 erreicht, welcher dann auf einen finalen Wert von 0,32 abfiel. In der Negativkontrolle konnte kein Wachstum festgestellt werden, da die OD_{600nm} von Anfang bis Ende des Versuches bei einem Wert von 0,09 verblieb. Der Verlauf der pH-Werte zeigte in keiner der drei Kulturen eine deutliche Veränderung oder Tendenz. Der pH-Wert der Positivkontrolle stagnierte konstant bei ca. 6 und der pH-Wert der Negativkontrolle und der pH-Wert der ausgewählten *C. kluyveri*-Kultur stagnierten bei ca. 6,6. Die finalen OD_{600nm} und pH-Werte aller drei Kultivierungen von *C. kluyveri* in präpariertem Medium verliefen sehr ähnlich (Abbildung 52 C und D). In allen drei Kulturen lag die OD_{600nm} nach 260 h bei ca. 0,15 und die pH-Werte verblieben in allen drei Kulturen bis zum Ende des Versuches bei ca. 6,5. Abbildung 53 (A und B) zeigt den Verlauf der Stoffwechselfparameter

beginnend mit dem Verlauf der Substratkonzentration von Ethanol und Acetat über die Dauer der Inkubation. In der ausgewählten *C. kluyveri*-Kultur war zu Beginn des Versuches Ethanol in einer Konzentration von 15,8 mM festzustellen, welches bereits nach 70 h komplett verbraucht wurde. In der Negativkontrolle verblieb die Ethanolkonzentration bei ca. 11 mM über die komplette Inkubationsdauer. Der Anfangswert der Acetatkonzentration in der ausgewählten *C. kluyveri*-Kultur lag bei 80,7 mM. Diese Konzentration fiel, ähnlich wie die Ethanolkonzentration, innerhalb von 92 h auf eine Konzentration von 65,7 mM und verblieb bis zum Versuchsende bei diesem Wert. In der Negativkontrolle war keine bedeutende Änderung der Acetatkonzentration zu sehen. Die Konzentration verblieb bei einem Wert um ca. 80 mM. Die finalen Acetatkonzentrationen aller drei *C. kluyveri*-Kulturen und deren Abweichung sind in Abbildung 53 (C) zu erkennen. In den zwei nicht dargestellten *C. kluyveri*-Kulturen wurden zum letzten Messpunkt mit

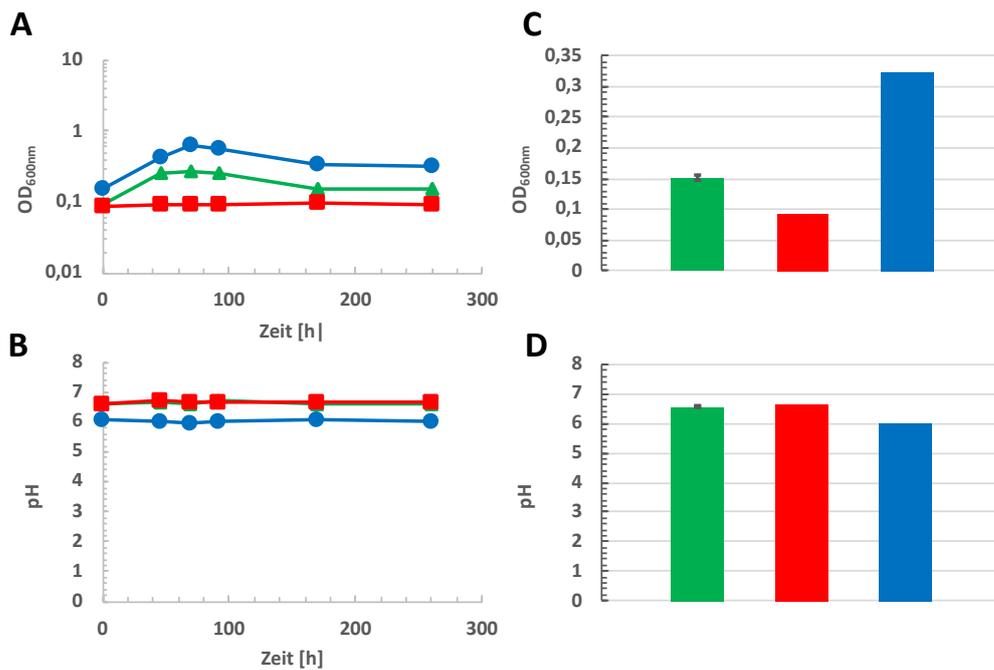


Abbildung 52: A: Wachstum, B: pH von \blacktriangle *C. kluyveri* in einem Medium präpariert aus einer *C. ljungdahlii*-Kultur mit der Gasphase N_2/CO_2 , \blacksquare nicht inokuliertes präpariertes Medium (Sterilitätskontrolle) mit der Gasphase N_2/CO_2 , \bullet *C. kluyveri* in Tanner-Medium „modified“ 2 mit der Gasphase N_2/CO_2 . C: OD_{600nm} -Werte, D: pH der \blacksquare drei Kultivierungen von *C. kluyveri* in einem Medium präpariert aus *C. ljungdahlii*-Kulturen - Mittelwert mit eingezeichneter Standardabweichung, von \blacksquare nicht inokuliertem präpariertem Medium (Sterilitätskontrolle), von \blacksquare *C. kluyveri* zum Zeitpunkt der letzten Messung.

zum einen 71,4 mM (Konzentration zu Beginn des Versuches: 78,6 mM) bzw. 71,9 mM (Konzentration zu Beginn des Versuches: 83,7 mM) vergleichbare Werte detektiert. Ethanol wurde in beiden nicht dargestellten sowie in der gezeigten *C. kluyveri*-Kultur nach 46 bzw. 70 h komplett verbraucht. Die Anfangskonzentrationen von Ethanol lagen in diesen Kulturen zum einen bei 11,5 mM bzw. bei 14,0 mM. In der weiteren Darstellung der Resultate wird nun der Fokus auf die Auswertung der Produktkonzentrationen an Butyrat und Capronat der ausgewählten *C. kluyveri*-Kultur sowie der Positiv- als auch Negativkontrolle über die Versuchsdauer gelegt (Abbildung 54 A und B). Innerhalb von 70 h wurden in der ausgewählten *C. kluyveri*-Kultur 14,2 mM Butyrat gebildet. Diese Konzentration blieb bis zur Beendigung des Versuches nahezu unverändert. In der Negativkontrolle konnte keine Bildung von Butyrat detektiert werden. Es wurde in diesem Ansatz generell kein Butyrat nachgewiesen, da bereits in der acetogenen *C. ljungdahlii*-

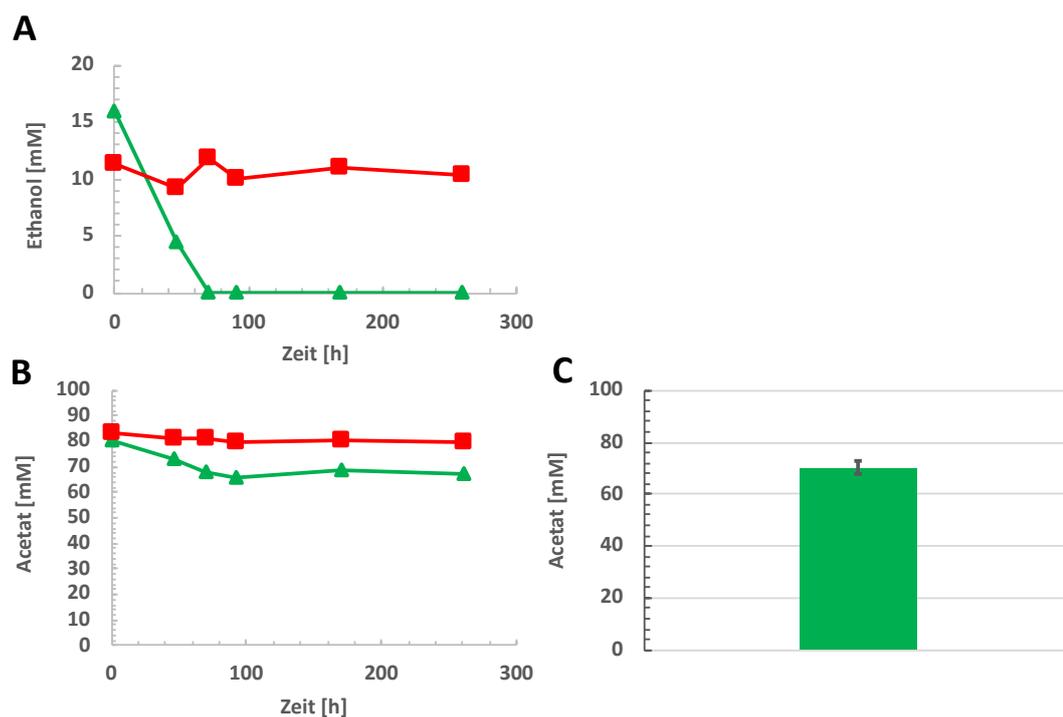


Abbildung 53: A: Ethanol-, B: Acetatkonzentrationen von \blacktriangle *C. kluyveri* in einem Medium präpariert aus einer *C. ljungdahlii*-Kultur mit der Gasphase N_2/CO_2 , \blacksquare nicht inokuliertes präpariertes Medium (Sterilitätskontrolle) mit der Gasphase N_2/CO_2 . C: Acetatkonzentrationen der \blacksquare drei Kultivierungen von *C. kluyveri* in einem Medium präpariert aus *C. ljungdahlii*-Kulturen - Mittelwert mit eingezeichneter Standardabweichung zum Zeitpunkt der letzten Messung.

Kultur, welcher diese Negativkontrolle entspringt, kein Butyrat nachgewiesen werden konnte. Analog zur Butyratproduktion wurde auch im gleichen Zeitraum Capronat in der ausgewählten *C. kluveri*-Kultur gebildet. Erzielt wurde eine Konzentration von 3,4 mM nach 70 h Inkubation. Diese Konzentration verblieb bis zum Ende des Versuches nahezu unverändert. In der Positivkontrolle konnte sowohl eine Butyrat- als auch eine Capronatproduktion detektiert werden. Der Nachweis der Funktionalität der genutzten *C. kluveri*-Kultur ist somit erbracht. Produziert wurden 8,3 mM Butyrat und 30,2 mM Capronat. Es wurden in allen drei *C. kluveri*-Kulturen vergleichbare Konzentrationen an Butyrat und Capronat bei Beendigung des Versuches (Abbildung 54 C und D) detektiert. In den nicht gezeigten *C. kluveri*-Kulturen wurden zum einen 14,7 mM und 10,2 mM Butyrat am Ende des Experimentes detektiert. Capronat wurde in allen drei *C. kluveri*-

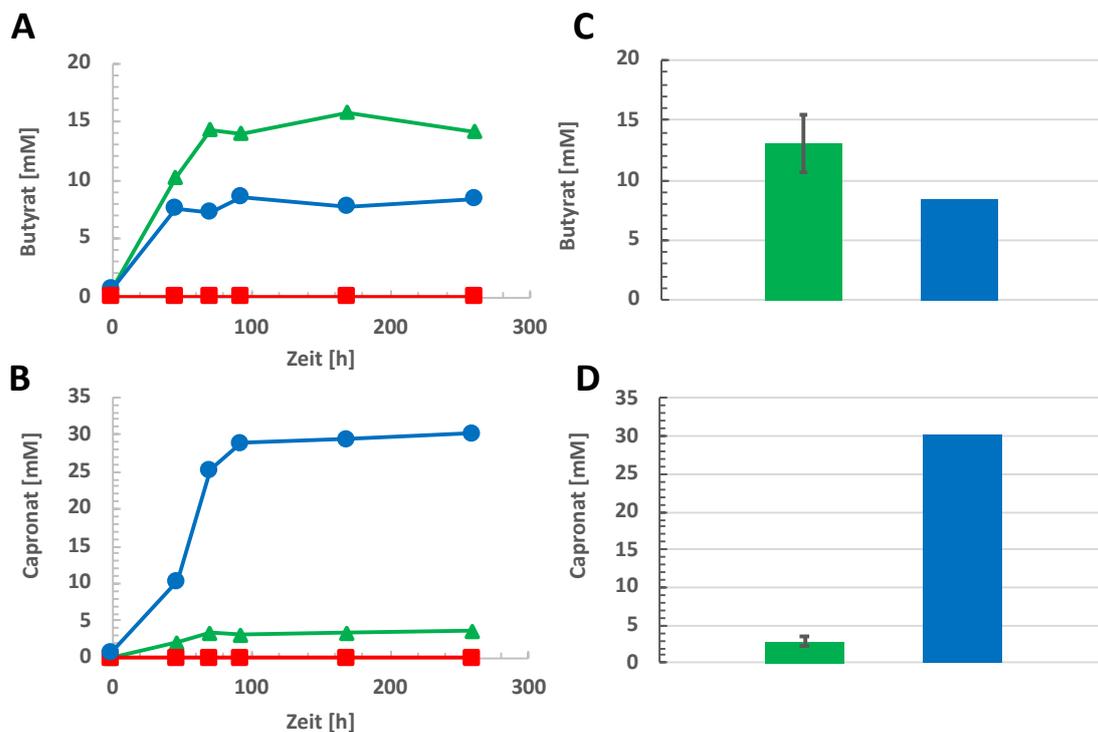


Abbildung 54: A: Butyrat-, B: Capronatkonzentrationen von ▲ *C. kluveri* in einem Medium präpariert aus einer *C. ljungdahlii*-Kultur mit der Gasphase N_2/CO_2 , ■ nicht inokuliertes präpariertes Medium (Sterilitätskontrolle) mit der Gasphase N_2/CO_2 , ● *C. kluveri* in Tanner-Medium „modified“ 2 mit der Gasphase N_2/CO_2 . C: Butyrat-, D: Capronatkonzentrationen der ■ drei Kultivierungen von *C. kluveri* in einem Medium präpariert aus *C. ljungdahlii*-Kulturen - Mittelwert mit eingezeichneter Standardabweichung, von ■ *C. kluveri* zum Zeitpunkt der letzten Messung.

Kulturen nachgewiesen. Es wurden in den zwei nicht gezeigten Kulturen mit 1,9 mM und 2,3 mM etwas niedrigere Konzentrationen als in der gezeigten Kultur produziert. In Abbildung 55 sind die Resultate der gewählten Kultivierung von *C. kluyveri* in Medium präpariert aus einer *C. ljungdahlii*-Kultur zusammengefasst. Es ist ersichtlich, dass nach 70-92 h Kultivierung der Verbrauch der Substrate (Ethanol und Acetat) sowie die Bildung der Produkte (Butyrat und Capronat) abgeschlossen waren, genauso wie das Wachstum (OD_{600nm}).

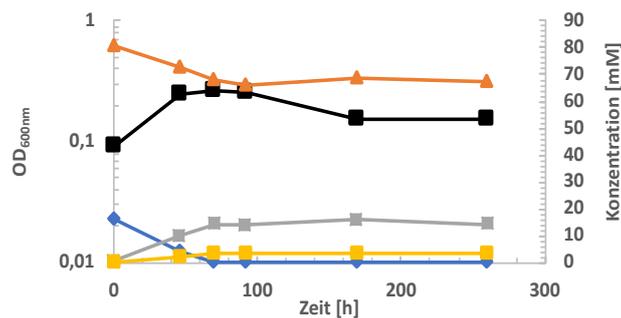


Abbildung 55: ■ OD_{600nm} , ◆ Ethanol-, ▲ Acetat-, ■ Butyrat und ■ Capronatkonzentration der *C. kluyveri*-Kultur kultiviert in einem Medium präpariert aus einer *C. ljungdahlii*-Kultur.

3.2.4.3 Zusammenfassung der separaten biphasischen Fermentation

Die im Laufe dieser separaten biphasischen Fermentationen maximal produzierten Konzentrationen an Butanol, Hexanol und Capronat sind in Tabelle 11 zu sehen. Die Fermentation von *C. kluyveri* in einem Medium, welches aus einer *C. carboxidivorans*-Kultur präpariert wurden, erbrachte die höchste Capronatkonzentration (15,1 mM), die mittels einer Cofermentation in dieser Arbeit erzielt wurden. In allen durchgeführten Kultivierungen der separaten biphasischen Fermentationen (sechs Kulturen insgesamt; pro Fermentation drei) konnte eine Capronatproduktion erzielt werden.

Tabelle 11: Maximal gebildete Konzentrationen an Butanol, Hexanol und Capronat in den separaten biphasischen Fermentationen

	Butanol [mM]	Hexanol [mM]	Capronat [mM]
<i>C. kluyveri</i> in Medium präpariert aus <i>C. carboxidivorans</i> -Kulturen	6,1	1,8	15,1
<i>C. kluyveri</i> in Medium präpariert aus <i>C. ljungdahlii</i> -Kulturen	0	0	3,7

3.3 Untersuchung des Einflusses verschiedener Substratkonzentrationen auf das Wachstum und das Produktspektrum von *C. kluyveri*

Mittels der in dieser Arbeit gezeigten (Co-)Fermentationen war es in einigen Versuchen möglich, Capronat durch die Nutzung von *C. kluyveri* ausgehend von Synthesegas zu produzieren. In jeder der (Co-)Fermentationen standen *C. kluyveri* unterschiedliche Substratkonzentrationen an Ethanol und Acetat zur Verfügung, um daraus Capronat zu bilden. Diese Substratkonzentrationen waren von den eingesetzten acetogenen Stämmen, welche die Substrate für *C. kluyveri* bilden sollten, abhängig. Die zur Verfügung stehenden Substratkonzentrationen konnten sehr unterschiedlich sein und vor allem stellte sich dabei die Frage, welche Capronatkonzentrationen daraus im Idealfall überhaupt gebildet werden können. Es wurden verschiedene Ethanol- und Acetatkonzentrationen und damit auch verschiedene Ethanol/Acetat-Quotienten für eine Kultivierung von *C. kluyveri* ausgewählt. Die ausgewählten Konzentrationen und Quotienten orientierten sich an Konzentrationen, welche in Kultivierungen von *C. carboxidivorans* und *C. ljungdahlii* (Synthesegas als Kohlenstoffquelle) zu bestimmten Zeitpunkten der stationären Wachstumsphasen detektiert wurden. Die Konzentrationen, die ausgewählt wurden, lagen bei 50 mM Ethanol/100 mM Acetat, 100 mM Ethanol/40 mM Acetat, 15 mM Ethanol/70 mM Acetat und 25 mM Ethanol/10 mM Acetat. Diese Konzentrationen wurden in einer Dreifachbestimmung getestet. Die

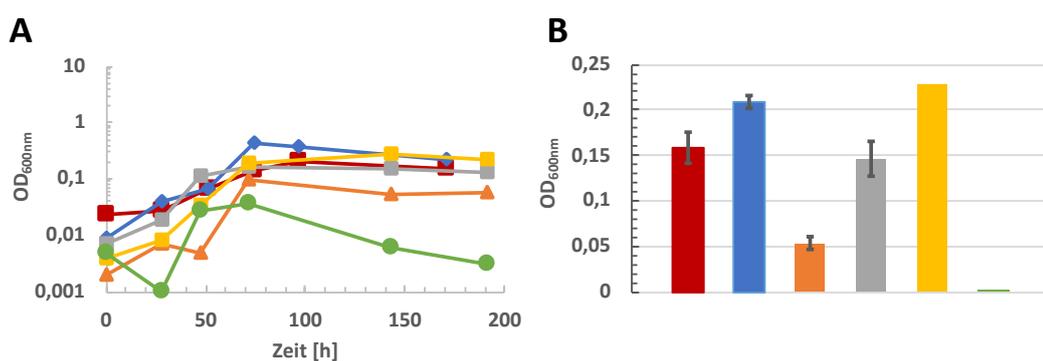


Abbildung 56: A: Wachstum von *C. kluyveri* in Tanner-Medium „modified“ 2 mit der Gasphase Synthesegas sowie ■ 50 mM Ethanol/100 mM Acetat; ■ 100 mM Ethanol/40 mM Acetat; ■ 15 mM Ethanol/70 mM Acetat; ■ 25 mM Ethanol und 10 mM Acetat; ■ 250 mM Ethanol/50 mM Acetat (Positivkontrolle) und ■ keine Zugabe von Ethanol und Acetat (Negativkontrolle) B: OD_{600nm} der zugehörigen Triplikate zum Zeitpunkt der letzten Messung – Mittelwerte mit eingezeichneter Standardabweichung.

Kultivierung erfolgte in 50 ml Tanner-Medium „modified“ 2 in 125-ml-Müller-Krempel-Flaschen bei 37 °C unter nicht schüttelnden Bedingungen. Es wurden zwei zeitlich voneinander getrennte Versuche durchgeführt. Daher sind in der Darstellung der Ergebnisse auch unterschiedliche Zeitpunkte der Messungen zu sehen. Zum Vergleich wurde eine Positivkontrolle mitgeführt, deren Medium 250 mM Ethanol und 50 mM Acetat enthielt und eine Negativkontrolle, der kein Ethanol und Acetat zugefügt wurde. In Abbildung 56 (A) sind die Verläufe der OD_{600nm} über die Zeit dieser unterschiedlichen Kultivierungen von *C. kluyveri* zu sehen. In absteigender Reihenfolge konnten folgende maximalen OD_{600nm} von den jeweiligen ausgewählten Kulturen erzielt werden: Kultur mit 100 mM Ethanol/40 mM Acetat – maximale OD_{600nm} -Werte von 0,43 nach 74 h; Kultur mit 250 mM Ethanol/50 mM Acetat (Positivkontrolle) – maximale OD_{600nm} 0,26 nach 143 h; Kultur mit 50 mM Ethanol/100 mM Acetat – maximale OD_{600nm} von 0,20 nach 96 h; Kultur mit 25 mM Ethanol/10 mM Acetat – maximale OD_{600nm} von 0,16 nach 71 h; Kultur mit 15 mM Ethanol/70 mM Acetat – maximale OD_{600nm} von 0,10 nach 71 h und Kultur ohne Zugabe von Ethanol und Acetat (Negativkontrolle) – maximale OD_{600nm} von 0,04 nach 71 h Inkubation. In allen Kulturen war festzustellen, dass die OD_{600nm} nach dem Erreichen ihrer Maximalwerte wieder absank und sich dann auf niedrigerem Niveau stabilisierte. Im Vergleich der jeweiligen Triplikate zum Zeitpunkt des Versuchsendes (Abbildung 56 B) ist zu sehen, dass sich fast dieselbe Situation ergab wie im Fall der gewählten Reinkulturen. Einziger Unterschied war, dass die Positivkontrolle bei Versuchsende eine höhere OD_{600nm} hatte als die Kultur mit 100 mM Ethanol und 40 mM Acetat. Es lässt sich sonst dieselbe absteigende Reihenfolge der maximalen OD_{600nm} -Werte wie zuvor erkennen. Deutlich erkennbar ist, dass die Kultur mit 15 mM Ethanol/70 mM Acetat und die Negativkontrolle mit Abstand die geringsten OD_{600nm} -Werte erreichten. In Abbildung 57 (A und B) ist der Verlauf der Substrate Ethanol und Acetat über die komplette Versuchsdauer der repräsentativen Kulturen zu sehen. In der Positivkontrolle fiel die Ethanolkonzentration von anfänglich 266,6 mM auf 156 mM zum letzten Messpunkt. In der Kultur, welcher 100 mM Ethanol und 40 mM Acetat zugefügt wurden, fiel die Ethanolkonzentration von anfänglich 103,1 mM auf 19,0 mM. In den restlichen Kulturen wurde Ethanol komplett bis zur Beendigung der Inkubation aufgebraucht. In der Negativkontrolle wurde trotz keiner direkten Zugabe von Ethanol eine Konzentration von 1,6 mM detektiert, welche bis zum

Ende des Versuches nahezu unverändert blieb. Auch die Acetatkonzentrationen sanken in allen ausgewählten Kulturen. In der Kultur eingestellt auf 50 mM Ethanol und 100 mM Acetat sank die Acetatkonzentration von am Anfang detektierten 93,7 mM auf 64,7 mM; in der Kultur eingestellt auf 15 mM Ethanol und 70 mM Acetat von am Anfang detektierten 66,3 mM auf 52,0 mM; in der Positivkontrolle von am Anfang detektierten 55,6 mM auf 14,3 mM; in der Kultur eingestellt auf 100 mM Ethanol und 40 mM Acetat von am Anfang detektierten 48,2 mM auf 12,2 mM und in der Kultur eingestellt auf 25 mM Ethanol und 10 mM Acetat von am Anfang detektierten 9,3 mM auf 1,7 mM zum Ende des Versuches. In der Negativkontrolle konnte zu keinem Zeitpunkt Acetat detektiert werden. Mit Blick auf die Endkonzentrationen aller Triplikate ist zu sehen, dass sich die jeweiligen Substratkonzentrationen an Ethanol und Acetat am Ende des Versuches teilweise deutlich unterschieden (Abbildung 57 C und D). Je höher die gewählten

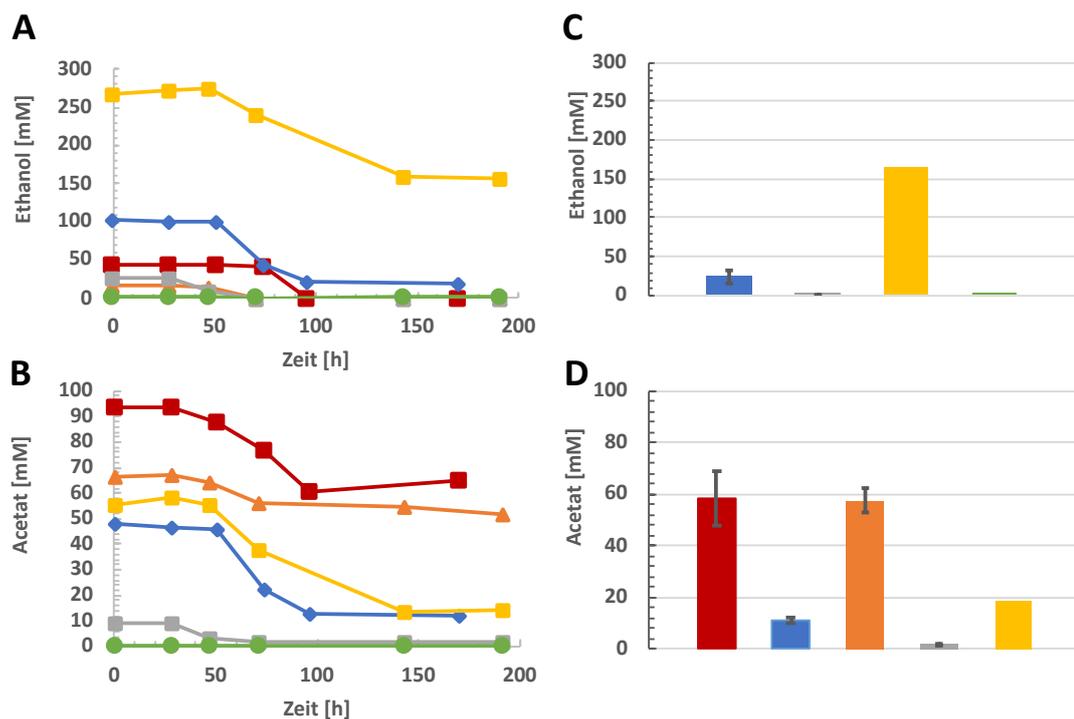


Abbildung 57: A: Ethanol-, B: Acetatkonzentrationen von *C. kluyveri* in Tanner-Medium „modified“ 2 mit der Gasphase Synthesegas sowie ■ 50 mM Ethanol/100 mM Acetat; ■ 100 mM Ethanol/40 mM Acetat; ■ 15 mM Ethanol/70 mM Acetat; ■ 25 mM Ethanol und 10 mM Acetat; ■ 250 mM Ethanol/50 mM Acetat (Positivkontrolle) und ■ keine Zugabe von Ethanol und Acetat (Negativkontrolle). C: Ethanol-, D: Acetatkonzentrationen der zugehörigen Triplikate zum Zeitpunkt der letzten Messung – Mittelwerte mit eingezeichneter Standardabweichung.

Substratkonzentrationen waren, desto höher konnten auch die Abweichungen ausfallen. Die Höhe der Endkonzentrationen selbst waren von den gewählten Substratkonzentrationen abhängig. In der weiteren Resultatdarstellung sind nun die produzierten Butyrat- und Capronatkonzentrationen der repräsentativ gewählten Kulturen zu sehen (Abbildung 58 A und B). Im Falle von Butyrat ergaben sich folgende Produktkonzentrationen (angeordnet von der höchsten zur niedrigsten Konzentration): in der Kultur mit 50 mM Ethanol und 100 mM Acetat wurden 27,9 mM Butyrat, in der Positivkontrolle wurden 18,5 mM Butyrat, in der Kultur mit 100 mM Ethanol und 40 mM Acetat wurden 15,7 mM Butyrat, in der Kultur mit 15 mM Ethanol und 70 mM Acetat wurden 10,2 mM Butyrat und in der Kultur mit 25 mM Ethanol und 10 mM Acetat wurden 2,3 mM am Ende des Versuches detektiert. In der Negativkontrolle konnte kein Butyrat nachgewiesen werden. Die Analyse von Capronat ergab folgenden Produktkonzentrationen (angeordnet von der höchsten zur niedrigsten Konzentration): in

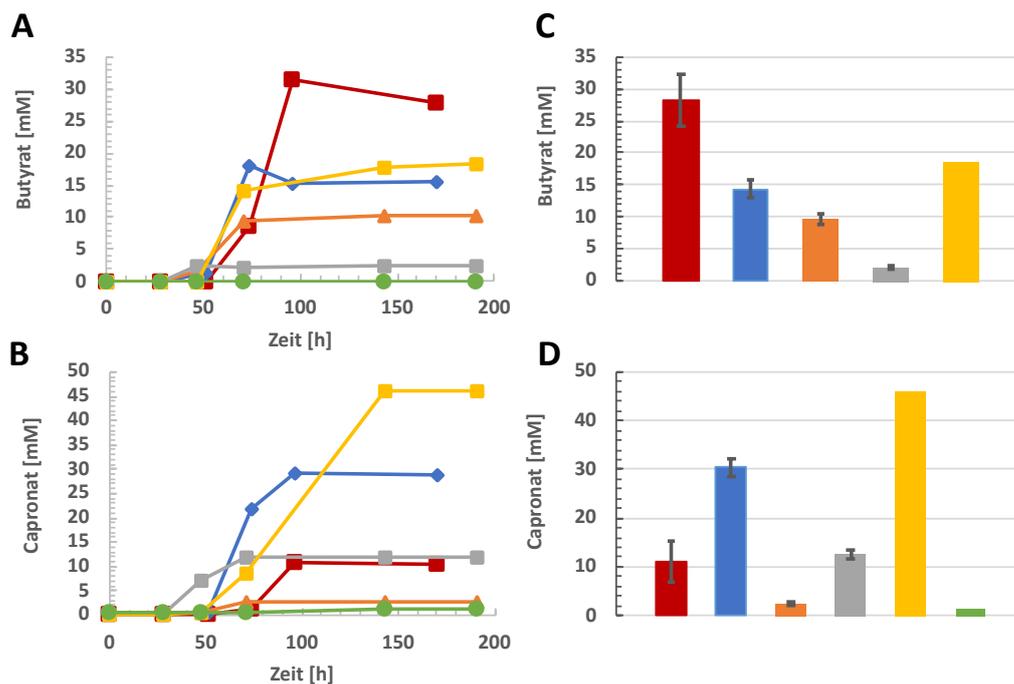


Abbildung 58: A: Butyrat-, B: Capronatkonzentrationen von *C. kluyveri* in Tanner-Medium „modified“ 2 mit der Gasphase Synthesegas sowie 50 mM Ethanol/100 mM Acetat; 100 mM Ethanol/40 mM Acetat; 15 mM Ethanol/70 mM Acetat; 25 mM Ethanol und 10 mM Acetat; 250 mM Ethanol/50 mM Acetat (Positivkontrolle) und keine Zugabe von Ethanol und Acetat (Negativkontrolle). C: Butyrat-, D: Capronatkonzentrationen der zugehörigen Triplikate zum Zeitpunkt der letzten Messung – Mittelwerte mit eingezeichneter Standardabweichung.

der Positivkontrolle wurden 46,0 mM Capronat, in der Kultur mit 100 mM Ethanol und 40 mM Acetat wurden 29,0 mM Capronat, in der Kultur mit 25 mM Ethanol und 10 mM Acetat wurden 11,8 mM Capronat, in der Kultur mit 50 mM Ethanol und 100 mM Acetat wurden 10,4 mM Capronat und in der Kultur mit 15 mM Ethanol und 70 mM Acetat wurden 2,6 mM Capronat zum Ende des Versuches detektiert. Auch in der Negativkontrolle konnten zum letzten Messpunkt 1,3 mM Capronat nachgewiesen werden. Diese Tendenzen und Reihenfolgen in der Butyrat- und Capronatkonzentrationen wurden auch beim Vergleich aller Triplikate untereinander festgestellt (Abbildung 58 C und D).

3.3.1 Zusammenfassung der Resultate bei der Untersuchung des Einflusses verschiedener Substratkonzentrationen auf das Wachstum und das Produktspektrum von *C. kluyveri*

In Tabelle 12 sind die wichtigsten Ergebnisse dieses Versuches zur besseren Übersicht und Analyse zusammengefasst. Angeordnet sind alle Ansätze von der höchsten zur niedrigsten eingesetzten Ethanolkonzentration. Mittels der Auswertung der gaschromatographischen Analyse wurde auch der jeweilige Quotient aus Ethanol und Acetat der zusammengehörenden Triplikate ausgehend von den tatsächlich gemessenen Konzentrationen bestimmt. Der Ethanol/Acetat-Quotient wurde zu Beginn und am Ende des Wachstumsversuchs errechnet. Des Weiteren sind die jeweils in den Kulturen maximal gemessenen Werte der OD_{600nm} sowie die maximalen Konzentrationen an Butyrat und Capronat mit aufgeführt. Bei Betrachtung der zusammengefassten Ergebnisse lässt sich erkennen, dass je höher die eingesetzte Ethanolkonzentration war, desto höher auch die Capronatkonzentration war. Im Falle eines zum Acetat verschobenen Quotienten am Anfang des Versuches wurde mehr Butyrat als Capronat gebildet.

Tabelle 12: Überblick über die genutzten Ethanol und Acetatkonzentrationen, den bestimmten Ethanol/Acetat-Quotient am Anfang und Ende des Versuchs, die maximal gemessenen OD_{600nm} -Werte sowie die maximal detektierten Konzentrationen an Butyrat und Capronat im Laufe der Inkubation (Resultate beziehen sich, falls durchgeführt, auf alle Triplikate).

	Ethanol/Acetat- Quotient (Beginn)	Ethanol/Acetat- Quotient (Ende)	OD_{600nm}	Butyrat [mM]	Capronat [mM]
250 mM Ethanol/50 mM Acetat	4,8	11,5	0,27	18,5	46,0
100 mM Ethanol/40 mM Acetat	2,3	2,2	0,44	18,1	32,6
50 mM Ethanol/100 mM Acetat	0,5	0	0,39	32,5	15,8

Tabelle 12 (fortgesetzt)

	Ethanol/Acetat- Quotient (Beginn)	Ethanol/Acetat- Quotient (Ende)	OD_{600nm}	Butyrat [mM]	Capronat [mM]
25 mM Ethanol/10 mM Acetat	3,0	0,65	0,19	2,7	13,9
15 mM Ethanol/70 mM Acetat	0,2	0	0,1	10,2	2,81
Keine Zugabe von Ethanol und Acetat	-*	-*	0,04	0	1,33

*Bestimmung nicht möglich, da Acetat komplett verbraucht wurde.

3.4 Untersuchung des Einflusses von Kohlenmonoxid auf das Wachstum und den Stoffwechsel von *C. kluyveri*

Im Laufe dieser Arbeit erschien 2016 eine Publikation (Diender *et al.*, 2016), welche ebenfalls eine Co-Kultivierung von *C. autoethanogenum* und *C. kluyveri* zur Produktion von u.a. Capronat zum Thema hatte. In dieser Publikation wurde die Behauptung aufgestellt, dass Kohlenmonoxid (Bestandteil des Synthesegases) eine toxische Wirkung auf *C. kluyveri* hat. In dieser Veröffentlichung wurden zwar Versuche unternommen, die zeigten, wie Kohlenmonoxid die Konzentrationen der Produkte einer Cofermentation stark beeinflusst (Vergleich schüttelnde gegen nicht schüttelnde Bedingungen), jedoch wurde kaum der direkte Einfluss von Kohlenmonoxid auf *C. kluyveri* allein gezeigt. Es wurde lediglich ein Wachstumsexperiment gezeigt, bei dem *C. kluyveri* unter Standardbedingungen kultiviert wurde und nach vier Tagen Inkubation 50 kPa (0,5 bar) Kohlenmonoxid zugegeben wurde. Diese Zugabe zeigte aber in diesem Versuch keinen Einfluss auf die Bildung der Endprodukte. Für diese Arbeit war es essentiell, den genauen Effekt und Einfluss von Kohlenmonoxid auf *C. kluyveri* zu klären, da in den simultanen und sequentiellen Cofermentationen (ohne Wechsel der Gasphase während der Kultivierung) *C. kluyveri* direkt dem Kohlenmonoxid ausgesetzt war. Zur Untersuchung dieses Einflusses wurden verschiedene Kultivierungen mit verschiedenen Gasphasen mit *C. kluyveri* vorgenommen. *C. kluyveri* wurde mit reinem Kohlenmonoxid, mit Synthesegas mit einem Anteil von 40 % Kohlenmonoxid (2.2.1) und zum Vergleich mit der üblicherweise genutzten Gasphase N_2/CO_2 kultiviert. Die jeweiligen Ansätze wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Kultivierungen erfolgten in 125-ml-Müller-Krempel-Flaschen, welche 50 ml Tanner-Medium „modified“ enthielten, welchem 100 mM Ethanol und 20 mM Acetat zugefügt wurde. Die Kulturen wurden nicht geschüttelt, um eine Diffusion von Kohlenmonoxid in das Medium zu vermeiden und um damit dieselben Bedingungen zu erzeugen wie in den simultanen und sequentiellen Cofermentationen. Der Wachstumsverlauf der repräsentativ gewählten Kulturen ist in Abbildung 59 (A) zu sehen. Es ist deutlich zu erkennen, dass es nur bei Verwendung der Gasphase N_2/CO_2 zum Wachstum kommen konnte. Diese Kultur erzielte eine OD_{600nm} von 0,326 nach 46 h. In den anderen zwei Kulturen überschritt die OD_{600nm} nie Werte von 0,03 (Gasphase Kohlenmonoxid) und 0,01 (Gasphase Synthesegas). Dieselbe Situation war in

allen Kulturen der Triplikate vorzufinden (Abbildung 59 B). Nur die Kulturen, deren Gasphase aus N_2/CO_2 bestand, zeigten eine deutlich erhöhte OD_{600nm} zum Ende des Versuchs. Korrelierend zum Verlauf der OD_{600nm} zeigte sich die Auswertung der Substratkonzentrationen von Ethanol und Acetat in den ausgewählten Kulturen. Den Nährmedien zugefügt werden sollten 100 mM Ethanol und 20 mM Acetat. Die gaschromatographische Analyse zeigte jedoch, dass die tatsächlichen Anfangskonzentrationen von Ethanol 128,8 mM, 134,2 mM sowie 137,0 mM waren. Die Acetatkonzentrationen zu Beginn des Wachstumsversuches lagen bei 18,7 mM, 33,1 mM und 21,8 mM. Trotz dieser Abweichungen von den gewünschten Ausgangskonzentrationen ist in diesem Versuch eine klare Tendenz zu sehen (Abbildung 60 A und B). So blieben die Ethanol- und Acetatkonzentrationen über die Dauer des Versuchs in der Kultur, welche zum einen reines Kohlenmonoxid als Gasphase hatte und zum anderen in der Kultur, welche mit Synthesegas befüllt wurde, nahezu unverändert. In der Kultur mit der Gasphase N_2/CO_2 wurden Ethanol und Acetat von *C. kluyveri* konsumiert. Die Ethanolkonzentration sank von 134,2 mM auf 53,6 mM nach 191 h ab. Der Verbrauch von Ethanol begann nach 25 h Inkubation. Der Verbrauch von Acetat begann nach dem gleichen Zeitraum, während die Konzentration von einem Anfangswert von 33,1 mM auf 4,3 mM nach 191 h fiel. Gleicher Sachverhalt und gleiche Konstellation waren im Vergleich aller jeweilig zugehörigen Kulturen bei Beendigung des Versuchs festzustellen (Abbildung 60 C und D). In allen Kulturen, deren Gasphase aus

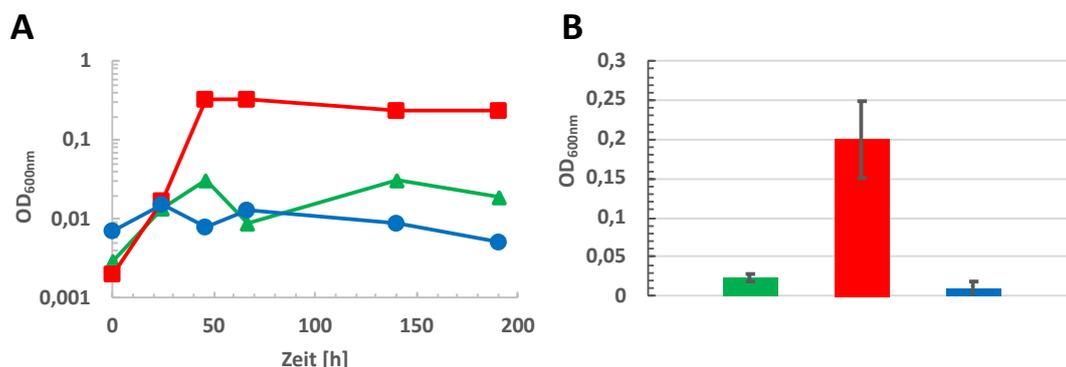


Abbildung 59: A: Wachstum von *C. kluyveri* in Tanner-Medium „modified“ mit verschiedenen Gasphasen ▲ Kohlenmonoxid, ■ N_2/CO_2 , ● Synthesegas. B: OD_{600nm} der zugehörigen Triplikate zum Zeitpunkt der letzten Messung – Mittelwerte mit eingezeichneter Standardabweichung.

Kohlenmonoxid oder Synthesegas bestand, blieben die Ethanol- und Acetatkonzentrationen über die Dauer des Versuches unverändert. Die gezeigten Abweichungen bei den jeweiligen Kulturen waren schon am Anfang festzustellen und waren kein Zeichen einer Stoffwechselaktivität. In allen Kulturen, die mit N_2/CO_2 befüllt waren, war eine deutliche Abnahme der Ethanol- und Acetatkonzentration festzustellen. So nahmen in den zwei nicht gezeigten Kulturen die Ethanolkonzentrationen von 143,8 mM auf 107,8 mM bzw. von 131,2 mM auf 65,8 mM ab. Acetat sank in den nicht gezeigten Kulturen von 13,8 mM auf 1,3 mM bzw. von 26,9 mM auf 3,23 mM. Ein zum Verbrauch der Substrate passendes Bild ergab sich bei Betrachtung der Produktkonzentrationen von Butyrat und Capronat in den ausgewählten Kulturen (Abbildung 61 A und B). Die Bildung beider Substanzen konnte nur in der Kultur mit der Gasphase N_2/CO_2 gezeigt werden. Nach 25 h Kultivierung stiegen diese Konzentrationen stark an und erreichten im Falle von Butyrat eine Konzentration von 7,9 mM (kurzzeitiger

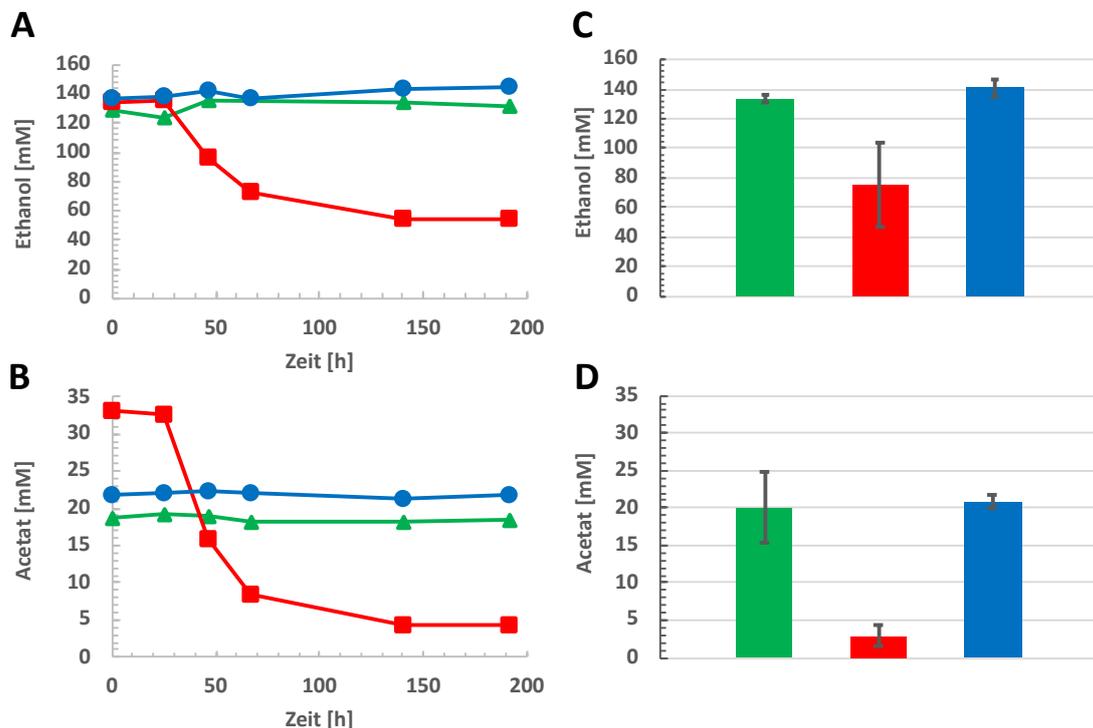


Abbildung 60: A: Ethanol-, B: Acetatkonzentrationen von *C. kluyveri* in Tanner-Medium „modified“ mit verschiedenen Gasphasen ▲ Kohlenmonoxid, ■ N_2/CO_2 , ● Synthesegas. C: Ethanol-, D: Acetatkonzentrationen der zugehörigen Triplikate zum Zeitpunkt der letzten Messung – Mittelwerte mit eingezeichneter Standardabweichung.

Maximalwert 11,4 mM nach 46 h) und im Falle von Capronat 38,8 mM nach 191 h Inkubation. In den restlichen zwei Kulturen mit den Gasphasen Kohlenmonoxid und Synthesegas konnte kein Butyrat oder Capronat nachgewiesen werden. Diese Sachlage war auch in allen Triplikaten festzustellen (Abbildung 61 C und D). Deutlich erhöhte Butyrat- und Capronatkonzentrationen waren in allen drei Kulturen mit der Gasphase N_2/CO_2 zu finden wenn auch die Konzentrationen untereinander zum Teil stark variierten. Mittels dieses Versuches wurde zwar der negative Effekt von Kohlenmonoxid auf *C. kluyveri* gezeigt, jedoch konnte keine direkte Unterscheidung gemacht werden, ob das Kohlenmonoxid nun toxisch (Absterben der Zellen) oder inhibitorisch (reversible Blockierung des Stoffwechsels) wirkt. Um diese Fragestellung zu klären, wurden drei neue Kulturen mit 1 ml aus den jeweiligen repräsentativen Kulturen (Einfachbestimmung) inokuliert, um zu klären, ob die Zellen der *C. kluyveri*-Kulturen wieder Wachstum zeigen bzw. noch lebensfähig sind. Inokuliert wurden 125-ml-Müller-Krempel-Flaschen, welche mit 50 ml Tanner-Medium „modified“ 2 und der Gasphase N_2/CO_2 befüllt waren. Das

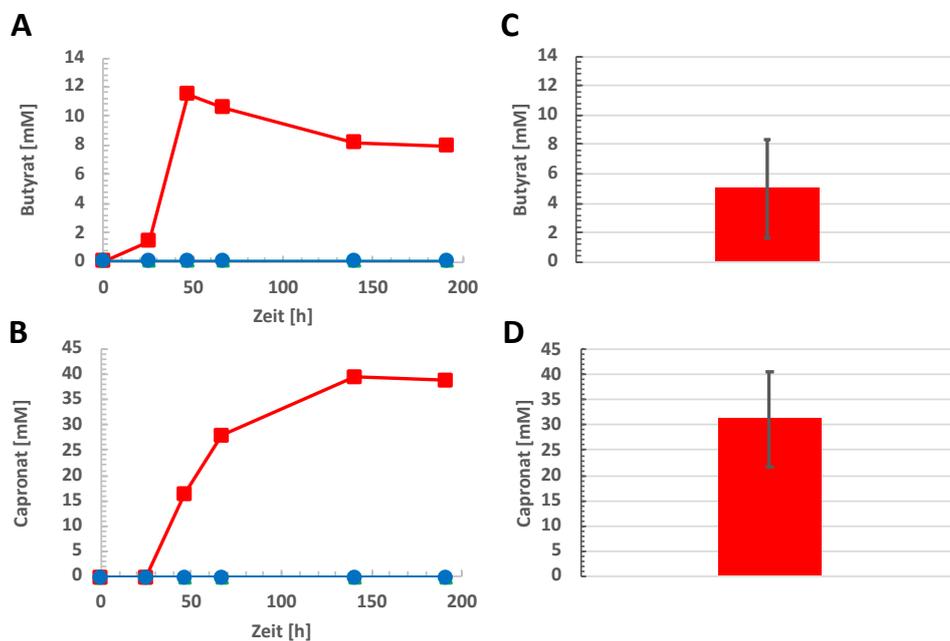


Abbildung 61: A: Butyrat- B: Capronatkonzentrationen von *C. kluyveri* in Tanner-Medium „modified“ mit verschiedenen Gasphasen ▲ Kohlenmonoxid, ■ N_2/CO_2 , ● Synthesegas. C: Butyrat-, D: Capronatkonzentrationen der zugehörigen Triplikate zum Zeitpunkt der letzten Messung – Mittelwerte mit eingezeichneter Standardabweichung.

Wachstum wurde bestimmt, indem zum Beginn und Ende der Kultivierung die OD_{600nm} bestimmt wurde. Zur Beurteilung einer vorhandenen Stoffwechselaktivität wurden die Konzentrationen von Butyrat und Capronat am Ende der Kultivierung herangezogen. Die Resultate dieses Versuches sind in Tabelle 13 zusammengefasst. Es ist zu erkennen, dass nur die Kulturen, die zuvor unter der Gasphase N_2/CO_2 und Synthesegas kultiviert wurden, wieder Wachstum zeigten. So erreichten diese Kulturen OD_{600nm} von 0,30 und 0,32. Diese Kulturen waren auch wieder im Stande, Butyrat und Capronat mit einer Konzentration von 4,9 mM Butyrat und 32,7 mM Capronat in der Kultur, die bereits zuvor unter N_2/CO_2 inkubiert wurde und 7,7 mM Butyrat und 12,6 mM Capronat in der Kultur, die zuvor unter Synthesegas inkubiert wurde, zu produzieren.

Tabelle 13: Ergebnisse der Inokulation von Tanner-Medium „modified“ 2 (Gasphase N_2/CO_2) mit *C. kluyveri*, welcher zuvor unter den Gasphasen Kohlenmonoxid, N_2/CO_2 und Synthesegas inkubiert wurde.

	OD_{600nm} zum Beginn der Inkubation	OD_{600nm} zum Ende der Inkubation	Butyrat zum Ende der Inkubation [mM]	Capronat zum Ende der Inkubation [mM]
<i>C. kluyveri</i> aus Kultur mit Kohlenmonoxid	0,01	0,03	0	0
<i>C. kluyveri</i> aus Kultur mit N_2/CO_2	0,01	0,30	4,9	32,7
<i>C. kluyveri</i> aus Kultur mit Synthesegas	0,01	0,32	7,7	12,6

3.5 Untersuchung der Fähigkeit von *C. carboxidivorans* und *C. ljungdahlii* zur Umwandlung von Butyrat und Capronat in die entsprechenden Alkohole

In den simultanen und sequentiellen Cofermentationen, die zu einer Produktion von Capronat führten, war neben Capronat immer auch Butanol und Hexanol in der Analyse vorzufinden. Im Falle von Cofermentationen mit *C. carboxidivorans* ist dieses Resultat wenig überraschend, da er nativ in der Lage ist, Butanol und Hexanol, neben Butyrat und Capronat, zu bilden (Phillips *et al.*, 2015; Fernández-Naveira *et al.*, 2017a). In dieser Publikation wird auch ein Stoffwechselweg für die Umwandlung von Butyrat und Capronat zu Butanol und Hexanol postuliert. Butyrat wird hierbei mittels der Aldehyd-Oxidoreduktase in Butyraldehyd umgewandelt, welches dann wiederum durch eine Aldehyd-/Alkohol-Dehydrogenase zu Butanol umgesetzt wird. Derselbe Mechanismus soll im Falle der Umwandlung von Capronat zu Hexanol vorliegen, auch wenn der erste Schritt der Umwandlung von Capronat zu Capronaldehyd von den Autoren nur vermutet wurde. Somit ist *C. carboxidivorans* in der Lage, in den Cofermentationen gebildetes Capronat wieder zu verstoffwechseln, was nicht unerheblich ist.

Im Falle von *C. ljungdahlii* gestaltete sich die Situation zusätzlich noch etwas anders. *C. ljungdahlii* ist nativ nicht in der Lage, Butanol und Hexanol zu bilden. Bei *C. kluyveri* konnte bei Wachstumsversuchen in der spätexponentiellen Wachstumsphase die Produktion von Butanol und Hexanol nachgewiesen werden (Thauer *et al.*, 1968), wenn auch, wie die Autoren behaupteten, nur in „vernachlässigbaren Mengen“. Genaue Konzentrationsangaben wurden nicht gemacht und es wurde auch nicht weiter darauf eingegangen. Erst einige Jahre später hatte man herausgefunden, dass *C. kluyveri* nur Butanol und Hexanol bildet, wenn als Substrat Succinat oder 4-Hydroxybutyrat verwendet wird (Kenealy und Waselefsky, 1985). In den Experimenten dieser Arbeit und mit den damit verbundenen Konditionen war *C. kluyveri* nicht in der Lage, Butanol und Hexanol zu bilden und daher war es nun sehr verwunderlich, in Cofermentationen von *C. ljungdahlii* und *C. kluyveri* genau diese beiden Substanzen vorzufinden. Erklärbar wird dieses Phänomen erst dadurch, dass *C. ljungdahlii* die Fähigkeit besitzt, Butyrat und Capronat in ihre entsprechenden Alkohole umzuwandeln. Der Nachweis, dass *C. ljungdahlii* die Fettsäuren Butyrat und Capronat zu Butanol und Hexanol umwandeln kann, wurde bereits zuvor erbracht (Perez *et al.*, 2013). In dieser Publikation wurde derselbe Mechanismus für

möglich gehalten, wie er bei *C. carboxidivorans* zuvor beschrieben wurde. Aufgrund dieser Fähigkeit von *C. ljungdahlii* kann auch dieser Organismus Einfluss nehmen auf mögliche Capronatkonzentrationen in Cofermentationen.

Eine Übersicht über die Wechselwirkungen der in der Cofermentation genutzten Organismen ist in Abbildung 62 zu sehen. Die Fähigkeit von *C. kluyveri*, direkt Butanol und Hexanol zu bilden, wird nur als eventuelle Möglichkeit dargestellt. Um auch im Rahmen dieser Arbeit die mögliche Umsetzung der Fettsäuren in ihre Alkohole durch die in dieser Arbeit genutzten Stämme zu untersuchen, wurden Kultivierungen von *C. ljungdahlii* und *C. carboxidivorans* Butyrat und Capronat zugegeben und die Auswirkungen untersucht.

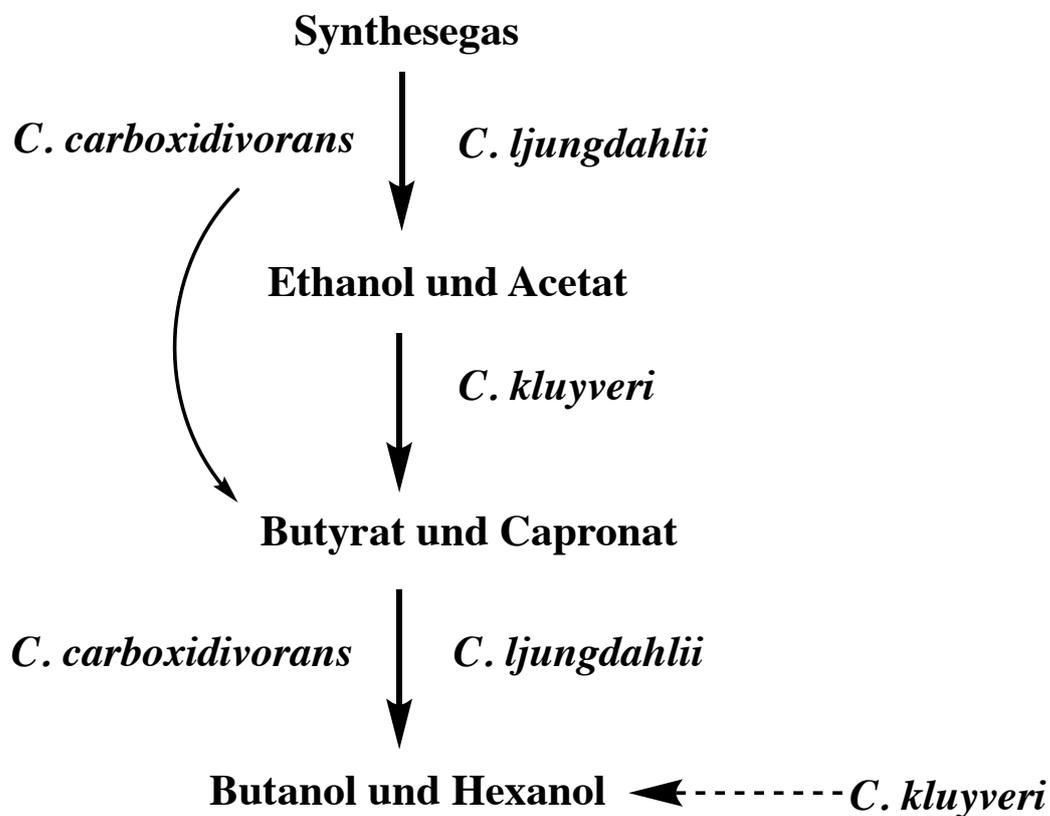


Abbildung 62: Schematischer Überblick, welche Organismen in einer Cofermentation in der Lage sind Butyrat, Capronat, Butanol und Hexanol zu bilden.

3.5.1 Umwandlung von Butyrat und Capronat durch *C. carboxidivorans*

Es wurde in diesem Experiment versucht, möglichst dieselben Bedingungen zu schaffen wie in einer Cofermentation, d.h. *C. carboxidivorans* wurde in 100 ml Tanner-Medium „modified“ in 1000-ml-Müller-Krempel-Flaschen (sieben Ansätze) inokuliert. Es wurden nicht schüttelnde Bedingungen gewählt, und die Gasphase der Kulturflaschen war Synthesegas (aufgefüllt in einem siebentägigen Zyklus). Es wurde vermieden, den Kulturen eine zu hohe Konzentration (nicht mehr als 5-6 mM) an Butyrat und Capronat zuzufügen, um Toxizitätseffekte zu vermeiden. Drei Kulturen wurde Butyrat zugegeben, drei weiteren Capronat und in einer Kultur wurde auf die Zugabe von Butyrat und Capronat verzichtet (Kontrollkultur). Der Verlauf der OD_{600nm} und des pH-Wertes von repräsentativ gewählten Kulturen über die Inkubationsdauer ist in Abbildung 63 (A und B) zu sehen. Alle Kulturen hatten im Vergleich zu vorhergegangenen Kultivierungen von *C. carboxidivorans* eine geringere OD_{600nm} . Die höchste OD_{600nm} wurde von der *C. carboxidivorans*-Kultur, welcher Butyrat zugegeben wurde, erreicht. Diese Kultur hatte

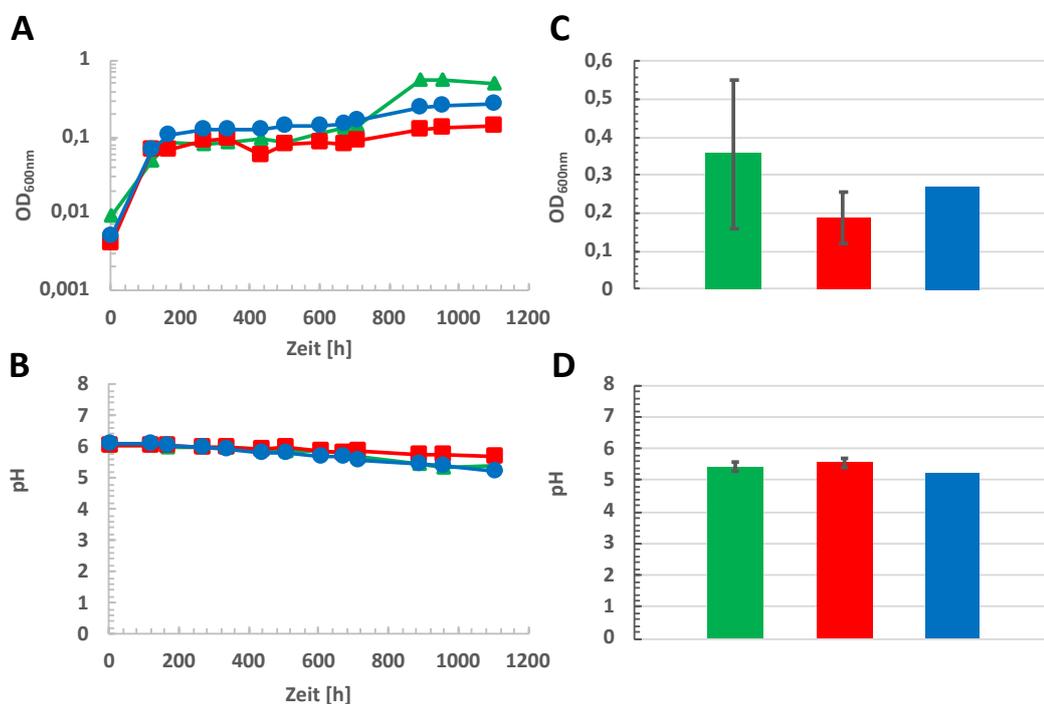


Abbildung 63: A: Wachstum, B: pH von *C. carboxidivorans* in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas und ▲ Zugabe von Butyrat, ■ Zugabe von Capronat, ● keiner Zugabe von Butyrat oder Capronat (Kontrollkultur). C: OD_{600nm} , D: pH der zugehörigen Triplikate zum Zeitpunkt der letzten Messung – Mittelwerte mit eingezeichneter Standardabweichung.

eine OD_{600nm} von 0,48 nach 1103 h Inkubation. In dieser Kultur erfolgte ein zweiter Anstieg der OD_{600nm} nach der stationären Phase, welche von einer Inkubationsdauer von 167 bis 711 h reichte. Die Kontrollkultur erzielte zum letzten Messpunkt eine OD_{600nm} von 0,27, und die Kultur mit Zugabe von Capronat zeigte mit einem Wert von 0,14 die geringste OD_{600nm} . Die anfänglichen pH-Werte aller repräsentativen Kulturen lagen bei 6, trotz der Zugabe von Butyrat und Capronat. Nach 1103 h Kultivierung war der pH-Wert in der Kultur mit Zugabe von Butyrat auf 5,4, in der Kultur mit Zugabe von Capronat auf 5,7 und in der Kontrollkultur auf 5,2 gefallen. Im Vergleich aller Kulturen fiel die finale OD_{600nm} teils sehr unterschiedlich aus (Abbildung 63 C und D). Im Falle der Kulturen mit Butyratzugabe zeigte eine der drei Kulturen bei Kultivierungsende eine vergleichbare OD_{600nm} mit 0,45, während eine weitere Kultur nur eine OD_{600nm} von 0,13 erreichte. Die zuvor nicht gezeigten Kulturen mit Zugabe von Capronat zeigten geringere Unterschiede, weil mit Werten von 0,14 und 0,16 vergleichbare OD_{600nm} gemessen wurden. Im Falle der pH-Werte konnten keine großen Unterschiede festgestellt werden. In allen Kulturen fielen

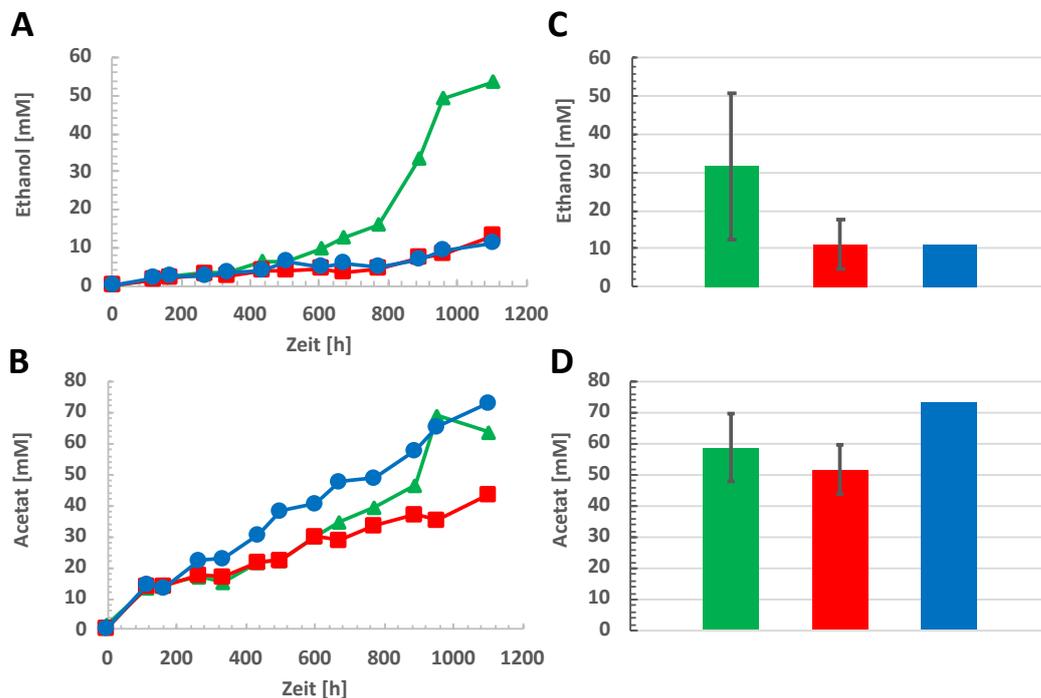


Abbildung 64: A: Ethanol-, B: Acetatkonzentrationen von *C. carboxidivorans* in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas und ▲ Zugabe von Butyrat, ■ Zugabe von Capronat, ● keiner Zugabe von Butyrat oder Capronat (Kontrollkultur). C: Ethanol-, D: Acetatkonzentrationen der zugehörigen Triplikate zum Zeitpunkt der letzten Messung – Mittelwerte mit eingezeichneter Standardabweichung.

die pH-Werte und erreichten Werte um ca. 5,3-5,6. Die Darstellung der Stoffwechselfparameter wird begonnen mit den nicht durch die Zugabe direkt betroffenen Konzentrationen an Ethanol und Acetat der ausgewählten Kulturen (Abbildung 64 A und B). Ethanol erreichte in der Kultur mit Zugabe von Capronat und in der Kontrollkultur (korrelierend zur OD_{600nm}) geringere Konzentrationen von 13,2 mM bzw. 11,0 mM. Nur in der Kultur mit Zugabe von Butyrat wurde mit einer Konzentration von 53,7 mM bei Inkubationsende deutlich mehr Ethanol gebildet. Im Falle der Acetatkonzentration lag die Situation umgekehrt vor. Hier erreichte die Kontrollkultur, welche zuvor noch die geringste Ethanolkonzentration hatte, die höchste Acetatkonzentration mit 73,2 mM. Die Kultur mit Zugabe von Butyrat erreichte 64,0 mM und die Kultur mit Zugabe von Capronat erreichte im Vergleich dazu nur eine Konzentration von 43,6 mM Acetat. In allen gezeigten Kulturen war zu sehen, wie die Acetatkonzentrationen stetig über die Zeit anstiegen. Der Befund, dass die Ethanolkonzentrationen höher und die

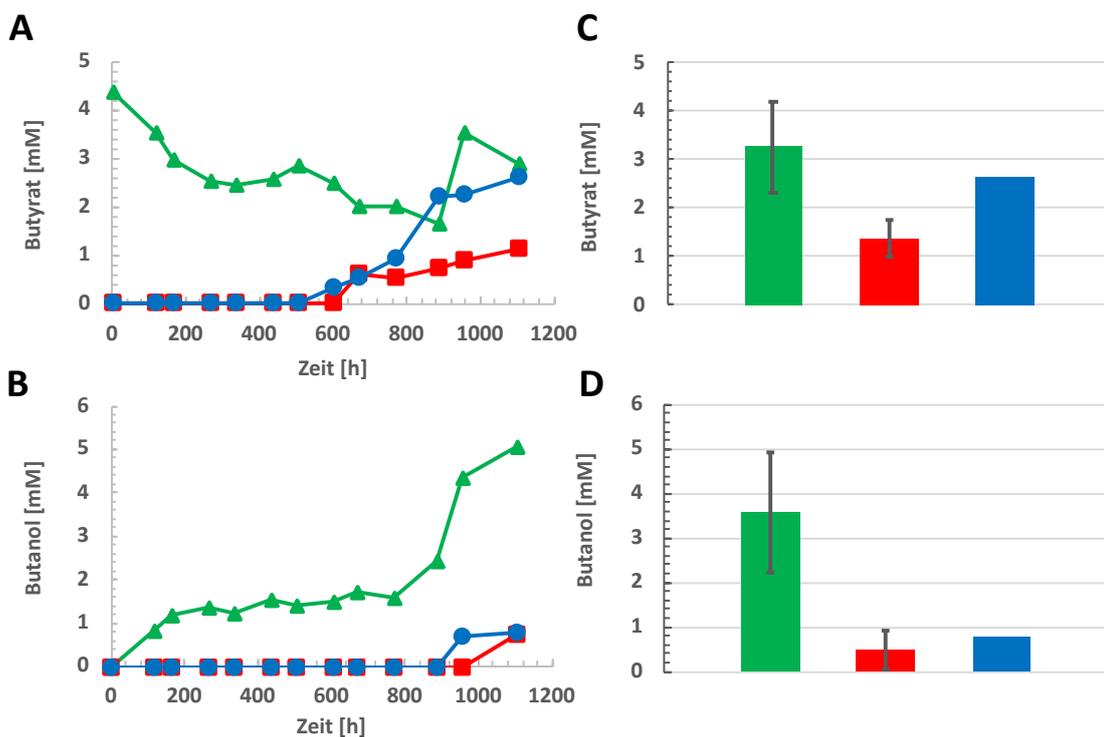


Abbildung 65: A: Butyrat-, B: Butanolkonzentrationen von *C. carboxidivorans* in Tanner-Medium „modified“ mit der Gashase Synthesegas und ▲ Zugabe von Butyrat, ■ Zugabe von Capronat, ● keiner Zugabe von Butyrat oder Capronat (Kontrollkultur). C: Butyrat-, D: Butanolkonzentrationen der zugehörigen Triplikate zum Zeitpunkt der letzten Messung – Mittelwerte mit eingezeichneter Standardabweichung.

Acetatkonzentrationen geringer ausfielen als in den Kulturen mit Zugabe von Butyrat und Capronat im Vergleich zur Kontrollkultur, war fast in allen Kulturen zu finden (Abbildung 64 C und D). Im Falle der Kulturen mit Zugabe von Butyrat ist erwähnenswert, dass nur die zuvor ausgewählte Kultur eine derart hohe Ethanolkonzentration von 53,7 mM erreichte, die anderen zwei Kulturen hingegen nur 19,4 mM bzw. 21,6 mM. In Abbildung 65 (A und B) ist der Verlauf der Butyrat- und Butanolkonzentrationen der ausgewählten Kulturen direkt gegenübergestellt. In den Kulturen, denen kein Butyrat zugegeben wurde, konnte eine eigenständige Bildung von Butyrat festgestellt werden, welche nach 500-600 h Inkubation begann. In der Kultur mit Zugabe von Capronat wurde eine Butyratkonzentration von 1,1 mM erreicht, während in der Kontrollkultur eine Konzentration von 2,6 mM erzielt wurden. In der Kultur mit Zugabe von Butyrat waren zu Beginn des Versuchs 4,4 mM Butyrat detektiert worden. Es ist zu erkennen, dass die Butyratkonzentration bis zu einer Inkubationsdauer von 888 h kontinuierlich abnahm (bis

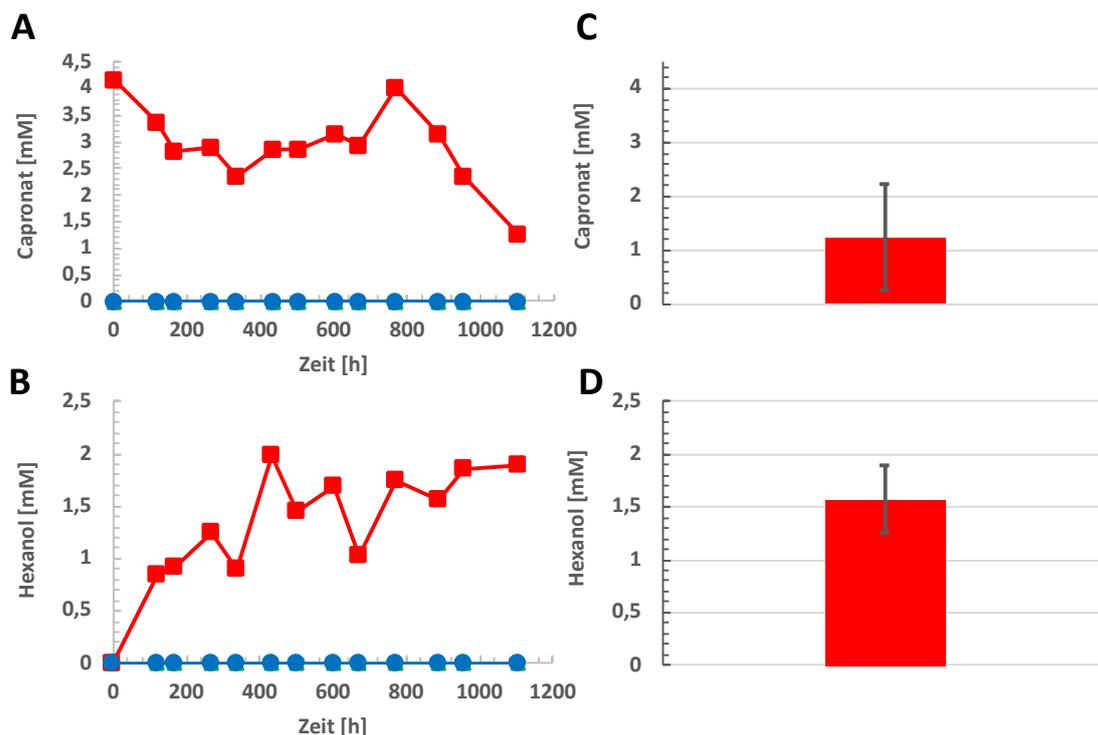


Abbildung 66: A: Capronat-, B: Hexanolkonzentrationen von *C. carboxidivorans* in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas und ▲ Zugabe von Butyrat, ■ Zugabe von Capronat, ● keiner Zugabe von Butyrat oder Capronat (Kontrollkultur). C: Capronat-, D: Hexanolkonzentrationen der zugehörigen Triplikate zum Zeitpunkt der letzten Messung – Mittelwerte mit eingezeichneter Standardabweichung.

1,7 mM), um dann nochmal auf eine finale Konzentration von 2,9 mM zu steigen. Der Konzentrationsverlauf des entsprechenden Alkohols zeigt, dass Butanol in der Kultur mit Zugabe von Capronat und in der Kontrollkultur erst nach 888 h Inkubation produziert wurde. In beiden Kulturen wurden dabei mit Werten von ca. 0,7 mM verhältnismäßig geringe Konzentrationen an Butanol detektiert. In der Kultur mit Zugabe von Butyrat war die Butanolkonzentration mit einer Konzentration von 5,0 mM mehr als fünfmal höher. Dieselbe Situation ergab sich bei Betrachtung der Butyrat- und Butanolkonzentrationen für alle Kulturen (Abbildung 65 C und D). In allen Kulturen mit Zugabe von Butyrat nahm dessen Konzentration über die Dauer der Kultivierung ab. In einer Kultur wurde am letzten Messpunkt eine zur repräsentativ gewählten Kultur vergleichbare Butyratkonzentration von 2,5 mM (Konzentration bei Start der Kultivierung: 4,3 mM) und eine noch höhere Konzentration von 4,3 mM (Konzentration bei Start der Kultivierung: 5,8 mM) detektiert. Damit korrelierten die Butanolkonzentrationen. In allen Kulturen, denen Butyrat zugegeben wurde, war eine deutlich erhöhte Produktion von Butanol im Vergleich zu den anderen Kulturen festzustellen. So konnten neben den zuvor gezeigten 5,0 mM auch 2,3 mM und 3,3 mM in den beiden anderen Kulturen detektiert werden. In der weiteren Darstellung der Resultate ist der Konzentrationsverlauf von Capronat und des zugehörigen Alkohols Hexanol in den ausgewählten Kulturen zu sehen (Abbildung 66 A und B). Capronat war in der Kultur mit Zugabe von Butyrat und auch in der Kontrollkultur nicht nachweisbar. In der Kultur mit Zugabe von Capronat war anfänglich eine Konzentration von 4,2 mM nachweisbar. Diese Konzentration fiel auf einen Wert von 1,3 mM nach 1103 h Inkubation. In vergleichender Betrachtung aller Kulturen konnte auch in den anderen Kulturen mit Zugabe von Butyrat kein Capronat nachgewiesen werden (Abbildung 66 C und D). Eine Abnahme von Capronat und eine Zunahme von Hexanol war in allen Kulturen festzustellen, bei denen den Kulturen Capronat zugegeben wurde. So sank in den nicht gezeigten Kulturen die Capronatkonzentration von anfänglich 3,2 mM auf 0,6 mM bzw. von anfänglich 3,9 mM auf 2,4 mM. Hexanol war nur in den Kulturen mit Zugabe von Capronat nachweisbar. Neben den gezeigten 1,9 mM wurden in den restlichen zwei Kulturen 1,6 mM bzw. 1,2 mM Hexanol gebildet. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass in diesem Wachstumsversuch bei Zugabe von Butyrat und Capronat immer die Konzentrationen der jeweiligen zugehörigen Alkohole anstiegen.

3.5.2 Umwandlung von Butyrat und Capronat durch *C. ljungdahlii*

Die Umwandlung von Butyrat und Capronat zu Butanol und Hexanol wurde nach den zuvor gezeigten Versuchen mit *C. carboxidivorans* auch mit *C. ljungdahlii* durchgeführt. Die Methodik und die damit verbundenen Bedingungen der Kultivierung waren dieselben wie im Versuch mit *C. carboxidivorans*. Drei *C. ljungdahlii*-Kulturen wurde zu Beginn Butyrat, drei weiteren zu Beginn Capronat zugegeben. Einer weiteren Kultur wurde keines von beiden zugegeben (Kontrollkultur). In Abbildung 67 (A und B) ist der Verlauf der OD_{600nm} und des pH-Wertes über die Dauer der Inkubation zunächst von jeweils einer ausgewählten Kultur zu sehen. Alle drei Kulturen zeigten einen ähnlichen Verlauf der OD_{600nm} . Die Kultur mit Zugabe von Capronat und die Kontrollkultur erreichten eine finale OD_{600nm} von ca. 1,23 und die Kultur mit Zugabe von Butyrat erreichte eine geringere OD_{600nm} von 0,96. Die Unterschiede bei Betrachtung der pH-Werte der unterschiedlichen Kulturen fielen noch geringer aus. Alle Kulturen erreichten nach 863 h Kultivierung pH-Werte von 4,6-4,7. Einzige feststellbare Differenz des Verlaufes war, dass in den Kulturen

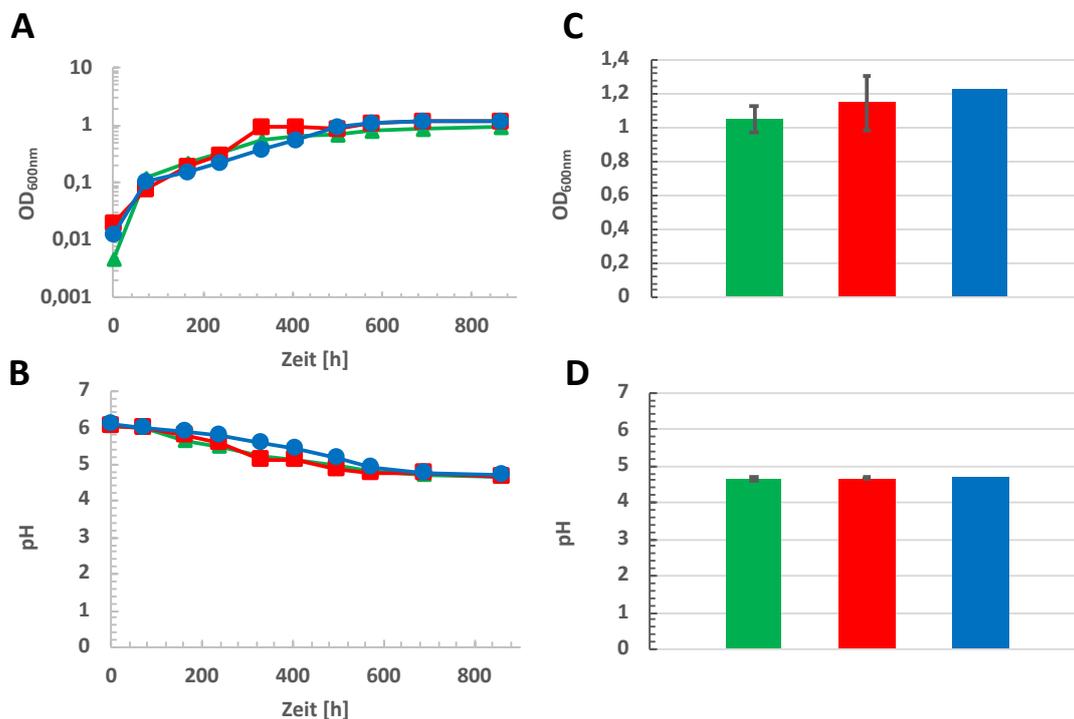


Abbildung 67: A: Wachstum, B: pH von *C. ljungdahlii* in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas und ▲ Zugabe von Butyrat, ■ Zugabe von Capronat, ● keiner Zugabe von Butyrat oder Capronat (Kontrollkultur). C: OD_{600nm} , D: pH der zugehörigen Triplikate zum Zeitpunkt der letzten Messung – Mittelwerte mit eingezeichneter Standardabweichung.

mit Zugabe von Butyrat und Capronat die pH-Werte schneller fielen. In allen Kulturen, denen Butyrat zugegeben wurde, waren geringere finale OD_{600nm} -Werte vorzufinden als in den restlichen Kulturen (Abbildung 67 C und D). Die Abweichungen innerhalb der Triplikate fielen gering aus. Nur ein Ansatz der Kulturen mit Zugabe von Capronat zeigte eine ähnlich niedrige OD_{600nm} von 0,96 wie die Kulturen, in die Butyrat zugegeben wurde. Im Falle der pH-Werte waren bei Beendigung des Versuches keine entscheidenden Unterschiede zueinander festzustellen. Die Zugabe von Butyrat und Capronat hatte einen deutlichen Einfluss auf den Verlauf der Ethanol- und Acetatkonzentrationen der ausgewählten Kulturen (Abbildung 68 A und B). Die Kontrollkultur erreichte mit 41,1 mM Ethanol deutlich mehr als die Kultur mit Zugabe von Butyrat (22,3 mM) und die Kultur mit Zugabe von Capronat (33,4 mM). Im Falle von Acetat konnten in allen Kulturen zum Versuchsende ca. 100 mM Acetat detektiert werden, jedoch ist zu erkennen, dass in den Kulturen mit Zugabe von Butyrat und Capronat ein früherer und schnellerer Anstieg der

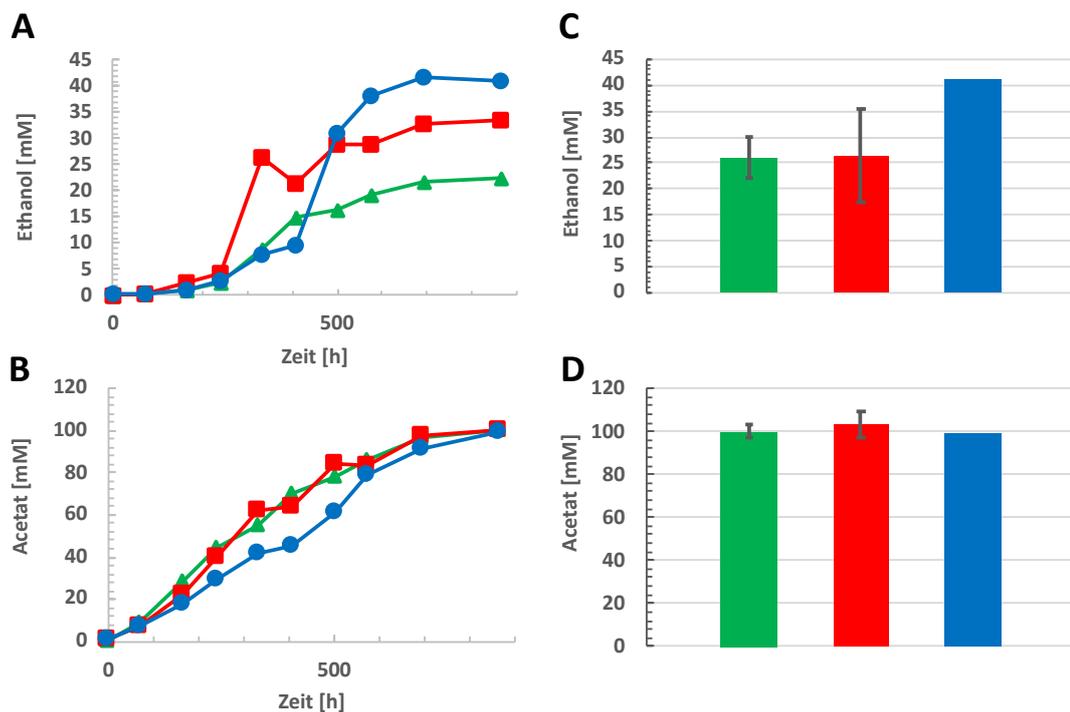


Abbildung 68: A: Ethanol-, B: Acetatkonzentrationen von *C. ljungdahlii* in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas und ▲ Zugabe von Butyrat, ■ Zugabe von Capronat, ● keiner Zugabe von Butyrat oder Capronat (Kontrollkultur). C: Ethanol-, D: Acetatkonzentrationen der zugehörigen Triplikate zum Zeitpunkt der letzten Messung – Mittelwerte mit eingezeichneter Standardabweichung.

Konzentration zu verzeichnen war. Die Tatsache, dass die Kulturen mit Zugabe von Butyrat und Capronat weniger Ethanol bildeten, war in allen Kulturen der Dreifachbestimmung zu erkennen (Abbildung 68 C und D). Die Acetatkonzentrationen waren zusammenfassend in allen Kulturen vergleichbar zur Kontrollkultur am Ende der Kultivierung. Entscheidend ist hier der Vergleich der Konzentrationsverläufe von Butyrat und Butanol in den repräsentativ ausgewählten Kulturen (Abbildung 69 A und B). Direkt zu erkennen ist, dass Butyrat nur in den Kulturen, in die dieses auch zugegeben wurde, detektierbar war. In keiner der anderen Kulturen wurde Butyrat nachgewiesen. In der Kultur mit der Zugabe von Butyrat ist zu sehen, wie die Konzentration von den anfangs zugefügten 5,4 mM auf eine Konzentration von 2,6 mM nach 863 h fällt. Korrelierend dazu ist zu erkennen, wie Butanol nur in der Kultur gebildet wird, der Butyrat zugegeben wurde. Die Butanolproduktion begann bereits nach 71 h und erreichte eine finale Konzentration von 2,2 mM. In allen Kulturen, denen Butyrat zugegeben wurde, fiel die Konzentration

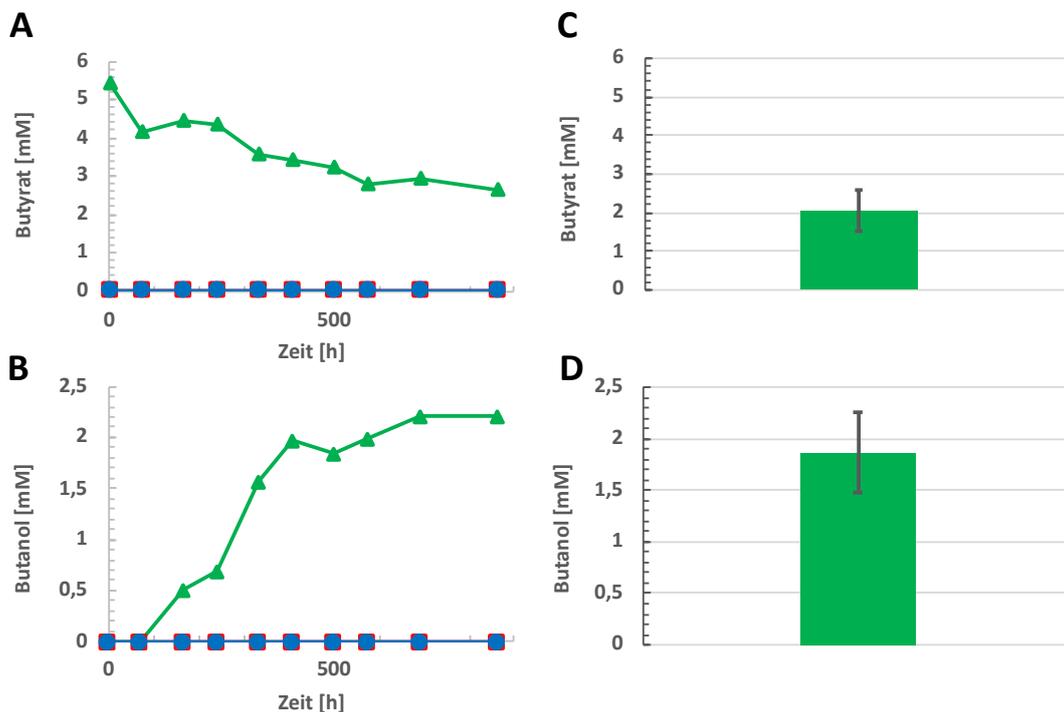


Abbildung 69: A: Butyrat-, B: Butanolkonzentrationen von *C. ljungdahlii* in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas und ▲ Zugabe von Butyrat, ■ Zugabe von Capronat, ● keiner Zugabe von Butyrat oder Capronat (Kontrollkultur). C: Butyrat-, D: Butanolkonzentrationen der zugehörigen Triplikate zum Zeitpunkt der letzten Messung – Mittelwerte mit eingezeichneter Standardabweichung.

während der Kultivierung, zudem wurde in diesen Kulturen Butanol gebildet (Abbildung 69 C und D). In den zwei nicht ausführlich gezeigten Kulturen fiel die anfängliche Butyratkonzentration von 3,9 mM auf 1,7 mM bzw. von 4,3 mM auf 1,8 mM. Butanol wurde in diesen Kulturen in einer Konzentration von 1,4 mM und 1,9 mM gebildet. Die Konzentrationsverläufe von Capronat und Hexanol entsprachen in den repräsentativ ausgewählten Kulturen dem Konzentrationsverlauf von Butyrat und Butanol (Abbildung 70 A und B). Hier war Capronat ebenfalls nur in der Kultur, welcher zu Beginn auch Capronat zugeben wurde, nachweisbar. Es ist zu erkennen, wie die Capronatkonzentration von anfänglich 3,5 mM auf 1,4 mM am Ende des Versuches sank. Eine Bildung des entsprechenden Alkohols, in diesem Fall Hexanol, ließ sich wiederum nur in der Kultur, welcher Capronat zugeben wurde, feststellen. Die Produktion von Hexanol begann direkt nach Inokulation und erreichte einen Endwert von 2,8 mM. Alle Kulturen des dreifachen Ansatzes verbrauchten Capronat, wenn es dem Kulturmedium zugeben

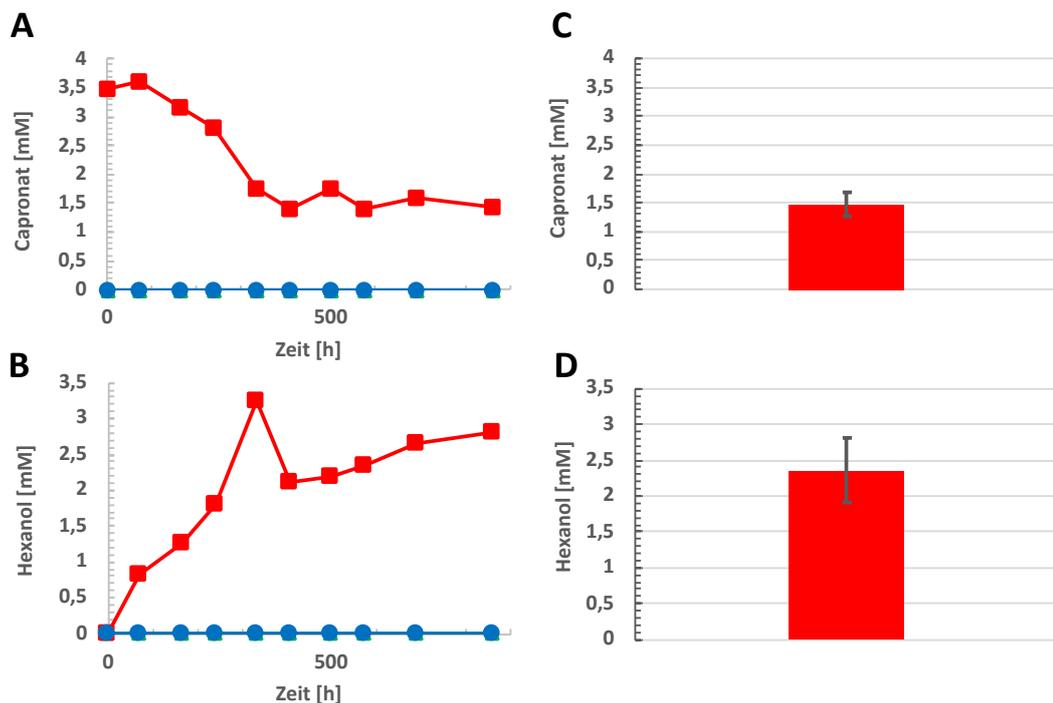


Abbildung 70: A: Capronat-, B: Hexanolkonzentrationen von *C. ljungdahlii* in Tanner-Medium „modified“ mit der Gasphase Synthesegas und ▲ Zugabe von Butyrat, ■ Zugabe von Capronat, ● keiner Zugabe von Butyrat oder Capronat (Kontrollkultur). C: Capronat-, D: Hexanolkonzentrationen der zugehörigen Triplikate zum Zeitpunkt der letzten Messung – Mittelwerte mit eingezeichneter Standardabweichung.

wurde (Abbildung 70 C und D). In einer der nicht gezeigten Kulturen fiel die Capronatkonzentration von 2,2 mM auf 1,3 mM, während in der anderen Kultur die Konzentration von 3,1 mM auf 1,7 mM fiel. Hexanol wurde in den zuvor nicht gezeigten Kulturen in einer Konzentration von 2,3 mM bzw. 1,9 mM gebildet. Es ist somit in diesem Versuch ein Zusammenhang zwischen der Zugabe von Butyrat bzw. Capronat und der Bildung von Butanol und Hexanol zu sehen.

3.5.3 Zusammenfassung der Versuche zur Untersuchung der Fähigkeit von *C. carboxidivorans* und *C. ljungdahlii* zur Umwandlung von Butyrat und Capronat in die entsprechenden Alkohole

In Tabelle 14 sind die wichtigsten Ergebnisse der zuvor gezeigten Versuche 3.5.1 und 3.5.2. zusammengefasst. Gezeigt werden dort nur die jeweiligen Kulturen, denen Butyrat oder Capronat zugegeben wurde. Gezeigt werden die Ausgangskonzentrationen an Butyrat und Capronat (Mittelwerte aus allen drei Kulturen) sowie die Konzentrationen an Butanol und Hexanol (ebenfalls Mittelwerte aus allen drei Kulturen). Es zeigte sich, dass *C. carboxidivorans* aus vergleichbaren Ausgangskonzentrationen an Butyrat und Capronat mehr Butanol bildete, während *C. ljungdahlii* mehr Hexanol bildete.

Tabelle 14: Übersicht über durchschnittlich entstandene Butanol- und Hexanolkonzentrationen in den jeweiligen Kultivierungen mit *C. carboxidivorans* und *C. ljungdahlii*, denen Butyrat oder Capronat zugegeben wurde.

	Butyrat zu Beginn des Versuches [mM]	Butanol am Ende des Versuches [mM]	Capronat zu Beginn des Versuches [mM]	Hexanol am Ende des Versuches [mM]
Kultivierung von <i>C. carboxidivorans</i>	4,8	3,5	3,8	1,6
Kultivierung von <i>C. ljungdahlii</i>	4,5	1,8	2,9	2,3

3.6 Untersuchung des Einflusses des pH-Wertes auf das Wachstum und das Produktspektrum bei Kultivierung von *C. kluyveri*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden bereits in vorangegangenen Experimenten bestimmte Parameter oder Bestandteile, welche in den Cofermentationen zu finden waren, ausgewählt, wie z.B. die unterschiedlich gebildeten Substratkonzentrationen (3.3) oder die Anwesenheit von Kohlenmonoxid (3.4), um deren Einfluss auf die Kultivierung von *C. kluyveri* zu untersuchen. In dem hier beschriebenen Versuch wurde der Einfluss des pH-Wertes auf das Wachstum von *C. kluyveri* und damit auch auf die Produktion von Capronat untersucht. *C. kluyveri* hat ein pH-Optimum von 6,8, ein Wert, der zu keinem Zeitpunkt einer simultanen oder sequentiellen Cofermentation vorzufinden ist, und eine tolerierte Bandbreite von 6,0-7,5 (Barker und Taha, 1942). In den Cofermentationen wurde als Nährmedium Tanner-Medium „modified“ verwendet, eingestellt auf einen pH-Wert von 6,1. Dieser pH-Wert orientierte sich primär an den optimalen Bedingungen für die Kultivierung von acetogenen Bakterien. *C. autoethanogenum* hat ein pH-Optimum von 6,0 bei einer tolerierten Bandbreite von 4,5-6,5 (Abrini *et al.*, 1994) *C. carboxidivorans* ein pH-Optimum von 6,2 mit einer tolerierten Bandbreite von 4,4-7,6 (Liou *et al.*, 2005) und *C. ljungdahlii* ein pH-Optimum von 6,0 mit einer tolerierten Bandbreite von 4,0-7,0 (Tanner *et al.*, 1993). In den Cofermentationen wurde nun versucht, mit dem im Tanner-Medium „modified“ gewählten pH-Wert von 6,1 eine einheitliche Grundlage aller Versuche und somit in Bezug auf das pH-Optimum einen Kompromiss zu finden. Um zu klären, wie sich dieser eingestellte pH-Wert und wie sich die während einer Cofermentation entstehenden niedrigeren pH-Werte auf das Wachstum und die Produktion von Capronat auswirken, wurde der im Folgenden näher beschriebenen Versuch durchgeführt. Es wurden Kultivierungen von *C. kluyveri* in Tanner-Medium „modified“ 2 (mit 100 mM Ethanol und 20 mM Acetat) durchgeführt. Die Nährmedien wurden vor Inokulation auf pH-Werte zwischen 5,0 und 7,0 eingestellt (2 Kulturflaschen jeweils der gleiche pH-Wert; Doppelbestimmung). Verwendet wurden 125-ml-Müller-Krempel-Flaschen mit 50 ml Nährmedium. Inkubiert wurde unter nicht schüttelnden Bedingungen. Die in der Darstellung der Resultate angegebenen pH-Werte sind die Mittelwerte der beiden Kulturflaschen (Abweichungen der pH-Werte der jeweiligen zugehörigen Kulturen waren sehr gering). In Abbildung 71 (A) ist der Verlauf der OD_{600nm}

von ausgewählten *C. kluyveri*-Kulturen in Nährmedien mit pH-Werten von 5,0 bis 7,0 zu sehen. Die Kulturen, in denen die anfänglichen pH-Werte bei 5,0, 5,1 und 5,2 lagen, zeigten keinen Anstieg der OD_{600nm} und somit kein Wachstum. Erst die Kultur mit einem anfänglichen pH-Wert von 5,6 zeigte einen Anstieg der OD_{600nm} , wenn auch verlangsamt im Vergleich zu Kulturen mit höheren pH-Werten. Alle Kulturen, die Wachstum zeigten, erreichten nach unterschiedlichen Maximalwerten gegen Ende der Kultivierung eine OD_{600nm} von 0,25 bis 0,34. Bei Betrachtung der finalen OD_{600nm} -Werte beider durchgeführten Kultivierungen zum letzten Zeitpunkt der Messung (Abbildung 71 B) lässt sich das gleiche Resultat ablesen. Erst ab einem pH-Wert von 5,6 war *C. kluyveri* im Stande zu wachsen. Der Ansatz mit dem eingestellten pH-Wert von 5,6 zeigte eine sehr hohe Abweichung, da in einer der beiden Kulturen bei diesem pH-Wert kein Anstieg der OD_{600nm} festzustellen war. Mit Ausnahme dieser Kultur hatten die zueinander gehörenden Kulturen der Doppelbestimmungen vergleichbare Werte der OD_{600nm} . In den ausgewählten Kulturen, in denen kein Anstieg der OD_{600nm} festgestellt wurde, konnte auch keine Bildung von Butyrat und Capronat detektiert werden (Abbildung 72 A und B). Die erste Produktbildung in Bezug auf eine Zunahme der pH-Werte wurde in der Kultur mit dem initialem pH-Wert von 5,6 detektiert. Diese Kultur bildete die höchste Butyratkonzentration im Vergleich zu allen Kulturen, mit einem Wert von 7 mM nach 214 h Kultivierung. Die restlichen Butyratkonzentrationen lagen in einem Bereich von 2,7-3,8 mM bei den initialen pH-Werten von 5,9-7,0. Die höchsten Capronatkonzentrationen

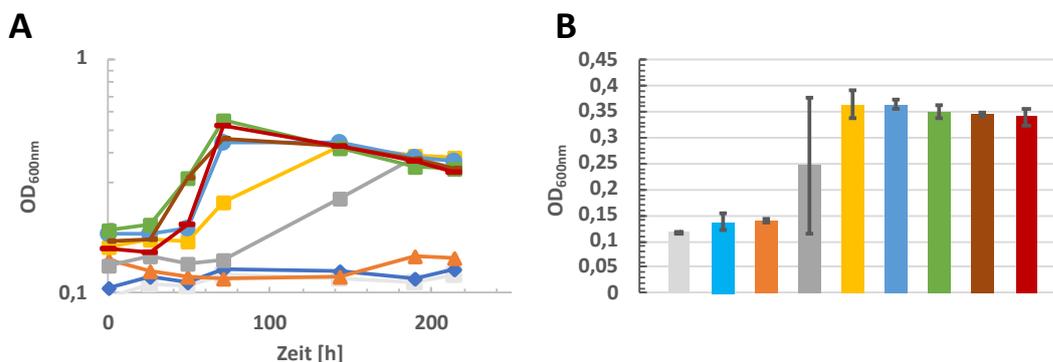


Abbildung 71: Wachstum von *C. kluyveri* in Tanner-Medium „modified“ 2 mit der Gasphase N_2/CO_2 und einem pH-Wert von 5,0; 5,1; 5,3; 5,6; 6,0; 6,4; 6,7; 6,9; 7,0; A: Verlauf der OD_{600nm} in repräsentativ gewählten Kulturen B: OD_{600nm} aller Kulturen zum letzten Punkt der Messung – Mittelwerte mit eingezeichneter Standardabweichung.

waren am Ende der Inkubation in Kulturen mit anfänglichen pH-Werten von 6,7 (33,8 mM Capronat), 6,4 (32,3 mM Capronat) und 6,9 (31,2 mM Capronat) zu finden. Im Vergleich der detektierten Konzentrationen beider zugehörigen Kulturen zueinander ließ sich die gleiche Tendenz erkennen (Abbildung 72 C und D). Auch hier konnten nur sehr geringe Konzentrationen an Butyrat und Capronat gemessen werden, wenn der pH-Wert zu Beginn auf einen Wert unter 5,6 eingestellt wurde. Bei der Kultur mit dem eingestellten pH-Wert von 5,6 konnte zum ersten Mal, aber nur in einer von beiden Kulturen, die Bildung von Butyrat und Capronat festgestellt werden. Die höchste Konzentration an Butyrat wurde in der Kultur mit dem initialen pH-Wert von 6,0 gebildet und die höchste Konzentration an Capronat in der Kultur mit einem initialen pH-Wert 6,4, 6,7 und 6,9.

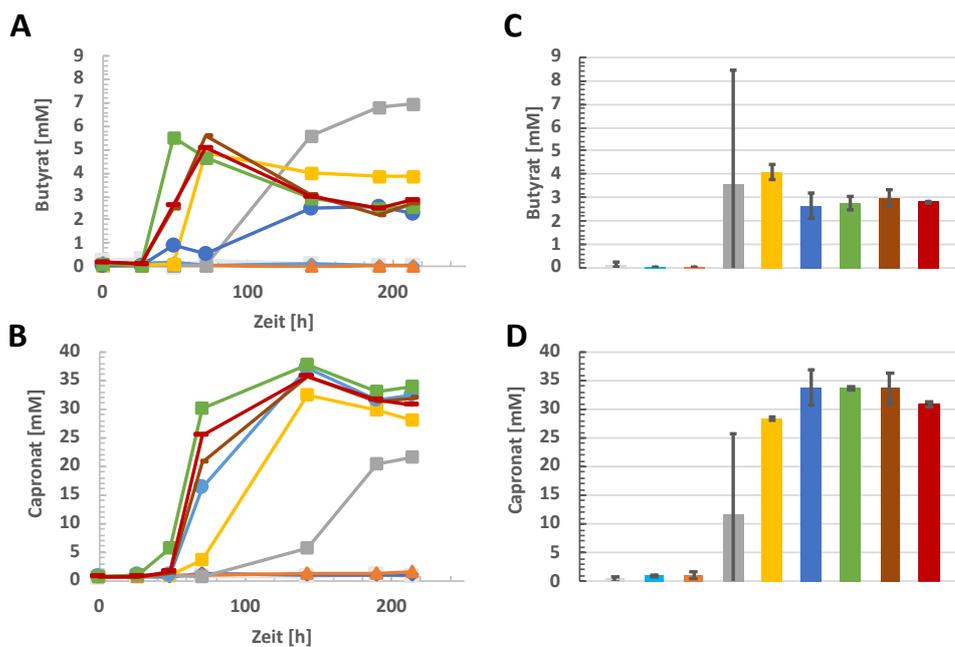


Abbildung 72: A: Butyrat-, B: Capronatkonzentrationen von *C. kluyveri* in Tanner-Medium „modified“ 2 mit der Gaspase N₂/CO₂ und einem initialem pH-Wert von 5,0; 5,1; 5,3; 5,6; 6,0; 6,4; 6,7; 6,9; 7,0. C: Butyrat-, D: Capronatkonzentrationen der zugehörigen Duplikate zum letzten Punkt der Messung – Mittelwerte mit eingezeichneter Standardabweichung.

3.6.1 Zusammenfassung der Resultate zur Untersuchung des Einflusses des pH-Wertes auf das Wachstum und das Produktspektrum von *C. kluyveri*

In Tabelle 15 sind alle Ergebnisse zur besseren Übersichtlichkeit zusammengefasst. Es wurden die Mittelwerte der maximalen OD_{600nm} und der maximalen Capronatkonzentrationen aus den jeweiligen zugehörigen Kulturen berechnet. Zu sehen ist, dass bei eingestellten pH-Werten von 6,7 und 7,0 die höchsten OD_{600nm} -Werte erzielt wurden, während bei pH-Werten von 6,4 und 6,7 die höchsten Capronatkonzentrationen detektiert wurden.

Tabelle 15: Maximal erzielte OD_{600nm} -Werte und maximale Capronatkonzentrationen von *C. kluyveri* bei den unterschiedlichen eingestellten initialen pH-Werten (Mittelwerte aus beiden Kulturen).

Eingestellter pH-Wert des Nährmediums	Maximale OD_{600nm}	Maximale Capronatkonzentration [mM]
5,0	0,12	0,7
5,1	0,12	0,8
5,3	0,14	1,0
5,6	0,27	3,4
6,0	0,45	33,1
6,4	0,45	40,2
6,7	0,53	38,0
6,9	0,48	35,5
7,0	0,50	34,7

3.7 Untersuchung der Auswirkung der Verschleppung von Ethanol und Acetat aus Vorkulturen von *C. kluyveri* bei Inokulation neuer Kulturen

C. kluyveri wurde für die Erstellung von Vorkulturen in Wachstumsversuchen und zur Stammhaltung als Dauerkultur zu Beginn der Arbeit in ATCC 1120 Medium und im weiteren Verlauf ausschließlich in Tanner-Medium „modified“ 2 kultiviert. Die jeweiligen Rezepte der Nährmedien sehen jedoch auch immer eine Zugabe von Ethanol und Acetat vor. Dies ist sinnvoll da *C. kluyveri* sowohl Ethanol als auch Acetat als Substrat benötigt. Eine Problematik, die sich daraus ergibt, war die Frage, wieviel Ethanol und Acetat aus stationären *C. kluyveri*-Kulturen in (Co-)Fermentationskulturen eingebracht wurde (Verschleppung). Zu Beginn dieser Arbeit wurde *C. kluyveri* in Medium kultiviert, welches 500 mM Ethanol und 100 mM Acetat enthielt. Später wurde festgestellt, dass auch geringere Konzentrationen ausreichend für das Wachstum waren, weshalb im Weiteren geringere Konzentrationen (100 mM Ethanol und 20 mM Acetat) gewählt wurden, um einen eventuellen Eintrag in (Co-)Fermentationskulturen zu vermindern. Die Vorkulturen, bei denen hohe Konzentrationen an Ethanol und Acetat genutzt wurden fanden nur Verwendung in den simultanen Cofermentationen und in den sequentiellen Cofermentationen mit einem Wechsel der Gasphase während der Kultivierung. In allen restlichen Versuchen wurden bereits die „niedriger konzentrierten“ Vorkulturen genutzt. Generell kam aber die Frage auf, wieviel Ethanol und Acetat in eine neu inokulierte (Co-) Fermentationskultur eingebracht wurde und welche Konzentrationen an Capronat daraus gebildet werden können. Wichtig waren diese Versuche, um in den durchgeführten (Co-) Fermentationen sicher sagen zu können, dass die detektierten Konzentrationen an Capronat ausgehend von aus Synthesegas produziertem Ethanol und Acetat gebildet wurden und nicht durch industriell hergestelltes Ethanol und Acetat, welches sich durch die Vorkultur im Nährmedium befand. Für die Versuche zur Aufklärung der Verschleppung von Ethanol und Acetat wurden nahezu dieselben Bedingungen gewählt, wie in den (Co-) Fermentationen selbst. Dies bezieht sich vor allem auf die Inokulationsvolumina. In den (Co-)Fermentationen wurden 100 ml Tanner-Medium „modified“ mit 2 ml einer stationären *C. kluyveri*-Kultur inokuliert. Um die Gasphase möglichst zu vergrößern, wurden 1000-ml-Müller-Krempel-Flaschen verwendet. Für diesen Versuch wurden 125-ml-Müller-Krempel-Flaschen mit 50 ml Tanner-Medium „modified“ genutzt und diese mit

1 ml der *C. kluyveri*-Vorkulturen inokuliert. Somit wurde, wie in den (Co-)Fermentationen auch, mit einem Volumenanteil von 1:50 [v/v] inokuliert. In diesen Kulturen bestand die Gasphase aus N_2/CO_2 und die Kulturen wurden unter nicht schüttelnden Bedingungen inkubiert. Inokuliert wurde mit stationären *C. kluyveri*-Kulturen, welche ursprünglich 500 mM Ethanol und 100 mM Acetat enthielten und mit *C. kluyveri*-Kulturen welche ursprünglich 100 mM Ethanol und 20 mM Acetat enthielten. Diese zwei Bedingungen wurden in einer Dreifachbestimmung untersucht. Zusätzlich wurde eine Kontrollkultur von *C. kluyveri* mitgeführt, welche in Tanner-Medium „modified“ 2 mit 100 mM Ethanol und 20 mM Acetat inkubiert wurde. In Abbildung 73 ist der Verlauf der OD_{600nm} -Werte einer repräsentativ gewählten Kultur (Abbildung 73 A) und die finalen OD_{600nm} -Werte aller drei Kulturen und deren Abweichung zum letzten Messpunkt zu sehen (Abbildung 73 B). Die repräsentativ ausgewählten *C. kluyveri*-Kulturen, welche aus Vorkulturen mit niedrigen (=100 mM Ethanol und 20 mM Acetat) und hohen Substratkonzentrationen (=500 mM Ethanol und 100 mM Acetat) inokuliert wurden, erreichten in Tanner-Medium „modified“ (enthält kein Ethanol und Acetat) nur sehr geringe Werte der OD_{600nm} . Die *C. kluyveri*-Kultur, welche aus der Vorkultur mit den niedrigeren Konzentrationen inokuliert wurde, erreichte eine finale OD_{600nm} von 0,04. Die *C. kluyveri*-Kultur, welche der

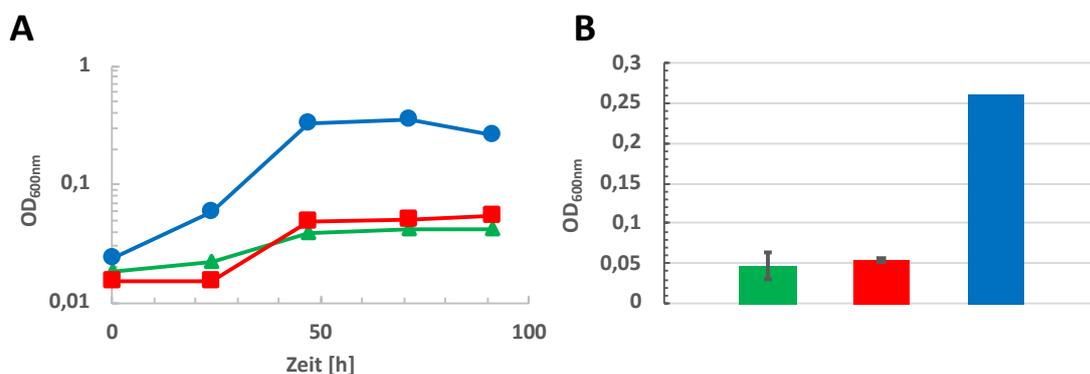


Abbildung 73: Wachstum von *C. kluyveri* in Tanner-Medium „modified“ (d.h. keine Zugabe von Ethanol und Acetat) mit der Gasphase N_2/CO_2 ; Inokulation mit *C. kluyveri*-Vorkulturen, welche ■ 100 mM Ethanol und 20 mM Acetat (geplant aber vermutlich höher konzentriert; siehe Text) ■ 500 mM Ethanol und 100 mM Acetat enthielten; ■ *C. kluyveri* inokuliert in Tanner-Medium „modified“ 2 mit 100 mM Ethanol und 20 mM Acetat (Positivkontrolle); A: OD_{600nm} der repräsentativ gewählten Kulturen B: OD_{600nm} aller drei durchgeführten Kulturen zum letzten Punkt der Messung – Mittelwerte mit eingezeichneter Standardabweichung.

Vorkultur mit den höheren Konzentrationen entstammte, erreichte eine minimal höhere OD_{600nm} von 0,05. Der Anstieg der OD_{600nm} erfolgte in beiden Kulturen zum gleichen Zeitpunkt wie in der Kontrollkultur, welche eine OD_{600nm} von 0,26 nach 91 h Inkubation erreichte. Alle jeweilig zueinander gehörenden Kulturen, welche in Nährmedium ohne Ethanol und Acetat inkubiert wurden, erreichten nur eine sehr geringe OD_{600nm} (Abbildung 73 B). Es war festzustellen, dass die *C. kluyveri*-Kulturen, welche den Vorkultur mit den höheren Konzentrationen entstammte, durchgehend eine höhere OD_{600nm} erreichten, als Kulturen, die aus Vorkulturen inokuliert wurden, die niedrigere Konzentrationen hatten. In Abbildung 74 (A und B) ist zu sehen, wieviel Ethanol und Acetat aus den Vorkulturen in die Nährmedien der repräsentativ gewählten Kulturen eingebracht wurde. In der *C. kluyveri*-Kultur, welche der Vorkultur mit niedrigeren Konzentrationen entstammte, wurden zu Beginn des Versuchs 5,3 mM Ethanol und 0,7 mM Acetat detektiert. Durch die Inokulation aus der Vorkultur mit den höheren Konzentrationen wurden mit 8,5 mM

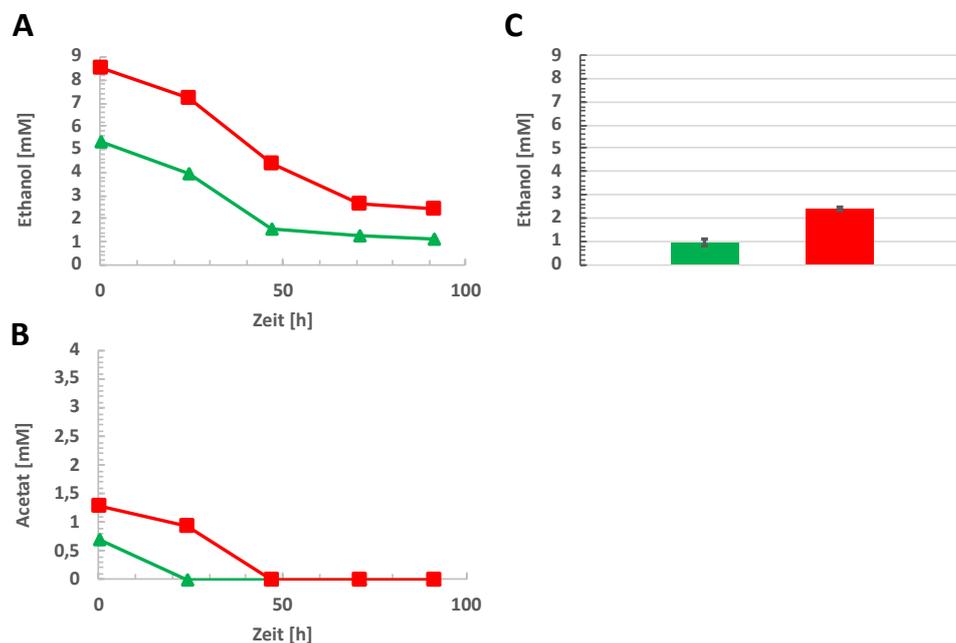


Abbildung 74: A: Ethanol-, B: Acetatkonzentrationen von *C. kluyveri* in Tanner-Medium „modified“ (d.h. keine Zugabe von Ethanol und Acetat) mit der Gasphase N_2/CO_2 ; Inokulation mit *C. kluyveri*-Vorkulturen, welche ▲ 100 mM Ethanol und 20 mM Acetat (geplant aber vermutlich höher konzentriert; siehe Text) ■ 500 mM Ethanol und 100 mM Acetat enthielten. C: Ethanolkonzentrationen der Triplikate zum letzten Punkt der Messung – Mittelwerte mit eingezeichneter Standardabweichung.

Ethanol und 1,3 mM Acetat ca. doppelt so hohe Konzentrationen eingebracht. Die Ethanol- und Acetatkonzentrationen nahmen in beiden Kulturen über die Dauer der Inkubation stark ab. So verblieben in der Kultur, die aus der Vorkultur mit den niedrigeren Konzentrationen entstammt, noch 1,1 mM Ethanol, während das Acetat nicht mehr nachweisbar war. In der *C. kluyveri*-Kultur, die der Vorkultur mit den höheren Konzentrationen entstammte, waren noch 2,4 mM Ethanol nachweisbar, während ebenfalls kein Acetat mehr nachweisbar war. In den jeweiligen Triplikaten lag dieselbe Situation vor (Abbildung 74 C). In keiner der *C. kluyveri*-Kulturen konnte noch Acetat nachgewiesen werden. Die Ethanolkonzentrationen lagen zum Ende der Kultivierung in den *C. kluyveri*-Kulturen, die der Vorkultur mit den niedrigeren Konzentrationen entstammen, bei ca. 1 mM und bei den Kulturen, welcher der Vorkultur mit den höheren

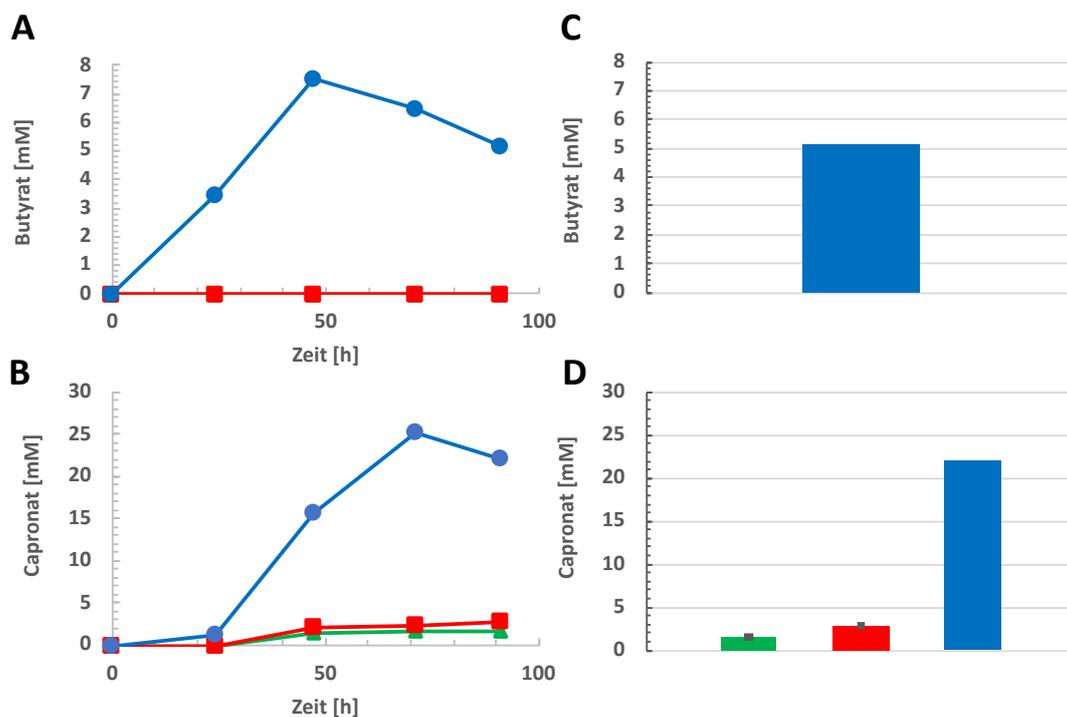


Abbildung 75: A: Butyrat-, B: Capronatkonzentrationen von *C. kluyveri* in Tanner-Medium „modified“ (d.h. keine Zugabe von Ethanol und Acetat) mit der Gasphase N_2/CO_2 ; Inokulation mit *C. kluyveri*-Vorkulturen welche ▲ 100 mM Ethanol und 20 mM Acetat (geplant aber vermutlich höher konzentriert; siehe Text) ■ 500 mM Ethanol und 100 mM Acetat enthielten; ● *C. kluyveri* inokuliert in Tanner-Medium „modified“ 2 mit 100 mM Ethanol und 20 mM Acetat (Positivkontrolle). C: Butyrat-, D: Capronatkonzentrationen der Triplikate zum letzten Punkt der Messung – Mittelwerte mit eingezeichneter Standardabweichung.

Konzentrationen entstammte, bei ca. 2,4 mM. Wie in Abbildung 75 (A und B) zu erkennen, konnten die ausgewählten Kulturen von *C. kluyveri* ausgehend von diesen eingebrachten Ethanol- und Acetatkonzentrationen auch geringe Konzentrationen an Capronat bilden. In der Kultur, welche der Vorkultur mit den niedrigeren Konzentrationen entstammte, wurde 1,8 mM und in der Kultur, welcher der Vorkultur mit den höheren Konzentrationen entstammte, wurden 2,9 mM nach 91 h detektiert. Die Bildung von Butyrat konnte in keiner der Kulturen, außer der Kontrollkultur, nachgewiesen werden. Capronat wurde in der Kontrollkultur in einer Konzentration von 22,0 mM nach 91 h gebildet. Die Bildung von Capronat war jeweils in allen drei zueinander gehörenden Kultivierungen zu erkennen (Abbildung 75 C und D). Die Capronatkonzentrationen lagen in den Kulturen, die inokuliert wurden aus den Vorkulturen mit dem höheren Ethanol und Acetatkonzentrationen, höher als in den Kulturen, welche inokuliert wurden mit der Vorkultur, die die niedrigeren Konzentrationen hatte. Eine Bildung von Butyrat war mit Ausnahme der Kontrollkultur nicht festzustellen.

Aufgrund der detektierten Konzentrationen an verschlepptem Ethanol und Acetat ist im Falle der Nutzung der Vorkulturen mit den niedrigeren Konzentrationen (100 mM Ethanol und 20 mM Acetat) anzunehmen das diese deutlich höher konzentriert vorlagen als gewünscht. Es ist davon auszugehen, dass die Substratkonzentrationen bei ca. 250 mM Ethanol und 100 mM Acetat lagen (siehe Diskussion 4.7).

3.7.1 Zusammenfassung der Untersuchung der Verschleppung von Ethanol und Acetat aus Vorkulturen von *C. kluyveri* bei Inokulation neuer Kulturen

In Tabelle 16 sind die wichtigsten Resultate dieses Versuches kurz zusammengefasst. Es ist zu sehen, welche Konzentrationen (Mittelwerte aus allen drei Kulturen) an Ethanol und Acetat mittels der verschiedenen Vorkulturen und deren verschiedenen Substratkonzentrationen in die Kulturen eingebracht wurden, und welche Konzentration an Capronat davon ausgehend gebildet werden konnte.

Tabelle 16: Konzentrationen an Ethanol und Acetat, die durch die Vorkulturen eingebracht wurden und die Capronatkonzentrationen, die davon ausgehend gebildet wurden (Mittelwerte aus allen drei Kulturen).

Verwendete Vorkultur	Ethanol zu Kultivierungsbeginn [mM]	Acetat zu Kultivierungsbeginn [mM]	Capronat zu Kultivierungsende [mM]
100 mM Ethanol und 20 mM Acetat (vermutlich höher konzentriert; siehe Text)	5,4	0,9	1,6
500 mM Ethanol und 100 mM Acetat	9,0	1,3	2,9

3.8 Elektronenmikroskopische Betrachtung von simultanen Cofermentationen

Für diese Arbeit wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen von simultanen Cofermentationen angefertigt, welche mit *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* sowie mit *C. ljungdahlii* und *C. kluyveri* durchgeführt wurden. Um eine visuelle Identifizierung der jeweiligen Organismen zu ermöglichen, wurden als Referenz auch Aufnahmen von den jeweils einzelnen Bakterienstämmen erstellt. Zielsetzung der elektronenmikroskopischen Betrachtung war es, morphologische Unterschiede in den Cofermentationen zu erkennen und um zusätzlich mit visuellen Möglichkeiten beide Organismen eventuell in den Kulturen nachzuweisen. Für diese Aufnahmen wurden die zwei simultanen Cofermentationen sowie einzelne Kulturen von *C. carboxidivorans*, *C. ljungdahlii* und *C. kluyveri* kultiviert. Alle Kulturen, außer der *C. kluyveri*-Kultur, wurden in 1000-ml-Müller-Krempel-Flaschen mit 100 ml Tanner-Medium „modified“ und der Gasphase Synthesegas durchgeführt. *C. kluyveri* wurde in 125-ml-Müller-Krempel-Flaschen, welche 50 ml Tanner-Medium „modified“ 2 (100 mM Ethanol und 20 mM Acetat) enthielten, mit der Gasphase N_2/CO_2 inkubiert. Jede Kultur wurde in einer Einfachbestimmung durchgeführt. Nach einer Inkubationsdauer von 337 h wurden Proben für die Elektronenmikroskopie (Präparation siehe 2.9) und für die gaschromatographische Analyse entnommen. Der frühe Zeitpunkt der Probennahme wurde gewählt, um *C. kluyveri*-Zellen zu erhalten, die möglichst zum Großteil nicht in einem lysierten Zustand vorlagen. In Abbildung 76 sind die OD_{600nm} -Werte und die Capronatkonzentrationen dieser Kulturen nach 337 h Inkubation zum Zeitpunkt der Probennahme zu sehen. In allen

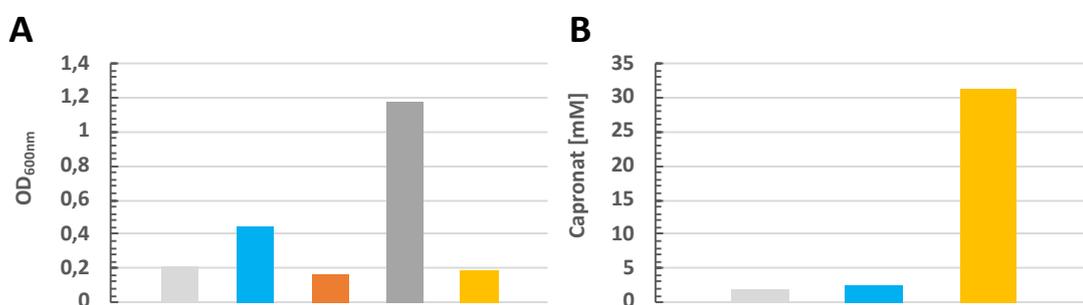


Abbildung 76: A: OD_{600nm} , B: Capronatkonzentration von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* (simultane Cofermentationskultur), *C. ljungdahlii* und *C. kluyveri* (simultane Cofermentationskultur), *C. carboxidivorans*, *C. ljungdahlii* und *C. kluyveri* beim Zeitpunkt der Probennahme für die Elektronenmikroskopie nach einer Inkubationsdauer von 337 h.

Kulturen war ein Anstieg der OD_{600nm} festzustellen. Die höchste OD_{600nm} mit einem Wert von 1,17 wurde von der *C. ljungdahlii*-Kultur erreicht, gefolgt von der Kultur von *C. ljungdahlii* zusammen mit *C. kluveri* mit einer OD_{600nm} von 0,44. Die andere Cofermentationskultur erreichte eine OD_{600nm} von 0,20. Die Kultur, die ausschließlich *C. kluveri* enthielt, erzielte eine OD_{600nm} von 0,18, während die Kultur, die nur *C. carboxidivorans* enthielt, eine OD_{600nm} von 0,16 erreichte. Die höchste Capronatkonzentration wurde in der *C. kluveri*-Kultur mit einer Konzentration von 31,3 mM detektiert. Capronat konnte mit Konzentrationen von 1,7 mM (*C. carboxidivorans* und *C. kluveri*) bzw. 2,5 mM (*C. ljungdahlii* und *C. kluveri*) auch in den zwei Cofermentationskulturen nachgewiesen werden. Somit haben die Cofermentationen bereits nach 337 h Capronat gebildet. In den Reinkulturen von *C. carboxidivorans* und *C. ljungdahlii* konnte kein Capronat detektiert werden.

Im Folgenden werden nun die elektronenmikroskopischen Aufnahmen gezeigt und erläutert. Die ersten Aufnahmen, welche mittels eines Rasterelektronenmikroskops

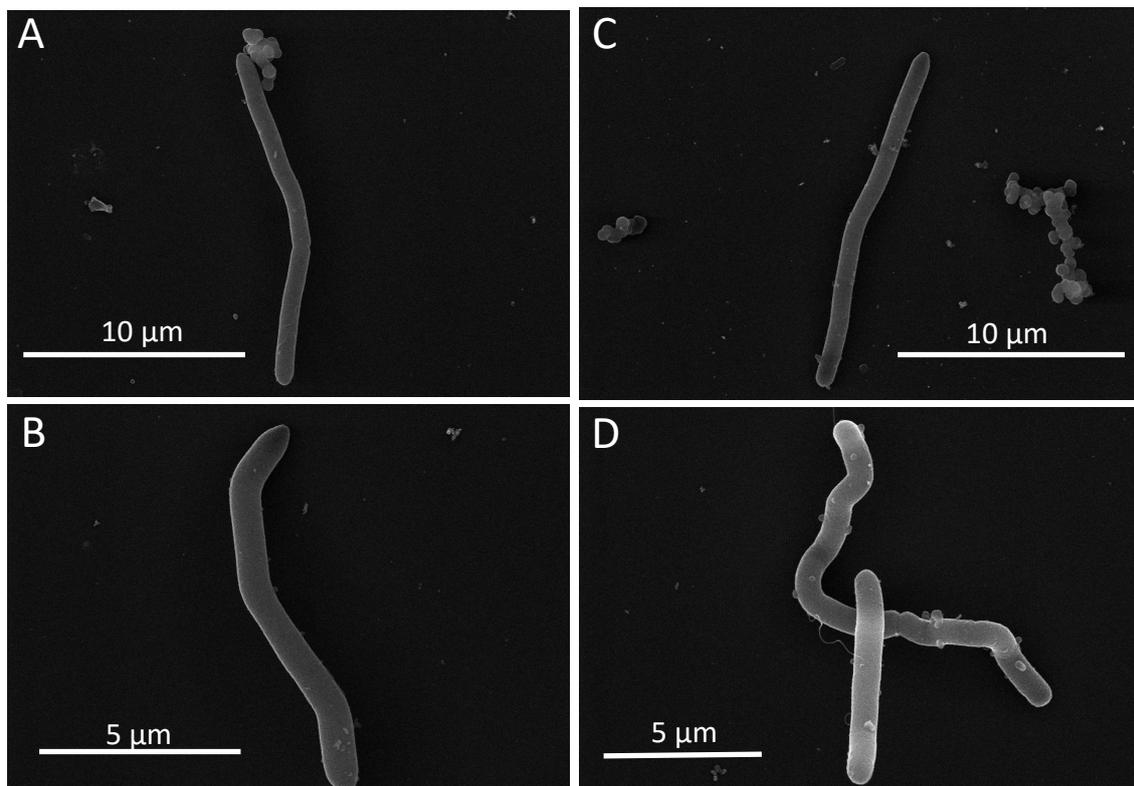


Abbildung 77: A-D: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Bakterienzellen aus einer *C. carboxidivorans*-Kultur erstellt mit dem Rasterelektronenmikroskop Hitachi S-5200 UltraHigh Resolution FE.

erstellt wurden (Abbildung 77), zeigen Einzelzellen einer *C. carboxidivorans*-Kultur. Zu erkennen sind stäbchenförmige Bakterien mit einem Durchmesser von ca. 0,6-0,9 μm und einer Länge von ca. 8-9 μm . Auffällig waren die glatten Oberflächen der Bakterienzellen. Peritrich angeordnete Flagellen wurden vereinzelt festgestellt. In einer der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 77 D) ist eine fast abgeschlossene Zellteilung zu erkennen. In der präparierten Kulturprobe, welche der *C. ljungdahlii*-Kultur entstammte, waren ebenfalls stäbchenförmige Bakterien zu sehen (Abbildung 78). Diese waren jedoch kleiner als die zuvor beschriebenen Bakterien. Der Durchmesser betrug ca. 0,5-0,6 μm , während die Länge ca. 3-4 μm betrug. In allen Aufnahmen (Abbildung 78 A-D) ist eine peritriche Begeißelung zu sehen und in einer Aufnahme (Abbildung 78 A) sind zwei Zellen zu sehen, die sich in der Zellteilung befinden. Die Oberfläche der Bakterien erscheint relativ glatt, jedoch auch etwas gröber verglichen mit den Zellen in der Probe der *C. carboxidivorans*-Kultur.

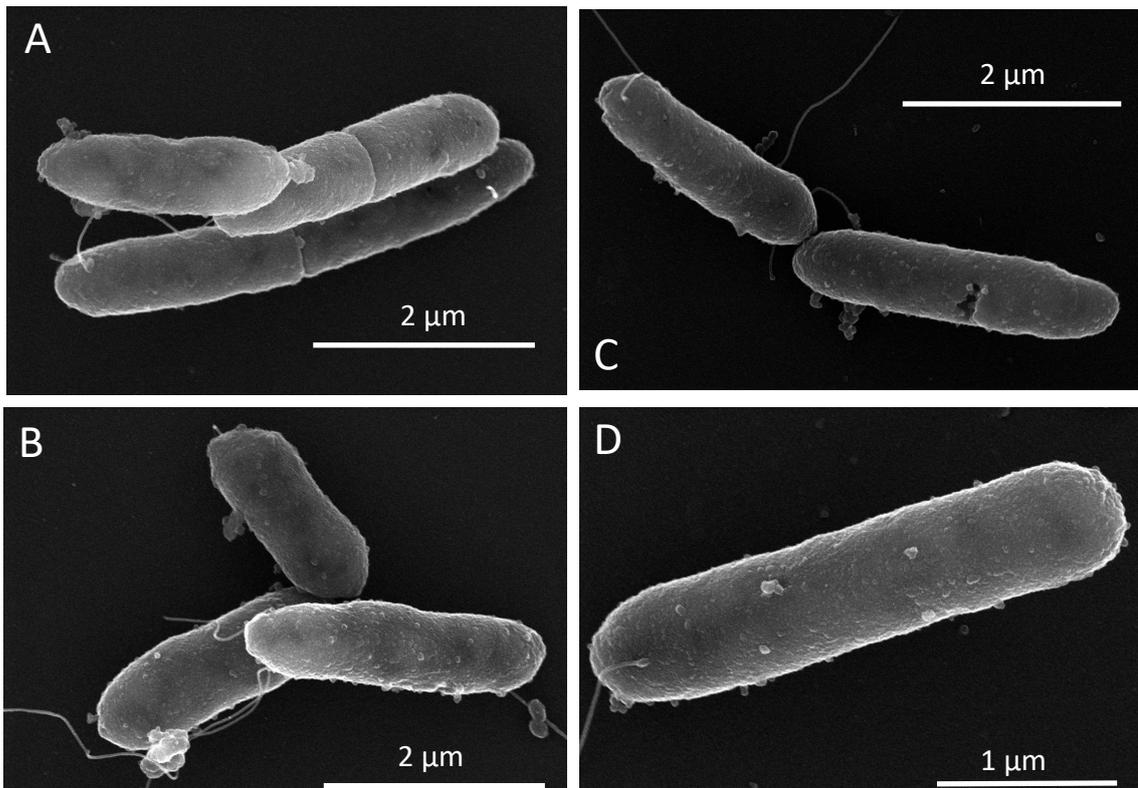


Abbildung 78: A-D: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Bakterienzellen einer *C. ljungdahlii*-Kultur erstellt mit dem Rasterelektronenmikroskop Hitachi S-5200 UltraHigh Resolution FE.

In der präparierten Kulturprobe, welche der *C. kluyveri*-Kultur entstammt, waren im Gegensatz dazu Zellen mit einer sehr rauen und ungleichmäßigen Oberfläche zu sehen (Abbildung 79). Zellen aus dieser Kultur erschienen bei rasterelektronenmikroskopischer Betrachtung stäbchenförmig und wiesen einen Durchmesser von ca. $0,6\ \mu\text{m}$ auf, während die Zelllänge ca. $5-6\ \mu\text{m}$ betrug. Eine Begeißelung konnte nicht festgestellt werden, jedoch sind zellassoziierte Strukturen erkennbar (Abbildung 79 B und D). Die Struktur der Zellen, vor allem an deren Oberfläche, war von runden bis kugelförmigen Strukturen geprägt. In der Probe waren auch einige Zellen zu sehen, die sich bereits in der Lyse befanden (Abbildung 79 C). Vereinzelt konnten auch sporeenähnliche Strukturen gesehen werden (nicht gezeigt).

In der Cofermentationskultur von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* wurden verschiedene Bakterienzellen beobachtet, die sich morphologisch voneinander unterschieden (Abbildung 80). Zum einen längliche, stäbchenförmige Zellen, welche einen Durchmesser von ca. $0,8-0,9\ \mu\text{m}$ aufwiesen und ca. $7-9\ \mu\text{m}$ lang waren. Interessanterweise konnten aber auch Zellen beobachtet werden, die nahezu doppelt so lang waren

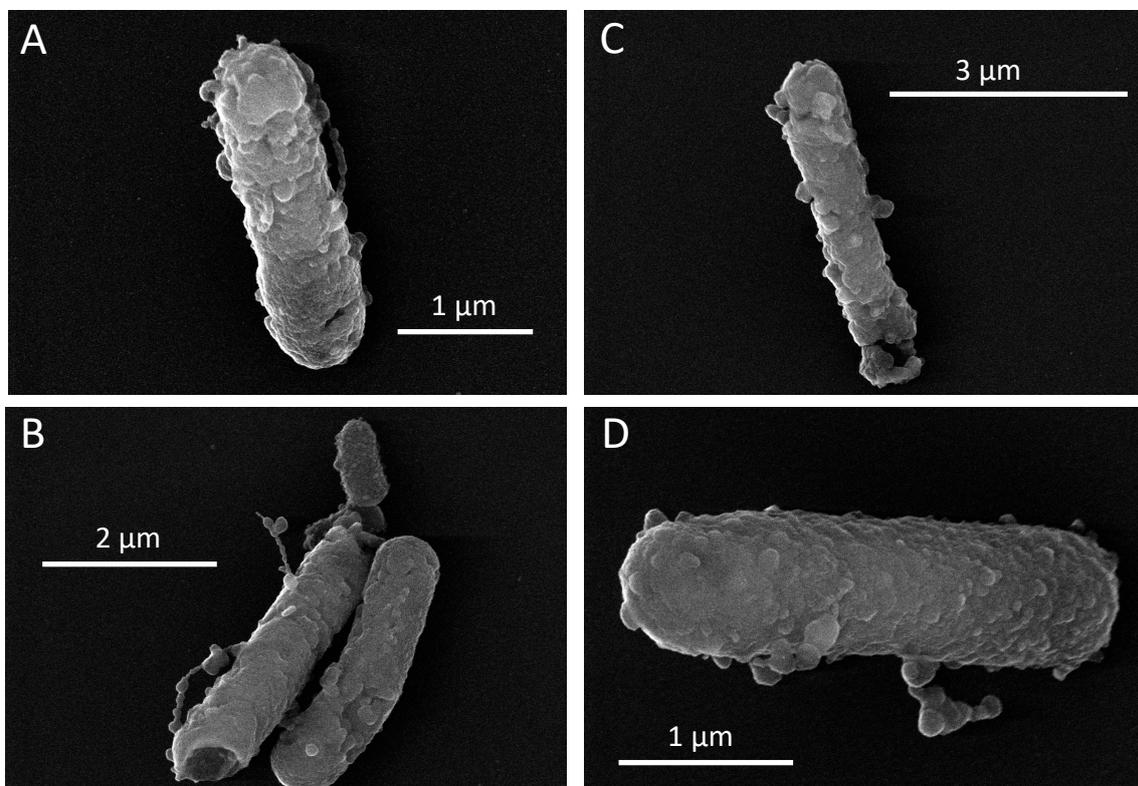


Abbildung 79: A-D: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Bakterienzellen einer *C. kluyveri*-Kultur erstellt mit dem Rasterelektronenmikroskop Hitachi S-5200 UltraHigh

(Abbildung 80 A). Des Weiteren konnten Zellen in der Phase der Zellteilung beobachtet werden (Abbildung 80 A und B). Die Oberflächen der meisten Zellen erschienen sehr glatt. Darüber hinaus wurden in dieser Probe auch Zellen gesehen, welche zwar stäbchenförmig waren und den gleichen Durchmesser von ca. 0,7-0,8 μm aufwiesen, aber mit einer Länge von ca. 5 μm deutlich kürzer waren (Abbildung 80 C und D). Diese Zellen zeigten zudem eine vergleichsweise raue Oberflächenstruktur. Beide Zelltypen zeigten vereinzelt eine peritriche Begeißelung.

In der zweiten Cofermentationskultur mit *C. ljungdahlii* und *C. kluyveri* wurden auf Grundlage der morphologischen Betrachtung ebenfalls zwei unterschiedliche Arten von Bakterienzellen gesehen (Abbildung 81). Alle Zellen wiesen mit ca. 0,5-0,6 μm einen ähnlichen Durchmesser bzw. mit ca. 3-5 μm eine ähnliche Länge auf. Deutlicher waren die Unterschiede aber in der Beschaffenheit der Zelloberfläche. So waren zum einen Zellen mit glatter Oberfläche zu sehen (Abbildung 81 A) und zum anderen Zellen mit einer sehr unebenen rauen Oberfläche (Abbildung 81 D). In einer Aufnahme (Abbildung 81 B) sind

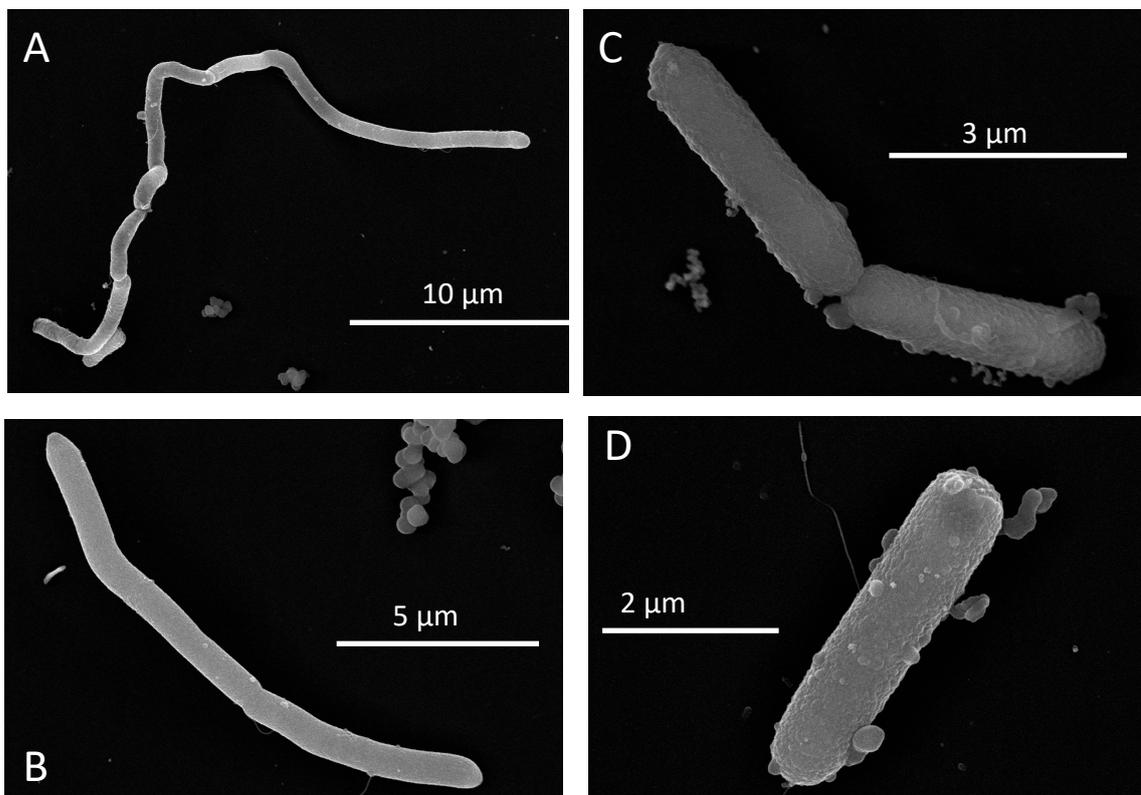


Abbildung 80: A-D: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Bakterienzellen einer Cofermentationskultur mit *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* erstellt mit dem Rasterelektronenmikroskop Hitachi S-5200 UltraHigh Resolution FE.

beide unterschiedlichen Zelltypen direkt nebeneinander zu sehen, wobei die Unterschiede klar zu erkennen sind. Eine peritriche Begeißelung ist bei beiden Zellformen zu erkennen und alle Bakterien waren stäbchenförmig.

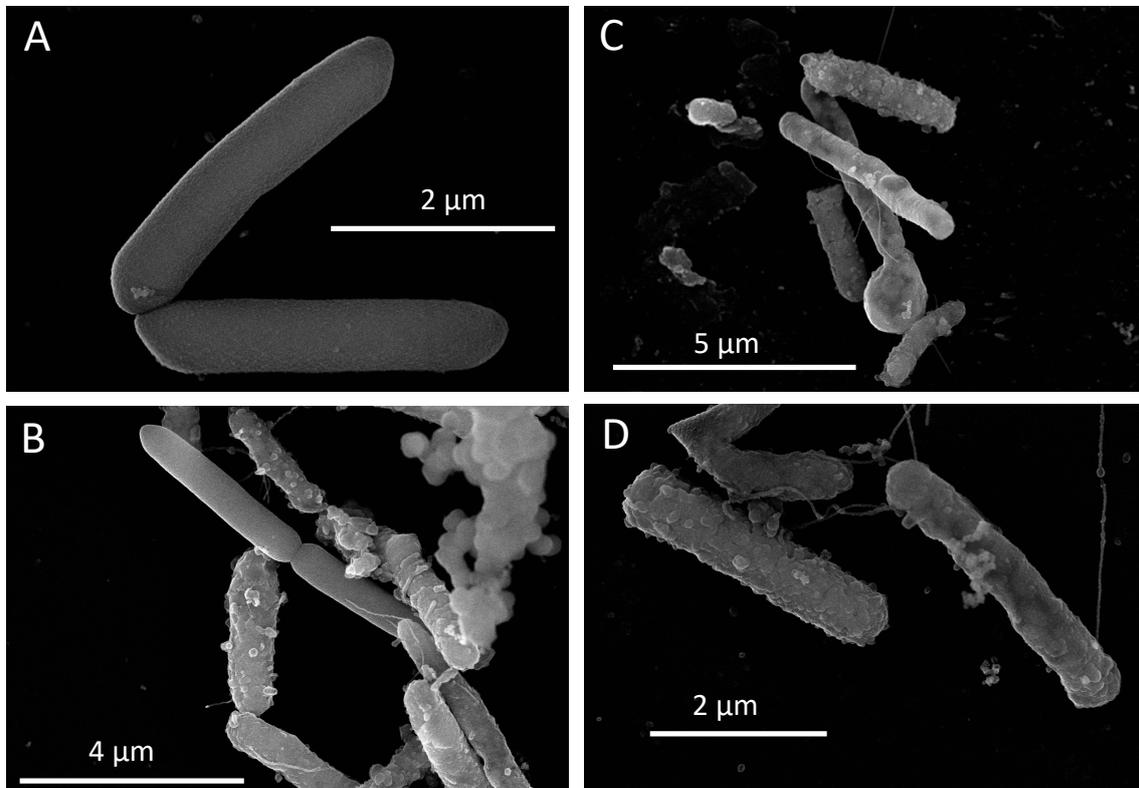


Abbildung 81: A-D: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Bakterienzellen einer Cofermentationskultur mit *C. ljungdahlii* und *C. kluyveri* erstellt mit dem Rasterelektronenmikroskop Hitachi S-5200 UltraHigh Resolution FE.

4 Diskussion

4.1 Konstruktion eines Biosyntheseweges zur Produktion von Capronat mittels rekombinanter acetogener Stämme

Mittels „metabolic engineering“ sollte ein Biosyntheseweg konstruiert werden, der die Produktion von Capronat, ausgehend von Synthesegas in acetogenen Bakterien ermöglicht. Wie zuvor beschrieben (3.1) wurde dieser Biosyntheseweg in zwei Teilschritte unterteilt. Zum einen sollte durch Einbringen von Genen aus *C. acetobutylicum* Acetyl-CoA zu Butyryl-CoA umgewandelt werden und zum anderen dieses dann weiter durch Gene aus *C. kluyveri* zu Capronyl-CoA umgesetzt werden. Die notwendigen Gene aus *C. acetobutylicum* befanden sich bereits auf dem Plasmid pMW 2, welches im Rahmen einer Dissertation der Universität Ulm, mit der Zielsetzung einer rekombinanten Butanolsynthese, erstellt wurde (Wensche, 2012). Für die Zwecke dieser Dissertation enthielt dieses Plasmid das Butyraldehyd-/Butanol-Dehydrogenase-Gen aus *C. acetobutylicum* (*adhE*). Dieses Gen wäre für die Zwecke der hier vorliegenden Arbeit störend gewesen, da mittels des von diesem Gen codierten Enzyms Butyryl-CoA zu Butanol umgewandelt worden wäre, womit ein Teil des Butyryl-CoA's für die weitergehende Synthese von Capronat weggefallen wäre. Dieses Gen wurde aus dem Plasmid pMW 2 entfernt, indem es mittels Restriktionsendonukleasen ausgeschnitten und das Plasmid anschließend religiert wurde. Dieses Plasmid, im weiteren als pMW 2.1 bezeichnet, wurde bereits im Rahmen einer Masterarbeit der Universität Ulm erstellt (Bielzer, 2013) und fraglich war nur noch dessen Funktionalität (siehe 4.1.1).

Für die Erstellung des zweiten Plasmides, pMTL82151_ *crt2_bcd2_etfB2_etfA2_hbd2* (Abbildung 6) wurde ebenfalls das sogenannte traditionelle Klonieren, d.h. Klonieren mit Verwendung von Restriktionsendonukleasen und Ligasen zum Einbau in Plasmide, angewandt. In dieses Plasmid sollten nun zusätzlich die für die Capronyl-CoA-Synthese benötigten Gene aus *C. kluyveri* eingefügt werden. Ein Großteil dieser Gene konnte auch in dieses Plasmid kloniert werden. Das einzige noch fehlende Gen war *crt2* aus *C. kluyveri*. Dieses Gen sollte aus Mangel an, nach dem bereits vollzogenen Einbau der restlichen Gene, noch vorhandenen Restriktionsschnittstellen des genutzten Vektors pMTL82151 erst mit einem Promoter ligiert werden und dann zusammen mit diesem eingebaut

werden. Für diesen Zweck wurde der Promoter P_{ptb} aus *C. acetobutylicum* ausgewählt. Dieser Promoter wurde ausgewählt, da mit ihm bereits zuvor sowohl in *E. coli* (Schuster, 2010) als auch in *C. ljungdahlii* (Köpke *et al.*, 2010) heterologe Genexpressionen erzielt werden konnten. Die Ligation von P_{ptb} und *crt2* sollte durch eine SOE-PCR vollzogen werden. Die dadurch erhaltenen DNA-Fragmente wurden sequenziert, und es wurde immer ein Fehlen von Teilen der Promoterstruktur bemerkt, während das Gen *crt2* immer komplett vorlag. Es wurde über einen längeren Zeitraum versucht, eine korrekte Ligation zu erzielen, jedoch ohne Erfolg. Die Ursache für das Fehlen von Teilen der Promotersequenz konnte nie eindeutig identifiziert werden und diese Klonierungsstrategie musste überdacht werden, da sie so nicht zielführend war. Somit wurden die Arbeiten an der Capronatsynthese mittels Cofermentation initiiert und intensiviert.

Dennoch kamen über die Zeit noch weitere Ideen bzw. neu entstandene Alternativen auf, die die Konstruktion des rekombinanten Biosyntheseweges hätten voranbringen können. Zum einen hätte durch die Nutzung anderer *E. coli*-Stämme ausgeschlossen werden können, dass der verwendete Stamm *E. coli* XL1-Blue MRF' verantwortlich für die Veränderung des Promoters P_{ptb} ist. Mit hoher Wahrscheinlichkeit könnte dieser Ansatz jedoch auch keine Lösung darstellen, da der Promoter P_{ptb} zuvor bereits in *E. coli* XL1-Blue MRF' erfolgreich für eine heterologe Expression, um eine Produktion von Butanol in *E. coli* zu erreichen, genutzt werden konnte (Schuster, 2010).

Ein vielversprechender Ansatz für die Lösung dieses Problem sind neu entstandene und in den letzten Jahren immer mehr beachtete Methoden der Klonierung. Wie bereits erwähnt wurde für die Plasmidkonstruktionen dieser Arbeit das als „traditionell“ bezeichnete Klonieren genutzt. Das bedeutet, dass die gewünschten Gene zuerst mittels PCR amplifiziert und gleichzeitig Restriktionsschnittstellen eingefügt werden. Daraufhin werden die DNA-Fragmente in Zwischenvektoren eingebracht (TA-Klonierung) und dann mittels Restriktionsverdau aus diesem Zwischenvektor wieder herausgeschnitten. Der Zielvektor wird ebenfalls mit denselben Restriktionsendonukleasen geschnitten. Dann werden geschnittener Zielvektor und DNA-Fragment noch mittels einer DNA-Ligase zusammengefügt.

Alternativ dazu gibt es neuere Verfahren, wie zum einen das sogenannte „Gibson Assembly“ (Gibson *et al.*, 2009; New England Biolabs, MA, USA) und zum anderen das

darauf basierende „In-Fusion Cloning“ (Takara Bio Inc., Kusatsu, Japan). Grundlegendes Prinzip beider Methoden ist, dass die zu inserierenden DNA-Fragmente mittels PCR amplifiziert werden und dabei gleichzeitig kurze Nukleotidsequenzen eingebaut werden, welche entweder homolog zu weiteren einzubauenden DNA-Fragmenten und/oder homolog zu freiliegenden Enden des Zielvektors sind. Der Zusammenbau des Plasmids wird dann mittels Zugabe von DNA-Polymerase und DNA-Ligase durchgeführt. Mittels dieser Methoden können mehrere Fragmente auf einmal in den Vektor eingebaut werden. Da die Inkubationstemperatur in allen Arbeitsschritten unverändert bleibt, werden diese Verfahren auch als isotherm bezeichnet. Für die Klonierung in dieser Arbeit wären diese Methoden sehr interessant. Als schwierig könnte es sich aber erweisen, die große Anzahl an Fragmenten (7 Fragmente = 5 Strukturgene plus Promoter und Terminator) fehlerfrei in das Zielplasmid einzubauen. Dieses Vorhaben könnte sich als problematisch oder zumindest als langwieriger erweisen, bis ein korrekter Einbau der Fragmente erfolgt ist. Behelfsweise konnten auch zuvor einzelne Fragmente bereits über z.B. eine SOE-PCR ligiert werden, um die Anzahl der einzubringenden Fragmente zu verringern. Diese Ligationen könnten aber auch wieder zu dem ursprünglichen Problem führen, welches schon bei der Ligation von P_{ptb} und $crt2$ auftrat.

Generell sind noch einige weitere Aspekte bei dieser geplanten heterologen Capronatproduktion erwähnenswert. Der angedachte Stoffwechselweg enthält eine relativ große Anzahl einzubringender Gene und damit verbundener Reaktionsschritte, weshalb es ungewiss erscheint, ob Capronat mittels dieses Weges hätte gebildet werden können. Um diese Anzahl an Genen einzubringen, hätten zwei Plasmide in ein acetogenes Bakterium wie z.B. *C. ljungdahlii* eingebracht werden müssen, die zudem beide stabil vorliegen müssten. Die Erfolgsaussicht der stabilen Coexistenz der in dieser Arbeit genutzten Plasmide unter Nutzung zweier Antibiotika zur Selektion ist nur schwer zu beurteilen. Weiterhin problematisch für eine hohe Produktausbeute könnte zudem sein, dass das am Anfang benötigte und durch den „Wood-Ljungdahl-Pathway“ entstandene Acetyl-CoA zum Teil einer möglichen Capronatsynthese durch die native Produktion anderer Stoffwechselprodukte entzogen werden würde. So wird Acetyl-CoA zum einen zur notwendigen Synthese von ATP mittels der Phosphotransacetylase und Acetatkinase

zu Acetat (Müller, 2003) und zum anderen mittels der bifunktionalen Aldehyd/Alkohol-Dehydrogenase zu Ethanol umgewandelt.

4.1.1 Test der Funktionalität des Plasmid pMW 2.1 in *E. coli* XL1-Blue MRF'

Das Plasmid pMW 2.1 konnte wie bereits zuvor erwähnt fertig gestellt werden (Abbildung 4). Dieses Plasmid enthielt Gene des Butanolsyntheseweges aus *C. acetobutylicum* um, ausgehend von Acetyl-CoA, eine Synthese von Butyryl-CoA zu erreichen (Abbildung 3). Der Nachweis der Funktionalität dieses Plasmids wurde nun durch Transformation in *E. coli* XL1-Blue MRF' durchgeführt. Zusätzlich wurde mit zwei weiteren Plasmiden jeweils eine Thioesterase eingebracht, welche Butyryl-CoA zum nachweisbaren Butyrat umwandeln sollte. Im durchgeführten Wachstumsversuch war zu sehen, dass *E. coli* XL1-Blue MRF' Wildtyp und *E. coli* XL1-Blue MRF' [pMW 2.1] kein Butyrat und auch kein Aceton bilden konnten. Im Falle des Wildtyps war das auch zu erwarten, da solch eine native Produktion noch nicht beschrieben wurde. Ein anderes Ergebnis, d.h. eine Bildung von Butyrat aus dem, in diesem Falle eventuell produzierten Butyryl-CoA, wäre beim Versuch mit *E. coli* XL1-Blue MRF' [pMW 2.1] möglich gewesen. Zwar wurden hier keine Thioesterasen eingebracht, jedoch besitzt *E. coli* bereits die Thioesterase I, genannt TesA, und die Thioesterase II, genannt TesB (Lennen und Pflieger, 2012).

Im Falle von TesA wurden die höchsten Enzymaktivitäten bei Nutzung von Acyl-CoAs mit einer Kettenlänge von C12 bis C14 als Substrat nachgewiesen (Bonner und Bloch, 1972). Eine Hydrolyse des kurzkettigen Acetyl-CoA konnte in dieser Publikation nicht festgestellt werden. Ein ähnliches Substratspektrum liegt bei TesB vor. Auch diese Thioesterase zeigte die höchsten Hydrolyseaktivitäten bei Verwendung von acylhaltigen Substraten mit einer Kettenlänge von C12 bis C18. Für diese Bestimmung wurden in diesem Falle nicht Acyl-CoAs gespalten, sondern die entsprechenden Acyl-ACPs. Die hydrolytische Aktivität von TesB wurde auch schon in der Konstruktion von Biosynthesewegen genutzt. So wurde TesB eingesetzt, um eine Produktion von 3-Hydroxysäuren in *E. coli* zu erzielen (Martin *et al.*, 2013). Die Substrate von TesB waren in diesem Fall 3-Hydroxyacyl-CoAs. Auch eine Produktion von 3-Hydroxyvalerat in *E. coli* konnte u.a. mit diesem Enzym erzielt werden (Tseng *et al.*, 2010). TesB wurde hier für den letzten Schritt der Synthese genutzt und hydrolysierte 3-Hydroxyvalerat-CoA. Besonders interessant ist die Publikation von Baek

et al. (2013), in der TesB genau für den Schritt verwendet wurde, der er auch in Zusammenhang mit dem Versuch dieser Arbeit eine Rolle spielt. Es wurde eine Produktion von Butyrat in *E. coli* erzielt, wobei TesB im letzten Syntheseschritt das Butyryl-CoA zum eben genannten Butyrat hydrolysiert. Ob nun TesB wirklich für diese Reaktion verantwortlich ist, bleibt trotzdem zweifelhaft. In der Publikation von Volker *et al.* (2014), deren Ziel ebenfalls eine Synthese von Butyrat in *E. coli* war, u.a. eben mit TesB, wurde auch in einem der Versuche das entsprechende Gen dieser Thioesterase deletiert. Dabei konnte jedoch kein Einfluss auf die produzierten Konzentrationen festgestellt werden, so dass eventuell auch ein anderes Enzym für diese Reaktion verantwortlich sein könnte. In dem in dieser Arbeit durchgeführten Wachstumsversuch mit *E. coli* XL1-Blue MRF' [pMW 2.1] wurde von keiner der nativ vorhandenen Thioesterasen Butyrat gebildet. Somit war es richtig und notwendig, die zwei anderen heterologen Thioesterasen einzubringen. Im Versuch mit *E. coli* XL1-Blue MRF' [pMW 2.1; pIMP_adc_tell_thIA] wurde ebenfalls keine Bildung von Butyrat nachgewiesen. Somit scheint es, dass die hier eingebrachte Thioesterase Tell das Butyryl-CoA nicht hydrolysieren konnte. Nachgewiesen bei Tell wurde bisher eine niedrige Hydrolyserate von Acetyl-CoA und Butyryl-CoA (Schwarzer *et al.*, 2002). In der entsprechenden Kultur konnten 0,9 mM Aceton detektiert werden. Die Ursache der Acetonbildung ist in der zusätzlichen Anwesenheit des Genes *adc* auf dem transformierten Plasmid zu finden. Das Gen *adc* codiert eine Acetacetat-Decarboxylase, welche ausgehend von Acetacetat Aceton unter Abspaltung von Kohlendioxid bilden kann (Gerischer und Dürre, 1990). Dabei stellt sich die Frage, woher das Acetacetat stammt, da es nativ von *E. coli* nicht gebildet werden kann. Anzunehmen ist, dass die eingebrachte Thioesterase Tell das Acetacetat gebildet hat, indem es Acetacetyl-CoA hydrolysiert hat. Acetacetyl-CoA wurde wiederum ausgehend von zwei Molekülen Acetat entweder durch eine Thiolase (codiert durch *thIA*; vorhanden auf beiden Plasmiden) oder der nativ in *E. coli* vorhandenen Acetyl-CoA Acetyltransferase (codiert durch *atoB*) gebildet (Winzer *et al.*, 2000; Baek *et al.*, 2013). Die Bildung von Aceton war kein Ziel dieses Versuchs, konnte aber indirekt bestätigen, dass das entsprechende Plasmid vorlag und die Gene auch abgelesen wurden.

Alle Aspekte, die gerade zur Acetonbildung genannt wurden, treffen auch auf die Kultur mit *E. coli* XL1-Blue MRF' [pMW 2.1; pIMP_adc_ybgC_thIA] zu. In dieser Kultur konnten

3,2 mM Aceton detektiert werden. Wie bereits zuvor im Falle von *E. coli* XL1-Blue MRF' [pMW 2.1; pIMP_adc_tell_thIA] ist davon auszugehen, dass die hier eingebrachte Thioesterase YbgC das für die Acetonbildung durch die Acetacetat-Decarboxylase benötigte Acetacetat bilden konnte. Entscheidend in diesem Versuch war die Bildung von 1,2 mM Butyrat. Das Butyrat wurde höchstwahrscheinlich wie beabsichtigt durch Hydrolyse von Butyryl-CoA durch die Thioesterase YbgC gebildet. Der Thioesterase YbgC konnte bereits zuvor eine Enzymaktivität bei Verwendung von Butyryl-CoA als Substrat nachgewiesen werden (Zhuang *et al.*; 2002). Aufgrund dieser Butyratbildung konnte davon ausgegangen werden, dass das Plasmid pMW 2.1 und der damit erstellte Biosyntheseweg prinzipiell funktional ist.

4.2 Produktion von Capronat ausgehend von Synthesegas mittels (Co-) Fermentationen

4.2.1 Simultane Cofermentation

Die ersten Versuche, die zur Etablierung einer nicht rekombinanten Capronatsynthese ausgehend von Synthesegas durchgeführt wurden, waren die der simultanen Cofermentationen. Die erste durchgeführte simultane Cofermentation wiederum war der Ansatz mit *C. autoethanogenum* und *C. kluyveri*. Es konnten in diesem Versuch keine bedeutenden Unterschiede im Wachstumsverhalten der Cofermentationskulturen und der *C. autoethanogenum*-Kultur festgestellt werden (Abbildung 12). Somit ist davon auszugehen, dass die Anwesenheit von *C. kluyveri* keine negativen Einflüsse auf das Wachstum von *C. autoethanogenum* in den Cofermentationskulturen hatte. Zudem besteht auch die Möglichkeit, dass kein Wachstum von *C. kluyveri* in diesen Kulturen stattgefunden hat. Es ist nicht eindeutig möglich, durch die Bestimmung der OD_{600nm} zu beurteilen, ob ein Wachstum von *C. kluyveri* in den Cofermentationskulturen stattgefunden hat, und wenn ja, wie es verlief, da in diesen Kulturen die OD_{600nm} von beiden Organismen gleichzeitig bestimmt wurde. Diese Problematik der OD_{600nm}-Bestimmung betraf alle Kulturen dieser Arbeit, in denen sich zwei unterschiedliche Organismen zu einem Zeitpunkt gleichzeitig befanden. Die relativ hohen OD_{600nm}-Werte der Cofermentationskulturen sind zusammen mit den detektierten Produktkonzentrationen ein Indiz, dass hier hauptsächlich nur ein Wachstum von

C. autoethanogenum stattgefunden hat, worauf später noch genauer eingegangen wird. Zu beachten ist, dass *C. kluyveri* selbst mit optimaler Substratversorgung (500 mM Ethanol und 100 mM Acetat) in diesem Versuch nur eine maximale OD_{600nm} von 0,32 im Falle der Wildtyp-Kultur erreichte. Bei Erreichen solch niedriger OD_{600nm}-Werte wäre der Beitrag von *C. kluyveri* zur gesamten OD_{600nm} der Cofermentationskultur eher gering. Die erzielten OD_{600nm}-Werte sanken nach Erreichen des Maximums wieder etwas ab, was sich auf eine Lyse einiger Zellen zurückführen lässt. Ein Rückgang der Zelltrockenmasse bzw. der OD_{600nm} bei Kultivierungen von *C. kluyveri* war nach Erreichen der stationären Phase schon in anderen Publikationen zu erkennen (Yin *et al.*, 2017; Reddy *et al.*, 2017). Das Absinken von OD_{600nm}-Werten im Falle von Kultivierungen von *C. kluyveri* war in allen entsprechenden Versuchen dieser Arbeit zu sehen. Der pH-Wert in der *C. autoethanogenum*-Kultur sank schneller ab als in den Cofermentationskulturen. Ursächlich dafür ist die in den Cofermentationskulturen anfänglich geringere Acetatbildung, verursacht durch die Anwesenheit von *C. kluyveri*. Die Acetatkonzentrationen erreichen erst ab einer Inkubationsdauer von 575 h das Niveau der *C. autoethanogenum*-Kultur. Ab diesem Zeitpunkt sind auch die Unterschiede im pH-Wert nur noch gering und die Werte haben sich nahezu angeglichen.

Bei Betrachtung der Ethanolkonzentrationen ist deutlich zu sehen, wie die Anwesenheit von *C. kluyveri* die Konzentrationen beeinflusst (Abbildung 13). In allen Cofermentationskulturen war um den Faktor fünf weniger Ethanol vorhanden als in der *C. autoethanogenum*-Kultur. Dies ist ein starkes Indiz, dass *C. kluyveri* die gebildeten Ethanolkonzentrationen verbraucht hat. Somit ist davon auszugehen, dass *C. kluyveri* in dieser Kultur lebensfähig war, da die metabolische Aktivität in Form des Ethanolverbrauchs vorhanden war. Anzumerken ist, dass eine höhere Ethanolproduktion durch *C. autoethanogenum* als die hier in der Wildtypkultur detektierten 5 mM erhofft wurde. In einigen Publikationen wurden durch autotrophe Kultivierungen von *C. autoethanogenum* ebenfalls nur vergleichbare Ethanolkonzentrationen erreicht. So wurden in der Erstbeschreibung von *C. autoethanogenum* maximal 7,7 mM Ethanol erreicht (Abrini *et al.*, 1994) und auch Cotter *et al.* (2009), welche den Einfluss verschiedener Parameter auf das Wachstum von *C. autoethanogenum* untersuchten, erreichten nur eine maximale Konzentration von 1,4 mM. Deutlich höhere

Ethanolkonzentrationen wurden von Köpke *et al.* (2011b) erreicht, welche im Rahmen des Nachweises einer nativen 2,3-Butandiolproduktion auch eine Produktion von ca. 22 mM Ethanol nachwies. Auch Abubackar *et al.* (2015), welche das Ziel hatten, den Ethanol/Acetat-Quotienten zugunsten von Ethanol zu verschieben, erreichten fast 20 mM Ethanol. Noch höhere Ethanolkonzentrationen mit einer Konzentration von fast 40 mM Ethanol in einer unkontrollierten Batchfermentation wurden von Bengelsdorf *et al.* (2016) publiziert. Beachtenswert ist, dass bei Köpke *et al.*, (2011b) und bei Bengelsdorf *et al.* (2016) ein Nährmedium genutzt wurde, das nahezu identisch zu dem war, welches in dieser Arbeit verwendet wurde. Der Grund der unterschiedlich erzielten Ethanolkonzentrationen liegt an den genutzten Gasphasen. Die Publikationen mit den höheren Ethanolkonzentrationen nutzten entweder nur Kohlenmonoxid alleine oder Synthesegase, die einen prozentual höheren Anteil an Kohlenmonoxid und/oder einen niedrigeren Anteil an Kohlendioxid hatten. Abrini *et al.* (1994) hatten schon in der Erstbeschreibung gezeigt, dass die Ethanolkonzentration mit einem höheren prozentualen Anteil Kohlenmonoxid deutlich ansteigt. So bewirkte eine Erhöhung des Anteils von Kohlenmonoxids von 33 % auf 60 % eine Steigerung der Ethanolkonzentration um den Faktor fünf (von 1,56 mM auf 7,7 mM). Eine mögliche Erklärung der erhöhten Ethanolproduktion liegt im Wood-Ljungdahl-Weg. Im Falle einer Nutzung von Kohlenmonoxid als Substrat wird dieses im ersten Schritt des Methylzweiges durch die Kohlenmonoxid-Dehydrogenase zu Kohlendioxid oxidiert und es entstehen reduziertes Ferredoxin sowie Protonen in Form von Wasserstoff (Bengelsdorf *et al.*, 2013). Zusätzlich wird im Carbonylzweig reduziertes Ferredoxin eingespart, welches für die Reduktion von Kohlendioxid zu Kohlenmonoxid benötigt wird. Durch diese zwei Schritte wären somit mehr Reduktionsäquivalente in Form von reduziertem Ferredoxin vorhanden, welches von der Aldehyd:Ferredoxin Oxidoreduktase genutzt werden könnte, um ausgehend von Acetat das Acetaldehyd zu bilden, welches die letzte Vorstufe der Ethanolproduktion ist. Eine erhöhte spezifische Aktivität der Aldehyd:Ferredoxin Oxidoreduktase in *C. autoethanogenum* bei Nutzung einer Gasphase mit höherem Anteil an Kohlenmonoxid (42 %) gegenüber der Nutzung einer Gasphase bestehend aus Wasserstoff und Kohlendioxid konnte in einem Fall nachgewiesen werden (20 U/mg gegenüber 8 U/mg; Mock *et al.*, 2015). Aufgrund von Schwierigkeiten in der Versuchsdurchführung (zu hohe

Hintergrundaktivität beim Enzymtest) konnte die spezifische Aktivität hier jedoch nur in der entgegengesetzten Reaktionsrichtung, d.h. bei der Reaktion von Acetaldehyd zu Acetat, bestimmt werden.

Die in dieser Cofermentation erzielten Ethanolkonzentrationen waren zu niedrig, um eine Capronatsynthese durch *C. kluyveri* zu ermöglichen. Möglichkeiten, wie die Ethanolkonzentration bei Kultivierung von *C. autoethanogenum* gesteigert werden könnte und wie mit diesen Organismen eine funktionale simultane Cofermentation erreicht werden könnte, werden noch später in der Diskussion aufgezeigt (siehe generelle Aspekte 4.9).

Die simultane Cofermentation von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* zeigte einen deutlichen Einfluss von *C. kluyveri* auf den Wachstumsparameter OD_{600nm} (Abbildung 14). Alle Cofermentationskulturen erreichten eine niedrigere OD_{600nm} als die *C. carboxidivorans*-Kultur. Dieser Befund lässt sich leicht erklären, da sich hier zwei Organismen alle Nährstoffe des Nährmediums teilen müssen. Der pH-Wert der Cofermentationskulturen war im Verlauf deutlich niedriger, weil im Gegensatz zur *C. carboxidivorans*-Kultur höhere Konzentrationen an Säuren gebildet wurden. Die *C. carboxidivorans*-Kultur wechselte bereits nach 236 h von der acidogenen in die solventogene Phase. Die Produktion von Acetat und Butyrat nahm ab diesem Zeitpunkt deutlich ab, und die Produktion von Butanol und Hexanol begann, wodurch auch der pH-Wert nicht weiter abfiel. Die Ethanolkonzentrationen der Cofermentationskulturen wurden durch die metabolische Aktivität von *C. kluyveri* niedrig gehalten (Abbildung 15). Im Vergleich dazu konnte ohne den Einfluss von *C. kluyveri* die Ethanolkonzentration wie in der *C. carboxidivorans*-Kultur immer weiter steigen. Die Acetatkonzentrationen waren in den Cofermentationskulturen sogar höher, was daran lag, dass die *C. carboxidivorans*-Kultur schon früh die acidogene Phase verlassen hatte. Die Cofermentationskulturen und die *C. carboxidivorans*-Kultur bildeten Butanol und Hexanol, wobei nur noch in der *C. carboxidivorans*-Kultur eine stetige Zunahme nach 333 h festgestellt wurde. Die Produktion von Butanol und Hexanol korrelierte in den Cofermentationskulturen mit der Aktivität von *C. kluyveri* v.a. mit der Capronatproduktion und stagnierte dann. Es scheint wahrscheinlich, dass zu diesem Zeitpunkt von *C. carboxidivorans* Butyrat und Capronat während der Bildung in den Cofermentationskulturen in die entsprechenden Alkohole

umgewandelt wurden. Es ist davon auszugehen, dass Butanol und Hexanol in den Cofermentationskulturen von *C. carboxidivorans* gebildet wurden und nicht von *C. kluyveri*. Eine Bildung von Butanol und Hexanol durch *C. kluyveri* wurde bisher nur bei Verwendung von Succinat oder 4-Hydroxybutyrat als Substrat beschrieben (Kenealy und Waselefsky, 1985). Butyrat und Capronat entstanden ebenfalls in allen Cofermentationskulturen, aber erst nach ca. 236 h Inkubation, was zeigt, dass *C. kluyveri* eine längere Anpassungszeit benötigte, bis es die Produktion beginnen konnte. Es ist stark davon auszugehen, dass höhere Konzentrationen an Capronat hätten erreicht werden können, aber *C. carboxidivorans* einen Teil zu Hexanol umgesetzt hat. Durch die Korrelation der Stoffwechselfparameter ist davon auszugehen, dass Capronat in den Cofermentationskulturen von *C. kluyveri* produziert wurde und nicht von *C. carboxidivorans*. Eine Produktion ausgehend von *C. carboxidivorans* würde keine Problematik darstellen, da die Zielsetzung einer Produktion von Capronat, ausgehend von Synthesegas, auch in diesem Falle gegeben wäre. Inwiefern diese Cofermentation noch zu optimieren wäre, wird im späteren Verlauf noch erläutert (siehe generelle Aspekte 4.9).

Für die letzte simultane Cofermentation wurden *C. ljungdahlii* und *C. kluyveri* verwendet. Im Vergleich zur zuvor beschriebenen Cofermentation mit *C. carboxidivorans* erreichten hier die Cofermentationskulturen sogar höhere OD_{600nm}-Werte als die *C. ljungdahlii*-Kultur nach 354 h Inkubation (Abbildung 18). Mit Blick auf die Capronatsynthese der repräsentativen Cofermentationskultur (Abbildung 20) ist zu sehen, dass genau zu diesem Zeitpunkt *C. kluyveri* keine metabolische Aktivität mehr aufweist und nur deswegen höhere OD_{600nm}-Werte erreicht werden, weil alle Nährstoffe des Nährmediums nun *C. ljungdahlii* zur Verfügung standen. Insgesamt war der OD_{600nm}-Wert auch gegenüber der *C. ljungdahlii*-Kultur erhöht, weil hier die OD_{600nm} zweier Organismen gleichzeitig bestimmt wurde. Der pH-Wert sank in der *C. ljungdahlii*-Kultur schneller, da die Säureproduktion in Form von Acetat bereits kurz nach Inkubationsbeginn angefangen hatte (Abbildung 18; Abbildung 20). Nachdem die Synthese von Capronat und Butyrat in der repräsentativen Cofermentationskultur abgeschlossen war, akkumulierte auch Acetat immer mehr, und der pH-Wert sank auf dieselben Werte wie die der *C. ljungdahlii*-Kultur.

Die Ethanolkonzentrationen der Cofermentationskulturen standen, wie bei allen simultanen Cofermentationen stark, unter dem Einfluss der Anwesenheit von *C. kluyveri* (Abbildung 19). Bis zu einer Inkubationszeit von 239 h war nur eine geringe Ethanolkonzentration in der repräsentativen Cofermentationskultur nachzuweisen. Diese stieg genau ab dem Zeitpunkt an, bei dem die Capronatsynthese geringer wurde (Abbildung 20). Somit ist zu erkennen, dass bis zur einer Inkubationsdauer von 354 h *C. kluyveri* metabolisch aktiv war, weil erst danach die Ethanolkonzentration in der Cofermentationskultur steigen konnte. Dieselbe Situation zeigte sich im Falle der Acetatkonzentration. Auch diese stieg in der Cofermentationskultur nicht an, solange *C. kluyveri* noch metabolisch aktiv war, und erreichte erst danach fast die gleiche Höhe wie die *C. ljungdahlii*-Kultur. Die Bildung von Butanol und Hexanol war bereits nach 167 h zu sehen. Wie zuvor beschrieben, kann *C. kluyveri* unter diesen Bedingungen kein Butanol und Hexanol bilden. Im Falle von *C. ljungdahlii* konnte die native Bildung von Butanol und Hexanol noch nie nachgewiesen werden. Beschrieben ist jedoch die Fähigkeit von *C. ljungdahlii* Butyrat und Capronat in seine entsprechenden Alkohole, also Butanol und Hexanol, umzuwandeln (Perez *et al.*, 2013). Die Konzentrationen von Butanol und Hexanol erreichten ihren Maximalwert genau zu dem Zeitpunkt, an dem auch die Bildung von Butyrat und Capronat abgeschlossen war. Auch bei dieser Cofermentation ist davon auszugehen, dass die Umwandlung in Butanol und Hexanol gleich nach der Bildung von Butyrat und Capronat begann. Somit wären auch hier höhere Capronatkonzentrationen ohne die Umwandlung zu Hexanol möglich gewesen. Auf Optimierungsmöglichkeiten dieser Cofermentation wird später noch verwiesen (siehe generelle Aspekte 4.9).

Abschließend ist zu den simultanen Cofermentationen zu sagen, dass sowohl mit *C. carboxidivorans* als auch mit *C. ljungdahlii* jeweils zusammen mit *C. kluyveri* eine erfolgreiche und reproduzierbare Synthese von Butanol, Hexanol und vor allem Capronat, ausgehend von Synthesegas, erzielt werden konnte. *C. autoethanogenum* jedoch erwies sich aufgrund der zu geringen Produktion von Ethanol als nicht geeignet.

4.2.2 Sequentielle Cofermentation mit einem Wechsel der Gasphase während der Kultivierung

Die zweite Versuchsreihe, die zur Etablierung einer nicht rekombinanten Capronatsynthese ausgehend von Synthesegas durchgeführt wurde, war die der sequentiellen Cofermentationen mit einem Wechsel der Gasphase während der Kultivierung. In der sequentiellen Cofermentation mit *C. autoethanogenum* und *C. kluyveri* konnten keine Unterschiede im Verlauf der OD_{600nm} und des pH-Wertes zwischen der *C. autoethanogenum*-Kultur und der Cofermentationskultur festgestellt werden (Abbildung 23). Deutlich zu erkennen ist, dass ab dem Wechsel der Gasphase (Zeitpunkt 236 h) die OD_{600nm} und der pH-Wert stagnierten. Ebenfalls stagnierten in der *C. autoethanogenum*-Kultur und der Cofermentationskultur ab diesem Zeitpunkt die Konzentrationen von Acetat und Ethanol (Abbildung 24). Es ist davon auszugehen, dass durch den Wechsel der Gasphase der Stoffwechsel von *C. autoethanogenum* zum Erliegen kam. Gewechselt wurde die Gasphase von Synthesegas auf N_2/CO_2 (80 % N_2 und 20 % CO_2). Der Stickstoff dient in dieser Gasphase als für den Energiestoffwechsel inertes Gas, sowie für die Schaffung von anaeroben Bedingungen. Kohlendioxid kann von acetogenen Bakterien wie *C. autoethanogenum* als Kohlenstoffquelle genutzt werden. Jedoch zieht die Nutzung von Kohlendioxid einige Konsequenzen nach sich. Im Carbonylzweig des Wood-Ljungdahl-Weges ist für die Reduktion von Kohlendioxid in Kohlenmonoxid reduziertem Ferredoxin, nötig und im Methylzweig kommt es zu keiner Bildung von reduziertem Ferredoxin, da keine Oxidation von Kohlenmonoxid in Kohlendioxid stattfindet (Bengelsdorf *et al.*, 2013). Dieser Mangel an Reduktionsäquivalenten kann kompensiert werden, wenn die verwendete Gasphase zusätzlich Wasserstoff enthält. Im Falle der Anwesenheit von Wasserstoff wird mittels einer elektronenbifurkierenden Hydrogenase neben Protonen und $NADH + H^+$ auch reduziertes Ferredoxin gebildet (Bengelsdorf *et al.*, 2013). Generell zu beachten ist, dass reduziertes Ferredoxin essentiell für den Metabolismus acetogener Bakterien ist. So wird u.a. reduziertes Ferredoxin benötigt, um mittels des membrangebundenen RNF-Komplexes einen Protonengradienten zwischen intrazellulärem und extrazellulärem Bereich zu schaffen (Mock *et al.*, 2015). Dieser Protonengradient wird durch eine ebenfalls membrangebundene ATPase genutzt, um ATP zu generieren. Aufgrund der oben

genannten Auswirkungen wird bei Kultivierung von acetogenen Bakterien, bei Nutzung von Kohlendioxid, immer ein Gemisch zusammen mit Wasserstoff verwendet. Somit dient Kohlendioxid bei diesen Gemischen als Kohlenstoffquelle und Wasserstoff als Energiequelle (Wiechmann und Müller, 2017). Die genannten Punkte liefern eine gute Erklärung, warum es im Falle dieser (und auch der restlichen) sequentiellen Cofermentationen zu keiner metabolischen Aktivität mehr nach dem Wechsel der Gasphase kam. Eine Möglichkeit, wie der Stoffwechsel von *C. autoethanogenum* dennoch hätte am Laufen gehalten werden können, liegt an dem Produktspektrum von *C. kluyveri*. Dieses produziert nämlich neben Butyrat und Capronat auch Wasserstoff (Barker und Taha, 1942; Seedorf *et al.*, 2008). Im Falle eines metabolisch (sehr) aktiven *C. kluyveri* in der Cofermentationskultur hätte *C. autoethanogenum* eventuell genug Wasserstoff zur Verfügung gehabt, und beide Organismen hätten davon profitieren können. Dieser Gedankengang lässt sich auch auf die anderen sequentiellen Cofermentationen mit einem Wechsel der Gasphase übertragen. In dieser sequentiellen Cofermentation mit *C. autoethanogenum* war nur eine geringe metabolische Aktivität von *C. kluyveri* vorhanden, da in der Cofermentationskultur die Ethanolkonzentration nur gering 100 h nach der Zugabe von *C. kluyveri* abnahm (Abbildung 24). Die Tatsache, dass in den Cofermentationskulturen mehr Ethanol gebildet wurde als in der entsprechenden *C. autoethanogenum*-Kultur, erscheint zufällig, da alle Kulturen unter gleichen Bedingungen kultiviert wurden. Auch durch Verschleppung von Ethanol aus der *C. kluyveri*-Vorkultur in die Cofermentationskultur lässt es sich nicht erklären, da damit nicht so hohe Konzentrationen erreicht worden wären (siehe auch 4.7). Die vorhandenen Ethanolkonzentrationen von ca. 10 mM ermöglichten eine geringe Produktion von 0,6 - 1 mM Butyrat und 0,5 – 1,2 mM Capronat. Somit war diese Cofermentation funktional, aber die produzierten Konzentrationen erwiesen sich als sehr gering. Hauptproblematik war die durch den Gaswechsel zu früh unterbrochene Ethanolproduktion des acetogenen Bakteriums sowie die Tatsache, dass *C. autoethanogenum* keine hohen Ethanolkonzentrationen erreichte, wie auch bereits zuvor festgestellt wurde (4.2.1). Der verhältnismäßig frühe Zeitpunkt des Gaswechsels in der sequentiellen Cofermentation wurde gewählt, damit noch genügend Nährstoffe für *C. kluyveri* vorhanden waren und der

pH-Wert der acetogenen Kultur noch nicht so weit gesunken war, dass er das Wachstum von *C. kluyveri* inhibieren würde.

Im Falle der sequentiellen Cofermentation von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* lag eine ähnliche Situation vor. Ab dem Zeitpunkt des Gasphasenwechsels und der Zugabe von *C. kluyveri* war entweder eine Stagnation oder nur geringe Änderung der OD_{600nm}, des pH-Wertes und der Produktkonzentrationen zu beobachten (Abbildung 25; Abbildung 26). Die Gründe dafür sind wie zuvor (sequentielle Cofermentation mit *C. autoethanogenum*) in der geringeren Bildung an Reduktionsäquivalenten zu finden. Zwar konnte *C. carboxidivorans* in den Cofermentationskulturen bis zum Zeitpunkt des Gaswechsels ca. 17 mM Ethanol produzieren, jedoch konnte nicht festgestellt werden, dass dieses von *C. kluyveri* als Substrat genutzt wurde. Zum Zeitpunkt der Zugabe von *C. kluyveri* war der pH-Wert der Cofermentationskulturen bereits auf einen Wert von ca. 4,8 abgefallen. Dieser niedrige pH-Wert hatte eine Aktivität von *C. kluyveri* und somit eine Capronatsynthese verhindert (siehe auch 4.6). Aufgrund der unterbrochenen metabolischen Aktivität von *C. carboxidivorans* konnte auch keine Produktion von Butanol und Hexanol festgestellt werden.

Die sequentielle Cofermentation von *C. ljungdahlii* und *C. kluyveri* erbrachte ebenfalls ein unzufriedenstellendes Ergebnis. Nach dem Austausch von Synthesegas durch N₂/CO₂ konnte in der Cofermentationskultur sowie der *C. ljungdahlii*-Kultur keine Änderung der OD_{600nm} mehr festgestellt werden (Abbildung 27). Ein weiteres Wachstum von *C. ljungdahlii* war unter dem Vorhandensein von nur noch Kohlendioxid als Substrat nicht mehr möglich (siehe Begründung weiter oben). Im Falle der pH-Werte, der Acetat- und Ethanolkonzentration konnten nach Wechsel der Gasphase noch deutliche Veränderungen gesehen werden. Der pH-Wert der Cofermentationskultur und *C. ljungdahlii*-Kultur fiel nach dem Wechsel der Gasphase noch weiter, was sich durch die weiterhin stattfindende Acetatsynthese in diesem Zeitraum erklären lässt. Nun stellt sich aber die Frage, warum hier auch nach Gaswechsel noch eine Acetatsynthese stattfand (Abbildung 28). Die Antwort ist bei Betrachtung der Ethanolkonzentrationen beider Kulturen zu sehen, welche nach dem Wechsel auf N₂/CO₂ deutlich abfallen. *C. ljungdahlii* nutzte in diesem Fall aufgrund des Mangels einer Energiequelle Ethanol als Substrat. Die Fähigkeit von *C. ljungdahlii*, Ethanol zu verwerten, wurde bereits in der Erstbeschreibung

festgestellt, in deren Rahmen verschiedene Substrate getestet wurden (Tanner *et al.*, 1993). Mittels der bifunktionalen Acetaldehyd-/Ethanol-Dehydrogenase wird Ethanol über die Zwischenstufe Acetaldehyd in Acetyl-CoA umgewandelt. Das Acetyl-CoA wird mittels der Phosphotransacetylase und Acetatkinase unter ATP-Generierung zu Acetat. Aus diesem Grunde fällt die Ethanolkonzentration ab, und die Acetatkonzentration steigt. Das Sinken der Ethanolkonzentration in der Cofermentationskultur erweist sich als zusätzlich kontraproduktiv für die mögliche Capronatsynthese von *C. kluyveri*. Somit konnte mittels dieser sequentiellen Cofermentation keine Capronatsynthese erzielt werden.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die sequentielle Cofermentation mit Wechsel der Gasphase sich als nicht erfolgreiche Methode erwiesen hat. Der Zeitpunkt der Zugabe von *C. kluyveri* in die Cofermentationskulturen muss immer zwischen mehreren Faktoren abgewogen werden. Zum einen muss für die Produktion von Ethanol und Acetat durch das acetogene Bakterium eine ausreichende Kultivierungsdauer vorhanden sein und zum anderen darf der pH-Wert dieser Kultur für die Capronatsynthese durch *C. kluyveri* nicht zu weit absinken. Außerdem müssen im Nährmedium der Cofermentationskultur noch genügend Nährstoffe für die Kultivierung von *C. kluyveri* vorhanden sein. Weiterhin negativ war, dass durch den Gaswechsel die Produktion von Ethanol und Acetat zum Erliegen kam und sogar wieder abfiel.

4.2.3 Sequentielle Cofermentation ohne Wechsel der Gasphase während der Kultivierung

Aufgrund der Problematiken, die sich durch den Wechsel der Gasphase bei den sequentiellen Cofermentationen ergaben, wurden diese Cofermentationen nochmals ohne einen Wechsel der Gasphase durchgeführt. Die erste dieser sequentiellen Cofermentationen war die Kultivierung von *C. autoethanogenum* und *C. kluyveri*. Das Wachstum und der Verlauf der pH-Werte der Cofermentationskultur und *C. autoethanogenum*-Kultur waren identisch (Abbildung 30). Es kam somit zu keiner sichtbaren Beeinträchtigung von *C. autoethanogenum* durch die Anwesenheit von *C. kluyveri*. Einen deutlichen Einfluss nahm *C. kluyveri* aber auf die Ethanolkonzentrationen der Cofermentationskulturen, welche in diesen deutlich

verringert waren (Abbildung 31). Diese Konzentrationen sanken genau zu dem Zeitpunkt, als *C. kluyveri* zugeben wurde, und es ist somit davon auszugehen, dass Ethanol von *C. kluyveri* als Substrat genutzt wurde. In der *C. autoethanogenum*-Kultur, welche als vergleichender Maßstab diente, konnte mit 5 mM wieder nur eine geringe Ethanolkonzentration festgestellt werden. Die Gründe sind wie zuvor im geringeren Anteil des Kohlenmonoxids am Synthesegas zu finden (4.2.1). Aufgrund der Tatsache, dass die Capronatproduktion hauptsächlich von der Ethanolkonzentration abhängig ist (siehe auch 4.3), konnte aufgrund der geringen Ethanolkonzentration keine Capronatproduktion erzielt werden. Der pH-Wert der Cofermentationskulturen dürfte die Capronatsynthese nicht blockiert haben, da dieser bei Zugabe von *C. kluyveri* in allen Cofermentationskulturen noch bei 5,9 lag.

In den sequentiellen Cofermentationen von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* ohne Wechsel der Gasphase war ein deutlicher Einfluss der Anwesenheit von *C. kluyveri* auf die OD_{600nm} der Cofermentationskulturen zu sehen (Abbildung 32). Diese war deutlich niedriger als die OD_{600nm} der *C. carboxidivorans*-Kultur, und somit ist von einer Hemmung des Wachstums von *C. carboxidivorans* auszugehen. Grund dafür ist, dass sich zwei Organismen die Nährstoffe des Nährmediums teilen müssen. Der pH-Wert sank in den Cofermentationskulturen weniger stark als in der mitgeführten *C. carboxidivorans*-Kultur. Grund hierfür ist die erhöhte Acetatbildung in der *C. carboxidivorans*-Kultur, während in den Cofermentationskulturen das Acetat von *C. kluyveri* nach dessen Zugabe als Substrat genutzt wurde (Abbildung 34). Die Ethanolkonzentrationen der Cofermentationskulturen wurden durch die metabolische Aktivität von *C. kluyveri* geringgehalten und waren dadurch deutlich niedriger als in der *C. carboxidivorans*-Kultur. Es ist auch davon auszugehen, dass *C. carboxidivorans* in der Cofermentationskultur weiterhin Ethanol produziert hatte, da es nur so zu einer deutlichen Capronatsynthese kommen konnte, wie es hier der Fall war (Abbildung 34). Butanol und Hexanol war in den Cofermentationskulturen in größeren Konzentrationen zu finden, was sich dadurch erklären lässt, dass ein Teil des gebildeten Butyrats und Capronats umgehend in die entsprechenden Alkohole umgewandelt wurde (siehe auch 4.5). Die Butanol- und Hexanolproduktion von *C. carboxidivorans* war bei Betrachtung aller Kultivierungen dieses Organismus in dieser Arbeit nicht sehr beständig. Ein möglicher Grund hierfür ist, dass

C. carboxidivorans bei Kultivierungen in Tanner-Medium aufgrund der Pufferung des Nährmediums nur sehr langsam niedrige pH-Werte durch Säureproduktion erreichte. Somit fand erst nach langer Kultivierungsdauer ein Wechsel von der acidogenen in die solventogene Phase statt.

Bei der sequentiellen Cofermentation mit *C. ljungdahlii* und *C. kluyveri* ohne Wechsel der Gasphase kam es nun zu einem Sonderfall der Cofermentation, welcher aber gut die Problematik der sequentiellen Cofermentation aufzeigt. Wie bereits zuvor erwähnt wurden die Cofermentationskulturen in Dreifachbestimmung durchgeführt. In diesem Versuch kam es nun zu dem Fall, dass eine Cofermentationskultur ein anderes Produktspektrum hatte, als die anderen zwei Kulturen. Nur dort kam es zu einer Synthese von Butanol, Hexanol und Capronat. Zuerst wird auf diese repräsentative Kultur eingegangen und dann erläutert, warum es in den anderen zwei Kulturen keine Synthese gab. In der repräsentativ gezeigten Cofermentationskultur zeigte die Anwesenheit von *C. kluyveri* einen deutlichen Einfluss auf die OD_{600nm} und den pH-Wert (Abbildung 36). Die OD_{600nm} war niedriger, weil sich wiederum beide Organismen die Nährstoffe des Nährmediums teilen mussten und der pH-Wert war höher, weil weniger Acetat vorhanden war bzw. gebildet wurde, welches den pH-Wert senken würde. Die Acetatkonzentration wurde von *C. kluyveri* durch Konsumierung geringgehalten (Abbildung 38). Auch die Ethanolkonzentration nimmt ab der Zugabe von *C. kluyveri* ab und wird durch dessen Metabolismus ebenfalls geringgehalten (Abbildung 37). Wie im Falle zuvor kann hier davon ausgegangen werden, dass weiterhin Ethanol produziert wurde und dieses unmittelbar verstoffwechselt wurde. Durch die Bildung von Butyrat und Capronat kam es dann auch zur Bildung von Butanol und Hexanol. Die Umwandlung der Fettsäuren in ihre entsprechenden Alkohole wurde durch *C. ljungdahlii* verursacht.

Der Grund, warum nur eine der drei Cofermentationskulturen eine Capronatsynthese zeigte, kann eindeutig identifiziert werden. Zum Zeitpunkt der Zugabe von *C. kluyveri* hatten die entsprechenden zwei Cofermentationskulturen bereits durch die Acetatsynthese pH-Werte von 5,7 und 5,8 erreicht und erreichten am nächsten Messpunkt bereits Werte von 5,3 und 5,5. Der pH-Wert der funktionalen Cofermentationskultur lag zum Zeitpunkt der Zugabe von *C. kluyveri* bei 6,2. Somit war in den zwei Cofermentationskulturen der pH-Wert für ein metabolisch aktiven *C. kluyveri* zu

niedrig (siehe auch 4.6). Dieser Befund zeigt wiederum die Problematik der sequentiellen Cofermentation, da einerseits dem acetogenen Bakterium genug Zeit gelassen werden muss, um die Substrate Ethanol und Acetat zu produzieren, und andererseits der pH-Wert nicht zu tief sinken darf, damit das ganze System der Capronatsynthese noch funktioniert. Auf diese Problematik wird u.a. auch noch im späteren Verlauf der Diskussion eingegangen (siehe generelle Aspekte 4.9).

4.2.4 Separate biphasische Fermentation

In den simultanen und sequentiellen Cofermentationen wurden ab bestimmten Zeitpunkten beide Organismen gleichzeitig kultiviert, was zur Folge hatte, dass für keinen der beiden Organismen optimale Bedingungen vorlagen. In der separaten biphasischen Fermentation wurden beide Organismen räumlich und zeitlich getrennt voneinander kultiviert. Somit wurden beide genutzten Organismen unter optimalen Bedingungen kultiviert und dennoch blieb der Grundgedanke einer Cofermentation erhalten, da die Kultivierung beider Organismen aufeinander aufbaute.

Diese Versuche wurden nicht mehr mit *C. autoethanogenum* durchgeführt, da die produzierten Ethanolkonzentrationen in den vorangegangenen Versuchen nicht zufriedenstellend und nicht ausreichend für eine Capronatsynthese durch *C. kluyveri* waren (4.2.1; 4.2.2; 4.2.3). Die erste separate biphasische Fermentation wurde mit zuerst stattfindender Kultivierung von *C. carboxidivorans* und dann mit anschließender Kultivierung von *C. kluyveri* in präpariertem Medium durchgeführt, welches der ersten Kultivierung entstammte. Die Kultivierung von *C. carboxidivorans* wurde zu bisherigen Kultivierungen leicht abgewandelt. In den simultanen und sequentiellen Cofermentationen wurde es unterlassen, die Kulturen zur besseren Substratversorgung zu schütteln. Damit sollte verhindert werden, dass Kohlenmonoxid in das Nährmedium diffundiert und *C. kluyveri* inhibiert (siehe auch 4.4). Die Kultivierung der acetogenen *C. carboxidivorans*-Vorkulturen erfolgte nun unter schüttelnden Bedingungen, um eine optimale Substratversorgung mit Synthesegas zu erreichen. Die *C. carboxidivorans*-Kulturen zeigten unter diesen Bedingungen ein Wachstumsverhalten und Produktspektrum, wie es zuvor in dieser Arbeit noch nicht festgestellt werden konnte. Auffallend war im Falle der repräsentativ gezeigten Kulturen ein biphasisches Wachstum

mit einem dazu nicht korrelierenden pH-Wert, welcher nur am Ende der Kultivierung sank (Abbildung 41). Besonders auffallend und abweichend gegenüber bisherigen Kultivierungen war, dass in diesem Falle zuerst eine deutliche Ethanolproduktion und nur eine sehr geringe Produktion von Acetat stattfand (Abbildung 42; Abbildung 43). Eine mögliche Begründung ist die Kultivierung unter schüttelnden Bedingungen. Eventuell wurden durch die verbesserte Substratversorgung deutlich mehr Reduktionsäquivalente gebildet, welche zur Aufrechterhaltung des Stoffwechsels regeneriert werden müssen. Diese Regeneration erfolgte in diesem Fall durch die sofort stattfindende Bildung von Ethanol. Die niedrigen Acetatkonzentrationen lassen sich dadurch erklären, dass Acetat direkt zu Ethanol umgewandelt wurde, ebenfalls unter Regeneration von Reduktionsäquivalenten. Eine Akkumulation von Acetat im Medium war erst festzustellen, als die Ethanolkonzentration stagnierte und dann auch nur in zwei der insgesamt vier (mit der Kontrollkultur) Kulturen. Sobald die Acetatkonzentration anstieg, liess sich auch die Bildung von Butanol, Hexanol und Capronat in der zweiten Wachstumsphase feststellen. Die Bildung dieser Substanzen bildet eine weitere Alternative der Regeneration von Reduktionsäquivalenten. Eine genaue Begründung, warum diese zweite Wachstumsphase nur in zwei der vier Kulturen stattfand, kann nicht gegeben werden. Dieses war in dieser Arbeit die erste Kultivierung von *C. carboxidivorans* unter schüttelnden Bedingungen und es sollten weitere Versuche durchgeführt werden, um zu bestimmen, ob dieses Wachstumsverhalten reproduzierbar auftritt. Interessanterweise war es durch diese Bedingungen erstmals möglich eine Capronatsynthese durch Kultivierung von *C. carboxidivorans* zu erzielen. Entscheidend war es, mittels der acetogenen Vorkulturen Ethanol zu produzieren, was in allen Kulturen erzielt werden konnte, auch wenn die Konzentrationen deutlich geringer ausfielen als in bisherigen Kultivierungen von *C. carboxidivorans* in dieser Arbeit. Für zukünftige Versuche dieser Art sollte daran gearbeitet werden, Bedingungen zu schaffen, um mit acetogenen Vorkulturen von *C. carboxidivorans* möglichst hohe Ethanolkonzentrationen bei gleichzeitiger Capronatsynthese zu erzielen. Damit wären optimale Bedingungen geschaffen, um eine hohe Gesamtcapronatkonzentration mittels der Kultivierung von *C. kluyveri* in davon ausgehend präpariertem Medium zu erzielen. Die Bedingungen dafür müssten durch weitere Wachstumsexperimente bestimmt werden.

Die acetogene Vorkultur und die mitgeführte Kontrollkultur wurden wie in 2.3.1.2 beschrieben präpariert. Durch die Präparation kam es zu einer Verringerung der durch die Kultivierung erzielten Substratkonzentrationen, was in der Art und Weise dieser Methodik unvermeidbar war. Ursprünglich waren in den acetogenen Vorkulturen 100 ml Nährmedium enthalten. Durch Probennahme hatten die Kulturen bei Beendigung der Kultivierung der acetogenen Stämme je nach Versuch nur noch ein Volumen von ca. 69 ml (*C. carboxidivorans*) bzw. ca. 63 ml (*C. ljungdahlii*). Aufgrund der Tatsache, dass nach mehrwöchiger Kultivierung der acetogenen Stämme der Großteil der Nährstoffe des Nährmedium verbraucht war, mussten diese wieder zugefügt werden. Nach Zugabe der entsprechenden Mengen Hefeextrakt, Spurenelemente, Vitamine und Mineralien (enthalten in der Supplementlösung; siehe 2.3.1.2) wurde das Volumen auf 100 ml mit anaeroben Wasser aufgefüllt, weil dieses Volumen die Grundlage der Berechnung war und somit dieselbe Konzentration der Nährstoffe vorlag wie im Originalmedium. Dadurch, dass dem präparierten Medium ca. 31 ml bis 37 ml anaerobes Wasser und Supplementlösung zugeben wurden, wurden die Substratkonzentrationen durch Verdünnung um ca. ein Drittel verringert. Aus diesem Grund waren die Anfangskonzentrationen im präparierten Medium stets geringer als in der Kultivierung der acetogenen Kulturen zuvor erreicht. Wie dieser negative Aspekt vermieden werden könnte, wird noch später in der Diskussion erläutert (siehe generelle Aspekte 4.9).

Die Kultivierung von *C. kluyveri* in ausgehend von *C. carboxidivorans*-Kulturen präpariertem Medium erbrachte trotz dieser verringerten Substratkonzentrationen eine Capronatsynthese in allen Kulturen (Abbildung 47). Die gebildeten Substratkonzentrationen waren somit ausreichend und in Korrelation zur Capronatsynthese sanken die Ethanol- und Acetatkonzentrationen in allen Kulturen deutlich ab. Der Verbrauch der Substrate Ethanol und Acetat war bereits kurz nach Beginn der Kultivierung feststellbar. Somit ist davon auszugehen, dass durch die in diesem Falle optimal vorliegenden Bedingungen (Gaspase und pH-Wert) die Anpassungszeit („lag“-Phase) von *C. kluyveri* verkürzt wurde. Im Falle der repräsentativen Kultur dieses Versuchs konnten 15 mM Capronat detektiert werden. Dieser Wert stellt die höchste Konzentration dar, die mittels Cofermentation in dieser Arbeit erzielt werden konnte. Möglich war diese hohe Konzentration vor allem auch, weil in diesem Falle bereits die acetogene

C. carboxidivorans-Kultur Capronat bilden konnte. Diese Cofermentation könnte somit einen Idealfall darstellen. Die Konzentrationen an Butanol und Hexanol, welche ebenfalls aus der acetogenen Vorkultivierung stammten, blieben unverändert, was zeigt, dass *C. kluyveri* diese Substanzen nicht als Substrat nutzen konnte und diese auch nicht umwandeln konnte. Mittels der mitgeführten Negativ- bzw. Sterilitätskontrolle sollte überprüft werden, ob im präparierten Medium lebensfähige Bakterienzellen der acetogenen Vorkultur vorhanden waren. Da in dieser Kontrollkultur keine Änderung der Stoffwechsel- und Produktparameter festzustellen war, ist ein Einfluss der acetogenen Vorkultur auf die Kultivierung von *C. kluyveri* in diesem Medium auszuschließen. Zu beachten ist aber, dass sich trotzdem noch Bakterienzellen der acetogenen Vorkultur in diesem Medium befunden haben könnten, aber durch die veränderte Gasphase diese nicht kultivierbar waren bzw. keine Energiequellen vorhanden waren.

Die zweite separate biphasische Fermentation wurde mit der Kultivierung unter schüttelnden Bedingungen von *C. ljungdahlii* als acetogene Vorkultur begonnen. Hierbei kam es im Gegensatz zur Kultivierung von *C. carboxidivorans* zu keinen unerwarteten Resultaten. Mit allen Kulturen konnte Ethanol und Acetat produziert werden, was auch das Ziel war (Abbildung 50). Im Vergleich zu weiteren in dieser Arbeit durchgeführten Kultivierungen von *C. ljungdahlii* waren die Ethanolkonzentrationen mit 20 mM deutlich niedriger. So wurden in anderen Kultivierungen von *C. ljungdahlii* ca. 40 – 50 mM erreicht (Abbildung 19; Abbildung 68). Somit gab es keinen positiven Effekt der schüttelnden Bedingungen auf die Ethanolproduktion, welcher eigentlich erhofft wurde. Die erzielten Konzentrationen an Ethanol und Acetat wurden, wie im Falle zuvor, wieder durch die Präparation um ca. ein Drittel verringert. Unter den für *C. kluyveri* optimalen Bedingungen (Gasphase und pH-Wert) war wiederum kurz nach Inokulation ein Wachstum ohne längere Anpassungsphase festzustellen (Abbildung 52). Die pH-Werte blieben, wie in der vorhergehenden Kultivierung von *C. kluyveri* in präpariertem Medium, nahezu unverändert, da die produzierten Konzentrationen an Säuren durch das Puffersystem des Nährmediums (MES-Puffer) abgefangen wurden. Aufgrund der Tatsache, dass nur verhältnismäßig wenig Ethanol als Substrat vorhanden war, wurde dieses in allen Kulturen komplett von *C. kluyveri* verbraucht. Auch die Acetatkonzentrationen nahmen dazu korrelierend ab. Butyrat und Capronat konnten in allen präparierten Medien produziert

werden, wenn auch aufgrund der niedrigen initialen Ethanolkonzentrationen nur in geringen Konzentrationen von 3-4 mM (siehe auch 4.3). Es wurde in diesen Kultivierungen deutlich mehr Butyrat als Capronat durch *C. kluyveri* gebildet (Abbildung 54). Der Grund dafür ist im Ethanol/Acetat-Quotienten zu finden. Es lag im präparierten Medium deutlich mehr Acetat als Ethanol vor, was eine Steigerung der Butyratkonzentration bewirkt. Der Sachverhalt, dass ein in Richtung des Acetats verschobener Ethanol/Acetat-Quotient die Butyratkonzentrationen steigert bei gleichzeitiger Verringerung der Capronatproduktion, wurde sowohl schon in anderen Publikationen (Weimer und Stevenson, 2012; Yin *et al.*, 2017) als auch in dieser Arbeit festgestellt (siehe auch 4.3).

Ein entscheidender Vorteil der separaten biphasischen Fermentation war es, dass beide Organismen unter ihren jeweiligen optimalen Bedingungen kultiviert werden konnten. Somit kam es zu keiner Beeinträchtigung von *C. kluyveri* durch die acetogenen Stämme, weder durch das Absinken des pH-Wertes während der Kultivierung, noch durch die Konkurrenz um die im Nährmedium vorhandenen Nährstoffe. Die Kultivierung der acetogenen Vorkulturen unter schüttelnden Bedingungen hatte nicht die erhofften Resultate erbracht. In weiteren Versuchen ist es nötig, die optimalen Bedingungen für eine erhöhte Ethanolproduktion der acetogenen Kulturen festzustellen. Einige weitere Ansätze, die zur Verbesserung u.a. dieser separaten biphasischen Fermentation führen könnten, werden noch in den generellen Aspekten zur Cofermentation erläutert (4.9).

4.3 Untersuchung des Einflusses verschiedener Substratkonzentrationen auf das Wachstum und das Produktspektrum von *C. kluyveri*

In den Cofermentationen wurden durch die Kultivierung der acetogenen Stämme unterschiedliche Konzentrationen an Ethanol und Acetat in den jeweiligen Versuchen gebildet. Die Frage, welche sich ergab, war, welche Konzentrationen an v.a. Capronat damit durch *C. kluyveri* unter optimalen Bedingungen (d.h. alleiniges Wachstum) gebildet werden können. In Tabelle 12 sind u.a. die erzielten Butyrat- und Capronatkonzentrationen bei Nutzung unterschiedlichster Substratkonzentrationen zu sehen. Deutlich erkennbar ist eine einfache Korrelation zwischen der anfänglichen Ethanolkonzentration und der gebildeten Capronatkonzentration. So konnten mit höheren Ethanolkonzentrationen auch höhere Capronatkonzentrationen erzielt werden.

Diese Korrelation konnte auch schon in anderen Publikationen aufgezeigt werden (Weimer und Stevenson, 2012; Yin *et al.*, 2017). Bei Kultivierungen von *C. kluyveri* 3231B, einem Stamm, welcher aus Rinderpansen isoliert wurde, konnte festgestellt werden, dass ab Ethanolkonzentrationen von 500 mM die Capronatbildung nicht mehr deutlich gesteigert werden konnte. Weiterhin aufschlussreich ist die Betrachtung der in dem Versuch dieser Arbeit genutzten Ethanol/Acetat-Quotienten und deren Auswirkung auf die Produktkonzentrationen. Im Falle eines Ethanol/Acetat-Quotienten mit einem höheren Wert als eins ist zu sehen, wie je nach Ansatz doppelt bis fünfmal soviel Capronat als Butyrat gebildet wurde. Bei Ethanol/Acetat-Quotienten kleiner als eins ergibt sich genau die umgekehrte Situation und die Butyratkonzentrationen sind höher als die Capronatkonzentrationen. Dieselbe Beobachtung konnte schon 1948 von Bornstein und Barker gemacht werden. Etwas abweichende Resultate wurden von Yin *et al.* erzielt (2017). In dieser Publikation wurden bei einer deutlichen Verlagerung des Quotienten in Richtung Acetat (Verhältnis Acetat zu Ethanol 8:2 und 7:3) nicht mehr Butyrat als Capronat gebildet (Verhältnis der Produkte zueinander ca. 1:1). Zu beachten ist aber, dass diese Kultivierung mit Wasserstoff als zusätzlichem Elektronendonator durchgeführt wurde. Ebenfalls gezeigt werden konnte in dieser Publikation, dass eine Verschiebung des Ethanol/Acetat-Quotienten in Richtung Ethanol zu einer vermehrten Bildung von Capronat und einer verminderten Konzentration von Butyrat führt. Generell ist anzumerken, dass es nur wenige Publikationen gibt, die im Falle von *C. kluyveri* die genauen Auswirkungen der Substratkonzentrationen auf die Capronatkonzentration untersuchten. Die meisten dieser Publikationen erschienen erst in den letzten Jahren. Eine Erklärung für die erhöhte Butyratproduktion bei Verschiebung des Ethanol/Acetat-Quotienten in Richtung Acetat lässt sich bei Betrachtung der Ethanol-Acetat-Fermentation von *C. kluyveri* finden (Abbildung 2). Im Falle eines Überschusses von Acetat wird Butyryl-CoA vermehrt zu Butyrat durch die Butyryl-CoA/Acetat-CoA-Transferase umgesetzt. Umgewandeltes Butyryl-CoA steht dann nicht mehr für die Bildung von Capronyl-CoA im zweiten Teil der Ethanol-Acetat-Fermentation zur Verfügung. Der Befund, dass ein zum Acetat verschobener Ethanol/Acetat-Quotienten die Bildung von Butyrat auf Kosten von Capronat fördert, ist ungünstig für das Vorhaben der Cofermentationen. In dieser Arbeit war bei Kultivierung von acetogenen Bakterien ein

derartiges Produktspektrum, d.h. mehr Acetat als Ethanol wurde gebildet, mehrmals zu sehen. Vor allem die Kultivierungen von *C. autoethanogenum* und *C. ljungdahlii* erreichten deutlich höhere Acetat- als Ethanolkonzentrationen, was in den mitgeführten Einzelkulturkontrollen (Abbildung 13, Abbildung 19, Abbildung 20, Abbildung 31, Abbildung 37, Abbildung 38, Abbildung 50 und Abbildung 68) zu erkennen war. Da mittels *C. autoethanogenum* aufgrund der geringen Ethanolbildung generell keine Capronatsynthese erzielt werden konnte, wird darauf nicht weiter eingegangen (Gründe für geringe Ethanolbildung siehe 4.2.1). Im Falle von Cofermentationen mit *C. ljungdahlii* und *C. kluyveri* war ein deutlicher Effekt der vermehrten Produktion von Acetat gegenüber Ethanol zu sehen. So wurde in allen Cofermentationen, in denen eine Capronatsynthese erzielt wurde, auch immer mehr Butyrat als Capronat produziert. Zu sehen war dieses Produktspektrum in der simultanen Cofermentation, der sequentiellen Cofermentation (ohne Wechsel der Gasphase) und auch der separaten biphasischen Fermentation. Es lässt sich somit sagen, dass der zum Acetat verschobene Ethanol/Acetat-Quotient eine deutliche Verringerung der Capronatsynthese bedingt. Eine Möglichkeit, wie diese Problematik umgangen werden kann, wird in den generellen Aspekten der Cofermentation aufgezeigt (siehe auch 4.9). Bei Kultivierungen von *C. carboxidivorans* konnten im Gegensatz zu *C. autoethanogenum* und *C. ljungdahlii* für *C. kluyveri* günstigere Ethanol/Acetat-Quotienten im Produktspektrum detektiert werden. So war in den entsprechenden Einzelkulturkontrollen der simultanen und sequentiellen Cofermentation ein zum Ethanol verschobener Ethanol/Acetat-Quotient festgestellt worden (Abbildung 16, Abbildung 33 und Abbildung 34). Im Falle der separaten biphasischen Fermentation war der Ethanol/Acetat-Quotient aber gegensätzlich zu Acetat verschoben, wie schon zuvor bei der Kultivierung von *C. autoethanogenum* und *C. ljungdahlii*. Hierbei ist anzumerken, dass in diesem Versuch ein generell atypisches Wachstumsverhalten festgestellt wurde. In der simultanen und sequentiellen Cofermentation von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* sollte aufgrund des besseren Ethanol/Acetat-Quotienten mehr Capronat als Butyrat entstehen, was aber nicht der Fall war. Ursächlich dafür ist das Wachstumsverhalten und die damit verbundene Produktbildung von *C. carboxidivorans*, die in zwei Phasen eingeteilt werden. Der anfänglichen acidogenen Phase folgt die solventogene Phase (Fernández-Naveira *et al.*,

2017b). Somit wird zuerst u.a. Acetat gebildet und dann u.a. Ethanol. Da somit zuerst Acetat im Überschuss für *C. kluyveri* vorlag, kam es auch in diesen Cofermentationen zu einer erhöhten Butyratbildung gegenüber Capronat. Durch die metabolische Aktivität von *C. kluyveri* wurde auch zusätzlich die Ethanolkonzentration geringgehalten und zusätzlich Acetat produziert. So nutzt *C. kluyveri* das Ethanol, um durch die Phosphotransacetylase das Intermediat Acetylphosphat zu bilden, welches durch die Acetatkinase unter Generierung von ATP zu Acetat umgewandelt wird (Seedorf *et al.*, 2008). Generell ist festzustellen, dass ein Ethanol/Acetat-Quotient, der am Ende der Kultivierung festgestellt wurde, zwar günstig erschien für eine Capronatsynthese durch *C. kluyveri*, aber es zeigte sich, dass zu Beginn einer Cofermentation oder zum Zeitpunkt der Zugabe von *C. kluyveri* ein ganz anderer und somit für die Capronatsynthese ungünstigerer Ethanol/Acetat-Quotient vorlag. In der separaten biphasischen Fermentation von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* war durchgehend ein zum Acetat verschobener Ethanol/Acetat-Quotient vorhanden. Somit kann auch die vermehrte Bildung von Butyrat erklärt werden. Wie im Falle dieser Cofermentationen ein optimiertes Resultat erreicht werden kann, wird im Kapitel generelle Aspekte der Cofermentation noch aufgeführt (siehe 4.9).

Zusammenfassend ist die Feststellung zu treffen, dass aufgrund der vorhandenen Ethanol- und Acetatkonstellation in allen funktionalen Cofermentationen eine vermehrte Bildung von Butyrat gegenüber Capronat festzustellen war. Dieser Versuch zeigte somit eine der Hauptproblematiken der Cofermentation auf und hat dadurch eine hohe Bedeutung. Die eigentliche Fragestellung, ob die produzierten Konzentrationen genauso zu erwarten waren, lässt sich nur begrenzt beurteilen. Für eine bessere Abschätzung müssten noch weitere Kultivierungen durchgeführt werden, um alle Konstellationen, die in Cofermentationen gefunden wurden, zu untersuchen. Jedoch bilden die durchgeführten Kultivierungen von *C. kluyveri* unter Verwendung verschiedener Ethanol- und Acetatkonzentrationen gute Ansatzpunkte zur Orientierung und helfen dem Verständnis über die Bedingungen der Capronatsynthese.

4.4 Untersuchung des Einflusses von Kohlenmonoxid auf das Wachstum und den Stoffwechsel von *C. kluyveri*

Mittels der Versuche, deren Resultate in 3.4 dargestellt sind, wurden die Auswirkungen der Anwesenheit von Kohlenmonoxid in der Gasphase auf *C. kluyveri* untersucht. Durchgeführt wurden Kultivierungen von *C. kluyveri* unter Verwendung der Gasphasen Kohlenmonoxid, Synthesegas (40 % CO) und N₂/CO₂. Die Auswirkungen der unterschiedlichen Gasphasen auf das Wachstum und Produktspektrum waren sehr deutlich zu erkennen (Abbildung 59, Abbildung 60, Abbildung 61). In allen Kulturen, bei denen sich Kohlenmonoxid in der Gasphase befand, konnte keinerlei Wachstum und Stoffwechselaktivität festgestellt werden. Es war somit ein klares und eindeutiges Ergebnis zu erkennen. Weniger eindeutig war jedoch, ob Kohlenmonoxid toxisch oder lediglich inhibitorisch auf *C. kluyveri* wirkt. Um diese Frage zu beantworten, wurde neues Tanner-Medium „modified“ 2 mit jeweils einer Kultur inokuliert, die zuvor unter den unterschiedlichen Gasphasen kultiviert wurde. Hier war zu erkennen, dass in der Kultur, die mit *C. kluyveri* aus einer Kultur mit der Gasphase Kohlenmonoxid inokuliert wurde, keine Wachstums- und Stoffwechselaktivität mehr festgestellt werden konnte (Tabelle 13). In diesem Falle ist eine toxische Wirkung von Kohlenmonoxid anzunehmen, da davon auszugehen ist, dass in der Kultur, aus welcher inokuliert wurde, alle Bakterienzellen abgetötet wurden und die Bildung von Sporen nicht mehr möglich war. Die Kultur, welche inokuliert wurde mit *C. kluyveri*, welche zuvor unter der Gasphase Synthesegas inkubiert wurde, zeigte in Bezug auf den Verlauf der OD_{600nm} keine Unterschiede zu sonstigen Kultivierungen von *C. kluyveri*. Diese Kultur hatte aber ein Defizit in der Stoffwechselaktivität, da die Capronatkonzentration um mehr als das Doppelte reduziert war. Bezogen auf diese Kultur schien das im Synthesegas vorhandene Kohlenmonoxid nicht ausreichend, um alle Bakterienzellen abzutöten. Der Stoffwechsel und das Produktspektrum wurden jedoch weiterhin negativ beeinflusst. Es ist zu berücksichtigen, dass diese Versuche zur Feststellung der noch vorhandenen Lebensfähigkeit der Bakterienzellen nur in einer Einfachbestimmung durchgeführt wurden. Für genauere Aussagen wären noch weitere Testreihen erforderlich.

Die Gründe, warum Kohlenmonoxid einen toxischen Einfluss auf *C. kluyveri* hat, sind nicht sofort ersichtlich. Es wurden diese Problematik betreffend bisher keine Publikationen

veröffentlicht. Lediglich Diender *et al.* (2016) haben den toxischen Einfluss von Kohlenmonoxid auf *C. kluyveri* festgestellt. In dieser Publikation wurde an einer Cofermentation von *C. autoethanogenum* und *C. kluyveri* gearbeitet. In dieser Publikation wurden aber keine Kultivierungen von *C. kluyveri* unter der Gasphase Kohlenmonoxid gezeigt und es wird auch keine Erklärung oder Referenz aufgezeigt, warum Kohlenmonoxid toxisch ist. Aufschluss oder einen Hinweis geben kann die Publikation von Seedorf *et al.* (2008). Dort ist die Aussage zu finden, dass die [FeFe]-Hydrogenase (HydA) von *C. kluyveri* eine hohe Sequenzähnlichkeit aufweist zu der [FeFe]-Hydrogenase von *C. pasteurianum*. Bei dieser Hydrogenase konnte bereits die Inhibierung durch exogen zugefügtes Kohlenmonoxid mittels der Arbeit an Zellextrakten von *C. pasteurianum* gezeigt werden (Lemon und Peters, 1999). Auch im Falle von *C. acetobutylicum* konnte gezeigt werden, dass Kohlenmonoxid die Hydrogenase inhibiert (Kim *et al.*, 1984). *C. kluyveri* besitzt eine ferredoxinabhängige Hydrogenase, welche für die Bildung von Wasserstoff verantwortlich ist und dabei Ferredoxin in die oxidierte und wieder nutzbare Form überführt (Seedorf *et al.*, 2008). Die Inhibierung der Hydrogenase durch Kohlenmonoxid könnte eventuell in weiteren Versuchen experimentell nachgewiesen werden. Durchzuführen wären Kultivierungen von *C. kluyveri* mit steigenden Kohlenmonoxidanteilen in der Gasphase. Überprüft werden müsste dann, ob mit höheren Kohlenmonoxidanteilen auch weniger Wasserstoff produziert wird. Möglich wäre dieses durch die gaschromatographische Analyse der Gasphase. In der Theorie besteht die Möglichkeit, dass *C. kluyveri* selbst die Toxizität von Kohlenmonoxid verringern könnte. Dafür nötig wäre das Vorhandensein einer Kohlenmonoxid-Dehydrogenase. Dieses Enzym kann Kohlenmonoxid in Kohlendioxid umwandeln. Es wurde in *C. kluyveri* ein Gen annotiert, welches für eine Kohlenmonoxid-Dehydrogenase kodieren könnte (Seedorf *et al.*, 2008), jedoch konnte eine solche Aktivität bisher nicht nachgewiesen werden. Es scheint somit eher unwahrscheinlich, dass wirklich ein solches Enzym vorhanden ist. Das tatsächliche Vorhandensein dieses Enzyms könnte durch den gleichen Versuch wie bereits zuvor beschrieben experimentell überprüft werden. Somit sollte bei Kultivierungen von *C. kluyveri* bei steigendem Kohlenmonoxidanteil in der Gasphase die vermehrte Bildung von Kohlendioxid nachgewiesen werden.

Auch wenn die genaue physiologische Auswirkung von Kohlenmonoxid unklar bleibt, ist dennoch der Nachweis des negativen Einflusses auf die Kultivierungen von *C. kluyveri* erbracht worden. Somit wäre die Nutzung von Synthesegas in den Cofermentationen absolut nicht in Betracht zu ziehen bzw. nicht möglich, da bereits der Anteil von 40 % Kohlenmonoxid alle Aktivität von *C. kluyveri* inhibieren würde. Dennoch wurden einige erfolgreiche Cofermentationen unter der Verwendung von Synthesegas und der gleichzeitigen Anwesenheit von *C. kluyveri* erreicht. Möglich gemacht wurde dies durch die Anwesenheit der acetogenen Bakterien und deren Eigenschaften. So wandeln die acetogenen Bakterien das für *C. kluyveri* toxische Kohlenmonoxid in das unschädliche Kohlendioxid um. Aufgrund der funktionalen Cofermentationen ist davon auszugehen, dass diese Umwandlung immer schnell genug stattfand, um große toxische Auswirkungen auf *C. kluyveri* zu vermeiden. Zu einer ähnlichen Schlussfolgerung kamen auch schon Diender *et al.* (2016) bei Cofermentationen mit *C. autoethanogenum* und *C. kluyveri*. Selbst die wöchentliche Auffrischung des Synthesegases in dieser Arbeit konnte die Capronatsynthese durch *C. kluyveri* nicht blockieren. Nichtsdestotrotz ist von negativen Auswirkungen des Kohlenmonoxid (d.h. geringere Produktmengen) in den Cofermentationen aufgrund der Ergebnisse des in dieser Arbeit durchgeführten Versuchs auszugehen. Abschließend ist zu sagen, dass die Methodik einer separaten biphasischen Fermentation die in diesem Falle beste Lösung darstellt. In der separaten biphasischen Fermentation können alle genutzten Organismen unter den für sie optimalen Gasphasen inkubiert werden und somit ein negativer Effekt von Kohlenmonoxid auf *C. kluyveri* vermieden werden. Weitere Anmerkungen dazu sind in generelle Aspekte der Cofermentation zu finden (siehe auch 4.9).

4.5 Untersuchung der Fähigkeit von *C. carboxidivorans* und *C. ljungdahlii* zur Umwandlung von Butyrat und Capronat in die entsprechenden Alkohole

Wie bereits in 3.5 mit der zugrunde liegenden Theorie dargestellt besitzen sowohl *C. carboxidivorans* als auch *C. ljungdahlii* die Fähigkeit, u.a. Butyrat und Capronat in die entsprechenden Alkohole Butanol und Hexanol umzuwandeln. In dieser Arbeit wurde diese Umwandlung mittels Kultivierung von *C. carboxidivorans* und *C. ljungdahlii* in Tanner-Medium „modified“ untersucht, zu denen Butyrat oder Capronat zugegeben wurde. Begonnen wurde mit Kultivierungen von *C. carboxidivorans*. Hauptaugenmerk lag bei diesem Versuch auf der Analyse der Produktpaare Butyrat/Butanol (Abbildung 65) und Capronat/Hexanol (Abbildung 66). Es war deutlich ersichtlich, dass in Kulturen, denen Butyrat zugegeben wurde, auch mehr Butanol gebildet wurde als in anderen Kulturen. Bei Betrachtung des Konzentrationsverlaufs der repräsentativen Kultur (Abbildung 65 A und B) lässt sich das beständige Absinken der Butyratkonzentration bei gleichzeitig steigender Butanolkonzentration erkennen. Es ist somit von einer eindeutigen Korrelation der beiden Substanzen auszugehen. Die gleiche Situation zeigte sich bei der Zugabe von Capronat in die Kulturen. Capronat sank im Verlauf der repräsentativen Kultur immer weiter ab und Hexanol stieg dazu passend immer weiter an (Abbildung 66 A und B). Hexanol war in diesem Fall nur in Kulturen mit Zugabe von Capronat nachweisbar (Abbildung 66 C und D). *C. carboxidivorans* kann alle die genannten Substanzen auf zwei Wegen (anstelle durch Umwandlung auch über Alkoholdehydrogenasen ausgehend von dem entsprechenden Acyl-CoA; Fernández-Naveira *et al.*, 2017a) auch nativ bilden, womit in der Theorie auch eine unabhängig voneinander stattfindende Produktion möglich wäre. Aufgrund der Korrelation zwischen Absinken der Fettsäurenkonzentrationen bei gleichzeitigem Ansteigen der Alkoholkonzentrationen ist davon auszugehen, dass in diesem Versuch überwiegend eine Umwandlung stattfindet. Diese Umwandlung ist Teil eines in *C. carboxidivorans* bereits beschriebenen Mechanismus, der in der Einteilung des Wachstums in acidogene und solventogene Phase begründet ist. Durch die Bildung der Alkohole, zum Teil auch auf Kosten der Fettsäuren, soll eine weitere Ansäuerung der Umgebung verhindert und somit weiteres Wachstum ermöglicht werden (Fernández-Naveira *et al.*, 2017b).

In den Versuchen mit *C. ljungdahlii* war ebenfalls eine Umwandlung der Fettsäuren zu erkennen. In diesem Falle gestaltete sich die Situation etwas klarer, da *C. ljungdahlii* keine dieser Substanzen auf natürlichem Weg bilden kann. Es waren eindeutige Umwandlungen bzw. Korrelationen zu erkennen, da Butanol nur bei Zugabe von Butyrat ins Medium entstanden ist. Hexanol hingegen entstand nur bei Zugabe von Capronat ins Medium (Abbildung 69; Abbildung 70). In den repräsentativen Kulturen war wiederum ersichtlich, wie die Fettsäuren über die Zeit der Kultivierung abnahmen und dabei die Alkohole immer mehr anstiegen.

Nun zur Bedeutung dieser Resultate für die durchgeführten Cofermentationen. Zum einen lässt sich damit erklären, warum in Cofermentationen mit *C. ljungdahlii* und *C. kluyveri* Butanol und Hexanol produziert wurden, auch wenn unter diesen Bedingungen kein Stamm allein die jeweiligen Alkohole produzieren konnte. Viel wichtiger ist aber die Erkenntnis, dass die Capronatkonzentrationen in den Cofermentationen höher seien könnten und wohl auch wären, wenn nicht ein Teil des von *C. kluyveri* synthetisierten Capronats in Hexanol durch das acetogene Bakterium umgewandelt werden würde. Die Umwandlung des Butyrats in Butanol sollte für die Capronatsynthese keine direkten Auswirkungen haben, da es ein Endprodukt im Rahmen der Capronatsynthese ist. Nur das Entziehen von Butyryl-CoA hätte Konsequenzen für die Capronatsynthese, da es Ausgangssubstanz für den zweiten Teil der Capronatsynthese ist (Abbildung 2).

Problematisch ist die Umwandlung der Fettsäuren für die simultanen und sequentiellen Cofermentationen, da sich dort ab einem bestimmten Zeitpunkt immer beide Organismen gleichzeitig in den Kulturen befinden und somit auch die Produkte Butyrat und Capronat durch acetogene Bakterien umgewandelt werden. Im Falle einer gewünschten Butanol- und Hexanolsynthese wäre diese Umwandlung sogar ein Vorteil, aber in dieser Arbeit lag der Hauptfokus auf der Capronatsynthese. Lösungsansatz für die Problematik der geminderten Capronatproduktion ist die Durchführung von separaten biphasischen Fermentationen, da es somit zu keiner Interaktion zwischen beiden Organismen kommt, welche die möglichen Produktkonzentrationen reduzieren könnte. Weitere Anmerkungen zur Optimierung der Cofermentation sind auch in generelle Aspekte zur Cofermentation zu finden (siehe 4.9).

In Abbildung 82 ist in einer schematischen Darstellung zu sehen, wie der Stoffwechsel der acetogenen Bakterien und der Stoffwechsel von *C. kluyveri* miteinander in Wechselwirkung treten bei Anwesenheit beider Organismen in einer Cofermentationskultur. Ausgehend von Synthesegas werden Ethanol und Acetat durch

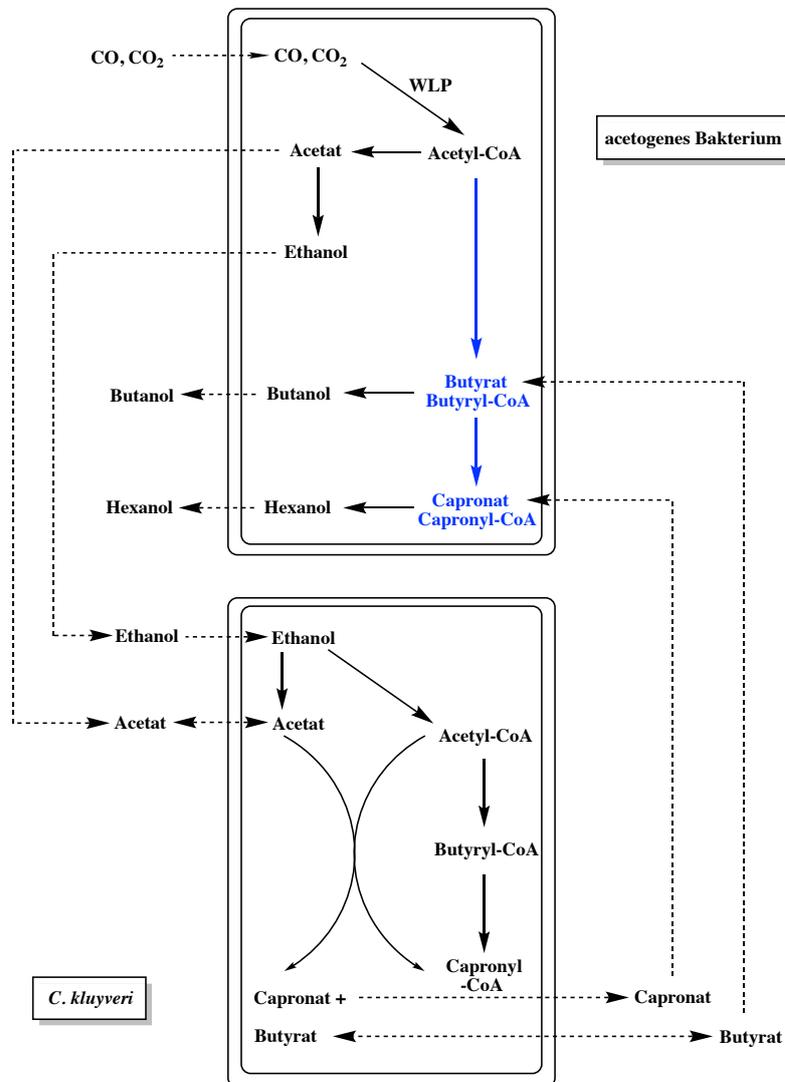


Abbildung 82: Schematische Darstellung der metabolischen Wechselwirkungen zwischen acetogenem Bakterium und *C. kluyveri* in einer Cofermentation. Für eine bessere Übersichtlichkeit ohne Nennung der entsprechenden Enzyme sowie mit verkürzter Darstellung der Stoffwechselwege. Ebenfalls zur Vereinfachung nicht dargestellt sind die Bildung von H_2 durch *C. kluyveri* und die Nutzung von H_2 durch die acetogenen Bakterien. Blau gekennzeichnete Substanzen werden im Rahmen der in dieser Arbeit genutzten acetogenen Bakterien nur von *C. carboxidivorans* gebildet. Für eine genaue Darstellung der einzelnen Synthesewege siehe Abbildung 1 und Abbildung 2.

das acetogene Bakterium produziert. Diese dienen als Substrate für die Butyrat- und Capronatsynthese durch *C. kluyveri*. Aus Butyrat und Capronat können wiederum, wie gerade dargestellt, Butanol und Hexanol durch das acetogene Bakterium gebildet werden. Somit kommt es in den Cofermentationskulturen zu einer Mischung aus Acetat, Ethanol, Butyrat, Butanol, Capronat und Hexanol.

4.6 Untersuchung des Einflusses des pH-Wertes auf das Wachstum und das Produktspektrum bei Kultivierung von *C. kluyveri*

Zur Untersuchung des Einflusses des pH-Wertes auf *C. kluyveri* wurden Kultivierungen in Tanner-Medium „modified“ 2 (in Doppelbestimmung) mit pH-Werten von 5 bis 7 durchgeführt. Mittels dieser Versuche konnte festgestellt werden, dass die höchste OD_{600nm} von *C. kluyveri* bei einem initialen pH-Wert von 6,7 und die höchsten Capronatkonzentrationen bei initialen pH-Werten von 6,4 und 6,7 erreicht wurden (Tabelle 15). Dieser Befund deckt sich mit dem von Barker und Taha (1942) beschriebenen pH-Optimum von *C. kluyveri* von 6,8. Die von den Autoren beschriebene tolerierbare Bandbreite von pH-Werten von 6,0 bis 7,5 für *C. kluyveri* deckt sich nicht komplett mit den in dieser Arbeit ermittelten Werten. Höhere Werte als 7,0 wurden nicht getestet. Somit lässt sich über diesen Bereich keine Aussage treffen. In dieser Arbeit wurden auch Kultivierungen von *C. kluyveri* mit pH-Werten kleiner als 6,0 durchgeführt. Bis zu einem initialen pH-Wert von 5,6 konnten noch Wachstum und metabolische Aktivität festgestellt werden. Eine deutlich höhere tolerierbare Bandbreite an pH-Werten wurde auch bei Kultivierungen von *C. kluyveri* 3231B beschrieben (Weimer und Stevenson, 2012). In dieser Publikation konnte ein Wachstum von *C. kluyveri* bei pH-Werten von 4,9 bis 9,2 nachgewiesen werden.

Entscheidend für die vorliegende Arbeit ist der zuvor beschriebene pH-Wert von 5,6. Bei diesem pH-Wert konnte nur noch in einer der zwei Kultivierungen Wachstum und metabolische Aktivität festgestellt werden. Bei niedrigeren Werten, ab pH 5,3, wurde kein Wachstum und keine metabolische Aktivität mehr festgestellt. Somit ist in dieser Arbeit und dem genutzten Medium ein pH-Wert von ca. 5,3 - 5,6 der gerade noch tolerierbare pH-Wert für Kultivierungen von *C. kluyveri*. Wenn der tolerierbare Bereich wie von Barker und Taha (1942) beschrieben nur bis 6,0 reichen würde, hätte dieses ein großes Problem

für die Cofermentationen dargestellt. Der initiale pH-Wert des in dieser Arbeit genutzten Tanner-Medium „modified“ lag bei 6,1. Aufgrund der Säurebildung durch die acetogenen Bakterien fiel dieser pH-Wert bereits nach relativ kurzer Zeit, trotz Verzögerung durch die pH-Pufferung des Mediums, auf pH-Werte unter 6. Somit wäre *C. kluyveri* in keiner der simultanen und sequentiellen Cofermentationen in der Lage gewesen, noch metabolisch aktiv zu sein. Die Tatsache, dass in diesen Cofermentationen dennoch eine Capronatbildung stattgefunden hat, spricht ebenfalls für eine erweiterte tolerierbare Bandbreite an pH-Werten.

Im Folgenden werden funktionale simultane und sequentielle Cofermentationen in Bezug auf die pH-Werte genauer betrachtet. In der simultanen Cofermentation von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* begann die Capronatsynthese nach 188 h Kultivierung (Abbildung 16). Zu diesem Zeitpunkt war in der repräsentativen Kultur ein pH-Wert von ca. 5,6 vorzufinden, welcher bis zur Stagnation der Capronatsynthese bei 403 h auf 5,2 absank (Abbildung 14). In einer weiteren Cofermentationskultur dieses simultanen Ansatzes war dieselbe Konstellation zu erkennen (Absinken von pH 5,7 nach 188 h auf pH 5,4 nach 403 h). Diese Ergebnisse sprechen für die Resultate weiter oben, dass der noch tolerierbare Schwellenwert des pH-Werts sich zwischen 5,3 und 5,6 befindet (vermutlich bei einem pH-Wert von ca. 5,4). Bei den Versuchen zur Untersuchung des Einflusses des pH-Wertes ist zu beachten, dass zwischen einem pH-Wert von 5,3 und 5,6 keine weiteren Kultivierungen unternommen wurden. Solche Versuche sollten durchgeführt werden, um den genauen Schwellenwert des pH-Werts für noch mögliches Wachstum und Capronatsynthese zu identifizieren. In der simultanen Cofermentation von *C. ljungdahlii* und *C. kluyveri* konnte der pH-Wert weniger Einfluss auf die Capronatsynthese ausüben. In diesen Cofermentationen war bereits nach 167 h eine deutliche Capronatsynthese nachweisbar, welche ab 354 h stagnierte (Abbildung 20). Nach 167 h lag der pH-Wert noch bei 5,7 und zum Zeitpunkt der Stagnation lag er noch bei 5,3 (Abbildung 18). Die Tatsache, dass in dieser Cofermentation ein längerer Zeitraum für die Capronatsynthese vorhanden war, erklärt auch, dass hier mehr Capronat gebildet werden konnte als im Cofermentationsansatz mit *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri*. Des Weiteren bestätigt die simultane Cofermentation von *C. ljungdahlii* und *C. kluyveri*, dass der Schwellenwert der

Capronatsynthese zwischen 5,7 und 5,3 liegen muss, da ab dem niedrigeren pH-Wert eine Stagnation der Konzentration stattfand.

In der sequentiellen Cofermentation (ohne Wechsel der Gasphase) von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* kam es zu keiner Beendigung der Capronatsynthese durch den pH-Wert. In allen Cofermentationskulturen sank der pH-Wert nicht weiter ab als auf 5,7 und lag somit deutlich über dem vermuteten Schwellenwert (Abbildung 32). Der Befund, dass der pH-Wert nicht weiter absank, lässt sich durch die niedrig gebliebenen Acetatkonzentrationen erklären. Acetat wie auch andere Fettsäuren wurden zum Teil in die entsprechenden Alkohole umgewandelt, was ein weiteres Ansäuern des Mediums unterband.

Im Gegensatz dazu hatte der pH-Wert einen sehr großen Einfluss auf die sequentielle Cofermentation von *C. ljungdahlii* und *C. kluyveri*. So war in dem über die Dauer der Kultivierung abgesunkenen pH-Wert die Ursache zu finden, dass bei dieser Cofermentation nur eine der drei Cofermentationskulturen eine Capronatsynthese zeigte (Abbildung 38). Zum Zeitpunkt 330 h begann in der funktionalen Cofermentationskultur die Capronatsynthese bei einem pH-Wert von 6,0 (Abbildung 36). Zu diesem Zeitpunkt lag der pH-Wert in den zwei anderen Kulturen bereits bei 5,3 – 5,4.

In den simultanen und sequentiellen Cofermentationen zeigte sich, dass das Absinken des pH-Wertes im Laufe der Kultivierung acetogener Bakterien problematisch für eine Capronatsynthese durch *C. kluyveri* ist. Damit eine Capronatsynthese noch möglich ist, muss immer eine ausreichende Kultivierungsdauer bei einem pH-Wert, der für *C. kluyveri* noch nicht zu weit abgesunken ist, vorhanden sein. Somit kann, wie im Falle der sequentiellen Cofermentation von *C. ljungdahlii* und *C. kluyveri*, nicht immer eine erfolgreiche Cofermentation garantiert werden. Für weitere Arbeiten an simultanen und sequentiellen Cofermentationen sollte daran gearbeitet werden, die pH-Werte mittels kontinuierlicher und automatischer Messung und Regulation über dem Schwellenwert von 5,3 – 5,4 konstant zu halten. Ebenfalls interessant wären Cofermentationen mit höheren initialen pH-Werten, um somit *C. kluyveri* einen längeren Zeitraum für die Capronatsynthese zu ermöglichen. Als Voraussetzung dafür müssten jedoch zuerst die Auswirkungen höherer initialer pH-Werte auf die Kultivierung der acetogenen Bakterien überprüft werden, da deren pH-Optima sich im Bereich von 6,0-6,2 befinden.

Der Ansatz der separaten biphasischen Fermentationen erscheint von allen Cofermentationen am sinnvollsten, da hier diese Problematik nicht nur umgangen werden kann, sondern auch die Möglichkeit besteht, alle Stämme unter den jeweils optimalen Bedingungen, u.a. auch dem pH-Wert, zu kultivieren. Auf Aspekte diese Thematik betreffend wird noch in generelle Aspekte der Cofermentation (siehe auch 4.9) eingegangen.

4.7 Untersuchung der Auswirkung der Verschleppung von Ethanol und Acetat aus Vorkulturen von *C. kluyveri* bei Inokulation neuer Kulturen

In dieser Arbeit konnte mittels Wachstumsversuchen bestimmt werden, welche Mengen an Ethanol und Acetat durch die in dieser Arbeit genutzten *C. kluyveri*-Vorkulturen bei Inokulation in neue Kulturen eingebracht bzw. verschleppt werden. Ebenfalls festgestellt wurde, dass allein aufgrund dieser Verschleppung geringe Konzentrationen an Capronat gebildet werden können (Tabelle 16). Im Falle der Inokulation mit Vorkulturen, welche eine initiale Substratkonzentration von 500 mM Ethanol und 100 mM Acetat aufwiesen, konnte allein aufgrund der verschleppten Mengen eine Capronatkonzentration von 2,9 mM gebildet werden. Eingebracht in die neuen Kulturen wurden 9,0 mM Ethanol und 1,3 mM Acetat. Das Inokulationsvolumen lag bei 1:50 (z.B: 1 ml der Vorkultur in 50 ml Medium). Somit erfolgte auch eine Verdünnung der Konzentrationen um den Faktor 1:50. Rein rechnerisch müssten die eingebrachten Konzentrationen somit 10,0 mM Ethanol und 2,0 mM Acetat betragen. Die Tatsache, dass die verschleppten Mengen etwas niedrig ausfielen, lag daran, dass mittels Vorkulturen inokuliert wurde, die sich bereits in der stationären Wachstumsphase befanden. Somit lagen die Substratkonzentrationen bereits in niedrigerer Konzentration in den Vorkulturen vor. Die ausgehend von verschleppten Substraten produzierte Capronatkonzentration ist nicht unerheblich. Eine Produktion von Capronat sollte auf dem Substrat Synthesegas mit dem ausgehend davon produzierten Ethanol und Acetat basieren und nicht auf Substraten aus den Vorkulturen. Vorkulturen mit solch hohen Substratkonzentrationen wurden in dieser Arbeit nur bei der simultanen Cofermentation (3.2) und der sequentiellen Cofermentation (mit Wechsel der Gasphase; 3.2.2) verwendet. Die in den funktionalen simultanen Cofermentationen detektierten Capronatkonzentrationen lagen über den Konzentrationen, die durch Verschleppung der

Substrate gebildet werden können. Somit ist von einer Capronatsynthese auszugehen, die vorwiegend auf Ethanol und Acetat basiert, das aus Synthesegas gebildet wurde. Jedoch ist keinesfalls auszuschließen, dass einem Teil der Capronatsynthese die verschleppten Substratkonzentrationen zugrunde liegen. Ziel dieser Arbeit war aber zuerst ein generelles Aufzeigen der Funktionalität einer Cofermentation, in welcher Capronat ausgehend von Synthesegas gebildet werden kann. Diese Tatsache konnte bereits mit der simultanen Cofermentation nachgewiesen werden. Bei Betrachtung der simultanen Cofermentation von *C. autoethanogenum* und *C. kluyveri* fällt auf, dass diese eingeschleppten Mengen an Ethanol und Acetat nicht zwangsläufig auch eine Capronatproduktion bewirkten. Hier wurden Vorkulturen mit denselben Konzentrationen wie in den anderen simultanen Cofermentationen verwendet. Dennoch kam es zu keiner Capronatsynthese, da kein Anstieg der Capronatkonzentration festgestellt werden konnte. Dies lässt die Vermutung zu, dass die im Rahmen einer Cofermentation eingebrachten Mengen an Ethanol und Acetat allein keinen Einfluss auf die Funktionalität einer Cofermentation haben. Dies legt nahe, dass die niedrigen Substratkonzentrationen nur für ein alleiniges Wachstum von *C. kluyveri* ausreichen, jedoch im Falle einer Cofermentation und der damit vorhandenen Anwesenheit der acetogenen Bakterien diese Stressfaktoren kein Wachstum und keine metabolische Aktivität von *C. kluyveri* mehr erlauben. Da aber dennoch die Problematik erkannt wurde, dass nicht zu vernachlässigende Mengen an Ethanol und Acetat eingeschleppt werden, wurden in den weiteren Cofermentationen Vorkulturen mit geringeren initialen Substratkonzentrationen verwendet. Diese *C. kluyveri*-Vorkulturen enthielten zu Beginn nur 100 mM und 20 mM Acetat. Da weiterhin mit demselben Inokulationsvolumen (1:50) gearbeitet wurde, ergibt sich daraus rein rechnerisch eine eingeschleppte Konzentration von 2,0 mM Ethanol und 0,4 mM Acetat. Diese Konzentrationen sollten jedoch noch etwas geringer sein, da aus stationären Vorkulturen inokuliert wurde (siehe weiter oben). In den Versuchen zur Untersuchung des Einflusses der Verschleppung ergab sich in diesem Falle experimentell eine deutlich höhere eingebrachte Konzentration von 5,4 mM Ethanol und 0,9 mM Acetat bei Nutzung dieser Vorkulturen. Da keine andere Erklärung möglich ist, muss davon ausgegangen werden, dass bereits in den Vorkulturen höhere Ausgangskonzentrationen an Substraten vorlagen. Es ist anzunehmen, dass die

Konzentrationen in den Vorkulturen mehr als doppelt so hoch bei ca. 250 mM Ethanol und 50 mM Ethanol vorlagen. Eine Messung der Konzentrationen in den Vorkulturen wurde nicht vorgenommen. Diese Annahme bestätigt sich rein rechnerisch, da bei Vorkulturen mit 250 mM Ethanol und 50 mM Acetat, sowie einem Inokulationsvolumen von 1:50 sich ein Wert von 5 mM Ethanol und 1 mM Acetat ergeben müsste. Trotz der eventuell unterschiedlich vorliegenden Konzentration in der Vorkultur können hier Schlussfolgerungen gezogen werden. Ungeachtet der Inokulation mit einer Vorkultur, die zu hohe Substratkonzentrationen hatte, konnten hier lediglich 1,6 mM Capronat detektiert werden. Im Falle der Nutzung von Vorkulturen mit der korrekten Konzentration ist diese Capronatkonzentration noch niedriger zu erwarten, was auch in einem anderen Versuch dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Im Rahmen der Versuche zur Untersuchung unterschiedlicher Substratkonzentrationen auf das Wachstum und das Produktspektrum von *C. kluyveri* (3.3) wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, die ebenfalls darstellt, was im Rahmen dieses Versuches gezeigt werden sollte. Für diese Negativkontrolle wurde Nährmedium inokuliert, welches kein Ethanol und kein Acetat enthielt, mit einer Vorkultur, welche 100 mM Ethanol und 20 mM Acetat enthielt. Eingebracht wurden in diese Kultur 1,6 mM Ethanol und 0,5 mM Acetat. Diese Werte entsprechen auch der theoretischen Rechnung. Obwohl hier deutlich weniger Substrat übertragen wurde, war die finale Capronatkonzentration mit 1,3 mM nur etwas niedriger als im Falle der Vorkulturen mit den inkorrekten höheren Konzentrationen. Vorkulturen mit 100 mM Ethanol und 20 mM wurden, wie bereits erwähnt, bei allen Cofermentationen außer der simultanen Cofermentation und sequentiellen Cofermentation (mit Wechsel der Gasphase) genutzt. In allen funktionalen und positiven sequentiellen (ohne Wechsel der Gasphase) und separaten biphasischen Fermentationen war die Capronatkonzentration deutlich höher als 1,3 mM bzw. 1,6 mM. Somit ist auch in diesen Fällen wiederum davon auszugehen, dass der Großteil des Capronats aus Ethanol und Acetat gebildet wurde, welches ausgehend von Synthesegas produziert wurde. Wie bereits zuvor beschrieben führt auch hier nicht die Verschleppung von Ethanol und Acetat in Cofermentationskulturen zwangsläufig zu einer Capronatsynthese. So kam es auch zu einigen sequentiellen Cofermentationen (mit und ohne Wechsel der Gasphase), in denen keine Capronatsynthese festgestellt wurde. Die Erklärung dafür liegt bei den sich

summierenden Stressfaktoren im Falle der simultanen Cofermentation wie zuvor beschrieben.

In *C. kluyveri*-Vorkulturen befand sich neben Ethanol und Acetat auch Capronat, welches im Laufe der Kultivierung nativ gebildet wurde. Auch Capronat wurde mittels Inokulation aus solchen Vorkulturen zum Teil in neue Kulturen verschleppt. Dafür gilt es abzuschätzen, wieviel Capronat sich in den unterschiedlichen Vorkulturen befinden kann. In den simultanen Cofermentationen wurde *C. kluyveri* in Tanner-Medium „modified“ 2 mit 500 mM Ethanol und 100 mM Acetat kultiviert. Diese Kulturen dienten in diesen Cofermentationen als Positivkontrolle. Detektiert wurden in diesen Kulturen Capronatkonzentrationen von 40 – 50 mM. Eine Kultivierung von *C. kluyveri* in Tanner-Medium „modified“ 2 mit 250 mM Ethanol und 50 mM Acetat erbrachte in etwa dieselbe Konzentration mit ca. 46 mM (Tabelle 12). In den separaten Cofermentationen und im Versuch zur Untersuchung des Einflusses von Kohlenmonoxid wurde *C. kluyveri* als Positivkontrolle in Tanner-Medium „modified“ 2 mit den niedrigeren Konzentrationen an Ethanol (100 mM) und Acetat (20 mM) kultiviert. Nachgewiesen werden konnten in diesen Kulturen ca. 30 mM Capronat. Wenn wie bereits zuvor ein Inokulationsvolumen von 1:50 für die Inokulation neuer Kulturen genutzt wird, ergibt sich mit derselben Rechnung wie zuvor, je nach genutzter Vorkultur, eine verschleppte Capronatkonzentration von 0,6 – 1 mM. Zu erkennen war dies auch in den Cofermentationskulturen, da ein Anstieg der Capronatkonzentration bei Zugabe von *C. kluyveri* erfolgte. Somit wurde, um eine Capronatproduktion zu beurteilen überprüft, ob ausgehend von diesem Zeitpunkt die Capronatkonzentration anstieg. Für die Gesamtbeurteilung der Thematik ist aber zu beachten, dass die Verschleppung von Capronsäure indirekt auch beim Versuch zur Untersuchung der Verschleppung von Ethanol und Acetat stattfand. Somit sind in den detektierten finalen Konzentrationen an Capronat bereits auch diese verschleppten Konzentrationen inbegriffen und auch berücksichtigt. Damit sind die detektierten Capronatkonzentrationen die Summe aus Capronat, welches verschleppt wurde, und Capronat, welches aus verschlepptem Ethanol und Acetat gebildet wurde.

Abschließend ist zu sagen, dass in allen funktionalen Cofermentationen die erreichten Capronatkonzentrationen deutlich höher waren als die Capronatkonzentrationen, welche

durch die jeweilige Verschleppung von Substraten und Capronat aus Vorkulturen erreicht werden können. Wie bereits zuvor dargestellt, war die Verschleppung von Ethanol und Acetat in Cofermentationskulturen auch kein Garant für eine Capronatsynthese, da auch hier mehrere Cofermentationen durchgeführt wurden, in denen keine Capronatsynthese erreicht werden konnte. Dennoch sollten die Konzentrationen in den Vorkulturen deutlich weiter verringert werden, da es sonst schwer zu beurteilen ist, wieviel Capronat wirklich auf der Basis von Synthesegas entstanden ist. In den Versuchen von 3.3 konnte gezeigt werden, dass auch deutlich geringere Substratkonzentrationen für die Kultivierung von *C. kluyveri* ausreichen. Alternativ und sinnvoll wäre es, die Methodik abzuändern, um das Problem der Verschleppung komplett zu umgehen. Anmerkungen dazu sind in generelle Aspekte zur Cofermentation zu finden (4.9).

4.8 Elektronenmikroskopische Betrachtung von simultanen Cofermentationen

Repräsentativ für alle durchgeführten Cofermentationen wurden simultane Cofermentationen gewählt, um mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen, die einzelnen Organismen visuell zu identifizieren und nachzuweisen. Ebenfalls wurden die Cofermentationskulturen auf gegebenenfalls vorhandene morphologische Auffälligkeiten untersucht. Als Referenz und um somit die Identifikation in den Cofermentationskulturen zu ermöglichen, wurden alle Bakterienarten auch einzeln kultiviert und betrachtet. Die Cofermentationskulturen sollten funktional sein, was mit der Detektion von Capronat nach 337 h Inkubation nachgewiesen wurde (Abbildung 76). In der Cofermentationskultur mit *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* wurden zu diesem Zeitpunkt 1,7 mM Capronat und in der Cofermentationskultur mit *C. ljungdahlii* und *C. kluyveri* 2,5 mM Capronat nachgewiesen. Im Falle der Cofermentationskultur mit *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* war dieser Wert noch relativ gering und nur knapp über der Konzentration, welche allein aufgrund einer Verschleppung entstehen könnte (4.7). Die finale Probennahme und die sich daraus anschließende Präparation der Zellen für die Elektronenmikroskopie erfolgten im Vergleich zu der Kultivierungsdauer anderer Cofermentationskulturen nach 337 h bereits sehr früh. Eine längere Kultivierungsdauer wurde vermieden, um alle beteiligten Bakterienarten in guter physiologischer Form vorzufinden, d.h. eine Lyse der Mehrheit der Zellen sollte noch nicht stattgefunden haben. Es ist zu erwarten, dass die

Capronatkonzentrationen mit längerer Kultivierungsdauer weiter ansteigen würden. Im Vergleich zur der im Beginn dieser Arbeit durchgeführten simultanen Cofermentation von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* (Abbildung 16) zeigte sich, dass im Falle dieser Organismen die Capronatsynthese erst verzögert nach 333 h Inkubation stattfinden konnte. Eine Funktionalität der für die Erstellung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen verwendeten Cofermentationskulturen ist somit erbracht.

Im Folgenden werden nun zuerst die elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Bakterienzellen diskutiert, die von Kulturen erstellt wurden, in denen die genutzten Bakterienarten jeweils einzeln kultiviert wurden. Bei den Aufnahmen von Bakterienzellen, welche aus einer *C. carboxidivorans*-Kultur stammten, waren stäbchenförmige Bakterien mit einem Durchmesser von ca. 0,6-0,9 μm und einer Länge von ca. 8-9 μm zu sehen (Abbildung 77). Auffällig waren die glatten Oberflächen der Bakterienzellen. In der Erstbeschreibung von *C. carboxidivorans* wurden ebenfalls stäbchenförmige Bakterien beschrieben, jedoch mit einer Breite von 0,5 μm und einer Länge von 3 μm (Liou *et al.*, 2005). Die hier beobachteten Bakterienzellen waren somit um den Faktor 2-3 länger als in der Erstbeschreibung. In einer Publikation von Fernández-Naveira *et al.* (2017a) wurden ebenfalls rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *C. carboxidivorans* angefertigt. In dieser Publikation wurde hauptsächlich die Beschreibung der Morphologie auf die Erstbeschreibung bezogen, dennoch zeigten sich auch hier zum Teil Zellen, die deutlich länger als 3 μm waren. Somit scheint *C. carboxidivorans* unter bestimmten Bedingungen verlängerte Zellformen auszubilden. Weitere Publikationen, in denen *C. carboxidivorans* mit dem Elektronenmikroskop genauer betrachtet wurden, sind aktuell nicht zu finden. Übereinstimmend mit den Aufnahmen dieser Arbeit waren bei Fernández-Naveira *et al.* (2017a) ebenfalls die glatten Oberflächen der Bakterienzellen zu erkennen.

Im Falle der Aufnahmen von Bakterienzellen, welche aus einer *C. ljungdahlii*-Kultur stammten, waren ebenfalls stäbchenförmige Bakterien mit einem Durchmesser von ca. 0,5-0,6 μm und einer Länge von ca. 3-4 μm zu sehen (Abbildung 78). Auch diese Bakterienzellen zeichneten sich durch eine glatte Oberfläche aus. Die festgestellten Abmessungen und die Morphologie in dieser Arbeit stimmen mit den Angaben der Erstbeschreibung von *C. ljungdahlii* überein (Tanner *et al.*, 1993). In dieser Publikation

wurden ebenfalls stäbchenförmige Bakterien mit einer Länge von 2-3 μm und einem Durchmesser von 0,6 μm beschrieben.

Im Gegensatz zu den weiter oben beschriebenen Bakterienzellen hatten die Bakterienzellen, welche aus einer *C. kluyveri*-Kultur stammten, eine deutlich rauere und unebenere Oberflächenstruktur (Abbildung 79). In einer Publikation von Barker und Taha (1942) wurde *C. kluyveri* als stäbchenförmiges Bakterium mit einem Durchmesser von 0,9-1,1 μm und einer hohen Bandbreite in Sachen Länge von 3-11 μm beschrieben. In dieser Arbeit konnten für *C. kluyveri* ein Durchmesser von ca. 0,6 μm sowie eine Länge von 5-6 μm beobachtet werden. Somit sind diese Werte lediglich in Bezug auf den Durchmesser etwas abweichend. Die festgestellte Länge befand sich in der Bandbreite, welche von den oben genannten Autoren festgestellt wurde. Weitere und vor allem aktuelle Vergleichsquellen, die genauer auf die Morphologie dieses *C. kluyveri*-Stammes eingehen oder gar ebenfalls elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, sind nicht zu finden.

In den Aufnahmen von Bakterienzellen aus Einzelkulturen waren im Falle von *C. carboxidivorans* und *C. ljungdahlii* Zellen zu sehen, die sich gerade im Status der Zellteilung befanden. Somit ist davon auszugehen, dass zum Zeitpunkt der Probennahme die Bakterienzellen dieser Kulturen noch vital waren und weiteres Wachstum stattgefunden hat. Die Bakterienzellen, welche der *C. kluyveri*-Kultur entstammen, zeigten zum Teil schon Anzeichen von Lyse. Es ist zu beachten, dass die *C. kluyveri*-Kultur bis zum Zeitpunkt der Probennahme bereits 337 h kultiviert wurde. Nach dieser Kultivierungsdauer konnte bereits bei allen bisherigen Wachstumsversuchen mit *C. kluyveri* in Rahmen der Bestimmung der $\text{OD}_{600\text{nm}}$ eine Lyse der Zellen beobachtet werden. Die Betrachtung mit dem Elektronenmikroskop bestätigte diesen Befund somit auch visuell.

In der Betrachtung von Bakterienzellen, welche aus der funktionalen Cofermentationskultur mit *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* stammten, waren zwei unterschiedliche Morphologien erkennbar. Zum einen waren stäbchenförmige Bakterienzellen mit glatter Oberfläche und einem Durchmesser von ca. 0,8-0,9 μm sowie einer Länge von ca. 7-9 μm zu erkennen. Diese Eigenschaften passen zu denen von *C. carboxidivorans*. Es ist daher davon auszugehen, dass es sich bei dem betrachteten Organismus um diese Art handelt. Die anderen Bakterienzellen, die zu sehen waren,

zeigten ebenfalls eine stäbchenförmige Gestalt. Die Oberfläche der Organismen erschien aber deutlich rauer. Der Durchmesser betrug ca. 0,7-0,8 μm und die Länge ca. 5 μm . Diese Eigenschaften passen wiederum zu den zuvor beschriebenen aus einer *C. kluyveri*-Kultur. Bei den Aufnahmen von Bakterienzellen, welche aus der zweiten funktionalen Cofermentationskultur in diesem Falle mit *C. ljungdahlii* und *C. kluyveri* stammten, waren wiederum zwei unterschiedliche Morphologien zu erkennen. Zum einen zeigten sich stäbchenförmige Bakterienzellen mit glatter Oberfläche, einem Durchmesser von ca. 0,5-0,6 μm und einer Länge von 3-4 μm . Diese Eigenschaften entsprechen Bakterienzellen, welche im Falle der *C. ljungdahlii*-Kultur beobachtet wurden. Andere Zellen waren ebenfalls stäbchenförmig und hatten einen vergleichbaren Durchmesser von 0,6 μm , aber eine Länge von 4-5 μm , unterschieden sich jedoch von anderen Zellen in ihrer Oberflächenstruktur, welche deutlich rauer war als bei anderen Zellen. Diese Eigenschaften entsprechen den morphologischen Eigenschaften von Zellen einer *C. kluyveri*-Kultur. Es ist festzustellen, dass in den Cofermentationskulturen aufgrund der deutlichen morphologischen Unterschiede immer beide Bakterienarten mittels Vergleiches mit der Referenzkultur identifiziert und somit auch visuell nachgewiesen werden konnten. Des Weiteren konnten mit diesem Versuch aktuellere rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *C. carboxidivorans*, *C. ljungdahlii* und vor allem *C. kluyveri* erstellt werden, als, wenn überhaupt vorhanden, in Publikationen zu finden sind. Allerdings konnten durch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen keine Auffälligkeiten oder Abweichungen zwischen den Bakterienzellen der Einzelkulturen im Vergleich zu den Bakterienzellen in den Cofermentationskulturen festgestellt werden. Somit ist nicht von einem Einfluss der Koexistenz beider Bakterienarten in einer Kultur auf die Morphologie auszugehen. Um die Morphologie der entsprechenden Stämme noch weiter zu untersuchen, könnten zukünftig zusätzlich transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt werden. Diese könnte weiteren Aufschluss in Bezug auf die Koexistenz und deren Auswirkungen auf die Morphologie bzw. intrazellulärer Strukturen der Stämme geben.

4.9 Generelle Aspekte zur Thematik der Cofermentation

Ursprüngliches Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines rekombinanten Biosyntheseweges für die Synthese von Capronat, welcher auf Synthesegas als Substrat basieren sollte. Die Etablierung scheiterte allerdings bereits in einem frühen Stadium. Wie sich zeigte, war die Konstruktion der dafür nötigen Plasmide sowie die Umsetzung in den entsprechenden Organismen nicht trivial. Selbst bei Fertigstellung der entsprechenden Plasmide wäre jedoch nicht gewährleistet gewesen, dass diese in acetogenen Bakterien auch wirklich zu einer befriedigenden Capronatsynthese führen würden. Nur eine geringe Anzahl an Publikationen ist zu finden, in denen eine rekombinante Capronatsynthese erreicht wurde. So sind zwei Publikationen zu finden, in welchen eine Capronatsynthese mittels der Erstellung eines rekombinanten Syntheseweges in *E. coli* erreicht und nachgewiesen werden konnte (Machado *et al.*, 2012; Volker *et al.*, 2014). Nachteil dieser rekombinanten Biosynthesewege ist das genutzte und zu Grunde liegende Substrat, welches in beiden Fällen Glucose war. Zielsetzung sollte aber eine nachhaltige Produktion von Capronat sein, die, wie in dieser Arbeit, auf Synthesegas und den damit enthaltenden klimaschädlichen Gasen Kohlenmonoxid und Kohlendioxid beruht. Vermutlich wird es zukünftig auch Publikationen geben, die trotz der Schwierigkeit des Unterfangens eine rekombinante Capronatsynthese in acetogenen Bakterien erreichen. Über die damit möglichen Produktionsmengen bei Nutzung von Synthesegas kann nur spekuliert werden. Viele weitere Capronatsynthesen werden weiterhin mittels Fermentationen von genetisch unveränderten acetogenen Bakterien erreicht oder verbessert werden. Darunter auch einige, die Synthesegas als Substrat verwenden.

Auch in dieser Arbeit und den darin durchgeführten Fermentationen kamen viele Aspekte auf, die zu einer Verbesserung der Cofermentation und somit zu einer effizienteren Biosynthese führen könnten. In den Cofermentationen waren einige Beeinträchtigungen mit negativem Einfluss auf die Produktkonzentrationen zu erkennen. Bei der simultanen Cofermentation von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* war anhand der OD_{600nm} zu sehen, dass in allen Cofermentationskulturen ein verringertes Wachstum im Vergleich zu den Kontrollkulturen stattfand (Abbildung 14). Auch in der sequentiellen Cofermentation dieser beiden Organismen war dieser inhibitorische Effekt zu erkennen (Abbildung 32). Ein verringertes Wachstum verringert auch die metabolische Aktivität und somit die

maximal mögliche Biosynthese. Mit der Methodik einer simultanen und sequentiellen Cofermentation, d.h. bei einer gleichzeitigen Anwesenheit zweier unterschiedlicher Bakterienarten, ist eine solche Problematik nicht auszuschließen. Umgangen werden kann diese Problematik jedoch, wenn beide Organismen nicht gleichzeitig kultiviert werden, so wie es in einer separaten biphasischen Fermentation vollzogen wird. Somit hat die separate biphasische Fermentation einen entscheidenden Vorteil. Weitere Vorteile der separaten biphasischen Fermentation sind weiter unten im Text zu finden.

Eine weitere bedeutende Problematik ist der Verlauf des pH-Wertes einer Cofermentation sowie die unterschiedlichen pH-Bandbreiten und die unterschiedlichen pH-Optima der genutzten Mikroorganismen. Im Falle der simultanen und sequentiellen Cofermentation war zu sehen, dass die Biosynthese von Butanol, Hexanol und Capronat zum Erliegen kommt oder nicht stattfindet, sobald ein pH-Wert von ca. 5,3 oder niedriger erreicht wurde. Dieser Sachverhalt konnte mit den Versuchen zur Untersuchung des Einflusses des pH-Wertes bestätigt werden (3.6). Ein Absinken des pH-Wertes in den Cofermentationskulturen findet zwangsläufig durch Produktion von Fettsäuren durch die acetogenen Bakterien statt. Für eine effizientere Capronatsynthese muss dem Absinken des pH-Wertes entgegengewirkt werden. Möglichkeiten hierfür wären der Test verschiedener weiterer pH-Puffersysteme in den Nährmedien. Erfolgversprechender wäre die Stabilisierung eines pH-Wertes mittels automatisierter pH-Reglersysteme. Der somit eingestellte pH-Wert sollte als Kompromiss genau zwischen den pH-Optima der genutzten Bakterienarten gewählt werden. In Wachstumsversuchen müsste dann verifiziert werden, dass aufgrund der Regulierung des pH-Wertes höhere Produktkonzentrationen erzielt werden können als in den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen, bei denen der pH-Wert nicht reguliert wurde. Auch unterschiedliche initiale pH-Werte könnten dann auf ihre Auswirkungen auf das Produktspektrum getestet werden.

Wie in der Literatur beschrieben (Diender *et al.*, 2016) und in dieser Arbeit nachgewiesen (3.4), ist Kohlenmonoxid toxisch für *C. kluyveri*. Somit ist Kohlenmonoxid ein weiterer Faktor mit negativen Auswirkungen auf die simultane und sequentielle Cofermentation. Generell ist anzumerken, dass trotz der Anwesenheit von 40 % Kohlenmonoxid in der Gasphase funktionale Cofermentationen möglich waren. Eine plausible Erklärung für die

Funktionalität der Cofermentationen ist, dass die Umwandlung und Verstoffwechslung von Kohlenmonoxid durch die acetogenen Bakterien immer schnell genug vorstatten ging, so dass größere toxische Effekte auf *C. kluyveri* vermieden werden konnten. Dennoch ist es möglich und auch wahrscheinlich, dass Kohlenmonoxid Einfluss auf das Wachstum von *C. kluyveri* genommen hat und die Produktkonzentrationen höher hätten ausfallen können. Weiterhin wurde auch durch die Kultivierung unter nicht schüttelnden Bedingungen eine Diffusion von Kohlenmonoxid in das Nährmedium vermieden. Dadurch kam es aber indirekt in den simultanen und sequentiellen Cofermentationen zu einem weiteren negativen Effekt, da somit diese Kulturen zur besseren Substratversorgung nicht geschüttelt werden konnten. Durch Kultivierung unter schüttelnden Bedingungen würden optimalere Bedingungen für die acetogenen Bakterien geschaffen und es käme eventuell zu einer schnelleren und erhöhten Bildung von Ethanol und Acetat, welches wiederum von Vorteil für eine Cofermentation wäre.

Die Umwandlung von Fettsäuren in ihre entsprechenden Alkohole (3.5) durch acetogene Bakterien stellt einen weiteren Einflussfaktor auf die Effizienz der simultanen und sequentiellen Cofermentationen dar. Es ist davon auszugehen, dass in allen funktionalen simultanen und sequentiellen Cofermentationen höhere Capronatkonzentrationen möglich gewesen wären, wenn nicht ein Teil durch die acetogenen Bakterien in Hexanol umgewandelt worden wäre. Falls nun speziell eine Capronatproduktion gewünscht wäre, ließe sich diese Umwandlung mit dieser Methodik nicht vermeiden. Im Falle einer gewünschten Hexanolproduktion könnte man sich diese Fähigkeit aber sogar zu Nutzen machen.

Wie dargestellt gibt es mehrere Faktoren mit negativem Einfluss auf die simultanen und sequentiellen Cofermentationen, die mehr oder weniger bei Beibehaltung der Methodik vermieden werden können. Umgangen werden alle diese Problematiken in den separaten biphasischen Fermentationen, da hier beide Organismen unter ihren jeweils optimalen Bedingungen getrennt voneinander, aber aufeinander aufbauend, kultiviert werden können. Durch die getrennte Kultivierung können alle diese Wechselwirkungen unterbunden werden. Die separate biphasische Fermentation stellt somit den effizienteren und effektivsten Ansatz aller durchgeführten Cofermentationen dar. Mittels der separaten biphasischen Fermentation von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* konnten

auch die höchsten Capronatkonzentrationen erreicht werden, was zudem auch noch daran lag, dass in diesem Falle bereits *C. carboxidivorans* unter seinen optimalen Bedingungen Capronat gebildet hatte. Die Capronatkonzentrationen in der separaten biphasischen Fermentation von *C. ljungdahlii* und *C. kluyveri* fielen zwar relativ gering aus, auch im Vergleich zu anderen Cofermentationen, der Grund dafür lag aber in diesem Falle an der nicht zufriedenstellenden Kultivierung von *C. ljungdahlii*. Der Ansatz der separaten biphasischen Fermentation ist der Ansatz, der weiterverfolgt werden sollte, da in allen anderen Cofermentationen es immer wieder zu negativen Wechselwirkungen und Effekten kam und keiner der genutzten Organismen unter seinen optimalen Bedingungen kultiviert werden konnte.

Die separate biphasische Fermentation dieser Arbeit besitzt ebenfalls weiteres Optimierungspotential, welches im Folgenden genauer dargestellt werden soll. Die Präparation eines Nährmediums aus acetogenen Kulturen führte zu einer Verdünnung der Substratkonzentrationen um ca. 30 % (3.2.4; 4.2.4). Dieser hohe Verlust an Substraten sollte durch eine Abänderung der Methodik verhindert werden. *C. kluyveri* wurde in diesen Versuchen immer in Medium kultiviert, welches aus acetogenen Kulturen präpariert wurde. Sinnvoller wäre es, acetogene Bakterien zu kultivieren und dann nur die entsprechenden Produkte Ethanol und Acetat aus dem Nährmedium zu präparieren, beziehungsweise von den restlichen Bestandteilen abzutrennen. Diese abgetrennten Produkte könnten dann Nährmedium für *C. kluyveri* beigefügt werden.

Weitere Verbesserungsmöglichkeiten betreffen wiederum vor allem die separate biphasische Fermentation, könnten aber auch in den anderen Cofermentationen zur Anwendung kommen. So wurde festgestellt, dass in die Cofermentationen eine nicht unerhebliche Konzentration an Ethanol, Acetat und Capronat aus den *C. kluyveri*-Vorkulturen bei Inokulation mit eingeschleppt wurde (3.7, 4.7). Problematisch war dies vor allem, weil diese verschleppten Substanzen nicht ausgehend von Synthesegas produziert wurden. Ein Lösungsansatz wäre eine Präparation von *C. kluyveri*-Vorkulturen. Somit sollten bei diesen Kulturen unter anaeroben Bedingungen die Zellen und das Nährmedium durch Zentrifugation mit anschließender Verwerfung des Überstandes voneinander getrennt werden. Die Zellen sollten dann in eine geeignete Pufferlösung überführt und suspendiert werden, nachdem diese mehrmals mit dieser „gewaschen“

wurden. Diese Pufferzellsuspension sollte dann für die Inokulation von Cofermentationskulturen genutzt werden. Zuvor nachgewiesen und überprüft werden müsste, ob auf diese Weise präparierte Zellen noch kultiviert werden können und zu Wachstum sowie den spezifischen Produkten führen. Aufgrund der Tatsache, dass es so zu keiner Verschleppung von Substraten und Produkten mehr kommt, wäre eine ausschließliche Produktion auf Grundlage von Synthesegas gewährleistet.

Ebenfalls alle Cofermentationen betreffend ist die Tatsache, dass in den Wachstumsversuchen dieser Arbeit zu erkennen war, dass bei Kultivierung acetogener Bakterien deutlich mehr Acetat als Ethanol entstand. Zu sehen war dies in den entsprechenden Kontrollkulturen der Versuche dieser Arbeit, in welchen die jeweiligen acetogenen Stämme allein kultiviert wurden. Dieses zum Acetat verschobene Produktspektrum ist dann auf Substratebene die Grundlage der Cofermentationen. In den Versuchen zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Substratkonzentrationen auf das Wachstum und das Produktspektrum von *C. kluyveri* konnte festgestellt werden, dass ein zum Acetat verschobener Ethanol/Acetat-Quotient bei den Substraten zu einer vermehrten Bildung von Butyrat auf Kosten von Capronat führte (3.3). Da in allen Cofermentationen durch die acetogenen Bakterien mehr Acetat vorlag, ist auch davon auszugehen, dass die Capronatkonzentrationen geringer ausfallen, da vermehrt Butyrat gebildet wird. So war auch in nahezu allen funktionalen Cofermentationen zu sehen, dass die Butyratkonzentrationen höher ausfielen als die Capronatkonzentrationen. Um diese Problematik zu lösen, muss versucht werden, das Produktspektrum und somit den Ethanol/Acetat-Quotient in Richtung Ethanol zu verschieben. Im Rahmen eines Patents konnte genau solch ein abgeändertes Produktspektrum bei Kultivierungen von *C. autoethanogenum*, *C. carboxidivorans* und *C. ljungdahlii* erzielt werden (Simpson *et al.*, 2013). Möglich gemacht wurde dies durch eine Erhöhung der Nickelkonzentration im Nährmedium auf Konzentrationen von bis zu 1000 μM . Die Ethanol/Acetat-Quotienten waren mit steigenden Nickelkonzentrationen entweder ungefähr ausgeglichen oder sogar deutlich in Richtung Ethanol verschoben. Nährmedien mit erhöhten Nickelkonzentrationen sollten somit für die Kultivierungen im Rahmen einer Cofermentation getestet werden. Dabei sollte untersucht werden, ob durch das geänderte Produktspektrum der acetogenen Bakterien auch die Capronatproduktion

gesteigert werden könnte. Die Arbeiten dieses Patentes könnten auch genutzt werden, um die Ethanolproduktion in *C. autoethanogenum* zu steigern. In allen Cofermentationen mit *C. autoethanogenum* konnte keine deutliche Capronatproduktion erzielt werden, da die produzierten Ethanolkonzentrationen zu gering ausfielen. Die Ethanolproduktion von *C. autoethanogenum* könnte eventuell auch gesteigert werden, wenn lediglich Kohlenmonoxid als Gasphase verwendet wird und der initiale pH-Wertes auf 4,75 abgesenkt wird, so wie es von Abubackar *et al.* (2015) praktiziert wurde. Solch eine Kultivierung im Rahmen einer Cofermentation wäre aufgrund der Toxizität von Kohlenmonoxid auf *C. kluyveri* nur in einer separaten biphasischen Fermentation möglich. Abschließend und wiederholend ist zu sagen, dass der Ansatz einer separaten biphasischen Fermentation aus vielen zuvor genannten Gründen am sinnvollsten erscheint. Durch die dargestellten Möglichkeiten und aufgezeigten beteiligten Faktoren in dieser Arbeit könnten diese Cofermentationen zukünftig noch weiter optimiert werden. Eine industrielle Option für die Zukunft wäre die nacheinander Schaltung zweier Fermentationsanlagen, bei denen in der ersten, ausgehend von Synthesegas, die Substrate produziert werden, welche dann in der zweiten Anlage zur Produktion gewünschter Substanzen genutzt werden können. Somit könnte ohne gentechnische Veränderung ökologisch, ökonomisch und vor allem nachhaltig produziert werden. Eventuell lässt sich zukünftig diese Art einer Cofermentation auf Basis von Synthesegas auch auf andere Produkte bzw. Substrate und auch andere Organismen ausweiten.

5 Zusammenfassung

Das Plasmid pMW 2.1 mit den Genen *thlA*, *hbd*, *crt*, *etfA*, *etfB* und *bcd* aus *C. acetobutylicum* für die Synthese von Butyryl-CoA konnte erfolgreich konstruiert werden. Die Funktionalität des Plasmides pMW 2.1 wurde in *E. coli* XL1-Blue MRF' mittels des zusätzlichen und notwendigen Einbringens der Thioesterasen YbgC aus *H. influenzae* und Tell aus *B. subtilis* nachgewiesen. Im Falle der Nutzung von YbgC wurde die Synthese von Butyrat ausgehend von Acetyl-CoA nachgewiesen. Detektiert wurden 1,2 mM Butyrat nach 48 Stunden Kultivierung. Die Konstruktion des Plasmids pMTL82151_*crt2_bcd2_etfB2_etfA2_hbd2* konnte nicht erfolgreich abgeschlossen werden. Die auf diesem Plasmid codierten Gene stammten aus *C. kluyveri* und sollten die Synthese von Capronyl-CoA ausgehend von Butyryl-CoA ermöglichen.

Es wurden simultane Cofermentationen mit einem acetogenen Stamm und *C. kluyveri* unter Nutzung von Synthesegas als Substrat durchgeführt. Bei den acetogenen Bakterienarten handelte es sich um *C. autoethanogenum*, *C. carboxidivorans* und *C. ljungdahlii*. Im Falle der simultanen Cofermentationen von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* sowie *C. ljungdahlii* und *C. kluyveri* konnte eine Synthese von Butanol, Hexanol und Capronat nachgewiesen werden. In der simultanen Cofermentation mit *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* wurden 6,5 mM Butanol, 2,2 mM Hexanol und 5,3 mM Capronat und in der simultanen Cofermentation mit *C. ljungdahlii* und *C. kluyveri* 11,5 mM Butanol, 7,1 mM Hexanol und 9,9 mM Capronat detektiert. Die simultane Cofermentation mit *C. autoethanogenum* und *C. kluyveri* erbrachte keine Produktion dieser Substanzen. In sequentiellen Cofermentationen mit den zuvor genannten Organismen wurde ein Wechsel der Gasphase von Synthesegas zu N₂/CO₂ während der Kultivierung vollzogen, um Toxizitätseffekte auf *C. kluyveri* zu vermeiden. Der Wechsel der Gasphase erfolgte zum Zeitpunkt der Zugabe von *C. kluyveri* in acetogene Kulturen. In keiner dieser Kultivierungen konnte eine signifikante Produktion von Butanol, Hexanol und Capronat erreicht werden. Als Grund dafür wurde die fehlende Substratversorgung nach Wechsel der Gasphase verantwortlich gemacht.

Weitere sequentielle Cofermentationen wurden durchgeführt, in denen durchgehend Synthesegas als Gasphase genutzt wurde. Im Falle dieser sequentiellen Cofermentation

(ohne Wechsel der Gasphase) von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* sowie *C. ljungdahlii* und *C. kluyveri*, konnte eine Synthese von Butanol, Hexanol und Capronat nachgewiesen werden. In der sequentiellen Cofermentation (ohne Wechsel der Gasphase) mit *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* wurden 6,0 mM Butanol, 3,9 mM Hexanol und 10,5 mM Capronat und in der sequentiellen Cofermentation mit *C. ljungdahlii* und *C. kluyveri* 6,7 mM Butanol, 4,0 mM Hexanol und 7,6 mM Capronat detektiert. Die entsprechende sequentielle Cofermentation (ohne Wechsel der Gasphase) mit *C. autoethanogenum* und *C. kluyveri* erbrachte keine Produktion dieser Substanzen.

Des Weiteren wurden separate biphasische Fermentationen, in welchen zuerst jeweils die acetogenen Stämme *C. carboxidivorans* und *C. ljungdahlii* mit Synthesegas als Substrat kultiviert wurden und dann aus diesen Kulturen ein Nährmedium für eine Kultivierung von *C. kluyveri* präpariert wurde, durchgeführt. Mittels der separaten biphasischen Fermentation von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* konnten 6,1 mM Butanol, 1,8 mM Hexanol und 15,1 mM Capronat produziert werden. In der separaten biphasischen Fermentation von *C. ljungdahlii* und *C. kluyveri* konnte Capronat in einer Konzentration von 3,7 mM produziert werden.

C. kluyveri wurde unter Verwendung verschiedener Substratkonzentrationen an Ethanol und Acetat und der damit verbundenen verschiedenen Ethanol/Acetat-Quotienten, um die Auswirkungen auf das Produktspektrum zu untersuchen, kultiviert. Es wurde festgestellt, dass ein zum Acetat verschobener Ethanol/Acetat-Quotient die Bildung von Butyrat auf Kosten von Capronat fördert. Die Capronatkonzentration war umso höher, je höher die Ethanolkonzentration war. Der toxische Effekt von Kohlenmonoxid auf *C. kluyveri* wurde durch Wachstumsversuche nachgewiesen. Bei Kultivierungen von *C. kluyveri* unter den Gasphasen Kohlenmonoxid und Synthesegas mit 40 % Kohlenmonoxidanteil konnten kein Wachstum und keine Stoffwechselprodukte mehr festgestellt werden. Die Fähigkeit von *C. carboxidivorans* und *C. ljungdahlii*, die Fettsäuren Butyrat und Capronat in die entsprechenden Alkohole Butanol und Hexanol umzuwandeln, wurde in dieser Arbeit einer genaueren Betrachtung unterzogen. In Wachstumsversuchen konnte bei beiden Organismen die Umwandlung der Fettsäuren in die entsprechenden Alkohole nachgewiesen werden. Es ist davon auszugehen, dass diese Umwandlung von Capronat durch *C. carboxidivorans* und *C. ljungdahlii* die maximal

mögliche Konzentration in den simultanen und sequentiellen Cofermentationen vermindert. In Wachstumsversuchen mit *C. kluyveri* wurden verschiedene initiale pH-Werte gewählt, um den pH-Wert zu identifizieren, welcher für das Wachstum und den Metabolismus von *C. kluyveri* noch tolerierbar ist. Getestet wurden pH-Werte zwischen 5 und 7. Bei pH-Werten niedriger als 5,5 war kein Wachstum mehr festzustellen. In einem weiteren Versuch wurde untersucht, welche Konzentrationen an Butyrat und Capronat durch die Substratkonzentrationen an Ethanol und Acetat, welche aus Vorkulturen mit eingebracht werden, bei Inokulation neuer Kulturen gebildet werden können. Durch die eingebrachten Substrate konnten geringe Konzentrationen an Capronat gebildet werden. Die Capronatkonzentrationen der in dieser Arbeit durchgeführten Cofementationen lagen höher. Somit ist von einer hauptsächlichen Produktion ausgehend von Synthesegas auszugehen und nicht von einer Produktion aus den eingebrachten Substratkonzentrationen. Es wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen von funktionalen Cofermentationskulturen sowie zusätzlich von *C. carboxidivorans*, *C. ljungdahlii* und *C. kluyveri* erstellt, um morphologische Unterschiede oder Auffälligkeiten zu erkennen. Auffälligkeiten konnten nicht festgestellt werden. Alle genutzten Organismen konnten aber aufgrund der morphologischen Unterschiede in den Cofermentationskulturen identifiziert werden.

6 Summary

The plasmid pMW 2.1 with the Genes *thlA*, *hbd*, *crt*, *etfA*, *etfB* and *bcd* deriving from *C. acetobutylicum* for synthesis of butyryl-CoA has been successfully constructed. The functionality of plasmid pMW 2.1 has been proven in *E. coli* XL1-Blue MRF' with additional and necessary expression of the thioesterases YbgC from *H. influenzae* and Tell from *B. subtilis*. In case of YbgC, the synthesis of butyrate starting from acetyl-CoA has been proven. After cultivation for 48 hours 1,2 mM butyrate were detected. The construction of plasmid pMTL82151_*crt2_bcd2_etfB2_etfA2_hbd2* could not be completed successfully. The genes encoded on this plasmid derived from *C. kluyveri* and should enable the synthesis of caproyl-CoA starting from butyryl-CoA.

Simultaneous cofermentations were performed by cultivation of an acetogenic strain together with *C. kluyveri* with the use of synthesis gas as substrate. The used acetogenic bacteria species were *C. autoethanogenum*, *C. carboxidivorans*, and *C. ljungdahlii*. In case of simultaneous cofermentation of *C. carboxidivorans* and *C. kluyveri* plus *C. ljungdahlii* and *C. kluyveri*, a synthesis of butanol, hexanol, and caproate has been shown. In the simultaneous cofermentation with *C. carboxidivorans* and *C. kluyveri* 6,5 mM butanol, 2,2 mM hexanol, and 5,3 mM caproate were detected. In the simultaneous cofermentation with *C. ljungdahlii* and *C. kluyveri* 11,5 mM butanol, 7,1 mM hexanol, and 9,9 mM caproate were detected. The production of these substances has not been detected in the simultaneous cofermentation with *C. autoethanogenum* and *C. kluyveri*. In a sequential cofermentation with the previously named organisms the gas phase was changed during the cultivation from synthesis gas to N₂/CO₂ to avoid toxicity effects on *C. kluyveri*. The change of the gas phase was performed at the time point at which *C. kluyveri* was added to the acetogenic cultures. In none of these cultivations a considerable production of butanol, hexanol, and caproate could be achieved. The reason for this is the missing supply of substrate after changing of the gas phase. Further sequential cofermentations were performed with the continuous use of synthesis gas as substrate. In case of the sequential cofermentation (without change of the gas phase) of *C. carboxidivorans* and *C. kluyveri* plus *C. ljungdahlii* and *C. kluyveri* a production of butanol, hexanol and caproate was detectable. In the sequential cofermentation (without

change of the gas phase) of *C. carboxidivorans* and *C. kluyveri* 6,0 mM butanol, 3,9 mM hexanol, and 10,5 mM caproate have been detected and in the sequential cofermentation of *C. ljungdahlii* and *C. kluyveri* 6,7 mM butanol, 4,0 mM hexanol, and 7,6 mM caproate were detectable. The sequential cofermentation (without change of the gas phase) of *C. autoethanogenum* and *C. kluyveri* did not lead to production of these substances. Also, separate biphasic fermentations, which started with the cultivation of the acetogenic strains *C. carboxidivorans* and *C. ljungdahlii* with the use of synthesis gas as substrate, were performed. These cultures have been prepared to obtain a culture medium for cultivation of *C. kluyveri*. With the separate biphasic fermentation of *C. carboxidivorans* and *C. kluyveri*, a production of 6,1 mM butanol, 1,8 mM hexanol, and 15,1 mM caproate has been achieved. In the second separate biphasic fermentation of *C. ljungdahlii* and *C. kluyveri* 3,7 mM caproate were detectable.

C. kluyveri was cultivated with different substrate concentrations (ethanol and acetate) and thereby the effect of the resulting different ethanol/acetate quotients on the product spectrum was investigated. It was noticed that a shift to acetate in the ethanol/acetate quotient leads to higher production of butyrate at cost of the caproate production. Caproate concentrations were higher when there was a higher initial ethanol concentration. The toxic effect of carbon monoxide on *C. kluyveri* was proven by growth experiments. At cultivations of *C. kluyveri* under the gas phase carbon monoxide and synthesis gas (with 40 % carbon monoxide) it was not possible to detect any more growth or metabolic activity of *C. kluyveri*. Also, the ability of *C. carboxidivorans* and *C. ljungdahlii* to convert the fatty acids butyrate and caproate into the corresponding alcohols butanol and hexanol was checked in more detail. The conversion of the fatty acids into the corresponding alcohols was shown for both organisms. It can be assumed that the conversion of caproate by *C. carboxidivorans* and *C. ljungdahlii* reduces the maximal possible concentrations in the simultaneous and sequential cofermentations. Also, different initial pH values were checked to identify the pH value which is still tolerable for growth and metabolic activity of *C. kluyveri*. pH values have been tested from 5 to 7. At pH values lower than 5,5, no growth was observable. In a further experiment it was checked what concentrations of butyrate and caproate can be produced starting from the substrate concentrations of ethanol and acetate which are carried over by inoculation of

new cultures. Low concentrations of caproate have been produced by the substrate which were carried over from pre-cultures. The caproate concentrations in the cofermentation performed in this PhD thesis were higher. Therefore, it can be assumed that the production of caproate was based on synthesis gas and not on the substrates which were carried over. Electronmicroscopic pictures of functional cofermentations and single cultures of *C. carboxidivorans*, *C. ljungdahlii*, and *C. kluyveri* have been taken to detect morphological differences or abnormalities. No abnormalities could be seen, but all used organisms were identified in the cofermentations due to their morphological differences.

7 Referenzen

Abrini J, Naveau H, Nyns E-J. 1994. *Clostridium autoethanogenum*, sp. nov., an anaerobic bacterium that produces ethanol from carbon monoxide. Arch Microbiol **161**:345–351.

Abubackar HN, Veiga MC, Kennes C. 2015. Carbon monoxide fermentation to ethanol by *Clostridium autoethanogenum* in a bioreactor with no accumulation of acetic acid. Bioresource Technol **186**:122–127.

Baek J-M, Mazumdar S, Lee S-W, Jung M-Y, Lim J-H, Seo S-W, Jung G-Y, Oh M-K. 2013. Butyrate production in engineered *Escherichia coli* with synthetic scaffolds. Biotechnol Bioeng **110**:2790–2794.

Barker HA. 1937. The production of caproic and butyric acids by the methane fermentation of ethyl alcohol. Arch Mikrobiol **8**:415–421.

Barker HA, Taha SM. 1942. *Clostridium kluyverii*, an organism concerned in the formation of caproic acid from ethyl alcohol. J Bacteriol **43**:347–363.

Bengelsdorf FR, Straub M, Dürre P. 2013. Bacterial synthesis gas (syngas) fermentation. Environ Technol **34**:1639–1651.

Bengelsdorf FR, Poehlein A, Linder S, Erz C, Hummel T, Hoffmeister S, Daniel R, Dürre P. 2016. Industrial acetogenic biocatalysts: a comparative metabolic and genomic analysis. Front Microbiol **7**:1036.

Bertani G. 1951. Studies on lysogenesis I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. J Bacteriol **62**:293–300.

Bielzer S. 2013. Konstruktion eines C6-Biosyntheseweges. Masterarbeit, Universität Ulm.

Bonner WM, Bloch K. 1972. Purification and properties of fatty acyl thioesterase I from *Escherichia coli*. J Biol Chem **247**:3123–3133.

Bornstein BT, Barker HA. 1948. The energy metabolism of *Clostridium kluyveri* and the synthesis of fatty acids. J Biol Chem **172**:659–669.

Cavalcante W de A, Leitão RC, Gehring TA, Angenent LT, Santaella ST. 2017. Anaerobic fermentation for *n*-caproic acid production: a review. Process Biochem **54**:106–119.

Celińska E, Grajek W. 2009. Biotechnological production of 2,3-butanediol—current state and prospects. Biotechnol Adv **27**:715–725.

Chen WS, Ye Y, Steinbusch KJJ, Strik DPBTB, Buisman CJN. 2016. Methanol as an alternative electron donor in chain elongation for butyrate and caproate formation. Biomass Bioenerg **93**: 201-208.

Cotter JL, Chinn MS, Grunden AM. 2009. Influence of process parameters on growth of *Clostridium ljungdahlii* and *Clostridium autoethanogenum* on synthesis gas. Enzyme Microb Tech **44**:281–288.

Diender M, Stams AJM, Sousa DZ. 2016. Production of medium-chain fatty acids and higher alcohols by a synthetic co-culture grown on carbon monoxide or syngas. Biotechnol Biofuels **9**:82.

Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW. 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. Nucleic Acids Res **16**:6127–6145.

Dürre P. 2008. Fermentative butanol production: bulk chemical and biofuel. Ann NY Acad Sci **1125**:353–362.

Dürre P. 2014. Physiology and sporulation in *Clostridium*. *Microbiol Spectrum* **2**:TBS-0010-2012.

Dürre P. 2016. Butanol formation from gaseous substrates. *FEMS Microbiol Lett* **363**.

Fernández-Naveira Á, Abubackar HN, Veiga MC, Kennes C. 2016. Efficient butanol-ethanol (B-E) production from carbon monoxide fermentation by *Clostridium carboxidivorans*. *Appl Microbiol Biotechnol* **100**:3361–3370.

Fernández-Naveira Á, Abubackar HN, Veiga MC, Kennes C. 2017a. Production of chemicals from C1 gases (CO, CO₂) by *Clostridium carboxidivorans*. *World J Microb Biotechnol* **33**:43.

Fernández-Naveira Á, Veiga MC, Kennes C. 2017b. H-B-E (hexanol-butanol-ethanol) fermentation for the production of higher alcohols from syngas/waste gas. *J Chem Technol Biotechnol* **92**:712–731.

Frazzetto G. 2003. White biotechnology. *EMBO Rep* **4**:835–837.

Elsden SR, Volcani BE, Gilchrist FMC, Lewis D. 1956. Properties of a fatty acid forming organism isolated from the rumen of sheep. *J Bacteriol* **72**:681-689.

Genthner BR, Davis CL, Bryant MP. 1981. Features of rumen and sewage slugde strains of *Eubacterium limosum*, a methanol- and H₂-CO₂-utilizing species. *Appl Environ Microbiol* **42**:12-19.

Gerischer U, Dürre P. 1990. Cloning, sequencing, and molecular analysis of the acetoacetate decarboxylase gene region from *Clostridium acetobutylicum*. *J Bacteriol* **172**:6907–6918.

Gest H. 1995. A serendipic legacy: Erwin Esmarch's isolation of the first photosynthetic bacterium in pure culture. *Photosynth Res* **46**:473–478.

Gibson DG, Young L, Chuang R-Y, Venter JC, Hutchison CA, Smith HO. 2009. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods* **6**:343–345.

Green MR, Sambrook J. 2012. *Molecular cloning: a laboratory manual* (fourth edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.

Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**:557–580.

Heap JT, Pennington OJ, Cartman ST, Minton NP. 2009. A modular system for *Clostridium* shuttle plasmids. *J Microbiol Methods* **78**:79–85.

Hu X, Du H, Xu Y. 2015. Identification and quantification of the caproic acid-producing bacterium *Clostridium kluyveri* in the fermentation of pit mud used for chinese strong-aroma type liquor production. *Int J Food Microbiol* **214**:116–122.

Huang CB, Alimova Y, Myers TM, Ebersole JL. 2011. Short- and medium-chain fatty acids exhibit antimicrobial activity for oral microorganisms. *Arch Oral Biol* **56**:650–654.

Immerseel FV, Buck JD, Boyen F, Bohez L, Pasmans F, Volf J, Sevcik M, Rychlik I, Haesebrouck F, Ducatelle R. 2004. Medium-chain fatty acids decrease colonization and invasion through *hilA* suppression shortly after infection of chickens with *Salmonella enterica* serovar enteritidis. *Appl Environ Microbiol* **70**:3582–3587.

Jeon BS, Moon C, Kim B-C, Kim H, Um Y, Sang B-I. 2013. In situ extractive fermentation for the production of hexanoic acid from galactitol by *Clostridium* sp. BS-1. *Enzyme Microb Tech* **53**:143–151.

Jeon BS, Choi O, Um Y, Sang B-I. 2016. Production of medium-chain carboxylic acids by *Megasphaera* sp. MH with supplemental electron acceptors. *Biotechnol Biofuels* **9**:129.

Kafarski P. 2012. Rainbow code of biotechnology. *Chemik* **66**:811-816.

Kenealy WR, Waselefsky DM. 1985. Studies on the substrate range of *Clostridium kluyveri*; the use of propanol and succinate. *Arch Microbiol* **141**:187–194.

Kenealy WR, Cao Y, Weimer PJ. 1995. Production of caproic acid by cocultures of ruminal cellulolytic bacteria and *Clostridium kluyveri* grown on cellulose and ethanol. *Appl Microbiol Biotechnol* **44**:507–513.

Kim BH, Bellows P, Datta R, Zeikus JG. 1984. Control of carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* fermentations: utilization of carbon monoxide to inhibit hydrogen production and to enhance butanol yields. *Appl Environ Microbiol* **48**:764–770.

Kim B-C, Jeon BS, Kim S, Kim H, Um Y, Sang B-I. 2015. *Caproiciproducens galactitolivorans* gen. nov., sp. nov., a bacterium capable of producing caproic acid from galactitol, isolated from a wastewater treatment plant. *Int J Syst Evol Microbiol* **65**: 4902-4908.

Kohlmiller EF, Gest H. 1951. A comparative study of the light and dark fermentations of organic acids by *Rhodospirillum rubrum*. *J Bacteriol* **61**: 269-282.

Köpke M, Held C, Hujer S, Liesegang H, Wiezer A, Wollherr A, Ehrenreich A, Liebl W, Gottschalk G, Dürre P. 2010. *Clostridium ljungdahlii* represents a microbial production platform based on syngas. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**:13087–13092.

Köpke M, Mihalcea C, Bromley JC, Simpson SD. 2011a. Fermentative production of ethanol from carbon monoxide. *Curr Opin Biotechnol* **22**:320–325.

Köpke M, Mihalcea C, Liew F, Tizard JH, Ali MS, Conolly JJ, Al-Sinawi B, Simpson SD. 2011b. 2,3-Butanediol production by acetogenic bacteria, an alternative route to chemical synthesis, using industrial waste gas. *Appl Environ Microbiol* **77**:5467–5475.

Köpke M, Liew F. 2012. Production of butanol from carbon monoxide by a recombinant microorganism. Patent WO2012053905A1.

Köpke M, Chen WY. 2013. Recombinant microorganism and uses therefor. Patent US20130323806A1.

Kundiyana DK, Wilkins MR, Maddipati P, Huhnke RL. 2011. Effect of temperature, pH and buffer presence on ethanol production from synthesis gas by “*Clostridium ragsdalei*”. *Bioresource Technol* **102**:5794–5799.

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

Lemon BJ, Peters JW. 1999. Binding of exogenously added carbon monoxide at the active site of the iron-only hydrogenase (Cpl) from *Clostridium pasteurianum*. *Biochemistry* **38**:12969–12973.

Lennen RM, Pflieger BF. 2012. Engineering *Escherichia coli* to synthesize free fatty acids. *Trends Biotechnol* **30**:659–667.

Liou JSC, Balkwill DL, Drake GR, Tanner RS. 2005. *Clostridium carboxidivorans* sp. nov., a solvent-producing clostridium isolated from an agricultural settling lagoon, and reclassification of the acetogen *Clostridium scatologenes* strain SL1 as *Clostridium drakei* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**:2085–2091.

Ljungdahl LG. 1986. The autotrophic pathway of acetate synthesis in acetogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* **40**:415–450.

Luli GW, Strohl WR. 1990. Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. *Appl Environ Microbiol* **56**:1004–1011.

Machado HB, Dekishima Y, Luo H, Lan EI, Liao JC. 2012. A selection platform for carbon chain elongation using the CoA-dependent pathway to produce linear higher alcohols. *Metab Eng* **14**:504–511.

Martin CH, Dhamankar H, Tseng H-C, Sheppard MJ, Reisch CR, Prather KLJ. 2013. A platform pathway for production of 3-hydroxyacids provides a biosynthetic route to 3-hydroxy- γ -butyrolactone. *Nat Commun* **4**:1414.

Mermelstein LD, Welker NE, Bennett GN, Papoutsakis ET. 1992. Expression of cloned homologous fermentative genes in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Nat Biotechnol* **10**:190–195.

Mermelstein LD, Papoutsakis ET. 1993. In vivo methylation in *Escherichia coli* by the *Bacillus subtilis* phage phi 3T I methyltransferase to protect plasmids from restriction upon transformation of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl Environ Microbiol* **59**:1077–1081.

Mock J, Zheng Y, Mueller AP, Ly S, Tran L, Segovia S, Nagaraju S, Köpke M, Dürre P, Thauer RK. 2015. Energy conservation associated with ethanol formation from H₂ and CO₂ in *Clostridium autoethanogenum* involving electron bifurcation. *J Bacteriol* **197**:2065–2980.

Müller V. 2003. Energy conservation in acetogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol* **69**:6345–6353.

Perez JM, Richter H, Loftus SE, Angenent LT. 2013. Biocatalytic reduction of short-chain carboxylic acids into their corresponding alcohols with syngas fermentation. *Biotechnol Bioeng* **110**:1066–1077.

Phillips JR, Atiyeh HK, Tanner RS, Torres JR, Saxena J, Wilkins MR, Huhnke RL. 2015. Butanol and hexanol production in *Clostridium carboxidivorans* syngas fermentation: medium development and culture techniques. *Bioresource Technol* **190**:114–121.

Pingoud A, Jeltsch A. 2001. Structure and function of type II restriction endonucleases. *Nucleic Acids Res* **29**:3705–3727.

Ragsdale SW, Pierce E. 2008. Acetogenesis and the Wood–Ljungdahl pathway of CO₂ fixation. *Biochim Biophys Acta* **1784**:1873–1898.

Reddy MV, Mohan SV, Chang Y-C. 2017. Medium-chain fatty acids (MCFA) production through anaerobic fermentation using *Clostridium kluyveri*: effect of ethanol and acetate. *Appl Biochem Biotechnol* **185**:594–605.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**:1350–1354.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**:5463–5467.

Schuchmann K, Müller V. 2014. Autotrophy at the thermodynamic limit of life: a model for energy conservation in acetogenic bacteria. *Nat Rev Microbiol* **12**:809–821.

Schuchmann K, Müller V. 2016. Energetics and application of heterotrophy in acetogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol* **82**:4056–4069.

Schuster S. 2010. Expression von identifizierten clostridiellen Butanol-Synthese-Genen im Zwischenwirt *Escherichia coli*. Dissertation, Universität Ulm.

Schwarzer D, Mootz HD, Linne U, Marahiel MA. 2002. Regeneration of misprimed nonribosomal peptide synthetases by type II thioesterases. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**:14083–14088.

Seedorf H, Fricke WF, Veith B, Brüggemann H, Liesegang H, Strittmatter A, Miethke M, Buckel W, Hinderberger J, Li F, Hagemeyer C, Thauer RK, Gottschalk G. 2008. The genome of *Clostridium kluyveri*, a strict anaerobe with unique metabolic features. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**:2128–2133.

Serhan M, Mattar J, Debs L. 2016. Concentrated yogurt (labneh) made of a mixture of goats' and cows' milk: physicochemical, microbiological and sensory analysis. *Small Ruminant Res* **138**:46–52.

Simpson SD, Warner IL, Eung JMY, Köpke M. 2013. Optimised media containing nickel for fermentation of carbon monoxide. Patent US8354269B2.

Soetaert W, Vandamme E. 2006. The impact of industrial biotechnology. *Biotechnol J* **1**:756–769.

Straub M. 2012. Fermentative Acetatproduktion durch Homoacetat-Gärung bzw. Acetacetatbildung. Dissertation, Universität Ulm.

Tang WL, Zhao H. 2009. Industrial biotechnology: tools and applications. *Biotechnol J* **4**:1725–1739.

Tanner RS, Miller LM, Yang D. 1993. *Clostridium ljungdahlii* sp. nov., an acetogenic species in clostridial rRNA homology group I. *Int J Syst Bacteriol* **43**:232–236.

Tanner RS. 2007. Cultivation of bacteria and fungi. In: Hurst C, Crawford R, Garland J, Lipson D, Mills A, Stetzenbach L (ed). Manual of environmental microbiology (third edition). American Society of Microbiology, Washington, D.C., WA, USA:69-78.

Thauer RK, Jungermann K, Henninger H, Wenning J, Decker K. 1968. The energy metabolism of *Clostridium kluyveri*. Eur J Biochem **4**:173–180.

Tseng H-C, Harwell CL, Martin CH, Prather KL. 2010. Biosynthesis of chiral 3-hydroxyvalerate from single propionate-unrelated carbon sources in metabolically engineered *E. coli*. Microb Cell Fact **9**:96.

Van Eerten-Jansen MCAA, Ter Heijne A, Grootcholten TIM, Steinbusch KJJ, Sleutels THJA, Hamelers HVM, Buisman CJN. 2013. Bioelectrochemical production of caproate and caprylate from acetate by mixed cultures. ACS Sustain Chem Eng **1**:513–518.

Volker AR, Gogerty DS, Bartholomay C, Hennen-Bierwagen T, Zhu H, Bobik TA. 2014. Fermentative production of short-chain fatty acids in *Escherichia coli*. Microbiology **160**:1513–1522.

Wallace RJ, McKain N, McEwan NR, Miyagawa E, Chaudhary LC, King TP, Walker ND, Apajalahti JHA, Newbold CJ. 2003. *Eubacterium pyruvativorans* sp. nov., a novel non-saccharolytic anaerobe from the rumen that ferments pyruvate and amino acids, forms caproate and utilizes acetate and propionate. Int J Syst Evol Microbiol **53**:965-970.

Wallace RJ, Chaudhary LC, Miyagawa E, McKain N, Walker ND. 2004. Metabolic properties of *Eubacterium pyruvativorans*, a ruminal 'hyper-ammonia-producing' anaerobe with metabolic properties analogous to those of *Clostridium kluyveri*. Microbiology **150**:2921-2930.

Wang H, Li X, Wang Y, Tao Y, Lu S, Zhu X, Li D. 2018. Improvement of *n*-caproic acid production with *Ruminococcaceae* bacterium CPB6: selection of electron acceptors and carbon sources and optimization of the culture medium. Microb Cell Fact **17**:99.

Weimer PJ, Stevenson DM. 2012. Isolation, characterization, and quantification of *Clostridium kluyveri* from the bovine rumen. *Appl Microbiol Biotechnol* **94**:461–466.

Weimer PJ, Moen GN. 2013. Quantitative analysis of growth and volatile fatty acid production by the anaerobic ruminal bacterium *Megasphaera elsdenii* T81. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**:4075–4081.

Wensche M. 2012. Produktion von 1-Butanol mit rekombinanten Stämmen auf LCB-Hydrolysat, CO und CO₂+H₂. Dissertation, Universität Ulm.

Wiechmann A, Müller V. 2017. Synthesis of acetyl-CoA from carbon dioxide in acetogenic bacteria. In: Geiger O (ed). *Biogenesis of fatty acids, lipids and membranes. Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology.* Springer, Cham.

Winzer K, Lorenz K, Zickner B, Dürre P. 2000. Differential regulation of two thiolase genes from *Clostridium acetobutylicum* DSM 792. *J Mol Microb Biotechnol* **2**:531–541.

Wood HG, Ragsdale SW, Pezacka E. 1986. The acetyl-CoA pathway of autotrophic growth. *FEMS Microbiol Lett* **39**:345–362.

Yan S, Wang S, Qiu Z, Wei G, Zhang K. 2015. Optimization of caproic acid production from *Clostridium kluyveri* H588 and its application in chinese luzhou-flavor liquor brewing. *Adv J Food Sci Technol* **7**:614–626.

Yin Y, Zhang Y, Karakashev DB, Wang J, Angelidaki I. 2017. Biological caproate production by *Clostridium kluyveri* from ethanol and acetate as carbon sources. *Bioresource Technol* **241**:638–644.

Zentek J, Buchheit-Renko S, Ferrara F, Vahjen W, Van Kessel AG, Pieper R. 2011. Nutritional and physiological role of medium-chain triglycerides and medium-chain fatty acids in piglets. *Anim Health Res Rev* **12**:83–93.

Zhu X, Zhou Y, Wang Y, Wu T, Li X, Li D, Tao Y. 2017. Production of high-concentration *n*-caproic acid from lactate through fermentation using a newly isolated *Ruminococcaceae* bacterium CPB6. *Biotechnol Biofuels* **10**:102.

Zhuang Z, Song F, Martin BM, Dunaway-Mariano D. 2002. The YbgC protein encoded by the *ybgC* gene of the *tol-pal* gene cluster of *Haemophilus influenzae* catalyzes acyl-coenzyme A thioester hydrolysis. *FEBS Lett* **516**:161-163.

Die Danksagung und der Lebenslauf wurden aus Gründen des Datenschutzes entfernt

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst habe, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet, sowie die wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Ulm, den _____