ulm university universität
uulm

Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie

Produktion von 1-Butanol mit rekombinanten Stämmen auf LCB-Hydrolysat, CO und CO_2+H_2

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

Vorgelegt von
Mandy Wensche
aus Dresden

Ulm, September 2012

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

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Axel Groß
Erstgutachter: Prof. Dr. Peter Dürre
Zweitgutachter: Prof. Dr. Bernhard J. Eikmanns

Tag der Promotion: 20.12.2012

Für meine Tochter Katharina

Inhalt

Inhalt ..... **I**

Abkürzungen ..... **IV**

1. Einleitung **1**

2. Material und Methoden **6**

2.1. Chemikalien, Enzyme, Materialien und Geräte **6**

2.1.1. Chemikalien 6

2.1.2. Gase 6

2.1.3. Enzyme 7

2.1.4. Molekularbiologische Hilfsmittel 8

2.1.5. Geräte 8

2.1.6. Software 11

2.2. Bakterienstämme, Plasmide und Oligodesoxynukleotide **12**

2.2.1. Bakterienstämme 12

2.2.2. Plasmide 14

2.2.3. Oligodesoxynukleotide 16

2.3. Nährmedien und Kultivierungsbedingungen **18**

2.3.1. Nährmedien und Medienzubereitung 18

2.3.2. Medienzusätze 26

2.3.3. Kultivierungsbedingungen 27

2.3.4. Stammhaltung 28

2.4. Bestimmung von Wachstums- und Stoffwechselparametern **29**

2.4.1. Bestimmung der optischen Dichte 29

2.4.2. Gaschromatographische Analysen 29

2.4.3. Lactat-Bestimmung 29

2.5. Arbeiten mit Nukleinsäuren **30**

2.5.1. Vorbereitung von Lösungen und Geräten 30

2.5.2. Isolierung von Nukleinsäuren 30

2.5.3. Reinigung von Nukleinsäuren 32
2.5.4. Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten 34
2.5.5. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure-Lösungen 36
2.5.6. Sequenzierung 36
2.5.7. Enzymatische Modifikation von DNA 37
2.5.8. Amplifikation von DNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) 40

2.6. Herstellung kompetenter Zellen und DNA-Transfer in Zellen 44
2.6.1. Transformation von *E. coli*-Zellen 44
2.6.2. Transformation von *A. woodii*, *C. aceticum* und *C. ljungdahlii* 46
2.6.3. Transformation von *B. coagulans* 47
2.6.4. Transformation von *L. hilgardii*, *L. pantheris* und *L. plantarum* 48
2.6.5. Blau-Weiß-Selektion rekombinanter *E. coli*-Klone 50

2.7. Anreicherung und Isolierung von Stämmen auf Hydrolysat C5/C6#B der Firma Süd-Chemie AG 51

3. Ergebnisse 53

3.1. Stand der Forschung 53

3.2. Auswahl geeigneter Stämme zur Butanol-Produktion 56
3.2.1. Wachstum von *A. woodii*, *C. aceticum* und *C. ljungdahlii* auf LCB-Hydrolysat 57
3.2.2. Wachstum von *A. woodii*, *C. aceticum* und *C. ljungdahlii* auf verschiedenen Zuckern 62
3.2.3. Klonierung von pMW1 und pMW2 67
3.2.4. Transformation von *A. woodii*, *C. aceticum* und *C. ljungdahlii* 73

3.3. Isolierung von Stämmen zur 1-Butanolproduktion aus Umweltproben 76
3.3.1. *L. plantarum*, *L. pantheris*, *L. hilgardii* 79
3.3.2. Test auf Antibiotikaresistenzen der isolierten sowie der DSMZ-Stämme *L. plantarum*, *L. pantheris* und *L. hilgardii* 96

3.4. Klonierung von pMW1/2/3-ori256 97

3.5. Transformation in Lactobacillen-Stämme 100
3.5.1. *L. plantarum* DSM 1055 pMW1-ori256 Wachstum auf MRS-mini-Medium 101
3.5.2. *L. plantarum* DSM 1055 1-Butanol-Verbrauch 103

4. Diskussion 105

5. a) Zusammenfassung 123

5. b) Summary 125

6. Literatur 127

7. Anhang 136

7.1. Internetadressen 136

7.2. Wachstumskurven und Produktspektren 137

Danksagung 140

Akademischer Lebenslauf 142

Abkürzungen

A	Adenin
A.	*Acetobacterium*
ad	bis
ADP	Adenosindiphosphat
AG	Aktiengesellschaft
Ap^R	Ampicillinresistenz
ATCC	„American Type Culture Collection“
ATP	Adenosintriphosphat
B.	*Bacillus*
Bp	Basenpaare
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C5#A	Weizenstrohhydrolysat
C5/C6#A	Weizenstrohhydrolysat
C5/C6#B	Weizenstrohhydrolysat
C.	*Clostridium*
°C	Grad Celsius
ca.	circa (ungefähr)

Cm^R	Chloramphenicolresistenz
CO	Kohlenmonoxid
CO_2	Kohlendioxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
Dr.	Doktor
dNTP	Desoxynukleotid-5'-triphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
E.	Escherichia
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Em^R	Erythromycinresistenz
et al.	et alii (und andere)
F	Farad
FID	Flammenionisationsdetektor
FWD	forward (vorwärts)
g	Gramm
G	Guanin

GC	Gaschromatograph
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde
H	Wasserstoff
H_2O	Wasser
IPTG	Isopropyl-1-thio-ß-D-galactopyranosid
k	kilo
KG	Kommanditgesellschaft
KGaA	Kommanditgesellschaft auf Aktien
Km^R	Kanamycinresistenz
l	Liter
L.	*Lactobacillus*
LB	Luria Broth (Komplexmedium)
LCB	Lignocellulose-Biomasse
m	milli (10^{-3})
M	Molar
µ	mikro (10^{-6})
max.	maximal

min	Minute
mod.	modifiziert
mol	Mol (6,023 x 10^{23} Teilchen)
MRS	Komplexmedium (de Man, Rogosa und Sharpe)
n	nano (10^{-9})
N	Stickstoff
NAD	ß-Nicotinamidadenindinukleotid
NTA	Nitrilo-Trichlor-Essigsäure
O	Sauerstoff
OD	optische Dichte
ori	origin of replication (Replikationsursprung)
p	Plasmid
P	Phosphat
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
pH	potentia Hydrogenii (negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration)
PMSF	Phenymethylsulfonylfluorid
Prof.	Professor

®	registered (eingetragenes Markenzeichen)
rer.	rerum
REV	reverse (rückwärts)
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
S	Sekunde
SAM	S-Adenosylmethionin
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
Sp^R	Spectinomycinresistenz
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Tc^R	Tetracyclinresistenz
Tet^R	Tetracyclinresistenz
THF	Tetrahydrofolsäure
Tm	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Uracil; Unit (Einheit)
UpM	Umdrehung pro Minute
USD	United States Dollar
UUL#2	Rübenhydrolysat

UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
w/v	weight per volume (Gewicht pro Volumen)
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-ß-D-galactosid
z.B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

1. Einleitung

Der primäre Alkohol 1-Butanol (n-Butanol oder Butan-1-ol) besteht aus 4 C-Atomen. Es gehört zu der Gruppe der Alkanole und ist ein aliphatischer Kohlenwasserstoff. Butanol ist eine farblose, brennbare Flüssigkeit mit einem charakteristischen Geruch, welche nur begrenzt in Wasser löslich ist. Mit organischen Lösungsmitteln ist 1-Butanol beliebig mischbar. Der Siedepunkt liegt bei 118 °C, der Schmelzpunkt bei -89 °C und die molare Masse beträgt 74,1216 g/mol. Die Strukturformel ist in Abbildung 1 zu sehen.

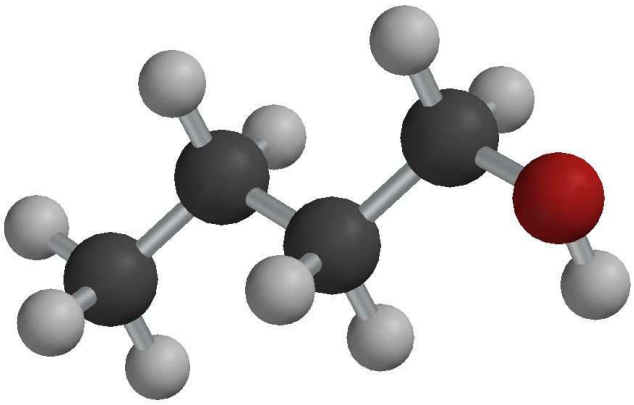


Abbildung 1: Struktur von 1-Butanol
(http://curriculum.union.edu/projects/tech/pics/prof/125_1.jpg)

Die chemische Synthese von 1-Butanol beläuft sich weltweit auf bis zu 5,5 Mio Tonnen pro Jahr (Donaldson et al., 2007). 1-Butanol wird in verschiedene Stoffe wie Butylacrylat, Butylmethacrylatester, Butylglykol und Butylacetat umgewandelt. Diese Stoffe finden dann Verwendung als Lösungsmittel in Lacken, Tinten, Farben, Reinigungsmittel, als künstliche Aromastoffe, in der Elektronik, als Extraktionsmittel für Medikamente, in der Kosmetikindustrie und der Textilbranche (Dürre, 2005; Dürre, 2008). Außerdem dient 1-Butanol als Ausgangsstoff für die Herstellung von Estern und Ethern, welche ebenfalls als Lösungsmittel und Weichmacher verwendet werden. Ebenso wird 1-Butanol als Zusatz in Kraftstoffen oder in Reinform als Biokraftstoff verwendet. Für die chemische Synthese von Butanol gibt es mehrere Verfahren.
Eine Methode der chemischen Synthese von 1-Butanol ist der von Walter Reppe 1942 entwickelte Prozess, bei dem Propen direkt zu 1-Butanol umgesetzt wird. Hierbei wird

ein Eisenpentacarbonylkatalysator verwendet (Abbildung 2b). Dieses Verfahren wurde allerdings auf Grund zu hoher Kosten im Jahre 1984 wieder eingestellt (von Kutepow und Kindler, 1960; Weißermel und Arpe, 2003).

Aus diesem Grund wird 1-Butanol heutzutage hauptsächlich durch das Verfahren der Oxo-Synthese, auch Hydroformulierung genannt (Abbildung 2a), hergestellt. Dieses Verfahren wurde von Otto Roelen im Jahre 1938 entdeckt. Bei der Oxo-Synthese handelt es sich um einen Zwei-Schritt-Prozess, wobei zunächst Propen mit einem Gemisch aus CO und H_2 (Synthesegas), Hitze (120-300 °C), Druck (150 bar) und eines Katalysators, meist Rhodium oder Kobalt, zu einem Aldehydgemisch umgewandelt wird. Dieses Aldehydgemisch besteht zu 65-75 % aus Butyraldehyd (je nach Prozessbedingungen), welches an einem Nickel- oder Kupferkatalysator zu 1-Butanol hydriert wird (Bahrmann und Bach. 2005; Weißermehl und Arpe, 2003).

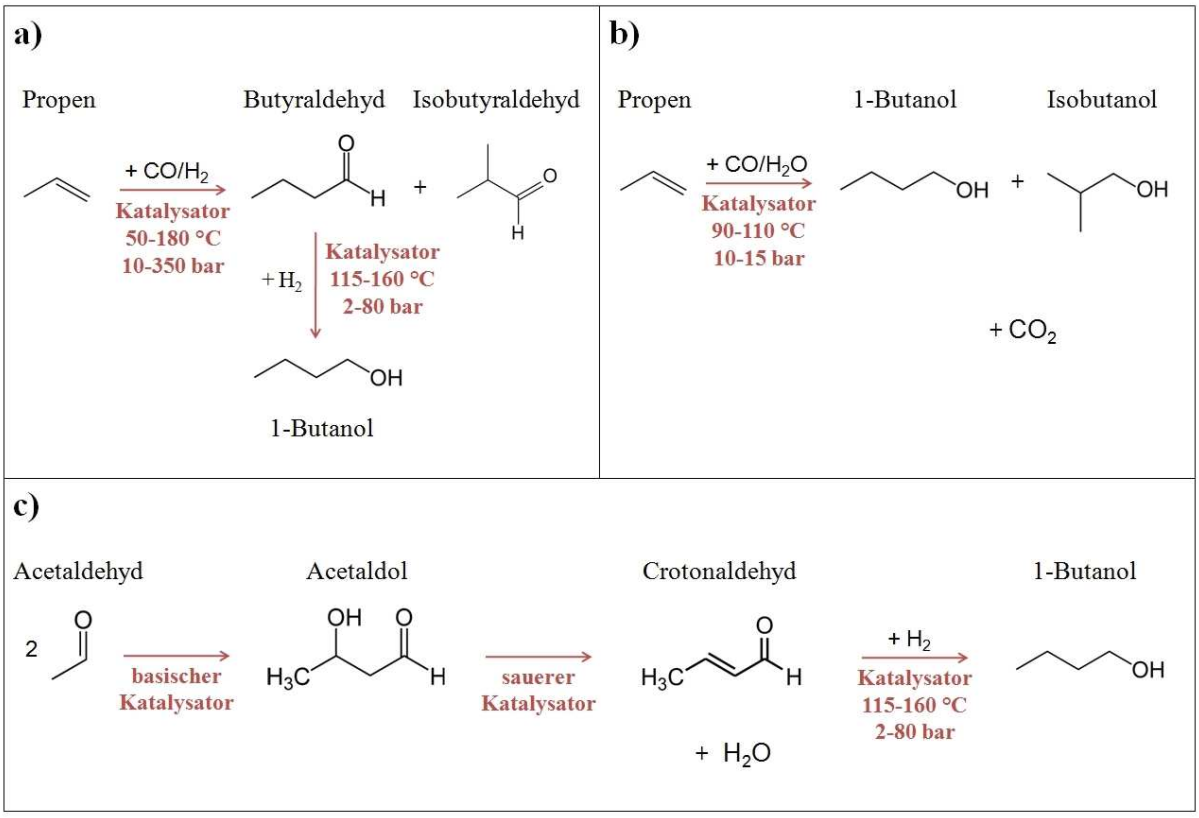


Abbildung 2: Chemische Verfahren zur Herstellung von 1-Butanol; **a:** Hydroformylierung; **b:** Reppe-Prozess; **c:** Acetaldolkondensation mit anschließender Crotonaldehyd-Hydrierung (Köpke, 2009)

Das Problem bei diesen beiden Verfahren ist, dass der Ausgangsstoff Propen aus Erdöl gewonnen wird. Wie allgemein bekannt ist, ist Erd- bzw. Rohöl eine Ressource, welche durch ihre hohe Nachfrage immer weiter abnimmt, was zu einer regelrechten Preisexplosion am Markt führt. So lag im Jahre 2000 der Jahresmittelpreis für ein Barrel Rohöl noch bei ca. 29 USD, 2009 war der Preis mit 62 USD schon doppelt so teuer und 2011 ist mit 107 USD/Barrel das bisher teuerste Öljahr in der Geschichte (Abbildung 3; www.tecson.de/historische-oelpreise.html). Da die Industrie stetig wächst, allen voran in China und Indien, wird die Nachfrage nach Kraftstoffen weiterhin steigen. Eine sichere Alternative zu Kraftstoffen ist bisher noch nicht ausgereift. Rohöl hat nach den steigenden Kosten einen weiteren, gravierenden Nachteil. Bei der Verwendung von Rohöl als Kraftstoff, also dessen Verbrennung, werden enorme Mengen an CO_2 freigesetzt, welches, wie allgemein bekannt ist, ein Treibhausgas ist. Somit reichert sich durch die Verbrennung von Rohöl die Atmosphäre immer weiter mit CO_2 an, was zu einer Erhöhung der durchschnittlichen Temperatur der Erdoberfläche führt, dem Treibhauseffekt. Eine Verwendung von Rohöl ist somit weder wirtschaftlich noch ökologisch erstrebenswert.

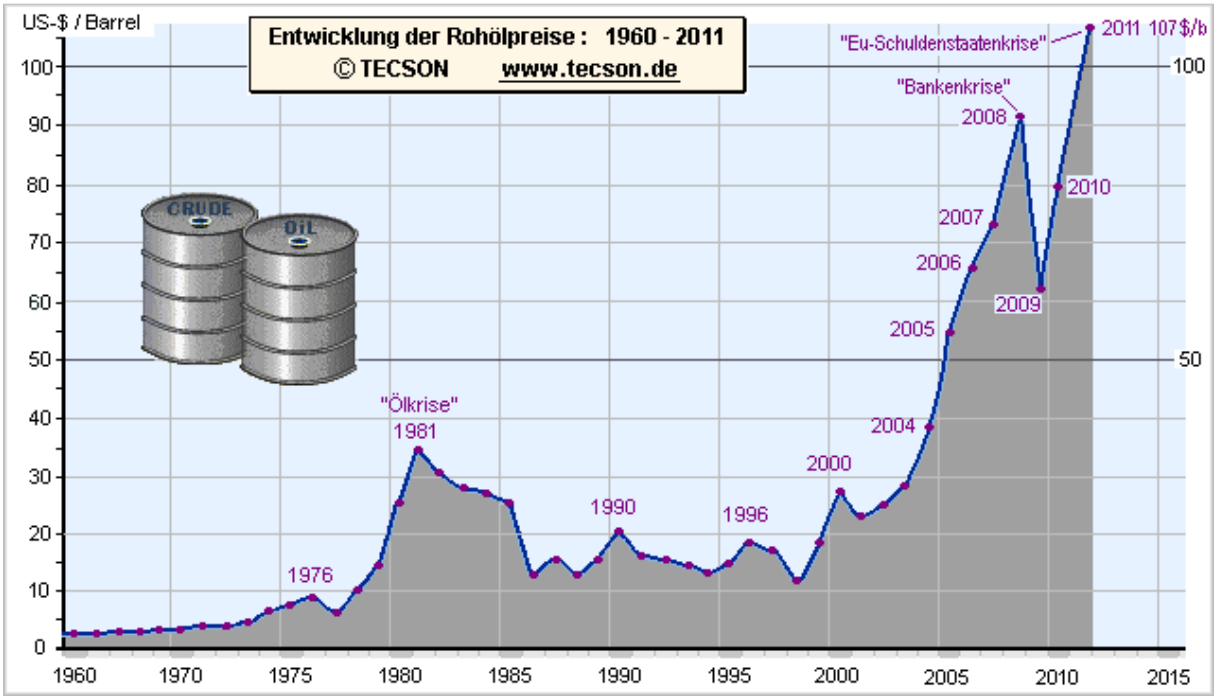


Abbildung 3: Historische Rohölpreise von 1960 bis 2011 in USD pro Barrel Rohöl (www.tecson.de/historische-oelpreise.html)

Um dieses Problem zu umgehen, gibt es ein alternatives Verfahren der chemischen 1-Butanolsynthese ausgehend vom Acetaldehyd (Abbildung 2c). Hierbei wird Acetaldehyd durch einen basischen Katalysator zu Acetaldol und anschließend durch einen sauren Katalysator zu Crotonaldehyd umgesetzt. Crotonaldehyd wird dann mit Hilfe eines weiteren Katalysators zu 1-Butanol umgesetzt. Dieses Verfahren ist jedoch sehr aufwendig, und es entstehen erhebliche Mengen an giftigem Abwasser (Weißermel und Arpe, 2003), was wiederum zu Umweltproblemen führen kann.

Neben der chemischen Synthese kann 1-Butanol auch biotechnologisch hergestellt werden. Hier stellt die sogenannte ABE-Fermentation (**A**ceton-**B**utanol-**E**thanol) der Clostridien eine alternative 1-Butanolherstellung dar. Neben der Ethanol-Fermentation ist dies der größte biotechnologische Prozess, der auf der Erde betrieben wurde. Chaim Weizmann isolierte 1913 einen Clostridien-Stamm, welcher eine große Menge an Aceton und 1-Butanol produzierte. Dieser Organismus wurde später als *Clostridium acetobutylicum* bekannt. Nach seiner Entdeckung meldete C. Weizmann diesen Prozess im Jahre 1915 zum Patent an (Weizmann, 1915). Heutzutage können *C. acetobutylicum*-Stämme zwischen 10 und 16 g/L 1-Butanol produzieren (Kumar und Gayen, 2011).
Am Interessantesten ist die Verwendung von 1-Butanol als alternativer Kraftstoff. 1-Butanol kann als Gemisch oder auch unverdünnt als Treibstoff verwendet werden. Es gibt bereits Biokraftstoffe, wie Bioethanol oder Biobutanol, die umweltschonender und günstiger sind als Rohöl. Biobutanol hat aber gegenüber dem wohl eher bekannten Bioethanol einige Vorteile. So hat 1-Butanol zum Beispiel einen Energiewert von ca. 30,65 MJ/L und Bioethanol 21,2 MJ/L. Durch seine nicht korrosive Eigenschaft kann Biobutanol problemlos in Pipelines statt wie Bioethanol in Tanks transportiert werden (www.butanol.com). Biobutanol kann nahezu unbegrenzt mit Benzin gemischt oder auch pur verwendet werden, wobei Bioethanol nur bis zu 85% Benzin beigemischt werden kann. Weiterhin hat Biobutanol einen niedrigeren Dampfdruck als Bioethanol und ist somit weniger gefährlich und eine Umrüstung der bisherigen Maschinen bei der Verbrennung von Biobutanol ist nicht notwendig (Dürre, 2007).
Biokraftstoffe werden bisher mit Hilfe von Pflanzen gewonnen, was prinzipiell eine lobenswerte Alternative zu Rohöl darstellt. Allerdings stellt sich auch hier die Frage der

Wirtschaftlichkeit, da die Getreidepreise, wie in Abbildung 4 zu sehen ist, ebenfalls stetig steigen (Statistisches Bundesamt, 2011).

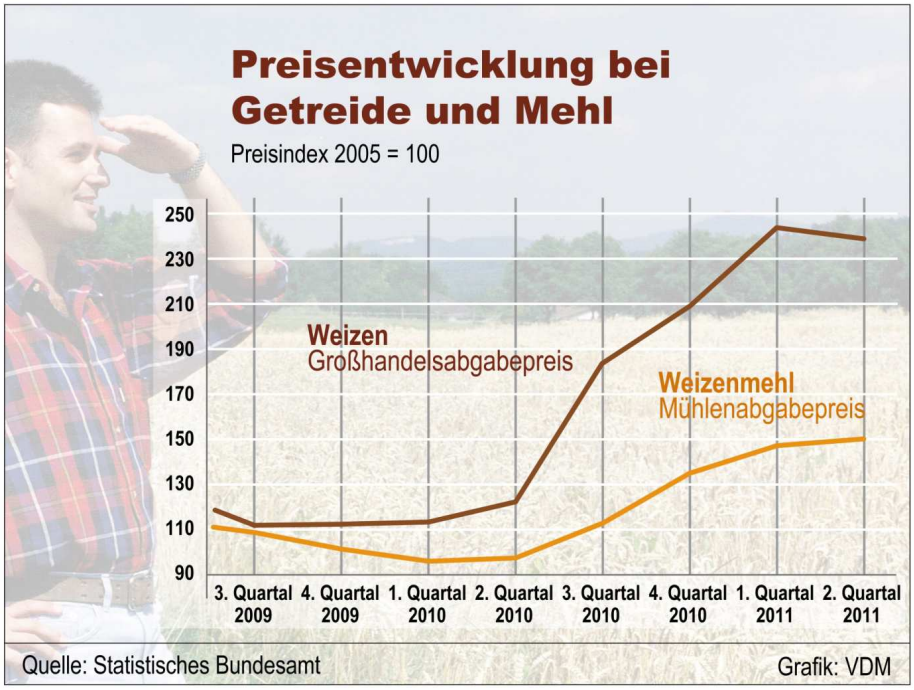


Abbildung 4: Preisentwicklung bei Mehl und Getreide von 2009-2011(http://bauernblog.de/muhlen-sichern-qualitat-in-schwieriger-lage)

Eine erstrebenswerte und notwendige Alternative der 1-Butanolherstellung zeigt sich deshalb im biotechnologischen Weg mit Hilfe rekombinanter Organismen. Idealerweise verwerten die Organismen ein Abfallprodukt unserer Gesellschaft und produzieren das für uns notwendige 1-Butanol. In dieser Arbeit sollen Gene für die 1-Butanol-Synthese auf einem Plasmid in acetogene Organismen oder Lactobacillen gebracht werden, welche in der Lage sind, hydrolysierte Lignocellulose-Biomasse (LCB-Hydrolysat), z.B. Weizenstroh als Nebenprodukt aus der Landwirtschaft oder Rübensubstrat zu verwerten, um so eine nachhaltige 1-Butanolproduktion zu gewährleisten. Die in dieser Arbeit verwendeten acetogenen Organismen haben den Vorteil, dass sie neben Zucker auch autotroph CO_2/H_2, CO/H_2 oder Synthesegas als Kohlenstoffquelle nutzen können. Sie sind somit in der Lage das Abfallprodukt und den „Klimakiller“ CO_2 zu verwerten.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien, Enzyme, Materialien und Geräte

2.1.1. Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

- Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden
- Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
- GERBU Biotechnik GmbH, Gaiberg
- Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze
- Merck KGaA, Darmstadt
- Otto Nordwald GmbH, Hamburg
- Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
- SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg

2.1.2. Gase

Alle in dieser Arbeit verwendeten Gase und Gasgemische wurden von der Firma MIT Industriegase AG, Neu-Ulm, bezogen und sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: Gase und Gasgemische

Gas/Gasgemisch	Zusammensetzung	Verwendung
CO_2 + N_2	80 % N_2 20% CO_2	Medienherstellung
Formiergas	95 % N_2 5% H_2	Anaerobenkammer
Stickstoff	100 % N_2	Trägergas des GC, Medienherstellung

Gas/Gasgemisch	Zusammensetzung	Verwendung
Synthetische Luft	79 % N_2 21 % O_2	FID GC
Wasserstoff	100 % H_2	FID GC

2.1.3. Enzyme

Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von der MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot bezogen. Alle weiteren in dieser Arbeit eingesetzten Enzyme sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Enzyme

Enzym	Lieferant / Hersteller
Lysozym (84468 U/mg)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Proteinase K (2,5 U/mg)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
RNase A (5 U/mg)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
ReproFast Polymerase (5 U/mg)	Genaxxon BioScience GmbH, Ulm
Taq Polymerase	Genaxxon BioScience GmbH, Ulm
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) (1 U/mg)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
T4-DNA Ligase (1 U/mg)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

2.1.4. Molekularbiologische Hilfsmittel

Als DNA-Größenstandard für die Agarosegelelektrophorese wurde der „GeneRuler™ DNA Ladder Mix" (2.5.4.2) und als Ladepuffer die „6x Loading Dye Solution" verwendet, welche von der Firma MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, bezogen wurden. Weiterhin wurden in dieser Arbeit die in Tabelle 3 aufgelisteten „Kits“ als molekularbiologische Hilfsmittel verwendet.

Tabelle 3: Verwendete „Kits“

„Kit“	**Lieferant / Hersteller**
DNA Clean & Concentrator™-5 Kit	Hiss Diagnostics GmbH, Freiburg
L-Lactic acid Test Kit	r-biopharm, Mannheim
Qiagen PCR Cloning Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit	Hiss Diagnostics GmbH, Freiburg
Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit	Hiss Diagnostics GmbH, Freiburg

2.1.5. Geräte

In Tabelle 4 sind alle Geräte aufgelistet die für diese Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 4: Verwendete Geräte

Gerät	**Hersteller**
Agarose-Gelelektrophorese-Kammer	Werkstatt der Universität Ulm
Anaerobenkammer	Werkstatt der Universität Ulm
Brutschrank „B 5050 T“	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Eismaschine „Scotsman AF-200“	Scotsman Ice Systems, Mailand (Italien)

Gerät	Hersteller
Elektrophorese „Power Supply ST 606“	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Elektrophorese „EPS 601“	amersham pharmacia biotech, Freiburg
Elektroporationsgerät „GenePulser XCell“	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Filmentwickler „P93D“	Mitsubishi
Gaschromatograph „Clarus 600“	PerkinElmer GmbH, Rodgau-Jügesheim
Heizblock	Technische Werkstatt des Instituts für Mikrobiologie und Genetik, Universität Göttingen
Heizpilz (2 L)	Tyco Thermal Controls GmbH, Heidelberg
Heizpilz (4 L)	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Inkubationsschüttler (30 °C) „Certomat SII“	Sartorius AG, Göttingen
Inkubationsschüttler (37 °C) „HT“	Infors GmbH, Einsbach
Inkubationsschüttler (30 °C) für Reagenzgläser „Certomat SSI“	Sartorius AG, Göttingen
Inkubationsschüttler (37 °C) für Reagenzgläser „G24 Environmental Incubation Shaker“	New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen
Magnetrührer „IKAMAG® RCT“	IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen
PCR-Maschine „PTC-200“	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
pH-Messgerät „WTW pH 521“	WTW Wissenschaftliche-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim
Photodokumentationsanlage „Gelprint 2000i“	MWG Biotech AG, Ebersberg
Reinstwasseranlage „PURELAB Classic“	ELGA LabWater, Celle
Spektralphotometer „Ultrospec 3100 pro“	GE Healthcare Europe GmbH, München
Spektralphotometer für Röhrchen „Genesys 10vis“	Thermo Fischer Scientific, Dreieich

Gerät	Hersteller
Sterilfilter „Filtropur S 0,2“	Sarstedt, Nürnbrecht
Tischzentrifuge „Biofuge *pico*“	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Tischzentrifuge „Mini Spin®“	Eppendorf AG, Hamburg
Ultraschallbad	Bandelin electronic GmbH & Co.KG, Berlin
UV-Schirm „UST-30L-8E“ (365 nm)	biostep GmbH, Jahnsdorf
UV-Schirm „TFP-M/WL“ (312 nm)	biostep GmbH, Jahnsdorf
Vortexer „K-550-GE“	Bender & Hobein AG, Schweiz
Waage „TE 412“	Sartorius AG, Göttingen
Waage „AE 163“ (Feinwaage)	Mettler-Toledo GmbH, Giessen
Waage „BP 8100“	Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad „GFL“	GFL-Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Zentrifuge für Hungate-Röhrchen „EBA 20“	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen

2.1.6. Software

In dieser Arbeit wurden die in Tabelle 5 aufgelisteten Softwareprogramme zur Erstellung von Klonierungsstrategien sowie Genkarten verwendet.

Tabelle 5: Software

Software	**Hersteller**
Clone Manager Suite 7	Scientific & Educational Software, Cary (USA)
Enhance Map Draw 4.1	Scientific & Educational Software, Cary (USA)
TotalChrom® Chromatography Data System	PerkinElmer GmbH, Rodgau-Jügesheim

2.2. Bakterienstämme, Plasmide und Oligodesoxynukleotide

2.2.1. Bakterienstämme

In Tabelle 6 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme aufgelistet.

Tabelle 6: Bakterienstämme

Stamm	Relevanter Geno- oder Phänotyp	Herkunft/Referenz
Acetobacterium woodii DSM 1030	Typstamm	DSMZ, Braunschweig
Blautia coccoides DSM 935	Typstamm	DSMZ, Braunschweig
Blautia producta DSM 3507	Typstamm	DSMZ, Braunschweig
Butyrivibrio fibrisolvens DSM 3071	Typstamm	DSMZ, Braunschweig
Bacillus coagulans DSM 1	Typstamm	DSMZ, Braunschweig
Bacillus coagulans	isolierter Stamm	diese Arbeit
Clostridium aceticum DSM 1496	Typstamm	DSMZ, Braunschweig
Clostridium carboxidivorans DSM 15243	Typstamm	DSMZ, Braunschweig
Clostridium drakei DSM 14770	Typstamm	DSMZ, Braunschweig
Clostridium mayombei DSM 6539	Typstamm	DSMZ, Braunschweig
E. coli BL21 (DE3)	F^- *ompT gal dcm lon* $hsdS_B(r_B^- m_B^-)$ *λ*(DE3) *pLysS*(Cm^R)	Stratagene, La Jolla, (USA)

Stamm	Relevanter Geno- oder Phänotyp	Herkunft/Referenz
E. coli CA434	*hsdS* (r_B^- m_B^-) *supE44 thi-1 recAB ara-14 leuB5pro A2 lacY1 galK rpsL20* (Str^R) *xyl-5 mtl-1* (pACYC184::Sau5)	Purdy *et al*., 2002
E. coli DH5α	*F⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 hsdR17*(r_K^- m_K^+) *λ–*	Hanahan, 1985
E. coli HB101	*F⁻ mcrB mrr hsdS20*(r_B^- m_B^-) *recA13 leuB6 ara-14 proA2 lacY1 galK2 xyl-5 mtl-1 rpsL20*(Sm^R) *glnV44 λ*$^-$	Boyer und Poullanddussoix, 1969
E. coli JM109	*endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 recA1 mcrB*$^+$ *Δ(lac-proAB) e14- [F' traD36 proAB*$^+$ *lacI*^{q} *lacZΔM15] hsdR17*($r_K^-m_K^+$)	Yanish-Perron *et al*., 1985
E. coli XL1-Blue MRF’	*Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr) 173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* [F′ *proAB lacI*^{q}*ZΔM15 Tn10* (Tet^R)]	Stratagene, La Jolla (USA)
Lactobacillus hilgardii DSM 20051	Typstamm	DSMZ, Braunschweig
Lactobacillus hilgardii	isolierter Stamm	diese Arbeit
Lactobacillus pantheris DSM 15945	Typstamm	DSMZ, Braunschweig
Lactobacillus pantheris	isolierter Stamm	diese Arbeit
Lactobacillus plantarum DSM 1055	Typstamm	DSMZ, Braunschweig
Lactobacillus plantarum	isolierter Stamm	diese Arbeit

2.2.2. Plasmide

In Tabelle 7 sind alle in dieser Arbeit verwendeten und konstruierten Plasmide aufgelistet.

Tabelle 7: Plasmide

Plasmid	Größe (kBp)	Relevante Merkmale	Herkunft/Referenz
p256	7,2	ori256	Sorvig *et al*., 2004
pANS1	6,2	pACYC148/p15A *ori* (*rep*), Sp^R, Methyltransferase-Gen des Phagen Φ3T	Böhringer, 2002
pBR322	4,3	pMB1 *oriV*, Ap^R, Tc^R	Bolivar *et al.*, 1977
pIMP1	4,7	Ap^R , MLS^R, ColE1 *oriR* pIMP13*oriR*$^+$	Mermelstein *et al.*, 1992
pDrive	3,8	pMB1/ColE1 *ori* (*rep*) f1 *ori,* Ap^R, Km^R	Qiagen GmbH, Hilden
pUC18	2,7	Ap^R, *lac*POZ‘, MB1 *oriR*	Vieira und Messing, 1982
pACYC184	4,2	p15A, Tc^R, Cm^R	DSMZ, Braunschweig
pMClj	7,2	pACYC184, Methyltransferase-Gen aus *C. ljungdahlii*, Cm^R	diese Arbeit
pMCljS	7,6	pACYC184, Methyltransferase-Gen *C. ljungdahlii*, Sp^R	diese Arbeit
pBRMClj	7,3	pBR322, Methyltransferase-Gen *C. ljungdahlii*	diese Arbeit

Plasmid	Größe (kBp)	Relevante Merkmale	Herkunft/Referenz
pSB3C5	3,8	pSB3/p15A *ori (rep) ccdB,* Cm^R	ATG:biosynthetics GmbH, Freiburg
pSB3C5-UUMKS 1	12,6	pSB3C5, P_{ptb}, *crt, bcd, etfB, etfA, hbd,* P_{ptb}, *thlA, catP,* P_{ptb}, *ald, bdhB,* Cm^R	ATG:biosynthetics GmbH, Freiburg
pSB3C5-UUMKS 2	12,5	pSB3C5, P_{ptb}, *crt, bcd, etfB, etfA, hbd,* P_{ptb}, *thlA, catP,* P_{ptb}, *adhE,* Cm^R	ATG:biosynthetics GmbH, Freiburg
pSB3C5-UUMKS 3	12,5	pSB3C5, P_{ptb}, *crt, bcd, etfB, etfA, hbd,* P_{ptb}, *thlA, catP,* P_{ptb}, *adhE2,* Cm^R	ATG:biosynthetics GmbH, Freiburg
pMW1	14,6	pSB3C5-UUMKS1, *ori repL*, Em^R	diese Arbeit
pMW2	14,5	pSB3C5-UUMKS2 *ori repL*, Em^R	diese Arbeit
pMW1-ori256	13,6	pSB3C5-UUMKS1, *ori256*	diese Arbeit
pMW2-ori256	13,4	pSB3C5-UUMKS2, *ori256*	diese Arbeit
pMW3-ori256	13,4	pSB3C5-UUMKS3, *ori256*	diese Arbeit
pUC18-ori256	3,6	pUC18, *ori256*	diese Arbeit

2.2.3. Oligodesoxynukleotide

In Tabelle 8 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Oligodesoxynukleotide aufgelistet. Diese wurden ausschließlich von der Firma biomers.net GmbH, Ulm, bezogen. Eingefügte Restriktionsschnittstellen sind fett und/oder farbig hervorgehoben.

Tabelle 8: Oligodesoxynukleotide

Name	Sequenz (5‘ – 3‘)	Enzym
adhE2-REV	ACAGAATTCCATCGTAG	-
adhE2-FW	GTTAGCCCTTAG	-
F-ermC-repL-NheI	ACAGCTAGCGCATCAGATTG	*Nhe*I
R-ermC-repL-NheI	ACAGCTAGCCGTGGTGTTATTG	*Nhe*I
Meth-C.ac.-SalI-FWD	ACACTGGACGTAGCACCTGAAGTCAGC	*Sal*I
Meth-C.ac.-SalI-REV	CACCTGGACCAGCAGCAATGC	*Sal*I
Orf-18-F-XbaI	ACA**TCTAGA**GTACACCAAACGAAGTGC	*Xba*I
Orf-18-R-KpnI-PaeI	ACA**GGTACC**GCATGCCTGCCAGTAGTAATGTACCG	*Kpn*I, *Pae*I
Orf18-FWD-NdeI	GACGTGAA**CATATG**GACGATATG	*Nde*I
Orf18-REV-NdeI	GCCAGT**CATATG**GTACCGACAGATTTAATAG	*Nde*I
P256-FWD-PstI	ACA**CTGCAG**GAAGCCCACAAG	*Pst*I
P256-REV-PstI	ACA**CTGCAG**GGTCTACGTGACTACTAG	*Pst*I
pBR-Met FW	CAACCTACTACTGG	-
pBR-Met REV	CTGGGTTGAAGGCTC	-
pBR-Met-Mitte	GAGGATACCGACAAGG	-
pSB3C5-1-repL-F	GTCGACTTAACTCCATCTGC	-

Name	Sequenz (5‘ – 3‘)	Enzym
pSB3C5-1-repL-R	CTGATTACCGCCTTTGAGTGAG	-
Ptb-R-XbaI	ACA**TCTAGA**GCTTAACTATGCGGCATC	*Xba*I
Ptb-F-PaeI-KpnI	ACA**GCATGC****GGTACC**GATTAAGCTTGGCTGCAGG	*Pae*I, *Kpn*I
ptb/orf18-PaeI-F	ACA**GCATGC**GATTAAGCTTGGCTGCAGG	*Pae*I
ptb/orf18-PaeI-R	ACA**GCATGC**GCTTAACTATGCGGCATC	*Pae*I
repL-ermC-PstI-F	AAG**CTGCAG**AAAGCCATGCTCTGACGC	*Pst*I
repL-ermC-PstI-R	GTCGAC**CTGCAG**CCAAGCTTAATCG	*Pst*I
Spec-Kpn2I-R	ACA**TCCGGA**GTACCTATAACCAGACCG	*Kpn*2I
Spec-Kpn2I-F	ACA**TCCGGA**GACTCTAGAGGATC	*Kpn*2I
R-Spec-pEGEX-Kpn2I	ACA**TCCGGA**GTTGCTGACTCATACC	*Kpn*2I
F-Spec-pEGEX-Kpn2I	ACA**TCCGGA**ACGGGAAACGTCTTG	*Kpn*2I
RP-2 (16S)*	CCCGGGATCCAAGCTTACGGCTACCTTGTTACGACTT	-
FD-1 (16S)*	CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	-

* Weisburg *et al.,* 1991

2.3. Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

2.3.1. Nährmedien und Medienzubereitung

Für die Herstellung aerober Flüssigmedien wurden die jeweiligen Bestandteile in Wasser aus der Reinstwasseranlage gelöst, aliquotiert und für mindestens 15 min bei 1,2 bar Druck autoklaviert. Zur Vermeidung chemischer Reaktionen einzelner Komponenten untereinander wurden diese separat autoklaviert und anschließend den jeweiligen Medien zugegeben. Hitzelabile Bestandteile wurden steril filtriert und danach dem abgekühlten Medium zugegeben.

Anaerobe Medien wurden, wenn nicht anders angegeben, nach dem Lösen für 20 min gekocht, unter N_2-Begasung abgekühlt, in der Anaerobenkammer aliquotiert und für 15 min bei 1,2 bar Druck autoklaviert. Außerdem wurde den anaeroben Medien 1 mg/L Resazurin zugegeben, welches als Sauerstoff- und pH-Indikator dient. Mit hitzelabilen sowie reaktiven Komponenten wurde wie oben angegeben verfahren.

Aerobe, feste Medien wurden durch Zugabe von 1,5 % (w/v) Agar vor dem Autoklavieren zu den Flüssigmedien hergestellt. Anaeroben Medien wurde zur Verfestigung der Agar nach dem Abkühlen zugegeben. Für eine mögliche Selektion wurden den festen Medien nach dem Autoklavieren und nach Abkühlung auf ca. 40 °C des Mediums entsprechende Antibiotika (Tabelle 9) zugegeben und in Petrischalen gegossen. Diese wurden über Nacht bei Raumtemperatur (RT) getrocknet und bis zum Gebrauch bei 4 °C gelagert.

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Nährmedien aufgelistet. Spezielle Medien und/oder Puffer sind unter den jeweiligen Methoden angegeben.

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

NH_4Cl	1,00	g	18,7	mM
KH_2PO_4	0,33	g	2,4	mM
K_2HPO_4	0,45	g	2,6	mM
$MgSO_4$ x 7 H_2O	0,10	g	0,4	mM
Wolfe Minerallösung	20,00	ml	2,0	% (v/v)
Wolfe Vitaminlösung	20,00	ml	2,0	% (v/v)
Hefeextrakt	2,00	g	0,2	% (w/v)
Fructose	10,00	g	55,0	mM
$NaHCO_3$	10,00	g	0,1	mM
Cystein-HCl x H_2O	0,50	g	2,8	mM
Na_2S x 9 H_2O	0,50	g	2,1	mM
destilliertes H_2O	ad 1000	ml		

Alle Bestandteile bis auf die Fructose wurden in Wasser gelöst, aliquotiert und mit N_2 + CO_2 (80 % + 20 %) begast, bis ein pH-Wert von 7,4 erreicht wurde. Anschließend wurde das Medium autoklaviert, wonach 25 ml/L einer 5 %igen Na_2CO_3-Lösung sowie die Fructose steril zugegeben wurden. Für *C. aceticum* wurde der pH-Wert auf 8,2 und für *A. woodii* auf 7,4 eingestellt.

Wolfe Minerallösung :

Nitrilotriessigsäure	1,50	g	10,50	mM
$MgSO_4$ x 7 H_2O	3,00	g	12,00	mM
$MnSO_4$ x H_2O	0,50	g	3,00	mM
NaCl	1,00	g	17,00	mM
$FeSO_4$ x 7 H_2O	0,10	g	0,35	mM
$CoSO_4$ x 7 H_2O	0,10	g	0,50	mM
$CaCl_2$ x 2 H_2O	0,10	g	0,75	mM
$ZnSO_4$ x 7 H_2O	0,10	g	0,40	mM
$CuSO_4$ x 5 H_2O	0,01	g	0,04	mM
$KAI(SO_4)_2$ x 12 H_2O	0,01	g	0,02	mM
H_3BO_3	0,01	g	0,16	mM
Na_2MoO_4 x 2 H_2O	0,01	g	0,04	mM
destilliertes H_2O	ad 1000	ml		

Für die Herstellung der Minerallösung wurden zunächst die Nitrilotriessigsäure bei einem pH-Wert von 6,5 vollständig gelöst und anschließend die Minerale zugegeben. Mit KOH wurde ein finaler pH-Wert von 7,0 eingestellt.

Wolfe Vitaminlösung:

Biotin (Vitamin H)	2,00	mg	8,0	µM
Folsäure (Vitamin B_9)	2,00	mg	4,5	µM
Pyridoxin-HCl (Vitamin B_6)	10,00	mg	49,0	µM
Thiamin-HCl (Vitamin B_1)	5,00	mg	15,0	µM
Riboflavin (Vitamin B_2)	5,00	mg	13,0	µM
Nicotinsäureamid (Vitamin PP)	5,00	mg	41,0	µM
D-Ca-Pantothenat	5,00	mg	10,5	µM
Cyanocobalamin (Vitamin B_{12})	0,10	mg	74,0	µM
p-Aminobenzoesäure	5,00	mg	36,0	µM
Liponsäure	5,00	mg	24,0	µM
destilliertes H_2O	ad 1000	ml		

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

K_2HPO_4	0,35	g	2,0	mM
KH_2PO_4	0,23	g	1,7	mM
NH_4Cl	0,50	g	9,3	mM
$MgSO_4$ x 7 H_2O	0,50	g	2,0	mM
$CaCl_2$ x 2 H_2O	0,25	g	1,7	mM
NaCl	2,25	g	38,5	mM
$FeSO_4$	2,00	mg	13,0	µM
Wolfe Vitaminlösung	10,00	ml	1,0	% (v/v)
Minerallösung	1,00	ml	0,1	% (v/v)
$NaHSeO_3$	0,015	mg	0,1	µM
Hefeextrakt	2,00	g	0,2	% (w/v)
Casiton	2,00	g	0,2	% (w/v)
Glucose	2,00	g	11,1	mM
Dithiothreitol	0,15	g	1,0	mM
destilliertes H_2O	ad 1000	ml		

Alle Bestandteile bis auf die Phosphate wurden in Wasser gelöst, aliquotiert und mit N_2 + CO_2 (80 % + 20 %) begast, bis ein pH-Wert von 7,4 erreicht wurde. Anschließend wurde das Medium autoklaviert, wonach die Phosphate steril zugegeben wurden. Der finale pH-Wert betrug 7,0.

Minerallösung (zu DSMZ Medium 515):

HCl	10,00	ml	0,10	% (v/v)
$FeCl_2$ x 4 H_2O	1,50	g	7,50	mM
$ZnCl_2$	70,00	mg	0,50	mM
$MnCl_2$ x 4 H_2O	100,00	mg	0,50	mM
H_3BO_3	6,00	mg	0,10	mM
$CoCl_2$ x 6 H_2O	190,00	mg	0,90	mM
$CuCl_2$ x 2 H_2O	2,00	mg	0,07	mM
$NiCl_2$ x 6 H_2O	24,00	mg	0,10	mM
Na_2MoO_4 x 2 H_2O	36,00	mg	0,15	mM
destilliertes H_2O	ad 990	ml		

Für die Herstellung der Minerallösung wurde zunächst das $FeCl_2$ in HCl gelöst und mit Wasser verdünnt, erst dann wurden alle weiteren Komponenten zugegeben.

Chopped-Meat-Medium (für ***B. coccoides***, DSMZ Medium **110**)

Cooked Meat (Medium Oxoid CM 81)	500,0	g	50,0	% (w/v)
Glucose	4,0	g	22,0	mM
Cellobiose	1,0	g	2,9	mM
Maltose	1,0	g	2,9	mM
lösliche Stärke	1,0	g	6,2	mM
destilliertes H_2O	ad 1000	ml		

Clostridium ljungdahlii*-Medium** (für ***C. ljungdahlii, DSMZ Medium **879**)

NH_4Cl	1,00	g	19,0	mM
KCl	0,10	g	1,35	mM
$MgSO_4$ x 7 H_2O	0,20	g	0,80	mM
NaCl	0,80	g	14,00	mM
KH_2PO_4	0,10	g	0,70	mM
$CaCl_2$ x 2 H_2O	0,02	g	0,15	mM
Hefeextrakt	1,00	g	0,10	% (w/v)
Wolfe Minerallösung	10,00	ml	1,00	% (v/v)
Na_2WO_4	0,20	mg	0,60	µM
Wolfe Vitaminlösung	10,00	ml	1,00	% (v/v)
$NaHCO_3$	1,00	g	11,90	mM
Fructose	5,00	g	27,75	mM
destilliertes H_2O	ad 1000	ml		

Alle Bestandteile dieses Mediums bis auf die Fructose wurden in Wasser gelöst, wie oben beschrieben anaerobisiert und autoklaviert. Die Fructose wurde anschließend steril dem Medium zugegeben. Mit Hilfe der Reduktionsmittel wurde das Medium auf einen finalen pH-Wert von 5,9 eingestellt.

Reduktionsmittel:

Cystein-HCl-Stammlösung

Cystein-HCl x H_2O	4,0	g	228,0	mM
destilliertes H_2O	ad 100	ml		

Das Cystein-HCl wurde in anaerobem Wasser gelöst und anschließend autoklaviert.

Natriumsulfid und Cystein-HCl-Stammlösung

Cystein-HCl x H_2O	4,0	g	228,0	mM
Na_2S x 9 H_2O	4,0	g	166,5	mM
destilliertes H_2O	ad 100	ml		

Zuerst wurde das Cystein-HCl in einer anaeroben NaOH-Lösung (225 mM) gelöst und anschließend das Na_2S x 9 H_2O zugegeben. Danach wurde die Lösung autoklaviert.

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

Trypticase Pepton	5,0	g	0,5	% (w/v)
Pepton vom Fleisch	5,0	g	0,5	% (w/v)
Hefeextrakt	10,0	g	1,0	% (w/v)
Glucose	5,0	g	27,8	mM
Salzlösung (siehe unten)	40,0	ml	4,0	% (v/v)
Cystein-HCl x H_2O	0,5	g	3,0	mM
destilliertes H_2O	ad 1000	ml		

Der pH-Wert wurde mit Hilfe von Cystein-HCl nach dem Abkühlen des Mediums auf 7,0 eingestellt.

Salzlösung:

$CaCl_2$ x 2 H_2O	0,25	g	1,7	mM
$MgSO_4$ x 7 H_2O	0,50	g	2,0	mM
K_2HPO_4	1,00	g	5,7	mM
KH_2PO_4	1,00	g	7,4	mM
$NaHCO_3$	10,00	g	119,0	mM
NaCl	2,00	g	34,2	mM
destilliertes H_2O	ad 1000	ml		

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

Minerallösung (siehe unten)	38,00	ml	3,80	% (v/v)
K_2HPO_4	0,30	g	1,70	mM
Trypticase Pepton (BBL)	2,00	g	0,20	% (w/v)
Hefeextrakt	0,50	g	0,05	% (w/v)
Fettsäurelösung (siehe unten)	3,10	ml	0,31	% (v/v)
Hämin	1,00	mg	15,0	µM
Glucose	0,50	g	2,80	mM
Maltose	0,50	g	1,50	mM
Cellobiose	0,50	g	1,50	mM
lösliche Stärke	0,50	g	3,10	mM
Glycerin	0,50	g	5,40	mM
Na_2CO_3	4,00	g	37,8	mM
Cystein-HCl x H_2O	0,25	g	1,50	mM
Na_2S x 9 H_2O	0,25	g	1,00	mM
destilliertes H_2O	ad 960	ml		

Die Begasung dieses Mediums erfolgte mit N_2 + CO_2 (80 % + 20 %). Der finale pH-Wert betrug 6,8.

Minerallösung:

KH_2PO_4	6,0	g	44,1	mM
NaCl	12,0	g	205,0	mM
$(NH_4)_2SO_4$	6,0	g	45,5	mM
$CaCl_2$ x 2 H_2O	1,6	g	11,0	mM
$MgSO_4$ x 7 H_2O	2,5	g	10,1	mM
destilliertes H_2O	ad 1000	ml		

Fettsäurelösung:

Essigsäure	4,25	ml	0,425	% (v/v)
Propionsäure	1,50	ml	0,150	% (v/v)
Buttersäure	1,00	ml	0,100	% (v/v)
n-Valeriansäure	0,25	ml	0,025	% (v/v)
iso-Buttersäure	0,25	ml	0,025	% (v/v)
DL-2-Methyl-Buttersäure	0,25	ml	0,025	% (v/v)
iso-Valeriansäure	0,25	ml	0,025	% (v/v)
destilliertes H_2O	ad 1000	ml		

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

Wilkins-Chalgren (Oxoid Cm 643)	33,0	g	3,3	% (w/v)
$NaHCO_3$	1,0	g	12,0	mM
destilliertes H_2O	ad 100	ml		

LB-Medium (für *E. coli*-Stämme; Sambrook und Russell, 2001)

NaCl	10,0	g	171,0	mM
Hefeextrakt	5,0	g	0,5	% (w/v)
Trypton	10,0	g	1,0	% (w/v)
destilliertes H_2O	ad 1000	ml		

MRS-Medium (für Lactobacillen und *Bacillus*, de Man *et al*., 1960)

MRS (Difco)	55,00	g	5,50	%
destilliertes H_2O	ad 1000	ml		

MRS-mini-Medium (für Lactobacillen und *Bacillus*, diese Arbeit)

Pepton	15,00	g	1,5	% (w/v)
Hefeextrakt	7,00	g	0,7	% (w/v)
Glucose	20,00	g	111,0	mM
K_2HPO_4	2,00	g	11,5	mM
Ammonium Fe(III)-Citrat	2,00	g	2,8	mM
$MgSO_4$ x 7 H_2O	2,00	g	8,1	mM
$MnSO_4$ x H_2O	0,05	g	0,3	mM
destilliertes H_2O	ad 1000	ml		

2.3.2. Medienzusätze

Die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika und Medienzusätze sind Tabelle 9 zu entnehmen. Antibiotika wurden als 1000-fach konzentrierte Stammlösungen und in ihrem jeweiligen Lösungsmittel angesetzt. Alle Lösungen wurden steril filtriert und bei -20 °C aufbewahrt. Nach Abkühlen der Nährmedien auf ca. 50 °C wurden die Antibiotika in den entsprechenden Konzentrationen zugegeben

Tabelle 9: Medienzusätze

Medienzusatz	Lösungsmittel	Stammkonzentration [mg/ml]	Endkonzentration [µg/ml]
Ampicillin	H_2O	100	100
Clarithromycin*	H_2O	5	2,5-5
Colistin	H_2O	10	10
Chloramphenicol	96 % (v/v) Ethanol	30	7,5-30

Medienzusatz	Lösungsmittel	Stammkonzentration [mg/ml]	Endkonzentration [µg/ml]
Erythromycin	96 % (v/v) Ethanol	200	200
Spectinomycin	H_2O	50	50
Tetracyclin	DMF	15	15
IPTG	96 % (v/v) Ethanol	24	24
X-Gal	DMF	20	40

* zur Herstellung von Clarithromycin wurde es zunächst in, mit HCl angesäuertem, Wasser (pH 2) gelöst und anschließend mit NaOH auf einen pH-Wert von 6,7-7 eingestellt.

2.3.3. Kultivierungsbedingungen

Bei aeroben Kulturen erfolgte die Anzucht bis zu einem Volumen von 5 ml in Reagenzgläsern und bei größeren Volumina in Erlenmeyerkolben mit Schikanen auf einem Inkubationsschüttler bzw. auf Agarplatten im Brutschrank.

Die Anzucht von anaeroben Organismen erfolgte bis zu einem Volumen von 5 ml in Hungate-Röhrchen (Bellco Glass Inc., Vineland (USA)) mit Butyl-Gummistopfen (Ochs GmbH, Bovenden) und Schraubdeckeln im Brutschrank. Für größere Volumina wurden Müller-Krempel-Flaschen (Müller & Krempel AG, Bülach (Schweiz)) mit Naturgummistopfen (Maag Technic GmbH, Göppingen) und Edelstahldeckeln verwendet. Agarplatten wurden im Brutschrank in der Anaerobenkammer oder in einem Anaerobentopf inkubiert.

Die Inkubation der Organismen erfolgte, je nach Temperaturoptimum, bei 30 °C bzw. 37 °C.

2.3.4. Stammhaltung

2.3.4.1. Stammhaltung von *E. coli*, *B. coagulans* und Lactobacillen

Die Stammhaltung von *E. coli*-, *Lactobacillus*- und *Bacillus*-Stämmen erfolgte, indem Glycerinkulturen angelegt wurden (Gherna, 1994). Hierzu wurden 500 µl einer über Nacht gewachsenen Kultur mit 500 µl 50 %-igem Glycerin (v/v) versetzt. Diese Suspension wurde in Schraubdeckelröhrchen bei -80 °C gelagert.

2.3.4.2. Stammhaltung von Clostridien, *Blautia coccoides*, *Blautia producta*, *Acetobacterium woodii* und *Butyrivibrio fibrisolvens*

Für die Stammhaltung der *Clostridien*-, *Blautia*-, Acetobacterien und *Butyrivibrio*-Stämme wurden 10 ml einer 2-Tages-Kultur anaerob für 10 min bei 5000 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde in 500 µl frischem, anaeroben Medium suspendiert und mit 500 µl sterilem, anaeroben, 50 %-igem Glycerin versetzt. Diese Suspension wurde bei -80 °C gelagert.

2.4. Bestimmung von Wachstums- und Stoffwechselparametern

2.4.1. Bestimmung der optischen Dichte

Die Bestimmung der optischen Dichte (OD) erfolgte mit Hilfe eines Spektralphotometers. Hierzu wurde die Bakterienkultur in einer 1- ml- Küvette aus Plastik (VWR International GmbH, Darmstadt) mit einer Schichtdicke von 1 cm bei einer Wellenlänge (λ) von 600 nm gegen einen Leerwert (steriles Medium) gemessen. Um einen linearen Messbereich zu gewährleisten, wurden die Proben bei Messwerten ab 0,3 mit sterilem Medium verdünnt.

2.4.2. Gaschromatographische Analysen

Die Analyse von im Medium befindlichen Säuren oder Lösungsmitteln erfolgte mit dem Gaschromatographen Clarus600 der Firma Perkin Elmer GmbH, Rodgau-Jügesheim mit Flammenionisationsdetektor. Die verwendete Säule war eine Chromosorb 101 Glassäule, das Trägergas Stickstoff. Die Aufbereitung der Proben erfolgte durch 10 min Zentrifugieren, wobei anschließend 1 ml des Überstandes (oder eine geeignete Verdünnung) in ein für den GC geeignetes Rollrandgefäß (Chromatographie Service GmbH, Langerwehe) gegeben wurde. Zu diesem Überstand wurden 100 µl interner Standard (110 mM Isobutanol in 2 N HCl) gegeben, so dass ein Gesamtvolumen von 1,1 ml vorlag. Dieses Rollrandgefäß wurde mit Hilfe einer Bördelkappe (Chromatographie Service GmbH, Langerwehe) gasdicht verschlossen. Die Auswertung der Proben erfolgte mit dem Programm TotalChrom® Chromatography Data System (CDS) von PerkinElmer GmbH, Rodgau-Jügesheim.

2.4.3. Lactat-Bestimmung

Für die Bestimmung von Lactat im Medium wurde das „L-Lactic acid Test Kit“ der Firma r-biopharm, Mannheim, verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.5. Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.5.1. Vorbereitung von Lösungen und Geräten

Alle hitzestabilen Lösungen und Geräte wurden bei 121 °C und einem Druck von 1,2 bar für mindestens 20 min autoklaviert, um mögliche Kontaminationen zu verhindern und Nukleasen zu inaktivieren. Alle hitzelabilen Lösungen wurden steril filtriert.

2.5.2. Isolierung von Nukleinsäuren

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

Um die chromosomale DNA aus *A. woodii*, *C. aceticum* und *C. ljungdahlii* zu isolieren, wurden zunächst 50 ml einer 2-Tages-Kultur bei 4 °C für 15 min mit 6000 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde anschließend in Kaliumphosphatpuffer (10 mM, pH 7,5) gewaschen. Danach wurde das Sediment in 3,8 ml STE-Puffer suspendiert. Zu dieser Lösung wurden 300 µl Lysozymlösung (20 mg/ml) gegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden der Lösung 280 µl einer 10 %-igen (w/v) SDS-Lösung zugegeben und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Es folgte eine Zugabe von 240 µl EDTA-Lösung (0,5 M), 20 µl Tris-HCl (1 M, pH 7,5) und 100 µl RNase A (10 mg/ml). Diese Suspension wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden der Suspension 100 µl Proteinase K-Lösung zugegeben und für 1-3 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit erfolgte die Zugabe von 600 µl einer Natrium-Perchlorat-Lösung (5 M). Es folgte eine, unter 2.5.3.3 beschriebene, Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion.

STE-Puffer:

Tris	6,0	g	50	mM
EDTA	0,3	g	1	mM
Saccharose	68,5	g	200	mM
destilliertes Wasser	ad 1000	ml		
(pH 8)				

2.5.2.2. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* mittels „Zyppy™-Plasmid-Miniprep-Kit“

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde der „Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit“ eingesetzt. Bei diesem Verfahren bindet die Plasmid-DNA auf Grund chaotroper Salze an das Säulenmaterial, welches aus einer Silicamatrix besteht. Durch Wasser oder einen Puffer kann die Plasmid-DNA wieder eluiert werden. Für die Gewinnung der Plasmid-DNA wurden 1,5 ml einer Übernachtkultur bei 10000 g für 5 min bei RT zentrifugiert. Das Sediment wurde nach den Angaben des Herstellers weiter behandelt. Die so gewonnene Plasmid-DNA bedarf keiner weiteren Nachbehandlung und ist für die weitere Verwendung geeignet.

2.5.2.3. Isolierung von Plasmid-DNA aus *A. woodii*, *C. aceticum* und *C. ljungdahlii* (Eikmanns *et al.,* 1994, mod.)

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus *A. woodii*, *C. aceticum* und *C. ljungdahlii* erfolgte unter anaeroben Bedingungen und mit anaeroben Lösungen.

Zunächst wurden 5 ml einer 2-Tages-Kultur bei 4000 g für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Sediment wurde anschließend mit 400 µl Wasser versetzt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde 1 ml STE-Puffer (2.5.2.1.) zugegeben und erneut bei 10000 g für 1 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Sediment wurde dann in 200 µl Lösung A, einer Spatelspitze Lysozym und 1 µl RNase A (10 mg/ml) suspendiert. Diese Lösung wurde für 45 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden 400 µl Lösung B zugegeben und vorsichtig gemischt, bis die Lösung klar war. Es folgte die Zugabe von Lösung C und die Suspension wurde vorsichtig gemischt, bis sie flockte. Anschließend wurde die Suspension bei 13000 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Aufreinigung mit dem „Zyppy™-Plasmid-Miniprep-Kit“ (siehe 2.5.2.2.).

Lösung A

Glucose	(50	mM)	1,76	ml
Tris-HCl (pH 8)	(25	mM)	40,00	µl
EDTA-Lösung	(10	mM)	200,00	µl

Lösung B (immer frisch ansetzen)

NaOH-Lösung	(10	N)	0,02	ml
SDS-Lösung	(10	%)	1,00	ml
destilliertes H_2O			8,80	ml

Lösung C

K-Acetat-Lösung	(5	M)	60,0	ml
Eisessig			11,5	ml
destilliertes H_2O			28,5	ml

2.5.2.4. Isolierung von Plasmid-DNA aus *L. plantarum*

5 ml einer über Nacht gewachsenen Kultur wurden zunächst durch Zentrifugation sedimentiert und in 600 µl STE-Puffer (2.5.2.1.) gelöst. Hierzu wurde eine Spatelspitze Lysozym gegeben und für 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Plasmid mit Hilfe des „Zyppy™ Plasmid Miniprep“-Kits gereinigt. Es wurde den Anweisungen des Herstellers gefolgt.

2.5.3. Reinigung von Nukleinsäuren

2.5.3.1. Ethanolfällung

Da Nukleinsäuren die Eigenschaft haben, in Gegenwart hoher Konzentrationen an monovalenten Kationen einen unlöslichen Niederschlag zu bilden, wurden dem Ansatz 0,1 Volumen einer 3 M Natrium-Acetat-Lösung (pH 3,2) sowie 2,5 Volumen eiskalten, absoluten Ethanols zugegeben. Diese Suspension wurde bei -20 °C für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Nukleinsäuren durch Zentrifugation

(30 min, 10000 g, 4 °C) sedimentiert. Das Sediment wurde mit 70 %-igem Ethanol gewaschen und nach erneutem Zentrifugieren (10 min, 13000 g, 4 °C) an der Luft getrocknet. Anschließend wurde das getrocknete Sediment in einem geeigneten Volumen sterilen Wassers gelöst und aufbewahrt.

2.5.3.2. Isopropanolfällung

Für die Fällung von Nukleinsäuren wurden 0,8 Volumen Isopropanol zu den jeweiligen Suspensionen gegeben, vorsichtig gemischt und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die nun ausgefallenen Nukleinsäuren wurden mit einer Pasteurpipette, welche mit Hilfe des Bunsenbrenners zu einer Öse geformt wurde, geangelt. Anschließend wurden die Nukleinsäuren mit 70 %-igen Ethanol gewaschen und bei 37 °C getrocknet. Danach wurde die DNA in einem geeigneten Volumen sterilen Wassers gelöst und aufbewahrt.

2.5.3.3. Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion

Die Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion dient dazu, Proteinverunreinigungen aus DNA-haltigen Lösungen zu entfernen. Hierzu wurde der DNA-haltigen Lösung 1 Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol zugegeben und für 30 Sekunden gut gemischt. Durch Zentrifugation (5 min, 13000 g, RT) wurden die Phasen getrennt, die obere, wässrige, DNA-haltige Phase vorsichtig abgenommen und in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Je nach Verunreinigung wurde dieser Schritt ein oder mehrmals wiederholt, bis keine Proteininterphase mehr zu sehen war. Anschließend wurde das Phenol durch Zugabe von 1 Volumen Chloroform-Isoamylalkohol vollständig entfernt. Durch Zentrifugation (5 min, 13000 UpM, RT) erfolgte erneut eine Phasentrennung, so dass die wässrige, DNA-haltige Phase erneut in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt werden konnte. Anschließend wurde der Ansatz einer Ethanolfällung (2.5.3.1) oder einer Isopropanolfällung (2.5.3.2) unterzogen.

2.5.3.4. Reinigung von DNA aus Lösung

Um Nukleinsäuren von Verunreinigungen trennen zu können, wurde der „DNA Clean & Concentrator^{TM}-5 Kit“ verwendet. Dieses Verfahren beruht auf der durch chaotrope Salze vermittelten selektiven Bindung von DNA an eine Silicamatrix und der anschließenden Elution mit Wasser oder einem Puffer geringer Ionenstärke. Die Reinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.5.3.5. Reinigung von DNA aus Agarose-Gelen

Nach der elektrophoretischen Trennung (siehe 2.4.5) der zu reinigenden DNA wurde diese auf einem UV-Schirm ausgeschnitten und in ein 1,5-ml-Eppendorfgefäß gegeben, gewogen und mit 3 Volumen (w/v) „ADB-Buffer“ versetzt. Die Reinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.5.4. Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten

2.5.4.1. Nichtdenaturierende Agarose-Gelelektrophorese

Zur Trennung von Nukleinsäuren wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Agarose besteht aus glykosidisch verbundener D-Galactose und 3,6-Anhydrogalactose. Durch die negative Ladung der Phosphatgruppen im Desoxyribose-Phosphat-Rückgrat der Nukleinsäuren können diese in einem elektrischen Feld wandern. Die Geschwindigkeit wird durch die Molekülgröße, die Konformation der Nukleinsäure, die Agarosekonzentration sowie durch die angelegte Spannung beeinflusst. Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente wurde eine Agarosekonzentration von 0,4 % bei Fragmenten über 10000 Bp, 0,8 % bei Fragmenten über 500 Bp oder 2 % bei Fragmenten unter 500 Bp eingesetzt. Die Agarose wurde in 1x TAE-Puffer durch Kochen gelöst und in eine Gelkammer mit Kamm gegossen. Nach dem Aushärten des Gels wurde dieses mit TAE-Puffer beschichtet und der Kamm vorsichtig aus dem Gel gezogen. Anschließend wurden die mit Ladepuffer ("6x Loading Dye Solution", MBI Fermentas GmbH) versetzten DNA-Proben aufgetragen. Zur Bestimmung

der Größe der Fragmente wurde zusätzlich ein Größenstandard ("GeneRuler™ DNA Ladder Mix", Fermentas GmbH) aufgetragen. Der Gellauf erfolgte unter einer Spannung von 5-10 V/cm über eine Distanz von 15 cm. Anschließend wurde das Gel in eine abgedunkelte Ethidiumbromid-Lösung (1 mg/ml) gelegt, wobei das Ethidiumbromid in die Nukleinsäuren interkaliert und so sein Absorptionsspektrum verändert. Die Intensität der Fluoreszenz-Emission nimmt dabei um den Faktor 50 - 100 zu. Die so sichtbar gewordenen Nukleinsäuren wurden mit einer Photodokumentationsanlage fotografiert und ausgewertet.

50x TAE-Stammlösung (Sambrook und Russell, 2001):

Tris/HCl (pH 7,5)	242,3	g	2	M
Eisessig	57,1	ml	1	M
EDTA	14,6	g	50	mM
destilliertes H_2O	ad 1000	ml		

2.5.4.2. Größenbestimmung von Nukleinsäuren

Für die Größenbestimmung von Nukleinsäuren wurden gebrauchsfertige Größenstandards der Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, verwendet. Für Fragmente einer Größe von 100 Bp bis 10000 Bp wurde der Größenstandard „GeneRuler™ DNA Ladder Mix“ und für Fragmente über 10000 Bp der „GeneRulerTM DNA Ladder, High Range“ verwendet. In Abbildung 5a und 5b sind beide Größenstandards aufgezeigt.

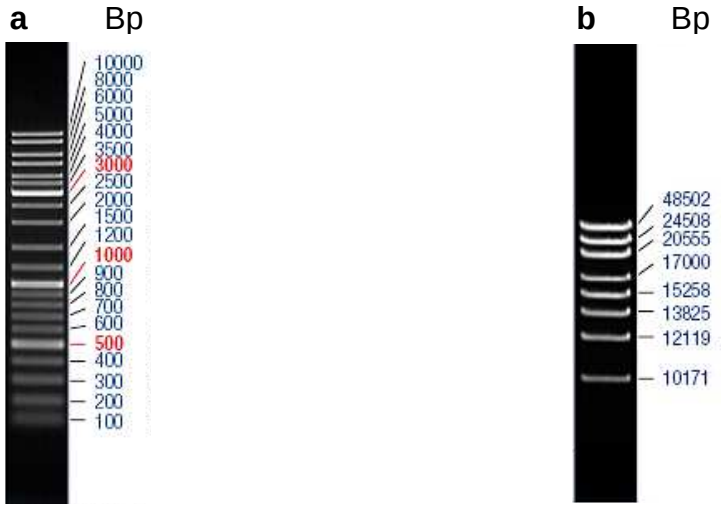


Abbildung 5: DNA-Größenstandards (www.fermentas.com) : **a**: „GeneRuler^{TM} DNA Ladder Mix“ (0,5 µl in 1 %-igem Agarose-Gel); **b**: „GeneRuler^{TM} DNA Ladder, High Range“ (0,5 µl in 0,4 %-igem Agarose-Gel)

2.5.5. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure-Lösungen

Die Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäurelösungen erfolgte photometrisch bei Wellenlängen von 260 und 280 nm. Hierzu wurden die zu bestimmenden Proben entsprechend verdünnt, in eine Quarzküvette gegeben und bei den oben genannten Wellenlängen gemessen. Eine OD_{260} von 1 entspricht ca. einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml (Wilfinger *et al.*, 1997).

2.5.6. Sequenzierung

Sequenzierungen von Plasmid-DNA oder PCR-Fragmenten wurden von der Firma GATC Biotech AG, Konstanz, durchgeführt. Die für eine Sequenzierung nötige Reinheit der Proben wurde durch Plasmidpräparation (2.5.2.1.) oder PCR-Aufreinigung (2.5.3.5.) gewährleistet. Die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren erfolgte wie in 2.5.5 beschrieben. Für eine erfolgreiche Sequenzierung sollte eine Konzentration von 30-100 ng/µl Plasmid-DNA und 10-50 ng/µl PCR-Produkt nicht über- oder unterschritten werden. Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden mit Hilfe des Programmes „Clone Manager 7.11“-Programmes ausgewertet.

2.5.7. Enzymatische Modifikation von DNA

2.5.7.1. Restriktionsspaltung

Die verwendeten Restriktionsenzyme sind Typ II-Enzyme. Sie benötigen für ihre Aktivität kein ATP, haben spezifische Erkennungssequenzen und produzieren definierte Enden. Die Aktivitätsangabe erfolgt in der Einheit Unit (U). Hierbei entspricht 1 U der Menge des Enzyms, die benötigt wird, um innerhalb 1 h bei optimalen Reaktionsbedingungen 1 µg DNA zu spalten. Um eine optimale Aktivität der Enzyme zu gewährleisten, wurden die vom Hersteller mitgelieferten Puffer verwendet. Ein analytischer Restriktionsverdau von PCR- oder Plasmid-DNA bestand aus einem Gesamtvolumen von 20 µl, ein präparativer Restriktionsverdau aus 50 µl Gesamtvolumen. Die Analyse des Restriktionsverdaus erfolgte durch die Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.5.4.1). Eine anschließende Reinigung der DNA erfolgte mit Hilfe des „Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit“ (siehe 2.5.3.5).

2.5.7.2. Dephosphorylierung linearer Plasmide (Sambrook und Russell, 2001)

Um eine Religation des Vektors nach einer Restriktionsspaltung zu verhindern, wurden die 5'-Phosphatreste durch das Enzym „Shrimp Alkaline Phosphatase" (SAP) entfernt. Die Reaktionsbedingungen waren durch den 10-fach Puffer des Herstellers festgelegt. Für eine Dephosphorylierung von 1 µg DNA wurden 10 U der SAP eingesetzt und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Die so behandelte Plasmid-DNA wurde anschließend direkt in eine Ligation (2.5.7.3.) eingesetzt.

2.5.7.3. Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte in 20-µl-Ansätzen. Hierbei wurde die Konzentration von Vektor-DNA zu „Insert“-DNA im Verhältnis 1:3 oder 1:5 eingestellt. Die Ligation erfolgte durch eine sogenannte Gradienten-Ligation, die mit Hilfe des PCR-Gerätes durchgeführt wurde. Dabei wurden folgende Schritte durchlaufen:

22	°C	1	h
21	°C	1	h
20	°C	1	h
19	°C	1	h
18	°C	1	h
17	°C	1	h
16	°C	12	h

Alle Ligationsansätze wurden anschließend ohne weitere Behandlung in die Transformation eingesetzt.

2.5.7.4. TA-Klonierung von PCR-Fragmenten

PCR-Fragmente können direkt, ohne Restriktionsverdau, in den Vektor pDRIVE aus dem „Qiagen PCR Cloning Kit“ kloniert werden. Dies ist möglich, da der pDRIVE-Vektor an den 3‘-Enden Thymidin-Überhänge besitzt, welche nicht gepaart sind. Die Taq-DNA-Polymerase erzeugt während der Elongation Adenin-Überhänge an den 5‘-Enden der PCR-Produkte. So können sich die T-Überhänge mit den A-Überhängen zusammenlagern und einen linearen Vektor bilden, welcher in kompetente Zellen transformiert werden kann. Die TA-Klonierung von PCR-Fragmenten erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.5.7.5. Methylierung von Plasmid-DNA

2.5.7.5.1. Methylierung von Plasmid-DNA für den Transfer in *A. woodii*, *C. aceticum* und *C. ljungdahlii*

Clostridien verfügen über ein Restriktions-Modifikations-System welches ihnen erlaubt, Fremd-DNA von eigener zu unterscheiden. Das bedeutet, dass Plasmid-DNA, die in diese Organismen transformiert werden soll, zuvor methyliert werden sollte, um so eine Degradierung der Plasmid-DNA zu verhindern und eine erfolgreiche Aufnahme zu gewährleisten. Hierzu wurde die Methyltransferase aus dem Organismus *C. ljungdahlii* verwendet. Die Plasmide pMClj, pMCljS oder pBRMClj, welche das Methyltransferase-Gen aus *C. ljungdahlii* besitzen, wurden zunächst in die *E. coli*-Stämme XL1-Blue MRF´ oder ER2275 transformiert. Beide Stämme besitzen die Restriktionssysteme McrA, McrBC und Mrr nicht, so dass unmethylierte Plasmid-DNA problemlos aufgenommen werden kann. Anschließend wurden die zu methylierenden Plasmide in die *E. coli*-Stämme transformiert. Auf Grund unterschiedlicher Replikationsursprünge können beide Plasmide in den *E. coli*-Stämmen koexistieren und das Plasmid, welches in die Clostridien transformiert werden soll, mit Hilfe der Methyltransferase aus *C. ljungdahlii*, methyliert werden. Durch Plasmidpräparation (2.5.2.2.) konnten die Plasmide gereinigt werden und anschließend in eine Transformation in die Clostridien-Stämme eingesetzt werden. Die für die Methylierung benötigten Plasmide pMClj, pMCljS oder pBRMClj mussten nicht aus der Plasmidpräparation entfernt werden, da sie nicht in der Lage sind, in Clostridien zu replizieren.

2.5.7.5.2. Methylierung von Plasmid-DNA für den Transfer in Lactobacillen

Die Modifizierung von Plasmid-DNA, die in eine Transformation in *L. plantarum* eingesetzt werden sollte, erfolgte nach Alegre *et al*. (2004). Hierzu wurden 45 ml einer über Nacht gewachsenen Kultur bei 4 °C für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Sediment mit 20 ml Waschpuffer gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in 2 ml Waschpuffer aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall (12x 30 s im Intervall von 60 s bei 60 W). Danach wurden die aufgeschlossenen Zellen für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Zum Überstand wurden 1,5 ml Glycerin (100 %) und 30 µl BSA-Lösung (10 mg/ml) zugegeben. Dieser

Zellextrakt wurde in 25-µl-Aliquots bei -20 °C gelagert. Die Modifizierung der DNA erfolgte, indem zu 25 µl Zellextrakt 50 µl TNE-Puffer, 10 µl SAM-Lösung (0,8 mM), 1 µl BSA-Lösung (10 mg/ml) und 10-30 µg Plasmid-DNA zugegeben wurden. Diese Mischung wurde für 16 h bei 30 °C inkubiert. Die DNA wurde anschließend mit Hilfe des „DNA Clean and Concentrator™-5 Kit“ (Hiss Diagnostics, Freiburg) gereinigt und konnte direkt in die Transformation eingesetzt werden.

Waschpuffer:

EDTA	2,90	g	10,0	mM
NaCl	2,90	g	50,0	mM
PMSF	35,00	mg	0,2	mM
K_2HPO_4	1,74	g	10,0	mM
destilliertes H_2O	ad 1000	ml		

TNE-Puffer: (pH 7,5)

Tris	6,00	g	49,5	mM
NaCl	3,00	g	51,4	mM
EDTA	3,00	g	10,3	mM
destilliertes H_2O	ad 1000	ml		

2.5.8. Amplifikation von DNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.5.8.1. Auswahl von Oligodesoxynukleotiden

Für eine erfolgreiche PCR wurden spezifische Oligodesoxynukleotide benötigt, welche in Tabelle 8 aufgelistet sind. Für die Auswahl von Oligodesoxynukleotiden wurde darauf geachtet, dass sie eine optimale Länge von 18-22 Nukleotiden besaßen. Die Schmelztemperatur sollte zwischen 50 °C und 60 °C liegen, was einem GC-Gehalt von 40-60 % entspricht. Ebenso sollten am 3‘-Ende der Oligodesoxynukleotide mindestens 2 Guanin- oder Cytosin-Basen sein, was die Bindung an die Ziel-DNA begünstigt. Weiterhin wurde darauf geachtet, dass die

Sequenz der Oligodesoxynukleotide keine Wiederholungen aufweist, so dass eine Ausbildung möglicher Sekundärstrukturen ausgeschlossen ist.

2.5.8.2. Standard-PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR; Saiki *et al*., 1985; Saiki *et al.,* 1988) ist eine der Standardmethoden des molekularbiologischen Arbeitens. Im Grunde besteht diese Methode aus 3 Schritten, die üblicherweise 20-30 mal wiederholt werden:

1) Denaturierung der doppelsträngigen, zu amplifizierenden DNA durch Hitze (in der Regel 95 ℃).
2) Anlagerung der Oligodesoxynukleotide („Primer“) an die zu amplifizierende DNA.
3) Elongation durch eine hitzestabile DNA-Polymerase in 3‘-Richtung (72 °C).

Die DNA-Polymerase setzt an den kurzen doppelsträngigen Abschnitten aus Schritt 2 an und ist in der Lage, zusammen mit den ebenfalls im Ansatz enthaltenen vier Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) die „Primer“ an deren 3‘-Ende zu verlängern und so einen komplementären Strang zu synthetisieren.

Die „Primer“ werden synthetisch hergestellt und so gewählt, dass sie jeweils komplementär zu einem der beiden 3‘-Einzelstrangenden des zu amplifizierenden DNA-Doppelstranges sind. Um ein Abfallen der DNA-Polymerase zu vermeiden, wurde darauf geachtet, dass nicht mehr als vier gleiche Adenosin-oder Thymin-Basen in Folge auftraten. Die Hybridisierungstemperatur (auch „Annealing“-Temperatur genannt) wird ca. 3-5 °C unter der errechneten Schmelztemperatur Tm der verwendeten „Primer“ angesetzt, welche mit folgender Formel berechnet werden kann (Suggs *et al*., 1981):

$$Tm\ [℃] = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$$

In Tabelle 10 sind die Bestandteile eines typischen PCR-Ansatzes aufgeführt und in Tabelle 11 ein Standard-PCR-Programm.

Tabelle 10: PCR – Ansatz

Zusatz	Menge
DNA	100 ng
10x Reaktionpuffer mit $MgCl_2$	5 µl
10 pmol/µl „Primer 1“	2 µl
10 pmol/µl „Primer 2“	2 µl
DNA-Polymerase (1 U/µl)	0,5 µl
destilliertes H_2O	ad 50 µl

Tabelle 11: Standard-PCR-Programm

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]
Initiale Denaturierung	95	5
Denaturierung	95	1
Anlagerung	variabel*	1
Elongation	72	variabel
Finale Elongation	72	10

* Abhängig von „Primer“-Temperatur
** pro 1000 Bp

Zur Kontrolle wurde ein Aliquot jedes Ansatzes auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt (2.5.4.1.). Entsprach die Größe des PCR-Produktes der erwarteten Größe, so wurde dieses anschließend mit Hilfe des „ZymocleanTM Gel DNA Recovery Kit“ (siehe 2.5.3.5) aufgereinigt.

2.5.8.3. Kolonie-PCR

Eine Kolonie-PCR wurde zur 16S-rDNA-Amplifikation der isolierten Stämme eingesetzt. Hierzu wurde eine Kolonie von einer Agarplatte in 50 µl sterilem H_2O gelöst und bei 95 °C für 10 min erhitzt. Anschließend wurde diese Lösung für 1 min bei 13000 g und Raumtemperatur zentrifugiert, so dass sich das Zellmaterial als Sediment absetzte. 10 µl des DNA-haltigen, zellfreien Überstandes wurden als „Template“ in eine Standard-PCR (2.5.8.8) eingesetzt.

2.5.8.4. Einfügen von Restriktionsschnittstellen

Um eine gerichtete Klonierung zu garantieren, wurden Restriktionsschnittstellen mit Hilfe der synthetisierten „Primer“ eingefügt. Dazu wurden an das 5‘-Ende der „Primer“ die Nukleotide angefügt, die der gewünschten Restriktionsschnittstelle entsprachen. Die Reaktion erfolgte wie bei einer Standard-PCR (2.5.8.2.).

2.6. Herstellung kompetenter Zellen und DNA-Transfer in Zellen

2.6.1. Transformation von *E. coli*-Zellen

2.6.1.1. Transformation elektrokompetenter *E. coli*-Zellen (Dower *et al*., 1988, mod.)

Zur Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen wurden 250 ml LB-Medium mit einer 5-ml-Übernachtkultur auf eine OD_{600nm} von 0,1 angeimpft und anschließend bei 37 °C unter Schütteln bis zu einer OD_{600nm} von 0,6-0,9 kultiviert. Danach wurden die Zellen für 15 min auf Eis inkubiert. Um die Zellen zu ernten, wurden diese bei 4000 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Das Sediment wurde zweimal mit 250 ml eiskaltem H_2O gewaschen. Schließlich wurde das Sediment in 20 ml (1/10 Volumen) sterilem, 10 %-igen (v/v) und eiskalten Glycerin aufgenommen und nach erneuter Zentrifugation in 0,4 ml (1/500 Volumen) kaltem 10 %-igen (v/v) Glycerin suspendiert. Anschließend wurden die Zellen in 50-µl-Portionen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

Für die Elektroporation wurden die kompetenten Zellen langsam auf Eis aufgetaut. In eine eiskalte Elektroporationsküvette (Biozym Scientific GmbH, Oldendorf) mit einem Elektrodenabstand von 0,2 cm wurden 250-1000 ng DNA gegeben. Dazu wurden 50 µl der kompetenten Zellen gegeben und mit Hilfe des „GenePulser XCell“ (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) erfolgte die Elektrotransformation der DNA in die kompetenten *E. coli*-Zellen (Spannung: 2,5 kV, Widerstand: 200 Ω, Kapazität: 25 µF). Hierbei lag die Zeitkonstante zwischen 4,5 und 5 ms. Anschließend wurden die Zellen in 300 µl LB-Medium aufgenommen und bei 37 °C unter Schütteln für 45 min inkubiert. Danach wurden 100 µl auf selektiven Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.6.1.2. Transformation kaltkompetenter *E. coli*-Zellen (Inoue *et al.*, 1990, mod.)

Zur Herstellung kaltkompetenter *E. coli*-Zellen wurden 250 ml SOB-Medium in einem 1-L-Erlenmeyerkolben mit einer Übernachtkultur auf eine OD_{600nm} von 0,1 eingestellt und bei 18 °C in einem Wasserbad unter Schütteln bis zu einer OD_{600nm} von 0,6 kultiviert. Anschließend wurde die Kultur in einen sterilen Zentrifugenbecher überführt und für 10 min auf Eis inkubiert. Um die Zellen zu ernten, wurden diese bei 4000 g bei 4 °C für 10 min zentrifugiert. Das Sediment wurde in 80 ml eiskaltem TB-Puffer suspendiert, 10 min auf Eis inkubiert und erneut für 10 min bei 4 °C und 4000 g zentrifugiert. Anschließend wurde das Sediment in 10 ml kaltem PIPES-Puffer suspendiert und auf Eis langsam mit sterilem DMSO bis zu einer Endkonzentration von 7 % (v/v) versetzt. Die Zugabe erfolgte nach und nach in kleinen Volumina, um ein Ausfallen des DMSO zu verhindert. Danach wurden je 200 µl der Zellsuspension in 1,5-ml-Eppendorfgefäße aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Zellen wurden bei -70 °C aufbewahrt.

Für die Transformation wurden die Zellen langsam auf Eis aufgetaut und mit 20 µl Ligationsansatz oder 0,1-1 µg Plasmid-DNA versetzt. Anschließend wurde das Gemisch für 10 min auf Eis, danach für 1 min bei 42 °C und wieder für 10 min auf Eis inkubiert. Dazu wurden 800 µl warmes LB-Medium gegeben und bei 37 °C unter Schütteln für eine Stunde inkubiert. Danach wurden 100 µl entnommen und auf selektiven Agarplatten mit Hilfe von sterilen Glasperlen ausplattiert. Die restliche Zellsuspension wurde bei 9000 g für 3 min zentrifugiert, der Überstand bis auf 100 µl verworfen, suspendiert und ebenfalls auf selektiven Agarplatten ausplattiert.

SOB-Medium (Sambrook und Russell, 2001; mod.)

Trypton	5,00	g	2,0	% (w/v)
Hefeextrakt	1,50	g	0,6	% (w/v)
NaCl	0,14	g	9,6	mM
KCl	0,48	g	25,8	mM
$MgCl_2$ x 6 H_2O	0,51	g	10,0	mM
$MgSO_4$ x 7 H_2O	0,61	g	9,9	mM
destilliertes H_2O	ad 250	ml		

PIPES-Puffer

Pipes	0,8	g	8,3	mM
$CaCl_2$	0,4	g	15,2	mM
KCl	4,7	g	0,3	mM
$MnCl_2$ x 4 H_2O	1,7	g	34,8	mM
destilliertes H_2O	ad 250	ml		

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

Für die Transformation von *A. woodii*, *C. aceticum* und *C. ljungdahlii* wurden zunächst elektrokompetente Zellen hergestellt. Hierzu wurden 200 ml Medium mit dem entsprechenden Stamm beimpft und bei 30 °C (*A. woodii*, *C. aceticum*) bzw. 37 °C (*C. ljungdahlii*) inkubiert, bis eine optische Dichte von 0,4-0,8 erreicht wurde. Danach wurden die Zellen in 50-ml-Aliquots in der Anaerobenkammer für 10 min bei 6000 g und bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Sediment wurde zweimal mit 25 µl SMP-Puffer gewaschen (10 min, 6000 g, RT) und anschließend in 600 µl SMP-Puffer aufgenommen. Wichtig hierbei war, dass der pH-Wert des SMP-Puffers an den für den jeweiligen Stamm optimalen pH-Wert angepasst wurde (pH 5,9: *C. ljungdahlii*; pH 7: *A. woodii*; pH 8: *C. aceticum*). Die so hergestellten Zellen sind in der Lage, Plasmid-DNA aufzunehmen. Für die Elektroporation wurden die Zellen direkt in eine 4-mm-Küvette (Biozym Scientific GmbH, Oldenburg) mit 1 µg Plasmid-DNA gegeben. Die Elektroporation erfolgte mit 2,5 kV Spannung, 600 Ω Widerstand und einer Kapazität von 25 µF. Anschließend wurden die transformierten Zellen in 5 ml frisches Medium überführt und für 3 Tage bei 30 °C bzw. 37 °C regeneriert. Danach wurden die Zellen in selektives Medium gegeben. Nach weiteren 3 Tagen Inkubation erfolgte die weitere Kultivierung. Alle Schritte wurden unter anaeroben Bedingungen durchgeführt.

SMP-Puffer (Zhu *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006)

Saccharose	92,42	g	270	mM
$MgCl_2$ x 6 H_2O	0,20	g	1	mM
NaH_2PO_4	0,84	g	7	mM
destilliertes H_2O	ad 1000	ml		

2.6.3. Transformation von *B. coagulans*

Die Transformation von *B. coagulans* erfolgte nach Rhee *et al.* (2006). Hierzu wurden 100 ml LB-Medium mit einer über Nacht gewachsenen Kultur auf eine OD_{600nm} von 0,1 beimpft und bei 50 °C bis zu einer OD_{600nm} zwischen 0,3 und 0,5 inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit SG-Medium gewaschen, mit Zentrifugationsschritten bei 4 °C für 10 min. Anschließend wurde das Sediment in 0,5 ml SG-Medium suspendiert. Zu 75 µl dieser elektrokompetenten *B. coagulans*-Zellen wurden in einer 1-mm-Küvette (Biozym Scientific GmbH, Oldenburg) 100 ng Plasmid gegeben. Die Elektroporation erfolgte mit 25 µF, 600 Ω und 1,5 kV. Direkt im Anschluss wurden zu den Zellen 2 ml RG-Medium gegeben und diese für 3 h bei 50 °C inkubiert. Anschließend erfolgte ein Zentrifguationsschritt für 10 min mit 10000 g bei Raumtemperatur, wonach 0,2 ml LB-Medium zugegeben wurden. 100 µl der Zellen wurden auf selektiven LB-Agar-Platten ausplattiert.

SG-Medium:

Glycerin	100,0	ml	10,0	%
Saccharose	171,7	g	500,0	mM
$MgCl_2$ x 6 H_2O	0,2	g	1,0	mM
destilliertes H_2O	ad 1000	ml		

RG-Medium:

Hefeextrakt	5,0	g	0,5	**%**
NaCl	10,0	g	172,0	mM
Trypton	10,0	g	1,0	%
Saccharose	171,7	g	500,0	mM
Glucose	10,0	g	55,6	mM
$MgCl_2$ x 6 H_2O	4,0	g	20,0	mM
$CaCl_2$ x 2 H_2O	0,15	g	1,0	mM
destilliertes H_2O	ad 1000	ml		

2.6.4. Transformation von *L. hilgardii*, *L. pantheris* und *L. plantarum*

Alle im Folgenden beschriebenen Transformationen sowie die Herstellung der kompetenten Zellen erfolgten jeweils aerob und anaerob.

2.6.4.1. Transformation nach Alegre *et al.* (2004)

Die Transformation von *L. plantarum*, *L. pantheris* und *L. hilgardii* erfolgte nach Alegre *et al*., 2004. Zunächst wurden elektrokompetente Zellen des jeweiligen Stammes hergestellt. Hierzu wurden 5 ml einer über Nacht gewachsenen Kultur in 25 ml MRS-Medium überführt und bei 37 °C inkubiert, bis eine OD_{600nm} von ca. 0,8 erreicht wurde. Anschließend wurden dieser Kultur 25 ml MRS-Medium, 5 g (1,4 M) Saccharose und 4 g (0,38 M) Glycin zugegeben und die Kultur für weitere 1,5 h inkubiert. Danach wurden die Zellen bei 4 °C für 10 min bei 8000 g zentrifugiert. Es folgten zwei Waschschritte mit eiskaltem H_2O, wonach 25 ml EDTA (50 mM) zugegeben wurden. Nach 30 min Inkubation auf Eis folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt. Dann wurden die Zellen mit 10 ml Elektroporationspuffer gewaschen und in 500 µl Elektroporationspuffer aufgenommen. Die Zellen wurden am selben Tag für eine Transformation eingesetzt.

Zur Transformation wurden 1-3 µg Plasmid-DNA (jeweils mit und ohne Modifizierung) und 100 µl der elektrokompetenten Zellen in 2-mm-Küvetten gegeben. Die Elektroporation erfolgte mit 25 µF, 200 Ω und 2,6 kV. Für die Regeneration der Zellen wurden 500 µl MRS (mit 80 mM $MgCl_2$ und 55 mM Glucose) zugegeben und die Zellen für 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl der Zellen auf selektiven MRS-Agarplatten ausplattiert und bei 37 °C mit und ohne Anaerobentopf inkubiert.

Elektroporationspuffer:

Glycerin	100	ml	10	%
Saccharose	102	g	300	mM
destilliertes H_2O	ad 1000	ml		

2.6.4.2. Transformation nach Thompson *et al*. (1996)

Die Transformation erfolgte nach Thompson *et al*. (1996). Zunächst wurden elektrokompetente Zellen hergestellt. Hierzu wurde 1 ml einer über Nacht gewachsenen Kultur in 25 ml MRS-Medium mit 0,3 M Saccharose und 8 % Glycin gegeben und bei 37 °C für 4,5 h nicht schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden 12,5 ml Kultur sedimentiert und 2x mit je 1 ml H_2O gewaschen. Danach wurden die Zellen in 1 ml EDTA (50 mM) suspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschritt mit 1 ml Saccharose-Lösung (0,3 M). Danach wurden die Zellen in 50 µl Saccharose-Lösung (0,3 M) gelöst und direkt in die Elektrotransformation eingesetzt.

Für die Transformation wurden in 2-mm-Küvetten (Biozym Scientific GmbH, Oldenburg) 500 ng Plasmid-DNA vorgelegt und diese mit 50 µl elektrokompetenten Zellen versetzt. Die Elektroporation erfolgte bei 1,5 kV, 200 Ω und 25 µF. Für die Regeneration der Zellen wurden 1,9 ml 37 °C warmes MRS-Medium mit 0,3 M Saccharose zugegeben und anschließend für 2 h bei 37 °C nicht schüttelnd inkubiert. Danach wurden 100 µl der Zellen auf selektiven MRS-Agarplatten ausplattiert und in einem Anaerobentopf bei 37 °C inkubiert.

2.6.4.3. Transformation nach Mason *et al*. (2005)

Für eine Transformation wurden zunächst elektrokompetente Zellen hergestellt. Hierzu wurden 4 ml einer über Nacht gewachsenen Kultur in 25 ml MRS-Medium mit 270 mM Glycin gegeben und bei 37 °C für 2 h inkubiert. Anschließend wurden 12 ml Kultur sedimentiert und 2x mit 1 ml H_2O und 1x mit 50 mM EDTA-Lösung gewaschen. Danach wurden die Zellen für 5 min auf Eis inkubiert und erneut einmal mit 1 ml H_2O und zweimal mit je 1 ml 0,3 M Saccharose-Lösung gewaschen. Danach wurden die Zellen in 100 µl 0,3 M Saccharose-Lösung aufgenommen und direkt in die Transformation eingesetzt.

Zur Transformation wurden 100 µg/ml Plasmid-DNA und 100 µl der elektrokompetenten Zellen in 2-mm-Küvetten (Biozym Scientific GmbH, Oldenburg) gegeben. Die Elektroporation erfolgte mit 25 µF, 200 Ω und 1,5 kV. Für die Regeneration der Zellen wurden 1,9 ml warmes MRS-Medium zugegeben und die

Zellen für 3 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl der Zellen auf selektiven MRS-Agarplatten ausplattiert und in einem Anaerobentopf bei 37 °C inkubiert.

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

Die Blau-Weiß-Selektion ist eine Möglichkeit, eine Insertion in die multiple Klonierungsstelle des Vektors pDRIVE in rekombinante *E. coli*-Stämme zu überprüfen. Das Prinzip der Blau-Weiß-Selektion beruht darauf, dass einige *E. coli*-Stämme keine funktionsfähige β-Galactosidase bilden können, da sie eine chromosomal lokalisierte Deletion im Gen *laq*I^qZΔM15 besitzen. Auf dem Vektor pDRIVE ist ein Genort (lacPOZ´) lokalisiert, der diesen Defekt ausgleichen kann, so dass eine funktionstüchtige β-Galactosidase gebildet werden kann. Dabei befindet sich die multiple Klonierungsstelle des Vektors pDRIVE in diesem Genort. Wird ein Insert eingebaut, kann der *E. coli*-Stamm keine aktive β-Galactosidase bilden. Bei Ausbildung der β-Galactosidase wird X-Gal zu Galactose und 5-Brom-4-Chlor-Indoxyl hydrolysiert, welches die Kolonien blau erscheinen lässt. Die blauen Kolonien tragen somit kein Insert und können als positive Klone ausgeschlossen werden. Für die Durchführung einer Blau-Weiß-Selektion wurden auf Agarplatten 40 µl X-Gal-Lösung und 20 µl IPTG-Lösung (Tabelle 9) ausplattiert, diese wurden für ca. 30 min getrocknet und anschließend die transformierten Zellen ausplattiert.

2.7. Anreicherung und Isolierung von Stämmen auf Hydrolysat C5/C6#B der Firma Süd-Chemie AG

Zum Anaerobisieren wurde das Hydrolysat C5/C6#B mit Stickstoff für ca. 2 h begast. Zusätzlich wurden 2 verschiedene Zusatzlösungen (siehe unten) angesetzt, welche durch Kochen und anschließendes Abkühlen unter N_2-Begasung anaerobisiert wurden. Danach erfolgte die Verdünnung des Hydrolysates mit jeweils einer der Zusatzlösungen 1:2 und anschließender Sterilfiltration. Die Zusatzlösungen wurden mit und ohne Kaliumphosphat-Puffer versetzt, so dass ein pH von 7 bzw. 4 eingestellt werden konnte.

Beimpft wurde das Anreicherungsmedium (Hydrolysat mit Zusatzlösung) mit Erdbodenproben, Baumproben, Biomüllproben sowie einer Probe aus einem anaeroben Becken einer Kläranlage.

Die Anreicherung erfolgte, indem 5 ml Anreicherungsmedium mit den jeweiligen Proben beimpft und bei 30 °C und 37 °C für 72 h inkubiert wurden. Danach wurden die Proben alle 3 Tage in frisches Anreicherungsmedium überimpft.

Zusatzlösung 1:

$(NH_4)_2SO_4$	4,00	g	30,27	mM
$CaCl_2$ x 2 H_2O	0,02	g	0,14	mM
$FeSO_4$ x 7 H_2O	0,03	g	2,00	mM
$MgSO_4$ x 7 H_2O	0,20	g	0,80	mM
+/- K_2HPO_4	34,80	g	200,00	mM
destilliertes H_2O	ad 1000	ml		

Zusatzlösung 2:

$(NH_4)_2SO_4$	4,00	g	30,27	mM
$CaCl_2$ x 2 H_2O	0,02	g	0,14	mM
$FeSO_4$ x 7 H_2O	0,03	g	2,00	mM
$MgSO_4$ x 7 H_2O	0,20	g	0,80	mM
+/- K_2HPO_4	34,80	g	200,00	mM
KNO_3	0,50	g	5,00	mM
destilliertes H_2O	ad 1000	ml		

Für die Isolierung der angereicherten Bakterien wurden dem Anreicherungsmedium 1,5 % Agar zugegeben, so dass Agar-Platten gegossen werden konnten.

Für die Charakterisierung der isolierten Bakterien wurde die chromosomale DNA präpariert (2.5.2.1.), welche als „Template“ in eine Standard-PCR zur Amplifikation der 16S rDNA eingesetzt wurde. Zur Sequenzierung wurden die gereinigten PCR-Produkte an die Firma GATC Biotech AG, Konstanz, geschickt.

3. Ergebnisse

3.1. Stand der Forschung

Ziel dieser Arbeit war es, eine plasmidbasierte 1-Butanolsynthese mit Hilfe clostridieller Gene in heterologen Wirten zu erreichen. In C. acetobutylicum erfolgt die 1-Butanol-Synthese ausgehend vom Intermediat Acetyl-CoA. Die Thiolase A kondensiert zwei Moleküle Acetyl-CoA zu Acetacetyl-CoA. Die 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase setzt Acetacetyl-CoA zu 3-Hydroxybutyryl-CoA um, woraufhin die Crotonase das 3-Hydroxybutyryl-CoA zu Crotonyl-CoA umwandelt. Die Butyryl-CoA-Dehydrogenase setzt anschließend Crotonyl-CoA zu Butyryl-CoA um. Die Umsetzung von Butyryl-CoA zu 1-Butanol kann durch verschiedene Enzyme katalysiert werden (Abbildung 6).

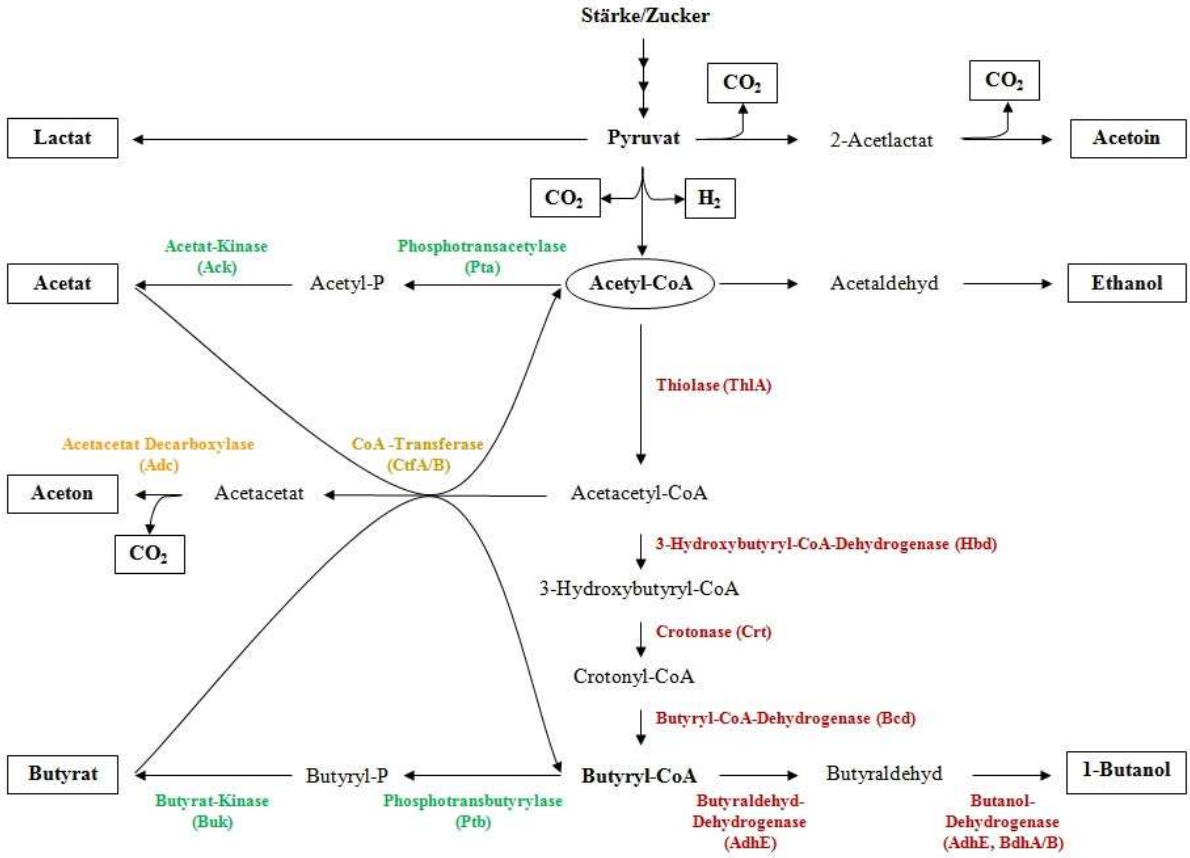


Abbildung 6: Stoffwechselweg von *C. acetobutylicum* (rot: Gene für die 1-Butanol-synthese, Lee *et al.*, 2008, mod.)

Für die 1-Butanolsynthese wurden drei verschiedene Plasmide (Abbildung 7a-c) von der Firma ATG Biosynthetics synthetisch hergestellt. Allen Plasmiden gemeinsam sind die Gene *thlA* (Thiolase A), *hbd* (3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase), *crt* (Crotonase) und *bcd* (Butyryl-CoA-Dehydrogenase) aus *C. acetobutylicum* sowie die Elektronentransfer-Flavoproteine *etfA* und *etfB* aus *C. ljungdahlii.* Die 3 Plasmide unterscheiden sich in den Genen, deren Produkte für die Umsetzung von Butyryl-CoA zu 1-Butanol zuständig sind. So besitzt das Plasmid pSB3C5-UUMKS 1 das Gen *ald* aus *C. beijerinckii*, welches für eine Butyraldehyddehydrogenase (Ald) kodiert, die Butyryl-CoA zu Butyraldehyd umsetzt, und das Gen *bdhB* aus *C. acetobutylicum*, welches für eine Butanol-Dehydrogenase (BdhB) kodiert, die Butyraldehyd zu 1-Butanol umwandelt (Abbildung 7a). Das Plasmid pSB3C5-UUMKS 2 (Abbildung 7b) besitzt anstelle der Gene *ald* und *bdhB* das Gen *adhE* aus *C. acetobutylicum*, welches für das bifunktionale Enzym Butyraldehyd-/Butanol-Dehydrogenase (AdhE) kodiert. Dieses ist in der Lage, beide Reaktionen vom Butyryl-CoA über Butyraldehyd zu 1-Butanol zu katalysieren. Das Plasmid pSB3C5-UUMKS 3 (Abbildung 7c) besitzt das Gen *adhE2* aus *C. acetobutylicum*, welches ebenfalls für ein bifunktionales Enzym, die Aldehyd-/Alkohol-Dehydrogenase 2 (AdhE2), kodiert. Die AdhE2 ist wie die AdhE in der Lage, Butyryl-CoA über Butyraldehyd zu 1-Butanol umzuwandeln. Die Gene der drei Plasmide stehen unter der Kontrolle des P_{ptb}, des Promoters des Phopsphotransbutyrylase-/Butyrat-Kinase-Operons.

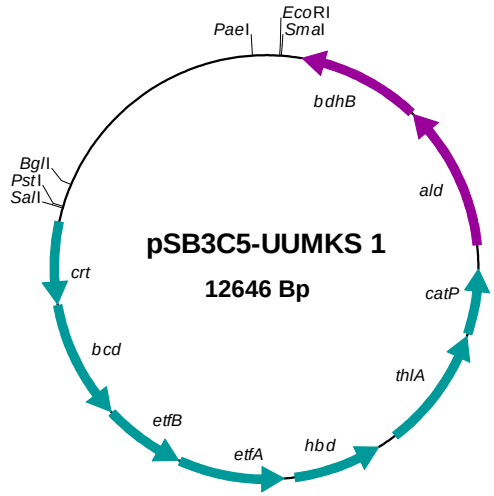


Abbildung 7a:
Plasmid pSB3C5-UUMKS 1

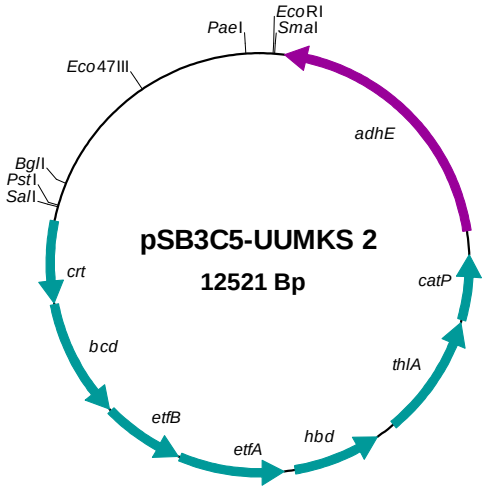


Abbildung 7b:
Plasmid pSB3C5-UUMKS 2

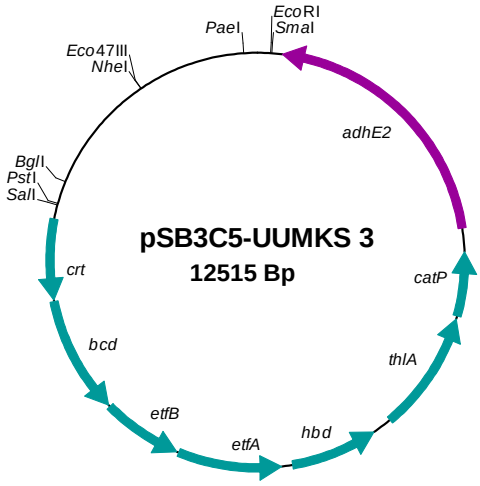


Abbildung 7c: Plasmid pSB3C5-UUMKS 3

Schuster konnte 2010 bereits zeigen, dass diese Plasmide in verschiedenen *E. coli*-Stämmen funktionell sind und nach Transformation mit diesen Plasmiden in der Lage sind, geringe Mengen an 1-Butanol zu produzieren.

Bereits 2009 konnte Köpke zeigen, dass *C. ljungdahlii* in der Lage ist, mit einem von Hujer konstruierten Plasmid $pSOB_{ptb}$ geringe Mengen an 1-Butanol herzustellen (Köpke et al., 2010). Dieses Plasmid trägt die Gene der Thiolase A (*thlA*), der 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase (*hbd*), der Crotonase (*crt*), der Butyryl-CoA-Dehydrogenase (*bcd*), der Butyraldehyd-/Butanol-Dehydrogenase (*adhE*) und der Butanol-Dehydrogenase A (*bdhA*) aus *C. acetobutylicum*. Die Gene des Plasmides $pSOB_{ptb}$ stehen unter der Kontrolle des P_{ptb}-Promoters des Phopsphotransbutyrylase-/Butyrat-Kinase-Operons. Dieses Plasmid besitzt Haarnadelstrukturen stromaufwärts der Gene *adhE* und *bdhA*, was die nur geringe Menge an produziertem 1-Butanol erklären kann und welche nicht entfernt werden konnten (Köpke, 2009).

In dieser Arbeit sollten in die synthetisch hergestellten Plasmide pSB3C5-UUMKS 1/2/3 ein Replikationsursprung für Gram-positive Organismen eingebracht werden und die Konstrukte anschließend in verschiedene Gram-positive Organismen durch Transformation eingebracht werden. Diese so modifizierten Organismen sollten in der Lage sein, auf LCB-Hydrolysat der Firma Süd-Chemie AG zu wachsen und 1- Butanol zu produzieren.

3.2. Auswahl geeigneter Stämme zur 1-Butanol-Produktion

Für die Auswahl geeigneter Stämme zur Produktion von 1-Butanol wurden verschiedene Stämme bei der DSMZ, Braunschweig, bestellt. Diese wurden alle auf ihr Wachstumsverhalten und Produktionsspektrum überprüft. Hierzu wurden alle Stämme auf eine OD_{600nm} von 0,1 in einem Volumen von 200 ml in ihrem jeweiligen Medium inokuliert. Alle Stämme sind anaerobe Organismen, und einige von ihnen haben die Fähigkeit auf, CO und auf CO_2+H_2 als Kohlenstoffquelle zu wachsen.

Tabelle 11 zeigt die maximalen OD_{600nm}-Werte, die maximalen Acetatkonzentrationen und andere Nebenprodukte verschiedener Stämme bei Wachstum auf ihrem jeweiligen DSMZ-Medium.

Tabelle 11: max. OD_{600nm}-Werte, Acetatkonzentrationen und Nebenprodukte verschiedener Stämme der DSMZ, Braunschweig

Stamm	max. OD_{600nm}	max. Acetat - Konzentration [mM]	Nebenprodukte [mM]
A. woodii	4,00	115	Ethanol: 6,4
B. coccoides	2,50	110	-
B. producta	1,50	30	-
B. fibrisolvens	0,75	-	Butanol: 3,8; Buyrat: 16
C. aceticum	2,35	70	-
C. carboxidivorans	2,50	17	Ethanol: 5,0; Butyrat: 4,0
C. drakei	1,60	12	Acetoin: 3,0; Butyrat: 3,0
C. ljungdahlii	1,00	60	Ethanol: 5,0
C. mayombei	0,35	16	-

In Tabelle 11 ist zu erkennen, dass alle Organismen Acetat produzieren, bis auf *B. fibrisolvens*. *A. woodii* hat mit 4 die höchste optische Dichte erreicht und mit 115 mM die höchste Acetatkonzentration. Da *A. woodii*, *C. aceticum* und *C. ljungdahlii* in der Lage sind, auch CO_2 bzw. CO als Kohlenstoffquelle zu verwerten und neben Acetat nur vernachlässigbar geringe Mengen Nebenprodukte bilden, wurden diese Organismen für weitere Versuche herangezogen.

3.2.1. Wachstum von *A. woodii*, *C. aceticum* und *C. ljungdahlii* auf LCB-Hydrolysat

LCB-Hydrolysat ist durch enzymatische Hydrolyse aufgeschlossene Lignocellulose-Biomasse, wie z. B. Weizenstroh oder Rübe, welche als Substrate zum Einsatz kommen und von der Firma Süd-Chemie AG, München, bereitgestellt wurden. Die Chargen der LCB-Hydrolysate unterscheiden sich auf Grund nicht offengelegter Hydrolysebedingungen in der Zusammensetzung der Zucker und anderer Komponenten. Aus diesem Grund wurden hier zunächst 3 verschiedene LCB-Hydolysate als Substrat in Wachstumsversuche mit *A. woodii*, *C. aceticum* und *C. ljungdahlii* eingesetzt, um zu testen, ob diese in der Lage sind zu wachsen. Im Idealfall sollten diese Stämme, nach erfolgreichem Einbringen eines Plasmides, welches das Butanol-Operon trägt, auf LCB-Hydrolysat wachsen und 1-Butanol produzieren. In der folgenden Tabelle 12 ist die Zusammensetzung der Zucker in den verschiedenen LCB-Hydrolysaten aufgelistet.

Tabelle 12: Zusammensetzung der Zucker in verschiedenen LCB-Hydrolysaten

Chargen-Nummer	Saccharose	Glucose	Xylose	Arabinose	Fructose	pH
UUL2#A	16,04 mM	504,30 mM	n.a.	40,10 mM	404,53 mM	4
C6#A	-	226,96 mM	101,05 mM	10,50 mM	-	5
C5/C6#A	-	298,50 mM	190,30 mM	87,90 mM	-	5

Wie in Tabelle 12 zu erkennen ist, unterscheiden sich die Hydrolysate nicht nur in den enthaltenen Zuckern, sondern auch in deren Konzentration. Der pH-Wert der LCB-Hydrolysate liegt mit 4-5 im sauren Bereich, was nicht den pH-Optima der getesteten Stämme entspricht.

Aus diesem Grund wurde der pH-Wert der einzelnen LCB-Hydrolysate an das Optimum des entsprechenden Stammes angepasst. Da die LCB-Hydrolysate sehr hohe Konzentrationen an Zucker enthalten, wurden diese 1:3 mit destillierten H_2O verdünnt. Desweiteren wurden die Hydrolysate entweder unter N_2-Begasung für 2 h

anaerobisiert und anschließend steril filtriert oder für 20 min gekocht, unter N_2-Begasung abgekühlt und autoklaviert. In Tabelle 13 ist dargestellt, ob die Stämme in der Lage waren, auf den unterschiedlich behandelten LCB-Hydrolysaten zu wachsen. Für diesen Versuch wurden 500 µl einer in DSMZ- bzw. ATCC-Medium gewachsenen Vorkultur der jeweiligen Stämme in 5 ml LCB-Hydrolysat inokuliert.

Tabelle 13: Wachstum der Stämme *A. woodii*, *C. aceticum* und *C. ljungdahlii* auf verschiedenen LCB-Hydrolysaten

		Wachstum von		
LCB-Hydrolysat		***A. woodii***	***C. aceticum***	***C. ljungdahlii***
C6#A (pH 5)	steril filtriert	--	--	ja
	autoklaviert	--	--	ja
C6#A (pH eingestellt *)	steril filtriert	--	--	ja
	autoklaviert	--	--	ja
C5/C6#A (pH 5)	steril filtriert	--	--	ja
	autoklaviert	--	--	ja
C5/C6#A (pH eingestellt *)	steril filtriert	--	--	ja
	autoklaviert	--	--	ja
UUL2#A (pH 4)	steril filtriert	--	--	ja
	autoklaviert	--	--	ja
UUL2#A (pH eingestellt *)	steril filtriert	ja	ja	ja
	autoklaviert	ja	ja	ja

--: kein Wachstum; ja: Wachstum (in 5 ml Volumen)
* : pH 5,9: *C. ljungdahlii*; pH 7,5: *A. woodii*; pH 8,2: *C. aceticum*

Alle 3 Stämme waren in der Lage, auf dem LCB-Hydrolysat UUL2#A in 5 ml zu wachsen, sofern der pH-Wert entsprechend dem Optimum des jeweiligen Stammes angepasst war. Auf den LCB-Hydrolysaten C6#A und C5/C6#A war nur *C. ljungdahlii* in der Lage zu wachsen, unabhängig davon, ob der pH-Wert seinem Optimum angepasst wurde oder nicht.

Weiterhin wurden Wachstumsversuche auf LCB-Hydrolysat in einem Volumen von 50 ml durchgeführt. Hierzu wurden eine OD_{600nm} von 0,1 aus einer Vorkultur, gewachsen auf LCB-Hydrolysat oder DSMZ- bzw. ATCC-Medium, eingestellt. Es

zeigte sich, dass nur *C. ljungdahlii* in der Lage war, in größeren Volumina auf LCB-Hydrolysat zu wachsen (Abbildung 8).

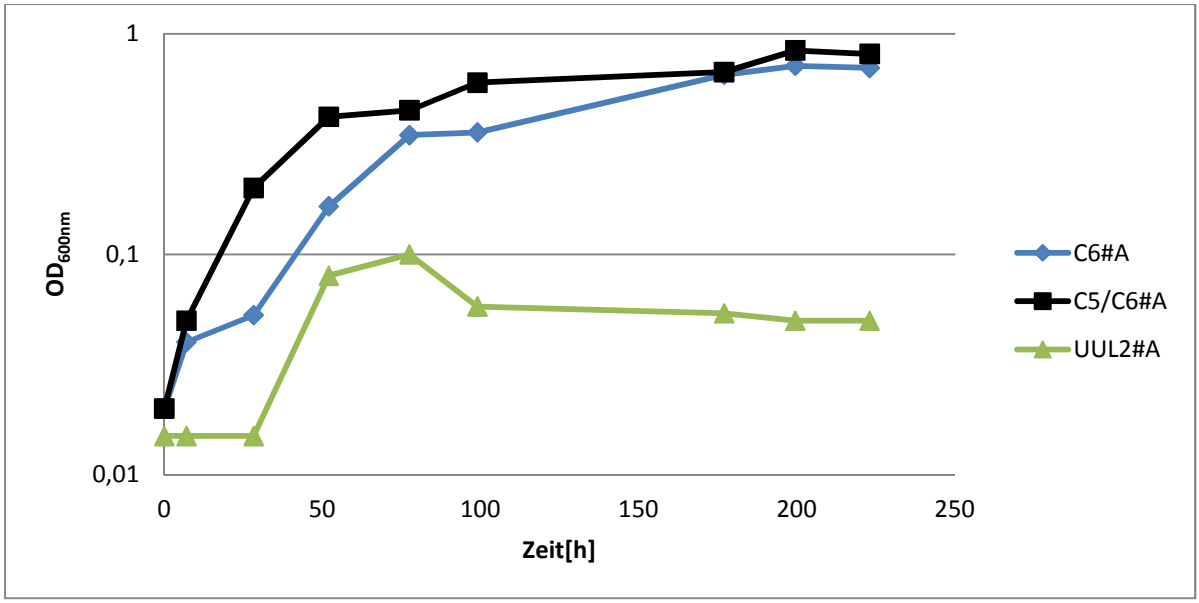


Abbildung 8: Wachstum von *C. ljungdahlii* auf den LCB-Hydrolysaten C6#A, C5/C6#A und UUL2#A (50 ml)

In Abbildung 8 ist zu erkennen, dass das Wachstum auf LCB-Hydrolysat C6#A und C5/C6#A mit einer maximalen optischen Dichte von 0,7-0,8, im Gegensatz zum Wachstum auf UUL2#A mit einer OD_{600nm} von 0,05, bis zu 16-mal so hoch war.

Da nur *C. ljungdahlii* in der Lage war, in einem größeren Volumen als 5 ml auf LCB-Hydrolysat zu wachsen, während *C. aceticum* und *A. woodii* nur auf LCB-Hydrolysat UUL2#A in 5 ml wachsen konnten, wurden weitere Wachstumsversuche durchgeführt, wobei das LCB-Hydrolysat als Kohlenstoffquelle anstelle von Fructose zu den gewöhnlichen DSMZ- bzw. ATCC-Medien zugegeben wurde. Dabei sollte überprüft werden, ob das LCB-Hydrolysat Hemmstoffe enthält, die ein Wachstum erschweren oder verhindern könnten. Hierzu wurden 250 ml des Mediums auf eine OD_{600nm} von 0,1 beimpft und bei 30 °C bzw. 37 °C inkubiert. Das Wachstum wurde über 5 Tage verfolgt und kann den Abbildungen 9-11entnommen werden.

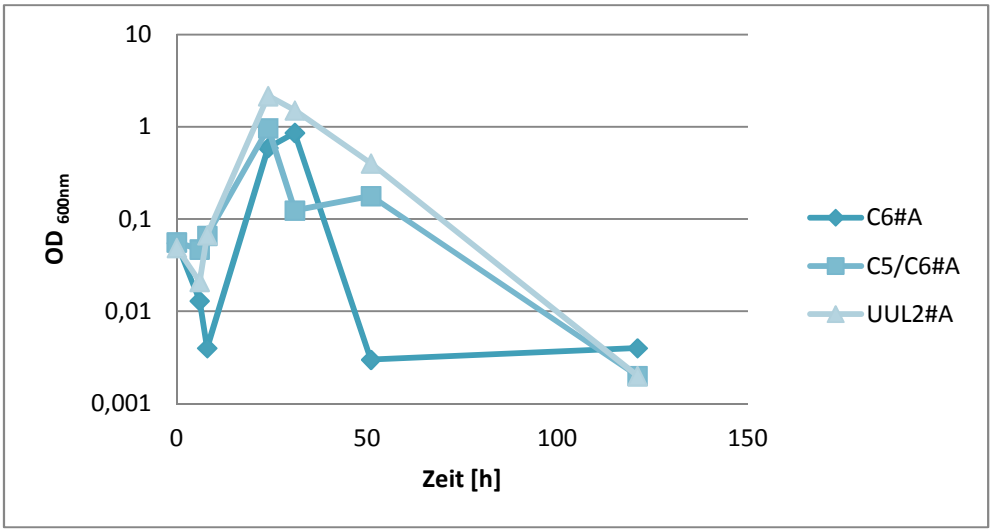


Abbildung 9: Wachstum von *A. woodii* auf ATCC-Medium mit LCB-Hydrolysat als Substrat

In Abbildung 9 ist zu erkennen, dass *A. woodii* mit dem Hydrolysat UUL2#A als Substrat mit 4-5 Verdopplungen, im Gegensatz zu maximal 3 Verdopplungen bei den Hydrolysaten C6#A und C5/C6#A als Substrat, am besten wuchs.

In der folgenden Abbildung 10 ist das Wachstum von *C. aceticum* auf ATCC-Medium mit LCB-Hydrolysat als Substrat dargestellt.

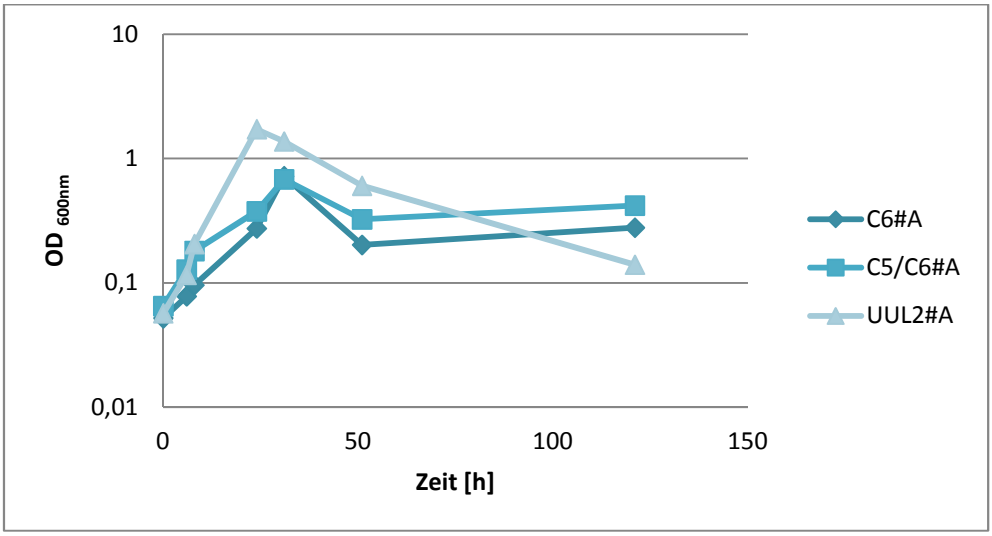


Abbildung 10: Wachstum von *C. aceticum* auf ATCC-Medium mit LCB-Hydrolysat als Substrat

In Abbildung 10 ist zu erkennen, dass *C. aceticum* bei Wachstum auf ATCC-Medium mit dem Hydrolysat UUL2#A mit ca. 3 Verdopplungen das beste Wachstum zeigte.

Mit den anderen Hydrolysaten C6#A und C5/C6#A als Substrat kam es nur zu einer bzw. zwei Verdopplungen.

Die nächste Abbildung 11 zeigt das Wachstum von *C. ljungdahlii* auf DSMZ-Medium mit LCB-Hydrolysat als Substrat.

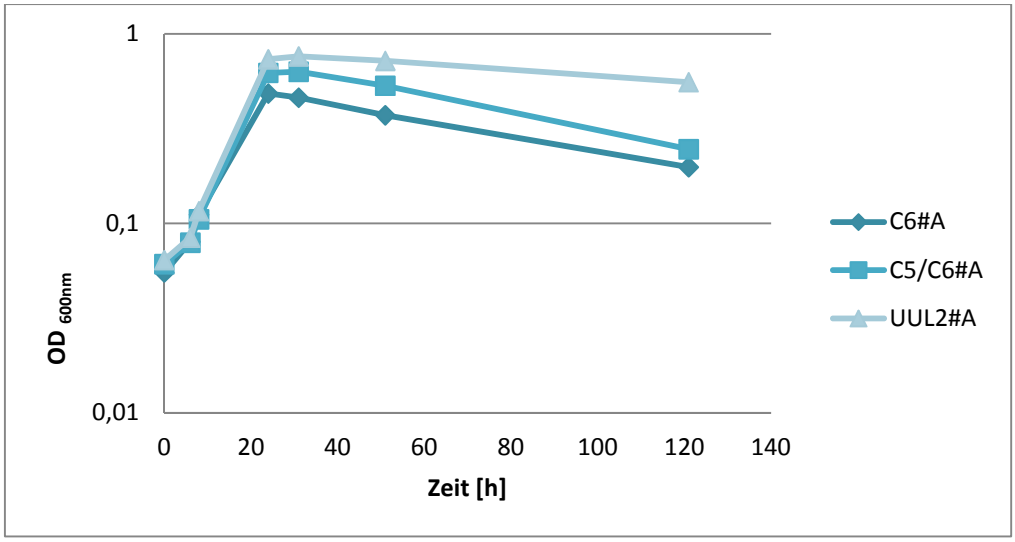


Abbildung 11: Wachstum von *C. ljungdahlii* auf DSMZ-Medium mit LCB-Hydrolysat als Substrat

C. ljungdahlii zeigte ebenfalls mit dem Hydrolysat UUL2#A als Substrat mit ca. 3 Verdopplungen das beste Wachstum. Auf den Hydrolysaten C6#A und C5/C6#A erreichte es höchstens 2-2,5 Verdopplungen.

Alle Stämme waren in der Lage, auf dem entsprechendem DSMZ- bzw. ATCC-Medium mit den verschiedenen Hydrolysaten als Substrat zu wachsen. Zur Veranschaulichung wurden die maximale OD_{600nm}-Werte sowie die Verdopplungszeiten bei Wachstum auf den jeweiligen Medien mit Hydrolysat als zusätzlichem Substrat in Tabelle 14 zusammengefasst.

Tabelle 14: maximale OD_{600nm}/Verdopplungszeiten bei Wachstum auf den jeweiligen Medien mit Hydrolysat als zusätzlichem Substrat

Medium	*C. ljungdahlii*	*C. aceticum*	*A. woodii*
DSMZ + Hydrolysat C6#A	0,48/9 h	0,27/7,5 h	0,8/7 h
DSMZ + Hydrolysat C5/C6#A	0,63/7 h	0,5/7 h	0,96/4,5 h
DSMZ + Hydrolysat UUL2#A	0,76/6 h	0,6/5,5 h	2,16/4 h

Aus Tabelle 14 ist zu erkennen, dass alle Stämme mit dem Hydrolysat UUL2#A als Kohlenstoffquelle das beste Wachstum zeigten.

3.2.2. Wachstum von *A. woodii*, *C. aceticum* und *C. ljungdahlii* auf verschiedenen Zuckern

Die Stämme *C. aceticum*, *C. ljungdahlii* und *A. woodi* wurden daraufhin untersucht, ob sie in der Lage sind, andere Kohlenstoffquellen als Fructose zu verwerten, welche sich ebenfalls in dem von der Firma Süd-Chemie AG bereitgestellten LCB-Hydrolysat befinden. Dafür wurde die normalerweise im DSMZ- bzw. ATCC-Medium enthaltene Kohlenstoffquelle Fructose (55 mM im ATCC-Medium und 27,5 mM im DSMZ-Medium) durch die Zucker Arabinose, Glucose, Xylose oder Saccharose, bei gleicher Konzentration wie Fructose, ersetzt. Das Medium wurde auf eine OD_{600nm} von ca. 0,1, aus einer Vorkultur mit den jeweiligen Zuckern als Kohlenstoffquelle, beimpft und bei 30 °C bzw. 37 °C inkubiert. Das Wachstum sowie das Produktspektrum wurde über mehrere Tage verfolgt und können den Abbildungen 12-14 entnommen werden.

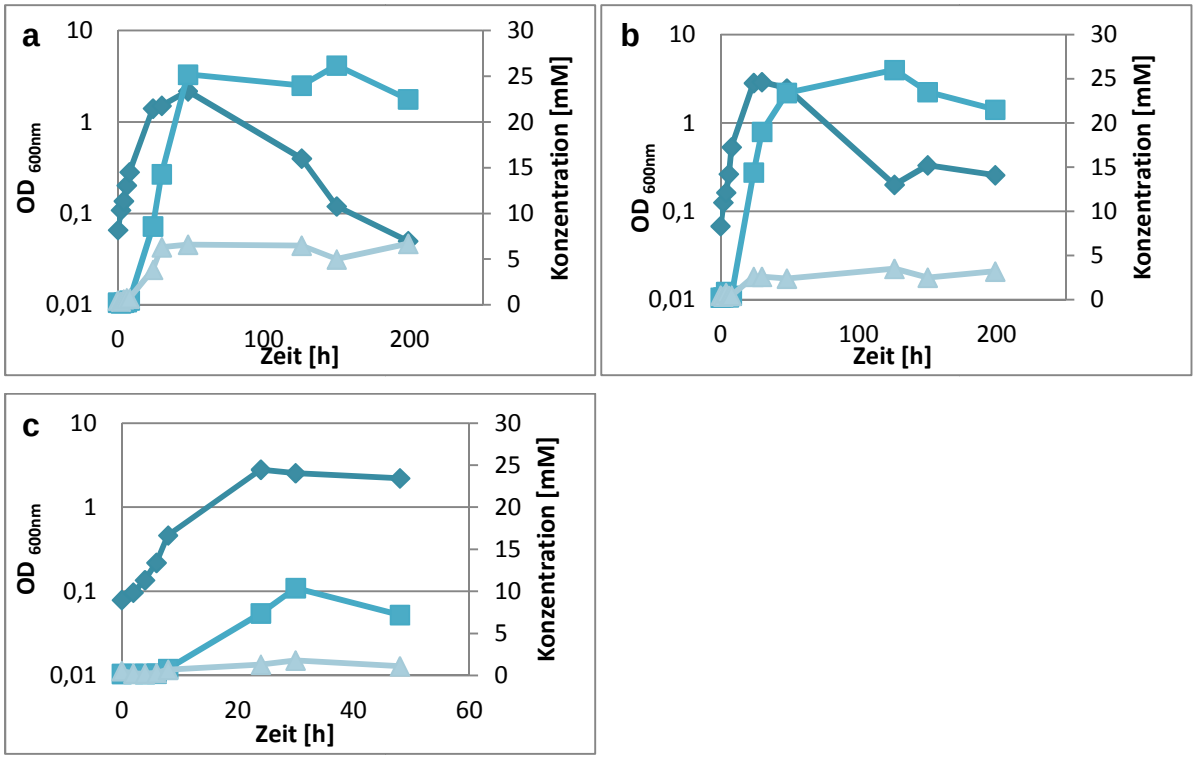


Abbildung 12: Wachstum und Produktspektrum von *A. woodii* auf ATCC-Medium mit **a**: Arabinose, **b**: Glucose oder **c**: Saccharose als Kohlenstoffquelle

A. woodii war nicht in der Lage, Xylose zu verwerten. Bei Wachstum auf Arabinose, Glucose und Saccharose erreichte es eine OD_{600nm} zwischen 2,2 und 2,9, was ca. 4,5 Verdopplungen entspricht. *A. woodii* produzierte mit Arabinose und Glucose als Kohlenstoffquelle bis zu 26 mM Ethanol und auf Saccharose bis zu 10 mM Ethanol. Ausserdem produzierte *A. woodii* auf Arabinose maximal 6,5 mM Acetat, auf Glucose rund 3,5 mM und auf Saccharose maximal 1,8 mM Acetat.

Die folgende Abbildung 13 (a-d) zeigt das Wachstum und die gaschromatographisch detektierte Acetatkonzentration von *C. aceticum* auf verschiedenen Zuckern.

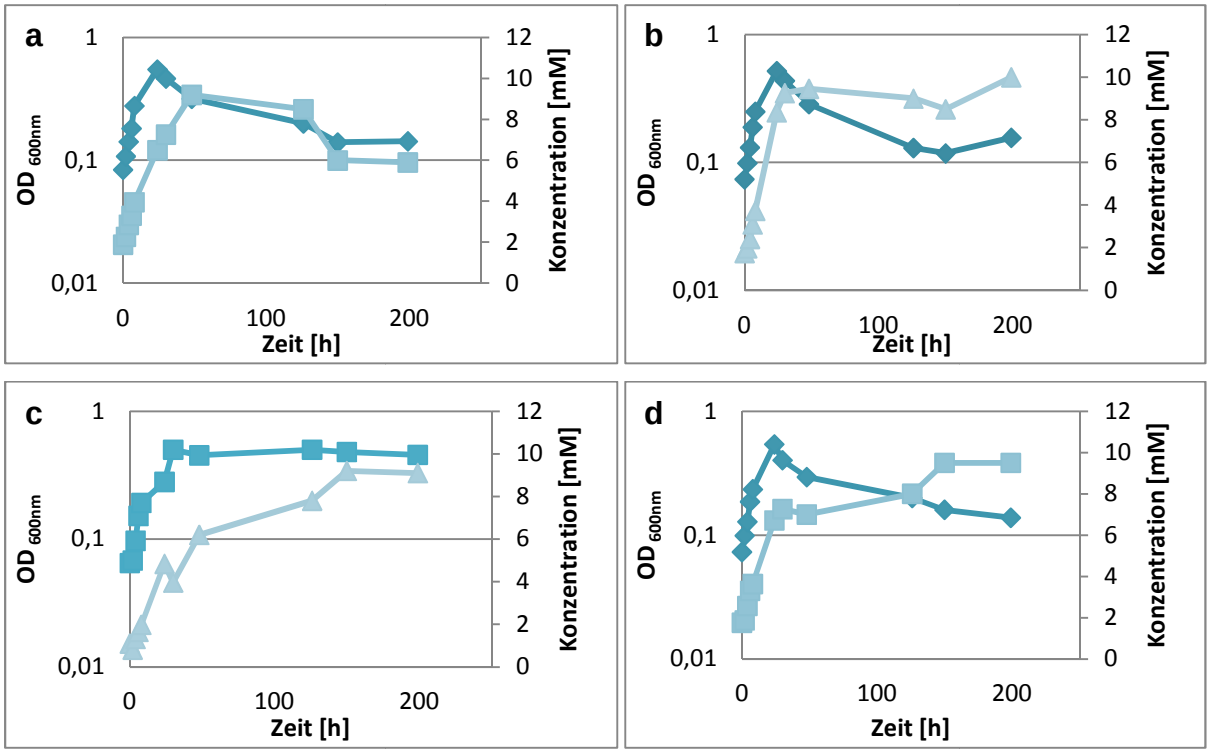


Abbildung 13: Wachstum und Produktspektrum von *C. aceticum* auf ATCC-Medium mit a: Arabinose, b: Glucose, c: Saccharose oder d: Xylose als Kohlenstoffquelle

C. aceticum war in der Lage, alle Zucker zu verwerten, wobei ca. 2 Verdopplungen möglich waren (max. OD_{600nm} 0,4-0,5). *C. aceticum* produzierte auf den verschiedenen Zuckern bis zu 9 mM Acetat.

Abbildung 14 zeigt Wachstum und Produktspektrum von *C. ljungdahlii* auf verschiedenen Zuckern.

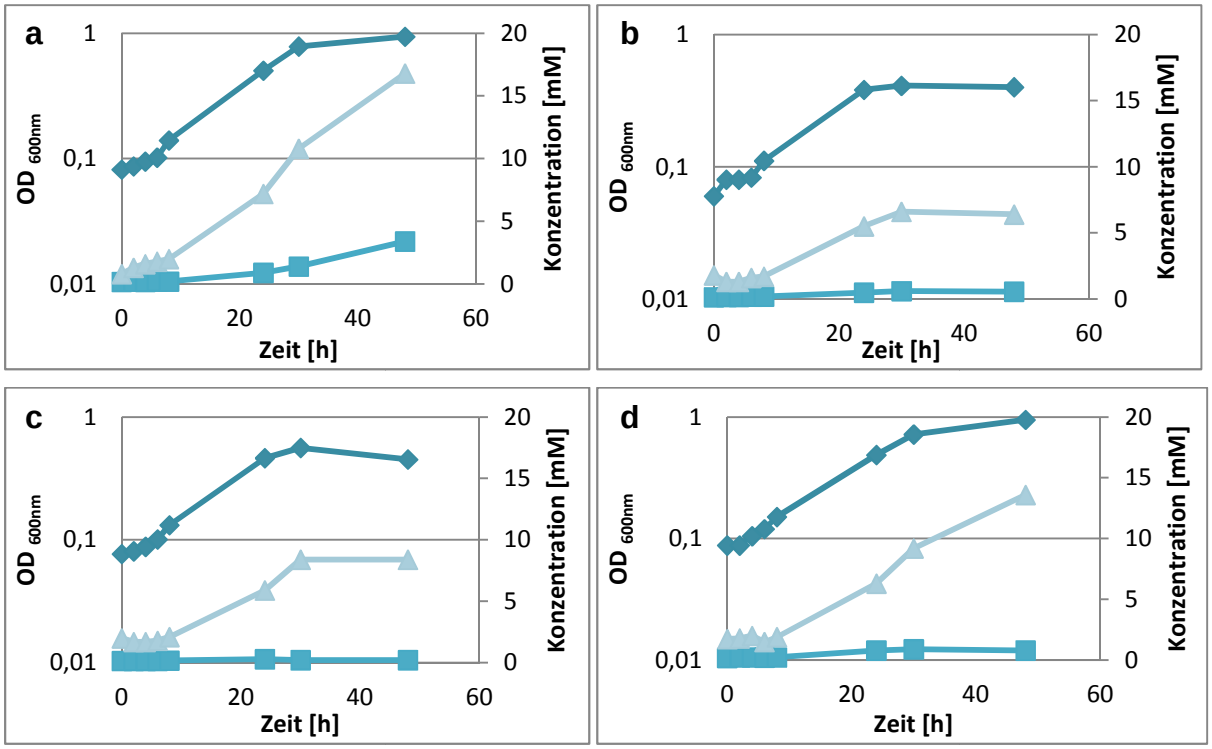


Abbildung 14: Wachstum und Produktspektrum von *C. ljungdahlii* auf DSMZ-Medium mit **a**: Arabinose, **b**: Glucose, **c**: Saccharose oder **d**: Xylose als Kohlenstoffquelle.

C. ljungdahlii war in der Lage, alle Zucker zu verwerten, wobei es bei Wachstum auf Arabinose und Xylose eine OD_{600nm} von ca. 1 (ca. 3 Verdopplungen) und bei Wachstum auf Glucose und Saccharose eine OD_{600nm} von 0,4 und 0,56 (ca. 2 Verdopplungen) erreichte. Auf Arabinose produzierte *C. ljungdahlii* nach 48 h maximal 3,4 mM Ethanol und 16 mM Acetat, auf Glucose 0,5 mM Ethanol und 6,6 mM Acetat, auf Xylose 0,9 mM Ethanol und 13,6 mM Acetat und auf Saccharose 0,23 mM Ethanol und 8,4 mM Acetat.

Zur Veranschaulichung wurden die maximal erreichten OD_{600nm}-Werte sowie die Verdopplungszeiten der verschiedenen Bakterien bei Wachstum auf verschiedenen Zuckern in Tabelle 15 zusammengefasst.

Tabelle 15: maximale OD_{600nm}/Verdopplungszeiten bei Wachstum auf verschiedenen Zuckern

Medium	*C. ljungdahlii*	*C. aceticum*	*A. woodii*
DSMZ/ATCC + Arabinose	0,94/6 h	0,5/4 h	2,18/4 h
DSMZ/ATCC + Glucose	0,4/9 h	0,43/4 h	2,9/3,5 h
DSMZ/ATCC + Xylose	0,95/6 h	0,4/4 h	n.g.
DSMZ/ATCC + Saccharose	0,56/7 h	0,45/4 h	2,8/2 h
DSMZ/ATCC + Fructose	1/4 h	1/ 3 h	2,7/5 h

n.g.: nicht gewachsen

In Tabelle 15 ist zu erkennen, dass alle Organismen in der Lage waren, mit den Zuckern als Kohlenstoffquelle in ihrem Medium zu wachsen. Nur *A. woodii* war nicht in der Lage, Xylose zu verstoffwechseln. *C. ljungdahlii* wuchs mit 6-9 h Verdopplungszeit am langsamsten und *A. woodii* hatte mit 2,18-2,9 die höchsten optischen Dichten.

3.2.3. Klonierung von pMW1 und pMW2

Die Plasmide pSB3C5-UUMKS 1/2/3, welche das Butanol-Operon tragen, besitzen keinen Replikationsursprung für Gram-positive Bakterien. Um diese Plasmide in *A. woodii*, *C. aceticum* und *C. ljungdahlii* einbringen zu können, war es notwendig, einen Replikationsursprung für Gram-positive Bakterien in die bestehenden Plasmide zu klonieren. Um die Selektion der erfolgreich klonierten Plasmide zu vereinfachen, wurde neben dem Replikationsursprung *repL* auch das Resistenzgen *ermC* aus dem Vektor pIMP1 in die Plasmide pSB3C5-UUMKS 1/2/3 eingebracht. Der Replikationsursprung *repL* sowie das Erythromycinresistenzgen *ermC* wurden gemeinsam mittels einer Standard-PCR aus dem Vektor pIMP1 amplifiziert. Mit Hilfe der verwendeten Oligodesoxynukleotide repL-ermC-PstI-F und repL-ermC-PstI-R wurden die Restriktionsschnittstellen *Pst*I jeweils am 5‘- und am 3‘-Ende generiert. Über diese Restriktionsschnittstellen wurden die Gene in die Plasmide pSB3C5-UUMKS 1/2/3 kloniert. Eine schematische Darstellung der Klonierung der Gene *ermC* und *repL* in das Plasmid pSB3C5-UUMKS 1 ist in Abbildung 15 zu sehen. Die Klonierung der Gene *ermC* und *repL* in die Plasmide pSB3C5-UUMKS 2 und 3 erfolgte nach dem gleichen Schema.

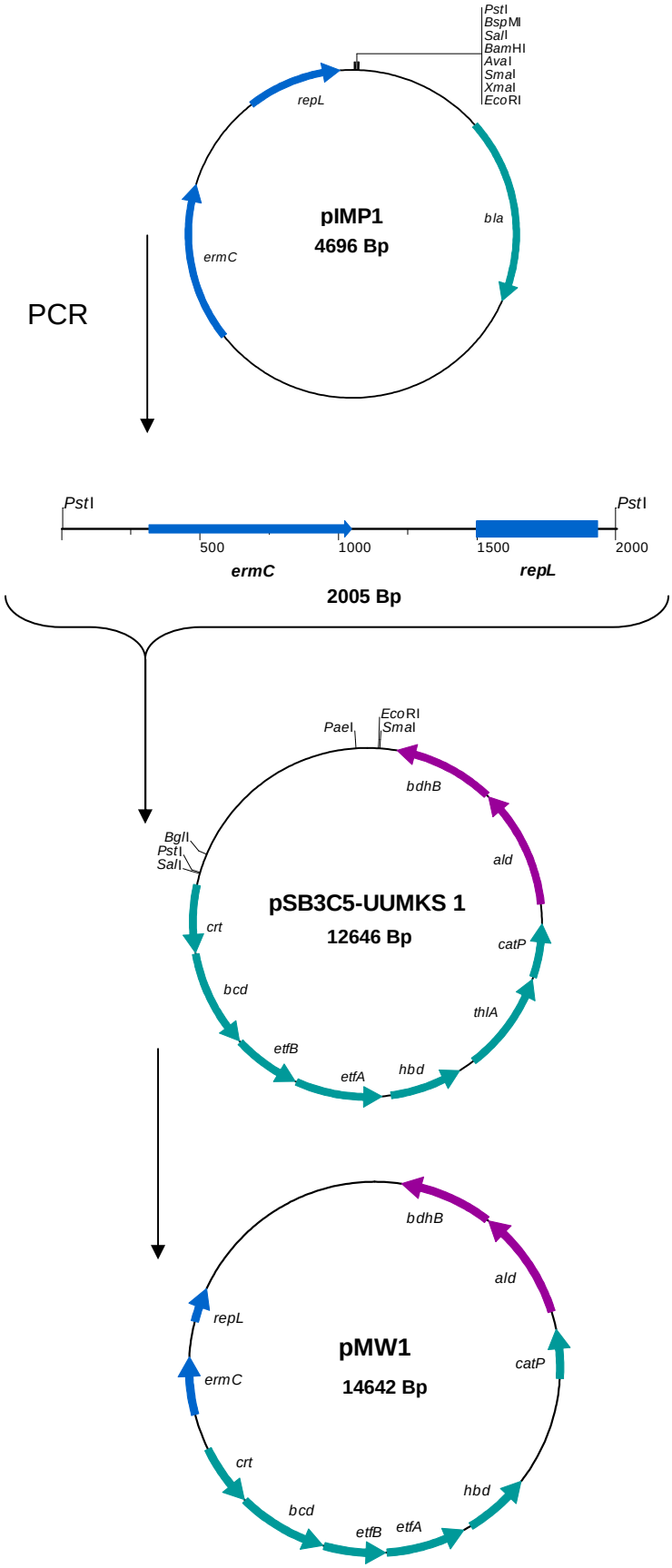


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Klonierung der Gene *ermC* und *repL* in das Plasmid pSB3C5-UUMKS 1

In die Plasmide pSB3C5-UUMKS 1 und pSB3C5-UUMKS 2 konnten die Gene *ermC* und *repL* erfolgreich kloniert werden, und die neuen Konstrukte tragen die Bezeichnung pMW1 und pMW2. Nach der Transformation in *E. coli* XL1-Blue wurden diese wieder isoliert und mit Hilfe des Enzyms *Pst*I verdaut. Bei erfolgreicher Klonierung zeigten sich nach dem Restriktionsverdau eine Bande von 2000 Bp und eine der Größe 12500 Bp. Dies ist für die Plasmide pMW1 und pMW2 in den Abbildungen 16a und 16b zu sehen.

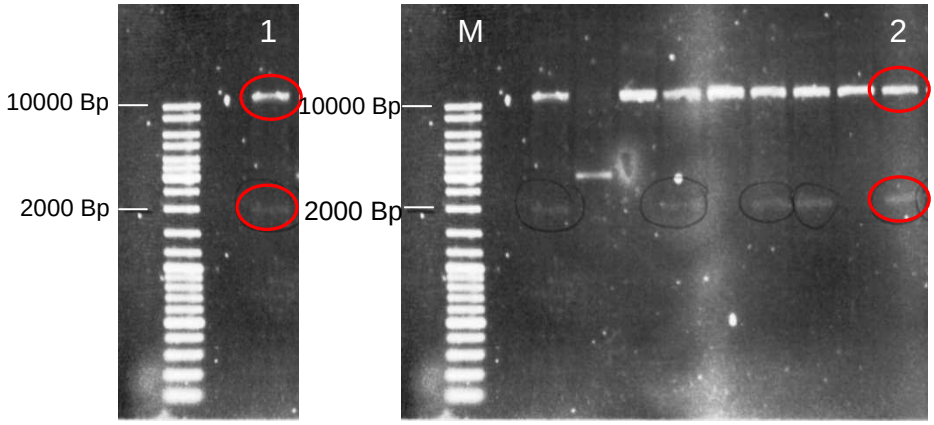


Abbildung 16a und b: 0,8 %-iges Agarosegel mit den Plasmiden pMW1 und pMW2 nach Restriktionsverdau mit *Pst*I. Spur 1: mit *Pst*I verdautes Plasmid pMW1; Spur 2: mit *Pst*I verdautes Plasmid pMW2; M: Größenstandard („GeneRuler™ DNA Ladder Mix“, Fermentas GmbH)

In den Abbildungen 16a und 16b sind Banden mit einer Größe von rund 2000 Bp und deutlich über 10000 Bp zu erkennen (rot eingerahmt).

Die Gene *ermC* und *repL* liegen mutationsfrei in den Plasmiden pMW1 und pMW2 vor. Dies wurde durch eine Sequenzierung der Firma GATC Biotech AG überprüft. In das Plasmid pSB3C5-UUMKS 3 konnten die Gene *ermC* und *repL* nicht kloniert werden.

3.2.3.1. Klonierung des Gens *adhE2* in den Vektor pIMP1

Eine Klonierung des Replikationsursprungs *repL* und des Erythromycinresistenzgens *ermC* in das Plasmid pSB3C5-UUMKS 3 war bisher nicht möglich. Der einzige Unterschied zu den anderen Plasmiden liegt in dem Gen *adhE2*, welche für die Acetaldehyd-CoA/Alkohol-Dehydrogenase 2 aus *Clostridium acetobutylicum* kodiert. Um auszuschließen, dass die erfolglose Klonierung an diesem Gen *adhE2* liegt, wurde dieses aus dem Plasmid pSB3C5-UUMKS 3 mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Eco*RI und *Ksp*AI herausgeschnitten und in den Vektor pIMP1 kloniert. Eine schematische Darstellung der Klonierung ist Abbildung 17 zu entnehmen.

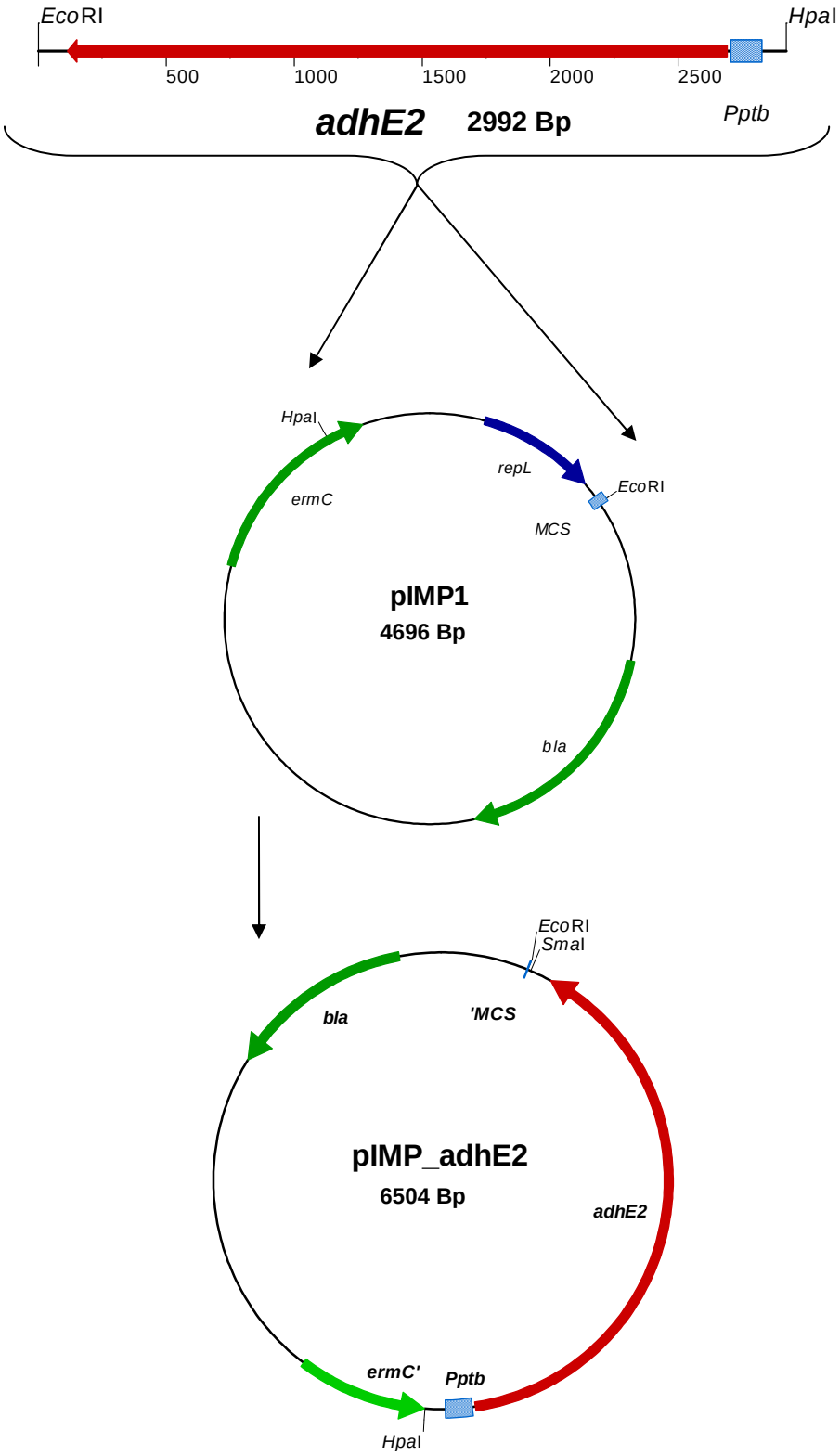


Abbildung 17: Schematische Darstellung der Klonierung des Gens *adhE2* in den Vektor pIMP1

Die Klonierung von *adhE2* in den Vektor pIMP1 war erfolgreich. Nach der Transformation des Plasmides pIMP1-adhE2 in *E. coli* XL1-Blue wurde dieses isoliert und mit Hilfe eines Restriktionsverdaus mit den Enzymen *Eco*RI und *Hpa*I nachgewiesen. Das Ergebnis ist in Abbildung 18 dargestellt.

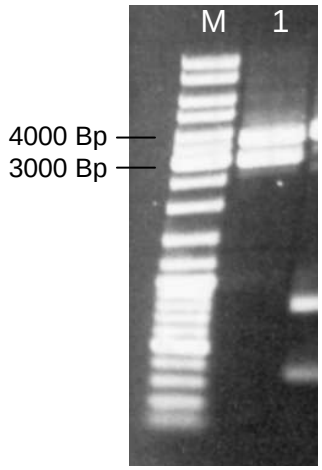


Abbildung 18: 0,8 %-iges Agarosegel; Spur 1: pIMP-adhE2 verdaut mit *EcoR*I und *HpA*I; M: Größenstandard („GeneRuler™ DNA Ladder Mix“, Fermentas GmbH)

Abbildung 18 zeigt das Plasmid pIMP1-adhE2 nach dem Restriktionsverdau mit den Enzymen *Eco*RI und *Hpa*I. Die Banden in Höhe von rund 3000 und 3600 Bp entsprechen den erwarteten Banden. Eine anschließende Sequenzierung durch die Firma GATC Biotech AG zeigte, dass das Insert *adh*E2 mutationsfrei in pIMP1 vorliegt.

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

Die Stämme *A. woodii*, *C. aceticum* und *C. ljungdahlii* sollten mit den Plasmiden pMW1 und pMW2, welche neben dem Butanol-Operon auch einen Replikationsursprung für Gram-positive Bakterien tragen, transformiert werden. Um eine erfolgreiche Transformation zu gewährleisten, wurden die Plasmide zunächst mit der Methyltransferase aus *C. ljungdahlii*, welche auf dem Plasmid pBRMClj lokalisiert ist, methyliert (2.5.7.5.1), um die eingebrachte Plasmid-DNA vor Degradation durch die Wirtszelle zu schützen. Das Methylierungsplasmid pBRMClj wurde in dieser Arbeit erstellt, indem das Gen der Methyltransferase aus *C. ljungdahlii* in den Vektor pBR322 kloniert wurde. Das Plasmid pMW1 ließ sich in *C. aceticum* erfolgreich einbringen. Die Transformation der Plasmide pMW1 und pMW2 in *C. ljungdahlii* und *A. woodii* blieb erfolglos.

3.2.4.1. *C. aceticum* pMW1

Das Plasmid pMW1 konnte erfolgreich in den Stamm *C. aceticum* transformiert werden. Eine Isolation des Plasmides zeigte, dass sich kein Restriktionsverdau als Kontrolle eignet, da *C. aceticum* selbst ein weiteres Plasmid besitzt. Aus diesem Grund wurde als Nachweis eine Standard-PCR mit der isolierten Plasmid-DNA als Template und den Oligodesoxynukleotiden ermC-repL-FWD und ermC-repL-REV durchgeführt. Diese Standard-PCR lieferte bei positiven Klonen ein rund 2000 Bp großes Fragment, welches in Abbildung 19 zu sehen ist. Als Negativkontrolle diente die isolierte, chromosomale DNA von *C. aceticum*-Wildtyp. Wurde diese als Template in die Standard-PCR eingesetzt, so zeigte sich keine Bande in Höhe von 2000 Bp.

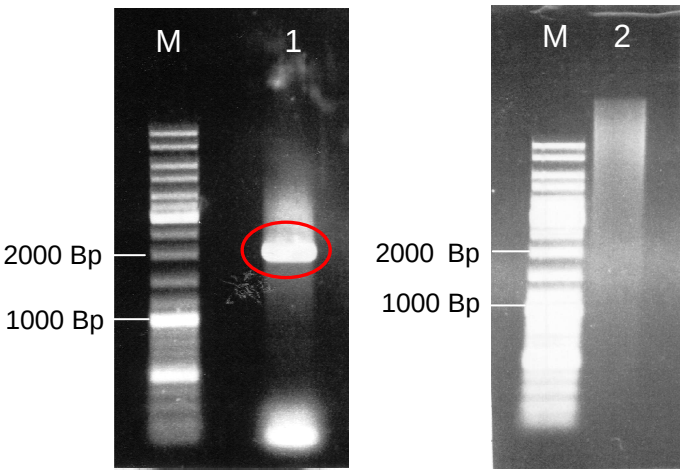


Abbildung 19: 0,8 %-iges Agarosegel; Nachweis des Vektors in *C. aceticum* über eine Standard-PCR. Spur 1: Nachweis des Vektors durch PCR, Template: Plasmidpräparation pMW1 aus *C. aceticum*; Spur 2: Plasmidpräparation aus *C. aceticum*; M: Größenstandard („GeneRuler™ DNA Ladder Mix“, Fermentas GmbH)

Abbildung 19, Spur 1 zeigt eine deutliche Bande auf Höhe von rund 2000 Bp (rot eingerahmt). *C. aceticum* trägt somit das Plasmid pMW1.

3.2.4.2. Wachstum und Produktspektrum von *C. aceticum* pMW1

Der Stamm *C. aceticum* pMW1 wurde nach erfolgreicher Transformation auf sein Wachstumsverhalten (Abbildung 20) und Produktspektrum (Abbildung 21) untersucht.

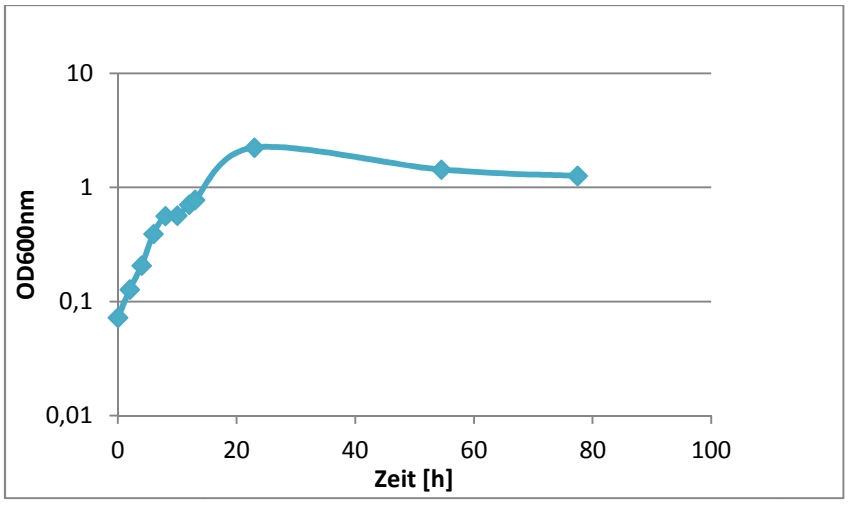


Abbildung 20: Wachstumskurve von *C. aceticum* pMW1

Wie in Abbildung 20 zu erkennen ist, erreichte der Stamm *C. aceticum* pMW1 eine maximale optische Dichte von 1,26.

In der folgenden Abbildung 21 ist das Produktspektrum von *C. aceticum* pMW1 zu sehen.

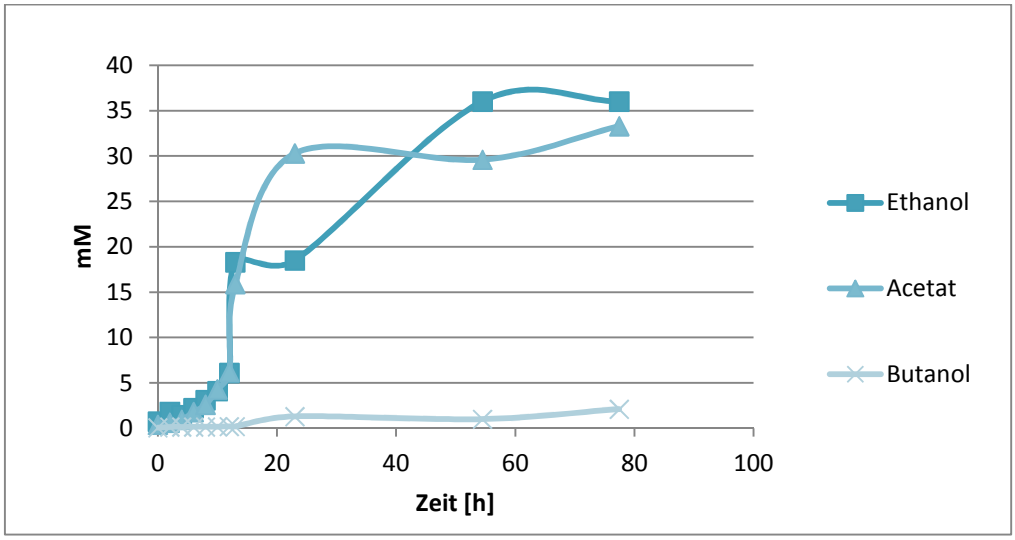


Abbildung 21: Produktspektrum von *C. aceticum* pMW1

Gaschromatographische Analysen zeigten ein Produktspektrum bestehend aus Ethanol, Acetat und Butanol. Dabei produzierte *C. aceticum* pMW1 2,1 mM Butanol. Die maximale Acetatkonzentration lag bei 33 mM und die Ethanolkonzentration bei 36 mM. In Tabelle 16 sind diese Ergebnisse zusammengefasst und dem *C. aceticum*-Wildtyp gegenübergestellt.

Tabelle 16: max. OD_{600nm}-Werte und Produktspektrum (mM) von *C. aceticum*-Wildtyp (WT) und *C. aceticum* pMW1

C. aceticum	**WT**	**pMW1**
max. OD_{600nm}	2,3	2,2
max. Acetat [mM]	70,0	33,3
max. Ethanol [mM]	-	36,0
max. Butanol [mM]	-	2,1

In Tabelle 16 ist zu erkennen, dass der *C. aceticum*-Wildtyp nicht in der Lage war 1-Butanol zu produzieren. Dabei produzierte er mit 70 mM doppelt so viel Acetat wie der Stamm *C. aceticum* pMW1 mit den 1-Butanol-Synthese-Genen. *C. aceticum*

pMW1 war in der Lage bis zu 2,1 mM 1-Butanol und 36,0 mM Ethanol zu produzieren.

3.3. Isolierung von Stämmen zur 1-Butanolproduktion aus Umweltproben

Pascher isolierte in seiner Bachelorarbeit 2010 Bakterienstämme, die zur späteren Butanolproduktion verwendet werden sollten. Hierzu wurden Waldbodenproben, Baumproben, Proben aus einem Anaerobenbecken einer Kläranlage sowie Proben aus der Flüssigkeit von Biomüll herangezogen. Das LCB-Hydrolysat C5/C6#B, eine weitere Charge, welche als Zucker Glucose, Xylose, Arabinose, Fructose und Disaccharide enthält, wurde mit den Zusatzlösungen 1 bzw. 2 (und sowohl mit den Zusätzen K_2HPO_4 als auch ohne) 1:2 verdünnt und nach dem Beimpfen bei 30 °C und 37 °C für 3 Tage inkubiert. Das Beimpfen erfolgte, indem kleine Mengen der verschiedenen Proben in das LCB-Hydrolysat gegeben wurden. Anschließend wurden die Kulturen alle drei Tage in frisches LCB-Hydrolysat überführt. Bei den Anreicherungsmedien ohne K_2HPO_4 zeigte sich nur bei den Biomüll- und Kläranlagenproben Wachstum, bei den Waldboden-, Baum- und Blätterproben konnte kein Wachstum beobachtet werden. Auf den Anreicherungsmedien mit K_2HPO_4 zeigte sich bei allen Proben Wachstum. Dabei konnten 6 verschiedene Bakterienstämme isoliert und charakterisiert werden. Diese sind Tabelle 17 zu entnehmen.

Tabelle 17: Erfolgreich isolierte Bakterienstämme nach Wachstum auf LCB-Hydrolysat C5/C6#B mit verschiedenen Zusatzlösungen

	Zusatzlösung 1 mit K_2HPO_4		**Zusatzlösung 1 ohne K_2HPO_4**		**Zusatzlösung 2 mit K_2HPO_4**		**Zusatzlösung 2 ohne K_2HPO_4**	
	30 °C	37 °C	30 °C	37 °C	30 °C	37 °C	30 °C	37 °C
Baum	X	*Lactobacillus plantarum*	X	X	X	*Lactobacillus plantarum*	X	X
Blätter	X	*Bacillus coagulans*	X	X	X	*Bacillus coagulans*	X	X
Boden	X	*Lactobacillus rhamnosus; Lactobacillus casei (*)*	X	X	X	X	X	X
Biomüll	X	*Lactobacillus rhamnosus; Lactobacillus casei*	*Lactobacillus pantheris*	X	*Lactobacillus plantarum*	*Lactobacillus casei*	X	X
Kläranlage	*Lactobacillus hilgardii*	X	X	X	X	*Lactobacillus casei*	X	*Lactobacillus plantarum, Lactobacillus sp.* (*)

(*): Mischkultur; X : kein Wachstum

Tabelle 17 zeigt, dass auf den ungepufferten Medien kaum Wachstum möglich war. Es konnten folgende sechs Organismen isoliert und identifiziert werden: *Lactobacillus plantarum, Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus casei, Lactobacillus hilgardii, Lactobacillus pantheris* und *Bacillus coagulans*. Bei den Organismen *L. rhamnosus* und *L. casei* scheint es sich um Mischkulturen zu handeln, da auf den Agarplatten noch Kolonien gefunden werden konnten die sich in Form und Farbe unterscheiden. Aus diesem Grund wurden die folgenden Versuche mit den isolierten Stämmen *L. plantarum*, *L. pantheris*, *L.hilgardii* und *B. coagulans* durchgeführt. Hierbei lag das Augenmerk auf den Lactobacillen, da für diese ein gemeinsamer Replikationsursprung für eine Transformation der Butanol-Synthese-Plasmide verwendet werden kann.

Neben den Isolaten wurden diese Stämme bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) als Reinkulturen bestellt, um Vergleichswerte zu erhalten.

3.3.1. *L. plantarum*, *L. pantheris*, *L. hilgardii*

Die aus den Anreicherungsversuchen isolierten Bakterien sowie die DSMZ-Stämme *L. plantarum, L. pantheris* und *L. hilgardii* wurden auf ihr Wachstum in MRS- und MRS-Minimal-Medium (MRS mini) unter anaeroben und semianaeroben Bedingungen hin untersucht. Anaerob wurde gearbeitet wie im Teil Material & Methoden beschrieben. Semianaerob wurde gearbeitet, indem die Medien aerob hergestellt wurden, die Versuche mit diesen aber nicht schüttelnd durchgeführt wurden, so dass keine gleichmäßige Sauerstoffversorgung gewährleistet war. Das MRS-Minimal-Medium wurde erstellt, um das Produktspektrum der einzelnen Stämme gaschromatographisch zu bestimmen, da das MRS-Medium bis zu 70 mM Acetat enthält und eine Analyse weiterer Produkte im Gaschromatographen unmöglich macht. Wachstumsversuche zu *B. coagulans* wurden ebenfalls durchgeführt und sind dem Anhang zu entnehmen, da dieser Stamm für eine erfolgreiche Transformation der Butanol-Synthese-Plasmide einen eigenen Replikationsursprung benötigte und dadurch keine positiven Ergebnisse mit diesem Stamm erzielt werden konnten.

.

3.3.1.1. Wachstum *L. plantarum*-Isolat und DSM 1055 auf MRS und MRS mini

Zur Bestimmung des Produktspektrums und des Wachstumsverhaltens wurden 250 ml MRS- bzw. MRS mini-Medium auf eine OD_{600nm} von 0,1, mit einer in MRS bzw. MRS mini gewachsenen Vorkultur, inokuliert. Die folgende Abbildung 22 zeigt das anaerobe und semianaerobe Wachstum auf MRS bzw. MRS mini des Isolates *L. plantarum*.

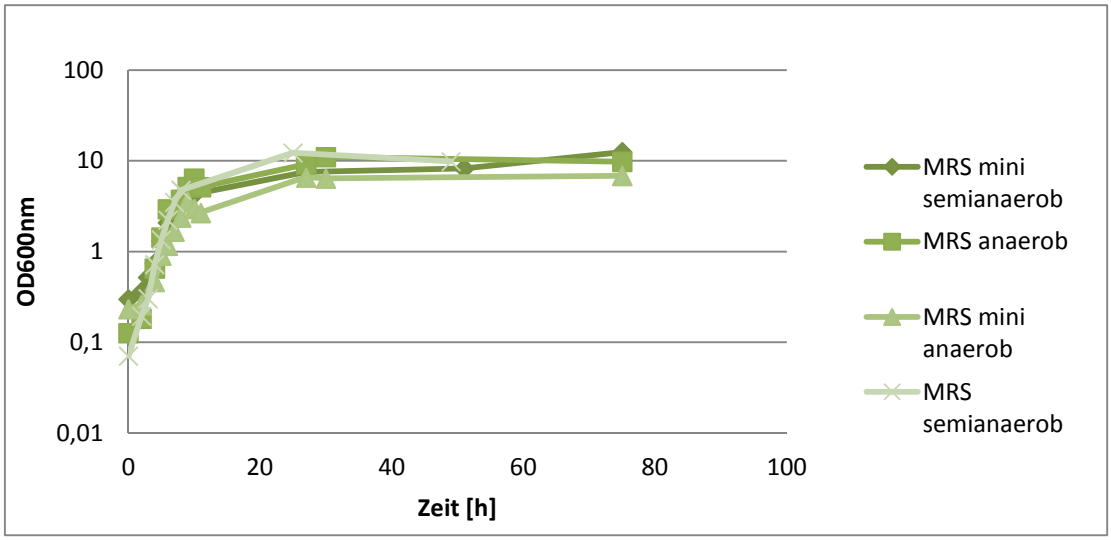


Abbildung 22: Wachstum von *L. plantarum* (Isolat) auf MRS-Medium und MRS-Minimal-Medium (MRS mini) unter anaeroben und semianaeroben Bedingungen

L. plantarum (Isolat) erreicht auf MRS Medium eine maximale optische Dichte von ca. 12 und auf MRS-Minimal-Medium von ca. 6,5. In beiden Medien, sowohl anaerob als auch semianaerob, weist *L. plantarum* (Isolat) ein vergleichbares Wachstum auf.

In Abbildung 23 ist die Lactatproduktion von *L. plantarum* (Isolat) auf MRS und MRS-Minimal-Medium unter anaeroben und semianaeroben Bedingungen dargestellt.

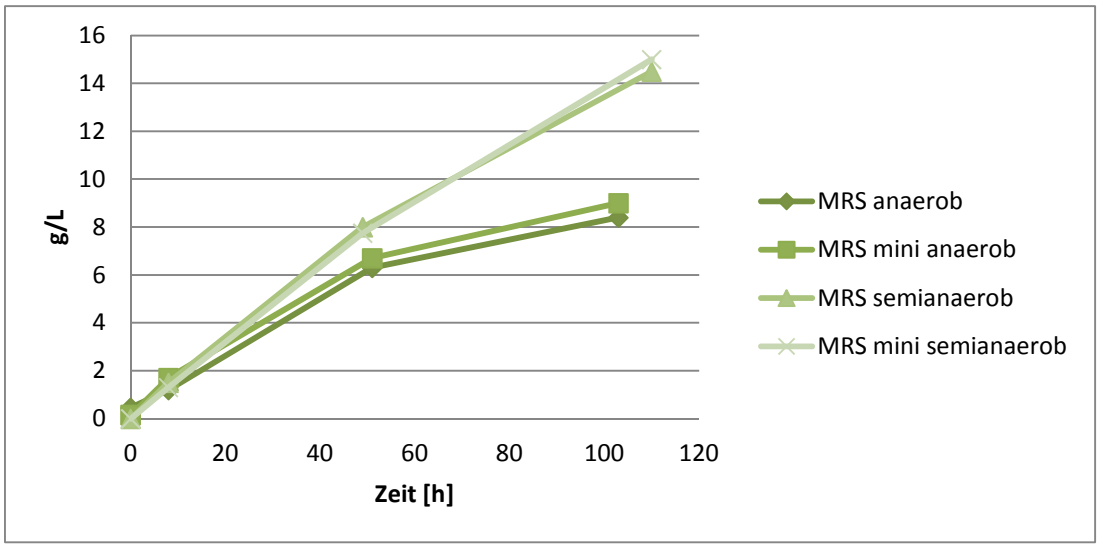


Abbildung 23: Lactatproduktion von *L. plantarum* (Isolat) bei Wachstum auf MRS und MRS-Minimal-Medium (MRS mini) unter anaeroben und semianaeroben Bedingungen

In Abbildung 23 ist zu erkennen, dass *L. plantarum* (Isolat) entsprechend der enzymatischen Analyse bei anaerobem Wachstum auf MRS ca. 8,4 g/L und bei Wachstum auf MRS mini bis zu 9 g/L Lactat produziert. Unter semianaeroben Bedingungen produziert er mit 14,5 (MRS) und 15 g/L (MRS mini) fast doppelt so viel Lactat wie unter anaeroben Bedingungen. Die gaschromatographischen Analysen bei Wachstum auf MRS mini unter anaeroben sowie semianaeroben Bedingungen zeigten keine der von uns messbaren Produkte.

Im Folgenden wird der *L. plantarum* DSMZ-Stamm betrachtet.

Die folgende Abbildung 24 zeigt das anaerobe und semianaerobe Wachstum auf MRS bzw. MRS mini des DSMZ-Stammes *L. plantarum* DSM 1055.

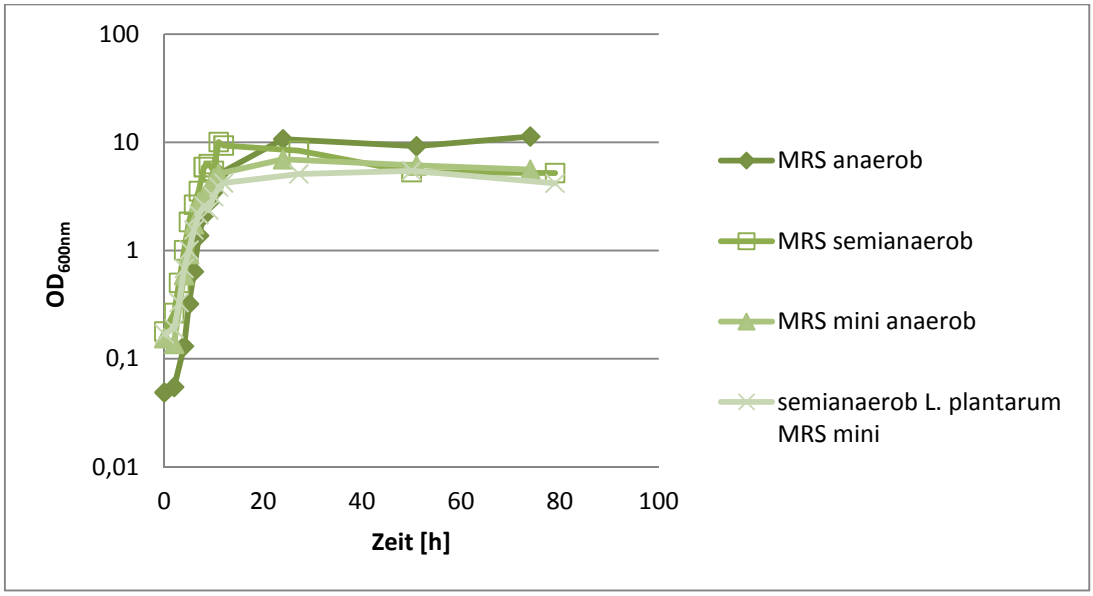


Abbildung 24: Wachstum von *L. plantarum* DSM 1055 auf MRS-Medium und MRS-Minimal-Medium (MRS mini) unter anaeroben und semianaeroben Bedingungen

L. plantarum DSM 1055 erreichte auf MRS Medium eine maximale optische Dichte von ca. 10 und auf MRS-Minimal-Medium von ca. 6. In allen Medien, ob anaerob oder semianaerob, weist *L. plantarum* DSM 1055 ein ähnliches Wachstum auf. In Abbildung 25 ist das Produktspektrum von *L. plantarum* DSM 1055 auf MRS-Minimal-Medium unter anaeroben und semianaeroben Bedingungen dargestellt.

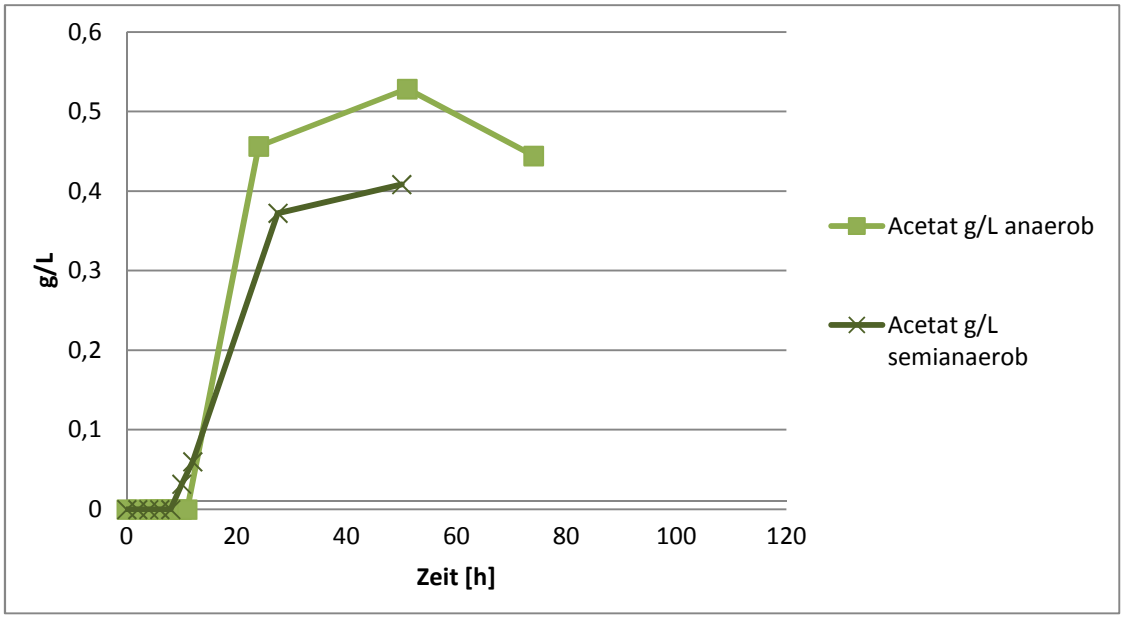


Abbildung 25: Wachstum und Produktspektrum von *L. plantarum* DSM 1055 auf MRS-Minimal-Medium (MRS mini) unter semianaeroben und anaeroben Bedingungen

In Abbildung 25 ist zu erkennen, dass *L. plantarum* DSM 1055 entsprechend der gaschromatographischen Analyse auf semianaeroben MRS-Minimal-Medium 0,4 g/L Acetat produzierte. Dies unterscheidet sich kaum von der Acetatproduktion bei Wachstum unter anaeroben Bedingungen. Hier lag die maximale Acetatkonzentration bei 0,5 g/L.

In Abbildung 26 ist die Lactatproduktion von *L. plantarum* DSM 1055 auf MRS und MRS-Minimal-Medium unter anaeroben und semianaeroben Bedingungen dargestellt.

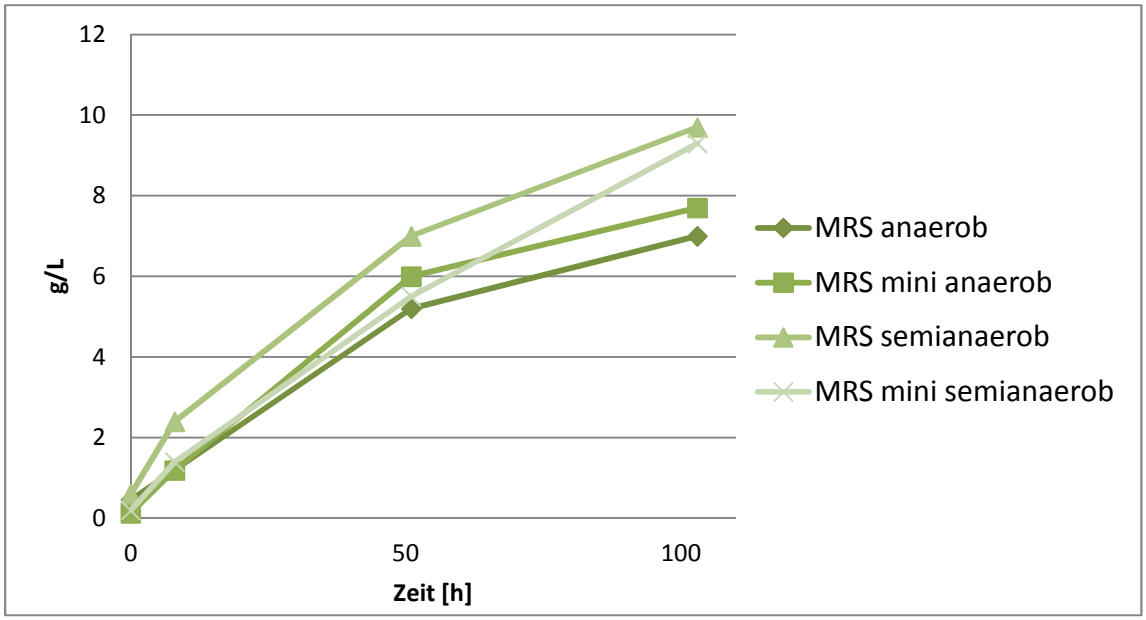


Abbildung 26: Lactatproduktion von *L. plantarum* DSM 1055 bei Wachstum auf MRS und MRS-Minimal-Medium (MRS mini) unter anaeroben und semianaeroben Bedingungen

In Abbildung 26 ist zu erkennen, dass *L. plantarum* DSM 1055 auf MRS mini unter anaeroben als auch unter semianaeroben Bedingungen eine höhere Lactatproduktion aufwies.

Die folgende Tabelle 18 zeigt eine Zusammenfassung des Wachstums und Produktspektrum von *L. plantarum* DSM 1055 und des isolierten *L. plantarum*.

Tabelle 18: Vergleich von Wachstum und Produktspektrum von *L. plantarum* (DSMZ vs. Isolat)

	max. OD_{600nm}		Ethanol g/L		Acetat g/L (mM)		Lactat g/L	
Medium	**DSMZ**	**Isolat**	**DSMZ**	**Isolat**	**DSMZ**	**Isolat**	**DSMZ**	**Isolat**
MRS semianaerob	10	12	*	*	*	*	9,7	14,5
MRS anaerob	10,6	11	*	*	*	*	7,1	8,4
MRS mini semianaerob	6	12	0	0	0,45 (7,5)	0	9,3	15
MRS mini anaerob	6	6,5	0	0	0,50 (8,3)	0	7,7	9

(*: mit unseren analytischen Methoden nicht messbar)

Der isolierte Stamm *L. plantarum* erreichte bei Wachstum auf MRS-mini unter semianaeroben Bedingungen eine doppelt so hohe optische Dichte wie der DSMZ-Stamm. Bei Wachstum auf den anderen Medien waren kaum Unterschiede zu beobachten, ebenso wie bei der maximalen Lactatkonzentration unter anaeroben Bedingungen. Im Gegensatz zum DSMZ-Stamm produzierte das isolierte *L. plantarum* kein Acetat.

3.3.1.2. Wachstum *L. pantheris*-Isolat und DSM 15945 auf MRS und MRS mini

Zur Bestimmung des Produktspektrums und des Wachstumsverhaltens von *L. pantheris* wurden 250 ml MRS- bzw. MRS mini-Medium auf eine OD_{600nm} von 0,1, mit einer in MRS bzw. MRS mini gewachsenen Vorkultur, inokuliert. Die folgende Abbildung 27 zeigt das anaerobe und semianaerobe Wachstum auf MRS bzw. MRS mini des Isolates *L. pantheris*.

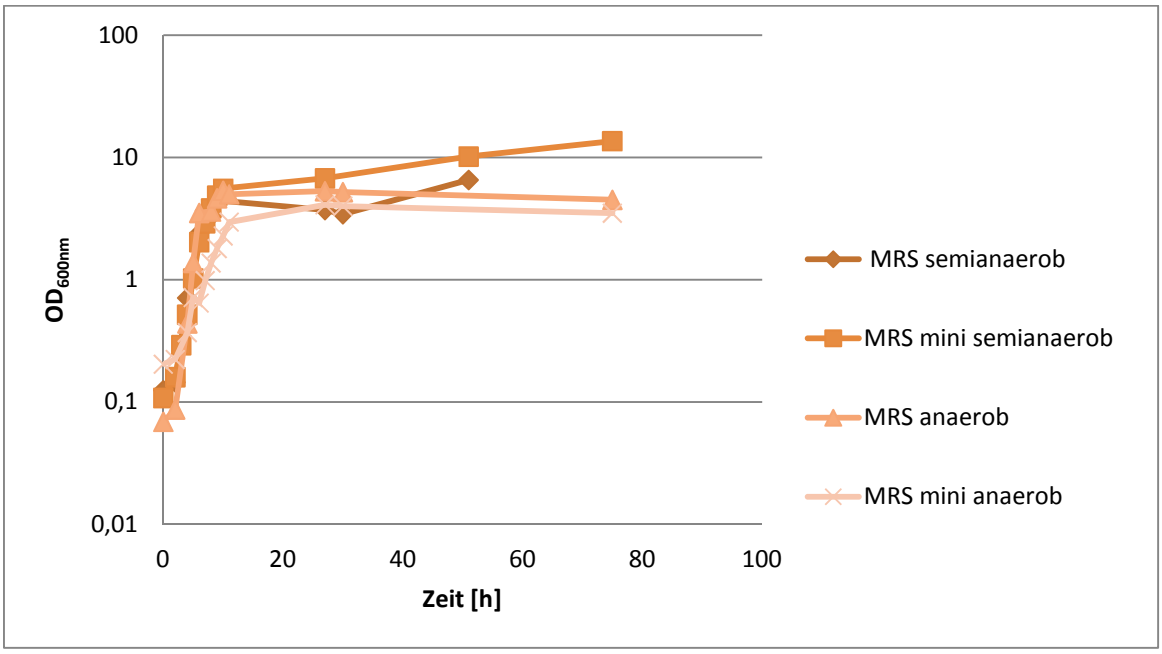


Abbildung 27: Wachstum des Isolates *L. pantheris* auf MRS-Medium und MRS-Minimal-Medium (MRS mini) unter anaeroben und semianaeroben Bedingungen

L. pantheris (Isolat) erreichte auf MRS-Medium und MRS mini anaerob eine maximale optische Dichte von ca. 4,5. Unter semianaeroben Bedingungen erreichte er bei Wachstum auf MRS und MRS mini mit 9 und 13 eine bis zu dreifach höhere optische Dichte als unter anaeroben Bedingungen.

In Abbildung 28 ist das Produktspektrum von *L. pantheris* (Isolat) auf MRS-Minimal-Medium unter anaeroben und semianaeroben Bedingungen dargestellt und in Abbildung 29 ist die Lactatproduktion unter anaeroben Bedingungen bei Wachstum auf MRS und MRS-mini zu sehen.

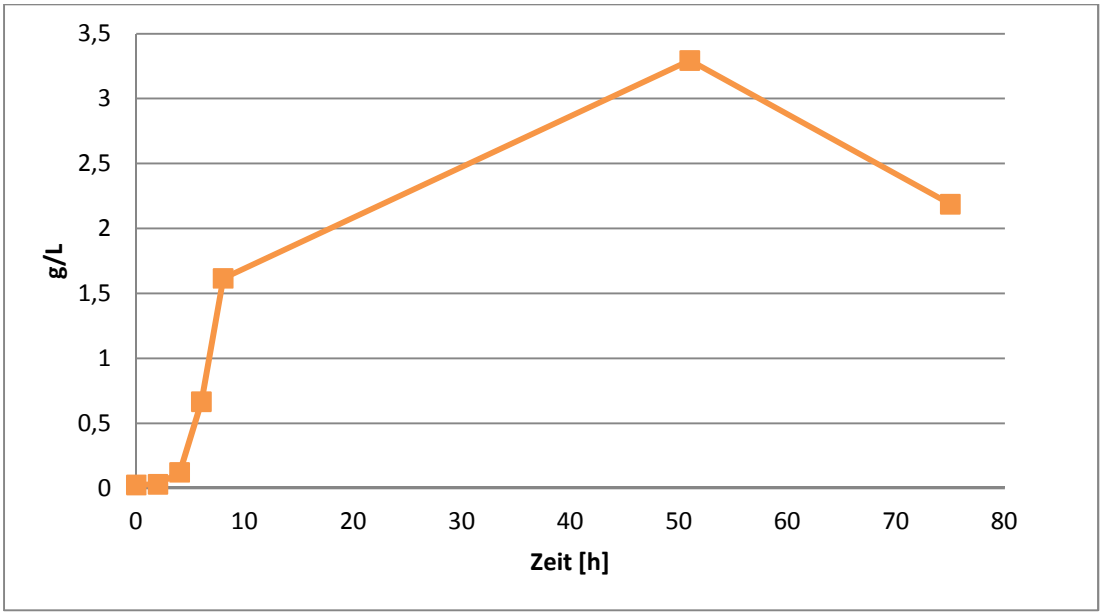


Abbildung 28: Produktspektrum von *L. pantheris* (Isolat) auf MRS-Minimal-Medium (MRS mini) unter semianaeroben und anaeroben Bedingungen.

Wie in Abbildung 28 zu erkennen ist, produzierte das Isolat *L. pantheris* unter semianaeroben Bedingungen bis zu 3,2 g/L Ethanol. Unter anaeroben Bedingungen produzierte *L. pantheris* (Isolat) neben Lactat (Abbildung 29) keine Produkte, die mit Hilfe unserer gaschromatographischen Analysen identifiziert werden konnten.

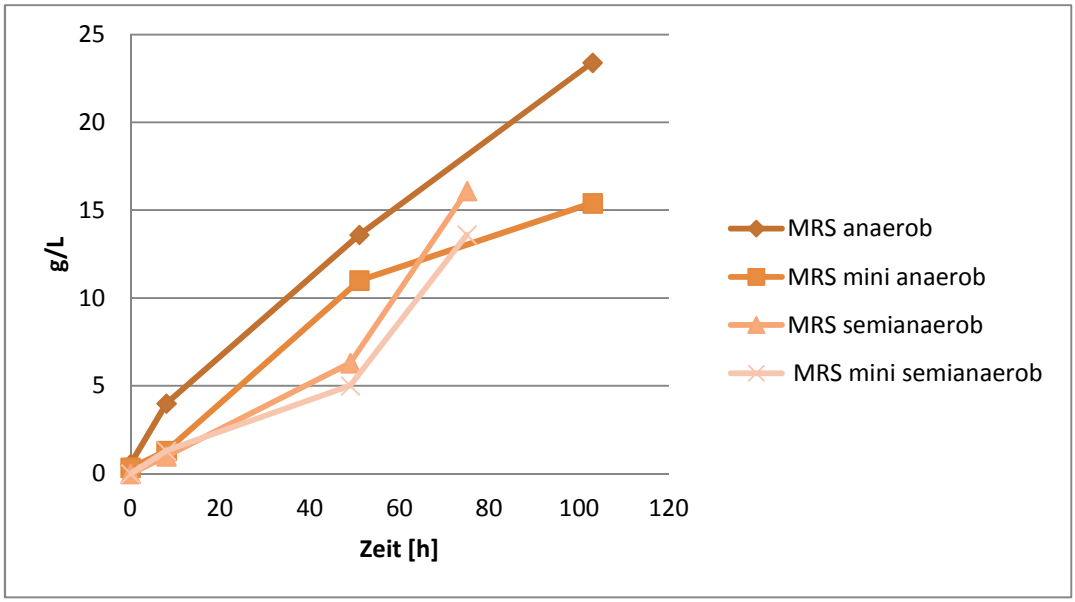


Abbildung 29: Lactatproduktion von *L. pantheris* (Isolat) bei Wachstum auf MRS- und MRS-Minimal-Medium (MRS mini) unter anaeroben und semianaeroben Bedingungen.

In Abbildung 29 ist zu erkennen, das *L. pantheris* (Isolat) bei Wachstum auf MRS unter anaeroben Bedingungen nach 103 h bis zu 23,4 g/L und auf MRS mini bis zu 15 g/L Lactat produzierte. Unter semianaeroben Bedingungen produzierte *L. pantheris* (Isolat) nach 75 h mit 13,6 (MRS mini) und 16,1 g/L (MRS) weniger Lactat als unter anaeroben Bedingungen.

Im Folgenden wird der *L. pantheris* DSMZ-Stamm betrachtet.

Die folgende Abbildung 30 zeigt das anaerobe und semianaerobe Wachstum auf MRS bzw. MRS-Minimal-Medium (MRS mini) von *L. pantheris* DSM 15945.

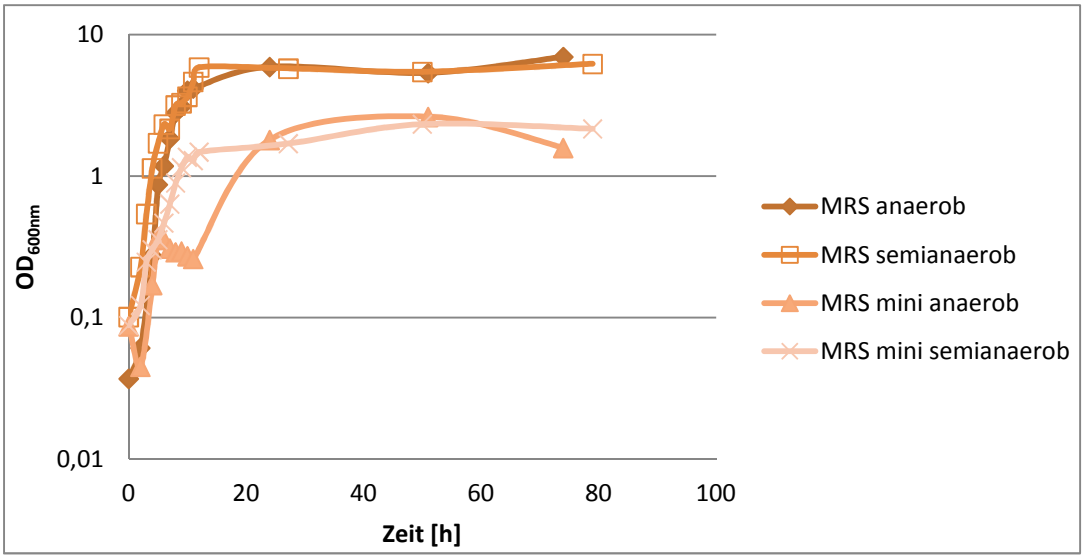


Abbildung 30: Wachstum von *L. pantheris* DSM 15945 auf MRS-Medium und MRS-Minimal-Medium (MRS mini) unter anaeroben und semianaeroben Bedingungen

L. pantheris DSM 15945 erreichte auf MRS-Medium anaerob sowie semianaerob eine maximale optische Dichte von ca. 6. Im Vergleich dazu erreichte *L. pantheris* DSM 15945 bei Wachstum auf MRS-Minimal-Medium mit einer OD_{600nm} von 2 nur ein Drittel davon. Anaerobe bzw. semianaerobe Bedingungen schienen hierbei keine Rolle zu spielen.

L. pantheris DSM 15945 produzierte hauptsächlich Lactat, welches enzymatisch nachgewiesen wurde (Abbildung 31).

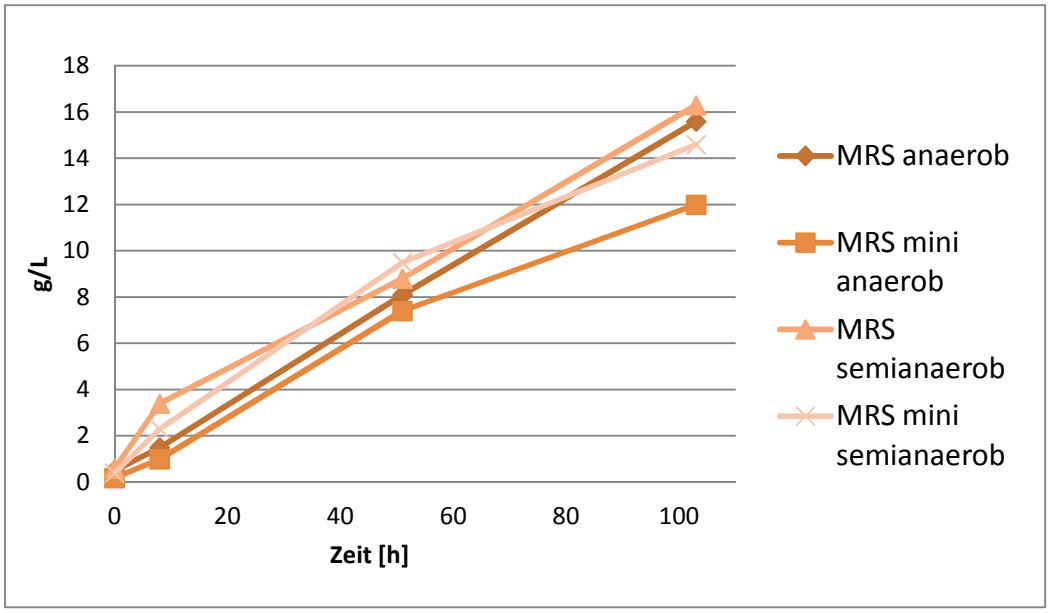


Abbildung 31: Lactatproduktion von *L. pantheris* DSM 15945 bei Wachstum auf MRS und MRS-Minimal-Medium (MRS mini) unter anaeroben und semianaeroben Bedingungen.

In Abbildung 31 ist zu erkennen, dass *L. pantheris* DSM 15945 nach 103 h mit maximal 12 g/L auf MRS mini unter anaeroben Bedingungen, im Gegensatz zu 16,3 (MRS semianaerob), 15,6 (MRS anaerob) und 14,6 (MRS semianaerob), am wenigsten Lactat produzierte.

Die folgende Tabelle 19 zeigt eine Zusammenfassung des Wachstums und Produktspektrum von *L. pantheris* DSM 15945 und des isolierten *L. pantheris*.

Tabelle 19: Vergleich von Wachstum und Produktspektrum von *L. pantheris* (DSMZ vs. Isolat)

	max. OD_{600nm}		Ethanol g/L (mM)		Acetat g/L		Lactat g/L	
Medium	**DSMZ**	**Isolat**	**DSMZ**	**Isolat**	**DSMZ**	**Isolat**	**DSMZ**	**Isolat**
MRS semianaerob	2	11,0	*	*	*	*	16,3	16,1
MRS anaerob	6	5,3	*	*	*	*	15,6	23,4
MRS mini semianaerob	6	13,6	0	3,2 (71)	0	0	14,6	13,6
MRS mini anaerob	2	4,1	0	0	0	0	12	15,4

(*: nicht mit unseren analytischen Methoden messbar)

In Tabelle 19 ist zu erkennen, dass das Isolat *L. pantheris* mit einer maximalen optischen Dichte von 11 auf MRS semianaerob, 13,6 auf MRS mini semianaerob und 4,1 auf MRS mini anaerob eine wesentlich höhere Zelldichte als der DSMZ-Stamm aufwies. Bei Wachstum auf MRS mini unter semianaeroben Bedingungen produzierte das Isolat im Gegensatz zum DSMZ-Stamm 3,2 g/L Ethanol. Ebenfalls produzierte das Isolat mit 23,4 g/L und 15,4 g/L mehr Lactat als der DSMZ-Stamm. Unter semianaeroben Bedingungen sind kaum Unterschiede in der Lactatproduktion zu erkennen. Weder das Isolat noch der DSMZ-Stamm produzierten Acetat.

3.3.1.3. Wachstum *L. hilgardii*-Isolat und DSM 20051 auf MRS und MRS mini

Die Wachstumsversuche wurden in einem Volumen von 250 ml Medium durchgeführt. Hierzu wurden 250 ml MRS bzw. MRS mini mit einer in MRS bzw. MRS mini gewachsenen *L. hilgardii*-Vorkultur inokuliert. Die folgende Abbildung 32 zeigt das anaerobe und semianaerobe Wachstum auf MRS bzw. MRS mini des Isolates *L. pantheris*.

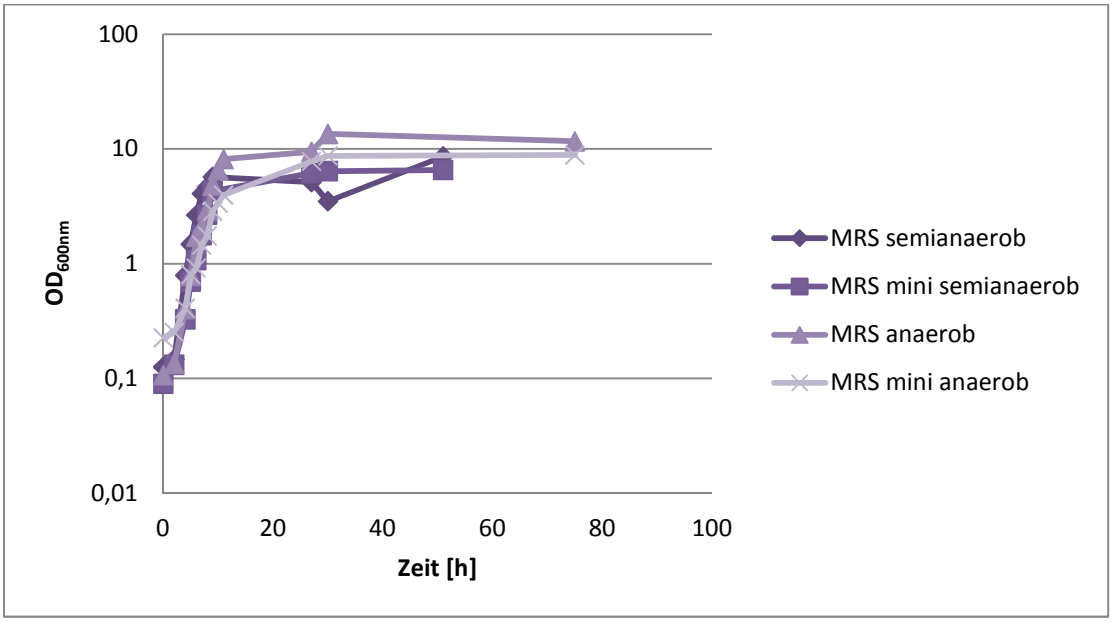


Abbildung 32: Wachstum von *L. hilgardii* (Isolat) auf MRS-Medium und MRS-Minimal-Medium (MRS mini) unter anaeroben und semianaeroben Bedingungen

L. hilgardii (Isolat) erreichte auf MRS-Medium semianaerob eine OD_{600nm} von 8,6, zweidrittel der optischen Dichte, die *L. hilgardii* (Isolat) bei Wachstum unter anaeroben Bedingungen erreichte. Ebenso verhielt es sich bei Wachstum auf MRS-Minimal-Medium. Hier erreichte *L. hilgardii* (Isolat) unter semianaeroben Bedingungen eine maximale OD_{600nm} von 8,8 und unter anaeroben Bedingungen von 12.

In Abbildung 33 ist das Produktspektrum von *L. hilgardii* (Isolat) auf MRS-Minimal-Medium unter anaeroben und semianaeroben Bedingungen dargestellt.

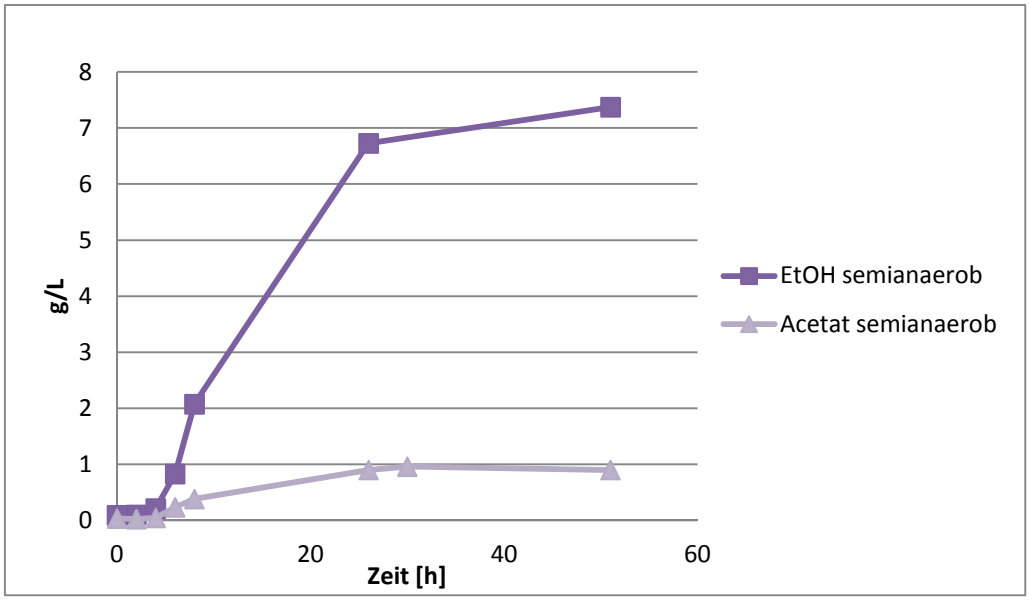


Abbildung 33: Produktspektrum von *L. hilgardii* (Isolat) auf MRS-Minimal-Medium (MRS mini) unter semianaeroben und anaeroben Bedingungen

In Abbildung 33 ist zu erkennen, dass *L. hilgardii* (Isolat) entsprechend der gaschromatographischen Analyse auf semianaerobem MRS-Minimal-Medium 7,3 g/L Ethanol und 0,9 g/L Acetat produzierte. Bei Wachstum unter anaeroben Bedingungen ergaben die gaschromatographischen Analysen keine Produkte.

Mit Hilfe eines enzymatischen Tests konnte die Lactatproduktion bei Wachstum auf MRS und MRS mini unter anaeroben und semianaeroben Bedingungen bestimmt werden. Dies ist Abbildung 34 zu entnehmen.

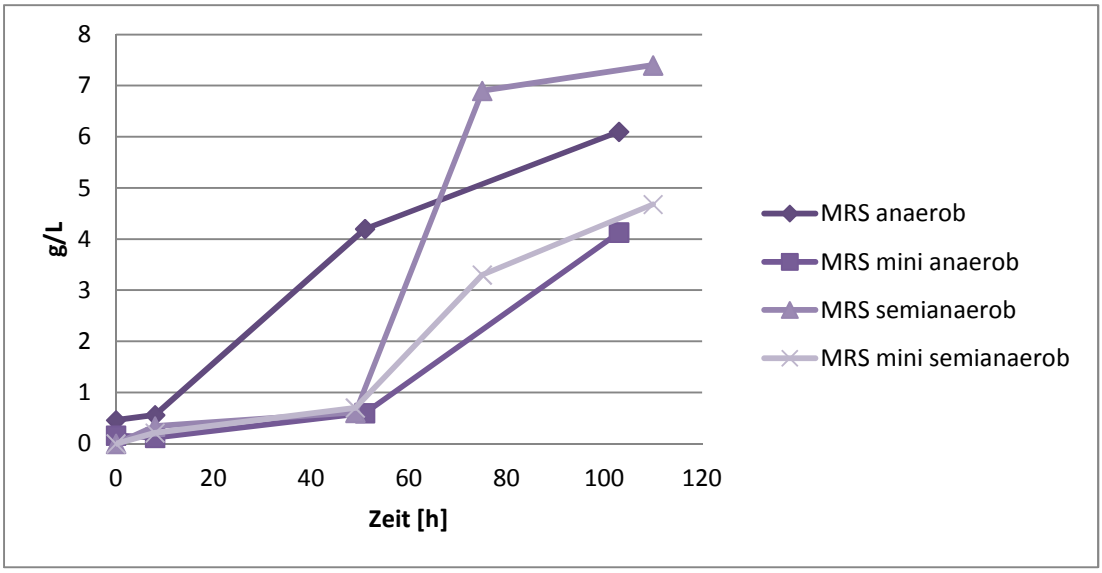


Abbildung 34: Lactatproduktion von *L. hilgardii* (Isolat) bei Wachstum auf MRS- und MRS-Minimal-Medium (MRS mini) unter anaeroben und semianaeroben Bedingungen.

In Abbildung 34 ist zu erkennen, das *L. hilgardii* (Isolat) bei Wachstum auf MRS unter anaeroben Bedingungen nach 103 h bis zu 6,1 g/L und auf MRS mini bis zu 4,1 g/L Lactat produziert. Unter semianaeroben Bedingungen produzierte er nach 110 h mit 7,4 (MRS) und 4,7 (MRS mini) g/L nicht signifikant mehr Lactat als unter anaeroben Bedingungen.

Im Folgenden wird der *L. hilgardii* DSMZ-Stamm betrachtet.

Die folgende Abbildung 35 zeigt das anaerobe und semianaerobe Wachstum auf MRS- bzw. MRS-Minimal-Medium (MRS mini) von *L. hilgardii* DSM 20051

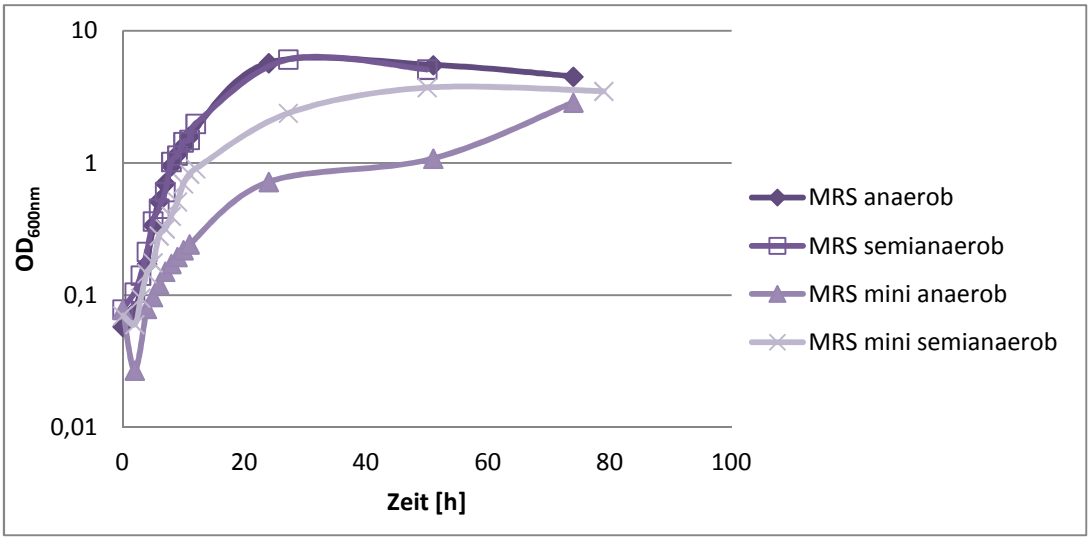


Abbildung 35: Wachstum von *L. hilgardii* DSM 20051 auf MRS-Medium und MRS-Minimal-Medium (MRS mini) unter anaeroben und semianaeroben Bedingungen

L. hilgardii DSM 20051 erreichte auf MRS-Medium anaerob sowie semianaerob eine maximale optische Dichte von ca. 6. Auf MRS-Minimal-Medium erreichte es unter semianaeroben Bedingungen eine maximal OD_{600nm} von 3,7 und unter anaeroben Bedingungen von 2,8.

In Abbildung 36 ist das Produktspektrum von *L. hilgardii* DSM 20051 auf MRS-Minimal-Medium unter anaeroben und semianaeroben Bedingungen dargestellt.

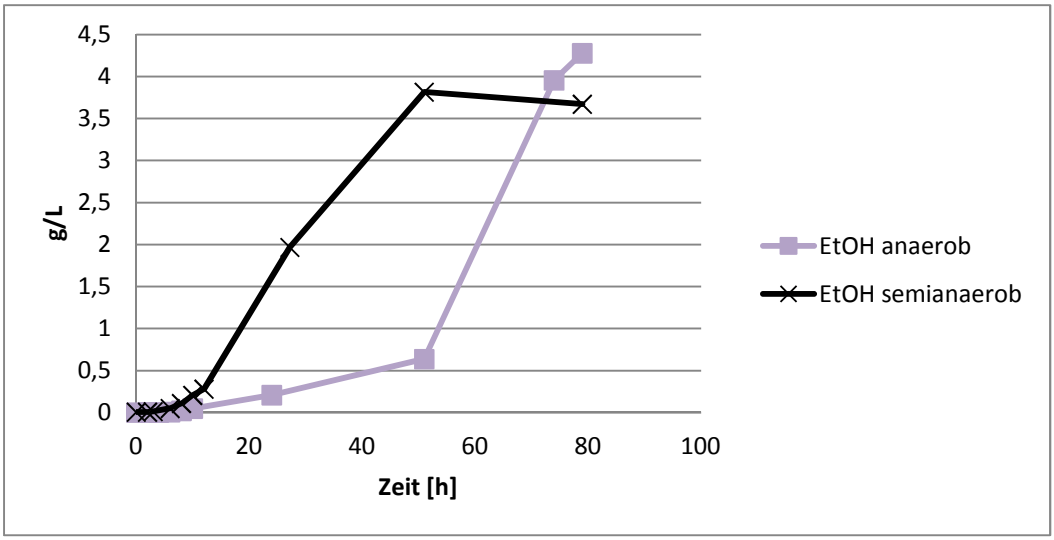


Abbildung 36: Produktspektrum von *L. hilgardii* DSM 20051 auf MRS-Minimal-Medium (MRS mini) unter semianaeroben und anaeroben Bedingungen

In Abbildung 36 ist zu erkennen, dass *L. hilgardii* DSM 20051 entsprechend der gaschromatographischen Analyse auf semianaerobem MRS-Minimal-Medium 3,5 g/L Ethanol produzierte. Bei Wachstum unter anaeroben Bedingungen produzierte *L. hilgardii* 3,8 g/L Ethanol. Unter anaeroben Bedingungen tritt die Produktion von Ethanol erst nach ca. 75 h ein, unter semianaeroben Bedingungen schon nach 24 h. Neben Ethanol produzierte *L. hilgardii* Lactat, welches enzymatisch nachgewiesen wurde (Abbildung 37).

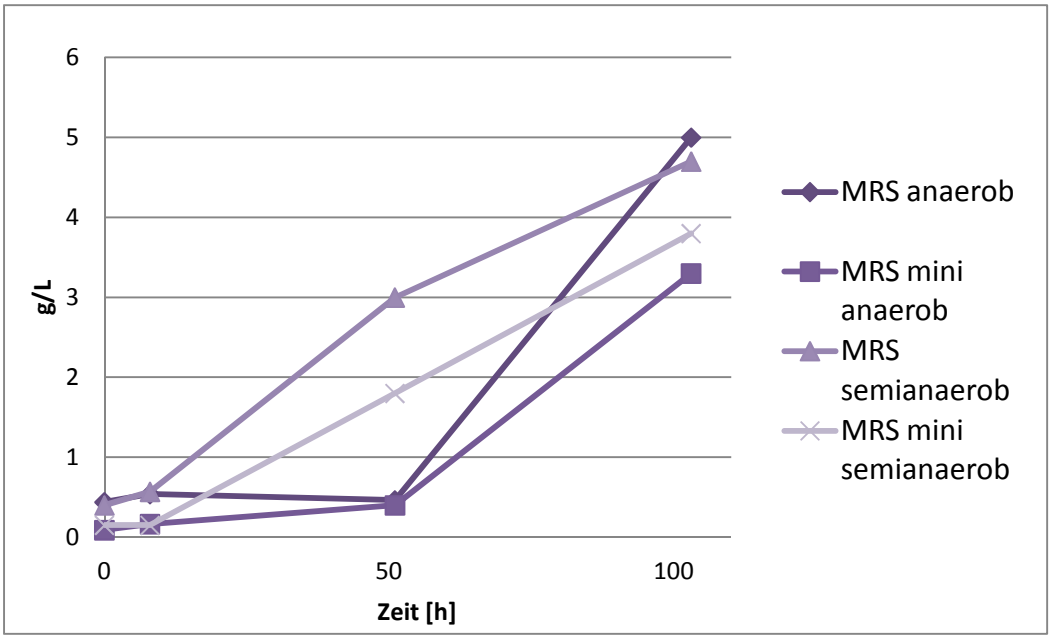


Abbildung 37: Lactatproduktion von *L. hilgardii* DSM 20051 bei Wachstum auf MRS und MRS-Minimal-Medium (MRS mini) unter anaeroben und semianaeroben Bedingungen.

In Abbildung 37 ist zu erkennen, dass *L. hilgardii* keine signifikanten Unterschiede in der Lactatproduktion unter verschiedenen Bedingungen nach 103 h zeigte.

Die folgende Tabelle 20 zeigt eine Zusammenfassung des Wachstums und Produktspektrum von *L. hilgardii* DSM 20051 und des isolierten *L. hilgardii*.

Tabelle 20: Vergleich von Wachstum und Produktspektrum von *L. hilgardii* (DSMZ vs. Isolat)

	max. OD_{600nm}		Ethanol g/L (mM)		Acetat g/L (mM)		Lactat g/L	
Medium	**DSMZ**	**Isolat**	**DSMZ**	**Isolat**	**DSMZ**	**Isolat**	**DSMZ**	**Isolat**
MRS semianaerob	6	8,6	*	*	*	*	4,7	6,8
MRS anaerob	6	13,5	*	*	*	*	4,9	6,1
MRS mini semianaerob	3,7	6,5	3,8 (82,5)	7,3 (159)	0	0,9 (15)	3,8	3,3
MRS mini anaerob	2,8	8,8	4,2 (91,1)	0	0	0	3,3	4,13

(*: mit unseren analytischen Methoden nicht messbar)

In Tabelle 20 ist zu erkennen, dass das Isolat *L. hilgardii* auf allen Medien unter allen Bedingungen eine höhere optische Dichte erreichte. Ebenfalls produzierte das Isolat mit 7,3 g/L auf MRS-mini unter semianaeroben Bedingungen mehr Ethanol als der DSMZ-Stamm. Nur das Isolat produzierte unter semianaeroben Bedingungen neben Lactat und Ethanol auch bis zu 0,9 g/L Acetat.

3.3.2. Test auf Antibiotikaresistenzen der isolierten sowie der DSMZ-Stämme *L. plantarum*, *L. pantheris* und *L. hilgardii*

Um eine erfolgreiche Transformation der verschiedenen Stämme zu gewährleisten, wurden sie auf ihre Antibiotikaresistenz untersucht. Hierbei wurden die Antibiotika gewählt, für die sich bereits Resistenzgene auf den zu transformierenden Plasmiden befinden, sowie Erythromycin und Tetracyclin. Das Wachstum der verschiedenen Stämme in Gegenwart der Antibiotika Chloramphenicol, Ampicillin, Erythromycin und Tetracyclin ist Tabelle 21 zu entnehmen.

Tabelle 21: Wachstum der Lactobacillen-Stämme in Gegenwart von Antibiotika in unterschiedlichen Konzentrationen.

	Chloramphenicol [mg/ml]				**Ampicillin [mg/ml]**				**Erythromycin [mg/ml]**				**Tetracyclin [mg/ml]**		
	7,5	15	30	45	25	50	100	200	25	50	100	200	5	10	20
L. plantarum DSMZ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L. plantarum ISOLAT	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L. pantheris DSMZ	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
L. pantheris ISOLAT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L. hilgardii DSMZ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L. hilgardii ISOLAT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(+: Wachstum; -: kein Wachstum)

In Tabelle 21 ist zu erkennen, dass die Isolate *L. pantheris* und *L. hilgardii* in der Lage waren, in Gegenwart aller getesteter Antibiotika in den unterschiedlichen Konzentrationen zu wachsen. Das Isolat *L. plantarum* war nicht resistent gegen Ampicillin, Erythromycin und Tetracyclin, jedoch gegen niedrige Konzentrationen von Chloramphenicol. Der DSMZ-Stamm *L. pantheris* war resistent gegenüber Tetracyclin und geringen Mengen an Chloramphenicol. Die anderen DSMZ-Stämme dagegen zeigten kaum Resistenz gegen diese Antibiotika. Eine Transformation in die isolierten Stämme *L. pantheris* und *L. hilgardii* ist somit nicht möglich, da sie, wie in Tabelle 21 gezeigt, resistent gegenüber den Antibiotika waren, für welche sich Resistenzgene auf den Plasmiden pMW1/2/3-ori256 (3.4.) befinden.

3.4. Klonierung von pMW1/2/3-ori256

Da die Transformation der Plasmide pMW1 und pMW2 in die Lactobacillen erfolglos war, wurde nach einem für Lactobacillen geeigneten Replikationsursprung gesucht. Einer dieser Replikationsursprünge ist der *ori256* aus dem *L. plantarum* NC7-eigenem Plasmid p256 (Sorvig *et al*., 2004). Für die Klonierung des Replikationsursprungs *ori256* in die Vektoren pSB3C5-UUMKS 1/2/3 wurde mit Hilfe einer PCR *ori256* aus dem Plasmid p256 amplifiziert und die Schnittstellen *Pst*I generiert. Über diese Schnittstellen wurde das Fragment in die Plasmide pSB3C5-UUMKS 1/2/3 und pUC18 (als Positivkontrolle) ligiert und anschließend in *E. coli* XL1-Blue transformiert. Abbildung 38 zeigt die schematische Darstellung der Klonierung von *ori256* in die Vektoren pSB3C5-UUMKS 1 und pUC18. Genauso wurde mit den Plasmiden pSB3C5-UUMKS 2 und 3 verfahren.

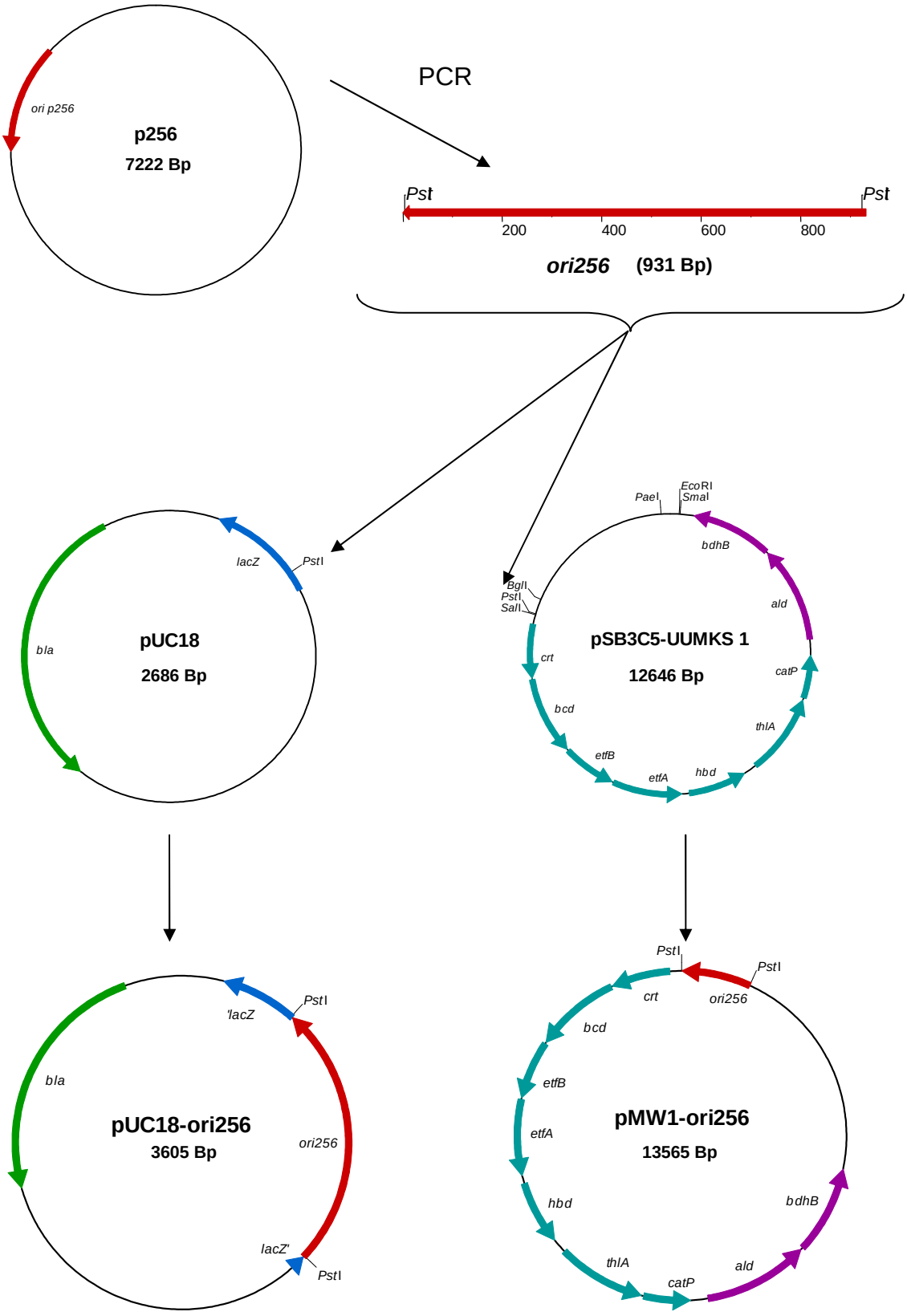


Abbildung 38: Schematische Darstellung der Klonierung des Replikationsursprunges *ori256* in die Vektoren pUC18 und pSB3C5-UUMKS 1

Die Plasmide pSB3C5-UUMKS 1/2/3 und pUC18 konnten erfolgreich mit dem Replikationsursprung *ori256* kloniert werden und tragen die Bezeichnung pMW1/2/3-*ori256* und pUC18-ori256. Nach der Transformation in *E. coli* XL1-Blue wurden diese wieder isoliert und mit Hilfe des Enzyms *Eco*RV einem Restriktionsverdau unterzogen. Bei erfolgreicher Klonierung konnten Banden der Größe von rund 2830 Bp und der Größe von 10730 Bp für pMW1-ori256, für pMW2-ori256 in den Größen von 2830 und 10600 Bp und für pMW3-ori256 in den Größen von 2830, 3300 und 7300 Bp nachgewiesen werden. Dies ist für die Plasmide pMW1/2/3-ori256 sowie pUC18-ori256 in den Abbildungen 39a und 39b zu sehen.

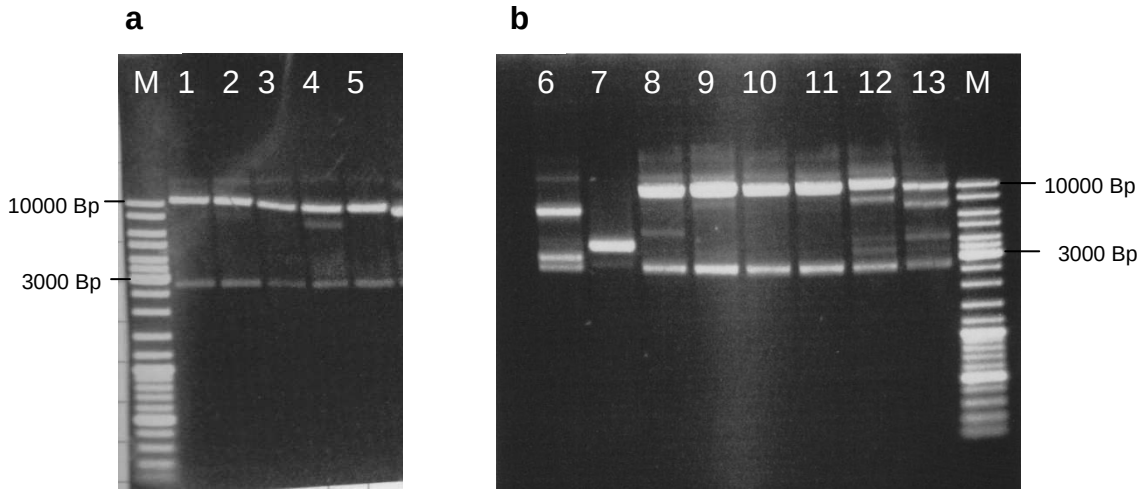


Abbildung 39: 0,8 %-iges Agarosegel; **a:** pMW1-ori256 verdaut mit *Eco*RV (Spur 1-5); **b:** pMW2/3-ori256 verdaut mit *Eco*RV (Spur 6-7: pMW2-ori256; Spur 8-13: pMW3-ori256); M: Größenstandard („GeneRuler^{TM} DNA Ladder Mix“, Fermentas GmbH)

In den Abbildungen 39a und 39b sind deutlich die erwarteten Banden in den oben beschriebenen Größen zu sehen. Durch Sequenzierung (GATC Biotech AG) des Replikationsursprunges *ori256* in den Plasmiden pMW1/2/3-ori256 und pUC18-ori256 konnte bestätigt werden, dass dieser mutationsfrei vorlag.

3.5. Transformation in Lactobacillen-Stämme

Die Lactobacillen wurden nach verschiedenen Methoden nach Alegre *et al*. (2004), nach Thompson *et al*. (1996) und nach Mason *et al*. (2005), transformiert. Das Plasmid pMW1-ori256 konnte mit der Methode nach Mason *et al*. (2005) erfolgreich in den DSMZ-Stamm *L. plantarum* DSM 1055 eingebracht werden. Die anschließende Isolierung der Plasmid-DNA zeigte, dass dieser Stamm mehrere Plasmide trägt (Abbildung nicht dargestellt), so dass eine Restriktionsanalyse nicht möglich war. Aus diesem Grund wurde das isolierte Plasmid mit Hilfe einer Standard-PCR nachgewiesen. In Abbildung 40a und b ist das Ergebnis der Standard-PCR mit dem isolierten Plasmid pMW1-ori256 aus *L. plantarum* als „Template“ sowie eine Negativ- und Positivkontrolle mit für die Sequenz des *ori256* spezifischen Oligodesoxynukleotiden P256-FWD-PstI und P256-REV-PstI zu sehen.

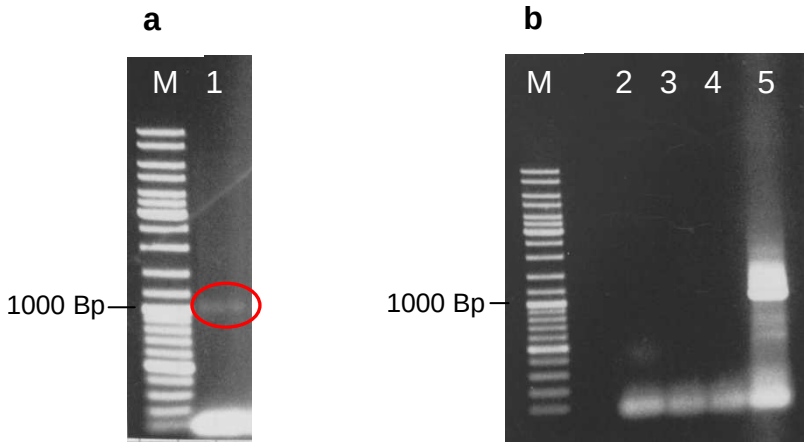


Abbildung 40: 0,8 %-iges Agarosegel; **a**: Spur 1: Template: pMW1-ori256 aus *L. plantarum*; **b**: Spur 2-4: Template: Negativkontrolle (*L. plantarum* WT); Spur 5: Template: pMW1-ori256 aus *E. coli* Xl1-Blue (Positivkontrolle)

In Abbildung 40a ist zu erkennen, dass nach PCR mit den für *ori256* spezifischen Oligodesoxynukleotiden und das aus *L. plantarum* isolierte Plasmid pMW1-ori256 eine Bande der Größe von rund 1000 Bp (rot eingerahmt) zu sehen ist. In Abbildung 40b ist diese Bande in den Spuren 2-4 nicht zu finden, da hier als Template eine Plasmidpräparation aus *L. plantarum*-Wildtyp eingesetzt wurde. Weiterhin diente als Positivkontrolle die in Spur 5 aufgetragene PCR, bei der als Template das Plasmid

pMW1-ori256, isoliert aus *E. coli* XL1-Blue, verwendet wurde. Hier ist die 1000-Bp-Bande deutlich zu erkennen.

Die Transformation der Plasmide pMW2-ori256 und pMW3-ori256 in die DSMZ-Stämme *L. plantarum*, *L. pantheris* und *L. hilgardii* sowie in den isolierten Stamm *L. plantarum* blieben erfolglos. Ebenso die Transformation des Plasmides pMW1-ori256 in die Stämme DSMZ-Stämme *L. pantheris* und *L. hilgardii* sowie in das Isolat *L. plantarum*.

3.5.1. *L. plantarum* DSM 1055 pMW1-ori256 Wachstum auf MRS-mini-Medium

Nachdem das Butanol-Synthese-Plasmid erfolgreich in den DSMZ-Stamm *L. plantarum* eingebracht wurde, erfolgten Wachstumsversuche mit anschließender Analyse des Produktspektrums auf MRS-Minimal-Medium unter semianaeroben und anaeroben Bedingungen. Auf MRS-Medium wurde hier verzichtet, da dieses für unsere gaschromatographischen Analysen ungeeignet ist. Für die Wachstumsversuche wurden 250 ml MRS-Minimal-Medium auf eine OD_{600nm} von 0,1 mit einer in MRS mini gewachsenen Vorkultur beimpft.

Abbildung 41 zeigt das semianaerobe und anaerobe Wachstum auf MRS mini des Stammes *L. plantarum* DSM 1055 pMW1-ori256.

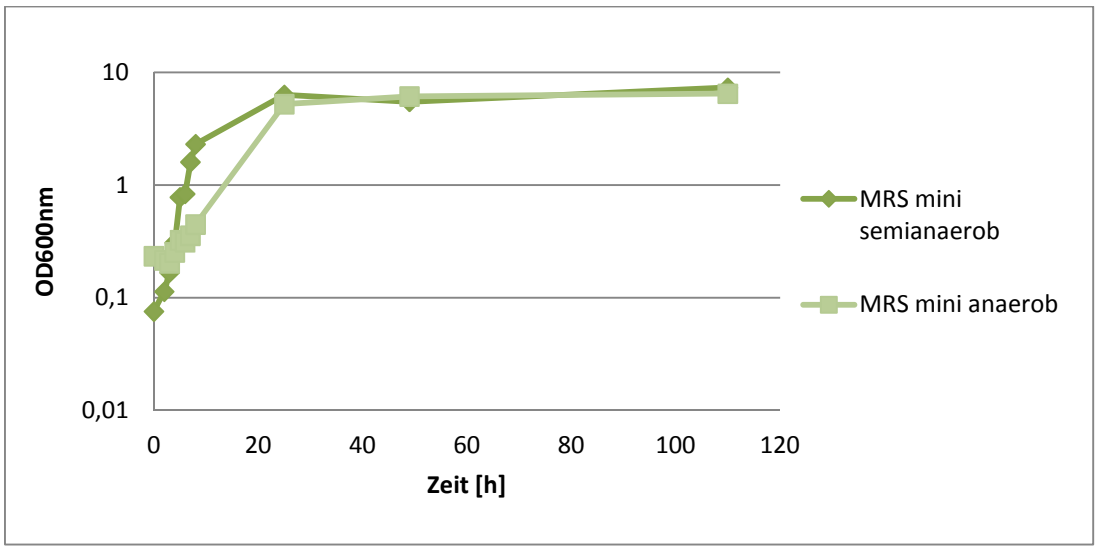


Abbildung 41: Wachstum von *L. plantarum* DSM 1055 pMW1-ori256 auf MRS mini unter semianaeroben und anaeroben Bedingungen

In Abbildung 41 ist zu erkennen, dass *L. plantarum* DSM 1055 pMW1-ori256 unter anaeroben Bedingungen eine längere *lag*-Phase aufwies. Die max. OD_{600nm} war mit 6 unter semianaeroben sowie anaeroben Bedingungen gleich.

Abbildung 42 zeigt das Produktspektrum von *L. plantarum* DSM 1055 pMW1-ori256 nach gaschromatographischer Analyse bei Wachstum auf MRS mini unter semianaeroben und anaeroben Bedingungen.

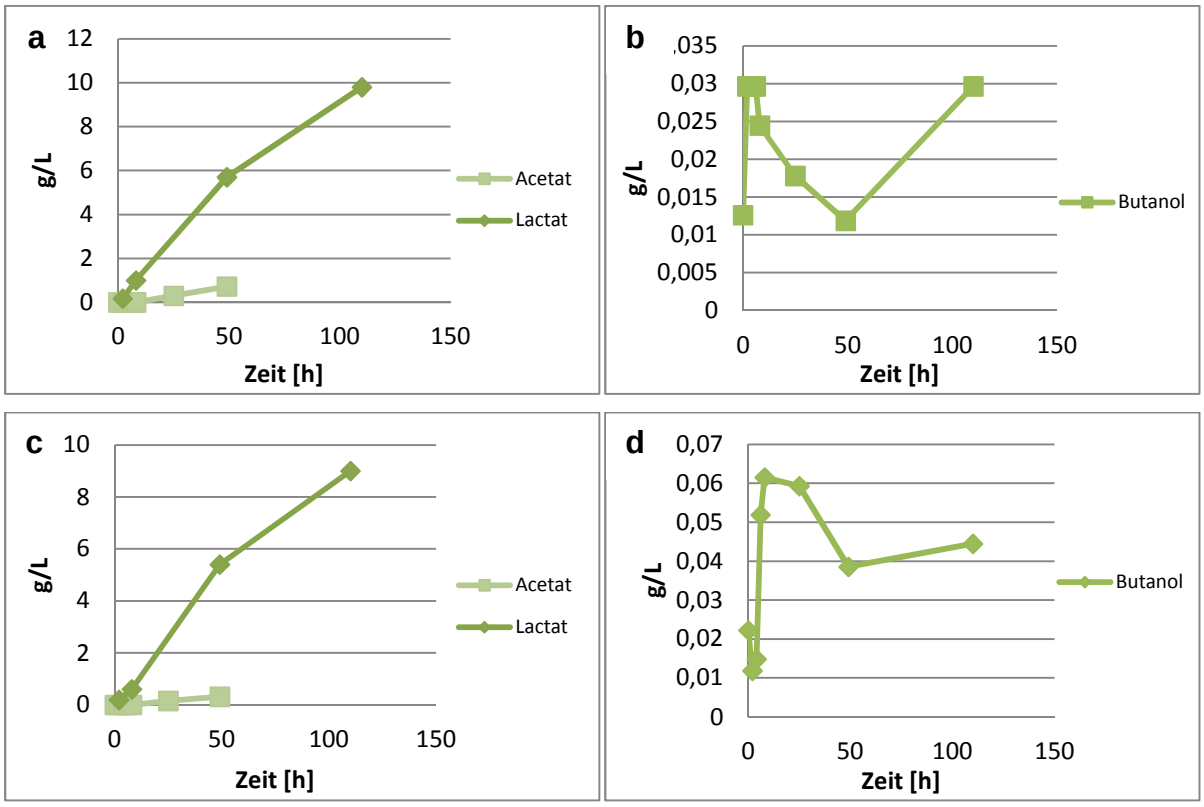


Abbildung 42: Produktspektrum von *L. plantarum* DSM 1055 pMW1-ori256 bei Wachstum auf MRS mini unter semianaeroben (a und b) und anaeroben (c und d) Bedingungen

In Abbildung 42 ist zu erkennen, dass der transformierte DSMZ-Stamm *L. plantarum* pMW1-ori256 unter semianaeroben Bedingungen 0,03 g/L 1-Butanol und unter anaeroben Bedingungen 0,06 g/L 1-Butanol produzierte. Nach 8 - 24 Stunden Wachstum sank die 1-Butanolkonzentration ab.

3.5.2. *L. plantarum* DSM 1055 1-Butanol-Verbrauch

Da die 1-Butanolkonzentration des Stammes *L. plantarum* DSM 1055 pMW1-ori256 während des Wachstums nach ca. 24 Stunden abnahm, wurde dieser sowie der Wildtyp auf ihre Fähigkeit, 1-Butanol zu verstoffwechseln untersucht. Hierzu wurden 250 ml MRS-Minimal-Medium mit 0,37 g/L 1-Butanol (0,2 g/L bei Wildtyp unter anaeroben Bedingungen) versetzt und mit einer in MRS mini gewachsenen Vorkultur auf eine OD_{600nm} von 0,1 eingestellt.

Abbildung 43 zeigt das semianaerobe und anaerobe Wachstum auf MRS mini mit 0,37 g/L bzw. 0,2 g/L Butanol des Stammes *L. plantarum* DSM 1055 pMW1-ori256 und des Wildtyps.

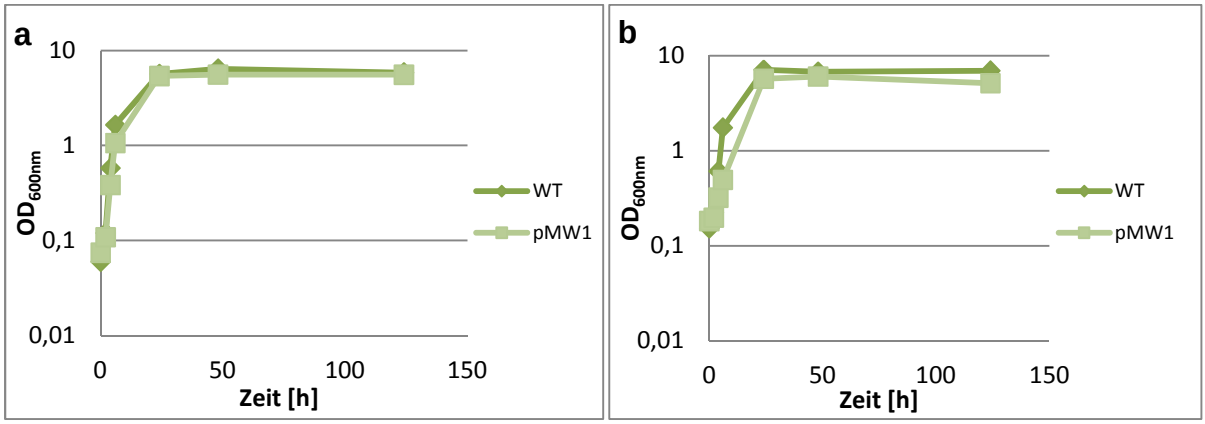


Abbildung 43: Wachstum von *L. plantarum* pMW1-ori256, sowie Wildtyp auf MRS mini unter semianaeroben (A) und anaeroben (B) Bedingungen in Anwesenheit von 1-Butanol.

In Abbildung 43 ist zu erkennen, dass *L. plantarum* pMW1-ori256 unter anaeroben Bedingungen in Anwesenheit von 0,37 bzw. 0,2 g/L 1-Butanol eine max. OD_{600nm} von 6,0 und unter semianaeroben eine von 5,5 erreichte. Der Wildtyp verhielt sich mit einer max. OD_{600nm} unter semianaeroben Bedingungen von 6,4 und unter anaeroben Bedingungen von 6,7 ähnlich.

Die Abbildung 44 zeigt den 1-Butanolverbrauch von *L. plantarum* pMW1-ori256 sowie Wildtyp nach gaschromatographischer Analyse bei Wachstum auf MRS mini unter semianaeroben und anaeroben Bedingungen mit 1-Butanol.

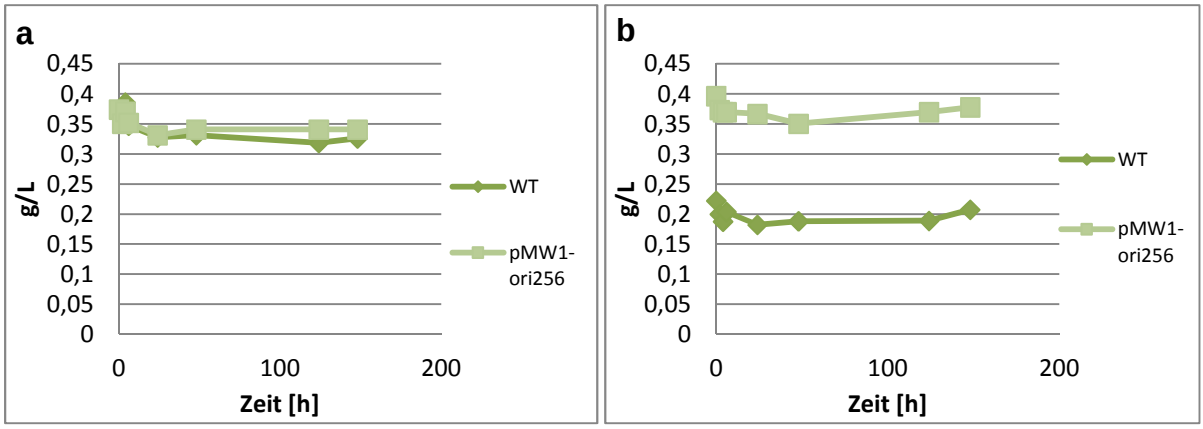


Abbildung 44: 1-Butanolverbrauch von *L. plantarum* pMW1-ori256 sowie Wildtyp bei Wachstum auf MRS mini unter semianaeroben (a) und anaeroben (b) Bedingungen

In Abbildung 44 ist zu erkennen, dass die 1-Butanolkonzentration zu Beginn des Wachstumsversuchs unter semianaeroben Bedingungen 0,37 g/L betrug und nach 24 h noch 0,33 g/L gemessen wurden, was eine Differenz von 0,04 g/L ausmacht. Unter anaeroben Bedingungen betrug die 1-Butanolkonzentration zu Beginn 0,37 g/L (*L. plantarum* pMW1-ori256) bzw. 0,2 g/L (*L. plantarum* WT), hier konnten nach 48 h bzw. 24 h Stunden noch 0,33 g/L (*L. plantarum* pMW1-ori256) 1-Butanol bzw. 0,18 g/L (*L. plantarum* WT) durch gaschromatographische Analysen detektiert werden. Somit waren der transformierte DSMZ-Stamm *L. plantarum* pMW1-ori256 sowie der Wildtyp unter semianaeroben und anaeroben Bedingungen in der Lage, bis zu 0,04 g/L 1-Butanol zu verstoffwechseln.

4. Diskussion

Die Herstellung von 1-Butanol über einen mikrobiellen Weg, statt der Synthese ausgehend von Rohöl, ist und bleibt ein erstrebenswertes Ziel, welches in dieser Arbeit erreicht werden sollte. Idealerweise verwertet der Organismus, welcher in der Lage ist, 1-Butanol zu produzieren, ein Substrat, welches weder in Konkurrenz zur Nahrungsmittelindustrie steht noch auf Rohöl basiert. Ein Abfallprodukt, welches im Überfluss vorhanden ist, stellt wirtschaftlich gesehen ein optimales Substrat dar. Das giftige Kohlenstoffmonoxid (CO) und der „Klimakiller“ Kohlenstoffdioxid (CO_2) mit Wasserstoff (H_2) sowie das aus Weizenstroh oder Rüben hergestellte LCB-Hydrolysat der Firma Süd-Chemie AG sind solche Substrate.

Kohlenstoffmonoxid (CO) ist ein farbloses, geruchloses Gas. In unserer Atmosphäre beträgt die CO-Konzentration 0,1 ppm. Für uns Menschen ist CO ab einer Konzentration von 50 ppm gesundheitsgefährdend (Daunderer, 1995). Die höchste Konzentration an CO findet sich in Abgasen. Gelangt CO in die Atmosphäre, so wird es zu Kohlenstoffdioxid (CO_2) oxidiert. Kohlenstoffdioxid ist ebenfalls ein geruch- und farbloses Gas. Die Konzentration in unserer Atmosphäre beträgt ca. 390 ppm. Gesundheitlich bedenklich wird Kohlenstoffdioxid für den Menschen ab einer Konzentration von über 5000 ppm (Daunderer, 1995). Durch die Industrialisierung wird die Atmosphäre stetig mit CO_2 angereichert, was zu einer Vergrößerung des schon vorhandenen Treibhauseffektes führt. Es ist also notwendig, die CO_2-Konzentration in der Atmosphäre zu verringern, um den Treibhauseffekt in Grenzen zu halten. Wird CO_2 sowie CO als Substrat genutzt, kann ein Beitrag zur Reduktion dieses Gases in unserer Atmosphäre geleistet werden.

Acetogene Organismen sind in der Lage, autotroph C_1-Körper zu verstoffwechseln. Sie können CO, CO_2 mit H_2 oder auch Formiat als Substrat nutzen. Zu dieser Gruppe gehören die Bakterien *C. ljungdahlii*, *C. aceticum* und *A. woodii*.
Nachdem zwölf verschiedene acetogene Organismen (Tabelle 11) getestet wurden, um solche Bakterienstämme zu finden, die eine möglichst hohe Acetatproduktion und gleichzeitig eine sehr geringe Produktion an Nebenprodukten aufweisen, wurden diese drei Stämme für weitere Experimente ausgewählt. Wird Acetat produziert, so kann das Intermediat Acetyl-CoA als Ausgangssubstanz für die 1-Butanolsynthese genutzt werden. Ist möglichst wenig Nebenprodukt vorhanden, so begünstigt dies

einerseits eine Abtrennung des produzierten 1-Butanols und andererseits steht mehr Substrat für die Bildung von Acetyl-CoA zur Verfügung, welches wiederum zu 1-Butanol umgesetzt werden kann. *C. ljungdahlii* und *A. woodii* sind Gram-positive Organsimen, *C. aceticum* ist Gram-negativ (Braun *et al*., 1981). Alle drei Stämme sind anaerobe, stäbchenförmige und teilweise sporenbildende (bis auf *A. woodii*) Bakterien. Sie können über den Wood-Ljungdahl-Weg (Barker *et al*., 1945; Ljungdahl, 1986; Drake *et al*., 2006), auch reduktiver Acetyl-CoA-Weg (Abbildung 45) genannt, die verschiedenen C_1-Körper zu Acetyl-CoA verstoffwechseln. Hierbei werden CO_2 und Wasserstoff durch die Formiat-Dehydrogenase zu Formiat reduziert, welches unter Energieaufwand und mit Hilfe des Enzyms Formyl-THF-Synthetase sowie dem Co-Faktor Tetrahydrofolsäure (THF) zu Formyl-THF wird. Dieses wird über mehrere Schritte zu Methyl-THF reduziert. Die Methylgruppe wird anschließend durch eine Methyltransferase auf ein Corrinoid übertragen. Die so gebundene Methylgruppe, das Coenzym A sowie ein enzymgebundenes CO werden durch den Enzymkomplex Acetyl-CoA-Synthase/CO-Dehydrogenase zu Acetyl-CoA kondensiert (Abbildung 45). Dieses zentrale Intermediat kann für den Anabolismus, also für die Synthese von Zellwandbestandteilen, oder auch für den Katabolismus, also für die Bereitstellung von Energie in Form von ATP über die Bildung von Acetat oder auch anderen Produkten wie Ethanol verwendet werden. *A. woodii*, *C. aceticum* und *C. ljungdahlii* sind von Natur aus nicht in der Lage, 1-Butanol zu produzieren. Sie nutzen wie der Name „Acetogene“ besagt den Wood-Ljungdahl-Weg und produzieren hauptsächlich Acetat.

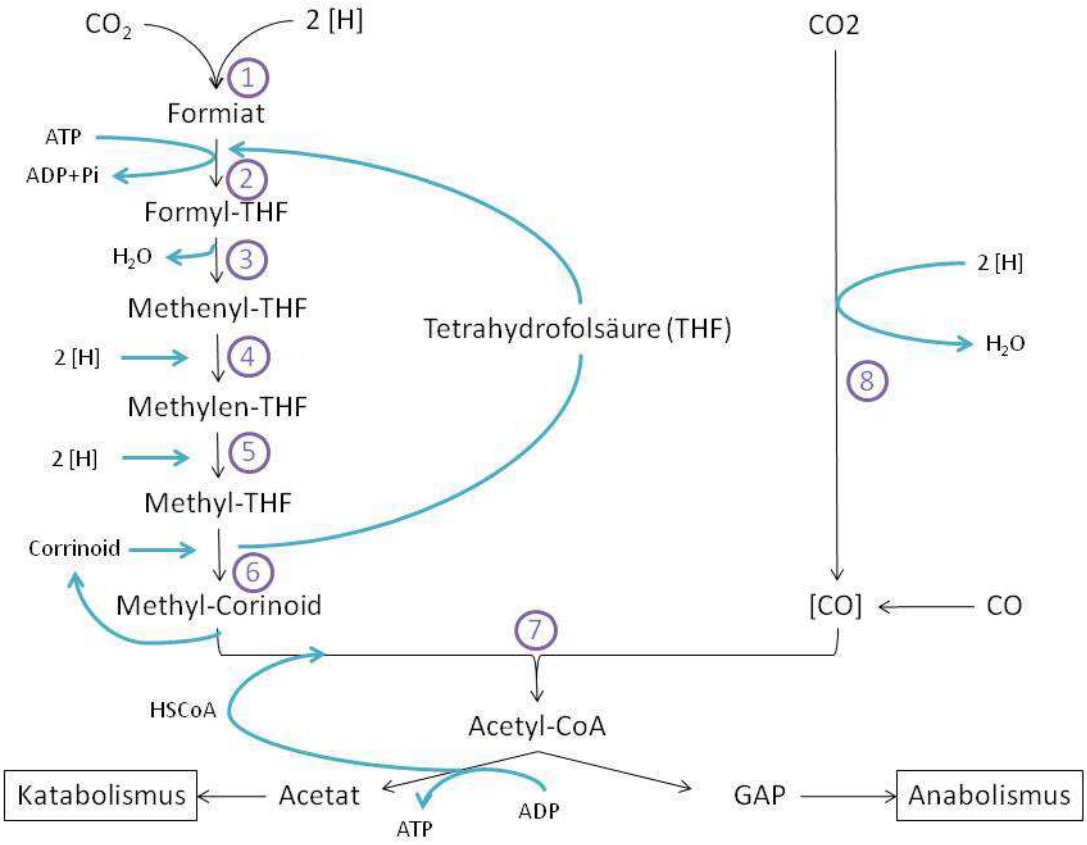


Abbildung 45: Schematische Darstellung des Wood-Ljungdahl-Wegs 1: Formiat-Dehydrogenase; 2: Formyl-THF-Synthetase; 3: Methenyl-THF-Cyclohydrolase; 4: Methylen-THF-Dehydrogenase; 5: Methylen-THF-Reduktase; 6: Methyltransferase; 7/8: Acetyl-CoA-Synthase/CO-Dehydrogenase

Das Substrat (LCB-Hydrolysat) der Firma Süd-Chemie AG, besteht aus durch enzymatische Hydrolyse aufgeschlossener Lignocellulose, wie z.B. Weizenstroh oder Rübe. Dies bedeutet, dass z.B landwirtschaftliche Nebenprodukte wie Weizenstroh als Substrat verwendet werden. Mit hydrolysierter Rübe steht ein weiteres nachhaltiges Fermentationssubstrat zur Verfügung. LCB-Hydrolysate bestehen vorwiegend aus Cellulose und Hemicellulose und enthalten Zucker, wie z.B. Arabinose, Glucose, Fructose, Saccharose oder diverse Dissacharide.

Zur Spaltung der im Hydrolysat enthaltenen Cellulose und Hemicelluose können cellulolytische Organismen, wie zum Beispiel *C. thermocellum* (Béguin *et al*., 1987; Demain *et al*., 2005) oder *C. cellulolyticum* (Bélaich *et al.*, 1997; Desvaux *et al.*, 2005) eingesetzt werden. Eine Alternative zu den genannten cellulolytischen Organismen ist die thermochemische oder enzymatische (Gray *et al.*, 2006) Aufspaltung der Cellulose. Allerdings sind diese Verfahren, da sie zeit- und energieaufwendig sind, sehr kostspielig und aus diesen Gründen wirtschaftlich nicht rentabel.

Die in dem LCB-Hydrolysat vorhandenen Zucker können durch eine Vielfalt von Organismen genutzt werden, so auch von *A. woodii*, *C. aceticum* und *C. ljungdahlii* (Abbildung 12-14; Tabelle 15). Allerdings kann eine Vielzahl von Organismen nicht auf diesem LCB-Hydrolysat wachsen, da durch die mit der Hydrolyse verbundenen Prozesse Stoffe wie Furfural oder 5-Hydroxymethylfurfural (5-HMF) entstehen können, welche das Wachstum hemmen oder ganz verhindern können (Boopathy *et al*., 1993; Lopez *et al.*, 2004). Catarina Erz (2012) konnte in ihrer Diplomarbeit zeigen, dass auch in verschiedenen LCB-Hydrolysaten der Firma Süd-Chemie AG bis zu 6 mM Furfural enthalten sind. Ab einer Konzentration von 1-12 mM wirkt Furfural hemmend auf das Wachstum von Mikroorganismen (Morris *et al.*, 1978). Auf den Organismus *C. acetobutylicum* DSM792 wirkt Furfural und 5-HMF nicht nur hemmend auf das Wachstum, sondern auch auf die 1-Butanolproduktion (Zhang *et al.,* 2011). Weiterhin ist die inhaltliche Zusammensetzung der in dieser Arbeit verwendeten Substrate stark mit deren nicht offengelegten Herstellungsprozess korreliert. Im Projektverlauf wurden verschiedene Substrate (z.B: C6#A, C5/C6#A, C5/C6#B und UUL2#A) getestet, was sich in oben dargestellten unterschiedlichen Wachstums- und Produktanalysen widerspiegelt. Der pH-Wert der in dieser Arbeit bereitgestellten LCB-Hydrolysate ist mit 4,5 bis 5 für viele Organismen zu sauer. Die acetogenen Organismen *C. aceticum* und *A. woodii* waren nicht in der Lage, in einem größeren Volumen als 5 ml auf dem LCB-Hydrolysat zu wachsen. *C. ljungdahlii* konnte das LCB-Hydrolysat verwerten, allerdings konnte kein Plasmid, welches das 1-Butanolsyntheseoperon von *C. acetobutylicum* trägt, erfolgreich in *C. ljungdahlii* eingebracht werden. *C. acetobutylicum* (Daten nicht gezeigt) war nicht in der Lage, LCB-Hydrolysat als Substrat zu nutzen.

Aus diesem Grund wurden parallel zu dieser Arbeit neue Organismen isoliert, die in der Lage sind, auf ausgewähltem LCB-Hydrolysat zu wachsen (Pascher, 2010). Die isolierten Organismen sind *B. coagulans* und Lactobacillen (*L. plantarum*, *L. pantheris* und *L. hilgardii*), welche durch die Milchsäuregärung hauptsächlich Lactat produzieren. Mit *B. coagulans* wurde nicht weiter gearbeitet, da dieser ein nur mäßiges Wachstumsverhalten auf LCB-Hydrolysat zeigte (Daten nicht gezeigt). Lactobacillen sind Gram-positive, aerotolerante, nicht sporenbildende Stäbchen. Bei der Milchsäuregärung wird zwischen homo- und heterofermentativ unterschieden. Wachstumsversuche auf den Medien MRS bzw. MRS-Minimal-Medium sowie anschließende gaschromatographische Analysen (MRS-Minimal-Medium; Abbildung 22-37) haben gezeigt, dass alle isolierten Lactobacillen fakultativ anaerob sind. Weiterhin kann gesagt werden, dass der isolierte Stamm *L. plantarum* unter semianaeroben sowie anaeroben Wachstumsbedingungen homofermentativ ist (Abbildung 23). Die isolierten Organismen *L. pantheris* und *L. hilgardii* sind unter semianaeroben Wachstumsbedingungen heterofermentativ und unter anaeroben Wachstumsbedingungen homofermentativ (Abbildung 28/29 und 33/34). Die entsprechenden DSMZ-Stämme *L. plantarum* und *L. hilgardii* sind heterofermentativ (Abbildung 25/26 und 36/37) und der DSMZ-Stamm *L. pantheris* homofermentativ (Abbildung 31).

Die homofermentative Milchsäuregärung zeichnet sich dadurch aus, dass ausschließlich Lactat als Endprodukt gebildet wird (Abbildung 46). Hier werden Hexosen wie Glukose über die Glykolyse zu zwei Molekülen Pyruvat umgesetzt und diese anschließend durch das Enzym Lactat-Dehydrogenase und das in der Glykolyse gebildete Coenzym NADH zu Lactat reduziert (Abbildung 46).

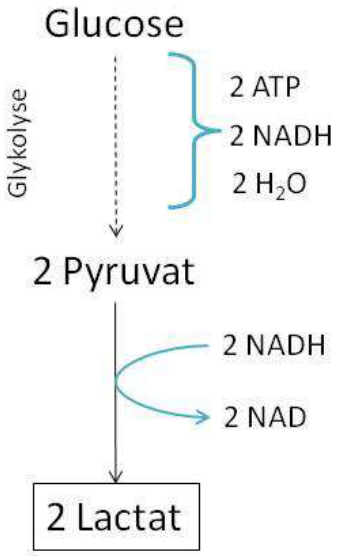


Abbildung 46: Schematische Darstellung der homofermentativen Milchsäuregärung

Bei der heterofermentativen Milchsäuregärung (Abbildung 47) können Hexosen (z. B. Glucose, Fructose) und Pentosen (z. B. Xylose, Ribose) verwertet werden. In der Regel fehlt den Organismen, die heterofermentativ sind, das Enzym Fructosebisphosphat-Aldolase, welches in der Glykolyse das Fructose-1,6-Bisphosphat in Dihydroxyacetonphosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat spaltet. Die heterofermentativen Milchsäurebakterien sind also auf den Abbau von Pentosen spezialisiert. Hierbei wird eine Pentose zu Pentose-5-Phosphat unter Verbrauch eines Moleküls ATP umgesetzt und durch eine Epimerase zu Xylulose-5-Phosphat isomerisiert. Durch die Phosphoketolase und den Cofaktor Thiaminpyrophosphat wird Xylulose-5-Phosphat zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Hydroxyethyl-Thiaminpyrophosphat. Glycerinaldehyd-3-Phosphat wird wie bei der homofermentativen Milchsäuregärung über Pyruvat zu Lactat verstoffwechselt. Hydroxyethylthiaminphosphat wird über mehrere Schritte zu Acetyl-Phosphat, welches zu Acetat, unter Generierung eines Moleküls ATP, verstoffwechselt werden kann.

Werden bei der heterofermentativen Milchsäuregärung Hexosen abgebaut, so werden diese durch eine Hexokinase unter ATP-Verbrauch zu Hexose-6-Phosphat (bspw.: Glucose-6-Phosphat) und anschließend durch eine Glucose-6-Phosphat-

Dehydrogenase zu 6-Phosphogluconat umgesetzt (Abbildung 47). Die Phosphogluconat-Dehydrogenase decarboxyliert 6-Phosphogluconat zu Ribulose-5-Phosphat. Ribulose-5-Phosphat wird wie oben beschrieben weiter verstoffwechselt. Allerdings wird beim Abbau von Hexosen hauptsächlich Ethanol gebildet, da hier zwei Reduktionsäquivalente regeneriert werden können, was bei der Verstoffwechselung zu Acetat nicht möglich ist. Somit wird Acetylphosphat zu Acetyl-CoA umgesetzt und dieses über Acetaldehyd zu Ethanol abgebaut (Abbildung 47). Der Abbau von Hexosen ist energetisch weniger attraktiv als der Abbau von Pentosen, da hier statt 2 ATP nur 1 ATP gebildet wird. Aus diesem Grund werden eher Pentosen als Hexosen abgebaut. Wird beim Abbau von Hexosen dennoch Acetat gebildet, so ist ein zusätzlicher Abbau von 2 Molekülen Fructose zu 2 Molekülen Mannit notwendig, um die Reduktionsäquivalente zu regenerieren.

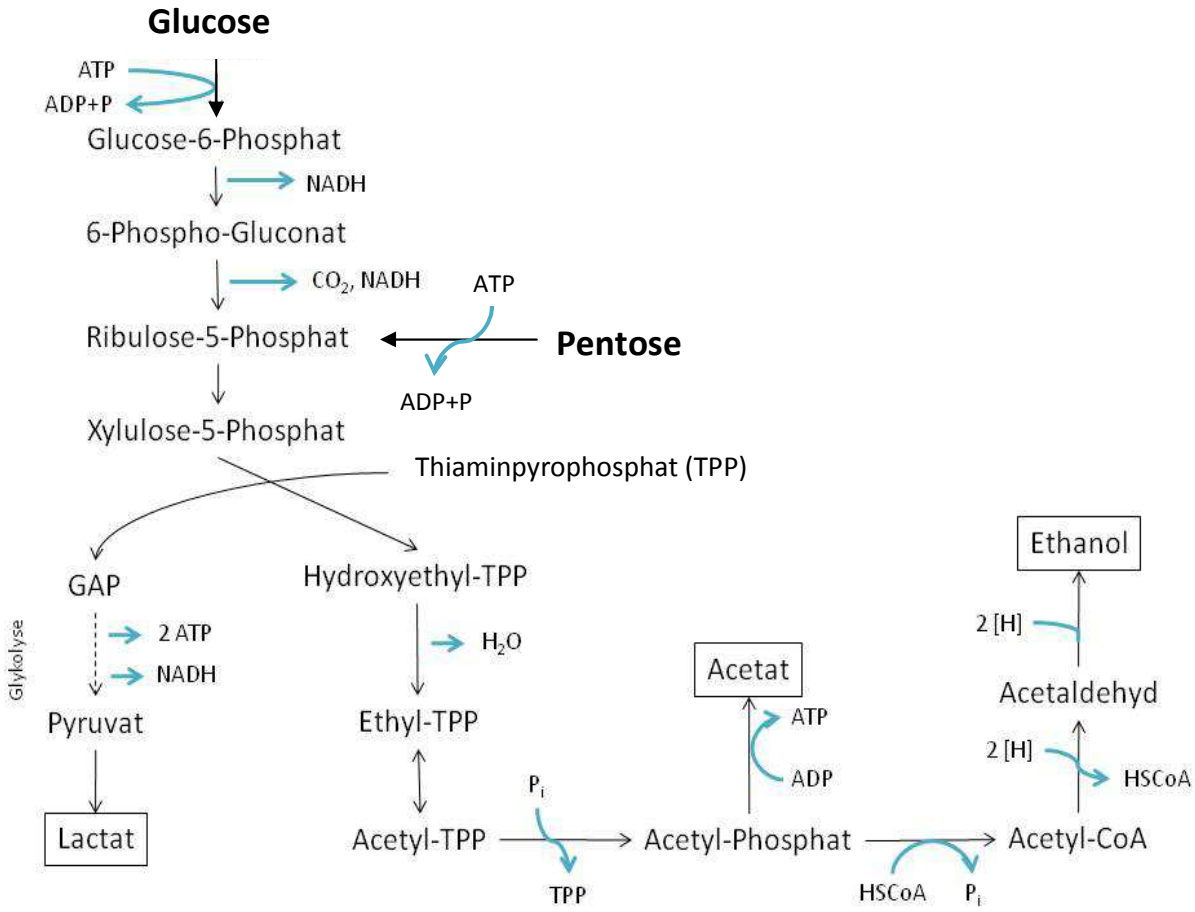


Abbildung 47: Schematische Darstellung der heterofermentativen Milchsäuregärung (GAP: Glycerinaldehyd-3-Phosphat)

Allerdings sind weder die acetogenen Organismen *C. ljungdahlii*, *C. aceticum* und *A. woodii*, welche auf CO oder CO_2 und H_2 wachsen können, noch die Lactobacillen *L. plantarum*, *L. pantheris* und *L. hilgardii*, welche das LCB-Hydrolysat verwerten können, in der Lage, von Natur aus 1-Butanol zu synthetisieren.

An dieser Stelle kommt der Organismus *C. acetobutylicum* ins Spiel, welcher durch die ABE-Fermentation unter anderem 1-Butanol (Abbildung 48) herstellen kann. Bei *C. acetobutylicum* ist Acetyl-CoA der Ausgangsstoff für die Produktion von Lösungsmitteln und Säuren und somit auch für die Produktion von 1-Butanol. Der zugehörige Stoffwechselweg ist in Abbildung 48 schematisch dargestellt. Für die 1-Butanolproduktion werden zunächst zwei Moleküle Acetyl-CoA durch die Thiolase A (ThlA) zu Acetacetyl-CoA kondensiert, welches wiederum durch die 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase (Hbd) zu 3-Hydroxybutyryl-CoA und durch die Crotonase (Crt) zu Crotonyl-CoA umgewandelt wird. Crotonyl-CoA wird anschließend durch die Butyryl-CoA-Dehydrogenase (Bcd) zu Butyryl-CoA umgesetzt. Für die Verstoffwechselung von Butyryl-CoA zu 1-Butanol besitzt *C. acetobutylicum* verschiedene Enzyme. So katalysiert die Butyraldehyd-/Butanol-Dehydrogenase (AdhE) (Peterson *et al*., 1991) als bifunktionelles Enzym die zwei Schritte vom Butyryl-CoA über Butyraldehyd zu 1-Butanol. Zusätzlich zu dem Enzym AdhE besitzt *C. acetobutylicum* ein weiteres, die Aldehyd-/Alkohol-Dehydrogenase 2 (AdhE2) (Fontaine *et al*., 2002), die ebenfalls ein bifunktionelles Enzym ist und wie AdhE beide Schritte ausgehend von Butyryl-CoA zu 1-Butanol katalysiert. Darüber hinaus trägt *C. acetobutylicum* die Gene *bdhA* und *bdhB*, welche 1-Butanol-Dehydrogenasen kodieren und ebenfalls die Umsetzung von Butyraldehyd zu 1-Butanol (Abbildung 48) gewährleisten (Walter *et al.*, 1992). Allerdings scheint die 1-Butanol-Dehydrogenase A (BdhA) hierbei in nur sehr geringem Maße Butyraldehyd zu 1-Butanol umzusetzen, da BdhA hauptsächlich in der exponentiellen Phase, wo weder Acetone noch 1-Butanol produziert werden, gebildet wird. Vielmehr setzt BdhA wohl die Reaktion von Acetaldehyd zu Ethanol um (Feustel *et al.,* 2003).

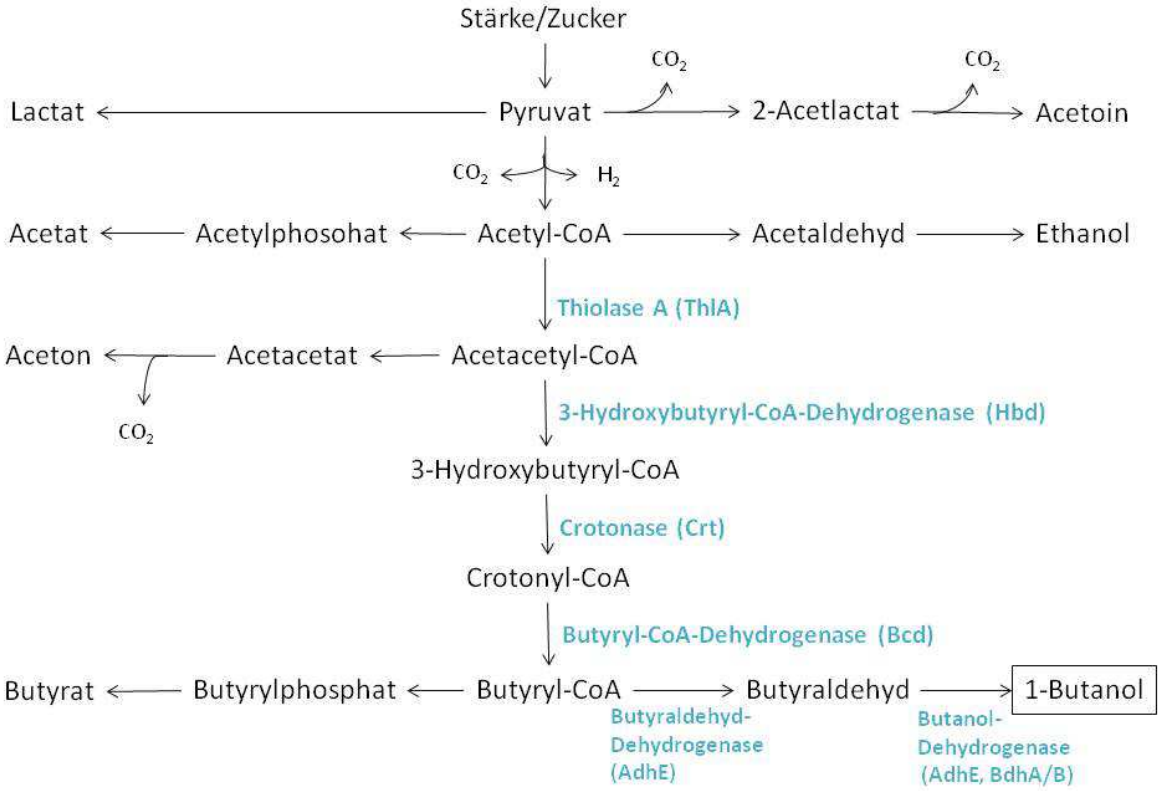


Abbildung 48: Schematische Darstellung des Stoffwechselweges von *C. acetobutylicum* (in blau sind die für die Synthese von 1-Butanol wichtigen Enzyme dargestellt) (Lee *et al*., 2008, mod.)

Es lag somit Überlegung nahe, die Gene zur 1-Butanolsynthese aus *C. acetobutylicum* zunächst in die acetogenen Organismen und im Verlauf dieser Arbeit auch in die isolierten Lactobacillen zu bringen. Hierzu wurden synthetisch drei verschiedene Plasmide hergestellt, welche die Gene *thlA*, *bcd*, *crt* und *hbd* tragen. Sie unterscheiden sich in den Genen *ald* (aus *C. beijerinckii*) und *bdhB* auf dem Plasmid pSB3C5_UUMKS 1, *adhE* auf dem Plasmid pSB3C5_UUMKS 2 und *adhE2* auf dem Plasmid pSB3C5_UUMKS 3 (Tabelle 7; Schuster, 2010). Der Organismus *C. beijerinckii* besitzt ebenfalls ein Enzym, welches die Umsetzung von Butyryl-CoA zu Butyraldehyd ermöglicht und Homologien zu den Genprodukten der Gene *adhE* und *adhE2* aus *C. acetobutylicum* aufweist (Toth *et al.*, 1999), die Butyraldehyd-Dehydrogenase. Sie wurde bereits genutzt, um 1-Butanol in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* zu produzieren (Steen *et al.*, 2008). Um verschiedene Butyryl-CoA zu Butyraldehyd bzw. 1-Butanol umsetzende Enzyme nutzen zu können, wurde dieses Gen *ald* aus *C. beijerinckii* dem synthetisch hergestellten

1-Butanoloperon zugefügt und anschließend in das Plasmid pSB3C5 kloniert, welches danach pSB3C5-UUMKS1 genannt wurde.

Schuster (2010) hat die drei Butanolsynthese-Plasmide bereits in verschiedene *E. coli*-Stämme transformiert und sie auf ihre Funktionalität, 1-Butanol zu produzieren, untersucht. Hierbei hat sie festgestellt, dass die Menge an produziertem 1-Butanol nicht genau bestimmt werden kann, da *E. coli* in der Lage ist, 1-Butanol wieder zu verbrauchen. Die maximale Konzentration an 1-Butanol, die *E. coli* mit diesen Plasmiden produzieren kann, liegt bei 11,6 mM (Schuster, 2010). Weiterhin sind die Plasmide pSB3C5-UUMKS 1-3, wie in dieser Arbeit festgestellt wurde, in *E. coli* nicht stabil. Nach Anzucht eines *E.coli*-Stammes (Glycerinkultur), welcher eines der drei Plasmide trägt, Präparation des Plasmides und anschließendem Restriktionsverdau, wurde festgestellt, dass die Plasmide nicht mehr ihre ursprüngliche Größe besaßen. Anscheinend werden von *E. coli* bestimmte Sequenzen aus dem Plasmid eliminiert, dessen Produkte in *E. coli* z. B. Wachstumsdefizite hervorrufen können oder gar toxisch wirken. Die Plasmide pSB3C5-UUMKS 1-3 besitzen keinen Replikationsursprung für Gram-positive Bakterien, lediglich den Replikationsursprung p15a für *E. coli*. In dieser Arbeit konnte in die Plasmide pSB3C5-UUMKS 1 und pSB3C5-UUMKS 2 der Replikationsursprung *repL*, aus dem Vektor pIMP1 (Tabelle 7), für Clostridien erfolgreich kloniert werden (Abbildung 17). Diese Plasmide wurden als sich pMW1 und pMW2 bezeichnet. In das Plasmid pSB3C5-UUMS 3 konnte kein Replikationsursprung kloniert werden. Der einzige Unterschied zu den anderen Plasmiden besteht darin, dass das Plasmid pSB3C5-UUMKS 3 statt der Gene *ald/bdhB* bzw. *adhE* das Gen *adhE2* trägt, welches für eine Acetaldehyd-/Alkohol-Dehydrogenase 2 kodiert. Aus diesem Grund wurde überprüft, ob das Gen *adhE2* allein ein Problem in der Klonierung darstellt. Hierzu wurde das Gen *adhE2* aus dem Plasmid pSB3C5-UUMKS 3 amplifiziert und in das Plasmid pIMP1 kloniert. Diese Klonierung war erfolgreich, so dass die Vermutung nahe liegt, dass das Produkt des Gens *adhE2* nur in Zusammenhang mit den anderen Genprodukten des 1-Butanol-Syntheseweges und dem Replikationsursprung *repL* in *E. coli* ein Wachstumsdefizit hervorruft.

Eine Transformation von Plasmid-DNA in die Organismen *C. ljungdahlii*, *C. aceticum* oder *A. woodii* ist prinzipiell möglich und wurde im Verlauf dieser Arbeit in Zusammenarbeit mit Melanie Straub (Straub, 2012) etabliert bzw. verbessert (Becker *et al.*, 2009). Es konnte gezeigt werden, dass der Vektor pIMP1 nach

entsprechender Methylierung in die Organismen transformiert werden kann. Die Methylierung der Plasmid-DNA vor einer Transformation in die acetogenen Organismen ist notwendig, damit die Fremd-DNA nicht degradiert wird. Da im Laufe dieser Arbeit das Genom von *C. ljungdahlii* vollständig sequenziert wurde (Köpke *et al.*, 2010), wurde die Sequenz der Methyltransferase aus *C. ljungdahlii* (CLJU_c03310) synthetisch hergestellt und in den Vektor pACYC184 kloniert. Dieses Plasmid wurde als pMClj (Tabelle 7) bezeichnet. Durch die Koexistenz des Plasmides pMClj und des zu transformierenden Plasmides pIMP1 in ein und demselben *E. coli*-Stamm, wird das zu transformierende Plasmid durch die Methyltransferase auf pMClj methyliert (siehe auch 2.5.7.5.1.). Ein Nachweis erfolgreich methylierter Plasmid-DNA ist in diesem Fall problematisch, da über die Methyltransferase aus *C. ljungdahlii* bisher wenig bekannt ist. Sie gehört zu den N-6-Methyltransferasen und sollte somit das Adenin in Gensequenzen methylieren (http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?clj:CLJU_c03310). Bauer (2011) versuchte, in seiner Bachelorarbeit eine Restriktionsendonuklease zu finden, welche durch diese Art von Methylierung in ihrem Schneideverhalten beeinflusst wird. Ein entsprechendes Beispiel stellt das Enzym *Sat*I in Zusammenhang mit der Methyltransferase des *Bacillus subtilis*-Phagen Φ3T dar. Diese Methyltransferase wird dazu benötigt, DNA für eine Transformation in *C. acetobutylicum* zu methylieren. Wurde die DNA erfolgreich methyliert, so erkennt die Restriktionsendonuklease *Sat*I die Schnittstellen nicht mehr, so dass man geschnittene methylierte von geschnittener, unmethylierter DNA auf einem Agarosegel-Bild unterscheiden kann. Ein solches Enzym konnte zur Feststellung der Methylierung mit der Methyltransferase aus *C. ljungdahlii* nicht eingesetzt werden (Bauer, 2011). Aus diesem Grund kann kein direkter Nachweis über eine erfolgreiche Methylierung erbracht werden. Um die Plasmide pMW1 und pMW2 erfolgreich zu methylieren, wurde die Methyltransferase aus *C. ljungdahlii* in den Vektor pBR322 (Tabelle 7) kloniert (pBRMClj), da das Methylierungsplasmid pMClj bzw. pMCljS (besitzt statt Chloramphenicolresistenzgen ein Spectinomycinresistenzgen; Tabelle 7) den gleichen Replikationsursprung (p15a) besitzt wie die Plasmide pMW1 und pMW2. Besitzen die Plasmide den gleichen Replikationsursprung, so kann eine Koexistenz dieser in *E. coli* nicht stattfinden und das jeweilige Plasmid nicht methyliert werden.

In dieser Arbeit konnte das Plasmid pMW1 (Abbildung 19) in *C. aceticum* transformiert werden und es zeigte sich nach erfolgreicher Transformation mit

2,1 mM eine geringe Produktion an 1-Butanol. Weiterhin zeigte sich mit 36 mM eine verhältnismäßig hohe Produktion an Ethanol (Abbildung 21; Tabelle 16) im Vergleich zum Wildtyp, der kein Ethanol produzierte. Der transformierte *C. aceticum*-Stamm produzierte mit 33,3 mM nur noch halb so viel Acetat wie der Wildtyp mit 70 mM. Der Weg vom Acetyl-CoA über Acetaldehyd zu Ethanol scheint hier bevorzugt abzulaufen, obwohl energetisch gesehen der Weg zum 1-Butanol von Vorteil wäre. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass hier schnellstmöglich zwei Reduktionsäquivalente regeneriert werden können. Die Enzyme Ald und BdhB sind keine spezifischen Enzyme und durchaus in der Lage, die Reaktion von Acetyl-CoA zu Acetaldehyd und weiter zu Ethanol zu katalysieren (Toth *et al*., 1999; Walter *et al*., 1992).

Weitere Transformationen der Plasmide pMW1 in *C. ljungdahlii* und *A. woodii* sowie pMW2 in *C. aceticum*, *C. ljungdahlii* und *A. woodii* blieben erfolglos. Es ist nicht trivial in diese Organismen Plasmid-DNA zu transformieren. Es ist möglich und erstmals 2009 (Becker et al., 2009) sowie in dieser Arbeit anhand des Vektors pIMP1 (Mermelstein *et al.*, 1992), aus welchem der Replikationsursprung für die Plasmide pMW1 und pMW2 stammt, bewiesen, dass Plasmid-DNA in die acetogenen Organismen *C. ljungdahlii* (Köpke *et al.*, 2010), *C. aceticum* und *A. woodii* transformierbar ist.

Allerdings hat das Plasmid pIMP1 mit einer Größe von ca. 4600 Bp nur ein Drittel der Größe der Plasmide pMW1 mit 14600 Bp und pMW2 mit 14500 Bp. Es ist somit möglich, dass die Größe der Plasmid-DNA bei einer Transformation der acetogenen Organismen eine erhebliche Rolle spielt. Straub (2012) konnte zeigen, dass ein Plasmid einer Größe von ca. 10600 Bp erfolgreich in *C. ljungdahlii*, *C. aceticum* und *A. woodii* transformiert werden kann. Bei *E. coli* ist bewiesen, dass die Transformationseffizienz stark abhängig von Größe und Konzentration der zu transformierenden DNA ist: Schon zwischen den Plasmiden pUC19 mit einer Größe von 2686 Bp und pBR322 mit einer Größe von 4636 Bp zeigten sich gravierende Unterschiede in der Transformationseffizienz. Ein Plasmid mit einer Gröβe von 23000 Bp (pPP4) war fast unmöglich in *E. coli* zu transformieren (Szostková und Horáková, 1998). Mit ca. 14600 Bp sind die Plasmide pMW1 und pMW2 sehr groß und selbst *E. coli* nimmt ein solch großes Plasmid nur schwer auf. Dies zeigte sich dadurch, dass bei einer Transformation der Plasmide pMW1 oder pMW2 entweder keine oder nur sehr wenige Klone auf einer selektiven Agarplatte wuchsen. Es liegt

also nahe, dass auch bei den acetogenen Organismen *C. ljungdahlii*, *C. aceticum* und *A. woodii* die Transformationseffizienz mit Zunahme der zu transformierenden DNA-Größe abnimmt. Nachdem weitere Transformationen der Plasmide pMW1 und pMW2 in die acetogenen Organismen erfolglos blieben, wurde mit den Lactobacillen weiter gearbeitet. Diese sind in der Lage, das von der Firma Süd-Chemie AG zur Verfügung gestellte LCB-Hydrolysat C5/C6#B zu verwerten. Neben den von Pascher (2010) im Verlauf dieser Arbeit isolierten Organismen wurde auch mit den entsprechenden Lactobacillus-Reinkulturen der DSMZ gearbeitet. Die Reinkulturen der DSMZ dienten als Kontrollen, um zu überprüfen, ob die Plasmide prinzipiell in Lactobacillen transformiert sowie auch repliziert und transkribiert werden können. Um eine Transformation der Plasmide pMW1 oder pMW2 in Lactobacillen zu ermöglichen, wurde zunächst der Replikationsursprung dieser Plasmide getauscht, da diese Plasmide einen Replikationsursprung für Clostridien (*repL*) tragen. Hierzu wurde von der Firma Nofima *Lactobacillus plantarum* NC7 bereitgestellt, aus dem das Plasmid p256 isoliert werden konnte (Sorvig *et al.*, 2005). Von diesem Plasmid p256 konnte anschließend der Replikationsursprung ori256 amplifiziert und in die Plasmide pMW1 und pMW2 anstelle des Replikationsursprunges *repL* kloniert werden. Ebenfalls konnte der Replikationsursprung ori256 in das Plasmid pSB3C5-UUMKS 3 erfolgreich kloniert werden. Diese Plasmide wurden als pMW1(2/3)-ori256 (Tabelle 7) bezeichnet.

Die Transformation des Plasmides pMW1-ori256 in den DSMZ-Stamm *L. plantarum* DSM 1055 war erfolgreich. Nach erfolgter Transformation war der DSMZ-Stamm *L. plantarum* DSM 1055 in der Lage, in Gegenwart von Antibiotikum zu wachsen, der Wildtyp nicht. Ebenfalls konnten bei Wachstum auf DSMZ-Medium geringe Mengen (max. 0,06 g/L bzw. 0,84 mM) 1-Butanol mit Hilfe des Gaschromatographen detektiert werden (Abbildung 31a). Dennoch ist nicht eindeutig bewiesen, dass dieser Stamm tatsächlich 1-Butanol produziert, da die Konzentrationen an 1-Butanol nicht reproduzierbar waren.

Ein Grund für die unterschiedlichen 1-Butanolkonzentrationen in verschiedenen Experimenten mit demselben Stamm könnte die Tatsache sein, dass *L. plantarum* DSM 1055 pMW1-ori256 in der Lage ist, bis zu 0,04 g/L 1-Butanol zu verstoffwechseln (Abbildung 32a). Außerdem trägt das Plasmid pMW1-ori256, welches in *L. plantarum* DSM 1055 transformiert wurde, die Gene für die 1-Butanolsynthese aus *C. acetobutylicum*. Lactobacillen und Clostridien,

insbesondere *C. acetobutylicum* und *L. plantarum* unterscheiden sich nicht nur in ihrer Fähigkeit, Sporen zu bilden, ihrem Stoffwechselweg oder ihrer Lebensweise (fakultativ/obligat anaerob), sondern auch im GC-Gehalt ihrer Gene. So hat *L. plantarum* einen GC-Gehalt von 42 mol % (http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=1590) und *C. acetobutylicum* von 31 mol % (Nölling *et al*., 2001). Damit einher geht auch die sogenannte „Codon Usage". Das bedeutet, dass unterschiedliche Basentripletts die gleiche Aminosäure kodieren können und verschiedene Organismen verschiedene Tripletts bevorzugen. Die Aminosäure Arginin zum Beispiel wird von *C. acetobutylicum* bevorzugt mit dem Triplett AGA kodiert und bei *L. plantarum* mit CGU (in Tabelle 22, blau unterlegt). Bei der Aminosäure Glycin bevorzugt *C. acetobutylicum* das Triplett GGA und *L. plantarum* GGU. Weitere Beispiele sowie eine genaue Übersicht über die „Codon Usage" von *C. acetobutylicum* im Vergleich zu *L. plantarum* sind in Tabelle 22 dargestellt.

Es liegt im Rahmen der Möglichkeiten, dass auf Grund der „Codon Usage", *L. plantarum* nicht immer funktionelle Enzyme für die 1-Butanolsynthese bildet. Weiterhin konnte Catarina Erz (2012) zeigen, dass der Stamm *L. plantarum* DSM 1055 pMW1-ori256 bei Wachstum auf MRS-Minimal-Medium hauptsächlich die Hexosen verwertet, was bedeutet, dass hier homofermentativ Lactat gebildet wird. Bei der homofermentativen Milchsäuregärung wird ausschließlich Lactat produziert, was bedeutet, dass das zentrale Intermediat Acetyl-CoA hier nicht gebildet wird. Fehlt Acetyl-CoA als Ausgangsstoff, so kann auch keine Synthese von 1-Butanol stattfinden. Da *L. plantarum* DSM 1055 pMW1-ori256 bei Wachstum auf MRS-Minimal-Medium neben Lactat und 1-Butanol in dieser Arbeit auch geringe Mengen an Acetat produzierte, ist nicht davon auszugehen, dass er ausschließlich homofermentativ gewachsen ist. Die mit 0,7 g/L (9,6 mM) geringen Mengen an Acetat korrelieren mit den noch geringeren Mengen an gebildetem 1-Butanol. Prinzipiell aber ist der Stamm *L. plantarum* DSM 1055 pMW1-ori256 in der Lage, geringe Mengen an 1-Butanol zu produzieren, wenn die entsprechenden Enzyme gebildet werden und der entsprechende Stoffwechselweg eingeschlagen wird. Die hier mit 0,03 g/L (0,4 mM) unter semianaeroben Bedingungen und 0,06 g/L (0,83 mM) unter anaeroben Bedingungen produzierte Menge an 1-Butanol ist für weitere Forschungsarbeiten ein notwendiger „proof of principle".

Tabelle 22: „Codon Usage“ bei *C. acetobutylicum* und *L. plantarum* (pro Tausend Tripletts; blau unterlegt: unterschiedlich bevorzugte Tripletts)

Aminosäure	Triplett	*C. acetobutylicum*	*L. plantarum*
Alanin	GCU	23,3	25,6
	GCC	4,2	19,2
	GCA	25,6	21,3
	GCG	3,6	16,6
Arginin	CGU	2,2	12,1
	CGC	0,6	7,0
	CGA	1,0	7,2
	CGG	0,2	10,9
	AGA	23,4	4,4
	AGG	5,9	1,7
Asparagin	AAU	52,5	30,1
	AAC	12,8	17,3
Asparaginsäure	GAU	46,8	36,6
	GAC	8,5	16,7
Cystein	UGU	8,3	4,8
	UGC	3,6	2,1
Glutamin	CAA	16,3	31,9
	CAG	7,0	14,3
Glutaminsäure	GAA	49,8	38,0
	GAG	17,8	10,4
Glycin	GGU	19,8	27,1
	GGC	6,3	15,0
	GGA	32,1	11,2
	GGG	5,0	11,9
Histidin	CAU	10,5	13,2
	CAC	2,9	8,2

Aminosäure	Triplett	*C. acetobutylicum*	*L. plantarum*
Isoleucin	AUU	35,5	45,5
	AUC	4,7	20,1
	AUA	55,6	8,0
Leucin	UUA	36,0	37,4
	UUG	9,7	25,2
	CUU	26,7	11,0
	CUC	2,4	6,4
	CUA	9,5	12,6
	CUG	2,4	9,9
Lysin	AAA	63,1	33,2
	AAG	30,4	26,9
Methionin	AUG	25,1	27,2
Phenylalanin	UUU	37,9	28,7
	UUC	6,8	14,0
Prolin	CCU	12,2	7,8
	CCC	1,3	4,5
	CCA	12,0	14,4
	CCG	1,7	8,0
Serin	UCU	16,4	9,0
	UCC	4,4	4,0
	UCA	18,4	14,1
	UCG	2,3	6,9
	AGU	18,8	16,9
	AGC	7,9	8,3
Threonin	ACU	19,6	19,3
	ACC	5,0	12,1
	ACA	21,9	12,5
	ACG	3,0	18,7

Aminosäure	Triplett	*C. acetobutylicum*	*L. plantarum*
Tryptophan	UGG	7,4	11,3
Tyrosin	UAU	33,6	24,0
	UAC	9,2	12,4
Valin	GUU	29,8	30,1
	GUC	2,1	15,3
	GUA	27,4	10,3
	GUG	7,0	15,2

Im Vergleich zu Berezina *et al*. (2010), welche mit dem rekombinanten Stamm *L. brevis* 0,3 g/L 1-Butanol produzieren konnten, ist die hier erreichte Menge an 1-Butanol zwar nur ein Zehntel bzw. ein Fünftel, allerdings wurden in *Lactobacillus brevis* analoge Gene des 1-Butanol-Operons von *C. acetobutylicum* gefunden (Berezina *et al*., 2010). Wie in dieser Arbeit über einen Sequenzvergleich geprüft wurde, finden sich in *L. plantarum* keine solchen analogen Gene des 1-Butanol-Operons von *C. acetobutylicum* (Daten nicht gezeigt).

Der Stamm *L. plantarum* DSM 1055 pMW1-ori256 ist direkt nach der Transformation nicht mehr in der Lage, das LCB-Hydrolysat zu verwerten. Eine Adaptation Stammes *L. plantarum* DSM 1055 pMW1-ori256 an LCB-Hydrolysat scheint prinzipiell möglich, konnte jedoch nicht mehr durchgeführt werden, da die entsprechende Charge LCB-Hydrolysat nicht mehr hergestellt wird.

Die anderen Lactobacillus-Reinkulturen der DSMZ, *L. pantheris* und *L. hilgardii*, konnten nicht erfolgreich mit einem der Plasmide pMW1-ori256, pMW2-ori256 und pMW3-ori256 transformiert werden. Die Aufnahme dieser Plasmide in *L. pantheris* kann deshalb problematisch sein, da dieser Organismus obligat homofermentativ ist. Dies bedeutet, dass *L. pantheris* in seinem Stoffwechsel theoretisch kein Acetyl-CoA bildet, welches das Schlüsselintermediat für den Weg der 1-Butanolsynthese darstellt. *L. pantheris* hat somit keinen Grund, ein Plasmid mit den Genen für die 1-Butanolsynthese zu behalten.

Ebenso konnte keiner der isolierten Lactobacillus-Stämme erfolgreich transformiert werden. Ein triftiger Grund, weshalb die Isolate *L. pantheris* und *L. hilgardii* keines

der Plasmide aufgenommen haben, liegt in ihrer breiten Resistenz gegenüber Antibiotika. Die auf diesen Plasmiden verwendeten Antibiotikaresistenzgene sind, wie sich herausstellte, nicht notwendig für die isolierten Stämme *L. pantheris* und *L. hilgardii*. Diese Stämme sind von Natur aus resistent gegenüber den Antibiotika Chloramphenicol, Ampicillin, Erythromycin und Tetracyclin (Tabelle 21). Der isolierte *L. plantarum* ist bei Wachstum auf MRS bzw. MRS-Minimal-Medium homofermentativ, was bedeutet, dass wie bei dem DSMZ-Stamm *L. pantheris* kein Acetyl-CoA als Intermediat für eine 1-Butanolsynthese gebildet wird.

Dennoch konnte in dieser Arbeit ein Organismus (*L. plantarum* DSM 1055 pMW1-ori256) so modifiziert werden, dass er bei Wachstum auf dem MRS-Minimal-Medium in der Lage ist, geringe Mengen an 1-Butanol zu produzieren.

5. a) Zusammenfassung

1. Zur Auswahl geeigneter Stämme für eine mögliche 1-Butanolproduktion wurden verschiedene Stämme getestet. Die Organismen *C. ljungdahlii*, *C. aceticum* und *A. woodii* stellten sich am geeignetsten heraus, da diese in hohen Konzentrationen Acetat produzierten (60 mM bis 115 mM) und dabei gleichzeitig keine störenden Nebenprodukte bildeten. Die Bildung von Acetat verläuft über Acetyl-CoA, welches für eine spätere 1-Butanolproduktion nötig ist. Weiterhin haben diese Organismen den Vorteil, dass sie auf CO_2/H_2 oder CO wachsen können.

2. In dieser Arbeit konnte ein Transformationsprotokoll für acetogene Organismen etabliert bzw. verbessert werden. Mit Hilfe eines zusammen mit Straub (2012) entwickelten Methylierungssystems lässt sich Plasmid-DNA erfolgreich in acetogene Organismen elektroporieren.

3. Es wurden zwei Plasmide, welche das Butanolsyntheseoperon aus *C. acetobutylicum* tragen, konstruiert, die im Stande sind, in Clostridien und anderen acetogenen Organismen zu replizieren. Hierzu wurde der Replikationsursprung *repL* aus dem Vektor pIMP1 erfolgreich in die entsprechenden synthetisch hergestellten Vorläuferplasmide kloniert. Diese Plasmide wurden als pMW1 und pMW2 bezeichnet.

4. Das Plasmid pMW1 wurde erfolgreich in *C. aceticum* transformiert. Der Stamm *C. aceticum* pMW1 produzierte 2,1 mM 1-Butanol, 36 mM Ethanol und im Gegensatz zum Wildtyp mit 33,3 mM nur noch die Hälfte an Acetat.

5. *C. aceticum* und *A. woodii* waren nicht in der Lage, in großen Volumina auf einem industriell hergestelltem LCB-Hydrolysat zu wachsen. Deswegen wurden von Pascher (2010) im Rahmen einer Bachelorarbeit verschiedene Lactobacillen isoliert, die in der Lage waren, das Hydrolysat zu verwerten. Um die Lactobacillen erfolgreich transformieren zu können, wurde der Replikationsursprung (ori256) für Lactobacillen aus dem Vektor p256 in die entsprechenden z. T. synthetisch hergestellten Vorläuferplasmide kloniert,

welche das Butanolsyntheseoperon aus *C. acetobutylicum* tragen. Diese Plasmide wurden als pMW1-ori256, pMW2-ori256 und pMW3-ori256 bezeichnet.

6. Die isolierten Lactobacillen wurden auf ihr Wachstumsverhalten sowie auf ihr Produktspektrum untersucht. Es stellte sich heraus, dass die isolierten Lactobacillen fakultativ anaerob sind. Der Stamm *L. plantarum* ist unter anaeroben sowie unter semianaeroben Bedingungen homofermentativ. *L. pantheris* und *L. hilgardii* sind unter semianaeroben Wachstumsbedingungen heterofermentativ und unter anaeroben Wachstumsbedingungen homofermentativ. Weiterhin sind die Organismen *L. pantheris* und *L. hilgardii* resistent gegenüber den Antibiotika Chloramphenicol, Ampicillin, Erythromycin und Tetracyclin.

7. Der DSMZ-Stamm *L. plantarum* konnte erfolgreich mit dem Plasmid pMW1 transformiert werden. Der Stamm *L. plantarum* pMW1-ori256 ist in der Lage, geringe Mengen an 1-Butanol zu produzieren. Allerdings ist dieser so modifizierte Stamm nicht mehr in der Lage, auf dem LCB-Hydrolysat zu wachsen.

5. b) Summary

1. After screening several organisms for a potential 1-butanol production, *C. ljungdahlii, C. aceticum,* and *A. woodii* proved to be most suitable. These three organisms produced high concentrations (60-115 mM) of acetate while producing no by-products. Acetate is produced via acetyl-CoA, which will be the precursor for a later 1-butanol production. In addition, all three organisms are able to grow on CO_2/H_2 or CO.

2. In this work, a transformation protocol for acetogenic bacteria was established or improved, respectively. Using a new methylation system, which was developed in cooperation with Straub (2012), electroporation of plasmid DNA in acetogenic bacteria is possible or more efficient, respectively.

3. Two plasmids carrying the butanol synthesis operon from *C. acetobutylicum* were constructed for transformation of clostridia and acetogenic organisms. Therefore *repL* from the vector pIMP1 was cloned into a partial synthetic plasmid construct, harbouring the butanol synthesis operon. The *repL* gene encodes a replicon, which is able to replicate in clostridia and acetogenic organisms. The corresponding plasmids were designated pMW1 and pMW2.

4. The organism *C. aceticum* was successfully transformed with the plasmid pMW1, however, 2,1 mM 1-butanol production was detected. *C. aceticum* pMW1 produced also ethanol (36 mM) and only half of the acetate (33.3 mM) compared to the wildtype (70 mM).

5. *C. aceticum* and *A. woodii* were not able to grow in higher volumes of a industrially produced LCB-hydrolysate. Therefore, Pascher (2012) isolated different *Lactobacillus* strains, which were able to grow in LCB- hydrolysate. For a successful transformation, the *ori256* for *Lactobacillus* strains from the vector p256 was cloned into the synthetic plasmid constructs harbouring the butanol synthesis operon. Three plasmids were constructed, they were designated pMW1-ori256, pMW2-ori256, and pMW3-ori256.

6. The isolated lactobacilli were characterized concerning growth and product formation. All isolated lactobacilli are facultative anaerobic organisms. Under anaerobic and semianaerobic conditions, *L. plantarum* shows a homofermentative metabolism. The isolated organisms *L. pantheris* and *L. hilgardii* display under anaerobic conditions a homofermentative and under semianaerobic conditions a heterofermentative metabolism. Furthermore, *L. pantheris* and *L. hilgardii* are resistant against the antibiotics chloramphenicol, ampicillin, erythromycin, and tetracycline.

7. The plasmid pMW1-ori256 was successfully transformed in the DSMZ strain *L. plantarum*. This strain is able to produce minor concentrations of 1-butanol, however, growth in LCB-hydrolysate was no longer possible.

6. Literatur

Alegre, M. T., M. C. Rodriguez und J. M. Mesas. 2004.
Transformation of *Lactobacillus plantarum* by electroporation with in vitro modified plasmid DNA.
FEMS Microbiology Letters 241: 73-77

Bahrmann, H., und H. Bach. 2005.
Oxo synthesis. In: Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry.
Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim: Online (www.mrw.interscience.wiley.com/emrw/9783527306732/ueic/article/a18_321/current/abstract).

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

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

Bauer, R. 2011.
Molekularbiologische Optimierung acetogener Organismen.
Bachelorarbeit, Universität Ulm

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

Béguin, P., J. Millet und J. P. Aubert. 1987.
The cloned *cel* (cellulose degradation) genes of *Clostridium thermocellum* and their products.
Microbiological Science 4: 277-280

Berezina, O. V., N. V. Zakharova, A. Brandt, S. V. Yarotsky, W. H. Schwarz und V. V. Zverlov. 2010.
Reconstructing the clostridial n- butanol metabolic pathway in *Lactobacillus brevis.*
Applied Microbiology and Biotechnology 87: 635-646

Bélaich, J.-P., C. Tardif, A. Bélaich und C. Gaudin. 1997.
The cellulolytic system of *Clostridium cellulolyticum*.
Journal of Biotechnology 57: 3-14

Boopathy, R., H. Bokang und L. Daniels. 1993.
Biotransformation of furfural and 5-hydroxymethyl furfural by enteric bacteria.
Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 11: 147-150

Braun, M., F. Mayer und G. Gottschalk. 1981.
Clostridium aceticum (Wieringa), a microorganism producing acetic acid from molecular hydrogen and carbon dioxide.
Archives of Microbiology 128: 288-293

Daunderer, M. 1995.
Klinische Toxikologie.
ecomed verlagsgesellschaft mbH

de Man, J. C., M. Rogosa und M. E. Sharpe. 1960.
A medium for the cultivation of lactobacilli.
Journal of Applied Microbiology 23: 130-135

Demain, A. L., M. Newcomb und J. H. Wu. 2005.
Cellulase, clostridia, and ethanol.
Microbiology and Molecular Biology Reviews 69: 124-154

Desvaux, M. 2005.
Clostridium cellulolyticum: model organism of mesophilic cellulolytic clostridia.
FEMS Microbiology Reviews 29: 741-764

Donaldson, G. K., L. L. Huang, L. A. Maggio-Hall, V. Nagarajan, C. E. Nakamura und W. Suh. 2007.
Fermentative production of four carbon alcohols.
Internationales Patent WO2007/041269

Dower, W.J., J. F. Miller und C. W. Ragsdale. 1988.
High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation.
Nucleic Acids Research 16: 6127-6145

Drake, H. L., K. Küsel und C. Matthies. 2006.
The Prokaryotes, Ecophysiology and Biochemistry
Springer Science+Business Media, LLC

Dürre, P. 2005.
Formation of solvents in clostridia. In: P. Dürre (Hrsg.), Handbook on clostridia.
CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL (USA): 671-693.

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

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

Erz, K. 2012
Butanolproduktion in verschiedenen Organismen.
Diplomarbeit, Universität Ulm

Feustel, L., S. Nakotte und P. Dürre. 2003.
Characterization and development of two reporter gene systems for *Clostridium acetobutylicum*.
Applied and Environmental Micobiology 70: 798-803

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

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

Gray, K. A., L. Zhao und M. Emptage. 2006.
Bioethanol.
Current Opinion in Chemical Biology 10: 141-146

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

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

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

Kumar, M., und K. Gayen. 2011.
Developments in biobutanol production: new insights.
Applied Energy 88: 1999-2012

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

Lee, S. Y., J. H. Park, S. H. Jang, L. K. Nielsen, J. Kim und K. S. Jung. 2008.
Fermentative butanol production by Clostridia.
Biotechnology and Bioengineering 101: 209-228

Liu, X., Y. Zhu und S.T. Yang. 2006.
Construction and characterization of *ack* deleted mutant of *Clostridium tyrobutyricum* for enhanced butyric acid and hydrogen production.
Biotechnology Progress 22: 1265-1275

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

Lòpez, M. J., N. N. Nichols, B. S. Dien, J. Moreno und R. J. Bothast. 2004.
Isolation of microorganisms for biological detoxification of lignocellulosic hydrolysates.
Applied Microbiology and Biotechnology 64: 125-131

Mason, C. K., M. A. Collins und K. Thompson. 2005
Modified electroporation protocol for lactobacilli isolated from the chicken corps facilitates transformation and the use of a genetic tool.
Journal of Microbiological Methods 60: 353-363

Mermelstein, L. D., N. E. Welker, G. N. Bennett und E. T. Papoutsakis. 1992.
Expression of cloned homologous fermentative genes in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824.
Biotechnology (NY) 10: 190-195

Morris, J. A., A. Kheltry und E. W. Seitz. 1978.
Antimicrobiol activity of aroma chemicals and essential oils.
Journal of American Oil Chemists Society 56: 595-603

Nair, R. V., B. N. George und E. T. Papoutskakis. 1993.
Molecular characterization of an aldehyde/alcohol dehydrogenase gene from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824.
Journal of Bacteriology 176: 871-885

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

Pascher, F. 2010.
Isolierung von Lignocellulose verwertenden Bakterien.
Bachelorarbeit, Universität Ulm

Petersen, D. J., R. W. Welch, F. B. Rudolph und G. N. Bennett. 1991.
Molecular cloning of an alcohol (butanol) dehydrogenase gene cluster from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824.
Journal of Bacteriology 173: 1831-1834

Rhee, M. S., J. Kim, Y. Qian, L. O. Ingram und K. T. Shanmugam. 2006.
Development of plasmid vector and electroporation condition for gene transfer in sporogenic lactic acid bacterium, *Bacillus coagulans*.
Plasmid 58: 13-22

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

Saiki, R. K., D. H. Gelfland, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis und H. A. Erlich. 1988.
Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.
Science 239: 487-491

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

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

Steen, E. J., R. Chan, N. Prasad, S. Myers, C. J. Petzold, A. Redding, M. Ouellet und J. D. Keasling. 2008.
Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of n-butanol.
Microbial Cell Factories 7: 36

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

Sørvig, E., M. Skaugen, K. Naterstad, V. G. H. Eijsink and L. Axelsson. 2005
Plasmid p256 from *Lactobacillus plantarum* represents a new type of replicon in lactic acid bacteria, and contains a toxin–antitoxin-like plasmid maintenance system.
Microbiology 151: 421-431

Szostková, M., und D. Horáková. 1998.
The effect of plasmid DNA sizes and other factors on electrotransformation of *Escherichia coli* JM 109.
Bioelectrochemistry and Bioenergetics 47: 319-323

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

Thompson, K., und M. A. Collins. 1996.
Improvement in electroporation efficiency for *Lactobacillus plantarum* by the use of high concentrations of glycine in the growth medium.
Journal of Microbiological Methods 26: 73-79

Toth, J., A. A. Ismaiel und J.-S. Chen. 1999.
The *ald* gene, encoding a coenzyme A-acylating aldehyde dehydrogenase, distinguishes *Clostridium beijerinckii* and two other solvent-producing Clostridia from *Clostridium acetobutylicum.*
Applied and Environmental Micobiology 65: 4973-4980

von Kutepow, N. ,und H. Kindler. 1960.
Die Alkoholsynthese nach W. Reppe.
Angewandte Chemie 72: 802-805

Walter, K. A., G. N. Bennett und E. T. Papoutskakis. 1992.
Molecular characterization of two *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 butanol dehydrogenase isozyme genes.
Journal of Bacteriology 174: 7149-7158

Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier und D. J. Lane. 1991.
16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study.
Journal of Bacteriology 173: 697-703

Weißermel, K., und H. J. Arpe. 1998.
Industrielle Organische Chemie. Bedeutende Vor- und Zwischenprodukte.
Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Weizmann, C. 1915.
Improvements in the bacterial fermentation of carbohydrates and in bacterial cultures for the same.
Br. Patent 4845

Wilfinger, W. W., K. Mackey und P. Chomczynski. 1997.
Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity.
Biotechniques 22: 474-481

Zhang, Y., B. Han und T. C. Ezeji. 2011.
Biotransformation of furfural and 5-hydroxymethyl furfural (HMF) by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 during butanol fermentation.
New Biotechnology 29: 345-351

Zhu, Y., X. Liu und S. T. Yang. 2005.
Construction and characterization of *pta g*ene-deleted mutant of *Clostridium tyrobutyricum* for enhanced butyric acid fermentation.
Biotechnology and Bioengineering 90: 154-166

7. Anhang

7.1. Internetadressen

In folgender Liste sind die für diese Arbeit verwendeten Internetadressen aufgelistet.

Codon Usage Table:	http://www.kazusa.or.jp/codon/
Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes:	http://www.genome.jp/kegg/
National Center for Biotechnological Information:	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Statistisches Bundesamt:	https://www.destatis.de
Tecson-Kompetenz in Tankmesstechnik:	http://www.tecson.de

7.2. Wachstumskurven und Produktspektren

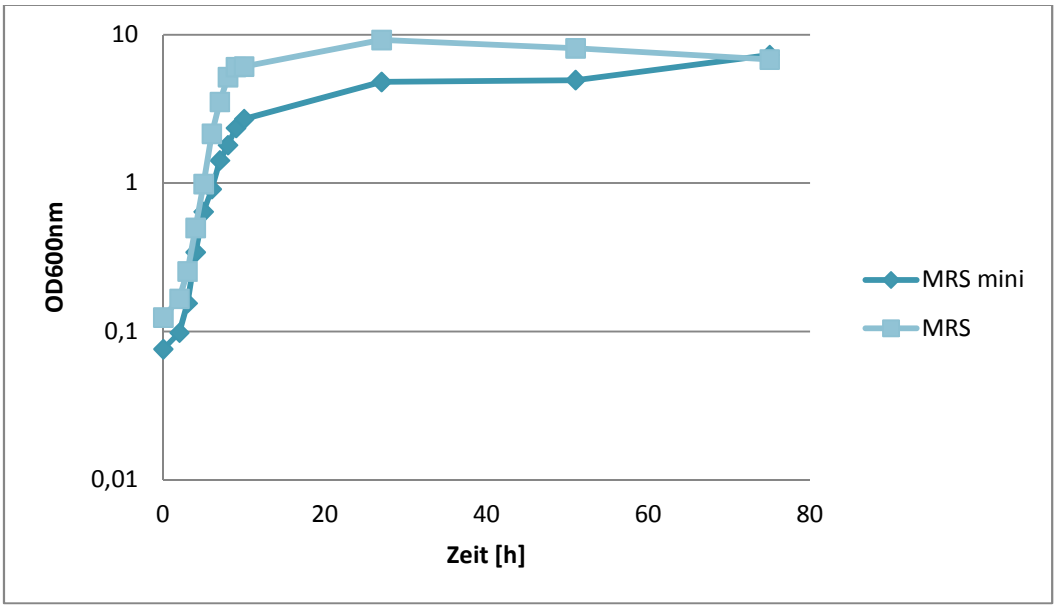


Abbildung 49: Wachstum von *B. coagulans* (Isolat) auf MRS- und MRS-Minimal-Medium (MRS mini) unter aeroben Bedingungen

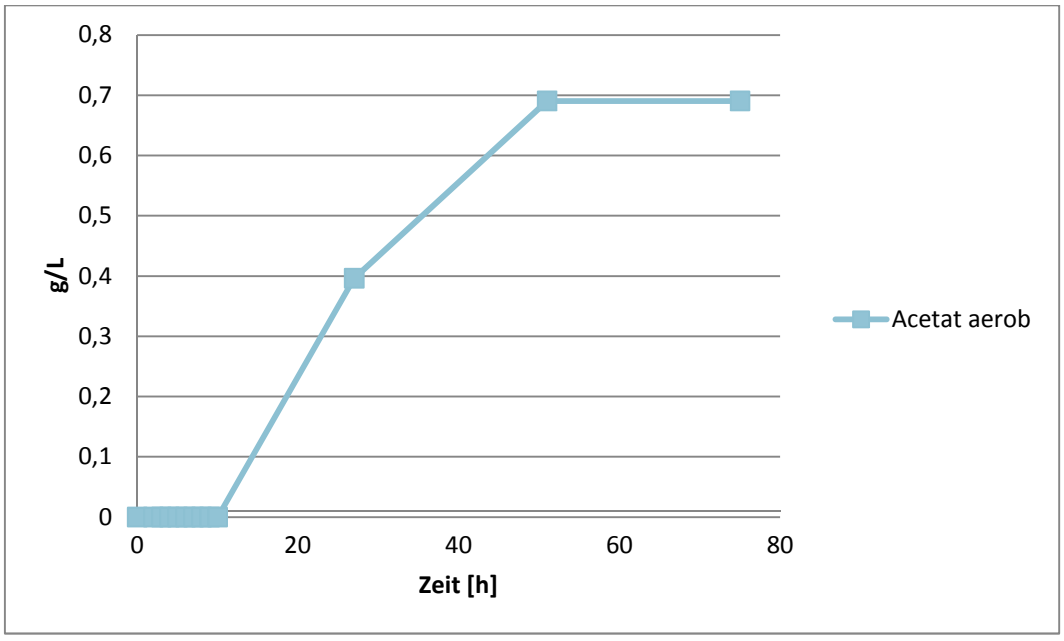


Abbildung 50: Produktspektrum von *B. coagulans* (Isolat) bei Wachstum auf MRS-Minimal-Medium (MRS mini) unter aeroben Bedingungen

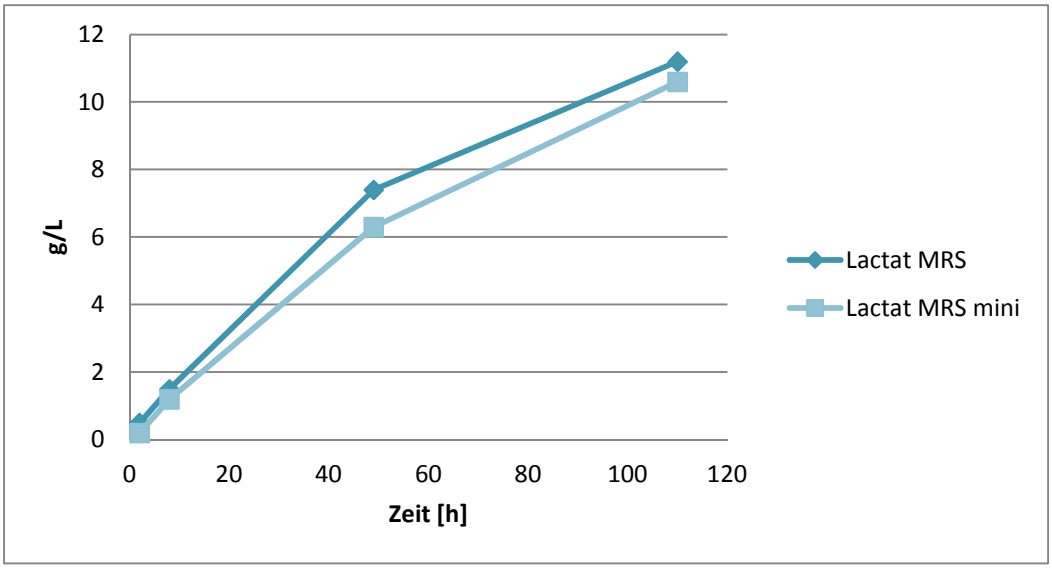


Abbildung 51: Lactatproduktion von *B. coagulans* (Isolat) bei Wachstum auf MRS- und MRS mini-Medium unter aeroben Bedingungen

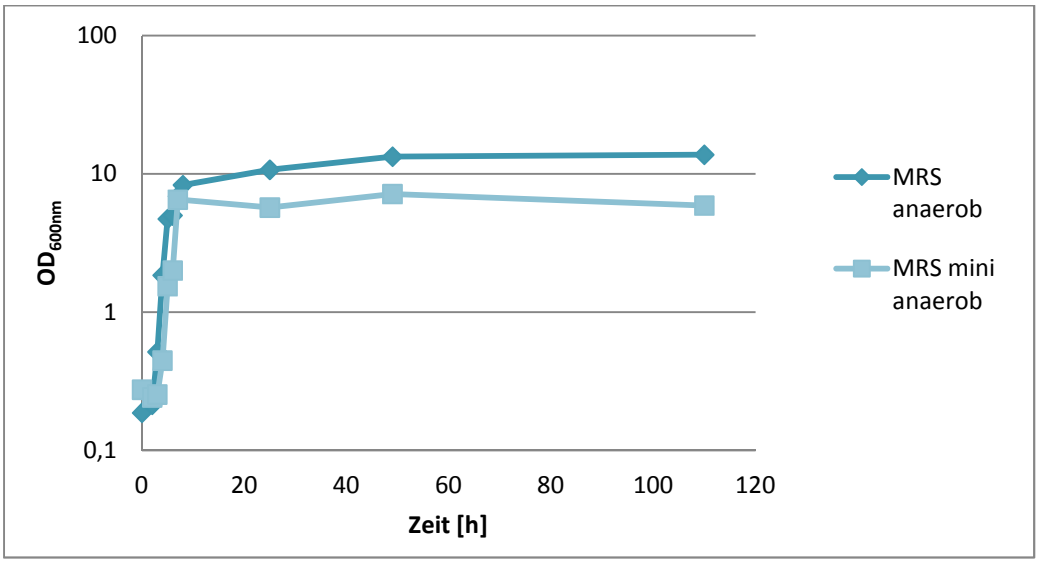


Abbildung 52: Wachstum von *B. coagulans* (Isolat) auf MRS- und MRS mini-Medium unter anaeroben Bedingungen

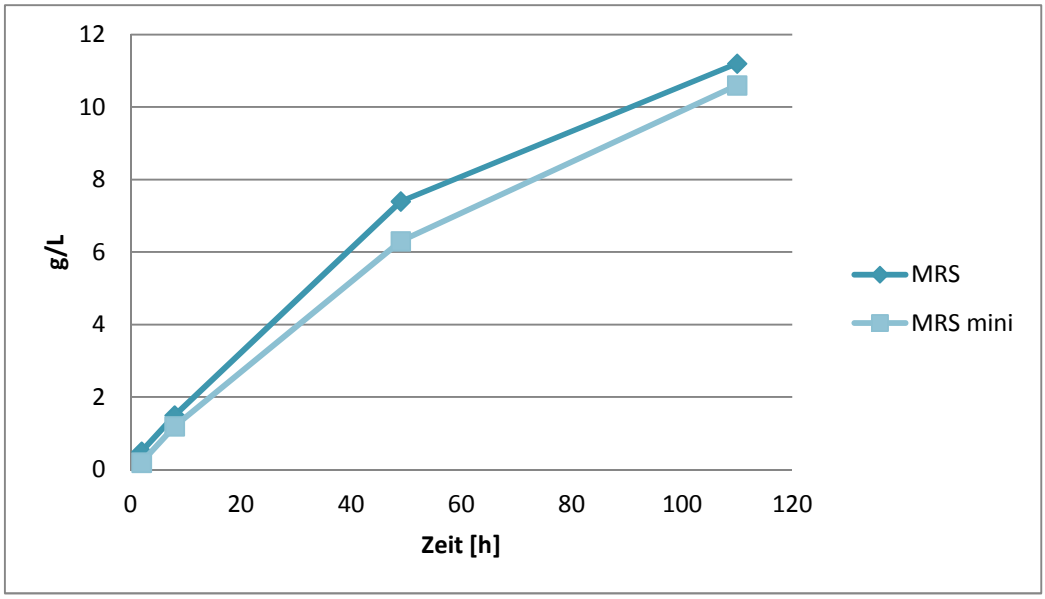


Abbildung 53: Lactatproduktion von *B. coagulans* (Isolat) bei Wachstum auf MRS- und MRS mini-Medium unter anaeroben Bedingungen

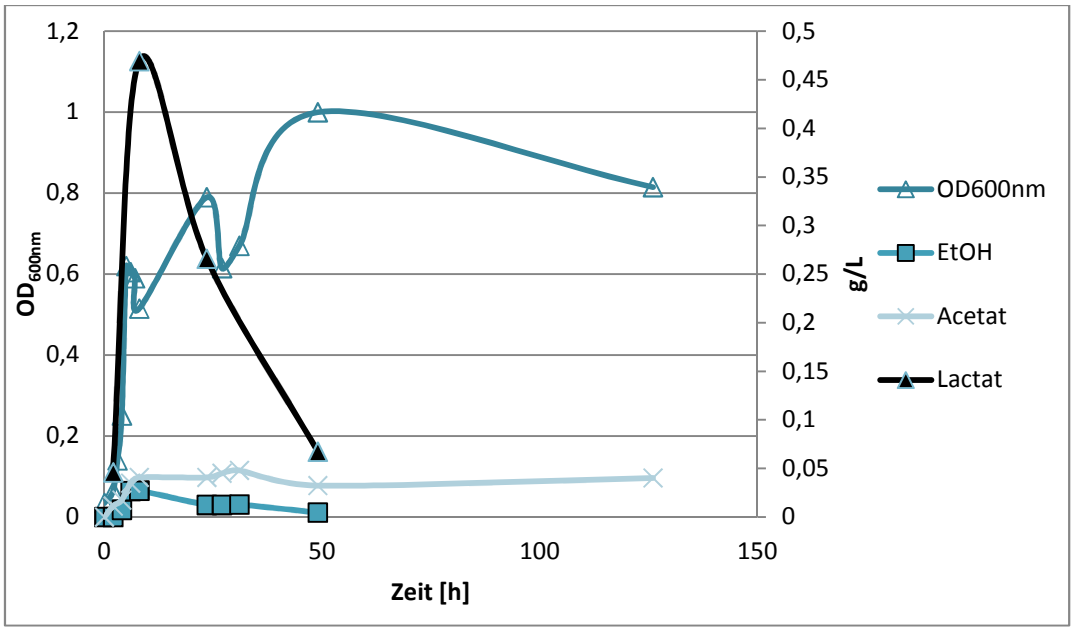


Abbildung 54: Wachstum und Produktspektrum von *B. coagulans* DSM 1 auf MRS-Minimal-Medium unter aeroben Bedingungen.

Danksagung

Zuerst möchte ich Herrn Prof. Dr. Peter Dürre für die Überlassung des interessanten Themas und die Ermöglichung des selbstständigen Arbeitens sowie die vielen Ratschläge, wenn ich mal nicht mehr weiter wusste, danken.

Danke an Herrn Prof. Dr. Bernhard Eikmanns für das Übernehmen des Korreferats meiner Arbeit.

Danke an Dr. Bettina Schiel-Bengelsdorf für die Betreuung meiner Arbeit. Schön, dass du mich unterstützt hast und mit Rat und Tat zur Seite standst, bis zum Schluss!

Danke an die Firma Süd-Chemie AG für die finanzielle Unterstützung und die gute Zusammenarbeit.

Danke an das gesamte Institut für die zahlreichen Ausflüge, Geburtstagsfeiern, Weihnachtsfeiern und natürlich die netten Leute dort.

Besonderen Dank gilt dem Labor 337 mit den „Insassen“ Meli, Simone, Sonja und Thiemo. Mit euch habe ich eine Atmosphäre erleben dürfen, die ich so schnell in keiner Arbeitsumgebung wieder finden werde. Über die Arbeit hinaus sind wir richtige Freunde geworden. Das ist für mich von unschätzbarem Wert, schön dass ich einen wichtigen Lebensabschnitt mit euch teilen durfte!

Ganz besonderen Dank an Dr. Melanie Straub für alles was du für mich getan hast. Ohne dich wäre ich heute nicht so gut wie ich es bin. Danke, dass du immer ein Ohr für mich hast und für mich da bist. Du bist mir schon während wir noch studiert haben ans Herz gewachsen, ich hoffe wir werden uns nie aus den Augen verlieren.

Danke an die deutschen Vizemeister in der Hobbyleague im Formationstanzen, die Lateinformation Ulm. Ohne euch und das Tanzen wäre mir schon öfter mal die Decke auf den Kopf gefallen. Ihr seid super!

Danke an meine Mama Ute Judisch. Ohne dich wäre ich nicht hier, danke dass du mir gezeigt hast wie stark man sein kann und dass ich in dir immer einen Fels in der Brandung habe. Du bist die beste Mama der Welt.

Danke an meinen Bruder Marcel Wensche, du musstest mir manchmal stundenlang zuhören und ich habe dich mit meinen Sorgen vollquatschen können. Danke, dass du nicht aufgelegt hast. Pass auf dich auf!

Besonderen Dank gilt meinem Freund, Lebensabschnittsgefährten, Partner, Homie und Lebenszeuge Andreas Hummel. Du bist die Kraft die mich weiter bringt und du bist derjenige, der mir das schönste Geschenk der Welt gemacht hat: Unsere Tochter Katharina! Ich liebe dich!

Akademischer Lebenslauf

09. Februar 1983 Geburt in Dresden, Sachsen

Schulbildung

Juni 2003 Erlangung der allgemeinen Hochschulreife am Albert-Schweitzer-Gymnasium in Crailsheim

Studium

Okt. 2004 - Sept. 2006 Vordiplom im Studienfach Biologie an der Universität Karlsruhe

Okt. 2006 - Juli 2008 Hauptstudium Biologie mit den Fächern Mikrobiologie (Hauptfach), Humangenetik, Neurobiologie und Philosophie an der Universität Ulm

Aug. 2008 - Apr. 2009 Diplomarbeit zum Thema „Etablierung von *B. subtilis* als Zwischenwirt im Rahmen des Projektes zur Behandlung von nekrotisierender Tumore mit clostridiellen Endosporen“ am Institut Mikrobiologie und Biotechnologie der Universität Ulm

April 2009 Erlangung des akademischen Grades „Diplom Biologin“

Promotion

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

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die hier angegebenen Quellen und Informationsmaterialien verwendet habe. Alle Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Ulm, September 2012 _____