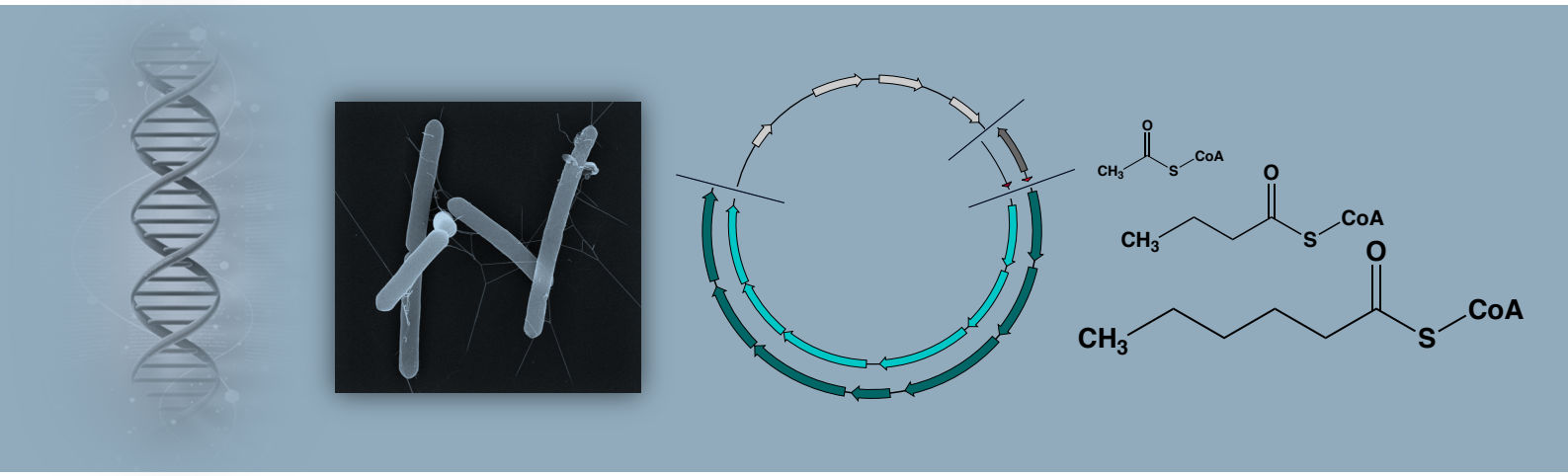
ulm university universität ulm



Chain-Elongation: Entschlüsselung essentieller Gene für die Bildung mittelkettiger Fettsäuren und Alkohole in acetogenen Bakterien

Dissertation

Eingereicht zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat.

an der Fakultät für Naturwissenschaften der

Universität Ulm

vorgelegt von

Steffen Wirth

aus Heidenheim an der Brenz

2020

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

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thorsten Bernhardt

Referent: Prof. Dr. Peter Dürre

Koreferent: Prof. Dr. Bernhard Eikmanns

Tag der Doktorprüfung: 03.02.2022

Teile dieser Arbeit wurden 2021 im Journal *Metabolic Engineering* veröffentlicht. Gemäß Autorenrecht ist der Abdruck gestattet.

Wirth S, Dürre P. 2021. Investigation of putative genes for the production of medium-chained acids and alcohols in autotrophic acetogenic bacteria. Metab. Eng. 66:296-307. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2021.04.010

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis I
1 Einleitung 1
1.1 Gasfermentation 1
1.2 Mittelkettige Säuren und Alkohole 5
1.3 *Chain-Elongation* in acetogenen Bakterien 7
2 Material und Methoden 15
2.1 Bakterienstämme, Plasmide und Primer 15
2.1.1 Bakterienstämme 15
2.1.2 Plasmide und Vektoren 16
2.1.3 Primer 19
2.2 Gase 26
2.3 Medienzusammensetzung 26
2.3.1 Medium für *Escherichia coli* 26
2.3.2 Medien für *Clostridium carboxidivorans* und *Clostridium ljungdahlii* 27
2.3.3 Medium für *Clostridium scatologenes* und *Clostridium drakei* 30
2.3.4 Medium für *Acetobacterium woodii* 32
2.3.5 Medien für *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* 34
2.3.6 Lyophilisierungsmedium 37
2.3.7 Medienzusätze 37
2.4 Bakterienkultivierung 39
2.4.1 Aerobe Kultivierung 39
2.4.2 Anaerobe Kultivierung 39
2.5 Konservierung von Bakterienstämmen 40
2.5.1 Glycerin-Dauerkulturen 40
2.5.2 SMP/DMSO-Dauerkulturen 40
2.5.3 Lyophilisierung 41

2.6 Analyse von Wachstum und metabolischem Produktspektrum 42
2.6.1 Bestimmung der optischen Dichte und des pH-Wertes 42
2.6.2 Quantifizierung von Substrat und bakteriellen metabolischen Produkten mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie 42
2.6.3 Quantitative Analyse bakterieller metabolischer Produkte und Substrat mittels Gaschromatographie 43
2.6.4 Qualitative Bestimmung bakterieller metabolischer Produkte durch Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung 44
2.6.5 Gaschromatographie zur Analyse der Gaszusammensetzung 45
2.7 Arbeiten mit Nukleinsäuren 45
2.7.1 Isolierung genomischer DNA 45
2.7.2 Isolierung von Plasmid-DNA 45
2.7.3 Isolierung und Aufreinigung von RNA aus Gram-positiven Bakterien 46
2.7.4 DNA-Verdau 47
2.7.5 Polymerasekettenreaktion 47
2.7.6 In-Fusion®-Klonierung 50
2.7.7 Ligation von DNA-Fragmenten 50
2.7.8 Agarose-Gelelektrophorese 51
2.7.9 Aufreinigung von DNA aus dem Agarosegel 51
2.7.10 Aufreinigung von DNA aus Lösungen 51
2.7.11 Quantifizierung von Nukleinsäuren 52
2.7.12 Restriktionsverdau von DNA 52
2.7.13 Sequenzierung und Analyse von DNA 53
2.7.14 Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) 54
2.8 Transfer von Nukleinsäuren in Bakterien 54
2.8.1 DNA-Transfer in chemisch kompetente *E. coli* XL1-Blue MRF' 54
2.8.2 DNA-Transfer in chemisch kompetente *E. coli* SCS110 55
2.8.3 DNA-Transfer in elektrokompetente *E. coli* CA434 55
2.8.4 Transformation acetogener Bakterien mittels Elektroporation 56

2.8.5 Transformation von *C. saccharoperbutylacetonicum* 57
2.8.6 DNA-Transfer in acetogene Bakterien durch Konjugation 58
2.9 Permeabilisierungs-Nachweis mit Fluoreszenz-markiertem Dextran 59
2.10 Nachweis aktiver Restriktionsendonukleasen 60
2.11 *Plasmid curing* 62
2.12 Mikroskopie 62
2.12.1 Licht- und Fluoreszenzmikroskopie 62
2.12.2 Rasterelektronen- und Transmissionselektronenmikroskopie 63
2.13 Bioinformatik 63
3 Ergebnisse 65
3.1 Native Bildung mittelkettiger Säuren und Alkohole in acetogenen Bakterien 65
3.2 Die genetische Zugänglichkeit von *C. carboxidivorans* 72
3.2.1 Das Restriktions- und Modifikationssystem von *C. carboxidivorans* 72
3.2.2 Transformation von *C. carboxidivorans* via Elektroporation oder Konjugation 75
3.2.3 Homologe Rekombination mit *C. carboxidivorans* 81
3.2.4 Untersuchung des nativen Plasmids p19 aus *C. carboxidivorans* und Experimente zu *plasmid curing* 83
3.3 *In silico*-Vergleich von C6-Körper-produzierenden acetogenen Bakterien 87
3.4 Transkriptnachweis der *hcs*-Cluster 1 und 2 in *C. carboxidivorans* 88
3.5 Heterologe Produktion mittelkettiger Säuren und Alkohole in acetogenen Bakterien 94
3.5.1 Konstruktion eines modularen Hexanoyl-CoA-Synthese-Plasmid-Systems 94
3.5.2 Heterologe Produktion von C6-Körpern mit *C. ljungdahlii* 96
3.5.3 Produktion mittelkettiger Säuren mit rekombinanten *A. woodii*-Stämmen 100
3.5.4 Analyse zur Optimierung der Hexansäure-Produktion mit AWO [pPta_hcs1] und AWO [pTet_hcs1] 108

3.5.5 Lactat und Methanol als Substrate zur Hexanoat-Produktion mit *A. woodii* [pPta_hcs1] ... 115
3.6 Ansatz zur Identifizierung essentieller Gene für die Produktion mittelkettiger Säuren und Alkohole in acetogenen Bakterien ... 118
3.6.1 Erweiterung des modularen Hexanoyl-CoA-Synthese-Plasmid-Systems ... 118
3.6.2 Untersuchung der C6-Körper-Produktion mit rekombinanten *C. saccharoperbutylacetonicum*-Stämmen ... 122
4 Diskussion ... 128
4.1 Vergleich acetogener Bakterien mit nativer C6-Körper-Produktion ... 128
4.2 Die genetische Zugänglichkeit von *C. carboxidivorans* ... 133
4.2.1 Elektroporation, Konjugation und homologe Rekombination ... 133
4.2.2 Das native Plasmid p19: Ursache oder Lösung des Problems? ... 137
4.2.3 Restriktionssystem als Transformations-Barriere ... 139
4.3 *In silico*-Vergleich und Genexpression der *hcs*-Cluster von *C. carboxidivorans* 140
4.4 Heterologe C6-Körper-Produktion mit acetogenen Bakterien ... 142
4.5 Hexanoat-Produktion aus Lactat, Methanol oder Synthesegas ... 147
4.6 Produktion von Hexanoat und Hexanol mit rekombinanten *C. saccharoperbutylacetonicum*-Stämmen ... 149
4.7 Der Stoffwechselweg zur Bildung mittelkettiger Säuren und Alkohole in *C. carboxidivorans* ... 152
5 Zusammenfassung ... 155
6 Summary ... 157
Literaturverzeichnis ... IX
Beitrag zu dieser Arbeit ... XXIV
Danksagung ... XXV
Lebenslauf ... XXVII
Erklärung ... XXIX

Abkürzungsverzeichnis

A

A	Absorption, Ampere
A.	*Acetobacterium*
ABE	Aceton-Butanol-Ethanol
ad	bis zu
ADP	Adenosindiphosphat
AG	Aktiengesellschaft
Ala	Alanin
AMA	anteilige molare Produktausbeute
ATCC	*American Type Culture Collection*
Atet	Anhydrotetracyclin
ATP	Adenosintriphosphat
AWO	*Acetobacterium woodii*

B

bcs	*butyryl-CoA synthesis*
BLAST	*Basic Local Alignment Search Tool*
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise

C

C	Kohlenstoff
C.	*Clostridium*; *Cupriavidus*
°C	Grad Celsius

ca.	*circa*
cDNA	komplementäre DNA
CGM	*clostridial growth medium*
CLJU	*Clostridium ljungdahlii*
cm	Zentimeter
CO	Kohlenstoffmonoxid
CO_2	Kohlenstoffdioxid
Co. KG	Compagnie Kommanditgesellschaft
CSAC	*Clostridium saccharoperbutylacetonicum*
Cys	Cystein

D

Δ	*Delta*
Da	*Dalton*
Dam	Desoxiadenosin
Dcm	Desoxicytosin
demin.	demineralisiert
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

E

e	Elektron

E.	*Escherichia*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	englisch
et al.	und andere
etc.	*et cetera*

F

F	Farad; Fragment
Fd	Ferredoxin
Fd^{2-}	reduziertes Ferredoxin

G

g	Gramm; Kraft bezogen auf die Erdbeschleunigung
GC	Gaschromatographie
ggf.	gegebenenfalls
Gly	Glycin
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung

H

h	Stunde
H^+	Proton
H_2	Wasserstoff
hcs	*hexanoyl-CoA synthesis*
hom.	homolog
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HS-CoA	Coenzym A

I

Ile	Isoleucin
IMG ER	*Integrated Microbial Genomes Expert Review*
Inc.	*Incorporated*
inkl.	inklusive

K

k	Kilo (10^3)

L

L	Liter
LB	*lysogeny broth*
Leu	Leucin
LM	Lösungsmittel

M

m	Milli (10^{-3}); Meter
M	Molar (mol/L)
M.	*Moorella*
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MIK	minimal inhibitorische Konzentration
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
m/v	Massenkonzentration
μ	Mikro (10^{-6})

N

n	Nano (10^{-9})
N_2	Stickstoff
Na^+	Natrium-Ion
NAD^+	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidiert)
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduziert)
NCBI	*National Center for Biotechnology Information*
Nfn	NAD^+-abhängige reduziertes Ferredoxin:NADP-Reduktase
NIST	*National Institute of Standards and Technology*

O

Ω	Ohm
O_2	Sauerstoff
OD_x	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
OLR	Offenes Leseraster
OMS	optimiertes, synthetisches Medium

P

%	Prozent
p	Piko (10^{-12})
P	Promoter
P_i	anorganisches Phosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	*phosphate-buffered saline*
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDB	Protein-Datenbank

PENP Phosphat-EDTA-Natrium-PMSF

pH negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration

PMSF Phenylmethylsulfonylfluorid

R

rDNA ribosomale DNA

REBASE *The Restriction Enzyme Database*

RM Restriktions-Modifikation

RNA Ribonukleinsäure

Rnf *Rhodobacter nitrogen fixation*

rRNA ribosomale RNA

RT Raumtemperatur; Reverse Transkriptase

RT-PCR Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion

S

s Sekunde

S Sedimentationskoeffizient in Svedberg

SDS Natriumlaurylsulfat

Ser Serin

SMC *Structural Maintenance of Chromosome*

SMP Saccharose-Magnesium-Phosphat

SOB *super optimal broth*

Syngas Synthesegas

synth. synthetisch

T

T.	*Treponema*
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Thr	Thryptophan
Tris	Tris-aminomethan
T_s	Schmelztemperatur
TSE	Tris-Saccharose-EDTA
Tyr	Tyrosin

U

U	*Unit*
UE	Untereinheit
Upm	Umdrehungen pro Minute

V

V	Volt
vs.	versus
v/v	Volumenkonzentration

W

WT	Wildtyp

Y

YTF	*yeast tryptone fructose*

1 Einleitung

1.1 Gasfermentation

Luftverschmutzung, Überbevölkerung, steigender Energiebedarf, Müllanhäufungen in den Ozeanen sowie zunehmende Treibhausgasemissionen und der damit verbundene Klimawandel sind nur ein Teil der größten Herausforderungen unserer Zeit. Bereits 1956 wurde der Einfluss des CO_2 in der Atmosphäre beschrieben. Schon damals konnte der Temperatur-Anstieg auf die zusätzliche CO_2-Emission durch den Menschen zurückgeführt werden (Plass, 1956). Auch die sich häufenden extremen Wetterphänomene können seit längerem in direkten Zusammenhang mit dem Klimawandel gebracht werden (Stott, 2016). Zur Verringerung der Treibhausgasemissionen haben im Jahr 2015 195 Staaten das Pariser Klimaabkommen zur aktiven Begrenzung des weltweiten Temperaturanstiegs auf deutlich unter 2 °C im Rahmen der 21. UN-Klimakonferenz unterzeichnet (Liew *et al.*, 2016). Noch ist unklar, ob die Menschheit den Klimawandel überhaupt aufhalten kann. Es besteht das Risiko, dass durch selbstverstärkende Effekte das planetare System an einen realen Schwellenwert gedrängt wird, ab dem eine Stabilisierung des Klimas nicht mehr möglich ist. Dadurch würde die globale Erderwärmung unaufhaltsam vorangetrieben, selbst wenn keine weiteren Treibhausgase durch den Menschen in die Atmosphäre gelangen würden (Steffen *et al.*, 2018). Um das Ziel, den globalen Temperaturanstieg unter 2 °C zu halten, überhaupt erreichen zu können, müssten ein Drittel der globalen Öl-Reserven, die Hälfte der Gas-Reserven und über 80 % der aktuellen Kohle-Reserven zwischen den Jahren 2010 und 2050 ungenutzt bleiben (McGlade und Ekins, 2015). Verstärkt wird die Problematik durch die zunehmende Bevölkerungszahl und den dadurch steigenden Ressourcenbedarf. Für das Jahr 2019 wurde berechnet, das bereits am 29. Juli der Tag erreicht ist, an dem die Menschheit das Ressourcenbudget der Natur für das gesamte Jahr verbraucht hat (*Earth Overshoot Day*). 1970 reichten die Ressourcen noch bis zum 29. Dezember des Jahres. Ein Industrieland wie Deutschland erreicht den „Overshoot Day“ 2020 bereits am 3. Mai. Würde durch Fortschreiten der Entwicklung jedes Land so viele Ressourcen wie Deutschland jährlich verbrauchen, wären bereits jetzt drei Erden notwendig (Global Footprint Network, 2020). China beispielsweise, das bevölkerungsreichste Land der Welt, befindet sich aktuell in der Phase der Industrialisierung, in der der Energieverbrauch am stärksten zunimmt. Bereits 2010 war China für ca. 25 % der weltweiten CO_2-Emission verantwortlich (Lin und Xie, 2014). Global betrachtet ist die Fertigungsindustrie für rund 43 % der CO_2-Emissionen

verantwortlich (Kim und Worrell, 2002). Vor allem aber der Bereich Transport nimmt weltweit ca. ein Drittel des gesamten Energieverbrauchs ein und ist einer der größten Verursacher von CO_2-Emissionen (Lin und Xie, 2014). Rund 24 % der globalen CO_2-Emission entsteht durch die Verbrennung von Kraftstoff, gefolgt von der Emission durch Elektrizität und Wärmeerzeugung. Allein für die Kraftstoff-Herstellung werden 65 % der weltweiten Öl-Gewinnung verbraucht (Solaymani, 2019). 2014 wurden in Deutschland 57 % des verbrauchten Rohöls im Bereich Transport, 29 % für die Energiegewinnung und 14 % als Rohmaterial für Chemikalien eingesetzt (Bertau *et al.*, 2014). In China ist die chemische Industrie zweitgrößter Produzent von CO_2-Emissionen (Lin und Long, 2016). In den USA wurden 2007 ca. 13 % des Rohöls für die nicht Kraftstoff-bezogene Chemikalienproduktion verwendet (Dodds und Gross, 2007). Das Problem bei der Verringerung der Treibhausgasemissionen ist, dass die aktuelle Gesellschaft auf Kohlenstoff-basierte Materialien, Chemikalien oder Kraftstoffe aus fossilen Rohstoffen angewiesen ist und ein Wechsel hin zu alternativen Rohstoffquellen innerhalb kurzer Zeit nicht umsetzbar ist (Liew *et al.*, 2016). Trotzdem oder gerade deshalb sollte eine nachhaltige Produktion von Plattform-Chemikalien und Kraftstoffen bei gleichzeitiger Verringerung der Treibhausgasemission langfristig anvisiert werden (Dürre und Eikmanns, 2015).

Für die Abkehr von fossilen Rohstoffen und dem damit verbundenen industriellen Wandel sind gleichwertige oder besser gestellte Alternativen in den Bereichen Rohstoff und Herstellung notwendig. Das Gute ist, dass eine Vielzahl solcher Alternativen bereits erforscht sind und teilweise schon Anwendung fanden. So wurden beispielsweise zwischen 1945 und 1950 in den USA 66 % des n-Butanols und 10 % des Acetons durch Fermentation von Molasse oder Stärke produziert. Auch andere Rohstoffe wie Essigsäure, Zitronensäure, Milchsäure und Itaconsäure wurden in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts durch Fermentation nachwachsender Rohstoffe produziert (Dodds und Gross, 2007). Steigende Rohstoffpreise für Zucker und sinkende Preise für Produkte aus petrochemischer Herstellung beendeten allerdings die fermentative Herstellung dieser Produkte. Interessante Alternativen für Rohöl-basierten Kraftstoff fanden sich in den Bio-Kraftstoffen der ersten Generation. Biodiesel, Bio-Ethanol oder Biogas werden in Mengen von rund 50 Milliarden Litern jährlich produziert (Naik *et al.*, 2010). Diese Kraftstoffe sind allerdings sehr umstritten, da sie auf der Nutzung von Pflanzen basieren, die auf Feldern angebaut werden, welche zuvor für die Lebensmittelherstellung eingesetzt wurden. Daraus entstanden ist die sogenannte „Food vs. Fuel"-Debatte, denn durch den Wegfall von Agrarland an die Kraftstoff-Industrie sind die Lebensmittelpreise drastisch gestiegen. Zur Umgehung dieser Problematik wurde an Bio-Kraftstoffen der zweiten

Generation geforscht, für deren Herstellung zum Beispiel Abfallstoffe von Lignocellulose-haltigen Pflanzen oder Biomasse aus Aquakulturen eingesetzt werden können. Die verwendeten Substrate stehen nicht in Konkurrenz mit der Lebensmittelherstellung. Außerdem können für die Herstellung viele bisher ungenutzte Ressourcen wie Abfälle aus der Landwirtschaft, dem Wald sowie der Industrie verwendet werden (Naik *et al.*, 2010). Aber auch die Bio-Kraftstoffe der zweiten Generation haben einige Nachteile. So muss die Lignocellulose-haltige Biomasse in der Regel durch Hydrolyse mit hohem Energieaufwand vorbehandelt werden, wobei der Lignin-Anteil anschließend nicht weiter verwertbar ist. Die mit der Vorbehandlung verbundenen Kosten machen den gesamten Produktionsprozess sehr teuer (Antonov *et al.*, 2016).

Damit ein alternativer Herstellungs-Prozess wirtschaftlich und für die Industrie lukrativ wird, müssen vor allem die eingesetzten Substrate, die typischerweise 60 % der Gesamtkosten eines Prozesses ausmachen, möglichst günstig sein (Dürre und Eikmanns, 2015). Hierfür in Frage kommende Substanzen sind beispielsweise Lactat, Methanol oder Synthesegas. Lactat ist ein billiges Substrat, welches als finales Endprodukt der anaeroben Glykolyse in vielen Organismen während der Fermentation anfällt und im letzten Jahrhundert als Abfallprodukt, ein sogenanntes „Dead-End Product“, angesehen wurde (Sola-Penna, 2008). Mittlerweile ist bekannt, dass Lactat beispielsweise durch den acetogenen Bakterienstamm *Acetobacterium woodii* zu Acetat verstoffwechselt werden kann und sich dadurch als Substrat zur Fermentation anbietet (Balch *et al.*, 1977; Weghoff *et al.*, 2015). Methanol als Rohstoff wurde bereits durch die chemische Industrie entdeckt. Als günstiges Substrat zur Fermentation hat es mittlerweile aber ebenso große Aufmerksamkeit erlangt. Die erste großtechnische Anlage zur Methanol-Herstellung wurde in Deutschland 1923 errichtet und produzierte bereits 1930 durch die Gasifizierung von Holz ca. 100.000 Tonnen Methanol pro Jahr (Bertau *et al.*, 2014). Ebenso wie Lactat kann auch Methanol durch *A. woodii* zu Acetat verstoffwechselt werden (Bache und Pfennig, 1981).

Gasfermentation mit Synthesegas (Syngas-Fermentation) ist in vielerlei Hinsicht der vielversprechendste Ansatz zur alternativen Herstellung von Plattform-Chemikalien oder Kraftstoffen. Bei der Gasifizierung wird Biomasse in CO- und H_2-reiches Synthesegas umgewandelt, das bei der Gasfermentation durch acetogene Bakterien in Kohlenwasserstoff-Verbindungen umgewandelt werden kann (Daniell *et al.*, 2012). Das hat den Vorteil, dass im Gegensatz zur Fermentation Lignocellulose-haltiger Substrate, nahezu der komplette Kohlenstoff inklusive des Lignin-Anteils umgewandelt werden

kann (Naik *et al.*, 2010). Außerdem ist die Gefahr eines drastischen Preisanstiegs des Substrats, anders als bei Zucker, nicht gegeben. Ein weiterer Vorteil der Gasfermentation steckt in der hohen Produkt-Selektivität durch die enzymatische Umwandlung (Liew *et al.*, 2016). Nachteile wie Nebenproduktbildung oder Kontaminationen durch Bakteriophagen fallen, anders als bei der Produktion mit Stärke oder Zucker als Kohlenstoffquelle, bei der Gasfermentation weniger ins Gewicht und machen den Prozess dadurch noch attraktiver (Dürre, 2011).

Ein weiterer entscheidender Vorteil der Gasfermentation liegt darin, dass neben der Gasifizierung von Biomasse auch direkt Abgas-Ströme der Stahlindustrie verwendet werden können (Dürre und Eikmanns, 2015). Die Eisen- und Stahlindustrie sind die Industriesektoren mit dem höchsten Energieverbrauch und sind für ca. 7 % der totalen anthropogenen CO_2-Emission verantwortlich (Kim und Worrell, 2002). Das anfallende CO_2 wird in der Regel ungenutzt als Abfallgas in die Umwelt geleitet (Zakkour und Cook, 2010). Somit hat die Verwendung von Synthesegas zwei entscheidende Vorteile: Das Substrat steht in keiner Konkurrenz mit der Lebensmittelherstellung und der Einsatz von Abfallgas-Strömen trägt aktiv zur Reduzierung der Treibhausgas-Emissionen bei. Die anaerobe Synthesegas-Fermentation wird durch autotrophe acetogene Bakterien ermöglicht. Das Produkt-Portfolio dieser Bakterien wurde bereits durch „Metabolic Engineering“ erweitert, sodass sie eine vielversprechende Alternative zur bisherigen Rohöl-basierten Herstellung von Plattform-Chemikalien oder Kraftstoff-Additiven bilden (Dürre, 2016). Die bisherige Forschung und Entwicklung führte dazu, dass die Synthesegas-Fermentation mittlerweile ein kommerzielles Level erreicht hat (Dürre, 2011; 2016). Dem Unternehmen LanzaTech ist es weltweit erstmals gelungen, nachhaltiges Ethanol, zum Einsatz als Kraftstoff-Additiv, durch die Umwandlung von industriellen Emissionen aus Stahlindustrie-Abgasen im kommerziellen Maßstab mit 46.000 Tonnen pro Jahr zu produzieren (LanzaTech, 2018). Außerdem konnte bereits an einem Modell demonstriert werden, dass der Einsatz des LanzaTech-Prozesses zur Aceton-Herstellung im Vergleich zur Herstellung aus fossilen Rohstoffen mehr als 180 % Treibhausgas-Emission über den gesamten Prozess einsparen könnte (Tschaplinski *et al.*, 2019).

Bei der Synthesegas-Fermentation durch acetogene Bakterien ist neben der Herstellung von kurzkettigen Produkten wie Acetat, Butyrat, Aceton, Ethanol oder Butanol, die einen niedrigen Marktpreis erzielen, auch die Produktion mittelkettiger Säuren und Alkohole, sogenannter „high-value“ Chemikalien, von enormer wirtschaftlicher Bedeutung (Molitor *et al.*, 2016b).

1.2 Mittelkettige Säuren und Alkohole

Der Begriff „mittelkettige Säuren und Alkohole“ beschreibt Carbonsäuren und primäre Alkohole, deren Kohlenstoff-Kette aus mindestens sechs bis acht (He *et al.*, 2018), ferner bis zu zwölf Atomen aufgebaut ist (Cavalcante *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2017). Diese Arbeit beschränkt sich auf die Untersuchung der C6-Körper-Produktion in acetogenen Bakterien. Dazu zählen Hexansäure, welche in der Regel als organisches Salz Hexanoat vorliegt, ebenso wie der korrespondierende Alkohol Hexanol. Beide Substanzen haben eine hohe Wertschöpfung. Der Marktpreis für Hexanol beispielsweise ist zehnmal höher als der von Methan (Ausfelder und Dura, 2018). Deshalb ist die Herstellung solcher Spezialchemikalien für die Industrie äußerst profitabel.

Für Hexanoat gibt es ein breites Spektrum an Einsatzmöglichkeiten in der Industrie. Als Plattform-Chemikalie kann es zur organischen Synthese von Feinchemikalien oder in der Medizin eingesetzt werden. Es wird aber auch direkt in der Parfümindustrie verwendet (Šalić *et al.*, 2013). Hexanoat kann auch als sogenanntes „grünes“ Antibiotikum in der Agrarwirtschaft genutzt werden und dient in der Lebensmittelindustrie als Vorstufe von Aromen bzw. Geschmacksstoffen (Kenealy *et al.*, 1995; Desbois, 2012). Die Säure konnte beispielsweise in destillierten alkoholischen Getränken als wichtiger Geschmacksstoff identifiziert werden (Hu *et al.*, 2015). Außerdem besteht die Möglichkeit, Hexanoat direkt als inhibitorischen Schutz vor Korrosion zu nutzen oder indirekt nach Umwandlung durch organische Chemie als Diesel-Kraftstoff oder Kerosin-Ersatz einzusetzen (Levy *et al.*, 1981; Spirito *et al.*, 2014).

Hexanol hat im Vergleich zu kurzkettigen Alkoholen wie Ethanol oder Butanol eine deutlich höhere Energiedichte, wodurch es sich besonders gut für den Einsatz als Additiv im Kraftstoff von Dieselmotoren eignet (De Poures *et al.*, 2017). Tests des erfolgversprechenden Additivs haben gezeigt, dass bei bestimmten Mischungsverhältnissen sogar weniger Schadstoffe in die Umwelt emittiert werden als es bei herkömmlichem Diesel der Fall ist (Sundar *et al.*, 2019). Zusätzlich kann Hexanol als Plattform-Chemikalie zur Herstellung von Kerosin eingesetzt werden. Hierfür gibt es bereits aussichtsreiche Ansätze, bei denen aus Hexanol durch chemische Umwandlung mit speziellen Katalysatoren unterschiedliche Kraftstoffe wie Kerosin (C12) oder Diesel (C18) generiert werden können. Diese Kraftstoffe besitzen dieselben Eigenschaften wie Kraftstoffe aus Rohöl-basierten Rohstoffen (Harvey und Meylemans, 2014).

Kurzkettige Substanzen kommen wegen des hohen Sauerstoff-zu-Kohlenstoff-Verhältnisses und der niedrigen Energiedichte nicht als Kraftstoff-Ersatz in Frage. Ein

weiterer industriell relevanter Vorteil mittelkettiger Säuren und Alkohole besteht darin, dass aufgrund der schlechteren Löslichkeit der Substanzen in Wasser die Auftrennung im „Downstream-Prozess“ erleichtert wird (Steinbusch *et al.*, 2011).

Die höherwertigen Säuren und Alkohole werden derzeit hauptsächlich durch petrochemische Herstellung aus fossilen Rohstoffen gewonnen. Teilweise werden die Stoffe auch aus natürlichen Ölen extrahiert (Spirito *et al.*, 2014; Cavalcante *et al.*, 2017). Die bisher eingesetzten Verfahren sind sehr komplex, weswegen hohe Kapitalinvestitionen seitens der Hersteller notwendig sind (Ausfelder und Dura, 2018).

Alternativ können Hexanoat und Hexanol auch durch Mikroorganismen produziert werden. Einige Untersuchungen hierzu basieren auf der Verwendung von Mischkulturen (Molitor *et al.*, 2016b; Liu *et al.*, 2017; He *et al.*, 2018). Trotz hoher Ausbeuten sind Mischkulturen aus verschiedenen Gründen ungeeignet für den großtechnischen Einsatz im industriellen Maßstab. Der Einsatz von Mischkulturen zeichnet sich vor allem dadurch aus, dass in der Regel ein Inokulum unbekannter Zusammensetzung zur Fermentation eingesetzt wird. Die Bakterienstämme im mikrobiellen Konsortium, die für die Produktion der Zielprodukte verantwortlich sind, können aufgrund ihrer Vielzahl nicht identifiziert werden. Dadurch und durch die Schwierigkeit der Langzeitlagerung einer Mischkultur, ist die Reproduzierbarkeit einer Fermentation sowie ein möglicher Patentschutz nicht gegeben. Dazu kommt, dass Mischkulturen zwar oftmals stabilere Produktionsraten liefern, diese aber niedriger ausfallen und eine sich einschleichende Kontamination deutlich später und schwieriger nachzuweisen ist als bei Monokulturen (Harrison, 1978; Molitor *et al.*, 2017). Aus den genannten Gründen werden Monokulturen von der Industrie nach wie vor bevorzugt. In der Forschung, vor allem bei der Stamm-Entwicklung und Analyse von bisher unbekannten Stoffwechselwegen, kommen ebenfalls nur Monokulturen zum Einsatz. Bisher konnten einige Bakterienstämme isoliert werden, die zur C6-Körper-Produktion im Stande sind. Der 1942 beschriebene, strikt anaerobe Stamm *Clostridium kluyveri* kann Hexanoat aus einem Substratgemisch von Acetat und Ethanol produzieren (Barker und Taha, 1942; Molitor *et al.*, 2016b). Aufgrund der Substratspezifität eignet sich *C. kluyveri* vor allem für den Einsatz in Kofermentationen (Bielzer, 2019). Das Gram-negative anaerobe Bakterium *Megasphaera elsdenii* wurde ebenfalls als Hexanoat-Produzent beschrieben. Als Substrat präferiert dieser Bakterienstamm Lactat oder Zucker (Marounek *et al.*, 1989). Eine Hexanoat-Herstellung aus Lactat konnte ebenfalls bei dem aus einem Fed-Batch isolierten anaeroben *Ruminococcaceae*-Bakterienstamm CPB6 nachgewiesen werden (Zhu *et al.*, 2017).

Unter den acetogenen Bakterien, die zur Synthesegas-Fermentation eingesetzt werden können, finden sich zwei beschriebene Stämme, die zur Produktion von C6-Körpern in der Lage sind. *Clostridium carboxidivorans* und der nah-verwandte Bakterienstamm *Clostridium scatologenes* wurden beide als Hexanoat-Produzenten beschrieben. *C. carboxidivorans* kann unter autotrophen Bedingungen zusätzlich zu Hexanoat den korrespondierenden Alkohol Hexanol in signifikanten Mengen (0,85 g/L) herstellen (Küsel *et al.*, 2000; Phillips *et al.*, 2015a; Fernández-Naveira *et al.*, 2017a). Die zur Stamm-Entwicklung und weiteren Optimierung der C6-Körper-Produktion essentiellen Enzyme und Stoffwechselwege konnten bisher in acetogenen Bakterien nicht identifiziert werden. Noch ist unklar, wie die sogenannte *Chain-Elongation* (engl. für Kettenverlängerungs-Reaktion) in *C. carboxidivorans* abläuft. Aus diesem Grund konnten auch bis heute keine rekombinanten acetogenen Bakterienstämme konstruiert werden, mit denen eine C6-Körper-Produktion, ausgehend von Synthesegas, möglich ist.

1.3 *Chain-Elongation* in acetogenen Bakterien

Der Begriff acetogene Bakterien (Acetogene) wurde 1994 durch Drake definiert, um die Besonderheiten dieser Organismen klar von denen anderer unterscheiden zu können. Unter Acetogenen versteht man anaerobe Bakterien, die den Acetyl-CoA-Stoffwechselweg als hauptsächlich verwendeten Mechanismus zur reduktiven Synthese von Acetyl-CoA aus CO_2 (i), als finalen Elektronen-Akzeptor sowie Prozess zur Energie-Konservierung (ii) und Mechanismus zur Synthese von Kohlenstoff zum Zellaufbau aus CO_2 (iii) nutzen können (Drake, 1994). Dazu kommt, dass acetogene Bakterien dazu in der Lage sind, eine Vielzahl organischer (Hexosen, Alkohole, etc.) und nicht organischer Substrate (Wasserstoff, Kohlenmonoxid, Kohlendioxid) verstoffwechseln können. Aufgrund dieser Fähigkeit lassen sich Acetogene überall in der Natur wiederfinden und spielen eine entscheidende Rolle beim globalen Kohlenstoff-Zyklus (Daniell *et al.*, 2012). Acetogene sind in 23 unterschiedlichen bakteriellen Gattungen wiederzufinden. Die meisten acetogenen Bakterien gehören der Gattung *Clostridium* und *Acetobacterium* an (Schuchmann und Müller, 2014). Mittlerweile sind über 60 mesophile und thermophile Acetogene isoliert und charakterisiert worden (Bengelsdorf *et al.*, 2018). Aus der Vielzahl acetogener Bakterien wurden drei Modell-Organismen durch intensive Forschung genauer untersucht: *Moorella thermoacetica*, *A. woodii* und *C. ljungdahlii* (Schuchmann und Müller, 2014). Nach über 30 Jahren Forschung war es gelungen, den sogenannten Wood-Ljungdahl-Stoffwechselweg, auch reduktiver Acetyl-CoA-Weg genannt, zur Synthese

des Acetyl-CoA in acetogenen Bakterien zu entschlüsseln (Wood, 1991). Es ist sehr wahrscheinlich, dass es sich hierbei um einen der ersten CO_2-fixierenden Stoffwechselwege handelt, mit dem die frühste Form von Leben auf der Erde möglich war (Wood, 1991; Russell und Martin, 2004).

A. woodii ist der erste acetogene Organismus, in dem die Energie-Konservierung entschlüsselt wurde (Schuchmann und Müller, 2014). Um zu verstehen, was die Verwertung von nicht organischem Substrat unter autotrophen Bedingungen ermöglicht, ist der Wood-Ljungdahl-Stoffwechselweg beispielhaft für den Modellorganismus *A. woodii* in Abbildung 1 nach neuesten Erkenntnissen dargestellt. Gezeigt wird die Fixierung von gasförmigem Kohlenstoff (CO/CO_2) in das zentrale Stoffwechsel-Intermediat Acetyl-CoA, von dem aus die Bildung verschiedener Produkte bei unterschiedlichen acetogenen Bakterien bereits erforscht ist. Der Metabolismus zur Energie-Konservierung in den beiden Modellorganismen *A. woodii* und *C. ljungdahlii* basiert auf demselben Grundprinzip, jedoch unterscheiden sich beide Organismen bei der Verwendung einzelner Enyzme voneinander (Schuchmann und Müller, 2014). In *A. woodii* wird im sogenannten Carbonyl-Zweig 1 Mol CO_2 durch einen Ferredoxin-abhängigen Kohlenmonoxid-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthetase-Enzymkomplex (CODh/Acs) zu 1 Mol CO reduziert (Ragsdale *et al.*, 1983). Ein weiteres Mol CO_2 wird im Methyl-Zweig des Wood-Ljungdahl-Stoffwechselwegs in *A. woodii* durch eine Elektronen-bifurkierende Wasserstoff-abhängige CO_2-Reduktase (HDCR) zu Formiat reduziert. Der Enzymkomplex besteht aus einer Hydrogenase- und einer Formiat-Dehydrogenase-Untereinheit, die durch zwei Elektronen-transferierende Untereinheiten miteinander verbunden sind. Somit ist die Reduktion von CO_2 bei *A. woodii* direkt mit der Oxidation des Wasserstoffs verknüpft (Schuchmann und Müller, 2014). In den anschließenden zwei Reaktionen wird zunächst Tetrahydrofolat (THF) durch eine Formyl-THF-Synthetase (Fhs) in einer ATP-verbrauchenden Reaktion an Formiat gebunden und das Folgeprodukt (Methylen-THF) anschließend unter Abspaltung von Wasser durch die Methenyl-THF-Cyclohydrolase (Mtc) zu Methyl-THF reduziert. Zwei weitere reduzierende Schritte erfolgen in *A. woodii* unter Verbrauch von NADH durch die Methylen-THF-Dehydrogenase (Mtd) und die Methylen-THF-Reduktase (Mtr). Im Stoffwechselweg von *C. ljungdahlii* konnten die Enzyme, die die Reduktion des CO_2 zu Formiat sowie die Reduktion des Methylen-THF zu Methyl-THF katalysieren, bisher noch nicht experimentell identifiziert werden (Schuchmann und Müller, 2014). Nach der Reduktion zu Methyl-THF wird die Methylgruppe durch eine Methyltransferase (Met) auf ein Corrinoid-Eisen-Schwefel-Protein übertragen. Die Protein-gebundene Methylgruppe wird dann in der finalen Reaktion durch CODh/Acs zusammen mit dem

enzymgebundenen CO und Co-Enzym A (HS-CoA) in das zentrale Stoffwechsel-Intermediat Acetyl-CoA umgewandelt. Zur Generierung von 1 Mol Acetyl-CoA werden in *A. woodii* insgesamt 1 Mol H_2, 2 Mol CO_2, 2 Mol NADH, 1 Mol reduziertes Ferredoxin und 1 Mol ATP benötigt. Bei der Herstellung von Acetat aus Acetyl-CoA durch die Enzyme Phosphotransacetylase (Pta) und Acetat-Kinase (Ack) wird 1 Mol ATP generiert, welches aber durch die Aktivierung von Formiat zu Methylen-THF wieder konsumiert wird (Dürre, 2016). Somit ist durch Substrat-Level-Prosphorylierung bei autotrophem Wachstum keine ATP-Generierung möglich (Bengelsdorf *et al.*, 2018). Durch die Analyse

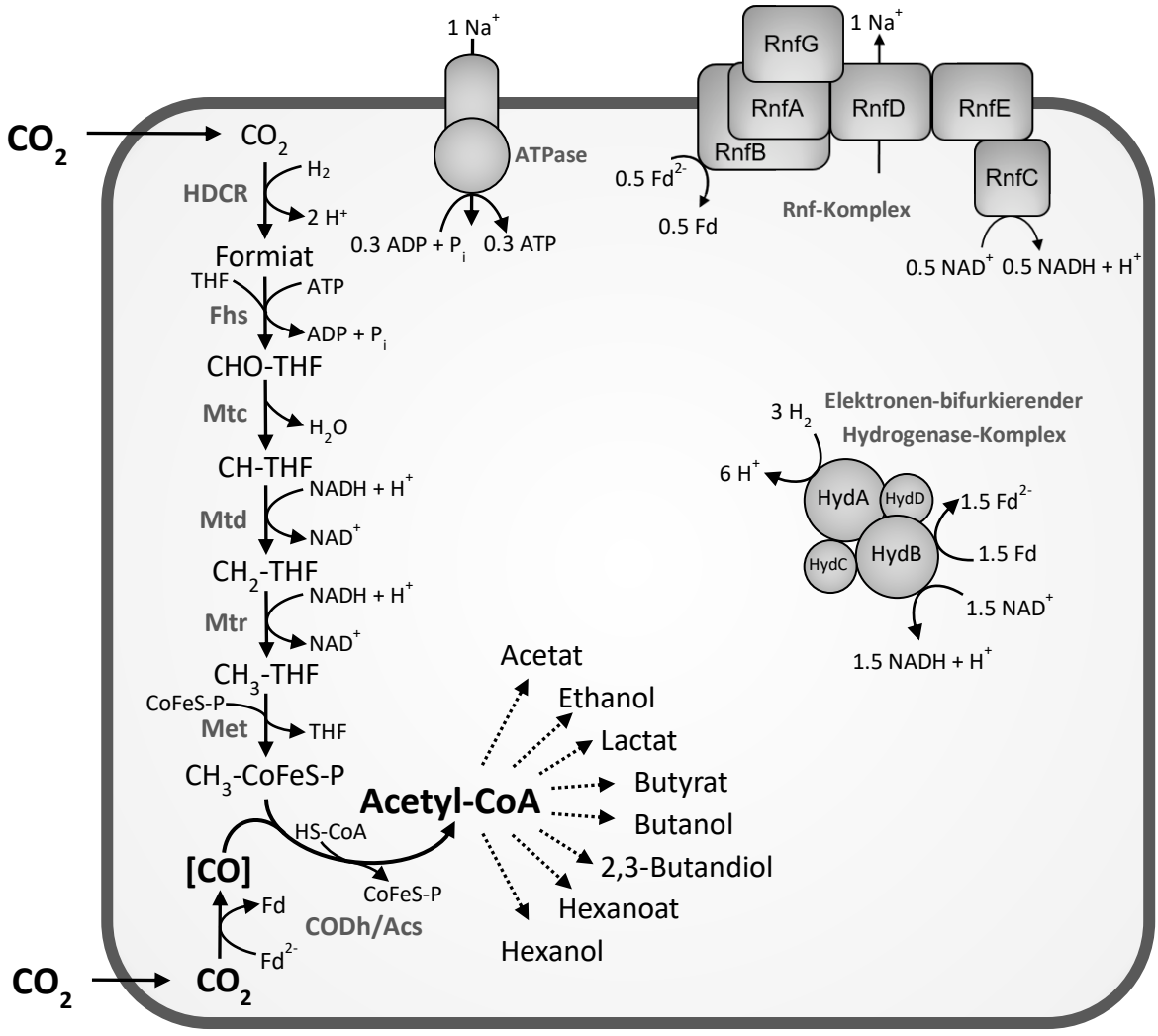


Abbildung 1: Schematisches Modell des Wood-Ljungdahl-Stoffwechselwegs am Beispiel von *A. woodii* und Auswahl natürlich gebildeter Produkte in acetogenen Bakterien. Zusätzlich Darstellung des Elektronen-bifurkierenden Hydrogenase-Komplexes, des Membran-gebundenen RNF-Komplexes und der Membran-gebundenen ATPase. CODh/Acs, CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthetase; Fdh, Formiat-Dehydrogenase; Fhs, Formyl-THF-Synthetase; HDCR, H_2-abhängige CO_2-Reduktase ; Met, Methyltransferase; Mtc, Methenyl-THF-Cyclohydrolase; Mtd, Methylen-THF-Dehydrogenase; Mtr, Methylen-THF-Reduktase.

der Genomsequenz konnte herausgefunden werden, dass alle Enzyme des Wood-Ljungdahl-Stoffwechselwegs und der benötigte Hydrogenase-Komplex in *A. woodii* nicht Membran-gebunden vorliegen (Poehlein *et al.*, 2012). Daneben wurde in *A. woodii* der Membran-integrierte Rnf-Komplex (engl.: *Rhodobacter nitrogen fixation*) identifiziert. Der Enzym-Komplex ist aus mehreren Untereinheiten aufgebaut, die den Elektronentransfer von reduziertem Ferredoxin auf NAD^+ katalysieren, wodurch 2 Mol Na^+ über die Cytoplasma-Membran transportiert werden können (Biegel *et al.*, 2009). Diese Na^+-Ionen können durch die Membran-gebundene ATP-Synthase (ATPase) in *A. woodii* zum Ausgleich des aufgebauten Potentialunterschieds wieder über die Cytoplasma-Membran in die Zelle gelangen. Dabei werden 3,3 Mol Na^+-Ionen benötigt, um 1 Mol ATP generieren zu können (Schuchmann und Müller, 2014). *C. ljungdahlii* besitzt ebenfalls einen Rnf-Komplex. Dieser ist jedoch nicht Na^+-abhängig, sondern verwendet H^+-Ionen zur Generierung des elektrochemischen Potentials (Tremblay *et al.*, 2013). Speziell bei thermophilen Acetogenen, zum Beispiel bei *M. thermoacetica*, konnte statt eines Rnf-Komplexes eine Energie-konservierende Hydrogenase (Ech) identifiziert werden, die einen Protonengradienten durch Oxidation von reduziertem Ferredoxin und einen Transfer der Elektronen zu Protonen aufbaut, bei dem molekularer Wasserstoff generiert werden kann (Schuchmann und Müller, 2014; Dürre, 2016). Um in der Lage zu sein, autotroph zu wachsen, kann *A. woodii* die benötigten Elektronen ausschließlich vom Wasserstoff beziehen. *A. woodii* besitzt hierfür eine Hydrogenase, die als lösliches Tetramer vorliegt (HydABCD; Schuchmann und Müller, 2012). Durch das Enzym kann Ferredoxin mit Wasserstoff reduziert werden. Bei der Elektronen-bifurkierenden Reaktion wird die endotherme Reaktion durch Kopplung mit der exothermen Reduktion von NAD^+ ermöglicht (Herrmann *et al.*, 2008; Schuchmann und Müller, 2012). Wird der Metabolismus zur Energie-Konservierung von *A. woodii* zusammengefasst, so ergeben sich durch die Oxidation von 4 Mol H_2 und die Reduktion von 2 Mol CO_2 0,5 Mol reduziertes Ferredoxin, das für den Rnf-Komplex zur Verfügung steht. Mit dem dadurch aufgebauten Membran-Potential und dem damit verbundenen Export bzw. folglichen Import von 1 Mol Na^+ können insgesamt 0,3 Mol ATP pro Mol Acetat durch die ATP-Synthase generiert werden (Schuchmann und Müller, 2014). Beim Modell-Organismus *C. ljungdahlii* liegt der Wert der ATP-Generierung, der durch Schuchmann und Müller (2014) aus mehreren möglichen Szenarien abgeleitet wurde, zwischen 0,13 Mol und 0,63 Mol ATP pro Mol Acetat. Die Energie-Konservierung durch *C. ljungdahlii* weist neben den genannten Abweichungen eine weitere Besonderheit gegenüber der von *A. woodii* auf. Bei *C. ljungdahlii* konnte eine zusätzliche Elektronen-bifurkierende Transhydrogenase (Nfn-Komplex) identifiziert werden (Nagarajan *et al.*, 2013). Durch

dieses Enzym können 2 Mol $NADP^+$ mit 1 Mol reduziertem Ferredoxin und 1 Mol NADH reduziert werden. Dadurch wird eine Verbindung des Pools an Elektronen von NAD^+ und Ferredoxin mit dem des NADPH ermöglicht, wie es bereits für *C. kluyveri* beschrieben wurde (Wang *et al.*, 2010). Aus der Betrachtung der Reduktion des gasförmigen CO_2 zu Acetat und der damit verbundenen Energie-Konservierung in acetogenen Bakterien kann abgeleitet werden, dass der größte Nachteil bei der anaeroben Gas-Fermentation die damit verbundene Energie-Limitierung der Organismen beim Wachstum und der Produktbildung ist (Dürre, 2016).

Das Hauptprodukt bei der Fermentation acetogener Bakterien ist Acetat. Daneben ist jedoch eine Vielzahl weiterer nativer Fermentationsprodukte beschrieben. Häufige Nebenprodukte, die in signifikanten Mengen bei unterschiedlichen Acetogenen während der Kultivierung identifiziert werden konnten, sind beispielsweise Formiat, Lactat, Butyrat, Hexanoat, 2,3-Butandiol, Ethanol, Butanol und Hexanol (Bengelsdorf *et al.*, 2018). Zur Erweiterung des Produkt-Portfolios acetogener Bakterien sowie zur Optimierung von Stoffwechselwegen für die industrielle Anwendung konnten bisher nur wenige der Bakterienstämme mit molekularbiologischen Methoden genetisch zugänglich gemacht werden. Dies liegt vor allem daran, dass für diese Bakterien bis heute kaum genetische Werkzeuge und Methoden entwickelt wurden, mit denen deren volles biotechnologisches Potential realisiert werden kann (Pyne *et al.*, 2014). Nichtsdestotrotz konnten mit Bakterienstämmen wie beispielsweise *A. woodii*, *C. ljungdahlii* oder *Clostridium coskatii* rekombinante Stämme konstruiert werden, die zur Herstellung von Aceton, 3-Hydroxypropionat, 3-Hydroxybutyrat, Polyhydroxybutyrat oder Isobutanol in der Lage sind (Hoffmeister *et al.*, 2016; Beck, 2019; Flüchter *et al.*, 2019; Weitz, 2020).

Für die beschriebenen nativen sowie die rekombinant hergestellten Produkte konnten die Stoffwechselwege und die damit verbundenen Enzyme mit einer Ausnahme identifiziert werden. Bisher konnte nicht geklärt werden, welche Enzyme für die native C6-Körper-Produktion in Acetogenen verantwortlich sind. Eine Produktion von Hexanoat und/oder Hexanol wurde nur bei den beiden acetogenen Bakterienstämmen *C. carboxidivorans* und *C. scatologenes* beschrieben (Küsel *et al.*, 2000; Phillips *et al.*, 2015a; Fernández-Naveira *et al.*, 2017a). Der Begriff *Chain-Elongation* beschreibt hierbei einen möglichen Weg, um kurzkettige Säuren oder Alkohole in mittelkettige umzuwandeln (Liu *et al.*, 2017). Zwischen 1912 und 1914 wurde der ABE-fermentierende (Aceton, Butanol, Ethanol) Stamm *Clostridium acetobutylicum* isoliert, der aufgrund seiner Fähigkeit, Aceton und Butanol in großen Mengen produzieren zu können, bekannt wurde (Jones und Woods, 1986). In dem C4-Körper-produzierenden Stamm konnten die

Enzyme identifiziert werden, die essentiell für die Bildung von Butyryl-CoA aus Acetacetyl-CoA sind. Dafür erforderlich sind eine 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase (Hbd), eine 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase (auch Crotonase, Crt) und eine Butyryl-CoA-Dehydrogenase (Bcd), welche in einem offenen Leseraster zusammen mit den Elektronen-transferierenden Flavoprotein-Untereinheiten EtfB und EtfA codiert sind. Die identifizierten Gene liegen in einem Cluster vor und bilden ein sogenanntes *bcs*-Operon (Boynton *et al.*, 1996). Es wird vermutet, dass die weitere Elongation von Butyryl-CoA zu Hexanoyl-CoA durch reverse β-Oxidation ermöglicht wird. Die β-Oxidation wird hierbei als reversibler Stoffwechselweg betrachtet, der, abhängig von bestimmten Bedingungen, entweder eine Oxidations- oder eine Reduktionsreaktion durchführen kann. Als Beispiel notwendiger Voraussetzungen für die reverse β-Oxidation in anaeroben Mischkulturen wird das Vorhandensein von Energie-reichen reduzierten Stoffen (zum Beispiel Ethanol oder Lactat) sowie ein genügend hoher H_2-Partialdruck beschrieben (González-Cabaleiro *et al.*, 2013). Dadurch soll die Oxidations-Reaktion verhindert werden. Außerdem konnte durch thermodynamische Berechnungen bestimmt werden, dass beim Einsatz von H_2 als Elektronendonor aufgrund der hoch endothermen Kondensationsreaktion von zwei Acetyl-CoA die hierdurch erzielbaren Acetacetyl-CoA-Konzentrationen sehr gering ausfallen (González-Cabaleiro *et al.*, 2013). Dadurch ist ein hoher H_2-Partialdruck bei der Kettenverlängerungs-Reaktion von Vorteil. Desweiteren wird die reverse β-Oxidation als zyklischer Prozess beschrieben, bei der ein Acetyl-CoA-Molekül zu einem Carboxylat hinzugefügt wird, sodass die Kohlenstoff-Kettenlänge jeweils um zwei C-Atome erweitert wird (González-Cabaleiro *et al.*, 2013).

Im Jahr 2008 wurde das Genom des Stamms *C. kluyveri*, der Hexanoat ausgehend von Acetat und Ethanol produzieren kann, analysiert. Dabei wurden die Enzyme bestimmt, die bei *C. kluyveri* an der Butyrat-Bildung beteiligt sind. Neben Hbd, Crt und Bcd/EtfAB befindet sich die zur *Chain-Elongation* notwendige Gensequenz der Thiolase (Thl) ebenfalls, anders als bei *C. acetobutylicum*, in diesem Gencluster. Außerdem konnte ein weiteres Set der Gene *crt*, *hbd*, *bcd*, *etfA* und *etfB* im Genom von *C. kluyveri* identifiziert werden. Allerdings liegen diese Gene nicht als Cluster vor. Es wird vermutet, dass dieses zweite Set an Genen an der Bildung von Hexanoyl-CoA beteiligt ist (Seedorf *et al.*, 2008). Eine Reaktion zu längerkettigen Säuren (> C6) durch weitere Kettenverlängerung wird mutmaßlich aufgrund der drastisch steigenden Produkttoxizität verhindert (Cavalcante *et al.*, 2017).

Die heterologe Herstellung von C6-Körpern durch Einbringung eines nicht natürlichen biosynthetischen Stoffwechselwegs in *Escherichia coli* konnte erstmals 2008 gezeigt werden. Durch die eingebrachten Gene *leuA*, *leuB*, *leuC*, *leuD*, *kivD* und *adh6* konnte neben der Produktion anderer Alkohole (C5-C8) auch die Akkumulation von Hexanol beobachtet werden. Durch eine Erweiterung des 2-Ketosäure-Stoffwechselwegs, der auf einem veränderten Leucin-Biosynthese-Stoffwechselweg basiert, konnte in *E. coli* ausgehend von 2-Ketobutyrat Hexanol produziert werden (Zhang *et al.*, 2008). Die Produktion von Butanol ausgehend von Acetyl-CoA konnte ebenfalls mit *E. coli* erzielt werden (Shen *et al.*, 2011). Hierfür wurde ein modifizierter clostridieller Butanol-Stoffwechselweg in *E. coli* eingebracht, wodurch eine Butanol-Produktion ermöglicht wurde. Eine signifikante Erhöhung des Butanoltiters konnte erreicht werden, indem anstelle des in vorangehenden Arbeiten eingesetzten Enzyms Bcd-EtfAB aus *C. acetobutylicum*, das NADH und reduziertes Ferredoxin benötigt, eine Trans-Enoyl-CoA-Reduktase (Ter) aus *Treponema denticola* in *E. coli* JCL116 eingesetzt wurde, bei dem zuvor die Fermentations-Reaktionen von Ethanol, Lactat und Succinat deletiert wurden (Δ*adhE*, Δ*ldhA*, Δ*frdBC*). Dadurch ist der Stamm nicht mehr zu NADH-verbrauchendem anaerobem Wachstum fähig, wodurch sich die intrazelluläre NADH-Konzentration erhöht. Zusätzlich zur gesteigerten NADH-Verfügbarkeit wurde zur Favorisierung der Bildung von Acetacetyl-CoA anstelle einer clostidiellen Thiolase die Acetyl-CoA-Acetyltransferase (AtoB) aus *E. coli* verwendet, die eine höhere spezifische Aktivität aufweist. Zur weiteren Verstärkung der Triebkraft wurde ein Gen zur Acetat-Bildung, die Phosphotransacetylase (Pta), deletiert. Darauf aufbauende Arbeiten durch Dekishima *et al.* (2011) ermöglichten schließlich auch die Produktion von Hexanol in *E. coli*, ausgehend von Acetyl-CoA. Die bereits durch die Enzyme AtoB, Hbd, Crt und Ter erreichte Synthese von Butyryl-CoA konnte dahingehend erweitert werden, dass eine Hexanoyl-CoA-Synthese in *E. coli* möglich wurde. Hierfür musste zusätzlich zu Hbd, Crt (aus *C. acetobotylicum*) und Ter (aus *T. denticola*) eine β-Ketothiolase (BktB) aus *Cupriavidus necator* (ehemals *Ralstonia eutropha*) eingebracht werden, die für eine Spalt-Aktivität von 3-Ketohexanoyl-CoA beschrieben wurde. Für die Umwandlung von Hexanoyl-CoA zu Hexanol wurde die Aldehyd-/Alkohol-Dehydrogenase (AdhE2) aus *C. acetobutylicum* eingesetzt. Die Hexanol-Produktion mit *E. coli* konnte anschließend durch Machado *et al.* (2012) weiter verbessert werden. Das bisher verwendete Enzym AdhE2 aus *C. acetobutylicum* wurde bereits durch Dekishima *et al.* (2011) untersucht, wobei sich herausstellte, dass das Enzym mit Butyryl-CoA eine höhere Aktivität als mit Hexanoyl-CoA aufweist. Für die Optimierung der C6-Körper-Produktion wurde es durch eine Acyl-CoA-Hydrolase (*mBACH*) aus der DNA einer Maus ersetzt. Diese

Hydrolase bevorzugt längerkettiges Acyl-CoA (C6-C12) als Substrat, setzt dieses allerdings in lineare Fettsäuren um. Der daraus resultierende Stamm, der nur noch zur Produktion von Hexanoat im Stande war, wurde anschließend zur Suche nach alternativen Enzymen zur Verbesserung der Reaktionen während der *Chain-Elongation* eingesetzt. Dabei wurde Hbd aus *C. acetobutylicum* durch das homologe Enyzm PaaH1 aus *C. necator* ersetzt und dieses durch gerichtete Evolution verbessert. Hierdurch und durch erneuten Austausch der Hydrolase durch AdhE2 resultierte schlussendlich eine zehnfache Erhöhung des Hexanol-Titers in *E. coli*.

Eine Analyse des Genoms von *C. carboxidivorans* ergab, dass der acetogene C6-Körper-produzierende Stamm, genauso wie *C. acetobutylicum*, ein *bcs*-Gencluster zur Umwandlung von Acetyl-CoA zu Butyryl-CoA besitzt. Die Gene sind jedoch anders organisiert. Mit Ausnahme des Aceton-Stoffwechselwegs besitzt *C. carboxidivorans* die gleichen Enzyme für die Produktion von Acetat, Butyrat, Ethanol und Butanol wie andere Lösungsmittel-produzierende Clostridien (Bruant *et al.*, 2010). Bisher konnten die Enzyme zur Herstellung des Hexanoyl-CoA in *C. carboxidivorans* nicht identifiziert werden, es wird allerdings vermutet, dass die *Chain-Elongation* durch spezielle Thiolasen ermöglicht wird. Nachfolgende Reaktionen werden mit hoher Wahrscheinlichkeit durch Enzyme katalysiert, die auch an der Umwandlung von Acetacetyl-CoA zu Butyryl-CoA beteiligt sind (Fernández-Naveira *et al.*, 2017b).

Der Fokus dieser Arbeit lag darauf, die bei der C6-Körper-Produktion in acetogenen Bakterien essentiellen Enzyme zu identifizieren, um somit den zugrunde liegenden Stoffwechselweg entschlüsseln zu können. Hierfür sollte zunächst der C6-Körper-produzierende Stamm *C. carboxidivorans* genetisch zugänglich gemacht werden, damit die Analyse des Stoffwechselwegs durch gezielte „Gen-Knockouts“ ermöglicht wird. Anschließend sollten die dadurch gewonnenen Informationen dafür genutzt werden, die Produktion von C6-Körpern in *C. carboxidivorans* durch den Austausch einzelner Enzyme, Überexpression von Genen oder Entfernung von Nebenprodukten durch „Gen-Knockouts“ zu steigern. Zweites Ziel der Dissertation war die heterologe Produktion von C6-Körpern aus Synthese-Gas durch Konstruktion eines rekombinanten acetogenen Bakterienstamms. Hierbei war es notwendig, mögliche für die *Chain-Elongation* essentielle Gene aus *C. carboxidivorans* über spezielle Schaukelvektoren in die acetogenen Modell-Organismen *C. ljungdahlii* und *A. woodii* einzubringen und daraus resultierende Stämme fermentationstechnisch zu charakterisieren.

2 Material und Methoden

2.1 Bakterienstämme, Plasmide und Primer

2.1.1 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme werden in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme.

Stamm	Geno- oder Phänotyp	Herkunft/Referenz
Acetobacterium woodii WB1 DSM1030	Typstamm	DSMZ*
Clostridium carboxidivorans P7 DSM15243	Typstamm	DSMZ*
Clostridium drakei SL1 DSM12750	Typstamm	DSMZ*
Clostridium ljungdahlii PETC DSM13528	Typstamm	DSMZ*
Clostridium saccharoperbutylacetonicum N1-4(HMT) DSM14923	Typstamm	DSMZ*
Clostridium scatologenes DSM757	Typstamm	DSMZ*
Escherichia coli CA434	*hsdS20 (r_{-B}, m_{-B}), supE44, thi-1, recAB, ara-14, leuB5proA2, lacY1, galK, rpsL20 (Str^R), xyl-5, mtl-1,* inklusive konjugierendem Plasmid R702 (*Tet^R, Sm^R, Su^R, Hg^R, Tra^+, Mob^+*)	Purdy *et al.*, 2002

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme (Fortsetzung).

Stamm	Geno- oder Phänotyp	Herkunft/Referenz
Escherichia coli SCS110	*psL, (Str^r), thr, leu, endA, thi-1, lacY, galK, gakT, ara, tonA, tsx, dam, dcm, supE44, Δ(lac-proAB)* [*F', traD36, proAB, lacIqZΔM15*]	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)
Escherichia coli XL1-Blue MRF'	*Δ(mcrA)183, Δ(mcrCB-hsdSMRmrr)173, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac* [*F', proAB, lacI^{q}ZΔM1, 5Tn10 (Tet^r)*]	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)

*Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland.

2.1.2 Plasmide und Vektoren

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten und konstruierten Plasmide werden in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Aufzählung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.

Plasmid	Größe [Bp]	Eigenschaften	Herkunft/Referenz
pbcd_etfAB	7.905	pMTL83251, $P_{pta\text{-}ack}$-Region aus *C. ljungdahlii*, *bcd*, *etfB*, *etfA* aus *C. carboxidivorans*	Diese Arbeit
pcrt	5.730	pMTL83251, $P_{pta\text{-}ack}$-Region aus *C. ljungdahlii*, *crt* aus *C. carboxidivorans*	Diese Arbeit

Tabelle 2: Aufzählung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide (Fortsetzung).

Plasmid	Größe [Bp]	Eigenschaften	Herkunft/Referenz
phbd	5.796	pMTL83251, $P_{pta\text{-}ack}$-Region aus *C. ljungdahlii*, *hbd* aus *C. carboxidivorans*	Diese Arbeit
pKOaor	6.356	pCB102 (*repH*), *aor-upstream*-Region (*C. carboxidivorans*), Cm^R (*catP*), *aor-downstream*-Region (*C. carboxidivorans*), ColE1, *traJ*, *lacZ*α	Diese Arbeit
pKOaor_Suizid	4.723	*aor-upstream*-Region (*C. carboxidivorans*), Cm^R (*catP*), *aor-downstream* Region (*C. carboxidivorans*), ColE1, *traJ*, *lacZ*α	Diese Arbeit
pMTL82151	5.254	pBP1 (*repA*, *orf2*), Cm^R (*catP*), ColE1, *traJ*, *lacZ*α	Heap *et al.*, 2009
pMTL83151	4.476	pCB102 (*repH*), Cm^R (*catP*), ColE1, *traJ*, *lacZ*α	Heap *et al.*, 2009
pMTL83151_Ppta	7.800	pCB102 (*repH*), Cm^R (*catP*), ColE1, *traJ*, *kivD, adhA*	Weitz, 2020
pMTL83151_Ptet	6.945	pCB102 (*repH*), Cm^R (*catP*), ColE1, *traJ*, *tetR*, *gusA*	Beck, 2019
pMTL83251	4.589	pCB102 (*repH*), Em^R (*ermB*), ColE1, *traJ*, *lacZ*α	Heap *et al.*, 2009
pMTL84151	6.297	pCD6 (*orfB, repA, oriV*), Cm^R (*catP*), ColE1, *traJ*, *lacZ*α	Heap *et al.*, 2009
pMTL85151	3.729	pIM13 (*repL*), Cm^R (*catP*), ColE1, *traJ*, *lacZ*α	Heap *et al.*, 2009

Tabelle 2: Aufzählung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide (Fortsetzung).

Plasmid	Größe [Bp]	Eigenschaften	Herkunft/Referenz
pMTLp19	4.808	Cm^R (*catP*), ColE1, *traJ*, *lacZ*α, Replikationsursprung von Plasmid p19 (Ccar_4289) aus *C. carboxidivorans*	Diese Arbeit
pPta_hcs1	10.907	pMTL83151, $P_{pta\text{-}ack}$-Region aus *C. ljungdahlii*, *crt*, *hbd*, *thl*, *bcd*, *etfB*, *etfA* (Cluster 1) aus *C. carboxidivorans*	Diese Arbeit
pPta_hcs1_C	11.024	pMTL83251, $P_{pta\text{-}ack}$-Region aus *C. ljungdahlii*, *crt*, *hbd*, *thl*, *bcd*, *etfB*, *etfA* (Cluster 1) aus *C. carboxidivorans*	Diese Arbeit
pPta_hcs2	11.473	pMTL83151, $P_{pta\text{-}ack}$-Region aus *C. ljungdahlii*, *crt*, *hbd*, *thl*, *crt**, *bcd*, *etfB*, *etfA* (Cluster 2) aus *C. carboxidivorans*	Diese Arbeit
pTet_hcs1	11.194	pMTL83151, P_{tet} von pDSW1728, *crt*, *hbd*, *thl*, *bcd*, *etfB*, *etfA* (Cluster 1) aus *C. carboxidivorans*	Diese Arbeit
pTet_hcs1_C	11.311	pMTL83251, P_{tet} von pDSW1728, *crt*, *hbd*, *thl*, *bcd*, *etfB*, *etfA* (Cluster 1) aus *C. carboxidivorans*	Diese Arbeit
pTet_hcs2	11.760	pMTL83151, P_{tet} von pDSW1728, *crt*, *hbd*, *thl*, *crt**, *bcd*, *etfB*, *etfA* (Cluster 2) aus *C. carboxidivorans*	Diese Arbeit

Tabelle 2: Aufzählung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide (Fortsetzung).

Plasmid	Größe [Bp]	Eigenschaften	Herkunft/Referenz
pthl	6.016	pMTL83251, $P_{pta\text{-}ack}$-Region aus *C. ljungdahlii*, *thl* aus *C. carboxidivorans*	Diese Arbeit

⋆verkürzte Gensequenz einer möglichen R-spezifischen Crotonase

2.1.3 Primer

In dieser Arbeit wurden Primer zur Sequenzierung von DNA-Abschnitten (genomische und Plasmid-DNA), Synthese von cDNA, Generierung von Klonierungsfragmenten (In-Fusion®-PCR, 2.7.6) und zur Verifikation von transformierten Bakterienstämmen (Standard-PCR, 2.7.5) verwendet. Die Oligonukleotide wurden mit Hilfe der Software „CLC Main Workbench 7" (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) geplant und entweder durch biomers.net GmbH (Ulm, Deutschland) oder durch Eurofins GATC Biotech GmbH (Konstanz, Deutschland) synthetisiert. Die speziell für In-Fusion®-Klonierung eingesetzten Primer wurden mit dem „NEBuilder® Assembly Tool v2.2.6" (nebuilder.neb.com) entworfen. Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer werden mit dazugehöriger Sequenz und Schmelztemperatur (T_S) in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: In dieser Arbeit eingesetzte Primer.

Primer	Sequenz (5'→3')	T_S [°C]	Anwendung
16S_fwd	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	59	Standard-PCR
16S_rev	ACGGCTACCTTGTTACGACTT		
pMTL_fwd	CTGGCCGTCGTTTTACAA	60	Standard-PCR
pMTL_rev	GGCTTTCCTTCCATTCTAT		
pKOaor_Inf1	TATGGATTATAAGCGGCCGG CCGTAGTAATTTGCCCATACC	57	In-Fusion®-PCR
pKOaor_Inf2	TCTGTGACACGTATAGATAGT TCACAGGATAC	57	

Tabelle 3: In dieser Arbeit eingesetzte Primer (Fortsetzung).

Primer	Sequenz (5'→3')	T_S [°C]	Anwendung
pKOaor_Inf3	CTATCTATACGTGTCACAGAA AGGATGATTG	60	In-Fusion®-PCR
pKOaor_Inf4	GACCACTTACAGGGATTTTGG TCATGAG	60	
pKOaor_Inf5	CAAAATCCCTGTAAGTGGTCC TGCTGCTATAATG	61	In-Fusion®-PCR
pKOaor_Inf6	AGATTATCAAAAAGGAGTTT AGATTCCCGTAGATGTTAGG	61	
pKOaor_Seq1	TACGGATACCAATGAAGG	-	Sequenzierung
pKOaor_Seq2	TAGCTACCTCTTCTTCATCT	-	Sequenzierung
pKOaor_Seq3	ACCGTTAAAGTGGATATCAC	-	Sequenzierung
pKOaor_Seq4	TCATGACCAAAATCCCTGTA	-	Sequenzierung
pKOaor_Seq5	TCTCTTATATTTCCAGGCCA	-	Sequenzierung
pKOaor_Suizid_Seq1	TTACCCAACTTAATCGCC	-	Sequenzierung
p19_fwd	CAATCCTGTTTCTATCGCA	55	Standard-PCR
p19_rev	AAAGGAGGGAATTGTGTGA		
pMTLp19_primer_fwd	CAGGCTTCTTATTTTTATGGTT GATATGAAAAATTTAAGGAA TAATTTTG	58	In-Fusion®-PCR
pMTLp19_primer_rev	TCAACTTGCCCACTGGCCGG AAATTTCACCTCCAAAAATTA AC	58	
pMTLp19_Seq1	GCCAGGAAGAGAAATATAGA	-	Sequenzierung

Tabelle 3: In dieser Arbeit eingesetzte Primer (Fortsetzung).

Primer	Sequenz (5'→3')	T_S [°C]	Anwendung
pMTLp19_Seq2	TAGGGGCAGATATTCAAG	-	Sequenzierung
pMTLp19_Seq3	GAATGGAGTGGGATAGATG	-	Sequenzierung
pMTLp19_Seq4	CTGGCCGTCGTTTTACAA	-	Sequenzierung
cDNA_hcs2_1	ATTGCTCCTGATATACCAC	58	cDNA-Synthese
cDNA_hcs2_2	GATCTATTCCCTTACTACCA	57	cDNA-Synthese
cDNA_hcs1_1	CTTCCTATTCCTCTTCCTC	58	cDNA-Synthese
cDNA_hcs1_2	ACAGCTCCTCCATTTACA	60	cDNA-Synthese
cDNA_hcs2_1n	TCTTGATCCTGCTACTGTT	60	cDNA-Synthese
cDNA_hcs2_2n	CTGCTCCATCATTTATACC	57	cDNA-Synthese
cDNA_hcs2_F1_fwd	GAAAGATAAGACACCAGAAG	59	Standard-PCR
cDNA_hcs2_F1_rev	CCAAAGTCCATCTGTAATC	59	
cDNA_hcs2_F2_fwd	TAAGGTTTGTGGTTCAGG	62	Standard-PCR
cDNA_hcs2_F2_rev	CCCAGCTTATCTTCTACTT	62	
cDNA_hcs2_F3_fwd	TATACATGGGTCAACAGG	60	Standard-PCR
cDNA_hcs2_F3_rev	CTTCCTATTCCTCTTCCAC	60	
cDNA_hcs1_F1_fwd	ATTAGGTGGCGGTTGTGA	62	Standard-PCR
cDNA_hcs1_R1_rev	GCATCCTGTTCTTCTCTAGT	62	
cDNA_hcs1_F2_fwd	AGTATTGATGGGCTGTGT	62	Standard-PCR
cDNA_hcs1_R2_rev	CTTTCTCATTGCTGCCTT	62	

Tabelle 3: In dieser Arbeit eingesetzte Primer (Fortsetzung).

Primer	Sequenz (5'→3')	T_S [°C]	Anwendung
cDNA_hcs1_F3_fwd	AATATGGTGGAGCTGGTG	62	Standard-PCR
cDNA_hcs1_R3_rev	ATTTGTGGTCTGTTTGCTG	62	
cDNA_hcs2_F1_3	TCCAATAAGCCGTGAAAGT	61	Standard-PCR
Ppta_hcs2_fwd	TAATTTTGTGTTAAATTTAAA GGGAGGATGACGTCATGGGG TATGAAAACGTTG	57	In-Fusion®-PCR
Ppta_hcs2_rev	CAAATGCAGGCTTCTTATTTT TATGCTAGCTTAATTGTTATTT ATTATTTTAATTTGATC	57	
Ppta_hcs1_fwd	TAATTTTGTGTTAAATTTAAA GGGAGGATGACGTCTTGGAA TATAAAAATATTAAAGTGG	58	In-Fusion®-PCR
Ppta_hcs1_rev	CAAATGCAGGCTTCTTATTTT TATGCTAGCTTAATTATTTAA AGCTTTTATTTCAG	58	
pTet_hcs2_fwd	CTGAGCTCCTGCAGTAAAGG AGAACTCGAGATGGGGTATG AAAACGTTG	57	In-Fusion®-PCR
pTet_hcs2_rev	CAAATGCAGGCTTCTTATTTT TATGCTAGCTTAATTGTTATTT ATTATTTTAATTTGATC	57	
pTet_hcs1_fwd	CTGAGCTCCTGCAGTAAAGG AGAACTCGAGTTGGAATATA AAAATATTAAAGTGG	58	In-Fusion®-PCR

Tabelle 3: In dieser Arbeit eingesetzte Primer (Fortsetzung).

Primer	Sequenz (5'→3')	T_S [°C]	Anwendung
pTet_hcs1_rev	CAAATGCAGGCTTCTTATTTT TATGCTAGCTTAATTATTTAA AGCTTTTATTTCAG	58	
pPta_Seq1	CCATGTCAAGAACTCTGTTT	-	Sequenzierung
pTet_Seq1	TGCAGTAAAGGAGAACTC	-	Sequenzierung
hcs1_Seq2	AGTTTATTGGAGGGAAAGG	-	Sequenzierung
hcs1_Seq3	GAAGAAAGACTGGAAAAGG	-	Sequenzierung
hcs1_Seq4	TCATGAGTGCAGATAAAGC	-	Sequenzierung
hcs1_Seq5	TGGTACAGAAGAGCAGAAA	-	Sequenzierung
hcs1_Seq6	GATAGATCCAAAGACAGGA	-	Sequenzierung
hcs1_Seq7	TACTTGGAAGTGAAGCTGA	-	Sequenzierung
hcs1_Seq8	AACAAAGATGAAGGTGCTG	-	Sequenzierung
hcs2_Seq2	TAAAAGGTATACAGGGAGG	-	Sequenzierung
hcs2_Seq3	GCTGGATATTTGGGAAGAA	-	Sequenzierung
hcs2_Seq4	CAGGTAATGCTTCAGGTAT	-	Sequenzierung
hcs2_Seq5	GGAGATACAATAAAGGCAG	-	Sequenzierung
hcs2_Seq6	GGAAAAGGATTTGGAATAGC	-	Sequenzierung
hcs2_Seq7	GTGTAGAAGAAGATTCGTTG	-	Sequenzierung
hcs2_Seq8	CAGTAAGACCAGGAGTATT	-	Sequenzierung
pPta_hcs1_Amp_fwd1	CCATGTCAAGAACTCTGTTT	55	Standard-PCR
pPta_hcs1_Amp_rev1	CCAGCTCCACCATATTCTTT	55	

Tabelle 3: In dieser Arbeit eingesetzte Primer (Fortsetzung).

Primer	Sequenz (5'→3')	T_S [°C]	Anwendung
pPta_hcs1_Amp_fwd2	TGTAAATGGAGGAGCTGT	58	Standard-PCR
pPta_hcs1_Amp_rev2	GTTTCTCTTGTATGTCGGT	58	
pPta_hcs2_Amp_fwd1	ATCTCTTTGGTCGACGTT	59	Standard-PCR
pPta_hcs2_Amp_frev1	ATGCGCTATTCTTCCCTT	59	
pPta_hcs2_Amp_fwd2	CTGTGGACCAATAACCATTT	59	Standard-PCR
pPta_hcs2_Amp_rev2	CGGCTTGATGTGTTGGTA	59	
pTet_hcs1_Amp_fwd1	TCTTCCAATACGCAACCT	59	Standard-PCR
pTet_hcs1_Amp_rev1	TCGTCTATTTCTGCTGCT	59	
pTet_hcs1_Amp_fwd2	CATGAGTGCAGATAAAGC	54	Standard-PCR
pTet_hcs1_Amp_rev2	GTTTCTCTTGTATGTCGGT	54	
pTet_hcs2_Amp_fwd1	CCAGCTTTCCCCTTCTAA	54	Standard-PCR
pTet_hcs2_Amp_rev1	CTTCTGCCTTTATTGTATCTCC	54	
pTet_hcs2_Amp_fwd2	GGAAGAATAGCGCATGGA	55	Standard-PCR
pTet_hcs2_Amp_rev2	CGGCTTGATGTGTTGGTA	55	
pthl_fwd	ATTTAAAGGGAGGATGACGT CATGAGAGATGTAGTTATAGT TAG	56	In-Fusion®-PCR
pthl_rev	GCAGGCTTCTTATTTTTATGCT AGCTTAACATCTTTCAACTAT TACAGATG	56	

Tabelle 3: In dieser Arbeit eingesetzte Primer (Fortsetzung).

Primer	Sequenz (5'→3')	T_S [°C]	Anwendung
pcrt_fwd	ATTTAAAGGGAGGATGACGT CTTGGAATATAAAAATATTA AAGTGGAAAAG	58	In-Fusion®-PCR
pcrt_rev	GCAGGCTTCTTATTTTTATGCT AGCCTATTTTAATTTAAAATT TGGACTTCTTTTTTC	58	
phbd_fwd	ATTTAAAGGGAGGATGACGT CATGAAGATATTTGTATTAGG AGC	57	In-Fusion®-PCR
phbd_rev	GCAGGCTTCTTATTTTTATGCT AGCTTATTTTGTATAATCATA GAATCCTTTTC	57	
pbcd_fwd	ATTTAAAGGGAGGATGACGT CATGGATCTTACATTGACAAA G	56	In-Fusion®-PCR
pbcd_rev	GCAGGCTTCTTATTTTTATGCT AGCTTAATTATTTAAAGCTTT TATTTCAGC	56	
pthl_pcrt_pbcd_Amp_ fwd	GGCCAGGGCTACAAAATCA	56	Standard-PCR
pthl_pcrt_pbcd_Amp_ rev	CCATCCATATCGGTTCATCT	56	

2.2 Gase

Die in dieser Arbeit verwendeten Gase wurden von MTI IndustrieGase AG (Neu-Ulm, Deutschland) bezogen. Die Zusammensetzung, Reinheit und Anwendung werden in Tabelle 4 gezeigt.

Tabelle 4: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Gase.

Gas	Gaszusammensetzung	Reinheit	Anwendung
Formiergas	95,0 % N_2	2.0	Anaerobenkammer
	5,0 % H_2	2.0	
Protadur® C20	80,0 % N_2	2.0	Medienherstellung
	20,0 % CO_2	2.0	
Stickstoff	100,0 % N_2	5.0	Medienherstellung
H_2 + CO_2	66,7 % H_2	5.0	Gasfermentation
	33,3 % CO_2	3.0	
Synthesegas	50,0 % CO	2.0	Gasfermentation
	45,0 % H_2	5.0	
	5,0 % CO_2	3.0	
Synthetische Luft	20,5 % O_2	3.0	Gaschromatographie
	79,5 % N_2	3.0	
Wasserstoff	100,0 % H_2	5.0	Gaschromatographie

2.3 Medienzusammensetzung

2.3.1 Medium für *Escherichia coli*

Zur Kultivierung von *Escherichia coli* wurde modifiziertes LB-Medium (engl.: *lysogeny broth* oder Luria Bertani) verwendet. Für die Herstellung von festem LB-Medium wurde zusätzlich 1,5 % (w/v) Agar eingewogen.

LB-Medium, modifiziert (Bertani, 1951)

Trypton	10 g	1 % (w/v)
NaCl	10 g	171,1 mM
Hefeextrakt	5 g	0,5 % (w/v)
$H_2O_{demin.}$	*ad* 1000 mL	

Modifiziertes SOB-Medium (engl.: *super optimal broth*) wurde zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen verwendet.

SOB-Medium, modifiziert (Sun *et al.*, 2009)

Trypton	20,0 g	2,0 % (w/v)
Hefeextrakt	5,0 g	0,5 % (w/v)
NaCl	0,5 g	8,6 mM
KCl	190,0 mg	2,5 mM
$MgCl_2$*	5,0 mL	10,0 mM
$H_2O_{demin.}$	*ad* 1000 mL	

*Als sterile Lösung separat autoklaviert und vor Benutzung hinzugegeben.

2.3.2 Medien für *Clostridium carboxidivorans* und *Clostridium ljungdahlii*

Die Stämme *Clostridium carboxidivorans* und *Clostridium ljungdahlii* (CLJU) wurden in modifiziertem Tanner-Medium flüssig kultiviert.

Tanner-Medium, modifiziert (Tanner *et al.*, 1993)

MES-Puffer	20 g	102,6 mM
Hefeextrakt*	0,5/2 g	0,05/0,2 % (w/v)
L-Cystein-HCl x H_2O	1 g	6,4 mM
Mineral-Lösung	25 mL	2,5 % (v/v)
Vitamin-Lösung	10 mL	1,0 % (v/v)
Spurenelement-Lösung	10 mL	1,0 % (v/v)
Resazurin	1 mg	4,4 μM
$H_2O_{demin.}$	*ad* 1000 mL	

*Bei autotropher Kultivierung Verringerung der Hefeextrakt-Konzentration auf 0,5 g/L.

Vor vollständiger Zugabe des demineralisierten Wassers wurde der pH-Wert des Mediums mit einer 10 M NaOH-Lösung auf 6,2 eingestellt. Nach Aliquotieren und Verschließen der Kulturgefäße wurde die Gasphase durch mehrmaliges Begasen und Vakuum ziehen durch ein $N_2 + CO_2$-Gasgemisch (Protadur® C20, 2.2) ersetzt. Anschließend wurde das Medium autoklaviert. Vor Benutzung des Mediums wurde bei heterotrophem Wachstum Fructose in Form einer sterilfiltrierten anaeroben Lösung (1,1 M) hinzugegeben. Für autotrophes Wachstum wurde die Gasphase nach dem Autoklavieren durch das entsprechende Gas ersetzt.

Mineral-Lösung

NH_4Cl	100 g	1,9 M
NaCl	80 g	1,4 M
$MgSO_4$ x 7 H_2O	20 g	81,1 mM
KCl	10 g	134,1 mM
KH_2PO_4	10 g	73,5 mM
$CaCl_2$ x 2 H_2O	4 g	27,2 mM
$H_2O_{demin.}$	*ad* 1000 mL	

Vitamin-Lösung

2-Mercaptoethansulfonat-Natrium	10 mg	60,9 μM
Pyridoxin-HCl	10 mg	59,1 μM
Thiamin-HCl x 2 H_2O	5 mg	14,8 μM
D-Ca-Pantothenat	5 mg	10,5 μM
Liponsäure	5 mg	24,2 μM
p-Aminobenzoesäure	5 mg	36,5 μM
Nicotinsäure	5 mg	40,6 μM
Vitamin B_{12}	5 mg	3,2 μM
Riboflavin	5 mg	13,3 μM
Biotin	2 mg	8,2 μM
Folsäure	2 mg	4,5 μM
$H_2O_{demin.}$	*ad* 1000 mL	

Spurenelement-Lösung

Nitrilotriessigsäure	2,0 g	10,5 mM
$MnSO_4$ x H_2O	1,0 g	5,9 mM
$Fe(SO_4)_2(NH_4)_2$ x 6 H_2O	0,8 g	2,0 mM
$CoCl_2$ x 6 H_2O	0,2 g	840,9 μM
$ZnSO_4$ x 7 H_2O	0,2 g	695,6 μM
$NiCl_2$ x 6 H_2O	0,02 g	84,1 μM
Na_2WO_4 x 2 H_2O	0,02 g	68,1 μM
Na_2SeO_4 x 5 H_2O	0,02 g	172,9 μM
$CuCl_2$ x 2 H_2O	0,02 g	117,3 μM
Na_2MoO_4 x 2 H_2O	0,02 g	97,1 μM
$H_2O_{demin.}$	*ad* 1000 mL	

Zur Herstellung der Spurenelement-Lösung wurde zuerst die Nitrilotriessigsäure, durch Einstellen des pH-Wertes mit einer KOH-Lösung (5 M) auf 6,0, in 250 mL $H_2O_{demin.}$ gelöst. Erst danach wurden die weiteren Komponenten hinzugefügt. Mineral-Lösung, Vitamin-Lösung und Spurenelement-Lösung wurden in 50-mL-Aliquots bei -20 °C gelagert.

Bei der Durchführung von Elektroporations- und Konjugationsexperimenten wurde für beide Stämme modifiziertes YTF-Medium (engl.: *yeast tryptone fructose*) als Fest-Medium verwendet.

YTF-Medium, modifiziert (Leang *et al.*, 2013)

Trypton	16 g	1,6 % (w/v)
Hefeextrakt	10 g	1,0 % (w/v)
Agar	10 g	1,0 % (w/v)
Fructose	5 g	27,8 mM
NaCl	4 g	68,4 mM
L-Cystein-HCl x H_2O	1 g	5,7 mM
Resazurin	1 mg	4,4 μM
$H_2O_{demin.}$	*ad* 1000 mL	

2.3.3 Medium für *Clostridium scatologenes* und *Clostridium drakei*

Zur Flüssigkultivierung der beiden Stämme *C. scatologenes* und *C. drakei* wurde das DSMZ 104b. PY + X Medium verwendet.

PY + X Medium (DSMZ-Medium 104b.)

Hefeextrakt	10,0 g	1,00 % (w/v)
Trypticase-Pepton	5,0 g	0,50 % (w/v)
Pepton aus Fleisch	5,0 g	0,50 % (w/v)
Mineral-Lösung (DSMZ 104)	40,0 mL	4,00 % (v/v)
L-Cystein-HCl x H_2O	0,5 g	2,85 mM
Resazurin	1,0 mg	4,40 μM
$H_2O_{demin.}$	*ad* 1000 mL	

Der pH-Wert des Mediums wurde vor vollständiger Zugabe des demineralisierten Wassers mit einer 10 M NaOH-Lösung auf 7,0 eingestellt. Nach Aliquotieren und Verschließen der Kulturgefäße wurde die Gasphase durch mehrmaliges Begasen und Vakuum ziehen durch ein $N_2 + CO_2$-Gasgemisch (Protadur® C20, 2.2) ersetzt. Anschließend wurde das Medium autoklaviert. Vor Benutzung des Mediums wurde Glucose in Form einer sterilfiltrierten anaeroben Lösung (1,1 M) hinzugegeben.

Mineral-Lösung (DSMZ-Medium 104)

$NaHCO_3$	10,00 g	0,10 M
NaCl	2,00 g	34,20 mM
K_2HPO_4	1,00 g	5,77 mM
KH_2PO_4	1,00 g	7,27 mM
$MgSO_4$ x 7 H_2O	0,50 g	2,03 mM
$CaCl_2$ x 2 H_2O	0,25 g	1,70 mM
$H_2O_{demin.}$	*ad* 1000 mL	

2.3.4 Medium für *Acetobacterium woodii*

Acetobacterium woodii (AWO) wurde in modifiziertem ATCC-Medium 1612 kultiviert. Für Wachstum auf festem Medium wurde modifiziertes YTF-Medium (2.3.2) verwendet.

ATCC-Medium 1612, modifiziert (Hoffmeister *et al.*, 2016)

$NaHCO_3$	10,00 g	0,10 M
Hefeextrakt	3,00 g	0,30 % (w/v)
L-Cystein-HCl x H_2O	0,50 g	3,16 mM
Na_2S x 9 H_2O	0,30 g	3,80 mM
NH_4Cl	0,20 g	3,70 mM
K_2HPO_4	8,44 g	48,76 mM
KH_2PO_4	1,76 g	12,80 mM
Vitamin-Lösung	2,00 mL	0,20 % (v/v)
Spurenelement-Lösung SL-9	2,00 mL	0,20 % (v/v)
Resazurin	1,00 mg	4,40 µM
$H_2O_{demin.}$	*ad* 1000 mL	

Nach Aliquotieren und Verschließen der Kulturgefäße wurde die Gasphase durch mehrmaliges Begasen und Vakuum ziehen durch ein $N_2 + CO_2$-Gasgemisch (Protadur® C20, 2.2) ersetzt und anschließend autoklaviert. Vor Benutzung des Mediums wurde bei heterotrophem Wachstum die C-Quelle entweder in Form einer sterilfiltrierten anaeroben Lösung (1,1 M Fructose, 1,5 M Lactat, 24,75 M Methanol) hinzugegeben oder für autotrophes Wachstum die Gasphase nach dem Autoklavieren durch das entsprechende Gas ersetzt.

Spurenelement-Lösung SL-9 (Tschech und Pfennig, 1984)

Nitrilotriessigsäure	12,8 g	67,0 mM
NaCl	5,0 g	85,6 mM
$FeCl_2 \times 4\ H_2O$	2,0 g	10,1 mM
NaOH	0,5 g	12,5 mM
$CoCl_2 \times 6\ H_2O$	0,2 g	0,8 mM
$MnCL_2 \times 4\ H_2O$	0,1 g	0,5 mM
$ZnCl_2$	70,0 mg	0,5 mM
$Na_2MoO_4 \times 2\ H_2O$	36,0 mg	0,2 mM
$NiCl_2 \times 6\ H_2O$	24,0 mg	0,1 mM
H_3BO_3	6,0 mg	97,0 μM
$Na_2WO_4 \times 2\ H_2O$	4,0 mg	12,0 μM
$Na_2SeO_3 \times 5\ H_2O$	3,0 mg	11,5 μM
$CuCl_2 \times 2\ H_2O$	2,0 mg	11,7 μM
$H_2O_{demin.}$	*ad* 1000 mL	

Für die Spurenelement-Lösung SL-9 wurde zuerst die Nitrilotriessigsäure, durch Einstellen des pH-Wertes mit einer KOH-Lösung (2 M) auf 6,5, in 250 mL $H_2O_{demin.}$ gelöst. Danach wurden die anderen Komponenten hinzugefügt und abschließend der pH auf 7,0 erhöht.

Vitaminlösung, modifiziert (Wolin *et al.*, 1963)

Nicotinsäure	50 mg	406 μM
p-Aminobenzoesäure	50 mg	365 μM
Pyridoxin-HCl	50 mg	296 μM
Thiamin-HCl x H_2O	50 mg	148 μM
Riboflavin	50 mg	133 μM
Liponsäure	25 mg	121 μM
D-Ca-Pantothenat	50 mg	105 μM
Biotin	25 mg	102 μM
Folsäure	25 mg	57 μM
Vitamin B_{12}	25 mg	16 μM
$H_2O_{demin.}$	*ad* 1000 mL	

Die modifizierte Vitamin-Lösung und Spurenelement-Lösung SL-9 wurden in 50 mL Aliquots bei -20 °C gelagert.

2.3.5 Medien für *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*

Der Bakterienstamm *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* (CSAC) wurde zur Durchführung von Transformationsexperimenten im Komplexmedium CGM (engl.: *clostridial growth medium*) kultiviert. Für Plattenwachstum wurde zusätzlich 1,5 % (w/v) Agar bei der Herstellung des Mediums eingewogen.

CGM, modifiziert (Wiesenborn *et al.*, 1988)

Glucose x H_2O	50,00 g	277,5 mM
Hefeextrakt	5,00 g	0,5 % (w/v)
Asparagin x H_2O	2,25 g	15,0 mM
$(NH_4)_2SO_4$	2,00 g	15,1 mM
NaCl	1,00 g	17,1 mM
KH_2PO_4	750,00 mg	5,5 mM
K_2HPO_4	750,00 mg	4,3 mM
$MgSO_4$ x 7 H_2O	710,00 mg	2,9 mM
$MnSO_4$ x H_2O	10,00 mg	59,2 μM
$FeSO_4$ x 7 H_2O	10,00 mg	36,0 μM
Resazurin	1,00 mg	4,4 μM
$H_2O_{demin.\ anaerob}$	*ad* 1000	mL

Alle Komponenten wurden unter anaeroben Bedingungen mit anaerobem und demineralisiertem Wasser gelöst und das Medium anschließend autoklaviert.

Für heterotrophe Wachstumsversuche mit *C. saccharoperbutylacetonicum* wurde ein Minimalmedium, OMS (optimiertes, synthetisches Medium), eingesetzt.

OMS (Standfest, 2013)

Glucose x H_2O	40,00 g	222,00 mM
MES-Puffer	20,00 g	100,00 mM
$(NH_4)_2SO_4$	2,00 g	15,00 mM
KH_2PO_4	0,55 g	4,04 mM
K_2HPO_4	0,42 g	2,41 mM
$FeSO_4$ x 7 H_2O	45,00 mg	162,00 µM
$MgSO_4$ x 7 H_2O	200,00 mg	800,00 µM
NaCl	10,00 mg	170,00 µM
$CaCl_2$ x 2 H_2O	10,00 mg	68,00 µM
Na_2MoO_4 x 2 H_2O	10,00 mg	41,00 µM
$MnSO_4$ x H_2O	10,00 mg	59,00 µM
$Na_2S_2O_4$	500,00 mg	4,40 mM
Thiamin-HCl	2,00 mg	6,00 µM
p-Aminobenzoesäure	2,00 mg	16,00 µM
Biotin	0,10 mg	0,40 µM
Resazurin	1,00 mg	4,40 µM
$H_2O_{demin.}$	*ad* 1000 mL	

Nach dem Lösen der einzelnen Komponenten in demineralisiertem Wasser wurde der pH-Wert des Mediums mit 10 M NaOH auf 7,3 eingestellt. Danach wurde das Medium 15 min gekocht und anschließend 15 min mit N_2 begast. Unter anaeroben Bedingungen wurde das Medium mit anaerobem und demineralisiertem Wasser auf das Zielvolumen aufgefüllt, aliquotiert, verschlossen und abschließend autoklaviert.

2.3.6 Lyophilisierungsmedium

Für die Dauerkonservierung wurden zu lyophilisierende Bakterienkulturen zunächst in einem Lyophilisierungsmedium suspendiert.

Lyophilisierungsmedium, modifiziert (Flüchter, 2017)

Fleischextrakt	2 g	0,20 % (w/v)
Saccharose	120 g	0,35 M
$H_2O_{demin.\ anaerob}$	*ad* 1000 mL	

Die Komponenten wurden nach Einwaage mit anaerobem demineralisierten Wasser gelöst, aliquotiert und autoklaviert. Direkt vor Benutzung wurden zu 5 mL Medium 6 mg anaerobes Eisen(II)-Sulfat in Form einer Stammlösung (20 mg/mL) hinzugegeben.

2.3.7 Medienzusätze

Zur Selektion rekombinanter Stämme wurden die in Tabelle 5 genannten Antibiotika eingesetzt. Zur Herstellung der Stammlösungen wurden die Antibiotika in entsprechendem Lösungsmittel (LM) gelöst, sterilfiltriert und anschließend aliquotiert. Damit sich Clarithromycin in Wasser löst, musste zunächst der pH-Wert mit einer 2 M HCl-Lösung auf 2,5 gebracht werden. Anschließend wurde der pH-Wert mit einer 2 M NaOH-Lösung wieder auf einen Wert zwischen 6,5 und 7 erhöht. Da Thiamphenicol in hohen Konzentrationen in Anwesenheit von Wasser ausfällt, wurde die Stammlösung nur mit Dimethylformamid (DMF) angesetzt und sterilfiltriertes Wasser kurz vor der Verwendung hinzugegeben. Die Antibiotika-Lösungen wurden bei -20 °C gelagert. Zugegeben wurden die Antibiotika unter sterilen Bedingungen in bereits autoklaviertes Medium. Bei festem Medium wurde das Antibiotikum erst hinzugefügt, nachdem die Temperatur des Mediums unter 50 °C lag. Für die Verwendung von Thiamphenicol bei *Clostridium ljungdahlii* wurde das Antibiotikum in Methanol gelöst, da DMF bei der Auftrennung mittels Gaschromatographie dieselbe Retentionszeit wie Hexanol besitzt.

Die Genexpression bei transformierten Plasmiden mit induzierbarem Promoter (P_{tet}) wurde durch das Tetracyclin-Analogon Anhydrotetracyclin (Atet) induziert. Anhydrotetracyclin besitzt keine antibiotische Aktivität unter den verwendeten

Bedingungen. Zur Detektion der Ethanol-Produktion durch *C. ljungdahlii* wurde das eingesetzte Anhydrotetracyclin nicht in Ethanol, sondern in Methanol gelöst.

Photo-sensitive Lösungen wie Tetracyclin, Thiamphenicol und Anhydrotetracyclin wurden bei der Lagerung und Verwendung in entsprechenden Gefäßen durch Ummantelung mit Aluminiumfolie vor Licht geschützt.

Tabelle 5: Medienzusätze und verwendete Konzentration.

Antibiotikum/ Derivat	Stammlösung [mg/mL] & LM	Arbeitskonzentration [µg/mL]	Anwendung
Chloramphenicol	30, in 96 % (v/v) Ethanol	15	*E. coli* XL1-Blue MRF', *E. coli* CA434, *E. coli* SCS110
Clarithromycin	5, in H_2O	5	*E. coli* XL1-Blue MRF', *C. saccharo-perbutylacetonicum*
Colistin	10, in H_2O	20	*E. coli* CA434
Tetracyclin*	10, in 50 % (v/v) Ethanol mit H_2O	10	*E. coli* CA434
Thiamphenicol*	20, in 50 % (v/v) DMF mit H_2O; 10, in Methanol	15	*A. woodii*, *C. ljungdahlii*
Anhydrotetracyclin*	1, in 96 % (v/v) Ethanol; 1, in Methanol	0,3	*A. woodii*, *C. ljungdahlii*, *C. saccharo-perbutylacetonicum*

*Photo-sensitive Lösung

2.4 Bakterienkultivierung

2.4.1 Aerobe Kultivierung

Die aerobe Kultivierung von *E. coli* erfolgte bei 37 °C. Lediglich zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* XL1-Blue MRF'-Zellen (2.8.1) wurde eine Temperatur von 18 °C verwendet. *E. coli* wurde in 5 mL LB-Medium (2.3.1) im Reagenzglas mit Aluminiumdeckel kultiviert. Nur zur Herstellung der chemisch kompetenten Zellen wurde der Stamm *E. coli* XL1-Blue MRF' in 250 mL SOB-Medium (2.3.1) in 1-L-Erlenmeyer-Kolben auf Orbital-Schüttlern (Thermo Scientific, Waltham, Ma, USA) bei 60 Upm kultiviert. Die verwendeten Stämme wurden mit 15 µL der entsprechenden Glycerin-Dauerkultur (2.5.1) angeimpft und bei der Inkubation ausreichend geschüttelt, um eine Sauerstofflimitation zu vermeiden. Platten mit festem LB-Medium wurden durch Parafilm® versiegelt und umgedreht bei 37 °C inkubiert.

2.4.2 Anaerobe Kultivierung

Zur anaeroben Kultivierung der einzelnen Bakterienstämme wurden diese entweder aus einem Lyophilisat (2.5.3), einer SMP/DMSO-Dauerkultur (2.5.2) oder einer Glycerin-Dauerkultur (2.5.1) angeimpft. Die Bakterienkulturen wurden in 5 mL Medium in Hungate-Röhrchen (Bellco Glass Inc., Vineland, USA), die mit Gummistopfen und Schraub-Deckeln (Ochs GmbH, Bovenden, Deutschland) verschlossen wurden, kultiviert. Die Stämme *A. woodii, C. drakei* und *C. saccharoperbutylacetonicum* wurden bei 30 °C inkubiert, die Stämme *C. carboxidivorans*, *C. scatologenes* und *C. ljungdahlii* bei 37 °C. Zum Überführen einer wachsenden Bakterienkultur in frisches Medium wurden 10 % (v/v) des finalen Medienvolumens überimpft, sofern nicht anders beschrieben. Wachstumsversuche wurden in 50 mL Medium in 125-mL-Müller-Krempel-Flaschen (Müller & Krempel AG, Bülach, Schweiz) durchgeführt. Diese wurden mit Stopfen aus Naturkautschuk (Maag Technic GmbH, Göppingen, Deutschland) und Schraub-Deckeln aus rostfreiem Stahl verschlossen. Die beimpften Kulturflaschen wurden während heterotropher und autotropher Wachstumsexperimente auf Orbital-Schüttlern bei 120 Upm (Thermo Scientific, Waltham, Ma, USA) inkubiert, sofern nicht anders beschrieben. Für die anaerobe Kultivierung auf Festmedium wurden die mit Bakterienstämmen beimpften Agarplatten, außer bei der Durchführung der Konjugation (2.8.6), umgedreht und durch Parafilm® versiegelt. Die Inkubation erfolgte in einem Inkubator in einer Anaerobenkammer bei 30 °C bzw. 37 °C.

2.5 Konservierung von Bakterienstämmen

2.5.1 Glycerin-Dauerkulturen

Zur Konservierung von *E. coli*-Stämmen wurden 0,5 mL einer 24 h alten Kultur mit 0,5 mL sterilem Glycerin in 2-mL-Schraubdeckel-Gefäßen gemischt und bei -80 °C gelagert. Für die Inkubation der Kultur wurden 10 µL der Glycerin-Dauerkultur in frisches Medium gegeben.

C. saccharoperbutylacetonicum-Stämme wurden in der exponentiellen Wachstumsphase in Hungate-Röhrchen zentrifugiert (5000 g, 10 min, 4 °C) und der Überstand steril abgenommen. Anschließend wurde das Sediment in 0,5 mL CGM (2.3.5) zusammen mit 0,5 mL sterilem Glycerin suspendiert und der Stamm bei -80 °C gelagert. Frisches Medium wurde mit 100 µL einer solchen Glycerin-Dauerkultur beimpft.

2.5.2 SMP/DMSO-Dauerkulturen

Die acetogenen Stämme wurden zur mittelfristigen Lagerung mit DMSO konserviert. Hierfür wurden Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase in Hungate-Röhrchen zentrifugiert (5000 g, 10 min, 4 °C) und der Überstand steril abgenommen. Anschließend wurde das Sediment in 400 µL SMP-Puffer und 200 µL Anti-Freezing-Puffer suspendiert und der Stamm bei -80 °C gelagert. Frisches Medium wurde mit 25 µL SMP/DMSO-Dauerkultur beimpft.

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

Saccharose	92,40 g	270 mM
$MgCl_2$ x 6 H_2O	0,20 g	1 mM
Na_2HPO_4 x 2 H_2O	0,84 g	7 mM
$H_2O_{demin.}$	*ad* 1000 mL	

Die Komponenten wurden in Wasser gelöst und der pH-Wert mit 2 M HCl auf 6,0 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung 20 min gekocht und danach 20 min mit Stickstoff begast. Unter anaeroben Bedingungen wurde dann die Lösung mit anaerobem

$H_2O_{demin.}$ auf das Endvolumen eingestellt, aliquotiert und in einer gasdicht verschlossenen Müller-Krempel-Flasche autoklaviert.

Anti-Freezing-Puffer

DMSO	60 mL	60 % (v/v)
SMP-Puffer	40 mL	40 % (v/v)

Zur Herstellung des Anti-Freezing-Puffers wurden die beiden Komponenten in einer sterilen, gasdicht verschlossenen und mit $N_2 + CO_2$ (Protadur® C20, 2.2) begasten Müller-Krempel-Flasche gemischt.

2.5.3 Lyophilisierung

Anaerob wachsende Bakterienstämme wurden zur Langzeit-Lagerung mittels Lyophilisation konserviert. Hierfür wurde die entsprechende Kultur im Hungate-Röhrchen in der späten exponentiellen Wachstumsphase zentrifugiert (5.000 g, 10 min, 4 °C) und der Überstand steril abgenommen. Anschließend wurde das Sediment mit 1,5 mL Lyophilisierungsmedium (2.3.6), nach vorheriger Zugabe von Eisen(II)-Sulfat, suspendiert. Als Gefäß für die späteren Lyophilisate wurden 2-mL-Langhals-Ampullen (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland) verwendet, die vor der Benutzung im oberen Bereich mit Glaswolle gestopft und mit Glasdeckeln autoklaviert wurden. Nach der Zugabe von je 0,6 mL Bakteriensuspension in die Glasampullen wurden diese in einem vorgekühlten Metallblock in flüssigem Stickstoff schockgefrostet. Der Metall-Block wurde dann zusammen mit den Glasampullen im vorgekühlten (-55 °C) Alpha 1-4 LDplus Lyophilisator (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland) platziert und die Kulturen über 20 h bei einem angelegten Druck von 0,01 mbar lyophilisiert. Dann wurden die Ampullen aus dem Lyophilisator genommen und an die Gummischläuche eines Verteilerrechens angebracht, um in einem weiteren Schritt für 6 h bei 0,001 mbar Druck vollständig von Sauerstoff befreit zu werden. Abschließend wurden die Glasampullen mit dem Propan-Sauerstoff-Brenner „Handbrenner 145/6 PSL“ (Herbert Arnold GmbH & Co. KG, Weilburg, Deutschland) an einer zuvor angebrachten Verjüngung abgeschmolzen und damit luftdicht versiegelt. Die unter Vakuum

gefriergetrockneten Bakterienstämme wurden bei 4 °C gelagert. Zur Reaktivierung eines Lyophilisats wurde dieses zunächst aufgesägt, die Kultur vollständig in entsprechendem Medium gelöst und anschließend in einem Hungate-Röhrchen kultiviert.

2.6 Analyse von Wachstum und metabolischem Produktspektrum

2.6.1 Bestimmung der optischen Dichte und des pH-Wertes

Bei der Bestimmung verschiedener Parameter während des bakteriellen Wachstums wurden unter anderem die optische Dichte und der pH-Wert des Mediums bestimmt. Die optische Dichte wurde bei 600 nm (OD_{600}) in einer 1,6-mL-Halbmikro-Küvette mit 1 cm Schichtdicke (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) im Photometer „Ultrospec™ 3100 pro“ (Amersham Bioscience Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) bestimmt. Ab einer optischen Dichte von 0,3 wurden die Proben mit Wasser verdünnt, um innerhalb des logarithmischen Messbereichs des Geräts zu bleiben. Als Referenz wurde das entsprechende Medium verwendet, welches in demselben Maß wie die Probe mit Wasser verdünnt wurde.

Die Messung des pH-Wertes erfolgte mit einer „Halbmikro-pH-Elektrode“ (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) im 2-mL-Mikroreaktionsgefäß.

2.6.2 Quantifizierung von Substrat und bakteriellen metabolischen Produkten mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) wurde als Methode für die Quantifizierung der Fructose- und Lactatkonzentration während des bakteriellen Wachstums verwendet. Hierfür wurden Kulturproben unter sterilen Bedingungen mit einer Spritze entnommen und bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert. Vor der HPLC-Analyse wurden die aufgetauten Proben zentrifugiert (15.000 g, 30 min, 4 °C). Je 500 µL der Kulturüberstände wurden in 2-mL-Rollrandflaschen (CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, Deutschland) gegeben. Diese wurden mit Aluminiumdeckeln (CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, Deutschland) verschlossen. Zur Analyse wurde ein „1260 Infinity Series HPLC System“ (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) verwendet. Dieses System war mit einem Diodenarray-Detektor und einem Brechungsindexdetektor (auf 35 °C beheizt) ausgestattet. 20 µL Kulturüberstand oder externer Standard (gekühlt auf 15 °C) wurden durch den *Autosampler* mit einer

Injektionstemperatur von 24 °C injiziert. Die Auftrennung erfolgte durch eine „CS-Chromatographie organic acid“ Säule (Packungsmaterial Polystyrol-Divinylbenzol; CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, Deutschland) mit den Maßen 150 mm x 8 mm bei 40 °C. Als mobile Phase wurde 5 mM H_2SO_4 mit einer Flussrate von 0,7 mL/min eingesetzt. Zur Datenanalyse wurde die Software „Agilent OPEN-Lab CDS Version A.01.03“ (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) verwendet.

2.6.3 Quantitative Analyse bakterieller metabolischer Produkte und Substrat mittels Gaschromatographie

Für die quantitative Bestimmung des Substrats Methanol sowie metabolischer Fermentationsprodukte wie Acetat, Ethanol, Butyrat, Butanol, Hexanoat, Hexanol und Aceton wurde Gaschromatographie (GC) eingesetzt. Hierfür wurden Proben unter sterilen Bedingungen mit einer Spritze aus einer Kulturflasche entnommen und bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert. Vor der GC-Analyse wurden die aufgetauten Proben zentrifugiert (15.000 g, 30 min, 4 °C). Je 480 µL der Kulturüberstände wurden zusammen mit 20 µL 2 M HCl in 2-mL-Rollrandflaschen (CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, Deutschland) gegeben. Diese wurden mit Aluminiumdeckeln (CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, Deutschland) verschlossen. 1 µL Kulturüberstand oder externer Standard wurden mittels *Autosampler* in ein „PerkinElmer Clarus 680 GC System“ (PerkinElmer, Waltham, Ma, USA) bei einer Injektionstemperatur von 225 °C und einem Split von 1:20 injiziert. Wasserstoffgas mit einem Fluss von 2,25 mL/min diente als Trägergas. Die eingesetzte „Elite-FFAP“-Kapillarsäule (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) mit 30 m Länge, 0,32 mm Innendurchmesser und 0,25 µm Filmdicke war für die Bestimmung freier organischer Säuren mit einer polaren Phase aus Nitroterephtalsäure, modifiziert durch gebundenes Polyethylenglykol, beschichtet. Das „PerkinElmer Clarus 680 GC System“ war mit einem Flammenionisations-Detektor (beheizt auf 300 °C; Detektorgas-Fluss: 45 mL H_2/450 mL/min synth. Luft) ausgestattet. Zur Auftrennung der einzelnen Metabolite in den Proben wurde folgendes Programm verwendet:

90 °C	2 min
90 °C auf 250 °C	mit 40 °C/min
250 °C	2 min

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Software „TotalChrom Version 6.3.2“ (PerkinElmer, Waltham, MA, USA).

2.6.4 Qualitative Bestimmung bakterieller metabolischer Produkte durch Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung

Zur Charakterisierung von Hexanoat wurde Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (GC-MS) eingesetzt. Hierfür wurden Kulturproben unter sterilen Bedingungen mit einer Spritze entnommen und bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert. Vor der GC-Analyse wurden die aufgetauten Proben zentrifugiert (15.000 g, 30 min, 4 °C). Je 500 µL der Kulturüberstände wurden in 2-mL-Rollrandflaschen (CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, Deutschland) gegeben. Diese wurden mit Aluminiumdeckeln (CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, Deutschland) verschlossen. Zur Analyse der Proben wurde das Single-Quadrupol-System „Thermo Scientific ISQ LT SSQ 7000 mit GC-MS-Kopplung“ (Thermo Scientific Trace 1300) (Thermo Scientific, Waltham, Ma, USA) eingesetzt. Die Messung wurde unter folgenden Konditionen durchgeführt:

Einlass/Temperatur:	GC/50 °C auf 300 °C mit 10 °C/min
Ionisierungsart:	Chemische Ionisation
Energie:	100 eV
Emission:	100 µA
Temperatur Quelle:	150 °C
SEV-Spannung:	2,0 kV
Scangeschwindigkeit:	0,2 s/Scan
Messbereich:	60-600 u (1 u = 1,66 x 10^{-24} g)

Die erhaltenen Massenspektren wurden unter Zuhilfenahme der NIST-Datenbank (National Institute of Standards and Technology) (2.13) ausgewertet.

2.6.5 Gaschromatographie zur Analyse der Gaszusammensetzung

Für die Bestimmung und Quantifizierung der Gaszusammensetzung während des autotrophen Wachstums der Bakterien wurde ein „PerkinElmer Clarus 580 GC System“ (PerkinElmer, Waltham, Ma, USA) eingesetzt. Die Probenahme erfolgte aus der Gasphase der Kulturflaschen. 2,5 mL Gas wurden mit einer gasdichten Spritze (SGE Analytical Science™, Melbourne, Australien) entnommen und vollständig in die Probenschleife des Gaschromatographen injiziert. Argon wurde mit einer Flussrate von 30 mL/min als Trägergas in der Säule mit der Bezeichnung MS13X4-09SF2 (PerkinElmer, Waltham, Ma, USA) eingesetzt. Bei einer Temperatur von 60 °C und einer Programmdauer von 11 min wurden die einzelnen Gase in der Säule aufgetrennt und anschließend mit einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor (beheizt auf 200 °C) analysiert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Software „TotalChrom Version 6.3.2“ (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Zur Quantifizierung der Gasanteile wurde eine Einpunktkalibrierung mit einem Gasgemisch (50 % CO, 45 % H_2, 5 % CO_2) durchgeführt und die so erhaltenen Daten mit Hilfe der allgemeinen Gasgleichung, bezogen auf das Volumen des Kulturmediums, berechnet.

2.7 Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.7.1 Isolierung genomischer DNA

Die Isolierung genomischer DNA aus Gram-positiven Bakterien erfolgte mit dem „MasterPure™ Gram Positive DNA Purification Kit“ (Epicentre, Madison, WI, USA). Hierfür wurden je nach Bedarf zwischen 1 mL und 5 mL einer Übernachtkultur eingesetzt, zentrifugiert (12.000 g, 1 min, RT) und der Überstand verworfen. Anschließend wurde den Angaben des Herstellers entsprechend verfahren. Die isolierte DNA wurde in 35 μL $H_2O_{demin.}$ gelöst.

2.7.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit dem „Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit“ (ZYMO Research Corporation, Irvine, CA, USA). Je nach Anwendung wurden 1 mL bis 4 mL einer Übernachtkultur zentrifugiert (12.000 g, 1 min, RT), der Überstand verworfen und das Sediment in 600 μL $H_2O_{demin.}$ suspendiert. Anschließend wurde die Isolierung der Plasmid-DNA gemäß den Angaben des Herstellers

durchgeführt. Lediglich ein zusätzlicher Schritt zur Trocknung der Säule mittels Zentrifugation (12.000 g, 3 min, RT) wurde in das Protokoll integriert. Abschließend wurde die Plasmid-DNA mit 2 x 18 µL $H_2O_{demin.}$ eluiert.

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus Gram-positiven Bakterien wurde ebenfalls das „Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit“ verwendet. Allerdings wurde ein zusätzlicher Schritt zur Zelllyse dem Protokoll vorangesetzt. Hierfür wurden zu dem in $H_2O_{demin.}$ suspendierten Zellsediment 50 µL Lysozym (20 mg/mL; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) gegeben und die Suspension 3 Stunden bei 37 °C inkubiert.

2.7.3 Isolierung und Aufreinigung von RNA aus Gram-positiven Bakterien

Die Isolierung der RNA von *C. carboxidivorans* wurde mit Guanidiniumthiocyanat (TRIzol) durchgeführt. Hierfür wurden 50 mL einer *C. carboxidivorans*-Kultur zunächst geerntet (4500 g, 4 °C, 10 min), der Überstand verworfen und das Sediment in 600 µL Lyse-Puffer suspendiert. Der Puffer wurde direkt vor der Benutzung angesetzt, indem 20 mg Lysozym (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) in 1 mL TSE-Puffer gelöst wurden. Nach 5 min Inkubation bei 37 °C wurde 1 mL eiskaltes „TRIzol™ RNA Isolation Reagent“ (Thermo Scientific, Waltham, Ma, USA) zugegeben und die Lösung vorsichtig homogenisiert. Anschließend wurden 0,3 mL Roti®-Chloroform/Isoamylalkohol (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) zugegeben und die Lösung kräftig gemischt. Nach einer 3-minütigen Inkubation bei RT erfolgte ein Zentrifugationsschritt (12.000 g, 4 °C, 15 min). Mit der oberen wässrigen Phase wurde nach vorsichtigem Abnehmen weitergearbeitet, indem 0,5 mL eiskaltes Isopropanol (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) zugegeben und die Lösung 10 min bei RT inkubiert wurde. Nach erneuter Zentrifugation (12.000 g, 4 °C, 10 min) wurde der Überstand abgenommen und verworfen und 1 mL eiskaltes 70 % (v/v) Ethanol (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) zugegeben. Es folgte ein abschließender Zentrifugationsschritt (4500 g, 4 °C, 4 min), bei dem der Überstand verworfen wurde. Die isolierte RNA wurde über Nacht bei RT getrocknet und das Sediment dann in 22 µL Ambion® DEPC-behandeltem $H_2O_{demin.}$ (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

TSE-Puffer (pH 7,6)

Saccharose	62,50 g	730 mM
EDTA	4,65 g	50 mM
Tris-HCl	1,50 g	50 mM
$H_2O_{demin.}$	*ad* 250 mL	

2.7.4 DNA-Verdau

Der DNA-Verdau wurde nach der Isolation von RNA (2.7.3) durchgeführt, um Kontaminationen durch DNA zu entfernen. Hierfür wurde das „TURBO DNA-free™ Kit“ (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) eingesetzt. Der Verdau erfolgte nach Anweisung des Herstellers. Es wurde lediglich nach 30 min Inkubation bei 37 °C erneut 1 µL 10x TURBO™ DNase zugegeben und das Gemisch für weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die DNase mittels „DNase Inactivation Reagent“ inaktiviert und nach Vorgaben des Herstellers fortgefahren. Zur Kontrolle auf DNA-Kontaminationen wurde die erhaltene Probe mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.7.8) auf Reinheit überprüft und anschließend deren Konzentration mittels Qubit™-Messung (2.7.11) bestimmt.

2.7.5 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde eingesetzt, um DNA-Fragmente für die Klonierung einzelner Vektoren zu generieren, die erfolgreiche Klonierung von Vektoren nachzuweisen, zur Stamm-Verifikation und zum Plasmid-Nachweis beim *plasmid curing* des nativen Plasmids p19 aus *C. carboxidivorans* (2.11). Hierfür wurden verschiedene Polymerasen mit unterschiedlichen Eigenschaften und Anwendungsprotokollen eingesetzt.

Zur Klonierung und für die Plasmid- bzw. Stamm-Verifikation wurde eine Standard-PCR durchgeführt. Die Amplifizierung von DNA-Fragmenten zur Durchführung der In-Fusion®-Klonierung (2.7.6) wurde mit dem „CloneAmp™ HiFi PCR Premix“ (Takara Bio USA Inc., Mountain View, CA, USA) durchgeführt. Die Polymerase wurde aufgrund ihrer niedrigen Fehlerrate und der Fähigkeit, DNA-Fragmente bis zu einer Länge von 10.000 Bp zu amplifizieren, eingesetzt.

Nach einer Klonierung, einer Transformation oder einem Wachstumsversuch wurden die verwendeten Vektoren sowie der eingesetzte Stamm verifiziert. Hierfür wurde bei Vektoren das Insert und bei Bakterien-Stämmen ein Teilstück der 16S rDNA mit speziellen Primern (2.1.3) amplifiziert und anschließend sequenziert (2.7.13). Die Amplifizierung der DNA-Fragmente erfolgte mit der „ReproFast DNA Polymerase“ (Genaxxon Bioscience GmbH, Ulm, Deutschland) und zusammen mit dem „FailSafe™ PCR Premix E“ (Epicentre, Madison, WI, USA). Die Polymerase kann DNA-Fragmente bis zu 5.000 Bp amplifizieren und besitzt eine 3'-5' Exonukleaseaktivität.

PCR-Ansatz mit dem CloneAmp™ HiFi PCR Premix

DNA-Template	1,0 µL	< 100 ng
2 x CloneAmp™ HiFi PCR Premix	12,5 µL	50,0 % (v/v)
Primer 1	1,0 µL	0,2 µM
Primer 2	1,0 µL	0,2 µM
$H_2O_{demin.}$	*ad* 25 µL	

PCR-Ansatz mit der ReproFast DNA-Polymerase

DNA-Template	1,0 µL	< 100 ng
FailSafe™ PCR Premix E	25,0 µL	50,00 % (v/v)
Primer 1	1,0 µL	0,20 mM
Primer 2	1,0 µL	0,20 mM
ReproFast DNA-Polymerase	0,5 µL	0,03 U/µL
$H_2O_{demin.}$	*ad* 50 µL	

Für die Standard-PCR wurden, abhängig von der eingesetzten Polymerase, die in Tabelle 6 gezeigten PCR-Programme verwendet.

Tabelle 6: Verschiedene PCR-Programme für die Standard-PCR.

Programmschritt	CloneAmp™ HiFi PCR Premix		ReproFast DNA-Polymerase	
1. Denaturierung	-		94 °C	300 s
2. Denaturierung	98 °C	10 s	94 °C	30 s
3. Primer-Hybridisierung	variabel	15 s	variabel	15 s
4. Elongation	72 °C	60 s/kBp	72 °C	60 s/kBp
5. Denaturierung	-		94 °C	30 s
6. Elongation	-		72 °C	300-600 s
Kühlung	4 °C		4 °C	

Bei PCRs mit dem „CloneAmp™ HiFi PCR Premix“ wurden die Programmschritte 2 bis 4 für 32 Zyklen wiederholt. Bei PCRs mit der „ReproFast“ DNA-Polymerase wurden die Programmschritte 2 bis 4 für 30 Zyklen wiederholt.

Zur Primer-Hybridisierung wurde entweder die vom Hersteller (biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland) vorgeschlagene Temperatur verwendet oder diese mittels Gradienten-PCR bestimmt. Für die Gradienten-PCR wurde entsprechend der Verwendung eine der oben genannten Polymerasen mit beschriebenem PCR-Ansatz und PCR-Programm eingesetzt. Mit einem „MJ Research PTC-200 Gradient Thermal Cycler“ (MJ Research, Waltham, MA, USA) wurden in einem Ansatz Primer-Hybridisierungstemperaturen zwischen 55 °C und 75 °C getestet.

Für die Hochdurchsatz-Untersuchung mittels Kolonie-PCR wurden zum *plasmid curing* des nativen Plasmids p19 aus *C. carboxidivorans* „PuReTaq Ready-To-Go PCR Beads“ (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) eingesetzt. Zu je 0,25 µL Primer 1 und 2 (0,2 µM Endkonzentration) wurden 24,5 µL $H_2O_{demin.}$ hinzugefügt. Anschließend wurden Proben von Einzel-Kolonien von *C. carboxidivorans* in die Lösung gegeben und abschließend die „PuReTaq Ready-To-Go PCR Beads“ darin gelöst. Es wurde das für die „ReproFast DNA Polymerase“ beschriebene Standard-PCR-Programm mit einer Verlängerung von Programmschritt 1 um weitere 600 s verwendet.

2.7.6 In-Fusion®-Klonierung

Für die Klonierung verwendeter Plasmide wurde das „In-Fusion® HD Cloning Kit“ (Takara Bio USA Inc., Mountain View, CA, USA) verwendet. Damit war es möglich, ein oder mehrere DNA-Fragmente durch eine Polymerase miteinander zu verbinden. Die Polymerase erkennt ca. 15 Bp lange Überhänge an den Enden von Vektor und Insert und verbindet diese. Hierfür wurden die Inserts mit speziellen Primern (2.1.3) amplifiziert, um die Überhänge zu generieren. Die eingesetzten Primer wurden mit Hilfe des „NEBuilder® Assembly Tools“ (2.13; New England Biolabs® Inc., Ipswich, MA, USA) konstruiert. Die durch PCR (2.7.5) amplifizierten Inserts und die mittels enzymatischem Verdau (2.7.12) geschnittenen Vektoren wurden aufgereinigt (2.7.9) und in vom Hersteller vorgegebenen Verhältnis in einem Reaktionsansatz gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei 50 °C fand eine Transformation der Klonierungsansätze in chemisch kompetente *E. coli* XL1-Blue MRF‘-Zellen statt (2.8.1).

2.7.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Klonierungs-Aufgaben, wie beispielsweise der Austausch einer DNA-Sequenz auf einem Plasmid, erfolgten mit einer DNA-Ligase. Nach erfolgtem Restriktionsverdau (2.7.12) und der Aufreinigung der zu verbindenden DNA-Teilstücke (2.7.9) wurde die Ligation der überstehenden Enden (engl.: *sticky ends*) der einzelnen DNA-Fragmente mit der T4-DNA-Ligase (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) durchgeführt.

Ansatz *Sticky-End*-Ligation

Vektor-DNA	50 ng	
Insert-DNA	1:1-1:5	Verhältnis Insert:Vektor
10x Ligase-Puffer	2 µL	
T4-DNA-Ligase	1 µL	5 U
$H_2O_{demin.}$	*ad* 20 µL	

Für die Ligation der eingesetzten DNA-Fragmente wurde der Reaktionsansatz 1 h bei 22 °C inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschritt zur Inaktivierung der T4-DNA-Ligase

(70 °C, 15 min). Anschließend wurde der komplette Ligations-Ansatz (20 µL) zur Transformation chemisch kompetenter *E. coli* XL1-Blue MRF'-Zellen eingesetzt (2.8.1).

2.7.8 Agarose-Gelelektrophorese

Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Auftrennung und Visualisierung doppelsträngiger DNA oder zur Kontrolle der Reinheit extrahierter RNA beim DNase-Verdau eingesetzt. Dafür wurde ein 0,8 %-iges (w/v) Agarosegel verwendet. Hergestellt wurde die Lösung durch Erhitzen der in TAE-Puffer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) gelösten Agarose (Roti®Garose NEEO; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland). Die Polymerisation des Agarosegels fand in horizontalen Gelkammern mit eingesetztem Plastikkamm zur Ausbildung der Geltaschen statt. Vor Beladung der Geltaschen wurden die DNA- und RNA-Proben mit 6x Ladepuffer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) im Verhältnis 1:5 gemischt. 4 µL „GeneRuler™ DNA Ladder Mix" (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) wurden bei jedem Agarosegel als Größenstandard verwendet. Die Auftrennung der DNA- bzw. RNA-Fragmente erfolgte bei einer angelegten Spannung von 130 V. Die anschließende Färbung der Fragmente wurde durch 15-minütige Inkubation des Agarosegels in einer Ethidiumbromid-Lösung erreicht. Für diese Lösung wurde Ethidiumbromid (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) mit TAE-Puffer im Verhältnis 1:10 gemischt. Visualisiert wurden die Fragmente auf dem Agarosegel mit einem Transilluminator bei einer Wellenlänge von 312 nm.

2.7.9 Aufreinigung von DNA aus dem Agarosegel

Für die Durchführung von Klonierungsarbeiten wurden doppelsträngige DNA-Fragmente nach der Auftrennung mittels Gelelektrophorese aus dem Agarosegel mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die anschließende Aufreinigung erfolgte mit dem „Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit" (ZYMO Research Corporation, Irvine, CA, USA) und wurde nach Vorgaben des Herstellers durchgeführt.

2.7.10 Aufreinigung von DNA aus Lösungen

Für die Aufreinigung und Konzentrierung doppelsträngiger DNA-Fragmente nach Durchführung einer PCR (2.7.5) wurde das „DNA Clean & Concentrator-5-Kit™"

(ZYMO Research Corporation, Irvine, CA, USA) verwendet. Die Durchführung erfolgte anhand der vorgegebenen Prozedur durch den Hersteller. Die DNA wurde abschließend 2 x mit 8 μL $H_2O_{demin.}$ eluiert.

2.7.11 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Reinheit und Konzentration von DNA wurde mit dem „NanoDrop 2000“ Spektralphotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) durchgeführt. Das Gerät analysiert die aufgetragene Probe bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm und errechnet die DNA-Konzentration. Zusätzlich lässt sich aus dem Verhältnis A_{260}/A_{280} die Reinheit der DNA-Probe bestimmen. Bei einem Wert über 1,8 kann von einer hohen Reinheit ausgegangen werden und bei einem Wert unter 1,8 sind Kontaminationen in der Probe wahrscheinlich, beispielsweise durch Proteine. Für die Messungen wurde zunächst 1 μL $H_2O_{demin.}$ als Leerwert mit dem Gerät festgelegt und anschließend jeweils 1 μL der Proben gemessen.

Für die Bestimmung der Konzentration und Reinheit von RNA wurde das „Invitrogen Qubit 4 Fluorometer“ (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) zusammen mit dem „Qubit™ RNA BR Assay Kit“ (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) verwendet. Dadurch wurde gewährleistet, dass spezifisch die Konzentration der RNA gemessen wurde, unabhängig von Kontaminationen wie DNA, Proteinen oder freien Nukleotiden. Die Durchführung der Messung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers.

2.7.12 Restriktionsverdau von DNA

Die Analyse und Präparation von Plasmiden erfolgte durch den Verdau mit Typ II-Restriktionsenzymen. Dafür wurden FastDigest™ Restriktionsenzyme (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) eingesetzt. Der Restriktionsverdau erfolgte entsprechend der Herstellerangaben. Zur Analyse klonierter Plasmide und zur Verifikation rekombinanter Stämme wurde ein analytischer Verdau, beim Einsatz von Plasmiden zur Klonierung ein präparativer Verdau durchgeführt.

Ansatz analytischer Restriktionsverdau

DNA	3 µL	> 100,0 ng/µL
10x FastDigest Green Puffer	2 µL	10,0 % (v/v)
FastDigest Restriktionsenzym	1 µL	0,5 U/µL
$H_2O_{demin.}$	*ad* 20 µL	

Ansatz präparativer Restriktionsverdau

DNA	0,2-1 µg	
10x FastDigest Green Puffer	5 µL	10,0 % (v/v)
FastDigest Restriktionsenzym	2 µL	0,5 U/µL
$H_2O_{demin.}$	*ad* 50 µL	

Beim Restriktionsverdau mit zwei Restriktionsenzymen wurde jeweils nur die Hälfte der Enzyme eingesetzt und die Inkubationszeit auf 30 min verlängert. Zur anschließenden Kontrolle des Restriktionsverdaus sowie zur weiteren Durchführung einer Klonierung wurde eine Agarose-Gelelektrophorese (2.7.8) und ggf. eine Aufreinigung der DNA aus dem Agarosegel (2.7.9) durchgeführt.

2.7.13 Sequenzierung und Analyse von DNA

Sequenzierung wurde zur Überprüfung von DNA-Amplifikaten und klonierten Vektoren sowie zur Stamm-Verifikation herangezogen und von Eurofins Genomics (Eurofins Genomics Europe Sequencing GmbH, Konstanz, Deutschland) durchgeführt. Die Vektoren wurden den Anforderungen des Service-Anbieters entsprechend vorbereitet und verschickt. PCR-Amplifikate wurden vor der Sequenzierung aufgereinigt (2.7.10). Die Proben wurden zusammen mit spezifischen Primern (2.1.3) unter Verwendung der Methode der Sanger-Sequenzierung (Sanger *et al.*, 1977) sequenziert. Die dadurch erhaltenen Sequenzen wurden mit der „CLC Main Workbench“ (2.13) analysiert. Zur Stamm-Verifikation mittels 16S rDNA-Analyse wurden die Sequenzen mit dem „Basic Local Alignment Search Tool“ (BLAST) (2.13) untersucht und mit der zugehörigen Datenbank verglichen.

2.7.14 Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Die cDNA-Synthese aus isolierter RNA (2.7.3) wurde mit der „Maxima H Minus Reverse Transcriptase“ (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) durchgeführt. Diese zeichnet sich dadurch aus, dass durch Eliminierung der RNaseH-Aktivität hohe cDNA-Ausbeuten erzielt werden. Die cDNA-Synthese wurde nach der vom Hersteller beschriebenen Prozedur mit spezifischen Primern (2.1.3) und einer Inkubationszeit von 30 min bei 50 °C durchgeführt. Nach der Synthese der cDNA wurden die Proben bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Ansatz zur cDNA-Synthese

RNA		5,0 µg	
spezifischer Primer		20,0 pmol	
dNTP Mix (je 10 mM)		1,0 µL	0,5 mM
$H_2O_{demin.}$, DEPC-behandelt	*ad*	14,5 µL	
5x RT Puffer		4,0 µL	20,0 % (v/v)
RiboLock™ RNase Inhibitor		0,5 µL	20,0 U
Maxima H Minus Reverse Transkriptase		20,0 U	
$H_2O_{demin.}$, DEPC-behandelt	*ad*	20 µL	

2.8 Transfer von Nukleinsäuren in Bakterien

2.8.1 DNA-Transfer in chemisch kompetente *E. coli* XL1-Blue MRF‘

Der Bakterienstamm *E. coli* XL1-Blue MRF' (dam^+, dcm^+; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) wurde für die Transformation klonierter Plasmide eingesetzt. Dafür wurden chemisch kompetente Zellen nach Beschreibung von Inoue *et al.* (1990) präpariert. Abweichend davon wurde zunächst eine Einzel-Kolonie über Nacht bei 18 °C in 5 mL LB-Medium (2.3.1) in einem Orbital-Schüttler (160 Upm; Thermo Scientific, Waltham, Ma, USA) inkubiert. Mit dieser Kultur wurden dann 250 mL SOB-Medium (2.3.1) in einem 1-L-Erlenmeyer-Kolben mit einer OD_{600} von 0,1 angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,5 bei 37 °C auf einem Orbital-Schüttler bei 60 Upm inkubiert. Alle

Zentrifugationsschritte erfolgten bei 4000 g, 4 °C und 10 min. Die kompetenten *E. coli*-Zellen wurden in 200 µL Aliquots in 1,5-mL-Mikroreaktionsgefäßen mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Zur Transformation wurden die chemisch kompetenten *E. coli* XL1-Blue MRF'-Zellen auf Eis aufgetaut, bevor entweder 5 µL In-Fusion® Reaktionsmix (2.7.6) oder 500 ng Plasmid-DNA dazugegeben wurde. Nach einer Inkubationszeit von 30 min auf Eis erfolgte ein Hitzeschock (42 °C, 45 s) und eine erneute Inkubation von 2 min auf Eis. 800 µL vorgewärmtes LB-Medium (37 °C) wurden dazugegeben, um anschließend die Zellen für 40 min auf einem Orbital-Schüttler (400 Upm; Thermo Scientific, Waltham, Ma, USA) zu regenerieren. 200 µL der Bakterien-Suspension wurden auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum (2.3.7) ausgestrichen und diese bei 37 °C inkubiert, bis Kolonien sichtbar wurden.

2.8.2 DNA-Transfer in chemisch kompetente *E. coli* SCS110

Für die Transformation nicht-methylierter DNA wurden Plasmide der pMTL80000er-Serie (Heap *et al.*, 2009) in den Bakterienstamm *E. coli* SCS110 (dam^-, dcm^-; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) transformiert. Die Herstellung der chemisch kompetenten *E. coli* SCS110-Zellen erfolgte nach der von Chan *et al.* (2013) beschriebenen Methode. Die Transformation von DNA in den Bakterienstamm *E. coli* SCS110 erfolgte mit derselben Methode, die bereits für den Bakterienstamm *E. coli* XL1-Blue MRF' beschrieben wurde (2.8.1).

2.8.3 DNA-Transfer in elektrokompetente *E. coli* CA434

Der DNA-Transfer in acetogene Bakterien mittels Konjugation erfolgte mit dem Helferstamm *E. coli* CA434 (Purdy *et al.*, 2002). Dieser Stamm trägt das für die Konjugation notwendige Plasmid R702. Die Präparation der elektrokompetenten Zellen wurde nach der Beschreibung von Dower *et al.* (1988) durchgeführt, zur Regeneration wurde allerdings LB-Medium (2.3.1) verwendet. Die kompetenten *E. coli* CA434-Zellen wurden in 50-µL-Aliquots in 1,5-mL-Mikroreaktionsgefäßen mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Die Transformation von *E. coli* CA434 wurde mit 200 ng Plasmid-DNA in Elektroporationsküvetten mit 2 mm Spaltbreite (Biozym Scientific GmbH, Oldendorf,

Deutschland) durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min auf Eis wurden die Zellen mit einem „Gene Pulser Xcell™“ (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) elektroporiert (2500 V, 25 µF, 200 Ω) und anschließend mit 800 µL vorgewärmtem (37 °C) LB-Medium 40 min bei 37 °C auf einem Orbital-Schüttler (400 Upm; Thermo Scientific, Waltham, Ma, USA) regeneriert. 100 µL der Bakterien-Suspension wurden auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum (2.3.7) ausgestrichen. Diese wurden bei 37 °C inkubiert, bis Kolonien sichtbar waren.

2.8.4 Transformation acetogener Bakterien mittels Elektroporation

Elektroporation wurde für den DNA-Transfer in die acetogenen Bakterienstämme *C. carboxidivorans*, *C. ljungdahlii* und *A. woodii* eingesetzt. Das von Leang *et al.* (2013) beschriebene Protokoll zur Elektroporation diente hierbei als Grundlage für die Transformation der drei acetogenen Stämme. Bei Versuchen zur genetischen Zugänglichkeit von *C. carboxidivorans* wurde zusätzlich das durch Molitor *et al.* (2016a) entwickelte Protokoll eingesetzt. Die Parameter der beiden Elektroporationsprotokolle werden in Tabelle 7 gezeigt. Die Transformation wurde in einer Anaerobenkammer durchgeführt und die dafür notwendigen Materialien mindestens 24 h vorher eingeschleust. Die Kulturen wurden den Vorgaben folgend in der entsprechenden Wachstumsphase aus 50 mL Kulturmedium geerntet und durch mehrere Waschschritte mit Waschpuffer kompetent gemacht. Der Elektropuls erfolgte mit dem „Gene Pulser Xcell™“ (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). Anschließend wurden die Zellen zur Regeneration in vorgewärmtes Medium gegeben. Nach mindestens einer Verdopplung der OD_{600} wurde das entsprechende Antibiotikum dazugegeben (2.3.7). Beim weiteren Anstieg der OD_{600} wurden die Kulturen in frisches Medium mit Antibiotikum überimpft. Danach erfolgte die Verifikation der rekombinanten Bakterienstämme durch Isolierung der genomischen DNA (2.7.1) oder Isolierung der Plasmid-DNA (2.7.2) und einen anschließenden Restriktionsverdau (2.7.12) sowie Sequenzierung der DNA (2.7.13).

Tabelle 7: Eingesetzte Elektroporationsprotokolle.

Protokollparameter	Leang *et al.* (2013)	Molitor *et al.* (2016a)
OD_{600} bei Zellernte	0,2 - 0,8	0,2 - 0,5
Medium-Additiv zur Zellwandschwächung	40 mM DL-Threonin	40 mM DL-Threonin
Waschpuffer	SMP (pH 6,0)	10 % (v/v) Glycerin
Zentrifugation	7690 g, 4 °C, 10 min	7690 g, 4 °C, 15 min
Eingesetztes Zellvolumen zur Elektroporation	25 µL	200 µL
Eingesetzte Menge Plasmid-DNA	1 - 20 µg	1 - 5 µg
Puls-Parameter	625 kV, 25 µF, 600 Ω	2500 kV, 25 µF, 600 Ω
Spaltabstand Küvette	1 mm	2 mm

2.8.5 Transformation von *C. saccharoperbutylacetonicum*

Der DNA-Transfer in den Bakterienstamm *C. saccharoperbutylacetonicum* erfolgte mittels Elektroporation. Hierfür wurde das von Flitsch (2015) beschriebene Protokoll in abgewandelter Form eingesetzt. Zunächst wurde eine Kultur von *C. saccharoperbutylacetonicum* in 5 mL CGM (2.3.5) über Nacht bei 30 °C inkubiert. Mit dieser Kultur wurden dann 50 mL CGM auf eine OD_{600} von 0,1 angeimpft und diese wiederum bei 30 °C bis zu einer OD_{600} von 1,2 inkubiert. Anschließend wurde die Kultur in einer Anaerobenkammer geerntet (2200 g, 4 °C, 10 min). Das Sediment wurde mit 20 mL Elektroporations-Puffer A gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (2200 g, 4 °C, 10 min) wurde das Sediment in 1 mL Elektroporations-Puffer B resuspendiert. 1 µg Plasmid-DNA wurde zu je 200 µL kompetenten Zellen gegeben und die Lösung 5 min auf Eis inkubiert. In Elektroporationsküvetten (Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland) mit 2 mm Spaltabstand fand die Elektroporation bei 1,5 kV, 200 Ω und 25 µF statt. Anschließend wurden die Zellen zur Regeneration in 1 mL CGM gegeben und 2 h bei 30 °C inkubiert. Danach wurden 200 µL der Lösung auf CGM-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum (2.3.7) ausplattiert und diese bei 30 °C inkubiert, bis Kolonien auf der Platte sichtbar wurden. 5 mL CGM mit Antibiotikum wurden mit einzelnen Kolonien beimpft und bei 30 °C inkubiert. Wachsende Stämme wurden

anschließend durch Isolierung der genomischen DNA (2.7.1) und Sequenzierung der DNA (2.7.13) verifiziert.

Elektroporations-Puffer A/B

Saccharose	51,3 g	300,00 mM	
NaH_2PO_4 x 2 H_2O	0,3 g	3,85 mM	
Na_2HPO_4 x 2 H_2O	53,3 mg	0,75 mM	
($MgCl_2$ x 6 H_2O	101,6 mg	1,00 mM	nur bei Puffer A)
$H_2O_{demin.}$	*ad* 500 mL		

Die beiden Elektroporations-Puffer A und B unterscheiden sich dadurch, dass Puffer B kein $MgCl_2$ x 6 H_2O enthält. Zur Herstellung der Elektroporations-Puffer wurden die oben beschriebenen Komponenten eingewogen, unter anaeroben Bedingungen in sauerstofffreiem $H_2O_{demin.}$ gelöst und in 500-mL-Müller-Krempel-Flaschen (Müller & Krempel AG, Bülach, Schweiz) gegeben. Diese wurden mit Stopfen aus Naturkautschuk (Maag Technic GmbH, Göppingen, Deutschland) und Schraub-Deckeln aus rostfreiem Stahl verschlossen. Anschließend wurden die Elektroporations-Puffer autoklaviert.

2.8.6 DNA-Transfer in acetogene Bakterien durch Konjugation

Als Grundlage für den DNA-Transfer in einen acetogenen Bakterienstamm mittels Konjugation dienten die von Williams *et al.* (1990) und Purdy *et al.* (2002) beschriebenen Protokolle. Zur Konjugation wurde der Stamm *E. coli* CA434 eingesetzt. Zu transferierende Plasmide wurden zuvor in diesen Stamm eingebracht (2.8.3). Eine Vorkultur des entsprechenden *E. coli* CA434-Stamms wurde in 5 mL LB-Medium (2.3.1) mit den Antibiotika Tetracyclin (Helferplasmid R702) und Chloramphenicol (zu übertragendes Plasmid) bei 37 °C bis zu einer OD_{600} von 0,5 inkubiert und anschließend wurden 2 mL der Kultur zentrifugiert (5000 g, 3 min, RT). Das Sediment wurde unter anaeroben Bedingungen mit 1 mL PBS-Puffer gewaschen und in 200 µL einer *C. carboxidivorans*-Kultur (OD_{600} 0,5) gelöst. Die Bakterien-Suspension wurde auf eine YTF-Agarplatte (2.3.2) getropft. Nach 4 bis 24 h Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen mit einer Impföse und 500 µL PBS-Puffer vorsichtig von der YTF-Agarplatte

abgewaschen und auf eine neue YTF-Agarplatte mit Colistin (20 μg/mL) und Thiamphenicol (15 μg/mL) gegeben. Diese Platte wurde bei 37 °C inkubiert, bis Kolonien sichtbar wurden. Diese Kolonien wurden auf weiteren YTF-Agarplatten mit denselben Antibiotika ausgestrichen. Dann wurden 5 mL Tanner-Medium (2.3.2) mit Einzel-Kolonien beimpft und bei 37 °C inkubiert. Wachsende Stämme wurden anschließend durch Isolierung der genomischen DNA (2.7.1) und einen anschließenden Restriktionsverdau (2.7.12) sowie Sequenzierung der DNA (2.7.13) verifiziert.

PBS-Puffer

NaCl	8,0 g	0,80 % (w/v)
Na_2HPO_4 x 2 H_2O	1,4 g	7,86 mM
KCl	0,2 g	2,68 mM
KH_2PO_4	0,2 g	1,47 mM
$H_2O_{demin.}$	*ad* 1000	mL

Für die Herstellung des PBS-Puffers wurden die Komponenten eingewogen und unter anaeroben Bedingungen in sauerstofffreiem $H_2O_{demin.}$ gelöst und in 500-mL-Müller-Krempel-Flaschen (Müller & Krempel AG, Bülach, Schweiz) gegeben. Diese wurden mit Stopfen aus Naturkautschuk (Maag Technic GmbH, Göppingen, Deutschland) und Schraub-Deckeln aus rostfreiem Stahl verschlossen. Anschließend wurde der PBS-Puffer autoklaviert.

2.9 Permeabilisierungs-Nachweis mit Fluoreszenz-markiertem Dextran

Die Permeabilisierung der Zellmembran während der Elektroporation ist wichtiger Bestandteil beim Transfer von DNA in Bakterien. Für den Nachweis der erfolgreichen Permeabilisierung sowie den Vergleich unterschiedlicher Puls-Parameter wurde „Texas Red™“-markiertes Dextran (Thermo Scientific, Waltham, Ma, USA) mit einer molekularen Masse von 70 kDa verwendet. Die von Lin *et al.* (2010) beschriebene Methode diente dazu, durch fluoreszierende Moleküle mit einer Größe vergleichbar der

eines Plasmids, die Effizienz verschiedener Pulsparameter während der Transformation zu bestimmen. Zur Durchführung wurden Kulturen des Stamms *C. carboxidivorans* entsprechend den Protokollen von Leang *et al.* (2013) und Molitor *et al.* (2016a) geerntet und gewaschen (2.8.4). Dann wurden die Zellen in 1 mL einer Stammlösung mit „Texas Red™"-markiertem Dextran suspendiert. Für die Stammlösung wurden 6,35 mg des Fluoreszenz-markierten Dextrans in 5 mL eines anaeroben Gemischs aus SMP-Puffer (2.5.2) und 10 % (v/v) Glycerin gelöst. Die Elektroporation erfolgte entsprechend der beiden Protokolle. Anschließend wurde der Fluoreszenz-Farbstoff durch viermaliges Waschen mit dem jeweiligen Puffer entfernt.

Für die Unterscheidung von lebendigen und toten Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop wurde im Anschluss eine Gegenfärbung der elektroporierten Zellen mit „SYTOX™ Green Nucleic Acid Stain" (Thermo Scientific, Waltham, Ma, USA) durchgeführt. Der Farbstoff färbt DNA, kann jedoch die Zellmembran lebender Zellen nicht durchdringen. Für die Gegenfärbung wurden die Bakterienzellen nach der Entfernung des „Texas Red™"-markierten Dextrans in 50 µL „SYTOX™ Green" Färbelösung suspendiert und der Ansatz 15 min bei RT inkubiert. Danach wurde der Farbstoff ebenfalls durch viermaliges Waschen mit dem jeweiligen durch die Elektroporationsprotokolle vorgeschriebenen Puffer entfernt.

Die Bestimmung des Einflusses verschiedener Elektroporationsprotokolle auf die Einbringung von „Texas Red™"-markierten Dextrans erfolgte nach Fixierung der Zellen mit 1 % Agarose auf einem Objektträger. Visualisiert und ausgewertet wurden die Proben mittels Fluoreszenz-Mikroskopie (2.12.1) bei den vom Hersteller vorgegebenen Anregungswellenlängen (Extinktion/Emission Texas Red™: 595/615 nm; Extinktion/Emission SYTOX™ Green: 504/523 nm).

2.10 Nachweis aktiver Restriktionsendonukleasen

Für die Untersuchung des Stamms *C. carboxidivorans* auf aktive Typ II-Restriktionsendonukleasen wurde eine von Whitehead und Brown (1985) publizierte Methode in abgewandelter Form angewandt. Für den Zellaufschluss wurde eine 50-mL-Kultur von *C. carboxidivorans* in der exponentiellen oder stationären Wachstumsphase geerntet (3500 g, 10 min, RT) und mit 20 mL PENP-Puffer (Matsushima und Baltz, 1994) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (3500 g, 10 min, RT) wurde der Überstand verworfen und das Sediment in 4 mL PENP-Puffer suspendiert. Die Zellen in der Suspension wurden in 2-mL-Schraubdeckel-Gefäßen mit 0,1 mM „Zirconia/Silica

Beads“ (BioSpec Products Inc., Bartlesville, OK, USA) in einem „Ribolyser Precellys24“ (Bertin Instruments, Montigny-le-Bretonneux, Frankreich) mechanisch aufgeschlossen. Der Zellaufschluss fand in 5 Zyklen mit je 6500 Upm für 45 s bei 4 °C statt. Zwischen den Zyklen wurde die Suspension 1 min auf Eis gekühlt. Nach einem Zentrifugationsschritt (10.000 g, 15 min, 4 °C) wurde mit dem Überstand weitergearbeitet. Das abgenommene Zellextrakt wurde mit 3 mL Glycerin (anaerob) und 0,6 mL BSA-Lösung (1 mg/mL, sterilfiltriert, anaerob) gemischt, in 2-mL-Schraubdeckel-Gefäße aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Mit dem Zellextrakt wurde die Untersuchung auf aktive Typ II-Restriktionsendonukleasen durchgeführt. Für den Reaktions-Ansatz wurden je 2 µL eines Puffers für Restriktionsendonukleasen (Thermo Scientific, Waltham, Ma, USA) mit 0,5-1,6 µg Plasmid-DNA und 4 µL Zellextrakt (1:10 verdünnt mit $H_2O_{demin.}$) gemischt und in einem Endvolumen von 25 µL (Rest $H_2O_{demin.}$) bei 37 °C 4 h inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.7.8) ausgewertet.

PENP-Puffer

EDTA	3,720 g	10,0 mM
NaCl	1,910 g	50,0 mM
K_2HPO_4	1,060 g	6,1 mM
KH_2PO_4	0,530 g	3,9 mM
PMSF	0,035 g	0,2 mM
$H_2O_{demin.}$	*ad* 1000 mL	

Für die Herstellung des PENP-Puffers wurden alle Komponenten, außer PMSF, eingewogen und in sauerstofffreiem $H_2O_{demin.}$ gelöst. Anschließend wurde der Puffer in eine Müller-Krempel-Flasche (Müller & Krempel AG, Bülach, Schweiz) gegeben. Diese wurde mit Stopfen aus Naturkautschuk (Maag Technic GmbH, Göppingen, Deutschland) und Schraub-Deckel aus rostfreiem Stahl verschlossen, autoklaviert. Das PMSF wurde kurz vor Benutzung des Puffers hinzugegeben.

2.11 *Plasmid curing*

Zur dauerhaften Entfernung des nativen Plasmids p19 aus *C. carboxidivorans* wurde *plasmid curing* durchgeführt. Die verwendete Methode wurde durch Trevors (1986) beschrieben. Das *plasmid curing* erfolgte mit den beiden *curing*-Agenzien Acridinorange und Novobiocin. Acridinorange ist eine DNA-interkalierende Substanz (Lerman, 1963), die die Replikation der Plasmid-DNA bevorzugt unterbindet (Hohn und Korn, 1969). Novobiocin hingegen sorgt mit einer Inhibierung der Gyrase-Aktivität dafür, dass die Trennung kovalent verbundener zirkulärer DNA-Moleküle während der Replikation beeinträchtigt wird (Wolfson *et al.*, 1982). Zur Durchführung wurden mit einer logarithmisch wachsenden *C. carboxidivorans*-Kultur 5 mL Tanner-Medium (2.3.2) mit unterschiedlichen Konzentrationen des entsprechenden *curing*-Agens angeimpft und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die Konzentration des Agens, bei der die Zellen noch in der Lage waren zu wachsen, wird als minimal inhibitorische Konzentration (MIK) bezeichnet. Die bei der MIK noch wachsende Kultur wurde anschließend auf YTF-Agarplatten (2.3.2) mit derselben Konzentration des *curing*-Agens ausplattiert. Kolonien des Stamms *C. carboxidivorans* wurden mittels Kolonie-PCR (2.7.5) auf den Verlust des nativen Plasmids p19 untersucht.

2.12 Mikroskopie

2.12.1 Licht- und Fluoreszenzmikroskopie

Zur Identifizierung und einfachen Kontrolle einer Bakterienkultur auf Kontaminationen sowie zur morphologischen Analyse der verwendeten Bakterienstämme in verschiedenen Wachstumsphasen wurde Lichtmikroskopie eingesetzt. 10 µL einer Zellsuspension wurden auf einen Objektträger gegeben und mit einem Deckglas bedeckt. Abhängig von der OD_{600} wurden die Proben vorher mit $H_2O_{demin.}$ verdünnt. Die Analyse der Proben erfolgte mit einem „Zeiss Standard 20“ Mikroskop (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland).

Untersuchungen mit „Texas Red™“-markiertem Dextran und „SYTOX™ Green“ wurden mit dem „Zeiss Axio Observer Z1 Inverted Phase Contrast Fluorescence Microscope“ (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland), entsprechende Fotos mit der Software „Zeiss Zen“ Version 2.3 SP1 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) gemacht. Die Proben wurden auf einen zuvor mit 1 % Agarosegel beschichteten

Objektträger gegeben, mit einem Deckglas bedeckt und zur Fixierung kurz zentrifugiert (2000 g, 10 s, RT).

2.12.2 Rasterelektronen- und Transmissionselektronenmikroskopie

Für den morphologischen Vergleich der drei acetogenen Bakterienstämme *C. carboxidivorans*, *C. scatologenes* und *C. drakei* wurde Rasterelektronen- und Transmissionselektronenmikroskopie eingesetzt. Dafür wurden Zellen aus der logarithmischen bzw. stationären Wachstumsphase geerntet (12000 g, 10 min, RT). Das Sediment wurde anschließend 2 x mit 0,9 %-iger (w/v) Kochsalz-Lösung gewaschen und dann in 500 µL 0,9 %-iger (w/v) Kochsalz-Lösung suspendiert. Die weitere Präparation der Zellen (Fixierung und Dehydration) erfolgte durch die Zentrale Einrichtung für Elektronenmikroskopie der Universität Ulm (Universität Ulm, Ulm, Deutschland). Hierbei wurden die Proben für das Rasterelektronenmikroskop „Hitachi S-5200 UltraHigh Resolution FE“ (Hitachi Ltd. Corp., Chiyoda, Japan) nach der Fixierung mit Platin beschichtet. Proben zur Analyse mit dem Transmissionselektronenmikroskop „Jeol 1400“ (Jeol GmbH, Freising, Deutschland) wurden in Epoxidharz eingebettet, in ultradünne Scheiben geschnitten und anschließend mit Bleicitrat kontrastiert.

2.13 Bioinformatik

Für die Analyse und Visualisierung von DNA- und Proteinsequenzen, Restriktions- und Modifikationssystemen, *in silico*-Klonierung und Auswertung von Daten wurden Internet-basierte Hilfsprogramme, Datenbanken und verschiedene Software-Anwendungen eingesetzt. Informationen über DNA-Sequenzen und Restriktions-Modifikationssysteme wurden über „Integrated Microbial Genomes Expert Review“ (IMG ER; Markowitz *et al.*, 2014) bezogen. Für den Vergleich von Nukleotid- oder Aminosäure-Sequenzen mit Sequenz-Datenbanken wurde das „Basic Alignment Search Tool“ (BLAST; Johnson *et al.*, 2008) des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) verwendet. Die Visualisierung von tBLASTx-Sequenzvergleichen erfolgte mit der Python-Anwendung Easyfig (Sullivan *et al.*, 2011). „InterPro - Protein sequence analysis & classification“ (Mulder und Apweiler, 2007) diente als Datenbank zur Analyse von Proteinfamilien und Domänenstrukturen. Restriktions- und Modifikationssysteme wurden mit „The Restriction Enzyme Database“ (REBASE®; Roberts *et al.*, 2010) analysiert. Für *in silico*-Klonierung wurde die Software-Anwendung „CLC Main

Workbench“ verwendet. In dieser Arbeit wurde zur Darstellung von Graphen das Darstellungs- und Analyseprogramm „OriginPro“ (OriginLab Corp., Northampton, Massachusetts, USA) verwendet. Primer für In-Fusion®-Klonierung (2.7.6) wurden mit dem „NEBuilder® Assembly Tool“ (New England Biolabs® Inc., Ipswich, MA, USA) geplant. Zur Auswertung von Massenspektren wurde die NIST-Datenbank (National Institute of Standards and Technology) herangezogen.

Tabelle 8 zeigt eine Zusammenfassung der verwendeten Datenbanken mit entsprechender Internetadresse und Tabelle 9 die in dieser Arbeit verwendete Software.

Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Datenbanken mit entsprechender Internetadresse.

Datenbank	Internetadresse
Integrated Microbial Genomes Expert Review (IMG ER)	https://img.jgi.doe.gov/
National Center for Biotechnology Information (NCBI)	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
InterPro - Protein sequence analysis & classification	https://www.ebi.ac.uk/interpro
The Restriction Enzyme Database (REBASE®)	rebase.neb.com/rebase/rebase.html
National Institute of Standards and Technology (NIST)	https://webbook.nist.gov/
Pictorial Database of 3D structures	https://www.ebi.ac.uk/> PDBsum

Tabelle 9: Übersicht über verwendete Software und deren Anbieter.

Software/Hilfsprogramm	Anbieter
Easyfig V2.2.2	Beatson Microbial Genomics Lab, University of Queensland, Brisbane, Australia
CLC Main Workbench V7.6.4	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
OriginPro V9.0.0G	OriginLab Corp., Northampton, MA, USA
NEBuilder® Assembly Tool V2.2.7	nebuilder.neb.com

3 Ergebnisse

3.1 Native Bildung mittelkettiger Säuren und Alkohole in acetogenen Bakterien

Innerhalb der Gruppe der acetogenen Bakterien wurden bisher nur einzelne Stämme beschrieben, die dazu in der Lage sind, mittelkettige Säuren oder Alkohole (C6-Körper) zu produzieren. Der am besten untersuchte acetogene Bakterienstamm, der sowohl Hexanoat als auch Hexanol produzieren kann, ist *Clostridium carboxidivorans* (Phillips *et al.*, 2015b). Die acetogenen Bakterienstämme, die laut 16S rDNA-Analyse am nächsten mit dem Stamm *C. carboxidivorans* verwandt sind, sind mit einer Sequenzähnlichkeit von mindestens 99,7 % *C. scatologenes* und *C. drakei* (Liou *et al.*, 2005). *C. scatologenes* wird als Produzent von Acetat, Butyrat und Hexanoat beschrieben (Küsel *et al.*, 2000), wohingegen *C. drakei* laut Literatur nur in der Lage ist, neben Acetat auch Butyrat zu produzieren (Gößner *et al.*, 2008). Da bisher der metabolische Stoffwechselweg zum C6-Körper in acetogenen Bakterienstämmen nicht entschlüsselt wurde, erfolgte zunächst eine Untersuchung und ein Vergleich der drei nah verwandten Stämme *C. carboxidivorans, C. scatologenes* und *C. drakei* miteinander.

Zur Untersuchung morphologischer Besonderheiten wurden die drei Stämme zunächst in dem für sie beschriebenen Medium (2.3.2; 2.3.3) inkubiert und Proben aus der logarithmischen und stationären Wachstumsphase entnommen. Diese Proben wurden anschließend für die weitere Analyse unter dem Rasterelektronenmikroskop und dem Transmissionselektronenmikroskop vorbehandelt (2.12.2). Aufnahmen einzelner Zellen der drei Stämme unter den beiden Mikroskopen werden in Abbildung 2 dargestellt. Die Aufnahmen von *C. carboxidivorans, C. scatologenes* und *C. drakei* aus der stationären Wachstumsphase zeigen unter dem Rasterelektronenmikroskop eine hohe Ähnlichkeit in der Morphologie der einzelnen Zellen. Alle Bakterien sind, wie bereits durch Liou *et al.* (2005) beschrieben, stäbchenförmig mit einer Länge von etwa 4-7 μm und peritrich mit Flagellen begeißelt. Auffällig ist, dass, im Gegensatz zu *C. scatologenes* und *C. drakei*, die sich in ihrem Aussehen während der logarithmischen und stationären Phase nicht unterscheiden, sich die Zellen von *C. carboxidivorans* aus der logarithmischen Wachstumsphase (Abbildung 2D) deutlich von den Zellen der beiden anderen Stämme unterscheiden. Anstelle einer Länge von 4-7 μm besitzen die Zellen im Durchschnitt eine Länge von 15-20 μm. Bei genauerer Betrachtung der elektronenmikroskopischen Aufnahme sind zwar kleinere Einbuchtungen in der Zellmembran erkennbar, eine

deutliche Abspaltung einer neuen Zelle zeigt jedoch keine der betrachteten Bakterienzellen. Die Aufnahmen der drei Bakterienstämme *C. carboxidivorans*, *C. scatologenes* und *C. drakei* unter dem Transmissionselektronenmikroskop (Abbildung 2E-I) spiegeln ein ähnliches Bild wider. Gut zu erkennen ist, dass bei den drei Proben der Stämme aus der stationären Wachstumsphase keine morphologischen Unterschiede sichtbar sind. Die einzelnen Zellen liegen entweder getrennt voneinander vor oder sind gerade dabei, sich voneinander abzuspalten. Die dargestellten Zellen von *C. scatologenes* und *C. drakei* zeigen eine ausgebildete mehrschichtig aufgebaute Zellmembran zwischen den noch miteinander verbundenen Zellen. Das Zellinnere der Bakterien wird als elektronendichter Raum dunkel dargestellt, einzelne Zellkompartimente sind nicht zu erkennen. Werden die ultradünn geschnittenen Zellschichten von *C. carboxidivorans* aus der logarithmischen Wachstumsphase unter dem Transmissionselektronenmikroskop betrachtet, so zeigt ein Großteil der längeren Zellen keine Anzeichen für eine Separation in einzelne kleinere Zellen (Abbildung 2H).

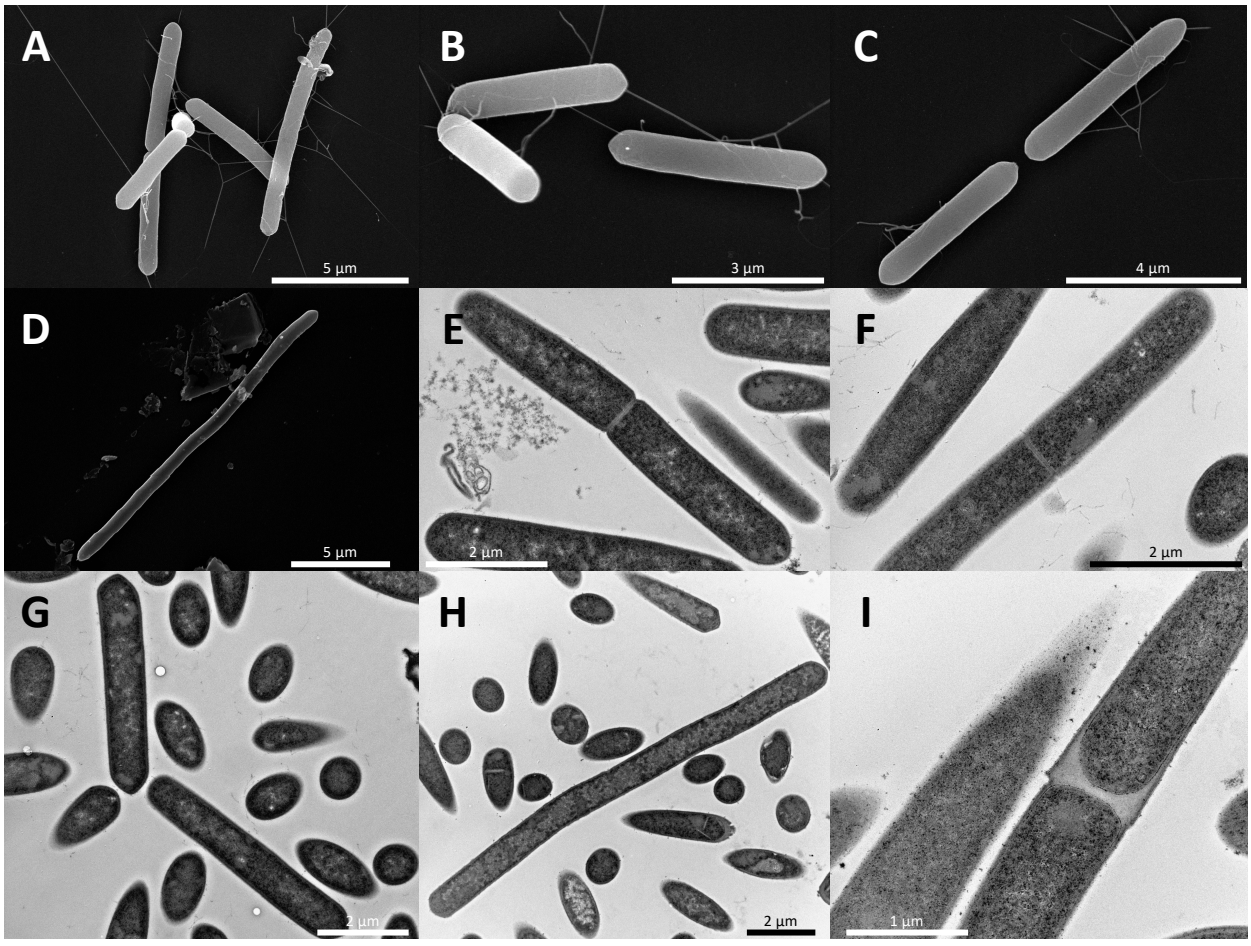


Abbildung 2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *C. carboxidivorans* (A: stationäre und D: exponentielle Wachstumsphase), *C. scatologenes* (B) und *C. drakei* (C) sowie Aufnahmen unter dem Transmissionselektronenmikroskop von *C. scatologenes* (E), *C. drakei* (F) und *C. carboxidivorans* (G: stationäre und H,I: exponentielle Wachstumsphase).

Vereinzelt sind jedoch, wie in der Nahaufnahme gezeigt, innerhalb einer äußeren Hülle kleinere Zellen gänzlich voneinander getrennt (Abbildung 2I).

Neben der morphologischen Analyse der Bakterienstämme *C. carboxidivorans*, *C. scatologenes* und *C. drakei* wurden die Bakterien auch bezüglich Wachstumsverhalten und Produktspektrum untersucht und miteinander verglichen. Um einen Vergleich der Stämme zu ermöglichen, wurden zunächst die Stämme *C. scatologenes* und *C. drakei* in dem für *C. carboxidivorans* verwendeten Tanner-Medium (2.3.2) inkubiert. Für diese Adaptation wurden jeweils 5 mL einer logarithmisch wachsenden Kultur aus dem DSMZ 104b. PY + X Medium in Tanner-Medium mit 30 mM Fructose als Kohlenstoffquelle überimpft. Danach wurden die wachsenden Kulturen zwei weitere Male in frisches Medium überimpft, bevor ein mit diesen Ausgangskulturen beimpfter heterotropher Wachstumsversuch durchgeführt wurde. Das Wachstumsexperiment mit den drei Bakterienstämmen *C. carboxidivorans*, *C. scatologenes* und *C. drakei* fand in 50 mL Tanner-Medium mit 30 mM Fructose statt. Das anaerobe Kulturmedium wurde steril mit Zellsuspension der Vorkulturen auf eine OD_{600} von 0,05 angeimpft. Der Versuch wurde mit biologischen Triplikaten durchgeführt. Die Kulturflaschen wurden je nach Bakterienstamm entweder bei 30 °C oder bei 37 °C inkubiert. Der heterotrophe Wachstumsversuch wurde nach 90 h Fermentationszeit beendet. In Abbildung 3A sind das Wachstumsverhalten der drei Bakterienstämme während der Fermentation sowie die gemessenen Prozessparameter zum Substratabbau und der Produktbildung graphisch aufgetragen. Die OD_{600} aller drei Bakterienstämme steigt von anfänglichen Werten zwischen 0,035 und 0,045 ohne Anlaufphase direkt an. Bis 10 h nach Beginn der Fermentation ist logarithmisches Wachstum bei den drei Stämmen erkennbar. Zum Messzeitpunkt 24 h wurde die maximal gemessene OD_{600} erreicht. Die maximale OD_{600} der Stämme *C. scatologenes* und *C. drakei* lag bei 2,96 und 3,45, die von *C. carboxidivorans* lag mit 1,53 niedriger. Bis zum Ende der Fermentation war kein signifikanter Abfall der OD_{600} messbar. Der gemessene pH-Wert des Kulturmediums lag anfänglich bei 6,25-6,50 und blieb konstant mit Zunahme der OD_{600} bis zum Fermentationszeitpunkt 6 h. Danach ist ein Abfall des pH-Werts bei den Bakterienstämmen *C. carboxidivorans* und *C. scatologenes* erkennbar, der bei *C. drakei* erst nach 10 h Fermentationszeit beginnt. Nach 24 h erreicht der pH-Wert aller Stämme seinen niedrigsten Punkt während der Fermentation und liegt für *C. carboxidivorans* bei 4,9, für *C. scatologenes* bei 5,24 und für *C. drakei* bei 5,28. Der pH-Wert im Kulturmedium ändert sich bis zum Ende der Fermentation wenig, liegt für *C. carboxidivorans* bei 4,9, für *C. scatologenes* bei 5,29 und für *C. drakei* bei 5,4. Dieser Wert nimmt, bei *C. carboxidivorans* um 3 h verzögert, kontinuierlich über die Fermentationszeit ab. Bei *C. drakei* ist bereits nach 24 h keine

Fructose mehr im Medium nachweisbar, *C. scatologenes* verbraucht die Fructose bis zum Ende der Fermentation und bei *C. carboxidivorans* lassen sich nach 90 h Fermentation noch 2,1 mM Fructose im Kulturmedium nachweisen. Die erreichten Produkttiter aller gemessenen Produkte zum Ende des heterotrophen Wachstumsversuchs sind in Abbildung 3B und Tabelle 10 aufgetragen, die anteiligen molaren Produkt-

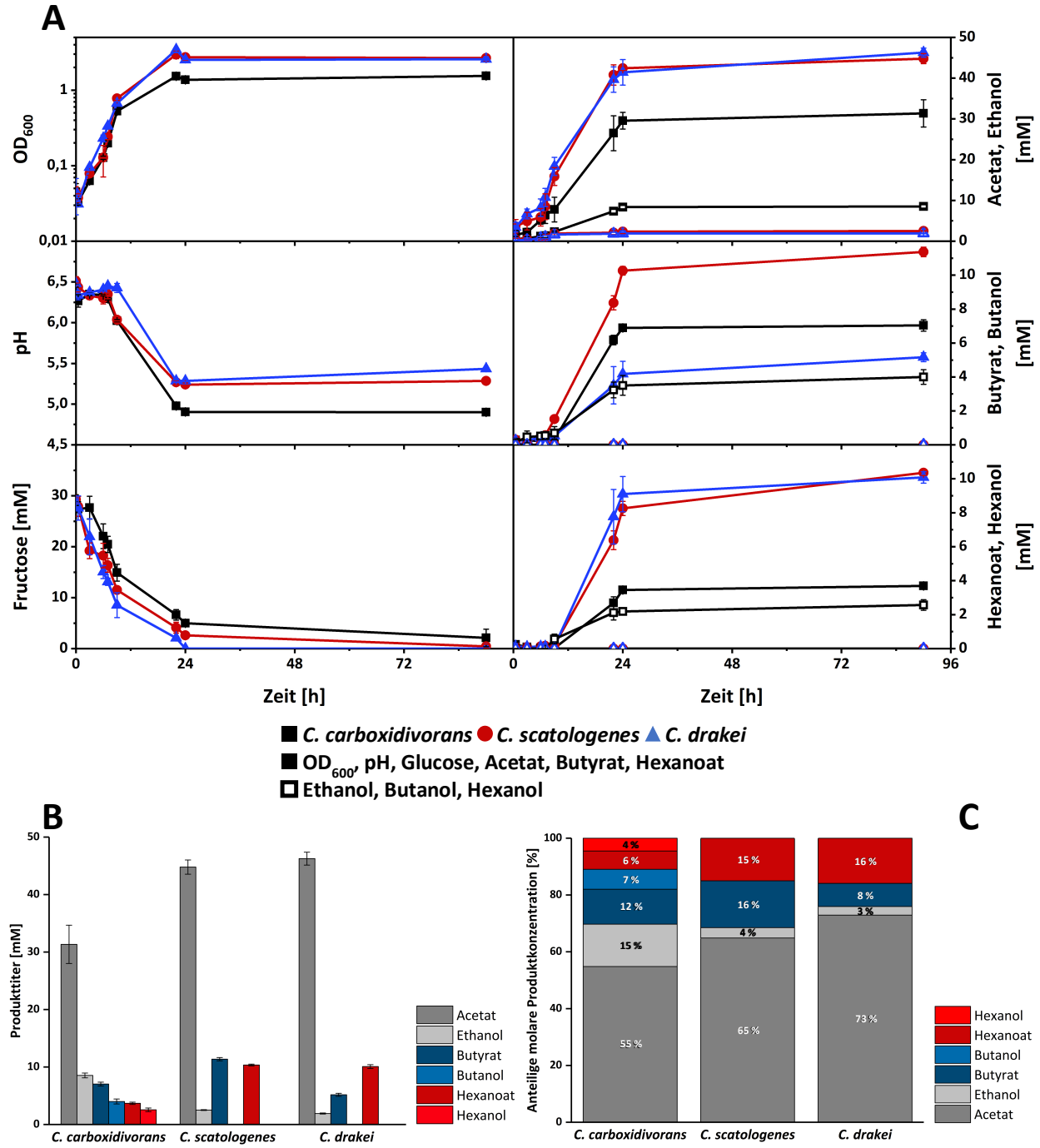


Abbildung 3: Wachstumsverhalten und Produktspektrum von *C. carboxidivorans*, *C. scatologenes* und *C. drakei* unter heterotrophen Bedingungen in 50 mL Tanner-Medium (A), Vergleich der finalen Produkttiter (B) und Darstellung der jeweilig anteiligen molaren Produktkonzentration (C).

konzentrationen in Abbildung 3C. Acetat wurde von den drei Stämmen bis zum Ende der Fermentation am meisten gebildet. Eine starke Zunahme der Acetat-Konzentrationen ist von Beginn an erkennbar, ab 24 h Fermentationszeit bis zum Ende der Fermentation ist der weitere Anstieg gering. *C. carboxidivorans* produziert in der heterotrophen Fermentation weniger Acetat (31,4 mM) als *C. scatologenes* (44,8 mM) und *C. drakei* (46,3 mM), produziert allerdings als einziger Stamm Ethanol (8,5 mM). Bei den anderen beiden Bakterienstämmen wurde im Kulturmedium eine konstante Ethanol-Konzentration zwischen 1,9 mM und 2,5 mM nachgewiesen. Der durch Kettenverlängerungs-Reaktion hergestellte C4-Körper Butyrat wurde ebenfalls von jedem der Bakterienstämme produziert. Hierbei konnte bei *C. scatologenes* die höchste Butyrat-Konzentration gemessen werden (11,4 mM), *C. carboxidivorans* und *C. drakei* produzierten weniger Butyrat (7,0 mM und 5,2 mM). Butanol wird ebenfalls nur von *C. carboxidivorans* gebildet (4 mM). Der C6-Körper Hexanoat wurde von den beiden Stämmen *C. scatologenes* (10,3 mM) und *C. carboxidivorans* (3,7 mM), aber auch von *C. drakei* (10,1 mM) gebildet. *C. carboxidivorans* war als einziger Stamm in der Lage, Hexanol zu produzieren (2,6 mM). Beim Vergleich der anteilig molaren Produktkonzentrationen in Abbildung 3C fällt auf, dass die Stämme *C. scatologenes* und *C. drakei* deutlich mehr C6-Körper produzierten (15-16 %) als *C. carboxidivorans* (10 %). Die Konzentration der C2-Körper nimmt den größten Anteil im gesamten Produktspektrum aller drei Bakterienstämme ein. Bei *C. carboxidivorans* ist das Verhältnis von C2- zu C4- zu C6-Körper kontinuierlich abnehmend, *C. scatologenes* produziert etwa gleich viel Butyrat und Hexanoat und von *C. drakei* wurde in dem heterotrophen Wachstumsexperiment doppelt so viel Hexanoat wie Butyrat produziert.

Zusätzlich zur fermentativen Analyse der drei Bakterienstämme *C. carboxidivorans*, *C. scatologenes* und *C. drakei* unter heterotrophen Wachstumsbedingungen wurde ein Wachstumsexperiment unter autotrophen Bedingungen durchgeführt. Hierbei wurde untersucht, ob die Stämme Hexanoat und Hexanol mit Synthesegas (2.2) in gleichem Maß wie mit Fructose synthetisieren können. Dafür wurden die bereits auf Tanner-Medium (2.3.2) wachsenden Stämme *C. carboxidivorans*, *C. scatologenes* und *C. drakei* in Tanner-Medium mit reduzierter Hefeextrakt-Konzentration (0,5 g/L), Synthesegas (50 % CO, 45 % H_2, 5 % CO_2) als Gasphase und ohne Fructose als weitere C-Quelle kultiviert. Nach Adaptation der Stämme durch dreifaches Überimpfen in frisches Medium wurde der Hauptversuch angeimpft.

Tabelle 10: Übersicht der maximalen OD_{600} und der Produkttiter von *C. carboxidivorans*, *C. scatologenes* und *C. drakei* am Ende der heterotrophen und autotrophen Fermentation.

Produkttiter [mM]	*C. carboxidivorans* hetero-/autotroph	*C. scatologenes* hetero-/autotroph	*C. drakei* hetero-/autotroph
OD_{600}	1,53/1,39	2,96/1,01	3,45/0,85
Acetat	31,4/47,0	44,8/33,0	46,3/30,9
Ethanol	8,5/13,3	2,5/0,8	1,9/0,6
Butyrat	7,0/9,8	11,4/9,2	5,2/9,4
Butanol	4,0/2,2	0,0/0,0	0,0/0,0
Hexanoat	3,7/2,8	10,3/4,1	10,1/6,5
Hexanol	2,6/1,2	0,0/0,0	0,0/0,0

Der autotrophe Wachstumsversuch wurde mit biologischen Triplikaten durchgeführt. Abbildung 4A zeigt den OD_{600}- und pH-Verlauf der drei Stämme *C. carboxidivorans*, *C. scatologenes* und *C. drakei*. Alle Kulturflaschen wurden auf eine OD_{600} von 0,1 angeimpft und 168 h bei 30 °C bzw. 37 °C schüttelnd inkubiert. Während des autotrophen Wachstumsversuchs wurde der auf anfänglich 1,0 bar eingestellte Überdruck in den Kulturflaschen mittels Manometer überwacht. Bei einem Druckabfall auf unter 0,5 bar Überdruck wurden die Kulturflaschen erneut mit Synthesegas auf einen Überdruck von 1,0 bar begast, sodass keine Limitierung durch Substratmangel das Wachstum der Zellen hemmen konnte. Die OD_{600} der drei Bakterienstämme erhöhte sich nach Beimpfung des Mediums konstant. *C. scatologenes* erreichte bereits nach 48 h die maximale OD_{600} und ging bei einem Wert von 1,01 in die stationäre Wachstumsphase über. Das logarithmische Wachstum der Stämme *C. carboxidivorans* und *C. drakei* war nach 72 h Inkubationszeit beendet. Die maximal erreichte OD_{600} von *C. drakei* war 0,85. *C. carboxidivorans* erreichte die höchste gemessene OD_{600} bei einem Wert von 1,39. Innerhalb der 168 h Inkubationszeit war keine Absterbephase bei den Bakterienstämmen erkennbar. Der pH-Wert der Kulturen lag zu Beginn des Versuchs zwischen 6,28 und 6,45 und begann nach 24 h und bis zum Fermentationszeitpunkt 72 h, sich zu verringern. Der gemessene pH-Wert von *C. carboxidivorans* war zum Ende des Versuchs mit einem Wert von 5,15 am niedrigsten. Die Kulturen von *C. scatologenes* und *C. drakei* erreichten einen pH-Wert von 5,41 und 5,45. Ein erneuter Anstieg des pH-Werts war bei keiner Kultur messbar. In Abbildung 4B und Tabelle 10 werden die final gemessenen Produkttiter am Ende des

autotrophen Wachstumsversuchs zusammengefasst. *C. carboxidivorans* hat mit einem Wert von 47 mM am meisten Acetat unter autotrophen Bedingungen hergestellt. Die Stämme *C. scatologenes* und *C. drakei* haben während der Fermentation 33 mM bzw. 31 mM Acetat produziert. Eine signifikante Ethanol-Produktion konnte mit 13,3 mM beim Stamm *C. carboxidivorans* gemessen werden. Bei den Stämmen *C. scatologenes* und *C. drakei* wurden Ethanol-Konzentrationen von 0,8 mM bzw. 0,6 mM im Kulturmedium bestimmt, die während der gesamten Fermentation konstant blieben. Butyrat wurde von allen drei Stämmen gebildet. Der C4-Körper wurde von den Stämmen *C. carboxidivorans* (9,8 mM), *C. scatologenes* (9,2 mM) und *C. drakei* (9,4 mM) in einer ähnlich hohen Konzentration hergestellt. Butanol-Produktion wurde nur bei *C. carboxidivorans* (2,2 mM) gemessen. Hexanoat-Produktion konnte ebenfalls bei allen drei Bakterienstämmen nachgewiesen werden. Der Stamm *C. drakei* produzierte mit 6,5 mM am meisten Hexanoat. *C. scatologenes* (4,1 mM) und *C. carboxidivorans* (2,8 mM) produzierten unter autotrophen Bedingungen weniger Hexanoat als *C. drakei*. Bei *C. carboxidivorans* war

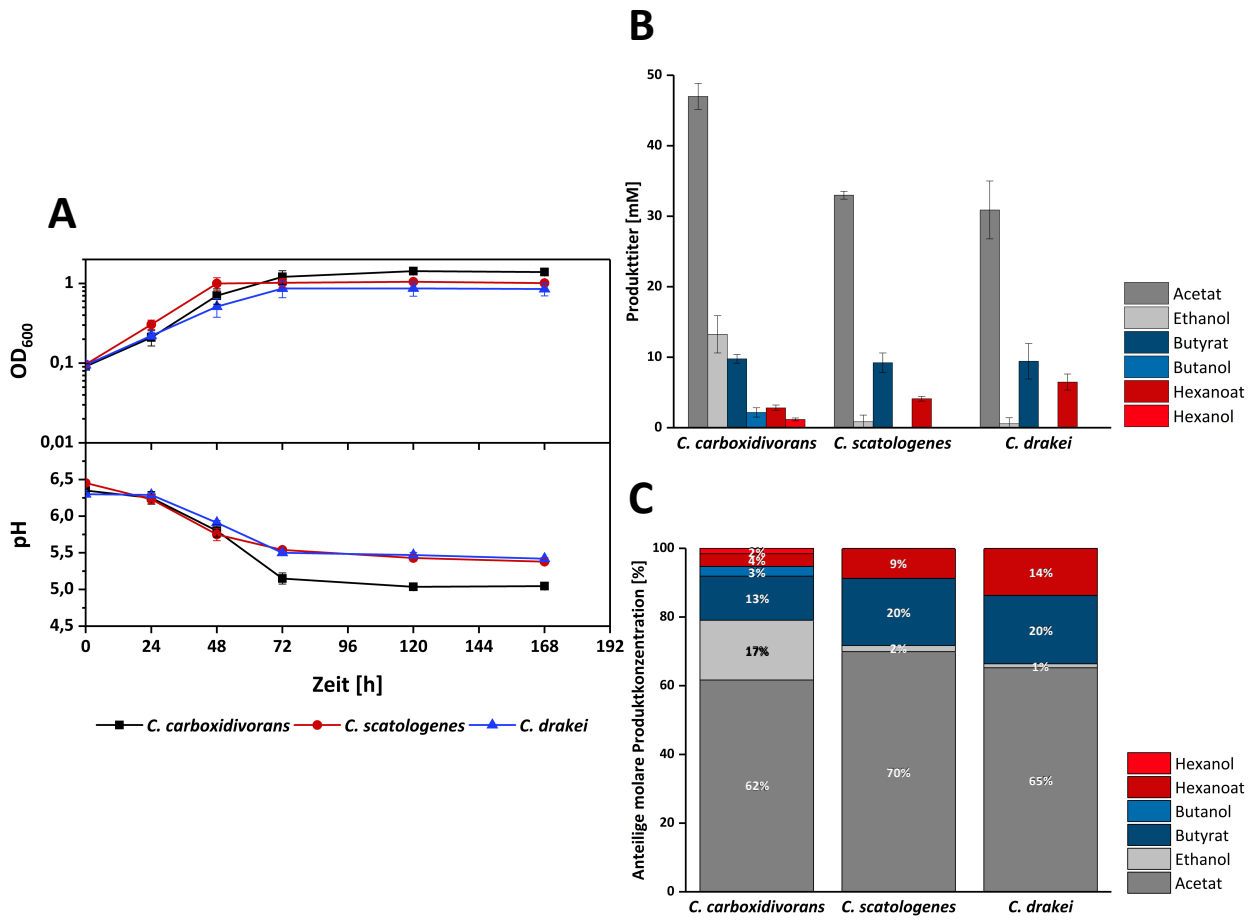


Abbildung 4: Wachstumsverhalten und Produktspektrum der Stämme *C. carboxidivorans*, *C. scatologenes* und *C. drakei* unter autotrophen Bedingungen in 50 mL Tanner-Medium (A), Vergleich der finalen Produkttiter (B) und Darstellung der jeweilig anteiligen molaren Produktkonzentration (C) (Wirth und Dürre, 2021).

zusätzlich die Produktion von 1,2 mM Hexanol nachweisbar. Bezieht man, wie in Abbildung 4C dargestellt, die einzelnen molaren Produktkonzentrationen auf die Gesamtmenge an produzierten Metaboliten, so war bei der autotrophen Kultivierung der Anteil an C2-Körpern bei *C. carboxidivorans* mit 79 % am höchsten. Bei *C. scatologenes* und *C. drakei* lag der Anteil bei 72 % bzw. 66 %. Der molare Anteil an C4-Körpern liegt bei *C. scatologenes* und *C. drakei* mit einem Wert von 20 % gleich hoch, bei *C. carboxidivorans* mit 16 % etwas niedriger. Anteilig am meisten C6-Körper wurden unter autotrophen Bedingungen durch *C. drakei* produziert (14 %). Der Anteil bei *C. scatologenes* lag mit 9 % niedriger. Bei *C. carboxidivorans* war der molare Anteil der C6-Körper mit insgesamt 6 % des gesamt gemessenen Produktspektrums am niedrigsten. Setzt man die anteilig molaren Produktkonzentrationen der C2-, C4- und C6-Körper bei den Stämmen miteinander in Bezug, fällt auf, dass bei allen drei Bakterienstämmen die Produktkonzentration mit Anzahl der Kohlenstoffatome abnimmt.

3.2 Die genetische Zugänglichkeit von *C. carboxidivorans*

Der acetogene Bakterienstamm *C. carboxidivorans* wurde aufgrund der Fähigkeit, bei der Fermentation signifikante Mengen an Hexanoat und Hexanol zu produzieren (Phillips *et al.*, 2015), ausgewählt, um den Stoffwechselweg zum C6-Körper bei acetogenen Bakterien entschlüsseln und optimieren zu können. Für die Analyse und Optimierung des Stoffwechselwegs durch Regulation, Überexprimierung oder Inaktivierung einzelner Gene ist es erforderlich, den Stamm *C. carboxidivorans* genetisch zugänglich zu machen.

3.2.1 Das Restriktions- und Modifikationssystem von *C. carboxidivorans*

Zu Beginn der Untersuchung der genetischen Zugänglichkeit von *C. carboxidivorans* wurde der Stamm auf ein vorhandenes Restriktions- und Modifikationssystem (RM-System) hin untersucht. Da ein vorhandenes RM-System aktiv die stabile Einbringung fremder DNA in einen Zielorganismus verhindern kann (Pyne *et al.*, 2014), wurde zunächst eine *in silico*-Analyse der Genomsequenz von *C. carboxidivorans* durchgeführt. Mit „The Restriction Enzyme Database“ (REBASE®; Roberts *et al.*, 2010) (2.13) wurden potentielle Restriktionsenzyme von *C. carboxidivorans* analysiert. Tabelle 11 zeigt eine Auflistung der von REBASE® identifizierten RM-Systeme in der Genomsequenz von *C. carboxidivorans* mit Angabe des offenen Leserasters (OLR), dazugehöriger Annotation

Tabelle 11: Von REBASE® identifizierte RM-Systeme in der Genomsequenz von *C. carboxidivorans.*

Offenes Leseraster (OLR)	Bezeichnung der codierenden Sequenzen	spezifische Erkennungssequenz
Typ I		
3565	CcaP7IIP (R)	CCANNNNNNNNTCG
3570	M.CcaP7II (M)	CCANNNNNNNNTCG
3575	S.CcaP7II (S)	CCANNNNNNNNTCG
11960	S.CcaP7I (S)	CAYNNNNNCTGC
11965	M.CcaP7I (M)	CAYNNNNNCTGC
11975	CcaP7IP (R)	CAYNNNNNCTGC
24300	CcaP7IIIP (R)	GCANNNNNNNTNNCG
24305	S.CcaP7III (S)	GCANNNNNNNTNNCG
24310	M.CcaP7III (M)	GCANNNNNNNTNNCG
Typ II		
7120	CcaP7ORF7120P (RM)	-
16660	M.CcaP7ORF16660P (RM)	CTSAG
23805	CcaP7ORF23805P (RM)	-
Typ III		
8700	CcaP7ORF8705P (R)	-
8705	M.CcaP7ORF8705P (M)	-
Typ IV		
3495	CcaP7ORF3495P (R)	-
3515	CcaP7McrB2P (R)	-
3525	CcaP7MCRBP (R)	-

N: G, A, C oder T; Y: C oder T; S: G oder C

und sofern vorhanden der spezifischen Erkennungssequenz. Mit der Datenbank „Integrated Microbial Genomes Expert Review“ (IMG ER; Markowitz *et al.*, 2014) konnten anhand ihrer Annotation dieselben RM-Systeme im Genom von *C. carboxidivorans* gefunden werden. Daneben konnten keine weiteren Restriktionsenzyme anhand der Genomsequenz identifiziert werden. Insgesamt wurden zehn potentielle RM-Systeme in der Genomsequenz gefunden. Jeweils drei RM-Systeme konnten dem Typ I, Typ II und Typ IV zugeordnet werden, ein RM-System dem Typ III. RM-Systeme bestehen je nach Typ aus ein bis drei OLR/Untereinheiten (UE): *hsdS* (DNA-Sequenz-Spezifität, S), *hsdM* (Methyl-Transferase-Aktivität, M) und *hsdR* (Endonuklease-Aktivität, R) (Bickle und Krüger, 1993). Die in Tabelle 11 aufgeführten RM-Systeme in der Genomsequenz von *C. carboxidivorans* konnten mit allen für die Aktivität notwendigen Untereinheiten nachgewiesen werden. Zu den drei RM-Systemen des Typs I sowie einem RM-System des Typs II konnte die Datenbank REBASE® Erkennungssequenzen ausgeben.

Die *in silico*-Analyse der Genomsequenz gab Hinweise auf bis zu zehn potentielle RM-Systeme in *C. carboxidivorans*. Die Gene für die Restriktionsenzyme könnten konstitutiv oder durch unterschiedliche Bedingungen gesteuert exprimiert werden. Bei einem aktiven RM-System kann die Einbringung fremder, ungeschützter DNA in den Stamm verschlechtert oder komplett verhindert werden (Pyne *et al.*, 2014).

Die Aktivität eines RM-Systems kann für Restriktionsendonukleasen des Typs II mit einer von Whitehead und Brown (1985) publizierten Methode nachgewiesen werden. Der Nachweis wurde mit Zellextrakt von *C. carboxidivorans* nach der in Kapitel 2.10

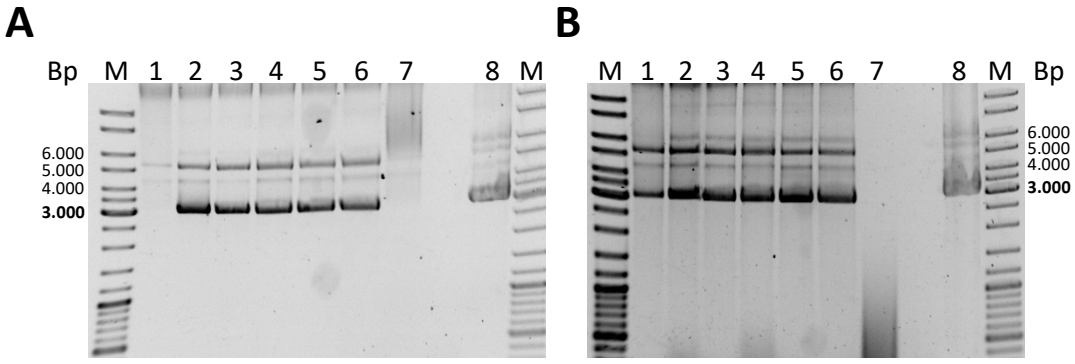


Abbildung 5: Ergebnis des Typ II-Restriktionstests zur Untersuchung des RM-Systems von *C. carboxidivorans* mit Zellextrakt aus der logarithmischen (A) und stationären (B) Wachstumsphase. Inkubation des Plasmids pMTL83151 mit *C. carboxidivorans*-Zellextrakt und verschiedenen kommerziell erwerblichen Reaktionspuffern: 1, FastDigest; 2, CutSmart; 3, Blue; 4, Green; 5, Orange; 6, Red. In 7 wurde Zellextrakt mit Puffer Blue ohne pMTL83151 aufgetragen, in 8 pMTL83151 ohne Zellextrakt und in M der GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

beschriebenen Methode durchgeführt. Untersucht wurde Zellextrakt von *C. carboxidivorans* aus der logarithmischen und der stationären Wachstumsphase. Abbildung 5 zeigt das Ergebnis des durchgeführten Typ II-Restriktionstests. Nach 4 h Inkubation bei 37 °C zur Durchführung des Tests wurden zwei Agarosegele mit Proben aus der logarithmischen (Abbildung 5A) und stationären (Abbildung 5B) Wachstumsphase beladen und eine Agarose-Gelelektrophorese (2.7.8) durchgeführt. In den Geltaschen 1 bis 6 wurden die Reaktions-Ansätze mit Zellextrakt, dem Plasmid pMTL83151 (2.1.2) und verschiedenen Reaktionspuffern für kommerziell erwerbliche Restriktionsendonukleasen aufgetragen. In Geltasche 7 wurde nur Zellextrakt mit Puffer „Blue“ aufgetragen und in Geltasche 8 lediglich das aufgereinigte Plasmid pMTL83151. Die in Geltasche 8 aufgetragene Kontrolle zeigte vier voneinander abgegrenzte Banden auf Höhe des Größenmarkers (M) zwischen 3.000 Bp und 6.000 Bp. Dieselben Banden waren bei den in den Geltaschen 2 bis 6 aufgetragenen Proben aus der logarithmischen Wachstumsphase zu erkennen. In Spur 1 fehlt die unterste Bande bei ca. 3.000 Bp. In den Spuren 1 bis 6 des Agarosegels mit den Proben aus der stationären Wachstumsphase sind ebenfalls Banden auf denselben Höhen wie in Spur 8 erkennbar. Kleinere DNA-Fragmente sind in keiner der Spuren 1 bis 6 der beiden Agarosegele erkennbar. Ein aktives RM-System des Typs II konnte somit bei *C. carboxidivorans* unter den getesteten Bedingungen nicht nachgewiesen werden.

3.2.2 Transformation von *C. carboxidivorans* via Elektroporation oder Konjugation

Versuche zur Transformation des C6-Körper-produzierenden acetogenen Bakterienstamms *C. carboxidivorans* wurden durchgeführt, nachdem keine aktiven Typ II-Restriktionsendonukleasen im Zellextrakt von *C. carboxidivorans* nachweisbar waren (3.2.1). Eine Verminderung der Transformationseffizienz oder Verhinderung der erfolgreichen Transformation durch aktive RM-Systeme des Typs I, III oder IV war aufgrund der Befunde bei der *in silico*-Analyse der Genomsequenz von *C. carboxidivorans* nicht ausschließbar.

Zunächst wurde die Möglichkeit untersucht, den Wildtyp-Stamm *C. carboxidivorans* durch Elektroporation zu transformieren. Hierfür wurden Plasmide der pMTL80000er-Serie verwendet (Heap *et al.*, 2009). Die eingesetzten vier Schaukelvektoren pMTL(82-85)151 unterscheiden sich in ihrem Replikationsursprung für Gram-positive Bakterien (2.1.2). Zur Selektion rekombinanter Bakterien tragen die Vektoren ein

Resistenzgen für die Antibiotikaresistenz gegen Thiamphenicol. Versuche zur Transformation des Stamms *C. carboxidivorans* durch Elektroporation erfolgten anfänglich in zehnfachen Ansätzen nach der durch Leang *et al.* (2013) für den Stamm *C. ljungdahlii* beschriebenen Methode (2.8.4). Die Schaukelvektoren wurden in *E. coli* XL1-Blue MRF' (2.1.1) repliziert und anschließend in aufgereinigter Form eingesetzt (2.7.2). Als Kontrolle wurden bei jedem Versuch zur Transformation von *C. carboxidivorans* drei Elektroporationsansätze mit *C. ljungdahlii* mitgeführt. Nach der Regeneration der Zellen wurde Thiamphenicol (15 µg/mL) zur Selektion auf Plasmid-tragende Zellen hinzugegeben. Beim Stamm *C. carboxidivorans* konnte daraufhin kein weiterer Anstieg der OD_{600} innerhalb von 360 h Inkubationszeit gemessen werden. Die OD_{600} bei den Versuchsansätzen mit *C. ljungdahlii* erhöhte sich nach maximal 144 h Inkubationszeit. Versuche zur Elektroporation von *C. carboxidivorans* wurden, nach dem Protokoll von Leang *et al.* (2013), mit demselben Ergebnis weitere sechs Mal wiederholt.

Mit dem verwendeten Elektroporations-Protokoll (Leang *et al.*, 2013) konnte kein rekombinanter Stamm von *C. carboxidivorans* generiert werden. Deshalb wurden weitere Versuche zur Elektroporation des Stamms nach dem von Molitor *et al.* (2016a) beschriebenen Protokoll mit den Plasmiden der pMTL80000er-Serie durchgeführt (2.8.4). Hierbei wurden acht Elektroporationsexperimente mit je zehn Ansätzen durchgeführt. Bei keiner der 80 *C. carboxidivorans*-Kulturen konnte nach Zugabe des Thiamphenicols eine weitere Erhöhung der OD_{600} gemessen werden. Die korrekte Durchführung der Experimente konnte durch je drei zusätzliche Versuchsansätze mit *C. ljungdahlii* bestätigt werden.

Da mit den verwendeten Elektroporations-Protokollen kein rekombinanter *C. carboxidivorans*-Stamm generiert werden konnte, wurden weitere Parameter bei der Durchführung des Versuchs verändert und getestet. Zunächst wurden die Zellen bei unterschiedlichen OD_{600}-Werten (0,3; 0,5; 0,8; 1,2) geerntet. In weiteren Versuchen wurden unterschiedliche Mengen Plasmid-DNA eingesetzt (1 µg; 2,5 µg; 5 µg). Außerdem wurde getestet, ob verschiedene Regenerationszeiten (Wachstum bis OD_{600} 0,4; 0,8; 1,2) einen Einfluss auf die Transformierbarkeit von *C. carboxidivorans* haben. Die getesteten Variationen und die Anzahl der durchgeführten Elektroporationsansätze sind Tabelle 12 zu entnehmen. Die genannten Änderungen in der Durchführung der Elektroporation mit *C. carboxidivorans* führten nicht zur erfolgreichen Transformation des Stamms.

Tabelle 12: Übersicht aller getesteten Varianten zur Transformation von *C. carboxidivorans* mittels Elektroporation und Konjugation.

	Variante	Anzahl der Versuchsansätze
Elektroporation	**Durchführung nach Leang *et al.* (2013)**	120
	OD_{600} Zellernte (0,3; 0,5; 0,8; 1,2)	48
	Plasmid-DNA (1; 2,5; 5 μg)	72
	Regenerationszeit (OD_{600} 0,4; 0,8; 1,2)	72
	Transformation nicht-methylierter DNA	40
	Einsatz von TypeONE™ Restriction Inhibitor	40
	Durchführung nach Molitor *et al.* (2016a)	80
Konjugation	**Durchführung nach adaptiertem Protokoll**	50
	OD_{600} Zellernte (0,25; 0,5; 0,75)	40
	Eingesetzte Menge *E. coli* CA434 (1; 2; 4 mL)	36
	Regenerationszeit (4; 8; 16; 24 h)	48
	Durchführung nach Roberts *et al.* (2001)	64

Für den Bakterienstamm *Clostridium pasteurianum* NRRLB-598 wurde beschrieben, dass eine erfolgreiche Transformation des Stamms nur dann möglich ist, wenn der eingesetzte Schaukelvektor nicht dam- oder dcm-methyliert vorliegt (Kolek *et al.*, 2016). Zum Ausschließen desselben Effekts bei der Transformation von *C. carboxidivorans* wurden die vier Plasmide der pMTL80000er-Serie in den Stamm *E. coli* SCS110 transformiert (2.1.1). Dieser repliziert die Plasmid-DNA ohne dam- bzw. dcm-Methylierung. Der Einsatz nicht-methylierter Schaukelvektoren führte in 40 Elektroporationsansätzen mit dem Protokoll von Leang *et al.* (2013) ebenfalls nicht zu einer erfolgreichen Transformation des Stamms *C. carboxidivorans* (Tabelle 12).

In der Genomsequenz von *C. carboxidivorans* konnten drei potenzielle RM-Systeme des Typs I identifiziert werden (3.2.1). Da mit dem durchgeführten Typ II-Restriktionstest der Nachweis aktiver Typ I-Restriktionsendonukleasen nicht möglich ist, könnten diese eine erfolgreiche Transformation des Stamms *C. carboxidivorans* verhindern. Um den Abbau fremder DNA nach der Elektroporation von *C. carboxidivorans* zu verhindern, wurde deshalb der „TypeONE™ Restriction Inhibitor“ (Epicentre, Madison, WI, USA)

verwendet. In insgesamt 40 Elektroporations-Ansätzen wurde der Inhibitor nach Angaben des Herstellers zusammen mit der Plasmid-DNA bei der Elektroporation eingesetzt (Walkinshaw *et al.*, 2002). Bei der wiederholten Durchführung mit Zugabe des „TypeONE™ Restriction Inhibitor“ konnte kein rekombinanter *C. carboxidivorans*-Stamm generiert werden.

Eine erfolgreiche Transformation durch Elektroporation ist nur dann möglich, wenn die Plasmid-DNA durch den Elektropuls in die Zelle eindringen kann. Für die Überprüfung der Membranpermeabilität während der Elektroporation von *C. carboxidivorans* wurde deshalb „Texas Red™“-markiertes Dextran (70 kDa) anstelle von Plasmid-DNA eingesetzt. Diese Methode (2.9) wurde bereits für thermophile Gram-positive anaerobe Bakterien eingesetzt (Lin *et al.*, 2010). Zur Gegenfärbung toter Zellen wurde „SYTOX™ Green Nucleic Acid Stain“ eingesetzt (2.9). Abbildung 6 zeigt Aufnahmen von *C. carboxidivorans*-Zellen nach der Durchführung des Versuchs zum Nachweis der Membranpermeabilität unter dem Fluoreszenzmikroskop (2.12.1). Das Fluoreszenz-markierte Dextran und der Farbstoff „SYTOX™ Green“ wurden wie in der Veröffentlichung beschrieben vor der Elektroporation zu den Zellen hinzugegeben. Verglichen wurde die Durchführung der Elektroporation von *C. carboxidivorans* nach dem Protokoll von Leang *et al.* (2013) ohne (Abbildung 6A) und mit (Abbildung 6B) Elektropuls, sowie die Durchführung nach dem Protokoll von Molitor *et al.* (2016a) (Abbildung 6C). Gezeigt wird jeweils die Aufnahme eines Probenausschnitts mit Phasenkontrast, bei einer Anregungswellenlänge von 595 nm (Texas Red™), bei einer Anregungswellenlänge von 504 nm (SYTOX™ Green) und eine Überlagerung der Aufnahmen. Gut zu erkennen ist, dass bei der Durchführung ohne Elektropuls (Abbildung 6A) keine rot-fluoreszierenden Zellen erkennbar sind. Ein Teil der abgebildeten Zellen leuchtet grün und stellt somit Zellen dar, deren Zellmembran dauerhaft geschädigt ist. Das außerhalb der Zellen vorliegende Kulturmedium fluoresziert nicht. Bei der Durchführung der Membranpermeabilität mit Elektropuls (Abbildung 6B & Abbildung 6C) sind sowohl rot- als auch grün-fluoreszierende *C. carboxidivorans*-Zellen erkennbar. Das „Texas Red™“-markierte Dextran konnte demnach die Zellmembran während der Elektroporation passieren. Zellen, die beide Farbstoffe tragen und somit gelblich fluoreszieren, sind sporadisch erkennbar.

Die Auswertung der Fluoreszenz-Aufnahmen (Abbildung 6) ermöglicht eine Bestimmung der Effizienz der eingesetzten Elektroporations-Protokolle bei der Membranpermeabilität von *C. carboxidivorans*. Hierfür wurden jeweils 300 Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Abbildung 7 zeigt den Einfluss verschiedener Elektroporationsprotokolle auf die Einbringung von „Texas Red™"-markiertem Dextran in den Stamm *C. carboxidivorans*. Zellen, die während des Färbeschritts mit „SYTOX™ Green" bereits tot waren, machen beim Ansatz nach Leang *et al.* (2013) ohne Elektropuls

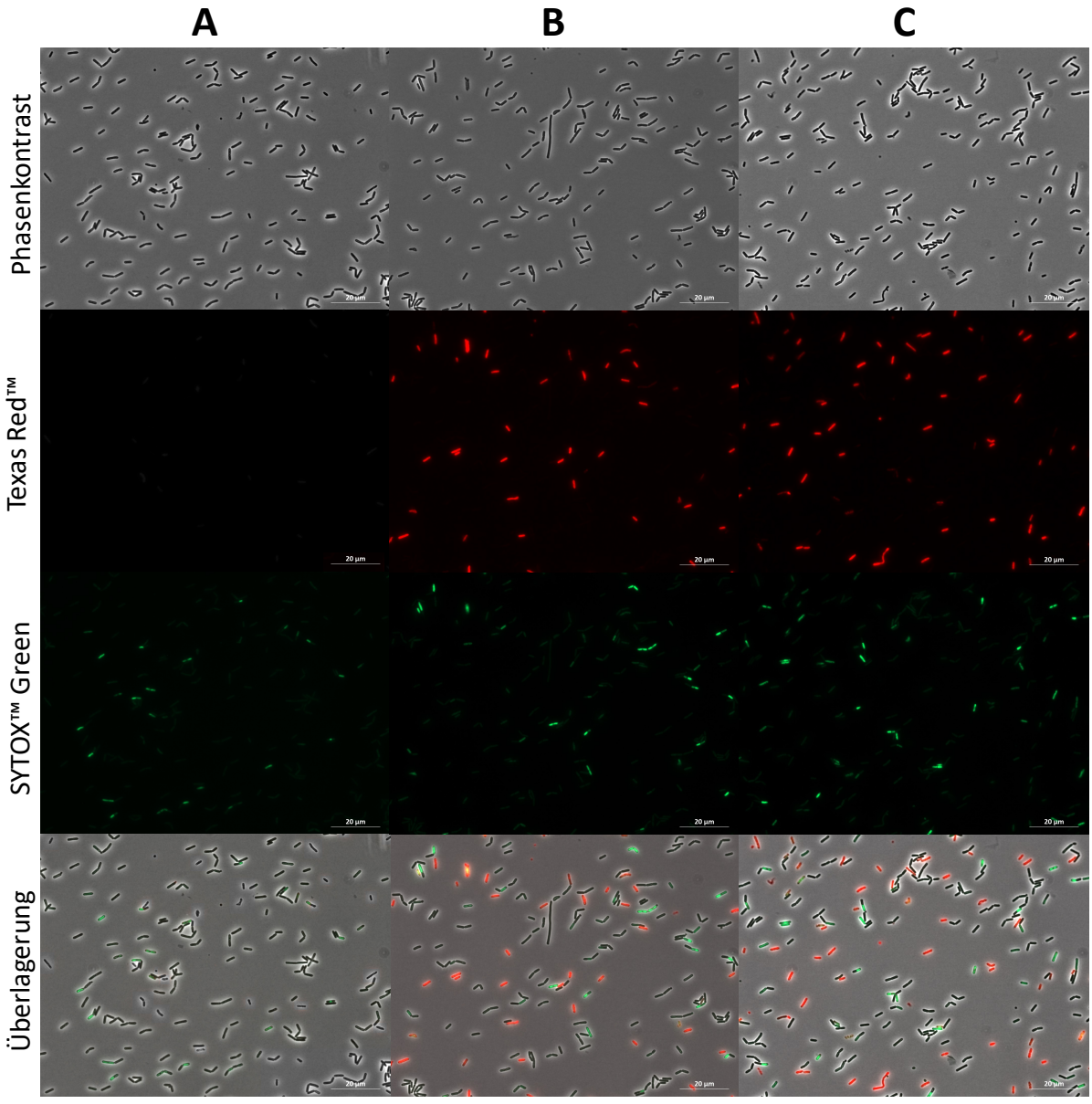


Abbildung 6: Einbringung von „Texas Red™"-markiertem Dextran (70 kDa) in den Stamm *C. carboxidivorans* zur Analyse der Membranpermeabilisierung während der Elektroporation und Gegenfärbung mit „SYTOX™ Green" zur Ermittlung der Zellviabilität. Verglichen wurden Zellfärbung ohne Elektropuls **(A)**, bei Durchführung des Standardprotokolls zur Elektroporation nach Leang *et al.* (2013) **(B)** und nach Molitor *et al.* (2016a) **(C)**.

10,5 % ± 2,6 %, mit Elektropuls 14,3 % ± 2,8 % und beim Ansatz nach Molitor *et al.* (2016a) 22,7 % ± 2,9 % der untersuchten Zellen aus. Bei der Durchführung ohne Elektropuls konnten keine rot-fluoreszierenden Zellen gefunden werden. Nach der Durchführung der Prozedur mit Elektropuls fluoreszierten 17,0 % ± 2,8 % (Leang *et al.*, 2013) bzw. 32 % ± 4,2 % (Molitor *et al.*, 2016a) der *C. carboxidivorans*-Zellen durch das eingebrachte „Texas Red™"-markierte Dextran unter dem Fluoreszenzmikroskop rot.

Da eine unzureichende Membranpermeabilisierung bei der Elektroporation nach der Untersuchung mit „Texas Red™"-markiertem Dextran auszuschließen war und sich durch Elektroporation kein rekombinanter *C. carboxidivorans*-Stamm herstellen ließ, wurden Konjugationsexperimente durchgeführt. Bei der Konjugation wird Plasmid-DNA von einem Donorstamm zum Beispiel nach dem Rolling-circle-Prinzip (pCD6 und pIM13) in den Rezipientenstamm übertragen (bei pBP1 und pCB102 nicht bekannt; Yu *et al.*, 2012). Für die Einbringung von Fremd-DNA mittels Konjugation in den Stamm *C. carboxidivorans* wurden die vier Schaukelvektoren der pMTL80000er-Serie verwendet (2.1.2), die zuvor in den zur Konjugation eingesetzten Donorstamm *E. coli* CA434 transformiert wurden. Die Vektoren tragen das für die Übertragung bei der Konjugation notwendige OLR *traJ* und oriT (Heap *et al.*, 2009). Als Kontrolle wurde bei jedem Konjugationsexperiment der Stamm *C. ljungdahlii* mitgeführt. Die durchgeführte Methode wurde von den durch Purdy *et al.* (2002) und Williams *et al.* (1990) beschriebenen Protokollen adaptiert (2.8.6). Die Durchführung der

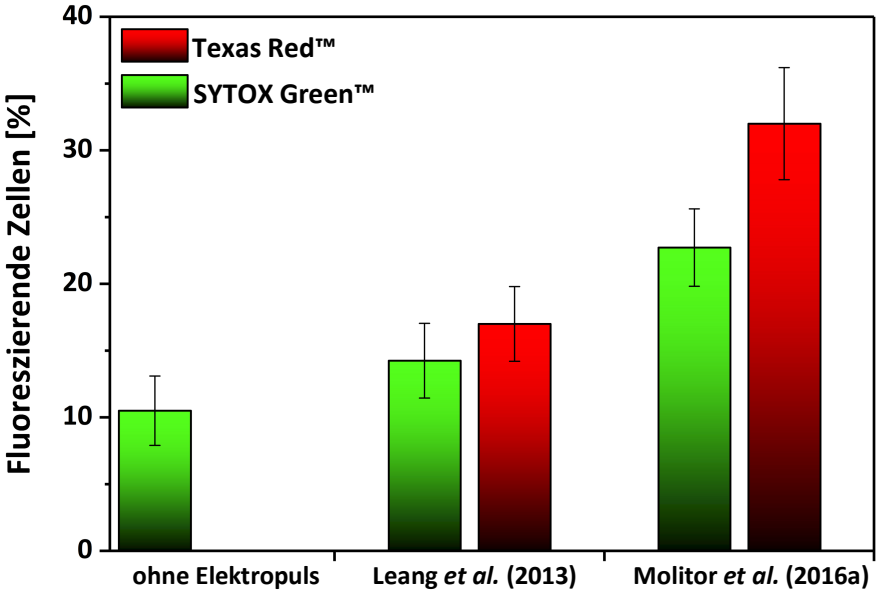


Abbildung 7: Einfluss verschiedener Elektroporationsprotokolle auf die Einbringung von „Texas Red™"-markiertem Dextran in den Stamm *C. carboxidivorans* und der durch „SYTOX™ Green" bestimmte Anteil toter Bakterien.

Konjugationsexperimente fand, zusammen mit den Schaukelvektoren pMTL(82-85)151, in biologischen Triplikaten statt. Bei der eingesetzten Methode zur Konjugation von *C. carboxidivorans* konnten auf den ersten Selektionsplatten durchschnittlich 10-25 wachsende Kolonien nach 4-6 Tagen Inkubationszeit gezählt werden. Die wachsenden Zellen ließen sich unter dem Lichtmikroskop (2.12.1) *C. carboxidivorans* zuordnen. Als Kontrolle wurde der Stamm *E. coli* CA434 in jedem Versuch separat auf eine Selektionsplatte mit Colistin ausplattiert. Wachsende *C. carboxidivorans*-Kolonien wurden entweder weiter vereinzelt oder in Flüssigmedium inokuliert. Nach jeder neuen Vereinzelung mit anschließender Inkubation konnten weniger oder gar keine neuen Kolonien mehr auf den Platten gezählt werden. Wachstum vermeintlich rekombinanter *C. carboxidivorans*-Stämme konnte in keinem beimpften Flüssigmedium mit den Antibiotika Colistin und Thiamphenicol beobachtet werden. In beimpftem Kulturmedium ohne Antibiotika war es dem Stamm *C. carboxidivorans* möglich, sich zu vermehren. Ein eingebrachtes Plasmid konnte erwartungsgemäß nicht nachgewiesen werden. Zur Optimierung des Konjugations-Protokolls wurden unterschiedliche Zeitpunkte zur Zellernte von *C. carboxidivorans* getestet (OD_{600} 0,25; 0,5; 0,75). Daneben wurden weitere Parameter wie die eingesetzte Menge des Donorstamms *E. coli* CA434 (1 mL; 2 mL; 4 mL) und die Regenerationszeit (4 h; 8 h; 16 h; 24 h) variiert. Zusätzlich wurde die von Roberts *et al.* (2001) beschriebene Methode zur Konjugation mit Einsatz von Filterpapier (0,45 μm Porengröße), platziert auf einer LB-Agarplatte, in 64 Versuchs-Ansätzen getestet. Bei keiner der getesteten Varianten zur Konjugation von *C. carboxidivorans* konnte ein stabiler rekombinanter Bakterienstamm hergestellt werden. Tabelle 12 zeigt eine Zusammenfassung der bei verschiedenen Versuchsparametern durchgeführten Versuchsansätze zur Konjugation von *C. carboxidivorans*.

3.2.3 Homologe Rekombination mit *C. carboxidivorans*

C. carboxidivorans erwies sich bei den durchgeführten Elektroporations- und Konjugationsexperimenten als nicht genetisch zugänglich. Bei der Einbringung fremder DNA mittels Konjugation konnte eine mögliche Instabilität des Plasmids im Rezipientenstamm aufgezeigt werden. Ein weiterer Ansatz, um *C. carboxidivorans* genetisch zugänglich zu machen, ist homologe Rekombination. Homologe Rekombination, der Einbau fremder DNA in die chromosomale DNA, funktioniert unabhängig von der Replikation der eingebrachten Plasmid-DNA im Zielorganismus. Eine Methode zur homologen Rekombination wurde bereits für den Modellorganismus *C. ljungdahlii* etabliert (Leang *et al.*, 2013).

Für die Durchführung homologer Rekombination mit dem Stamm *C. carboxidivorans* wurde zunächst ein Gen zur Inaktivierung ausgewählt. *C. carboxidivorans* besitzt im Gegensatz zu den nächst verwandten Bakterien *C. scatologenes* und *C. drakei* das in der Genomsequenz annotierte Gen *aor* (Ga0111308_1113694), welches für eine Aldehyd:Ferredoxin-Oxidoreduktase codiert. Es besteht die Möglichkeit, dass der Stamm *C. carboxidivorans* aufgrund dieses Proteins dazu in der Lage ist, nicht nur Hexanoat, sondern auch den entsprechenden Alkohol Hexanol zu produzieren. Eine erfolgreiche Inaktivierung des Gens mittels homologer Rekombination könnte demnach physiologisch durch ein verändertes Produktspektrum nachweisbar sein. Die Konstruktion der hierfür verwendeten Plasmide wird in Abbildung 8 dargestellt. Eine etwa 4.000 Bp lange DNA-Sequenz vor und hinter dem Gen *aor* aus *C. carboxidivorans*

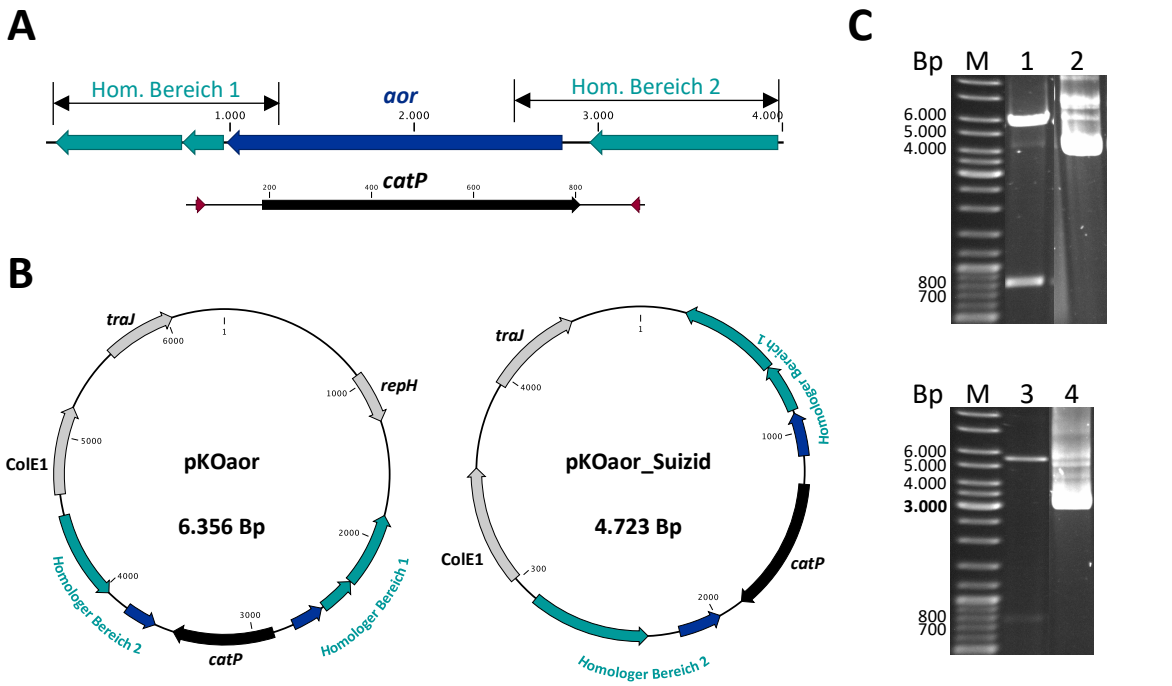


Abbildung 8: Klonierung der Plasmide pKOaor und pKOaor_Suizid für homologe Rekombination in *C. carboxidivorans*. A: Homologe Genregionen stromaufwärts und -abwärts des Gens *aor* in *C. carboxidivorans* und eingebrachte *catP*-Resistenzkassette. **B:** Schematische Darstellung der klonierten Plasmide pKOaor und pKOaor_Suizid. ColE1, Replikationsursprung für Gram-negative Bakterien; *traJ*, Transfer-Funktion für Konjugation; *repH*, Replikationsursprung für Gram-positive Bakterien; *catP*, Chloramphenicol-Acetyltransferase. **C:** Restriktionsverdau zum Nachweis des Klonierungserfolgs für Plasmid pKOaor mit den erwarteten Fragmentgrößen 5.594 Bp und 770 Bp in Spur 1 und für Plasmid pKOaor_Suizid mit erwarteten Fragmentgrößen 3.961 Bp und 770 Bp in Spur 3. M, GeneRuler™ DNA Ladder Mix; 1, Plasmid pKOaor nach Restriktionsverdau; 2, Plasmid pKOaor unverdaut; 3, Plasmid pKOaor_Suizid nach Restriktionsverdau; 4, Plasmid pKOaor_Suizid unverdaut.

wurde als homologer Bereich 1 und 2 um das Antibiotika-Resistenz-vermittelnde Gen *catP* (codiert für eine Chloramphenicol-Acetyltransferase) kloniert (Abbildung 8A; Primer zur Klonierung: pKOaor_Inf1-6). Dieser Bereich wurde als Insert in den Vektor pMTL83151 (2.1.2) integriert. Durch Restriktionsverdau und mit anschließender Ligation wurde der Replikationsursprung für Gram-positive Bakterien (*repH*) entfernt. Hierdurch entstanden sind die beiden Plasmide pKOaor_Suizid und pKOaor (Abbildung 8B), die nach Transformation in den Stamm *E. coli* XL1-Blue MRF' durch einen Restriktionsverdau (2.7.12) verifiziert wurden (Abbildung 8C). Mit den beiden Plasmiden wurde in insgesamt 80 Elektroporationsansätzen (Durchführung nach Leang *et al.*, 2013; 2.8.4) und 30 Konjugationsansätzen (2.8.6) erfolglos versucht, den Stamm *C. carboxidivorans* genetisch zu verändern. Als Positivkontrolle wurde in den Versuchen *C. ljungdahlii* mit dem Plasmid pKOaor, welches den Replikationsurpsrung für Gram-positive Bakterien trägt, mitgeführt.

3.2.4 Untersuchung des nativen Plasmids p19 aus *C. carboxidivorans* und Experimente zu *plasmid curing*

Der Stamm *C. carboxidivorans* trägt das native Plasmid p19 (Bruant *et al.*, 2010). Es besteht die Möglichkeit, dass das native Plasmid p19 die Einbringung eines weiteren Plasmids unterbindet und somit eine Koexistenz zweier Plasmide in *C. carboxidivorans* nicht ermöglicht wird. Vor weiteren Experimenten zur Transformation von *C. carboxidivorans* wurde zunächst eine *in silico*-Analyse des Plasmids p19 durchgeführt.

Abbildung 9 zeigt eine Darstellung des 19.899 Bp großen Plasmids p19 aus *C. carboxidivorans*. Es trägt 22 codierende Sequenzen (Ccar_4280-Ccar4301), die sich anhand der DNA-Sequenz identifizieren lassen. Mit Hilfe der „InterPro - Protein sequence analysis & classification"-Datenbank (Mulder und Apweiler, 2007) zur Analyse von Proteinfamilien und Domänenstrukturen (2.13) wurden den codierenden Sequenzen anhand ihrer Domänenstruktur möglichen Funktionen zugewiesen. Neun der OLR konnten nicht zugewiesen werden und codieren für „hypothetische Proteine" (grau). Sechs OLR haben laut Analyse eine signifikante Ähnlichkeit zu beschriebenen DNA-Sequenzen aus Bakteriophagen (schwarz). Ccar_4289 wurde bereits durch Bruant *et al.* (2010) als möglicher Replikationsursprung des Plasmids p19 identifiziert (blau). Die restlichen sechs OLR zeigen Domänenstrukturen, die bei Proteinen vorkommen, welche

stabilisierende Funktionen bei der Chromosomenanordnung während der Zellteilung einnehmen (rot). Die OLR Ccar_4281, Ccar_4283, Ccar_4284, Ccar_4286, Ccar_4296 und Ccar_4297 codieren laut Analyse für DNA-Bindeproteine, stabilisierende Proteine bei der Zellteilung, Proteine zur Chromosomenteilung oder ATPasen zur Trennung der Chromosome. Es konnten keine Kopien der codierenden Sequenzen in der chromosomalen DNA von *C. carboxidivorans* ermittelt werden.

Die aus der *in silico*-Analyse des Plasmids p19 gewonnenen Erkenntnisse über mögliche für die Zellteilung essentielle Gensequenzen wurden durch einen experimentellen Ansatz zum *plasmid curing* überprüft. Es wurde versucht, das native Plasmid p19 dauerhaft aus dem Stamm *C. carboxidivorans* zu entfernen. *Curing*-Experimente wurden anhand der von Trevors (1986) beschriebenen Methode mit Acridinorange oder Novobiocin durchgeführt (2.11). Hierfür wurde zunächst die minimal inhibitorische Konzentration (MIK) bestimmt. Diese lag für Novobiocin bei 10 μg/mL und für Acridinorange bei 35 μg/mL. Wurde *C. carboxidivorans* mit weniger als 35 μg/mL Acridinorange inkubiert, konnte der Organismus aufgrund einer Adaptation an das

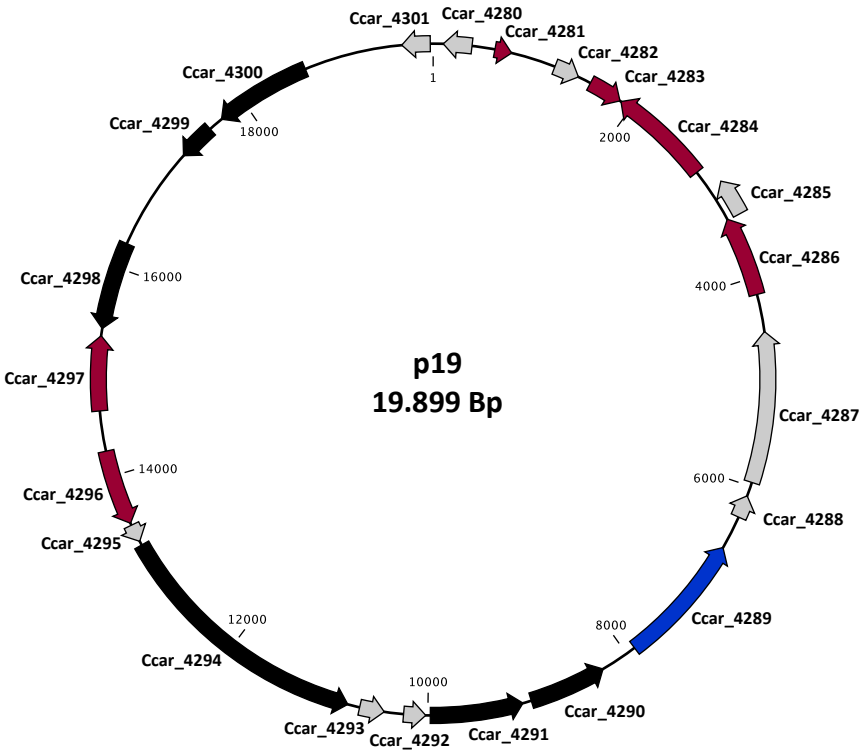


Abbildung 9: *In silico*-Analyse des nativen Plasmids p19 aus *C. carboxidivorans*. Auf dem Plasmid lassen sich 22 codierende Sequenzen identifizieren, die sich 9 hypothetischen Proteinen (grau), 6 Phagen-bezogenen Proteinen (schwarz), 6 Proteinen mit stabilisierenden Funktionen bei der Chromosomenanordnung während der Zellteilung (rot) und einem Replikationsursprung (blau) zuordnen lassen.

Curing-Agens wachsen. So war *C. carboxidivorans* nach mehrfachem Überimpfen in frisches Medium dazu in der Lage, bei einer Acridinorange-Konzentration von bis zu 50 µg/mL zu wachsen. Ein solcher Effekt konnte bei der Inkubation mit Novobiocin nicht beobachtet werden. Abbildung 10 zeigt den Ablauf des *plasmid curing* mit *C. carboxidivorans*. Bei sechs durchgeführten *curing*-Experimenten mit Novobiocin konnte das Plasmid p19 in 282 untersuchten Kolonien mittels Kolonie-PCR (2.7.5) und den Primern p19_fwd/p19_rev (2.1.3) weiterhin nachgewiesen werden. Mit dem *curing*-Agens Acridinorange wurden fünf Experimente zum *plasmid curing* durchgeführt, bei denen das Plasmid p19 in insgesamt 645 *C. carboxidivorans*-Kolonien nachweisbar war. In den *curing*-Experimenten mit *C. carboxidivorans* konnte kein Stamm ohne das native Plasmid p19 nachgewiesen werden.

Das Plasmid p19 wird von *C. carboxidivorans* repliziert und liegt stabil in dem Bakterienstamm vor. Der identifizierte Replikationsursprung des Plasmids p19 ist zu 35 % identisch mit dem des Schaukelvektors pMTL82151 (pBP1 aus *Clostridium botulinum*) (Bruant *et al.*, 2010). Die Einbringung eines Plasmids mit einer Resistenzkassette (*catP*) sowie dem in *C. carboxidivorans* funktionalen nativen Replikationsursprung des Plasmids p19 könnte zu einem stabilen rekombinanten Stamm führen. Zur Generierung eines Schaukelvektors speziell für die Transformation von *C. carboxidivorans* wurde das Plasmid pMTLp19 kloniert, welches den

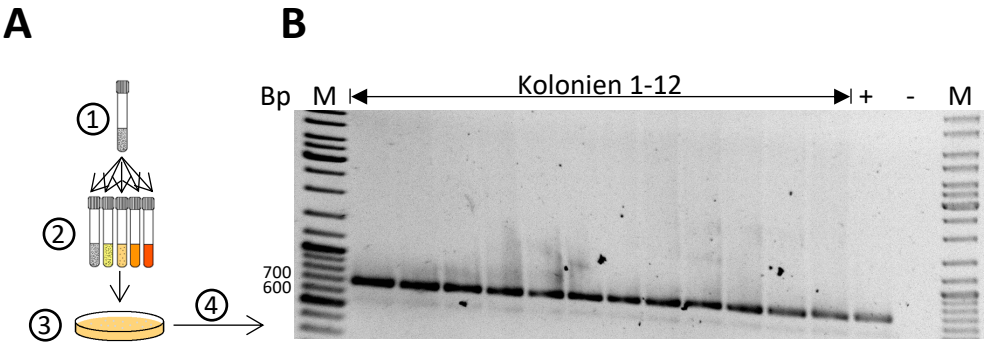


Abbildung 10: Schematische Darstellung zur Durchführung des *plasmid curing* mit *C. carboxidivorans* (A) und exemplarische Abbildung eines Agarosegels zum Nachweis des erfolgreichen *plasmid curing* mittels Kolonie-PCR (B). Die Vorkultur *C. carboxidivorans* (1) wird mit verschiedenen Konzentrationen des *curing* Agens Acridinorange/Novobiocin inkubiert (2) und die bei der höchsten Konzentration des Agens noch wachsende Kultur auf Agarplatten mit entsprechender Agens-Konzentration separiert (3). Anschließend werden wachsende *C. carboxidivorans*-Kolonien mittels Kolonie-PCR auf den Verlust des nativen Plasmids p19 hin untersucht (4). M, GeneRuler™ DNA Ladder Mix; +, PCR mit aufgereinigter DNA des Plasmids p19; -, PCR ohne Template.

Replikationsurpsrung des Plasmids p19 trägt. In Abbildung 11 wird die Konstruktion und der Aufbau des Plasmids pMTLp19 dargestellt. Für die Klonierung des Plasmids wurde zunächst ein Bereich um das OLR Ccar_4289 mit den Primern pMTLp19_primer_fwd/pMTLp19_primer_rev (2.1.3) amplifiziert (Abbildung 11A). Nach Restriktionsverdau und Entfernung von *repH* aus dem Schaukelvektor pMTL83151 wurde das Plasmid pMTLp19 mittels In-Fusion®-Reaktion (2.7.6) kloniert (Abbildung 11B), in *E. coli* XL1-Blue MRF' transformiert (2.8.1) und anschließend mittels Restriktionsverdau (2.7.12) (Abbildung 11C) und Sequenzierung (2.7.13) verifiziert. Der speziell für die Transformation von *C. carboxidivorans* klonierte Schaukelvektor pMTLp19 wurde in sechs Elektroporationsexperimenten (Protokoll nach Molitor *et al.*, 2016a) und, nach vorheriger Transformation in den Konjugations-Stamm *E. coli* CA434 (2.8.3), in fünf Konjugations-Experimenten eingesetzt. Als Kontrolle wurde der Stamm *C. ljungdahlii* mitgeführt. Der Stamm *C. carboxidivorans* konnte mit dem Plasmid pMTLp19 nicht

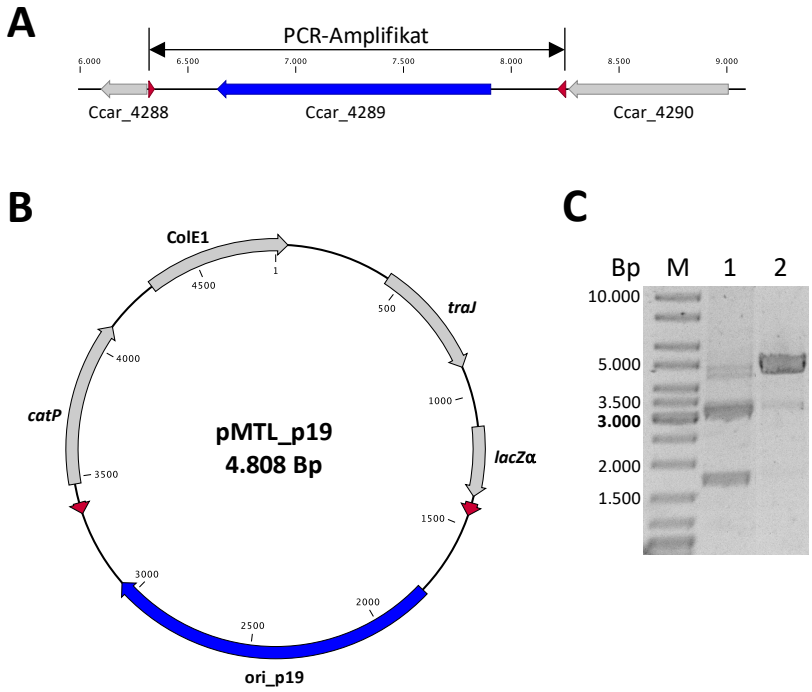


Abbildung 11: Konstruktion des Plasmids pMTLp19. A: Genregion auf Plasmid p19 aus *C. carboxidivorans* mit mutmaßlichem Replikationsursprung (blau) und Position der eingesetzten Primer für die In-Fusion® Klonierung (rot). **B:** Schematische Darstellung des Plasmids pMTLp19 mit pMTL83151 Rückgrat. *catP*, Chloramphenicol-Acetyltransferase; ColE1, Replikationsursprung für Gram-negative Bakterien; *traJ*, Transfer-Funktion für Konjugation; *lacZα*, Polylinker; ori_p19, Replikationsursprung Plasmid p19. **C:** Restriktionsverdau zum Nachweis des Klonierungserfolgs für Plasmid pMTLp19 mit den erwarteten Fragmentgrößen 3.087 Bp und 1.725 Bp. M, GeneRuler™ DNA Ladder Mix; 1, Plasmid unverdaut; 2, Plasmid nach Restriktionsverdau.

transformiert werden. Eine erfolgreiche Verifikation des Plasmids war jedoch in dem rekombinanten Stamm CLJU [pMTLp19] möglich.

3.3 *In silico*-Vergleich von C6-Körper-produzierenden acetogenen Bakterien

Neben Versuchen, den Bakterienstamm *C. carboxidivorans* genetisch zugänglich zu machen, wurden weitere Ansätze zur Entschlüsselung essentieller Gene für die Kettenverlängerungs-Reaktion vom C4- zum C6-Körper in acetogenen Bakterien verfolgt.

Zur Identifizierung von Proteinen, die vermeintlich für die Herstellung mittelkettiger Säuren und Alkohole bei den acetogenen Bakterien *C. carboxidivorans*, *C. scatologenes* und *C. drakei* essentiell sind, wurde eine *in silico*-Analyse der chromosomalen DNA der drei Stämme durchgeführt. Der Bakterienstamm *Clostridium acetobutylicum*, bekannt als ABE-fermentierender Organismus (Nölling *et al.*, 2001), ist dazu in der Lage, C4-Körper zu produzieren und wurde deshalb als Referenz herangezogen. Der Mechanismus der

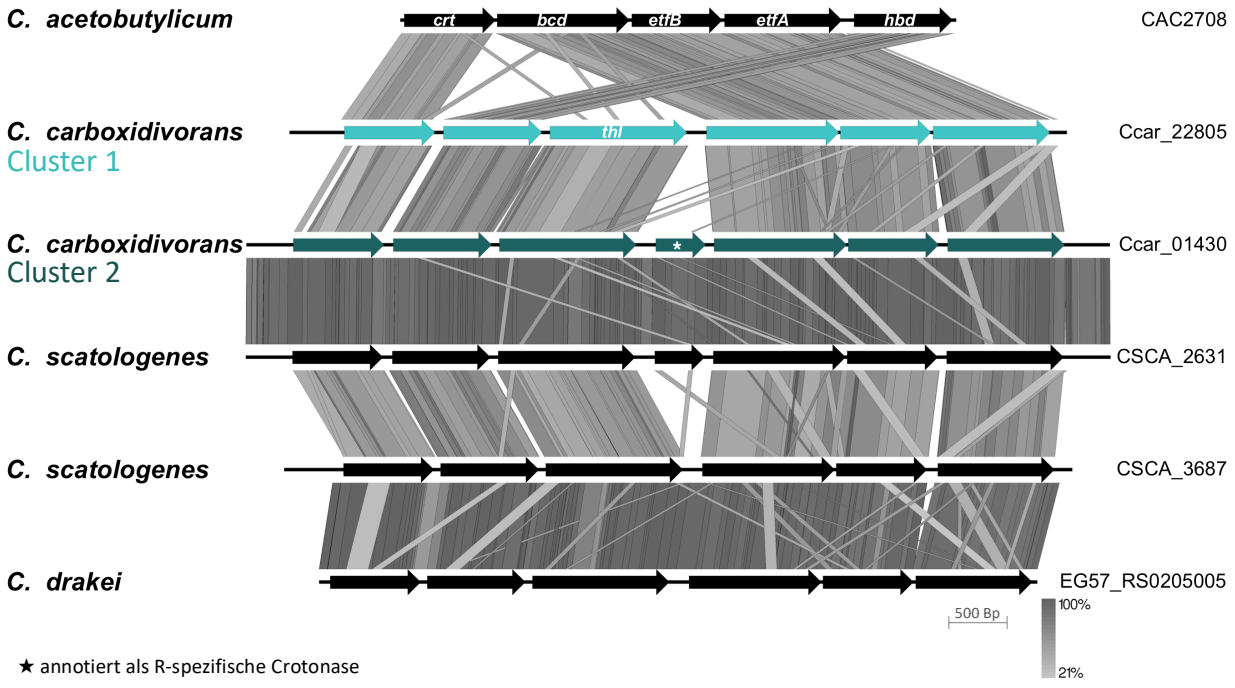


Abbildung 12: Graphische Darstellung eines tBLASTx-Vergleichs der im Chromosom von *C. acetobutylicum*, *C. carboxidivorans*, *C. scatologenes* und *C. drakei* annotierten *bcs/hcs*-Gencluster, erstellt mit der Softwareanwendung Easyfig (Wirth und Dürre, 2021). Gezeigt ist die prozentuale Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen der einzelnen DNA-Abschnitte.

Kettenverlängerung vom C2- zum C4-Körper wurde bei *Clostridium acetobutylicum* bereits aufgeklärt. Mit den Genprodukten von *crt, bcd, etfB, etfA, hbd* und *thl*, die in der Genomsequenz, bis auf *thl,* als *bcs*-Gencluster (*bcs*: *butyryl-CoA synthesis*) bzw. Operon vorliegen, kann *C. acetobutylicum* C4-Körper produzieren (Boynton *et al.*, 1996). Die Genom-Sequenzen von *C. carboxidivorans, C. scatologenes* und *C. drakei* enthalten ebenfalls ein oder zwei solcher Gencluster. Zum Vergleich der Gencluster wurde zunächst ein tBLASTx durchgeführt und das Ergebnis anschließend mit der Python-Anwendung Easyfig (Sullivan *et al.*, 2011) visualisiert (2.13). Abbildung 12 zeigt die Darstellung des tBLASTx-Vergleichs der annotierten Gencluster. In den acetogenen Bakterienstämmen *C. carboxidivorans* und *C. scatologenes* konnten jeweils zwei dieser Gencluster, bei *C. drakei* ein Gencluster gefunden werden. Anders als bei *C. acetobutylicum* ist das Gen *thl* bei den acetogenen Stämmen mit in den Genclustern integriert. Ebenso ist das Gen *hbd* anders im Gencluster organisiert, als bei *C. acetobutylicum*. Der Vergleich der Gencluster innerhalb der acetogenen Bakterienstämme zeigt eine hohe Übereinstimmung im Aufbau und in der Aminosäuresequenz. Die Stämme *C. carboxidivorans* und *C. scatologenes* besitzen jeweils eine Kopie des Genclusters mit zusätzlichem siebten OLR. Diese Kopien haben eine hohe Ähnlichkeit zueinander, unterscheiden sich aber in ihrer Aminosäuresequenz leicht von den anderen Genclustern. Die Sequenz des siebten Gens codiert laut Annotation für eine R-spezifische Crotonase. Eine Domänen-Analyse der Aminosäuresequenz mit der „InterPro - Protein sequence analysis & classification"-Datenbank (2.13) zeigte jedoch, dass es sich hierbei nur um einen partiellen Teil, nicht aber um ein gesamtes funktionales Genprodukt handelt (Bruant *et al.*, 2010).

3.4 Transkriptnachweis der *hcs*-Cluster 1 und 2 in *C. carboxidivorans*

Der Hypothese folgend, dass ein oder beide in *C. carboxidivorans* vorliegenden *bcs*-Gencluster gemeinsam, gleichermaßen oder unabhängig voneinander für die Kettenverlängerungs-Reaktion zum C6-Körper verantwortlich sind, wurden diese, fortan als *hcs*-Cluster 1 und 2 bezeichnet (*hcs*: *hexanoyl-CoA synthesis*), weiter untersucht.

Eine Analyse mittels RT-PCR sollte zeigen, ob beide Gencluster während des Wachstums von *C. carboxidivorans* und gleichzeitiger Produktion von C6-Körpern transkribiert werden. Dazu wurde zunächst ein heterotrophes Wachstumsexperiment mit *C. carboxidivorans* in 120 mL Tanner-Medium (2.3.2) mit biologischen Triplikaten durchgeführt. Abbildung 13 zeigt den Verlauf des Wachstums, die Produktion von Hexanoat und Hexanol sowie die zwei Probenahmezeitpunkte in der logarithmischen

und stationären Wachstumsphase, bei denen jeweils 50 mL Kultur für die Isolierung der RNA (2.7.3) entnommen wurden. Eingesetzt wurden als C-Quelle 40 mM Fructose. Nach Beimpfung der Kulturmedien mit einer logarithmisch wachsenden Vorkultur nahm die OD_{600} nach sechsstündiger Anlaufphase logarithmisch von einem Wert von 0,02 bis zu der maximal gemessenen OD_{600} von 2,44 zu. Bis zum Ende der Fermentation fiel der Wert auf 2,20 ab. Die Hexanoat- und Hexanolproduktion war nach 14 h Fermentationszeit messbar. Nach 26 h Fermentationszeit blieb die Konzentration der C6-Körper bis zum Ende der Fermentation konstant.

Nach der RNA-Isolierung wurde die Reinheit der RNA mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.7.8) überprüft. Wie im Agarosegel in Abbildung 14A erkennbar, enthielt das Isolat aus der logarithmischen Wachstumsphase nach der Aufreinigung noch Reste genomischer DNA. Diese waren bei einer verdünnten Auftragung der Probe (1:20) nur schwach erkennbar (Abbildung 14B). Nach einem DNA-Verdau (2.7.4) waren keine Reste chromosomaler DNA mehr in den Isolaten zu finden (Abbildung 14C). Auch bei der Quantifizierung der RNA- und DNA-Konzentration (2.7.11) konnten keine DNA-Kontaminationen mehr gemessen werden.

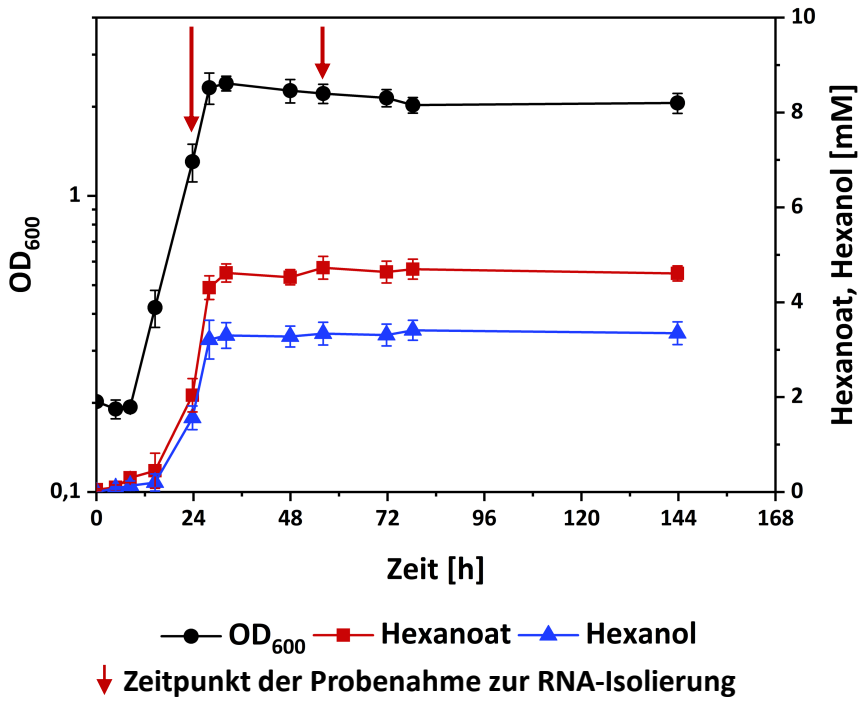


Abbildung 13: Wachstum und Produktion von C6-Körpern durch *C. carboxidivorans* in 50 mL Tanner-Medium sowie gekennzeichnete Probeentnahmezeitpunkte für nachfolgende RNA-Isolierung, Aufreinigung und cDNA-Synthese (Wirth und Dürre, 2021).

Die Synthese der cDNA erfolgte mit den aufgereinigten RNA-Isolaten aus der logarithmischen und stationären Wachstumsphase des heterotrophen Wachstumsexperiments mit *C. carboxidivorans*. Die eingesetzten Primer wurden für Cluster 1 und 2 so gewählt, dass sie im Gen *thl* oder *etfA* hybridisieren (cDNA-Primer siehe 2.1.3). Als Positivkontrolle wurde die RT-PCR parallel mit isolierter RNA aus den Stämmen *E. coli* [pPta_hcs1] und *E. coli* [pPta_hcs2] durchgeführt (3.5.1). Für die Negativkontrolle wurde die cDNA-Synthese jeweils einmal ohne Reverse Transkriptase angesetzt (-RT). In Abbildung 15A werden die PCR-Amplifikate gezeigt, die nach der cDNA-Synthese bei *hcs*-Cluster 1 nach anschließender PCR (cDNA als Template) entstehen können. Abbildung 15B stellt das Ergebnis für die RT-PCR nach erfolgter Agarose-Gelelektrophorese (2.7.8) dar. Es zeigte sich, dass für die angesetzten Reaktionen die Fragmente F1.1, F1.2 und F1.3 für den Nachweis des RNA-Transkripts und entsprechender cDNA von Cluster 1 amplifiziert werden konnten. Das Transkript kann in beiden untersuchten Wachstumsphasen nachgewiesen werden und scheint als Operon exprimiert zu werden. Bei den Negativkontrollen waren keine Amplifikate erkennbar.

Abbildung 16A und Abbildung 16B zeigen den Transkriptnachweis von *hcs*-Cluster 2 durch RT-PCR. Die erwarteten PCR-Fragmente F2.1, F2.2 und F2.3 waren nur bei der Positivkontrolle der PCR mit genomischer DNA von *C. carboxidivorans* und der RT-PCR mit isolierter RNA aus *E. coli* [pPta_hcs2] erkennbar. Bei der RT-PCR mit RNA von

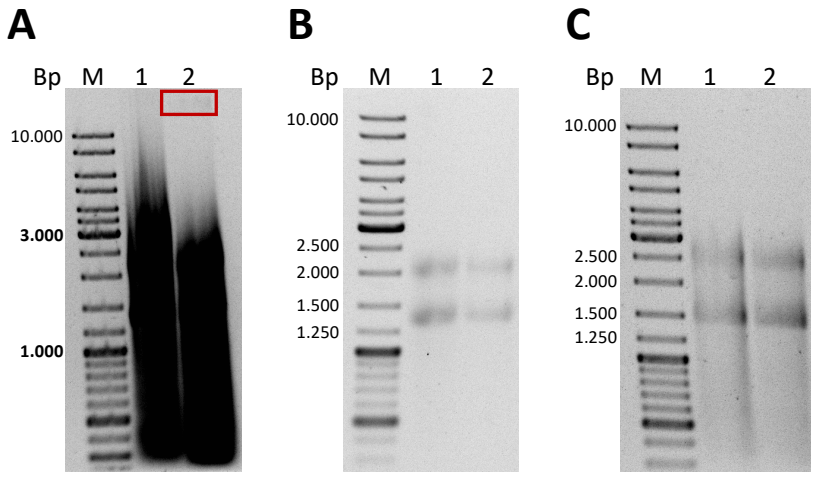


Abbildung 14: Agarosegel zur Kontrolle der RNA-Aufreinigung aus *C. carboxidivorans*. Unverdünnte (A) bzw. 1:20 verdünnte (B) Probenauftragung nach RNA-Isolation und Auftragung der Proben nach erfolgtem DNase Verdau (C). Die rote Markierung zeigt ein schwaches Fragment genomischer DNA. 1, Isolat Probenahmezeitpunkt logarithmische Wachstumsphase; 2, Isolat Probenahmezeitpunkt stationäre Wachstumsphase; M, GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

C. carboxidivorans konnte kein Teil eines Transkripts von *hcs*-Cluster 2 nachgewiesen werden.

Um sicherzustellen, dass nicht hybridisierende cDNA-Primer das Ergebnis verfälschen, wurde die cDNA-Synthese erneut mit anderen cDNA-Primern durchgeführt (Abbildung 17A). Eine Wiederholung des Nachweises mit anderen cDNA-Primern führte zum gleichen Ergebnis (Abbildung 17B). Außer bei den Positivkontrollen konnte keine cDNA von *hcs*-Cluster 2 nachgewiesen werden. Weder in der logarithmischen noch in der stationären Wachstumsphase des heterotrophen Wachstumsexperiments mit

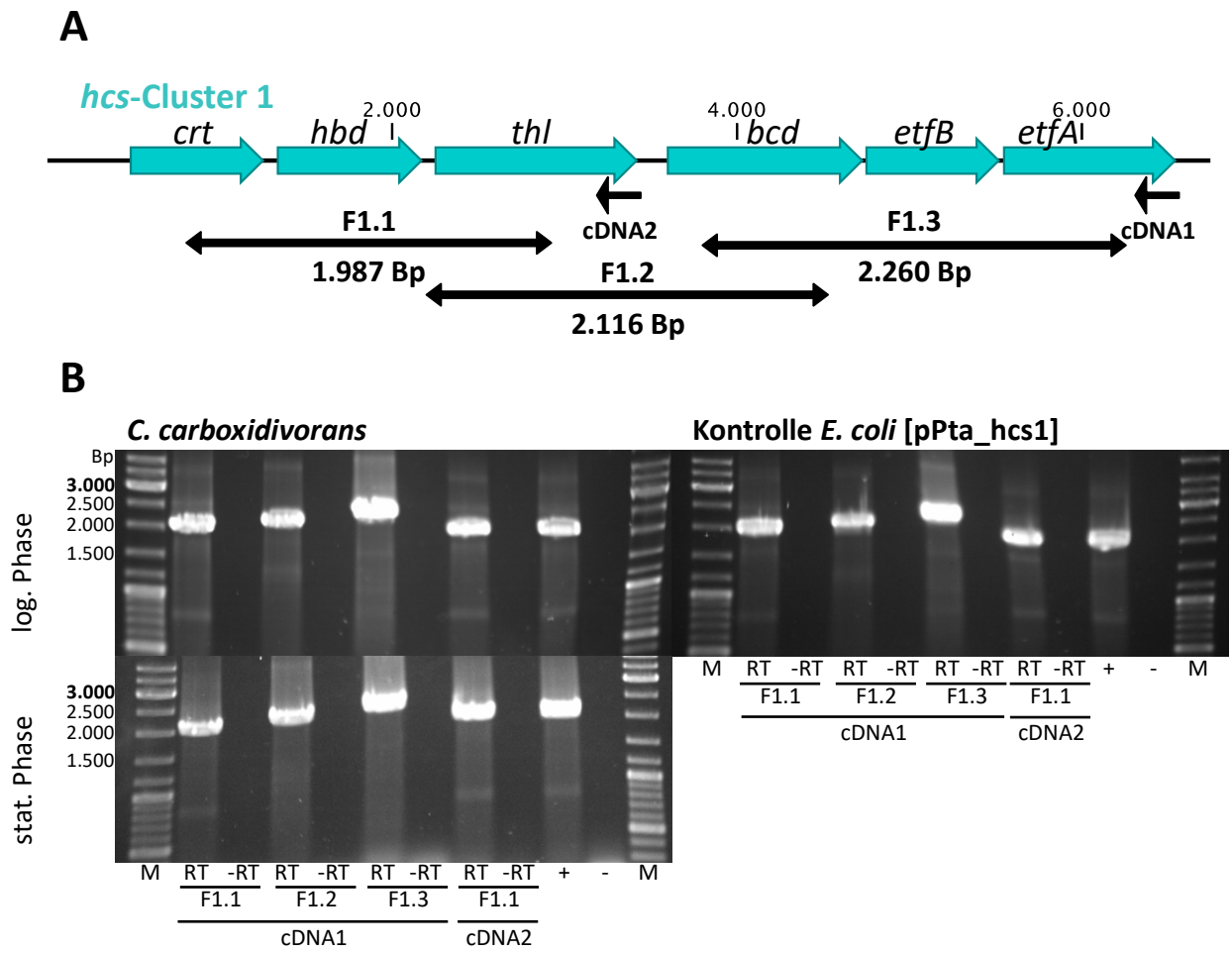


Abbildung 15: Schematische Darstellung des Transkriptnachweises von *hcs*-Cluster 1 mittels RT-PCR in RNA von *C. carboxidivorans* (A) und Agarosegel-Nachweis der mittels PCR amplifizierten Fragmente F1.1, F1.2 und F1.3 nach erfolgter cDNA-Synthese (B). Der Stamm *E. coli* [pPta_hcs1] diente hierbei als Positivkontrolle (Wirth und Dürre, 2021). RT, cDNA-Synthese-Reaktion mit SuperScript™ III Reverse Transkriptase; -RT, cDNA-Synthese-Reaktion ohne Reverse Transkriptase; +, PCR mit chromosomaler DNA von *C. carboxidivorans* als Template; -, PCR ohne Template; M, GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

C. carboxidivorans konnte somit eine Transkription des *hcs*-Clusters 2 mittels RT-PCR nachgewiesen werden.

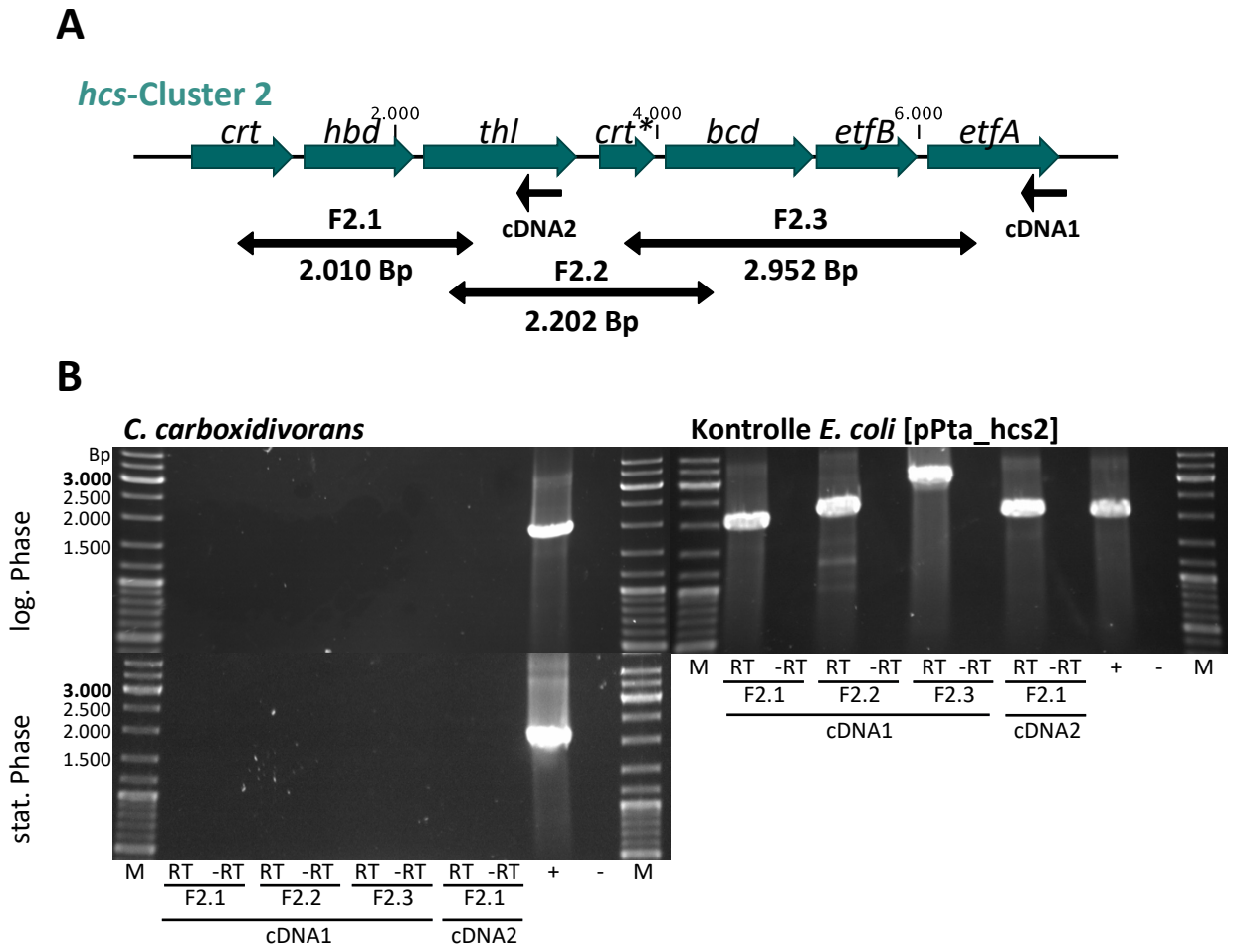


Abbildung 16: Schematische Darstellung des Transkriptnachweises von *hcs*-Cluster 2 mittels RT-PCR in RNA von *C. carboxidivorans* (A) und Agarosegel-Nachweis der mittels PCR amplifizierten Fragmente F2.1, F2.2 und F2.3 nach erfolgter cDNA-Synthese (B). Der Stamm *E. coli* [pPta_hcs2] diente hierbei als Positivkontrolle (Wirth und Dürre, 2021). RT, cDNA-Synthese-Reaktion mit SuperScript™ III Reverse Transkriptase; -RT, cDNA-Synthese-Reaktion ohne Reverse Transkriptase; +, PCR mit chromosomaler DNA von *C. carboxidivorans* als Template; -, PCR ohne Template; M, GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

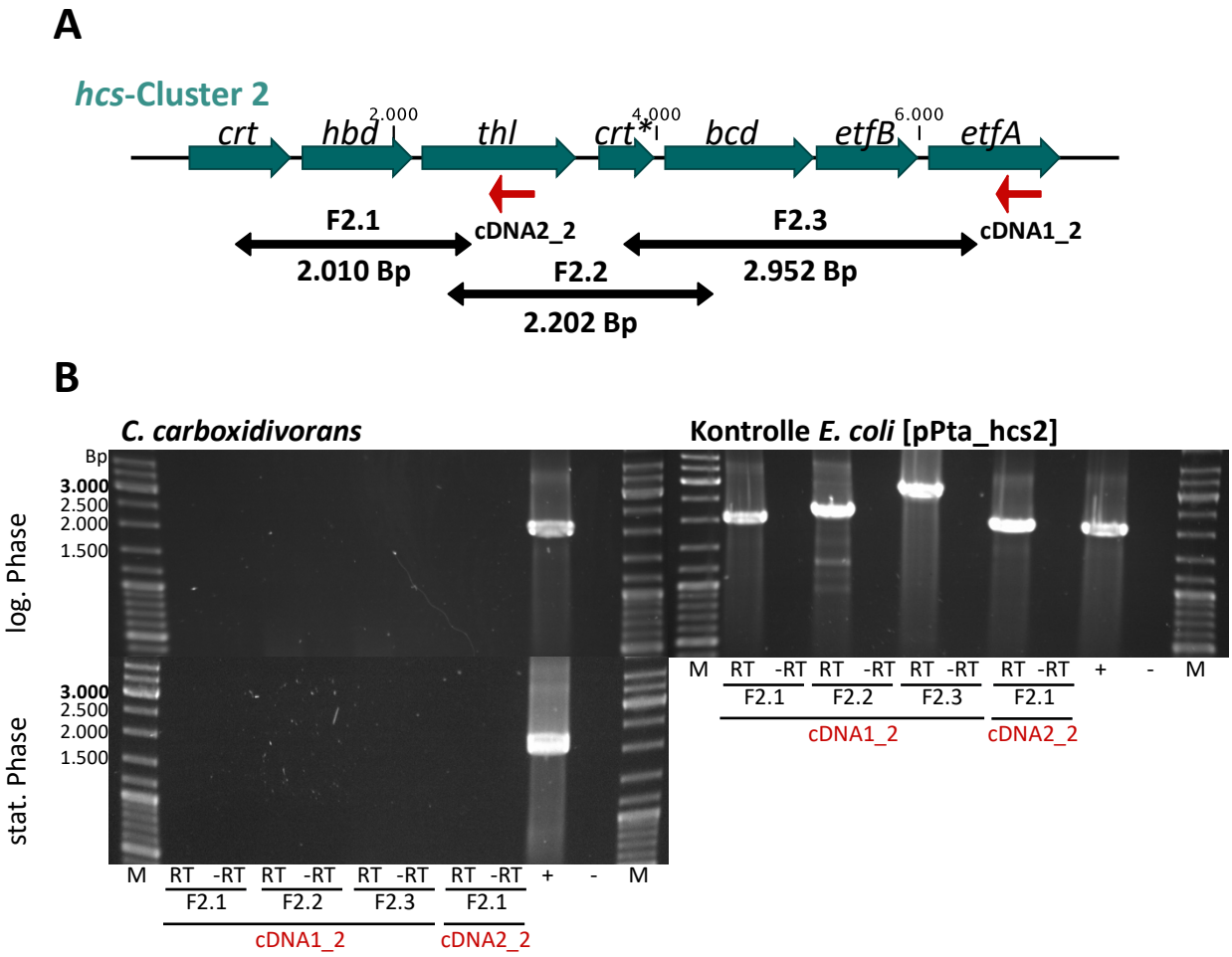


Abbildung 17: Schematische Darstellung des Transkriptnachweises von *hcs*-Cluster 2 mittels RT-PCR in RNA von *C. carboxidivorans* (A) und Agarosegel-Nachweis der mittels PCR amplifizierten Fragmente F2.1, F2.2 und F2.3 nach erfolgter cDNA-Synthese mit alternativen Primern (B). Der Stamm *E. coli* [pPta_hcs2] diente hierbei als Positivkontrolle. RT, cDNA-Synthese-Reaktion mit SuperScript™ III Reverse Transkriptase; -RT, cDNA-Synthese-Reaktion ohne Reverse Transkriptase; +, PCR mit chromosomaler DNA von *C. carboxidivorans* als Template; -, PCR ohne Template; M, GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

3.5 Heterologe Produktion mittelkettiger Säuren und Alkohole in acetogenen Bakterien

Nach der *in silico*-Analyse der C6-Körper-produzierenden acetogenen Bakterienstämme *C. carboxidivorans*, *C. scatologenes* und *C. drakei* wurde untersucht, in welcher Art und Weise die *hcs*-Cluster 1 und 2 aus *C. carboxidivorans* an der Herstellung von C4- oder C6-Körpern beteiligt sind. Hierfür wurden Experimente zur heterologen Produktion mittelkettiger Säuren und Alkohole in den acetogenen Modellorganismen *Clostridium ljungdahlii* und *Acetobacterium woodii* durchgeführt.

3.5.1 Konstruktion eines modularen Hexanoyl-CoA-Synthese-Plasmid-Systems

Zur Analyse der funktionellen Aufgabe von *hcs*-Cluster 1 (Ccar_22805-Ccar22810) und *hcs*-Cluster 2 (Ccar_01430-Ccar_01436) aus *C. carboxidivorans* sollten die Gene heterolog in acetogenen Bakterien exprimiert werden, die natürlicherweise nicht zu einer Kettenverlängerungs-Reaktion im Stande sind. Dafür wurde zunächst ein modular aufgebautes Hexanoyl-CoA-Synthese-Plasmid-System (*hcs*-Plasmid-System) entwickelt, auf dessen Basis vier Plasmide zur späteren Transformation in die Stämme *C. ljungdahlii* und *A. woodii* konstruiert wurden. Abbildung 18 zeigt eine schematische Darstellung des *hcs*-Plasmid-Systems. Die daraus klonierten Plasmide basieren auf dem Vektor-Rückgrat von pMTL83151 (Heap *et al.*, 2009), welches *repH* (Replikationsursprung funktional in Gram-positiven Bakterien), *catP* (codiert für eine Chloramphenicol-Acetyltransferase), ColE1 (Replikationsursprung funktional in Gram-negativen Bakterien) und *traJ* (Transfer-Funktion für Konjugation) trägt. Als Insert wurden *hcs*-Cluster 1 und *hcs*-Cluster 2 aus *C. carboxidivorans* jeweils in ein Plasmid kloniert. Zur Kontrolle der Genexpression in den acetogenen Bakterienstämmen wurden zwei unterschiedliche Promotoren vor die *hcs*-Cluster eingebracht. Der konstitutiv aktive Promoter $P_{pta\text{-}ack}$ aus *C. ljungdahlii* (Hoffmeister *et al.*, 2016) und der Anhydrotetracyclin-induzierbare Promoter P_{tet} (Ransom *et al.*, 2015) wurden zusammen mit der pMTL83151-Gensequenz von den Plasmiden pMTL83151_Ppta und pMTL83151_Ptet (2.1.2) mittels Restriktionsverdau (2.7.12) für die Klonierung mittels In-Fusion®-Reaktion (2.7.6) vorbereitet.

Die durch Standard-PCR (2.7.5) und passende Primer mit Überhängen (2.1.3) generierten Amplifikate der *hcs*-Cluster 1 und 2 wurden jeweils mit dem konstitutiv aktiven und dem induzierbaren Promoter in einer In-Fusion®-Reaktion miteinander verbunden. Daraus

resultierten die vier Plasmide pPta_hcs1, pPta_hcs2, pTet_hcs1 und pTet_hcs2. Abbildung 19 zeigt den Aufbau der vier konstruierten Plasmide, die anschließend in den Stamm *E. coli* XL1-Blue MRF' transformiert wurden (2.8.1). Die Verifikation der Plasmide erfolgte mittels Amplifikation des Insert-Bereichs (2.7.5) und nachfolgender Sequenzierung (2.7.13). Das Ergebnis der Standard-PCR zur Verifikation einer erfolgreichen In-Fusion®-Reaktion ist in Abbildung 19 zu sehen. Die vier Plasmide konnten mutationsfrei in dem Stamm *E. coli* XL1-Blue MRF' nachgewiesen werden.

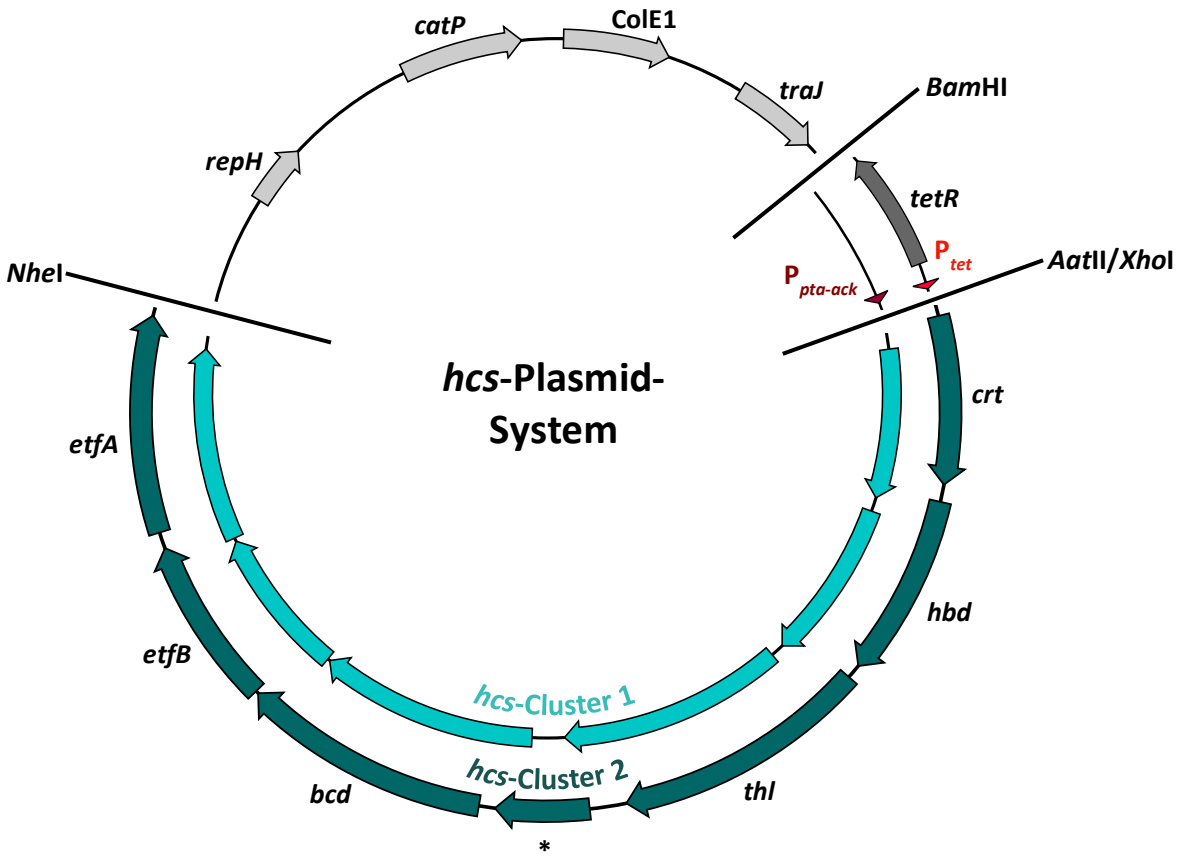


Abbildung 18: Schematische Darstellung des modularen *hcs*-Plasmid-Systems, aufgebaut aus drei variablen Komponenten: Vektor-Rückgrat (pMTL83151, hellgrau), Promoterregion $P_{pta\text{-}ack}$ (konstitutiv aktiv, dunkelrot) oder P_{tet} (induzierbar durch Anhydrotetracyclin, hellrot) und *hcs*-Gencluster 1 (blau) bzw. 2 (grün) aus *C. carboxidivorans* (Wirth und Dürre, 2021). *repH*, Replikationsursprung funktional in Gram-positiven Bakterien; *catP*, Chloramphenicol-Acetyltransferase; ColE1, Replikationsursprung funktional in Gram-negativen Bakterien; *traJ*, Transfer-Funktion für Konjugation; $P_{pta\text{-}ack}$, Promoterregion aus *C. ljungdahlii*; *tetR*, Repressor-Protein; P_{tet}, Promoterregion aus Plasmid pMTL83151_Ptet; *crt*, Crotonase; *hbd*, 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase; *thl*, Thiolase; *, annotiert als R-spezifische Crotonase; *bcd*, Butyryl-CoA-Dehydrogenase; *etfB*, Elektronen-transferierendes Flavoprotein B; *etfA*, Elektronen-transferierendes Flavoprotein A.

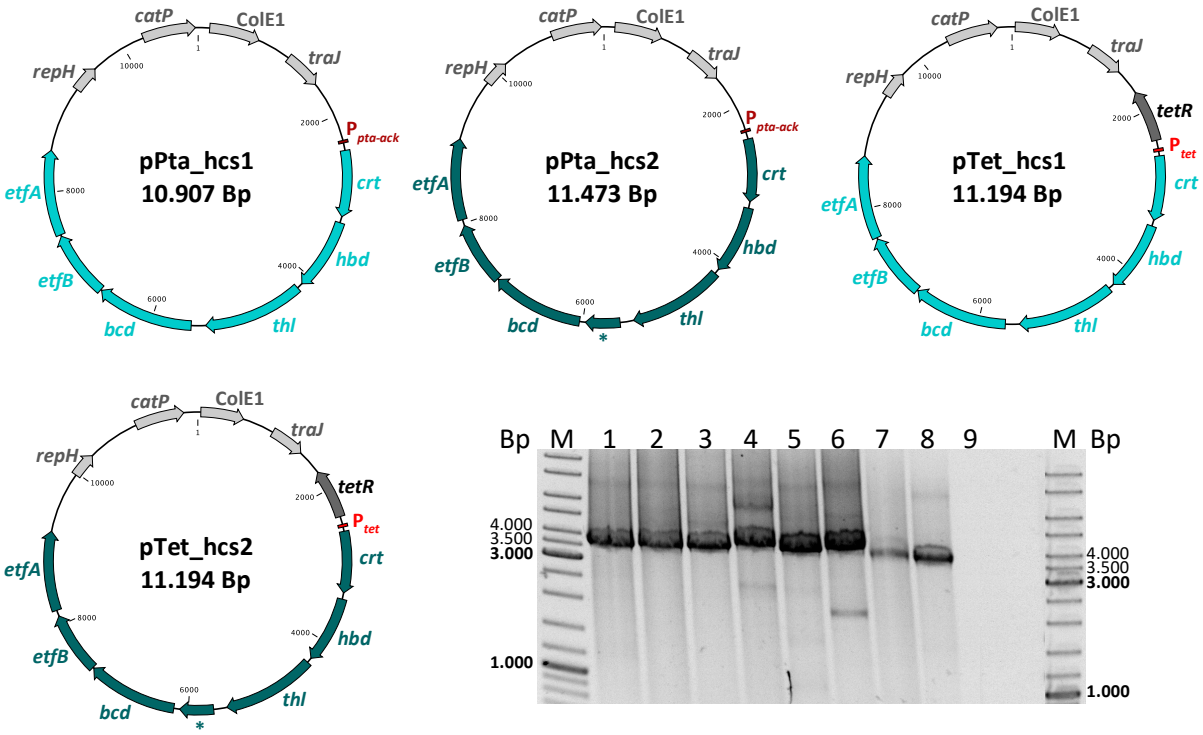


Abbildung 19: Schematische Darstellung der Plasmide pPta_hcs1, pPta_hcs2, pTet_hcs1 und pTet_hcs2 sowie deren Verifikation mittels Standard-PCR nach der Transformation in den Stamm *E. coli* XL1-Blue MRF'. Amplifiziert wurde jeweils die erste und zweite Hälfte der Gencluster mit folgenden Fragmentgrößen: 1+2, pPta_hcs1 (3.684 Bp und 3.710 Bp); 3+4, pPta_hcs2 (3.843 Bp und 3.977 Bp); 5+6, pTet_hcs1 (3.850 Bp und 3.950 Bp); 7+8, pTet_hcs2 (3.838 Bp und 3.720 Bp); 9, PCR-Ansatz ohne Template. *repH*, Replikationsursprung funktional in Gram-positiven Bakterien; *catP*, Chloramphenicol-Acetyltransferase; ColE1, Replikationsursprung funktional in Gram-negativen Bakterien; *traJ*, Transfer-Funktion für Konjugation; $P_{pta\text{-}ack}$, Promoterregion aus *C. ljungdahlii*; *tetR*, Repressor-Protein; P_{tet}, Promoterregion aus Plasmid pMTL83151_Ptet; *crt*, Crotonase; *hbd*, 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase; *thl*, Thiolase; *, annotiert als R-spezifische Crotonase; *bcd*, Butyryl-CoA-Dehydrogenase; *etfB*, Elektronen-transferierendes Flavoprotein B; *etfA*, Elektronen-transferierendes Flavoprotein A.

3.5.2 Heterologe Produktion von C6-Körpern mit *C. ljungdahlii*

Clostridium ljungdahlii (CLJU), einer der bekanntesten und industriell relevanten Modellorganismen unter den acetogenen Bakterien (Köpke *et al.*, 2010), wurde für Versuche zur heterologen Produktion von Hexanoat und Hexanol ausgewählt. Der Bakterienstamm wurde bereits als genetisch zugänglich beschrieben (Leang *et al.*, 2013), ist zur Verwertung von Synthesegas ($CO + H_2 + CO_2$) in der Lage und produziert neben

dem Hauptfermentationsprodukt Acetat auch signifikante Mengen des Alkohols Ethanol (Tanner *et al.*, 1993).

Vor Beginn der Transformationsexperimente wurde das Wachstum von *C. ljungdahlii* in Anwesenheit des für die Selektion auf rekombinante *C. ljungdahlii*-Stämme verwendeten Antibiotikums Thiamphenicol überprüft. Abbildung 20A zeigt, dass der Stamm bei einer Thiamphenicol-Konzentration von 10 µg/mL innerhalb von 168 h in 5 mL Tanner-Medium (2.3.2; mit 40 mM Fructose) nicht zu Wachstum fähig ist. Zur Selektion auf rekombinante Stämme wurde in den durchgeführten Transformationsexperimenten 15 µg/mL Thiamphenicol eingesetzt.

Des Weiteren wurde mit dem Wildtyp-Stamm *C. ljungdahlii* vorab untersucht, ob rekombinante Stämme zur Verstoffwechselung erwarteter Fermentationsprodukte fähig wären. Hierfür wurde ein Wachstumsexperiment mit CLJU WT in 5 mL Tanner-Medium (40 mM Fructose) durchgeführt, bei dem zusätzlich in die einzelnen Versuchsansätze Butyrat, Butanol, Hexanoat und Hexanol vor Beginn der Fermentation zugegeben wurde. Es wurden in separaten Ansätzen je 5 mM oder 10 mM C4-Körper (Butyrat/Butanol) bzw. 2,5 mM oder 5 mM C6-Körper (Hexanoat/Hexanol) eingesetzt. Der Versuch wurde mit biologischen Triplikaten durchgeführt. Das Medium wurde mit einer logarithmisch wachsenden *C. ljungdahlii*-Vorkultur auf eine OD_{600} von 0,1 angeimpft und die Kulturen anschließend 168 h bei 37 °C inkubiert. Am Anfang und Ende des Versuchs wurden die Produkttiter der zugegebenen Substanzen mittels GC (2.6.3) analysiert. Zur Kontrolle auf toxische Effekte durch die eingebrachten Substanzen Butyrat, Butanol, Hexanoat und Hexanol wurde zusätzlich die maximal erreichte OD_{600} der Kulturen in den einzelnen Ansätzen gemessen. Als Referenz wurde *C. ljungdahlii* ohne weitere Zusätze inkubiert. In Abbildung 21 werden die gemessenen Produkttiter vor und nach der Fermentation sowie

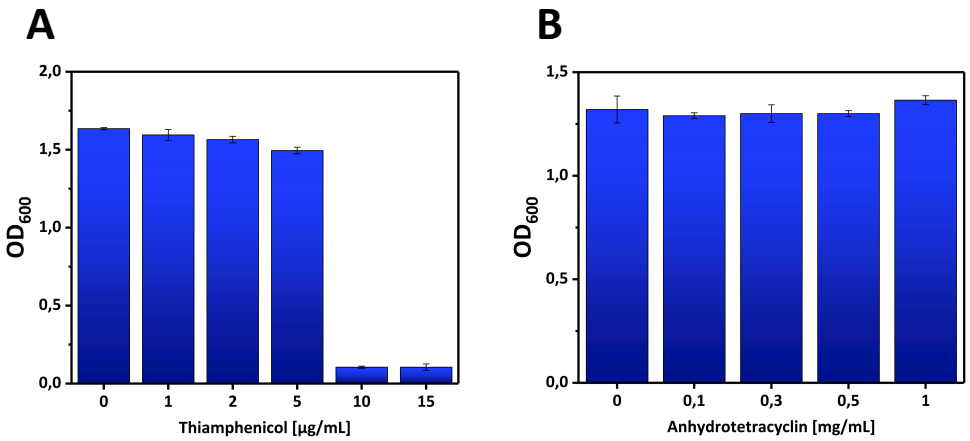


Abbildung 20: Maximale OD_{600} von *C. ljungdahlii* WT in 5 mL Tanner-Medium (168 h) bei vorheriger Zugabe von Thiamphenicol (A) oder Anhydrotetracyclin (B).

die erreichte OD_{600} bei Zugabe von C4- oder C6-Körpern dargestellt. Nach 72 h Fermentationszeit lag die maximal erreichte OD_{600} bei Zugabe der Säuren und Alkohole in dem Experiment mit Werten zwischen 1,31 und 1,48 im Durchschnitt etwas niedriger als bei der Referenz (1,56). Werden die Produkttiter der einzelnen Substanzen betrachtet und die Werte zu Beginn des Experiments mit den gemessenen Konzentrationen am Ende des Versuchs verglichen, so ist keine signifikante Abnahme bzw. Verstoffwechselung durch den Stamm CLJU WT erkennbar.

Die in Kapitel 3.5.1 beschriebenen und in *E. coli* XL1-Blue MRF' verifizierten Plasmide pPta_hcs1, pPta_hcs2, pTet_hcs1 und pTet_hcs2 sollten zur weiteren Analyse in den Wildtyp-Stamm *C. ljungdahlii* eingebracht werden. Hierfür wurden Versuche zur Transformation des Stamms mit Elektroporation unter Verwendung des durch Leang *et al.* (2013) beschriebenen Protokolls durchgeführt. Nach sechs Transformationsexperimenten mit insgesamt 250 Elektroporationsansätzen konnte der Stamm CLJU [pTet_hcs2], welcher die Gene des *hcs*-Clusters 2 aus *C. carboxidivorans* unter Kontrolle des induzierbaren Promoters P_{tet} trägt, erfolgreich transformiert und verifiziert werden. Die Auswertung der Sequenzierung (2.7.13) von *C. ljungdahlii*-Kulturen, die nach Transformation mit den Plasmiden pPta_hcs1 und pPta_hcs2 in Anwesenheit von Antibiotikum gewachsen sind, ergab immer Punktmutationen im Bereich der Promotersequenz $P_{pta\text{-}ack}$. Bei den Transformationsexperimenten mit

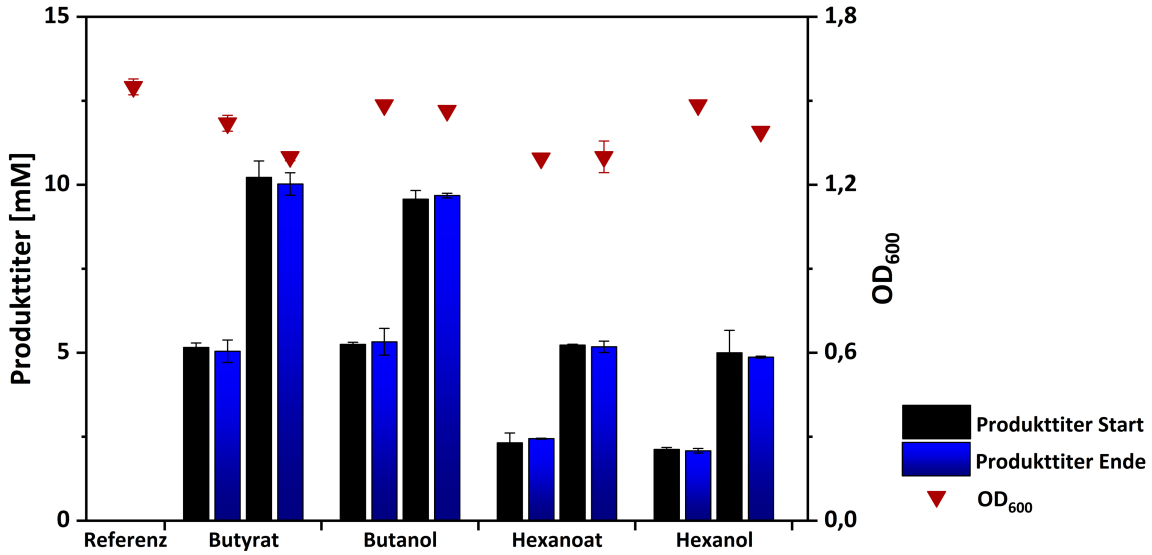


Abbildung 21: Untersuchung der Toxizität und Verstoffwechselung von Butyrat, Butanol, Hexanoat und Hexanol durch den Stamm *C. ljungdahlii* Wildtyp in 5 mL Tanner-Medium. Gemessen wurde die maximal erreichte OD_{600} (rot) nach 72 h sowie die Konzentration der zugegebenen Komponenten zu Beginn des Versuchs (schwarz) und nach 168 h (blau).

C. ljungdahlii und dem Plasmid pTet_hcs1 konnte kein rekombinanter Stamm konstruiert werden, da nach der Regeneration kein Wachstum in Anwesenheit von Antibiotikum messbar war.

Der Stamm CLJU [pTet_hcs2] wurde in einem heterotrophen Wachstumsexperiment auf sein Produktspektrum hin untersucht. In dem Versuch wurden der Wildtyp-Stamm CLJU WT und der Stamm CLJU [pMTL83151], der den Schaukelvektor pMTL83151 trägt, als Kontrollen mitgeführt. Der Versuch wurde mit biologischen Triplikaten in 50 mL Tanner-Medium (2.3.2) durchgeführt. Als Kohlenstoffquelle (C-Quelle) wurden 50 mM Fructose eingesetzt. Abbildung 22 zeigt das Wachstumsverhalten und Produktspektrum von CLJU WT, CLJU [pMTL83151] und CLJU [pTet_hcs2] im heterotrophen Wachstumsversuch. Die Hauptkulturen wurden aus einer logarithmisch wachsenden Vorkultur auf eine OD_{600} von ca. 0,05 angeimpft und wuchsen ohne Anlaufphase logarithmisch weiter. Zur Induktion der Genexpression bei CLJU [pTet_hcs2] wurde im Vorfeld die Anhydrotetracyclin-Verträglichkeit des Wildtyp-Stamms *C. ljungdahlii* überprüft. Hierfür wurden *C. ljungdahlii*-Kulturen zusammen mit verschiedenen

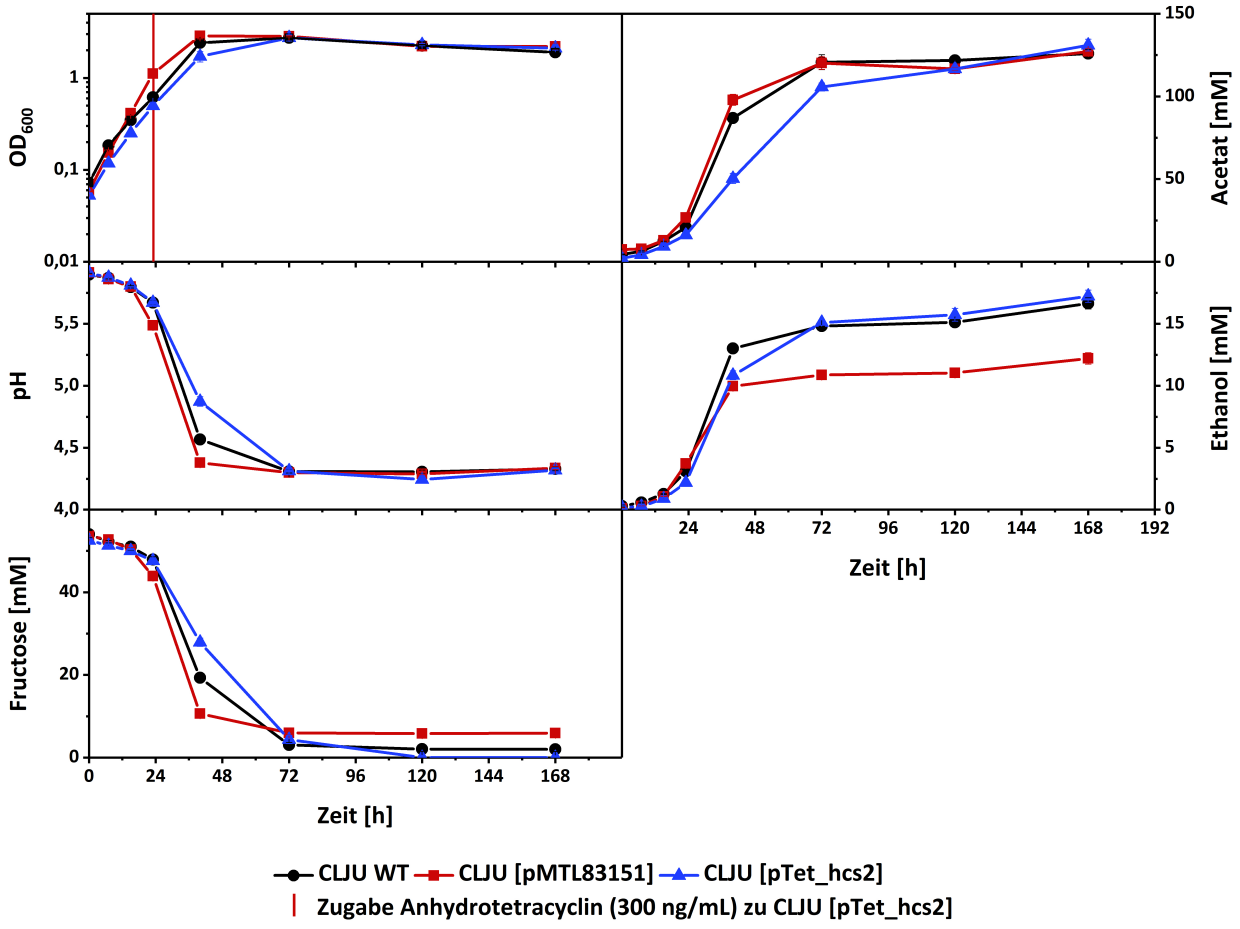


Abbildung 22: Wachstumsverhalten und Produktspektrum von CLJU WT, CLJU [pMTL83151] und CLJU [pTet_hcs2] unter heterotrophen Bedingungen in 50 mL Tanner-Medium.

Konzentrationen an Anhydrotetracyclin in 5 mL Tanner-Medium (40 mM Fructose) 168 h bei 37 °C inkubiert. Die erreichte OD_{600} der Kulturen mit 0, 0,1, 0,3, 0,5 und 1 mg/mL Anhydrotetracyclin wird in Abbildung 20B dargestellt. Alle Ansätze (biologische Triplikate) erreichten eine OD_{600} von >1,25. Zur Induktion der Genexpression während des heterotrophen Wachstumsversuchs wurden 300 ng/mL Anhydrotetracyclin zu CLJU [pTet_hcs2] bei einer OD_{600} von 0,5 hinzugegeben. Die Kulturen beendeten die logarithmische Wachstumsphase nach 40 h und erreichten eine OD_{600} von 2,7 (CLJU WT bzw. CLJU [pTet_hcs2]) und 2,8 (CLJU [pMTL83151]) nach 72 h Fermentationszeit. Der pH-Wert der drei Bakterienstämme lag zu Beginn des Versuchs bei einem Ausgangswert von 5,9 und verringerte sich innerhalb der ersten 12 h langsam und danach immer schneller. Nach 72 h Fermentationszeit erreichten die Kulturen CLJU WT, CLJU [pMTL83151] und CLJU [pTet_hcs2] einen pH-Wert von 4,3, der bis zum Ende des heterotrophen Wachstumsexperiments konstant blieb. Die eingesetzte Fructose (50 mM) wurde von den drei Kulturen zu Beginn des Versuchs gleichermaßen verbraucht. Nach 40 h Versuchszeit waren im Medium von CLJU WT noch 19,3 mM, bei CLJU [pMTL83151] noch 10,6 mM und bei CLJU [pTet_hcs2] noch 27,9 mM Fructose im Medium nachweisbar. Im Kulturmedium des Stamms CLJU [pTet_hcs2] konnte nach 120 h keine Fructose mehr gemessen werden. Bei CLJU [pMTL83151] waren am Ende der Fermentation noch 5,9 mM Fructose und beim Wildtyp-Stamm 1,9 mM Fructose im Kulturmedium nachweisbar. Von den Kulturen wurde während der Fermentation Acetat als Hauptprodukt hergestellt. Die Acetat-Konzentrationen zum Ende des Versuchs waren mit 126 mM (CLJU WT), 127 mM (CLJU [pMTL83151]) und 131 mM (CLJU [pTet_hcs2]) vergleichbar hoch. Daneben wurde von den Stämmen auch Ethanol produziert. CLJU WT und CLJU [pTet_hcs2] produzierten 17 mM, CLJU [pMTL83151] 12 mM Ethanol. Neben den C2-Körpern Acetat und Ethanol waren keine zusätzlichen Säuren oder Alkohole im Fermentationsmedium nachweisbar.

3.5.3 Produktion mittelkettiger Säuren mit rekombinanten *A. woodii*-Stämmen

Parallel zu den Experimenten mit rekombinanten *C. ljungdahlii*-Stämmen (3.5.2) wurden Versuche zur heterologen C6-Körper-Produktion mit dem acetogenen Bakterium *Acetobacterium woodii* (AWO) durchgeführt. *A. woodii* ist ebenso wie *C. ljungdahlii* ein gut untersuchter Modell-Organismus (Schuchmann und Müller, 2014), der dazu in der Lage ist, mit CO_2 und H_2 als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle zu wachsen. Der Bakterienstamm ist als genetisch zugänglich beschrieben (Hoffmeister *et al.*, 2016) und

kann mit dem von Leang *et al.* (2013) beschriebenen Protokoll transformiert werden (2.8.4).

Vor der Transformation der bereits klonierten Plasmide pPta_hcs1, pPta_hcs2, pTet_hcs1 und pTet_hcs2 in *A. woodii* wurde die Resistenz des Wildtyp-Stamms gegenüber des zur Selektion eingesetzten Antibiotikums Thiamphenicol überprüft. Hierfür wurde der Stamm *A. woodii* mit unterschiedlichen Konzentrationen an Thiamphenicol (0-15 µg/mL) in 5 mL ATCC-Medium 1612 (2.3.4, 40 mM Fructose) 168 h bei 30 °C inkubiert und dabei die maximal erreichte OD_{600} gemessen. Der Versuch wurde mit biologischen Triplikaten durchgeführt. In Abbildung 23A werden die erreichten OD_{600}-Werte dargestellt und es zeigt sich, dass ein Wachstum des Wildtyp-Stamms ab einer Konzentration von 5 µg/mL Thiamphenicol nicht mehr möglich ist. Zur Selektion und weiteren Inkubation rekombinanter *A. woodii*-Stämme wurden in den Transformationsexperimenten und Wachstumsversuchen 15 µg/mL Thiamphenicol eingesetzt. Im selben Versuch wurde auch die Verträglichkeit des zur Genexpression, bei Einsatz des induzierbaren Promoters P_{tet}, notwendigen Anhydrotetracyclins getestet. *A. woodii* WT wurde zusammen mit unterschiedlichen Anhydrotetracyclin-Konzentrationen (0-1 mg/mL) inkubiert und die maximal erreichte OD_{600} gemessen. Abbildung 23B zeigt, dass bei AWO WT kein inhibitorischer Effekt durch Anhydrotetracyclin-Zugabe auf die maximal erreichte OD_{600} messbar war. Für die Induktion der Genexpression während der durchgeführten Wachstumsexperimente mit *A. woodii* wurde eine Anhydrotetracyclin-Konzentration von 0,3 mg/mL eingesetzt.

Bei der Untersuchung zur heterologen Expression der Gene der *hcs*-Cluster 1 und 2 aus *C. carboxidivorans* war eine Herstellung von C4- und/oder C6-Körpern in rekombinanten *A. woodii*-Stämmen vorstellbar. Zum Ausschließen einer Toxizität und Sicherstellung

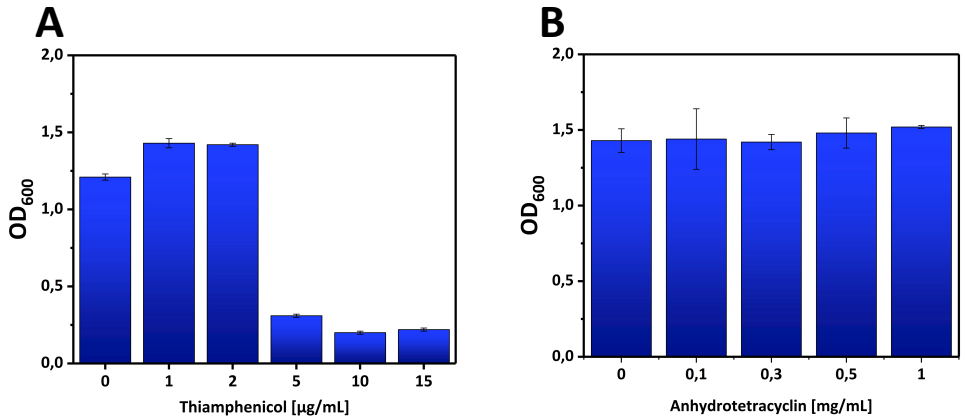


Abbildung 23: Maximal erreichte OD_{600} von *A. woodii* WT in 5 mL ATCC-Medium 1612 (168 h) bei vorheriger Zugabe von Thiamphenicol (A) oder Anhydrotetracyclin (B).

keiner Metabolisierung der erwarteten Fermentationsprodukte Butyrat, Butanol, Hexanoat und Hexanol durch den Stamm *A. woodii* wurde ein Wachstumsexperiment durchgeführt. Es wurden 5 mL ATCC-Medium 1612 (40 mM Fructose) mit einer logarithmisch wachsenden Vorkultur (AWO WT) auf eine OD_{600} von 0,1 angeimpft. In einzelne Versuchsansätze wurden zusätzlich 5 bzw. 10 mM Butyrat/Butanol oder 2,5 bzw. 5 mM Hexanoat/Hexanol zugegeben. Ein Ansatz ohne Zugabe weiterer Säuren oder Alkohole diente dabei als Kontrolle. Alle Versuchsansätze wurden mit biologischen Triplikaten durchgeführt. Die Produkttiter der Substanzen wurden zu Beginn und nach 168 h Inkubationszeit bei 30 °C mit GC-Analyse bestimmt (2.6.3). Als Indikator für einen hemmenden/toxischen Effekt der Substanzen wurde die OD_{600} von AWO WT nach 48 h Inkubationszeit bestimmt. In Abbildung 24 sind die Ergebnisse der Untersuchung gezeigt. Zu sehen sind die Produkttiter zu Beginn und zum Ende des Versuchs sowie die maximal erreichte OD_{600}. Es zeigte sich, dass in allen Versuchsansätzen *A. woodii* WT eine OD_{600} zwischen 1,27 und 1,39 erreicht hat. Eine Abnahme und damit Metabolisierung der zugesetzten C4- und C6-Körper war nicht feststellbar.

Nach erfolgter Transformation der vier konstruierten *hcs*-Cluster-Plasmide (3.5.1) in *A. woodii* konnten die Stämme AWO [pPta_hcs1], AWO [pPta_hcs2], AWO [pTet_hcs1] und AWO [pTet_hcs2] durch Sequenzierung (2.7.13) verifiziert werden. Das Wachstumsverhalten und Produktspektrum der rekombinanten *A. woodii*-Stämme wurde zunächst in einem heterotrophen Wachstumsexperiment untersucht. Zusammen

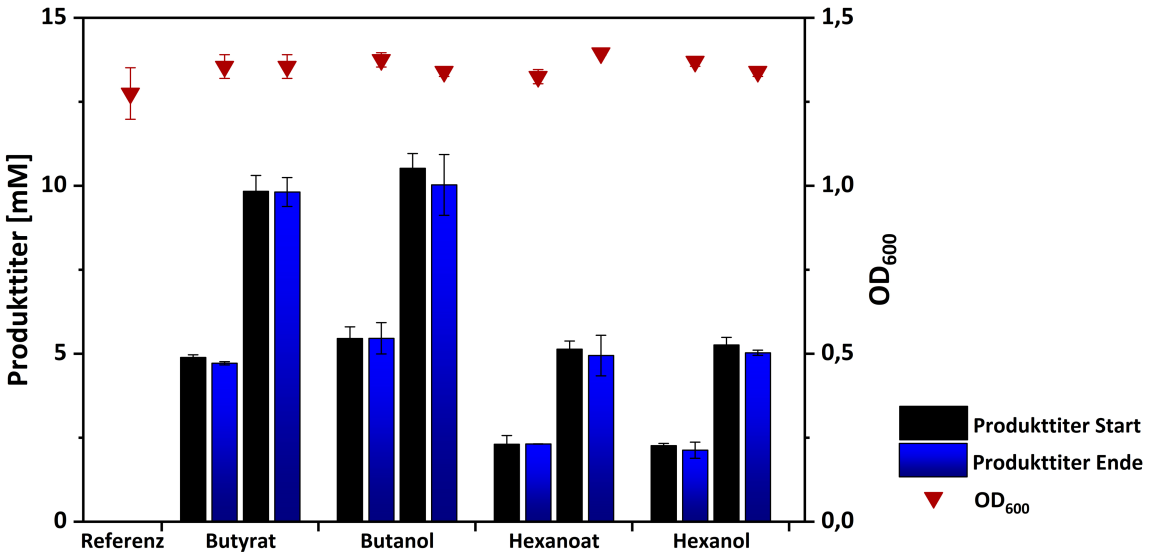


Abbildung 24: Untersuchung der Toxizität und Verstoffwechselung von Butyrat, Butanol, Hexanoat und Hexanol durch den Stamm *A. woodii* Wildtyp in 5 mL ATCC-Medium 1612. Gemessen wurde die maximal erreichte OD_{600} (rot) nach 48 h sowie die Konzentration der zugegebenen Komponenten zu Beginn des Versuchs (schwarz) und nach 168 h (blau).

mit den Stämmen AWO WT und AWO [pMTL83151] wurden Vorkulturen in 50 mL ATCC-Medium 1612 inkubiert, mit denen anschließend die Hauptkulturen auf eine OD_{600} von ca. 0,05 angeimpft wurden. Als Kohlenstoffquelle wurden 40 mM Fructose eingesetzt. Der Wachstumsversuch wurde mit biologischen Triplikaten durchgeführt. Abbildung 25 zeigt die gemessenen OD_{600}-Werte während des heterotrophen Wachstumsversuchs, den Substratverbrauch sowie die im Medium detektierten Produktkonzentrationen. Die Stämme wuchsen nach Beimpfen des Mediums ohne Anlaufphase logarithmisch bis zu einer Fermentationszeit von 20 h. Bei einer OD_{600} von 0,48 und 0,59 wurde nach 20 h die Genexpression bei den Stämmen AWO [pTet_hcs1] und AWO [pTet_hcs2] durch Zugabe von 300 ng/mL Anhydrotetracyclin induziert. Alle sechs *A. woodii*-Stämme gingen anschließend in die stationäre Wachstumsphase über. Die maximal erreichten OD_{600}-Werte werden, ebenso wie die erreichten Produkttiter der Stämme, in Tabelle 13 zusammengefasst. Die beiden Stämme AWO [pTet_hcs1] und AWO [pTet_hcs2] erreichten mit 1,72 und 1,65 deutlich niedrigere OD_{600}-Werte als die

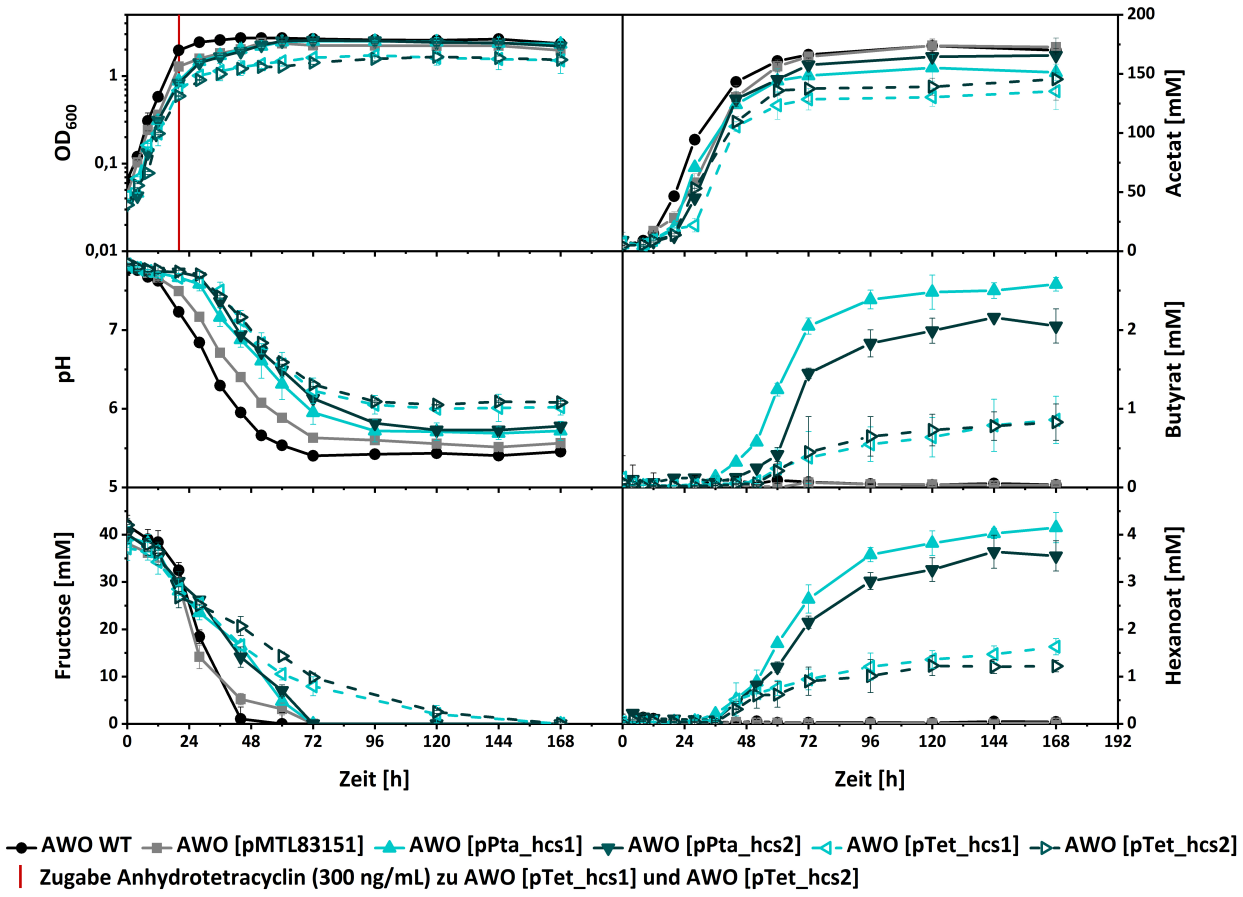


Abbildung 25: Wachstumsverhalten und Produktspektrum von AWO WT, AWO [pMTL83151], AWO [pPta_hcs1], AWO [pPta_hcs2], AWO [pTet_hcs1] und AWO [pTet_hcs2] unter heterotrophen Bedingungen in 50 mL ATCC-Medium 1612 (Wirth und Dürre, 2021).

anderen Stämme, bei denen die Werte zwischen 2,39 und 2,71 lagen. Der pH-Wert zu Beginn der Fermentation lag bei allen Kulturen zwischen 7,7 und 7,9 und nahm im Laufe des Versuchs deutlich ab. Am schnellsten fiel der pH-Wert bei den Stämmen AWO WT und AWO [pMTL83151], am langsamsten bei den Stämmen AWO [pTet_hcs1] und AWO [pTet_hcs2]. Zum Ende der Fermentation nach 168 h war der pH-Wert in allen Kulturen konstant und lag für AWO WT bei 5,45, für AWO [pMTL83151] bei 5,56, für AWO [pPta_hcs1] bei 5,72, für AWO [pPta_hcs2] bei 5,78, für AWO [pTet_hcs1] bei 6,02 und für AWO [pTet_hcs2] bei 6,08. Die gemessene Fructose-Konzentration der sechs Stämme lag zu Beginn der Fermentation zwischen 37 und 42 mM. AWO WT hatte die Fructose nach 60 h komplett verbraucht. Keine Fructose konnte nach 72 h im Medium der Stämme AWO [pMTL83151], AWO [pPta_hcs1] und AWO [pPta_hcs2] mehr nachgewiesen werden. Die beiden Stämme AWO [pTet_hcs1] und AWO [pTet_hcs2] hatten die Fructose erst nach 168 h komplett verbraucht. Acetat war das Haupt-Fermentationsprodukt aller Stämme mit einem Maximalwert zwischen 135 und 172 mM. Neben Acetat konnten bei den Stämmen AWO [pPta_hcs1], AWO [pPta_hcs2], AWO [pTet_hcs1] und AWO [pTet_hcs2] weitere Peaks in den Chromatogrammen der GC-Analyse (2.6.3) detektiert werden. Diese ließen sich durch zusätzliche Analyse mit GC-MS (2.6.4) den Säuren Butyrat und Hexanoat zuordnen. *A. woodii*-Stämme, die Plasmide mit den *hcs*-Clustern 1 und 2 aus *C. carboxidivorans* tragen, produzierten während der heterotrophen Fermentation neben Acetat auch Butyrat und Hexanoat. Ein

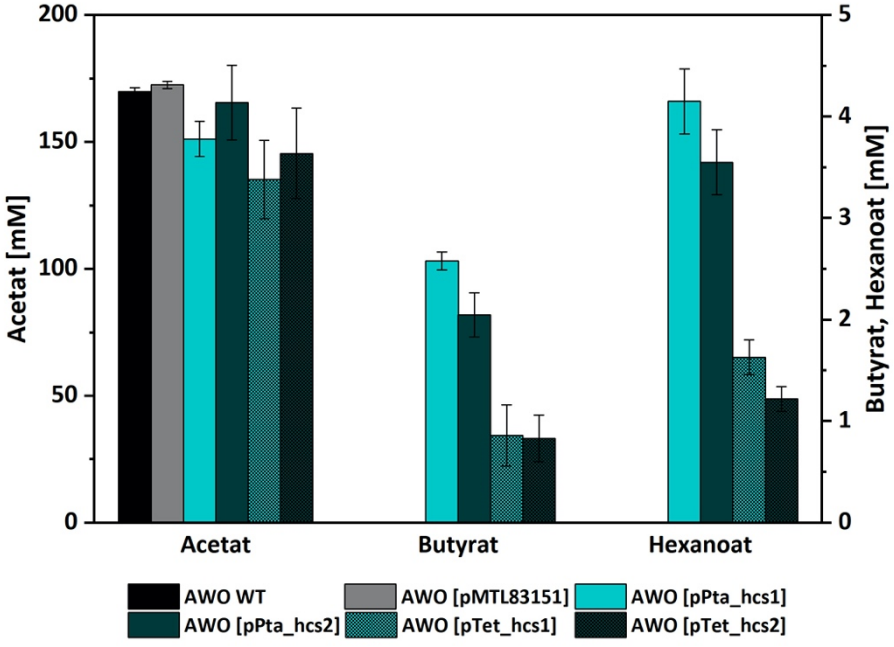


Abbildung 26: Produkttiter von AWO WT, AWO [pMTL83151], AWO [pPta_hcs1], AWO [pPta_hcs2], AWO [pTet_hcs1] und AWO [pTet_hcs2] unter heterotrophen Bedingungen in 50 mL ATCC-Medium 1612 zum Ende der Fermentation.

messbarer Anstieg der Konzentrationen der C4- und C6-Körper war frühestens nach 36 h Fermentationszeit erkennbar. Bis zum Ende der Fermentation produzierten die Stämme mit konstitutiv aktivem Promoter deutlich mehr Butyrat (AWO [pPta_hcs1] 2,58 mM, AWO [pPta_hcs2] 2,05 mM) als die Stämme mit induzierbarem Promoter (AWO [pTet_hcs1] 0,86 mM, AWO [pTet_hcs2] 0,83 mM). Bei der Hexanoat-Produktion verhielt es sich ähnlich. Die Stämme AWO [pPta_hcs1] und AWO [pPta_hcs2] produzierten 4,15 und 3,55 mM, die Stämme AWO [pTet_hcs1] und AWO [pTet_hcs2] 1,63 und 1,22 mM Hexanoat. Eine Alkoholproduktion (Ethanol, Butanol, Hexanol) konnte bei keinem der untersuchten *A. woodii*-Stämme nachgewiesen werden.

Tabelle 13: Übersicht der maximal erreichten OD_{600} und der Produkttiter von AWO WT, AWO [pMTL83151], AWO [pPta_hcs1], AWO [pPta_hcs2], AWO [pTet_hcs1] und AWO [pTet_hcs2] am Ende des heterotrophen und autotrophen Wachstumsversuchs.

	Produkttiter der *A. woodii*-Stämme heterotroph/autotroph [mM]					
	Wildtyp	**[pMTL83151]**	**[pPta_hcs1]**	**[pPta_hcs2]**	**[pTet_hcs1]**	**[pTet_hcs2]**
OD_{600}	2,71/1,84	2,39/1,53	2,50/1,42	2,55/1,34	1,72/1,00	1,65/0,69
Acetat	169/189	172/184	151/180	165/168	135/140	145/128
Butyrat	0,00/0,00	0,00/0,00	2,58/0,69	2,05/0,60	0,86/0,37	0,83/0,32
Hexanoat	0,00/0,00	0,00/0,00	4,15/1,56	3,55/1,21	1,63/0,73	1,22/0,48

Die zum Ende des heterotrophen Wachstumsversuchs bestimmten Produkttiter werden in Abbildung 26 zusammengefasst. Aus der Graphik lässt sich ableiten, dass sich bei allen Stämmen der Kohlenstoff zum Großteil im gebildeten Acetat wiederfinden ließ. Die Acetat-Konzentration lag bei den rekombinanten Stämmen mit $P_{pta\text{-}ack}$ etwas niedriger, bei den Stämmen mit induzierbarer Genexpression deutlich niedriger als bei AWO WT und AWO [pMTL83151]. Bei der heterotrophen Fermentation wurde von den Stämmen AWO [pPta_hcs1], AWO [pPta_hcs2], AWO [pTet_hcs1] und AWO [pTet_hcs2] Butyrat und Hexanoat gebildet, wobei die Konzentration des C6-Körpers immer über der des C4-Körpers lag. Die Stämme AWO [pTet_hcs1] und AWO [pTet_hcs2] mit induzierbarer Genexpression produzierten weniger als halb so viel Butyrat und Hexanoat wie die Stämme AWO [pPta_hcs1] und AWO [pPta_hcs2] mit konstitutiv aktiver Genexpression. Zusätzlich produzierten die Stämme mit dem *hcs*-Cluster 1 mehr Butyrat und Hexanoat als die Stämme mit *hcs*-Cluster 2.

Nach der heterotrophen Analyse der rekombinanten *A. woodii*-Stämme und der Erkenntnis, dass diese durch die *hcs*-Cluster 1 und 2 aus *C. carboxidivorans* zur Kettenverlängerungs-Reaktion fähig sind, wurde die C6-Körper-Produktion unter autotrophen Bedingungen untersucht. Dafür wurden die sechs *A. woodii*-Stämme AWO WT, AWO [pMTL83151], AWO [pPta_hcs1], AWO [pPta_hcs2], AWO [pTet_hcs1] und AWO [pTet_hcs2] aus einer heterotrophen Vorkultur (40 mM Fructose) in 50 mL ATCC-Medium 1612 überimpft, bei dem zuvor die Gasphase (N_2 + CO_2) durch ein H_2 + CO_2-Gasgemisch (Tabelle 4) ersetzt wurde. Nachdem Wachstum der Stämme bei gleichzeitiger Abnahme des Gesamtdrucks in den Kulturflaschen erkennbar war, wurden die Stämme weitere zwei Mal in frisches Medium überimpft, um die Adaptation der Stämme an die autotrophen Bedingungen zu ermöglichen. Mit logarithmisch wachsenden Vorkulturen wurden schließlich die Hauptkulturen des autotrophen Wachstumsversuchs auf eine OD_{600} von 0,1 angeimpft (biologische Triplikate). Abbildung 27 zeigt das Wachstumsverhalten der *A. woodii*-Stämme und die

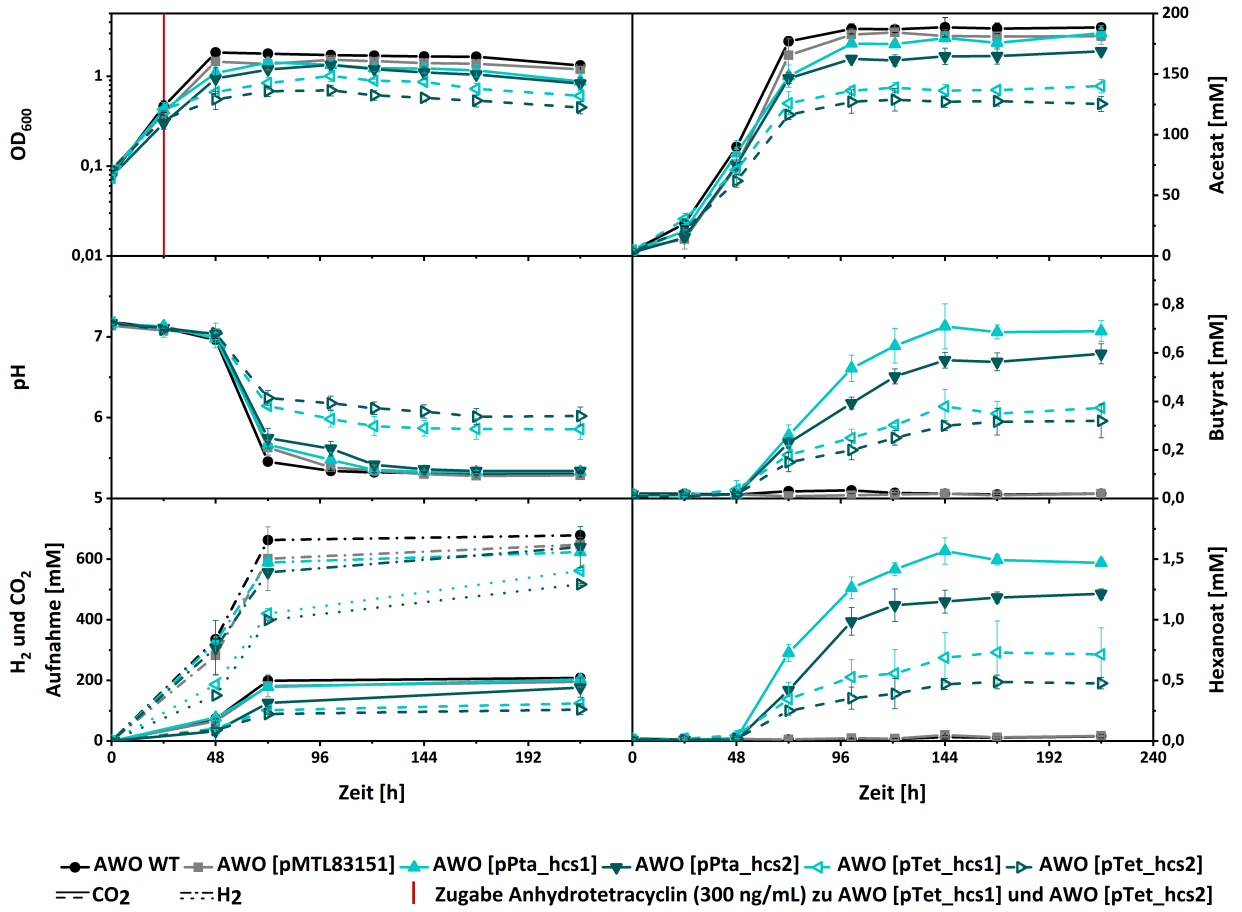


Abbildung 27: Wachstumsverhalten und Produktspektrum der Stämme AWO WT, AWO [pMTL83151], AWO [pPta_hcs1], AWO [pPta_hcs2], AWO [pTet_hcs1] und AWO [pTet_hcs2] unter autotrophen Bedingungen in 50 mL ATCC-Medium 1612 (Wirth und Dürre, 2021).

Produktbildung. Die OD_{600} stieg bei allen Stämmen von Beginn logarithmisch an. Nach 24 h Fermentationszeit wurde bei den Stämmen AWO [pTet_hcs1] und AWO [pTet_hcs2] die Genexpression durch Zugabe von 300 ng/mL Anhydrotetracyclin induziert. Daraufhin beendeten diese Stämme die logarithmische Wachstumsphase und gingen innerhalb weiterer 48 h in die stationäre Wachstumsphase über. Die maximal erreichte OD_{600} betrug bei AWO [pTet_hcs1] 1,00 und bei AWO [pTet_hcs2] 0,69. Die Stämme AWO WT, AWO [pMTL83151], AWO [pPta_hcs1] und AWO [pPta_hcs2] erreichten deutlich höhere OD_{600}-Werte (1,84; 1,53; 1,42; 1,34) und gingen bereits nach 48 h in die stationäre Wachstumsphase über. Zu Beginn des autotrophen Wachstumsversuchs lag der gemessene pH-Wert im Kulturmedium bei 7,17. Ein signifikanter Abfall des pH-Wertes aller Kulturen ist erst nach 48 h Fermentationszeit messbar. Der pH-Wert der Stämme mit induzierbarer Genexpression lag bis zum Ende der Fermentation zwischen 5,9 und 6,0 und war stabil. Die anderen vier Stämme AWO WT, AWO [pMTL83151], AWO [pPta_hcs1] und AWO [pPta_hcs2] erreichten einen pH-Wert von 5,3. Während der Fermentation wurde die Gasphase zweimal durch neues Gas ersetzt und die kumulative H_2- bzw. CO_2-Aufnahme mittels GC-Analyse bestimmt (2.6.5). Die Stämme AWO WT (208 mM CO_2, 679 mM H_2), AWO [pMTL83151] (196 mM CO_2, 648 mM H_2), AWO [pPta_hcs1] (203 mM CO_2, 623 mM H_2) und AWO [pPta_hcs2] (176 mM CO_2, 640 mM H_2) haben CO_2 und H_2 in ähnlichen Mengen aufgenommen. Die kumulative Gasaufnahme von AWO [pTet_hcs1] (124 mM CO_2,

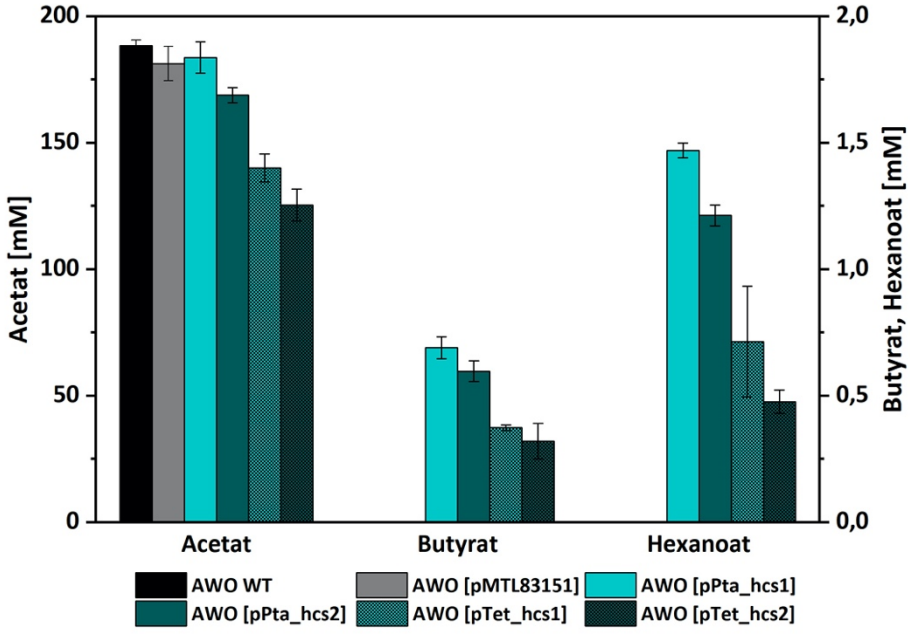


Abbildung 28: Produkttiter von AWO WT, AWO [pMTL83151], AWO [pPta_hcs1], AWO [pPta_hcs2], AWO [pTet_hcs1] und AWO [pTet_hcs2] unter autotrophen Bedingungen in 50 mL ATCC-Medium 1612 zum Ende der Fermentation.

561 mM H_2) und AWO [pTet_hcs2] (104 mM CO_2, 517 mM H_2) fiel geringer aus. Die maximal erreichten Produkttiter bei autotrophem Wachstum sind in Tabelle 13 zusammengefasst. Alle Stämme produzierten als Haupt-Fermentationsprodukt Acetat, wobei die mit Anhydrotetracyclin induzierten Stämme deutlich weniger Acetat produzierten. Wie bereits bei heterotrophem Wachstum beobachtet, konnten die Stämme, welche die Gene der *hcs*-Cluster 1 und 2 aus *C. carboxidivorans* tragen, neben Acetat auch Butyrat und Hexanoat in quantifizierbaren Mengen produzieren. Die erreichten Produkttiter von Acetat, Butyrat und Hexanoat bei der autotrophen Fermentation werden in Abbildung 28 aufgezeigt. Die Stämme AWO [pPta_hcs1], AWO [pPta_hcs2], AWO [pTet_hcs1] und AWO [pTet_hcs2] erreichten eine Butyrat-Konzentration von 0,69, 0,60, 0,37 und 0,32 mM sowie eine Hexanoat-Konzentration von 1,56, 1,21, 0,73 und 0,48 mM. Auch hier zeigte sich, dass die Konzentration des C4-Körpers bei allen Stämmen niedriger war als die des produzierten C6-Körpers. Mit dem *hcs*-Cluster 1 konnte, unabhängig vom Promoter, mehr Butyrat und Hexanoat produziert werden als mit *hcs*-Cluster 2 und entsprechendem Promoter. Auch unter autotrophen Bedingungen wurde mit dem konstitutiv aktiven Promoter $P_{pta\text{-}ack}$ deutlich mehr Produkt hergestellt als mit dem induzierbaren Promoter P_{tet}.

3.5.4 Analyse zur Optimierung der Hexansäure-Produktion mit AWO [pPta_hcs1] und AWO [pTet_hcs1]

Die durchgeführten Wachstumsexperimente mit den *A. woodii*-Stämmen AWO [pPta_hcs1], AWO [pPta_hcs2], AWO [pTet_hcs1] und AWO [pTet_hcs2] haben gezeigt, dass die Stämme durch die Expression der Gene der eingebrachten *hcs*-Cluster aus *C. carboxidivorans* zur Hexanoat-Produktion fähig sind (3.5.3). Mit dem induzierbaren Promotersystem P_{tet} wurden hierbei deutlich geringere Butyrat- und Hexanoat-Konzentrationen erreicht als mit dem konstitutiv aktiven Promoter $P_{pta\text{-}ack}$. Außerdem konnte bei allen Stämmen, verglichen mit der Acetat-Herstellung, eine Verzögerung in der Produktbildung der C4- und C6-Körper festgestellt werden. Zur Untersuchung dieses Effekts und zur weiteren Optimierung der Hexanoat-Produktion wurde eine Versuchsreihe mit den Stämmen AWO [pPta_hcs1] und AWO [pTet_hcs1] durchgeführt. Die Auswirkungen des pH-Werts oder der Acetat-Konzentration im Kulturmedium sowie die mögliche Abhängigkeit der Hexanoat-Produktion von der Zelldichte wurden durch drei separate heterotrophe Wachstumsexperimente mit AWO [pPta_hcs1] analysiert.

Bei der Durchführung des heterotrophen Wachstumsexperiments mit AWO [pPta_hcs1] (3.5.3) war eine Hexanoat-Produktion nach 48 h Fermentationszeit quantifizierbar. Zu diesem Zeitpunkt lag der gemessene pH des Kulturmediums bei einem Wert von 6,9. Zur Untersuchung der Auswirkung des pH-Wertes auf die Hexanoat-Bildung wurde ein heterotrophes Wachstumsexperiment mit AWO [pPta_hcs1] in 50 mL ATCC-Medium 1612 durchgeführt. Als Kohlenstoffquelle wurden 60 mM Fructose eingesetzt, um eine Substratlimitierung auszuschließen. Der pH-Wert wurde in den einzelnen Kulturmedien vor Beginn des Versuchs mit einer HCl-Lösung auf die Werte 7,5; 7,0; 6,5; 6,0; 5,5 und 5,0 eingestellt. Abbildung 29 zeigt das Wachstumsverhalten und die gemessenen Produktkonzentrationen des Stamms AWO [pPta_hcs1] bei unterschiedlichen, vor Beginn der Fermentation eingestellten, pH-Werten. Nach Beimpfen der Kulturflaschen mit einer logarithmisch wachsenden Vorkultur (AWO [pPta_hcs1]) auf einen OD_{600}-Wert zwischen 0,05 und 0,07 wuchsen alle Kulturen ohne Anlaufphase weiter, allerdings unterschiedlich schnell. Bereits bei einem pH-Wert unter 7,0 war verlangsamtes Wachstum und eine niedrigere maximal erreichte OD_{600} erkennbar (2,0 statt 2,8). Mit

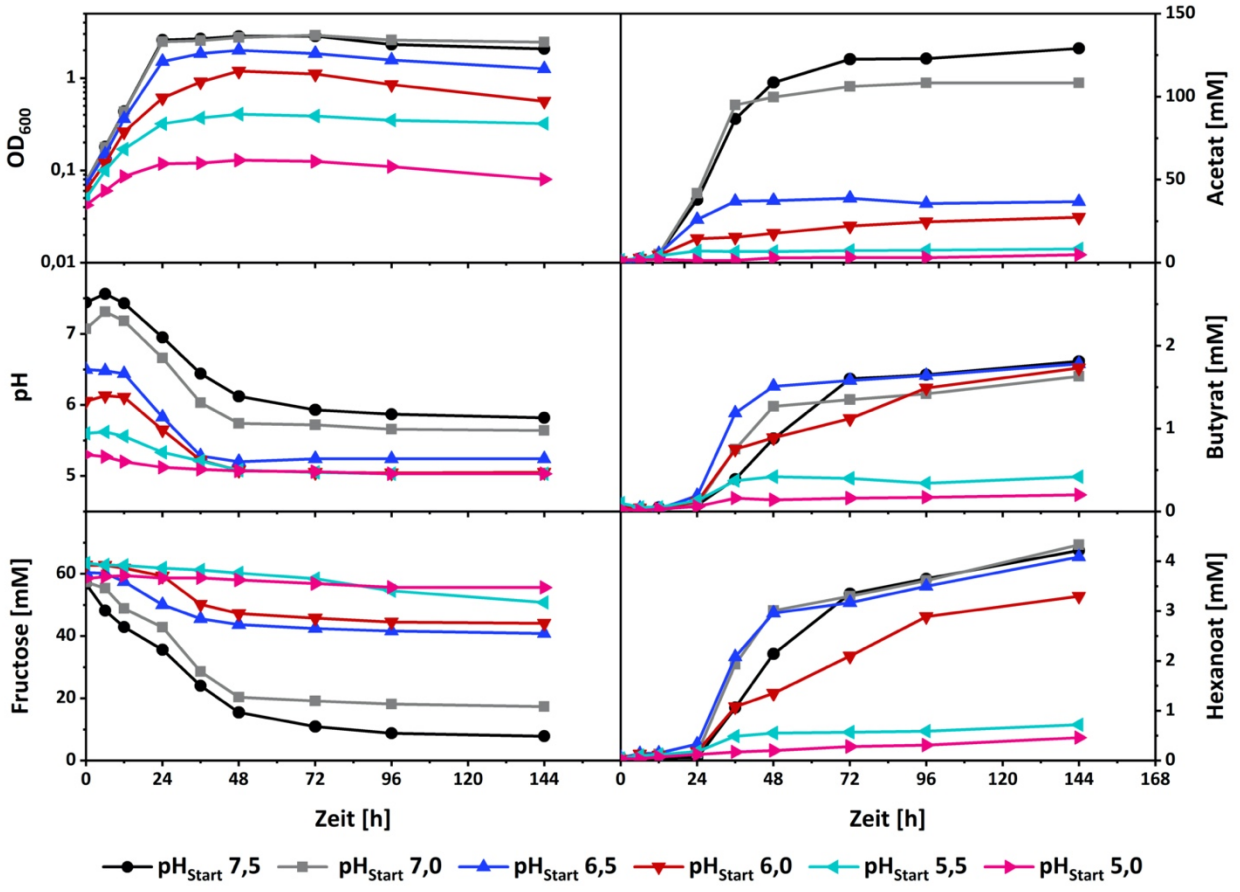


Abbildung 29: Wachstumsverhalten und Produktspektrum von AWO [pPta_hcs1] unter heterotrophen Bedingungen in 50 mL ATCC-Medium 1612 mit unterschiedlichem pH-Wert zu Beginn der Kultivierung.

niedrigerem pH-Wert (< 7,0) des Kulturmediums verstärkte sich der auf das Wachstumsverhalten wirkende Effekt. Bei einem pH-Wert von 5,5 oder niedriger wurde das Wachstum des Stamms stark inhibiert. Der gemessene pH-Wert nahm während der Fermentation ab und blieb nach dem Übergang der Kulturen in die stationäre Wachstumsphase konstant. Bei einem pH-Wert von 7,0 oder höher (zu Beginn der Fermentation) lag der pH-Wert zum Ende des Versuchs zwischen 5,6 und 5,8. Deutlich niedriger waren die finalen pH-Werte der Kulturen mit Anfangs-pH-Werten unter 7,0. Hier lagen alle pH-Werte der Kulturmedien am Ende der Fermentation zwischen 5,0 und 5,2. Die eingesetzten 60 mM Fructose wurden innerhalb der 144 h Fermentationszeit von keiner Kultur vollständig verbraucht. Bei pH-Werten von 7 oder höher (zu Beginn der Fermentation) wurden bis zum Ende 40-48 mM Fructose verbraucht. Die Kulturen in Medium mit Anfangs-pH-Werten zwischen 6,5 und 6,0 verbrauchten 19 mM Fructose und bei Werten unter 6,0 wurden 2-12 mM Fructose konsumiert. Eine deutliche Limitierung der Acetat-Produktion wurde bereits bei pH-Werten ab 6,5 oder niedriger sichtbar. Ab einem pH-Wert unter 6,0 war keine signifikante Acetat-Produktion mehr erkennbar. Butyrat war bei allen Kulturen messbar, allerdings war die Konzentration der Säure in Versuchsansätzen mit pH-Werten unterhalb von 6,0 nicht höher als 0,5 mM. Die anderen Kulturen erreichten zueinander ähnliche Butyrat-Konzentrationen mit Werten zwischen 1,73 mM und 1,81 mM. Die Butyrat-Produktion startete nach 24 h Fermentationszeit. Eine pH-abhängige Verschiebung des Produktions-Starts war nicht erkennbar. Ebenso wie die Butyrat-Produktion startete auch die Hexanoat-Herstellung erst nach 24 h Fermentationszeit. Die Kulturen mit Anfangs-pH-Werten von 6,0 oder höher erreichten bis zum Ende der Fermentation Hexanoat-Konzentrationen zwischen 4,1 mM und 4,35 mM. Bei pH-Werten unter 6,0 wurden finale Hexanoat-Titer von 0,46 mM und 0,72 mM gemessen.

Neben der Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher pH-Werte des Kulturmediums wurde im selben Wachstumsexperiment auch der Einfluss der Acetat-Konzentration auf die Hexanoat-Produktion von AWO [pPta_hcs1] untersucht. Da zu Beginn der Butyrat- und Hexanoat-Produktion während des heterotrophen Wachstumsexperiments (3.5.3) von den Stämmen durchschnittlich bereits über 70 mM Acetat produziert wurden, wäre eine im Medium vorliegende minimal erforderliche Acetat-Konzentration für den Start der Kettenverlängerungs-Reaktion zum Butyrat und Hexanoat denkbar. Der Verlauf des heterotrophen Wachstumsexperiments mit AWO [pPta_hcs1] bei unterschiedlichen im Kulturmedium vorliegenden Acetat-Konzentrationen ist in Abbildung 30 dargestellt. Der Versuch wurde mit biologischen Triplikaten durchgeführt. Vor Beginn des Versuchs wurde das Kulturmedium in einem

Versuchsansatz mit 40 mM und in einem weiteren mit 80 mM Natriumacetat versetzt. Ein dritter Ansatz ohne Zugabe von Natriumacetat diente hierbei als Referenz. Da durch die Zugabe der Säure der pH-Wert im Kulturmedium niedriger war, wurde dieser zur Vergleichbarkeit der Versuchsansätze mit einer NaOH-Lösung wieder erhöht. Das Wachstum der Kulturen wurde durch die Zugabe des Natriumacetats leicht beeinflusst. Erreicht wurde ohne Acetat-Zugabe eine maximale OD_{600} von 2,97, mit 40 mM Acetat eine OD_{600} von 2,72, bei 80 mM Acetat eine OD_{600} von 2,69. Bei 80 mM Acetat im Kulturmedium war zudem eine leichte Verzögerung bis zum Erreichen der maximalen OD_{600} erkennbar. Der pH-Wert im Kulturmedium der drei Ansätze stagnierte gleichermaßen bei einem Wert von 5,90 ± 0,02, obwohl der pH-Wert beim Ansatz ohne Acetat-Zugabe zu Beginn etwas höher lag. Die 60 mM Fructose wurden durch die Stämme nicht komplett verbraucht. Nicht konsumiert wurden durch die Kulturen 4-8 mM. Mit steigender Acetat-Konzentration wurde die Fructose langsamer verbraucht. Ohne Acetat-Zugabe wurden von den Kulturen 128 mM Acetat hergestellt. Bei Zugabe von 40 mM Acetat ins Kulturmedium wurden zusätzliche 104 mM, bei Zugabe von

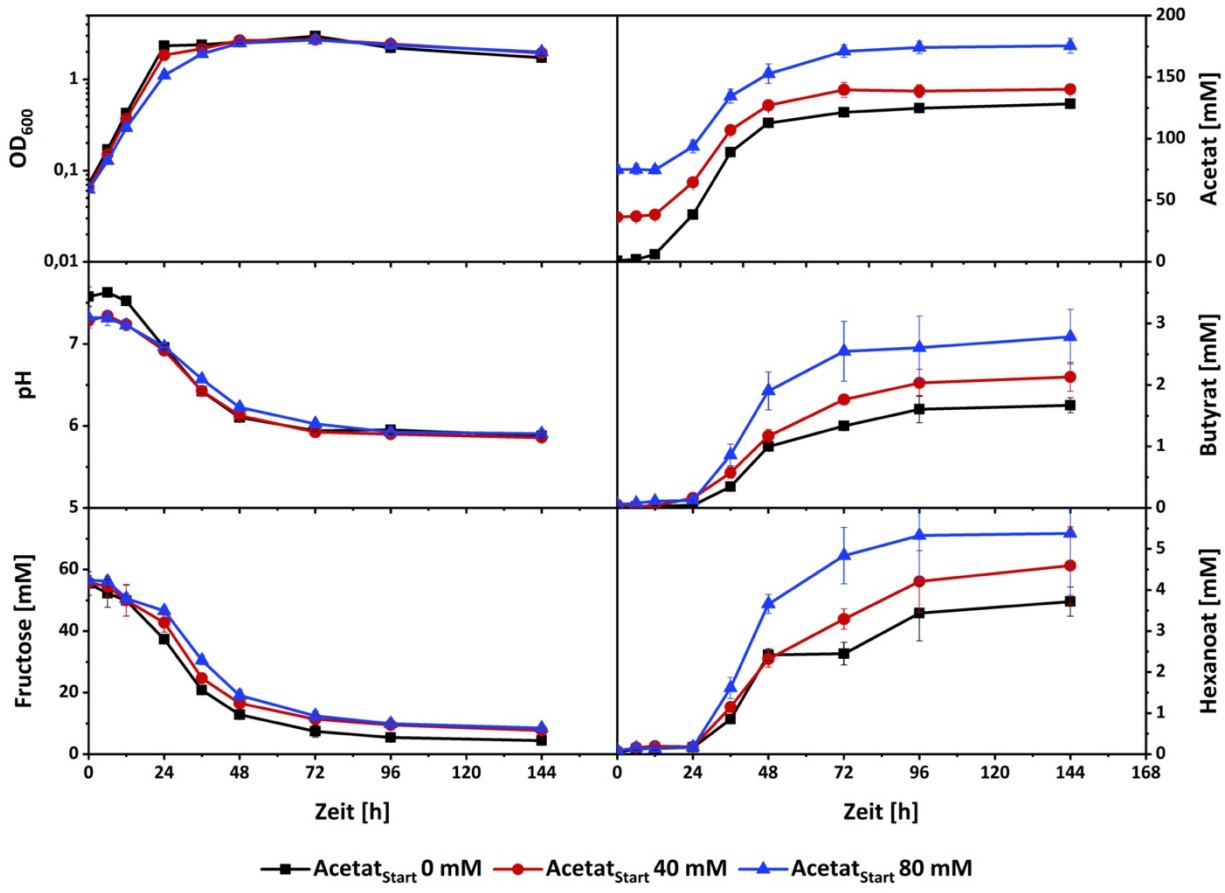


Abbildung 30: Wachstumsverhalten und Produktspektrum von AWO [pPta_hcs1] unter heterotrophen Bedingungen in 50 mL ATCC-Medium 1612 mit vorheriger Zugabe von 0 mM, 40 mM oder 80 mM Natriumacetat.

80 mM Acetat zusätzliche 100 mM Acetat gebildet. Die Butyrat- wie auch die Hexanoat-Produktion startete nach 24 h Fermentationszeit, unabhängig von der Acetat-Konzentration. Dennoch ist ein Effekt der Acetat-Zugabe auf die finale Produktkonzentration erkennbar. Mit 80 mM Acetat im Medium wurden bis zum Ende der Fermentation mehr Butyrat (2,78 mM) und Hexanoat (5,38 mM) gebildet als beim Ansatz ohne vorherige Acetat-Zugabe (1,67 mM Butyrat und 3,72 mM Hexanoat).

Im heterotrophen Wachstumsexperiment mit AWO [pPta_hcs1] (3.5.3) wurde deutlich, dass sowohl die Butyrat- als auch die Hexanoat-Produktion erst beginnt, wenn die Kulturen bereits von der logarithmischen in die stationäre Wachstumsphase übergehen. Hierbei lag die OD_{600} aller Stämme bei einem Wert größer 1,0. Um zu überprüfen, ob die Butyrat- und Hexanoat-Konzentrationen von der Zelldichte abhängig sind, wurden im selben heterotrophen Wachstumsexperiment, in dem auch die pH-bedingte und Acetat-bedingte Abhängigkeit getestet wurde, vier weitere Versuchsansätze untersucht. Dabei wurden zu den eingesetzten 50 mL ATCC-Medium 1612 zu drei unterschiedlichen

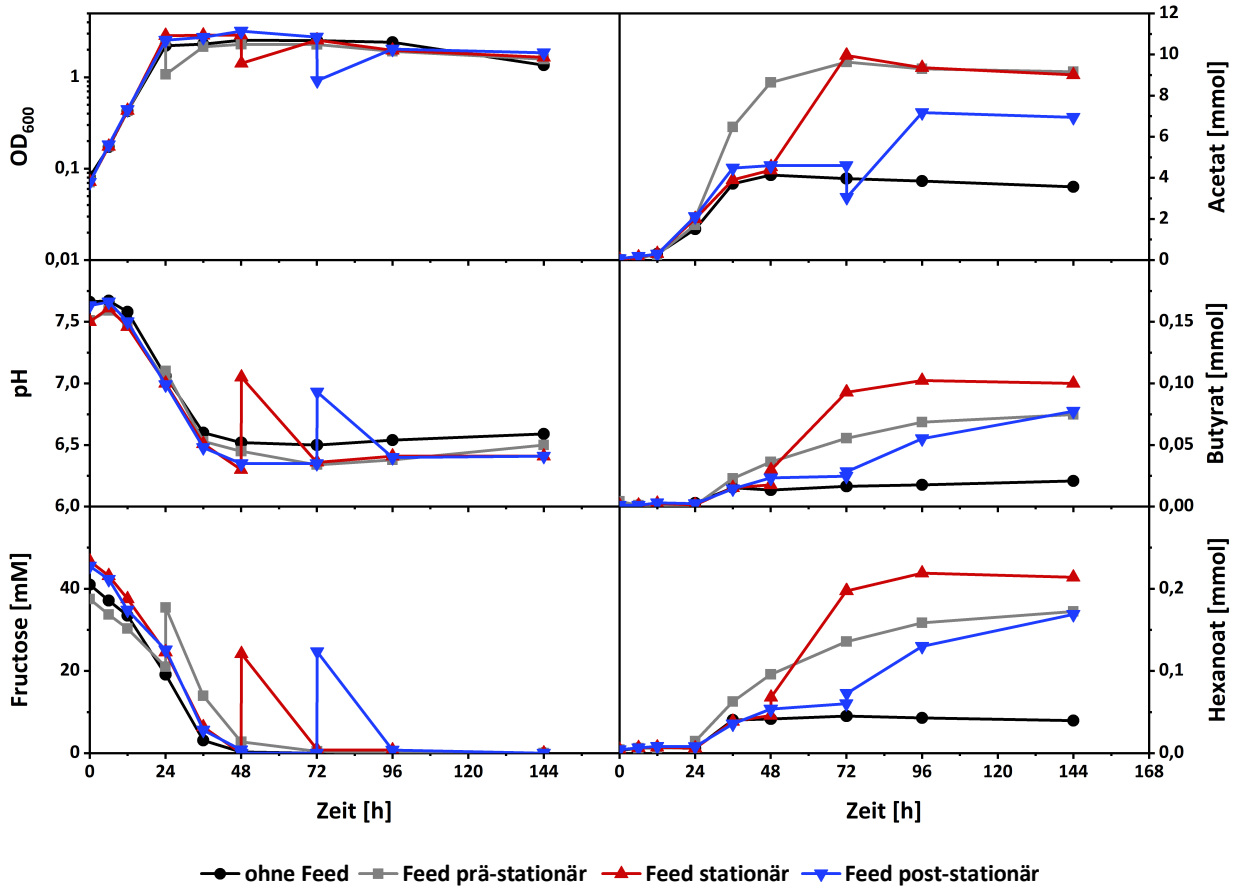


Abbildung 31: Wachstumsverhalten und Produktspektrum von AWO [pPta_hcs1] unter heterotrophen Bedingungen in 50 mL ATCC-Medium 1612 mit Zugabe von zusätzlich 50 mL frischem Medium zu verschiedenen Fermentationszeitpunkten.

Fermentationszeitpunkten je 50 mL frisches ATCC-Medium 1612 hinzugegeben. Der sogenannte „Feed“ fand einmal vor dem Übergang in die stationäre Wachstumsphase (prä-stationär), in der stationären Wachstumsphase (stationär) und in der Absterbephase (post-stationär) statt. Zu Beginn wurden 40 mM Fructose und mit dem zugegebenen frischen Medium ca. 20 mM Fructose als Kohlenstoffquelle eingesetzt. Als Referenz wurde eine Kultur ohne „Feed“ verwendet. Abbildung 31 zeigt das Wachstumsverhalten und die Produktbildung von AWO [pPta_hcs1] bei Zugabe frischen Mediums zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Alle Kulturen wuchsen gleichermaßen innerhalb von 24 h logarithmisch auf OD_{600}-Werte zwischen 2,2 und 2,8. Bei Zugabe von 50 mL frischem Medium fiel die OD_{600} jeweils um mindestens die Hälfte ab. Unabhängig vom Zeitpunkt wuchsen die Kulturen nach der Zugabe des Mediums weiter und gingen gegebenenfalls erneut in die stationäre Wachstumsphase über. Der pH-Wert bei Kulturen, in die zusätzliches Medium gegeben wurde, war zum Ende des Wachstumsexperiments mit Werten zwischen 6,4 und 6,5 etwas niedriger als bei den Kulturen ohne Zugabe frischen Mediums (6,6). Die Produktkonzentrationen sind, bezogen auf das tatsächliche Volumen des Kulturmediums, als Stoffmenge [mmol] angegeben. Nach der Zugabe des Mediums, unabhängig vom Zeitpunkt der Zugabe, stieg die produzierte Acetatmenge weiter an. Beim post-stationären „Feed“ wurde insgesamt weniger Acetat gebildet (6,9 mmol) als beim prä-stationären „Feed“ (9,2 mmol) bzw. stationären „Feed“ (9,0 mmol). Neben der Acetat-Produktion wurde auch die Herstellung von Butyrat und Hexanoat nach dem „Feed“ ohne Unterbrechung fortgeführt. Durch die Zugabe frischen Mediums in der stationären Wachstumsphase wurde am meisten Butyrat und Hexanoat bis zum Ende der Fermentation produziert.

Neben der detaillierten Analyse der Hexanoat-Produktion mit dem Stamm AWO [pPta_hcs1] in unterschiedlichen Versuchsansätzen wurde zudem getestet, ob durch unterschiedliche Anhydrotetracyclin-Konzentrationen und Zeitpunkte der Induktion die Herstellung von Hexanoat mit dem Stamm AWO [pTet_hcs1] optimiert werden kann. Hierfür wurde ein heterotrophes Wachstumsexperiment in 50 mL ATCC-Medium 1612 mit 60 mM Fructose durchgeführt, bei dem die Genexpression entweder vor Beginn oder bei einem OD_{600}-Wert von 0,5 durch die Zugabe von 300 ng/mL bzw. 500 ng/mL Anhydrotetracyclin (Atet) induziert wurde. Die Hauptkulturen wurden mit einer logarithmisch wachsenden Vorkultur von AWO [pTet_hcs1] auf eine OD_{600} von 0,1 angeimpft. Abbildung 32 zeigt das Wachstumsverhalten, den Substratverbrauch und die Produktbildung im heterotrophen Wachstumsversuch mit AWO [pTet_hcs1]. Die Kulturen, bei denen das Atet vor Beginn der Fermentation ins Medium gegeben wurde, zeigten eine deutliche Wachstumsinhibierung sowohl bei einer Konzentration von

300 ng/mL als auch bei 500 ng/mL. Nach etwa zwei Verdopplungen der OD_{600} stagnierte das Wachstum, bis nach 96 h Fermentationszeit bei 300 ng/mL Atet ein erneuter Anstieg der OD_{600} auf einen Wert von 2,31 messbar war. Bei 500 ng/mL Atet fand ein Anstieg der OD_{600} auf einen Wert von 2,13 nach 144 h statt. Die Kulturen, bei denen die Zugabe des Atet bei einem OD_{600}-Wert von 0,5 stattfand, erreichten eine maximale OD_{600} von 1,08 (300 ng/mL Atet) und 1,45 (500 ng/mL Atet). Entsprechend der verlängerten lag-Phasen bei vorheriger Anhydrotetracyclin-Zugabe verringerten sich der pH-Wert sowie die gemessene Fructose-Konzentration bei den Kulturen verzögert. Der gemessene pH-Wert im Medium der Kulturen lag bei einem Wert von 5,8 ± 0,2. Die 60 mM Fructose wurden bis zum Ende des heterotrophen Wachstumsversuchs nahezu vollständig verbraucht. Nachweisbar waren Fructose-Konzentrationen im Kulturmedium zwischen 4,1 mM und 5,7 mM nach 312 h. Wurde Atet vor Beginn der Fermentation ins Medium gegeben, so konnte neben der verzögerten Acetat-Produktion keine Butyrat- oder Hexanoat-Produktion festgestellt werden. Im Gegensatz dazu führte die Zugabe des Atet in der

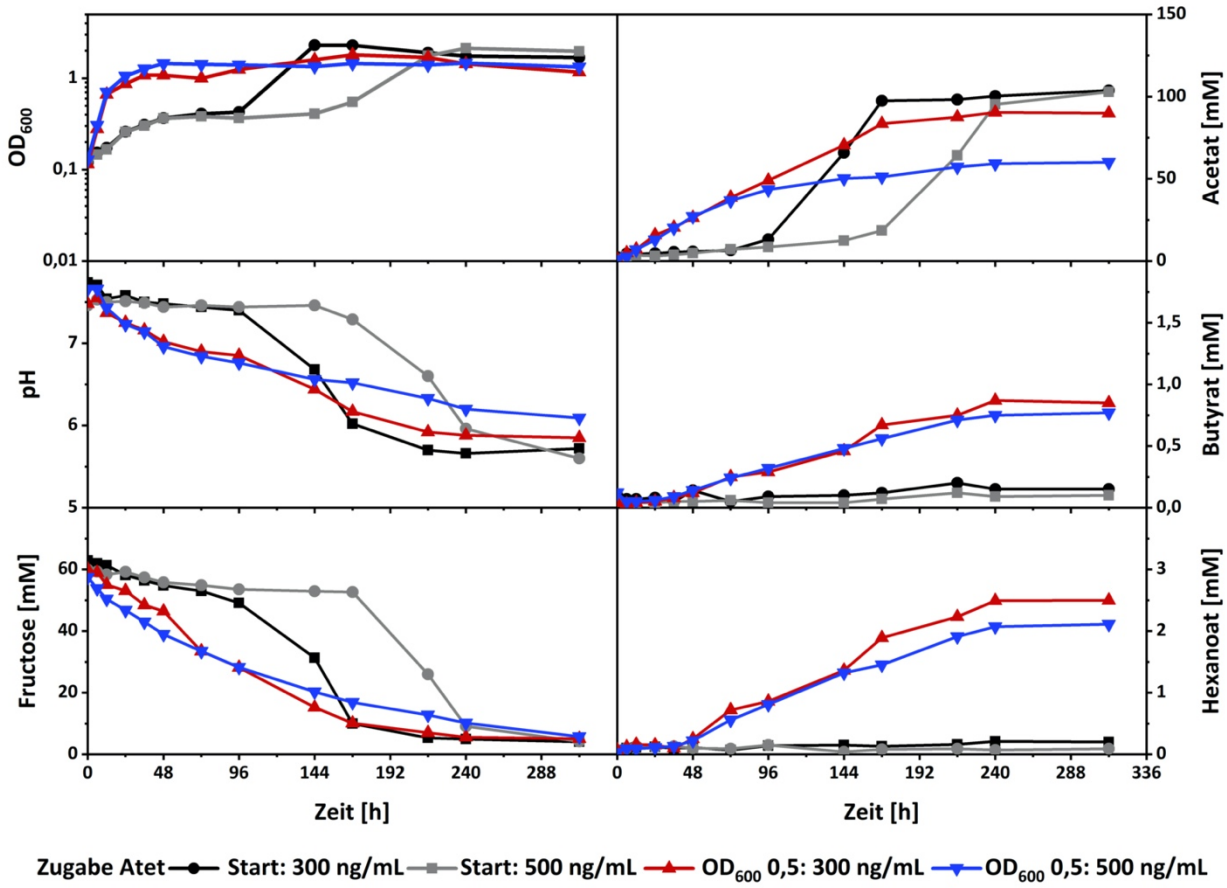


Abbildung 32: Wachstumsverhalten und Produktspektrum von AWO [pTet_hcs1] unter heterotrophen Bedingungen in 50 mL ATCC-Medium 1612 mit Zugabe verschiedener Konzentrationen Anhydrotetracyclin (300 ng/mL oder 500 ng/mL) zu verschiedenen Fermentationszeitpunkten (zu Beginn oder bei OD_{600} 0,5).

logarithmischen Wachstumsphase zur Produktion von Butyrat und Hexanoat. Bei Zugabe von 500 ng/mL Atet wurde deutlich weniger Acetat gebildet als bei allen anderen Kulturen (35 mM weniger). Die gemessenen Butyrat- und Hexanoat-Konzentrationen bei späterer Induktion der Genexpression mit unterschiedlichen Mengen Atet lagen in einem ähnlichen Bereich. Bei 300 ng/mL Atet wurden 0,85 mM Butyrat und 2,5 mM Hexanoat gebildet, bei 500 ng/mL Atet 0,77 mM Butyrat und 2,11 mM Hexanoat.

3.5.5 Lactat und Methanol als Substrate zur Hexanoat-Produktion mit *A. woodii* [pPta_hcs1]

Für die großtechnische Hexanoat-Produktion mit rekombinanten *A. woodii*-Stämmen ist neben Gasfermentation auch der Einsatz weiterer industriell relevanter Substrate wie Methanol oder Lactat denkbar. Die Stoffwechselwege zur Verwertung der beiden Substrate durch *A. woodii* wurden bereits durch Kremp *et al.* (2018) und Weghoff *et al.* (2015) untersucht und beschrieben.

Der Nachweis zur heterologen Hexanoat-Produktion mit Lactat oder Methanol sowie der Vergleich der eingesetzten Substrate wurde durch ein heterotrophes Wachstumsexperiment mit AWO [pPta_hcs1] erbracht. Hierfür wurden 50 mL ATCC-Medium 1612 entweder mit 40 mM Fructose, 80 mM DL-Natriumlactat (hierbei pH-Wert mit einer NaOH-Lösung angepasst) oder mit 240 mM Methanol versetzt und mit einer logarithmisch wachsenden Vorkultur von AWO [pPta_hcs1] (40 mM Fructose) auf einen OD_{600}-Wert von 0,1 angeimpft. Die nach einer Anpassungsphase an das veränderte Substrat wachsenden Kulturen wurden weitere zweimal in frisches Medium mit entsprechender Kohlenstoffquelle überimpft, bevor mit den Kulturen der Hauptversuch auf einen OD_{600}-Wert von 0,05 angeimpft wurde. Das Wachstumsexperiment wurde mit biologischen Triplikaten durchgeführt. In Abbildung 33 wird das Wachstumsverhalten, der Substratabbau sowie die Produktbildung von AWO [pPta_hcs1] im heterotrophen Wachstumsexperiment mit den Substraten Fructose, Lactat oder Methanol dargestellt. Die höchste Wachstumsrate sowie die maximal erreichte OD_{600} wurden mit Fructose erreicht. Nach 25 h Fermentationszeit wurde mit Fructose eine OD_{600} von 2,12 erreicht. Danach nahm der OD_{600}-Wert bis zum Ende der Fermentation ab (0,83 nach 168 h). Das Wachstum der Kulturen mit Lactat war vergleichsweise langsamer und der maximal gemessene OD_{600}-Wert lag nach 48 h bei 0,77. Bis zum Ende der Fermentation nach 168 h verringerte sich die OD_{600} auf einen Wert von 0,13. Beim Wachstum der Kulturen mit

Methanol war erst nach 72 h ein verzögertes Wachstum erkennbar. Danach erhöhte sich der OD_{600}-Wert bis zum Fermentationszeitpunk 122 h auf 2,1 und blieb stabil bis zum Ende der Fermentation. Der pH-Wert lag bei allen Kulturen zu Beginn bei 7,45, verringerte sich beim Wachstum mit Fructose innerhalb der ersten 48 h auf einen Wert von 6,66 und blieb dann stabil. Während des Wachstums mit Lactat als Kohlenstoffquelle war kein signifikanter Abfall des pH-Wertes messbar. Dieser verringerte sich bis zum Ende der Fermentation auf 7,33. Der pH-Wert im Fermentationsmedium beim Wachstum mit Methanol verringerte sich nach 48 h Fermentationszeit zuerst langsam und dann schneller, bis er nach 144 h mit 6,0 den niedrigsten gemessenen Wert erreichte. Die eingesetzten 40 mM Fructose wie auch die 80 mM Lactat wurden von den Kulturen im Wachstumsexperiment innerhalb von 48 h kontinuierlich verbraucht und waren danach nicht mehr nachweisbar. Von den anfangs gemessenen 252 mM Methanol wurden von den Kulturen nach Beginn der Fermentation 20 mM innerhalb von 48 h verbraucht. Danach erhöhte sich der Substratverbrauch. Nach 100 h Fermentationszeit waren 138 mM Methanol im Kulturmedium nachweisbar, die bis zum Ende der Fermentation vollständig verbraucht wurden. Die Acetat-Produktion der Kulturen mit Fructose und

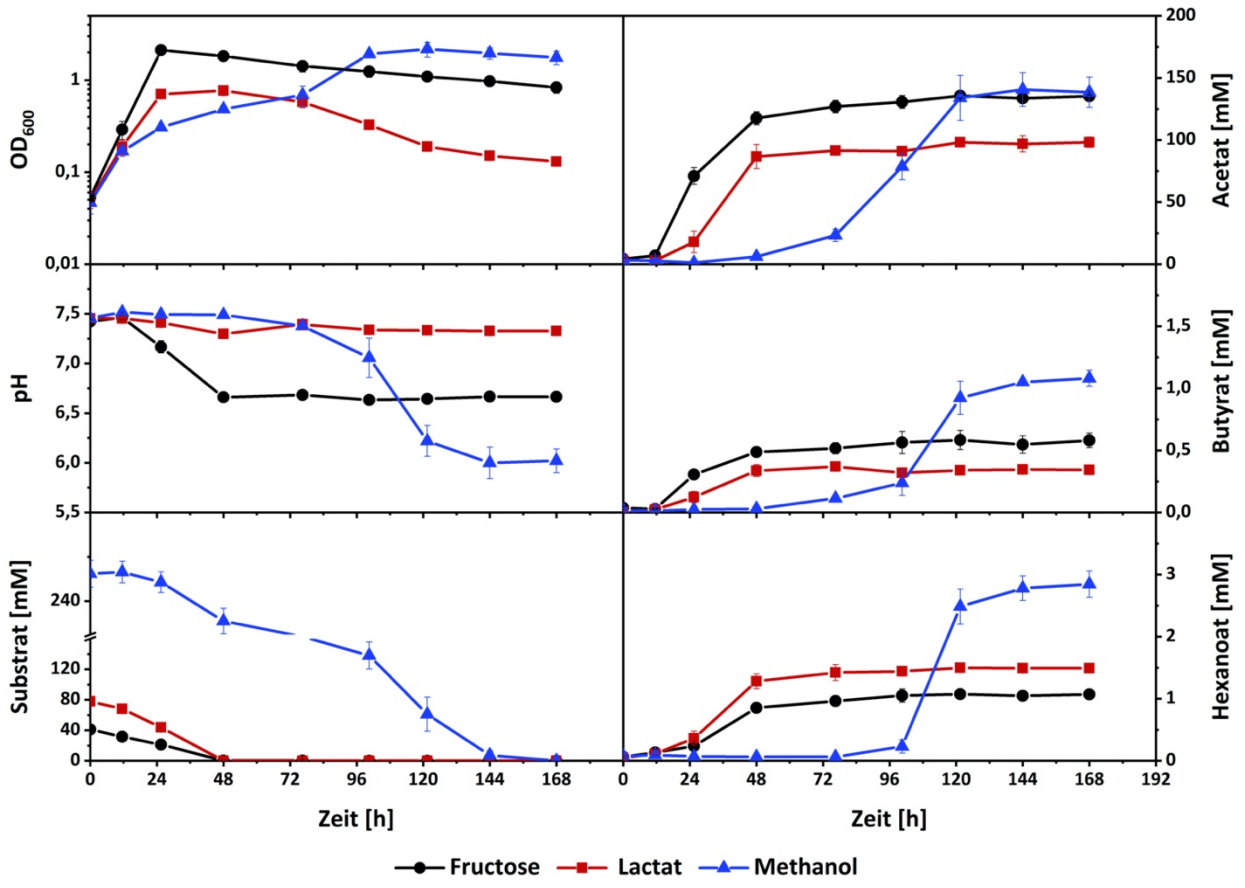


Abbildung 33: Wachstumsverhalten und Produktspektrum von AWO [pPta_hcs1] unter heterotrophen Bedingungen in 50 mL ATCC-Medium 1612 mit unterschiedlichen Substraten.

Lactat als C-Quelle war nach 12 h Fermentationszeit nachweisbar, beim Wachstum mit Methanol erst nach 48 h. Bis zum Ende der Fermentation produzierte der Stamm AWO [pPta_hcs1] mit 40 mM Fructose 135 mM Acetat, mit 80 mM Lactat 98 mM Acetat und mit 252 mM Methanol 138 mM Acetat. Neben Acetat wurden mit den drei eingesetzten Substraten auch Butyrat und Hexanoat von dem rekombinanten Stamm AWO [pPta_hcs1] hergestellt. Die Butyrat- und Hexanoat-Konzentrationen waren beim Wachstum mit Fructose und Lactat nach 24 h im quantifizierbaren Bereich und blieben nach 48 h stabil. Die Produktion von Butyrat war beim Wachstum mit Methanol erst nach 74 h quantifizierbar, die Produktion von Hexanoat nach 98 h. In Abbildung 34 werden die erreichten Produkttiter von Acetat, Butyrat und Hexanoat zum Ende der Fermentation mit Fructose, Lactat oder Methanol zusammengefasst. Die Kulturen mit Fructose produzierten im Durchschnitt 1,07 mM und die Kulturen mit Lactat 1,49 mM Hexanoat. Mit einem Wert von 2,85 mM wurde von den Kulturen mit Methanol als Substrat die höchste Hexanoat-Konzentration bei der Fermentation erreicht. Auch konnte die höchste Acetat- (138 mM) und Butyrat-Konzentration (1,08 mM) bei den Versuchsansätzen mit Methanol gemessen werden. Beim Wachstum mit Lactat wurde von den Kulturen am wenigsten Acetat (98 mM) und Butyrat (0,58 mM) gebildet, aber mehr Hexanoat (1,49 mM) als beim Ansatz mit Fructose. Mit Fructose als Kohlenstoffquelle wurde ähnlich viel Acetat gebildet wie mit Methanol (135 mM), aber weniger Butyrat (0,58 mM) und deutlich weniger Hexanoat (1,07 mM) produziert.

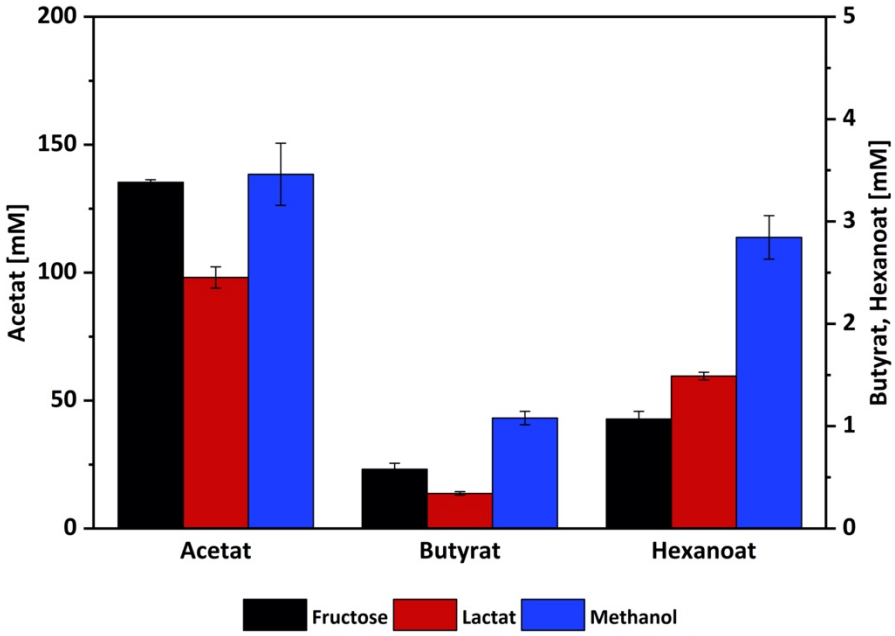


Abbildung 34: Produkttiter von AWO [pPta_hcs1] unter heterotrophen Bedingungen in 50 mL ATCC-Medium 1612 mit unterschiedlichen Substraten zum Ende der Fermentation.

3.6 Ansatz zur Identifizierung essentieller Gene für die Produktion mittelkettiger Säuren und Alkohole in acetogenen Bakterien

Mit den in Kapitel 3.5.3 durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass sowohl mit den heterolog exprimierten Genen des *hcs*-Clusters 1 als auch mit denen des *hcs*-Clusters 2 aus *C. carboxidivorans* eine Produktion von Butyrat und Hexanoat in dem Modellorganismus *A. woodii* möglich ist. Die Genprodukte der *hcs*-Cluster ähneln denen der *bcs*-Cluster aus Bakterien, die nur zur Herstellung von C4-Körpern in der Lage sind, und wurden auf die gleiche Weise annotiert (3.3). Es ist denkbar, dass nicht alle sechs codierenden Sequenzen der *hcs*-Cluster für die Kettenverlängerungs-Reaktion vom C4- zum C6-Körper essentiell sind. Um der Frage nachzugehen, ob ein einzelnes Gen des *hcs*-Clusters und dessen Genprodukt für die Reaktion zum Hexanoyl-CoA ausreichend ist, wurden die Gene *crt*, *hbd*, *thl* und *bcd* (zusammen mit *etfA* und *etfB*) separat in einzelne Plasmide kloniert. Diese Plasmide sollten, zusammen mit den bereits in *A. woodii* eingesetzten Plasmiden pPta_hcs1 und pTet_hcs1, in ein C4-Körper-produzierendes Bakterium eingebracht und dessen Produktspektrum daraufhin analysiert werden.

3.6.1 Erweiterung des modularen Hexanoyl-CoA-Synthese-Plasmid-Systems

Als Organismus zur Überprüfung der These, dass nur einzelne Genprodukte der *hcs*-Cluster für die Kettenverlängerungs-Reaktion vom Butyryl-CoA zum Hexanoyl-CoA notwendig sind, wurde *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* (CSAC) ausgewählt. Das ABE-fermentierende Bakterium *C. saccharoperbutylacetonicum*, welches 2001 durch Keis *et al.* (2001) beschrieben wurde, ist zur Solventogenese fähig und damit zur Butanol-Produktion. Der Bakterienstamm wandelt gebildete Säuren in die Alkohole Ethanol und größtenteils Butanol um (Thang *et al.*, 2010). Deshalb war durch das Einbringen und Expression des vollständigen *hcs*-Clusters 1 aus *C. carboxidivorans* (mit pPta_hcs1 oder pTet_hcs1; 3.5.1) neben der erwarteten Hexanoat-Produktion auch die Herstellung von Hexanol denkbar.

Vor Klonierungs-Beginn der Plasmide für *C. saccharoperbutylacetonicum* wurde die Resistenz des Stamms gegenüber den Antibiotika Thiamphenicol und Anhydrotetracyclin (Induktion von P_{tet}) getestet. Abbildung 35A zeigt das Wachstum von *C. saccharoperbutylacetonicum* in 5 mL CGM (2.3.5) bei unterschiedlichen Thiamphenicol-Konzentrationen (0-150 μg/mL), Abbildung 35C bei unterschiedlichen Anhydrotetracyclin-Konzentrationen (0-1 mg/mL). Die Untersuchung wurde mit

biologischen Triplikaten durchgeführt. Nach 168 h Inkubation bei 30 °C wurde der OD_{600}-Wert der Kulturen gemessen. Dieser lag bei vorheriger Zugabe von Anhydrotetracyclin zwischen 1,4 und 1,7. Eine signifikante Wachstumsinhibierung durch Anhydrotetracyclin war nicht messbar. Bei Thiamphenicol-Konzentrationen bis 50 µg/mL erreichte der Stamm einen OD_{600}-Wert zwischen 1,65 und 1,85. Bei höheren Thiamphenicol-Konzentrationen bis 150 µg/mL konnte Wachstum bis zu einer OD_{600} von mindestens 0,65 gemessen werden. Eine *in silico*-Untersuchung der DNA-Sequenz von *C. saccharoperbutylacetonicum* mit der Datenbank „Integrated Microbial Genomes Expert Review" (2.13) ergab, dass der Stamm zwei Gene auf dem Chromosom trägt (Cspa_c32480; Cspa_c34740), deren Genprodukte als Chloramphenicol-O-Acetyltransferasen Typ A annotiert sind. Ein mittels BLAST-Analyse erbrachter Vergleich (2.13) der beiden Aminosäure-Sequenzen mit der des Gens *catP* aus dem Schaukelvektor pMTL83151 ergab eine Übereinstimmung von 54 %/29 % (Cspa_c32480/Cspa_c34740). Aufgrund der nachgewiesenen Thiamphenicol-Resistenz von *C. saccharoperbutylacetonicum* wurde die Resistenz des Stamms gegenüber dem Antibiotikum Clarithromycin getestet. Abbildung 35B zeigt die gemessene OD_{600} nach 168 h Inkubation des Stamms in 5 mL CGM mit unterschiedlichen Clarithromycin-Konzentrationen (mit biologischen Triplikaten). Ab einer Konzentration von 2,5 µg/mL wurde das Wachstum von *C. saccharoperbutylacetonicum* inhibiert. Zur Generierung und Selektion möglicher rekombinanter *C. saccharoperbutylacetonicum*-Stämme sowie bei nachfolgend durchgeführten Wachstumsexperimenten wurden 5 µg/mL Clarithromycin eingesetzt.

Die nachgewiesene Thiamphenicol-Resistenz von *C. saccharoperbutylacetonicum* und die Erstellung von Plasmiden mit einzelnen Genen des *hcs*-Clusters 1 aus *C. carboxidivorans* machten es notwendig, dass das konstruierte modulare *hcs*-Plasmid-System (3.5.1)

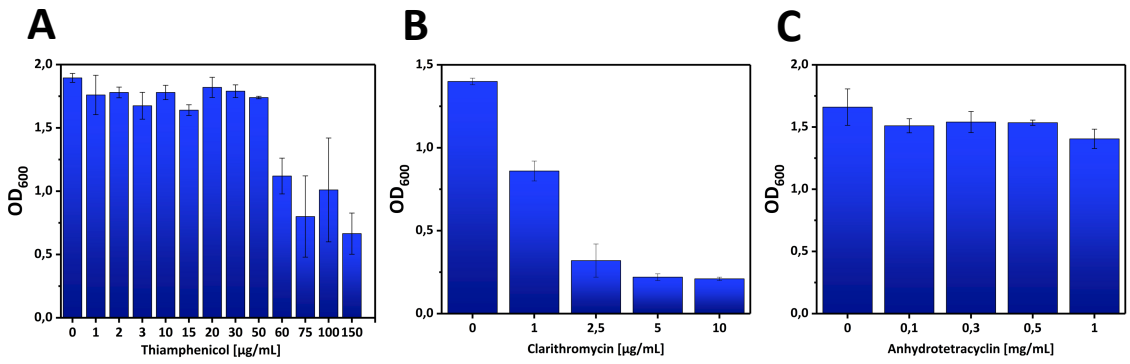


Abbildung 35: Maximale OD_{600} von *C. saccharoperbutylacetonicum* WT in 5 mL CGM (168 h) bei vorheriger Zugabe unterschiedlicher Thiamphenicol- (A), Clarithromycin- (B) oder Anhydrotetracyclin-Konzentrationen (C).

erweitert wurde. Abbildung 36 stellt die Erweiterung des *hcs*-Plasmid-Systems schematisch dar. Zunächst wurde die Resistenzkassette *catP* mittels Restriktionsverdau (2.7.12) aus den Plasmiden pPta_hcs1 und pTet_hcs1 geschnitten und anschließend das Gen *ermB* (aus Plasmid pMTL83251 ausgeschnitten; codiert für eine 23S rRNA Adenin-

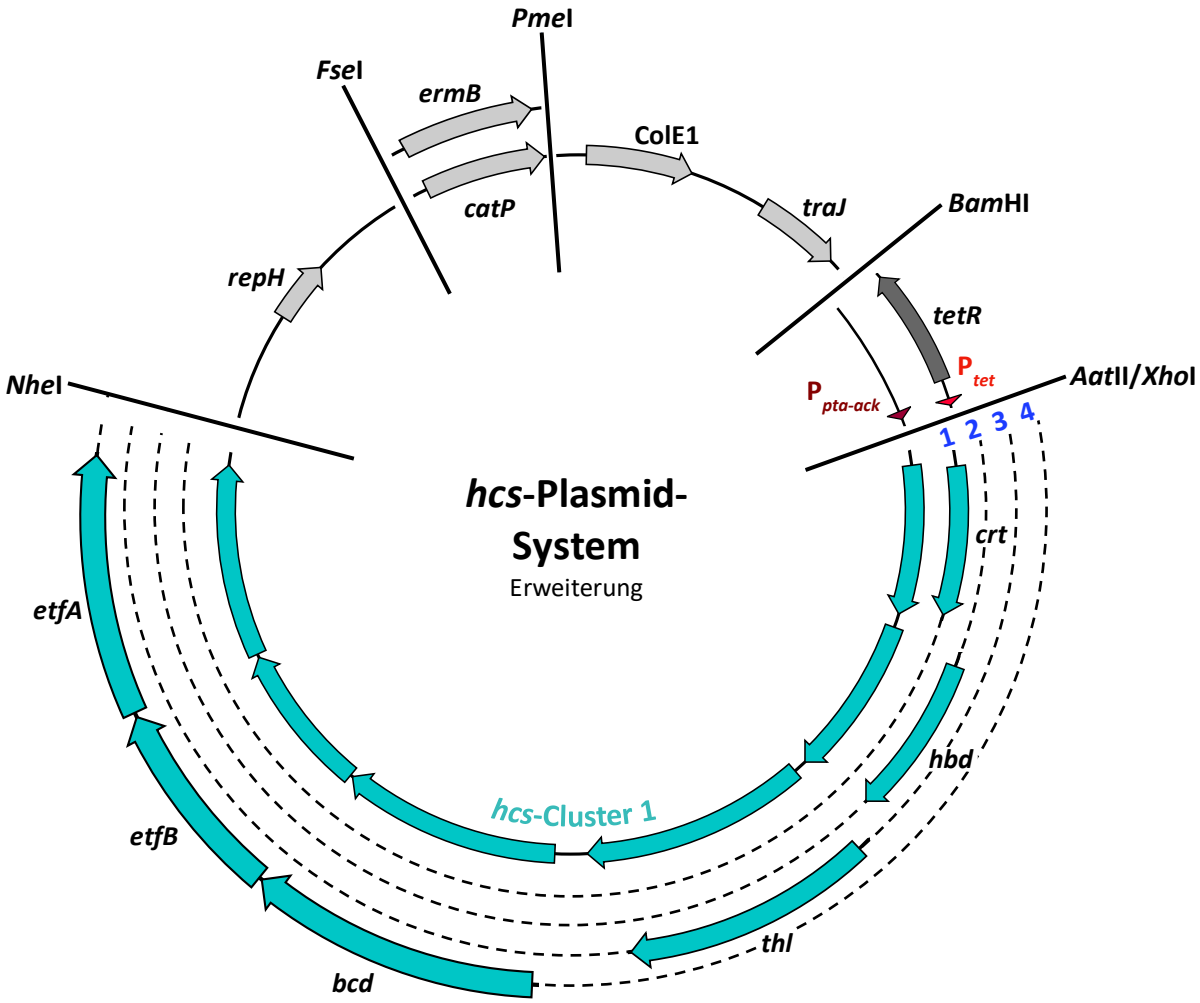


Abbildung 36: Erweiterung des modularen *hcs*-Plasmid-Systems. Die Antibiotikaresistenzkassette *catP* wurde für *C. saccharoperbutylacetonicum* in den Plasmiden pPta_hcs1 und pTet_hcs1 durch *ermB* ersetzt. Daraus resultierten die Plasmide pPta_hcs1_C und pTet_hcs1_C. Zusätzlich wurden vier Plasmide mit einzelnen Genen des *hcs*-Clusters 1 unter Kontrolle des Promoters $P_{pta\text{-}ack}$ konstruiert: pcrt (1), phbd (2), pthl (3) und pbcd_etfAB (4) (Wirth und Dürre, 2021). *repH*, Replikationsursprung funktional in Gram-positiven Bakterien; *catP*, Chloramphenicol-Acetyltransferase; *ermB*, 23S rRNA Adenin-N6-Methyltransferase; ColE1, Replikationsursprung funktional in Gram-negativen Bakterien; *traJ*, Transfer-Funktion für Konjugation; $P_{pta\text{-}ack}$, Promoterregion aus *C. ljungdahlii*; *tetR*, Repressor-Protein; P_{tet}, Promoterregion aus Plasmid pMTL83151_Ptet; *crt*, Crotonase; *hbd*, 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase; *thl*, Thiolase; *bcd*, Butyryl-CoA-Dehydrogenase; *etfB*, Elektronen-transferierendes Flavoprotein B; *etfA*, Elektronen-transferierendes Flavoprotein A.

N6-Methyltransferase) durch Ligation (2.7.7) in das Zielplasmid eingebracht. Die dadurch erhaltenen Plasmide pPta_hcs1_C und pTet_hcs1_C wurden nach Transformation in *E. coli* XL1-Blue MRF' (2.8.1) durch Restriktionsverdau (2.7.12) und

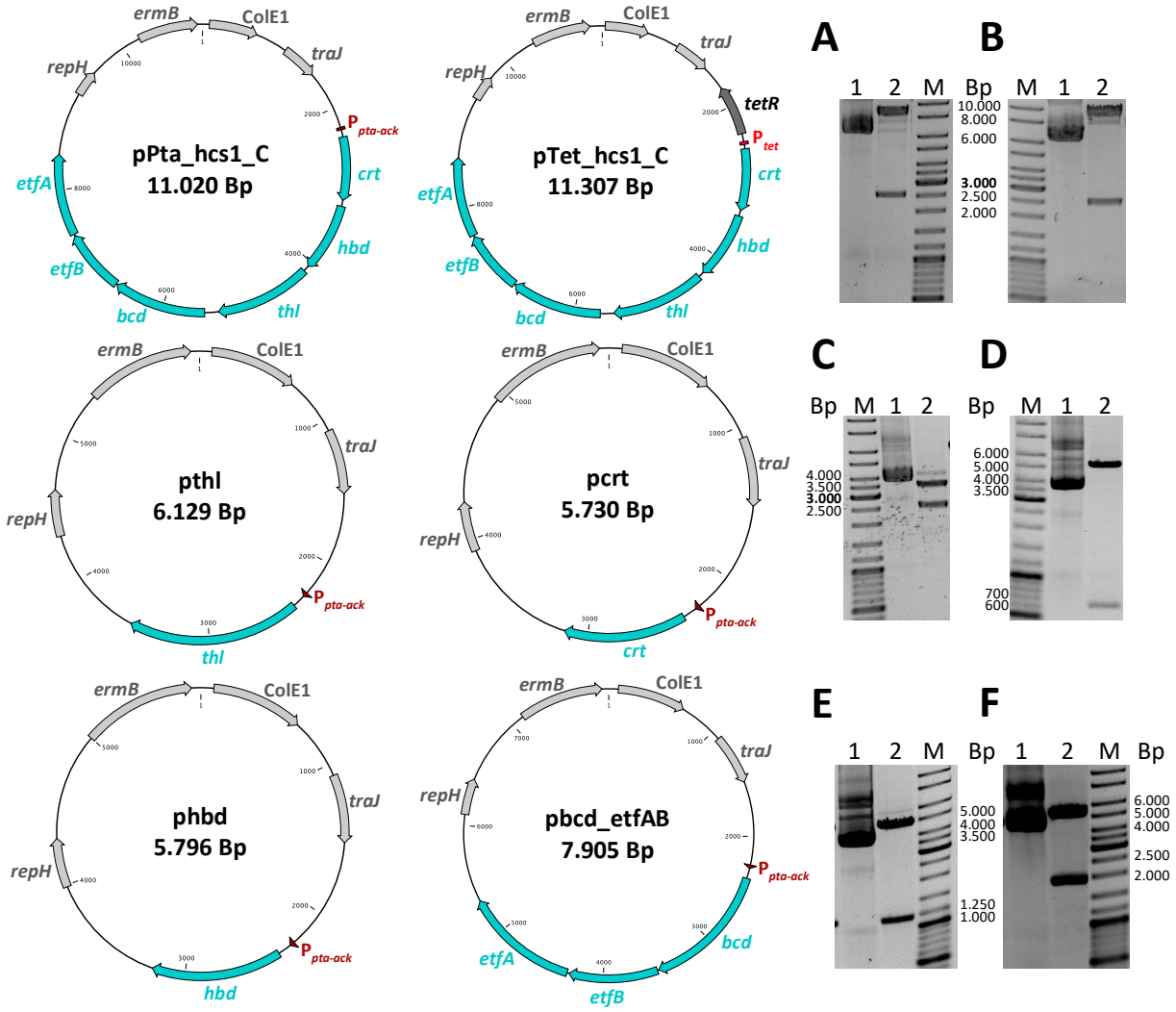


Abbildung 37: Schematische Darstellung der Plasmide pPta_hcs1_C (A), pTet_hcs1_C (B), pthl (C), pcrt (D), phbd (E) und pbcd_etfAB (F) sowie deren Verifikation mittels Restriktionsverdau nach Transformation in *E. coli* XL1-Blue MRF'. Erwartete Fragmentgrößen auf dem Agarosegel: A, 8.305 Bp und 2.450 Bp; B, 8.620 Bp und 2.550 Bp; C, 3.420 Bp und 2.560 Bp; D, 5.070 Bp und 667 Bp; E, 4.609 Bp und 1.191 Bp, F: 5.711 Bp und 2.198 Bp. 1, aufgereinigtes Plasmid unverdaut; 2, aufgereinigtes Plasmid mit Restriktionsenzymen verdaut; M, GeneRuler™ DNA Ladder Mix; *repH*, Replikationsursprung funktional in Gram-positiven Bakterien; *ermB*, 23S rRNA Adenin-N6-Methyltransferase; ColE1, Replikationsursprung funktional in Gram-negativen Bakterien; *traJ*, Transfer-Funktion für Konjugation; $P_{pta\text{-}ack}$, Promoterregion aus *C. ljungdahlii*; *tetR*, Repressor-Protein; P_{tet}, Promoterregion aus Plasmid pMTL83151_Ptet; *crt*, Crotonase; *hbd*, 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase; *thl*, Thiolase; *bcd*, Butyryl-CoA-Dehydrogenase; *etfB*, Elektronen-transferierendes Flavoprotein B; *etfA*, Elektronen-transferierendes Flavoprotein A.

Sequenzierung (2.7.13) verifiziert. Der Aufbau der zwei klonierten Plasmide pPta_hcs1_C und pTet_hcs1_C wird in Abbildung 37, das Ergebnis der Verifikation durch Restriktionsverdau in Abbildung 37A und Abbildung 37B gezeigt.

Die Klonierung der vier Plasmide pcrt, phbd, pthl und pbcd_etfAB erfolgte mittels In-Fusion®-Reaktion (2.7.6). Dafür wurden die einzubringenden DNA-Abschnitte mit pPta_hcs1 (DNA-Template) und entsprechenden In-Fusion®-Primern amplifiziert (2.1.3). Als Vektor-Rückgrat wurde pMTL83251 zur In-Fusion®-Klonierung eingesetzt. Die Konstruktion von pcrt, phbd, pthl und pbcd_etfAB wird in Abbildung 37 dargestellt. Verifiziert wurden die vier Plasmide nach Transformation in *E. coli* XL1-Blue MRF' (2.8.1) zunächst durch Restriktionsverdau (2.7.12). Die Agarosegel-Bilder in Abbildung 37D-F zeigen das Ergebnis des Restriktionsverdaus. Anschließend wurden die Plasmide sequenziert (2.7.13), um Mutationen auszuschließen zu können.

3.6.2 Untersuchung der C6-Körper-Produktion mit rekombinanten *C. saccharoperbutylacetonicum*-Stämmen

Vor Einbringung der sechs Plasmide pPta_hcs1_C, pTet_hcs1_C, pthl, pcrt, phbd und pbcd_etfAB in den Stamm *C. saccharoperbutylacetonicum* wurde überprüft, ob der C4-Körper-produzierende Stamm bei Anwesenheit von Hexanoat oder Hexanol in seinem Wachstumsverhalten negativ beeinflusst wird. Zusätzlich wurde getestet, ob eine Verstoffwechselung der C6-Körper durch *C. saccharoperbutylacetonicum* stattfindet. Hierfür wurden 5 mL CGM (2.3.5) mit einer logarithmisch wachsenden Vorkultur (*C. saccharoperbutylacetonicum* WT) auf eine OD_{600} von 0,1 angeimpft. In einzelne Kulturmedien wurden 2,5 mM bzw. 5,0 mM Hexanoat oder Hexanol hinzugegeben. Ein Ansatz ohne Zugabe weiterer Säuren oder Alkohole diente dabei als Referenz. Alle Versuchsansätze wurden mit biologischen Triplikaten durchgeführt. Die Produkttiter der Substanzen wurden zu Beginn und nach 168 h Inkubationszeit bei 30 °C mit GC-Analyse bestimmt (2.6.3). Zusätzlich wurde die maximal erreichte OD_{600} nach 48 h Inkubation bestimmt, um Aussagen über die Toxizität der Substanzen treffen zu können. Die Ergebnisse der GC-Analyse sowie die bestimmten OD_{600}-Werte werden in Abbildung 38 zusammengefasst. Alle Kulturen erreichten eine OD_{600} zwischen 1,80 und 2,12. Eine Inhibierung des Wachstums von *C. saccharoperbutylacetonicum* durch die C6-Körper war bei den untersuchten Konzentrationen nicht erkennbar. Die Produkttiter der zugegebenen Substanzen Hexanoat und Hexanol veränderten sich während 168 h

Fermentationszeit nicht. Eine Metabolisierung der C6-Körper durch *C. saccharoperbutylacetonicum* konnte nicht beobachtet werden.

Die Plasmide pPta_hcs1_C, pTet_hcs1_C, pthl, pcrt, phbd und pbcd_etfAB wurden mittels Elektroporation (2.8.5) in den Stamm *C. saccharoperbutylacetonicum* eingebracht. Eine erfolgreiche Transformation wurde, nach Isolierung der DNA (2.7.1), durch Sequenzierung (2.7.13) der Plasmide erbracht. Verifiziert wurden die Stämme CSAC [pPta_hcs1_C], CSAC [pTet_hcs1_C], CSAC [pthl], CSAC [pcrt], CSAC [phbd] und CSAC [pbcd_etfAB]. Die sechs rekombinanten Bakterienstämme wurden anschließend zusammen mit dem Wildtypstamm CSAC WT und dem Stamm CSAC [pMTL83251] in einem heterotrophen Wachstumsexperiment analysiert. Vorkulturen der acht *C. saccharoperbutylacetonicum*-Stämme wurden zunächst in 5 mL CGM kultiviert, mit denen anschließend 50 mL OMS (2.3.5) angeimpft wurden. Nach Adaptation der Stämme an das Minimalmedium wurde der Hauptversuch mit logarithmisch wachsenden Kulturen auf einen OD_{600}-Wert von 0,1 angeimpft. Das Wachstumsexperiment wurde mit biologischen Triplikaten durchgeführt. Die Ergebnisse des Experiments zur Analyse des Produktspektrums der rekombinanten *C. saccharoperbutylacetonicum*-Stämme sind in Abbildung 39 dargestellt. Gezeigt werden Wachstumsverhalten und Produktbildung der Stämme. Alle Kulturen wuchsen gleichermaßen ohne Anlaufphase direkt nach Beginn des Versuchs weiter. Bei den rekombinanten Stämmen war die logarithmische Wachstumsphase nach 23 h beendet.

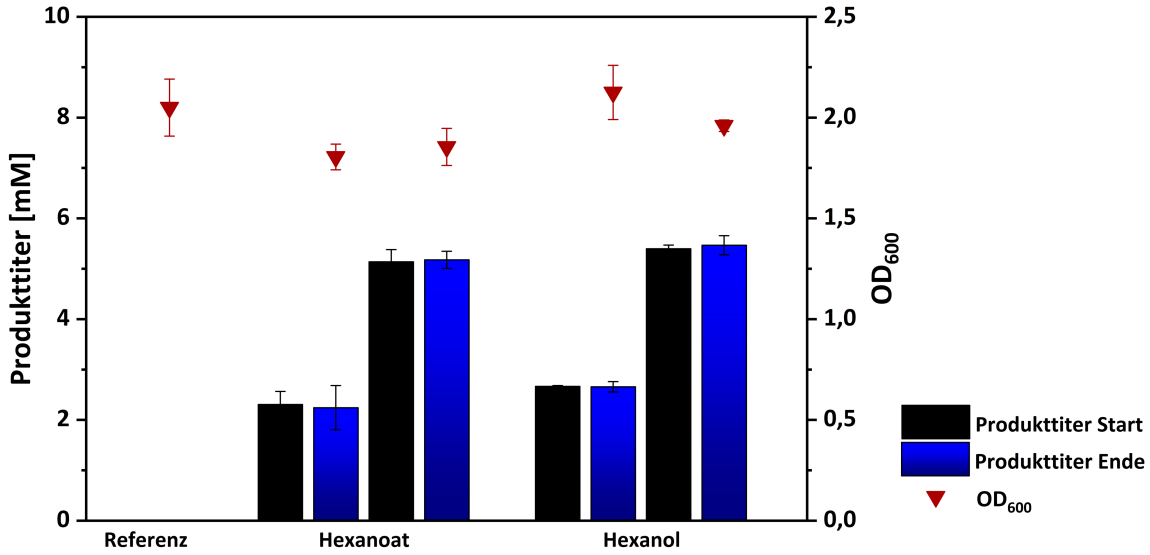


Abbildung 38: Untersuchung der Toxizität und Verstoffwechselung von Hexanoat oder Hexanol durch den Stamm *C. saccharoperbutylacetonicum* Wildtyp in 5 mL CGM. Gemessen wurde die maximal erreichte OD_{600} (rot) nach 48 h sowie die Konzentration der zugegebenen Komponenten zu Beginn des Versuchs (schwarz) und nach 168 h (blau).

Der Wildtyp-Stamm ging nach 40 h in die stationäre Wachstumsphase über und erreichte eine maximale OD_{600} von 4,5 nach 72 h Fermentationszeit. Danach fiel die OD_{600} bei CSAC WT bis zum Ende des Versuchs nach 168 h auf einen Wert von 2,2 ab. Die rekombinanten Stämme gingen nach 40 h in eine stationäre Wachstumsphase über. Der maximal erreichte OD_{600}-Wert wurde von den rekombinanten Stämmen nach 72 h, 120 h oder 168 h erreicht und lag im Durchschnitt bei 3,0 ± 0,3. Bei CSAC [pTet_hcs1_C] wurde die Genexpression nach 23 h durch die Zugabe von 300 ng/mL Anhydrotetracyclin induziert. Der gemessene pH-Wert im Kulturmedium der Stämme lag zu Beginn der Fermentation zwischen 6,75 und 6,83 und fiel bei allen Kulturen gleichmäßig auf einen Wert zwischen 5,47 und 5,71 nach 40 h ab. Bis zum Ende der Fermentation blieb der pH-Wert je nach Kultur stabil oder erhöhte sich leicht. Der pH-Wert von CSAC WT lag mit einem Wert von 5,94 nach 168 h am höchsten. Bei den rekombinanten Stämmen lag der pH-Wert am Ende der Fermentation zwischen 5,54 und 5,78. Die Konzentration der

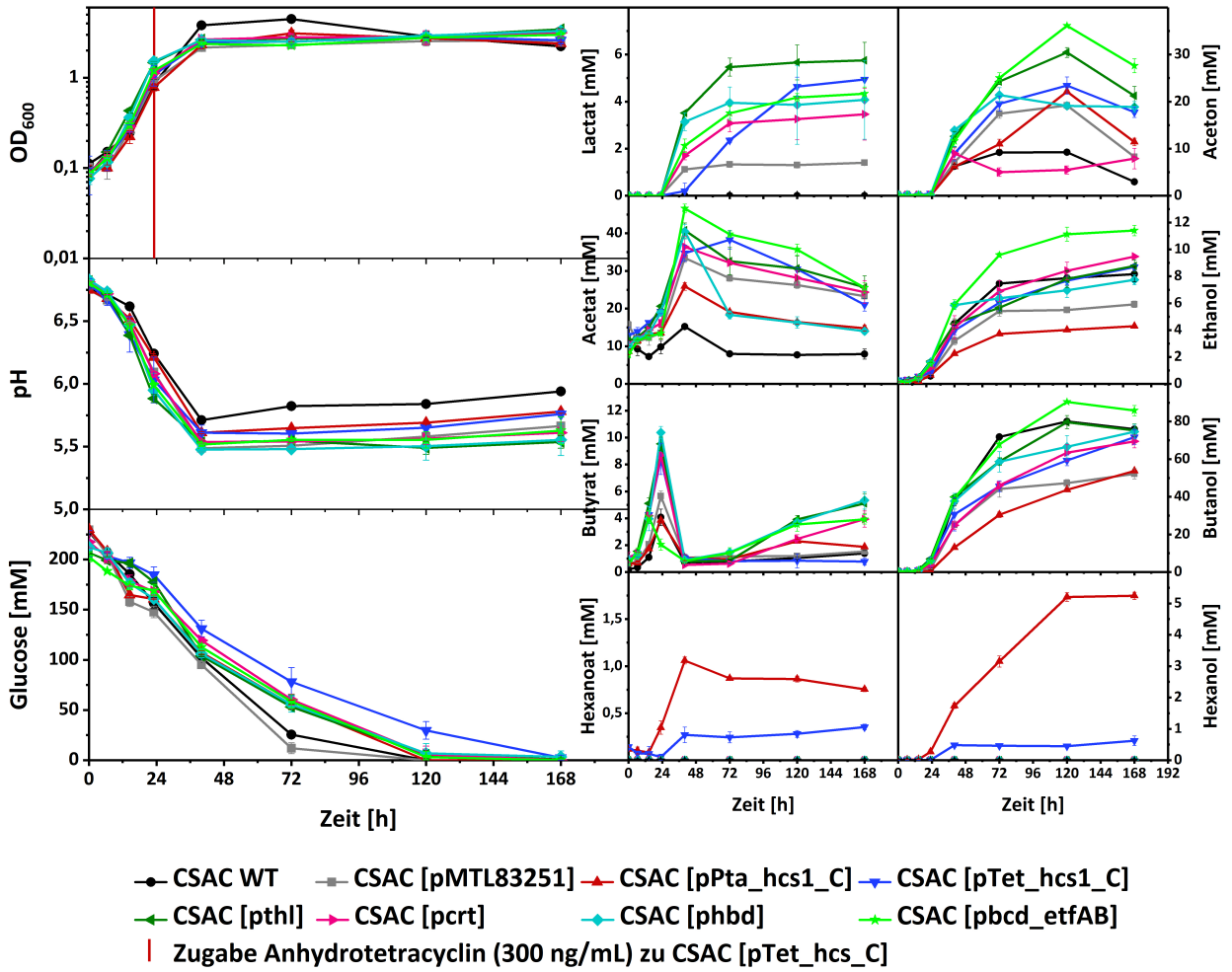


Abbildung 39: Wachstumsverhalten und Produktspektrum der Stämme CSAC WT, CSAC [pMTL83251], CSAC [pPta_hcs1_C], CSAC [pTet_hcs1_C], CSAC [pthl], CSAC [crt], CSAC [phbd] und CSAC [pbcd_etfAB] unter heterotrophen Bedingungen in 50 mL OMS (Wirth und Dürre, 2021).

Glucose im Minimalmedium wurde mittels HPLC (2.6.2) bestimmt und lag zum Start der Fermentation zwischen 202 mM und 229 mM. Das Substrat wurde am schnellsten durch CSAC WT und CSAC [pMTL83251] verstoffwechselt. Hier konnten nach 72 h Fermentationszeit noch 25 mM (CSAC WT) und 12 mM (CSAC [pMTL83251]) Glucose im Medium nachgewiesen werden. Nach 120 h konnte nur noch bei CSAC [pTet_hcs1_C] Glucose (30 mM) im Medium bestimmt werden, die bis zum Ende der Fermentation ebenfalls verbraucht wurde. Tabelle 14 zeigt eine Zusammenfassung der maximal erreichten OD_{600} sowie Produkttiter der untersuchten *C. saccharoperbutylacetonicum*-Stämme nach 168 h Fermentationszeit.

Tabelle 14: Übersicht der maximal erreichten OD_{600} und der Produkttiter von CSAC WT, CSAC [pMTL83251], CSAC [pPta_hcs1_C], CSAC [pTet_hcs1_C], CSAC [pthl], CSAC [pcrt], CSAC [phbd] und CSAC [pbcd_etfAB] am Ende des heterotrophen Wachstumsversuchs.

	Produkttiter der *C. saccharoperbutylacetonicum*-Stämme [mM]							
	Wildtyp	**[pMTL83251]**	**[pPta_hcs1_C]**	**[pTet_hcs1_C]**	**[pthl]**	**[pcrt]**	**[phbd]**	**[pbcd_etfAB]**
OD_{600}	4,5	2,6	3,1	2,8	3,4	3,2	3,3	3,0
Lactat	0,0	1,4	0,0	4,9	5,7	3,5	4,1	4,3
Aceton	2,9	8,2	11,4	17,7	21,2	7,9	18,9	27,6
Acetat	7,9	23,3	14,7	21,0	25,6	24,4	13,9	25,6
Ethanol	8,2	5,9	4,3	8,7	8,8	9,5	7,7	11,4
Butyrat	1,4	1,5	1,9	0,8	5,1	3,9	5,3	3,9
Butanol	76,0	52,2	53,8	71,7	75,3	69,4	74,6	85,8
Hexanoat	0,0	0,0	0,8	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0
Hexanol	0,0	0,0	5,2	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0

Insgesamt wurden acht unterschiedliche Produkte mittels GC-Analyse (2.6.3) detektiert. Lactat-Produktion konnte bei allen Stämmen außer CSAC WT und CSAC [pPta_hcs1_C] ab 24 h Fermentationszeit beobachtet werden. Aceton-Produktion konnte bei allen Stämmen, ebenfalls nach 24 h, nachgewiesen werden. Aceton wurde von den Stämmen teilweise wieder verstoffwechselt, weswegen die Konzentration bis zum Ende der Fermentation wieder abnahm. Die gemessene Acetat-Konzentration im Kulturmedium

lag bei allen Stämmen zu Beginn zwischen 9 mM und 16 mM. Nach 23 h wurde ein Acetat-Peak erreicht, nach dem die Konzentration bis zum Ende der Fermentation wieder abnahm. Auch bei der Butyrat-Produktion trat ein Peak bei einer Fermentationszeit zwischen 14,5 h und 23 h auf. Danach fiel die Konzentration stark ab und blieb bei einzelnen Kulturen anschließend konstant bei Werten zwischen 0,9 mM und 1,5 mM. Bei den anderen Kulturen erhöhte sich die Butyrat-Konzentration bis zum Ende der Fermentation auf bis zu 5,3 mM. Eine Produktion der Alkohole Ethanol und Butanol konnte bei allen Kulturen gleichermaßen beobachtet werden. Nach 23 h Fermentationszeit startete die Alkoholproduktion. Die Konzentrationen erhöhten sich bis zum Ende der Fermentation stetig. Die niedrigsten Alkohol-Konzentrationen wurden beim Stamm CSAC [pPta_hcs1_C] gemessen. Am meisten Ethanol (11,4 mM) und Butanol (85,8 mM) wurden durch den Stamm CSAC [pbcd_etfAB] produziert. Neben den nativen Fermentationsprodukten von *C. saccharoperbutylacetonicum* wurden auch die C6-Körper Hexanoat und Hexanol mitbestimmt. Eine Hexanoat-Produktion konnte nur in den Stämmen CSAC [pPta_hcs1_C] und CSAC [pTet_hcs1_C] nachgewiesen werden, welche das gesamte *hcs*-Cluster 1 aus *C. carboxidivorans* tragen. Der Stamm CSAC [pPta_hcs1_C] produzierte bereits nach 14,5 h Hexanoat. Bei CSAC [pTet_hcs1_C] konnte eine Hexanoat-Produktion nach 23 h beobachtet werden. Bei denselben Stämmen

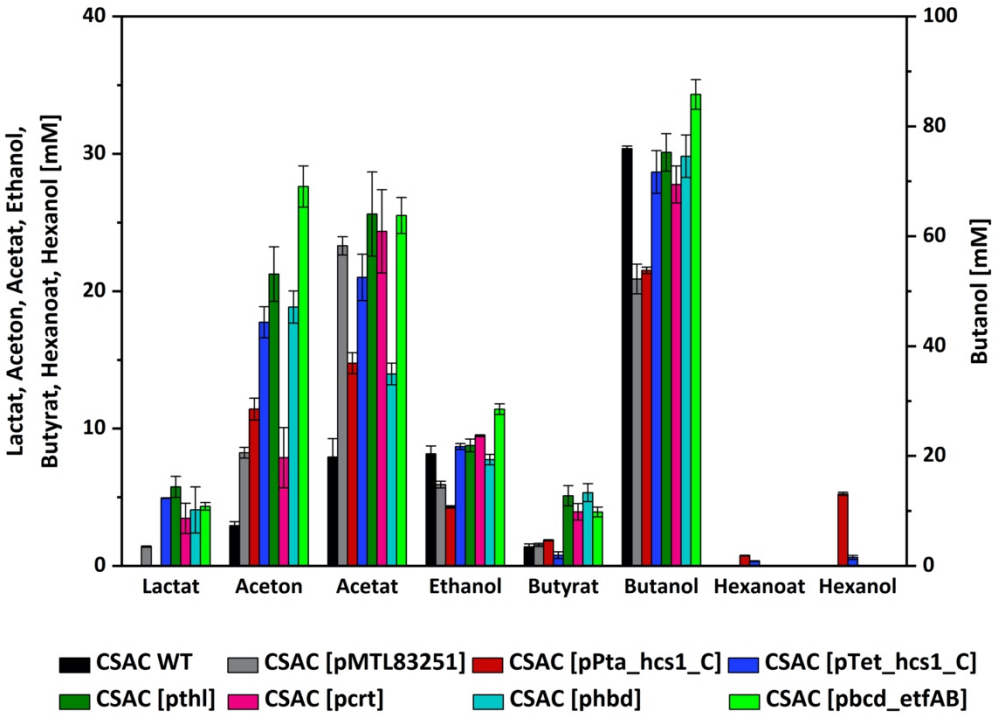


Abbildung 40: Produkttiter von CSAC WT, CSAC [pMTL83251], CSAC [pPta_hcs1_C], CSAC [pTet_hcs1_C], CSAC [pthl], CSAC [crt], CSAC [phbd] und CSAC [pbcd_etfAB] unter heterotrophen Bedingungen in 50 mL OMS zum Ende der Fermentation.

konnte auch erstmals rekombinant die Produktion von Hexanol nachgewiesen werden. Auch bei diesem Versuch wurde durch den Stamm CSAC [pPta_hcs1_C] eine deutlich höhere Hexanoat-Konzentration erzielt als durch CSAC [pTet_hcs1_C]. Bei keinem der anderen Stämme konnte Hexanoat oder Hexanol in quantifizierbaren Mengen im Medium nachgewiesen werden. Ein Vergleich der im Wachstumsexperiment erzielten Produkttiter aller acht untersuchten *C. saccharoperbutylacetonicum*-Stämme ermöglicht Abbildung 40. Lactat wurde von den rekombinanten Stämmen in ähnlichen Konzentrationen produziert (4,1 - 5,7 mM). Von CSAC [pMTL83251] wurde weniger Lactat (1,4 mM) und von CSAC WT gar kein Lactat produziert. Die gemessenen Aceton-Konzentrationen zum Ende des Versuchs lagen weit auseinander (2,9 - 27,6 mM). Von CSAC [pbcd_etfAB] wurde am meisten und von CSAC WT am wenigsten Aceton produziert. Auch bei der ermittelten Acetat-Konzentration waren die Werte bei den Stämmen unterschiedlich hoch (7,9 - 15,6 mM). Ethanol wurde von den Stämmen in ähnlichen Konzentrationen produziert (4,3 - 11,4 mM), wobei durch CSAC [pPta_hcs1] am wenigsten Ethanol produziert wurde. Butyrat lag am Ende der Fermentation in geringen Mengen vor (0,8 - 5,3 mM), allerdings lag die Butyrat-Konzentration bei den Stämmen, die einzelne Gene des *hcs*-Clusters 1 aus *C. carboxidivorans* tragen, etwa doppelt so hoch. Haupt-Fermentationsprodukt aller Stämme war Butanol. Auch hier konnte eine große Spanne in den ermittelten Konzentrationen beobachtet werden (52,2 - 85,8 mM). Am wenigsten Butanol wurde durch CSAC [pMTL83251] und CSAC [pPta_hcs1_C] produziert, am meisten Butanol durch CSAC [pbcd_etfAB]. Mit dem Stamm CSAC [pPta_hcs1_C], bei dem die Gene des kompletten *hcs*-Clusters 1 aus *C. carboxidivorans* unter Kontrolle des konstitutiv aktiven Promoters $P_{pta\text{-}ack}$ stehen, konnte doppelt so viel Hexanoat (0,8 mM) und acht mal so viel Hexanol (5,2 mM) produziert werden wie mit dem Stamm CSAC [pTet_hcs1_C] (0,4 mM Hexanoat; 0,6 mM Hexanol), bei dem die Gene unter Kontrolle des induzierbaren Promoters P_{tet} stehen.

4 Diskussion

4.1 Vergleich acetogener Bakterien mit nativer C6-Körper-Produktion

Um den Wandel zur Produktion wichtiger Plattform-Chemikalien und Kraftstoffe mittels Synthesegas-Fermentation voranzutreiben und dadurch unabhängig von der petrochemischen Herstellung zu werden, wurde zunächst die natürliche C6-Körper-Produktion dreier acetogener Mikroorganismen untersucht. Die Stämme *C. carboxidivorans*, *C. scatologenes* und *C. drakei* wurden durch Liou *et al.* (2005) als nah miteinander verwandte acetogene Bakterien beschrieben. C6-Körper-Produktion konnte bisher allerdings nur bei *C. carboxidivorans* und *C. scatologenes* nachgewiesen werden (Küsel *et al.*, 2000; Phillips *et al.*, 2015a). Bei *C. drakei* hingegen wurde lediglich die Produktion von Butyrat, nicht aber von Hexanoat oder Hexanol gemessen (Gößner *et al.*, 2008). Bevor Arbeiten zur genetischen Zugänglichkeit C6-Körper-produzierender Acetogene vorgenommen wurden, sollte zunächst durch einen Vergleich der drei Bakterienstämme und einer damit verbundenen fermentationstechnischen Analyse überprüft werden, ob und wenn ja, welche C6-Körper unter hetero- bzw. autotrophen Bedingungen produziert werden. Neben der Morphologie wurden auch das Wachstumsverhalten, die Produkttiter und das Verhältnis der produzierten C2-, C4- und C6-Körper miteinander verglichen.

Die Morphologie der obligat anaeroben Bakterien *C. carboxidivorans*, *C. scatologenes* und *C. drakei* ist beschrieben als stäbchenförmig mit einer Größe von ca. 0,6 x 4-7 μm. Außerdem sind die jeweiligen Bakterienzellen peritrich mit Flagellen begeißelt (Liou *et al.*, 2005). Mit den elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnten diese Angaben bestätigt werden (Abbildung 2). Morphologisch auffällig waren bei der Untersuchung unter dem Rasterelektronenmikroskop Zellen von *C. carboxidivorans*, die vor allem in der logarithmischen Wachstumsphase Zelllängen von bis zu 20 μm aufwiesen. Um dieses Phänomen genauer untersuchen zu können, wurden zusätzlich Aufnahmen der drei Bakterienstämme unter dem Transmissionselektronenmikroskop gemacht. Hierbei ergab sich, dass bei längeren Zellen, wie sie nur bei *C. carboxidivorans* beobachtet wurden, teilweise eine Separation in kleinere Zellen sichtbar war. Die einzelnen Zellen waren durch eine äußere Hülle miteinander verbunden, wobei innerhalb dieser Hülle eine komplette Abgrenzung der Zellen durch eine weitere Hülle erkennbar war (Abbildung 2I). Eine solche Verkettung von Zellen wurde bisher nicht für *C. carboxidivorans* beschrieben. Allerdings konnte dasselbe Phänomen durch Küsel *et al.* (2000) bei elektronenmikroskopischen Aufnahmen von *C. scatologenes* beobachtet

werden. Hier wurden Zellketten mit einer Länge von bis zu 10 µm beschrieben. Neben dem Auftreten von Zellverkettungen bei *C. carboxidivorans*, die nur in der logarithmischen Wachstumsphase und nicht in der stationären Wachstumsphase beobachtet wurden, waren keine weiteren morphologischen Unterschiede zwischen den drei Bakterienstämmen *C. carboxidivorans*, *C. scatologenes* und *C. drakei* erkennbar.

Für den Vergleich der Produktspektren wurde zunächst ein heterotrophes Wachstumsexperiment mit modifiziertem Tanner-Medium durchgeführt. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Stämme *C. scatologenes* und *C. drakei* ein ähnliches Wachstumsverhalten und Produktspektrum aufwiesen (Abbildung 3; Tabelle 10). Eine niedrigere maximale OD_{600} sowie ein niedrigerer finaler pH-Wert konnte bei der Fermentation von *C. carboxidivorans* beobachtet werden. Zu Beginn der Fermentation wurden während der Acidogenese von *C. carboxidivorans*, *C. scatologenes* und *C. drakei* Säuren gebildet. Anders als bisher bekannt, können alle drei Bakterienstämme Acetat, Butyrat und Hexanoat produzieren. Die C6-Körper-Produktion durch *C. drakei* wurde bisher nicht beschrieben. Butyrat- und Hexanoat-Produktion war bei den Stämmen erst nach 10 h Fermentationszeit messbar, wohingegen die Bildung von Acetat bereits ab Beginn der Fermentation nachweisbar war. Solventogenese, die Bildung von Lösungsmitteln, konnte nur bei *C. carboxidivorans* beobachtet werden. Allerdings fand die Bildung von Ethanol, Butanol und Hexanol nicht in einer separaten Wachstumsphase statt, sondern parallel zur Bildung der korrespondierenden Säuren. Eine separate solventogene Wachstumsphase bei der Fermentation von *C. carboxidivorans* wurde durch Ukpong *et al.* (2012) beschrieben. In dieser Wachstumsphase konnte eine verstärkte Expression der Gene für Alkohol-Dehydrogenasen nachgewiesen werden. Die Feststellung, dass bei der Fermentation von *C. carboxidivorans* keine Trennung der beiden Phasen vorhanden ist, wird wiederum durch andere Studien bestätigt, in denen ebenfalls die Alkohol-Produktion zeitgleich mit der Herstellung der Säuren abläuft (Shen *et al.*, 2014a, 2014b, 2017; Fernández-Naveira *et al.*, 2017a). In dem durchgeführten heterotrophen Wachstumsexperiment veränderten sich Produkttiter und pH-Wert nach dem Übergang der Bakterienstämme in die stationäre Wachstumsphase bis zum Ende der Fermentation kaum. Dies ist bedingt durch den vollständigen Verbrauch des Substrats und das damit verbundene „Herunterfahren" des Stoffwechsels der Bakterien. Dazu kommt die Möglichkeit eines „acid crash". Dieser Effekt definiert sich durch eine verfrühte Beendigung der Solventogenese aufgrund der Akkumulation von organischen Säuren im Medium und wurde bereits für *C. carboxidivorans* beschrieben (Ramió-Pujol *et al.*, 2015). Durch Substratüberschuss und kontinuierliche Fermentation bei konstant

niedrigem pH-Wert wäre eine Wiederaufnahme und Umwandlung der gebildeten Säuren möglich. Dieser pH-abhängige Wechsel hin zur verstärkten Alkohol-Produktion in *C. carboxidivorans* konnte durch Fernández-Naveira *et al.* (2017c) gezeigt werden. Die von Ganigué *et al.* (2016) durchgeführten Studien weisen jedoch darauf hin, dass ein niedriger pH-Wert zwar die Bildung von Alkoholen verstärken kann, dadurch jedoch *Chain-Elongation* behindert wird. Die finalen Produkttiter der gebildeten Säuren liegen bei *C. scatologenes* und *C. drakei* im heterotrophen Wachstumsexperiment deutlich höher als bei *C. carboxidivorans*. Dies hängt vor allem mit der fehlenden Alkohol-Synthese zusammen. *C. drakei* produzierte bis zum Ende der Fermentation am meisten Acetat, aber am wenigsten Butyrat. Anders als bei *C. carboxidivorans* und *C. scatologenes* liegt das Temperaturoptimum bei *C. drakei* nicht bei 37 °C, sondern bei 30 °C (Liou *et al.*, 2005). Ein Einfluss der Fermentationstemperatur auf die Produktbildung kann jedoch ausgeschlossen werden, da *C. scatologenes* bei gleichem Wachstumsverhalten ähnlich viel Acetat und sogar mehr Hexanoat bilden konnte als *C. drakei*.

Parallel zur Untersuchung des heterotrophen Wachstumsverhaltens wurde mit den Stämmen *C. carboxidivorans*, *C. scatologenes* und *C. drakei* auch das Wachstum und die Produktbildung unter autotrophen Bedingungen analysiert (Abbildung 4; Tabelle 10). Im hierzu durchgeführten Wachstumsexperiment mit Synthesegas verhielten sich Wachstum und Produktbildung der Stämme anders als unter heterotrophen Bedingungen. Die höchste Wachstumsrate und der früheste Übergang in die stationäre Wachstumsphase konnten bei *C. scatologenes* beobachtet werden. Außerdem wurde unter autotrophen Bedingungen von *C. carboxidivorans* die höchste OD_{600} erreicht. Der mit dem Wachstum der Zellen verbundene pH-Abfall war vergleichbar zu dem im heterotrophen Wachstumsexperiment. Auch hier wurde von *C. carboxidivorans* ein deutlich niedrigerer pH-Wert erreicht. Der gemessene pH-Abfall bei *C. scatologenes* und *C. drakei* verlief ähnlich. Gleichermaßen wie unter heterotrophen Wachstumsbedingungen waren alle drei acetogenen Bakterienstämme zur Herstellung von C6-Körpern im Stande. Der Stamm *C. drakei*, der bisher nicht als C6-Körper-Produzent beschrieben wurde, produzierte in diesem Experiment am meisten Hexanoat. Eine Alkohol-Bildung konnte auch unter autotrophen Bedingungen bei den Stämmen *C. scatologenes* und *C. drakei* nicht beobachtet werden. Genau wie beim heterotrophen Wachstumsversuch produzierte *C. carboxidivorans* neben Acetat, Butyrat und Hexanoat auch die Alkohole Ethanol, Butanol und Hexanol aus Synthesegas. Anders als beim Einsatz von Fructose als Substrat, wurden ausgehend von Synthesegas durch *C. carboxidivorans* deutlich mehr C2-Körper produziert als durch die beiden anderen Stämme. Die erzielten Butyrat-Konzentrationen zum Ende der Fermentation waren vergleichbar hoch. Hexanoat wurde am meisten von

C. drakei produziert. Addiert man die gemessenen Konzentrationen von Hexanoat und Hexanol bei der Fermentation von *C. carboxidivorans*, so produzierte der Stamm C6-Körper in ähnlichen Mengen wie *C. scatologenes* und *C. drakei*. Bezogen auf die anteilig molare Produktkonzentration wurden durch *C. carboxidivorans* am wenigsten C6-Körper unter autotrophen Bedingungen produziert.

Zusammengefasst kann aus dem Vergleich der drei C6-Körper-produzierenden acetogenen Bakterienstämme *C. carboxidivorans*, *C. scatologenes* und *C. drakei* abgeleitet werden, dass zwar alle drei Stämme zur Kettenverlängerungs-Reaktion fähig sind, die Herstellung der korrespondierenden Alkohole jedoch nur bei *C. carboxidivorans* stattfindet. In Abbildung 41 werden die bisher identifizierten Enzyme und der damit verbundene Stoffwechselweg zu den Produkten Acetat, Ethanol, Butyrat und Butanol in *C. carboxidivorans* schematisch dargestellt. Ausgehend vom zentralen Stoffwechsel-Intermediat Acetyl-CoA kann die Ethanol-Produktion und von Butyryl-CoA die Butanol-

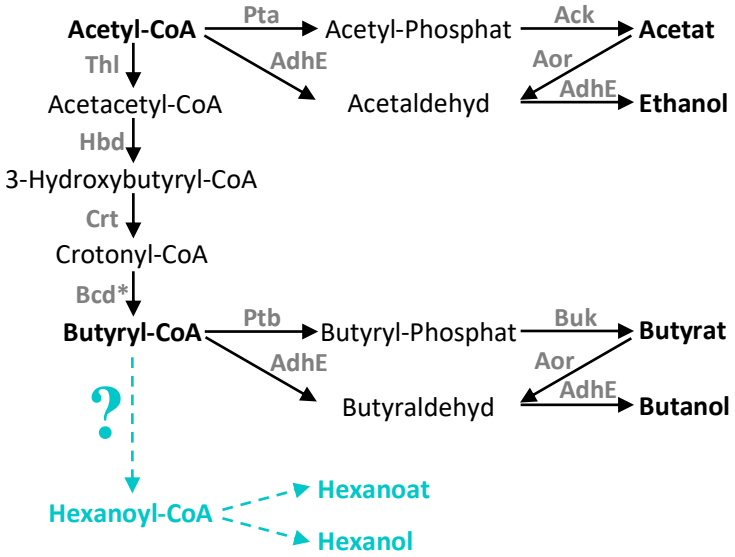


Abbildung 41: Schematische Darstellung des Metabolismus des C6-Körper-produzierenden acetogenen Bakterienstamms *C. carboxidivorans* (Wirth und Dürre, 2021). Ausgehend vom zentralen Stoffwechsel-produkt Acetyl-CoA sind die für die Produktion von C4-Körpern notwendigen Proteine bekannt (grau). Die für die Kettenverlängerungs-Reaktion zum C6-Körper verantwortlichen Proteine sowie der entsprechende Stoffwechselweg wurden bisher nicht identifiziert (blau). Ack, Acetat-Kinase; AdhE, bifunktionelle Acetaldehyd-/Alkohol-Dehydrogenase; Aor, Aldehyd:Ferredoxin-Oxidoreduktase; Bcd*, Butyryl-CoA-Dehydrogenase (*, beinhaltet Elektronen-transferierendes Flavoprotein B und Elektronen-transferierendes Flavoprotein A); Buk, Butyrat-Kinase; Crt, Crotonase; Hbd, 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase; Pta, Phosphotransacetylase; Ptb, Phosphotransbutyrylase; Thl, Thiolase.

Produktion, beispielsweise durch die nachgewiesene bifunktionelle Acetaldehyd-/Alkohol-Dehydrogenase katalysiert werden. Neben diesem Enzym konnten durch Bruant *et al.* (2010) verschiedene weitere Alkohol-Dehydrogenasen im Genom von *C. carboxidivorans* identifiziert werden, die entsprechende Reaktionen katalysieren können. Als Alternative zur direkten Bildung von Ethanol oder Butanol aus Acetyl-/Butyryl-CoA kann der Stamm *C. carboxidivorans* auch bereits gebildete Säuren mit Hilfe einer Aldehyd:Ferredoxin-Oxidoreduktase (Aor) in entsprechende Aldehyde umwandeln, die anschließend durch eine Alkohol-Dehydrogenase weiter zu Ethanol oder Butanol metabolisiert werden können. Ein entsprechendes Gen, welches für eine Aor codiert, ist im Genom von *C. carboxidivorans* annotiert (Ga0111308_113694). Die Tatsache, dass sich bei der Durchführung einer BLASTp-Analyse in den Genomsequenzen von *C. scatologenes* und *C. drakei* keine *aor*-ähnlichen Gensequenzen finden lassen, Alkohol-Dehydrogenasen aber in allen drei Stämmen gleichermaßen vorhanden sind, indiziert, dass die Alkohol-Produktion in *C. carboxidivorans* vorwiegend über die Aor abläuft. Dafür spricht auch, dass in anderen Fermentations-Experimenten mit *C. carboxidivorans* gebildete oder zugegebene Säuren anschließend in entsprechende Alkohole umgewandelt wurden (Zhang *et al.*, 2016; Fernández-Naveira *et al.*, 2017b). Die Fähigkeit, gebildete Säuren in Alkohole umzuwandeln, bietet *C. carboxidivorans* gegenüber *C. scatologenes* und *C. drakei* den Vorteil, dass eine Übersäuerung des Mediums weniger schnell und das damit verbundene „toxische Level", bei dem die Zellen nicht mehr fähig sind zu wachsen, später eintritt. Andererseits sind auch die gebildeten Alkohole aufgrund ihrer Fähigkeit, die Zellmembran zu durchschreiten, ab einer gewissen Konzentration toxisch für die Zelle (Zhang *et al.*, 2016). Die Toxizität der Produkte ist hierbei abhängig von der Kohlenstoff-Kettenlänge (Cavalcante *et al.*, 2017).

Als bisher einziger identifizierter Hexanol-produzierender acetogener Bakterienstamm ist *C. carboxidivorans* vor allem für die industrielle Anwendung interessant. Die Vielzahl der durchgeführten Studien zur fermentationstechnischen Analyse zeigt, von welcher Bedeutung *C. carboxidivorans* ist (Ukpong *et al.*, 2012; Shen *et al.*, 2014b; a; Phillips *et al.*, 2015a; Ramió-Pujol *et al.*, 2015; Fernández-Naveira *et al.*, 2017; Fernández-Naveira *et al.*, 2017a, 2017b; Shen *et al.*, 2017). Damit einhergehend liegt das Interesse darin, den Stamm genetisch verändern zu können.

4.2 Die genetische Zugänglichkeit von *C. carboxidivorans*

Nachdem die Analyse der Stämme *C. carboxidivorans*, *C. scatologenes* und *C. drakei* gezeigt hat, dass ausschließlich *C. carboxidivorans* zur Umwandlung von Hexanoat zu Hexanol fähig ist, wurden Versuche durchgeführt, den Stamm durch das Einbringen fremder DNA genetisch zu verändern. Anschließend sollte durch Inaktivierung einzelner Gene untersucht werden, welche Enzyme in dem acetogenen Bakterienstamm *C. carboxidivorans* essentiell für die Bildung von C6-Körpern sind.

4.2.1 Elektroporation, Konjugation und homologe Rekombination

Obwohl die erfolgreiche Transformation von *C. carboxidivorans* mittels Elektroporation in einer 2014 veröffentlichten Doktorarbeit beschrieben wurde, gab es seither keine weiteren Veröffentlichungen zur genetischen Zugänglichkeit von *C. carboxidivorans* (Ukpong, 2014). Weder die Herstellung rekombinanter Stämme noch deren Analyse wurden beschrieben.

Erste Versuche, den acetogenen Stamm *C. carboxidivorans* zu transformieren, wurden durchgeführt, nachdem die Aktivität von Typ II-Restriktionsendonukleasen im Zellextrakt von *C. carboxidivorans* ausgeschlossen werden konnte (3.2.1). Zunächst wurde versucht, Plasmid-DNA mittels Elektroporation in den Stamm einzubringen. Die dafür verwendeten Plasmide der pMTL80000er-Serie wurden zusammen mit dem von Leang *et al.* (2013) beschriebenen Elektroporationsprotokoll eingesetzt (Heap *et al.*, 2009). Das zur Transformation des acetogenen Modell-Organismus *C. ljungdahlii* beschriebene Protokoll führte im Fall von *C. carboxidivorans* nicht zur erfolgreichen Transformation des Stamms. Nach 120 erfolglosen Elektroporationsansätzen wurden weitere Versuche zur Elektroporation mit dem von Molitor *et al.* (2016a) für *C. ljungdahlii* beschriebenen Protokoll durchgeführt. 80 Elektroporationsansätze mit diesem für *C. ljungdahlii* optimierten Protokoll blieben ebenfalls erfolglos und führten nicht zu einem rekombinanten *C. carboxidivorans*-Stamm. Da ein Anwendungsfehler aufgrund mitgeführter *C. ljungdahlii*-Kontrollkulturen ausgeschlossen werden konnte, wurden die drei Parameter OD_{600} bei der Zellernte, eingesetzte Menge Plasmid-DNA und Regenerationszeit in weiteren Versuchen mit dem Protokoll von Leang *et al.* (2013) variiert. Die vielen individuellen bereits veröffentlichten Elektroporationsprotokolle zeigen, dass eine Anpassung der Parameter für das erfolgreiche Einbringen von Fremd-DNA bei jedem neuen Clostridien-Stamm erforderlich ist (Oultram *et al.*, 1988; Scott und

Rood, 1989; Zhou und Johnson, 1993; Olson und Lynd, 2012; Pyne *et al.*, 2013). Nachdem auch die Variation der Prozessparameter nicht zur Herstellung eines rekombinanten *C. carboxidivorans*-Stamms führte, wurde der Einsatz falscher Parameter als grundsätzliche Ursache ausgeschlossen. Die mit *E. coli* XL1-Blue MRF' amplifizierte und zur Elektroporation eingesetzte Plasmid-DNA wird durch den Stamm sowohl dam- als auch dcm-methyliert. Bereits bei *C. pasteurianum* NRRLB-598 wurde gezeigt, dass ein falsches Methylierungs-Muster die erfolgreiche Transformation verhindern kann (Kolek *et al.*, 2016). Aufgrund dessen wurden weitere Elektroporationsansätze mit Plasmid-DNA durchgeführt, die zuvor in dem *E. coli*-Stamm SCS110 amplifiziert wurde. Die Verwendung von nicht dam- bzw. dcm-methylierter DNA führte ebenfalls zu keiner erfolgreichen Transformation von *C. carboxidivorans*. Ein möglicher Grund, wieso die Transformation mittels Elektroporation nicht möglich ist, wäre der Abbau der eingebrachten Vektoren durch aktive Restriktionsendonukleasen (Pyne *et al.*, 2014). Dies ist durchaus vorstellbar, da neben Typ II-Restriktionsendonukleasen in der Genomsequenz von *C. carboxidivorans* auch RM-Systeme vom Typ I, III und IV annotiert sind (Tabelle 11). Zur Überlistung von Typ I-Restriktionsendonukleasen wurde der „TypeONE™ Restriction Inhibitor“ zusammen mit der Plasmid-DNA bei weiteren Elektroporationsexperimenten mit *C. carboxidivorans* eingesetzt. Bei dem Inhibitor handelt es sich um ein Protein aus dem Bakteriophagen T7, welches dafür beschrieben wurde, dass es die Aktivität von Typ I-Restriktionsendonukleasen komplett inhibiert. Dies geschieht dadurch, dass das Protein aufgrund seiner Struktur die B-Form von DNA nachahmt und eine sehr hohe Bindungsaffinität gegenüber den Restriktions-endonukleasen aufweist. Somit wird eine Bindung der Restriktionsenzyme an die Ziel-DNA verhindert (Walkinshaw *et al.*, 2002). Trotz Einsatz des Inhibitors blieb die Transformation von *C. carboxidivorans* erfolglos.

Da keiner der durchgeführten Elektroporationsversuche erfolgreich und in keinem der Ansätze *C. carboxidivorans* in Anwesenheit des Antibiotikums in der Lage war zu wachsen, stellte sich die Frage, ob überhaupt Plasmid-DNA durch den Elektropuls in die Zellen gelangen kann. Eine hierfür einsetzbare Methode zur Überprüfung der Membranpermeabilität während der Elektroporation wurde bereits erfolgreich mit thermophilen Gram-positiven Bakterien durchgeführt (Lin *et al.*, 2010). Die Methode fand Einsatz beim Vergleich unterschiedlicher Transformationsprotokolle (Ultraschall, Elektropuls) und ermöglichte die Bestimmung der damit verbundenen Effizienz der eingesetzten Protokolle. Zusätzlich wurden dabei die jeweilige Überlebensrate der Zellen analysiert und miteinander verglichen. Zur Bestimmung der Membranpermeabilität von *C. carboxidivorans* wurde anstelle von Plasmid-DNA „Texas Red™“-markiertes Dextran

mit einer Molekülmasse von 70 kDa eingesetzt. Das Molekül ist aufgrund seiner Größe mit einem Plasmid vergleichbar. Der daran gebundene fluoreszierende Farbstoff ermöglicht es, die Permeabilisierung der Zellmembran nachträglich sichtbar zu machen. In dem durchgeführten Versuch mit *C. carboxidivorans* konnte gezeigt werden, dass das „Texas Red™"-markierte Dextran zusammen mit dem zur Bestimmung toter Zellen eingesetzten Fluoreszenzfarbstoff „SYTOX™ Green" zur Bestimmung der Membranpermeabilität während der Elektroporation verwendet werden kann (3.2.2; Abbildung 6). So war ohne Elektropuls kein „Texas Red™"-markiertes Dextran in den *C. carboxidivorans*-Zellen nachweisbar, mit Elektropuls fluoreszierte ein Teil der Zellen rot. Verglichen wurde in dem Versuch die Durchführung der Elektroporation von *C. carboxidivorans* nach den Protokollen von Leang *et al.* (2013) und Molitor *et al.* (2016a). Die mikroskopische Analyse von je 300 *C. carboxidivorans*-Zellen ergab, dass zwischen 17 und 32 % der Zellen, von denen 10 bzw. 14 % bereits vorher tot waren, durch den Elektropuls permeabilisiert wurden. Neben der Erkenntnis, dass eine unzureichende Membranpermeabilität nicht die Ursache dafür ist, dass sich *C. carboxidivorans* nicht transformieren lässt, zeigte der Versuch außerdem, dass das von Molitor *et al.* (2016a) beschriebene Protokoll zur Permeabilisierung der Zellmembran fast doppelt so effizient ist. Die damit einhergehende Zunahme toter Zellen ist geringer als die Zunahme der Zellen, in die das „Texas Red™"-markierte Dextran gelangt ist.

Wird aufgrund eines fehlenden oder falschen Methylierungsmusters die eingebrachte Plasmid-DNA von *C. carboxidivorans* erkannt und abgebaut, ist eine Transformation des Stamms durch Elektroporation nicht möglich. Ein Nachteil beim Einbringen von Fremd-DNA mittels Elektroporation besteht in der Bakterienstamm- bzw. Protokoll-abhängigen niedrigen Effizienz (Philipps *et al.*, 2019). Dazu kommt die Tatsache, dass die Effizienz der Elektroporation proportional mit der Größe des Plasmids abnimmt (Sheng *et al.*, 1995; Szostková und Horáková, 1998). Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Größe der eingesetzten Plasmide (3,7 bis 6,3 kBp) oder die verwendeten Parameter bei der Durchführung der Elektroporation eine erfolgreiche Transformation von *C. carboxidivorans* verhindern, wurden Versuche zur Einbringung der Plasmid-DNA mittels Konjugation durchgeführt. Der DNA-Transfer durch Konjugation bietet den Vorteil, dass deutlich größere Plasmide mit höherer Effizienz in den Rezipientenstamm eingebracht werden können (Philipps *et al.*, 2019). Darüber, ob die eingebrachte DNA anfällig für das RM-System des Rezipientenstamms ist (Suzuki, 2012) oder ob die als Einzelstrang übertragene DNA vor den Restriktionsendonukleasen des Rezipientenstamms geschützt wird (Jennert *et al.*, 2000), gibt es unterschiedliche Aussagen. Das Ergebnis der durchgeführten Konjugationsexperimente mit den

Schaukelvektoren der pMTL80000er-Serie und *C. carboxidivorans* war, dass sowohl mit dem adaptierten Protokoll, als auch mit dem Protokoll von Roberts *et al.* (2001) kein stabiler rekombinanter Stamm generiert werden konnte. Ebenso wie bei den Elektroporationsversuchen wurden hierbei verschiedene Prozessparameter wie die OD_{600} bei der Zellernte von *C. carboxidivorans*, die eingesetzte Menge *E. coli* CA434 oder die Regenerationszeit variiert. Diese unterschiedlichen Parametervariationen führten zum selben Ergebnis. Anders als bei der Elektroporation mit *C. carboxidivorans*, wurde bei der Konjugation Zellwachstum in Form von Kolonien auf den Selektionsplatten in Anwesenheit des Antibiotikums festgestellt. Die scheinbar rekombinanten *C. carboxidivorans*-Zellen konnten jedoch auf weiteren Selektionsplatten oder in Flüssigmedium nicht stabil angezogen werden. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass entweder die Stabilität der eingebrachten Plasmide im Stamm *C. carboxidivorans* nicht gegeben ist, oder die eingebrachte Fremd-DNA durch das RM-System des Rezipientenstamms erkannt und sukzessive abgebaut wird. Letztere Möglichkeit ist weniger wahrscheinlich, weil dies bedeuten würde, dass alle Zellen den Abbau der DNA erst mit deutlicher Verzögerung initiieren würden. Hat der Bakterienstamm *C. carboxidivorans* ein generelles Problem bei der Replikation eines zusätzlichen Plasmids neben dem nativen Plasmid p19, so wäre die Generierung eines stabilen rekombinanten Stamms nur durch das Einbringen fremder Gene in die chromosomale DNA möglich.

Das System der stabilen Integration von Genen durch homologe Rekombination hat den Vorteil, dass bei anschließender Zellteilung kein Plasmid vom Wirtsorganismus repliziert werden muss. Homologe Rekombination konnte erfolgreich mit dem acetogenen Modell-Organismus *C. ljungdahlii* durchgeführt werden (Leang *et al.*, 2013). Die Häufigkeit des „double-crossover"-Ereignisses wird dabei jedoch als sehr gering beschrieben (Green und Bennett, 1996; Leang *et al.*, 2013). Nichtsdestotrotz wurde versucht, das Gen *catP*, welches für eine Chloramphenicol-Acetyltransferase codiert, mittels homologer Rekombination in das auf der chromosomalen DNA von *C. carboxidivorans* annotierte Gen *aor* (Ga0111308_1113694; codiert für eine Aldehyd:Ferredoxin-Oxidoreduktase) zu integrieren. Die dafür eingesetzten Plasmide pKOaor und pKOaor_Suizid konnten erfolgreich kloniert und in *E. coli* XL1-Blue MRF' verifiziert werden (Abbildung 8). Für die homologe Rekombination in *C. carboxidivorans* ist ein in Gram-positiven Bakterien funktionaler Replikationsursprung auf dem Plasmid nicht zwingend erforderlich. Dennoch wurde neben dem Suizid-Plasmid (pKOaor_Suizid) ein weiteres Plasmid mit dem Replikationsursprung *repH* kloniert (pKOaor), um die Möglichkeit eines „double-crossover"-Ereignisses zu erhöhen. Die

Plasmide mit den homologen Genregionen stromaufwärts bzw. -abwärts des Gens *aor* wurden in Elektroporations- und Konjugationsexperimenten mit *C. carboxidivorans* eingesetzt (3.2.3). Über die homologen Genregionen und den Selektionsdruck durch das eingesetzte Antibiotikum sollte eine Integration des Gens *catP* in die chromosomale DNA des Stamms ermöglicht werden. Bei erfolgreicher Transformation des Stamms hätte neben dem Nachweis der Integration auch eine Veränderung des Produktspektrums von *C. carboxidivorans* erwartet werden können, da die Umwandlung der gebildeten Säuren in entsprechende Alkohole in dem Stamm mit großer Wahrscheinlichkeit ohne das Enzym Aor nicht im selben Maß möglich wäre. Bei keinem der experimentellen Ansätze mit den beiden Plasmiden pKOaor und pKOaor_Suizid konnte ein stabiler rekombinanter *C. carboxidivorans*-Stamm generiert werden. Durch den Nachweis des Plasmids nach durchgeführter Transformation in *C. ljungdahlii* wurde bestätigt, dass pKOaor stabil in Gram-positiven Acetogenen repliziert werden kann. Die Tatsache, dass es zu keinem Einbau des Gens *aor* in die chromosomale DNA von *C. carboxidivorans* kam, könnte verschiedene Ursachen haben. Der wahrscheinlichste Grund ist, dass das eingebrachte Plasmid nicht lange genug unverändert in den Bakterienzellen vorlag, damit ein „single-“ oder „double-crossover“-Ereignis stattfinden konnte. Entweder das eingebrachte Plasmid wurde sofort durch ein aktives RM-System von *C. carboxidivorans* abgebaut oder der Bakterienstamm kann neben dem nativen Plasmid p19 kein weiteres Plasmid replizieren.

4.2.2 Das native Plasmid p19: Ursache oder Lösung des Problems?

Anhand der durchgeführten Konjugationsexperimente mit *C. carboxidivorans* konnte gezeigt werden, dass die Einbringung fremder DNA in den Stamm zwar möglich, aber nicht stabil ist (3.2.2). *C. carboxidivorans* trägt das 19.899 Bp große Plasmid p19 (Bruant *et al.*, 2010). Da bisher kein weiteres Plasmid stabil repliziert wurde, liegt die Vermutung nahe, dass die Koexistenz eines zweiten Plasmids von dem Bakterienstamm nicht toleriert bzw. ermöglicht wird. Sind sich beispielsweise die Replikationsursprünge des nativen Plasmids p19 und des eingebrachten Plasmids zu ähnlich, ist es wahrscheinlich, dass nur eines der beiden Plasmide repliziert wird. Tatsächlich konnte bei der *in silico*-Analyse des Plasmids p19 eine 35 %-ige Übereinstimmung des Replikationsursprungs mit dem des Schaukelvektors pMTL82151 nachgewiesen werden (3.2.4). Dagegen spricht die Tatsache, dass in den durchgeführten Experimenten mit den Schaukelvektoren der pMTL80000er-Serie vier unterschiedliche Replikationsursprünge getestet wurden. Außerdem konnte bereits mit dem Modell-Organismus *A. woodii* gezeigt werden, dass

zwei dieser Replikationsursprünge zeitgleich und stabil in einem acetogenen Bakterienstamm repliziert werden können (pMTL82151 und pMTL83151; Beck, 2019).

Es wurden Versuche durchgeführt, um das native Plasmid p19 dauerhaft aus *C. carboxidivorans* zu entfernen und dadurch die genetische Zugänglichkeit des Stamms zu verbessern. Die hierfür eingesetzte Methode wurde mehrfach erfolgreich zum *plasmid curing* bei anderen Bakterienstämmen eingesetzt (Trevors, 1986). Trotzdem ließ sich das native Plasmid p19 weder durch den Einsatz von Acridinorange noch durch Novobiocin dauerhaft aus *C. carboxidivorans* entfernen (3.2.4). Die *in silico*-Analyse des Plasmids ergab, dass sechs der Gene auf dem Plasmid p19 möglicherweise für Proteine codieren, die stabilisierende Funktionen bei der Chromosomenanordnung während der Zellteilung einnehmen (Abbildung 9). Diese SMC-Proteine (engl.: *structural maintenance of chromosome*) gehören zu der Familie der DNA-prozessierenden Proteine und sind notwendig für die Stabilisierung bei der Kondensierung und Separierung der chromosomalen DNA während der Zellteilung (Melby *et al.*, 1998). Da sich in der chromosomalen DNA von *C. carboxidivorans* keine Kopie der Gene identifizieren ließ, muss davon ausgegangen werden, dass die Gene und somit das Plasmid p19 essentiell für den Bakterienstamm sind.

Um ausschließen zu können, dass eine fehlende Kompatibilität der eingesetzten Replikationsursprünge Ursache für die instabile Plasmidreplikation ist, wurde ein spezifischer Schaukelvektor für *C. carboxidivorans* konstruiert. Der Replikationsursprung des Plasmids p19, welches stabil in *C. carboxidivorans* vorliegt, wurde hierfür in das Plasmid pMTL_p19 kloniert (Abbildung 11). Dieses wurde zur Transformation von *C. carboxidivorans* eingesetzt. Zwar konnte die Funktionalität des Vektors durch den Stamm *C. ljungdahlii* [pMTLp19] nachgewiesen werden, eine Verifikation des Plasmids in *C. carboxidivorans* war jedoch nicht möglich. Ein Grund dafür, weshalb pMTLp19 trotz des nativen Replikationsursprungs und des Selektionsdrucks nicht in den Stamm *C. carboxidivorans* eingebracht werden konnte, ist die Tatsache, dass eine Koexistenz zweier Plasmide mit demselben Replikationsursprung unwahrscheinlich ist. Dies führt dazu, dass eines der beiden Plasmide nicht weiter repliziert werden kann, obwohl beide für das Überleben des Stamms essentiell sind. Außerdem kann nach wie vor nicht ausgeschlossen werden, dass das eingebrachte Plasmid durch ein aktives RM-System von *C. carboxidivorans* abgebaut wird.

4.2.3 Restriktionssystem als Transformations-Barriere

Die Versuche, den acetogenen Bakterienstamm *C. carboxidivorans* genetisch zugänglich zu machen, wurden in ähnlicher Weise wie in dem von Pyne *et al.* (2014) veröffentlichten Leitfaden durchgeführt. Abbildung 42 zeigt die hierbei verfolgte Strategie, mit der ein Protokoll zur Generierung stabiler rekombinanter *C. carboxidivorans*-Stämme erstellt werden sollte. Sukzessive wurden dabei unterschiedliche Herangehensweisen überprüft, wobei die einzelnen Lösungsansätze als nicht erfolgversprechend ausgeschlossen werden konnten. In Anbetracht der Tatsache, dass mit keinem der durchgeführten Versuche ein rekombinanter *C. carboxidivorans*-Stamm generiert werden konnte, bleibt die Verhinderung der Transformation durch aktive RM-Systeme als einzig mögliche Ursache übrig. Die *in silico*-Analyse der Genomsequenz von *C. carboxidivorans* ergab, dass der Bakterienstamm über zehn annotierte RM-Systeme verfügt. Die gefundenen Restriktionsendonukleasen lassen sich den bekannten Subtypen I-IV zuordnen (Roberts *et al.*, 2010). Von den vier Subtypen kann einzig die Aktivität von Typ II-Restriktionsendonukleasen mit einem Restriktionstest überprüft werden, da nur diese Enzyme die Reaktion ATP-unabhängig katalysieren (Suzuki, 2012). Anhand der durchgeführten Tests konnte, unabhängig von der Wachstumsphase, keine Aktivität der drei bei *C. carboxidivorans* annotierten Typ II-Restriktionsendonukleasen nachgewiesen werden (Abbildung 5). Um eine mögliche Aktivität von Typ I-Restriktions-endonukleasen zu unterdrücken, wurde während der Elektroporation neben der Plasmid-DNA auch der „TypeONE™ Restriction Inhibitor“ eingesetzt. Damit konnte allerdings kein rekombinanter *C. carboxidivorans*-Stamm generiert werden (3.2.2). Weiterhin sind ein RM-System vom Typ III und drei Restriktionsendonukleasen vom Typ IV in der Genomsequenz von *C. carboxidivorans* annotiert. RM-Systeme vom Typ IV

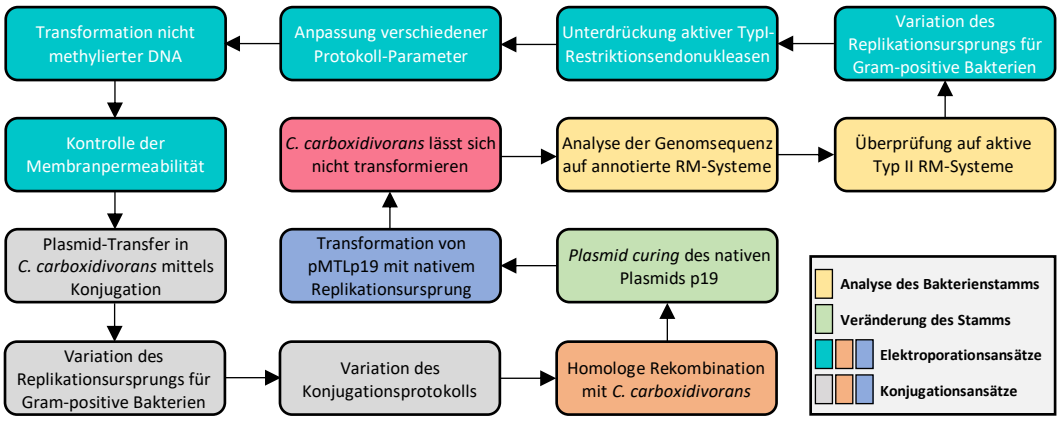


Abbildung 42: Herangehensweise zur Etablierung eines Protokolls für die Generierung stabiler rekombinanter *C. carboxidivorans*-Stämme. Nach Pyne *et al.* (2014).

zeichnen sich speziell dadurch aus, dass sie, im Gegensatz zu den Enzymen der anderen drei Subtypen, nur methylierte DNA schneiden. Dadurch sind sie besonders effizient bei der Abwehr von Bakteriophagen mit hoch-modifizierter DNA (Suzuki, 2012). Um den Abbau der eingebrachten DNA durch RM-Systeme vom Typ IV zu verhindern, wurden bei den Elektroporationsversuchen mit *C. carboxidivorans* auch Plasmide eingesetzt, die weder dam- noch dcm-methyliert sind. Da neben den anderen Versuchen zur Elektroporation, Konjugation und homologen Rekombination auch dieser Ansatz zur Transformation von *C. carboxidivorans* nicht erfolgreich war, ist es wahrscheinlich, dass mehrere RM-Systeme aus verschiedenen Subtypen in dem Bakterienstamm aktiv sind.

In der Veröffentlichung von Pyne *et al.* (2014) wurde gezeigt, dass in der Genomsequenz von *C. carboxidivorans* sieben bis acht Gene für Methyltransferasen annotiert sind. Um nachweislich feststellen zu können, wie das Methylierungsmuster des Stamms tatsächlich aussieht, müsste eine Methylom-Analyse durchgeführt werden. Mit dem Wissen darüber, welche Methyltransferasen in *C. carboxidivorans* aktiv sind, könnte man die Plasmid-DNA *in vivo* in einem *E. coli*-Stamm, der entsprechende Methyltransferasen exprimiert, oder *in vitro* mit kommerziell erhältlichen Methyltransferasen methylieren. Die Plasmide würden somit dasselbe Methylierungsmuster wie die DNA von *C. carboxidivorans* aufweisen und wären dadurch nach dem Einbringen in den Bakterienstamm vor dessen RM-Systemen geschützt.

4.3 *In silico*-Vergleich und Genexpression der *hcs*-Cluster von *C. carboxidivorans*

Für das Verständnis über den Stoffwechselweg zur Herstellung von C6-Körpern, genauso wie für die heterologe C6-Körper-Produktion, wurde zunächst untersucht, welche Gene sich hierfür als mögliche Kandidaten für die *Chain-Elongation* in Acetogenen identifizieren lassen. Die Tatsache, dass *C. carboxidivorans*, *C. scatologenes* und *C. drakei* beim Wachstum unter anaeroben Bedingungen Hexanoat oder Hexanol herstellen können (Tabelle 10), deutet darauf hin, dass die C6-Körper in den Bakterienstämmen ausgehend vom zentralen Stoffwechsel-Intermediat Acetyl-CoA synthetisiert werden. Eine heterologe Hexanol-Produktion konnte bereits mit *E. coli* erzielt werden (Dekishima *et al.*, 2011). Für die Umwandlung von Acetyl-CoA zu Hexanoyl-CoA waren die Enzyme AtoB (aus *E. coli*), Hbd, Crt (beide aus *C. acetobutylicum*), Ter (aus *T. denticola*) und BktB (aus *C. necator*) notwendig. Damit unterscheidet sich der C6-Körper-produzierende

E. coli von dem zuvor durch Shen *et al.* (2011) veröffentlichten Butanol-produzierenden *E. coli*-Stamm lediglich durch die zusätzlich eingebrachte β-Ketothiolase (BktB). Die katalytische Aktivität des Enzyms gegenüber 3-Ketohexanoyl-CoA wurde bereits gezeigt (Slater *et al.*, 1998). Auch die enzymatische Aktivität der Crt aus *C. acetobutylicum* gegenüber C6-Körpern konnte nachgewiesen werden (Waterson *et al.*, 1972). Beim C4-Körper-produzierenden Stamm *C. acetobutylicum* sind die zur Kettenverlängerungs-Reaktion notwendigen Enzyme, mit Ausnahme der Thiolase, im *bcs*-Operon codiert (Boynton *et al.*, 1996). Die Vermutung liegt nahe, dass in den drei C6-Körper-produzierenden Acetogenen die *Chain-Elongation* ebenfalls über reverse β-Oxidation mit dem *bcs*-Gencluster entsprechenden Enzymen stattfindet. Eine *in silico*-Analyse der Genomsequenz von *C. carboxidivorans*, *C. scatologenes* und *C. drakei* ergab, dass bei den drei Bakterienstämmen ein entsprechendes Gencluster vorliegt. Im Falle von *C. carboxidivorans* und *C. scatologenes* konnten zwei Cluster im Genom identifiziert werden. Anders als bei *C. acetobutylicum* ist das Gen für die Thiolase ebenfalls in den identifizierten Genclustern integriert. Ein durchgeführter tBLASTx-Vergleich der Gencluster (Abbildung 12) zeigte, dass sich die Gene in ihrer Anordnung innerhalb der Gencluster von der in *C. acetobutylicum* unterscheiden. Die Unterschiede der Aminosäuresequenzen zwischen den Stämmen *C. carboxidivorans*, *C. scatologenes* und *C. drakei* sind vergleichsweise gering, wobei sich die in *C. carboxidivorans* und *C. scatologenes* zusätzlich gefundenen Gencluster 2 in der abgeleiteten Aminosäure-sequenz deutlich von der des Genclusters 1 unterscheiden. Außerdem konnte in den zusätzlichen Genclustern ein weiteres Gen identifiziert werden. Dieses wurde als R-spezifische Crotonase annotiert, was sich bei genauerer Analyse jedoch als falsch erwies, da dem daraus entstehenden Protein essentielle funktionelle Domänen fehlen (3.3). Um herauszufinden, ob und welche der Gene beim Wachstum und der Herstellung von C6-Körpern exprimiert werden, wurde ein Transkriptnachweis in *C. carboxidivorans* durchgeführt (3.4). Die Ergebnisse zeigten, dass ein durchgängiges Transkript von Gencluster 1 in der logarithmischen und stationären Wachstumsphase nachweisbar ist (Abbildung 15). Eine Expression der Gene von Cluster 2 aus *C. carboxidivorans* konnte bei den untersuchten Bedingungen nicht nachgewiesen werden (Abbildung 16 und Abbildung 17). Beim Hexanoat-produzierenden Stamm *C. kluyveri* wurde vermutet, dass mit den Enzymen des identifizierten *bcs*-Genclusters Butyrat-Produktion ermöglicht wird und durch weitere im Genom verstreute Gene die *Chain-Elongation* zum C6-Körper stattfindet (Seedorf *et al.*, 2008). Da bei *C. drakei* nur eines der Gencluster identifiziert wurde, bei *C. carboxidivorans* nur eines der Cluster exprimiert wurde und in den Genomsequenzen der beiden Bakterienstämme kein weiteres Set an Genen gefunden

wurde, war davon auszugehen, dass die Gencluster sowohl für die Butytyl-CoA-, als auch die Hexanoyl-CoA-Synthese (*hcs*) verantwortlich sind. Diese These wird durch die Tatsache gestützt, dass einzig durch die Einbringung des *hcs*-Clusters 1 oder 2 aus *C. carboxidivorans* mit dem acetogenen Modell-Organismus *A. woodii* die Herstellung von Hexanoat möglich war (3.5). Aus den gewonnenen Daten kann geschlussfolgert werden, dass die Umwandlung von Acetyl-CoA zu Hexanoyl-CoA in *C. carboxidivorans* mit den beiden *hcs*-Clustern 1 und 2 über reverse β-Oxidation ermöglicht wird und dass das zusätzliche *hcs*-Cluster 2 unter den getesteten Bedingungen nur als inaktive Kopie, eventuell als Reserve, vorliegt.

4.4 Heterologe C6-Körper-Produktion mit acetogenen Bakterien

Versuche, heterolog Hexanoat oder Hexanol mit dem acetogenen Modell-Organismus *C. ljungdahlii* zu produzieren, waren erfolglos. Von den vier konstruierten Plasmiden des modularen *hcs*-Plasmid-Systems konnte nach mehreren Transformationsversuchen mittels Elektroporation lediglich pTet_hcs2 in *C. ljungdahlii* verifiziert werden (3.5.2). Bei Kulturen, die in Anwesenheit des Antibiotikums nach Transformation von pPta_hcs1 und pPta_hcs2 zu Wachstum fähig waren, wiesen die sequenzierten Plasmide wiederholt Mutationen im Bereich des Promoters $P_{pta\text{-}ack}$ auf. Als mögliche Ursachen für die Veränderung der eingebrachten Plasmid-DNA durch *C. ljungdahlii* kommen eine Produktunverträglichkeit oder eine Inkompatibilität des Promoters mit dem Bakterienstamm in Frage. Da es sich bei dem Promoter um einen nativen Promoter des Stamms handelt und dieser bereits bei der durch Weitz (2020) gezeigten Isobutanol-Produktion in *C. ljungdahlii* erfolgreich eingesetzt wurde, kann eine Inkompatibilität ausgeschlossen werden. Die bei der Fermentation rekombinanter *C. ljungdahlii*-Stämme erwarteten Produkte Butyrat, Butanol, Hexanoat und Hexanol könnten aufgrund ihrer Toxizität dazu führen, dass die Zellen nur noch dann zu Wachstum fähig wären, wenn eine Expression der eingebrachten Gene aufgrund von Mutationen unterbunden wird. Die im Vorfeld durchgeführte Untersuchung zur Toxizität der vier Produkte zeigte keine signifikanten Auswirkungen auf das Wachstum von *C. ljungdahlii* (Abbildung 21). Da hierbei die Produkte allerdings nicht intrazellulär vorlagen, sondern extrazellulär in das Medium gegeben wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine Produkttoxizität der Grund für die auftretenden Mutationen ist, die nur im Bereich des Promoters stattgefunden hat. Dazu kommt, dass jeweils nur eines der Produkte zugegeben wurde und die eingesetzten Konzentrationen nicht mit denen übereinstimmen, die in den

C. ljungdahlii-Zellen tatsächlich entstehen können. Bei den rekombinanten *A. woodii*-Stämmen AWO [pPta_hcs1] und AWO [pPta_hcs2] konnten keine Mutationen, dafür aber eine C6-Körper-Produktion nachgewiesen werden (3.5.3). Des Weiteren produzierte der *A. woodii*-Stamm mit dem Plasmid pTet_hcs2, verglichen mit den anderen drei Plasmiden, Hexanoat in der geringsten Konzentration. Im durchgeführten heterotrophen Wachstumsexperiment mit CLJU [pTet_hcs2] konnte nach Induktion der Genexpression mit Anhydrotetracyclin keine Produktion von C4- oder C6-Körpern nachgewiesen werden (Abbildung 22).

All diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass *C. ljungdahlii* aufgrund einer Produkttoxizität, entweder durch die erwarteten Endprodukte oder durch andere möglicherweise toxische Zwischen- oder Nebenprodukte, nicht zur Herstellung von C4- oder C6-Körpern mit den *hcs*-Clustern 1 oder 2 aus *C. carboxidivorans* im Stande ist. Um diese Hypothese beweisen zu können, müssten weitere Experimente mit *C. ljungdahlii* durchgeführt werden. Durch einen Austausch des nativen $P_{pta\text{-}ack}$-Promoters mit einem anderen konstitutiv aktiven Promoter wie beispielsweise P_{thl} aus *C. acetobutylicum* (Dusséaux *et al.*, 2013) könnte überprüft werden, ob allein der Promoter Ursache für die auftretenden Mutationen ist. Zur Verbesserung des Gentransfers in *C. ljungdahlii* sollten weitere Transformationsversuche mittels Konjugation durchgeführt werden (Philipps *et al.*, 2019).

Mit AWO [pPta_hcs1], AWO [pPta_hcs2], AWO [pTet_hcs1] und AWO [pTet_hcs2] konnten erfolgreich Stämme generiert und verifiziert werden, die zu einer heterologen C6-Körper-Produktion fähig sind. Sowohl unter heterotrophen als auch autotrophen Bedingungen konnte mit den rekombinanten *A. woodii*-Stämmen Hexanoat hergestellt werden (Abbildung 26 und Abbildung 28). Durch das Einbringen der Gene des *hcs*-Clusters 1 und ebenso denen des *hcs*-Clusters 2 aus *C. carboxidivorans* war der acetogene Modell-Organismus zu *Chain-Elongation* im Stande. Unter autotrophen Bedingungen konnten dabei, neben Butyrat, Hexanoat-Konzentrationen zwischen 0,48 und 1,56 mM, ausgehend von Fructose sogar bis zu 4,15 mM Hexanoat im Kulturmedium quantifiziert werden. Auffällig dabei war, dass mit dem konstitutiv aktiven Promoter $P_{pta\text{-}ack}$ deutlich höhere Konzentrationen an Butyrat und Hexanoat produziert wurden, was auf die konstante Produktion der zur Herstellung notwendigen Enzyme Thl, Crt, Hbd und Bcd (inkl. EtfA und EtfB) zurückzuführen ist. Mit den Enzymen des *hcs*-Clusters 2 war die Produktion von Butyrat und Hexanoat vergleichsweise geringer als mit *hcs*-Cluster 1. Inwieweit die zusätzliche siebte codierende Sequenz in dem Gencluster Einfluss auf die Genexpression und Bildung der Enzyme hat, ist unklar. Allerdings

konnte keine Genexpression des *hcs*-Clusters 2 unter den gewählten Bedingungen in *C. carboxidivorans* nachgewiesen werden. In einem weiteren heterotrophen Wachstumsversuch mit AWO [pTet_hcs1] konnte außerdem gezeigt werden, dass durch Optimierung der Fermentation mit dem induzierbaren Promotersystem P_{tet} eine Steigerung der Hexanoat-Produktion, in diesem Fall um ca. 50 %, möglich ist (Abbildung 32).

Anders als die Acetat-Produktion, konnte die Herstellung von Butyrat und Hexanoat bei den rekombinanten *A. woodii*-Stämmen erst verzögert nachgewiesen werden (Abbildung 25 und Abbildung 27). Zwar zeigen native C6-Körper-produzierende Acetogene ein ähnliches Phänomen (Abbildung 3 und Abbildung 4), dennoch wurde in weiteren Versuchen überprüft, ob sich diese Verzögerung erklären oder verhindern lässt. Als mögliche Ursachen wurden der pH-Wert des Kulturmediums, die extrazellulär vorherrschende Acetat-Konzentration und eine Kopplung mit der Zelldichte untersucht. Die Synthese mittelkettiger Säuren und Alkohole bietet Bakterien den Vorteil, dass dadurch die Ansäuerung des Mediums durch die kontinuierliche Acetat-Produktion verlangsamt werden kann. So sind drei Acetyl-CoA notwendig, um ein Hexanoyl-CoA zu synthetisieren. Andererseits sind mittelkettige Säuren und Alkohole aufgrund ihrer steigenden Toxizität gefährlich für die Zellen (Cavalcante *et al.*, 2017). Folglich wäre es nachvollziehbar, wenn die Bildung längerkettiger Produkte erst bei niedrigerem pH-Wert verstärkt würde. Das durchgeführte Experiment, bei dem Kulturmedium mit unterschiedlichen pH-Werten für die heterotrophe Fermentation von AWO [pPta_hcs1] verwendet wurde (Abbildung 29), zeigte, dass unabhängig vom pH-Wert *Chain-Elongation* verzögert nachweisbar war. Dazu kommt, dass bei einem pH-Wert niedriger 6,5 das Wachstum und die Acetatproduktion der Kulturen verstärkt eingeschränkt wurden, wobei die Butyrat- und Hexanoat-Produktion erst bei einem pH-Wert niedriger 5,5 stark inhibiert war. Diese Beobachtungen decken sich mit der Aussage von Ganigué *et al.* (2016), dass *Chain-Elongation* durch einen niedrigen pH-Wert unterbunden wird, wobei in dem durchgeführten Experiment vorrangig die Verschlechterung der vorherrschenden Wachstumsbedingungen zum Tragen kamen.

Auch durch die vorherige Zugabe unterschiedlicher Mengen an Natriumacetat ins Kulturmedium konnte die Produktion von Butyrat und Hexanoat mit AWO [pPta_hcs1] unter heterotrophen Bedingungen nicht beschleunigt werden (Abbildung 30). Dennoch war bei steigender Acetat-Konzentration auch eine Steigerung der finalen Butyrat- und Hexanoat-Konzentration feststellbar. Dies deutet darauf hin, dass eine Abhängigkeit der Hexanoat-Produktion von der intrazellulär bzw. extrazellulär vorliegenden Acetat-

Konzentration besteht. Am meisten Butyrat und Hexanoat wurde zum Ende der logarithmischen und zu Beginn der stationären Wachstumsphase produziert. In einer Veröffentlichung zur Ethanol-Produktion in *C. ljungdahlii* wurde beschrieben, dass, wenn aufgrund einer Limitierung des Wachstums keine Biomasse mehr produziert werden kann, es zu einem Anstieg der intrazellulären Acetat-Konzentration und zu einem Überschuss an Reduktionsäquivalenten kommt (Richter *et al.*, 2016). Dazu kommt, dass die extrazelluläre Acetat-Konzentration auch die Acetat-Konzentration innerhalb der Zelle beeinflusst. Der dadurch erzeugte „Rückstau" bei der Synthese des Acetats könnte folglich die Synthese längerkettiger Säuren verstärken. *Chain-Elongation* als Möglichkeit zur Kompensation bietet sich auch deshalb an, weil die Reaktionen der Enzyme Hbd und Bcd abhängig von den Reduktionsäquivalenten NADH und Ferredoxin sind (Abbildung 45).

Mit einem heterotrophen Wachstumsexperiment, bei dem einmalig frisches Medium zu den Kulturen zu verschiedenen Fermentationszeitpunkten gegeben wurde, konnte gezeigt werden, dass Hexanoat mit AWO [pPta_hcs1] ohne Verzögerung und Abhängigkeit von der Wachstumsphase weiter produziert wird (Abbildung 31). Daraus kann abgeleitet werden, dass *Chain-Elongation* in den rekombinanten *A. woodii*-Stämmen und darüber hinaus auch bei den nativen C6-Körper-produzierenden Acetogenen von der vorhandenen Biomasse-Konzentration abhängig ist. Es ist außerdem davon auszugehen, dass die Enzyme Pta und Ack in *A. woodii* eine sehr starke Affinität zu Acetyl-CoA aufweisen, da das gebildete Acetat Hauptfermentations-Produkt des Wildtyp-Stamms ist (Bache und Pfennig, 1981). Dadurch ist zu erwarten, dass in Batch-Versuchen die Konzentration längerkettiger Produkte langsamer ansteigt als die des Acetats, wodurch Butyrat und Hexanoat später quantifizierbar sind.

Die einzig beschriebenen Fermentationsprodukte von *A. woodii* sind Acetat und Ethanol, wobei Ethanol nur unter gewissen Bedingungen in geringen Mengen nachgewiesen wurde (Bache und Pfennig, 1981; Buschhorn *et al.*, 1989). Durch das Einbringen der Gene *thl, hbd, crt, bcd, etfA* und *etfB* aus *C. carboxidivorans* sind rekombinante *A. woodii*-Stämme zur Butyrat- und Hexanoat-Produktion im Stande. In Abbildung 43 wird der native sowie der zusätzlich eingebrachte synthetische Stoffwechselweg vom Acetyl-CoA zu den Produkten Acetat, Ethanol, Butyrat und Hexanoat in *A. woodii* dargestellt. Die Fähigkeit der Stämme zur Bildung von Hexanoyl-CoA und Hexanoat mit nur einem Gencluster zeigt, dass die vier Enzyme Thl, Hbd, Crt und Bcd aus *C. carboxidivorans* sowohl die Synthese von C4-Körpern als auch von C6-Körpern durchführen können. Für die Crt (Waterson *et al.*, 1972) und später auch für die Hbd aus *C. acetobutylicum* konnte

nachgewiesen werden (Shen *et al.*, 2011), dass die Enzyme aus dem Gencluster nicht spezifisch für C4- oder C6-Körper sein müssen. Allerdings war eine C6-Körper-Produktion mit der Thl und Bcd aus *C. acetobutylicum* nicht möglich. Es scheint, dass die beiden Enzyme Thl und Bcd aus *C. carboxidivorans*, anders als die aus *C. acetobutylicum*, ebenfalls unspezifisch die Reaktionen zum Acetacetyl-CoA bzw. 3-Ketohexanoyl-CoA und zum Butyryl-CoA bzw. Hexanoyl-CoA katalysieren können. Die weitere Verstoffwechselung von Butyryl-CoA und Hexanoyl-CoA in *A. woodii* scheint über native unspezifische Enzyme, wie eine Phosphat-Transferase (Ptf) und eine Fettsäure-Kinase (engl.: *Fatty acid kinase*, Fak), katalysiert zu werden. Eine Umwandlung von Butyryl-CoA oder Hexanoyl-CoA zu Butanol oder Hexanol, wie es durch eine in *A. woodii* identifizierte bifunktionelle Aldehyd-/Alkohol-Dehydrogenase oder eine der zehn weiteren Alkohol-Dehydrogenasen möglich wäre (Bertsch *et al.*, 2015), konnte nicht nachgewiesen werden.

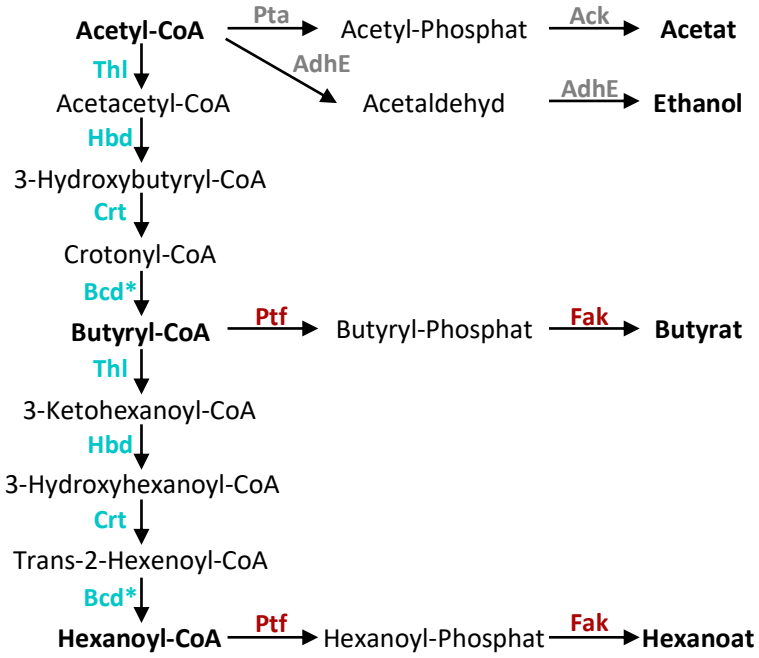


Abbildung 43: Stoffwechselweg von *A. woodii* ausgehend von Acetyl-CoA und Kettenverlängerung zur Synthese von Butyrat und Hexanoat in rekombinanten *A. woodii*-Stämmen. Rekombinant produzierte Proteine des *hcs*-Clusters 1 oder 2 aus *C. carboxidivorans* sind in Blau, für die weitere Verstoffwechselung von Butyryl-CoA/Hexanoyl-CoA verantwortliche native Proteine aus *A. woodii* in Rot dargestellt. Ack, Acetat-Kinase; AdhE, bifunktionelle Aldehyd-/Alkohol-Dehydrogenase; Bcd*, Butyryl-CoA-Dehydrogenase (*, beinhaltet Elektronen-transferierendes Flavoprotein B und Elektronen-transferierendes Flavoprotein A); Crt, Crotonase; Fak, Fettsäure-Kinase; Hbd, 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase; Pta, Phosphotransacetylase; Ptf, Phosphat-Transferase; Thl, Thiolase.

4.5 Hexanoat-Produktion aus Lactat, Methanol oder Synthesegas

Gasfermentation zur Herstellung mittelkettiger Säuren und Alkohole hat gegenüber anderen Produktionsplattformen den Vorteil, dass eine aufwändige und teure Vorbehandlung des Substrats nicht notwendig ist (Naik *et al.*, 2010; Dürre und Eikmanns, 2015). Die Herstellung komplexer Produkte aus Synthesegas ist jedoch mit einem höheren Energieaufwand für die Zelle verbunden. Die Energie-Limitierung bei der anaeroben Gasfermentation ist hierbei das zentrale Problem (Dürre, 2016). Dazu kommt die Substrat-Limitierung durch die niedrige Massentransferrate des Synthesegases in die Flüssigphase und die damit verbundene niedrige Produktivität acetogener Bakterien (Munasinghe und Khanal, 2010). Zur Steigerung des Massentransfers und Minimierung der Kosten werden stetig neue, effizientere Fermenter-Architekturen erforscht (Riegler *et al.*, 2019). Alternative Ansätze, die für die industrielle Anwendung geeignet sind, bei denen die Substrat-Löslichkeit vernachlässigbar ist und mit denen ebenfalls die Umwelt geschont werden kann, sind Fermentationen mit Lactat oder Methanol. Beide Substrate sind im Überfluss und damit günstig erhältlich (1.1). *A. woodii* ist neben der Verstoffwechselung von Fructose oder H_2 + CO_2 auch dazu fähig, die beiden Substrate Lactat und Methanol als Kohlenstoffquelle zu verwerten (Balch *et al.*, 1977; Bache und Pfennig, 1981). Die Stoffwechselwege zur Verwertung von Fructose, Lactat, Methanol und $H_2 + CO_2$ sind für *A. woodii*, ebenso wie die damit gekoppelte Energie-Konservierung, bekannt. Daraus abgeleitet lassen sich die Substrate in Bezug auf die ATP-Generierung durch die Zelle miteinander vergleichen. Am meisten ATP kann *A. woodii* bei der Verwertung von Fructose generieren (2 + n ATP pro Mol Acetat; Schuchmann und Müller, 2014). Danach folgen Methanol (0,83 ATP pro Mol Acetat; Kremp *et al.*, 2018) und H_2 + CO_2 (0,3 ATP pro Mol Acetat; Schuchmann und Müller, 2014). Am wenigsten ATP kann *A. woodii* bei der Verstoffwechselung von Lactat generieren (0,25 ATP pro Mol Acetat; Weghoff *et al.*, 2015). Aufgrund des ATP-Verbrauchs durch die Bildung von Biomasse steht für die Produktbildung, abhängig vom eingesetzten Substrat, nur wenig ATP zur Verfügung. Umso bedeutender ist die Tatsache, dass *Chain-Elongation* und damit die Bildung mittelkettiger Säuren und Alkohole ATP-unabhängig stattfindet.

Neben der Produktion aus Synthesegas wurde die Herstellung von Hexanoat mit dem rekombinanten Stamm AWO [pPta_hcs1] aus Lactat und Methanol untersucht. In einem Wachstumsexperiment wurde das Wachstumsverhalten und die Produktbildung mit

den Substraten Fructose, Lactat und Methanol miteinander verglichen. Dabei konnte gezeigt werden, dass mit AWO [pPta_hcs1] die Hexanoat-Produktion aus Lactat (1,49 mM) und Methanol (2,85 mM) ebenfalls möglich ist (Abbildung 33). Wird aus den gewonnenen Daten die anteilig molare Produktausbeute (AMA) vom gebildeten Hexanoat berechnet, bezogen auf die eingesetzte Menge Kohlenstoff, so kann beim Einsatz von Methanol 6,78 % des Kohlenstoffs im Zielprodukt Hexanoat wiedergefunden werden. Damit wurde fast doppelt so viel Substrat zu Hexanoat umgesetzt, als es beim Einsatz von Lactat (3,72 %) oder Fructose (2,68 %) der Fall war. Wird dieselbe Rechnung bei der autotrophen Hexanoat-Produktion mit AWO [pPta_hcs1] durchgeführt (3.5.3), so kommt man auf eine AMA von 4,61 %. Dieser Vergleich ist jedoch mit Vorsicht zu genießen, da die Daten nicht die Verwendung des im ATCC-Medium 1612 (2.3.4) enthaltenen Natriumhydrogencarbonats als zusätzliche Kohlenstoffquelle für *A. woodii* mit einbeziehen. Dass *A. woodii* mehr Kohlenstoff bezieht, als durch das Substrat zum Medium zugegeben wurde, zeigt auch eine Bestimmung der Kohlenstoffbilanzen in den durchgeführten Versuchen (Abbildung 25 und Abbildung 27). Beispielsweise liegt der Wert des wiederfindbaren Kohlenstoffs bei der heterotrophen Fermentation von AWO WT bei 141 % und bei der autotrophen Fermentation bei 182 %. Bezieht man die vollständige Verwertung des Natriumhydrogencarbonats in die Kohlenstoffbilanzen ein, so minimieren sich die Werte auf 94 % (heterotroph) und 116 % (autotroph). Dies macht deutlich, dass für einen sinnvollen Vergleich der Produktausbeuten beim Einsatz unterschiedlicher Substrate zusätzliche Experimente mit einem speziell auf *A. woodii* angepassten Minimalmedium ohne Natriumhydrogencarbonat und Hefeextrakt notwendig sind.

Die Bildung von Hexanoat aus Acetyl-CoA durch *Chain-Elongation* ist zwar ATP-unabhängig, benötigt aber Reduktionsäquivalente wie NADH und reduziertes Ferredoxin. Ein allgemeiner Überschuss an Reduktionsäquivalenten beim Übergang in die stationäre Wachstumsphase erklärt zwar (4.4), weshalb Hexanoat hauptsächlich erst in dieser Wachstumsphase durch AWO [pPta_hcs1] gebildet wird, erläutert jedoch nicht, wieso ausgehend von Methanol deutlich mehr Hexanoat synthetisiert wurde. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass *A. woodii* aus Methanol CO_2 und H_2 generiert, wobei das CO_2 mit einem weiteren Molekül Methanol wieder bei der Synthese von Acetyl-CoA eingesetzt wird und der Wasserstoff für die Reaktion der Hydrogenase notwendig ist (Kremp *et al.*, 2018). Kommt es dazu, dass Wachstum und Biomassebildung inhibiert werden, könnte *A. woodii* zusätzliches ATP ohne die Bildung von Acetyl-CoA generieren, indem Methanol weiter zu CO_2 verstoffwechselt wird. Dadurch läge jedoch ein Überschuss an NADH vor. Diesen kann der Stamm verringern, indem reduziertes

Ferredoxin gebildet wird und beide Reduktionsäquivalente zum Beispiel für die Bildung von Hexanoat eingesetzt werden. Um den Effekt der verstärkten *Chain-Elongation* ausschließlich auf den Einsatz von Methanol als Substrat zurückführen zu können, müsste das Experiment zunächst wiederholt werden, um sicherzustellen, dass eine Reproduzierbarkeit gegeben ist.

Welches Substrat tatsächlich für die Hexanoat-Produktion mit den rekombinanten *A. woodii*-Stämmen optimal ist, kann anhand der durchgeführten Experimente nicht festgelegt werden. Allerdings konnte gezeigt werden, dass sich die Stämme aufgrund ihrer hohen Substrat-Flexibilität in unterschiedlichen Produktionsprozessen einsetzen lassen.

4.6 Produktion von Hexanoat und Hexanol mit rekombinanten *C. saccharoperbutylacetonicum*-Stämmen

Nachdem durch das Einbringen der *hcs*-Cluster aus *C. carboxidivorans* in rekombinanten *A. woodii*-Stämmen *Chain-Elongation* nachgewiesen wurde, folgten weitere Experimente mit dem von Keis *et al.* (2001) beschriebenen ABE-fermentierenden Bakterienstamm *C. saccharoperbutylacetonicum*. Zunächst wurde untersucht, ob mit den rekombinanten Stämmen CSAC [pPta_hcs1_C] und CSAC [pTet_hcs1_C] die Herstellung von C6-Körpern in *C. saccharoperbutylacetonicum* möglich ist. Mit der konstitutiv aktiven Genexpression durch den Promoter $P_{pta\text{-}ack}$ konnten, ausgehend von Glucose, 0,8 mM Hexanoat und 5,2 mM Hexanol durch den Stamm CSAC [pPta_hcs1_C] hergestellt werden. CSAC [pTet_hcs1_C] war nach Induktion der Genexpression ebenfalls zur Produktion von Hexanoat (0,4 mM) und Hexanol (0,6 mM) fähig (Abbildung 39; Tabelle 14). Somit konnte erstmals Hexanol-Produktion rekombinant in einem clostridiellen Bakterienstamm etabliert werden. Das Produktspektrum der beiden Stämme wies sonst keine Veränderung auf. Wird die C6-Körper-Ausbeute berechnet, so lassen sich bei CSAC [pPta_hcs1_C] 2,61 % und bei CSAC [pTet_hcs1_C] 0,46 % des Kohlenstoffs im Hexanoat/Hexanol wiederfinden. Mit CSAC [pPta_hcs1_C] konnte somit ähnlich viel Substrat zu C6-Körpern umgesetzt werden wie mit AWO [pPta_hcs1] (2,68 %) (4.5). Im Gegensatz zu den Wachstumsexperimenten mit *A. woodii* wurde der Versuch mit *C. saccharoperbutylacetonicum* in Minimal-Medium, ohne Zugabe von Hefeextrakt oder Natriumhydrogencarbonat als zusätzliche Kohlenstoffquellen, durchgeführt. *C. saccharoperbutylacetonicum* kann neben Acetat auch Lactat, Aceton,

Ethanol, Butyrat und Butanol herstellen, wobei letzteres das Hauptfermentationsprodukt ist (Nakayama *et al.*, 2008). Abbildung 44 zeigt, ausgehend vom Pyruvat, die Stoffwechselwege zu den nativen Produkten und den eingebrachten synthetischen Weg zur Synthese von Hexanoat und Hexanol in *C. saccharoperbutylacetonicum*. Ebenso wie für *C. acetobutylicum* beschrieben, besitzt *C. saccharoperbutylacetonicum* ein *bcs*-Operon, in dem mit Ausnahme der Thiolase dieselben Proteine codiert sind (Cspa_c04330-Cspa_c04370) wie auf dem eingebrachten *hcs*-Operon aus *C. carboxidivorans*. Nur mit den zusätzlich eingebrachten Genen kann *C. saccharoperbutylacetonicum* Hexanoyl-CoA aus Butyryl-CoA synthetisieren. Das Hexanoyl-CoA wird anschließend durch native Enzyme weiter zu

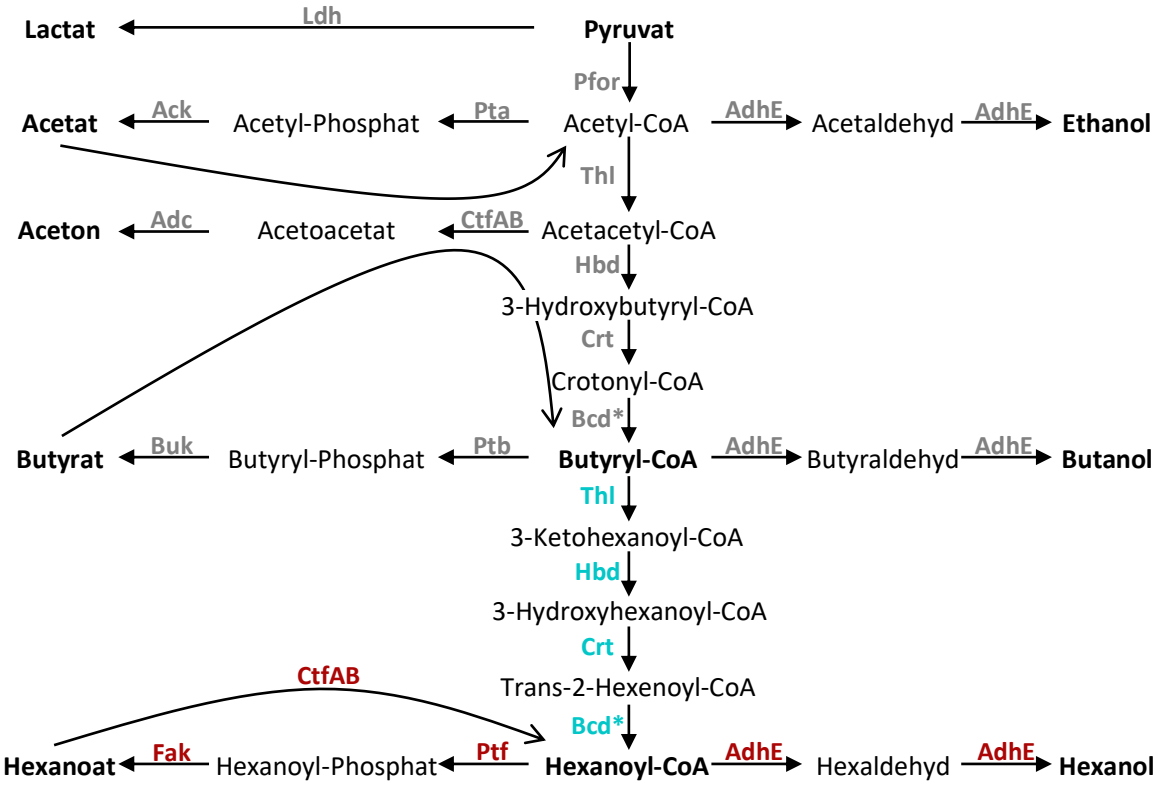


Abbildung 44: Zentraler Stoffwechselweg des ABE-fermentierenden Stamms *C. saccharoperbutylacetonicum* ausgehend von Pyruvat und Kettenverlängerung zur Synthese von Hexanoat und Hexanol in rekombinanten *C. saccharoperbutylacetonicum*-Stämmen. Rekombinant produzierte Proteine des *hcs*-Clusters 1 aus *C. carboxidivorans* sind in Blau und für die weitere Verstoffwechselung von Hexanoyl-CoA mögliche native Proteine aus *C. saccharoperbutylacetonicum* in Rot dargestellt. Ack, Acetat-Kinase; Adc, Acetoacetat-Decarboxylase; AdhE, bifunktionelle Aldehyd-/Alkohol-Dehydrogenase; Bcd*, Butyryl-CoA-Dehydrogenase (*, beinhaltet Elektronen-transferierendes Flavoprotein B und Elektronen-transferierendes Flavoprotein A); Buk, Butyrat-Kinase; Crt, Crotonase; CtfAB, CoA-Transferase; Fak, Fettsäure-Kinase; Hbd, 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase; Ldh, Lactat-Dehydrogenase; Pfor, Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase; Pta, Phosphotransacetylase; Ptb, Phosphotransbutyrylase; Ptf, Phosphat-Transferase; Thl, Thiolase.

Hexanoat oder Hexanol umgesetzt. Für die 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase, ebenso wie für die Crotonase aus *C. acetobutylicum*, konnte bereits eine Aktivität gegenüber C6-Körpern nachgewiesen werden (Dekishima *et al.*, 2011; Shen *et al.*, 2011). Somit kommen die Thiolase und die Butyryl-CoA-Dehydrogenase aus *C. carboxidivorans* als essentielle Enzyme für die *Chain-Elongation* zur Bildung mittelkettiger Säuren und Alkohole in Frage. Beide wurden zur Bildung von Hexanol mit *E. coli* ausgetauscht (Dekishima *et al.*, 2011). Um diese These zu überprüfen, wurden die Gene des *hcs*-Clusters 1 aus *C. carboxidivorans* einzeln in Plasmide kloniert und diese anschließend in *C. saccharoperbutylacetonicum* eingebracht. Die fehlenden Funktionen der anderen drei Proteine sollten theoretisch durch die nativen Enzyme des Stamms kompensiert werden. Mit den Stämmen CSAC [pthl], CSAC [pcrt], CSAC [phbd] und CSAC [pbcd_etfAB] wurde überprüft, ob eines der Gene des *hcs*-Clusters ausreicht, um *Chain-Elongation* zur Bildung von C6-Körpern in *C. saccharoperbutylacetonicum* zu ermöglichen. In einem Wachstumsexperiment mit den vier rekombinanten Stämmen konnte gezeigt werden, dass mit nur einem der Gene des *hcs*-Clusters 1 aus *C. carboxidivorans* keine C6-Körper-Produktion möglich ist (Abbildung 39 und Tabelle 14). Folglich sind mindestens zwei der Enzyme für die Umwandlung von Butyryl-CoA zu Hexanoyl-CoA notwendig. Um die essentiellen Enzyme identifizieren zu können, müssten weitere Experimente folgen. Zunächst müsste nachgewiesen werden, ob die Proteine bei CSAC [pthl], CSAC [pcrt], CSAC [phbd] und CSAC [pbcd_etfAB] tatsächlich von dem Stamm produziert werden. Hierfür würde sich eine Analyse mittels SDS-PAGE anbieten. Daneben besteht die Möglichkeit, dass die Thiolase gemeinsam mit der Butyryl-CoA-Dehydrogenase die C6-Körper-Produktion ermöglicht. Dies kann überprüft werden, indem bei dem Plasmid pbcd_etfAB der Replikationsursprung und das Resistenzgen ausgetauscht werden. Nach Transformation des Plasmids in den Stamm CSAC [pthl] könnte dessen Produktspektrum Aufschluss darüber geben, ob diese beiden Enzyme essentiell für *Chain-Elongation* zur Bildung mittelkettiger Säuren und Alkohole sind.

Eine weitere Möglichkeit zum Vergleich der Proteine des *hcs*-Clusters 1 aus *C. carboxidivorans* mit denen eines *bcs*-Clusters bietet die Proteinkristallographie. Dabei kann die Struktur der Proteine und deren aktive Zentren beim Verständnis darüber helfen, wieso die Enzyme des *bcs*-Clusters nur Reaktionen bis zum Butyryl-CoA, die Enzyme des *hcs*-Clusters aber Reaktionen zum Butyryl-CoA und zum Hexanoyl-CoA katalysieren können. Die Kristallstruktur der Thiolase (CAC2873) aus *C. acetobutylicum* wurde beispielsweise bereits analysiert (Kim *et al.*, 2015). Dabei konnte unter anderem festgestellt werden, dass die Aktivität des Enzyms mittels Bildung reversibler Disulfidbrücken gesteuert wird. Dieselben Bindungsstellen (Cys88 und Cys378) lassen

sich auch in der Aminosäuresequenz der Thiolase des *hcs*-Clusters 1 aus *C. carboxidivorans* (Ga0111308_11438) nachweisen. Mit Hilfe der Online-Datenbank PDBsum (2.13) konnten mögliche Bindungsstellen der Thiolase aus *C. acetobutylicum* zum Liganden (Acetat-Ion, $C_2H_3O_2$) identifiziert werden. Die Aminosäuren, die dabei unmittelbar über Wasserstoffbrückenbindung oder in nicht-gebundenem Kontakt zum Ligand stehen, sind Leu92, Ser96, Tyr278, Gly279, Ser280, Thr385, Ala386 und Ile387. Die Thiolase von *C. carboxidivorans* (*hcs*-Cluster 1) ist auf Aminosäureebene zu 72 % mit der von *C. acetobutylicum* identisch. Von den besagten acht Aminosäuren im katalytischen Zentrum sind ebenfalls fünf identisch. Bei der Thiolase aus *C. carboxidivorans* ist allerdings anstelle von Ser280 Threonin, anstelle von Ala386 Serin und anstelle von Ile387 Valin in das Protein eingebaut. Inwieweit dieser und die anderen Unterschiede in der Aminosäuresequenz Einfluss auf die Selektivität des Liganden haben, müsste durch weitere Analysen mit der Kristallstruktur der Thiolase aus *C. carboxidivorans* geklärt werden. Selbiges gilt auch für die Butyryl-CoA-Dehydrogenase, die 3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase und die Crotonase des *hcs*-Clusters 1 aus *C. carboxidivorans*.

4.7 Der Stoffwechselweg zur Bildung mittelkettiger Säuren und Alkohole in *C. carboxidivorans*

Anhand bekannter und der durch diese Arbeit erworbenen Erkenntnisse kann ein Modell des Stoffwechselwegs zur Synthese mittelkettiger Säuren und Alkohole in *C. carboxidivorans* abgeleitet werden. Durch eine umfassende Genomanalyse konnten Gene für den Wood-Ljungdahl-Stoffwechselweg sowie für die Bildung von Säuren und Lösungsmitteln in *C. carboxidivorans* identifiziert werden (Bruant *et al.*, 2010). So konnten in der Genomsequenz von *C. carboxidivorans* alle 17 essentiellen Gene für die Umwandlung von CO bzw. CO_2 zum zentralen Stoffwechselintermediat Acetyl-CoA gefunden werden, von denen bis auf die zwei Gene für die Formiat-Dehydrogenase alle in einem Cluster angeordnet sind. Aus Acetyl-CoA wird Acetat durch eine Phosphotransacetylase und eine Acetat-Kinase gebildet. Analog dazu erfolgt die Synthese von Butyrat aus Butyryl-CoA in *C. carboxidivorans* durch eine Phosphat-Butyryltransferase und eine Butyrat-Kinase. Die Umwandlung von Acetyl-CoA und Butyryl-CoA zu Ethanol und Butanol wird vermutlich mittels identifizierter bifunktioneller Aldehyd-/Alkohol-Dehydrogenase katalysiert. In *C. acetobutylicum* wird die Umwandlung von Säuren in entsprechende Alkohole durch eine CoA-Transferase ermöglicht. Die dafür notwendigen Gene *ctfA* und *ctfB* konnten nicht in der Genomsequenz von

C. carboxidivorans gefunden werden (Bruant *et al.*, 2010). Deshalb ist es wahrscheinlich, dass die nachgewiesene Umwandlung von Säuren in Alkohole bei *C. carboxidivorans* durch die identifizierte Aldehyd:Ferredoxin-Oxidoreduktase (Aor) stattfindet. Die These wird dadurch gestützt, dass sich bei beiden Acetogenen *C. scatologenes* und *C. drakei* kein Gen für die Aor, dafür aber ein entsprechendes Gen für die AdhE nachweisen lässt und beide nicht zur Alkohol-Produktion fähig sind. Durch Bruant *et al.* (2010) wurden die beiden Gencluster mit *thl, hbd, crt, bcd, etfA und etfB* ebenfalls identifiziert. Allerdings

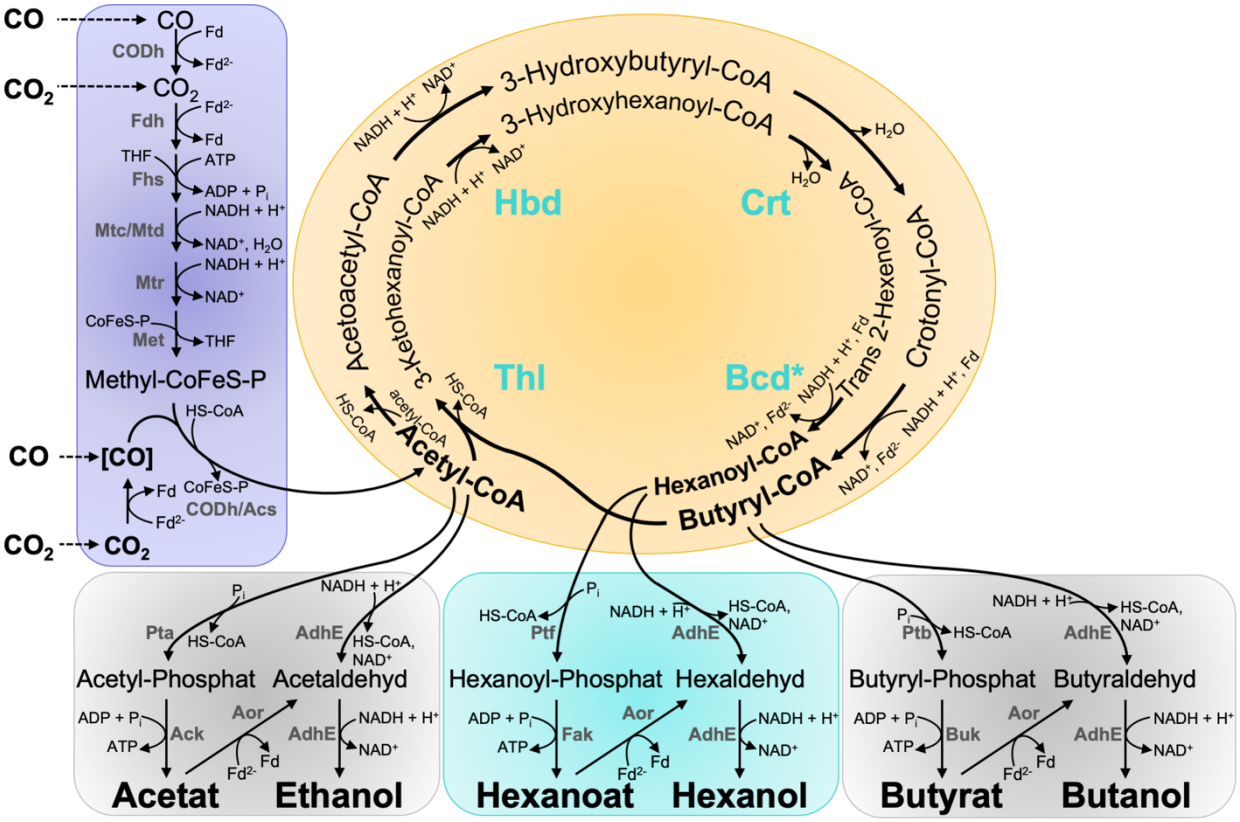


Abbildung 45: Postulierter Stoffwechselweg für die autotrophe Bildung mittelkettiger Säuren und Alkohole in *C. carboxidivorans* (Wirth und Dürre, 2021). Ausgehend vom Wood-Ljungdahl-Stoffwechselweg (lila) können Acetat und Ethanol (grau) gebildet werden. Mittels *Chain-Elongation* (gelb) durch die Proteine eines der beiden *hcs*-Cluster 1 oder 2 kann *C. carboxidivorans* C4-Körper (grau) und C6-Körper (grün) synthetisieren. Ack, Acetat-Kinase; AdhE, bifunktionelle Aldehyd-/Alkohol-Dehydrogenase; Aor, Aldehyd:Ferredoxin-Oxidoreduktase; Bcd*, Butyryl-CoA-Dehydrogenase (*, beinhaltet Elektronen-transferierendes Flavoprotein B und Elektronen-transferierendes Flavoprotein A); Buk, Butyrat-Kinase; CODh, CO-Dehydrogenase; CODh/Acs, CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthetase; Crt, Crotonase; Fak, Fettsäure-Kinase; Fdh, Formiat-Dehydrogenase; Fhs, Formyl-THF-Synthetase; Hbd, 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase; Met, Methyltransferase; Mtc/Mtd, bifunktionelle Methenyl-THF-Cyclohydrolase/Methylen-THF-Dehydrogenase; Mtr, Methylen-THF-Reduktase; Pta, Phosphotransacetylase; Ptb, Phosphotransbutyrylase; Ptf, Phosphat-Transferase; Thl, Thiolase.

konnte nur ein Zusammenhang zur Bildung von Butyryl-CoA hergestellt werden. Anhand der in dieser Arbeit gesammelten Ergebnisse kann nun der beschriebene Stoffwechselweg in *C. carboxidivorans* erweitert werden. In Abbildung 45 wird der vollständige Stoffwechselweg zur Synthese mittelkettiger Säuren und Alkohole in *C. carboxidivorans*, ausgehend von CO bzw. CO_2, dargestellt. Der Mechanismus der *Chain-Elongation* von Acetyl-CoA über Butyryl-CoA zu Hexanoyl-CoA erfolgt durch die in den *hcs*-Genclustern 1 und 2 codierten Proteine. Die Enzyme Thl, Hbd, Crt und Bcd (zusammen mit EtfA und EtfB) katalysieren unspezifisch sowohl die Bildung von Butyryl-CoA als auch von Hexanoyl-CoA. Die weitere Umwandlung von Hexanoyl-CoA zu Hexanoat und Hexanol erfolgt mutmaßlich durch dieselben unspezifischen Enzyme, die auch Acetyl-CoA und Butyryl-CoA zu entsprechenden Säuren und Alkoholen umwandeln können. Bei den beiden *hcs*-Genclustern handelt es sich jeweils um ein Operon, wobei keine Genexpression des *hcs*-Genclusters 2 aus *C. carboxidivorans* bei gleichzeitiger C6-Körper-Produktion nachgewiesen wurde. Dass beide Gencluster *Chain-Elongation* ermöglichen, konnte mit der heterologen Genexpression in rekombinanten *A. woodii*-Stämmen nachgewiesen werden (3.5.3). Aus den erhaltenen Ergebnissen zu *C. carboxidivorans* kann auch abgeleitet werden, dass *Chain-Elongation* bei den beiden acetogenen Bakterienstämmen *C. scatologenes* und *C. drakei* einzig durch die in den identifizierten *hcs*-Genclustern codierten Enzyme ermöglicht wird.

5 Zusammenfassung

Treibhausgasemissionen und der damit verbundene Klimawandel sind längst im Fokus der Politik und Gesellschaft. Haupt-Verursacher der globalen CO_2-Emissionen und gleichzeitig das größte Problem bei Versuchen, diese zu verringern, sind die Herstellung und Verbrennung von Kraftstoffen sowie die Abhängigkeit der Industrie von fossilen Brennstoffen. Gasfermentation als Technologie zur Herstellung von Plattform-Chemikalien und Kraftstoffen ist eine der vielversprechendsten Alternativen zur Petrochemie. Mit dem vergleichsweise günstigen Verfahren kann die CO_2-Konzentration effektiv reduziert und damit ein Beitrag zum Klimaschutz geleistet werden. Die Produktion von Chemikalien aus Synthesegas wird durch den Einsatz acetogener Bakterien ermöglicht. Vor allem mittelkettige Säuren und Alkohole wie Hexanoat und Hexanol sind aufgrund ihrer vielseitigen Einsatzmöglichkeiten in Bereichen wie Medizin, Agrarwirtschaft, Parfüm- und Lebensmittelindustrie, aber auch zur Herstellung von Kraftstoffen wie Kerosin oder Diesel, besonders interessant. Ziel dieser Arbeit war es, neue Erkenntnisse darüber zu erlangen, wodurch *Chain-Elongation* in nativen C6-Körper-produzierenden Acetogenen ermöglicht wird. Hierfür wurden mögliche essentielle Gene zur Synthese mittelkettiger Säuren und Alkohole identifiziert, um anschließend die katalytische Aktivität der Genprodukte in den acetogenen Modell-Organismen *Clostridium ljungdahlii* und *Acetobacterium woodii* unter Beweis zu stellen.

Im Zuge der Analysen zu *Chain-Elongation* konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass neben den beiden beschriebenen nativen C6-Körper-produzierenden Bakterienstämmen *Clostridium carboxidivorans* und *Clostridium scatologenes* auch der nächste verwandte Bakterienstamm *Clostridium drakei* Hexanoat, ausgehend von Synthesegas, produzieren kann. Um den entsprechenden Stoffwechselweg entschlüsseln zu können, sollte *C. carboxidivorans* genetisch zugänglich gemacht werden, da dieser als einziger acetogener Bakterienstamm Hexanoat und Hexanol produzieren kann. Es wurden Experimente zur Transformation von *C. carboxidivorans* mittels Elektroporation, Konjugation und homologer Rekombination durchgeführt. Dabei konnte aufgrund von Plasmid-Instabilitäten kein stabiler rekombinanter Stamm generiert werden. Um auszuschließen, dass das native Plasmid p19 einen Einfluss auf die Plasmid-Instabilität hat, wurde mit Hilfe von *plasmid curing* versucht, das Plasmid aus *C. carboxidivorans* zu entfernen. Dieser Ansatz war aufgrund vermeintlich essentieller Gene nicht erfolgreich. Auch mit einem speziell für *C. carboxidivorans* entwickelten Schaukelvektor pMTLp19 konnte kein rekombinanter Stamm erzeugt werden. Des Weiteren ergab eine *in silico*-Analyse der Genomsequenz von *C. carboxidivorans*, dass der Stamm über zehn annotierte

RM-Systeme verfügt. Versuche, aktive Restriktionsendonukleasen nachzuweisen oder den Verdau eingebrachter DNA zu verhindern, waren ebenfalls nicht erfolgreich.

Bei der Analyse des Genoms von *C. carboxidivorans* wurden zwei Gencluster identifiziert, die dem *bcs*-Operon aus *C. acetobutylicum* ähneln und dort für die Umwandlung von Acetyl-CoA zu Butyryl-CoA durch reverse β-Oxidation verantwortlich sind. Mittels RT-PCR wurde nachgewiesen, dass ausschließlich die Gene von Cluster 1 bei gleichzeitiger Bildung von C6-Körpern unabhängig von der Wachstumsphase exprimiert werden. Der Annahme folgend, dass die darin codierten Enzyme die Reaktionen sowohl zu Butyryl-CoA als auch zu Hexanoyl-CoA katalysieren, wurde ein modulares *hcs*-Plasmid-System konstruiert. Von den vier hieraus resultierenden Plasmiden konnte nur eines in den acetogenen Modell-Organismus *C. ljungdahlii* eingebracht werden. Der rekombinante Stamm CLJU [pTet_hcs2] zeigte kein verändertes Produktspektrum. Alle vier Plasmide wurden erfolgreich in *A. woodii* eingebracht, woraufhin mit den rekombinanten Stämmen AWO [pPta_hcs1], AWO [pPta_hcs2], AWO [pTet_hcs1] und AWO [pTet_hcs2] Butyrat- und Hexanoat-Produktion unter autotrophen Bedingungen mit beiden *hcs*-Clustern aus *C. carboxidivorans* nachgewiesen werden konnte (0,48-1,56 mM Hexanoat). Weitere fermentationstechnische Analysen zur *Chain-Elongation* mit AWO [pPta_hcs1] ermöglichten eine Optimierung und Steigerung der Hexanoat-Produktion unter heterotrophen Bedingungen (5,38 mM Hexanoat). Mit AWO [pPta_hcs1] konnte außerdem die Hexanoat-Produktion aus Lactat und aus Methanol nachgewiesen werden.

Zur Identifizierung einzelner für *Chain-Elongation* essentieller Gene wurde das *hcs*-Cluster 1 aus *C. carboxidivorans* in den ABE-fermentierenden Bakterienstamm *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* eingebracht. Für die Analyse der einzelnen Gene des Clusters wurden diese einzeln in das *hcs*-Plasmid-System kloniert und die vier entstandenen Plasmide separat in *C. saccharoperbutylacetonicum* eingebracht. Die daraus resultierenden rekombinanten Stämme produzierten weder Hexanoat noch Hexanol. Einzig die Stämme mit dem gesamten Gencluster waren zu *Chain-Elongation* befähigt und produzierten bis zu 0,8 mM Hexanoat und 5,2 mM Hexanol bei der Fermentation mit Glucose.

Anhand der gewonnenen Erkenntnisse war es möglich, erstmals den vollständigen Stoffwechselweg zur Bildung von Hexanoat und Hexanol in *C. carboxidivorans* zu postulieren, der auch auf *C. scatologenes* und *C. drakei* übertragbar ist. Zusätzlich konnte, ausgehend von Synthesegas, erstmals die heterologe Produktion von C6-Körpern in acetogenen Bakterien etabliert werden. Die hierbei generierten Daten bilden den Grundstein für eine nachhaltige und flexible Produktion von Hexanoat und Hexanol.

6 Summary

Greenhouse gas emissions and the associated climate change are finally in the focus of politics and society. The production and combustion of fuels and the dependence of industry on fossil fuels are the main causes of global CO_2 emissions and, at the same time, the biggest problem in attempts to reduce them. Gas fermentation as a technology for manufacturing platform chemicals and fuels is one of the most promising alternatives to petrochemicals. With the comparatively cheap process, CO_2 concentration can be effectively reduced and thus a contribution to climate protection can be made. The production of chemicals from synthesis gas is possible with the use of acetogenic bacteria. Especially medium-chain acids and alcohols such as hexanoate and hexanol are particularly interesting due to their versatile application in areas such as medicine, agriculture, perfume and food industry, but also for the production of fuels such as kerosene or diesel. The aim of this thesis was to gain new knowledge about what enables chain elongation in native C6 compound-producing acetogens. First, possible essential genes for the synthesis of medium-chain acids and alcohols should be identified in order to subsequently demonstrate their catalytic activity in the acetogenic model organisms *Clostridium ljungdahlii* and *Acetobacterium woodii*.

As part of the analysis of chain elongation, it was shown for the first time that in addition to the two described native C6 compound-producing strains *Clostridium carboxidivorans* and *Clostridium scatologenes*, the closest related bacterial strain *Clostridium drakei* can also produce hexanoate from synthesis gas. In order to be able to decrypt the corresponding metabolic pathway, attempts were made to make *C. carboxidivorans* genetically accessible, since it is the only acetogenic strain that can produce hexanoate and hexanol. Therefore, experiments were carried out to transform *C. carboxidivorans* using electroporation, conjugation, and homologous recombination. However, due to observed plasmid instabilities, no stable recombinant strain could be generated. To exclude that the native plasmid p19 has an influence on the plasmid instability, plasmid curing was performed to remove the plasmid from *C. carboxidivorans.* This approach was unsuccessful due to supposedly essential genes. Even with the shuttle vector pMTLp19, which was specially developed for *C. carboxidivorans*, no recombinant strain could be generated. In addition, an *in silico* analysis of the genome sequence of *C. carboxidivorans* revealed that the strain has ten annotated RM systems. Attempts to detect or to prevent the digestion of introduced DNA were also unsuccessful.

When analyzing the genome of *C. carboxidivorans*, two gene clusters were identified which are similar to the *bcs* operon from *C. acetobutylicum* and are responsible for the conversion of acetyl-CoA to butyryl-CoA by reverse β-oxidation. Using RT-PCR it could be demonstrated that only the genes of cluster 1 are expressed regardless of the growth phase with the simultaneous formation of C6 compounds. Following the theory that the enzymes encoded in the gene cluster catalyze the reactions to both butyryl-CoA and hexanoyl-CoA, a modular *hcs* plasmid system was constructed. Of the resulting four plasmids, only one could be transferred into the acetogenic model organism *C. ljungdahlii*. The recombinant strain CLJU [pTet_hcs2] showed no change in the product spectrum. All four plasmids were successfully transferred into *A. woodii*. With the recombinant strains AWO [pPta_hcs1], AWO [pPta_hcs2], AWO [pTet_hcs1] and AWO [pTet_hcs2] butyrate and hexanoate production under autotrophic conditions with both *hcs* clusters from *C. carboxidivorans* could be detected (0.48-1.56 mM hexanoate). Further fermentation analyses for chain elongation with AWO [pPta_hcs1] enabled the optimization and the increase of hexanoate production under heterotrophic conditions (5.38 mM hexanoate). In addition, hexanoate production from lactate and methanol could be detected with AWO [pPta_hcs1].

In order to identify individual genes essential for chain elongation, the *hcs* cluster 1 from *C. carboxidivorans* was transferred into the ABE-fermenting bacterial strain *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*. For the analysis of the genes of *hcs* cluster 1, these were cloned individually into the *hcs* plasmid system and the resulting four plasmids were transferred separately into *C. saccharoperbutylacetonicum*. The resulting recombinant strains neither produced hexanoate nor hexanol. Only the strains with the entire gene cluster were capable of chain elongation and could produce up to 0.8 mM hexanoate and 5.2 mM hexanol in the fermentation with glucose.

Based on the knowledge gained from the experiments, it was possible to postulate the complete metabolic pathway for the formation of hexanoate and hexanol in *C. carboxidivorans* for the first time. The metabolic pathway should accordingly also be transferable to *C. scatologenes* and *C. drakei*. In addition, the heterologous production of C6 compounds under autotrophic conditions in acetogenic bacteria was demonstrated for the first time. The generated data form an important base for sustainable and flexible production of hexanoate and hexanol.

Literaturverzeichnis

Antonov E, **Wirth S**, **Gerlach T**, **Schlembach I**, **Rosenbaum MA**, **Regestein L**, **Büchs J**. 2016. Efficient evaluation of cellulose digestibility by *Trichoderma reesei* Rut-C30 cultures in online monitored shake flasks. Microb. Cell Fact. **15**:164.

Ausfelder F, **Dura HE**. 2018. Optionen für ein nachhaltiges Energiesystem mit Power-To-X Technologien: Herausforderungen-Potenziale-Methoden-Auswirkungen: 1. Roadmap des Kopernikus-Projektes „Power-to-X“: Flexible Nutzung erneuerbarer Ressourcen (P2X). DECHEMA Gesellschaft für Chemische Technik und Biotechnologie eV.

Bache R, **Pfennig N**. 1981. Selective isolation of *Acetobacterium woodii* on methoxylated aromatic acids and determination of growth yields. Arch. Microbiol. **130**:255–261.

Balch WE, **Schoberth S**, **Tanner RS**, **Wolfe RS**. 1977. *Acetobacterium*, a new genus of hydrogen-oxidizing, carbon dioxide-reducing, anaerobic bacteria. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **27**:355–361.

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

Beck MH. 2019. Biological conversion of CO_2 into the platform chemicals lactate and 3-hydroxypropionate using recombinant strains of *Acetobacterium woodii*. Dissertation, Universität Ulm, Deutschland.

Bengelsdorf FR, **Beck MH**, **Erz C**, **Hoffmeister S**, **Karl MM**, **Riegler P**, **Wirth S**, **Poehlein A**, **Weuster-Botz D**, **Dürre P**. 2018. Bacterial anaerobic synthesis gas (syngas) and CO_2+H_2 fermentation. *In* Sariaslani S, Gadd GM (Eds.), Advances in Applied Microbiology (Vol. 103, pp. 143–221). Academic Press, New York, NY, USA.

Bertani G. 1951. A method for detection of mutations, using streptomycin dependence in *Escherichia coli*. Genetics **36**:598–611.

Bertau M, Offermanns H, Plass L, Schmidt F, Wernicke H-J. 2014. Methanol: the basic chemical and energy feedstock of the future. Springer Verlag, Berlin, Deutschland.

Bertsch J, **Siemund AL**, **Kremp F**, **Müller V**. 2016. A novel route for ethanol oxidation in the acetogenic bacterium *Acetobacterium woodii*: the acetaldehyde/ethanol dehydrogenase pathway. Environ. Microbiol. **18**:2913–2922.

Bickle TA, **Krüger DH**. 1993. Biology of DNA restriction. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **57**:434–450.

Biegel E, **Schmidt S**, **Müller V**. 2009. Genetic, immunological and biochemical evidence for a Rnf complex in the acetogen *Acetobacterium woodii*. Environ. Microbiol. **11**:1438–1443.

Bielzer S. 2019. Herstellung von Butanol, Hexanol und Capronsäure auf Basis CO und CO_2 mittels Fermentation von acetogenen Bakterien zusammen mit *C. kluyveri* und Untersuchung der beteiligten Faktoren. Dissertation, Universität Ulm, Deutschland.

Boynton ZL, **Bennet GN**, **Rudolph FB**. 1996. Cloning, sequencing, and expression of clustered genes encoding β-Hydroxybutyryl-coenzyme A (CoA) dehydrogenase, crotonase, and butyryl-CoA dehydrogenase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. J. Bacteriol. **178**:3015–3024.

Bruant G, **Lévesque M-J**, **Peter C**, **Guiot SR**, **Masson L**. 2010. Genomic analysis of carbon monoxide utilization and butanol production by *Clostridium carboxidivorans* strain $P7^T$. PLoS One **5**.

Buschhorn H, **Dürre P**, **Gottschalk G**. 1989. Production and utilization of ethanol by the homoacetogen *Acetobacterium woodii*. Appl. Environ. Microbiol. **55**:1835–1840.

Chan W-T, **Verma CS**, **Lane DP**, **Gan SK-E**. 2013. A comparison and optimization of methods and factors affecting the transformation of *Escherichia coli*. Biosci. Rep. **33**:931–937.

Daniell J, **Köpke M**, **Simpson SD**. 2012. Commercial biomass syngas fermentation. Energies **5**:5372–5417.

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

De Poures MV, **Sathiyagnanam AP**, **Rana D**, **Kumar BR**, **Saravanan S**. 2017. 1-Hexanol as a sustainable biofuel in DI diesel engines and its effect on combustion and emissions

under the influence of injection timing and exhaust gas recirculation (EGR). Appl. Therm. Eng. **113**:1505–1513.

Dekishima Y, **Lan EI**, **Shen CR**, **Cho KM**, **Liao JC**. 2011. Extending carbon chain length of 1-butanol pathway for 1-hexanol synthesis from glucose by engineered *Escherichia coli*. J. Am. Chem. Soc. **133**:11399–11401.

Desbois AP. 2012. Potential applications of antimicrobial fatty acids in medicine, agriculture and other industries. Recent Pat. Anti-Infective Drug Discovery **7**:111–122.

Dodds DR, **Gross RA**. 2007. Chemicals from biomass. Science **318**:1250–1251.

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

Drake HL. 1994. Acetogenesis, acetogenic bacteria, and the acetyl-CoA "Wood/Ljungdahl" pathway: past and current perspectives. *In* H. Drake (Ed.), Acetogenesis (pp. 3–60). Springer, New York, NY, USA.

Dürre P. 2011. Fermentative production of butanol – the academic perspective. Curr. Opin. Biotechnol. **22**:331–336.

Dürre P. 2016. Gas fermentation – a biotechnological solution for today's challenges. Microb. Biotechnol. **10**:14–16.

Dürre P, **Eikmanns BJ**. 2015. C1-carbon sources for chemical and fuel production by microbial gas fermentation. Curr. Opin. in Biotechnol. **35**:63–72.

Dusséaux S, **Croux C**, **Soucaille P**, **Meynial-Salles I**. 2013. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 for the high-yield production of a biofuel composed of an isopropanol/butanol/ethanol mixture. Metab. Eng. **18**:1–8.

Fernández-Naveira Á, **Abubackar HN**, **Veiga MC**, **Kennes C**. 2017a. Production of chemicals from C1 gases (CO, CO_2) by *Clostridium carboxidivorans*. World J. Microbiol. Biotechnol. **33**:43.

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

Fernández-Naveira Á, **Veiga MC**, **Kennes C**. 2017c. Effect of pH control on the anaerobic H-B-E fermentation of syngas in bioreactors. J. Chem. Technol. Biotechnol. **92**:1178–1185.

Flitsch SK. 2015. Identifikation und Charakterisierung von Regulatoren der Lösungsmittelbildung in *Clostridium acetobutylicum*. Dissertation, Universität Ulm, Deutschland.

Flüchter S. 2017. Production of 3-hydroxybutyrate and poly-3-hydroxybutyrate using acetogenic bacteria. Dissertation, Universität Ulm, Deutschland.

Flüchter S, **Follonier S**, **Schiel-Bengelsdorf B**, **Bengelsdorf FR**, **Zinn M**, **Dürre P**. 2019. Anaerobic production of poly(3-hydroxybutyrate) and its precursor 3-hydroxybutyrate from synthesis gas by autotrophic Clostridia. Biomacromolecules **20**:3271–3282.

Ganigué R, **Sánchez-Paredes P**, **Bañeras L**, **Colprim J**. 2016. Low fermentation pH is a trigger to alcohol production, but a killer to chain elongation. Front. Microbiol. **7**:702.

Global Footprint Network. 2020. Pressemitteilung, Oakland, CA, USA. https://www.overshootday.org/newsroom/country-overshoot-days/ (abgerufen April 2020).

González-Cabaleiro R, **Lema JM**, **Rodríguez J**, **Kleerebezem R**. 2013. Linking thermodynamics and kinetics to assess pathway reversibility in anaerobic bioprocesses. Energy Environ. Sci. **6**:3780–3789.

Gößner AS, **Picardal F**, **Tanner RS**, **Drake HL**. 2008. Carbon metabolism of the moderately acid-tolerant acetogen *Clostridium drakei* isolated from peat. FEMS Microbiol. Lett. **287**:236–242.

Green EM, **Bennett GN**. 1996. Inactivation of an aldehyde/alcohol dehydrogenase gene from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. Appl. Biochem. Biotechnol. **57**:213-221.

Harrison DEF. 1978. Mixed cultures in industrial fermentation processes. *In* Advances in Applied Microbiology (Vol. 24, pp. 129–164). Academic Press, New York, NY, USA.

Harvey BG, **Meylemans HA**. 2014. 1-Hexene: a renewable C6 platform for full-performance jet and diesel fuels. Green Chem. **16**:770–776.

He P, **Han W**, **Shao L**, **Lü F**. 2018. One-step production of C6–C8 carboxylates by mixed culture solely grown on CO. Biotechnol. Biofuels **11**:4.

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

Herrmann G, **Jayamani E**, **Mai G**, **Buckel W**. 2008. Energy conservation via electron-transferring flavoprotein in anaerobic bacteria. J. Bacteriol. **190**:784–791.

Hoffmeister S, **Gerdom M**, **Bengelsdorf FR**, **Linder S**, **Flüchter S**, **Öztürk H**, **Blümke W**, **May A**, **Fischer R-J**, **Bahl H**, **Dürre P**. 2016. Acetone production with metabolically engineered strains of *Acetobacterium woodii*. Met. Eng. **36**:37–47.

Hohn B, **Korn D**. 1969. Cosegregation of a sex factor with the *Escherichia coli* chromosome during curing by acridine orange. J. Mol. Biol. **45**:385–395.

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

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

Jennert KCB, **Tardif C**, **Young DI**, **Young M**. 2000. Gene transfer to *Clostridium cellulolyticum* ATCC 35319. Microbiology **146**:3071–3080.

Johnson M, **Zaretskaya I**, **Raytselis Y**, **Merezhuk Y**, **McGinnis S**, **Madden TL**. 2008. NCBI BLAST: a better web interface. Nucleic Acids Res. **36**:5–9.

Jones DT, **Woods DR**. 1986. Acetone-butanol fermentation revisited. Microbiol. Rev. **50**:484–524.

Keis S, **Shaheen R**, **Jones DT**. 2001. Emended descriptions of *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*, and descriptions of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* sp. nov. and *Clostridium saccharobutylicum* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **51**:2095–2103.

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

Kim S, **Jang Y-S**, **Ha S-C**, **Ahn J-W**, **Kim E-J**, **Lim JH**, **Cho C**, **Ryu YS**, **Lee SK**, **Lee SY**, **Kim K-J**. 2015. Redox-switch regulatory mechanism of thiolase from *Clostridium acetobutylicum*. Nat. Commun. **6**:8410.

Kim Y, **Worrell E**. 2002. International comparison of CO_2 emission trends in the iron and steel industry. Energy Policy **30**:827–838.

Kolek J, **Sedlar K**, **Provaznik I**, **Patakova P**. 2016. Dam and Dcm methylations prevent gene transfer into *Clostridium pasteurianum* NRRL B-598: development of methods for electrotransformation, conjugation, and sonoporation. Biotechnol. Biofuels **9**:14.

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

Kremp F, **Poehlein A**, **Daniel R**, **Müller V**. 2018. Methanol metabolism in the acetogenic bacterium *Acetobacterium woodii*. Environ. Microbiol. **20**:4369–4384.

Küsel K, **Dorsch T**, **Acker G**, **Stackebrandt E**, **Drake HL**. 2000. *Clostridium scatologenes* strain SL1 isolated as an acetogenic bacterium from acidic sediments. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **50**:537–546.

LanzaTech. 2018. World's first commercial waste gas to ethanol plant starts up. Pressemitteilung. http://www.lanzatech.com/worlds-first-commercial-waste-gas-ethanol-plant-starts/ (abgerufen April 2020)

Leang C, **Ueki T**, **Nevin KP**, **Lovley DR**. 2013. A genetic system for *Clostridium ljungdahlii*: a chassis for autotrophic production of biocommodities and a model homoacetogen. Appl. Environ. Microbiol. **79**:1102–1109.

Lerman LS. 1963. The structure of the DNA-acridine complex. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **49**:94–102.

Levy PF, **Sanderson JE**, **Kispert RG**, **Wise DL**. 1981. Biorefining of biomass to liquid fuels and organic chemicals. Enzyme Microb. Technol. **3**:207–215.

Liew F, **Martin ME**, **Tappel RC**, **Heijstra BD**, **Mihalcea C**, **Köpke M**. 2016. Gas fermentation – A flexible platform for commercial scale production of low-carbon-fuels and chemicals from waste and renewable feedstocks. Front. Microbiol. **7**:694.

Lin B, **Long H**. 2016. Emissions reduction in China's chemical industry – based on LMDI. Renewable Sustainable Energy Rev. **53**:1348–1355.

Lin B, **Xie C**. 2014. Reduction potential of CO_2 emissions in China's transport industry. Renewable Sustainable Energy Rev. **33**:689–700.

Lin L, **Song H**, **Ji Y**, **He Z**, **Pu Y**, **Zhou J**, **Xu J**. 2010. Ultrasound-mediated DNA transformation in thermophilic Gram-positive anaerobes. PLoS One **5**.

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

Liu Y, **He P**, **Shao L**, **Zhang H**, **Lü F**. 2017. Significant enhancement by biochar of caproate production via chain elongation. Water Res. **119**:150–159.

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

Markowitz VM, **Chen I-MA**, **Palaniappan K**, **Chu K**, **Szeto E**, **Pillay M**, **Ratner A**, **Huang J**, **Woyke T**, **Huntemann M**, **Anderson I**, **Billis K**, **Varghese N**, **Mavromatis K**, **Pati A**, **Ivanova NN**, **Kyrpides NC**. 2014. IMG 4 version of the integrated microbial genomes comparative analysis system. Nucleic Acids Res. **42**:D560–D567.

Marounek M, **Fliegrova K**, **Bartos S**. 1989. Metabolism and some characteristics of ruminal strains of *Megasphaera elsdenii*. Appl. Environ. Microbiol. **55**:1570–1573.

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

McGlade C, **Ekins P**. 2015. The geographical distribution of fossil fuels unused when limiting global warming to 2 °C. Nature **517**:187–190.

Melby TE, **Ciampaglio CN**, **Briscoe G**, **Erickson HP**. 1998. The symmetrical structure of structural maintenance of chromosomes (SMC) and MukB proteins: long, antiparallel coiled coils, folded at a flexible hinge. J. Cell Biol. **142**:1595–1604.

Molitor B, **Kirchner K**, **Henrich AW**, **Schmitz S**, **Rosenbaum MA**. 2016a. Expanding the molecular toolkit for the homoacetogen *Clostridium ljungdahlii*. Sci. Rep. **6**:1–10.

Molitor B, **Marcellin E**, **Angenent LT**. 2017. Overcoming the energetic limitations of syngas fermentation. Curr. Opin. Chem. Biol. **41**:84–92.

Molitor B, **Richter H**, **Martin ME**, **Jensen RO**, **Juminaga A**, **Mihalcea C**, **Angenent LT**. 2016b. Carbon recovery by fermentation of CO-rich off gases – Turning steel mills into biorefineries. Bioresour. Technol. **215**:386–396.

Mulder N, **Apweiler R**. 2007. InterPro and InterProScan. *In* Comparative Genomics (Vol. 396, pp. 59–70). Humana Press, Totowa, NJ, USA.

Munasinghe PC, **Khanal SK**. 2010. Biomass-derived syngas fermentation into biofuels: opportunities and challenges. Bioresour. Technol. **101**:5013–5022.

Nagarajan H, **Sahin M**, **Nogales J**, **Latif H**, **Lovley DR**, **Ebrahim A**, **Zengler K**. 2013. Characterizing acetogenic metabolism using a genome-scale metabolic reconstruction of *Clostridium ljungdahlii*. Microb. Cell Fact. **12**:118.

Naik SN, **Goud VV**, **Rout PK**, **Dalai AK**. 2010. Production of first and second generation biofuels: a comprehensive review. Renewable and Sustainable Energy Rev. **14**:578–597.

Nakayama S-I, **Kosaka T**, **Hirakawa H**, **Matsuura K**, **Yoshino S**, **Furukawa K**. 2008. Metabolic engineering for solvent productivity by downregulation of the hydrogenase gene cluster *hupCBA* in *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* strain N1-4. Appl. Microbiol. Biotechnol. **78**:483–493.

Nölling J, **Breton G**, **Omelchenko MV**, **Makarova KS**, **Zeng Q**, **Gibson R**, **Lee HM**, **Dubois J**, **Qiu D**, **Hitti J**, **GTC sequencing center production, finishing, and bioinformatics teams**, **Wolf YI**, **Tatusov RL**, **Sabathe F**, **Doucette-Stamm L**, **Soucaille P**, **Daly MJ**, **Bennett GN**, **Koonin EV**, **Smith DR**. 2001. Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. J. Bacteriol. **183**:4823–4838.

Olson DG, **Lynd LR**. 2012. Transformation of *Clostridium thermocellum* by electroporation. *In* Methods in Enzymology (Vol. 510, pp. 317–330). Academic Press, New York, NY, USA.

Oultram JD, **Loughlin M**, **Swinfield T-J**, **Brehm JK**, **Thompson DE**, **Minton NP**. 1988. Introduction of plasmids into whole cells of *Clostridium acetobutylicum* by electroporation. FEMS Microbiol. Lett. **56**:83–88.

Philipps G, **de Vries S**, **Jennewein S**. 2019. Development of a metabolic pathway transfer and genomic integration system for the syngas-fermenting bacterium *Clostridium ljungdahlii*. Biotechnol. Biofuels **12**:112.

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

Plass GN. 1956. The carbon dioxide theory of climatic change. Tellus **8**:140–154.

Poehlein A, **Schmidt S**, **Kaster A-K**, **Goenrich M**, **Vollmers J**, **Thürmer A**, **Bertsch J**, **Schuchmann K**, **Voigt B**, **Hecker M**, **Daniel R**, **Thauer RK**, **Gottschalk G**, **Müller V**. 2012. An ancient pathway combining carbon dioxide fixation with the generation and utilization of a sodium ion gradient for ATP synthesis. PLoS One **7**.

Purdy D, **O'Keeffe TAT**, **Elmore M**, **Herbert M**, **McLeod A**, **Bokori-Brown M**, **Ostrowski A**, **Minton NP**. 2002. Conjugative transfer of clostridial shuttle vectors from *Escherichia coli* to *Clostridium difficile* through circumvention of the restriction barrier. Mol. Microbiol. **46**:439–452.

Pyne ME, **Bruder M**, **Moo-Young M**, **Chung DA**, **Perry Chou C**. 2014. Technical guide for genetic advancement of underdeveloped and intractable *Clostridium*. Biotechnol. Adv. **32**:623–641.

Pyne ME, **Moo-Young M**, **Chung DA**, **Perry Chou C**. 2013. Development of an electrotransformation protocol for genetic manipulation of *Clostridium pasteurianum*. Biotechnol. Biofuels **6**:50.

Ragsdale SW, **Ljungdahl LG**, **DerVartanian DV**. 1983. Isolation of carbon monoxide dehydrogenase from *Acetobacterium woodii* and comparison of its properties with those of the *Clostridium thermoaceticum* enzyme. J. Bacteriol. **155**:1224–1237.

Ramió-Pujol S, **Ganigué R**, **Bañeras L**, **Colprim J**. 2015. Incubation at 25 °C prevents acid crash and enhances alcohol production in *Clostridium carboxidivorans* P7. Bioresour. Technol. **192**:296–303.

Ransom EM, **Ellermeier CD**, **Weiss DS**. 2015. Use of mCherry red fluorescent protein for studies of protein localization and gene expression in *Clostridium difficile*. Appl. Environ. Microbiol. **81**:1652–1660.

Richter H, **Molitor B**, **Wei H**, **Chen W**, **Aristilde L**, **Angenent LT**. 2016. Ethanol production in syngas-fermenting *Clostridium ljungdahlii* is controlled by thermodynamics rather than by enzyme expression. Energy Environ. Sci. **9**:2392–2399.

Riegler P, **Chrusciel T**, **Mayer A**, **Doll K**, **Weuster-Botz D**. 2019. Reversible retrofitting of a stirred-tank bioreactor for gas-lift operation to perform synthesis gas fermentation studies. Biochem. Eng. J. **141**:89–101.

Roberts AP, **Mullany P**, **Wilson M**. 2001. Gene transfer in bacterial biofilms. *In* Doyle RJ (Ed.), Methods in Enzymology (Vol. 336, pp. 60–65) Academic Press, New York, NY, USA.

Roberts RJ, **Vincze T**, **Posfai J**, **Macelis D**. 2010. REBASE – a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes. Nucleic Acids Res. **38**:D234–D236.

Russell MJ, **Martin W**. 2004. The rocky roots of the acetyl-CoA pathway. Trends Biochem. Sci. **29**:358–363.

Šalić A, **Pindrić K**, **Zelić B**. 2013. Bioproduction of food additives hexanal and hexanoic acid in a microreactor. Appl. Biochem. Biotechnol. **171**:2273–2284.

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

Schuchmann K, **Müller V**. 2012. A bacterial electron-bifurcating hydrogenase. J. Biol. Chem. **287**:31165–31171.

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

Scott PT, **Rood JI**. 1989. Electroporation-mediated transformation of lysostaphin-treated *Clostridium perfringens*. Gene **82**:327–333.

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

Shen CR, **Lan EI**, **Dekishima Y**, **Baez A**, **Cho KM**, **Liao JC**. 2011. Driving forces enable high-titer anaerobic 1-butanol synthesis in *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. **77**:2905–2915.

Shen Y, **Brown R**, **Wen Z**. 2014a. Syngas fermentation of *Clostridium carboxidivoran* P7 in a hollow fiber membrane biofilm reactor: evaluating the mass transfer coefficient and ethanol production performance. Biochem. Eng. J. **85**:21–29.

Shen Y, **Brown R**, **Wen Z**. 2014b. Enhancing mass transfer and ethanol production in syngas fermentation of Clostridium carboxidivorans P7 through a monolithic biofilm reactor. Applied Energy **136**:68–76.

Shen Y, **Brown RC**, **Wen Z**. 2017. Syngas fermentation by *Clostridium carboxidivorans* P7 in a horizontal rotating packed bed biofilm reactor with enhanced ethanol production. Appl. Energy **187**:585–594.

Sheng Y, **Mancino V**, **Birren B**. 1995. Transformation of *Escherichia coli* with large DNA molecules by electroporation. Nucleic Acids Res. **23**:1990–1996.

Slater S, **Houmiel KL**, **Tran M**, **Mitsky TA**, **Taylor NB**, **Padgette SR**, **Gruys KJ**. 1998. Multiple β-ketothiolases mediate poly(β-hydroxyalkanoate) copolymer synthesis in *Ralstonia eutropha*. J. Bacteriol. **180**:1979–1987.

Sola-Penna M. 2008. Metabolic regulation by lactate. IUBMB Life **60**:605–608.

Solaymani S. 2019. CO_2 emissions patterns in 7 top carbon emitter economies: the case of transport sector. Energy **168**:989–1001.

Spirito CM, **Richter H**, **Rabaey K**, **Stams AJM**, **Angenent LT**. 2014. Chain elongation in anaerobic reactor microbiomes to recover resources from waste. Curr. Opin. Biotechnol. **27**:115–122.

Standfest T. 2013. Optimierung und alternative Substrate in der ABE-Fermentation mit *Clostridium acetobutylicum*. Dissertation, Universität Ulm, Deutschland.

Steffen W, **Rockström J**, **Richardson K**, **Lenton TM**, **Folke C**, **Liverman D**, **Summerhayes CP**, **Barnosky AD**, **Cornell SE**, **Crucifix M**, **Donges JF**, **Fetzer I**, **Lade SJ**, **Scheffer M**, **Winkelmann R**, **Schellnhuber HJ**. 2018. Trajectories of the earth system in the anthropocene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **115**:8252–8259.

Steinbusch KJJ, **Hamelers HVM**, **Plugge CM**, **Buisman CJN**. 2011. Biological formation of caproate and caprylate from acetate : fuel and chemical production from low grade biomass. Energy Environ. Sci. **4**:216–224.

Stott P. 2016. How climate change affects extreme weather events. Science **352**:1517–1518.

Sullivan MJ, Petty NK, Beatson SA. 2011. Easyfig: a genome comparison visualizer. Bioinformatics **27**:1009–1010.

Sun Q-Y, **Ding L-W**, **He L-L**, **Sun Y-B**, **Shao J-L**, **Luo M**, **Xu Z-F**. 2009. Culture of *Escherichia coli* in SOC medium improves the cloning efficiency of toxic protein genes. Anal. Biochem. **394**:144–146.

Sundar TS, **Sathish A**, **Nithya K**. 2019. Investigation of the blue-green algae based bio diesel using n-hexane and n-hexanol solvents: diesel engine emission parameter and characterization studies. IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng. **577**:012009.

Suzuki H. 2012. Host-mimicking strategies in DNA methylation for improved bacterial transformation. *In* Methylation - from DNA, RNA and histones to diseases and treatment. INTECH Open.

Szostková M, **Horáková D**. 1998. The effect of plasmid DNA sizes and other factors on electrotransformation of *Escherichia coli* JM109. Bioelectrochem. and Bioenerg. **47**:319–323.

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

Thang VH, **Kanda K**, **Kobayashi G**. 2010. Production of acetone–butanol–ethanol (ABE) in direct fermentation of cassava by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4. Appl. Biochem. Biotechnol. **161**:157–170.

Tremblay P-L, **Zhang T**, **Dar SA**, **Leang C**, **Lovley DR**. 2013. The Rnf complex of *Clostridium ljungdahlii* is a proton-translocating ferredoxin:NAD^+ oxidoreductase essential for autotrophic growth. mBio **4**.

Trevors JT. 1986. Plasmid curing in bacteria. FEMS Microbiol. Rev. **32**:149–157.

Tschaplinski TJ, **Charania P**, **Engle NL**, **Giannone RJ**, **Hettich RL**, **Klingeman D**, **Poudel S**, **Yang ZK**, **Simpson SD**, **Abdalla T**, **Brown SD**, **Canter C**, **Conrado R**, **Daniell J**, **Dassanayake A**, **Gao A**, **Jensen RO**, **Köpke M**, **Leang C**, **Liew F (Eric)**, **Nagaraju S**,

Nogle R, **Tappel RC**, **Tran L, LanzaTech Inc**. 2019. Development of a sustainable green chemistry platform for production of acetone and downstream drop-in fuel and commodity products directly from biomass syngas via a novel energy conserving route in engineered acetogenic bacteria. Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, TN, USA.

Tschech A, **Pfennig N**. 1984. Growth yield increase linked to caffeate reduction in *Acetobacterium woodii*. Arch. Microbiol. **137**:163–167.

Ukpong M. 2014. Enhancing alcohol production in *Clostridium carboxidivorans* strain P7^{T} and the role of tandem *adh* genes. Dissertation, University of Oklahoma, OKLA, USA.

Ukpong MN, **Atiyeh HK**, **De Lorme MJM**, **Liu K**, **Zhu X**, **Tanner RS**, **Wilkins MR**, **Stevenson BS**. 2012. Physiological response of *Clostridium carboxidivorans* during conversion of synthesis gas to solvents in a gas-fed bioreactor. Biotechnol. Bioeng. **109**:2720–2728.

Walkinshaw MD, **Taylor P**, **Sturrock SS**, **Atanasiu C**, **Berge T**, **Henderson RM**, **Edwardson JM**, **Dryden DTF**. 2002. Structure of Ocr from bacteriophage T7, a protein that mimics B-form DNA. Mol. Cell **9**:187–194.

Wang S, **Huang H**, **Moll J**, **Thauer RK**. 2010. $NADP^+$ reduction with reduced ferredoxin and $NADP^+$ reduction with NADH are coupled via an electron-bifurcating enzyme complex in *Clostridium kluyveri*. J. Bacteriol. **192**:5115–5123.

Waterson RM, **Castellino FJ**, **Hass GM**, **Hill RL**. 1972. Purification and characterization of crotonase from *Clostridium acetobutylicum*. J. Biol. Chem. **247**:5266–5271.

Weghoff MC, **Bertsch J**, **Müller V**. 2015. A novel mode of lactate metabolism in strictly anaerobic bacteria. Environ. Microbiol. **17**:670–677.

Weitz S. 2020. Konstruktion und Analyse isobutanolbildender autotropher acetogener Bakterien. Dissertation, Universität Ulm, Deutschland.

Whitehead PR, **Brown NL**. 1985. A simple and rapid method for screening bacteria for type II restriction endonucleases: enzymes in *Aphanothece halophytica*. Arch. Microbiol. **141**:70–74.

Wiesenborn DP, **Rudolph FB**, **Papoutsakis ET**. 1988. Thiolase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and its role in the synthesis of acids and solvents. Appl. Environ. Microbiol. **54**:2717–2722.

Williams DR, **Young DI**, **Young M**. 1990. Conjugative plasmid transfer from *Escherichia coli* to *Clostridium acetobutylicum*. J. Gen. Microbiol. **136**:819–826.

Wirth S, Dürre P. 2021. Investigation of putative genes for the production of medium-chained acids and alcohols in autotrophic acetogenic bacteria. Metab. Eng. **66:**296-307.

Wolfson JS, **Hooper DC**, **Swartz MN**, **McHugh GL**. 1982. Antagonism of the B subunit of DNA gyrase eliminates plasmids pBR322 and pMG110 from *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **152**:338–344.

Wolin EA, **Wolin MJ**, **Wolfe RS**. 1963. Formation of methane by bacterial extracts. J. Biol. Chem. **238**:2882–2886.

Wood HG. 1991. Life with CO or CO_2 and H_2 as a source of carbon and energy. FASEB J. **5**:156–163.

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

Zakkour P, **Cook G**. 2010. CCS Roadmap for industry: high-purity CO_2 sources. Final draft report. Carbon Counts Company (UK) Ltd.

Zhang J, **Taylor S**, **Wang Y**. 2016. Effects of end products on fermentation profiles in *Clostridium carboxidivorans* P7 for syngas fermentation. Bioresour. Technol. **218**:1055–1063.

Zhang K, **Sawaya MR**, **Eisenberg DS**, **Liao JC**. 2008. Expanding metabolism for biosynthesis of nonnatural alcohols. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **105**:20653–20658.

Zhou Y, **Johnson EA**. 1993. Genetic transformation of *Clostridium botulinum* hall a by electroporation. Biotechnol. Lett. **15**:121–126.

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

Zhu Y, **Liu X**, **Yang S-T**. 2005. Construction and characterization of *pta* gene-deleted mutant of *Clostridium tyrobutyricum* for enhanced butyric acid fermentation. Biotechnol. Bioeng. **90**:154–166.

Beitrag zu dieser Arbeit

Die Arbeiten, die zu den erbrachten Ergebnissen geführt haben, wurden innerhalb des Forschungsvorhabens „Gase als neue Kohlenstoffquelle für biotechnologische Fermentationen“ (kurz: Gas-Fermentation) durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung finanziert (Förderungskennzeichen: 031A468A).



Danksagung

Die Danksagung wurde aus Datenschutzgründen entfernt.

Die Danksagung wurde aus Datenschutzgründen entfernt.

Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Datenschutzgründen entfernt.

Der Lebenslauf wurde aus Datenschutzgründen entfernt.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, sowie Zitate kenntlich gemacht habe. Alle existierenden Kopien dieser Arbeit sind, bezogen auf ihre Form und Inhalt, identisch.