

**Metabolic Engineering von
Clostridium acetobutylicum zur Produktion von
1,4-Butandiol**

Dissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von
Markus Klipp

Rostock, 23.03.2016

Gutachter: **Prof. Dr. Hubert Bahl**
Universität Rostock,
Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät,
Institut für Biowissenschaften, Abteilung Mikrobiologie

Prof. Dr. Bernd Kreikemeyer
Universitätsmedizin Rostock,
Medizinische Fakultät,
Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene

Datum der Einreichung: 23. März 2016

Datum der Verteidigung: 24. Juni 2016

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis.....	X
Tabellenverzeichnis	XIII
1. Einleitung.....	1
1.1 Zielstellung.....	1
1.2 1,4-Butandiol	2
1.3 <i>Clostridium acetobutylicum</i>	4
1.4 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase/Vinylacetyl-CoA- Δ -Isomerase	6
2. Material und Methoden.....	10
2.1 Organismen und Plasmide.....	10
2.2 Oligonukleotide	15
2.3 Nährmedien	16
2.3.1 Nährmedium für <i>E. coli</i>	16
2.3.2 Medien für <i>C. acetobutylicum</i>	16
2.3.3 Medienzusätze	19
2.4 Stammhaltung	20
2.5 Zellanzucht.....	20
2.5.1 Zellanzucht von <i>E. coli</i>	20
2.5.2 Zellanzucht von <i>C. acetobutylicum</i>	20
2.5.2.1 Zellanzucht von <i>C. acetobutylicum</i> auf Festmedium	21
2.5.2.2 Zellanzucht von <i>C. acetobutylicum</i> in statischer Kultur.....	21
2.5.2.3 pH-kontrollierte Batch-Fermentation.....	21
2.6 Bestimmung physiologischer Parameter.....	22
2.6.1 Optische Dichte.....	22
2.6.2 Bestimmung der Wachstumsrate und Verdopplungszeit	22
2.6.3 Bestimmung des externen pH-Wertes	23
2.6.4 Optisch-enzymatische Glukosebestimmung	23
2.6.5 Optisch-enzymatische Laktatbestimmung	24
2.6.6 Gaschromatografie	25

2.6.6.1 Gaschromatografische Analyse der Gärungsprodukte von <i>C. acetobutylicum</i>	25
2.6.6.2 Gaschromatografische Analyse von 1,4-Butandiol und γ-Hydroxybutyrat	26
2.7 Visualisierung von 1,4-Butandiol	27
2.8 Arbeiten mit Nukleinsäuren	28
2.8.1 Isolierung von Nukleinsäuren	28
2.8.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	28
2.8.1.2 Isolierung chromosomaler DNA aus Clostridien.....	29
2.8.2 PCR-Techniken	31
2.8.2.1 Oligonukleotid-Design.....	31
2.8.2.2 Standard-PCR	32
2.8.2.3 „Colony“-PCR	32
2.8.3 Enzymatische Modifikation von DNA	32
2.8.3.1 Restriktion von DNA.....	32
2.8.3.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	33
2.8.3.3 Ligation von DNA-Fragmenten.....	33
2.8.3.4 <i>in vivo</i> Methylierung von Plasmid-DNA	34
2.8.4 Agarosegelektrophorese.....	34
2.8.5 Reinigung von Nukleinsäuren	35
2.8.5.1 Extraktion von DNA aus Agarosegelen	35
2.8.5.2 Kit-basierte DNA-Aufreinigung	35
2.9 Erzeugung rekombinanter Organismen	35
2.9.1 DNA-Transfer in <i>E. coli</i>	35
2.9.1.1 CaCl ₂ -vermittelte Transformation in <i>E. coli</i>	35
2.9.1.2 Transformation von <i>E. coli</i> durch Elektroporation	36
2.9.2 DNA-Transfer in <i>C. acetobutylicum</i>	36
2.9.2.1 Transformation von <i>C. acetobutylicum</i> durch Elektroporation.....	36
2.10 Arbeiten mit Proteinen	37
2.10.1 Zellaufschluss von <i>C. acetobutylicum</i> mittels Ultraschall	37
2.10.2 Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatografie	38
2.10.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen (Bradford, 1976)	39

2.10.4 Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	39
2.10.5 Kolloidale Coomassie-Färbung	41
2.10.6 Transfer von Proteinen auf Membranen (Western Blot)	41
2.10.7 Detektion von <i>Strep-tag II</i> Fusionsproteinen.....	42
2.11 Bezugsquellen.....	43
3. Ergebnisse.....	46
3.1 1,4-Butandioltoleranz von <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824.....	46
3.2 Nachweismethoden für 1,4-Butanol	49
3.2.1 Dünnschichtchromatografie-basierte Nachweismethode	49
3.2.2 GC/MS-basierte Nachweismethode	50
3.3 Generierung von rekombinanten <i>C. acetobutylicum</i> -Stämmen zur Produktion von 1,4-Butanol	52
3.4 Wachstumsphysiologische Charakterisierung von generierten 1,4-BDO-Produktions- stämmen	56
3.4.1 Wachstumsverlauf und Gärungsprodukte.....	57
3.4.2 1,4-Butanolproduktion	61
3.4.3 Zeitlicher Verlauf der 1,4-BDO-Produktion.....	63
3.5 Optimierungsstrategien.....	65
3.5.1 pH-regulierte Batch-Fermentation von <i>C. acetobutylicum</i> pTc::P(<i>thlA</i>) <i>cbei_2100</i>	65
3.5.2 Verwendung verschiedener Kohlenhydratquellen.....	67
3.5.3 Modifikation der 4HBD-Expression durch Verwendung unterschiedlicher Promotoren.....	70
3.5.3.1 Vektorgenerierung.....	71
3.5.3.2 1,4-BDO-Produktion rekombinanter <i>C. acetobutylicum</i> -Stämme.....	73
3.5.4 Stoffwechseldefektmutanten von <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824.....	75
3.5.4.1 <i>C. acetobutylicum</i> -Mutanten mit Defekten in der Säurebildung	75
3.5.4.2. <i>C. acetobutylicum</i> -Mutanten mit Defekten in der Lösungsmittelbildung	77
4. Diskussion	80
4.1 1,4-Butandioltoleranz.....	81
4.2 1,4-Butanolproduktion	82

4.2.1 Limitierung durch die 4HBD	83
4.2.2 Limitierung durch die Aldehyd-/Alkoholdehydrogenase (AdhE).....	84
4.2.3 Codon Usage	85
4.3 GHB-Produktion.....	86
4.4 1,4-BDO-Produktion unter Verwendung verschiedener Kohlenhydratquellen.....	88
4.4.1 Pentosen	88
4.4.1.1 Xylose.....	88
4.4.1.2 Arabinose	90
4.4.2 Hexosen	91
4.4.2.1 Galaktose	91
4.4.2.2 Mannose	91
4.4.3 Kohlenhydratgemisch	92
4.5 <i>C. acetobutylicum</i> pT::P(<i>ptb</i>) <i>ckl_3020</i>	94
4.6 Stoffwechseldefektmutanten.....	95
4.6.1 Defekte in der Lösungsmittelproduktion.....	95
4.6.2 Defekte in der Säureproduktion	97
4.7 Fazit.....	98
5. Zusammenfassung.....	100
6. Literaturverzeichnis.....	101
7. Anhang.....	113
Danksagung.....	126
Selbstständigkeitserklärung	128

Abkürzungsverzeichnis

α	alpha
A	Adenin, Ampere
A.	Aqua
ABC	“ATP binding cassette”
AbfD	4HBD aus <i>Clostridium aminobutyricum</i>
<i>abfD</i>	<i>4hbd</i> -Gen aus <i>Clostridium aminobutyricum</i>
<i>ad</i>	auffüllen auf
<i>adc</i>	Acetoacetadecarboxylase-Gen
<i>adhE</i>	Aldehyd-Alkoholdehydrogenase-Gen
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
ATCC	„American Type Culture Collection“
ATP	Adenosintriphosphat
β	beta
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat
BDH	Butanol-Dehydrogenase
BDO	Butandiol
Bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
Buk	Butyratkinase
BYDH	Butyraldehyd-Dehydrogenase
γ	gamma
c	Konzentration, centi (10^{-2})
C	Kohlenstoff, Cytosin
C-	Carboxy-
C.	<i>Clostridium</i>
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
ca.	zirka

Cbei_2100	4HBD aus <i>Clostridium beijerinckii</i>
<i>cbei_2100</i>	<i>4hbd</i> -Gen aus <i>Clostridium beijerinckii</i>
CCR	„carbon catabolite repression“
CGM	„Clostridial Growth Medium“
Ckl_3020	4HBD aus <i>Clostridium kluyveri</i>
<i>ckl_3020</i>	<i>4hbd</i> -Gen aus <i>Clostridium kluyveri</i>
Cm	Chloramphenicol
CoA	Coenzym A
<i>ctfA</i>	Acetoacetyl-CoA:Acyl-CoA-Transferase-Gen
d	desoxy
D	„dextro“ (rechts)
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatografie
<i>dest.</i>	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5-triphosphat
E	Extinktion
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
Ery	Erythromycin
<i>et al.</i>	„et alteri“ (lat., und andere)
FAD	Flavinadenindinukleotid
FID	Flammenionisationsdetektor
Form.	Formel
fw	forward
g	Gramm, Erdbeschleunigung
G	Guanin
GC	Gaschromatograph(ie)
GHB	γ-Hydroxybutyrat
h	Stunde
HBD	4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase/Vinylacetyl-CoA-Δ-Isomerase

<i>hbd</i>	4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase/Vinylacetyl-CoA- Δ -Isomerase-Gen
IS	interner Standard
k	kilo (10^3)
K	Kontrolle
konz.	konzentriert
l	Liter, Länge
L	„levo“ (links)
LB	Luria-Bertani
<i>ldh</i>	Laktatdehydrogenase-Gen
LDH	Laktatdehydrogenase
In	natürlicher Logarithmus
log	dekadischer Logarithmus
Lsg.	Lösung
LW	Leloir-Weg
μ	Mikro (10^{-6})
m	Meter, milli (10^{-3}), „messenger“
M	Molar, Marker
MBDSTFA	N-Methyl-N-tert-butyldimethylsilyl-tifluoracetamid
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minute
MMfvK	Minimalmedium für Vorkulturen
mod.	modifiziert
MS	„medium-synthetique“
MW	Molekulargewicht
n	Nano (10^{-9}), Anzahl der Versuche
N	Stickstoff, Normal
N-	Amino-
NAD(P) ⁺	Nicotinamidadenindinucleotid-(phosphat), oxidiert
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinucleotid-(phosphat), reduziert
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid

NCBI	„National Center for Biotechnology Information“
NCIMB	„National Collection of Industrial, Marine and Food Bacteria“
NEB	„New England Biolabs“
Nr.	Nummer
nt	Nukleotid(e)
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
P	Promotor, Phosphat
PABA	Para-aminobenzoësäure
PAGE	Polyacrylamidgelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDO	Propandiol
pH	negativer Logarithmus der Protonenkonzentration
pI	isoelektrischer Punkt
PKW	Phosphoketolaseweg
PPW	Pentosephosphatweg
<i>pta</i>	Phosphotransacetylase-Gen
<i>ptb</i>	Phosphotransbutyrylase-Gen
PTS	Phosphoenolpyruvat-Transferasesystem
R	Resistenz
RCA	„Reinforced Clostridial Agar“
rev	reverse
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIM	„Selected Ion Mode“
t	Zeit
T	Thymin

T6PW	Tagatose-6-Phosphatweg
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tc	Tetracyclin
<i>thIA</i>	Thiolase A-Gen
Tm	Thiamphenicol
T _m	Schmelztemperatur
U	Units
UE	Untereinheit
ü. N.	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
VF	Verdünnungsfaktor
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
WT	Wildtyp
w/v	Masse pro Volumen

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Strukturformel von 1,4-Butandiol	2
Abb. 1.2: Produktderivatkette von 1,4-Butandiol	3
Abb. 1.3: Biphasischer Gärungsstoffwechsel von <i>C. acetobutylicum</i>	5
Abb. 1.4: Reaktionen der 4HBD	6
Abb. 1.5: Vorausgesagter Reaktionsmechanismus der 4HBD	7
Abb. 1.6: Strukturelle Darstellung der 4HBD aus <i>C. aminobutyricum</i>	9
Abb. 3.1: Wachstum von <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 in Anwesenheit von unterschiedlichen 1,4-BDO-Konzentrationen.....	47
Abb. 3.2: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von <i>C. acetobutylicum</i> bei verschiedenen 1,4-BDO-Konzentrationen	48
Abb. 3.3: Dünnschichtchromatogramm von 1,4-BDO.....	49
Abb. 3.4: Schematische Darstellung von 1,4-BDO und GHB nach Silylierungsreaktion mit MBDSTFA.....	51
Abb. 3.5: SIM-Chromatogramm von 1,4-BDO und GHB.....	51
Abb. 3.6: Erzeugung der 4HBD-kodierenden Gene <i>cbei_2100</i> , <i>ckl_3020</i> und <i>abfD</i>	52
Abb. 3.7: Vektorkarten.....	53
Abb. 3.8: Kontrollrestriktion der Plasmide pTc::P(<i>thlA</i>) <i>cbei_2100</i> , pTc::P(<i>thlA</i>) <i>ckl_3020</i> und pTc::P(<i>thlA</i>) <i>abfD</i>	55
Abb. 3.9: Verifizierung von rekombinanten <i>C. acetobutylicum</i> -Klonen.....	56
Abb. 3.10: Kultivierungsexperimente von <i>C. acetobutylicum</i> pTc::P(<i>thlA</i>) <i>cbei_2100</i> , <i>C. acetobutylicum</i> pTc::P(<i>thlA</i>) <i>ckl_3020</i> und <i>C. acetobutylicum</i> pTc::P(<i>thlA</i>) <i>abfD</i> vergleichend zum <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 Typstamm und <i>C. acetobutylicum</i> Kontrollvektorstamm	57

Abb. 3.11: Gärungsprodukte der Kultivierungsexperimente <i>C. acetobutylicum</i> pTc::P(<i>thlA</i>) <i>cbei_2100</i> , <i>C. acetobutylicum</i> pTc::P(<i>thlA</i>) <i>ckl_3020</i> und <i>C. acetobutylicum</i> pTc::P(<i>thlA</i>) <i>abfD</i> vergleichend zum <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 Wildtypstamm und <i>C. acetobutylicum</i> pTc-Kontrollvektorstamm	59
Abb. 3.12: 1,4-BDO- und GHB-Produktion der Expressionsstämme nach 120 h Kultivierung in 200 ml MS-MES.....	62
Abb. 3.13: Zeitlicher Verlauf der 1,4-BDO- und GHB-Produktion.	64
Abb. 3.14: Kultivierungsexperiment von <i>C. acetobutylicum</i> pTc::P(<i>thlA</i>) <i>cbei_2100</i> in 1,5 l Kulturvolumen.....	66
Abb. 3.15: 1,4-BDO- und GHB-Produktion von <i>C. acetobutylicum</i> pTc::P(<i>thlA</i>) <i>cbei_2100</i> in 1,5 l Kulturvolumen in Abhängigkeit verschiedener Medien.	67
Abb. 3.16: Kultivierungsexperimente von <i>C. acetobutylicum</i> pTc::P(<i>thlA</i>) <i>cbei_2100</i> auf verschiedenen C-Quellen.....	68
Abb. 3.17: 1,4-BDO- und GHB-Produktion von <i>C. acetobutylicum</i> pTc::P(<i>thlA</i>) <i>cbei_2100</i> auf verschiedenen C-Quellen.....	69
Abb. 3.18: Zeitlicher Verlauf der 1,4-BDO- und GHB-Produktion von <i>C. acetobutylicum</i> pTc::P(<i>thlA</i>) <i>cbei_2100</i>	70
Abb. 3.19: Schematische Darstellung der Vektorherstellung mit unterschiedlichen Promotoren.....	72
Abb. 3.21: Gärungsstoffwechsel von <i>C. acetobutylicum</i>	76
Abb. 3.22: 1,4-BDO- und GHB-Produktion rekombinanter <i>C. acetobutylicum</i> -Mutanten.....	77
Abb. 3.23: Gärungsstoffwechsel von <i>C. acetobutylicum</i>	78
Abb. 3.24: 1,4-BDO- und GHB-Produktion rekombinanter <i>C. acetobutylicum</i> -Mutanten.....	79
Abb. 4.1: Schematische Darstellung der potentiellen Bildungswege von 4-Hydroxybutyrat (GHB).....	87
Abb. 4.2: Schematische Darstellung der Kohlenhydratverwertung in <i>C. acetobutylicum</i>	89

Abb. 4.3: Schematische Darstellung der Lignocellulose-Zusammensetzung	93
Abb. A1: Dünnschichtchromatogramm von 1,4-BDO.....	113
Abb. A2: Dünnschichtchromatogramm von 1,4-BDO mit <i>C. acetobutylicum</i> Kulturüberstand	113
Abb. A3: Analysenfunktion für die Kalibrierung der 1,4-BDO-Messung	114
Abb. A4: Analysenfunktion für die Kalibrierung der GHB-Messung.....	114
Abb. A5: Aminosäure-Alignment der 4HBDs	115
Abb. A6: Vektorkarte vom pT-Vektor	116
Abb. A7: Nukleotidsequenz von <i>cbei_2100</i> nach Sequenzierung positiver Plasmide.....	116
Abb. A8: Nukleotidsequenz von <i>ckl_3020</i> nach Sequenzierung positiver Plasmide.....	117
Abb. A9: Nukleotidsequenz von <i>abfD</i> nach Sequenzierung positiver Plasmide	117
Abb. A10: Zeitlicher Verlauf der 1,4-BDO- und GHB-Produktion von <i>C. acetobutylicum</i> pTc::P(<i>thIA</i>) <i>cbei_2100</i> auf verschiedenen Kohlenstoffquellen	118
Abb. A11: Vektorkarten der generierten Vektoren zur Variation der Promotoren	120
Abb. A12: Vektorkarten pT::P(<i>ptb</i>) <i>pp2</i> , pT::P(<i>adc</i>) <i>pp2</i> und pT::P(<i>fac</i>) <i>pp2</i>	121
Abb. A13: Colony-PCR auf die 4HBD-kodierenden Gene	122
Abb. A14: SDS-PAGE aufgereinigter 4HBDs	122
Abb. A15: Western Blot der aufgetrennten Proteinproben	123
Abb. A16: Zeitlicher Verlauf der 1,4-BDO- und GHB-Produktion von <i>C. acetobutylicum</i> pT::P(<i>ptb</i>) <i>ckl_3020</i>	125

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1: Bifunktionelle 4-Hydroxybutyryl-CoA Dehydratasen/Vinylacetyl-CoA- Δ -Isomerasen (4HBDs) aus verschiedenen Clostridien-Spezies.....	8
Tab. 2.1: Organismen	10
Tab. 2.2: Vektoren.....	13
Tab. 2.3: rekombinante Plasmide	14
Tab. 2.4: Oligonukleotide.....	15
Tab. 2.5: Medienzusätze	19
Tab. 2.6: Restriktionsendonukleasen.....	33
Tab. 2.7: SDS-PAGE-Gellösungen	40
Tab. 2.8: Bezugsquellen für Chemikalien.....	43
Tab. 2.9: Bezugsquellen für Geräte und Materialien.....	44
Tab. 3.1: Wachstumsraten (μ) und Verdopplungszeiten (t_d) von <i>C. acetobutylicum</i> bei unterschiedlichen 1,4-BDO-Konzentrationen.....	47
Tab. 3.2: 1,4-BDO-Produktivitäten der Expressionsstämme.	63
Tab. A1: Kalibrierung der 1,4-BDO- und GHB-Nachweismethode.....	114
Tab. A2: Wachstumsparameter und Gärungsprodukte der 200-ml Kultivierungsexperimente	118
Tab. A3: Wachstumsparameter und Gärungsprodukte von rekombinanten <i>C. acetobutylicum</i> Stämmen.....	123
Tab. A4: Vergleich der Häufigkeiten der verwendeten Codons in <i>C. acetobutylicum</i> , Cbei_2100, Ckl_3020 und AbfD	124
Tab. A5: Gärungsprodukte transformierter <i>C. acetobutylicum</i> -Mutantenstämmen in 200 ml MS-MES nach 120 h	125

1. Einleitung

1.1 Zielstellung

Die Möglichkeit der Nutzung von fossilen Ressourcen, wie z. B. Erdöl, Kohle und Gas führten zur Entwicklung der heutigen Gesellschaft und ihres Wohlstands. Aus diesem Grund lag bis ins 20. Jahrhundert hinein der Schwerpunkt vieler Forschungen auf der Entwicklung der erdölbasierten Produktion von Chemikalien und anderen Gütern (Demirbas, 2006; Chandra *et al.*, 2012). Dies resultierte jedoch in einer Abhängigkeit der heutigen Weltwirtschaft von diesen nicht-erneuerbaren Energieträgern, sodass ca. 90 % der genutzten Energiequellen fossilen Ursprungs sind (Chandra *et al.*, 2012). Aufgrund exzessiven Gebrauchs jener Quellen kommt es durch Emission von Kohlenstoffdioxid neben Luftverschmutzungen in urbanen Ballungsgebieten vor allem zu einem Anstieg der Treibhausgase in der Erdatmosphäre (Sarkar *et al.*, 2012), welche maßgeblich mit der Erderwärmung assoziiert sind (Chandra *et al.*, 2012). Durch die zunehmende Weltbevölkerung und dem damit einhergehenden steigenden Energiebedarf wird die Situation in Hinblick auf Nachhaltigkeit und Klimawandel erheblich verschlechtert. Aus diesem Grund ist die Entwicklung von alternativen Strategien zur Nutzung und Optimierung von erneuerbaren Energiequellen unabdingbar. Ein entsprechender Ansatz beinhaltet die Erzeugung von bisher auf Erdölbasis hergestellten Grundchemikalien für die chemische Industrie aus nachwachsenden Rohstoffen. Hierzu zählt unter anderem die biotechnologische Produktion von Diolen, die als Plattformchemikalien für viele verschiedene industrielle Anwendungen eingesetzt werden (Zeng und Sabra, 2011). Zu den wichtigsten industriell genutzten Diolen gehören 1,3-Propandiol (1,3-PDO), 2,3-Butandiol (2,3-BDO) und 1,4-Butandiol (1,4-BDO). Dabei werden 1,3-PDO und 2,3-BDO bereits im industriellen Großmaßstab biotechnologisch produziert (Zeng und Sabra, 2011). Im Gegensatz zu diesen Diolen kommt 1,4-BDO in der Natur nicht vor, sondern wird ausschließlich über chemische Synthesen auf Erdölbasis erzeugt (Yim *et al.*, 2011). Daher ist es von Interesse auch diese Verbindung unabhängig von fossilen Energiequellen aus erneuerbaren Rohstoffen zu gewinnen. Vor wenigen Jahren gelang es Yim *et al.* (2011) einen 1,4-BDO-Biosyntheseweg in *Escherichia coli* zu etablieren. Hierfür waren jedoch komplexe und umfangreiche genetische Veränderungen des Wirtsorganismus notwendig. Im Gegensatz dazu beinhaltete die in dieser Arbeit verfolgte Strategie die Generierung eines

1,4-BDO-Biosyntheseweges durch eine einzige genetische Veränderung des Wirtsorganismus *Clostridium acetobutylicum*. Durch das Zusammenspiel einer heterolog exprimierten 4HBD (1.4) und einem nativen Enzym (AdhE) sollte der Stoffwechsel des Wirtsorganismus erweitert und so die 1,4-BDO-Bildung ermöglicht werden. Demnach bestand das vorrangige Ziel dieser Arbeit darin, *C. acetobutylicum* durch Bereitstellung der genetischen Voraussetzungen zu einem 1,4-BDO-Produzenten zu entwickeln. Bei erfolgreicher 1,4-BDO-Produktion sollte weiterhin durch erste Optimierungsversuche die Produktbildung verbessert und der Einfluss verschiedener Kohlenhydratquellen auf die Biosynthese untersucht werden.

1.2 1,4-Butandiol

1,4-Butandiol ist ebenso wie 2,3-Butandiol ein Isomer des Butandiols und wird aufgrund der beiden Hydroxylgruppen (OH-) der Gruppe der Diole zugeordnet (Zeng und Sabra, 2011). Die OH-Gruppen sind dabei an den Kohlenstoffatomen 1 und 4 gebunden (Abb. 1.1). 1,4-BDO ist eine farb- und geruchslose Flüssigkeit und leicht biologisch abbaubar (OECD 301C: 100 % nach 14 Tagen).

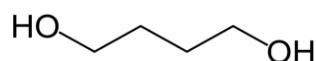


Abb. 1.1: Strukturformel von 1,4-Butandiol.

Von den vier Kohlenstoff-basierten Diolen in der Industrie wird 1,4-BDO am häufigsten im Großmaßstab verwendet (Haas *et al.*, 2005). Die jährliche chemische Produktion beträgt ca. 1,3 Mio. Tonnen pro Jahr (Yim *et al.*, 2011; Zeng und Sabra, 2011) mit einem Marktpreis von ca. 1850 €/t (van Haveren *et al.*, 2008). Analysen bescheinigen dem globalen 1,4-BDO-Markt eine jährliche Wachstumsrate von 4,8 % bis 2020 (in: 1,4-Butanediol market analysis and segment forecasts to 2020; www.hexareports.com/report/1-4-butanediol-market-analysis-and-segment-forecasts-to-2020/details, Stand: 25.02.2016). Die Produktderivatkette des 1,4-BDO umfasst vier Hauptzweige: Tetrahydrofuran (THF), γ -Butyrolactone (GBL), Polybutylenterephthalate (PTB) und Polyurethane (PUR) (Abb. 1.2). Daraus gehen wiederum jährlich 2,5 Mio. Tonnen Plastik, Polyester und Elastanfasern hervor (Yim *et al.*, 2011), die

unter anderem Anwendung in der Automobil-, Textil- und Kosmetikindustrie finden (Haas *et al.*, 2005). In Form von Funktionsbekleidung, Schuhsohlen, Schutzgehäusen für Haushaltskleingeräte und technisches Plastik für Armaturenbretter sind diese Erzeugnisse aus dem heutigen Alltag nicht mehr wegzudenken. Aufgrund dieser zahlreichen verschiedenen Anwendungsmöglichkeiten wird 1,4-BDO infolgedessen auch als eine „Top-Mehrwert“-Chemikalie bezeichnet (Yim *et al.*, 2011).

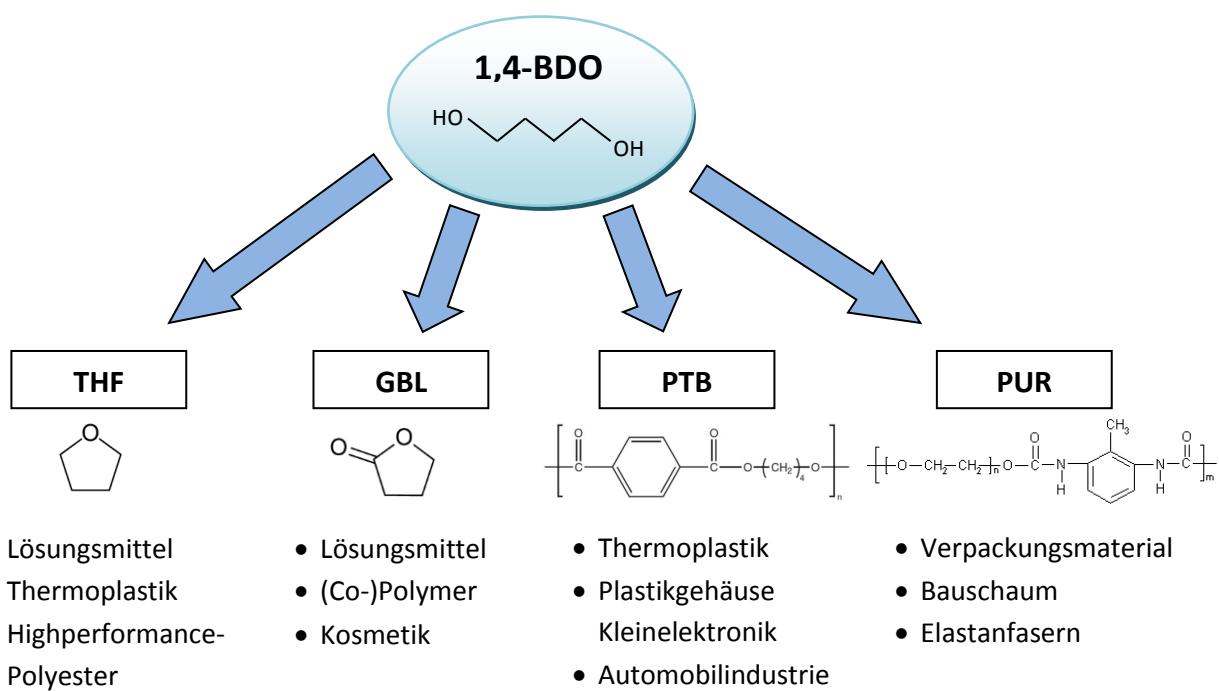


Abb. 1.2: Produktderivatkette von 1,4-Butandiol (1,4-BDO). THF, Tetrahydrofuran; GBL, γ -Butyrolacton; PTB, Polybutylenterephthalat; PUR, Polyurethan.

Die Produktion von 1,4-BDO erfolgt bisher rein synthetisch aus erdölbasierten Rohstoffen, wie Acetylen, Butan, Propylen oder Butadien (Haas *et al.*, 2005). Damit unterliegt die Produktion der wichtigen Plattformchemikalie den allgemeinen wirtschaftlichen Problemen, wie Schwankungen in den Erdölpreisen und verknappenden Erdölreserven. Um eine vom Erdöl unabhängige Produktion von 1,4-BDO zu gewährleisten, wurde für die biotechnologische Erzeugung dieser Chemikalie der Modellorganismus *C. acetobutylicum* als Wirtsstamm eingesetzt.

1.3 *Clostridium acetobutylicum*

Nach Isolierung und Erstbeschreibung durch Chaim Weizmann zwischen 1912 und 1914 wurde *C. acetobutylicum* vorwiegend für die Aceton-Butanol-Ethanol-(ABE) Fermentation eingesetzt (Jones und Woods, 1986). Vor allem während des 1. Weltkrieges erlangte die ABE-Fermentation eine enorme Bedeutung, insbesondere in Großbritannien, da Aceton für die Herstellung von Kordit, einem rauchfreien Schießpulver, benötigt wurde (Dürre, 2008). Mit der raschen Ausbreitung der Automobilindustrie in den USA nach dem Krieg wurde das als Nebenprodukt angesehene Butanol immer wichtiger. Ab den 1950er Jahren kam es jedoch aufgrund gesunkenener Rohölpreise und der Entwicklung von wirtschaftlicheren und effizienteren petrochemischen Verfahren zu einem rapiden Rückgang der industriellen ABE-Fermentation (Dürre, 2008). Gestiegene Erdölpreise in den 70er Jahren und ein zunehmendes Interesse an der Erzeugung von Biokraftstoffen führten dann zu einem erneuten Aufschwung der ABE-Fermentation (Dürre, 2008). Besonders in China wurden seitdem alte ABE-Fermentationsanlagen wieder in Stand gesetzt und neue eingerichtet, wodurch bis heute mehrere 100.000 t Butanol pro Jahr erzeugt werden (Chiao und Sun, 2007). Somit rückte *C. acetobutylicum* in den Fokus aktueller Forschungen (Lütke-Eversloh und Bahl, 2011) und entwickelte sich so zu einem Modellorganismus apathogener Clostridien (Bahl und Dürre, 1993).

Bei *C. acetobutylicum* handelt es sich um ein Gram-positives, sporenbildendes und strikt anaerobes Bakterium (Madigan *et al.*, 2013), welches in der Lage ist, eine Vielzahl an verschiedenen Kohlenhydraten, wie z. B. Arabinose, Galaktose, Glukose, Mannose und Xylose, zu verwerten (Qureshi *et al.*, 2006; Ezeji und Blaschek, 2008; Servinsky *et al.*, 2010). Mit Blick auf die Verwendung als biotechnologische Produktionsplattform ist dies ein wichtiger ökonomischer Vorteil für die Umwandlung von preisgünstigen Substraten. Denn diese Zucker sind die Hauptkomponenten von Hemicellulose, einem wesentlichen Bestandteil der Lignocellulose (Mussatto und Teixeira, 2010), einem günstigen und nachwachsenden Rohstoff, der aktuell in Form von Weizenstroh, Getreidestroh, Reisstroh und Bagasse (Sarkar *et al.*, 2012) jedes Jahr in sehr großen Mengen verfügbar ist ($10\text{-}50 \times 10^9$ Tonnen; Kuhad und Singh, 1993). Lignocellulose-Hydrolysate würden somit ein optimales Substrat für die biotechnologische Fermentation darstellen, so auch für die in dieser Arbeit angestrebte 1,4-BDO-Synthese. Die Metabolisierung der Kohlenhydratquellen

erfolgt in einem biphasischen Gärungsstoffwechsel (Abb. 1.3), welcher für *C. acetobutylicum* charakteristisch ist und in eine säure- (acidogene) und lösungsmittelbildende (solventogene) Phase gegliedert wird. Während des exponentiellen Wachstums werden die aufgenommenen Kohlenhydrate über die Glykolyse zu den Säuren Acetat und Butyrat umgesetzt, welche in das umgebende Medium abgegeben werden. Dies führt zu einem Absinken des externen pH-Wertes (Hartmanis und Gatenbeck, 1984). Durch die zunehmende Akkumulation der Säuren kommt es beim Übergang von der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase zu einer Veränderung im Genexpressionsprofil von *C. acetobutylicum* (Alsaker und Papoutsakis, 2005) und zur Einleitung des „Lösungsmittelshifts“. Infolgedessen werden Acetat und Butyrat assimiliert und in die pH-neutralen Lösungsmittel Aceton, Butanol und Ethanol im Verhältnis von 3:6:1 umgewandelt (Mitchell, 1998).

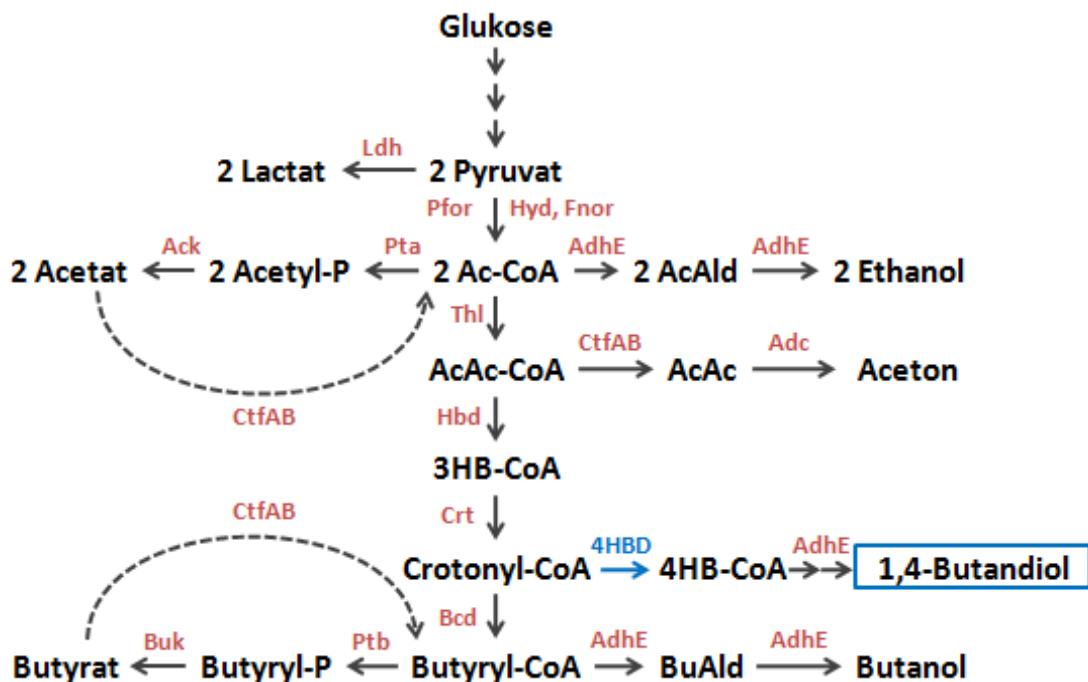


Abb. 1.3: Biphasischer Gärungsstoffwechsel von *C. acetobutylicum*. Der Abzweig des 1,4-BDO-Biosynthesewegs sowie die verantwortliche rekombinante 4HBD sind in blau, native Enzyme in rot dargestellt. Gestrichelte Linien weisen auf die Reassimilation der Säuren während der Solventogenese hin. Abkürzungen: Ldh, Lactat-Dehydrogenase; Pfor, Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase; Hyd, Hydrogenase; Fnor, Ferredoxin-NAD(P)⁺-Oxidoreduktase; Pta, Phosphotransacetylase; Ack, Acetokinase; AdhE, Aldehyd/ Alkohol-Dehydrogenase; CtfAB, Acetoacetyl-CoA:Acyl-CoA-Transferase; Adc, Acetoacetat-Decarboxylase; Thl, Thiolase; Hbd, 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase; Crt, Crotonase; 4HBD, 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase; Bcd, Butyryl-CoA-Dehydrogenase-Komplex; PtB, Phosphotransbutyrylase; Buk, Butyrylkinase; Acetyl-P, Acetylphosphat; Ac-CoA, Acetyl-CoA; AcAld, Acetaldehyd; AcAc-CoA, Acetoacetyl-CoA; AcAc, Acetoacetat; 3HB-CoA, 3-Hydroxybutyryl-CoA; 4HB-CoA, 4-Hydroxybutyryl-CoA; Butyryl-P, Butyrylphosphat; BuAld, Butyraldehyd.

Der C₄-Stoffwechsel von *C. acetobutylicum* bietet die besondere Möglichkeit durch die Einbringung einer 4HBD-Aktivität einen Weg zur 1,4-BDO-Bildung zu eröffnen (Abb. 1.3).

1.4 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase/Vinylacetyl-CoA- Δ -Isomerase

Eine weitverbreitete Reaktion in biochemischen Stoffwechselwegen ist die Dehydratation (Martins *et al.*, 2004). Derzeit sind mehr als 100 Dehydratasen (Hydrolyasen [EC 4.2.1.-]) bekannt (Martins *et al.*, 2007). Die meisten dieser Enzyme katalysieren dabei die Eliminierung von Wasser unter Ausbildung einer Doppelbindung, wobei das α -Wasserstoff an Position C2 durch die Elektronen-ziehende Wirkung der benachbarten funktionellen Gruppe (z. B. CoA-Thioestergruppe) aktiviert und dann als Proton entfernt werden kann. Daraufhin wird die Hydroxylgruppe in β -Position (C3) freigegeben (Martins *et al.*, 2007). In anaeroben Mikroorganismen gibt es jedoch die Möglichkeit durch Radikal-vermittelte Reaktionen ein Wasserstoffatom von einem nicht-aktivierten β -Kohlenstoff (C3) zu entfernen (Martins *et al.*, 2004). Die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase/Vinylacetyl-CoA- Δ -Isomerase (4HBD; EC 4.2.1.120/ EC 5.3.3.3) ist solch eine atypische Dehydratase und katalysiert sowohl die reversible, sauerstoffempfindliche Dehydrierung von 4-Hydroxybutyryl-CoA (4HB-CoA) zu Crotonyl-CoA als auch die irreversible, Sauerstoff-unempfindliche Isomerisierung von Vinylacetyl-CoA zu Crotonyl-CoA (Scherf und Buckel, 1993) (Abb. 1.4). Die Gesamtreaktion verläuft dabei trotz eines nicht-kovalent gebundenen FADs ohne Netto-Redoxveränderungen ab (Müh *et al.*, 1996), was zu der Annahme eines Radikal-basierten Reaktionsmechanismus führte (Martins *et al.*, 2004) (Abb. 1.5).

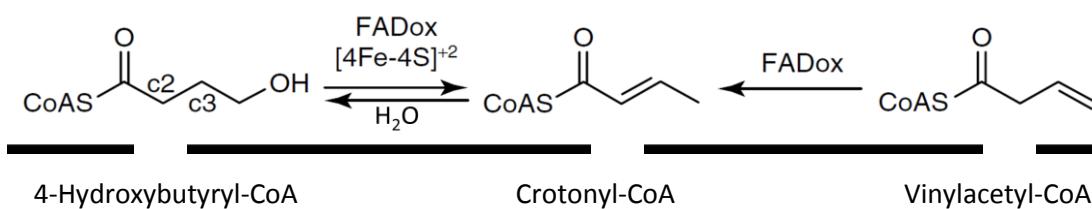


Abb. 1.4: Reaktionen der 4HBD (Martins *et al.*, 2007; mod.).

Durch Bindung von 4HB-CoA durch die 4HBD zwischen den beiden prosthetischen Gruppen (FAD und [4Fe-4S]²⁺-Cluster) wird das C2-Proton von 4HB-CoA abgespalten (Abb. 1.5) und ein Elektron von [4Fe-4S]²⁺ auf FAD übertragen. Das entstandene Flavin-Semiquinon-Anion ($\text{FAD}^{\cdot -}$) oxidiert anschließend das Enolat zum Enoxylradikal, welches infolgedessen das C3-Proton ansäuerst ($pK_a = 14$). Das Flavin-Semiquinon-Anion agiert daraufhin als Base und entfernt das Proton von der β -Position. Es entstehen das neutrale Semiquinon (FADH) und ein Ketyl-Radikal-Anion. Es folgt durch Abspaltung der Hydroxylgruppe die Bildung eines Dienoxyl-Radikals und dessen Reduktion zum Dienolat unter Regenerierung des FADs. Abschließend wird durch Protonierung das Dienolat zu Crotonyl-CoA umgewandelt.

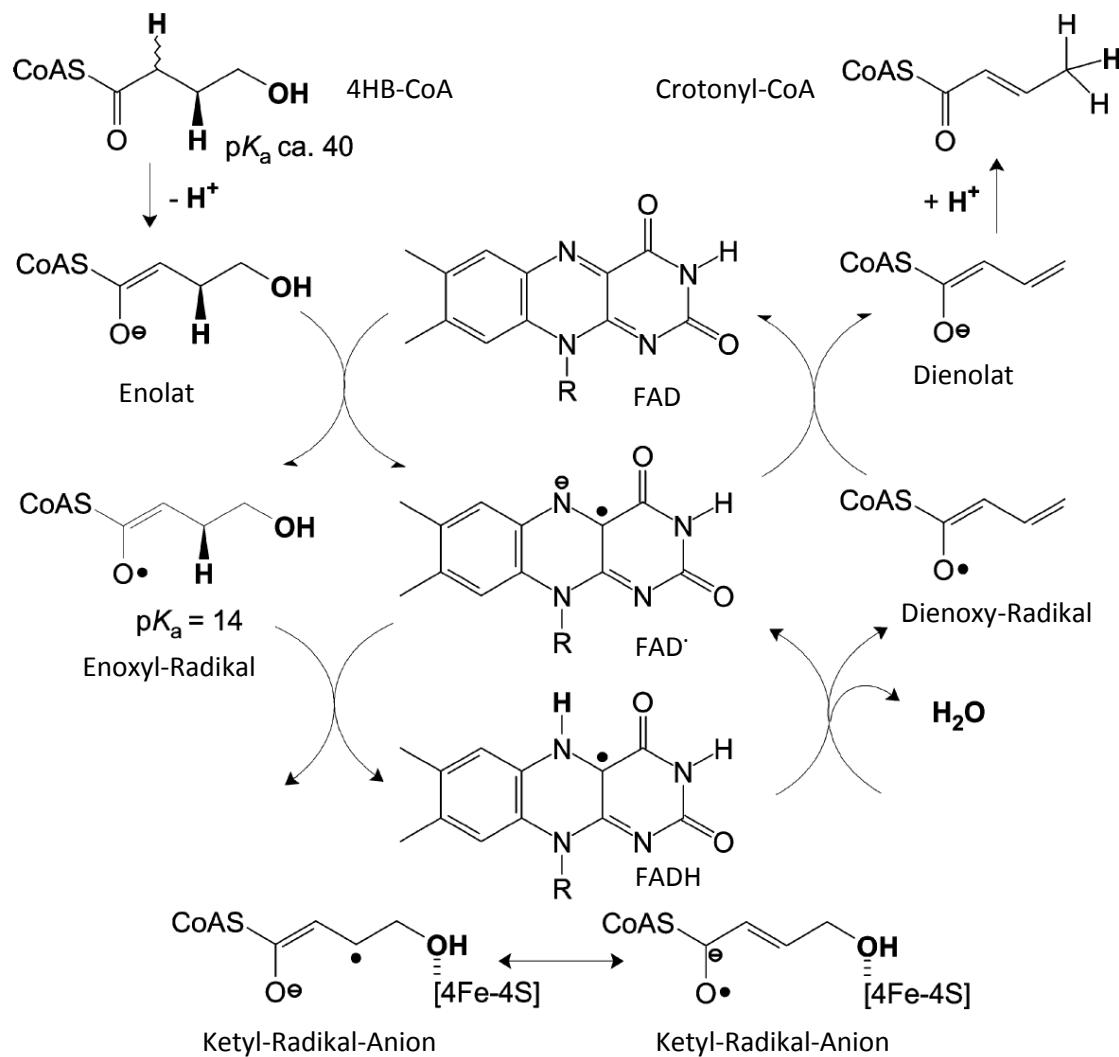


Abb. 1.5: Vorausgesagter Reaktionsmechanismus der 4HBD (Näser et al., 2005; mod.).

Die Dehydratation von 4-Hydroxyacyl-CoA-Derivaten zu Crotonyl-CoA ist zwar von anaeroben Bakterien, vorzugsweise bei Vertretern der *Fusobacteriales* und *Clostridiales* bekannt (Buckel *et al.*, 2005), *C. acetobutylicum* verfügt jedoch über keine 4HBD. Allerdings kommen 4HBD homologe Enzyme aus relativ nah verwandten Arten, wie beispielsweise *C. aminobutyricum* (*AbfD*), *C. beijerinckii* (*cbei_2100*) und *C. kluyveri* (*ckl_3020*) (Tab. 1.1), in denen sie eine wesentliche Rolle bei der Aminobutyrat- bzw. Succinat-Fermentation einnehmen, vor (Scherf und Buckel, 1993; Scherf *et al.*, 1994; Buckel, 2001). Aufgrund der Verwandtschaftsbeziehung der Donorstämme zum Wirtsorganismus galten diese Enzyme als erste Kandidaten, um eine 1,4-BDO-Synthese in *C. acetobutylicum* zu ermöglichen. Denn durch die 4HBD sollte es möglich sein, das im Stoffwechsel von *C. acetobutylicum* gebildete Crotonyl-CoA zu 4HB-CoA umzuwandeln, welches dann weiter zu 1,4-BDO umgesetzt wird (Abb. 1.3).

Tab. 1.1: Bifunktionelle 4-Hydroxybutyryl-CoA Dehydratasen/Vinylacetyl-CoA-Δ-Isomerasen (4HBDs) aus verschiedenen Clostridien-Spezies.

Organismus	ORF	annotierte Funktion	Gen [Bp]	Protein [AS]	MW [kDa] ¹	pI [pH]
<i>C. beijerinckii</i>	<i>cbei_2100</i>	Vinylacetyl-CoA-Δ-Isomerase EC [5.3.3.3]	1455	484	53,6	6,61
<i>C. kluyveri</i> ^{a)}	<i>ckl_3020</i>	4-Hydroxybutyryl-CoA Dehydratase EC [4.2.1.120]	1455	484	53,7	5,84
<i>C. aminobutyricum</i> ^{b)}	<i>abfD</i>	4-Hydroxybutyryl-CoA Dehydratase EC [4.2.1.120]	1473	490	54,4	5,78

¹ Theoretisch ermitteltes Molekulargewicht über die AS-Sequenz (http://web.expasy.org/compute_pi/).

Legende: ORF, offener Leserahmen; Bp, Anzahl der Basenpaare; AS, Anzahl der Aminosäuren; MW, Molekulargewicht der Proteine; kDa, Kilodalton; pI, isoelektrischer Punkt. ^{a)} Scherf *et al.*, 1994, ^{b)} Scherf und Buckel, 1993.

Die katalytisch aktive Form der 4HBD ist eine homotetramere Struktur mit einem Gesamt molekulargewicht von 232 kDa, welche sich aus vier identischen Untereinheiten (MW ca. 54 kDa) zusammensetzt (Scherf und Buckel, 1993) (Abb. 1.6, A). Dabei sind beide

Dimere mit zwei aktiven Zentren pro Dimer katalytisch funktionsfähig (Martins *et al.*, 2007). Die Monomere sind jeweils aus drei Domänen aufgebaut (Abb. 1.6, B). Die N- und C-terminalen α -Helices werden durch eine β -Faltblattstruktur miteinander verbunden (Zhang, 2010). Darüber hinaus sind je Untereinheit ein [4Fe-4S] $^{2+}$ -Cluster und ein FAD in oxidiertter Form gebunden (Scherf und Buckel, 1993; Müh *et al.*, 1996). Beide prosthetischen Gruppen sind für den bereits beschriebenen Reaktionsmechanismus essentiell.

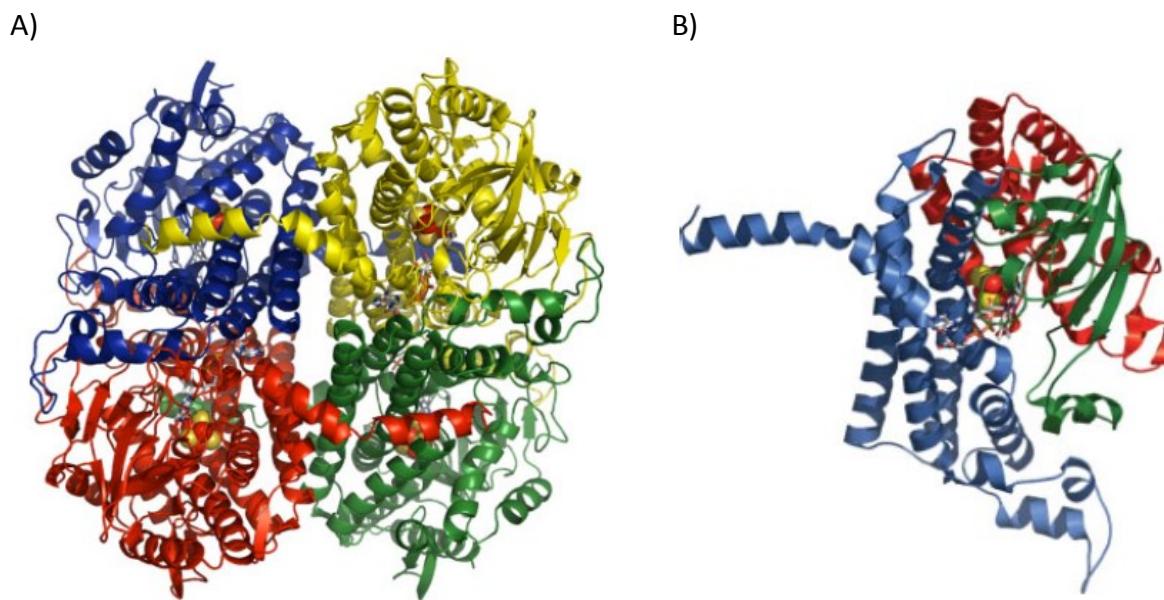


Abb. 1.6: Strukturelle Darstellung der 4HBD aus *C. aminobutyricum*. A) Homotetramere Struktur der 4HBD. Die vier Monomere sind individuell angefärbt (blau, rot, grün und gelb). B) Sekundärstruktur eines Monomers. Die N- und C-terminalen α -Helices (rot bzw. blau) sowie die β -Faltblattstruktur (grün) sind farblich hervorgehoben (Martins *et al.*, 2007).

2. Material und Methoden

2.1 Organismen und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Organismen (Tab. 2.1), Vektoren (Tab. 2.2) und rekombinannten Plasmide (Tab. 2.3) sind nachfolgend aufgeführt.

Tab. 2.1: Organismen

Organismen	Genotyp	Herkunft/ Referenz
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	Typstamm	ATCC, Laborsammlung Nr. 258
<i>C. acetobutylicum</i> pTc	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 pTc-Vektor ohne Insert, Amp ^R , Cm ^R /Tm ^R	Schulz, 2013, Laborsammlung Nr. 356
<i>C. acetobutylicum</i> pTc::P(thlA)cbei_2100	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 pTc::P(thlA)cbei_2100; C-terminaler Strep-tag II, Cm ^R /Tm ^R , Amp ^R	diese Arbeit, Laborsammlung Nr. 648
<i>C. acetobutylicum</i> pT::P(ptb)cbei_2100	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 pT::P(ptb)cbei_2100; C-terminaler Strep-tag II, Ery ^R , Amp ^R	diese Arbeit, Laborsammlung Nr. 649
<i>C. acetobutylicum</i> pT::Padc)cbei_2100	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 pT::Padc)cbei_2100; C-terminaler Strep-tag II, Ery ^R , Amp ^R	diese Arbeit, Laborsammlung Nr. 650
<i>C. acetobutylicum</i> pT::P(fac)cbei_2100	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 pT::P(fac)cbei_2100; C-terminaler Strep-tag II, Ery ^R , Amp ^R	diese Arbeit, Laborsammlung Nr. 651
<i>C. acetobutylicum</i> pTc::P(thlA)ckl_3020	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 pTc::P(thlA)ckl_3020; C-terminaler Strep-tag II, Cm ^R /Tm ^R , Amp ^R	diese Arbeit, Laborsammlung Nr. 652
<i>C. acetobutylicum</i> pT::P(ptb)ckl_3020	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 pT::P(ptb)ckl_3020; C-terminaler Strep-tag II, Ery ^R , Amp ^R	diese Arbeit, Laborsammlung Nr. 653
<i>C. acetobutylicum</i> pT::Padc)ckl_3020	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 pT::Padc)ckl_3020; C-terminaler Strep-tag II, Ery ^R , Amp ^R	diese Arbeit, Laborsammlung Nr. 654
<i>C. acetobutylicum</i> pT::P(fac)ckl_3020	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 pT::P(fac)ckl_3020; C-terminaler Strep-tag II, Ery ^R , Amp ^R	diese Arbeit, Laborsammlung Nr. 655
<i>C. acetobutylicum</i> pTc::P(thlA)abfD	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 pTc::P(thlA)abfD; C-terminaler Strep-tag II, Cm ^R /Tm ^R , Amp ^R	diese Arbeit, Laborsammlung Nr. 656

Tab. 2.1: Organismen (Fortsetzung)

Organismen	Genotyp	Herkunft/ Referenz
<i>C. acetobutylicum</i> pT::P(ptb)abfD	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 pT::P(ptb)abfD; C-terminaler Strep-tag II, Ery ^R , Amp ^R	diese Arbeit, Laborsammlung Nr. 657
<i>C. acetobutylicum</i> pT::P(adc)abfD	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 pT::P(adc)abfD; C-terminaler Strep-tag II, Ery ^R , Amp ^R	diese Arbeit, Laborsammlung Nr. 658
<i>C. acetobutylicum</i> pT::P(fac)abfD	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 pT::P(fac)abfD; C-terminaler Strep-tag II, Ery ^R , Amp ^R	diese Arbeit, Laborsammlung Nr. 659
<i>C. acetobutylicum</i> pta::int(80)	Gruppe II Intron integrierte zw. 80./81. Bp von pta, Ery ^R	Lehmann, 2012a; Laborsammlung Nr. 328
<i>C. acetobutylicum</i> pta::int(80) pTc::P(thlA)cbei_2100	Gruppe II Intron integrierte zw. 80./81. Bp von pta, Ery ^R ; pTc::P(thlA)cbei_2100; C-terminaler Strep-tag II, Cm ^R /Tm ^R , Amp ^R	diese Arbeit, Laborsammlung Nr. 660
<i>C. acetobutylicum</i> ptb::int(87)	Gruppe II Intron integrierte zw. 87./88. Bp von ptb, Ery ^R	Lehmann, 2012a; Laborsammlung Nr. 329
<i>C. acetobutylicum</i> ptb::int(87) pTc::P(thlA)cbei_2100	Gruppe II Intron integrierte zw. 87./88. Bp von ptb, Ery ^R ; pTc::P(thlA)cbei_2100; C-terminaler Strep-tag II, Cm ^R /Tm ^R , Amp ^R	diese Arbeit, Laborsammlung Nr. 661
<i>C. acetobutylicum</i> ldh1::int(93)	Gruppe II Intron integrierte zw. 93./94. Bp von ldh1, Ery ^R	Lehmann, 2012a; Laborsammlung Nr. 326
<i>C. acetobutylicum</i> ldh1::int(93) pTc::P(thlA)cbei_2100	Gruppe II Intron integrierte zw. 93./94. Bp von ldh1, Ery ^R ; pTc::P(thlA)cbei_2100; C-terminaler Strep-tag II, Cm ^R /Tm ^R , Amp ^R	diese Arbeit, Laborsammlung Nr. 662
<i>C. acetobutylicum</i> ldh2::int(231)	Gruppe II Intron integrierte zw. 231./232. Bp von ldh2, Ery ^R	Lehmann, 2012a; Laborsammlung Nr. 327
<i>C. acetobutylicum</i> ldh2::int(231) pTc::P(thlA)cbei_2100	Gruppe II Intron integrierte zw. 231./232. Bp von ldh2, Ery ^R ; pTc::P(thlA)cbei_2100; C-terminaler Strep-tag II, Cm ^R /Tm ^R , Amp ^R	diese Arbeit, Laborsammlung Nr. 663
<i>C. acetobutylicum</i> adhE1::int(158)	Gruppe II Intron integrierte zw. 158./159. Bp von adhE1, Ery ^R	Lehmann, 2012a; Laborsammlung Nr. 332
<i>C. acetobutylicum</i> adhE1::int(158) pTc::P(thlA)cbei_2100	Gruppe II Intron integrierte zw. 158./159. Bp von adhE1, Ery ^R ; pTc::P(thlA)cbei_2100; C-terminaler Strep-tag II, Cm ^R /Tm ^R , Amp ^R	diese Arbeit, Laborsammlung Nr. 664
<i>C. acetobutylicum</i> adhE2::int(114)	Gruppe II Intron integrierte zw. 114./115. Bp von adhE2, Ery ^R	Lehmann, 2012a; Laborsammlung Nr. 333

Tab. 2.1: Organismen (Fortsetzung)

Organismen	Genotyp	Herkunft/ Referenz
<i>C. acetobutylicum</i> <i>adhE2::int(114)</i>	Gruppe II Intron integrierte zw. 114./115. Bp von <i>adhE2</i> , Ery ^R ; pTc::P(<i>thlA</i>) <i>cbei_2100</i> ;	diese Arbeit, Laborsammlung
<i>pTc::P(<i>thlA</i>)<i>cbei_2100</i></i>	C-terminaler Strep-tag II, Cm ^R /Tm ^R , Amp ^R	Nr. 665
<i>C. acetobutylicum</i> <i>adc::int(180)</i>	Gruppe II Intron integrierte zw. 180./181. Bp von <i>adc</i> , Ery ^R	Lehmann, 2012a; Laborsammlung Nr. 330
<i>C. acetobutylicum</i> <i>adc::int(180)</i>	Gruppe II Intron integrierte zw. 180./181. Bp von <i>adc</i> , Ery ^R ; pTc::P(<i>thlA</i>) <i>cbei_2100</i> ;	diese Arbeit, Laborsammlung
<i>pTc::P(<i>thlA</i>)<i>cbei_2100</i></i>	C-terminaler Strep-tag II, Cm ^R /Tm ^R , Amp ^R	Nr. 666
<i>C. acetobutylicum</i> <i>ctfA::int(352)</i>	Gruppe II Intron integrierte zw. 352./353. Bp von <i>ctfA</i> , Ery ^R	Lehmann, 2012a; Laborsammlung Nr. 331
<i>C. acetobutylicum</i> <i>ctfA::int(352)</i>	Gruppe II Intron integrierte zw. 352./353. Bp von <i>ctfA</i> , Ery ^R ; pTc::P(<i>thlA</i>) <i>cbei_2100</i> ;	diese Arbeit, Laborsammlung
<i>pTc::P(<i>thlA</i>)<i>cbei_2100</i></i>	C-terminaler Strep-tag II, Cm ^R /Tm ^R , Amp ^R	Nr. 667
<i>C. beijerinckii</i> NCIMB 8052	Typstamm	NCIMB, Laborsammlung Nr. 107
<i>C. kluyveri</i>	Typstamm	Laborsammlung
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> , Δ <i>lacU169</i> , <i>hsdR17</i> , (ϕ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15), <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>	Grant et al., 1990; Laborsammlung Nr. 272
<i>E. coli</i> DH5 α <i>pTc::P(<i>thlA</i>)<i>cbei_2100</i></i>	pTc::P(<i>thlA</i>) <i>cbei_2100</i> , C-terminaler Strep-tag II, Amp ^R , Cm ^R /Tm ^R	diese Arbeit, Laborsammlung Nr. 668
<i>E. coli</i> DH5 α <i>pT::P(<i>ptb</i>)<i>cbei_2100</i></i>	pT::P(<i>ptb</i>) <i>cbei_2100</i> , C-terminaler Strep-tag II, Amp ^R , Ery ^R	diese Arbeit, Laborsammlung Nr. 669
<i>E. coli</i> DH5 α <i>pT::P(<i>adc</i>)<i>cbei_2100</i></i>	pT::P(<i>adc</i>) <i>cbei_2100</i> , C-terminaler Strep-tag II, Amp ^R , Ery ^R	diese Arbeit, Laborsammlung Nr. 670
<i>E. coli</i> DH5 α <i>pT::P(<i>fac</i>)<i>cbei_2100</i></i>	pT::P(<i>fac</i>) <i>cbei_2100</i> , C-terminaler Strep-tag II, Amp ^R , Ery ^R	diese Arbeit, Laborsammlung Nr. 671
<i>E. coli</i> DH5 α <i>pTc::P(<i>thlA</i>)<i>ckl_3020</i></i>	pTc::P(<i>thlA</i>) <i>ckl_3020</i> , C-terminaler Strep-tag II, Amp ^R , Cm ^R /Tm ^R	diese Arbeit, Laborsammlung Nr. 672
<i>E. coli</i> DH5 α <i>pT::P(<i>ptb</i>)<i>ckl_3020</i></i>	pT::P(<i>ptb</i>) <i>ckl_3020</i> , C-terminaler Strep-tag II, Amp ^R , Ery ^R	diese Arbeit, Laborsammlung Nr. 673
<i>E. coli</i> DH5 α <i>pT::P(<i>adc</i>)<i>ckl_3020</i></i>	pT::P(<i>adc</i>) <i>ckl_3020</i> , C-terminaler Strep-tag II, Amp ^R , Ery ^R	diese Arbeit, Laborsammlung Nr. 674

Tab. 2.1: Organismen (Fortsetzung)

Organismen	Genotyp	Herkunft/ Referenz
<i>E. coli</i> DH5α pT::P(fac)ckl_3020	pT::P(fac)ckl_3020, C-terminaler Strep-tag II, Amp ^R , Ery ^R	diese Arbeit, Laborsammlung Nr. 675
<i>E. coli</i> DH5α pTc::P(thlA)abfD	pTc::P(thlA)abfD, C-terminaler Strep-tag II, Amp ^R , Cm ^R /Tm ^R	diese Arbeit, Laborsammlung Nr. 676
<i>E. coli</i> DH5α pT::P(ptb)abfD	pT::P(ptb)abfD, C-terminaler Strep-tag II, Amp ^R , Ery ^R	diese Arbeit, Laborsammlung Nr. 677
<i>E. coli</i> DH5α pT::Padc)abfD	pT::Padc)abfD, C-terminaler Strep-tag II, Amp ^R , Ery ^R	diese Arbeit, Laborsammlung Nr. 678
<i>E. coli</i> DH5α pT::P(fac)abfD	pT::P(fac)abfD, C-terminaler Strep-tag II, Amp ^R , Ery ^R	diese Arbeit, Laborsammlung Nr. 679
<i>E. coli</i> DH5α pT::P(ptb)pp2	pT::P(ptb)pp2, C-terminaler Strep-tag II, Amp ^R , Ery ^R	Schulz, 2013; Laborsammlung Nr. 233
<i>E. coli</i> DH5α pT::Padc)pp2	pT::Padc)pp2, C-terminaler Strep-tag II, Amp ^R , Ery ^R	Schulz, 2013; Laborsammlung Nr. 212
<i>E. coli</i> DH5α pT::P(fac)pp2	pT::P(fac)pp2, C-terminaler Strep-tag II, Amp ^R , Ery ^R	Schulz, 2013; Laborsammlung Nr. 349
<i>E. coli</i> DH5α pASK-IBA3 ⁺ ::abfD	pASK-IBA3 ⁺ ::abfD, C-terminaler Strep-tag II, Amp ^R	diese Arbeit, Laborsammlung Nr. 680
<i>E. coli</i> ER2275	trp-31, his-1, tonA2, rpsL104, supE44, xyl-7, mtl-2, metB1, el4 ⁻ , Δ(lac)U169, endA1, recA1, R(zbg10::Tn10) Tc ^s , Δ(mcr-hsd-mrr)114::1510, [F', proAB, laql ^q ZΔ2.15zzf::mini-Tn10 (Km ^r)]	NEB, Laborsammlung Nr. 271

Tab. 2.2: Vektoren

Vektor	Relevantes Merkmal	Herkunft/ Referenz
pANII	Tc ^R , Φ3tl; p15A oriR	Heap <i>et al.</i> , 2007; Laborsammlung Nr. 271
pTc::hydA	thlA Promotor, hydA, Strep-tag II, Amp ^R , Cm ^R /Tm ^R , repL, ColE1 ori, cytoplasmatische Expression in <i>E. coli</i>	Schulz, 2013; Laborsammlung Nr. 397
pASK-IBA3 ⁺ ::abfD	ColE1 origin, F1 origin, MCS, Amp ^R , tet-Represor, cytoplasm. Express. in <i>E. coli</i>	Gerhardt <i>et al.</i> , 2000

Tab. 2.2: Vektoren (Fortsetzung)

Vektor	Relevantes Merkmal	Herkunft/ Referenz
pT::P(<i>ptb</i>) <i>pp2</i>	<i>ptb</i> Promotor, <i>pp2</i> , Amp ^R , Cm ^R /Tm ^R , repL, ColE1 ori, cytoplasmatische Expression in <i>E. coli</i>	Schulz, 2013 Laborsammlung Nr. 233
pT::P(<i>adc</i>) <i>pp2</i>	<i>adc</i> Promotor, <i>pp2</i> , Amp ^R , Cm ^R /Tm ^R , repL, ColE1 ori, cytoplasmatische Expression in <i>E. coli</i>	Schulz, 2013; Laborsammlung Nr. 212
pT::P(<i>fac</i>) <i>pp2</i>	<i>fac</i> Promotor, <i>pp2</i> , Amp ^R , Cm ^R /Tm ^R , repL, ColE1 ori, cytoplasmatische Expression in <i>E. coli</i>	Schulz, 2013; Laborsammlung Nr. 349

Tab. 2.3: rekombinante Plasmide

Plasmid	Relevantes Merkmal	Insert	Herkunft
pTc::P(<i>thlA</i>) <i>cbei_2100</i>	<i>thlA</i> -Promotor, 5' <i>Bam</i> HI, 3' <i>Cfr</i> 9I, 1455 Bp <i>cbei_2100</i> , Strep-tag II, Amp ^R , Cm ^R /Tm ^R , repL, ColE1 ori, cytoplasmatische Exp.	1455 Bp	diese Arbeit
pT::P(<i>ptb</i>) <i>cbei_2100</i>	<i>ptb</i> -Promotor, 5' <i>Bam</i> HI, 3' <i>Cfr</i> 9I, 1455 Bp <i>cbei_2100</i> , Strep-tag II, Amp ^R , Ery ^R , repL, ColE1 ori, cytoplasmatische Expression	1455 Bp	diese Arbeit
pT::P(<i>adc</i>) <i>cbei_2100</i>	<i>adc</i> -Promotor, 5' <i>Bam</i> HI, 3' <i>Cfr</i> 9I, 1455 Bp <i>cbei_2100</i> , Strep-tag II, Amp ^R , Ery ^R , repL, ColE1 ori, cytoplasmatische Expression	1455 Bp	diese Arbeit
pT::P(<i>fac</i>) <i>cbei_2100</i>	<i>fac</i> -Promotor, 5' <i>Bam</i> HI, 3' <i>Cfr</i> 9I, 1455 Bp <i>cbei_2100</i> , Strep-tag II, Amp ^R , Ery ^R , repL, ColE1 ori, cytoplasmatische Expression	1455 Bp	diese Arbeit
pTc::P(<i>thlA</i>) <i>ckl_3020</i>	<i>thlA</i> -Promotor, 5' <i>Nhe</i> I, 3' <i>Cfr</i> 9I, <i>ckl_3020</i> , Strep-tag II, Amp ^R , Cm ^R /Tm ^R , repL, ColE1 ori, cytoplasmatische Expression	1455 Bp	diese Arbeit
pT::P(<i>ptb</i>) <i>ckl_3020</i>	<i>ptb</i> -Promotor, 5' <i>Nhe</i> I, 3' <i>Cfr</i> 9I, <i>ckl_3020</i> , Strep-tag II, Amp ^R , Ery ^R , repL, ColE1 ori, cytoplasmatische Expression	1455 Bp	diese Arbeit
pT::P(<i>adc</i>) <i>ckl_3020</i>	<i>adc</i> -Promotor, 5' <i>Nhe</i> I, 3' <i>Cfr</i> 9I, <i>ckl_3020</i> , Strep-tag II, Amp ^R , Ery ^R , repL, ColE1 ori, cytoplasmatische Expression	1455 Bp	diese Arbeit
pT::P(<i>fac</i>) <i>ckl_3020</i>	<i>fac</i> -Promotor, 5' <i>Nhe</i> I, 3' <i>Cfr</i> 9I, <i>ckl_3020</i> , Strep-tag II, Amp ^R , Ery ^R , repL, ColE1 ori, cytoplasmatische Expression	1455 Bp	diese Arbeit
pTc::P(<i>thlA</i>) <i>abfD</i>	<i>thlA</i> -Promotor, 5' <i>Nhe</i> I, 3' <i>Cfr</i> 9I, <i>abfD</i> , 1473 Bp Strep-tag II, Amp ^R , Cm ^R /Tm ^R , repL, ColE1 ori, cytoplasmatische Expression	1473 Bp	diese Arbeit

Tab. 2.3: rekombinante Plasmide (Fortsetzung)

Plasmid	Relevantes Merkmal	Insert	Herkunft
pT::P(<i>ptb</i>) <i>abfD</i>	<i>ptb</i> -Promotor, 5'Nhel, 3'Cfr9I, <i>abfD</i> , Strep-tag II, Amp ^R , Ery ^R , repL, ColE1 ori, cytoplasmatische Exp.	1473 Bp	diese Arbeit
pT::P(<i>adc</i>) <i>abfD</i>	<i>adc</i> -Promotor, 5'Nhel, 3'Cfr9I, <i>abfD</i> , Strep-tag II, Amp ^R , Ery ^R , repL, ColE1 ori, cytoplasmatische Exp.	1473 Bp	diese Arbeit
pT::P(<i>fac</i>) <i>abfD</i>	<i>fac</i> -Promotor, 5'Nhel, 3'Cfr9I, <i>abfD</i> , Strep-tag II, Amp ^R , Ery ^R , repL, ColE1 ori, cytoplasmatische Exp.	1473 Bp	diese Arbeit

2.2 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in der Tabelle 2.4 aufgelistet.

Tab. 2.4: Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')*	Verwendung
<i>cbei_2100_fw_BamHI</i>	CCCC <u>G</u> ATCCATGCCATTAAAAACAAAGGAAC	Klonierung
<i>cbei_2100_rev_Cfr9I</i>	GGGG <u>CCCGG</u> TTCTTAATTCTAGCTATTCTTAGC	<i>cbei_2100</i>
<i>ckl_3020_fw_Nhel_BamHI</i>	GGGG <u>GG</u> ATCCGCTAGCATGTCTTAATGACTGGGA	Klonierung
<i>ckl_3020_rev_Cfr9I</i>	GGGG <u>CCC</u> GGATCTCTATTCTAGCTATCTCTTG	<i>ckl_3020</i>
<i>abfD_fw_Nhel</i>	CCCC <u>G</u> CATGTTAACAGCAGAACAG	Klonierung
<i>abfD_rev_Cfr9I</i>	GGGG <u>CCC</u> GGGTTAACCCAGCGATTGCC	<i>abfD</i>
<i>pT_fw_SacI</i>	CCCC <u>G</u> A <u>G</u> CTTGATAAAATGAACATGA	Schnittstellen-
<i>pT_rev_Nhel_Cfr9I</i>	GGGG <u>CCC</u> GGGCTAGCTCAACTAACCTCCTTGATCC	anpassung
<i>Strep-tag_rev_KasI</i>	TTT <u>GGCG</u> CTTATTTCAAATTGAGGATGTGAC	Klonierung Strep-tagII
<i>Padc_fw_SacI</i>	GGGG <u>G</u> AGCTTATTTATTTGTATTGGAATTGTTATAGT	Klonierung
<i>Padc_rev_Nhel_BamHI</i>	TTT <u>GG</u> ATCCGCTAGCTCATCCTAACATAAAAGTCAC	<i>adc</i> -Promotor
<i>Pptb_fw_SacI</i>	GGGG <u>G</u> AGCTATGAAGGATACAGTAAGCACT	Klonierung
<i>Pptb_rev_Nhel_BamHI</i>	AAA <u>AGG</u> ATCCGCTAGCAATCACTGGTCGTACACT	<i>ptb</i> -Promotor
<i>Pfac_fw_SacI</i>	GGGG <u>G</u> AGCTCTTTAACATAGATAAAGTTAGAACAA	Klonierung
<i>Pfac_rev_Nhel_BamHI</i>	TTT <u>GG</u> ATCCGCTAGCCATATGAAATACACCTCCTAAAATT	<i>fac</i> -Promotor
<i>pT_seq_fw</i>	GGGATAAACTATGGA <u>ACTT</u> TGAAA	Sequenzierung
<i>pT_seq_rev</i>	TGCAAGAATGTGAGAGCTAGAAA	der 4 <i>hbd</i>
<i>pT_seq_fw_P</i>	GAGCCGATTCAA <u>AGA</u> TATTATCATG	Sequenzierung
<i>pT_seq_rev_P</i>	TGCAAGAATGTGAGAGCTAGAAA	Promotoren

* unterstrichene Basen symbolisieren entsprechende Restriktionsschnittstellen.

2.3 Nährmedien

Hitzestabile Nährösungen und Medien wurden im Anschluss an die Herstellung für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Hitzelabile Lösungen wurden mittels Einwegfiltern (Porengröße 0,2 µm; Sarstedt) sterilfiltriert.

2.3.1 Nährmedium für *E. coli*

Zellen von *E. coli* wurden entweder in LB-Flüssigmedium oder auf LB-Agarplatten bei 37 °C kultiviert. Medienzusätze wurden bei Bedarf zugegeben (2.3.3).

LB-Medium (Luria Bertani) (Sambrook und Russel, 2001)

Hefeextrakt	5,0	g
Trypton	10,0	g
NaCl	10,0	g
<i>A. dest.</i>	ad	1000 ml

Zur Herstellung von LB-Festmedien wurden dem Medium vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar-Agar zugegeben.

2.3.2 Medien für *C. acetobutylicum*

Anaerobe Nährmedien für die Anzucht von *C. acetobutylicum* wurden nach Vorschrift von Breznak und Costilow (1994) hergestellt. Die Medien wurden in einer Mikrowelle zur Entfernung des Luftsauerstoffs aufgekocht und unter kontinuierlicher Stickstoffbegasung abgekühlt. Die Anaerobität der Medien konnte optisch anhand des Redoxindikators Resazurin (0,0001 % [w/v]) überprüft werden. Die Kulturgefäße wurden im Anschluss luftdicht verschlossen und autoklaviert. Etwaiger Restsauerstoff wurde durch die Zugabe von Titan-(III)-Nitrilotriessigsäure (NTA) (2.3.3) vor Verwendung der Nährmedien reduziert.

CGM (clostridial growth medium) (Wiesenborn *et al.*, 1988; mod.)

Glukose x H ₂ O (50 %, [w/v])*	50,0	ml
Hefeextrakt	5,0	g
Asparagin	2,0	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0	g
NaCl	1,0	g
KH ₂ PO ₄	0,75	g
K ₂ HPO ₄	0,75	g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,71	g
MnSO ₄ x H ₂ O	10,0	mg
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	10,0	mg
Resazurin (0,1 % [w/v])	1,0	ml
<i>A. dest.</i>	<i>ad</i> 1000	ml

* Nach dem Autoklavieren und vor dem Beimpfen wurde die Glukose aus einer sauerstofffreien, sterilen Stammlösung (50 %, [w/v]) zugegeben.

MS-MES Medium (medium synthétique) (Monot *et al.*, 1982; mod.)

Glukose x H ₂ O	60,0	g
KH ₂ PO ₄	0,55	g
K ₂ HPO ₄	0,55	g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,22	g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	11,0	mg
Eisessig	2,3	ml
MES*	21,3	g
PABA (0,8 mg/l)**	10,0	ml
Biotin (0,08 mg/l)**	1,0	ml
Resazurin (0,1 % [w/v])	1,0	ml
<i>A. dest.</i>	<i>ad</i>	1000 ml

* Vor der Zugabe von MES wurde der pH-Wert mit NH₄OH auf 6,6 eingestellt.

** Vor dem Autoklavieren wurde PABA aus einer 100-fachen und Biotin aus einer 1000-fachen sterilen Stammlösung hinzugegeben.

Bei Verwendung verschiedener Kohlenstoffquellen (C-Quellen) wurde anstelle der Glukose die entsprechende C-Quelle aus einer anaeroben, sterilfiltrierten Stammlösung (Mannose 50 % [w/v], Galaktose 50 % [w/v], Arabinose 50 % [w/v], Xylose 50 % [w/v]) zugegeben.

MMfvK (Minimalmedium für Vorkulturen) (Fischer et al., 2006)

Glukose (50 % [w/v])*	40,0	ml
CaCO ₃	1,0	g
K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	1,0	g
KH ₂ PO ₄	1,0	g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,1	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0	g
NaCl**	10,0	mg
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O**	10,0	mg
CaCl ₂ x 2 H ₂ O**	10,0	mg
MnSO ₄ x H ₂ O**	15,0	mg
FeSO ₄ x 7 H ₂ O**	15,0	mg
PABA**	2,0	mg
Thiamin-HCl**	2,0	mg
Biotin**	0,1	mg
Resazurinlösung (0,1 % [w/v])	1,0	ml
Na ₂ S ₂ O ₄	35,0	mg
A. dest.	ad	1000 ml

* Nach dem Autoklavieren wurde die Glukose direkt vor dem Beimpfen des Mediums aus einer sauerstofffreien, sterilen Stammlösung (50 % [w/v]) zugesetzt.

** Diese Komponenten wurden zusammen als 100-fache Stammlösung angesetzt, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

RCA (reinforced clostridial agar)*

Glukose x H ₂ O	5,0	g
Hefeextrakt	3,0	g
Trypton	10,0	g
NaCl	5,0	g
Fleischextrakt	10,0	g
Na-Aacetat	3,0	g
Cystein-HCl	0,5	g
Stärke	1,0	g
Agar-Agar	15,0	g
<i>A. dest.</i>	<i>ad</i>	1000 ml

* RCA wurde als kommerzielles Komplettmedium von der Firma Oxoid (Wesel) erworben. Der pH-Wert entsprach ohne Einstellung 6,8.

2.3.3 Medienzusätze

Den Nährmedien wurden im Bedarfsfall nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf etwa 50 °C bzw. direkt vor dem Animpfen nachstehende Medienzusätze (Tab. 2.5) beigefügt.

Tab. 2.5: Medienzusätze

Mediumzusatz	Stammkonzentration	Arbeitskonzentration
Ampicillin (Amp)	50 mg/ml in <i>A. dest.</i> (sterilfiltriert)*	100 µg/ml
Chloramphenicol (Cm)	34 mg/ml in Ethanol (96 % [v/v])**	25 µg/ml
Tetracyclin (Tc)	10 mg/ml in Ethanol (96 % [v/v])**	10 µg/ml
Erythromycin (Ery)	50 mg/ml in Ethanol (96 % [v/v])**	20 µg/ml
Thiamphenicol (Tm)	15 mg/ml in Ethanol (96 % [v/v])**	15 µg/ml

* Porengröße 0,2 µm (Sterilfilter, Schleicher & Schuell)

** in Ethanol gelöste Substanzen bedürfen keiner Sterilfiltration

Titan-(III)-NTA-Lösung

Die Herstellung der Titan-(III)-Nitrilotriessigsäure erfolgte wie bei Lehmann (2012 a) beschrieben.

2.4 Stammhaltung

E. coli Zellen wurden vorübergehend auf LB-Agarplatten bis zu vier Wochen bei 4 °C gelagert. Für eine dauerhafte Konservierung wurden 1 ml einer exponentiell wachsenden *E. coli*-Kultur zu 0,5 ml LB-Glycerin-Lösung (Glycerin 60 % [v/v], LB-Medium 40 % [v/v]) gegeben, gründlich durchmischt und anschließend bei -70 °C gelagert.

Zur Stammhaltung von *C. acetobutylicum* wurden zu 1-ml exponentiell wachsenden Zellen in CGM (2.3.2) 0,5 ml CGM-Glycerin-Lösung (Glycerin 60 % [v/v], CGM 40 % [v/v]) zugegeben und anschließend nach einer halbstündigen Inkubationszeit (37 °C, Anaerobenbox) bei -70 °C konserviert.

Vitalitäts- und Reinheitskontrollen wurden durch erneutes Ausstreichen auf Antibiotika-haltigen Agarplatten und mittels Mikroskopie durchgeführt.

2.5 Zellanzucht

2.5.1 Zellanzucht von *E. coli*

Die Anzucht der *E. coli*-Stämme (Tab. 2.1) erfolgte unter aeroben Bedingungen in LB-Flüssigkulturen unter Schütteln (180 Upm) bzw. auf LB-Festmedien (2.3.1) im Brutschrank bei 37 °C unter Verwendung entsprechender Medienzusätze (2.3.3).

2.5.2 Zellanzucht von *C. acetobutylicum*

C. acetobutylicum Stämme wurden zum einen auf RCA-Festmedien und zum anderen in Flüssigmedien (CGM und MS-MES) (2.3.2) kultiviert.

2.5.2.1 Zellanzucht von *C. acetobutylicum* auf Festmedium

Für die Anzucht auf Festmedien wurden die aerob angefertigten Platten zur Minimierung des Sauerstoffgehaltes mindestens 24 h vor Verwendung in eine Anaeroben-Werkbank (MACS-MG-1000-anaerobic work station, Meinstrup DWS, Lähden-Holte) eingeschleust. Die anschließende Kultivierung von *C. acetobutylicum* erfolgte ebenda bei 37 °C unter Stickstoffatmosphäre. Zur Reduktion von eingetragenen Sauerstoff wurden maximal 5 % [v/v] Wasserstoff zugegeben.

2.5.2.2 Zellanzucht von *C. acetobutylicum* in statischer Kultur

Die Kultivierung von *C. acetobutylicum* in statischer Kultur (Batch-Kultur) erfolgte anaerob unter einer abgeschlossenen N₂-Atmosphäre bei 37 °C in Hungate-Röhrchen (Ochs GmbH) oder in Müller&Krempel-Serumflaschen (Müller & Krempel AG). Batch-Kulturen (10 ml) wurden mit 0,1 Vol. einer MS-MES Sporensuspension bzw. mit 1 ml einer CGM-Glycerin-Stammkultur (2.4) inokuliert. Im Falle einer Sporensuspension wurde die Sporenkeimung durch Pasteurisierung (80 °C, 10 min) induziert. Anschließend erfolgte die Inkubation bei 37 °C. Vorkulturen dienten in der Regel der Anzucht von Batch-Hauptkulturen in Müller&Krempel-Serumflaschen mit unterschiedlichen Volumina (50 - 500 ml), die aufgrund der Gasentwicklung und des damit einhergehenden Druckanstieges nur bis maximal 60 % des Fassungsvermögens gefüllt wurden. Die Anzucht von Vorkulturen erfolgte in Komplexmedium (CGM; 2.3.2). Wachstumsversuche wurden stets in 200-ml MS-MES durchgeführt. Im Falle eines Medienwechsels war eine weitere Vorkultur in MS-MES Medium notwendig. Hierfür wurden 0,1 Vol. der CGM-Vorkultur in 10-ml-MS-MES-Vorkulturen überimpft, die bei Bedarf mit verschiedenen C-Quellen (Mannose, Galaktose, Arabinose und Xylose) versetzt wurden. Hauptkulturen wurden in der Regel mit einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,1 inokuliert.

2.5.2.3 pH-kontrollierte Batch-Fermentation

Für höhere Kulturvolumina wurde ein pH-regulierter „BIOSTAT B“ Chemostat (BBI, Melsungen) mit einem Arbeitsvolumen von 1,5 l eingesetzt. Die Steuereinheit ermöglichte eine konstante Temperatur von 37 °C und eine Regulation des pH-Wertes durch die Zufuhr

von 2 M KOH. Das Kulturgefäß wurde mit 1,3 l MS-MES bzw. MMfvK (2.3.2) gefüllt, autoklaviert und während des Abkühlens mit N₂ durchgast. Vor dem Beimpfen der Hauptkultur wurde zur Reduzierung des Restsauerstoffs 0,5 ml Titan-(III)-NTA-Lösung (2.3.3) zugegeben. CGM-Vorkulturen (2.5.2.2) dienten der Inokulation von 10 ml-Vorkulturen (MS-MES bzw. MMfvK), die nach einer Inkubation von 12 h bei 37 °C für die Inokulation von 200 ml Kulturmedium eingesetzt wurden. Die Hauptkultur wurde über einen sterilen Beimpfungsschlauch mit einer gut gasenden, exponentiell wachsenden 200-ml-Vorkultur inokuliert. Die Anwachsphase der Kultur erfolgte bei einer pH-Wertkontrolle von 5,2 und einer Durchmischung bei 50 Upm. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von ca. 1,0 wurde die Durchgasung mit N₂ eingestellt und die Rührgeschwindigkeit erhöht (200 Upm). Bei einer OD₆₀₀ von ca. 2,0 wurde die pH-Wertkontrolle auf 4,7 gesetzt, um die Lösungsmittelphase einzuleiten (Fontaine *et al.*, 2002).

2.6 Bestimmung physiologischer Parameter

2.6.1. Optische Dichte

Das Wachstum der Batchkulturen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm in einem Spektralphotometer (Photometer WPA Biowave II, Biochrom, Cambridge) gegen *A. dest.* in einer Plastikküvette mit 1 cm Schichtdicke ermittelt. Bei einer Extinktion über 0,3 erfolgte die Verdünnung der Zellsuspension mit *A. dest.*

2.6.2 Bestimmung der Wachstumsrate und Verdopplungszeit

Die Wachstumsrate μ gibt die masseabhängige Verdopplung pro Stunde an und lässt sich mit folgender Formel berechnen (Formel 2.1). Über die Wachstumsrate kann weiterhin die Verdopplungszeit t_d bestimmen werden (Formel 2.2), welche das Zeitintervall der Zellmasseverdopplung pro Stunde angibt (Madigan *et al.*, 2013).

$$\mu = \frac{\ln x_2 - \ln x_1}{(t_2 - t_1)}$$

Formel 2.1: Berechnung der spezifischen Wachstumsrate (μ). x_1/x_2 , Messwerte der optischen Dichte während des exponentiellen Wachstums zu den Zeitpunkten t_1 und t_2 .

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Formel 2.2: Berechnung der Verdopplungszeit (t_d). μ , spezifische Wachstumsrate

2.6.3 Bestimmung des externen pH-Wertes

Die Veränderung des externen pH-Wertes in Batch-Kulturen wurde in zellfreien Überständen nach Sedimentation (13000 Upm, 4 °C, 5 min) mit Hilfe eines pH-Meters (pH-Meter SevenEasy) verfolgt.

2.6.4 Optisch-enzymatische Glukosebestimmung

Zur Bestimmung des Glukoseverbrauchs während des Wachstums von *C. acetobutylicum* diente ein optisch-enzymatischer Test (Bergmeyer, 1983, mod.). Dabei wird D-Glukose in einer ersten Reaktion durch die Hexokinase [EC 2.7.1.1] unter ATP-Verbrauch zu Glukose-6-Phosphat und ADP umgewandelt. Anschließend erfolgt die Umwandlung von Glukose-6-Phosphat unter NADP⁺-Verbrauch durch die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase [EC 1.1.1.49] zu 6-Phospho-D-Glukonat und NADPH+H⁺. Die gebildete NADPH-Menge ist dabei direkt proportional zur Glukosemenge und kann photometrisch durch Bestimmung der Extinktionsänderung bei einer Wellenlänge von 340 nm (WPA Biowave II) gemessen werden. Die Berechnung der Glukosekonzentration erfolgte anschließend mit der Formel 2.3.

$$c_{\text{Glukose}} = \frac{\Delta E * V * \text{MW}_{\text{Glukose}} * \text{VF}}{\varepsilon * d * v} \quad [\frac{\text{g}}{\text{l}}]$$

Formel 2.3: Berechnung der Glukosekonzentration. c, Konzentration; ΔE, Extinktionsänderung; V, Gesamtvolumen des Ansatzes (ml); MW, Molekulargewicht (180,16 g/mol); ε, Extinktionskoeffizient von NADPH bei 340 nm (6,3 l * mmol⁻¹ * cm⁻¹); d, Schichtdicke der Küvette (1 cm); v, Probenvolumen.

Für die Bestimmung der Glukosekonzentration wurde folgender Reaktionsansatz in einer Halbmikroliterplastikküvette durchgeführt:

0,2 M Tris-HCl + 0,002 M MgSO ₄ (pH 7,6)	900	μl
NADP ⁺ (44 mg/ml)	10	μl
ATP (96 mg/ml)	10	μl
Probe (zellfreier Überstand)	10	μl

Nach dem Mischen des Ansatzes wurde die Extinktion des Leerwertes (E1) bei 340 nm gemessen. Durch Zugabe von 10 µl des Hexokinase/Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase Enzymgemisches (3 mg/ml, Roche) wurde die zuvor beschriebene Reaktion eingeleitet. Der Reaktionsansatz wurde erneut gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die erneute Messung der Extinktion der Probe (E2) bei 340 nm.

2.6.5 Optisch-enzymatische Laktatbestimmung

Die Bestimmung des während des Wachstums produzierten Laktats wurde in einem optisch-enzymatischen Test mit Hilfe des „D-/L-Laktat“-Kits von Megazyme (Megazyme International, Irland) durchgeführt. Die Quantifizierung des Laktats erforderte zwei Enzymreaktionen. Während der ersten Reaktion wird das D- bzw. L-Laktat in Anwesenheit von NAD⁺ zu Pyruvat über die D-Laktatdehydrogenase (D-LDH) [EC 1.1.1.27] bzw. L-Laktatdehydrogenase (L-LDH) [EC 1.1.1.27] oxidiert. In einer zweiten Reaktion, die der Rückreaktion zum D-/L-Laktat entgegenwirkt, wird das gebildete Pyruvat über die D-Glutamat-Pyruvat-Transaminase (D-GPT) [EC 2.6.1.2] zu D-Alanin und 2-Oxoglutarat umgewandelt. Dabei ist die Menge des gebildeten NADH aus der ersten Reaktion stöchiometrisch zu der Laktatmenge. Die Bestimmung der Laktatkonzentration erfolgte photometrisch in einer Halbmikroliter-Plastikküvette bei einer Wellenlänge von 340 nm. Für die Berechnung der Konzentration wurde die Formel 2.4 verwendet.

$$c_{\text{Laktat}} = \frac{V * \text{MW}_{\text{Laktat}}}{\varepsilon * d * v} * \Delta E \quad [\frac{\text{g}}{\text{l}}]$$

Formel 2.4: Berechnung der Gesamtlaktatkonzentration. c, Konzentration; V, Gesamtvolumen des Ansatzes (ml); MW, Molekulargewicht von Laktat (90,1 g/mol); ε, Extinktionskoeffizient von NADH bei 340 nm (6,3 l * mmol⁻¹ * cm⁻¹); d, Schichtdicke der Küvette (1 cm); v, Probenvolumen (ml); ΔE, Extinktionsänderung.

Der Reaktionsansatz umfasste 750 µl A. dest., 250 µl Glycylglycin-Puffer, 50 µl NAD⁺-Lösung und 10 µl D-GPT. Anschließend wurden 50 µl der zu untersuchenden Probe, nach zu voriger Sedimentation (13000 Upm, 4 °C, 10 min), dem Ansatz zugeführt, gründlich durchmischt und die Extinktion des Blindwertes gegen A. dest. und der Leerwerte bei 340 nm gemessen. Die zuvor beschriebenen Reaktionen wurden durch Zugabe von jeweils 10 µl D-LDH und L-LDH

gestartet. Nach 10 minütiger Inkubation der Reaktionsansätze bei RT wurde erneut die Extinktion gemessen.

2.6.6 Gaschromatografie

2.6.6.1 Gaschromatografische Analyse der Gärungsprodukte von *C. acetobutylicum*

Die Analyse und Quantifizierung der Gärungsprodukte Acetat, Butyrat, Aceton, Butanol und Ethanol erfolgte mit einem Agilent 7890A Gaschromatographen (Agilent Technologies, Böblingen) unter Verwendung eines Flammenionisationsdetektors (FID). Als Trägergas wurde über Feuchtigkeits- und Sauerstofffilter gereinigtes N₂ eingesetzt, welches der Zurückhaltung von Wasser, Sauerstoff und schwefeligen und chlorierten Substanzen diente. Die FID-Brenngase, synthetische Luft und Wasserstoff, wurden zur Entfernung von organischen Substanzen über einen Aktivkohlefilter geführt. Für die Analyse von Alkoholen und Carbonsäuren wurde eine mit Porapak P (80-100 mesh) gepackte Säule eingesetzt.

Nach Sedimentation der zu analysierenden Zellsuspension bei 13000 Upm und 4 °C für 10 min wurde der zellfreie Überstand in ein steriles 1,5-ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt und bis zur Verwendung bei -20 °C eingefroren. Für die Bestimmung des Produktspektrums wurden 100 µl des zellfreien Überstandes zu 900 µl destilliertem Wasser und 100 µl internem Standard (IS; 55 mM Isobutanol in 2 M HCl und 0,5 M Acetoin) in ein Rollrandgefäß gegeben. Anschließend wurden die Rollrandgefäße mittels Bördelkappen gasdicht verschlossen. Über einen automatisierten Probengeber wurden 0,5 µl der Probe zur Analyse in das System injiziert.

Die Quantifizierung der Gärungsprodukte erfolgte über eine Eichlösung bestehend aus 5 mM der zu analysierenden Produkte einschließlich des internen Standards, woraus ein Eichchromatogramm erstellt werden konnte. Über das Programm EZChrom Elite (Agilent Technologies, Böblingen) erfolgte sowohl die Steuerung des Gaschromatographen und des Probengebers als auch die Auswertung der Signale.

Die Analysebedingungen für die Detektion der Substanzen Acetat, Butyrat, Aceton, Butanol und Ethanol sind nachfolgend dargestellt.

Chromatografiesäule:	INNOSteel-GC-Säule (2 m x 1/8"AD x 2 mm, Porapak P 80/100 mesh)
Säulentemperatur:	155-197 °C; 9 °C/min
Trägergas:	N ₂ (30 ml/min)
Injektortemperatur:	195 °C
Detektor:	FID; 230 °C

2.6.6.2 Gaschromatografische Analyse von 1,4-Butandiol und γ-Hydroxybutyrat

Die Analyse und Quantifizierung von 1,4-BDO und GHB erfolgte mit einem Gaschromatographen mit massenselektivem Detektor (GC/MS) bestehend aus einem Agilent GC 6890 Gaschromatographen (Agilent Technologies, Böblingen) und einem massenselektiven Detektor (MSD 593). Als Trägergas diente Helium.

Die zu analysierenden Zellsuspensionen wurden bei 13000 Upm und 4 °C für 10 min sedimentiert und der zellfreie Überstand in ein steriles 1,5-ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Bis zur Weiterverwendung wurden die Proben bei -20 °C gelagert. Für die Analyse der 1,4-BDO- und GHB-Konzentration wurden 50 µl des Silylierungsreagenz N-Methyl-N-tert-butyldimethylsilyl-tifluoracetamid (MBDSTFA, Macherey und Nagel, Düren) in ein Rollrandgefäß mit Insert vorgelegt. Anschließend wurden je 1 µl der internen Standards (8-fach deuteriertes 1,4-BDO [100 µg/ml] und 6-fach deuteriertes GHB [100 µg/ml]) und 1 µl der Probe zugegeben, gut vermischt und das Probengefäß luftdicht verschlossen. Zur Beschleunigung der Silylierung der Proben und der internen Standards mit MBDSTFA folgte eine Inkubation des Reaktionsansatzes bei 80 °C für 20 min. Im Anschluss daran wurde 1 µl des Reaktionsansatzes über einen automatisierten Probengeber (Autosampler 7683) in das System injiziert.

Für die Quantifizierung von 1,4-BDO und GHB wurde eine isotopenverdünnte Nachweismethode mit dem „Selected Ion Mode“ (SIM) angewandt. Die SIM-Ionen für 1,4-BDO/ 1,4-BDO-d8 und GHB/ GHB-d6 sind 219/221 bzw. 317/323. Die Analysebedingungen von 1,4-BDO und GHB sind nachfolgend dargestellt.

Chromatografiesäule:	VF-5ms (25 m x 0,2 mm; 0,33 µm)
Säulentemperatur:	Initial 80 °C (3 min halten), + 20 °C/min bis 150 °C, + 10 °C/min bis 300 °C (8,5 min halten)
Trägergas:	Helium (0,9 ml/min)
Injektionsmodus:	splitless
Injektortemperatur:	290 °C
Detektor:	MSD

2.7 Visualisierung von 1,4-Butandiol

Für einen schnellen, präzisen und kostengünstigen Nachweis von 1,4-Butanolproduzenten wurde eine auf Dünnschichtchromatografie-basierte Methode evaluiert. Als stationäre Phase diente eine ALUGRAM SIL G DC-Fertigfolie (Macherey-Nagel, Düren) mit Kieselgel (Schichtdicke 0,2 mm) als Sorptionsmittel. Diese wurde zur Aktivierung bei 90 °C für 30 min erhitzt und nach dem Abkühlen mit den Proben beladen. Hierfür wurde der zellfreie Überstand von *C. acetobutylicum* bzw. 1,4-BDO (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) ca. 1 cm vom unteren Rand tropfenweise aufgetragen. Nach Lufttrocknung der Proben wurde die beladene Kieselgelplatte aufrecht in eine mit Fließmittel enthaltene Trennkammer überführt. Dabei galt es zu beachten, dass die Probenfront oberhalb des Fließmittels lag. Als mobile Phase wurde ein Gemisch aus Chloroform und Methanol im Verhältnis 80:20 gewählt. Damit eine mit dem Fließmittel gesättigte Atmosphäre entstand, wurde die Trennkammer geschlossen. Durch Kapillarkräfte stieg das Fließmittel vom unteren zum oberen DC-Plattenrand und transportierte so die aufgetragenen Proben mit. Sobald die Lauffront annähernd den oberen Rand der Platte erreichte, wurde die Platte aus der Trennkammer entnommen und an der Luft getrocknet. Es folgte das Besprühen der DC-Platte mit einer Vanillin-Färbelösung. Hierfür wurde in 98 ml Ethanol (96 %, reinst) 2 ml konzentrierte Schwefelsäure gelöst und mit 1 g Vanillin versetzt. Die Entwicklung der Spots erfolgte bei 100 °C bis eine Farbreaktion zu beobachten war. Anschließend konnten die Platte der Kammer entnommen und fotodokumentiert werden.

2.8 Arbeiten mit Nukleinsäuren

Zur Vermeidung von Verunreinigungen bei Arbeiten mit Nukleinsäuren wurden alle hitzestabilen Lösungen und Materialien bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Hitzelabile Lösungen hingegen wurden sterilfiltriert (Porengröße 0,2 µm, Sarstedt).

2.8.1 Isolierung von Nukleinsäuren

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

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte nach den Prinzipien der alkalischen Lyse von Birnboim und Doly (1979). In der Regel wurden 5 ml einer Übernachtkultur (2.5.1) für die Plasmid-Isolierung eingesetzt und nach folgender Prozedur behandelt.

1. Sedimentation der Zellen durch Zentrifugation (13000 Upm, 4 °C, 2 min)
2. Suspendieren des Zellpellets mit 300 µl Puffer P1
3. Zugabe von 300 µl Puffer P2, vorsichtiges Schwenken und Inkubation für 5 min bei RT
4. Zugabe von 300 µl Puffer P3, vorsichtiges Schwenken und Inkubation für 5 min bei RT
5. Zentrifugation für 20 min bei 13000 Upm und 4 °C
6. Überführung des Überstandes in ein neues 1,5-ml Eppendorfreaktionsgefäß
7. Zentrifugation für 10 min bei 13000 Upm und 4 °C
8. Überführung des Überstandes in ein neues 1,5-ml Reaktionsgefäß unter Zugabe von 0,8 Vol. Isopropanol
9. Zentrifugation für 20 min bei 13000 Upm und 4 °C
10. Überstand verwerfen und Waschen des Pellets mit 500 µl eiskaltem Ethanol (70 % [v/v], reinst)
11. Zentrifugation für 5 min bei 13000 Upm und 4 °C
12. Dekantieren des Überstandes, Trocknung des Pellets und Aufnahme in 15 µl A. dest.

Die Qualität der isolierten Plasmid-DNA wurde in einem 0,8 %igen Agarosegel (2.8.4) überprüft.

Puffer P1

50 mM Tris-HCl (pH 8,0)	10	ml	(1 M Stammlösung)
10 mM EDTA (pH 8,0)	4	ml	(0,5 M Stammlösung)
100 µg/ml RNaseA	2	ml	(10 mg/ml Stammlösung)
A. dest.	ad	200	ml

Die Zugabe der RNaseA erfolgte nach dem Autoklavieren. Der Puffer wurde bei 4 °C gelagert.

Puffer P2

1 % [w/v] SDS	10	ml	(10 % Stammlösung)
200 mM NaOH	2	ml	(1 M Stammlösung)
A. dest.	ad	100	ml

Der Puffer wurde nicht autoklaviert. Die Lagerung erfolgte bei RT.

Puffer P3

Kaliumacetat	58,88	g
A. dest.	ad	100

Der pH-Wert wurde mit Eisessig auf 5,5 eingestellt. Anschließend wurde der Puffer autoklaviert.

2.8.1.2 Isolierung chromosomaler DNA aus Clostridien

Zur Isolierung von chromosomaler DNA aus *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii* und *C. kluyveri* wurden jeweils 50 ml CGM (2.3.2) mit 0,1 Vol. einer entsprechenden Vorkultur inkubiert und bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss folgte die Sedimentation der Zellen (5000 Upm, 10 min, 4 °C), das Waschen der Zellpellets mit 10 ml Waschpuffer und die Überführung in 2-ml-Eppendorfreaktionsgefäß. Bis zur Weiterverwendung wurden die Zellen bei -20 °C gelagert. Die Isolierung der chromosomalen DNA erfolgte nach der Methode von Bertram (1989):

1. Resuspension der gefrorenen Zellpellets in 1 ml Waschpuffer
2. Zentrifugation bei 6000 g und 4 °C für 5 min
3. Suspendieren des Zellpellets in 1 ml Lysispuffer
4. Zugabe von 100 µl Lysozymlösung (200 mg/ml) und 5 µl RNase-A-Lösung (10 mg/ml)
5. Ansatz schwenken und Inkubation für 30 min bei 37 °C
6. Zugabe von 30 µl SDS-Lösung (20 % [w/v]) und 30 µl Proteinase K (20 mg/ml)
7. Inkubation des Ansatzes für 30-60 min bei 37 °C
8. Zugabe von 1 Vol. Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (PCI, 25:24:1 [v/v])
9. Zentrifugation bei 8000 Upm, 4 °C für 10 min
10. Überführung der oberen, wässrigen Phase in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß
11. Zweimalige Wiederholung der Schritte 8-10

12. Extraktion mit 1 Vol. Chloroform-Isoamylalkohol (24:1 [v/v]) zur Phenolentfernung
13. Zentrifugation bei 8000 Upm, 4 °C für 5 min
14. Abnehmen der oberen, wässrigen Phase und Fällung der DNA mit 0,1 Vol. 3 M Na-Acetat (pH 5,2) und 2,5 Vol. Ethanol (96 % [v/v], reinst)
15. Inkubation für 5 min bei RT
16. Zentrifugation bei 8000 Upm, 4 °C für 5 min
17. Dekantieren des Überstandes und Trocknung des Pellets
18. Aufnahme des Pellets in 60 µl TE-Puffer
19. Zugabe von 30 µl RNase-A-Lösung (10 mg/ml)
20. Inkubation für 15 min bei 37 °C
21. Zugabe von 30 µl Proteinase K (20 mg/ml)
22. Inkubation über Nacht bei 37 °C
23. Erhöhung des Volumens mit *A. dest.* auf 400 µl
24. Zugabe von 60 µl 3 M Na-Acetat (pH 5,2)
25. Extraktion mit 1 Vol. Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (Schritte 8-10)
26. Extraktion mit 1 Vol. Chloroform-Isoamylalkohol (Schritte 12 und 13)
27. Fällung der DNA mit 1 Vol. 3 M Na-Acetat (pH 5,2) und 2,5 Vol. Ethanol (96 % [v/v], reinst)
28. Zentrifugation bei 13000 Upm, 4 °C für 15 min
29. Zweimaliges Waschen des Pellets mit eiskaltem Ethanol (70 % [v/v], reinst)
30. Zentrifugation bei 6000 Upm, 4 °C für 15 min
31. Trocknung und Aufnahme des Pellets in 50 µl TE-Puffer bzw. *A. dest.*

Die Qualität der DNA wurde anschließend in einem 0,8 % igen Agarosegel (2.8.4) überprüft.

Waschpuffer			Lysispuffer		
EDTA (0,5 M; pH 8,0)	40	ml	NaCl (5 M)	4	ml
Tris-HCl (1 M)	10	ml	EDTA (0,5 M; pH 8,0)	20	ml
KCl (1 M)	25	ml	<i>A. dest.</i>	ad	200 ml
<i>A. dest.</i>	ad	200 ml	Der pH wurde mit HCl auf 7,5 eingestellt.		

RNase-A-Lösung			Lysozym-Lösung		
RNase-A	10	mg	Lysozym	200	mg
Tris-HCl (1 M; pH 8,0)	0,1	ml	<i>A. dest.</i>	ad	1 ml
NaCl	9	mg			
<i>A. dest.</i>	ad	1 ml			

Der pH wurde mit HCl auf 7,5 eingestellt.

1 ml Aliquots wurden bei -20 °C gelagert.

Proteinase K			TE-Puffer		
Protinase K	20	mg	EDTA (0,5 M; pH 8,0)	1	ml
<i>A. dest.</i>	ad	1 ml	Tris-HCl (1 M; pH 8,0)	0,2	ml
Aliquots zu je 30 µl wurden bei -20 °C gelagert.			Der pH wurde mit HCl auf 8,0 eingestellt.		

2.8.2 PCR-Techniken

Zur Erzeugung von DNA-Fragmenten, die für weitere Klonierungsschritte (2.8.3) benötigt wurden und zur Verifikation positiver Klone wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzt. Die Amplifikation fand in Thermocyclern mit Deckelbeheizung (PCR-Cycler, Biometra) statt. Standard-PCR-Analysen wurden mit der *Pwo* DNA-Polymerase (2,5 U/µl) (Genaxxon biosciene GmbH, Ulm) durchgeführt.

2.8.2.1 Oligonukleotid-Design

Zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurden spezifisch an die entsprechenden Zielsequenzen angepasste Oligonukleotide (Tab. 2.4) abgeleitet. Darüberhinaus wurden die Oligonukleotide derart konstruiert, dass die Amplifikate am 5'- und 3'-Ende über entsprechende Restriktionsschnittstellen für eine spätere Klonierung verfügten. Zur Berechnung der Schmelztemperaturen und zur Überprüfung der Ausbildung von Homo- und Heterodimeren der Oligonukleotide wurden diese mit dem Oligo-Analyzer von IDT (<http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) überprüft. Bei Oligonukleotid-Paaren wurde darauf geachtet, dass sich die Schmelztemperaturen nicht mehr als 3 °C unterschieden.

2.8.2.2 Standard-PCR

Ein Standard-PCR Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Template DNA	10-100 ng
dNTPs (10 mM)	1 µl
Fw-Primer (10 µM)	1 µl
Rev-Primer (10 µM)	1 µl
10 x <i>Pwo</i> PCR-Puffer (komplett)	5 µl
<i>Pwo</i> DNA-Polymerase (2,5 U/µl)	1 µl
<i>A. dest.</i>	ad 50 µl

Nachfolgendes PCR-Programm wurde durchgeführt:

Denaturierung	94 °C	2	min	1x
Denaturierung	94 °C	30	s	←
Annealing	T _m (Primer)-3 °C	30	s	30x
Elongation	72 °C	1	min/kBp	—
Elongation	72 °C	5	min	1x
Lagerung	4 °C	∞	unendlich	

2.8.2.3 „Colony“-PCR

Zur Verifikation von positiven *C. acetobutylicum*-Klonen wurden entsprechende Einzelkolonien mit einer sterilen Impföse von RCA-Platten entnommen und in 25 µl sterilem *A. dest.* resuspendiert, bei 99 °C für 10 min aufgekocht und die Zelltrümmer sedimentiert (13000 Upm, 1 min, 4 °C). Anschließend konnte 1 µl des zellfreien Überstands für einen 25 µl-Standard-PCR-Reaktionsansatz (2.8.2.2) eingesetzt werden.

2.8.3 Enzymatische Modifikation von DNA

2.8.3.1 Restriktion von DNA

Zur Erzeugung von DNA-Fragmenten mit definierten Enden wurde die DNA mit nachfolgenden Restriktionsendonukleasen (Tab. 2.6) behandelt. Die erzeugten linearen DNA-Fragmente wurden zum einen für eine Agarosegelelektrophorese (2.8.4) und zum

anderen für Ligationsreaktionen (2.8.3.3) eingesetzt. Die Verwendung der empfohlenen Puffer und Inkubationszeiten erfolgte nach Herstellerangaben (Thermo Scientific, Braunschweig). Das Mindestvolumen des Restriktionsansatzes für den Verdau von 1 µg DNA betrug 10 µl.

Tab. 2.6: Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonuklease	Erkennungssequenz ¹	Puffersystem
<i>BamHI</i>	5'-G ^A GATCC-3' 3'-CCTAG ^V G-5'	1x <i>BamHI</i> -Puffer, 1x Tango TM
<i>Cfr9I (XmaI)</i>	5'-C ^A CCGGG-3' 3'-GGGCC ^V C-5'	1x <i>Cfr9I</i> -Puffer, 1x Tango TM
<i>NheI</i>	5'-G ^A CTAGC-3' 3'-CGATC ^V G-5'	1x Tango TM
<i>KasI (SspDI)</i>	5'-G ^A GCGCC-3' 3'-CCGCG ^V G-5'	1x Tango TM
<i>SacI</i>	5'-GAGCT ^A C-3' 3'-C ^V TCGAG-5'	1x <i>SacI</i> -Puffer, 1x Tango TM
<i>SatI (Fnu4HI)</i>	5'-GC ^A NGC-3' 3'-CGN ^V CG-5'	1x Puffer G, 1x Tango TM

¹ N = A, T, C oder G; ^V Restriktionsschnittstellen

2.8.3.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Zur Verminderung der Selbstligation enzymatisch hydrolysiert Vektor-DNA wurde diese mit einer alkalischen Phosphatase (FastAP, Thermo Scientific, Braunschweig) behandelt, was zu einer Dephosphorylierung der freien 5'-Ende führte. Hierfür wurden 2 U FastAP (1 U/µl) zu dem Restriktionsansatz gegeben und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Phosphatase hitzeinaktiviert (75 °C, 5 min) und die DNA mittels „Plasmid PLUS DNA Purification Mini Prep Kit“ (Genaxxon BioScience GmbH, Ulm) aufgereinigt (2.8.5.2).

2.8.3.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte unter Verwendung der T4-DNA-Ligase (1 U/µl) (Thermo Scientific, Braunschweig) in einem 20 µl-Standardvolumen mit 1x T4-Ligase-Puffer bei 22 °C für 1 h oder bei 16 °C über Nacht. Für eine optimale Ligationseffizienz wurde ein molares Verhältnis von Vektor zu Insert von 1:3 gewählt. Der Ligationsansatz konnte anschließend für die Transformation in CaCl₂-kompetente *E. coli*-Zellen verwendet werden.

2.8.3.4 *in vivo* Methylierung von Plasmid-DNA

Für eine Transformation von Plasmid-DNA in *C. acetobutylicum* müssen die Plasmide zuvor spezifisch methyliert werden, da diese andernfalls als Fremd-DNA erkannt und abgebaut werden. Hierfür wurden die entsprechenden Plasmide in *E. coli* ER2275 pANII transformiert (2.9.1.2). Dieser Stamm verfügt über eine auf dem Plasmid pANII kodierte Methyltransferase Φ3T1 (*B. subtilis* Phage), die das gleiche Methylierungsmuster wie *C. acetobutylicum* (Cac824I) aufweist (Mermelstein *et al.*, 1992). Die Plasmide wurden erneut isoliert (2.8.1.1), auf Methylierung mittels Restriktionsverdau mit *SatI* kontrolliert (2.8.3.1) und anschließend für die Transformation in *C. acetobutylicum* (2.9.2.1) eingesetzt.

2.8.4 Agarosegelelektrophorese (Sambrook und Russell, 2001)

Zur qualitativen und quantitativen Beurteilung der DNA diente die horizontale Agarosegelelektrophorese. Dabei variierten in Abhängigkeit von den DNA-Fragmenten die Agarosekonzentrationen von 0,8 - 2,0 % (w/v) in 1x TAE-Puffer. Zum Beschweren der Proben und um eine Markierung der Lauffront zu gewährleisten, wurden die Ansätze mit 0,2 Vol. 6x Loading Dye versetzt. Weiterhin wurden zur Größenabschätzung linearisierter DNA die Längenstandards GeneRuler™ 1 kb Ladder bzw. MassRuler™ DNA Ladder Mix (Thermo Scientific, Braunschweig) mitgeführt. Letzterer ermöglichte zudem eine Konzentrationsabschätzung der DNA. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in 1x TAE-Laufpuffer bei einer konstanten Spannung von 90 V (Power Pack P 25; Biometra, Göttingen) für ca. 45 min. Zur Visualisierung der DNA kamen zwei Techniken zum Einsatz: einerseits wurden die Gele in einem Ethidiumbromidbad (1 µg/ml in *A. dest.*) für 15-30 min inkubiert und anschließend die Nukleinsäuren mit einer Photodokumentationsanlage (Gelprint 2000; MWG-Biotech, Ebersberg) bei einer Wellenlänge von 254 nm visualisiert und dokumentiert; andererseits konnten die Nukleinsäuren durch die Anwendung des Farbstoffes „GelRed“ (Genaxxon BioScience GmbH, Ulm) im Loading Dye direkt bei einer Wellenlänge von 312 nm mittels einer Photodokumentationsanlage (DarkHood DH-50; Biostep GmbH, Barkhardtsdorf) sichtbar gemacht und dokumentiert werden.

50x TAE-Puffer

Tris	242	g
Eisessig (konz.)	57	ml
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	100	ml
A. dest.	ad	1000 ml

Der pH-Wert wurde mit 0,1 M HCl auf 7,5 eingestellt.

2.8.5 Reinigung von Nukleinsäuren

2.8.5.1 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Für die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das „Gel extraction Mini Prep Kit“ (Genaxxon BioScience GmbH, Ulm) verwendet. Die gewünschten DNA-Banden wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung (2.8.4) unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und nach Herstellerangaben unter Verwendung der entsprechenden Puffer behandelt. Es folgte die Qualitätsüberprüfung der DNA in einem 0,8 %igem Agarosegel (2.8.4).

2.8.5.2 Kit-basierte DNA-Aufreinigung

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus einem PCR-Ansatz oder nach einem Restriktionsverdau erfolgte mit dem „Plasmid PLUS DNA Purification Mini Prep Kit“ (Genaxxon BioScience GmbH, Ulm) gemäß den Herstellervorgaben.

2.9 Erzeugung rekombinanter Organismen

2.9.1 DNA-Transfer in *E. coli*

2.9.1.1 CaCl₂-vermittelte Transformation in *E. coli*

Für die CaCl₂-vermittelte Transformation von Vektor-DNA in *E. coli*-Zellen (Tab. 2.1) wurden 10 µl eines Ligationsansatzes (2.8.3.3) zu 50 µl auf Eis aufgetauter, kompetenter Zellen gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 90 s bei 42 °C, eine anschließende Inkubation für 2 min auf Eis und die Zugabe von 500 µl LB-Medium (2.3.1). Die Regenerierung der Zellen erfolgte für 1 h bei 37 °C unter Schütteln (180 rpm).

Abschließend wurden je 50 µl, 100 µl und 150 µl des Transformationsansatzes zur Selektion auf Antibiotika-haltigen LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.9.1.2 Transformation von *E. coli* durch Elektroporation

Die Elektroporation von *E. coli* Zellen (Tab. 2.1) erfolgte nach der Methode von Dower *et al.* (1988) unter Verwendung eines GenePulserII™ (Bio-Rad Laboratories, München). Während die elektrokompetenten *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut wurden, wurden Elektroporationsküvetten mit einem Elektrodenabstand von 0,2 cm bei -20 °C vorgekühlt und die Plasmide entsprechend ihrer Konzentration 1:5 bzw. 1:10 verdünnt. Die verdünnten Plasmide (2 µl) wurden zu 40 µl kompetenter Zellen gegeben und der Ansatz in die Elektroporationsküvetten überführt. Die Elektroporation erfolgte bei einer Kapazität von 25 µF, einem Widerstand von 200 Ω und einer Spannung von 2,5 kV. Ideale Zeitkonstanten lagen im Bereich von 4,5 - 5,5 ms. Nach dem Elektroporationsvorgang wurden die Zellen zur Regeneration in 500 µl LB-Medium aufgenommen und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Jeweils 10 µl, 20 µl und 50 µl des Transformationsansatzes wurden auf LB-Agarplatten mit entsprechenden Medienzusätzen (2.3.3) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.9.2 DNA-Transfer in *C. acetobutylicum*

2.9.2.1 Transformation von *C. acetobutylicum* durch Elektroporation

Die Transformation methylierter Vektor-DNA (2.8.3.4) in *C. acetobutylicum* erfolgte nach der Methode von Mermelstein *et al.* (1992) unter zu Hilfenahme eines GenePulserII™ (Bio-Rad Laboratories, München) unter anaeroben Bedingungen in einer Anaerobenwerkbank (MACS-MG 1000; Meintrup dws, Lähden-Holte). Für die Elektroporation wurden stets frisch kultivierte Zellen eingesetzt. Hierfür wurden 50 ml CGM mit einer exponentiell wachsenden CGM-Vorkultur inokuliert (2.5.2) und bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 bei 37 °C inkubiert. Die nachfolgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt:

1. Inkubation der Hauptkultur für 30 min auf Eis
2. Zentrifugation für 5 min bei 5000 x g und 4 °C
3. Waschen der Zellen mit 10 ml vorgekühltem Elektroporationspuffer
4. Zentrifugation für 5 min bei 5000 x g und 4 °C
5. Resuspendieren des Zellpellets in 0,5-2,0 ml Elektroporationspuffer

6. Überführung von 400 µl kompetenter Zellen und 25 µl Plasmid-DNA in vorgekühlte Elektroporationsküvetten (0,4 cm Elektrodenabstand)
7. Inkubation des Ansatzes für 5 min auf Eis
8. Elektroporation: 50 µF, 600 Ω und 1,8 kV (Zeitkonstanten: 10 - 20 ms)
9. Zugabe von 1 ml CGM und Überführung des Ansatzes in 2-ml Schraubdeckelrörchen
10. Regeneration der Zellen für ca. 4 h bei 37 °C
11. Ausplattieren von 300 µl Zellsuspension und Auftröpfen von max. 500 µl auf RCA-Platten mit entsprechenden Medienzusätzen
12. Inkubation für mindestens 48 h bei 37°C

Natriumphosphat-Puffer (pH 7,4)¹NaH₂PO₄ (200 mM) 22,6 mlNa₂HPO₄ (200 mM) 77,4 ml**Elektroporationspuffer²**

Saccharose-Lsg. (270 mM) 10 ml

Natriumphosphat-Puffer (pH 7,4) 150 µl

¹ Der Puffer wurde autoklaviert.² Der Elektroporationspuffer wurde steril filtriert.

2.10 Arbeiten mit Proteinen

2.10.1 Zellaufschluss von *C. acetobutylicum* mittels Ultraschall

Für den Nachweis der heterologen Proteinexpression wurden die Zellen der rekombinanten *C. acetobutylicum* Stämme mittels Ultraschall (UP200S Hielscher, Teltow) aufgeschlossen. Dazu wurde eine 200-ml CGM-Hauptkultur mit 0,1 Vol. einer entsprechenden 10-ml CGM-Übernachtkultur inkuliert und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 2,0 - 3,0 inkubiert. Die Zellen wurden unter Antibiotika-Zusatz (2.3.3) kultiviert. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation (Sorvall RC6+, Rotor F12S-6x500 LEX) für 10 min bei 10000 Upm und 4 °C. Anschließend wurde das Zellpellet in 5 ml Puffer W (2.10.2) aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Nach dem Auftauen der Zellen wurden diese in einen Glasmessbecher überführt, auf Eis gelagert und für die Ultraschallbehandlung eingesetzt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mittels Ultraschall und einer S2 bzw. S3 Sonotrode bei einem Zyklus von 3 min Beschallung (Amplitude: 50 %, cycle: 0,5) und 1 min Pause für eine Dauer von 30 min. Der Erfolg des Aufschlusses wurde mittels Lichtmikroskopie überprüft. Es folgte die Sedimentation der Zelltrümmer (13000 Upm, 4 °C, 10 min). Der geklärte Überstand wurde anschließend für eine Affinitätschromatographie eingesetzt (2.10.2).

2.10.2 Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatografie

Die Aufreinigung rekombinanter *Strep-tagII* Fusionsproteine aus geklärten Lysaten von *C. acetobutylicum* (2.10.1) erfolgte chromatografisch über eine mit Strep-Tactin immobilisierte Sepharose-Säule (IBA, Göttingen). Der aus dem Ultraschallauflösung (2.10.1) gewonnene Überstand wurde auf die Säule gegeben und der daraus resultierende Durchfluss aufgefangen. Es folgte zur Entfernung überschüssiger Proteine das fünfmalige Waschen der Säule mit jeweils 1 ml Puffer W und das Sammeln der einzelnen Waschfraktionen in 1,5-ml Eppendorfreaktionsgefäß. Die aufgrund des *Strep-tagII* zurückgehaltenen Fusionsproteine wurden durch Zugabe von 6x 0,5 ml Puffer E von der Säule eluiert und in 1,5-ml Eppendorfreaktionsgefäß aufgefangen. Die Proteinfraktionen wurden bei -20 °C gelagert und zur Konzentrationsbestimmung (2.10.3) und für die SDS-PAGE (2.10.4) eingesetzt. Zur Regeneration der Säule wurde selbige mit 10 ml Puffer R behandelt, erkennbar durch einen Farbumschlag der Säule von weiß zu orange-rot. Die anschließende Zugabe von 10 ml Puffer W führte zu einer Entfärbung der Säule. Die so behandelte Säule konnte mit 1 ml Puffer W beschichtet bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

Puffer W¹

Tris	100	mM
NaCl	100	mM
EDTA (pH 8,0)	0,5	mM
<i>A. dest. ad</i>	300	ml

Puffer E

Tris	100	mM
NaCl	100	mM
EDTA (pH 8,0)	0,5	mM
Desthiobiotin	2,5	mM

¹ Der pH wurde mit 1 M HCl auf 8,0 eingestellt. Der Puffer wurde anschließend autoklaviert und bei RT gelagert.

Puffer R

Tris	100	mM
NaCl	100	mM
EDTA (pH 8,0)	0,5	mM
HABA	1,0	mM

2.10.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen (Bradford, 1976)

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration in wässrigen Lösungen wurde die Methode nach Bradford (1976) angewandt. Es wurden 1 ml Bradford-Reagenz mit 50 µl Proteinprobe (gegebenenfalls verdünnt) versetzt, gut durchmischt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Absorption bei 595 nm in einer Plastikküvette (Schichtdicke: 1 cm) in einem Photometer (WPA Biowave II) gegen einen Blindwert (1 ml Bradford-Reagenz + 50 µl *A. dest.*). Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe einer mit Rinderserumalbumin (BSA) erstellten Eichreihe (0 - 0,15 mg/ml).

Bradford-Reagenz

Brilliant-Blau G-250	70	ml
Ethanol (96 % [v/v])	50	ml
H ₃ PO ₄ (85 % [v/v])	100	ml
<i>A. dest.</i>	<i>ad</i>	1000 ml

Das Reagenz wurde lichtgeschützt bei RT gelagert.

2.10.4 Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht wurde die denaturierende SDS-PAGE nach Laemmli (1970, mod.) durchgeführt. Die Bindung von negativ geladenen SDS-Molekülen („Sodium Dodecyl-Sulfate“) an die hydrophoben Regionen der Proteine führt zu einer Überlagerung der nativen Proteinladung, sodass alle Proteine eine negative Ladung erhalten. Die Durchführung der SDS-PAGE erfolgte in entsprechenden Gelkammern (Biometra, Göttingen) unter Verwendung der in Tabelle 2.7 dargestellten Gellsolutions. Das Sammelgel, mit einem Acrylamidgehalt von 4 % [w/v] und neutralem pH-Wert, diente der Bündelung der Proteine, welche anschließend im Trengel (Acrylamidgehalt 12 % [w/v]) separiert wurden.

Tab. 2.7: SDS-PAGE-Gellösungen

Reagenz	Sammelgel (4 % [v/v])	Trenngel (12 % [v/v])
A. dest.	3,1 ml	3,1 ml
Acrylamid-Lösung (40 % Acrylamid)	0,52 ml	2,35 ml
4x Sammelgelpuffer	1,25 ml	---
4x Trenngelpuffer	---	1,88 ml
TEMED	10 µl	10 µl
APS (10 % [w/v])	100 µl	100 µl

Die Proteinproben wurden vor der gelelektrophoretischen Auftrennung im Verhältnis von 4:1 [v/v] mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 100 °C denaturiert. Nach dem Auftragen der behandelten Proteinproben erfolgte die Elektrophorese bei einer konstanten Stromstärke von 10 mA (Sammelgel) bzw. 20 mA (Trenngel) in 1x SDS-Laufpuffer bei RT. Sobald die Lauffront das untere Gelende erreicht hatte, wurde die Elektrophorese gestoppt und das Gel für die Coomassie-Färbung (2.10.5) bzw. für den Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran (2.10.6) eingesetzt. Die Größenabschätzung der Proteine erfolgte durch parallel mitgeführte Proteinmarker („prestained proteinmarker“, „prestained plus proteinmarker“ bzw. „unstained proteinmarker“; Thermo Scientific, Braunschweig).

4x Trenngelpuffer

Tris-HCl (pH 8,8)	0,5	M
SDS [w/v]	4	%
A. dest.	ad 400	ml

Der pH von 8,8 wurde mit HCl eingestellt.

4x Sammelgelpuffer

Tris-HCl (pH 6,8)	0,5	M
SDS [w/v]	4	%
A. dest.	ad 400	ml

Der pH von 6,8 wurde mit HCl eingestellt.

10x SDS-Laufpuffer

Tris	0,25	M
Glycin	1,92	M
SDS [w/v]	1	%
A. dest.	ad 1000	ml

SDS-Probenpuffer

Glycerin [v/v]	40	%
DTE	40	mM
SDS [w/v]	10	%
Bromphenolblau [w/v]	0,4	%
Tris-HCl (pH 6,8)	250	mM
A. dest.	ad 50	ml

Ammoniumpersulfatlösung (APS)

Ammoniumpersulfat	10	%
A. dest.	ad	100 ml

2.10.5 Kolloidale Coomassie-Färbung

SDS-Polyacrylamidgele (2.10.4) wurden nach der Methode von Neuhoff *et al.* (1988) behandelt und zunächst für mindestens 1 h in einer Fixierlösung unter Schwenken inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Fixierlösung entfernt und durch die kolloidale Coomassie-Lösung ersetzt, in welcher die Gele über Nacht bei RT unter Schwenken inkubiert wurden. Durch mehrmaliges Waschen mit destilliertem Wasser konnten die Gele anschließend entfärbt werden, bis ein ausreichender Kontrast zwischen Hintergrund und Probe vorlag.

Kolloidales Coomassie	Fixierlösung		
Coomassie Brilliant Blue G-250	0,75	g	Essigsäure 10 %
o-Phosphorsäure (85 %)	15	ml	Ethanol (96 % [v/v], reinst) 50 %
Ammoniumsulfat	75	g	A. dest. ad 1000 ml
Methanol	250	ml	
A. dest.	ad	1000	ml

2.10.6 Transfer von Proteinen auf Membranen (Western Blot)

Bei einem Western Blot (Towbin *et al.*, 1979) werden die Proteine von einem Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen, um diese mit immunologischen Methoden spezifisch detektieren zu können. Der Transfer der aufgereinigten Proteinproben (2.10.2) auf eine Nitrocellulose-Membran wurde nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung (2.10.4) in einer Semi-Dry-Blottingapparatur (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Hierfür wurden zuvor zwei Lagen extra dickes Blottingpapier (Bio-Rad Laboratories, Hercules) und die Nitrocellulose-Membran (0,2 µm, Biometra) auf die Gelgröße (abzüglich des entfernten Sammelgels) zugeschnitten und mit Transferpuffer befeuchtet. Auf die Anodenseite der Blottingapparatur wurde luftblasenfrei eine Lage Blottingpapier gelegt, gefolgt von der Nitrocellulose-Membran, dem ebenfalls mit

Transferpuffer benetztem Polyacrylamidgel und der zweiten Lage Blottingpapier. Überschüssiger Puffer wurde mit einem saugfähigen Papier entfernt. Durch Auflegen der Kathodenplatte wurde die Blotting-Kammer geschlossen und der Transfer bei einer konstanten Stromstärke von 5 mA/m² durchgeführt. Sobald die Spannung auf die Hälfte ihres Ausgangswertes absank, wurde der Blotvorgang beendet.

Transferpuffer

Tris	125	mM
Glycin	192	mM
Ethanol (96 % [v/v], reinst)	20	%
A. dest.	ad	1000 ml

Der Puffer wurde bei 4 °C gelagert.

2.10.7 Detektion von *Strep-tag II* Fusionsproteinen

Die Detektion der rekombinanten Fusionsproteine erfolgte über einen Strep-Tactin-Antikörper, welcher gegen das *Strep-tag* Antigen der Fusionsproteine gerichtet und an eine alkalische Phosphatase gekoppelt ist. Durch die Umwandlung der Substrate Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) und 5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl-Phosphat (BCIP) kommt es aufgrund der gekoppelten alkalischen Phosphatase zu einer Farbreaktion.

Nach Beendigung des Blotvorgangs (2.10.6) wurde die Membran in 50 ml Blocking-Puffer über Nacht bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Membran zweimal mit 1x TGST-Puffer für jeweils 10 min gewaschen und mit 50 ml 1x TGST-Puffer und 5 µl Strep-Tactin-AP-Konjugatlösung (IBA, Göttingen) für 45 min bei RT unter Schwenken inkubiert. Zur Entfernung von ungebundenen Antikörpern wurde die Membran erneut dreimal mit 50 ml 1x TGST-Puffer für jeweils 10 min gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit 5 ml 1x AP-Puffer und 45 µl NBT/BCIP-Lösung (Roche, Mannheim) im Dunkeln und bei RT gelagert, bis die Signale erkennbar waren. Die Farbreaktion konnte bei ausreichender Intensität der Signale durch Spülen der Membran mit destilliertem Wasser abgestoppt und die Membran getrocknet und fotodokumentiert werden.

10x TGST-Puffer

Tris	1,21	g
NaCl	3,55	g
Tween20*	0,5	g
<i>A. dest.</i>	<i>ad</i> 100	ml

10x AP-Puffer

Tris	1,21	g
NaCl	5,7	g
MgCl ₂	0,47	g
<i>A. dest.</i>	<i>ad</i> 100	ml

*Zugabe nach dem Autoklavieren

Der pH wurde mit HCl auf 9,5 eingestellt.

Der pH wurde mit HCl auf 8,0 eingestellt.

Blocking-Puffer

Magermilchpulver	2,5	g
BSA	0,5	g
1x TGST-Puffer <i>ad</i>	50	ml

Dem Puffer wurde eine Spatelspitze Avidin zugegeben.

2.11 Bezugsquellen

Chemikalien ohne zusätzlichen Vermerk wurden mit dem Reinheitsgrad „reinst“ oder „zur Analyse“ von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Carl Roth GmbH & Co.KG (Karlsruhe), Diagonal (Münster), Merck KG (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Gase wurden von der Westfalen AG (Münster) geliefert.

Tab. 2.8: Bezugsquellen für Chemikalien

Bezugsquelle	Produkt
AppliChem GmbH, Darmstadt	Acrylamid, Agarose, Ammoniumsulfat, Ammoniumhydroxid, Ampicillin, Asparagin, Avidin, β-NADH, BSA, DNase I, Erythromycin, Ethidiumbromid, Glukose, Glycin, Lysozym, Magermilchpulver, Mannose, MES, Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol, Proteinase K, RNase A, SDS, TEMED, Tris, Hefeextrakt, Trypton
Biolab Inc., Lawrenceville, USA	Brilliant Blue G-250, Tris, Vanillin, Xylose
Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	Thiamphenicol
Chemos GmbH, Regenstauf	

Tab 2.8: Bezugsquellen für Chemikalien (Fortsetzung).

Bezugsquelle	Produkt
Difco Laboratories, Hamburg	Agar-Agar
Genaxxon Bioscience GmbH, Ulm	GelRed
IBA GmbH, Göttingen	Desthiobiotin, Strep-Tactin-Sepharose, Strep-Tactin AP-Konjugatlösung
Merck KGaA, Darmstadt	Chloramphenicol, Magnesiumsulfat, Mangansulfat, PABA
Oxoid GmbH, Wesel	Reinforced Clostridial Agar (RCA)
Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen	Pwo-Polymerase I
Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	NBT/ BCIP, Hexokinase/ Glucose-6- Phosphat-Dehydrogenase
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	1,4-Butandiol; 2,3-Butandiol, Oligonukleotide 1,4-Butandiol-d8, γ -Hydroxybutyrat-d6

Tab. 2.9: Bezugsquellen für Geräte und Materialien

Bezugsquelle	Geräte/ Materialien
Agilent Technologies GmbH, Böblingen	Agilent 6890, Agilent 7890A, EZ Chrom Elite,
Amersham Buchler GmbH, Braunschweig	Photometer Ultrospec 3000
Biochrom, Cambridge, UK	Photometer WPA Biowave II
Biometra GmbH, Göttingen	Agarosegelektrophorese-Kammern, Blotting-Apparatur, Nitrocellulosemembran, PCR-Cykler, Power Pack P25, Gene Pulser™ II, Blottingpapier
Biorad GmbH, München	
Biostep GmbH, Jahnsdorf	Geldokumentationsanlage Dark Hood DH+50
Braun AG, Melsungen	sterile Kanülen
Eppendorf Research AG, Hamburg	Reaktionsgefäße, Thermomixer Comfort
Genaxxon Bioscience GmbH, Ulm	Gel Extraction Kit, Plasmid Plus DNA Purification Mini Prep Kit
Heraeus-Holding GmbH, Hanau	Tischzentrifuge Biofuge fresco
Hielscher Ultrasonic GmbH, Teltow	Hielscher UP200S
Kendro Laboratory Products GmbH,	Sorvall RC 6C Plus Zentrifuge
Langenselbold	

Tab. 2.9: Bezugsquellen für Geräte und Materialien (Fortsetzung).

Bezugsquelle	Geräte/ Materialien
Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren	ALUGRAM SIL G DC-Fertigfolie, Kieselgel 0,2 mm
Megazyme International Ltd., Wicklow	Laktat-Kit
Meintrup DWS Laborgeräte GmbH, Lähden-Holte	MACS-MG-500/MG-1000-anaerobic workstation
Memmert GmbH & Co.KG, Schwabach	Brutschrank
Mettler-Toledo GmbH, Giessen	pH Meter SevenEasy
Müller&Kempel AG, Bülach	Müller&Kempel Serumflaschen
MWG-Biotech AG, Ebersberg	Geldokumentationsanlage TFP-M/WL
Ochs Laborfachhandel e. K., Bovenden	Hungateröhrchen
Olympus Deutschland GmbH, Hamburg	Mikroskop CH20
Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen	Elektroporationsküvetten, peqGold Gel Extraction Kit
Sartorius AG, Göttingen	Biostat B Plus Twin Fermenter
Sarstedt AG & Co., Nürnberg	50-ml Röhrchen, 0,2 µm Sterilfilter, Plastikküvetten, Einmal-Impföse, Einmal-Spatel
Schütt Labortechnik GmbH, Göttingen	Wasserbad
Thermo Scientific Inc., Braunschweig	dNTPs, Fast-AP, GeneRuler 1kB DNA Ladder, Mass Ruler (SM403), Restriktionsenzyme, Protein Molecular Weight Marker (SM0431, SM0672), T4-DNA-Ligase

3. Ergebnisse

Zur Erzeugung und Optimierung biotechnologischer Produktionsstämme werden unterschiedliche Strategien angewandt, welche Veränderungen in enzymatischen und regulatorischen Funktionen im jeweiligen Produktionsstamm bewirken (Steinbüchel & Lütke-Eversloh, 2003; Atsumi *et al.*, 2008; Keasling, 2010). Diese sind auch unter dem Begriff „Metabolic Engineering“ zusammengefasst (Stephanopoulos *et al.*, 1998). Dementsprechend war das Ziel dieser Arbeit die Veränderung des Metabolismus des obligaten Anaerobiers *C. acetobutylicum* zur Produktion von 1,4-Butanol (1,4-BDO).

Die Etablierung des neuen Biosyntheseweges von 1,4-BDO erfolgte durch eine plasmidbasierte, heterologe Expression der bifunktionellen 4-Hydroxybutyryl-CoA Dehydratasen/Vinylacetyl-CoA- Δ -Isomerasen (4HBD) aus *C. aminobutyricum*, *C. beijerinckii* bzw. *C. kluyveri* im Wirtsorganismus *C. acetobutylicum*. Neben unterschiedlichen Strategien zur Produktionssteigerung konnte ebenso die Verwertung verschiedener Kohlenstoffquellen für die 1,4-BDO-Produktion gezeigt werden. So ist der Einsatz von Lignocellulosehydrolysaten als kostengünstiges, nicht mit der Lebensmittelindustrie konkurrierendes Substrat für die 1,4-BDO-Produktion möglich. Darüber hinaus erfolgte neben dem GC/MS-Nachweis von 1,4-BDO auch die Validierung mittels einer auf Dünnschichtchromatografie basierten Nachweismethode.

3.1 1,4-Butanoltoleranz von *C. acetobutylicum* ATCC 824

Zur Vorbereitung dieser Arbeit erfolgte die Überprüfung der Toleranz von *C. acetobutylicum* gegenüber der zu produzierenden Verbindung 1,4-BDO. Chemische Verbindungen, die von biotechnologischen Produktionswirten heterolog erzeugt werden, können einen inhibierenden Effekt auf den jeweiligen Produktionsstamm ausüben und dadurch die Ausbeuten negativ beeinflussen (Maiorescu *et al.*, 1983).

Bisher ist nicht bekannt, dass die hochreduzierte Verbindung 1,4-BDO natürlich synthetisiert wird (Yim *et al.*, 2011). Da die Produkttoleranz ein wesentlicher Faktor bei der Realisierbarkeit von biotechnologischen Produktionsprozessen ist (Burk, 2010), wurde das Wachstum des Wirtsstamms bei verschiedenen Konzentrationen von 1,4-BDO dokumentiert.

Dazu erfolgte die Anzucht von *C. acetobutylicum* in 10 ml MS-MES mit unterschiedlichen Konzentrationen an 1,4-BDO (0 bis 144 g/l) für 75 h bei 37 °C. Der Wachstumsverlauf ist in der Abbildung 3.1 dargestellt.

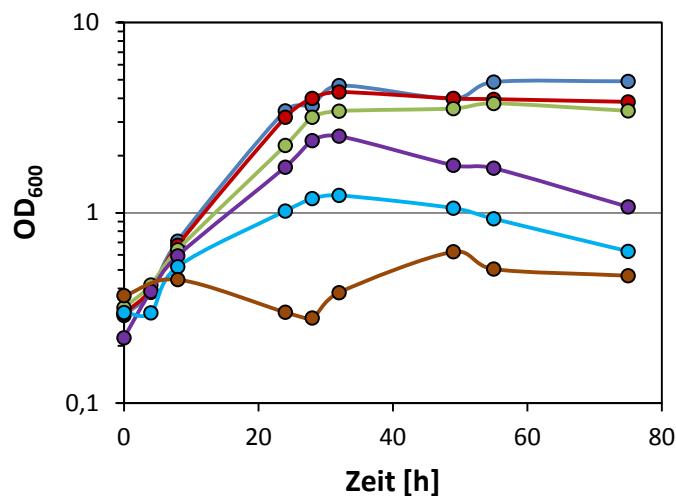


Abb. 3.1: Wachstum von *C. acetobutylicum* ATCC 824 in Anwesenheit von unterschiedlichen 1,4-BDO-Konzentrationen. 10 ml MS-MES, 37 °C, 75 h. 0 g/l (●); 18 g/l (●); 36 g/l (●); 54 g/l (●); 72 g/l (●); 144 g/l (●). n ≥ 3.

C. acetobutylicum ist in der Lage, Konzentrationen von bis zu 5 % [w/v] 1,4-BDO zu tolerieren und verfügt damit im Vergleich zu *E. coli* (5 - 6 %) über eine ähnliche Toleranz gegenüber 1,4-BDO (Burk, 2010). Erste signifikante Inhibitionseffekte auf das Wachstum traten erst ab einer Konzentration von 54 g/l auf ($p < 0,05$). Es kam zu einer Verlangsamung des Wachstums und zu einem Peak mit Erreichen der stationären Phase, gefolgt von einer Abnahme der OD₆₀₀. Jenes spiegelte sich ebenfalls in den Wachstumsraten und Verdopplungszeiten wider (Tab. 3.1). Dieser Effekt verstärkte sich bei einer Konzentration von 72 g/l. Bei 144 g/l konnte kein Wachstum mehr festgestellt werden.

Tab. 3.1: Wachstumsraten (μ) und Verdopplungszeiten (t_d) von *C. acetobutylicum* bei unterschiedlichen 1,4-BDO-Konzentrationen.

1,4-BDO [g/l]	Wachstumsrate [h^{-1}]	Verdopplungszeit [min]
0	0,11	378
18	0,10	398
36	0,084	491
54	0,075	553**
72	0,061	675
144	---	---

** p < 0,05

Der Einfluss von 1,4-BDO zeigte sich nicht nur beim Wachstumsverhalten, sondern auch auf morphologischer Ebene. Parallel zu den Messungen der optischen Dichte (2.6.1) wurden die Kulturen lichtmikroskopisch (Olympus CH20) untersucht.

Im Konzentrationsbereich von 0 - 36 g/l 1,4-BDO zeigten die Zellen für *C. acetobutylicum* charakteristische Morphologien (Jones *et al.*, 1982) (Abb. 3.2). So wiesen Zellen der späten exponentiellen Wachstumsphase (24 h) ein stäbchenförmiges und im Phasenkontrast dunkles Erscheinungsbild auf. Nach 48 h und dem Erreichen der stationären Wachstumsphase (Abb. 3.1) konnten zunehmend Vorsporen detektiert werden und nach 75 h waren auch einzelne freie Sporen sichtbar. Mit zunehmender 1,4-BDO-Konzentration (54 g/l) zeigten die Zellen weiterhin ihre stäbchenförmige Morphologie, die Anzahl der gebildeten Vorsporen sowie freien Sporen war jedoch stark reduziert. Die deutlichsten morphologischen Veränderungen traten bei den beiden höchsten 1,4-BDO-Konzentrationen auf (72 g/l und 144 g/l). Diese führten zu einem kompletten Ausbleiben der Bildung von Vorsporen bzw. freien Sporen. Stattdessen kam es zu einer Verlängerung der vegetativen Zellen, was unter Mikroorganismen ein weitverbreitetes Verhalten ist, wenn sie unter stressvollen Bedingungen leben (Shi und Xia, 2003; Pianetti *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012).

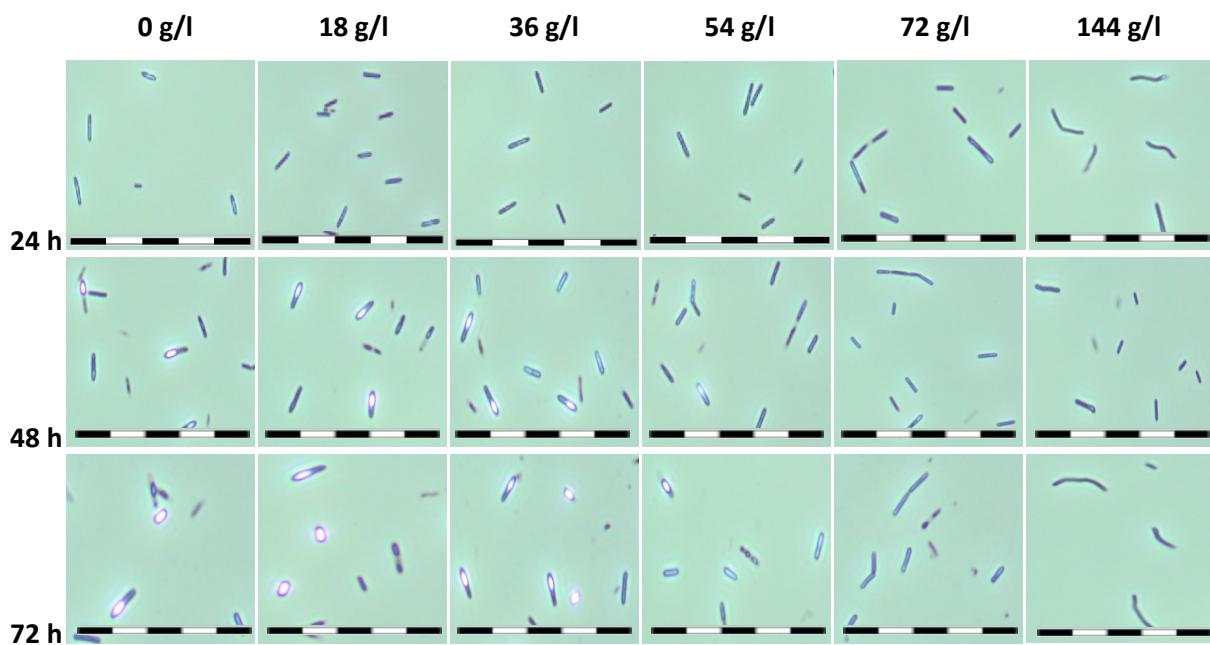


Abb. 3.2: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von *C. acetobutylicum* bei verschiedenen 1,4-BDO-Konzentrationen. 40-fache Vergrößerung; Größenbalken: 50 µm; n = 2.

3.2 Nachweismethoden für 1,4-Butandiol

Nachdem gezeigt werden konnte, dass *C. acetobutylicum* in der Lage ist, 1,4-BDO-Konzentrationen von mindestens 54 g/l zu tolerieren, sollte im nächsten Schritt eine geeignete Nachweismethode für 1,4-BDO etabliert werden. Hierfür wurden zwei verschiedene Ansätze erprobt.

3.2.1 Dünnschichtchromatografie-basierte Nachweismethode

Zu Beginn der Arbeiten sollte eine möglichst schnelle, einfache und kostengünstige Methode zum Nachweis von 1,4-BDO entwickelt werden. Hierfür wurde eine auf Dünnschichtchromatografie-basierende Nachweismethode evaluiert (2.7). Die auf einer mit Kieselgel beschichteten DC-Fertigfolie (Macherey-Nagel) aufgetragenen Proben wurden nach entsprechender Auftrennung mit einem Vanillinreagenz zur Visualisierung der Spots besprüht und zeigten eine für 1,4-BDO spezifische Pinkfärbung (Abb. 3.3). Ähnliche Moleküle, wie das 1,3-Propandiol und 2,3-Butandiol, wiesen unter gleichen Bedingungen eine Lila- bzw. Blaufärbung auf (Anand und Saxena, 2012).

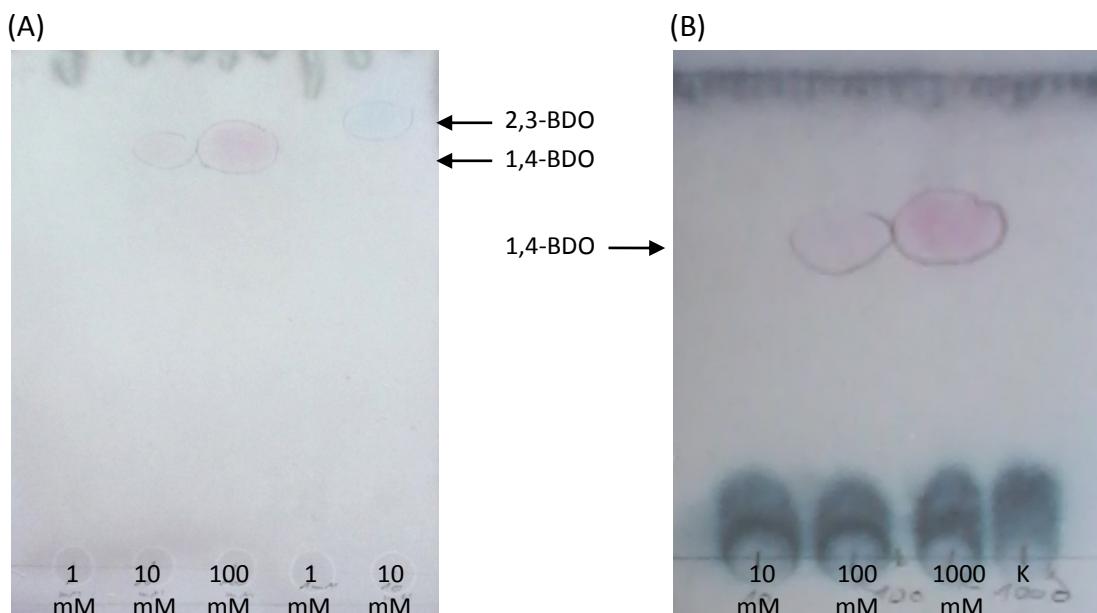


Abb. 3.3: Dünnschichtchromatogramm von 1,4-BDO. Zur Visualisierung wurde ein Vanillin-Sprühreagenz angewandt. (A) 1,4-BDO und 2,3-BDO (Sigma-Aldrich). (B) 1,4-BDO (Sigma-Aldrich) gemischt mit *C. acetobutylicum*-Kulturüberstand (48 h). K, Kontrolle, Kulturüberstand ohne Zusatz von 1,4-BDO.

Mit Hilfe der Dünnschichtchromatografie (DC) war es also möglich, 1,4-BDO aus einem Gemisch aufzutrennen und zu visualisieren. Dabei ließ sich 1,4-BDO durch eine Vanillin-Färbelösung spezifisch anfärben (rosa Spots), während strukturell ähnliche Moleküle, wie 2,3-BDO, eine charakteristische Blaufärbung zur Folge hatten. Die Intensität der 1,4-BDO-Färbung war von der eingesetzten Konzentration abhängig (Abb. 3.3, A; A1 und A2). Bis zu 10 mM waren die Spots mit bloßen Augen noch feststellbar, bei niedrigeren Konzentrationen (< 10 mM) erschwerte die Hintergrundfärbung die optische Beurteilung.

Weiterhin wurde die Anwendbarkeit dieser Methode zur Detektion von 1,4-BDO in Kulturüberständen überprüft. Dazu wurden die Überstände einer 48-stündigen *C. acetobutylicum* Kultur mit unterschiedlichen Konzentrationen 1,4-BDO versetzt und über DC aufgetrennt. Die Visualisierung erfolgte ebenfalls über die Vanillin-Färbelösung. Es zeigte sich, dass die im Überstand enthaltenen Stoffwechselprodukte (Aceton, Butanol und Ethanol) keinen Einfluss auf die Auftrennung oder die Anfärbung hatten (Abb. 3.3, B; A2).

Da in den Arbeiten von Yim *et al.* (2011) und Hwang *et al.* (2014) eingangs deutlich geringere 1,4-BDO-Konzentrationen (0,6 mM bzw. 0,3 mM) erzielt wurden, ist davon auszugehen, dass die nachzuweisenden Konzentrationen in *C. acetobutylicum* in einem ähnlichen Bereich sein werden. Aus diesem Grund musste eine sensitivere Nachweismethode etabliert werden.

3.2.2 GC/MS-basierte Nachweismethode

1,4-BDO ist aufgrund seiner endständigen Hydroxylgruppen ein sehr polares Molekül, was seine gaschromatografische Auftrennung deutlich erschwert (pers. Mitteilung, Dr. Rentsch). Aus diesem Grund wurde 1,4-BDO zunächst mittels N-Methyl-N-tert-butyldimethylsilyl-tifluoracetamid (MBDSTFA, Macherey-Nagel) silyliert (Abb. 3.4) (2.6.6.2). Durch den Austausch der endständigen Hydroxylgruppen durch Silylgruppen wechselt der polare Charakter des Moleküls zu einem apolaren, gleichzeitig wird die Molekülstabilität erhöht und so eine bessere gaschromatografische Auftrennung ermöglicht (Corey und Venkateswarlu, 1972).

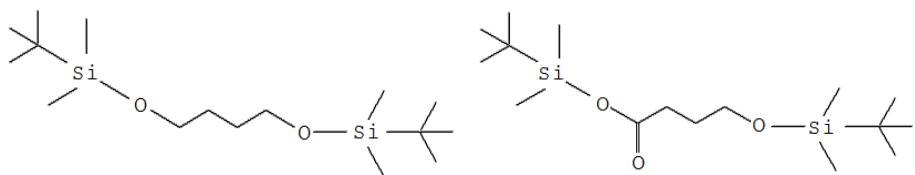


Abb. 3.4: Schematische Darstellung von 1,4-BDO (links) und GHB (rechts) nach Silylierungsreaktion mit MBDSTFA. Erläuterungen siehe Text.

Die Normierung der Proben erfolgte über einen isotopenmarkierten internen Standard (IS), einem 8-fach-deuterierten 1,4-BDO (1,4-BDO-d8, Sigma-Aldrich), in dem alle Wasserstoffatome im Molekül durch Deuteriumatome ersetzt sind. Die chemischen Eigenschaften wurden dabei jedoch nicht verändert, sodass sich der IS analytisch ähnlich zu dem zu untersuchenden 1,4-BDO verhielt. Über einen massenselektiven Detektor konnte zwischen deuterierten und undeuterierten Verbindungen unterschieden werden. Die Unterscheidung beider Verbindungen erfolgte über die Auswerteionen 219 für 1,4-BDO und 221 für 1,4-BDO-d8. Vorversuche ergaben, dass in den Kulturproben der rekombinanten Stämme zusätzlich γ-Hydroxybutyrat (GHB) detektiert werden konnte. Für dessen qualitative und quantitative Analyse wurde es ebenso wie 1,4-BDO silyliert (Abb. 3.4) und über einen entsprechenden isotopenmarkierten internen Standard (GHB-d6, Sigma-Aldrich) normiert. Die für die Auswertung herangezogenen SIM-Ionen waren 317 für GHB und 323 für GHB-d6. Über ein entsprechendes SIM-Chromatogramm (Abb. 3.5) konnte durch das Verhältnis der Fläche des Analyten zur Fläche des dazugehörigen IS und mit Hilfe von erstellten Eichgeraden (Tab. A1; Abb. A3 und A4) die Konzentrationsbestimmung der jeweiligen Verbindungen erfolgen.

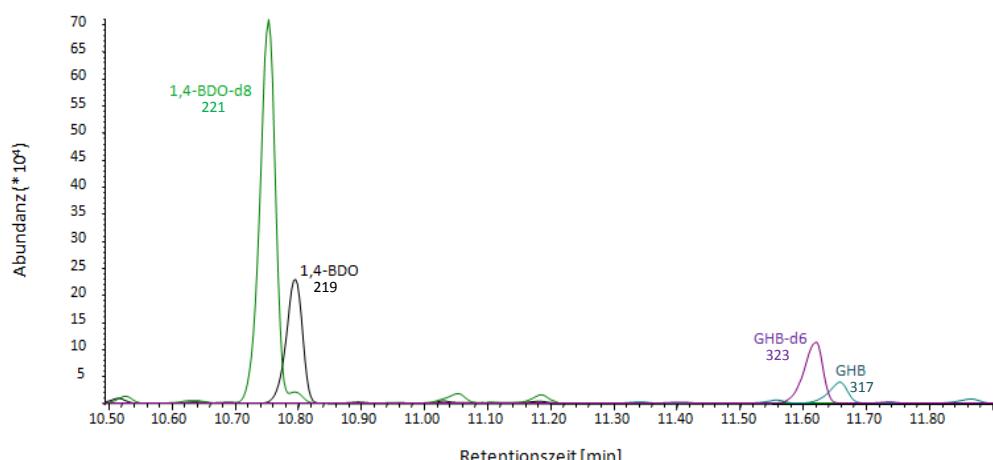


Abb. 3.5: SIM-Chromatogramm von 1,4-BDO und GHB. Erläuterungen siehe Text.

3.3 Generierung von rekombinanten *C. acetobutylicum*-Stämmen zur Produktion von 1,4-Butandiol

Die in der Arbeit verwendeten und eingangs beschriebenen 4HBDs aus *C. aminobutyricum* (*AbfD*), *C. beijerinckii* (*cbei_2100*) und *C. kluyveri* (*ckl_3020*) zeigten für die Aminosäure-Sequenzen in *in silico*-Analysen (Abb. A5) eine Übereinstimmung von 73 - 79 % und besaßen das für 4HBDs charakteristische [4Fe-4S]²⁺-Cluster-Motiv (CX₃CX₁₇₉₋₁₈₃HX₆C). Dabei sind die katalytisch relevanten Aminosäuren in den aktiven Zentren (Martins *et al.*, 2004) konserviert.

Die jeweiligen 4HBD-kodierenden Gene wurden mittels PCR (2.8.2) amplifiziert (Abb. 3.6, C) und über entsprechende Oligonukleotide (Tab. 2.4) mit Restriktionsschnittstellen am 5'- und 3'- Ende für eine Insertion in den pTc-Shuttlevektor (Abb. 3.7) versehen. Als PCR-Matrize für die Gene *cbei_2100* und *ckl_3020* diente die zuvor isolierte chromosomal DNA (2.8.2.2) aus *C. beijerinckii* bzw. *C. kluyveri* (Abb. 3.6, A). Für die Amplifizierung des *abfD*-Gens aus *C. aminobutyricum* wurde der Vektor pASK-IBA3⁺::*abfD* (Gerhardt *et al.*, 2000) herangezogen (Abb. 3.6, B).

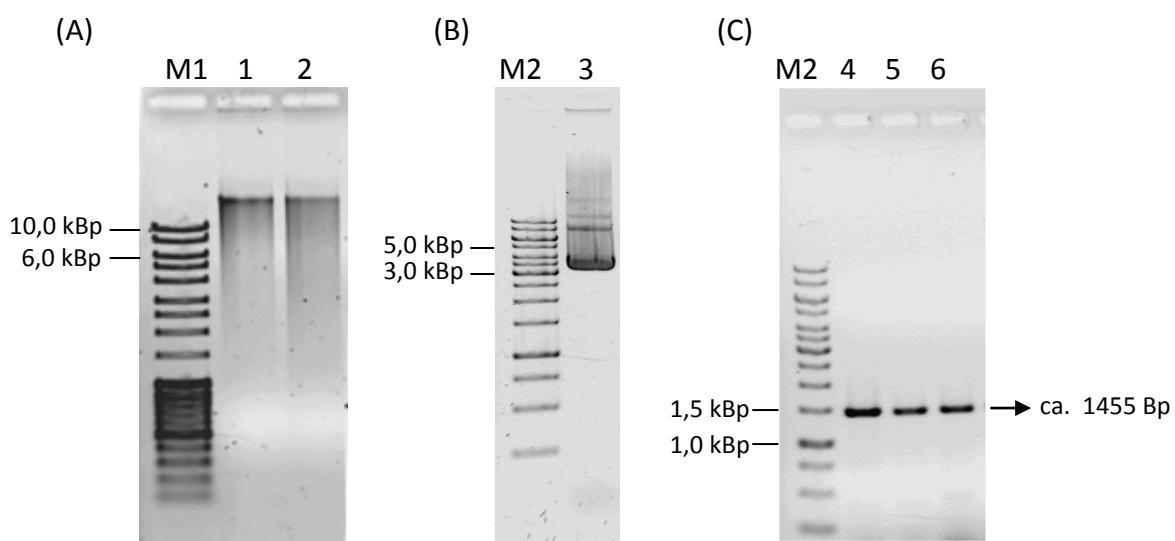


Abb. 3.6: Erzeugung der 4HBD-kodierenden Gene *cbei_2100*, *ckl_3020* und *abfD*. 0,8%ige Agarosegele. (A) Chromosomal DNA (1 µg pro Spur) von *C. beijerinckii* (Spur 1) und *C. kluyveri* (Spur 2). Spur M1: MassRuler™ DNA-Ladder Mix. (B) Plasmid-DNA pASK-IBA3⁺::*abfD* (4 µg Spur 3). Spur M2: 1kb-GeneRuler™ DNA-Ladder. (C) PCR-Amplifikate der Gene *cbei_2100* (Spur 4), *ckl_3020* (Spur 5) und *abfD* (Spur 6).

Der pTc-Vektor (Wietzke, unveröffentlicht) (Abb. 3.7), ein Derivat des pT-Vektors (Girbal *et al.*, 2005) (Abb. A6), gestattet die homologe und heterologe Expression von Genen sowohl in Gram-positiven als auch in Gram-negativen Bakterien. Möglich ist dies durch die beiden Replikationsursprünge „repL“ und „pBR322“. Diese genetische Ausstattung erlaubte den Einsatz des Vektorsystems als Shuttle-Vektor für die Bakterien *Escherichia coli* und *C. acetobutylicum*. Darüber hinaus verfügte jener Vektor über einen C-terminalen *Strep-tag II* für eine spätere Proteinaufreinigung, zwei Resistenzgene (*bla/catP*) und über einen konstitutiven ThiolaseA-Promotor (P_{thlA}), welcher eine starke und konstante Expression gewährleistet (Tummala *et al.*, 1999).

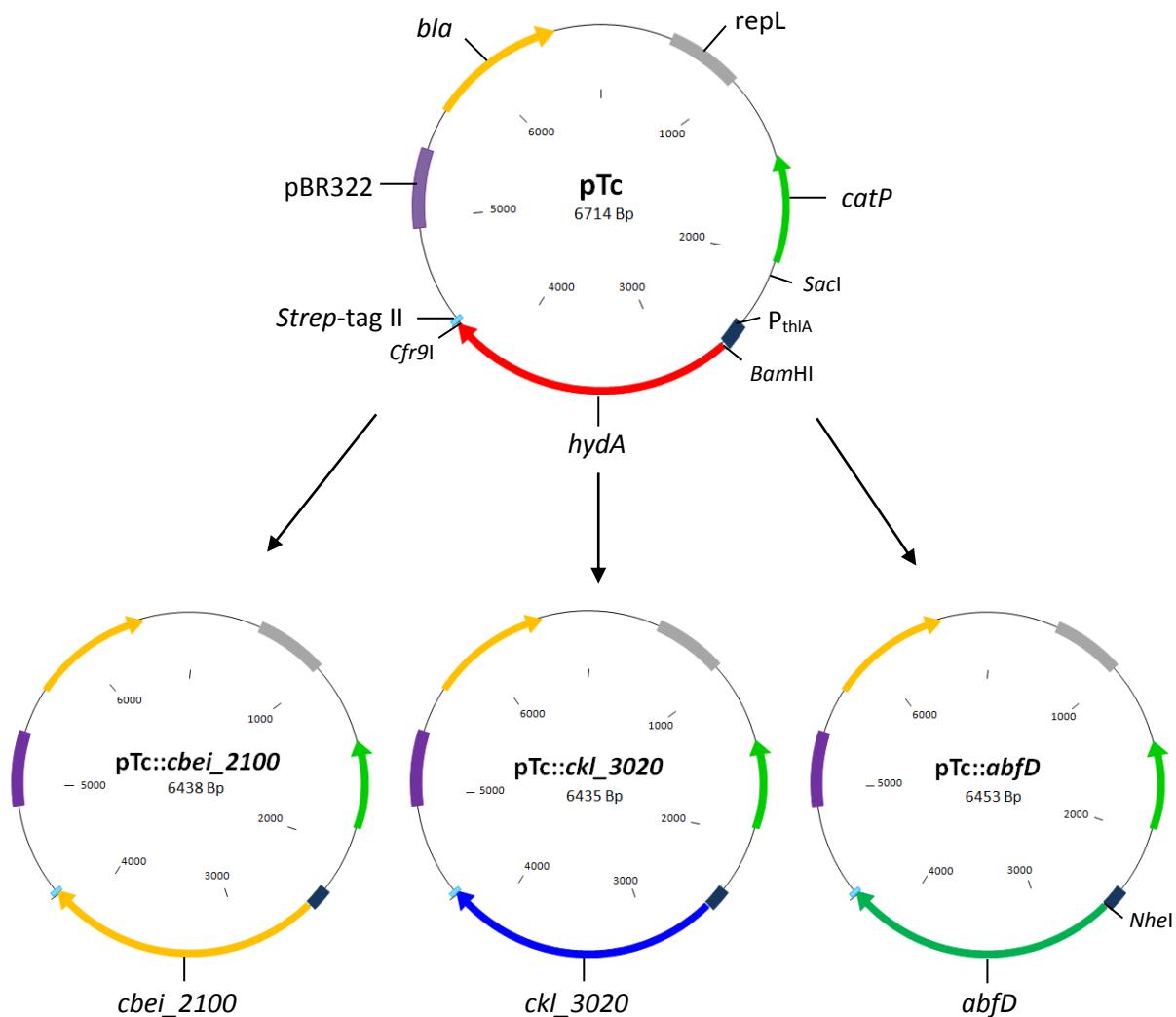


Abb. 3.7: Vektorarten. Der obere Vektor stellt den Ausgangsvektor pTc dar. Die untere Vektorreihe zeigt die generierten Vektoren mit den 4HBD-kodierenden Genen. (Erläuterungen siehe Text).

Durch Behandlung des pTc-Vektors mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Cfr*9I wurde das Hydrogenase-Gen (*hydA*) entfernt (2.8.3.1) und nach einer anschließenden Ligationsreaktion (2.8.3.3) durch die entsprechenden 4HBD-kodierenden Gene ersetzt. Für die Insertion der beiden Gene *cbei_2100* und *ckl_3020* in den Vektor waren keine weiteren Anpassungen der Restriktionsschnittstellen notwendig, jedoch für die Insertion des Gens *abfD*. Hierfür musste die *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle des pTc-Vektors ausgetauscht werden, da diese auch im *abfD*-Gen vorhanden war. Zu diesem Zweck wurde der Vektorbereich zwischen den Schnittstellen *Sac*I und *Bam*HI (Abb. 3.7) mit spezifischen Oligonukleotiden (Tab. 2.4) amplifiziert. Die verwendeten Oligonukleotide verfügten am 5'-Ende anstelle der *Bam*HI- eine *Nhe*I-Schnittstelle mit einer nachfolgenden *Cfr*9I-Erkennungsstelle. Infolgedessen wurde die *Bam*HI- durch eine *Nhe*I-Schnittstelle ersetzt. Die *Nhe*I- und *Cfr*9I-Erkennungsstellen waren nun direkt aufeinanderfolgend. Anschließend wurde sowohl der pTc::*hydA*-Vektor als auch das PCR-Amplifikat mit den Restriktionsenzymen *Sac*I und *Cfr*9I verdaut. Es ergab sich für den Verdau des Vektors ein 4515 Bp- und ein 2199 Bp-Fragment, welches den ThiolaseA-Promotor und das *hydA*-Gen enthielt. Das 2199 Bp-Fragment wurde nachfolgend durch den zuvor amplifizierten Vektorbereich ersetzt (2.8.3.3). Der neu generierte Vektor verfügte nun über den ThiolaseA-Promotor, aber nicht mehr über das *hydA*-Gen. Es folgten die Restriktion des angepassten Vektors und des *abfD*-Gens mit den Restriktionsenzymen *Nhe*I und *Cfr*9I sowie die anschließende Klonierung des *abfD*-Gens in den Vektor.

Zur Kontrolle der korrekten Integration der 4HBD-kodierenden Gene wurden die Konstrukte aus transformierten *E. coli*-Zellen (Tab. 2.1) isoliert und einem Kontrollverdau unterzogen (Abb. 3.8). Des Weiteren wurden die Genbereiche mittels Sequenzierung (LGC Genomics, Berlin) auf mögliche Veränderungen in den Nukleotidsequenzen überprüft (Abb. A7-9).

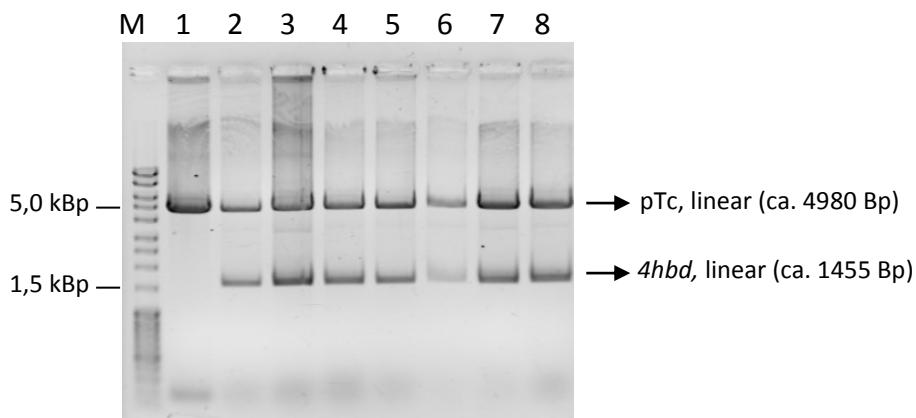


Abb. 3.8: Kontrollrestriktion der Plasmide pTc::P(*thlA*)*cbei_2100*, pTc::P(*thlA*)*ckl_3020* und pTc::P(*thlA*)*abfD*.
0,8%iges Agarosegel. Restriktionsenzyme *Bam*H**I**/*Sma***I** bzw. *Nhe***I**/*Sma***I**. Spur M: MassRulerTM DNA-Ladder Mix, Spuren 1-3: pTc::P(*thlA*)*cbei_2100* (Klone 1 [5 µg], 2 [3 µg] und 6 [4 µg]), Spuren 4-6: pTc::P(*thlA*)*ckl_3020* (Klone 8 [3 µg], 15 [3 µg] und 18 [2 µg]), Spuren 7 und 8: pTc::P(*thlA*)*abfD* (Klone 22 [4 µg] und 24 [4 µg]).

Vektoren, welche die erwarteten Restriktionsfragmente (ca. 4980 Bp und 1455 Bp) aufwiesen (Abb. 3.8), wurden anschließend für die Transformation von *C. acetobutylicum* eingesetzt (2.9.2.1) und die Klone mittels Colony-PCR (2.8.2.3), SDS-PAGE (2.10.4) und Western Blot-Analysen (2.10.6) verifiziert (Abb. 3.9). Da die Gene *cbei_2100*, *ckl_3020* und *abfD* nicht im Genom von *C. acetobutylicum* vorkommen und somit keine Falsch-positiven Signale verursachen, konnte ihr Nachweis mittels „Colony“-PCR (2.8.2.3) erfolgen. Nur Klone, die das entsprechende Plasmid aufgenommen haben, zeigten Banden auf Höhe von 1,5 kBp im Agarosegel (Abb. 3.9, A). Jeweils einer der positiven Klone, welche ein entsprechendes Plasmid aufgenommen haben, wurde in 200 ml CGM kultiviert und für die Proteinaufreinigung via Affinitätschromatografie eingesetzt (2.10.2). Elutionsfraktionen mit den höchsten Proteinkonzentrationen wurden für eine SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot verwendet. Im SDS-Polyacrylamidgel (Abb. 3.9, B) und im Western Blot (Abb. 3.9, C) sind entsprechende Banden bzw. Signale der aufgereinigten Proteine erkennbar.

Demnach haben die transformierten *C. acetobutylicum*-Stämme die jeweiligen Plasmide aufgenommen und die auf den Vektoren kodierten Gene exprimiert.

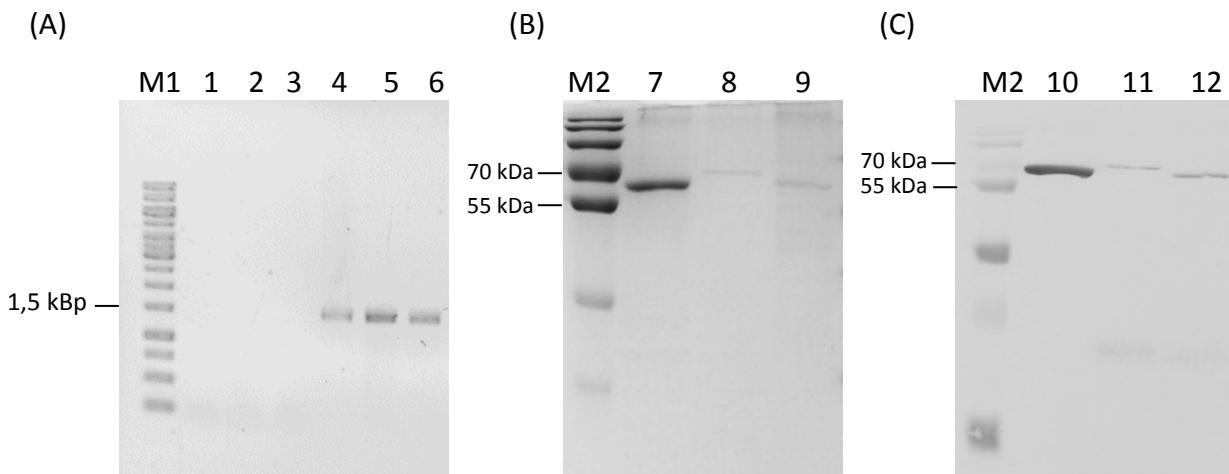


Abb. 3.9: Verifizierung von rekombinanten *C. acetobutylicum*-Klonen. (A) Colony-PCR der Gene *cbei_2100* (Spur 4), *ckl_3020* (Spur 5) und *abfD* (Spur 6). 0,8%iges Agarosegel. Spur M1: GeneRuler™ 1kb DNA-Ladder, Spur 1-3: Negativkontrollen der Oligonukleotide mit *C. acetobutylicum*-WT DNA. (B) SDS-PAGE der aufgereinigten Proteine *Cbei_2100* (Spur 7; 3 µg), *Ckl_3020* (Spur 8; 1 µg) und *AbfD* (Spur 9; 1 µg) nach kolloidaler Coomassie-Färbung. 12%iges SDS-Polyacrylamidgel. Spur M2: PageRuler™ Prestained-Protein Ladder. (C) Western Blot der aufgetrennten Proteine *Cbei_2100* (Spur 10), *Ckl_3020* (Spur 11) und *AbfD* (Spur 12). Detektion erfolgte über Strep-Tactin Antikörper.

3.4 Wachstumsphysiologische Charakterisierung von generierten 1,4-BDO-Produktionsstämmen

Die rekombinanten *C. acetobutylicum*-Stämme (*C. acetobutylicum* pTc::P(*thIA*)*cbei_2100*, *C. acetobutylicum* pTc::P(*thIA*)*ckl_3020* und *C. acetobutylicum* pTc::P(*thIA*)*abfD*) (3.3) wurden in 200-ml MS-MES kultiviert (2.5.2.2) und wachstumsphysiologisch charakterisiert (2.6). Die Abbildungen 3.10 und 3.11 zeigen den Verlauf der optischen Dichten, pH-Werte und der gebildeten Gärungsprodukte. Weiterhin erfolgte die Analyse der 1,4-BDO-Bildung (Abb. 3.12). Zu Vergleichszwecken wurden der Typstamm *C. acetobutylicum* ATCC 824 und ein Vektorkontrollstamm (pTc-empty) mitgeführt.

3.4.1 Wachstumsverlauf und Gärungsprodukte

Hinsichtlich des Verlaufes der optischen Dichte unterschieden sich die beiden Expressionsstämmen *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*ckl_3020* und *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*abfD* nicht von den Kontrollstämmen. Einzig *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*cbei_2100* zeigte ein abweichendes Wachstumsverhalten (Abb. 3.10).

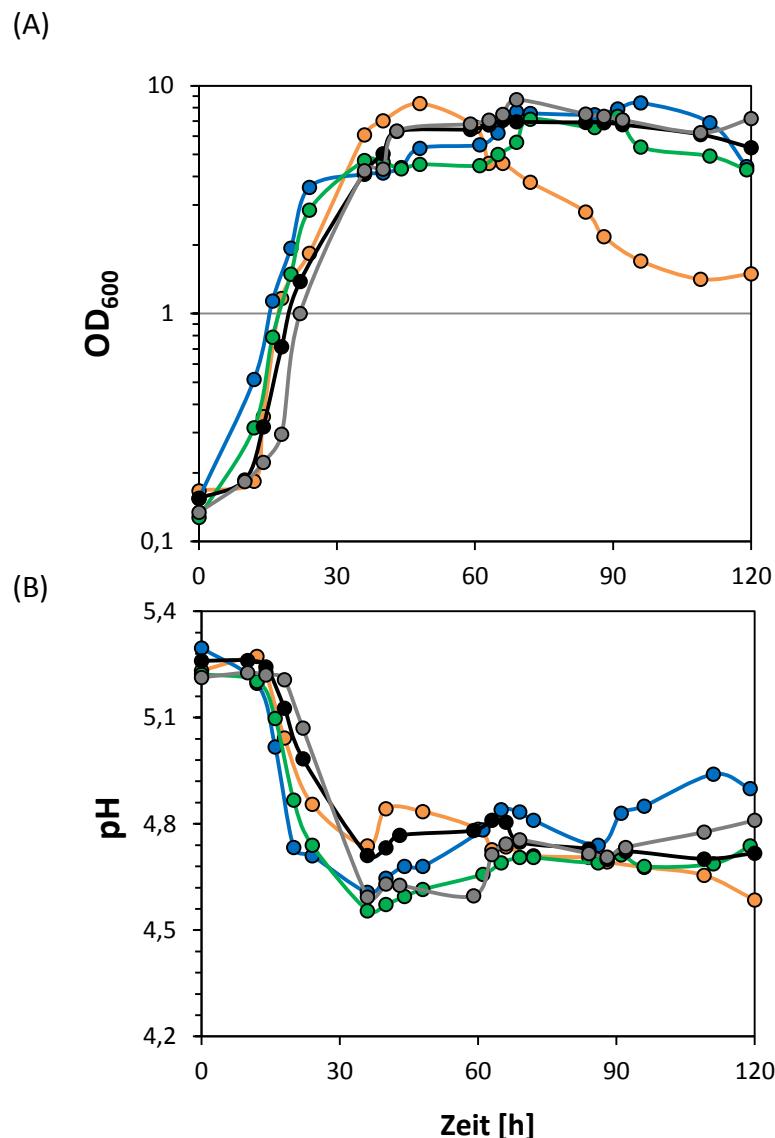


Abb. 3.10: Kultivierungsexperimente von *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*cbei_2100* (●), *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*ckl_3020* (○) und *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*abfD* (○) vergleichend zum *C. acetobutylicum* ATCC 824 Typstamm (●) und *C. acetobutylicum* Kontrollvektorstamm (○). (A) Optische Dichte bei 600 nm. (B) ph-Wert. 200 ml MS-MES, 120 h, 37 °C, n = 3 (aus Übersichtlichkeitsgründen wurde auf die Darstellung der Fehlerbalken verzichtet).

Nach einer ca. 12-stündigen *lag*-Phase gingen die Kulturen in die exponentielle Wachstumsphase über (Abb. 3.10, A). Dabei zeigten die Expressionsstämme *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*ckl_3020* ($\mu = 0,13 \text{ h}^{-1}$) und *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*abfD* ($\mu = 0,129 \text{ h}^{-1}$) eine ähnliche Wachstumsgeschwindigkeit wie der Vektorkontrollstamm ($\mu = 0,134 \text{ h}^{-1}$). Der Expressionsstamm *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*cbei_2100* ($\mu = 0,146 \text{ h}^{-1}$) besaß die höchste ermittelte Wachstumsrate (Tab. A2). Dieser Stamm erreichte bereits nach 48 h als erstes die maximale optische Dichte von 8,35. Im Vergleich zu den weiteren Stämmen war die Wachstumsrate des Wildtyps ($\mu = 0,116 \text{ h}^{-1}$) am geringsten. Die exponentielle Wachstumsphase wurde anschließend nach etwa 40 h von der stationären Wachstumsphase abgelöst. Hierbei zeigte ebenfalls einziger *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*cbei_2100* ein abweichendes Verhalten, indem nach Erreichen eines Peaks die optische Dichte deutlich abnahm. Die finale OD lag nach 120 h bei 1,5.

Zusätzlich zu der optischen Dichte wurde der extrazelluläre pH-Wert der Kulturen gemessen (Abb. 3.10, B). Der Ausgangswert von ca. 5,2 sank mit Eintreten der Kulturen in die exponentielle Wachstumsphase aufgrund der Produktion der Säuren Acetat und Butyrat (Abb. 3.11, A und B) bis auf einen Minimalwert von pH 4,6 (*C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*abfD*). Die pH-Werte des Wildtyps und von *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*cbei_2100* sanken indes nur bis jeweils 4,7. Mit dem Übergang in die stationäre Wachstumsphase setzte der für *C. acetobutylicum* charakteristische „Lösungsmittelshift“ ein. Dieser ging mit der Assimilierung der Säuren und deren Umwandlung in die pH-neutralen Lösungsmittel Aceton, Butanol und Ethanol einher (Abb. 3.11, C, D und E). Dies wiederum führte zu einem erneuten, leichten Anstieg des pH-Werts.

Auch im Hinblick auf das Produktspektrum zeigte der Stamm *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*cbei_2100* ein abweichendes Verhalten im Vergleich zu allen anderen untersuchten Stämmen (Abb. 3.11). Deutliche Unterschiede traten vor allem beim „Lösungsmittelshift“ und somit bei der Assimilation der Säuren Acetat und Butyrat auf (Abb. 3.11, A und B).

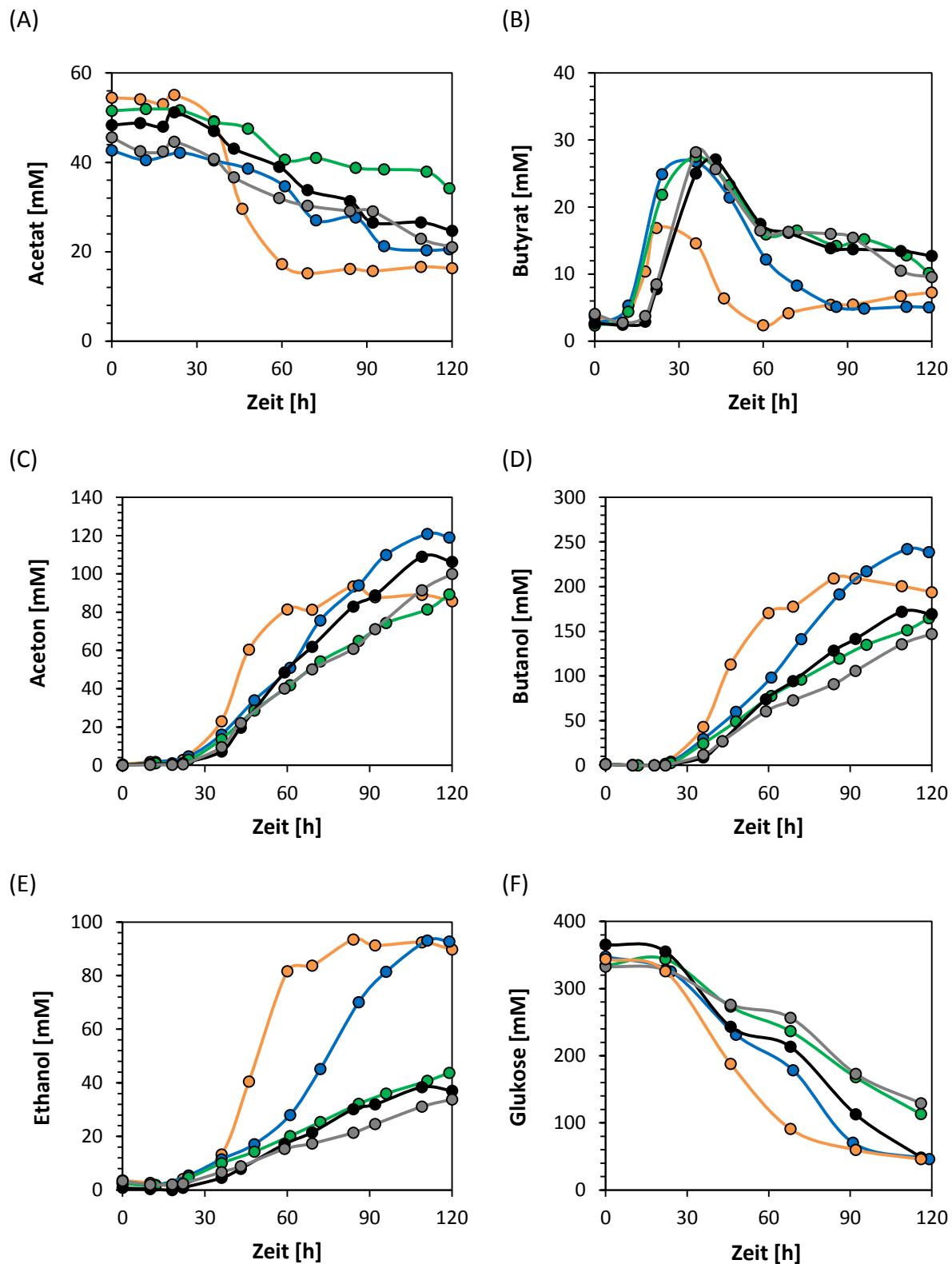


Abb. 3.11: Gärungsprodukte der Kultivierungsexperimente *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*cbei_2100* (●), *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*ckl_3020* (○) und *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*abfD* (■) vergleichend zum *C. acetobutylicum* ATCC 824 Wildtypstamm (●) und *C. acetobutylicum* pTc-Kontrollvektorstamm (○). (A) Acetat, (B) Butyrat, (C) Aceton, (D) Butanol, (E) Ethanol und (F) Glukose, 200 ml MS-MES, 120 h, 37 °C, n = 3.

Die Acetatassimilation der Expressionsstämme *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*ckl_3020* und *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*abfD* sowie der beiden Kontrollstämme erstreckte sich über einen längeren Zeitraum und führte zu einer stetigen Abnahme der Acetatkonzentration über den gesamten Wachstumsverlauf hinweg. Infolgedessen wurde bis zum Ende der Kultivierungsexperimente ca. 50 % (*C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*ckl_3020* und beide Kontrollstämme) bzw. 34 % (*C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*abfD*) Acetat assimiliert (Abb. 3.11, A). Im Gegensatz dazu sank die Acetatkonzentration bei *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*cbei_2100* nach 22 h Kultivierung während der exponentiellen Wachstumsphase deutlich und erreichte nach weiteren 38 h Wachstum einen Minimalwert von ca. 17 mM. Dies entsprach einer Acetatassimilation von 67,5 %.

Der Butyratstoffwechsel von *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*cbei_2100* wies ebenfalls einige Unterschiede zu den anderen Stämmen auf (Abb. 3.11, B). Während des exponentiellen Wachstums kam es zum Anstieg der Butyratkonzentration, welche nach Erreichen eines Peaks aufgrund der Butyratreassimilation wieder sank. Dabei betrug die maximale Butyratkonzentration bei *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*cbei_2100* 17 mM und entsprach damit lediglich 63 % der Butyratkonzentrationen der weiteren Stämme (ca. 27 mM). Darüber hinaus wurde das Maximum bereits nach 22 h und somit 14 h eher im Vergleich zu den anderen Stämmen erreicht. Ebenfalls auffällig war die stärkere Abnahme der Butyratkonzentration bei *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*ckl_3020*, welche bis auf 5 mM herabsank und damit die niedrigste Endkonzentration einnahm.

Mit Übergang in die stationäre Wachstumsphase werden die Säuren assimiliert und die Lösungsmittel Aceton, Butanol und Ethanol gebildet (Jones und Woods, 1986), (Abb. 3.11, C, D und E). Die Lösungsmittelproduktion setzte bei *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*cbei_2100* (22 h) deutlich früher ein als bei allen anderen Stämmen (36 h), diese stagnierte jedoch bereits nach ca. 80 h. Es zeigte sich, dass die Acetonkonzentration trotz früher einsetzender Produktion durch *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*cbei_2100* am geringsten war (85,7 mM) und damit *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*abfD* (89,3 mM) ähnelte. Im Gegensatz dazu produzierte *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*ckl_3020* das meiste Aceton nach 120 h (119,0 mM), (Abb. 3.11, C). Die Ausbeuten an Butanol erhöhten sich bei *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*cbei_2100* (193,7 mM) und deutlich bei *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*ckl_3020* (238,6 mM) im Vergleich zu den beiden Kontrollstämmen (ATCC 824 [169,2 mM] und pTc [147,1 mM]), (Abb. 3.11, D). Die größte Zunahme konnte jedoch bei der Produktion von

Ethanol durch die beiden Stämme *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*cbei_2100* (89,7 mM) und *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*ckl_3020* (92,7 mM) detektiert werden. Die Menge des produzierten Ethanols betrug ca. das 2,5-fache der Konzentration der beiden Kontrollstämme (ATCC 824 [37,0 mM] und pTc [33,8 mM]), (Abb. 3.11, E).

Die höchste Gesamtkonzentration an Lösungsmitteln (28,9 g/l) konnte bei *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*ckl_3020* detektiert werden. Dieser Stamm produzierte 112 % mehr Aceton, 141 % mehr Butanol ($p < 0,01$) und 250 % mehr Ethanol ($p < 0,001$) als die Kontrollstämme.

Es bleibt festzuhalten, dass im Hinblick auf das Wachstumsverhalten und das Produktspektrum der Stamm *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*abfD* ein ähnliches Wachstumsverhalten wie die Kontrollstämme aufwies. Der Stamm *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*cbei_2100* zeigte neben einer früher einsetzenden Assimilation der Säuren auch eine früher einsetzende Lösungsmittelproduktion, wohingegen *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*ckl_3020* sich durch eine deutlich erhöhte Lösungsmittelbildung auszeichnete. Bei beiden letztgenannten Stämmen konnte zudem eine gesteigerte Ethanolproduktion festgestellt werden. Einen genauen Überblick über die Wachstumsparameter und Gärungsprodukte liefert die Tabelle A2 (Anhang).

3.4.2 1,4-Butandiolproduktion

Nachdem die Expressionsstämme *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*cbei_2100*, *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*ckl_3020* und *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*abfD* über eine entsprechende 4HBD verfügten und diese auch exprimierten (3.3), galt es anschließend die Produktion von 1,4-BDO in Kultivierungsexperimenten nachzuweisen. Aus diesem Grund wurde neben der gaschromatografischen Analyse der herkömmlichen Gärungsprodukte (3.4.1) auch die Produktion von 1,4-BDO mittels GC/MS-Analysen überprüft.

Wie aus der Abbildung 3.12 hervorgeht, waren alle drei Expressionsstämme in der Lage 1,4-BDO zu synthetisieren.

Dabei produzierte der Stamm *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*cbei_2100* mit 0,46 mM (41,5 mg/l) 77 % mehr 1,4-BDO als *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*ckl_3020* (0,26 mM, [23,7 mg/l]) und 3,5 mal so viel wie *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*abfD* (0,13 mM,

[11,6 mg/l]). Zur Veranschaulichung wurden auch die entsprechenden Produktivitäten berechnet (Tab. 3.2).

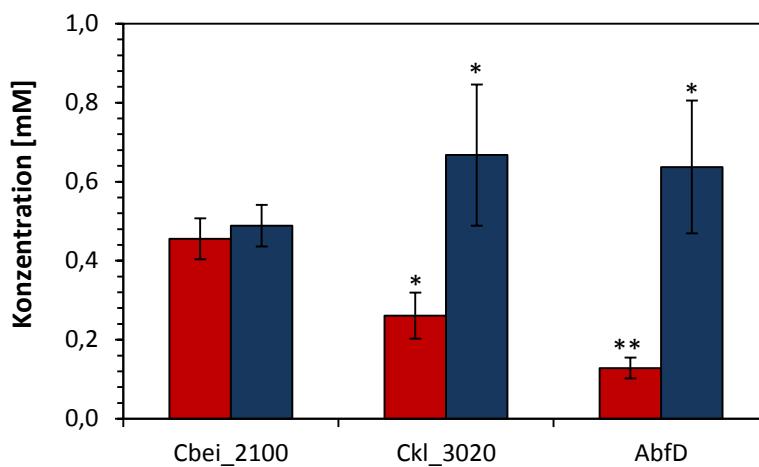


Abb. 3.12: 1,4-BDO- und GHB-Produktion der Expressionsstämme nach 120 h Kultivierung in 200 ml MS-MES.

Cbei_2100, *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*cbei_2100*; Ckl_3020, *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*ckl_3020*; AbfD, *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*abfD*. ■ 1,4-BDO, ■ GHB. * p < 0,05; ** p < 0,01. n = 3.

Darüber hinaus konnte bei den Expressionsstämmen neben 1,4-BDO auch γ -Hydroxybutyrat (GHB) detektiert werden. GHB tritt scheinbar als Nebenprodukt der 1,4-BDO-Synthese auf. Dieses Phänomen wurde bereits 2011 in den Arbeiten von Yim *et al.* festgestellt und auch dort produzierten die frühen rekombinanten Stämme in der Regel mehr GHB als 1,4-BDO. Es zeigte sich, dass mit geringerer 1,4-BDO-Konzentration die Konzentration an GHB zunahm. Dabei betrug die Gesamtkonzentration beider Produkte etwa 1 mM (95 mg/l). Somit lag das 1,4-BDO zu GHB-Verhältnis auf Seiten des GHBs. Im Falle von *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*ckl_3020* war die GHB-Konzentration um den Faktor drei (0,67 mM, [69,8 mg/l]) und bei *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*abfD* um den Faktor 6 (0,64 mM, [66,6 mg/l]) im Vergleich zur jeweiligen 1,4-BDO-Konzentration erhöht. Der Stamm *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*cbei_2100* produzierte mit 0,49 mM (51,0 mg/l) am wenigsten GHB mit einem Verhältnis zu 1,4-BDO von 1:1,1.

Diese Ergebnisse belegen, dass die plasmidgestützte 1,4-BDO-Bildung in *C. acetobutylicum* möglich ist, wodurch der „Proof of Principle“ eindeutig belegt werden konnte. Es ist weiterhin festzuhalten, dass für die 1,4-BDO-Produktion in *C. acetobutylicum* eine einzige, zusätzliche 4HBD ausreichend ist. Für die 1,4-BDO-Bildung konnten die Enzyme aus drei verwandten Organismen der Clostridien experimentell bestätigt werden.

Tab. 3.2: 1,4-BDO-Produktivitäten der Expressionsstämme.

	Biomasse-spezifische Produktivität (mg/l/OD)	Produktivität (mg/l/h)	
	<u>1,4-BDO</u>	<u>GHB</u>	<u>1,4-BDO</u>
			<u>GHB</u>
<i>C. acetobutylicum</i> pTc::P(<i>thlA</i>) <i>cbei_2100</i>	4,97	6,09	0,35
<i>C. acetobutylicum</i> pTc::P(<i>thlA</i>) <i>ckl_3020</i>	2,73	8,26	0,19
<i>C. acetobutylicum</i> pTc::P(<i>thlA</i>) <i>abfD</i>	1,63	9,02	0,11

3.4.3 Zeitlicher Verlauf der 1,4-BDO-Produktion

Neben der Endpunktbestimmung der 1,4-BDO- und GHB-Produktion nach 120 h Kultivierung (Abb. 3.12) wurde zusätzlich der zeitliche Verlauf der 1,4-BDO-Synthese ermittelt (Abb. 3.13). Auch hier unterschied sich *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*cbei_2100* deutlich von den beiden weiteren Expressionsstämmen *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*ckl_3020* und *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*abfD*.

Die 1,4-BDO-Bildung erfolgte im Falle von *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*cbei_2100* kurz nach dem Erreichen der maximalen OD während der frühen stationären Phase. Anschließend stagnierte die gemessene Konzentration nach 60 h Kultivierung auf einem Maximalwert von ca. 0,46 mM. Dies deckte sich ebenfalls mit dem Ende der Lösungsmittelproduktion (Abb. 3.11). Im Gegensatz dazu setzte die Produktion von 1,4-BDO bei *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*ckl_3020* und *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*abfD* erst nach 60 h Kultivierung ein. Die Zunahme war jedoch deutlich schwächer ausgeprägt als bei *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*cbei_2100*. Insbesondere bei *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*abfD* konnte nur ein geringfügiger Anstieg detektiert werden.

Prinzipiell startete die Synthese von GHB bei allen drei Expressionsstämmen bereits während der exponentiellen Wachstumsphase und die gemessenen Konzentrationen erreichten im Falle von *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*ckl_3020* und *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*abfD* erst in der späten stationären Wachstumsphase ihre Maxima. Bei *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*cbei_2100* stagnierten die gemessenen GHB-Konzentrationen zum selben

Zeitpunkt wie die 1,4-BDO-Konzentrationen. Die Produktion von GHB setzte somit deutlich früher und stärker ein als die Synthese von 1,4-BDO.

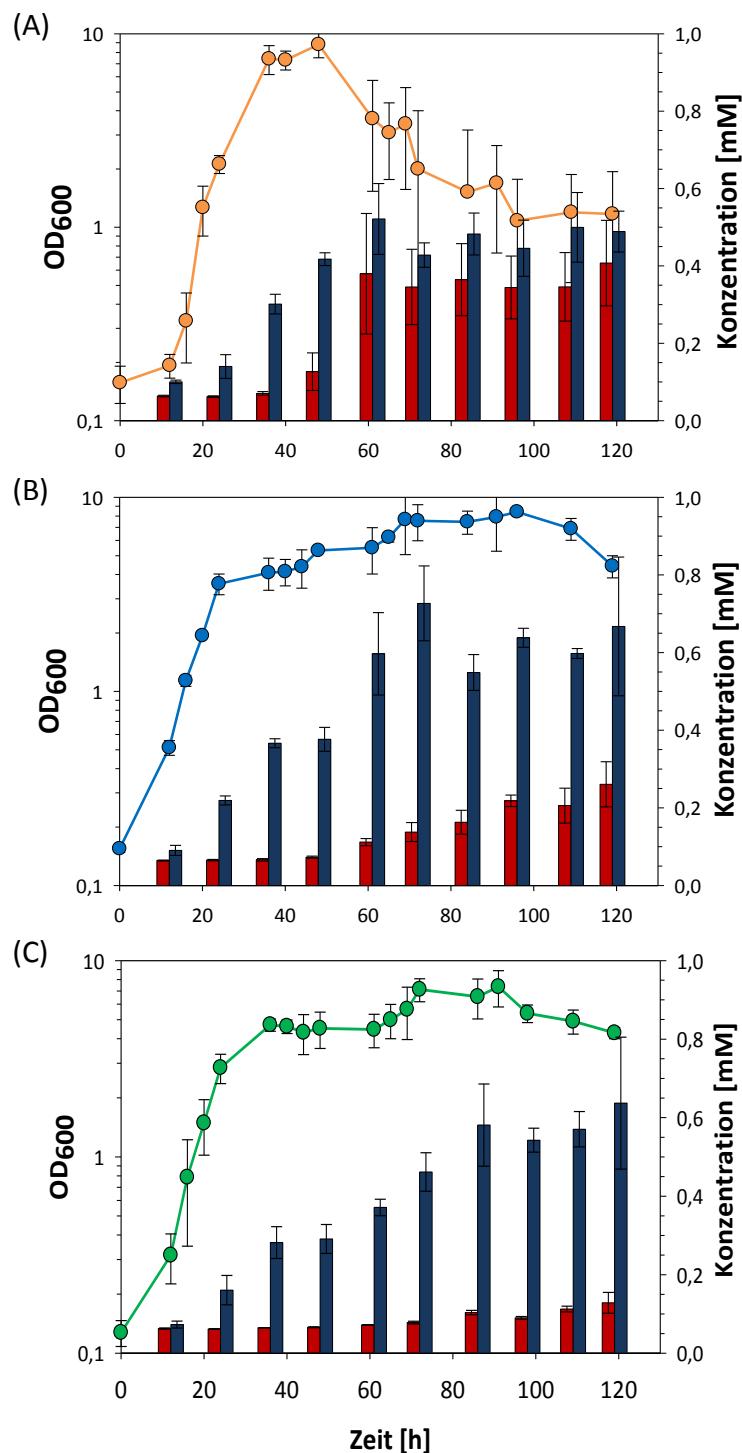


Abb. 3.13: Zeitlicher Verlauf der 1,4-BDO- und GHB-Produktion. (A) *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*cbei_2100*, (B) *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*ckl_3020*, (C) *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*abfD*. ■ 1,4-BDO, ■ GHB. 200 ml MS-MES, 37 °C, n = 3.

3.5 Optimierungsstrategien

Da nachgewiesen werden konnte, dass die generierten Stämme in der Lage waren, 1,4-BDO zu synthetisieren (3.4), lag das Interesse weiterer Arbeiten auf ersten Versuchen zur Optimierung der 1,4-BDO-Produktion. Hierfür sollte zunächst der Einfluss einer Erhöhung des Kulturvolumens („Scale-up“) und die Anwendung eines anderen Minimalmediums untersucht werden (3.5.1). Darüber hinaus wurden verschiedene Kohlenstoffquellen für die Fermentation von *C. acetobutylicum* und deren Einfluss auf die 1,4-BDO-Produktion geprüft, um mögliche Alternativen zur Glukose aufzuzeigen (3.5.2). Weiterhin wurden unterschiedliche Promotoren für die Expression der 4HBD-kodierenden Gene (3.5.3) und diverse Stoffwechseldefektmutanten von *C. acetobutylicum* (3.5.4) als Rezipientenstämme ausgetestet.

3.5.1 pH-regulierte Batch-Fermentation von *C. acetobutylicum*

pTc::P(*thlA*)*cbei_2100*

Für die industrielle Nutzung von mikrobiell erzeugten Verbindungen stellt die Überführung vom Labormaßstab (0,1 – 10 l) zum Industriemaßstab (10.000 – 500.000 l) einen wichtigen Aspekt dar (Takors, 2012). Denn mit Erhöhung des Kulturvolumens können Veränderungen in physiologischen und physikalischen Parametern auftreten, welche zu beeinträchtigenden Reaktionsbedingungen und infolgedessen zu verringerten Produktausbeuten führen (Schmidt, 2005). Daher wurde die experimentelle Erhöhung des Kultivierungsmaßstabes von 0,2 l- auf 1,5 l-Batch-Kulturen vorgenommen. Aufgrund der höchsten erzielten 1,4-BDO-Konzentrationen wurden diese Versuche mit dem Stamm *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*cbei_2100* durchgeführt.

In einem 2-l-Bioreaktor erfolgte die Kultivierung unter Regulation des pH-Wertes. Diese wurde während der Anwachsphase konstant bei pH 5,2 gehalten und erst nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 2,0 auf pH 4,7 herabgesetzt. Neben MS-MES wurde dabei ein weiteres Medium (MMfvK, 2.3.2) eingesetzt.

Hinsichtlich des Wachstumsverhaltens (Abb. 3.14) konnte ein Unterschied zwischen den beiden Medien festgestellt werden. Während der Stamm *C. acetobutylicum*

*pTc::P(*thlA*)*cbei_2100** auf MS-MES frühzeitig in die exponentielle Phase eintrat, musste beim Wachstum in MMfvK jeweils nach 14 h und 29 h weitere 100 ml einer MMfvK-Vorkultur zugeführt werden, damit die Kulturen die *lag*-Phase überbrücken und in die exponentielle Phase eintreten konnten. Dementsprechend wurde die maximale OD₆₀₀ von 9,6 etwa 22 h später erreicht als beim Wachstum auf MS-MES (OD₆₀₀ = 9,4 nach 24 h). Weiterhin auffällig war, dass die optische Dichte nach Erreichen des Maximalwerts beim Wachstum auf MMfvK weniger stark absank (OD₆₀₀ ca. 4,6) als beim Wachstum auf MS-MES (OD₆₀₀ ca. 2,5).

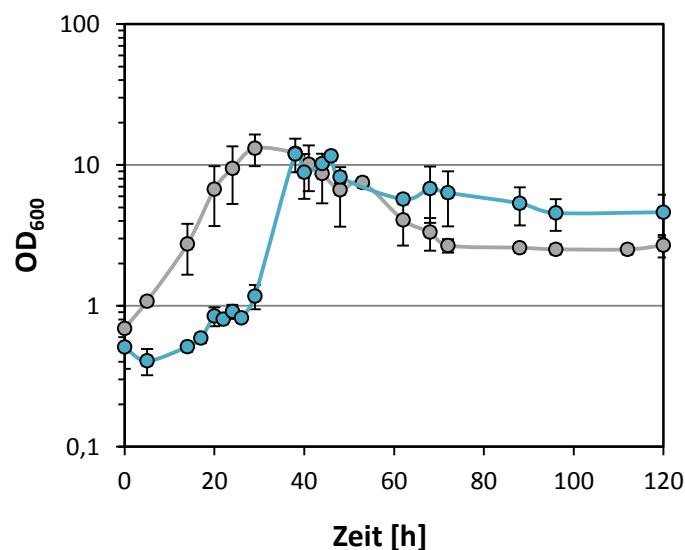


Abb. 3.14: Kultivierungsexperiment von *C. acetobutylicum* *pTc::P(*thlA*)*cbei_2100** in 1,5 l Kulturvolumen. (○) MS-MES, (●) MMfvK. 37 °C. n ≥ 2.

Im Hinblick auf die Produktion synthetisierte der rekombinante *C. acetobutylicum*-Stamm in MS-MES mehr 1,4-BDO (0,23 mM) als in MMfvK (0,12 mM) (Abb. 3.15). Dennoch sank die 1,4-BDO-Konzentration im Vergleich zum 200 ml-Kulturmaßstab um die Hälfte von 0,46 mM (Abb. 3.12) auf 0,23 mM. Im Gegensatz dazu kam es bei der Erhöhung des Kulturvolumens auf 1,5 l zu einer deutlichen Zunahme in der GHB-Produktion. Diese stieg um 225 % von 0,49 mM (Abb. 3.12) auf 1,1 mM. Die GHB-Konzentration beim Wachstum in MMfvK entsprach hingegen mit 0,45 mM annähernd der Konzentration im 200 ml-Maßstab in MS-MES.

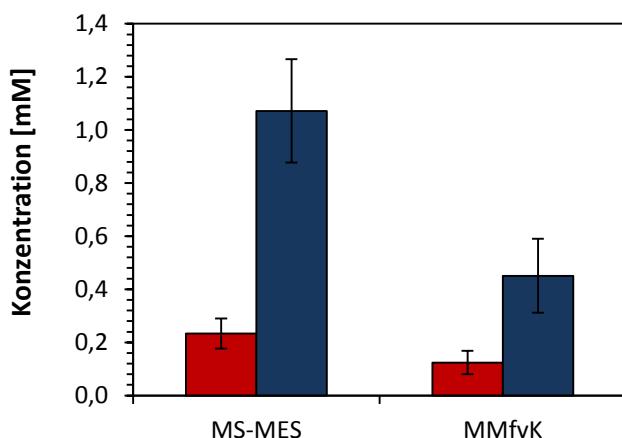


Abb. 3.15: 1,4-BDO- und GHB-Produktion von *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*cbei_2100* in 1,5 l Kulturvolumen in Abhängigkeit verschiedener Medien. 120 h. ■ 1,4-BDO, ■ GHB. n ≥ 2.

3.5.2 Verwendung verschiedener Kohlenhydratquellen

Für die Entwicklung neuer Biosynthesewege wird im Allgemeinen auf das bevorzugte Substrat des jeweiligen Produktionsstammes zurückgegriffen. Häufig handelt es sich dabei um Glukose, da viele heterotrophe Mikroorganismen jene Kohlenhydratquelle präferieren (Servinsky *et al.*, 2010). Um mit Blick auf eine mögliche, zukünftige 1,4-BDO-Synthese durch *C. acetobutylicum* einen größeren Handlungsspielraum im Hinblick auf die Substratnutzung zu bekommen, wurden während dieser Arbeit verschiedene Kohlenhydratquellen (Arabinose, Xylose, Galaktose und Mannose) als Substrate für die 1,4-BDO-Fermentation eingesetzt. Aufgrund der höchsten 1,4-BDO-Produktion wurde dazu der Stamm *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*cbei_2100* verwendet (Abb. 3.12).

Dieser Stamm zeigte auf allen untersuchten C-Quellen ein ähnliches Wachstumsverhalten (Abb. 3.16). Nach einer etwa 12-stündigen *lag*-Phase erfolgte das exponentielle Wachstum. Bei den Pentosen Arabinose und Xylose wurde die maximale OD₆₀₀ von 7,7 bzw. 7,55 nach ca. 60 h erreicht. Bei den Hexosen erfolgte dies bereits nach 48 h Kultivierung und somit 12 h früher. Beim Wachstum auf Galaktose wurde nur eine maximale OD₆₀₀ von 5,5 erzielt. Jedoch verblieb der Stamm am längsten in der stationären Wachstumsphase. Ein gegensätzliches Bild zeigte sich beim Wachstum auf Mannose. Die maximale OD₆₀₀ von 8,4 entsprach in etwa der beim Wachstum auf Glukose (8,35), es folgte jedoch die deutlichste Absenkung der OD₆₀₀ bis zum Ende des Kultivierungsexperimentes auf 0,7.

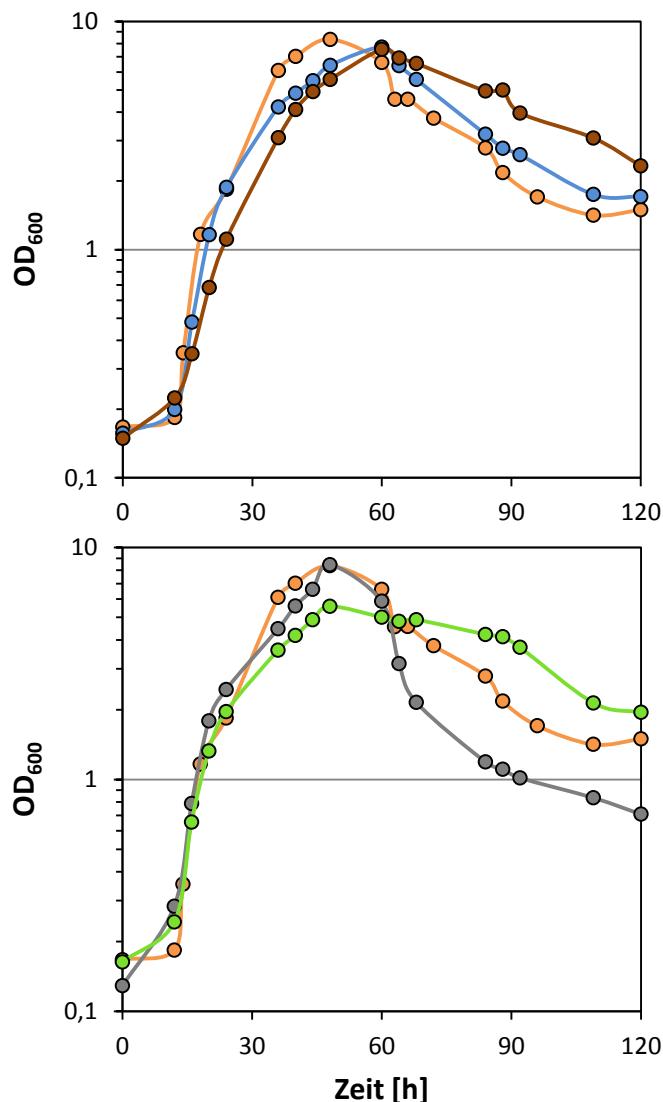


Abb. 3.16: Kultivierungsexperimente von *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*cbei_2100* auf verschiedenen C-Quellen. 200 ml MS-MES, 120 h, 37 °C. Glukose (●), Arabinose (○), Xylose (■), Mannose (▲), Galaktose (◆). n = 3.

Die Abbildungen 3.17 und A10 zeigen die 1,4-BDO-Produktion von *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*cbei_2100* in Abhängigkeit der verwendeten C-Quellen. Die Synthese von 1,4-BDO durch *C. acetobutylicum* erfolgte auf allen getesteten Substraten. Die Konzentrationen waren jedoch niedriger als beim Wachstum auf Glukose. Die zweithöchste 1,4-BDO-Konzentration konnte auf Arabinose (0,3 mM) detektiert werden, welche ca. 44 % höher war als auf Mannose (0,23 mM), gefolgt von Xylose (0,15 mM) und Galaktose (0,11 mM). Die Einbußen gegenüber Glukose entsprachen dabei mindestens 27 % (Arabinose) und maximal 73 % (Galaktose). Darüber hinaus verschob sich das 1,4-BDO-GHB-Verhältnis weiter in Richtung GHB.

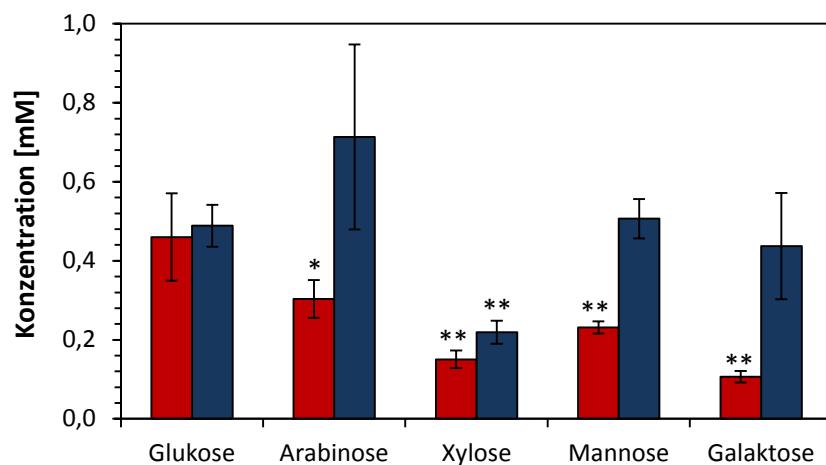


Abb. 3.17: 1,4-BDO- und GHB-Produktion von *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*cbei_2100* auf verschiedenen C-Quellen. 200 ml MS-MES, 120 h, 37 °C. ■ 1,4-BDO, ■ GHB. * p < 0,05; ** p < 0,01. n = 3.

Die Fähigkeit von *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*cbei_2100* 1,4-BDO aus verschiedenen C-Quellen zu synthetisieren, ermöglichte den Einsatz von Kohlenhydratgemischen, welche der Zusammensetzung landwirtschaftlicher Abfallstoffe entsprechen. Dadurch ist die Anwendung von kostengünstigen und in hohen Mengen verfügbaren Substraten, wie Lignocellulosehydrolysaten, für Fermentationsprozesse denkbar (Kuhad und Singh, 1993). In Anlehnung an die Kohlenhydratzusammensetzung der Hemicellulose von Getreidestroh wurde ein Kohlenhydratgemisch (39 % Glukose, 22 % Xylose, 5 % Arabinose, 3 % Galaktose und 2 % Mannose) als Substrat für die Kultivierung eingesetzt. Ähnliche Zusammensetzungen konnten auch für Reisstroh, Weizenstroh und Bagasse ermittelt werden (Sarkar *et al.*, 2012).

Wie aus der Abbildung 3.18 hervorgeht, konnte 1,4-BDO von *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*cbei_2100* auf dem entsprechenden Kohlenhydratgemisch synthetisiert werden. Dabei entsprach die gemessene 1,4-BDO-Konzentration der Ausbeute beim Wachstum auf Xylose. Das Maximum von ca. 0,15 mM 1,4-BDO konnte nach 60 h detektiert werden. Wie zuvor bereits festgestellt, begann die GHB-Synthese bereits während des exponentiellen Wachstums und erreichte ein Maximum von 0,5 mM ebenfalls nach 60 h.

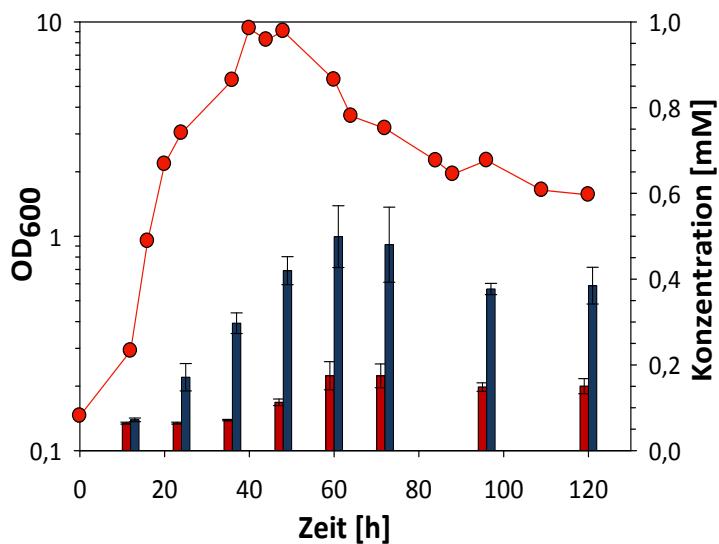


Abb. 3.18: Zeitlicher Verlauf der 1,4-BDO- und GHB-Produktion von *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)cbei_2100.
200 ml MS-MES, Kohlenstoffgemisch (39 % Glukose, 22 % Xylose, 5 % Arabinose, 3 % Galaktose und 2 % Mannose), 120 h, 37 °C. ■ 1,4-BDO, ■ GHB. n = 3.

3.5.3 Modifikation der 4HBD-Expression durch Verwendung unterschiedlicher Promotoren

Die Expression von Genen wird maßgeblich von ihren jeweiligen Promotoren bestimmt. Diese regulatorischen Elemente ermöglichen die genaue und effiziente Initiation der Transkription sowie die Kontrolle der Genexpression (Ayoubi und Van de Ven, 1996). In Abhängigkeit der Promotoren werden die Transkriptmenge und der Zeitpunkt der Genexpression festgelegt. Durch den Austausch des *thlA*-Promotors (P_{thlA}) gegen zwei weitere clostridielle Promotoren (Phosphotransbutyrylase-Promotor [P_{ptb}] und Acetoacetatdecarboxylase-Promotor [P_{adc}]) und einem artifiziellen Promotor (P_{fac}) (Heap *et al.*, 2007) sollten die Transkriptmengen und der Zeitpunkt der 4HBD-Expression variiert werden. Dies diente der Überprüfung, ob eine mutmaßliche Erhöhung der Transkriptmenge und eine auf den Wachstumsverlauf abgestimmte Expression der 4HBDs einen Einfluss auf die 1,4-BDO-Produktion hatten.

Der *thlA*-Promotor, welcher standardmäßig im pTc-Vektorsystem vorlag, ermöglichte eine konstitutive Expression der 4HBDs und zeigt eine konstant hohe Aktivität (Girbal *et al.*, 2003; Schulz, 2013). Im Gegensatz dazu besitzt der *adc*-Promotor neben einem Aktivitätsmaximum in der späten exponentiellen Wachstumsphase auch ein konstantes Aktivitätslevel während der solventogenen Phase (Girbal *et al.*, 2003). Als gegensätzliche Strategie wurde der *ptb*-Promotor verwendet, welcher vor allem mit der frühen Acidogenese assoziiert ist (Tummala *et al.*, 1999; Girbal *et al.*, 2003). Bei dem dritten eingesetzten Promotor handelte es sich um den artifiziellen *fac*-Promotor (Heap *et al.*, 2007), bestehend aus einem *lacO*-Operator aus *E. coli* und dem *fdx*-Promotor des Ferredoxingens aus *C. pasteurianum*. Der *fac*-Promotor zeichnete sich unter anderem durch ein hohes Expressionslevel von heterologen Genen in Clostridien aus (Heap *et al.*, 2007).

3.5.3.1 Vektorgenerierung

Als Ausgangspunkt für die Generierung der Plasmide pT::P(*ptb*)*cbei_2100*, pT::P(*adc*)*cbei_2100*, pT::P(*fac*)*cbei_2100*, pT::P(*ptb*)*ckl_3020*, pT::P(*adc*)*ckl_3020*, pT::P(*fac*)*ckl_3020*, pT::P(*ptb*)*abfD*, pT::P(*adc*)*abfD* und pT::P(*fac*)*abfD* (Abb. A11) dienten die von Schulz (2013) erzeugten Vektoren pT::P(*ptb*)*pp2*, pT::P(*adc*)*pp2*, pT::P(*fac*)*pp2* (Abb. A12).

Die notwendigen Anpassungsschritte bei der Vektorherstellung sind in der Abbildung 3.19 dargestellt.

Für die Klonierung der Gene *cbei_2100* und *ckl_3020* wurden die Ausgangs-Vektoren (Schulz, 2013) mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Kas*I verdaut (I). Dies führte zur Entfernung des Reporterproteingens *pp2*. Parallel dazu wurden die Vektoren pTc::P(*thlA*)*cbei_2100* und pTc::P(*thlA*)*ckl_3020* ebenfalls mit *Bam*HI und *Kas*I hydrolysiert (II). Nach Auftrennung der Fragmente in einem 2 %igem Agarosegel und einer anschließenden Gelelution wurden die beiden 4HBD-kodierenden Gene (*cbei_2100* und *ckl_3020*) in einer nachfolgenden Ligationsreaktion (2.8.3.3) in die vorbereiteten Vektoren (I) ligiert (III).

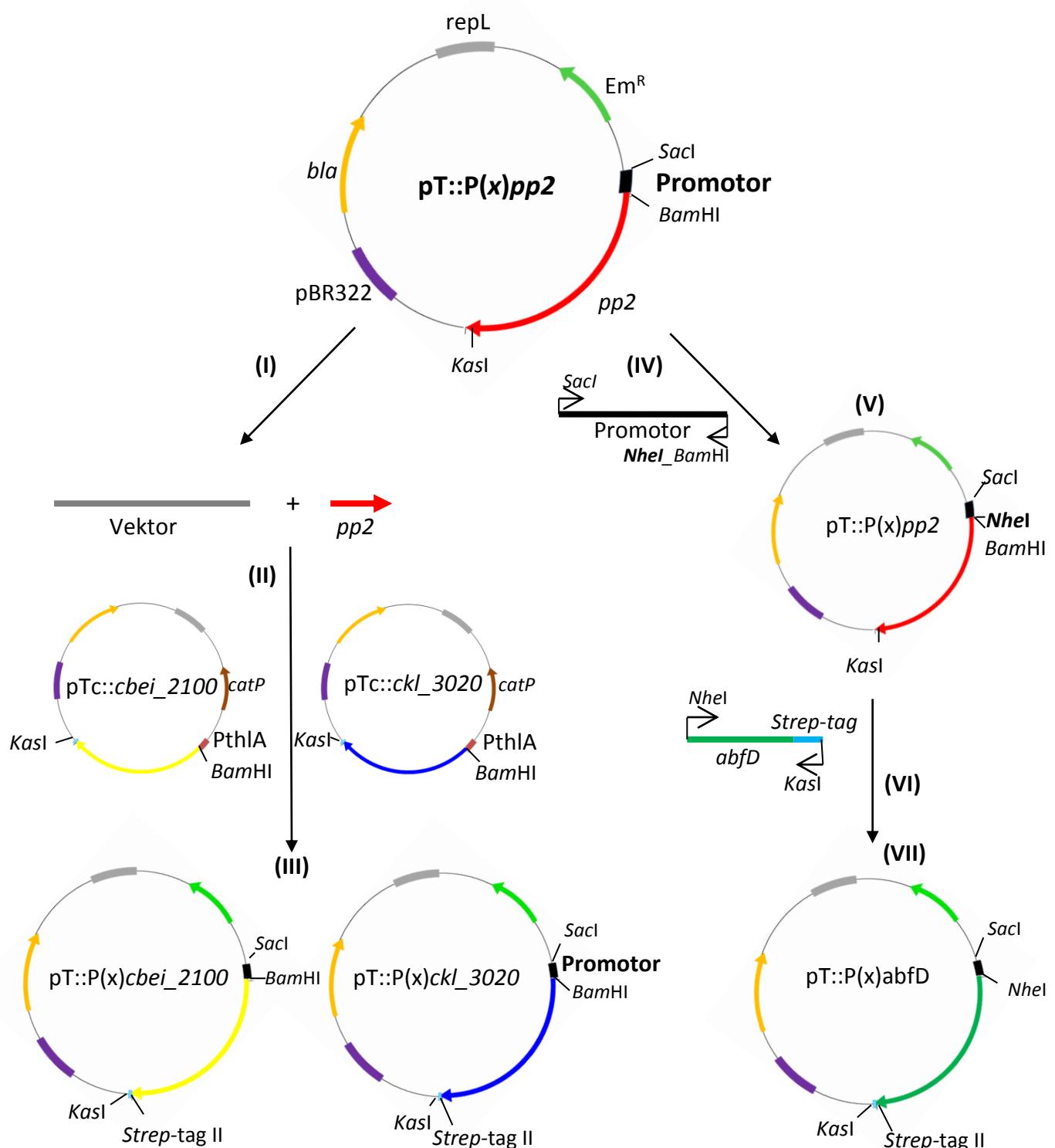


Abb. 3.19: Schematische Darstellung der Vektorherstellung mit unterschiedlichen Promotoren. (x), *ptb-*, *adc-*, bzw. *fac*-Promotor. Erläuterungen siehe Text.

Da der Vektor pTc::P(*thlA*)*abfD* über eine *Bam*HI-Schnittstelle innerhalb des Genbereichs verfügte, wurden die entsprechenden Promotorbereiche der Vektoren pT::P(*ptb*)*pp2*, pT::P(*adc*)*pp2* und pT::P(*fac*)*pp2* über eine PCR amplifiziert (IV). Die verwendeten Oligonukleotide (Tab. 2.4) waren mit einer zusätzlichen *Nhe*I-Erkennungsstelle ausgestattet, sodass die beiden Schnittsequenzen für *Bam*HI und *Nhe*I in den amplifizierten Promotorbereichen direkt aufeinander folgend waren. Die so veränderten Promotorbereiche wurden ebenso wie die jeweiligen Vektoren (pT::P(*ptb*)*pp2*, pT::P(*adc*)*pp2* und pT::P(*fac*)*pp2*) mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Sac*I verdaut und in einer anschließenden Ligationsreaktion in die Vektoren kloniert (V). Die resultierenden Vektoren entsprachen somit den Ausgangsvektoren pT::P(*ptb*)*pp2*, pT::P(*adc*)*pp2* und pT::P(*fac*)*pp2* mit der Ausnahme einer zusätzlichen *Nhe*I-Erkennungsstelle. Mittels PCR wurde das *abfD*-Gen mit zugehöriger *Strep*-tag II-Sequenz des Vektors pTc::P(*thlA*)*abfD* amplifiziert (VI). Anschließend folgten die Restriktionen des amplifizierten Genbereiches und der zuvor veränderten Vektoren mit *Nhe*I und *Kas*I und die Klonierung des *abfD*-Gens in die vorbereiteten Vektoren (VII).

Die korrekte Integration der Promotoren und Gene in die jeweiligen Vektoren wurde durch Sequenzierung (LGC Genomics) mit Promotor- und genspezifischen Oligonukleotiden (Tab. 2.4) bestätigt.

Die generierten Vektoren wurden nach einer *in vivo* Methylierung in *E. coli* ER2275 (2.8.3.4) für die Transformation von *C. acetobutylicum* (2.9.2) eingesetzt. Die Verifizierung rekombinanter Klone erfolgte im Anschluss mittels Colony-PCR, SDS-PAGE und Western Blot-Analysen (Abb. A13-15). Weiterhin wurden die rekombinanten *C. acetobutylicum*-Stämme wachstumsphysiologisch charakterisiert (Tab. A3) und im Hinblick auf die 1,4-BDO-Produktion analysiert (3.5.3.2).

3.5.3.2 1,4-BDO-Produktion rekombinanter *C. acetobutylicum*-Stämme

Anhand der Abbildung 3.20 ist ersichtlich, dass die unter 3.5.3 generierten *C. acetobutylicum*-Stämme in der Lage waren, 1,4-BDO zu synthetisieren.

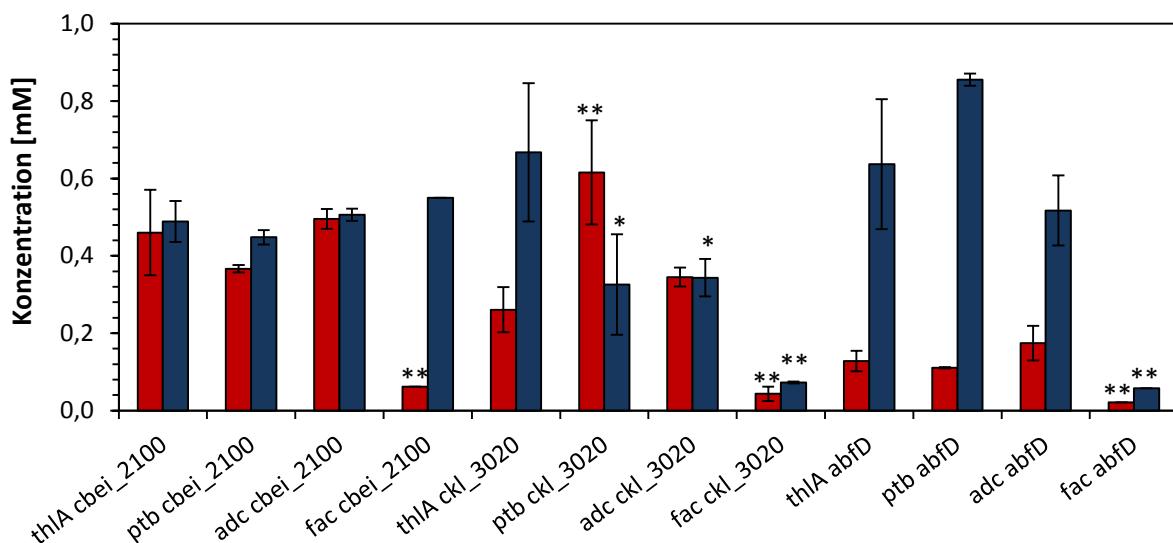


Abb. 3.20: 1,4-BDO- und GHB-Produktion rekombinanter *C. acetobutylicum*-Stämmen nach 120 h Kultivierung in 200 ml MS-MES. ■ 1,4-BDO, ■ GHB. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. n = 3. Erläuterungen siehe Text.

Der *ptb*-Promotor in Kombination mit dem Gen *cbei_2100* hatte im Vergleich zum *thlA*-Promotor (0,46 mM) eine leicht verringerte 1,4-BDO-Bildung (0,37 mM) zur Folge (Abb. 3.20). Im Gegensatz dazu konnte durch die Verwendung des *adc*-Promotors bei *cbei_2100* eine geringfügige Zunahme in der 1,4-BDO-Konzentration (0,49 mM) festgestellt werden. In diesem Fall war das 1,4-BDO-GHB-Verhältnis mit ca. 1:1 nahezu ausgeglichen. Am auffälligsten war jedoch die deutliche Abnahme der gemessenen 1,4-BDO-Konzentration unter Verwendung des *fac*-Promotors, sowohl beim Stamm *C. acetobutylicum* pT::P(*fac*)*cbei_2100* (0,062 mM) als auch bei *C. acetobutylicum* pT::P(*fac*)*ckl_3020* (0,04 mM) und *C. acetobutylicum* pT::P(*fac*)*abfD* (0,02 mM). Bei den beiden zuletzt genannten Stämmen war ebenso die GHB-Bildung massiv beeinträchtigt.

Bei den Stämme *C. acetobutylicum* pT::P(*ptb*)*ckl_3020* und *C. acetobutylicum* pT::P(*adc*)*ckl_3020* besaßen die Promotoren P_{ptb} und P_{adc} einen positiven Effekt auf die 1,4-BDO-Produktion. Deren jeweiligen 1,4-BDO-Ausbeuten waren im Vergleich zum *thlA*-Promotor um 237 % bzw. 132 % erhöht. Insbesondere der Stamm *C. acetobutylicum* pT::P(*ptb*)*ckl_3020* zeigte die bisher höchste Konzentration an 1,4-BDO mit 0,62 mM und einem 1,4-BDO-GHB-Verhältnis von 1 : 0,5 und ist damit der einzige Stamm, bei dem die 1,4-BDO-Konzentration höher war als die von GHB.

Die gemessenen 1,4-BDO-Konzentrationen der Stämme mit dem *abfD*-Gen waren im Vergleich zu den Stämmen mit den Genen *cbei_2100* und *ckl_3020* am niedrigsten. Der

Einsatz verschiedener Promotoren führte bei jenen Stämmen zu keiner wesentlichen Erhöhung der 1,4-BDO-Produktion. Im Gegensatz dazu war das 1,4-BDO-GHB-Verhältnis deutlich auf Seiten des GHBs. Weiterhin wurden bei diesen Stämmen die höchsten Konzentrationen an GHB gemessen, insbesondere beim Stamm *C. acetobutylicum pT::P(ptb)abfD* mit 0,86 mM.

Im Wesentlichen veränderte sich die 1,4-BDO-Konzentration mit den Genen *cbei_2100* und *abfD* trotz verschiedener Promotoren (P_{ptb} und P_{adc}) nicht. Im Gegensatz dazu führten diese beiden Promotoren in Kombination mit dem Gen *ckl_3020* zu einer Steigerung der 1,4-BDO-Bildung. Insbesondere mit dem *ptb*-Promotor konnte eine deutliche Zunahme von 238 % an 1,4-BDO im Vergleich zum Referenzstamm *C. acetobutylicum pTc::P(thlA)ckl_3020* verzeichnet werden. Einen deutlichen negativen Effekt konnte bei allen drei Synthesegenen unter Einfluss des *fac*-Promotors beobachtet werden, sodass dieser für zukünftige Arbeiten ausgeschlossen wurde. Des Weiteren ist die Verwendung des *abfD*-Gens aufgrund der geringen 1,4-BDO-Bildung ebenfalls als ungeeignet einzustufen.

3.5.4 Stoffwechseldefektmutanten von *C. acetobutylicum* ATCC 824

Aufgrund der Nebenproduktbildung, welche die Gesamtausbeute an 1,4-BDO verringern kann, wurde im Folgenden auf bereits zuvor erzeugte Stoffwechseldefektmutanten (Tab. 2.1) (Lehmann, 2012 a) zurückgegriffen. Diese zeichneten sich unter anderem dadurch aus, dass sowohl die Produktion der Säuren Acetat und Butyrat als auch die Bildung der Lösungsmittel Aceton, Butanol und Ethanol durch den Funktionsverlust bestimmter Gene nahezu ausgeschaltet werden konnte (Lehmann *et al.*, 2012 b und c).

Da der Vektor *pTc::P(thlA)cbei_2100* (Abb. 3.7) die bisher höchste 1,4-BDO-Produktion ermöglichte (Abb. 3.12), wurde dieser für die Transformation der nachfolgenden Stoffwechseldefektmutanten eingesetzt.

3.5.4.1 *C. acetobutylicum*-Mutanten mit Defekten in der Säurebildung

Die Eingangsenzyme für die Produktion der Säuren Acetat und Butyrat sind die Phosphotransacetylase (Pta) und die Phosphotransbutyrylase (PtB) (Abb. 3.21). Durch

Ausschalten der entsprechenden Gene konnte die Acetat- bzw. Butyrat-Bildung stark verringert werden (Lehmann *et al.*, 2012 b und c).

Darüber hinaus wurden neben den Pta- und PtB-Defektmutanten (*C. acetobutylicum pta::int(80)* und *C. acetobutylicum ptb::int(87)*) auch die Ldh1- und Ldh2-Mutanten (*C. acetobutylicum ldh1::int(93)* und *C. acetobutylicum ldh2::int(231)*), (Lehmann, 2012 a) für die Untersuchungen herangezogen (Abb. 3.21). Die Laktatdehydrogenasen sind für die Laktatbildung unter Verbrauch von NADH+H⁺ verantwortlich und stehen somit in Konkurrenz zur 1,4-BDO-Synthese.

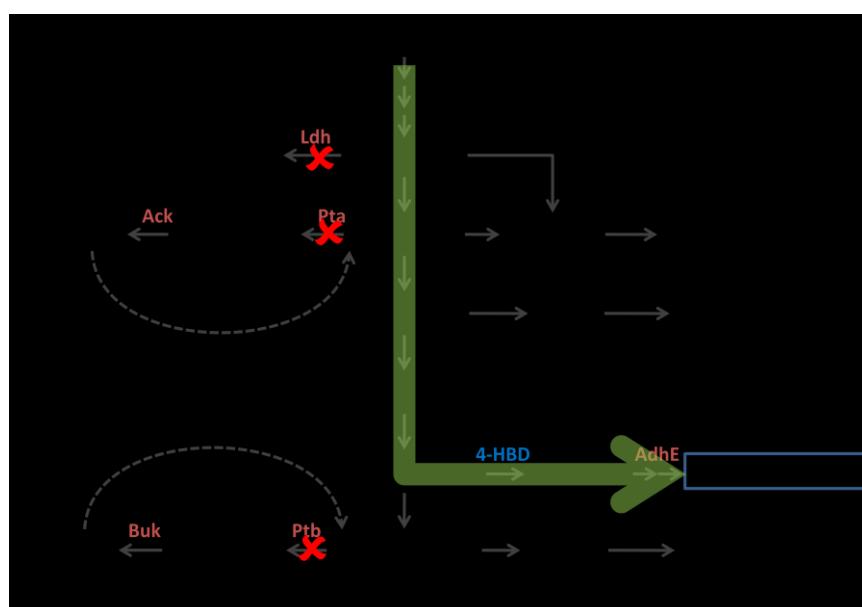


Abb. 3.21: Gärungsstoffwechsel von *C. acetobutylicum*. Inaktivierte Enzyme werden durch ein rotes X gekennzeichnet. Ldh, *C. acetobutylicum ldh1::int(93)* bzw. *C. acetobutylicum ldh2::int(231)*; Pta, *C. acetobutylicum pta::int(80)* und PtB, *C. acetobutylicum ptb::int(87)*. Erläuterungen siehe Text. Abkürzungen: Ac-CoA, Acetyl-CoA; Acetyl-P, Acetyl-Phosphat; AcAld, Acetaldehyd; AcAC-CoA, Acetoacetyl-CoA; AcAc, Acetoacetat; 3HB-CoA, 3-Hydroxybutyryl-CoA; 4HB-CoA, 4-Hydroxybutyryl-CoA; BuAld, Butyraldehyd; Butyryl-P, Butyryl-Phosphat, Ack, Acetatkinaise; Buk, Butyratkinase; 4-HBD, 4-Hydroxybutyryl-CoA Dehydratase; AdhE, Aldehyd/Alkoholdehydrogenase.

Die Abbildung 3.22 zeigt die 1,4-BDO-Produktion transformierter Rezipientenstämme. Es ist ersichtlich, dass die 1,4-BDO-Konzentration durch Verwendung von Stoffwechselmutanten mit Defekten in der Säurebildung nicht gesteigert werden konnte. Stattdessen kam es zu einer Verringerung der 1,4-BDO-Produktion, im deutlichsten Fall um bis zu 81 % (*C. acetobutylicum ptb::int(87)* pTc::P(*thlA*)*cbei_2100*: 0,079 mM) im Vergleich zum

Referenzstamm *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*cbei_2100*. Die Einbußen der übrigen Rezipientenstämme lagen zwischen 53-69 %. Dabei konnte beim Pta::int-Rezipientenstamm die höchste 1,4-BDO-Konzentration mit 0,192 mM detektiert werden. Im Gegensatz zur 1,4-BDO-Produktion konnte eine Erhöhung der GHB-Konzentration mit Ausnahme des Pta::int-Rezipientenstammes festgestellt werden. Bei den beiden Stämmen *C. acetobutylicum* *ptb::int(87)* pTc::P(*thlA*)*cbei_2100* und *C. acetobutylicum* *ldh2::int(231)* pTc::P(*thlA*)*cbei_2100* stiegen die GHB-Konzentrationen (0,71 mM bzw. 0,73 mM) um ca. 75 % im Vergleich zum Referenzstamm (0,49 mM).

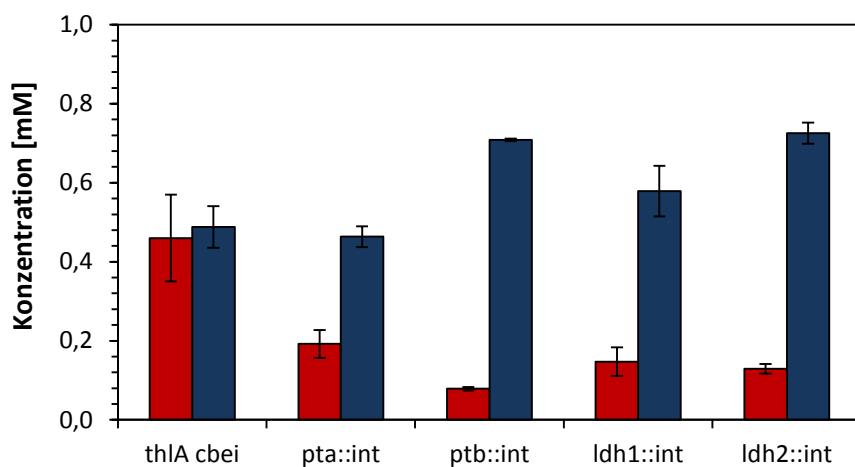


Abb. 3.22: 1,4-BDO- und GHB-Produktion rekombinanter *C. acetobutylicum*-Mutanten. 200 ml MS-MES, 120 h, 37 °C. thlA cbei, *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*cbei_2100*; pta::int, *C. acetobutylicum* *pta::int(80)* pTc::P(*thlA*)*cbei_2100*; ptb::int, *C. acetobutylicum* *ptb::int(87)* pTc::P(*thlA*)*cbei_2100*; ldh1::int, *C. acetobutylicum* *ldh1::P(thlA)int(93)* pTc::cbei_2100; ldh2::int, *C. acetobutylicum* *ldh2::int(231)* pTc::P(*thlA*)*cbei_2100*. ■ 1,4-BDO, ■ GHB. n = 2.

3.5.4.2. *C. acetobutylicum*-Mutanten mit Defekten in der Lösungsmittelbildung

Nach Einsetzen des „Lösungsmittelshifts“ produziert *C. acetobutylicum* die Lösungsmittel Aceton, Butanol und Ethanol (Jones und Woods, 1986). Durch deren Bildung wird der Kohlenstofffluss mutmaßlich nur in geringem Maße in Richtung 1,4-BDO-Synthese gelenkt, wodurch es zu einer Limitation kommen kann.

Bei den verwendeten Lösungsmitteldefektmutanten (Abb. 3.23) handelte es sich zum einen um die Mutante *C. acetobutylicum* *adc::int(180)*, bei welcher neben einer drastischen Reduzierung der Acetongbildung auch eine Verringerung in der Butanol- und

Ethanolkonzentration festgestellt werden konnte (Lehmann *et al.*, 2012 b). Zum anderen wurde die Mutante *C. acetobutylicum* *ctfA::int(352)* eingesetzt, da diese sich ebenfalls durch eine deutlich verringerte Lösungsmittelproduktion auszeichnete (Lehmann *et al.*, 2012 b). Des Weiteren wurden Mutanten mit Defekten in der Aldehyd/Alkoholdehydrogenase (AdhE, *C. acetobutylicum* *adhE1::int(158)* und *C. acetobutylicum* *adhE2::int(114)*), (Lehmann 2012 a) ausgewählt, um zu überprüfen, inwieweit die AdhE2 essentiell für die 1,4-BDO-Bildung ist (Yim *et al.*, 2011).

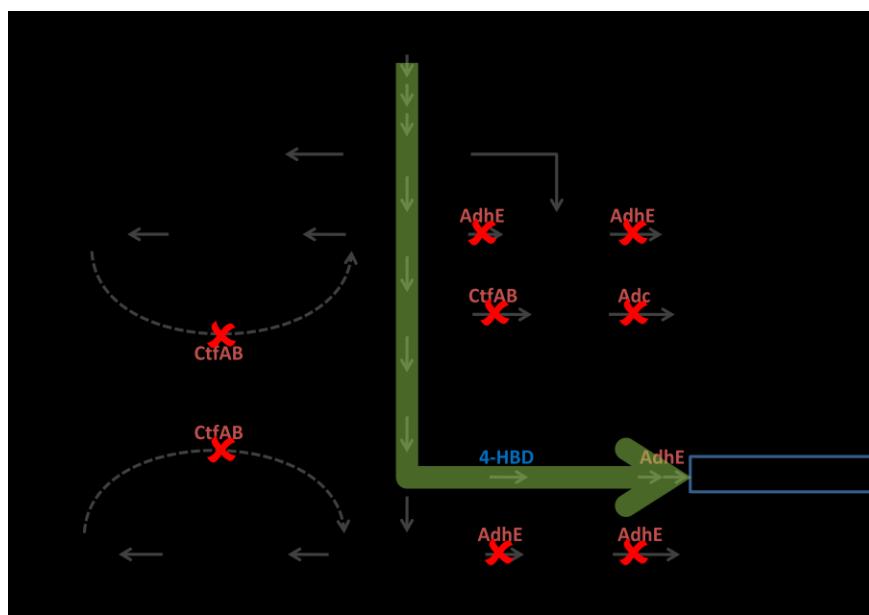


Abb. 3.23: Gärungsstoffwechsel von *C. acetobutylicum*. Inaktivierte Enzyme werden durch ein rotes X gekennzeichnet. Adc, *C. acetobutylicum* *adc::int(180)*, AdhE, *C. acetobutylicum* *adhE1::int(158)* bzw. *C. acetobutylicum* *adhE2::int(114)*; CtfAB, *C. acetobutylicum* *ctfA::int(352)*. Erläuterungen siehe Text. Abkürzungen: Ac-CoA, Acetyl-CoA; Acetyl-P, Acetyl-Phosphat; AcAld, Acetaldehyd; AcAC-CoA, Acetoacetyl-CoA; AcAc, Acetoacetat; 3HB-CoA, 3-Hydroxybutyryl-CoA; 4HB-CoA, 4-Hydroxybutyryl-CoA; BuAld, Butyraldehyd; Butyryl-P, Butyryl-Phosphat, 4-HBD, 4-Hydroxybutyryl-CoA Dehydratase.

Die Abbildung 3.24 gibt Aufschluss über die 1,4-BDO- und GHB-Produktion transformierter *C. acetobutylicum*-Defektmutanten. Es zeigte sich, dass die 1,4-BDO-Konzentrationen in den Lösungsmitteldefektmutanten im Vergleich zum Referenzstamm verringert waren. Die Einbußen lagen dabei im Bereich von 66 - 86 %. Der Stamm *C. acetobutylicum* *adc::int(180)* pTc::P(*thlA*)*cbei_2100* produzierte mit 0,14 mM am meisten 1,4-BDO. Bei den weiteren Mutantenstämmen lagen die 1,4-BDO-Konzentrationen unter 0,1 mM. Die gemessenen GHB-Konzentrationen waren ebenfalls verringert, welche jedoch weniger deutlich

ausgeprägt waren im Vergleich zum 1,4-BDO. Eine Ausnahme bildete dabei jedoch der Stamm *C. acetobutylicum adc::int(180) pTc::P(thlA)cbei_2100*, welcher mit 0,73 mM 78 % mehr GHB produzierte als der Referenzstamm.

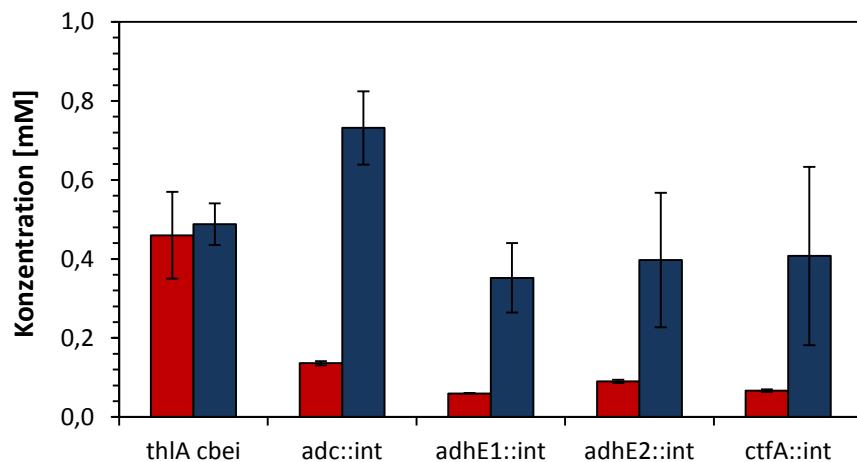


Abb. 3.24: 1,4-BDO- und GHB-Produktion rekombinanter *C. acetobutylicum*-Mutanten. 200 ml MS-MES, 120 h, 37 °C. thlA cbei, *C. acetobutylicum pTc::P(thlA)cbei_2100*; adc::int, *C. acetobutylicum adc::int(180) pTc::P(thlA)cbei_2100*; adhE1::int, *C. acetobutylicum adhE1::int(158) pTc::P(thlA)cbei_2100*; adhE2::int, *C. acetobutylicum adhE2::int(114) pTc::P(thlA)cbei_2100*; ctfA::int, *C. acetobutylicum ctfA::int(352) pTc::P(thlA)cbei_2100*. ■ 1,4-BDO, ■ GHB. n = 2.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Verwendung von Stoffwechselmutanten keine erhöhte 1,4-BDO-Produktion zur Folge hatte, auch wenn die Nebenproduktbildung eingeschränkt gewesen ist.

Es bleibt abschließend festzuhalten, dass die rekombinanten *C. acetobutylicum*-Stämme, welche das Gen *cbei_2100* besaßen, eine konstante und hohe 1,4-BDO-Produktion ermöglichten (ca. 0,45 mM). Daher eignet sich Cbei_2100 am besten von den drei 4HBDs zur Produktion von 1,4-BDO in *C. acetobutylicum*. Des Weiteren war der Stamm *C. acetobutylicum pT::P(ptb)ckl_3020* der einzige, bei dem das Verhältnis 1,4-BDO zu GHB auf Seiten des 1,4-BDOs war (1 : 0,5). Dieser stellt somit einen weiteren vielversprechenden Kandidaten für zukünftige Arbeiten dar. Die Volumenerhöhung und die Verwendung von Stoffwechseldefektmutanten führten jedoch zu keinem Anstieg der 1,4-BDO-Produktion.

4. Diskussion

Die heutige Weltwirtschaft ist überwiegend von verschiedenen fossilen Energiequellen, wie Öl, Kohle und Gas abhängig (Sarkar *et al.*, 2012). In Anbetracht der steigenden Weltbevölkerung und dem damit einhergehenden Anstieg des Energiebedarfs und der Ausbeutung nicht-erneuerbarer Energiequellen wird ein kritischer Punkt im Hinblick auf Nachhaltigkeit und Klimawandel erreicht. Alternative Strategien, wie die Nutzung erneuerbarer Ressourcen für die biotechnologische Produktion von Treibstoffen und Basischemikalien, könnten dieser Situation entgegenwirken.

In den letzten Jahrzehnten wurde eine Vielzahl verschiedenster Forschungen auf dem Gebiet der mikrobiellen Produktion von Chemikalien durchgeführt, welche zukünftig mit der Petrochemie konkurrieren könnten (u.a. Biebl *et al.*, 1999; Nakamura und Whited, 2003; Ma *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010). Dabei wurden oft gut erforschte Mikroorganismen wie *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* oder *Klebsiella oxytoca* durch genetische Veränderungen des Genoms zu Produktionsstämmen modifiziert und beständig optimiert (Nissen *et al.*, 2000; Ji *et al.*, 2010; Clomburg und Gonzalez, 2011). Aufgrund der Fähigkeit zur Bildung der Lösungsmittel Aceton, Butanol und Ethanol rückte ebenso *C. acetobutylicum* wieder in den Fokus und bedingte so die Entwicklung neuer genetischer Manipulationstechniken (Desai & Papoutsakis, 1999; Papoutsakis, 2008; Lütke-Eversloh & Bahl, 2011). Diese verbesserten das Verständnis über den Metabolismus von *C. acetobutylicum* und führten zu „Metabolic Engineering“-Strategien, die gezielt den Stoffwechsel veränderten (Lehmann *et al.*, 2012 b und c). So kann auch die Synthese von Verbindungen, welche natürlicherweise nicht in einem Organismus vorkommen, in Betracht gezogen werden. Hierzu zählt unter anderem das bisher ausschließlich petrochemisch erzeugte 1,4-Butandiol, welches im industriellen Großmaßstab mit 1,3 Mio. Tonnen pro Jahr für die Produktion von Plastik und Polyester eingesetzt wird (Yim *et al.*, 2011). Durch die zusätzliche genetische Information zur heterologen Expression der 4HBD und der damit einhergehenden Veränderung des Stoffwechsels von *C. acetobutylicum* sollte diese Verbindung auf biologische Weise und damit unabhängig von den bisher genutzten petrochemischen Verfahren erzeugt werden.

4.1 1,4-Butandioltoleranz

Alkohole und andere organische Lösungsmittel, wie Aromate und Phenole, besitzen eine giftige Wirkung auf die Zellen, sodass die mikrobielle Produktion dieser Chemikalien limitiert wird (Isken und de Bont, 1998; Tomas *et al.*, 2003). Die Akkumulation von organischen Lösungsmitteln führt unter anderem zu einer Permeabilisierung der Zellmembran und zu einem passiven Flux von ATP, Protonen und Ionen (Sikkema *et al.*, 1995). Dadurch kommt es zum Zusammenbruch der Protonenmotorischen Kraft sowie des Protonengradienten, was wiederum einen Einbruch im Energieaushalt der Zelle nach sich zieht (Tomas *et al.*, 2003).

Ähnliche Effekte konnten auch bei *C. acetobutylicum* in Gegenwart von Butanol beobachtet werden (Bowles und Ellefson, 1985). Butanol bewirkt aufgrund seiner chaotischen Wirkung auf die Zellmembran eine Änderung in der Phospholipidzusammensetzung (Ingram, 1976; Vollherbst-Schnecke *et al.*, 1984; Baer *et al.*, 1987) und führt letztlich zu ihrer Zerstörung. Dadurch ist die Zelle nicht mehr in der Lage, den intrazellulären pH-Wert sowie das Membranpotential aufrechtzuerhalten (Tomas *et al.*, 2003). Die Aktivitäten der membrangebundenen ATPase, der Glukose-Aufnahmesysteme und Nährstofftransporter kommen zum Erliegen (Bowles und Ellefson, 1985). Aufgrund dessen ist die Produktion von Butanol bei *C. acetobutylicum* auf etwa 13 g/l limitiert (Jones und Woods, 1986).

Im Gegensatz dazu zeigte sich, dass *C. acetobutylicum* in der Lage ist, bis zu 5 % an extrazellulärem 1,4-BDO zu tolerieren. Erste wachstumsinhibierende Effekte traten ab einer Konzentration von 54 g/l auf (3.1). Damit ist die Toleranzgrenze gegenüber 1,4-BDO ca. viermal höher als gegenüber Butanol, wenn 1,4-BDO der alleinige Stressfaktor ist. Ein ähnliches Toleranzverhalten gegenüber 1,4-BDO konnte auch bei *E. coli* beobachtet werden. Dessen natürliche Toleranz liegt ebenfalls bei 5 - 6 %, welche durch entsprechende Adaptationsversuche auf > 10 % angehoben werden konnte (Burk, 2010). Die hohen biotechnologischen Produktionen anderer Diole deuten auf ebenso hohe Toleranzwerte der entsprechenden Organismen hin (Zeng und Sabra, 2011). So ist beispielsweise ein rekombinanter *E. coli*-Stamm in der Lage, über 130 g/l 1,3-Propandiol (1,3-PDO) zu produzieren (Nakamura und Whited, 2003). In vergleichbaren Konzentrationen wird 2,3-Butandiol (2,3-BDO) von *Klebsiella pneumoniae* (130 g/l) bzw. *Serratia marcescens* (152 g/l) synthetisiert (Ma *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010).

Die Toleranz von Mikroorganismen gegenüber Diolen scheint dabei deutlich höher zu sein als gegenüber Alkoholen. Somit sind Diole im Vergleich zum chemisch ähnlichen Butanol vermeintlich weniger toxisch für die Zellen. Die Toxizität einer Verbindung korreliert dabei mit dem Oktanol-Wasser-Koeffizienten ($\log P_{ow}$) (De Bont, 1998). Dieser beschreibt das Verhältnis der Konzentration einer Substanz in einem Zwei-Phasen-System bestehend aus n-Oktanol und Wasser (Sangster, 1989) und ermöglicht Rückschlüsse über das Verhalten von Verbindungen in lipophilen bzw. wässrigen Lösungen. Positive $\log P_{ow}$ -Werte deuten auf eine lipophile Verbindung hin, negative Werte auf eine hydrophile. Generell gilt, je geringer der $\log P_{ow}$ -Wert, desto weniger toxisch ist die Verbindung (Siemerink *et al.*, 2011). Verbindungen mit einem $\log P_{ow}$ -Wert zwischen 1 und 5 sind stark toxisch für Mikroorganismen (Isken und de Bont, 1998). Butanol mit einem $\log P_{ow}$ -Wert von 0,8 (Inoue und Horikoshi, 1989) besitzt einen positiven Wert und kann dementsprechend gut mit der lipophilen Zellmembran interagieren, wodurch die zuvor beschriebenen Effekte auf die Membran hervorgerufen werden. Diole, wie 1,3-PDO, 2,3-BDO und 1,4-BDO, hingegen besitzen negative $\log P_{ow}$ -Werte (-1,0; -0,92 bzw. -0,8) (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>). Diese sind bis zu einer Einheit niedriger als beim Butanol. Dies bedeutet, dass Diole folglich schlechter mit der Membran interagieren können und so ein toxischer Effekt dieser Verbindungen erst bei deutlich höheren Konzentrationen auftritt.

4.2 1,4-Butandiolproduktion

Die heterologe Expression der 4-Hydroxybutyryl-CoA Dehydratase/Vinylacetyl-CoA- Δ -Isomerase (4HBD) generierte einen Abzweig im Stoffwechsel von *C. acetobutylicum* (Abb. 1.3) und befähigt die rekombinanten Stämme, 1,4-BDO auf biologischem Wege unter Nutzung von nachwachsenden Rohstoffen zu produzieren. Dabei lagen die Ausbeuten in Abhängigkeit der drei in dieser Arbeit heterolog in *C. acetobutylicum* exprimierten 4HBD-kodierenden Gene (*abfD*, *cbei_2100* und *ckl_3020*) im Bereich von ca. 0,1 - 0,5 mM (9 - 45 mg/l) (Abb. 3.12). Ähnliche Konzentrationen wurden bei den frühen rekombinanten *E. coli*-Stämmen von Hwang *et al.* (2014) (29 mg/l) und Yim *et al.* (2011) (54 mg/l) erzielt. Im Falle von *E. coli* konnten durch Anpassungen und Veränderungen die Produktionen auf 0,66 g/l (Hwang *et al.*, 2014) bzw. 18 g/l (Yim *et al.*, 2011) erhöht werden. Um gegenüber der

chemischen Erzeugung von 1,4-BDO wettbewerbsfähig zu sein, wird eine biotechnologische Produktionsleistung von > 100 g/l, wie bei 1,3-PDO und 2,3-BDO, vorausgesetzt (Zeng und Sabra, 2011). Die hier bisher erzielten Konzentrationen sind noch deutlich geringer. Sie zeigten aber erstmalig die prinzipielle Realisierbarkeit der anaeroben 1,4-BDO-Synthese durch *C. acetobutylicum* und stellen damit die Grundlage für die weitere Optimierungen dar. Allerdings ist die Produktion von 1,4-BDO von verschiedenen Faktoren beeinflussbar, welche die Gesamtausbeute limitieren können. Da sie für die weitere Strategie essentiell sind, sollen die Faktoren im Folgenden erörtert werden.

4.2.1 Limitierung durch die 4HBD

Zu den limitierenden Faktoren zählt unter anderem das Eingangsenzym der 1,4-BDO-Synthese, die 4HBD. Dieses Enzym katalysiert die reversible Reaktion von 4-Hydroxybutyryl-CoA (4-HB-CoA) zu Crotonyl-CoA (Willadsen und Buckel, 1990; Scherf und Buckel, 1993; Scherf *et al.*, 1994; Müh *et al.*, 1996; Martins, 2004). Dabei liegt die Gleichgewichtskonstante der Reaktion mit $K = 4,2$ deutlich auf Seiten von Crotonyl-CoA (Scherf und Buckel, 1993). Die Bevorzugung der Crotonyl-CoA-Bildung spiegelt sich ebenfalls in der Kinetik der reversiblen Dehydrierung von 4-HB-CoA wider. Während ca. 80 % des 4-HB-CoA durch die 4HBD zu Crotonyl-CoA umgewandelt wird, beträgt der Anteil der Rückreaktion (Crotonyl-CoA zu 4-HB-CoA) gerade einmal 20 % (Scherf und Buckel, 1993). Eine Ursache für die Begünstigung der Crotonyl-CoA-Bildung könnte die höhere Stabilität von Crotonyl-CoA im Vergleich zu 4-HB-CoA sein (Müh *et al.*, 1996).

Darüber hinaus ist die spezifische Aktivität der 4HBD für 4-HB-CoA mit 209 nkat/mg relativ niedrig (Scherf und Buckel, 1993). In der Regel liegt die spezifische Aktivität von Enzymen zumeist zwischen 1 - 2 µkat/mg (Scherf und Buckel, 1993), wie z. B. die am Primärstoffwechsel von *C. acetobutylicum* beteiligte Thiolase (3,6 µkat/mg; Wiesenborn *et al.*, 1988). Die Aktivität der 4HBD ist somit um den Faktor 5 bis 10 niedriger. Um dies zu kompensieren, ist die 4HBD das dominierende Enzym im Cytosol mit einem Anteil von 20 - 25 % in *C. aminobutyricum* (Scherf und Buckel, 1993). Durch die in dieser Arbeit erzielten heterologen Expressionen der 4HBDs in *C. acetobutylicum* (Abb. 3.9 und Abb. A14) ist dieser hohe Anteil nicht gegeben, sodass die geringe spezifische Aktivität des Enzyms nicht durch die Proteinmenge ausgeglichen werden konnte.

Das bedeutet, eine geringe Enzymmenge und die Bevorzugung der Crotonyl-CoA-Bildung durch die 4HBD lassen in direkter Konsequenz auch nur wenig 4-HB-CoA erwarten und in der Folge auch nur minimale Mengen an 1,4-BDO.

4.2.2 Limitierung durch die Aldehyd-/Alkoholdehydrogenase (AdhE)

Des Weiteren können die beiden nachfolgenden Reduktionsreaktionen von 4-HB-CoA über 4-Hydroxybutyraldehyd zum 1,4-BDO, welche durch die bifunktionelle Aldehyd-/Alkohol-Dehydrogenase (AdhE) von *C. acetobutylicum* katalysiert werden, limitierend wirken.

Bereits 1986 stellten Jewell *et al.* fest, dass der Wildtyp von *C. acetobutylicum* in der Lage ist, externes 4-Hydroxybutyrat (4-HB bzw. GHB) zu 1,4-BDO zu verstoffwechseln. Die verantwortlichen Gene bzw. Enzyme waren jedoch noch nicht identifiziert. Erst 2011 wurde durch Yim *et al.* die Beteiligung der AdhE2 von *C. acetobutylicum* an der Bildung von 1,4-BDO nachgewiesen. Dies stellte bisher das einzige Enzym dar, welches unter *in vivo* Bedingungen dazu befähigt war. Entsprechende Untersuchungen hinsichtlich der Enzymaktivität zeigten eine spezifische Aktivität von 2,5 - 4,8 U/mg (Yoo *et al.*, 2015). Bei der Nutzung eines nicht-natürlichen Substrates wird die Umwandlungseffizienz jedoch deutlich herabgesetzt.

Darüber hinaus wird die AdhE2 im Gegensatz zur AdhE1 spezifisch in alkohologenen Kulturen exprimiert, welche sich durch die Bildung von Ethanol und Butanol, aber nicht von Aceton, auszeichnen (Fontaine *et al.*, 2002). Dieses metabolische Stadium wird beim Wachstum bei neutralem pH-Wert und unter hoher NAD(P)H-Verfügbarkeit eingeleitet und unterscheidet sich somit vom solventogenen Zustand, in dem die Lösungsmittel Aceton, Butanol und Ethanol in der Regel bei saurem pH-Wert produziert werden (Fontaine *et al.*, 2002), welches den Kulturbedingungen in dieser Arbeit entspricht. Untersuchungen konnten zeigen, dass während des solventogenen Zustands der Proteinanteil der AdhE2 in der Zelle verschwindend gering ist und der Anteil an der Butanolbildung gerade einmal 5 - 9 % beträgt (Yoo *et al.*, 2015). Ein anderes Bild zeigt sich jedoch beim alkohologenen Stadium. Dieses wird ausschließlich mit 94 - 100 % Beteiligung an der Butanolbildung von der AdhE2 dominiert (Yoo *et al.*, 2015). Das bedeutet, dass die Verfügbarkeit des mutmaßlich hauptverantwortlichen Enzyms (AdhE2) für die beiden finalen Syntheseschritte der 1,4-BDO-Bildung unter den solventogenen Bedingungen dieser Arbeit massiv eingeschränkt gewesen ist. Dadurch wurde die 1,4-BDO-Synthese vermutlich negativ beeinflusst. In diesem Fall könnte

sich die parallele Überexpression der AdhE2 in *C. acetobutylicum* anbieten, da auch Yim *et al.* (2011) eine Zunahme der 1,4-BDO-Produktion bei erhöhter AdhE2-Expression verzeichnen konnten. Des Weiteren ist es möglich den alkohologenen Zustand der Kulturen zu induzieren, indem einerseits der pH-Wert auf pH 6,5 reguliert und andererseits Glycerol als zusätzliches Substrat eingesetzt wird. Glycerol ist im Vergleich zur Glukose deutlich stärker reduziert und setzt bei der Umwandlung zum Pyruvat doppelt so viel NADH frei (Vasconcelos *et al.*, 1994), welches über die NADH-Aufnahmewege (Butanol-/ Ethanol- bzw. 1,4-BDO-Bildung) oxidiert werden muss.

4.2.3 Codon Usage

Wie in Abschnitt 3.4.2 dargestellt, variierte die Produktion von 1,4-BDO der rekombinanten *C. acetobutylicum*-Stämme in Abhängigkeit der 4HBD-kodierenden Gene (Abb. 3.12). Dabei konnte unter Verwendung des Enzyms Cbei_2100 die höchste Konzentration an 1,4-BDO mit 0,46 mM detektiert werden, gefolgt von Ckl_3020 mit 0,26 mM und AbfD mit 0,13 mM. Obwohl die Aminosäuren im katalytischen Zentrum bei allen drei 4HBDs konserviert sind (Abb. A5), weichen die 1,4-BDO-Ausbeuten doch erheblich voneinander ab. Dies ist somit nicht auf das katalytische Zentrum zurückzuführen. Da die 4HBDs untereinander nur bis zu 73 - 79 % übereinstimmen, scheinen die nicht-konservierten Aminosäuren einen Effekt auf die Bildung der jeweiligen 4HBDs und damit auch auf die erzielbaren 1,4-BDO-Konzentrationen zu haben. Zusätzlich zu den Aminosäuresequenzen unterscheiden sich die 4HBDs hinsichtlich ihres GC-Gehalts sowohl untereinander als auch zum Wirtsorganismus. Dieser ist mit ca. 25 % (Cornillot *et al.*, 1997) deutlich niedriger als die GC-Gehalte der 4HBDs (Cbei_2100: 33,3 %, Ckl_3020: 35,4 % und AbfD: 41,5 %; http://www.bioinformatics.org/sms2/codon_usage.html). Der GC-Gehalt beeinflusst dabei die Codon-Verteilung eines Organismus (Gustafsson *et al.*, 2004), welches wiederum einen Einfluss auf das Codon Usage der 4HBDs hat.

Während bei der Translation von Cbei_2100 überwiegend die gleichen Codons wie in *C. acetobutylicum* verwendet werden, variiert das Codon Usage bei Ckl_3020 etwas und bei AbfD deutlich (Tab. A4). So werden bei Ckl_3020 die drei Aminosäuren Glutamin (Gln), Aspartat (Asp) und Lysin (Lys) neben den mit dem Wirtsorganismus übereinstimmenden Codons auch durch weitere synchrone Codons kodiert. Diese zweiten synonymen Codons

(CAG, GAC bzw. UGC) werden in *C. acetobutylicum* wesentlich seltener verwendet. Besonders deutlich werden die Unterschiede beim Codon Usage zwischen AbfD und *C. acetobutylicum*. Hier werden die Aminosäuren Phenylalanin (Phe), Isoleucin (Ile), Prolin (Pro), Histidin (His), Glutamin (Gln), Asparagin (Asn), Lysin (Lys), Cystein (Cys) und Glycin (Gly) bevorzugt von anderen Codons kodiert, die in *C. acetobutylicum* deutlich unterrepräsentiert sind. Darüber hinaus werden die synonymen Codons der Aminosäuren Serin (Ser), Tyrosin (Tyr) und Aspartat (Asp) mit ähnlich hoher Häufigkeit verwendet, wie die bevorzugten in *C. acetobutylicum*.

Die Häufigkeit, in welcher die unterschiedlichen Codons verwendet werden, variiert dabei deutlich zwischen den verschiedenen Organismen (Gustafsson *et al.*, 2004, Hershberg und Petrov, 2008), sodass ein unterschiedliches Codon Usage zum Teil gravierende Auswirkungen auf die heterologe Proteinexpression haben kann (Kane, 1995; Kurland und Gallant, 1995; Plotkin und Kudla, 2011). Dabei können Fehler im Ablauf der Proteinsynthese durch Abstoppen der Ribosomen an Triplets, welche bestimmte, seltene tRNA-Moleküle benötigen, auftreten. Dies kann dazu führen, dass entweder die Synthese abbricht, eine falsche Aminosäure eingebaut wird (Substitution) oder es zum „in-frame hopping“ kommt, wodurch der Leserahmen um eine Position nach vorne oder hinten verschoben und damit die Codonabfolge verändert wird (Kurland, 1991; Kurland und Gallant, 1995). Somit ist die quantitative und qualitative Produktion des zu synthetisierenden Proteins reduziert (Kane, 1995). Die unterschiedliche Verwendung der Codons insbesondere bei AbfD im Vergleich zum Wirtsorganismus kann daher die Proteinsynthese derart beeinträchtigen, dass schlussendlich die finale 1,4-BDO-Konzentration am geringsten war. Abhilfe könnte der Einsatz von synthetischen Genen, die auf den entsprechenden Wirtsorganismus abgestimmt sind, bringen. Das „Protein-Engineering“ ist heutzutage eine gängige Strategie beim „Metabolic-Engineering“. So konnte im Vergleich zum nativen Enzym durch eine Codon-optimierte Variante die 1,4-BDO-Produktion in *E. coli* gesteigert werden (Yim *et al.*, 2011).

4.3 GHB-Produktion

Neben 1,4-BDO konnte in den rekombinanten *C. acetobutylicum*-Stämmen GHB (0,49 mM, 0,66 mM bzw. 0,63 mM) nachgewiesen werden (Abb. 3.12). Dabei wurden höhere Konzentrationen an GHB als an 1,4-BDO gemessen, wodurch das 1,4-BDO-GHB-Verhältnis

auf Seiten des GHB lag. Bei niedrigeren 1,4-BDO-Konzentrationen waren erhöhte GHB-Konzentrationen feststellbar. Die GHB-Bildung konnte bereits während der exponentiellen Wachstumsphase detektiert werden, wohingegen 1,4-BDO erst in der stationären Phase vermehrt produziert wurde (Abb. 3.13).

GHB als Nebenprodukt wurde ebenso bei den Arbeiten von Yim *et al.*, (2011) festgestellt. Die GHB-Konzentrationen des frühen rekombinanten *E. coli*-Stammes waren mit 2,1 mM etwa um den Faktor 3 höher als die des 1,4-BDOs (0,6 mM). Es wird angenommen, dass das GHB spontan durch Abspaltung der CoA-Gruppe aus 4-HB-CoA entsteht (Yim *et al.*, 2011) (Abb. 4.1) und somit nur indirekt durch den Einsatz einer effizienteren Umwandlung von 4-HB-CoA zu 1,4-BDO beeinflusst werden kann.

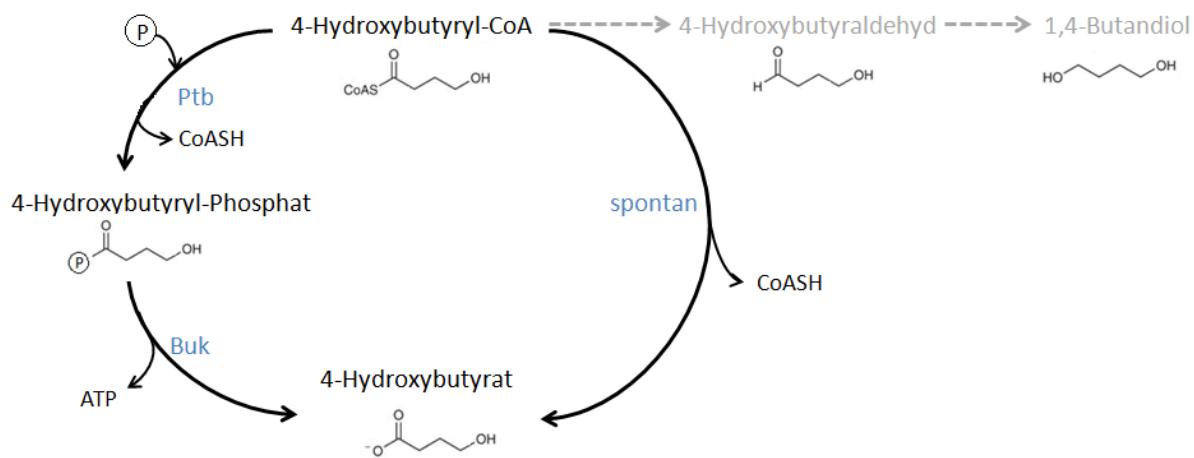


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der potentiellen Bildungswege von 4-Hydroxybutyrat (GHB).

Darüber hinaus könnte in *C. acetobutylicum* eine weitere theoretische Möglichkeit der GHB-Bildung existieren. Ein bereits im Wirtsorganismus vorhandener und somit natürlicher Stoffwechselweg ist die Umwandlung von Butyryl-CoA über Butyryl-Phosphat zu Butyrat durch die beiden Enzyme Phosphotransbutyrylase (PtB) und Butyrylkinase (Buk) (Wiesenborn *et al.*, 1989). Das vielfältige Substratspektrum der PtB (Wiesenborn *et al.*, 1989) beinhaltet unter anderem auch 4-HB-CoA (Liu und Steinbüchel, 2000). Dieses wird mit einer spezifischen Aktivität von 21,7 U/mg Protein zu 4-HB-Phosphat umgewandelt, was einer Restaktivität von 3 % im Vergleich zum Butyryl-CoA entspricht (Liu und Steinbüchel, 2000). Analog zum Butyryl-Phosphat könnte 4-HB-Phosphat durch die Buk zu GHB verstoffwechselt

werden (Abb. 4.1). Letzterer Schritt ist theoretisch denkbar, da die Buk auch die entgegengesetzte Reaktion – die Phosphorylierung von GHB – mit einer Restaktivität von 7 % im Vergleich zum Butyrat katalysiert (Liu und Steinbüchel, 2000). Es ist vorstellbar, dass die Dephosphorylierungsreaktion von 4-HB-Phosphat mit einer höheren Aktivität abläuft, da dies mit der eigentlichen Funktion der Buk (Dephosphorylierung von Butyryl-Phosphat) übereinstimmt. Demnach könnten die beiden in *C. acetobutylicum* natürlich vorkommenden Enzyme (PtB und Buk) zu einem weiteren Stoffwechselweg führen, welcher die Umwandlung von 4-HB-CoA zu GHB beinhaltet. Durch die Synthese eines zusätzlichen Moleküls ATP kann dieser unter Umständen vom Organismus bevorzugt werden.

4.4 1,4-BDO-Produktion unter Verwendung verschiedener Kohlenhydratquellen

Solventogene Clostridien, wie *C. acetobutylicum*, sind in der Lage, die Lösungsmittel Aceton, Butanol und Ethanol aus einer Vielzahl verschiedener Kohlenhydratquellen zu generieren (Ounine *et al.*, 1985; Qureshi *et al.*, 2006; Zverlov *et al.*, 2006; Ren *et al.*, 2010). Dabei können sowohl Hexosen, wie z. B. Mannose und Galaktose, als auch Pentosen, wie z. B. Arabinose und Xylose von *C. acetobutylicum* verstoffwechselt werden (Servinsky *et al.*, 2010). Dieses weitgefächerte Substratspektrum ermöglicht dem Bakterium einen Wettbewerbsvorteil gegenüber anderen Mikroorganismen, da unter anderem die Fähigkeit zur Fermentation von Pentosen bei Mikroorganismen eingeschränkt ist (Ounine *et al.*, 1985). Des Weiteren gestattet die Substratvielfalt eine größere Handlungsfreiheit bei der industriellen Nutzung von *C. acetobutylicum*, da bis zu 79 % der Kosten durch Substratkosten verursacht werden (Green, 2011). Daher wird nachfolgend die Verwertung ausgewählter Pentosen, wie Xylose und Arabinose aber auch der Hexosen Galaktose und Mannose erörtert.

4.4.1 Pentosen

4.4.1.1 Xylose

Die Verwendung von D-Xylose als alleinige C-Quelle führte bei *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*cbei_2100* zu einem langsameren Wachstum ($\mu = 0,11 \text{ h}^{-1}$) im Vergleich zum

Wachstum auf Glukose ($\mu = 0,15 \text{ h}^{-1}$). Daraus resultierte, dass die maximale OD₆₀₀ von 7,55 erst nach 60 h Kultivierung und somit 12 h später als mit Glukose erreicht wurde (Abb. 3.16). Ursache hierfür ist die schnellere Aufnahme und Metabolisierung von Glukose im Vergleich zur Xylose (Ounine *et al.*, 1985). Für die Aufnahme von Xylose aus dem Medium sind entsprechende ABC-Transporter und Symporter verantwortlich (Servinsky *et al.*, 2010). Innerhalb der Zelle erfolgt die Umwandlung von Xylose zu Xylulose, welche anschließend in phosphorylierter Form (Xylulose-5-Phosphat) überwiegend in den Phosphoketolase-Weg (PKW) und zu einem geringen Teil in den Pentosephosphatweg (PPW) eingeht (Abb. 4.2) (Aristilde *et al.*, 2014).

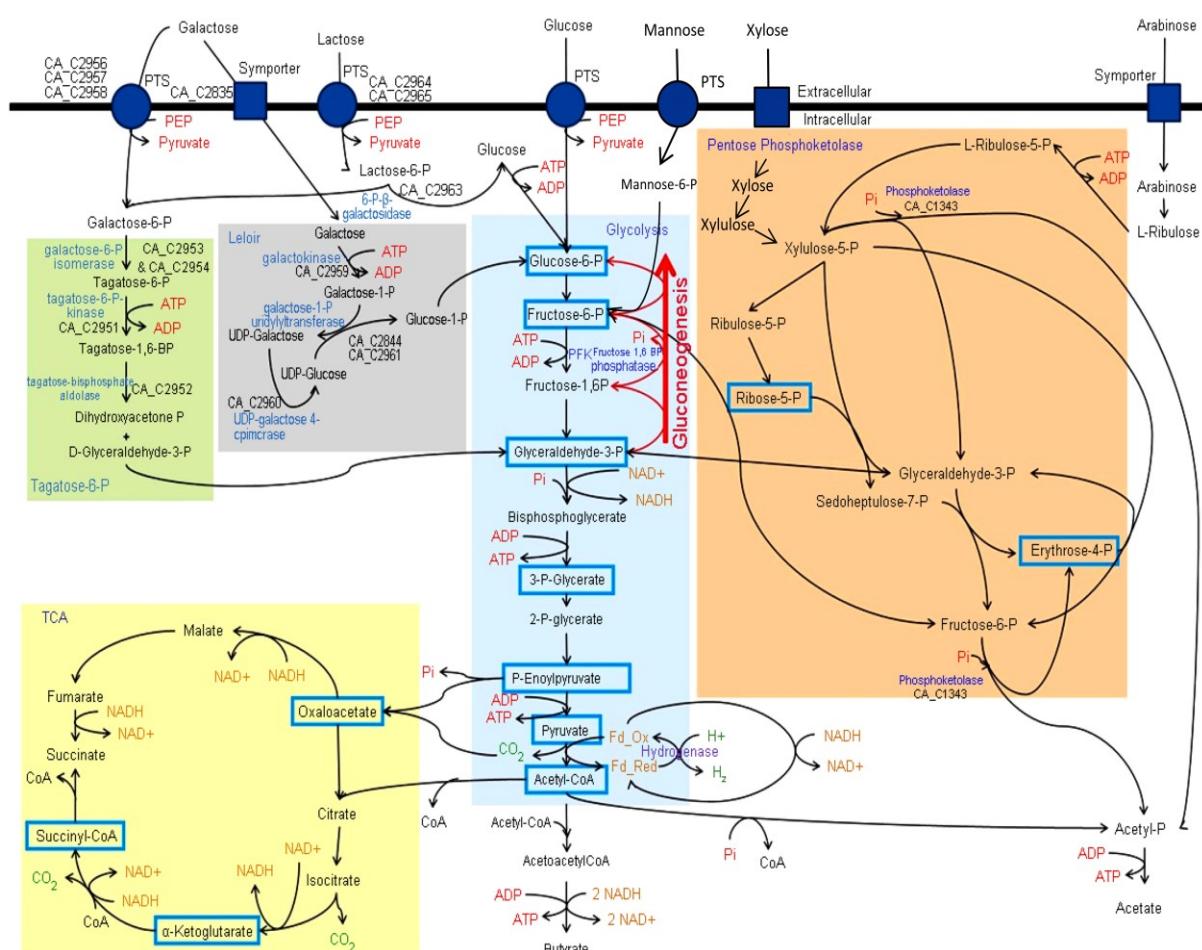


Abb. 4.2: Schematische Darstellung der Kohlenhydratverwertung in *C. acetobutylicum*. Essentielle metabolische Vorstufen sind durch blaue Kästchen hervorgehoben (Sund *et al.*, 2013, mod.).

Hexosen, wie Glukose und Mannose, welche die Glykolyse dominieren, fördern die Glykolyse-basierte Acidogenese und Solventogenese. Xylose hingegen akkumuliert im PPW, wodurch die Ribonukleotidsynthese unterstützt und der Kohlenstoff für den PKW zur

Verfügung gestellt wird (Aristilde *et al.*, 2014). Da durch die Verwendung von Xylose als C-Quelle andere Stoffwechselwege gefördert werden, kam es im Vergleich zum Wachstum auf Glukose zur Verringerung der 1,4-BDO-Synthese um 67 % (Abb. 3.17). Ein weiterer wichtiger Aspekt, welcher die 1,4-BDO-Bildung beeinträchtigen kann, ist die höhere Anfälligkeit des Xylose-Metabolismus gegenüber Butanol, aufgrund der Inhibierung der Xylose-Permease ab einer Butanolkonzentration von 8 g/l (Ounine *et al.*, 1985). Demgegenüber wird der Stoffwechsel beim Wachstum auf Glukose erst ab einer Butanolkonzentration von 13 g/l inhibiert (Jones und Woods, 1986).

4.4.1.2 Arabinose

Unter Verwendung von L-Arabinose als Substrat war das Wachstum von *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*cbei_2100* im Vergleich zur Glukose ($\mu = 0,15 \text{ h}^{-1}$) minimal verlangsamt ($\mu = 0,13 \text{ h}^{-1}$), erreichte jedoch wie auf Xylose eine maximale OD₆₀₀ von 7,7 nach 60 h Kultivierung (Abb. 3.16).

Ähnlich wie Xylose wird Arabinose über Symporter in die Zelle aufgenommen (Servinsky *et al.*, 2010) und über L-Ribulose und L-Ribulose-5-Phosphat dem Stoffwechsel zugeführt (Abb. 4.2). Für die Metabolisierung zeigt sich ebenfalls der Phosphoketolaseweg (PKW) hauptverantwortlich (Aristilde *et al.*, 2014). Darüber hinaus wird der PKW durch den Pentosephosphatweg unterstützt (Sund *et al.*, 2013). Der metabole Flux in die Glykolyse ist hingegen nur minimal (Aristilde *et al.*, 2014), was sich ebenfalls auf die 1,4-BDO-Produktion auswirkt und zu einer Verminderung um 27 % führte (Abb. 3.17). Trotz ähnlich genutzter Stoffwechselwege ist die 1,4-BDO-Produktion auf Arabinose (0,3 mM) höher als auf Xylose (0,15 mM). Als Grund ist die Bevorzugung von Arabinose von *C. acetobutylicum* zu nennen (Qureshi *et al.*, 2006; Aristilde *et al.*, 2014). Das liegt einerseits daran, dass in Anwesenheit von Arabinose die mRNA-Expression von Enzymen des PKW um das 100-fache gesteigert wird (Servinsky *et al.*, 2010). Andererseits gilt der Xylose-Metabolismus als ineffizienter durch die ratenlimitierenden Schritte beim Transport, bei der Isomerisierung und Phosphorylierung von Xylose (Xiao *et al.*, 2011), was sich ebenso in der niedrigeren Wachstumsrate widerspiegelt (Ounine *et al.*, 1983).

4.4.2 Hexosen

4.4.2.1 Galaktose

Der rekombinante Stamm *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*cbei_2100* erreichte beim Wachstum auf Galaktose die geringste maximale OD₆₀₀ von 5,5. Dafür konnte sich dieser am längsten in der stationären Phase halten (Abb. 3.16).

Für die Metabolisierung von Galaktose stehen *C. acetobutylicum* zwei verschiedene Wege zur Verfügung (Abb. 4.2): zum einen der Leloir-Weg (LW) und zum anderen der Tagatose-6-Phosphatweg (T6PW), (Servinsky *et al.*, 2010; Sund *et al.*, 2013). Die Aufnahme von Galaktose aus dem Medium erfolgt einerseits durch Symporter und andererseits durch das Phosphoenolpyruvat-Transferase-System (PTS), (Sund *et al.*, 2013). Dabei wird in Abhängigkeit der Aufnahmesysteme Galaktose entweder über den bevorzugten Leloir-Weg (Symporter-assoziiert) oder über den T6P-Weg (PTS-assoziiert) metabolisiert (Sund *et al.*, 2013). Deren Intermediate können anschließend in die Glykolyse eingehen. Das bedeutet, dass für das Wachstum auf Galaktose zwei verschiedene Stoffwechselwege, die einer komplexen Regulation unterliegen (Servinsky *et al.*, 2010), aufrechterhalten werden müssen. Dies bedeutet jedoch höhere Kosten für den Organismus. Infolgedessen ist die Lösungsmittelproduktion auf Galaktose verringert (Yu & Saddler, 1982) und führte letztlich zu einer verminderten 1,4-BDO-Synthese, die mit 0,11 mM am geringsten von den eingesetzten Kohlenhydraten war (Abb. 3.17).

4.4.2.2 Mannose

Mannose zählt zu den bevorzugten Kohlenhydratquellen von *C. acetobutylicum* (Servinsky *et al.*, 2010), was sich auch im ähnlichen Wachstumsverhalten des rekombinanten Stammes auf Glukose und Mannose widerspiegelt (Abb. 3.16). Es wurde eine ähnlich hohe maximale OD₆₀₀ von 8,4 nach 48 h Kultivierung verglichen mit Glukose (OD₆₀₀ = 8,35) erreicht.

Wie bei Hexosen üblich, erfolgt die Aufnahme von Mannose aus dem Medium über das PTS (Servinsky *et al.*, 2010; Voigt *et al.*, 2014). In der Zelle wird das gebildete Mannose-6-Phosphat zu Fructose-6-Phosphat umgewandelt, welches anschließend in die Glykolyse eingeht (Abb. 4.2). Das bedeutet, für den Mannose-Stoffwechsel wird im Gegensatz zu den anderen getesteten Kohlenhydratquellen nur ein einziges weiteres Enzym (Mannose-6-

Phosphat-Isomerase) benötigt (Servinsky *et al.*, 2010), wodurch die entstehenden Kosten für den Organismus niedrig gehalten werden. Des Weiteren werden die Gene, welche für die Aufnahme und den Metabolismus von Mannose verantwortlich sind, konstitutiv exprimiert (Servinsky *et al.*, 2010), wodurch eine schnelle und effiziente Umwandlung ermöglicht wird. Dennoch stellte sich heraus, dass die 1,4-BDO-Produktion (0,23 mM) im Vergleich zur Glukose (0,46 mM) verringert war (Abb. 3.17). Es lässt daraus schließen, dass in Anwesenheit von Glukose die am Stoffwechsel beteiligten Enzyme effektiver stimuliert werden und dementsprechend effizienter sind.

4.4.3 Kohlenhydratgemisch

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der rekombinante *C. acetobutylicum*-Stamm prinzipiell in der Lage ist, 1,4-BDO durch Fermentation verschiedener, einzelner C-Quellen zu synthetisieren. Dies eröffnet die Möglichkeit auch Lignocellulose-Hydrolysate, in denen diese Kohlenhydrate vorkommen, für die 1,4-BDO-Produktion einzusetzen.

Lignocellulose ist ein Bestandteil der pflanzlichen Zellwand und gehört demzufolge zu den nahezu unbegrenzt auf der Erde verfügbaren, nachwachsenden Rohstoffen (Kuhad & Singh, 1993; Lee, 1997; Ezeji *et al.*, 2007), welche jedoch größtenteils ungenutzt bleiben (Sarkar *et al.*, 2012). Der Einsatz von Forstabfällen oder landwirtschaftlichen Abfallstoffen, wie Getreidestroh, Reisstroh und Weizenstroh bieten das Potential, die Kosten für Fermentationssubstrate deutlich zu senken (Lee, 1997). Die Zusammensetzung der Lignocellulose umfasst drei Hauptgruppen von Polymeren: Cellulose, Hemicellulose und Lignin. Cellulose stellt den größten Anteil mit 33 - 51 %, gefolgt von Hemicellulose (19 - 34 %) und Lignin (21 - 32 %) dar (Ibraheem und Ndimba, 2013) und besteht aus β -1,4-glykosidisch-verknüpften α -D-Glukosemolekülen. Die Hemicellulose ist hingegen ein sehr heterogenes Polymer bestehend aus den Zuckern L-Arabinose, D-Galaktose, D-Glukose, D-Mannose und D-Xylose (Mussatto und Teixeira, 2010). Durch Hydrolyse der Lignocellulose können die Zuckermoleküle anschließend für Fermentationsprozesse eingesetzt werden (Abb. 4.3).

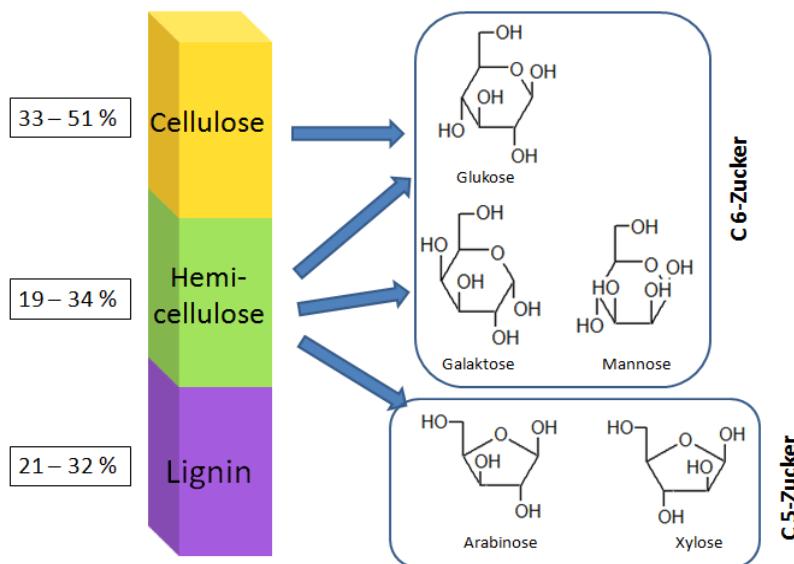


Abb. 4.3: Schematische Darstellung der Lignocellulose-Zusammensetzung. Die Pfeile deuten auf die Hauptzucker der einzelnen Lignocellulose-Fraktionen hin. (Ibraheem und Ndimba, 2013; mod.).

Die Fermentation von simulierten Lignocellulose-Hydrolysaten basierend auf der Hemicellulose-Zusammensetzung von Getreidestroh (Sarkar *et al.*, 2012) durch *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*cbei_2100* erbrachte eine 1,4-BDO-Produktion von 0,15 mM (Abb. 3.17). Im Vergleich zum Wachstum auf Glukose verringerte sich dabei die 1,4-BDO-Konzentration um 67 % und entsprach damit der Ausbeute mit Xylose.

C. acetobutylicum ist jedoch nicht in der Lage, die verschiedenen Kohlenhydrate simultan zu verwerten, da die im Medium enthaltene Glukose die Aufnahme der anderen Kohlenhydrate inhibiert (= C-Katabolit-Repression, CCR), (Servinsky *et al.*, 2010). Erst wenn die Glukose nahezu aufgebraucht ist, wird die CCR aufgehoben und die weiteren Kohlenhydrate können aufgenommen und verstoffwechselt werden. Die CCR limitiert infolgedessen die Fermentation von Lignocellulose-Hydrolysaten (Ren *et al.*, 2010). Die geringere Glukose-Konzentration im Gemisch (30 g/l) im Vergleich zum Medium mit Glukose als alleinige C-Quelle (60 g/l) und die Verwertung der weniger bevorzugten Xylose (Aristilde *et al.*, 2014) begünstigten die verminderte 1,4-BDO-Bildung.

Nichtsdestotrotz stellt der Einsatz von Lignocellulose-Hydrolysaten aufgrund der Verfügbarkeit und Kostenersparnis einen vielversprechenden Ansatz für Fermentationsstrategien dar. Insbesondere da Ren *et al.* (2010) eine *ccpA*-Mutante von *C. acetobutylicum* generierten, in welcher die CCR unterdrückt wird.

4.5 *C. acetobutylicum* pT::P(ptb)ckl_3020

Der Zeitpunkt der Expression eines Enzyms kann einen starken Effekt auf die Produktbildung haben (Sillers *et al.*, 2009). Daher sah die Vorgehensweise dieser Arbeit die Verwendung von drei unterschiedlichen Promotoren für die Expression der 4HBDs vor, die gut untersucht waren und eine starke Expression in *C. acetobutylicum* erwarten ließen (3.5.3).

Der Effekt der Promotoren P_{thlA} , P_{ptb} und P_{adc} auf die 1,4-BDO-Produktion mit *Cbei_2100* war jedoch trotz unterschiedlicher Expressionszeitpunkte minimal. Anders verhielt es sich mit der 1,4-BDO-Synthese unter Verwendung von *Ckl_3020*. Hier führten die Promotoren P_{ptb} und P_{adc} zu einer Steigerung der 1,4-BDO-Bildung im Vergleich zum P_{thlA} und infolgedessen zu einer Verminderung der GHB-Konzentration (Abb. 3.20). Insbesondere *C. acetobutylicum* pT::P(ptb)ckl_3020 zeichnete sich durch eine deutliche Zunahme der 1,4-BDO-Produktion aus (0,62 mM). Analysen der 1,4-BDO-Synthese über die Zeit (Abb. A16) offenbarten, dass die 1,4-BDO-Bildung nun mehr dem Verhalten von *C. acetobutylicum* pTc::P(thlA)cbei_2100 (Abb. 3.13, A) und weniger dem von *C. acetobutylicum* pTc::P(thlA)ckl_3020 (Abb. 3.13, B) entsprach. Durch die mutmaßlich frühere Expression von *Ckl_3020* durch P_{ptb} stieg die Konzentration von 1,4-BDO bereits nach 48 h Kultivierung an und erreichte bereits nach 60 h die Maximalkonzentration. Im Vergleich dazu begann die 1,4-BDO-Produktion bei *C. acetobutylicum* pTc::P(thlA)ckl_3020 erst nach 60 h. Diesen Effekt konnten auch Sillers *et al.* (2009) feststellen: die frühere Expression von Lösungsmittel-assoziierten Enzymen in *C. acetobutylicum* führte ebenfalls zu einer früher einsetzenden und vermehrten Alkoholbildung. Ein Aspekt weiterer fortführender Arbeiten sollte deshalb eine detailliertere, zeitliche Analyse der Expression der einzelnen Gene beinhalten. Quantitative RT-PCR-Analysen können dabei Aufschluss über die mRNA-Transkriptmengen geben. Immunologische Arbeiten mittels entsprechender Antikörper ermöglichen weiterhin eine Auskunft darüber, inwieweit gesteigerte Konzentrationen von 1,4-BDO mit erhöhten Enzymmengen korrelieren.

4.6 Stoffwechseldefektmutanten

Die Produktion der Lösungsmittel Aceton, Butanol und Ethanol führte zu einer Verringerung der 1,4-BDO-Produktion, da der Kohlenstofffluss vom neuen Syntheseweg weggeführt wurde. Zuvor generierte Stoffwechseldefektmutanten von *C. acetobutylicum* (Lehmann, 2012 a) zeichneten sich zum Teil durch ein stark verändertes Produktspektrum aus (Lehmann et al., 2012 b und c). Aus diesem Grund wurden für die weitere Herangehensweise dieser Arbeit verschiedene *C. acetobutylicum*-Mutanten (Tab. 2.1) für die 1,4-BDO-Synthese eingesetzt.

4.6.1 Defekte in der Lösungsmittelproduktion

Die rekombinanten Stämme produzierten ebenso wie der Wildtyp die Lösungsmittel Aceton, Butanol und Ethanol. Dabei konnten jedoch bei *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*cbei_2100* und *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*ckl_3020* erhöhte Konzentrationen an Butanol und Ethanol detektiert werden (Abb. 3.11). Die für die Lösungsmittelbildung verantwortlichen Enzyme sind unter anderem die Acetoacetatdecarboxylase (Adc) und Aldehyd-/Alkoholdehydrogenase (AdhE). Beide Enzyme sind in den entsprechenden Mutantenstämmen (Lehmann, 2012 a) ausgeschaltet (Tab. 2.1).

Die transformierte Adc-Defektmutante zeigte einen ähnlichen Phänotyp wie die Adc-Mutante (Lehmann et al., 2012 b). Die Acetonproduktion erfolgte nur noch durch die spontane Decarboxylierung von Acetoacetat (Han et al., 2011) und wurde dementsprechend ohne Enzymunterstützung drastisch reduziert (Endkonzentration ca. 5 mM). Infolgedessen kam es zu einer deutlichen Akkumulation von Acetat (ca. 67 mM), mutmaßlich hervorgerufen durch einen Rückstau von Acetoacetat, welches wiederum die Enzymaktivität der Acetoacetyl-CoA:Acyl-CoA-Transferase (CtfAB) durch Feedback-Inhibierung reduzierte und somit die Acetatassimilation verringerte. Die Reduktion der Acetonbildung führte jedoch nicht zu einer erhöhten 1,4-BDO-Synthese. Stattdessen war der gesamte Stoffwechsel der Mutante derart beeinflusst, dass auch die 1,4-BDO-Bildung deutlich reduziert war (0,14 mM), (Abb. 3.24). In gleicher Weise wirkte sich dieser Effekt auch auf die Butanolsynthese aus. Diese ist um etwa die Hälfte (ca. 90 mM) im Vergleich zum Wildtypstamm gesunken und konnte ebenfalls bei Lehmann et al. (2012 b) festgestellt

werden. Durch Akkumulation und verringelter Assimilation des Acetats stand der verwendete Kohlenstoff nicht mehr für die Bildung der Lösungsmittel und insbesondere für die 1,4-BDO-Synthese zur Verfügung, sodass eine verringerte 1,4-BDO-Produktion die Folge war.

Auf ähnliche Weise wirkte sich der Defekt im *ctfA*-Gen der entsprechenden Mutante auf die 1,4-BDO-Bildung aus. Die Coenzym A-Transferase ist für die Assimilierung der Säure Acetat verantwortlich (Hartmanis *et al.*, 1984). Der Defekt verursachte eine Akkumulation des Acetats und führte aufgrund der „Kohlenstoffspeicherung“ infolgedessen zu einer verminderten Lösungsmittel- (Lehmann *et al.*, 2012 b) sowie 1,4-BDO-Produktion (Abb. 3.24).

Yim *et al.* zeigten 2011, dass die AdhE2 von *C. acetobutylicum* in der Lage ist, die Bildung von 1,4-BDO zu katalysieren. Weitere getesteten Aldehyd- und Alkoholdehydrogenasen waren dazu nicht befähigt. Da *C. acetobutylicum* weitere Gene für Aldheyd- und Alkoholdehydrogenasen im Genom besitzt (Nölling *et al.*, 2001), galt es zu überprüfen, ob diese Fähigkeit der AdhE2 ein Alleinstellungsmerkmal und somit essentiell für die 1,4-BDO-Bildung ist oder ob eine andere entsprechende Dehydrogenase ebenso die Funktion ausführen kann. Aus diesem Grund wurden die beiden Aldehyd-/Alkoholdehydrogenasen AdhE1 und AdhE2 von *C. acetobutylicum* für Untersuchungen herangezogen. Wenn die AdhE2 essentiell für die 1,4-BDO-Bildung ist, müsste die Produktion im Rezipientenmutantenstamm ausbleiben. Bei der transformierten AdhE1-Mutante hingegen dürfte der Defekt keine Auswirkungen auf die 1,4-BDO-Produktion haben. Es zeigte sich jedoch, dass sowohl bei der AdhE1-Mutante als auch bei der AdhE2-Mutante die Bildung von 1,4-BDO im Vergleich zum Referenzstamm *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*cbei_2100* deutlich sank, nicht aber komplett eingestellt wurde (0,06 mM bzw. 0,09 mM; Abb. 3.24). Dies könnte bedeuten, dass die AdhE2 nicht hauptverantwortlich für die 1,4-BDO-Bildung ist, sondern, dass die finalen Syntheseschritte durch beide AdhEs katalysiert werden können. Inwieweit weitere Aldehyd- und Alkoholdehydrogenasen, wie die Butyraldehyddehydrogenase (BYDH) und Butanoldehydrogenase (BDH), daran beteiligt sind, bleibt weiterhin zu überprüfen.

Obwohl die Lösungsmittelbildung bei den Defektmutanten reduziert werden konnte (Tab. A5), spiegelt sich der veränderte Kohlenstofffluss nicht in einer erhöhten 1,4-BDO-

Konzentration wider. Damit blieb die 1,4-BDO-Bildung der Mutantenstämme hinter den Erwartungen zurück. „Metabolic Engineering“-Strategien, wie z. B. das Ausschalten von bestimmten Genen, ermöglichen eine Vielzahl von Veränderungen im Stoffwechsel und bieten ein großes Potential für zukünftige Arbeiten. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass einzelne Veränderungen zum Teil drastische Auswirkungen auf den Stoffwechsel haben können und dementsprechend komplex sind. Des Weiteren fehlen noch genaue Angaben zum Transkriptom und zur biochemischen Charakterisierung der jeweiligen Mutantenstämme. Das Verhalten jener Mutanten auf molekularer Ebene ist somit noch unklar, weshalb weitere Analysen folgen müssen. Aus diesem Grund ist eine finale Aussage bezüglich der 1,4-BDO-Produktion der Mutantenstämme auf diesem Stand schwierig und noch nicht eindeutig.

4.6.2 Defekte in der Säureproduktion

Die Produktion der Säuren Acetat und Butyrat dient *C. acetobutylicum* der Energiegewinnung (Hartmanis und Gatenbeck, 1984; Wiesenborn *et al.*, 1989) und stellt somit einen wichtigen Aspekt im Stoffwechsel dar. Die Eingangsenzyme für die jeweiligen Biosynthesewege sind die Phosphotransacetylase (Pta) und Phosphotransbutyrylase (PtB). Letztere steht, wie zuvor bereits beschrieben, im Verdacht die GHB-Produktion durch die Umwandlung von 4-HB-CoA zu 4-HB-Phosphat (Liu und Steinbüchel, 2000) zu begünstigen. Um dies näher zu beleuchten, wurde die PtB-Rezipientenmutante (Tab. 2.1) hinsichtlich der 1,4-BDO- und GHB-Bildung untersucht. Bei einer Beteiligung der PtB an der GHB-Produktion müsste die GHB-Konzentration im Vergleich zum Referenzstamm *C. acetobutylicum pTc::P(thlA)cbei_2100* verringert sein, da der mutmaßliche GHB-Syntheseweg ausgeschaltet ist. Die Ergebnisse zeigten jedoch, dass es zu einem deutlichen Anstieg der GHB- (0,71 mM) und zu einer Abnahme der 1,4-BDO-Konzentration (0,08 mM) kam (Abb. 3.22). Dies bedeutet, dass die Bildung von GHB höchstwahrscheinlich überwiegend spontan abläuft und somit unabhängig von Enzym-katalysierten Reaktionen ist. Um diesen Sachverhalt weiter zu untermauern und um auszuschließen, dass die Pta, welche eine ähnliche Reaktion (Acetyl-CoA zu Acetyl-Phosphat) wie die PtB katalysiert (Boynton *et al.*, 1996), an der GHB-Bildung beteiligt ist, wurde zusätzlich die Pta-Mutante näher untersucht. Es stellte sich dabei heraus, dass die GHB-Konzentration im Vergleich zum PtB-Rezipientenstamm sank (0,46 mM) und gleichzeitig die 1,4-BDO-Konzentration anstieg (0,19 mM). Vergleichend zum

Referenzstamm *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*cbei_2100* konnte jedoch kein Effekt des Pta-Defekts auf die GHB-Produktion festgestellt werden.

Die Hinweise deuten somit verstrk auf eine spontane Bildung von GHB hin und weniger auf eine enzymkatalysierte. Dass dies im Konzentrationsbereich von ca. 1 mM möglich ist, zeigt die nicht-enzymatische Decarboxylierung von Acetaldehyd zu Aceton in entsprechenden Defektmutanten (Lehmann *et al.*, 2012 b). Nichtsdestotrotz sollte dies durch eine Pta/Ptb-Doppel-„Knock down“ Mutante überprüft werden. Bei dieser wäre ein berleben der Zellen noch möglich und der theoretische Einfluss beider Enzyme auf die GHB-Bildung minimal.

4.7 Fazit

Der globale Bedarf und die Bedeutung von 1,4-BDO wchs Jahr für Jahr (in: 1,4-Butanediol market analysis and segment forecasts to 2020; www.hexareports.com; Stand: 25.02.2016), sodass die Produktion von 1,4-BDO immer wichtiger wird. Zukunftsorientierte Forschungen setzen dabei vermehrt auf Erdöl-unabhängige Produktionen von Plattformchemikalien (Zeng und Sabra, 2011).

Die in dieser Arbeit vorgestellte Strategie ermöglichte durch die Bereitstellung einer 4HBD-Aktivität eine Erweiterung des zentralen Stoffwechsels und des Produktspektrums von *C. acetobutylicum* und die erstmalige anaerobe biotechnologische Erzeugung von 1,4-BDO. Somit konnte der „Proof-of-Principle“ gezeigt und ein erster, wichtiger Schritt für eine petrochemisch unabhängige Synthese von 1,4-BDO erfolgreich genommen werden. Die 1,4-BDO-Produktion in *C. acetobutylicum* wurde durch drei verschiedene 4HBDs ermöglicht. Da die erzielten 1,4-BDO-Konzentrationen (11 - 45 mg/l) bisher noch deutlich unter den wirtschaftlichen 100 g/l lagen, wurden bereits erste Optimierungsansätze angedeutet. Aufgrund der Komplexität des Wirtsorganismus hatten diese bisher jedoch noch keine 1,4-BDO-Steigerung zur Folge, sodass noch weitere wichtige Arbeiten, wie z. B. die Analyse und Veränderung der Kultivierungsparameter im „Scale-up“ sowie die Aufklärung der zeitlichen Expression und mRNA-Menge der 4HBD durch immunologische Methoden und qRT-PCR, notwendig sind. Ein vielversprechender Ansatz, welcher weiterhin verfolgt werden sollte, zeigte sich durch die Verwertbarkeit von verschiedenen Kohlenhydratquellen für die 1,4-BDO-Synthese, wodurch Lignocellulose-Hydrolysate als kostengünstiges Substrat

denkbar sind. Es müssen jedoch noch weitere Untersuchungen, insbesondere mit Lignocellulose-Hydrolysaten, folgen. Dabei sollte der Einfluss von inhibierenden Verbindungen, wie z. B. Furfural, Hydroxymethylfurfural, Ferulasäure, Coumarinsäure und Glucoronsäure, die bei der Aufarbeitung von Lignocellulose entstehen (Ezeji *et al.*, 2007), auf *C. acetobutylicum* genauer untersucht werden.

Es bleibt abschließend festzuhalten, dass *C. acetobutylicum* das Potential durch Weiterentwicklung und Modifikation besitzt, sich als zukünftiger 1,4-BDO-Produktionsstamm zu etablieren.

5. Zusammenfassung

1. Das nicht-natürlich vorkommende 1,4-Butandiol konnte durch einen neuen anaeroben Stoffwechselweg in *Clostridium acetobutylicum* auf biologische Weise erzeugt werden.
2. Für die Erzeugung von 1,4-BDO in *C. acetobutylicum* wird nur ein zusätzliches Enzym, die 4HBD, benötigt.
3. Für den 1,4-BDO-Nachweis wurden zwei verschiedene Methoden etabliert: zum einen eine schnelle und kostengünstige Methode basierend auf der Dünnschichtchromatografie und zum anderen ein sensitiver Nachweis via GC/MS-Analysen.
4. Die 1,4-BDO-Ausbeuten variierten in Abhängigkeit der verwendeten 4HBDs: Cbei_2100 (0,46 mM), Ckl_3020 (0,26 mM) und AbfD (0,13 mM).
5. Als Nebenprodukt der 1,4-BDO-Synthese konnte γ -Hydroxybutyrat (GHB) detektiert werden. Die Konzentrationen an GHB waren in den meisten rekombinanten Stämmen höher als 1,4-BDO.
6. Die 1,4-BDO-Produktion mit Hilfe von *C. acetobutylicum* war unter Verwendung verschiedener Kohlenhydratquellen (Arabinose, Xylose, Mannose, Galaktose und Glukose) möglich. Dadurch ist der Einsatz von Lignocellulose-Hydrolysaten für die Produktion von 1,4-BDO denkbar.
7. Der Austausch des ThiolaseA-Promotors durch den Phosphotransbutyrylase-Promotor führte bei dem rekombinanten Stamm *C. acetobutylicum* pT::P(ptb)ckl_3020 zu einer erhöhten 1,4-BDO-Produktion (0,62 mM) und zu einer Verschiebung des 1,4-BDO-GHB-Verhältnisses zum 1,4-BDO.
8. Weitere erste Optimierungsansätze, wie der „Scale-up“ und die Verwendung von Stoffwechseldefektmutanten, führten bisher noch zu keiner Steigerung der 1,4-BDO-Produktion.

6. Literaturverzeichnis

- Alsaker, K. V., & Papoutsakis, E. T.** 2005. Transcriptional program of early sporulation and stationary-phase events in *Clostridium acetobutylicum*. *J. Bacteriol.* **187**: 7103-7118.
- Anand, P., & Saxena, R. K.** 2012. A novel thin-layer chromatography method to screen 1,3-propanediol producers. *J Ind Microbiol Biotechnol.* **39**: 1713-1718.
- Aristilde, L., Lewis, I. A., Park, J. O., & Rabinowitz, J. D.** 2014. Hierarchy in Pentose sugar metabolism in *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* doi:10.1128/AEM.03199-14.
- Atsumi, S., Cann, A. F., Connor, M. R., Shen, C. R., Smith, K. M., Brynildsen, M. P., Chou, K. J. Y., Hanai, T., & Liao, J. C.** 2008. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol production. *Metabol Engineer.* **10**: 305-311.
- Ayoubi, T. A. Y., & Van de Ven, W. J. M.** 1996. Regulation of gene expression by alternative promoters. *FASEB J.* **10**: 453-460.
- Baer, S. H., Blaschek, H. P., & Smith, T. L.** 1987. Effect of butanol challenge and temperature on lipid composition and membrane fluidity of butanol tolerant *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 2854-2861.
- Bahl, H., & Dürre, P.** 1993. Clostridia, S. 285-323. In H. Sahm (ed.), *Biotechnology*, 2nd ed., vol. 1. VCH-Verlag GmbH, Weinheim, Germany.
- Bergmeyer, H. U.** 1983. Methods in enzymatic analysis. Verlag Chemie Weinheim, Germany.
- Bertram, J.** 1989. Entwicklung eines Systems zum DNA-Transfer und zur Transposon-Mutagenese für *Clostridium acetobutylicum*. Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen.
- Biebl, H., Menzel, K., Zeng, A.-P., & Deckwer, D.-W.** 1999. Microbial production of 1,3-propanediol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**: 289-297.
- Birnboim, H. C., & Doly, J.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Acids Research* **7**: 1513-1523.

- Bowles, L. K., & Ellefson, W., L.** 1985. Effects of butanol on *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 1165-1170.
- Boynton, Z. L., Bennett, G. N., & Rudolph, F. B.** 1996. Cloning, sequencing, and expression of genes encoding Phosphotransacetylase and Acetate Kinase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2758-2766.
- Bradford, M.** 1976. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Breznak, J. A. & Costilow, R. N.** 1994. Physiochemical factors of growth. In: Methods of general and molecular bacteriology. (Gerhardt, Ed.) Washington DC, USA: American Society for Microbiology. 137-154.
- Buckel, W.** 2001. Unusual enzymes involved in five pathways of glutamate fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**: 263-273.
- Buckel, W., Martins, B. M., Messerschmidt, A., & Golding, B. T.** 2005. Radical-mediated dehydration reactions in anaerobic bacteria. *Biol. Chem.* **386**: 951-959.
- Burk, M. J.** 2010. Sustainable production of industrial chemicals from sugars. *Int. Sugar J.* **112**: 30-35.
- Chandra, R., Takeuchi, H., & Hasegawa, T.** 2012. Methane production from lignocellulosic agricultural crop wastes: A review in context to second generation of biofuel production. *Ren. Sust. Ener. Rev.* **16**: 1462-1476.
- Chiao, J.-s., & Sun, Z.-h.** 2007. History of the acetone-butanol-ethanol fermentation industry in China: Development of continuous production technology. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **13**: 12-14.
- Clomburg, J. M., & Gonzalez, R.** 2011. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of 1,2-propanediol from glycerol. *Biotechnol. Bioeng.* **108**: 897-879.
- Corey, E. J., & Venkateswarlu, A.** 1972. Protection of hydroxyl groups as tert-butyldimethylsilyl derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **94**: 6190-6191.

- Cornillot, E., Croux, C., & Soucaille, P.** 1997. Physical and genetic map of the *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 chromosome. *J. Bacteriol.* **179**: 7426-7434.
- De Bont, J. A. M.** 1998. Solvent-tolerant bacteria in biocatalysis. *TIBTECH.* **16**: 493-499.
- Demirbas, M.F.** 2006. Current technologies for biomass conversion into chemicals and fuels. *Energy Sources, Part A: recovery, utilization, and environmental effects.* **28**: 1181-1188.
- Desai, R. P., & Papoutsakis, E. T.** 1999. Antisense RNA strategies for metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 936-945.
- Dower, W. J., Miller, J. F., & Ragsdale, C. W.** 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucl. Acids Research* **16**: 6127-6145.
- Dürre, P.** 2008. Fermentative Butanol production – Bulk chemical and biofuel. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1125**: 353-362.
- Ezeji, T., Qureshi, N., & Blaschek, H. P.** 2007. Butanol production from agricultural residues: Impact of degradation products on *Clostridium beijerinckii* growth and butanol fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* **97**: 1460-1469.
- Ezeji, T., & Blaschek, H. P.** 2008. Fermentation of dried distillers'grains and solubles (DDGS) hydrolysates to solvents and value-added products by solventogenic clostridia. *Bior. Tech.* **99**: 5232-5242.
- Fischer, R. J., Oehmcke, S., Meyer, U., Mix, M., Schwarz, K., Fiedler, T., & Bahl, H.** 2006. Transcription of the *pst* operon of *Clostridium acetobutylicum* is dependent on phosphate concentration and pH. *J. Bacteriol.* **188**: 5469-5478.
- Fontaine, L., Meynil-Salles, I., Girbal, L., Yang, X., Croux, C., & Soucaille, P.** 2002. Molecular characterization and transcriptional analysis of *adhE2*, the gene encoding the NADH-dependent Aldehyde/ Alcohol Dehydrogenase responsible for Butanol production in alcohologenic cultures of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J. Bacteriol.* **184**: 821-830.
- Gerhardt, A., Cinkaya, I., Lindner, D., Huisman, G., & Buckel, W.** 2000. Fermentation of 4-aminobutyrate by *Clostridium aminobutyricum*: cloning oft wo genes involved in the formation and dehydration of 4-hydroxybutyryl-CoA. *Arch. Microbiol.* **174**: 189-199.

- Girbal, L., Mortier-Barrière, I., Raynaud, F., Rouanet, C., Croux, C., & Soucaille, P.** 2003. Development of a Sensitive Gene Expression Reporter System for *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 4985-4988.
- Girbal, L., von Abendroth, G., Winkler, M., Benton, P. M. C., Meynil-Salles, I., Croux, C., Peters, J. P., Happe, T., & Soucaille , P.** 2005. Homologous and Heterologous Overexpression in *Clostridium acetobutylicum* and Characterization of purified clostridial and algal Fe-only hydrogenases with high specific activities. *App. Environ. Microbiol.* **5**: 2777-2781.
- Grant, S. G. N., Jessee, J., Bloom, F. R., & Hanahan, D.** 1990. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**: 4645-4649.
- Green, E. M.** 2011. Fermentative production of butanol – the industrial perspective. *Curr. Opin. Biotechnol.* **22**: 337-343.
- Gustafsson, C., Govindarajan, S., & Minshull, J.** 2004. Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol.* **22**: 346-353.
- Haas, T., Jaeger, B., Weber, R., Mitchell, F. S., & King, C. F.** 2005. New diol processes: 1,3-propanediol and 1,4-butanediol. *Appl. Catalys.* **280**: 83-88.
- Han, B., Gopalan, V., & Ezeji, T. C.** 2011. Acetone production in solventogenic *Clostridium* species: new insights from non-enzymatic decarboxylation of acetoacetate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **91**: 565-576.
- Hartmanis, M. G. N, & Gatenbeck, S.** 1984. Intermediary metabolism in *Clostridium acetobutylicum*: Levels of enzymes involved in the formation of acetate and butyrate. *App. Environ. Microbiol.* **47**: 1277-1283.
- Hartmanis, M., Klason, T., & Gatenbeck, S.** 1984. Uptake and activation of acetate and butyrate in *Clostridium acetobutylicum*. *App. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 66-71.
- Heap, J. T., Pennington, O. J., Cartman, S. T., Carter, G. P., & Minton, N. P.** 2007. The CloStron: A universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*. *J. Microbiol. Meth.* **70**: 452-464.

- Hershberg, R., & Petrov, D. A.** 2008. Selection on codon bias. *Annu. Rev. Genet.* **42**: 287-299.
- Hwang, H. J., Park, J. H., Kim, J. H., Kong, M. K., Kim, J. W., Park, J. W., Cho, K. M., & Lee, P. C.** 2014. Engineering of a butyraldehyde dehydrogenase of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* to fit an engineered 1,4-butanediol pathway in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **111**: 1374-1384.
- Ibraheem, O., & Ndimba, B. K.** 2013. Molecular adaptation mechanisms employed by ethanologenic bacteria in response to lignocelluloses-derived inhibitory compounds. *Int. J. Biol. Sci.* **9**: 598-612.
- Ingram, L. O.** 1976. Adaption of membrane lipids to alcohols. *J. Bacteriol.* **125**: 670-678.
- Inoue, A., & Horikoshi, K.** 1989. A *Pseudomonas* thrives in high concentrations of toluene. *Nat.* **338**: 264-266.
- Isken, S., & de Bont, J. A. M.** 1998. Bacteria tolerant to organic solvents. *Extremophiles.* **2**: 229-238.
- Jewell, J. B., Coutinho, J. B., & Kropinski, A. M.** 1986. Bioconversion of Propionic, Valeric, and 4-Hydroxybutyric acids into the corresponding alcohols by *Clostridium acetobutylicum* NRRL 527. *Curr. Microbiol.* **13**: 215-219.
- Ji, X.-J., Huang, H., Zhu, J.-G., Ren, L.-J., Nie, Z.-K., Du, J., & Li, S.** 2010. Engineering *Klebsiella oxytoca* for efficient 2,3-butanediol production through insertional inactivation of acetaldehyde dehydrogenase gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**: 1751-1758.
- Jones, D. T., van der Westhuizen, A., Long, S., Allock, E. R., Reid, S. J., & Woods, D. R.** 1982. Solvent production and morphological changes in *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**: 1434-1439.
- Jones, D.T, & Woods, D. R.** 1986. Acetone-Butanol fermentation revisited. *Microbiol. Rev.* **50**: 484-524.
- Kane, J. F.** 1995. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**: 494-500.

- Keasling, J. D.** 2010. Manufacturing molecules through metabolic engineering. *Science*. **330**: 1355-1358.
- Kuhad, R. C., & Singh, A.** 1993. Lignocellulose Biotechnology: Current and future prospects. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2**: 151-172.
- Kurland, C. G.** 1991. Codon bias and gene expression. *FEBS*. **285**: 165-169.
- Kurland, C. G., & Gallant, J.** 1995. Errors of heterologous protein expression. *Curr. Opin. Biotechnol.* **7**: 489-493.
- Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nat.* **227**: 680-685.
- Lee, J.** 1997. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *J. Biotechnol.* **56**: 1-24.
- Lehmann, D.** 2012 a. Neue Einblicke in den Gärungsstoffwechsel von *Clostridium acetobutylicum*. Dissertation. Universität Rostock.
- Lehmann, D., Hönicke, D., Ehrenreich, A., Schmidt, M., Weuster-Botz, D., Bahl, H., & Lütke-Eversloh, T.** 2012, b. Modifying the product pattern of *Clostridium acetobutylicum* – Physiological effects of disrupting the acetate and acetone formation pathways. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **94**: 743-754.
- Lehmann, D., Radomski, N., & Lütke-Eversloh, T.** 2012 c. New insights into the butyric acid metabolism of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **96**: 1325-1339.
- Liu, S.-J., & Steinbüchel, A.** 2000. Exploitation of butyrate kinase and phosphotransbutyrylase from *Clostridium acetobutylicum* for the *in vitro* biosynthesis of poly(hydroxyalkanoic acid). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**: 545-552.
- Lütke-Eversloh, T., & Bahl, H.** 2011. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum*: recent advances to improve butanol production. *Curr. Opin. Biotechnol.* **22**: 634-647.
- Ma, C., Wang, A., Qin, J., Li, L., Ai, X., Jiang, T., Tang, H., & Xu, P.** 2009. Enhanced 2,3-butanediol production by *Klebsiella pneumoniae* SDM. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **82**: 49-57.

- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A., & Clark, D. P.** 2013. Brock - Biology of Microorganisms. 13. überarbeitete Auflage. Pearson Studium, San Francisco, USA .
- Maiorella, B., Blanch, H. W., & Wilke, C. R.** 1983. By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* **25**: 103-121.
- Martins, B. M., Dobbek, H., Cinkaya, I., Buckel, W., & Messerschmidt, A.** 2004. Crystal structure of 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase: radical catalysis involving a [4Fe-4S] cluster and flavin. *PNAS*. **101**: 15645-15649.
- Martins, B. M., Messerschmidt, A., Friedrich, P., Zhang, J., & Buckel, W.** 2007. 4-Hydroxybutyryl-CoA dehydratase. *Handbook Metalloproteins*. 1-11.
- Mermelstein, L. D., Welker, N. E., Bennett, G. N., & Papoutsakis, E. T.** 1992. Expression of Cloned Homologous Fermentative Genes in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Bio/Technology* **10**: 190-195.
- Mermelstein, L. D., & Papoutsakis, E. T.** 1993. *In Vivo* Methylation in *Escherichia coli* by the *Bacillus subtilis* Phage φ3T I Methyltransferase To Protect Plasmids from Restriction upon Transformation of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1077-1081.
- Mitchell, W. J.** 1998. Physiology of carbohydrate to solvent conversion by clostridia. *Adv. Microb. Physiol.* **39**: 31-130.
- Monot, F. J.-R. M., Petitdemange, H. & Gay, R.** 1982. Acetone and Butanol Production by *Clostridium acetobutylicum* in a Synthetic Medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 1318-1324.
- Mussatto, S. I., & Teixeira, J. A.** 2010. Lignocellulose as raw material in fermentation processes. *Curr. Research.* **2**: 897-907.
- Müh, U., Cinkaya, I., Albracht, S. P. J., & Buckel, W.** 1996. 4-Hydroxybutyryl-CoA Dehydratase from *Clostridium aminobutyricum*: Characterization of FAD and Iron-Sulfur Clusters involved in an overall non-redox reaction. *Biochem.* **35**: 11710-11718.
- Nakamura, C. E., & Whited, G. M.** 2003. Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**: 454-459.

- Näser, U., Pierik, A. J., Scott, R., Cinkaya, I., Buckel, W., & Golding, B. T.** 2005. Synthesis of ^{13}C -labeld γ -hydroxybutyrate for EPR studies with 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase. *Bioorg. Chem.* **33**: 53-66.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., & Ehrhardt, W.** 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**: 255-262.
- Nissen, T. L., Kielland-Brandt, M. C., Nielsen, J., & Villadsen, J.** 2000. Optimization of ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering of the ammonium assimilation. *Metabol. Engineer.* **2**: 69-77.
- Nölling, J., Breton, G., Omelchenko, M. V., Makarova, K. S., Zeng, Q., Gibson, R., Lee, H. M., Dubois, J., Qiu, D., Hitti, Y., et al.** 2001. Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *J. Bacteriol.* **183**: 4823-4838.
- Ounine, K., Petitdemange, H., Raval, G., & Gay, R.** 1983. Acetone-butanol production from pentoses by *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnol. L.* **5**: 605-610.
- Ounine, K., Petitdemange, H., Raval, G., & Gay, R.** 1985. Regulation and Butanol inhibition of D-Xylose and D-Glucose uptake in *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**:874-878.
- Papoutsakis, E. T.** 2008. Engineering solventogenic clostridia. *Curr. Opin. Biotechnol.* **19**: 420-429.
- Pinaetti, A., Battistelli, M., Citterio, B., & Bruscolini, F.** 2009. Morphological changes in *Aeromonas hydrophila* in response to osmotic stress. *Micron* **40**: 426-433.
- Plotkin, J. B., & Kudla, G.** 2011. Synonymous but not the same: the causes and consequences of codon bias. *Nat.* **12**: 32-42.
- Qureshi, N., Li, X.-L., Hughes, S., Saha, B. C., & Cotta, M. A.** 2006. Butanol Production from Corn Fiber Xylan Using *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnol. Prog.* **22**: 673-680.

- Ren, C., Gu, Y., Hu, S., Wu, Y., Wang, P., Yang, Y., Yang, C., Yang, S., & Jiang, W.** 2010. Identification and inactivation of pleitropic regulator CcpA to eliminate glucose repression of xylose utilization in *Clostridium acetobutylicum*. *Metabol. Engineer.* **12**: 446-454.
- Sambrook, J., & Russell, D.** 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sangster, J.** 1989. Octanol-Water Partition Coefficients of simple organic compounds. *J. Phys. Chem. Ref.* **18**: 1111-1227.
- Sarkar, N., Ghosh, S. K., Bannerjee, S., & Aikat, K.** 2012. Bioethanol production from agricultural waste: an overview. *Ren. Ener.* **37**: 19-27.
- Scherf, U., & Buckel, W.** 1993. Purification and properties of an iron-sulfur and FAD containing 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase/ vinylacetyl-CoA $\Delta^3\text{-}\Delta^2$ - isomerase from *Clostridium aminobutyricum*. *Eur. J. Biochem.* **215**: 421-429.
- Scherf, U., Söhling, B., Gottschalk, G., Linder, D., & Buckel, W.** 1994. Succinate-ethanol fermentation in *Clostridium kluyveri*: purification and characterisation of 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase/ vinylacetyl-CoA $\Delta^3\text{-}\Delta^2$ - isomerase. *Arch. Microbiol.* **161**: 239-245.
- Schmidt, F. R.** 2005. Optimization and scale up of industrial fermentation processes. *App. Microbiol. Biotechnol.* **68**: 425-435.
- Schulz, F.** 2013. Fluoreszenzproteine in *Clostridium acetobutylicum*- Ein neues *in vivo* Reportersystem. Dissertation, Universität Rostock.
- Servinsky, M. D., Kiel, J. T., Dupuy, N. F., & Sund, C. J.** 2010. Transcriptional analysis of differential carbohydrate utilization by *Clostridium acetobutylicum*. *Microbiol.* **156**: 3478-3491.
- Shi, B., & Xia, X.** 2003. Morphological changes of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* in response to temperature selection. *Curr. Microbiol.* **46**: 120-123.
- Sikkema, J., de Bont, J. A. M., & Poolman, B.** 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* **59**: 201-222.

- Sillers, R., Al-Hinai, M. A., & Papoutsakis, E. T.** 2009. Aldehyde-Alcohol Dehydrogenase and/or Thiolase Overexpression Coupled with CoA Transferase Downregulation Lead to Higher Alcohol Titers and Selectivity in *Clostridium acetobutylicum* Fermentations. *Microbiol. Bioeng.* **102**: 38-49.
- Siemerink, M. A. J., Kuit, W., Lopez Contreras, A. M., Eggink, G., van der Oost, J., & Kengen, S. W. M.** 2011. D-2,3-Butanediol Production due to heterologous expression of an acetoaldehyde reductase in *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 2582-2588.
- Steinbüchel, A., & Lütke-Eversloh, T.** 2003. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Biochem. Engineer. J.* **16**: 81-96.
- Stephanopoulos, G. N., Aristidou, A. A., & Nielsen, J.** 1998. Metabolic Engineering. Principles and Methodologies. Academic Press, San Diego. S. 1 ff.
- Sund, C. J., Servinsky, M. D., & Gerlach, E. S.** 2013. Differing roles for *Clostridium acetobutylum*'s Galactose utilization pathways. *Advan. Microbiol.* **3**: 490-497.
- Takors, R.** 2012. Scale-up of microbial processes: Impacts, tools and open questions. *J. Biotechnol.* **160**: 3-9.
- Tomas, C. A., Welker, N. E., & Papoutsakis, E. T.** 2003. Overexpression of *groESL* in *Clostridium acetobutylicum* results in increased solvent production and tolerance, prolonged metabolism, and changes in the cell's transcriptional program. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 4951-4965.
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **76**: 4350-4354.
- Tummala, S. B., Welker, N. E., & Papoutsakis, E. T.** 1999. Development and characterization of a gene expression reporter system for *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3793-3799.
- Van Haveren, J., Scott, E. L., & Sanders, J.** 2008. Bulk chemicals from biomass. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* **2**: 41-57.

- Vasconcelos, I., Girbal, L., & Soucaille, P.** 1994. Regulation of carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture at neutral pH on mixtures of glucose and glycerol. *J. Bacteriol.* **176**: 1443-1450.
- Voigt, C., Bahl, H., & Fischer, R.-J.** 2014. Identification of PTS^{Fru} as the major fructose uptake system of *Clostridium acetobutylicum*. *App. Microbiol. Biotechnol.* **98**: 7161-7172.
- Vollherbst-Schneck, K., Sands, J. A., & Montenecourt, B. S.** 1984. Effect of butanol on lipid composition and fluidity of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 193-194.
- Wiesenborn, D. P., Rudolph, F. B., & Papoutsakis, E. T.** 1988. Thiolase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and Its Role in the Synthesis of Acids and Solvents. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 2717-2722.
- Wiesenborn, D. P., Rudolph, F. B., & Papoutsakis, E. T.** 1989. Phosphotransbutyrylase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and Its role in acidogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 317-322.
- Willadsen, P., & Buckel, W.** 1990. Assay of 4-Hydroxybutyryl-CoA dehydratase from *Clostridium aminobutyricum*. *FEMS Microbiol. Le.* **70**: 187-192.
- Xiao, H., Gu, Y., Ning, Y., Yang, Y., Mitchell, W. J., Jiang, W., & Yang, S.** 2011. Confirmation and elimination of xylose metabolism bottlenecks in Glucose-Phosphoenolpyruvate-dependent Phosphotransferase system-deficient *Clostridium acetobutylicum* for simultaneous utilization of glucose, xylose and arabinose. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 7886-7895.
- Yim, H., Haselbeck, R., Niu, W., Pujol-Baxley, C., Burgard, A., Boldt, J., Khandurina, J., Trawick, J. D., Osterhout, R. E., Stephen, R., Estadilla, J., Teisan, S., Schreyer, H. B., Andrae, S., Yang, T. H., Lee, S. Y., Burk, M. J., & Van Dien, S.** 2011. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for direct production of 1,4-butanediol. *Nat. Chem. Biol.* **7**: 445-452.
- Yoo, M., Bestel-Corre, G., Croux, C., Riviere, A., Meynial-Salles, I., & Soucaille, P.** 2015. A quantitative system-scale characterization of the metabolism of *Clostridium acetobutylicum*. *mBio.* **6**: 1-12.

- Yu, E. K. C., & Saddler, J. N.** 1982. Enhanced acetone-butanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum* grown on D-Xylose in the presence of acetic or butyric acid. *FEMS Microbiol. Lett.* **18**: 103-107.
- Zeng, A.-P., & Sabra, W.** 2011. Microbial production of diols as platform chemicals: recent progresses. *Curr. Opin. Biotechnol.* **22**: 749-757.
- Zhang, J.** 2010. On the enzymatic mechanism of 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase and 4-hydroxybutyrate-CoA transferase from *Clostridium aminobutyricum*. Dissertation. Philipps-Universität Marburg.
- Zhang, L., Sun, J., Hao, Y., Zhu, J., Chu, J., Wie, D., & Shen, Y.** 2010. Microbial production of 2,3-butanediol by a surfactant (serrawettin)- deficient mutant of *Serratia marcescens* H30. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **37**: 857-862.
- Zhang, H., Chong, H., Ching, C. B., Song, H., & Jiang, R.** 2012. Engineering global transcription factor cyclic AMP receptor protein of *Escherichia coli* for improved 1-butanol tolerance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **94**: 1107-1117.
- Zverlov, V. V., Berezina, O., Velikodvorskaja, G. A., & Schwarz, W. H.** 2006. Bacterial acetone and butanol production by industrial fermentation in the Soviet Union: use of hydrolyzed agricultural waste for biorefinery. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **71**: 587-597.

7. Anhang

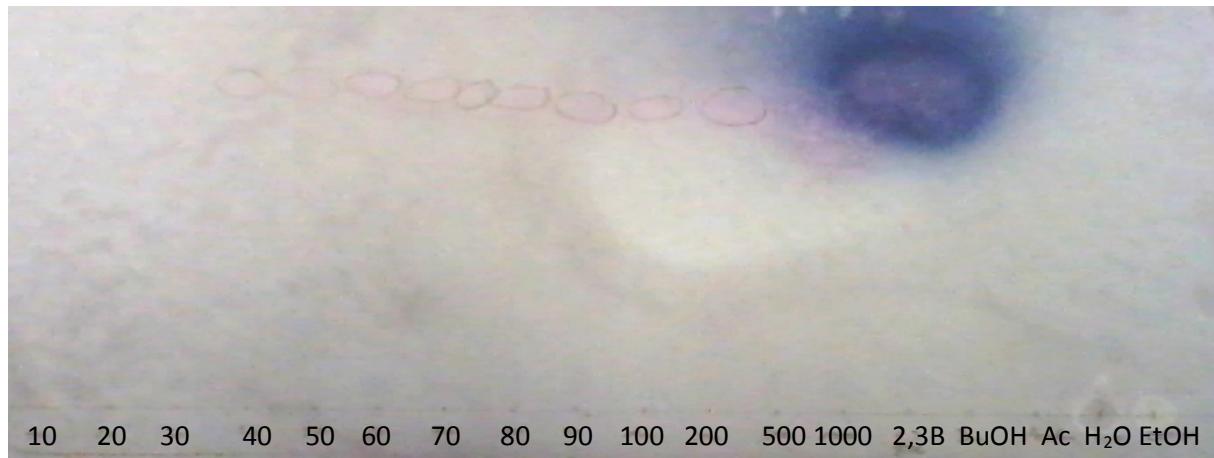


Abb. A1: Dünnschichtchromatogramm von 1,4-BDO. 1,4-BDO wurde in unterschiedlichen Konzentrationen (10-1000 mM) aufgetragen. Zusätzlich wurden 2,3-BDO (2,3B), Butanol (BuOH), Aceton (Ac), Ethanol (EtOH) und Wasser mitgeführt.

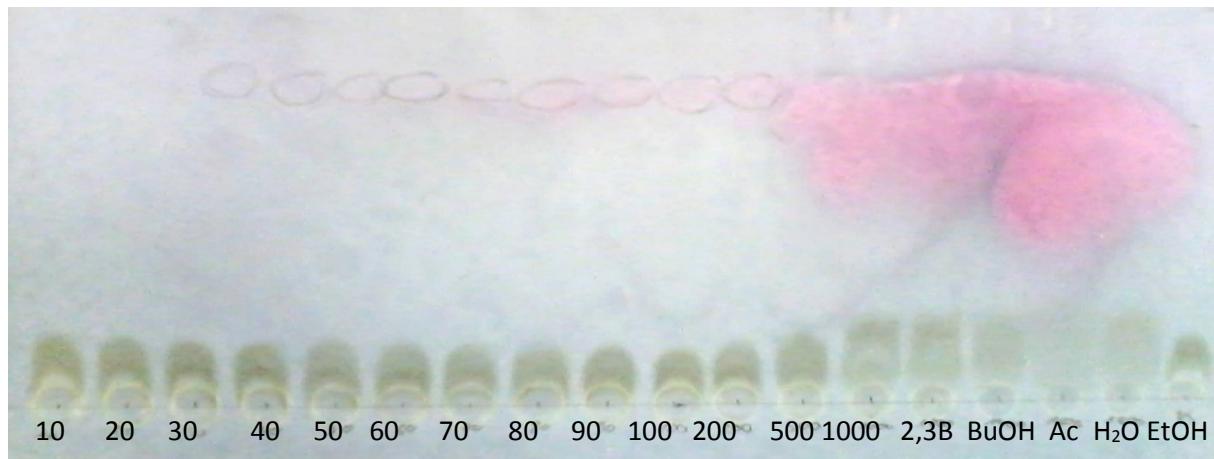
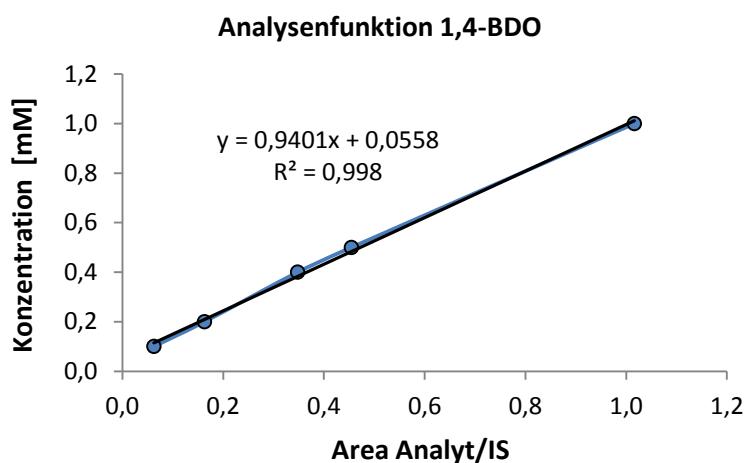
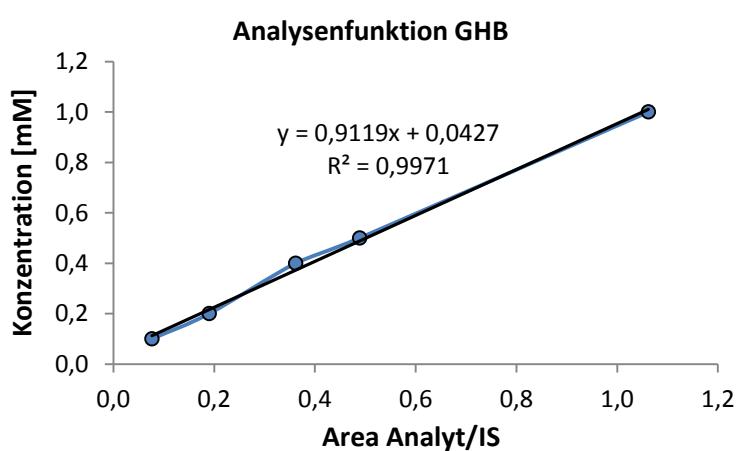


Abb. A2: Dünnschichtchromatogramm von 1,4-BDO mit *C. acetobutylicum* Kulturüberstand. 1,4-BDO wurde in unterschiedlichen Konzentrationen (10-1800 mM) aufgetragen und mit dem Kulturüberstand (1:10 verdünnt) einer 48 h *C. acetobutylicum*-Kultur versetzt.

Tab. A1: Kalibrierung der 1,4-BDO- und GHB-Nachweismethode.

1,4-BDO			GHB		
Konzentration [mM]	MW Area Analyt/IS	Rückrechnung [mM]	Konzentration [mM]	MW Area Analyt/IS	Rückrechnung [mM]
0,1	0,062	0,114	0,1	0,076	0,112
0,2	0,163	0,209	0,2	0,190	0,216
0,4	0,348	0,383	0,4	0,362	0,373
0,5	0,454	0,483	0,5	0,488	0,488
1,0	1,016	1,011	1	1,062	1,011

Abkürzungen: MW, Mittelwert bestimmt aus sechs unabhängigen Ansätzen; IS, interner Standard.

**Abb. A3: Analysenfunktion für die Kalibrierung der 1,4-BDO-Messung.****Abb. A4: Analysenfunktion für die Kalibrierung der GHB-Messung.**

AbfD	1	M-LMTAEQYIESLRKLNTRVYMEGEKIE N VDHPMIRPSINCVA M TYELAQDPQYADLMTTKSNL I GKTINRFANLHQST	79
Ckl_3020	1	MSLMT G EYIESLRKL K LNVY Y IGEKIDN P VDNP V IRPSLNSV M TYDLAQ E A A EYEDLMTTSNIT G EKINRFTNLHQSS	80
Cbei_2100	1	MPLKTKE Q YIESLRKLNLKVYME G KPV D N V DNP I IRPSLNSV M TYELAQ M PEYE D LMTAT S NLT I GEKVNRFAHLHQST	80
AbfD	80	D D LLRK K KVKM Q RLL G QKTA S C FOR C VGMD A FNA V FS I T E ID Q KY G TNY H KN F TEY L KY Y Q E NDL I VDGAMTD P KGD R GLA	159
Ckl_3020	81	E D LVKKVKM Q RLL G QKTA A C FOR C VGMD S FNA V YS I T E ID K EY N TNY F EN F KFL T Y W Q E NDL I VDGAMTD P KGD R G L S	160
Cbei_2100	81	D D LIKKVKM Q RLL G QKTA S C FOR C VGMD A FNA L Y S T E ID K ACC T NY H E F N K FL T Y W Q E NDL I VDGAMTD P KGD R G L S	160
AbfD	160	P S A Q KD D DL F LR I VE P RED G V V RGA K A H O T G S I N H E H I IMPTIA M TE A DKD Y A V S F A C P S DA A GLFM I Y G RQ S CD T RK	239
Ckl_3020	161	PSK Q AD D DLY L R V VE P RED G V V RGA K A H O T G S I N H E V L V M PTIA M R P DKD Y A I A F S V P T D A E G IT M I T GRQ S CD T RK	240
Cbei_2100	161	PSK Q AD D DLY L R V VE P RED G V V RGA K A H O T G S I N H E V L V M PTIA M R P DKD Y A I A F S V P T D A E G II H I Y GRQ S CD T RK	240
AbfD	240	M E E G AD D I I GN K Q F GG Q E A L V V F D N V F IP N R I F L C Q E Y D F AG M VER F AG Y HR Q SY G C C K V G G D V V I GAA A A A D Y NG	319
Ckl_3020	241	M E K R D A D I D V GN K E F GG Q E A L V V F F D D V F W P N R I F L C Q E Y D F AG M VER F AG Y HR Q SY G C C K V G G D V V I GAA A A A D Y NG	320
Cbei_2100	241	I E PG A D I D V GN K E F GG Q E T L I F D N V F W P N R I F L C Q E Y D F AG M VER F AG Y HR Q SY G C C K V G G D V V I GAA A A A D Y NG	320
AbfD	320	A K A S H K D K L I E M H LN E T L Y A CGIA S A E G Y P T A A G N Y Q I D I I LLAN V E K Q N I T RF P YE I V R L A E D I I AG G I M V T T MP S E A	399
Ckl_3020	321	A K A S H K D K L I E M H LN E T L Y A CGIA S A E G H A T K A G N Y Q I D I I LLAN V E K Q N I T RF P YE I V R L A E D I I AG G I M V T T MP S E K	400
Cbei_2100	321	A K A S H K D K L I E M H LN E T L Y A CGIA S A E G H A T K A G N Y Q I D I I LLAN V E K Q N I T RF P YE I C R L A E D I I AG G I M V T T MP S E A	400
AbfD	400	DE K S [8] E T I G DFCN K FFAA A PTCT E ER M R R V L R I E N I C LG A S V G Y R T E SMHGAG S P Q A O R I M I A R Q G N I N A K K K E AK	484
Ckl_3020	401	D Y K S K D E P V G K Y V E K Y L V G A S V P V E D R M K I L R L I E N I C LG A S V G Y R T E SMHGAG S P Q A O R I M I A R Q G N I N A K K K E AK	477
Cbei_2100	401	D F K D E E K I G P Y I D K Y L R G V V N S V T E N R M R I L R L I E N I C LG A S V G Y R T E SMHGAG S P Q A O R I M I A R Q G N I N A K K K E AK	477
AbfD	485	A I A G I K -	490
Ckl_3020	478	K I A R I E D	484
Cbei_2100	478	K I A R I K E	484

Abb. A5: Aminosäure-Alignment der 4HBDs. Schwarz markierte AS sind konserviert, grün hervorgehobene AS sind verantwortlich für die katalytische Funktion der Enzyme. Blau unterlegte AS bilden das Eisen-Schwefel-Cluster-Motiv CX₃CX₁₇₉₋₁₈₃HX₆C. Abkürzungen: AS, Aminosäuren; AbfD, 4HBD aus *C. aminobutyricum*; Ckl_3020, 4HBD aus *C. kluyveri*; Cbei_2100, 4HBD aus *C. beijerinckii*.

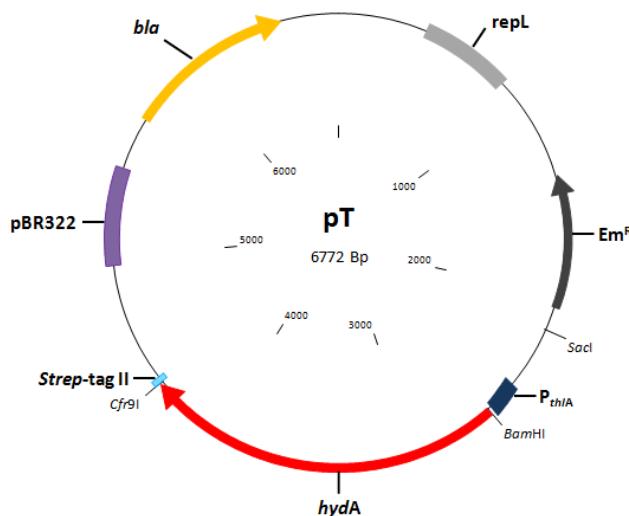


Abb. A6: Vektorkarte vom pT-Vektor (Girbal et al., 2005; mod.). Der pT-Vektor verfügt über zwei Replikationsursprünge („repL“ und „pBR322“), welche den Einsatz des Vektorsystems in Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien ermöglicht. Darüber hinaus besitzt dieser Vektor zwei Resistenzgene- *bla* (Ampicillin-Resistenzgen) und *Em^R* (Erythromycin-Resistenzgen), eine C-terminalen Strep-tag II Sequenz und einen ThiolaseA-Promotor.

CAAGGAGGTTAGTTAGAATGGGATCCCATGCCATTAAAAACAAAGGAACAATATTGAAAGCCTAGAAAGTTAACCTA
 AAAGTGTACATGTTGGAAAACCAGTTGACAATGTTGTGATAATCCAATCATAAGACCCTCTTAATTGAGCTATGCTATG
 CTTATGAATTAGCACAAATGCCAGAGTATGAAGATTAACTGACAGCTACTTCTAACAGGGGAAAAAGTAAATAGAT
 TTGCTCATTTACATCAAAGCACAGATGATCTTAAAAAGTAAAGATGCAAAGATTACTGGTCAAAAAACCGCATCAT
 GTTTCAAAGGTGCGTGGATGGATGCTTTAATGCATTATACAGTCACATACGAAATAGATAAAGCGTGTGAAACAA
 ATTATCATGAAAATTTAAAGTTTAAATATGTTCAAGAAAACGACTTAACCGTTGATGGTCAATGACTGATCCTAA
 AGGGGACAGAGGATTATGCCAAGTAAACAAGCTGATGGAGATTACTTAAGGGTTGTTGAAAGAAGAGAAGATGGG
 GTAGTTTAGAGGGAGCAAAATGTCACCAACTGGAATGTTAAATTCTCATGAGGTAGTAGTAATGCCAACATAGCATTAA
 ACTCCAAATGATAAGGATTGGCAATATCTTGCACTGCTACAGATGCTGAAGGAATAATTCTATATATGGAAGGCAA
 TCTTGTGATACAAGAAAATTGGAGCCAGGTGCTGATATAGATCTGGAAATGCTGAATTGGTGGACAAGAAACATTAAC
 AATATTGATAATGTATTGTACCAATGAAAGAATTCTTAAATGGAGAAACTGATTTGCTGGAATGATAGTTGAAAG
 ATTGCAAGGATATCATAGACAAAGTTGGATGCAAAGTCGGAGTTGAGATGTTCTAATTGGAGCTGCTGAGTAG
 CTGCTGATTATAATGGAGCTCACAAAGCATCTCATGTTAAAGATAAATTAGAAATGACTCACTTAAATGAAACTTTATT
 CTCTTGTGGTATTGATGTCAGCAATGGTTCTAAACAGAAGCTGAAATTATTGATAATCTGCTAGCAAATGTA
 TGTAAGCAAAATGTTACAAGATTCCCTATGAAATATGTTAGACTGCAAGAGATTGCTGGAGGAATCATGGTACTATG
 CCATCAGAAGCAGATTAAAGATGAAAAGATAGGTCCATATAGATAAATTGAGAGGTGAAACTCAGTTCAACA
 GAAAATAGAATGAGAATATTAAGATTAAGAAAATTGTTAGGGACTGCAGCTGTCGGATATAGAACAGAAATCAAT
 GCATGGAGCTGGATCACCACAAAGCTCAAAGAATTATGATAGCTAGACAAGGAAATTAGCAGCTAAAGAAAATAGCTA
 AGAAAATAGCTAGAATTAAAGGAACCCGGGTGGTCACATCCTCAATTGAAAATAAGGCGCCA

Abb. A7: Nukleotidsequenz von *cbel_2100* nach Sequenzierung positiver Plasmide. Unterstrichene Sequenzen signalisieren die Restriktionsschnittstellen. Grün markierte Nukleotide zeigen den Beginn und das Ende des Gens. Die Nukleotidsequenz des Strep-tag II ist blau hervorgehoben.

TAGTTAGAGCTAGCATGTCTTAATGACTGGGAAGAATATGTAGAAAGTTACGTAATTAAACGTTATTATCT
 GGGAGAGAAAATAGATAATCCAGTGGATAACCCCTGTACTCGTCCATCTTAAATTCTGTTAACAGTACTTATGACTTGGC
 CCAAGAACAGAATATGAGGATTAATGACAACACATCAAATATAACAGGTAAAAAAATAAGATTACAAATTACA
 TCAAAGCAGTGAAGATTGGTAAAAAAAGTTAAATGCAGAGATTGTGCGGACAAAAAAACTGCAGCCTGTTCCAAGAT
 GCCTGGTATGGACTCATTTAATGCAGTGTACAGTACTACTTTGAAATAGATAAGGAATATAACAAATTATTTGAAAA
 TTCAAGAAATTAACTTATGTCAAAAGAACGATTAACAGTAGATGGAGCTATGACAGATCCAAAAGGGAGACAGAG
 GATTGTCACCAAGCAAACAGGCTGATCCAGATTATTTAAGAGTTAGAAAGAAGAGACGGTAGTTGTAAGA
 GGAGCAAAGGCTCACAGACAGGTATATGTAATTCTCATGAAGTATTGGTATGCCACTATTGCTATGAGACCGGATGAT
 AAAGATTATGCAATAGCTTTCTGTCCTACAGATGCAGAAGGAATAACTATGATAATTGGAAGACAGTCCTGTGATACT
 AGAAAATGGAAAAAGATGCGGACATAGATGTTGTAATAAGAATTGGCGGAGTAGAACGATTAGTAGTTGAC
 ATGTATTGTCATGACAGGATATTCTTAAATGGTAAACTGAATATGCAGGAATGTTAGTAGAGAGATTGAGGAT
 ATCATAGACAAAGTTATGGTGGATGCAAAGTAGGAGTGGAGATGTATTGATAGGCGCTGCTGCAGTGGCTGCAGACTA
 TAATGGAGCTGCAAAGGCATCTCACATAAAGGATAAAATTAGAAATGATGCAATTAAATGAAACTCTTACGCTGCGG
 AATTGCGTGCAGCAGAAGGACATGCAACAAAAGCTGAAATTACCAAATAGACTGCTCTTGCAAATGTATGTAAGCA
 AAATATAACAAGATTCCCTATGAAATTGTGAGATTAGCAGAAGATATGCAGGAGGATTAATGGTACTATGCCTCTGA
 AAAGGATTATAAGAGTCAGAGGTTGAAAATATGTAGAGAAGTAGCTTGGGGAGTTGCATCCGTACCTGTTGAAGACA
 GAATGAAGATATTAAGATTATTAGAAAATATGTCTTGGAACGGCTGAGTAGGATATAGAAACTGAATCCATGCATGGA
 GCAGGTTACCTCAAGCACAGAGAATAATGATATCAAGACAGGGAAACCTAGCACATAAGAAGAAACTGCAAAGAAGA
 TAGCTAGAATAGAAGATCCCGGGTGGTCACATCCTCAATTGAAAATAAGGCGCCAC

Abb. A8: Nukleotidsequenz von *cki_3020* nach Sequenzierung positiver Plasmide. Unterstrichene Sequenzen signalisieren die Restriktionsschnittstellen. Grün markierte Nukleotide zeigen den Beginn und das Ende des Gens. Die Nukleotidsequenz des Strep-tag II ist blau hervorgehoben.

CCGTAGGATCAAGGAGGTTAGTTAGGCTAGCATGTAATGACAGCAGAACAGTACATTGAGAGTCTAAGAAAGCTAA
 CACAAGAGTTATATGTTGGTAAAAAAATCGAGAAATTGGGTGGATCATCCAATGATCAGACCTTCATCAA
 ACTCGTAG
 AATGACTTATGAATTAGCTCAGGATCCTCAGTACGCTGACTTAATGACTACAAAGTCAAACTTAATAGGTA
 AAAACTATCAAC
 AGATTGCAAATCTACACCAGAGCACAGATGACCTAGAAAAAGGTTAAGATGCAGAGACTTCTGGACAGAACCGC
 ATCATGCTTCCAGAGATGTAGGTATGGACGCTTCAATGCAGTTCTCAACTACATGAAATCGAC
 CAGAACATATGG
 AACAAACTATCACAAGAACTTACTGAATACTTAAAGTATATACAGGAAAATGACCTATTGTTGACGGTCA
 ATGACTGA
 CCCTAAGGGTGACAGAGGACTTGCTCCATCCGCACAGAAGGATCCAGATCTTCTTGAGAATCGTTGAAA
 AGAG
 ATGGTATCGTTGAAGAGGAGCTAAGGCTCACCAGACTGGTCCATCAA
 CTCCACGAACACATCATGCCTACAATCG
 CTATGACAGAACGCTGATAAGGATTATGAGTATCATTGCTTGTCTCCGATGCTGATGGTCTATT
 CATGATCTACGGCAG
 ACAGTCATGTGACACAAGAAAGATGGAAGAAGGCCTGACATTGACCTGGTAACAAGCAGTCGGCG
 ACAGGAAGCT
 TTAGTCGTATTGATAACGTATTATCCAAATGACAGAACTTCCCTTCCAAGAATATGATTGCTGGCATGATGGTAG
 AAAGATTGCTGGATACCACAGACAGTCATA
 CGCGGATGTAAGGTTGGAGTAGGCAGCTGTAATCGGTGCTGCT
 TTAGCTGCTGACTACAATGGAGCTCAGAAGGCTCACGTTAAAGATAAGCTTATCGAAATGACTCA
 CTTAAATGAAACT
 TTATATTGCTCGGTATTGCTTGTTCAGCAGAAGGTTATCCA
 ACTGCTGCTGGTA
 ACTATCAGATTGACCTTCTTGC
 AA
 ATGTATGTAAGCAGAACATCACTAGATTCCCTACGAAATCGTAAGACTAGCTGAGATATCGCTGG
 GTTAATGGTT
 CTATGCCTCAGAACAGCTGACTTAAGTCAGAAACAGTTGGTAGAGATGGC
 GAAACTATTGGAGATTCTGCAATAAGT
 TCTCGCTGCTCCTACTTGACAAACAGAACAGAACATCTGCTTAGGTGCATC
 CGCTGAGGTACAGAACACTGAATCCATGCATGGTCAGGTTCCCTCAGGCTCAGAGAACATCATGATCGCTCG
 CAGGGCA
 ACATCAACGCTAAGAAAGAATTAGCTAAGGCAATCGCTGGAATTAAACCCCGGGTGGTCACATCCTCAATTGAAAATAAGGCGCCAC

Abb. A9: Nukleotidsequenz von *abfD* nach Sequenzierung positiver Plasmide. Unterstrichene Sequenzen signalisieren die Restriktionsschnittstellen. Grün markierte Nukleotide zeigen den Beginn und das Ende des Gens. Die Nukleotidsequenz des Strep-tag II ist blau hervorgehoben.

Tab. A2: Wachstumsparameter und Gärungsprodukte der 200-ml Kultivierungsexperimente.

	<i>C. ac</i> ATCC 824	<i>C. ac</i> pTc	<i>C. ac</i> pTc::cbei_2100	<i>C. ac</i> pTc::ckl_3020	<i>C. ac</i> pTc::abfD
Wachstumsrate μ (h^{-1})	0,116	0,134	0,146	0,13	0,129
Verdopplungszeit t_d (min)	358	310	285	320	322
max. OD ₆₀₀ (nach)	7,07 (66 h)	7,5 (66 h)	8,35 (48 h)	8,41 (96 h)	7,35 (91 h)
min. pH (nach)	4,7 (88 h)	4,63 (40 h)	4,59 (120 h)	4,6 (40 h)	4,56 (36 h)
Acetat [(mM) nach 120 h]	24,7 ± 6,3	21,0 ± 1,9	16,3 ± 4,3	20,6 ± 2,4	34,2 ± 3,7
Butyrat [(mM) nach 120 h]	12,7 ± 2,3	9,5 ± 1,7	7,3 ± 3,0	5,0 ± 0,9	10,2 ± 2,1
Aceton [(mM) nach 120 h]	106,3 ± 15,2	99,9 ± 22,6	85,7 ± 9,7	119,0 ± 6,4	89,3 ± 9,5
Butanol [(mM) nach 120 h]	169,2 ± 13,9	147,1 ± 15,2	193,7 ± 17,5	238,6 ± 6,1	164,6 ± 18,4
Ethanol [(mM) nach 120 h]	37,0 ± 1,6	33,8 ± 2,9	89,7 ± 21,4	92,7 ± 1,8	43,8 ± 6,2
Aceton : Butanol : Ethanol	2,9 : 4,6 : 1	3 : 4,4 : 1	0,9 : 2,1 : 1	1,3 : 2,6 : 1	2 : 3,8 : 1

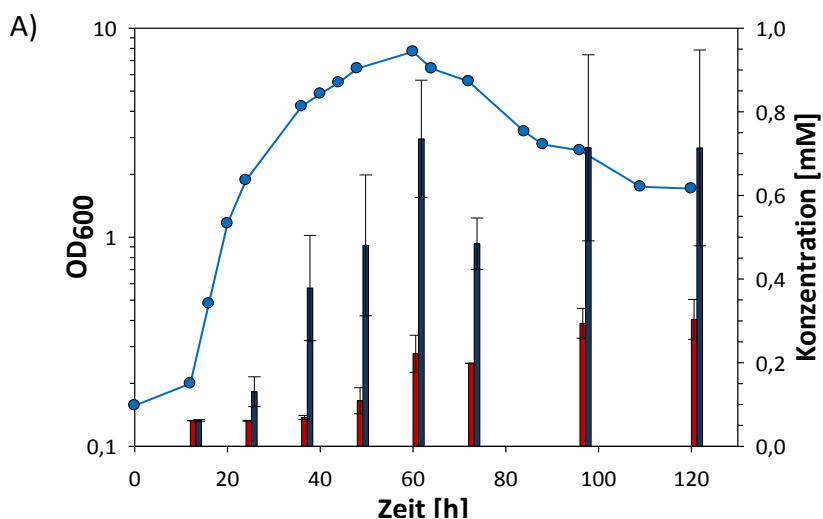


Abb. A10: Zeitlicher Verlauf der 1,4-BDO- und GHB-Produktion von *C. acetobutylicum* pTc::P(*thlA*)*cbei_2100* auf verschiedenen Kohlenstoffquellen. Die Kultivierung erfolgte in 200 ml MS-MES über einen Zeitraum von 120 h. (A) Arabinose, (B) Xylose, (C) Mannose und (D) Galaktose. ■ 1,4-BDO, ■ GHB. n = 3.

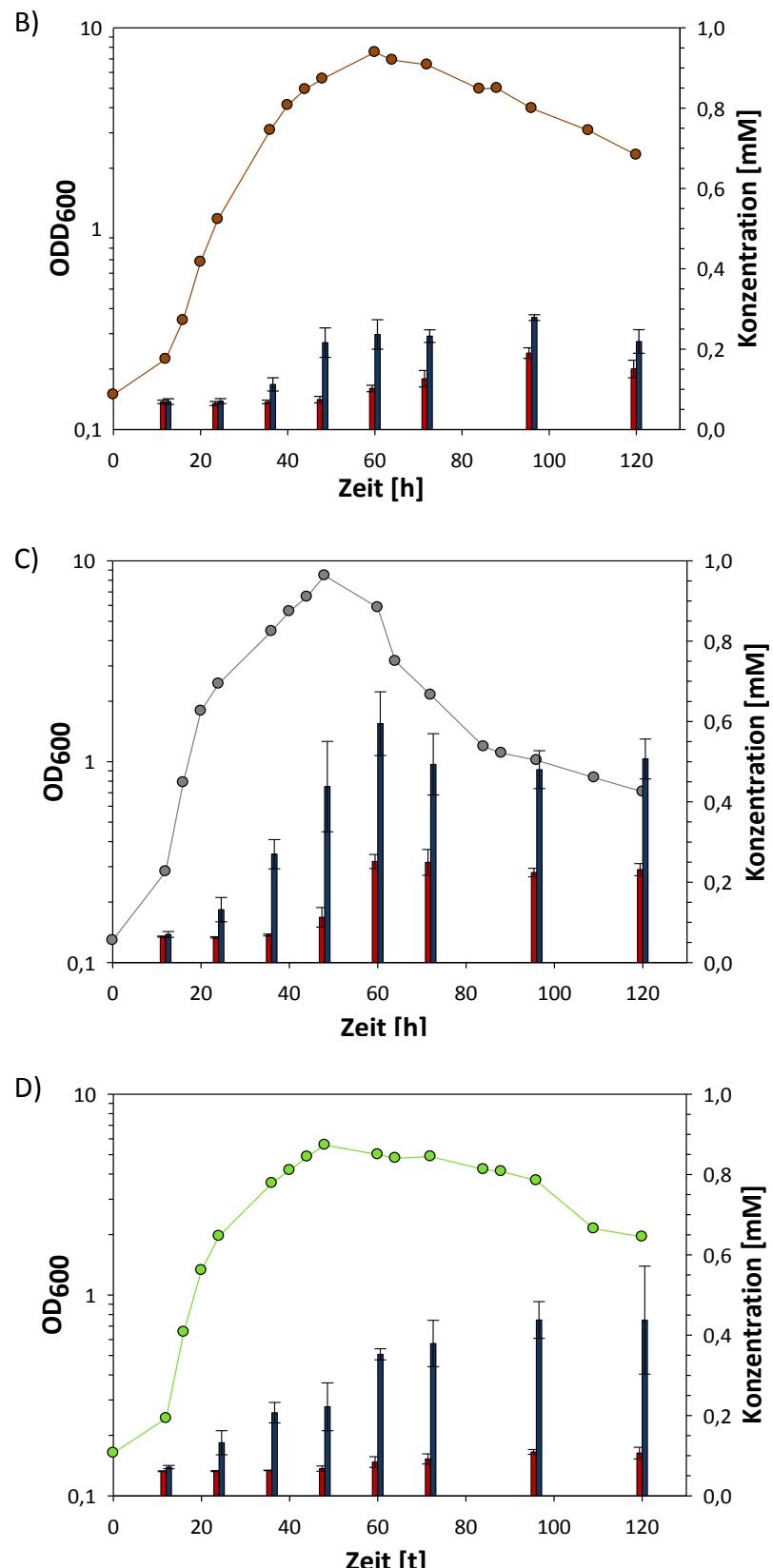


Abb. A10: Zeitlicher Verlauf der 1,4-BDO- und GHB-Produktion von *C. acetobutylicum* pTc::P(*thIA*)*cbei_2100* auf verschiedenen Kohlenstoffquellen. (Fortsetzung). (A) Arabinose, (B) Xylose, (C) Mannose und (D) Galaktose. ■ 1,4-BDO, ■ GHB. n = 3.

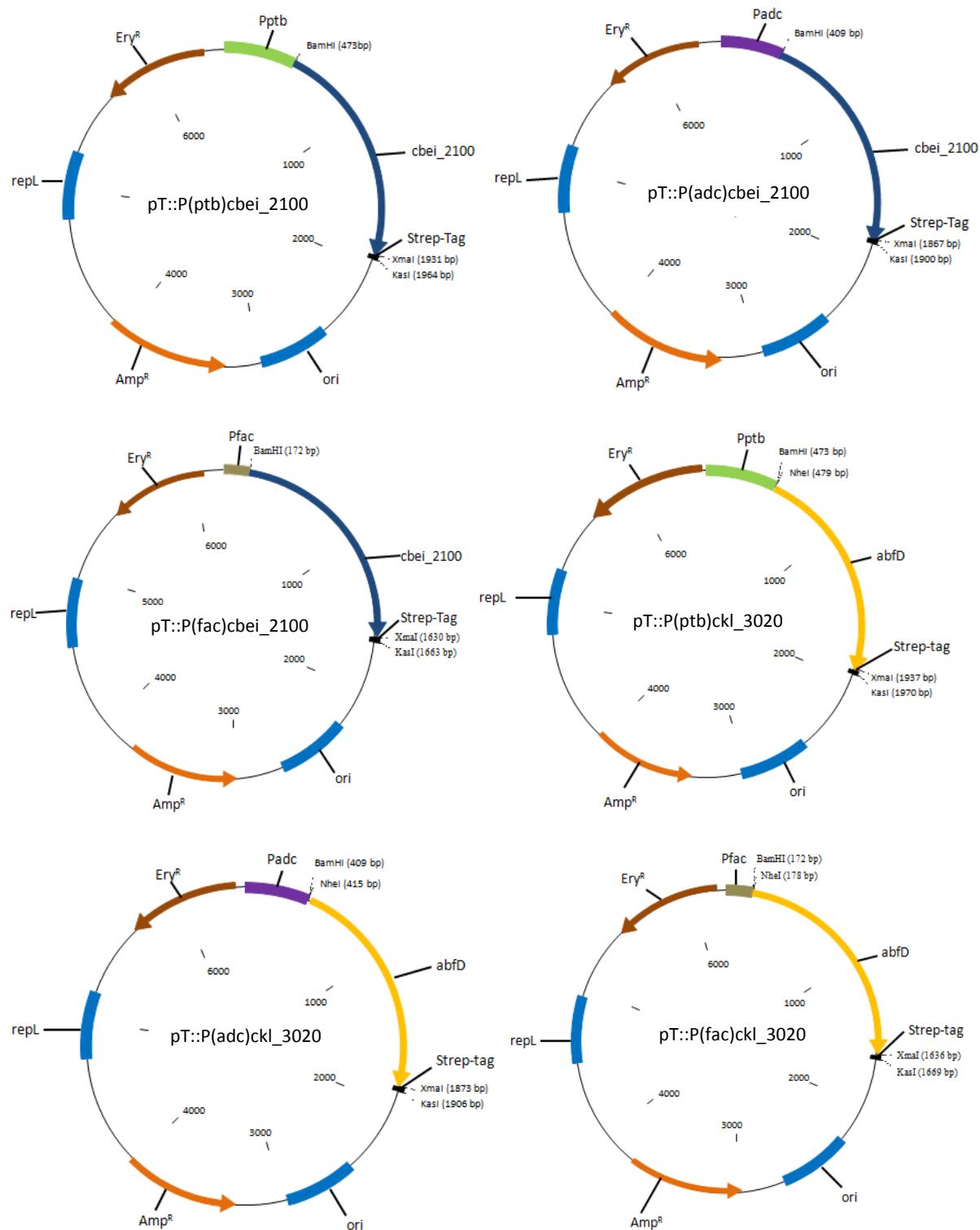


Abb. A11: Vektorkarten der generierten Vektoren zur Variation der Promotoren. Die Plasmide basieren auf den Vektoren von Schulz (2013) (Abb. A12) und enthalten neben den 4HBD-kodierenden Genen (*cbei_2100*, *ckl_3020* und *abfD*), den Ampicillin- und Erythromycinresistenzgenen (Amp^R bzw. Ery^R), zwei Replikationsursprünge für Gram-positive (repL) und Gram-negative Bakterien (ori).

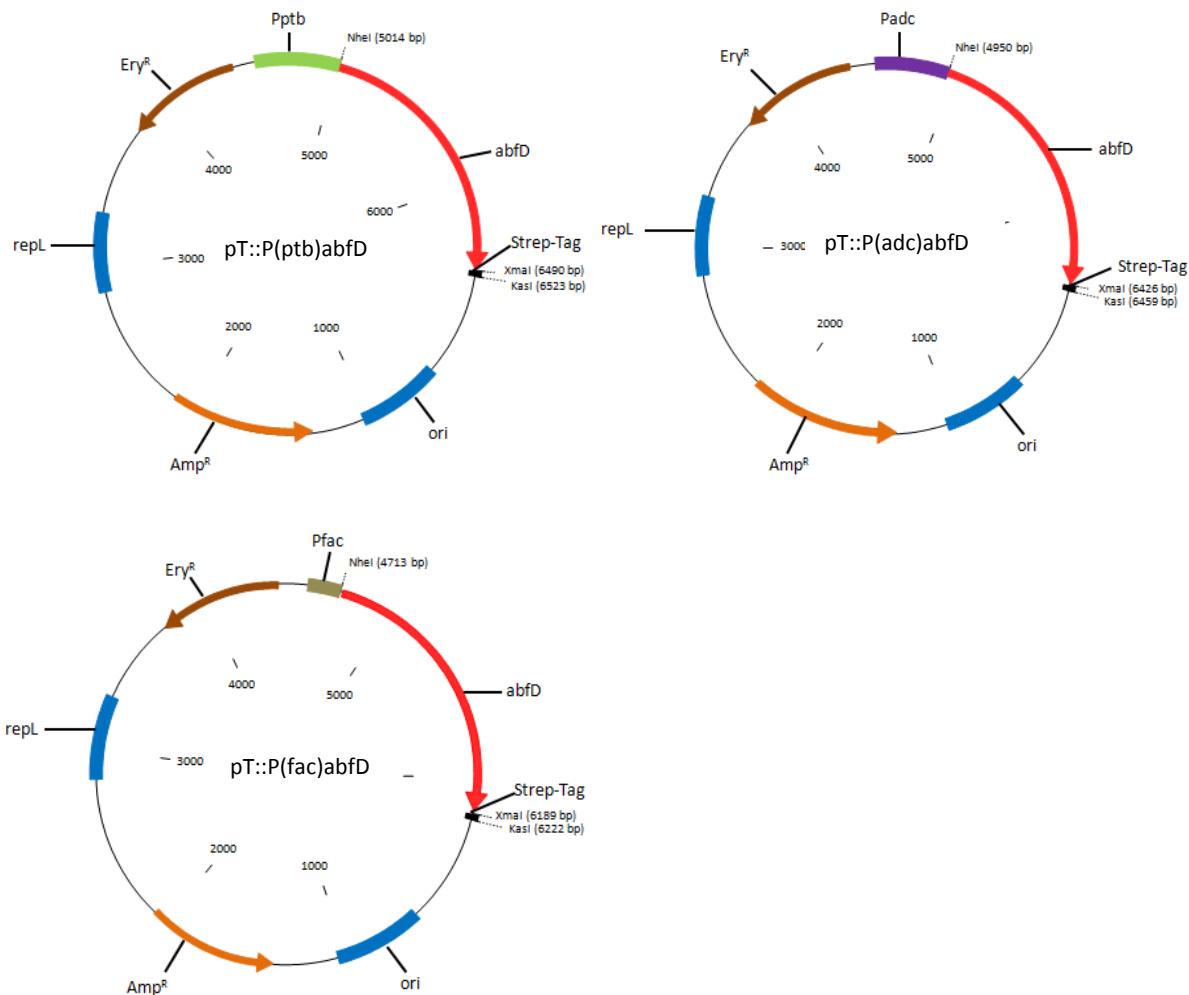


Abb. A11: Vektorkarten der generierten Vektoren zur Variation der Promotoren. (Fortsetzung).

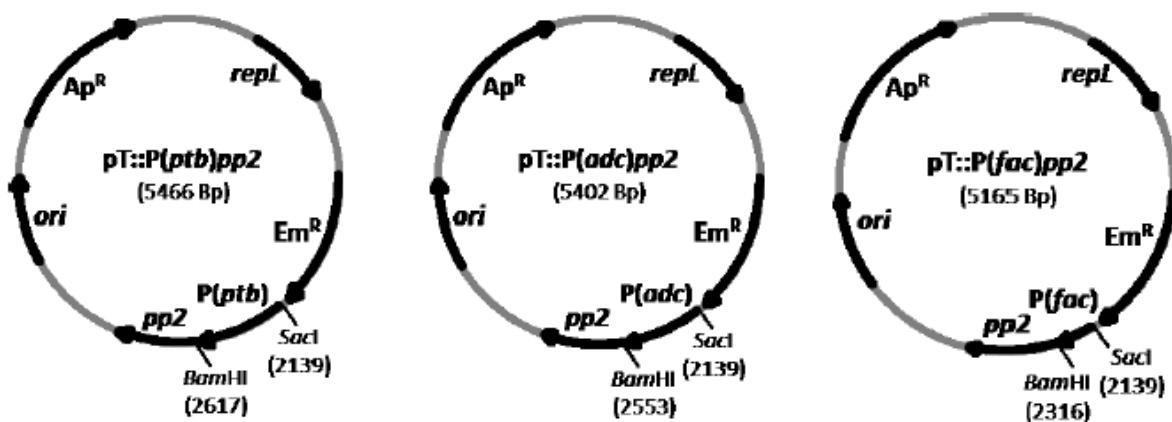


Abb. A12: Vektorkarten pT::P(ptb)pp2, pT::P(adc)pp2 und pT::P(fac)pp2 (Schulz, 2013). Die Plasmide enthalten neben dem pp2-Fluoreszenzreporterogen, den Ampicillin- und Erythromycinresistenzgenen (Ap^R bzw. Em^R), zwei Replikationsursprünge für Gram-positive (repL) und Gram-negative Bakterien (ori).

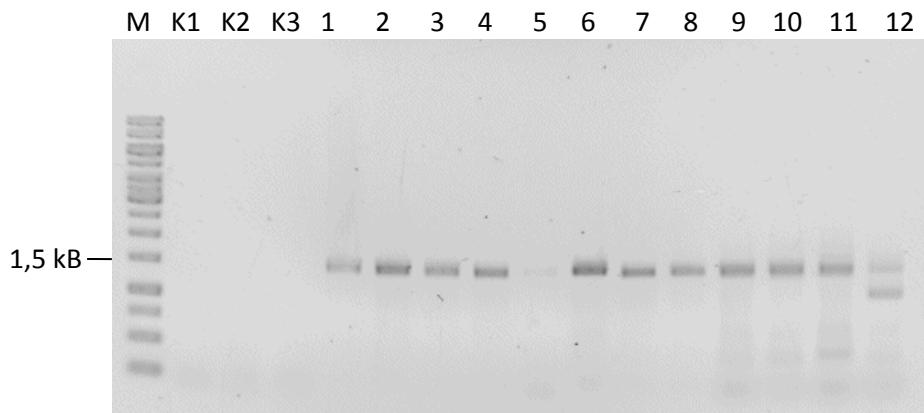


Abb. A13: Colony-PCR auf die 4HBD-kodierenden Gene. 0,8 %iges Agarosegel. Spur M1: 1kb-GeneRuler™ DNA-Ladder, Spuren K1-K3: Kontrollen, *C. acetobutylicum* Wildtyp-DNA, Spur 1: *C. acetobutylicum* pT::P(*thlA*)*cbei_2100*, Spur 2: *C. acetobutylicum* pT::P(*ptb*)*cbei_2100*, Spur 3: *C. acetobutylicum* pT::P(*adc*)*cbei_2100*, Spur 4: *C. acetobutylicum* pT::P(*fac*)*cbei_2100*, Spur 5: *C. acetobutylicum* pT::P(*thlA*)*ckl_3020*, Spur 6: *C. acetobutylicum* pT::P(*ptb*)*ckl_3020*, Spur 7: *C. acetobutylicum* pT::P(*adc*)*ckl_3020*, Spur 8: *C. acetobutylicum* pT::P(*fac*)*ckl_3020*, Spur 9: *C. acetobutylicum* pT::P(*thlA*)*abfD*, Spur 10: *C. acetobutylicum* pT::P(*ptb*)*abfD*, Spur 11: *C. acetobutylicum* pT::P(*adc*)*abfD* und Spur 12: *C. acetobutylicum* pT::P(*fac*)*abfD*.

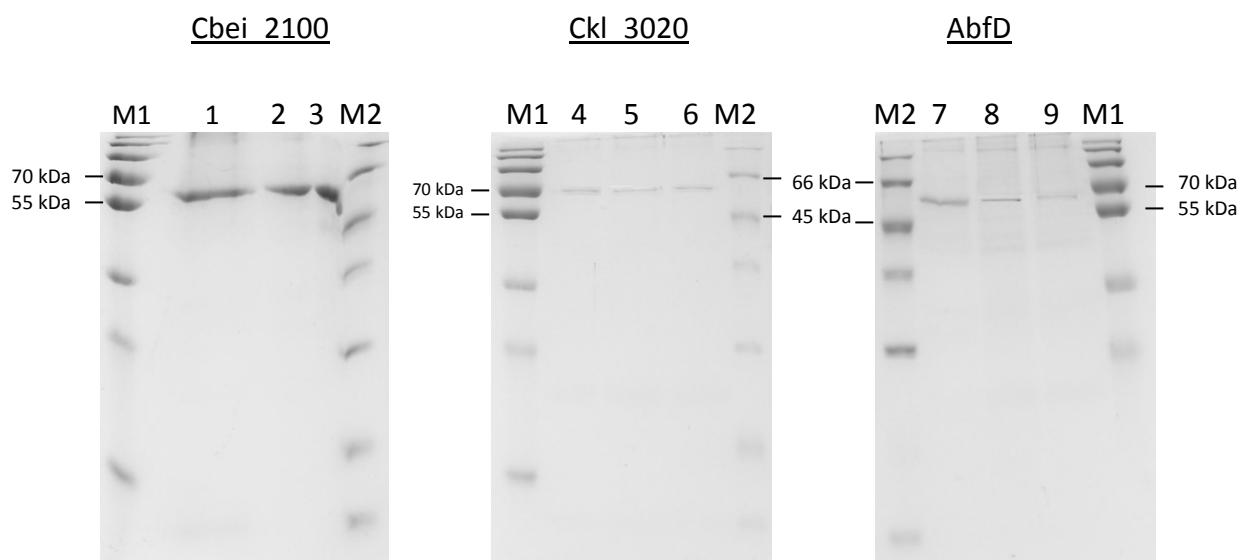


Abb. A14: SDS-PAGE aufgereinigter 4HBDs. Die Expression der Proteine erfolgte in Abhängigkeit verschiedener Promotoren. Dargestellt sind 12 %ige Polyacrylamidgele. Die Anfärbung der Proteine erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue. Spur M1: PageRuler™ Prestained-Protein Ladder, M2: PageRuler™ Unstained-Protein Ladder, Spur 1/4/7: P_{ptb}, Spur 2/5/8: P_{adc}, Spur 3/6/9: P_{fac}.

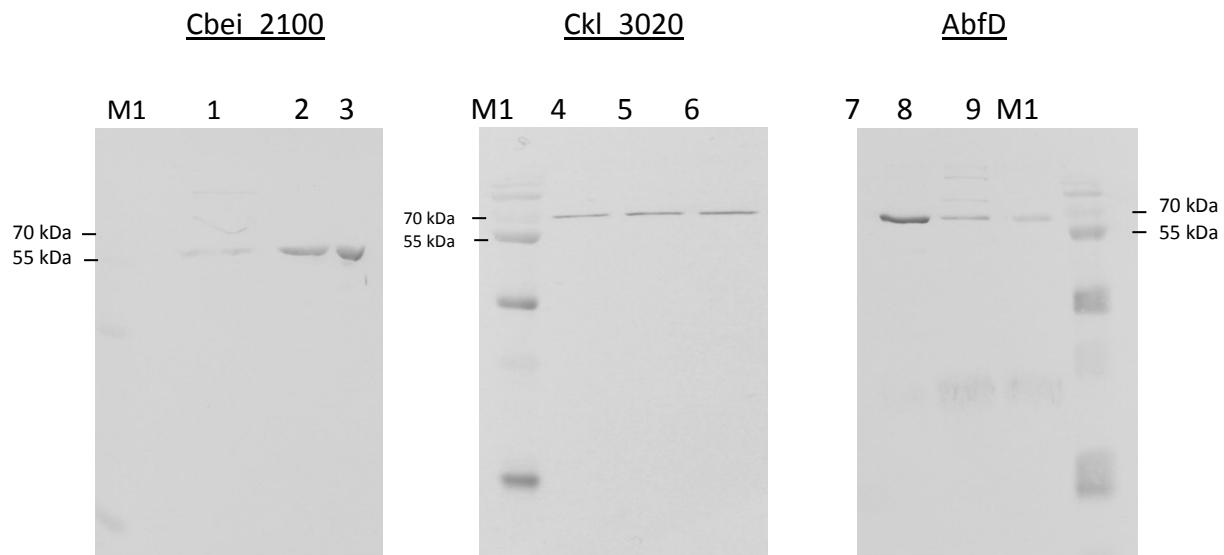


Abb. A15: Western Blot der aufgetrennten Proteinproben. Die Expression der Proteine erfolgte in Abhängigkeit verschiedener Promotoren. Die rekombinanten Proteine wurden mit Hilfe eines Strep-Tactin Antikörpers detektiert. Spur M1: PageRulerTM Prestained-Protein Ladder, Spur 1/4/7: P_{ptb}, Spur 2/5/8: P_{adc}, Spur 3/6/9: P_{fac}.

Tab. A3: Wachstumsparameter und Gärungsprodukte von rekombinanten *C. acetobutylicum*-Stämmen. Die Kultivierung der Stämme erfolgte in 200 ml MS-MES für 120 h. n = 3.

	Promotor	μ (h ⁻¹)	max. OD	Acetat (mM)	Butyrat (mM)	Aceton (mM)	Butanol (mM)	Ethanol (mM)
<i>cbei_2100</i>	<i>thlA</i>	0,146	8,35	16,3 ± 4,3	7,3 ± 3,0	85,7 ± 9,7	193,7 ± 17,5	89,7 ± 21,4
	<i>ptb</i>	0,140	8,33	18,2 ± 2,6	6,3 ± 0,8	91,9 ± 10,4	207,4 ± 26,5	137,9 ± 24,8
	<i>adc</i>	0,138	9,8	16,5 ± 3,0	8,2 ± 0,9	85,6 ± 21,1	186,1 ± 15,9	99,9 19,0
	<i>fac</i>	0,139	7,93	14,8 ± 2,6	8,9 ± 2,6	83,9 ± 17,7	152,8 ± 4,7	86,3 ± 25,9
<i>ckl_3020</i>	<i>thlA</i>	0,130	8,41	20,6 ± 2,4	5,0 ± 0,9	119,0 ± 6,4	238,6 ± 6,1	92,7 ± 1,8
	<i>ptb</i>	0,133	8,03	22,6 ± 0,7	10,2 ± 3,9	87,8 ± 18,5	189,9 ± 12,6	145,1 ± 16,2
	<i>adc</i>	0,113	7,46	21,4 ± 0,8	8,2 ± 0,6	95,9 ± 9,5	182,7 ± 32,1	72,9 ± 5,5
	<i>fac</i>	0,129	4,53	46,7 ± 16,3	41,4 ± 16,8	0	0	6,0 ± 1,2
<i>abfD</i>	<i>thlA</i>	0,129	7,36	34,2 ± 3,7	10,2 ± 2,1	89,3 ± 9,5	164,6 ± 18,4	43,8 ± 6,2
	<i>ptb</i>	0,129	6,12	27,1 ± 3,2	15,8 ± 3,7	82,6 ± 8,3	155,6 ± 7,4	40,9 ± 0,1
	<i>adc</i>	0,119	6,96	31,9 ± 8,9	12,9 ± 3,8	84,4 ± 8,6	151,9 ± 12,7	36,7 ± 3,5
	<i>fac</i>	0,09	3,42	44,1 ± 3,6	49,5 ± 5,7	0	0	4,8 ± 0,5

Tab. A4: Vergleich der Häufigkeiten der verwendeten Codons in *C. acetobutylicum*, Cbei_2100, Ckl_3020 und AbfD.

<i>C.ac</i>					<i>Cbei</i>					<i>Ckl</i>					<i>AbfD</i>					<i>C.ac</i>					<i>Cbei</i>					<i>Ckl</i>																																																																																																																																																																																																																																			
AS	Codon	%	%	%	AS	Codon	%	%	%	AS	Codon	%	%	%	AS	Codon	%	%	%	AS	Codon	%	%	%	AS	Codon	%	%	%	AS	Codon	%	%	%																																																																																																																																																																																																																															
Phe	UUU	37,9	24,7	20,6	14,3	Ser	UCU	16,4	16,5	14,4	2,0	Tyr	UAU	33,6	30,9	37,1	22,4	Cys	UGU	8,3	18,6	10,3	12,2	Leu	UGC	3,6	4,1	10,3	16,3	Stop	UAC	9,2	8,2	8,2	18,3	Stop	UGA	0,4	0,0	0,0	0,0	Trp	UGG	7,4	2,1	0,0	2,0	Pro	UAA	2,1	2,1	2,1	2,0	His	UAG	0,8	0,0	0,0	0,0	Arg	CGU	2,2	0,0	4,1	2,0	Ile	CCU	12,2	6,2	12,4	18,3	Gln	CAU	10,5	16,5	14,4	4,1	Trp	CGC	0,6	0,0	0,0	0,0	Asn	CAC	2,9	6,2	4,1	16,3	Arg	CGA	1,0	0,0	0,0	0,0	Met	CCA	12,0	26,8	16,5	10,2	Lys	CAG	7,0	0,0	12,4	42,8	Trp	CGG	0,2	0,0	0,0	0,0	Thr	ACU	19,6	20,6	26,8	30,5	Asn	AAU	52,5	47,4	39,2	18,3	Ser	AGU	18,8	6,2	10,3	2,0	Val	ACC	5,0	4,1	0,0	2,0	Asp	AAC	12,8	8,2	8,2	28,5	Trp	AGC	7,9	4,1	4,1	2,0	Ala	ACA	21,9	30,9	24,7	24,4	Lys	AAA	63,1	49,5	41,2	16,3	Trp	AGA	23,4	45,4	43,3	48,9	Met	ACG	3,0	0,0	2,1	0,0	Asp	AAG	30,4	18,6	33,0	42,8	Trp	AGG	5,9	6,2	2,1	0,0	Gly	GCU	23,3	47,4	26,8	73,3	Glu	GAU	46,8	55,7	47,4	32,6	Gly	GGU	19,8	20,6	16,5	38,7	Val	GCC	4,2	0,0	4,1	0,0	Glu	GAC	8,5	6,2	20,6	32,6	Gly	GGC	6,3	0,0	4,1	16,3	Ala	GCA	25,6	37,1	49,5	26,5	Glu	GAA	49,8	55,7	59,8	57,0	Gly	GGA	32,1	51,5	53,6	24,4	Val	GCG	3,6	2,1	4,1	0,0	Glu	GAG	17,8	6,2	10,3	4,1	Gly	GGG	5,0	8,2	2,1	0,0
	UUC	6,8	8,2	8,2	28,5		UCC	4,0	0,0	6,2	16,3		UCA	18,4	18,6	12,4	18,3		UAA	2,1	2,1	2,1	2,0		UAG	0,8	0,0	0,0	0,0		CGU	2,2	0,0	4,1	2,0		UGC	3,6	4,1	10,3	16,3		UAA	2,1	2,1	2,1	2,0		CGC	0,6	0,0	0,0	0,0		UGA	0,4	0,0	0,0	0,0		CGA	1,0	0,0	0,0	0,0		CGG	0,2	0,0	0,0	0,0		ACU	19,6	20,6	26,8	30,5		AAU	52,5	47,4	39,2	18,3		AGU	18,8	6,2	10,3	2,0		AGC	7,9	4,1	4,1	2,0		ACA	21,9	30,9	24,7	24,4		AAA	63,1	49,5	41,2	16,3		AGA	23,4	45,4	43,3	48,9		ACG	3,0	0,0	2,1	0,0		AAG	30,4	18,6	33,0	42,8		AGG	5,9	6,2	2,1	0,0		GCU	23,3	47,4	26,8	73,3		GAU	46,8	55,7	47,4	32,6		GGU	19,8	20,6	16,5	38,7		GCC	4,2	0,0	4,1	0,0		GAC	8,5	6,2	20,6	32,6		GGC	6,3	0,0	4,1	16,3		GCA	25,6	37,1	49,5	26,5		GAA	49,8	55,7	59,8	57,0		GGA	32,1	51,5	53,6	24,4		GCG	3,6	2,1	4,1	0,0		GAG	17,8	6,2	10,3	4,1		GGG	5,0	8,2	2,1	0,0																																																						
	UUG	9,7	4,1	16,5	2,0		UCG	2,3	2,1	0,0	0,0		CCU	12,2	6,2	12,4	18,3		CAU	10,5	16,5	14,4	4,1		CGU	2,2	0,0	4,1	2,0		AGU	18,8	6,2	10,3	2,0		AGC	7,9	4,1	4,1	2,0		ACA	21,9	30,9	24,7	24,4		AAA	63,1	49,5	41,2	16,3		AGA	23,4	45,4	43,3	48,9		ACG	3,0	0,0	2,1	0,0		AAG	30,4	18,6	33,0	42,8		AGG	5,9	6,2	2,1	0,0		GCU	23,3	47,4	26,8	73,3		GAU	46,8	55,7	47,4	32,6		GGU	19,8	20,6	16,5	38,7		GCC	4,2	0,0	4,1	0,0		GAC	8,5	6,2	20,6	32,6		GGC	6,3	0,0	4,1	16,3		GCA	25,6	37,1	49,5	26,5		GAA	49,8	55,7	59,8	57,0		GGA	32,1	51,5	53,6	24,4		GCG	3,6	2,1	4,1	0,0		GAG	17,8	6,2	10,3	4,1		GGG	5,0	8,2	2,1	0,0																																																																																																												
	CUC	2,4	0,0	0,0	0,0		CCC	1,3	0,0	0,0	0,0		CCA	12,0	26,8	16,5	10,2		CAG	7,0	0,0	12,4	42,8		CGA	1,0	0,0	0,0	0,0		ACG	3,0	0,0	2,1	0,0		AAC	12,8	8,2	8,2	28,5		AGA	7,9	4,1	4,1	2,0		ACA	21,9	30,9	24,7	24,4		AAA	63,1	49,5	41,2	16,3		AGA	23,4	45,4	43,3	48,9		ACG	3,0	0,0	2,1	0,0		AAG	30,4	18,6	33,0	42,8		AGG	5,9	6,2	2,1	0,0		GCU	23,3	47,4	26,8	73,3		GAU	46,8	55,7	47,4	32,6		GGU	19,8	20,6	16,5	38,7		GCC	4,2	0,0	4,1	0,0		GAC	8,5	6,2	20,6	32,6		GGC	6,3	0,0	4,1	16,3		GCA	25,6	37,1	49,5	26,5		GAA	49,8	55,7	59,8	57,0		GGA	32,1	51,5	53,6	24,4		GCG	3,6	2,1	4,1	0,0		GAG	17,8	6,2	10,3	4,1		GGG	5,0	8,2	2,1	0,0																																																																																																						
	CUA	9,5	6,2	2,1	10,2		CCG	1,7	0,0	2,1	0,0		CCA	12,0	26,8	16,5	10,2		CAG	7,0	0,0	12,4	42,8		CGA	1,0	0,0	0,0	0,0		ACG	3,0	0,0	2,1	0,0		AAC	12,8	8,2	8,2	28,5		AGA	7,9	4,1	4,1	2,0		ACA	21,9	30,9	24,7	24,4		AAA	63,1	49,5	41,2	16,3		AGA	23,4	45,4	43,3	48,9		ACG	3,0	0,0	2,1	0,0		AAG	30,4	18,6	33,0	42,8		AGG	5,9	6,2	2,1	0,0		GCU	23,3	47,4	26,8	73,3		GAU	46,8	55,7	47,4	32,6		GGU	19,8	20,6	16,5	38,7		GCC	4,2	0,0	4,1	0,0		GAC	8,5	6,2	20,6	32,6		GGC	6,3	0,0	4,1	16,3		GCA	25,6	37,1	49,5	26,5		GAA	49,8	55,7	59,8	57,0		GGA	32,1	51,5	53,6	24,4		GCG	3,6	2,1	4,1	0,0		GAG	17,8	6,2	10,3	4,1		GGG	5,0	8,2	2,1	0,0																																																																																																						
	CUG	2,4	2,1	2,1	0,0		CCC	1,3	0,0	0,0	0,0		CCA	12,0	26,8	16,5	10,2		CAG	7,0	0,0	12,4	42,8		CGA	1,0	0,0	0,0	0,0		ACG	3,0	0,0	2,1	0,0		AAC	12,8	8,2	8,2	28,5		AGA	7,9	4,1	4,1	2,0		ACA	21,9	30,9	24,7	24,4		AAA	63,1	49,5	41,2	16,3		AGA	23,4	45,4	43,3	48,9		ACG	3,0	0,0	2,1	0,0		AAG	30,4	18,6	33,0	42,8		AGG	5,9	6,2	2,1	0,0		GCU	23,3	47,4	26,8	73,3		GAU	4																																																																																																																																																																					

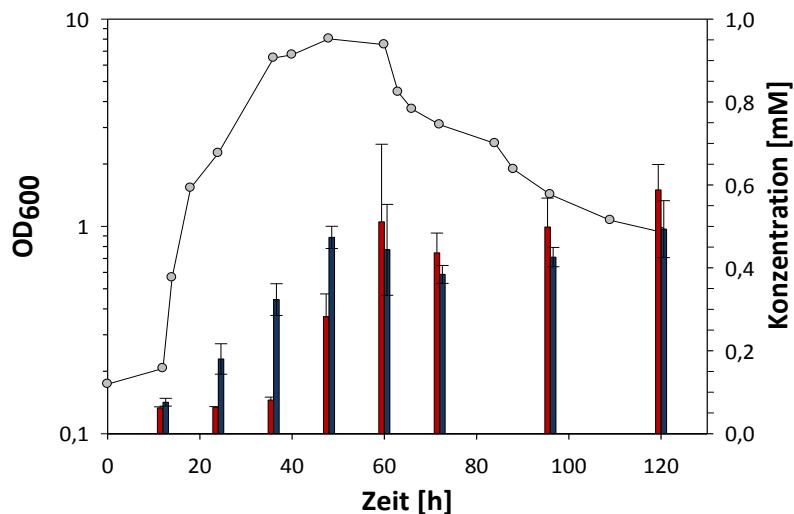


Abb. A16: Zeitlicher Verlauf der 1,4-BDO- und GHB-Produktion von *C. acetobutylicum* pTc::P(ptb)ckl_3020. Die Kultivierung erfolgte in 200 ml MS-MES über einen Zeitraum von 120 h. ■ 1,4-BDO, ■ GHB. n = 3.

Tab. A5: Gärungsprodukte transformierter *C. acetobutylicum*-Mutantenstämme in 200 ml-MS-MES nach 120 h. Die Mutanten enthalten das Plasmid pTc::P(thlA)cbei_2100.

	Acetat [mM]	Butyrat [mM]	Aceton [mM]	Butanol [mM]	Ethanol [mM]	1,4-BDO [mM]	GHB [mM]
ATCC 824	24,7 ± 6,3	12,7 ± 2,3	106,3 ± 15,2	169,2 ± 13,9	37,0 ± 1,6	---	---
pta::int	12,0 ± 2,1	8,3 ± 1,2	84,1 ± 7,6	194,2 ± 14,8	108,0 ± 7,3	0,19 ± 0,03	0,46 ± 0,03
ptb::int	27,1 ± 0,1	1,6 ± 0,2	63,9 ± 8,2	82,9 ± 8,7	89,6 ± 3,1	0,08 ± 0,01	0,71 ± 0,01
ldh1::int	22,0 ± 1,2	9,8 ± 1,3	87,6 ± 4,8	150,7 ± 12,6	79,7 ± 7,2	0,15 ± 0,04	0,58 ± 0,06
ldh2::int	28,5 ± 2,2	14,0 ± 0,7	82,3 ± 0,3	153,5 ± 4,8	65,9 ± 1,8	0,13 ± 0,01	0,73 ± 0,03
adc::int	67,4 ± 2,8	1,4 ± 0,1	8,9 ± 0,7	92,8 ± 2,6	156,9 ± 27,1	0,14 ± 0,01	0,73 ± 0,09
ctfA::int	73,5 ± 5,8	10,9 ± 3,3	0,0 ± 0,0	59,2 ± 10,6	50,9 ± 6,1	0,07 ± 0,01	0,41 ± 0,2
adhE1::int	38,7 ± 1,4	58,7 ± 1,8	4,5 ± 0,5	2,5 ± 0,3	43,9 ± 3,5	0,06 ± 0,0	0,35 ± 0,09
adhE2::int	31,7 ± 1,5	12,7 ± 0,9	79,7 ± 7,4	127,5 ± 5,2	72,2 ± 2,9	0,09 ± 0,0	0,39 ± 0,17

Danksagung

Zunächst bedanke ich mich recht herzlich bei Herrn **Prof. Dr. Hubert Bahl** für das entgegengebrachte Vertrauen und die Gelegenheit der selbstständigen Anfertigung dieser Arbeit, sowie für die Freiheiten, die ich er mir bei der Bearbeitung ließ.

Desweiteren möchte ich mich bei Frau **Dr. Tina Lütke-Eversloh** für die Bereitstellung dieses Themas, für die wissenschaftliche Betreuung sowie für die interessanten Gespräche und Anregungen bedanken.

Darüber hinaus möchte ich auch Herrn **Dr. Ralf-Jörg Fischer** danken, der vor allem im letzten Jahr mit konstruktiver Kritik und Ratschlägen meine Arbeit voranbrachte. Ebenso danke ich ihm für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Weiterhin gilt einen großen Dank allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der Abteilung Mikrobiologie der Universität Rostock, die mich während meiner Zeit begleitet haben. Insbesondere **Ilona Boldt, Hella Goschke, Regina Karstädt** und **Monika Timm** möchte ich für die vielen großen und kleinen Hilfestellungen während des Laboralltags danken. Darüber hinaus bedanke ich mich bei **Igor Bill, Tina Drenckhan, Franziska Jenzen, Dr. Katja Kriebel, Maria Lehmann, Anne Lunze, Dr. Antje May, Christoph Prohaska** und **Dr. Christine Voigt** für Hilfestellungen jeglicher Art und für die gute Arbeitsatmosphäre sowohl im Labor als auch im Büro.

Ganz besonders bedanke ich mich bei **Ronny Uhlig** und **Dr. Daniela Wetzel**, die mich vor allem mit Ratschlägen und Arbeitseifer stets unterstützt haben und immer ein offenes Ohr für meine Probleme hatten. Insbesondere die fröhlichen und unterhaltsamen Mittagspausen werde ich vermissen. Ebenso gilt ein großer Dank **Katja Zimmermann**, die viel Arbeit und Mühe in das Korrekturlesen dieser Arbeit gesteckt und es immer wieder geschafft hat, mich zu motivieren.

Ich danke ebenfalls **Dajana Domik** für das super Arbeitsklima über Abteilungsgrenzen hinweg und für den Spaß während langer Labornächte.

Dr. Daniel Rentsch, aus der Abteilung forensische Toxikologie, gebührt ebenfalls ein sehr großes Dankeschön, da ohne sein Einsatz und Interesse an diesem Thema eine

Nachweismethode für das 1,4-Butandiol nicht zustande gekommen und somit die Anfertigung dieser Arbeit fraglich gewesen wäre.

Der **Landesgraduiertenförderung Mecklenburg-Vorpommern** danke ich für die finanzielle Förderung dieser Promotion.

Bei meinen Freunden, besonders bei **Sebastian** und **Gyöngyver Foth** und **Rene Kaiser**, möchte ich mich für die vielen schönen Zeiten und Ablenkungen außerhalb des Labors bedanken.

Schließlich gilt jedoch der größte Dank meiner Familie, meinen Eltern **Michael** und **Doris Klipp** und meiner Schwester **Carolin Klipp**, die mich bei allen meinen Vorhaben unterstützt haben und ständig für mich da sind. Der Dank, den ich meiner Verlobten **Julia Ruttman** entgegenbringe, ist kaum in Worte zu fassen, da sie immer für mich da ist, mich aufbaut, mich motiviert, mich beruhigt und mich zum Lachen bringt. Ohne sie wäre es ein viel beschwerlicherer Weg gewesen. Vielen Dank!

Selbstständigkeitserklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegeben Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche gekennzeichnet

Rostock, den 23.03.2016

Markus Klipp