

Neue Einblicke in den Gärungsstoffwechsel von
Clostridium acetobutylicum

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Dörte Lehmann, geb. am 17.11.1983 in Berlin

aus Rostock

Rostock, 02.05.2012

Wissenschaftliches Kolloquium: 06.07.2012

Gutachter:

Prof. Dr. Hubert Bahl

Universität Rostock

Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät,

Institut für Biowissenschaften, Mikrobiologie

Prof Dr. Martin Hagemann

Universität Rostock

Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät,

Institut für Biowissenschaften, Pflanzenphysiologie

Das sind die Starken, die unter Tränen lachen, eigene Sorgen verbergen und andere glücklich machen.

Franz Grillparzer

Kathi du hast mir gezeigt, was es bedeutet zu kämpfen und leider auch die Einsicht, dass man nicht alle Ungerechtigkeiten im Leben besiegen kann. In diesem Sinne widme ich dir, die du für immer in meinem Herzen weiterleben wirst, meine Doktorarbeit.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
2 Material und Methoden	6
2.1 Organismen und Plasmide	6
2.2 Oligonukleotide	8
2.3 Stammlösungen	10
2.4 Nährmedien	10
2.4.1 Medium für <i>E. coli</i>	11
2.4.2 Medien für <i>C. acetobutylicum</i>	11
2.4.3 Medienzusätze	13
2.5 Stammhaltung	13
2.6 Anaerobe Anzucht von <i>C. acetobutylicum</i>	14
2.6.1 Anzucht von <i>C. acetobutylicum</i> auf Festmedium	14
2.6.2 Batch-Kulturen	14
2.6.3 pH-kontrollierte Batch-Fermentation	15
2.7 Bestimmung physiologischer Parameter	16
2.7.1 Optische Dichte	16
2.7.2 Berechnung des Wachstums	16
2.7.3 Bestimmung des pH-Werts	16
2.7.4 Lichtmikroskopie	16
2.7.5 Optisch-enzymatische Glukosebestimmung	16
2.7.6 Xylose-Bestimmung	17
2.7.7 Laktat-Bestimmung	18
2.7.8 Gaschromatographie	19
2.7.9 Bestimmung der gebildeten Gesamtgasmenge	20
2.8 Arbeiten mit Nukleinsäuren	21
2.8.1 Vorbehandlung von Geräten und Lösungen	21
2.8.2 PCR-Techniken	21
2.8.2.1 Zielgerichtete Mutagenese mittels SOE PCR	21
2.8.2.2 Primerdesign	23
2.8.2.3 Standard-PCR	23
2.8.2.4 High Fidelity PCR	23

2.8.2.5	Eub-PCR	24
2.8.3	Enzymatische Modifikationen von DNA	24
2.8.3.1	Restriktion von DNA	24
2.8.3.2	Dephosphorylierung von Vektor-DNA	26
2.8.3.3	Ligation	26
2.8.4	Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren	26
2.8.4.1	Phenol-Chloroform-Extraktion	26
2.8.4.2	Isopropanolfällung	26
2.8.4.3	Natriumacetatfällung	27
2.8.4.4	Ammoniumacetatfällung	27
2.8.4.5	DNA-Extraktion aus Agarosegelen	27
2.8.5	Agarosegelelektrophorese	27
2.9	Isolierung von Nukleinsäuren	28
2.9.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	28
2.9.2	Isolierung von chromosomaler DNA aus <i>C. acetobutylicum</i>	29
2.9.3	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>C. acetobutylicum</i>	31
2.10	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	33
2.10.1	DNase Behandlung von RNA	33
2.10.2	Herstellung von cDNA	34
2.11	Transfer von Nukleinsäuren auf Membranen	35
2.11.1	DNA-Markierung	35
2.11.1.2	Sondenquantifizierung	36
2.11.2	Southern-Hybridisierung	36
2.11.2.1	DNA-Gelelektrophorese für Southern-Hybridisierung	36
2.11.2.2	Aufbau des Southern Blots	37
2.11.2.3	Hybridisierung	37
2.11.2.4	Detektion Digoxigenin-markierter DNA	38
2.12	Erzeugung rekombinanter Organismen	40
2.12.1	DNA Transfer in <i>E. coli</i>	40
2.12.1.1	CaCl ₂ -vermittelte Transformation in <i>E. coli</i>	40
2.12.1.2	Transformation von <i>E. coli</i> durch Elektroporation	40
2.12.2	DNA Transfer in <i>C. acetobutylicum</i>	41
2.12.2.1	Transformation von <i>C. acetobutylicum</i> durch Elektroporation	41
2.13	Clostron® Insertionsmutante	42
2.13.1	Erzeugung der genspezifischen pMTL007C-E2 Vektoren	42
2.13.2	Transformation in <i>C. acetobutylicum</i>	42
2.13.3	Nachweis der Insertion	43
2.13.3.1	PCR-Nachweis	43
2.13.3.1	Southern-Hybridisierung	44
2.14	Entfernen der RAM-Kassette von Insertionsmutanten	45

2.15	Arbeiten mit Proteinen	46
2.15.1	Zellaufschluss mittels Ultraschall	46
2.15.2	Protein-Konzentrationsbestimmung	46
2.15.3	Thiolase-Assay	47
2.15.4	3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase-Assay	48
2.15.5	Crotonase-Assay	48
2.15.6	Butanol-Dehydrogenase-Assay	48
2.15.7	Acetat- und Butyratkinase-Assay	49
2.15.8	Phosphotransbutyrylase Assay	49
2.16	Bezugsquellen	50
3	Ergebnisse	53
3.1	Mutationsstrategie	53
3.2	Butyrat/Butanol negativer <i>C. acetobutylicum</i> Stamm	55
3.2.1	Herstellung einer <i>C. acetobutylicum hbd::int(69)</i> Integrannte	57
3.2.2	Charakterisierung der 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase Integrationsmutante	59
3.2.2.1	Glucose Batch Fermentation	59
3.2.2.2	Kohlendioxid-/Wasserstoff-Messung	62
3.2.2.3	Xylose Batch Fermentation	63
3.2.3	Biochemische Charakterisierung	66
3.2.3.1	Charakterisierung auf Enzymebene	66
3.2.3.2	Charakterisierung auf Translationsebene	68
3.3	Butyrat negativer <i>C. acetobutylicum</i> Stamm	69
3.3.1	Herstellung einer <i>C. acetobutylicum ptb::int(87)</i> Integrannte	70
3.3.2	Charakterisierung der Phosphotransbutyrylase Integrationsmutante	71
3.3.2.1	Glukose Batch Fermentation	71
3.3.2.2	pH-kontrollierte Fermentation	73
3.3.2.3	Butyrat Fed Batch Fermentation	75
3.4	Untersuchung des Acetat- und Aceton-Stoffwechsels	78
3.4.1	Herstellung von Acetat- und Aceton- negativen Integrannten	78
3.4.2	Charakterisierung der Insertionsmutanten	79
3.4.3	Herstellung von Doppel-Integrannten	81
3.4.4	Charakterisierung der Doppel-Integrannten	82
4	Diskussion	84
4.1	Das ClosTron®-System	84
4.1.1	Integranntenherstellung	85
4.1.2	Inaktivierung des C ₄ -Weges	86
4.1.2.1	Einfluss der Hbd-Inaktivierung auf der enzymatischen Ebene	87

4.1.2.2	NADH-abhängige Alkohol-Dehydrogenasen	89
4.1.2.2	Alkohologenese durch Hbd-Inaktivierung?	91
4.1.3	Inaktivierung der Butyratsynthese	93
4.1.3.1	Vergleich der Ethanolproduzenten	95
4.1.3.2	Eintritt in die Lösungsmittelphase durch einen Butyratimplus	97
4.1.4	Reduktion von Nebenprodukten	98
4.1.4.2	Reduktion von Nebenprodukten durch Doppelmutation	100
4.2	Einfluss der Mutationen auf den Gärungsstoffwechsel	101
4.2.1	Das „Acid Crash“-Phänomen	101
4.2.2	Mögliche Auslöser der Lösungsmittelproduktion	103
4.2.3	Säure-Reassimilation	105
4.2.4	Stammoptimierung durch „Metabolic Engineering“	107
5	Zusammenfassung	109
	Literaturverzeichnis	110
	Anhang	122
	Danksagung	147

Abkürzungsverzeichnis

A Adenin , Ampere

A. Aqua

Abb. Abbildung

ABE Aceton, Butanol und Ethanol

Ack Acetatkinase

ad auffüllen auf

AdhE Aldehyd/Alkoholdehydrogenase

Adc Acetoacetat-Decarboxylase

APase alkalische Phosphatase

ATCC American Type Culture Collection

B. Bacillus

Bcd Butyryl-CoA-Dehydrogenase-Komplex

Bdh Butanol-Dehydrogenase

Buk Butyratkinase

Bp Basenpaare

BSA Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)

bzw. beziehungsweise

C- Carboxy-

C Cytosin, Kohlenstoff

C. Clostridium

°C Grad Celsius

CGM Clostridial Growth Medium

Cm Chloramphenicol

CoA CoenzymA

CtfA/B Acetoacetyl-CoA:Acyl-CoA-Transferase

d Desoxy-

dest. destilliert

DMSO Dimethylsulfoxid

DNA Desoxyribonucleinsäure

DNase Desoxyribonuclease

dNTP Desoxyribonucleosid-5`-triphosphat

DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

E. Escherichia

Em Erythromycin

et al. et alteri (und andere)

FID Flammen-Ionisations-Detektor

FNOR Ferredoxin:NAD(P)⁺ Oxidoreduktase

fw forward

g Gramm

G Guanin

h Stunde

Hbd 3 Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase

k kilo

l Liter

L. Lactococcus

log. dekadischer Logarithmus

μ mikro (10⁻⁶)

m Meter, milli, ‚messenger‘

M Molar

min Minute

mod. modifiziert

MS Massenspektrometrie

n nano (10⁻⁹)

nt Nukleotid(e)

NTA Nitrilotriessigsäure

o ortho

OD optische Dichte

ORF open reading frame

PCR Polymerase-Kettenreaktion

PFOR Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase

p/ isolektrischer Punkt

pH negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration

Pta Phosphotransacetylase

Ptb Phosphotransbutyrylase

rev reverse

RNA Ribonukleinsäure

RNase Ribonuklease
RT Raumtemperatur
s Sekunde
S. Saccharomyces
SAP Shrimps alkalische Phosphatase
SDS Natriumdodecylsulfat
T Thymin, Temperatur
Tab. Tabelle
TAE Tris-Acetat-EDTA
TCA Trichloressigsäure
TE Tris-EDTA
Tm Schmelztemperatur
Thl Thiolase
Tris Tris-Hydroxymethyl-Aminoethan
U Unit
UE Untereinheit
Upm Umdrehungen pro Minute
UV Ultraviolett
V Volt
vs. versus
v/v Volumen pro Volumen
Vol. Volumen
W Watt
WLD Wärmeleitdetektor
WT Wildtyp
w/v Masse pro Volumen

1 Einleitung

Louis Pasteur hatte mit seinen Entdeckungen 1861 nicht nur Einfluss auf die Lebensmitteltechnologie sondern auch auf die Aceton-Butanol-Ethanol-(ABE)-Fermentation wie wir sie heute kennen. Er prägte zum einen den Begriff „Anaerobier“ um auf das Leben ohne Sauerstoff hinzuweisen und erwähnte zum anderen erstmals die Produktion von Butanol durch mikrobielle Fermentation (JONES & WOODS, 1986; DÜRRE, 1998). Wenngleich Pasteur wahrscheinlich keine Reinkultur verwendete, lassen seine Beschreibungen vermuten, dass es sich schon damals um einen Butyrat-produzierenden Stamm wie *Clostridium acetobutylicum* oder *Clostridium butyricum* handelte. Im späteren Verlauf seiner Untersuchungen bildete dieses Bakterium sogar Butanol, entsprechend dem regulatorischen Modell, wie es heute für *C. acetobutylicum* bekannt ist (BAHL & DÜRRE, 2001). Vielleicht arbeitete Pasteur bereits damals mit dem *C. acetobutylicum* Stamm, den Chaim Weizmann zwischen 1912 und 1914 erstmals isolierte, identifiziert und dadurch den späteren industriellen ABE-Fermentationsprozess ermöglichte (NÖLLING *et al.*, 2001).

Im 1. und 2. Weltkrieg kam *C. acetobutylicum* eine bedeutende Rolle zu. So wurde die Nutzung der ABE-Fermentation komplett auf die Acetonproduktion ausgerichtet, da dies für die Korditherstellung benötigt wurde. Erst danach konnte die sich die entwickelnde normale Lösungsmittelproduktion wieder gestartet werden. Aufgrund der zunehmenden Ausweitung der Automobilindustrie erforderte der steigende Butanolbedarf den Ausbau und die Leistungsintensivierung der Fabriken und führte einhergehend mit unbekanntem Fermentationsproblemen (wie beispielsweise Bakteriophagen Infektionen) führte diese Entwicklung auch zu einem erhöhten Forschungsinteresse (JONES *et al.*, 2000). Dadurch kam es zur Vergabe von Forschungszuschüssen an Universitäten und erstmals sogar zur Einführungen von Forschungsprogrammen die sich ausschließlich mit der ABE-Fermentation auseinandersetzten. Im Zuge dieser Entwicklung wurden 1945 66 % der gesamten Butanol- und 10 % der Acetonproduktion in den Vereinigten Staaten durch Fermentation erzielt. (JONES & WOODS, 1986). Jedoch führten zunehmende Substratkosten sowie die Verfügbarkeit von kostengünstiger produzierten Lösungsmitteln durch die petrochemische Industrie zum Rückgang der biotechnologischen Prozesse.

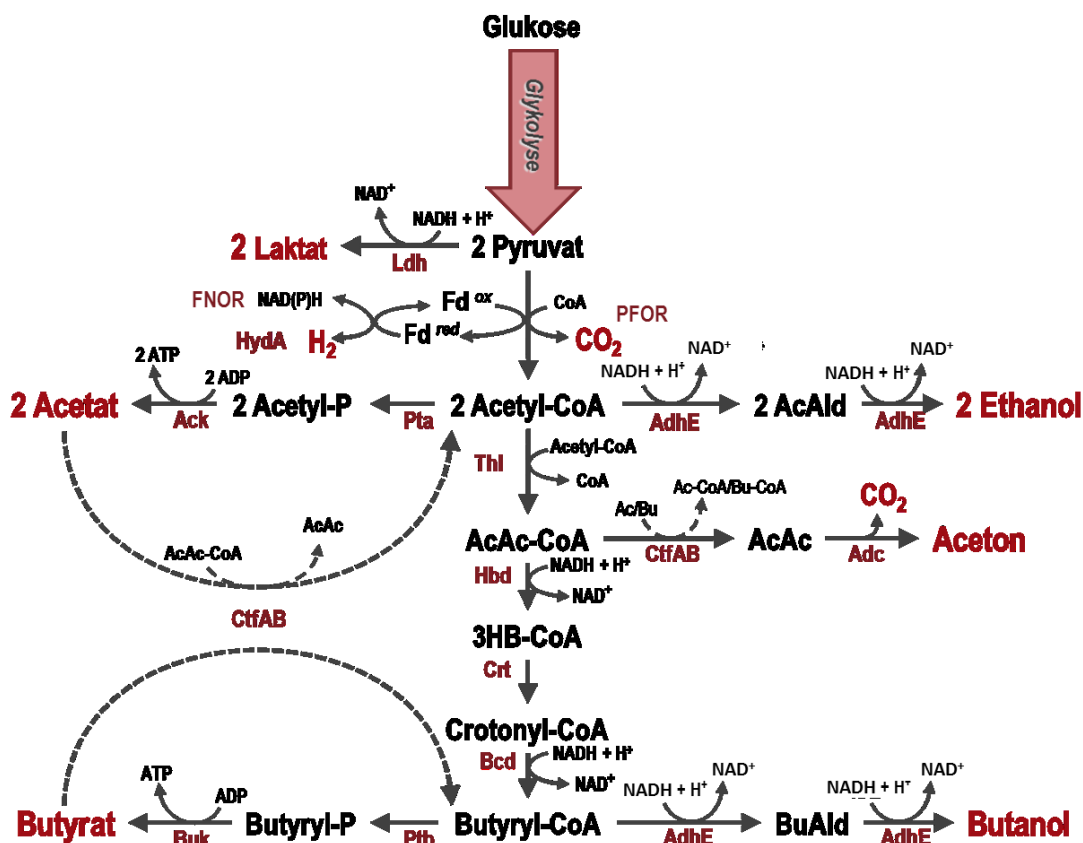


Abb. 1.1: Gärungsstoffwechsel von *Clostridium acetobutylicum*. Abkürzung: Ldh, Laktatdehydrogenase; FNOR, Ferredoxin:NAD(P)⁺ Oxidoreduktase; HydA, Hydrogenase; PFOR, Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase; Pta, Phosphotransacetylase; Ack, Acetatkinase; AdhE, Aldehyd/Alkoholdehydrogenase, CftA/B, Acetoacetyl-CoA:Acyl-CoA-Transferase; Adc, Acetoacetat-Decarboxylase; Thl, Thiolase; Hbd, 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase; Crt, Crotonase; Bcd, Butyryl-CoA-Dehydrogenase-Komplex; Ptb, Phosphotransbutyrylase; Buk, Butyratekinase; Acetyl-P, Acetylphosphat; Ac-CoA, Acetyl-CoA; AcAld, Acetaldehyd; AcAc, Acetoacetat; 3HB-CoA, 3-Hydroxybutyryl-CoA; Butyryl-P, Butyrylphosphat; BuAld; Butyraldehyd. Die gestrichelten Linien spiegeln die Säure Reassimilation in der Solventogenese wieder. Dies wird aktiviert durch den Co-A Transfer von Acetoacetyl-CoA.

C. acetobutylicum zeichnet sich durch einen komplexen Stoffwechsel aus, der es dem Organismus ermöglicht zu unterschiedlichen Zeitpunkten seines Wachstums verschiedene Produkte zu bilden. Wie bereits erwähnt, werden jedoch nur die Lösungsmittel Butanol und Aceton industriell genutzt. Trotz allgemein sinkendem Interesse in den 1950er Jahren, legten Internationale Arbeitskreise ihren Fokus auf die Erforschung der Regulation des Stoffwechsels, der Genetik und der Entwicklung lösungsmittelbildenden *Clostridien* (BAHL & DÜRRE, 2001). Das bieten nun eine hervorragende Grundlage für die Optimierung der Lösungsmittelproduktion. Wenngleich *C. acetobutylicum* mittlerweile seit 100 Jahren bekannt ist, beschränkten sich die Techniken zur Mutationsgenerierung lange Zeit auf Chemikalien wie N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin (NTG) (MURRAY *et al.*, 1983) oder auf konjugative Transposons. Diese großen mobilen Elemente, wie Tn916 aus

S. faecalis (FRANKE, et al., 1981) oder Tn4451 von *C. perfringens* (ABRAHAM, et al., 1987) konnten erfolgreich in verschiedenen *Clostridien* wie *C. tetani*, *C. botulinum* (LIN, et al., 1991) aber auch in *C. acetobutylicum* ATCC 824 (WOOLLEY et al., 1989) zur Mutation eingesetzt werden. Der Nachteil dieser Mutationsstrategien war jedoch die rein zufällige Veränderung beziehungsweise Integration in das Genom. Ein generelles Anliegen bei der Analyse von Genfunktionen besteht in ihrer gezielten Inaktivierung. Aus diesem Grund entwickelten sich im Laufe der Forschungsgeschichte eine Vielzahl verschiedener Technologien, wie z. B. die „Campbell-like“ Integration durch homologe Rekombination von nicht-replikativen Plasmiden in den 90er Jahren. Dieses Verfahren wurde erfolgreich für *C. beijerinckii* (LIYANAGE et al., 2001), *C. perfringens* (RAJU & SARKER, 2005; CHIAREZZA et al., 2009), *C. difficile* (O`CONNOR et al., 2006) und *C. acetobutylicum* (WILKINSON & YOUNG, 1994; GREEN et al., 1996; GREEN & BENNETT, 1998) eingesetzt. Allerdings war die Integrationseffizienz relativ gering, so dass nur wenige genspezifische Insertionsmutanten in *C. acetobutylicum* ATCC 824 publiziert wurden. Ebenso waren diese Mutanten nur über 25 bis 30 Generationen stabil (GREEN et al., 1996; GREEN und BENNETT, 1996; KAIZHI et al., 2011). Ähnliche alternative Methoden wurden von HARRIS et al. (2002) und SARKER et al. (1999) entwickelt. Diese konnten sich jedoch ebenfalls nicht etablieren, da auch mit diesem Verfahren die Effizienz gering war und Mutationsungenauigkeiten auftraten (HEAP et al., 2009).

Ein anderer Versuch, *Clostridium* genetisch zugänglich zu machen, war die antisense-(as)-RNA-Technologie. Diese wurde zur „Herab“-Regulierung der Butyratkinase und Phosphotransbutyrylase (DESAI et al., 1999), CoA-Transferase und der Acetoacetat-Decarboxylase (TUMMALA et al., 2003a), sowie bei der Alkohol-Aldehyd-Dehydrogenase (TUMMALA et al., 2003b) verwendet. Allerdings kann die asRNA das Transkriptprogramm der Zelle betreffen, doch diese Veränderungen müssen nicht zwangsläufig mit der verminderten Genexpression des Zielgens zusammenhängen (SILLERS et al., 2009; KAIZHI et al., 2011). Einen Meilenstein in der Forschungsgeschichte von *C. acetobutylicum* symbolisiert die Sequenzierung des kompletten Genoms im Jahre 2001 (NÖLLING et al., 2001). Weitere Jahre vergingen, bis sich 2007 auf Grund der vorliegenden Genominformation, eine neue Technologie etablierte. Dabei erfolgte die Anpassung des LI.LtrB Gruppe II Intron von *Lactococcus lactis* für die Gattung *Clostridia*, woraufhin das System als ClosTron® bezeichnet wurde. Die Verwendung ermöglichte nun eine gezielte

Geninaktivierung in *C. acetobutylicum* (HEAP *et al.*, 2007) und eröffnete neue Möglichkeiten den Metabolismus im Hinblick auf die Lösungsmittelbildung zu beeinflussen. Das Konzept der Stoffwechselmanipulation zum Erschaffen von Bakterienstämmen mit bestimmten Eigenschaften zu erschaffen, ist nicht neu. Es gibt viele bedeutende Beispiele im Bereich der Aminosäure-, Antibiotika-, Vitamin- und auch Lösungsmittelproduktion, die jedoch bislang meist empirisch durch Mutation und Selektion gewonnen wurden (KENNERKNECHT *et al.*, 2003). Die Entwicklung molekularbiologischer Techniken eröffnete eine neue Dimension der Stoffwechselmanipulation. Gleichzeitig wurde eine Vielzahl von Begriffen geprägt, um der potenziellen Kraft dieser neuen Technologie Rechnung zu tragen. Neben „molecular breeding“ (KELLOGG *et al.*, 1981), „*in vitro* evolution“ (TIMMIS *et al.*, 1988) „microbial oder metabolic pathway engineering“ (MACQUITTY, 1988; TONG *et al.*, 1991) sowie „cellular engineering“ (NEREM, 1991) tauchte ebenfalls der Begriff „Metabolic Engineering“ (STEPHANOPOULOS & VALLINO, 1991; BAILEY, 1991) auf. Die Bezeichnung „Metabolic Engineering“ hat sich durchgesetzt und dient heutzutage sogar als Titel einer naturwissenschaftlichen Zeitschrift (ELSEVIER), welche sich auf Publikationen konzentriert, dessen Ergebnisse durch „Metabolic Engineering“ erzielt wurden. Dieser Begriff bezeichnet mit Blick auf die Produktbildung einen direkten Fortschritt durch Modifikationen spezifischer biochemischer Reaktionen. Dabei können das Einbringen neuer Reaktionen mit Hilfe der rekombinanten DNA-Technologie ebenso enthalten sein, wie das gezielte Ausschalten unerwünschter Reaktionswege. (STEPHANOPOULOS *et al.*, 1998; ALPER & STEPHANOPOULOS, 2009).

Im Hinblick auf *C. acetobutylicum* sind seit 1980 zunehmende akademische und industrielle Forschungsaktivitäten zu verzeichnen. Im Vordergrund steht dabei das Interesse an der mikrobiellen Produktion von Biokraftstoffen. Dieses wird zum einen hervorgerufen durch steigende Kosten in ölverarbeitenden Industrien, zum anderen drängt der stetige Wunsch nach erhöhtem Umweltschutz und -bewusstsein zu Weiterentwicklungen im Bereich der erneuerbaren Energien. Andererseits führen Verbesserungen der Fermentation und der verarbeitenden Prozesse, wie auch die zunehmende Erforschung der Physiologie und Genetik von solventogenen *Clostridien*, sowie die Ankündigung der Ölindustrie die industrielle ABE-Fermentation wieder

einzuführen zu einer besonderen Fokussierung auf *C. acetobutylicum* (ZHENG *et al.*, 2009; LÜTKE-EVERSLOH & BAHL, 2011).

Die vorliegende Arbeit war eingebettet in das Forschungsprojekt „BioFuels 2021“, welches mit Basis öffentlicher und industrieller Förderung einen systematischen Ansatz zum modernen Metabolic Engineering von *C. acetobutylicum* verfolgte. Dabei galt es gezielt und sukzessive Zweige des Metabolismus durch das Ausschalten von Enzymaktivitäten mittels Clostron® zu inaktivieren und die Auswirkungen mit den sogenannten Insertionsmutanten auf molekularer, biochemischer und physiologischer Ebene zu analysieren. Im besonderen Fokus stand die Erkenntnis im Blick auf die Steigerung der Butanol-Konzentration beziehungsweise der Beseitigung von Nebenprodukten. Die erzeugten Integrierten gewährten einerseits Einblicke in einen Stoffwechsel von *C. acetobutylicum* der ohne den C₄-Weg in der Lage war enorme Ethanolmengen zu produzieren und andererseits konnte die angestrebte Reduktion der Nebenprodukte durch die Inaktivierung des Butyrat- und Aceton-Stoffwechselzweiges erzielt werden. Zusätzlich wurde erstmals Doppelmutationen in *C. acetobutylicum* mit der Nutzung des Clostron®-Systems erzeugt. Die vorliegende Arbeit verdeutlicht zudem die Komplexität einen bestimmten Phänotyp durch „Metabolic Engineering zu erreichen. Die Ergebnisse dieser Forschung, sowie die daraus gewonnenen Erkenntnisse konnten bisher in 3 Originalpublikationen (LEHMANN & LÜTKE-EVERSLOH, 2011; LEHMANN, *et al.*, 2012 a; LEHMANN *et al.*, 2012 b) einfließen und ermöglichen eine weiterführende Erforschung des Gärungsstoffwechsels in *C. acetobutylicum*.

2 Material und Methoden

2.1 Organismen und Plasmide

Die verwendeten Organismen sind in der Tabelle 2.1, Vektoren in der Tabelle 2.2 und die rekombinanten Plasmide in der Tabelle 2.3 aufgelistet.

Tab. 2.1: Organismen

Organismus	Besondere Eigenschaften	Herkunft/Referenz
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	Typstamm	Laborsammlung
<i>C. acetobutylicum</i> <i>ldh1::int(93)</i>	Gruppe II Intron integrierte zw. 93./94. Bp von <i>ldh1</i> , Erm ^R	diese Arbeit/ Laborsammlung Nr. 326
<i>C. acetobutylicum</i> <i>ldh2::int(231)</i>	Gruppe II Intron integrierte zw. 231./232. Bp von <i>ldh2</i> , ErmR	diese Arbeit/ Laborsammlung Nr. 327
<i>C. acetobutylicum</i> <i>pta::int(80)</i>	Gruppe II Intron integrierte zw. 80./81. Bp von <i>pta</i> , ErmR	diese Arbeit/ Laborsammlung Nr. 328
<i>C. acetobutylicum</i> <i>ptb::int(87)</i>	Gruppe II Intron integrierte zw. 87./88. Bp von <i>ptb</i> , ErmR	diese Arbeit/ Laborsammlung Nr.329
<i>C. acetobutylicum</i> <i>adc::int(180)</i>	Gruppe II Intron integrierte zw. 180./181. Bp von <i>adc</i> , ErmR	diese Arbeit/ Laborsammlung Nr.330
<i>C. acetobutylicum</i> <i>ctfA::int(352)</i>	Gruppe II Intron integrierte zw. 352./353. Bp von <i>ctfA</i> , ErmR	diese Arbeit/ Laborsammlung Nr.331
<i>C. acetobutylicum</i> <i>adhE1::int(158)</i>	Gruppe II Intron integrierte zw. 158./159. Bp von <i>adhE1</i> , ErmR	diese Arbeit/ Laborsammlung Nr.332
<i>C. acetobutylicum</i> <i>adhE2::int(114)</i>	Gruppe II Intron integrierte zw. 114./115. Bp von <i>adhE2</i> , ErmR	diese Arbeit/ Laborsammlung Nr.333
<i>C. acetobutylicum</i> <i>hbd::int(69)</i>	Gruppe II Intron integrierte zw. 69./70. Bp von <i>hbd</i> , ErmR	diese Arbeit/ Laborsammlung Nr.334
<i>C. acetobutylicum</i> <i>pta::int(80)ΔRAM- adc::int(180)</i>	Gruppe II Intron ohne RAM-Kassette zw. 80./81. Bp in <i>pta</i> und Gruppe II Intron zw. 180./181. Bp von <i>adc</i> , ErmR	diese Arbeit/ Laborsammlung Nr.335
<i>C. acetobutylicum</i> <i>pta::int(80)ΔRAM- ctfA::int(352)</i>	Gruppe II Intron ohne RAM-Kassette zw. 80./81. Bp in <i>pta</i> und Gruppe II Intron zw. 352./353. Bp von <i>ctfA</i> , ErmR	diese Arbeit/ Laborsammlung Nr.336
<i>C. acetobutylicum</i> <i>adc::int(180)ΔRAM- pta::int(80)</i>	Gruppe II Intron ohne RAM-Kassette zw. 180./181. Bp von <i>adc</i> und Gruppe II Intron zw. 80./81. Bp von <i>pta</i> , ErmR	diese Arbeit/ Laborsammlung Nr.337
<i>E. coli</i> DH5α	<i>supE44</i> , Δ <i>lacU169</i> , <i>hsdR17</i> , (ϕ 8 <i>lacZΔM15</i>), <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>	Laborsammlung Nr. 272/ HANAHAN, 1983

<i>E. coli</i> ER2275	<i>trp-31, his-1, tonA2, rpsL104, supE44, xyl-7, mtl-2, metB1, el4-, Δ(lac)U169, endA1, recA1, R(zbgZ10::Tn10)Tc^S, Δ(mcr-hsd-mrr)114::1510, [F', proAB, laqI⁹ZΔM15zsd::mini Tn10(Km^r)]</i>	Laborsammlung Nr. 271/ NEB, New England BioLabs
-----------------------	---	---

Tab. 2.2: Vektoren

Vektor	relevantes Merkmal	Herkunft/Referenz
pAN-2	Tc ^r , Φ3tl; p15A oriR	Laborsammlung Nr 271/ HEAP <i>et al.</i> 2007.
pMTL007C-E2	<i>Csp fdx, IBS, EBS2, EBS1d, ClosTron-ErmRAM, 350-Bp-Intron, LtrA, T1/T2-Terminator, pCB102, catP, ColE1, lacZalpha, oriT, Cm^r</i>	Laborsammlung Nr. 20/ HEAP <i>et al.</i> 2007,
pCLF1-1		Laborsammlung Nr. 98/ Soucaille
pTHyDA	P ^{thiolase} , ATG, <i>ori, repl</i> ; C-term. <i>Strep</i> -tag, Em ^R , Ap ^R , cytoplasmatische Expression in <i>E. coli</i>	Laborsammlung Nr. 22/ GIRBAL <i>et al.</i> 2004

Tab. 2.3: Rekombinante Plasmide

Plasmid	relevante Merkmale	Insertgröße	Herkunft
pMTL007C:: <i>ldh1</i> -Intron	pMTL007C-E2, <i>HindIII, BsrGI, ldh1</i> -Intron	350 Bp	diese Arbeit Laborsammlung Nr. 338
pMTL007C:: <i>ldh2</i> -Intron	pMTL007C-E2, <i>HindIII, BsrGI, ldh2</i> -Intron	350 Bp	diese Arbeit Laborsammlung Nr. 339
pMTL007C:: <i>pta</i> -Intron	pMTL007C-E2, <i>HindIII, BsrGI, pta</i> -Intron	350 Bp	diese Arbeit Laborsammlung Nr. 340
pMTL007C:: <i>ptb</i> -Intron	pMTL007C-E2, <i>HindIII, BsrGI, ptb</i> -Intron	350 Bp	diese Arbeit Laborsammlung Nr. 341
pMTL007C:: <i>adc</i> -Intron	pMTL007C-E2, <i>HindIII, BsrGI, adc</i> -Intron	350 Bp	diese Arbeit Laborsammlung Nr. 342
pMTL007C:: <i>ctfA</i> -Intron	pMTL007C-E2, <i>HindIII, BsrGI, ctfA</i> -Intron	350 Bp	diese Arbeit Laborsammlung Nr. 343
pMTL007C:: <i>adhE1</i> -Intron	pMTL007C-E2, <i>HindIII, BsrGI, adhE1</i> -Intron	350 Bp	diese Arbeit Laborsammlung Nr. 344

pMTL007C:: <i>adhE2</i> -Intron	pMTL007C-E2, <i>HindIII</i> , <i>BsrGI</i> , <i>adhE2</i> -Intron	350 Bp	diese Laborsammlung Nr. 345	Arbeit
pMTL007C:: <i>hbd</i> -Intron	pMTL007C-E2, <i>HindIII</i> , <i>BsrGI</i> , <i>hbd</i> -Intron	350 Bp	diese Laborsammlung Nr. 346	Arbeit

2.2 Oligonukleotide

Die in der Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in der Tabelle 2.4 zusammengefasst.

Tab. 2.4: Oligonukleotide

Name	5' → 3' Sequenz*	Verwendung
EBS Universal	CGAAATTAGAACTTGC GTTCAGTAAAC	Intron-spez. Primer
1593 1594s-IBSLdh1	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTACTTGCTCTGAGGTGCG CCCAGATAGGGTG	<i>ldh1</i> -spez. Primer
1593 1594s-EBS1dLdh1	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCTCTGA GATTAACCTACCTTTCTTTGT	(Insertion: 93./94. Bp, E-value: 0,263)
1593 1594s-EBS2Ldh1	TGAACGCAAGTTTCTAATTCGGTTGCAAGTCGATAGAG GAAAGTGTCT	
2231 2232s-IBSLdh2	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTAGATGCCAGATAGTGCG CCCAGATAGGGTG	<i>ldh2</i> -spez. Primer
2231 2232s-EBS1dLdh2	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCCAGAT AATTAACCTACCTTTCTTTGT	(Insertion: 231./232. Bp, E-value: 0,060)
2231 2232s-EBS2Ldh2	TGAACGCAAGTTTCTAATTCGATTGCATCTCGATAGAGG AAAGTGTCT	
987 988s-IBS-pta	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTAGAAGACAAAAGAGTGC GCCCAGATAGGGTG	<i>pta</i> -spez. Primer
987 988s-EBS1d-pta	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCAAAG AATAACCTACCTTTCTTTGT	(Insertion: 80./81. Bp, E-value: 0,079)
987 988s-EBS2-pta	TGAACGCAAGTTTCTAATTCGATTCTTCTCGATAGAGG AAAGTGTCT	
87 88s-IBS-ptb	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTACAAGACGAGCCAGTGC GCCCAGATAGGGTG	<i>ptb</i> -spez. KO- Primer
87 88s-EBS1d-ptb	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCGAGCC AGTTAACCTACCTTTCTTTGT	(Insertion: 87./88. Bp, E-value: 0,060)
87 88s-EBS2-ptb	TGAACGCAAGTTTCTAATTCGGTTCTTGTCGATAGAGG AAAGTGTCT	
1473/74sIBS Cap0165	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTATTAGTCAGGTTTGTGCG CCCAGATAGGGTG	<i>adc</i> -spez. Primer
1473/74sEBS1dCap0165	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCAGGT TGATAACCTACCTTTCTTTGT	(Insertion: 180./181. Bp, E-value: 0,010)
1473/74sEBS2Cap0165	TGAACGCAAGTTTCTAATTCGGTTACTAATCGATAGAGG AAAGTGTCT	
2380 2381s-IBS-ctfA	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTATAGTCTGTACGTGCG CCCAGATAGGGTG	<i>ctfA</i> -spez. KO-

2380 2381s-EBS1d-ctfA	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCGTGTA CTATAACTTACCTTTCTTTGT	Primer (Insertion: 352./353. Bp, E-value: 0,079)
2380 2381s-EBS2-ctfA	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGGTTACCTATCGATAGAGG AAAGTGTCT	
2686/87sIBSAdhE	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTAAGCAACAGCAGCGTGC GCCAGATAGGGTG	<i>adhE1</i> -spez. Primer
2686/87sEBS1dAdhE	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCAGCAG CTGTAACTTACCTTTCTTACC	(Insertion: 158./159. Bp, E-value: 0,079)
2686/87sEBS2AdhE	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGATTTGCTTCGATAGAGG AAAGTGTCT	
114 115s-IBS-adhe2	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTATTTAACCAATGTGTGCG CCCAGATAGGGTG	<i>adhE2</i> -spez. Primer
114 115s-EBS1d-adhe2	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCCAATG TGCTAACTTACCTTTCTTTGT	(Insertion: 114./115. Bp, E-value: 0,087)
114 115s-EBS2-adhe2	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGGTTTAAATCGATAGAGG AAAGTGTCT	
2569/70sIBSHbd	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTATTTGCCGCTAAAGTGCG CCCAGATAGGGTG	<i>hbd</i> -spez. Primer
2569/70sEBS1dHbd	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCGCTAA AGGTAACTTACCTTTCTTTGT	(Insertion: 69./70. Bp, E-value: 0,026)
2569/70sEBS2Hbd	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGGTTGCAATCGATAGAG GAAAGTGTCT	
Ldh1-Fw-BamHI	AAAAAGGATCCAAAAAGAATACTAAAATTTTCAG	<i>ldh1</i> -spez. Primer
Ldh1-Rev-Cfr9I	AAAAACCCGGGAAATATACTATCTAGTGATTCC	
Ldh2-Fw-Cfr9I	AAAAACCCGGGAATTTTGTAAAAATAAG	<i>ldh2</i> -spez. Primer
Ldh2-Rev-BamHI	AAAAAGGATCCTTTATTAGTATTAAGTCC	
pta-Fw	GATTTAATAGAAAGCATATGGG	<i>pta</i> -spez. Primer
pta-Rev	GCCTGAACAACAGTTATAG	
ptb-Fw	ATTAAGAGTTTTAATGAAATTATC	<i>ptb</i> -spez. Primer
ptb-Rev	TTCATTTTTGTTTCATGG	
CtfA-Fw-BamHI	AAAAAGGATCCAACTCTAAAATAATTAGATTTGAAAATTT AAGG	<i>ctfA</i> -spez. Primer
CtfA-Rev-Cfr9I	AAAAACCCGGGTGCAGGCTCCTTACT	
AdhE-Fw-BamHI	AAAAAggatccAAAGTCACAACAGTAAAGG	<i>adhE1</i> -spez. Primer
AdhE-Rev-Cfr9I	AAAAACCCGGGAGGTTGTTTTTAAACAATTTATATAC	
adhe2-Fw	AAAGTTACAAATCAAAAAGAAC	<i>adhE2</i> -spez.

adhe2-Rev	TTAAAATGATTTTATATAGATATCC	Primer	
Adc-Fw-Cfr9I	AAAAA CCCGGG TTAAAGGATGAAGTAATTAACAAATTA G	<i>adc</i> -spez. Primer	
Adc-Rev-BamHI	AAAAA GGATCC CTTAAGATAATCATATATAACTTCAGC		
Hbd-Fw-Cfr9I	AAAAA CCCGGG AAAAAGGTATGTGTTATAGG	<i>hbd</i> -spez. Primer	
Hbd-Rev-BamHI	AAAAA GGATCC TTTTGAATAATCGTAGAAACC		
pta	CCCCAAGCTTGTTCAAAG	Operon Primer	spez.
ack	CCCCGCTGATATCTCATC		
ptb	CCCCGAGAAGTTGCTGG	Operon Primer	spez.
buk	CCCCGCCTCTTCCAAC		
Eub1 (Forward)	GAGTTTGATCCTGGCTCAG	16s	rRNA
Eub2 (Revers)	AGAAAGGAGGTGATCCAGCC	Primer	

*Die roten Buchstaben verdeutlichen die Basen, die zur Anpassung an das Gen für die Insertionsmutagenese verändert wurden. Die blauen Buchstaben zeigen die verwendeten Restriktionsschnittstellen. E-value ist das Maß für die theoretische Effizienz der Integration.

2.3 Stammlösungen

Die Stammlösung oder auch Stocklösung dient als Grundlage für andere Lösungen zum Beispiel Puffer. Da die Stammlösung höher konzentriert ist als die Arbeitslösung kann jederzeit ein größeres Volumen der Arbeitslösung durch einfaches Verdünnen hergestellt werden, ohne die Arbeitslösung aus ihren Komponenten neu ansetzen zu müssen.

2.4 Nährmedien

Sofern nicht anders dokumentiert, wurden alle hitzestabilen Lösungen und Nährmedien bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Bei hitzelabilen Lösungen erfolgte eine Sterilfiltration mittels Einwegfiltern (Porengröße 0,2 µm; Sarstedt).

2.4.1 Medium für E. coli

LB-Medium (SAMBROOK, et al., 2001)

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

Zur Herstellung von Agarplatten wurden dem Medium 1,5 % (w/v) Agar-Agar zugesetzt.

2.4.2 Medien für C. acetobutylicum

Die Herstellung der anaeroben Medien erfolgte nach BREZNAK & COSTILOW (1994). Nachdem der erforderliche pH-Wert eingestellt wurde, erfolgte das Aufkochen in der Mikrowelle um Luftsauerstoff aus dem Medium zu entfernen, ersichtlich durch einen Farbumschlag des Redoxindikators Resazurin (Endkonzentration im Medium 0,0001 % [w/v]). Anschließend kühlte das Medium unter N₂-Begasung ab. Vor der Verwendung der Medien konnte eventueller Restsauerstoff durch Zugabe von Titan-(III)-Nitritotriessigsäure reduziert werden.

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

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

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

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

Glukose	60	g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,22	g
KH ₂ PO ₄	0,55	g
K ₂ HPO ₄	0,55	g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,011	g
Eisessig	2,3	ml
PABA (8 mg/l) **	5	ml
Biotin (0,08 mg/l) **	4	ml
MES	21,3	g
Resazurin (0,1 %, [w/v])	1	ml
<i>A. dest</i> <i>ad</i>	1000	ml

** Diese Komponenten wurden aus 100x Stammlösung vor dem Autoklavieren zugegeben.

Vor der Zugabe von MES wurde der pH-Wert mit NH₄OH auf 6,6 eingestellt. Das Medium wurde auch zur Herstellung von Sporensuspensionen genutzt. Zeitweise erfolgte die Herstellung ohne das Zufügen von Eisessig, aus diesem Grund wurde erst nach der MES-Zugabe der pH-Wert eingestellt.

RCA (reinforced clostridial agar)

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

Der pH-Wert betrug 6,8. RCA wurde als fertiges Gemisch kommerziell bei der Firma Oxoid erworben.

2.4.3 Medienzusätze

Um gewünschte Selektionen durchführen zu können, wurden den Medien die in Tabelle 2.5 aufgeführten Antibiotika beigemischt. Dies erfolgte nach dem Autoklavieren und der Abkühlung auf unter 50 °C.

Tab. 2.5: Medienzusätze

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

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

** in Ethanol gelöste Substanzen brauchen nicht sterilfiltriert werden

Titan-(III)-NTA-Lösung

Die Nitrilotriessigsäure (NTA) wurde in 30 ml *A. dest.* und 5 M NaOH gelöst und mit Stickstoff durchgast, um vorhandenen Sauerstoff zu entfernen. In der Anaerobenbox erfolgte unter ständigem Schütteln der Müller&Krempel-Serumflasche die gleichzeitige Zugabe von 15 %iger (w/v) TiCl₃- und 2 M Na₂CO₃-Lösung. Anschließend wurde die Titan-(III)-NTA-Lösung mit anaerobem *Aqua dest.* auf 75 ml aufgefüllt und steril filtriert.

Nitrilotriessigsäure	5,73	g
NaOH (5 M) *	20	ml
TiCl ₃ -Lösung (15 % [w/v])	6,4	ml
Na ₂ CO ₃ (2 M) *	10	ml
<i>A. dest.</i> * <i>ad</i>	75	ml

* Diese Komponenten wurden vor ihrer Verwendung mittels N₂-Durchgasung anaerobisiert.

2.5 Stammhaltung

Alle verwendeten *E. coli*-Stämme wurden vorübergehend in LB-Flüssigmedium (2.4.1) bis zu 7 Tagen bzw. auf LB-Agar bis zu 4 Wochen bei 4 °C gelagert. Zur Stammhaltung wurde

1 ml einer exponentiell wachsenden LB-Kultur mit 0,5 ml LB-Glycerin-Lösung (Glycerin 60 % [v/v], LB-Medium 40 % [v/v]) versetzt, anschließend gründlich durchmischt und bei -70 °C gelagert. Die Vitalität und Reinheit der Stammkulturen wurde durch erneutes Ausstreichen auf Antibiotika enthaltenden Selektionsplatten geprüft.

Die Stammhaltung von *C. acetobutylicum* erfolgte bei -20 °C als Sporensuspension im MS-MES Medium (2.4.2). Bei nicht-sporulierenden Stämmen wurden zu 1 ml einer exponentiell wachsenden CGM-Kultur 0,5 ml einer CGM-Glycerin-Lösung (Glycerin 60 % [v/v], LB-Medium 40 % [v/v]) zugegeben. Die in dieser Arbeit erzeugten Insertionsmutanten wurden nach Sporenbildung zur Langzeitaufbewahrung bei -70 °C gelagert. Dazu erfolgte die Herstellung von Stammkulturen im MS-MES Medium bzw. CGM-Glycerin mit oder falls nötig ohne Zusatz von Erythromycin.

2.6 Anaerobe Anzucht von *C. acetobutylicum*

2.6.1 Anzucht von *C. acetobutylicum* auf Festmedium

C. acetobutylicum konnte auf Agarplatten (2.4.2) ausplattiert werden. Diese wurden zuvor aerob gegossen und drei Tage vor Gebrauch in eine Anaeroben-Werkbank (MACS-MG-500/MG-1000-anaerobic workstation) eingeschleust, in der nachdem Beimpfen auch ihre Inkubation bei 37 °C unter N₂-Atmosphäre erfolgte. Zur Reduktion von eingetragendem Sauerstoff wurde automatisiert bis zu 5 % Wasserstoff beigemischt. Die Kontrolle der Sauerstoffkonzentration erfolgte regelmäßig mit Indikatorpapier (Anaerobic Indicator BR55).

2.6.2 Batch-Kulturen

Die Anzucht von *C. acetobutylicum* in Flüssigmedium erfolgte anaerob in Hungate-Röhrchen oder in Müller&Krempel-Serumflaschen unter N₂-Atmosphären. Batch-Kulturen (10 ml) wurden mit 0,1 Volumen *C. acetobutylicum*-Sporensuspension (2.5) inokuliert und durch Pasteurisierung (10 min, 80 °C) die Sporenkeimung aktiviert oder mit Zellmaterial von Agarplatten (in der Regel 1 – 2 Kolonien) angeimpft. Anschließend erfolgte die Inkubation bei 37 °C. Diese 10-ml-Kulturen dienten überwiegend als Vorkulturen für Hauptkulturen (50 ml bis 500 ml) in 500-ml-Müller&Krempel-Serumflaschen, die aufgrund des Druckanstiegs durch Gasentwicklung nur zu maximal 60 % des Fassungsvermögens

befüllt wurden. Die Anzucht der Vorkultur erfolgte im Komplexmedium (CGM, 2.4.2). Sollte MS-MES für die Hauptkultur verwendet werden, musste von der CGM-Vorkultur zuvor in eine MS-MES-Vorkultur überimpft und diese daraufhin zum Animpfen der MS-MES-Hauptkultur verwendet werden. Dieser zusätzliche Schritt vermeidet den CGM-Medium-Eintrag. Die Hauptkultur wurde in der Regel mit einer optischen Dichte von 0,1 inokuliert. Die Untersuchung des Wachstums erfolgte durch eine regelmäßige Prüfung der optischen Dichte (wobei ab einen Wert größer als 0,3 verdünnt wurde), des pH-Wertes, der Glukosekonzentration und der gebildeten Produkte.

Neben den üblichen statischen Kulturen erfolgte ebenso die Durchführung von sogenannten Fed-Batch-Versuchen, in denen Glukose mindestens einmal erneut zugegeben wurde, wenn die Bakterien die Ausgangsglukose fast verbraucht hatten. Die Kultivierung erfolgte in 200 ml MS-MES bei 37°C, mit einer Ausgangskonzentration von 30 g/l (166 mM) Glukose. In regelmäßigen Abständen wurde die optischen Dichte und der pH-Wert bestimmt. Die Bestimmung der Glukosekonzentration erfolgte enzymatisch (bei einer Konzentration von 10 g/l (ca. 50 mM) wurde erneut Glukose aus einer 50 %igen Stammlösung (w/v) zugegeben. Damit ließ sich der Einfluss von verschiedenen Produkten auf den Wildtyp im Vergleich zu den erzeugten Mutanten untersuchen. Neben der Glukose Fed-Batch Kultivierung wurden auch Butyrat zugegeben. Bei der Butyrat-Fed-Batch-Kultur erfolgte die Zugabe verschiedene Butyratkonzentrationen (10 – 40 mM) bei einer optischen Dichte von etwa 3, zu dem Zeitpunkt weist *C. acetobutylicum* generell die höchste Butyratproduktion auf.

2.6.3 pH-kontrollierte Batch-Fermentation

Während des Wachstums in Müller&Krempel-Serumflaschen ist es nicht möglich den pH-Wert ständig zu kontrollieren, aus diesem Grund erfolgte die Anzucht im BIOSTAT® B PLUS TWIN FERMENTOR mit einem Arbeitsvolumen von 1,5 l. Die Steuereinheit gewährleistete eine konstante Temperatur von 37 °C und der pH-Wert wurde durch das integrierte Pumpsystem durch die Zufuhr von 2 M KOH reguliert. Vor dem Animpfen wurde das Kulturgefäß mit 1,2 l MS-MES Medium gefüllt, die pH-Elektrode geeicht und alle Ein- und Ausgänge verschlossen, anschließend autoklaviert und während des Abkühlens mit Stickstoff durchgast. Die Inokulation mit 200 ml einer logarithmisch wachsenden Vorkultur erfolgte steril über einen ebenso autoklavierten Beimpfungsschlauch. Falls nötig wurde maximal 1 ml Titan-(III)-NTA-Lösung zugegeben

und der pH-Wert auf den festgelegten Ausgangspunkt eingestellt. Nachdem die Kultur eine optische Dichte von 1 erreicht hatte wurde die N₂-Durchgasung beendet und die Rührung auf 200 UpM eingestellt.

2.7 Bestimmung physiologischer Parameter

2.7.1 Optische Dichte

Die optische Dichte dient als Wachstumsparameter für Flüssigkulturen und wurde zur Beurteilung des Zellwachstums bei einer Wellenlänge von 600 nm im Spektralphotometer (Spekol 1100) gegen einen Medienleerwert in einer Plastikkuvette mit 1 cm Schichtdicke gemessen. Bei Extinktionen über 0,3 wurde Zellsuspension vor der Messung mit Wasser verdünnt.

2.7.2 Berechnung des Wachstums

Zur Bestimmung des Wachstums einer Bakterienkultur wird die Wachstumsrate (μ) erfasst, die die massenabhängige Verdopplung pro Stunde anzeigt:

$$\mu = \frac{\log x_2 - \log x_1}{\log e \cdot (t_2 - t_1)} \quad (1)$$

Formel 1: Wachstumsbestimmung: $x_{1/2}$: Messwert zu den Zeitpunkten 1 u. 2; $t_{1/2}$: Messwert zu den Zeitpunkten 1 und 2; $\log e$: 0,43429

2.7.3 Bestimmung des pH-Werts

Der pH-Wert von zellfreiem Überstand wurde nach der Sedimentation der Zellen (13.000 x g, 4 °C, 5 min) mittels pH Meter bestimmt.

2.7.4 Lichtmikroskopie

Zur Bestimmung der Zellmorphologie von *C. acetobutylicum* wurde ein Hellfeldmikroskop (Olympus CHS-Mikroskop) bei einer 400fachen Vergrößerung (Objektiv: A40LP) verwendet.

2.7.5 Optisch-enzymatische Glukosebestimmung (BERGMEYER, 1970, mod.)

Zur Messung des Glukoseverbrauchs von *C. acetobutylicum* diente ein optisch-enzymatischer Test. Die D-Glukose wird dabei durch die Hexokinase [EC 2.7.1.1] unter

ATP-Verbrauch zu Glukose-6-phosphat und ADP umgewandelt. Daraufhin erfolgt die Umsetzung von Glukose-6-Phosphat unter NADP⁺-Verbrauch mit Hilfe der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Glu-6-P-DH) [EC 1.1.1.49] zu 6-Phospho-D-glukonat und NADPH. Die entstandene Menge an NADPH ist zu der freigesetzten Glukosemenge proportional und kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm (Ultrospec 3000) gemessen und durch die Bestimmung der Extinktionsänderung erfasst werden. Die Berechnung der Glukosemenge erfolgte dabei nach folgender Formel:

$$c_{Glukose} = \frac{\Delta E \cdot V \cdot MW_{Glukose}}{\epsilon \cdot d \cdot v} \cdot VF \quad \left[\frac{mg}{l} \right] \quad (2)$$

Formel 2: Glukosebestimmung: c: Konzentration; V: Volumen des Ansatzes; V: Volumen der Probe; ΔE: Extinktionsänderung; ε₃₄₀: Extinktionskoeffizient (6,3 l x mmol⁻¹ x cm⁻¹), d: Schichtdicke der Küvette (1 cm); MW: Molekulargewicht (198,17 g/mol).

Die Glukosebestimmung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. Zentrifugation der Zellsuspension in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß (13.000 x g, 10 min, 4 °C)
2. Zugabe folgender Komponenten in eine Halb-Mikro-Küvette mit 1 cm Schichtdicke:

0,2 M Tris-HCl-Puffer + 0,002 M MgSO ₄ (pH 7,6)	960	μl
NADP (44 mg/ml)	10	μl
ATP (96 mg/ml)	10	μl
Probe (zellfreier Überstand - ggf. verdünnt)	10	μl
3. Mischen des Ansatzes und Leerwertbestimmung in einem Photometer (Ultrospec®3000) bei 340 nm
4. Zugabe von 10 μl des Enzymgemisches HK/Glu-6-P-DH (3 mg/ml)
5. Mischen des Ansatzes und Inkubation für 10 min bei RT

2.7.6 Xylose-Bestimmung

Um die Xyloseabnahme in einem Wachstumsversuch detektieren zu können, wurde die Konzentration durch ein D-Xylose Kit von Megazyme wie folgt gemessen:

1. Zentrifugation der Zellsuspension (10.000 x g, 10 min, 4 °C)

- Zugabe folgender Komponenten in eine Plastikkuvette mit 1 cm Schichtdicke:

<i>A. dest</i>	1000	μl
Probe (zellfreier Überstand - ggf. verdünnt)	50	μl
TEA/MgCl ₂ Puffermix	200	μl
NAD ⁺ /ATP	200	μl
Hexokinase	10	μl

- Mischen der jeweiligen Ansätze und Leerwertbestimmung (Wasser anstelle der Probe) in einem Photometer (Ultrospec 3000) bei 340 nm
- Zugabe von 10 μl β-Xylose Dehydrogenase/ Xylose Mutarotase
- Mischen des Ansatzes und Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur und Bestimmung der Extinktionsänderung bei 340 nm

Bei dieser Reaktion wird α-D-Xylose mittels Xylose Mutarotase zu β-D-Xylose umgewandelt. Anschließend oxidiert die β-Xylose Dehydrogenase β-D-Xylose mittels NAD⁺ zu D-Xylonat und NADH + H⁺, dessen Veränderung bei einer Absorption von 340 nm gemessen wird. Die Berechnung erfolgte wie bei der Glukosebestimmung (2.7.5), jedoch musste das Molekulargewicht durch das von Xylose (150,1 g/mol) ersetzt werden.

2.7.7 Laktat-Bestimmung

Das während des Wachstums gebildete Laktat wurde mit Hilfe des Kits „D-Lactic Acid (D-Lactate) and L-Lactic Acid (L-Lactate)“ (Megazyme), erfasst. Zwei Enzymreaktionen sind dabei notwendig um D- und L-Laktat separat zu quantifizieren. In der ersten Reaktion wird das vorhandene D-Laktat bzw. L-Laktat durch eine D-Laktatdehydrogenase [EC 1.1.1.27] bzw. L-Laktatdehydrogenase [EC 1.1.1.27] in Anwesenheit von NAD⁺ zu Pyruvat oxidiert. In der zweiten Reaktion wird das entstandene Pyruvat durch das Enzym D-Glutamat-Pyruvat-Transaminase [EC 2.6.1.2] zu D-Alanin und 2-Oxoglutarat umgewandelt, womit einer Rückreaktion zum Laktat entgegen gewirkt wird. Die gebildete Menge an NADH ist direkt proportional zur Laktatmenge und kann photometrisch durch Bestimmung der Extinktionsänderung bei einer Wellenlänge von 340 nm nachgewiesen werden. Für die Berechnung wurde die Formel 2 (2.7.5) herangezogen und das Molekulargewicht durch das von Laktat (90,1 g/mol) ersetzt. Die Laktatbestimmung erfolgte nach folgendem Protokoll:

1. Zentrifugation der Zellsuspension (10.000 x g, 10 min, 4 °C)
2. Zugabe folgender Komponenten in eine Plastikkuvette mit 1 cm Schichtdicke:

<i>A. dest</i>	750	µl
Probe (zellfreier Überstand - ggf. verdünnt)	50	µl
Glycylglycin Puffer	250	µl
NAD ⁺	50	µl
D-GTP	10	µl
3. Mischen der jeweiligen Ansätze und Leerwertbestimmung (Wasser anstelle der Probe) in einem Photometer (Ultrospec 3000) bei 340 nm
4. Zugabe von 10 µl D-Laktatdehydrogenase bzw. L-Laktatdehydrogenase
5. Mischen des Ansatzes und Inkubation für 10 min bei RT und Bestimmung der Extinktionsänderung bei 340 nm

2.7.8 Gaschromatographie

Die Analyse und Quantifizierung flüssiger Gärungsendprodukte erfolgte mit einem Gaschromatographen (Agilent 7890A). unter Verwendung eines Flammenionisationsdetektors (FID). Als Trägergas diente N₂, welches über einen Feuchtigkeitsfilter und anschließend über einen Sauerstofffilter nachgereinigt wurde. Neben Wasser und Sauerstoff konnten dadurch auch schweflige und chlorierte Substanzreste zurückgehalten werden. Die eingesetzten FID-Brenngase, synthetische Luft und Wasserstoff, wurden zur Entfernung organischer Substanzen über einen Aktivkohlefilter geführt. Der Einsatz einer mit Chromosorb 101 (80-100 mesh) gepackten Säule erlaubte die Analyse sowohl von Alkoholen als auch von Karbonsäuren. Der Überstand der zu analysierenden Zellsuspensionen wurden nach der Zentrifugation (13.000 x g, 10 min) in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und anschließend zur Bestimmung der Produktspektren genutzt. Dazu wurden 100 µl des Überstandes, 900 µl destilliertes Wasser und 100 µl interner Standard in ein Rollrandgefäß pipettiert. Der interne Standard diente der Quantifizierung und setzte sich aus 55 mM Isobutanol in 2 M HCl und 1,5 M Acetoin zusammen. Nachdem das Gefäß mit einer Bördelkappe gasdicht verschlossen wurde, konnten 0,5 µl dieser Probe über einen automatisierten Probengeber zur Analyse in das System injiziert werden. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe einer Eichlösung, die jeweils 5 mM der zu analysierenden Produkte einschließlich des internen Standards enthielt, daraus wurde ein Eichchromatogramm erstellt. Die

gesamte GC- und Probengebersteuerung, sowie die Auswertung der Signale, erfolgte mit dem Programm E2Chrom Elite. Unter folgenden Analysebedingungen konnten die Substanzen Aceton, Butanol, Isobutanol, Butyrat, Acetat und Ethanol detektiert werden:

Chromatographiesäule	:	2 m x 2 mm Chromosorb 101 (80-100 mesh)
Säulentemperatur	:	155-197 °C, 9 °C/min
Trägergas	:	N ₂ (30 ml/min)
Injektor	:	195 °C
Detektor	:	FID, 230 °C
Probevolumen	:	0,5 µl

2.7.9 Bestimmung der gebildeten Gesamtgasmenge (HÖNICKE, 2009)

Um die gebildete Gasmenge in 100-ml-Batch-Kulturen erfassen zu können, wurden mit wassergefüllte Glaszylinder (1000 ml Fassungsvermögen) über Schläuche mit den Müller&Krempel-Serumflaschen verbunden. Das während des Wachstumsverlaufes produzierte Gas strömte über den Schlauch in den Gaszylinder und verdrängte das entsprechende Wasservolumen, welches in Erlenmeyerkolben aufgefangen und zu bestimmten Zeitpunkten mit Hilfe eines Messzylinders bestimmt wurde. Gleichzeitig erfolgte die Gasentnahme mit einer gasdichten Spritze (SGE). Die Analyse und Quantifizierung gasförmiger Gärungsendprodukte erfolgte mit einem Gaschromatographen (Agilent Technologies, 7820A GC-System, SIM GmbH) unter Verwendung eines Wärmeleitfähigkeitsdetektors (WLD). Um die prozentualen Anteile an Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff zu bestimmen, musste eine Eichgerade am Gaschromatographen erstellt werden. Hierfür wurden Eichgase (Westfalen AG) mit 10 % CO₂ (90 % H₂), 50 % CO₂ (50 % H₂) und 80 % CO₂ (20 % H₂) eingesetzt. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der gasförmigen Produkte durch manuelles Einspritzen von 100 µl Probe, die aus dem Gasraum über der Kultur genommen wurden. Mit Hilfe der Eichgeraden konnten die Flächen der jeweiligen gemessenen Produkte aus den Proben mit den prozentualen Anteilen der Eichgase in Bezug gesetzt werden. Die gesamte Auswertung der Signale erfolgte mit dem Programm EZ Chrom Elite (Agilent). Unter folgenden Analysebedingungen konnten die Substanzen Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff detektiert werden:

Chromatographiesäule	:	50 M x 0,53 mm CP-Carbobond Silizium Säule
Säulentemperatur	:	155-197 °C, 9 °C/min
Trägergas	:	N ₂ (30 ml/min)
Injektor	:	195 °C
Detektor	:	WLD
Probenvolumen	:	100 µl

2.8 Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.8.1 Vorbehandlung von Geräten und Lösungen

Alle hitzestabilen Lösungen und Geräte wurden 20 min bei 121 °C autoklaviert, wohingegen bei hitzelabilen Lösungen die Sterilität durch Filtration (Einwegfilter, Porengröße 0,2 µm; Sarstedt) gewährleistet wurde. Nicht autoklavierbare Geräte wurden mit 96 %igen [v/v] Ethanol behandelt oder abgeflammt. Die Desinfektion von Arbeitsflächen und hitzelabilen Gebrauchsgegenständen erfolgte mit Ethanol (70 % [v/v]). Alle für den Umgang mit RNA benötigten Lösungen und Materialien wurden zweimal autoklaviert. Die Geräte sowie der Arbeitsplatz wurden mit RNase-ExitusPlus™ (AppliChem) gesäubert. Das Tragen von ebenso behandelten Einweghandschuhen minimierte zusätzlich mögliche Kontaminationen mit RNasen.

2.8.2 PCR-Techniken

Die Polymerase-Ketten-Reaktion wurde gezielt eingesetzt, um Fragmente für Klonierungen und zur Herstellung von Sonden zu gewinnen. Die Amplifikation fand in Thermocyclern mit Deckelbeheizung (PCR-Cycler, Biometra) statt.

2.8.2.1 Zielgerichtete Mutagenese mittels SOE PCR

Bei dem Clostron Gene Knockout System (HEAP *et al.*, 2007) diente ein Gruppe II Intron zur Inaktivierung spezifischer Gene (2.13). Als Ausgangspunkt diente die Sequenz des zu mutierenden Gens. Das verwendete Programm (www.sigma-genosys.com/targetron/ bzw. www.clostron.com/clostron2.php) errechnete mögliche Insertionsorte für das Gruppe II Intron. Bei der Entscheidung musste zum einen darauf geachtet, dass ein möglichst geringer E-Value-Wert gegeben war (< 0,5) und zum anderen die Insertion möglichst weit im 5'-Bereich des Gens erfolgte. Anhand dieser Parameter wurden Oligonukleotide abgeleitet, welche spezifisch für das Gruppe II Intron und das Zielgen waren. Mit Hilfe der SOE (splicing by overlap extension) PCR (HO *et al.*, 1989) und den an

das Gen angepassten Oligonukleotiden ließ sich das Intron genspezifisch verändern. Dazu mussten in einer PCR-Reaktion vier verschiedene Primer unterschiedlicher Konzentration eingesetzt werden. Die Primer IBS und EBS1d waren bei dieser PCR 5fach höher konzentriert, als der EBS2 und der nicht modifizierte EBS Universal Primer. Dies ist damit zu begründen, dass EBS2 und EBS Universal die unvollständigen 100 Bp und 200 Bp Fragmente herstellten, welche daraufhin als Template für die äußeren Oligonukleotide (IBS und EBS1d) dienen. Dadurch konnte vermehrt das genspezifische 350-Bp-Fragment hergestellt werden

Herstellung des „Vier-Primer-Mix“:

IBS Primer (100 µM)	2	µl
EBS1d Primer (100 µM)	2	µl
EBS2 Primer (20 µM)	2	µl
EBS Universal (20 µM)	2	µl
<i>A. dest.</i> <i>ad</i>	20	µl

Anschließend wurde dieser Vier-Primer-Mix für die SOE-PCR-Reaktion verwendet.

Intron-PCR-Template (1:10 verdünnt)	1	µl
10x <i>Pwo</i> -Puffer (complete)	5	µl
MgSO ₄ (25 mM)	2	µl
Primer-Mix	2	µl
dNTPs (je 10 mM)	1	µl
<i>Pwo</i> -Polymerase	1	µl
<i>A. dest.</i> <i>ad</i>	50	µl

Die Amplifikation erfolgte nach folgendem Schema:

Denaturierung	94 °C	30	s	1 x
Denaturierung	94 °C	15	s	30 Zyklen
Anlagerung	55 °C	30	s	
Elongation	72 °C	30	s	
Elongation	72 °C	2	min	1 x

Anschließend wurden alle Ansätze bei 4 °C gelagert und die Reaktionsprodukte mittels Gelelektrophorese (2.8.5) aufgetrennt und anschließend über Gel-Extraktion (2.8.4.5) aufgereinigt.

2.8.2.2 Primerdesign

Primer werden zur Amplifikation spezifischer Zielgene eingesetzt. Dies diente zum Nachweis oder für die Klonierung in Plasmide. In diesem Fall wurde die jeweilige Gensequenzen so abgeleitet, dass sich am 5`- und 3`-Ende des Amplifikats Restriktionsstellen befanden. Die Berechnung der Schmelztemperatur erfolgte nach der Formel von CHESTER & MARSHAK (1993) oder mit Hilfe des Oligo Analyzers (www.idtdna.com), der gleichzeitig zur Überprüfung auf Self- und Hetero-Dimere diente. Ebenso wurde darauf geachtet, dass Primer und Gegenprimer nahezu die gleiche Schmelztemperatur besaßen.

2.8.2.3 Standard-PCR

Template		10	ng
dNTPs (je 10 mM)		2	µl
10x <i>Pwo</i> -Puffer (complete)		5	µl
MgSO ₄ (25 mM)		4	µl
Fw-Primer (10 µM)		10	µl
Rev-Primer (10 µM)		10	µl
<i>Pwo</i> -Polymerase		1,5	µl
<i>A. dest.</i>	<i>ad</i>	100	µl

Die PCR-Reaktion erfolgte nach folgendem Schema:

Denaturierung	94 °C	30	s	1 x
Denaturierung	94 °C	30	s	30 Zyklen
Anlagerung	T _m (Primer) °C	60	s	
Elongation	72 °C	1 min/kBp	Fragment	
Elongation	72 °C	5	min	1 x

Da es bei der Amplifikation von Fragmenten mit Restriktionsschnittstellen zu Problemen kommen könnte, erfolgte zu Beginn der PCR eine Anlagerung mit niedrigeren Schmelzpunkt für 10 bis 15 Zyklen und anschließend 15 bis 30 Zyklen mit der berechneten Temperatur, ähnlich der Eub-PCR (2.8.2.5). Anschließend wurden die Ansätze bei 4 °C gelagert und mittels Gelelektrophorese analysiert (2.8.5).

2.8.2.4 High Fidelity PCR

Der High Fidelity PCR Enzyme Mix (Fermentas) wurde verwendet um große bzw. problematische Fragmente zu erhalten.

Denaturierung	94 °C	180 s		1 x
Denaturierung	94 °C	30 s	←	10 Zyklen
Anlagerung	T _m (Primer) °C	30 s		
Elongation	68 °C	1 min/kb		
Denaturierung	94 °C	30 s	←	15 – 25 Zyklen
Anlagerung	T _m (Primer) °C	30 s		
Elongation	68 °C	1 min/kb + 10 s/Zyklus		
Elongation	68 °C	10 min		1 x

2.8.2.5 Eub-PCR

Zur Herstellung der 16s-RNA-Sonde wurde die Eub-PCR verwendet. Der PCR-Ansatz entspricht der Standard-PCR (2.8.2.3), jedoch unterschied sich das PCR-Programm.

Denaturierung	94 °C	5 min		1 x
Denaturierung	94 °C	20 s	←	9 Zyklen
Anlagerung	48 °C	30 s		
Elongation	72 °C	2 min		
Denaturierung	94 °C	20 s	←	19 Zyklen
Anlagerung	55 °C	20 s		
Elongation	72 °C	1 min		
Elongation	72 °C	10 min		1 x

2.8.3 Enzymatische Modifikationen von DNA

2.8.3.1 Restriktion von DNA

Tab. 2.6: Restriktionsendonukleasen

Restriktionsenzyme	Erkennungssequenz	Puffersystem (Fermentas)
<i>A/w44I</i> (<i>Apa</i> LI)	5'...G [^] T G C A C...3' 3'...C A C G T [^] G...5'	1x Tango™
<i>Bam</i> HI	5'...G [^] A G A T C C...3' 3'...C C T A G [^] G...5'	1x <i>Bam</i> HI-Puffer; 1x Tango™
<i>Bsp</i> 119I (<i>Bst</i> BI)	5'...T T [^] A C G A A...3' 3'...A A G C [^] T T...5'	1x Tango™
<i>Bsp</i> 143I (<i>Sau</i> A3I)	5'... [^] A G A T C ...3' 3'... C T A G [^] ...5'	1x <i>Bsp</i> 143I-Puffer; 1x Tango™
<i>Bsp</i> 1407I (<i>Bsr</i> GI)	5'...T [^] A G T A C A...3' 3'...A C A T G [^] T...5'	1x Tango™
<i>Ca</i> II (<i>Alw</i> NI)	5'...C A G N N N [^] A C T G...3' 3'...G T C [^] A N N N G A C...5'	1x Tango™
<i>Cfr</i> 9I (<i>Xma</i> I)	5'...C [^] A C C G G G...3' 3'...G G G C C [^] A...5'	1x <i>Cfr</i> 9I-Puffer; 1x Tango™

<i>Clal</i> (<i>Bsu</i> 151)	5'...A T [^] C G A T...3' 3'...T A G C [^] T A...5'	1x Tango™
<i>EcoRV</i> (<i>Eco</i> 321)	5'...G A T [^] A T C...3' 3'...C T A [^] T A G...5'	1x Puffer R; 1x Tango™
<i>FaqI</i> (<i>Bsm</i> 1)	5'...G G G A C (N)10 [^] ...3' 3'...C C C T G (N)14 [^] ...5'	1x Tango™ + SAM
<i>GsuI</i> (<i>Bpm</i> 1)	5'...C T G G A G (N)16 [^] ...3' 3'...G A C C T C (N)14 [^] ...5'	1x Puffer B; 1x Tango™
<i>HaeIII</i>	5'...R G C G C [^] Y...3' 3'...Y [^] C G C G R...5'	1x NEBuffer 4, 100 µg/ml BSA (NEB)
<i>HindIII</i>	5'...A [^] A G C T T...3' 3'...T T C G A [^] A...5'	1x Puffer R; 1x Tango™
<i>KasI</i> (<i>Ssp</i> DI)	5'...G [^] A G C G C C...3' 3'...C C G C G [^] A...5'	1x Tango™
<i>Fnu4HI</i> (<i>Sat</i> 1)	5'...G C [^] N G C...3' 3'...C G N [^] C G...5'	1x Puffer G; 1x Tango™
<i>PaeI</i> (<i>Sph</i> 1)	5'...G C A T G [^] C...3' 3'...C [^] A G T A C G...5'	1x Puffer B; 1x Tango™
<i>PciI</i> (<i>Psc</i> 1)	5'...A [^] C A T G T...3' 3'...T G T A C [^] A...5'	1x Tango™
<i>PpuMI</i> (<i>Psp</i> 5II)	5'...R G [^] A W C C Y...3' 3'...Y C C W G [^] A R...5'	1x Puffer G; 2x Tango™
<i>PstI</i>	5'-CTGCA [^] G-3' 3'-G [^] ACGTC-5'	1x Puffer O; 1x Tango™
<i>PsuI</i> (<i>Bst</i> YI)	5'...R [^] A G A T C Y...3' 3'...Y C T A G [^] R...5'	1x Puffer B; 1x Tango™
<i>SacI</i>	5'-GAGCT [^] C-3' 3'-C [^] ATCGAG-5'	1x <i>SacI</i> -Puffer; 1x Tango™
<i>SpeI</i> (<i>Bcu</i> 1)	5'...A [^] C T A G T...3' 3'...T G A T C [^] A...5'	1x Tango™
<i>XbaI</i>	5'...T [^] A C T A G A...3' 3'...A G A T C [^] T...5'	1x Tango™

[^] Restriktionsposition

Durch die Eigenschaft der Restriktionsenzyme sequenzspezifisch zu schneiden, wurden lineare DNA-Fragmente mit definierten Enden erzeugt. Die entstandenen DNA-Fragmente konnten anschließend sowohl im Agarosegel (2.8.5) kontrolliert als auch für eine Ligation (2.8.3.3) verwendet werden. Die Restriktion wurde mit dem empfohlenen Puffer des Herstellers und mindestens einem Volumen von 10 µl für die Restriktion von 1 µg DNA durchgeführt. Die sequenzspezifische Hydrolyse von Plasmiden und PCR-Fragmenten wurde in der Regel für 2-14 h, im Falle von chromosomaler DNA für bis zu 24 h bei 37 °C durchgeführt. Bei Kontrollrestriktionen [10 µl] wurde die Reaktion durch Zugabe von 6x Loading Dye beendet und für die Auftrennung im Agarosegel präpariert. Andernfalls wurde die Reaktion durch Hitzeinaktivierung (nach Herstellerangaben in der Regel für 20 min, 80 °C) gestoppt. Die verwendeten Restriktionsenzyme, deren Erkennungssequenzen und Puffer sind der Tabelle 2.6 zu entnehmen.

2.8.3.2 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Linearisierte Vektoren neigen zur Selbstligation, um das zu verhindern schloss sich eine Dephosphorylierung an die Restriktion an (SAMBROOK *et al.*, 2001). Zum inaktivierten Restriktionsansatz wurden 1 U/ μ l „Shrimp Alkaline Phosphatase“ (SAP, Fermentas) und 1x SAP-Puffer (10x konzentriert) gegeben und für 20 min bei 37 °C inkubiert, mit anschließender Hitzeinaktivierung bei 80 °C für 10 min. Um Restaktivitäten des Enzyms zu unterbinden, wurden die Ansätze im Anschluss einer Natriumacetatfällung (2.8.4.3) unterzogen.

2.8.3.3 Ligation

Die Ligationen wurden entsprechend den Angaben des Herstellers (Fermentas) unter Verwendung der T4-Ligase durchgeführt. Um die Ligationseffizienz zu erhöhen diente ein molares Verhältnis von Vektor zu Insert von 1:3. Das Standardvolumen der Ligation (5 U/ μ l) betrug 20 μ l. Die T4-DNA-Ligase wurde mit einer Konzentration von 0,1 U/ μ l im entsprechenden Reaktionspuffer eingesetzt. Die Ligationen erfolgten für 60 min bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16 °C. Anschließend konnten sie direkt für die Transformation von CaCl₂ kompetenten *E. coli*-Zellen eingesetzt werden.

2.8.4 Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren

2.8.4.1 Phenol-Chloroform-Extraktion (SAMBROOK *et al.*, 2001)

Die Aufreinigung und Deproteinierung der DNA erfolgte mittels Phenol Chloroform Extraktion. Eine Emulsion entstand nach der Zugabe von 1 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1 [v/v/v]) zu der DNA-Lösung und anschließendem Invertieren. Eine Phasentrennung wurde durch Zentrifugation (Biofuge Fresco; Heraeus) für 3 min bei 6.000 x g und RT bewirkt. Die entstandene wässrige Phase konnte dann in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt werden. Um noch vorhandene Phenolreste zu entfernen, erfolgte die Zugabe von 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 [v/v]). Um nach der Zentrifugation die DNA aus der wässrigen Phase zu erhalten, erfolgte eine Natriumacetatfällung (2.8.4.3).

2.8.4.2 Isopropanolfällung (SAMBROOK *et al.*, 2001)

Diese Methode wurde nur zur Fällung von Plasmid-DNA während der Plasmidisolierung aus *E. coli* verwendet. Sie ist näher unter 2.9.1 beschrieben.

2.8.4.3 Natriumacetatfällung (SAMBROOK et al., 2001)

Diese Methode wurde vorrangig bei der Fällung von Plasmid-DNA, Restriktionsansätzen und chromosomaler DNA angewendet. Hierzu wurde das Volumen der Nukleinsäurelösungen in der Regel auf 300 µl erhöht und mit 0,1 Vol. Natriumacetat (3 M, pH 5,2) und 2,5 Vol. Ethanol (96 % [v/v], reinst, eiskalt) versetzt, gründlich gemischt und bei -20 °C für 1 h (alternativ 4 °C ü. N. bzw. -70 °C für 30 min) inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 13.000 x g und 4 °C für 20 min. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet mit Ethanol (70 % [v/v], reinst, eiskalt) gewaschen, anschließend getrocknet und in entsprechender Menge TE Puffer bzw. *A. dest* aufgenommen.

2.8.4.4 Ammoniumacetatfällung (SAMBROOK et al., 2001)

Diese Methode wurde zur Fällung von PCR-Fragmenten verwendet. Ihr Vorteil besteht in der geringen Kopräzipitation von Salzen und Oligonukleotiden. Die wässrige DNA-Lösung wurde mit 1 Vol. Ammoniumacetat (7,5 M; pH 7,5) und 3 Vol. Ethanol (96 % [v/v], reinst, eiskalt) versetzt, gründlich gemischt und für 30 min bei -70 °C inkubiert. Die weitere Behandlung erfolgte wie unter 2.8.3.3 beschrieben.

2.8.4.5 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurde der peqGOLD Gel Extraction Kit verwendet. Die gewünschte DNA-Bande wurde nach der Färbung im Ethidiumbromidbad unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten, gewogen und den Angaben des Herstellers entsprechend mit den im Kit zur Verfügung gestellten Puffern aus der Agarose extrahiert. Abschließend erfolgte eine Kontrolle mittels Gelelektrophorese (2.8.5.).

2.8.5 Agarosegelelektrophorese (SAMBROOK et al., 2001)

Zur analytischen und präparativen Auftrennung, sowie zur qualitativen und quantitativen Einschätzung diente die horizontale Agarosegelelektrophorese in Agargel-Mini-Kammern. In Abhängigkeit von der Größe der DNA-Fragmente variierte die Agarosekonzentration in 1x TAE-Puffer zwischen 0,8 und 2 % (w/v). Die RNA-Agarosegelelektrophorese erfolgte mit gesondert gereinigten Elektrophoreseutensilien (2.9.3), sowie mit autoklavierter Agarose und Laufpuffer. Um die Lauffront zu markieren und ein möglichst komplettes Einsinken der Proben zu gewährleisten, wurden diese mit 0,2 Vol. 6x Loading Dye versetzt. Als Längenstandard diente GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder oder der MassRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas), welcher gleichzeitig zur Konzentrationsbestimmung

herangezogen wurde. Das Auftrennen der Nukleinsäurefragmente erfolgte in der Regel bei einer konstanten Spannung von 70 - 90 V (Power Pack P 25; Biometra) unter Verwendung von 1x TAE als Laufpuffer. Nach 15- bis 30-minütiger Inkubation des Gels in einem Ethidiumbromidbad (1 µg/ml *A. dest.*) konnten die Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 254 nm mit Hilfe einer Photodokumentationsanlage sichtbar gemacht und dokumentiert werden.

50x TAE

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

Das Einstellen des pH-Wertes auf 7,5 erfolgte mit 0,1 M HCl.

2.9 Isolierung von Nukleinsäuren

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

Die Präparation der Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte nach den Prinzipien von BIRNBOIM und DOLY (1979). Zur Plasmid-DNA Gewinnung dienten in der Regel 5 ml einer Übernachtskultur, die wie folgt behandelt wurden:

1. Sedimentation der Zellen durch Zentrifugation (5.000 x g, 10 min, 4 °C)
2. Suspendieren des Zellpellets in 300 µl Puffer P1
3. Zugabe von 300 µl Puffer P2, vorsichtiges Schwenken und Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min
4. Zugabe von 300 µl Puffer P3, vorsichtiges Schwenken, erneute Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min
5. Zentrifugation: 20 min, 16.000 x g, 4 °C
6. Überführung des Überstands in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß
7. Zentrifugation: 10 min, 16.000 x g, 4 °C
8. Überführung des Überstands in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß unter Zugabe von 0,75 Vol. Isopropanol mit anschließender Durchmischung
9. Zentrifugation: 20 min, 16.000 x g, 4 °C
10. Waschen des Pellets mit 500 µl Ethanol (70 % [v/v], reinst, eiskalt)
11. Zentrifugation: 5 min, 16.000 x g, 4 °C
12. Trocknung des Pellets und abschließende Aufnahme in 10 µl *A. dest.*

Anschließend wurde die Qualität der isolierten Plasmid-DNA im 0,8 %igen Agarosegel (2.8.5) überprüft.

P1-Puffer

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

Nach dem Autoklavieren wurde RNaseA zugegeben, anschließend erfolgte die Lagerung des Puffers bei 4 °C.

P2-Puffer

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 und bei Raumtemperatur gelagert.

P3-Puffer

Kaliumacetat	58,88 g
A. dest. ad	100 ml

Der pH-Wert wurde mit Eisessig auf 5,5 eingestellt und danach autoklaviert.

2.9.2 Isolierung von chromosomaler DNA aus *C. acetobutylicum*

Zur Isolierung von chromosomaler DNA aus *C. acetobutylicum* wurden 200 ml CGM-Medium (2.4.2) mit 10 % (v/v) Zellsuspension einer entsprechenden Vorkultur inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von 1 bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (5 min, 6.000 x g, 4 °C; Sorvall RC5C; Rotor SLA-3000) sedimentiert. Das Zellpellet wurde mit 10 ml Waschpuffer gewaschen, in 2-ml-Reaktionsgefäße aufgeteilt und diese bei -20 °C eingefroren. Die chromosomale DNA wurde nach BERTRAM (1989), wie folgt isoliert:

1. Resuspension der gefrorenen Zellpellets in 1 ml Waschpuffer
2. Zentrifugation 5 min, 6.000 x g, 4 °C
3. Wiederholung der Schritte 1 - 2
4. Suspendieren des Zellpellets in 1 ml Lysispuffer
5. Zugaben von 100 µl Lysozymlösung (200 mg/ml) und 5 µl RNaseA-Lösung (10 mg/ml)
6. Ansatz schwenken

7. Inkubation: 30 min, 37 °C (Heizblock, Eppendorf)
8. Zugabe von 30 µl N-Laurylsarcosin-Lösung (20 % [w/v])
9. Inkubation: 30 min, 37 °C (Heizblock, Eppendorf)
10. Zugabe von 1 Vol. Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1 [v/v/])
11. Zentrifugation: 10 min, 9.000 x g, 4 °C
12. Abnahme der oberen, wässrigen Phase
13. Zweimalige Wiederholung der Schritte 10. - 12.
14. Extraktion mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1 [v/v]) zur Phenolentfernung
15. Zentrifugation: 5 min, 9.000 x g, 4 °C und Abnehmen der oberen, wässrigen Phase
16. Fällung der DNA mit 0,1 Vol. 3 M Na-Acetat (pH 5,2) und 2,5 Vol. Ethanol (96 % [v/v], reinst)
17. Inkubation: 5 min bei RT
18. Zentrifugation: 15 min, 6.000 x g, 4 °C
19. Trocknen des Pellets, anschließende Aufnahme in 60 µl TE-Puffer
20. Zugabe von 15 µl RNaseA (10 mg/ml)
21. Inkubation: 15 min, 37 °C
22. Zugabe von 30 µl Proteinase K (20 mg/ml)
23. Inkubation: über Nacht, 37 °C
24. Erhöhung des Volumens mit *A. dest.* auf 400 µl
25. Zugabe von 60 µl 3 M Na-Acetat (pH 5,2)
26. Extraktion mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (Schritte 10. - 12.)
27. Extraktion mit 1 Vol. Chloroform-Isoamylalkohol
29. Fällung der DNA mit 1 Vol. 3 M Na-Acetat (pH 5,2) und 2,5 Vol. Ethanol (96 % [v/v], reinst)
30. Zentrifugation: 15 min, 16.000 x g, 4 °C
31. Zweimaliges Waschen des Pellets mit Ethanol (70 % [v/v], reinst)
32. Zentrifugation: 15 min, 16.000 x g, 4 °C
33. Aufnahme des Pellets in 50 µl TE-Puffer oder *A. dest.*

Anschließend wurde die Qualität der Isolierung im 0,8 %igen Agarosegel (2.8.5) überprüft.

Waschpuffer

EDTA (pH 8,0) 0,1 M	80 ml aus 0,5 M Stocklösung
Tris-HCl (pH 8) 50 mM	20 ml aus 1 M Stocklösung
KCl 0,5 M	50 ml aus 1 M Stocklösung
<i>A. dest.</i> <i>ad</i>	400 ml

Lysispuffer

NaCl 0,1 M	4 ml aus 5 M Stocklösung
EDTA (pH 8) 50 mM	20 ml aus 0,5 M Stocklösung
A. dest. ad	200 ml

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

Lysozym-Lösung

Lysozym	400 mg
A. dest. ad	1 ml

Die Lysozym-Lösung wurde für den Gebrauch frisch angesetzt.

RNaseA-Lösung

RNaseA	10 mg
Tris-HCl (1 M, pH 8,0)	100 µl
NaCl	9 mg
A. dest. ad	1 ml

Der pH-Wert wurde auf 7,5 eingestellt und anschließend die Lösung für 15 min auf 90 °C erhitzt, um DNasen zu inaktivieren. Die Lagerung der Lösung erfolgte als 1-ml-Aliquots bei -20 °C.

20 % [w/v] N-Laurylsarcosin-Lösung

N-Laurylsarcosin	10 g
A. dest. ad	50 ml

TE-Puffer

Tris-HCl (pH 8) 10 mM	800 µl aus 1 M Stammlösung
EDTA 1 mM	160 µl aus 0,5 M Stammlösung

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 8,0 eingestellt.

Proteinase K-Lösung

Proteinase K	20 mg
A. dest. ad	1 ml

Die Lösung wurde in 30-µl-Aliquots bei -20 °C gelagert. Nach einmaligem Auftauen wurde der Rest der Lösung verworfen (SAMBROOK und RUSSELL, 2001).

2.9.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus *C. acetobutylicum*

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus *C. acetobutylicum* erfolgte nach (OELMÜLLER *et al.*, 1990, mod.). Während eines Wachstumsversuches wurden zu unterschiedlichen

Zeitpunkten 5 x 2 ml Proben entnommen, zentrifugiert (1 min, 16.000 x g, 4 °C), die entstandenen Pellets sofort in Flüssigstickstoff schockgefroren und daraufhin bei -70 °C gelagert. Die RNA-Isolierung wurde mittels Phenol-Extraktion nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. Zugabe von 15 µl 25 %iger (w/v) SDS-Lösung zu 1,2 ml saurer Phenol-Lösung (Phenol, wassergesättigt, stabilisiert, pH 4,0; AppliChem, Darmstadt) in ein 2-ml-Reaktionsgefäß, Erhitzen auf 65 °C
2. Suspendieren des gefrorenen Zellpellets in 600 µl AE-Puffer, sofortiger Transfer der Suspension in die heiße Phenol-SDS-Lösung und Invertierung
3. Inkubation: 10 min, 65 °C, wiederholtes Invertieren
4. Zentrifugation: 15 min, 9.000 x g, 4 °C
5. Überführung der oberen, wässrigen Phase in ein frisches 2-ml-Reaktionsgefäß und Zugabe von 2 M Natriumacetat (pH 5,2)
6. Zugabe von 600 µl Phenol-Lösung (pH 4), Invertierung
7. Zentrifugation: 15 min 9.000 x g, 4 °C
8. Wiederholung der Schritte 5.-7.
9. Überführung der oberen, wässrigen Phase in ein frisches 2-ml-Reaktionsgefäß
10. Fällung der RNA durch Zugabe von 2,5 Vol. Ethanol (96 % [v/v], reinst, eiskalt)
11. Inkubation 2 h, -20 °C
12. Zentrifugation: 1 h, 16.000 x g, 4 °C
13. Waschen des Pellets mit Ethanol (70% [v/v], reinst, eiskalt)
14. Trocknung des Pellets bei RT
15. Suspension des Pellets in 15 µl TE-Puffer

Anschließend wurden die RNA-Proben bei -70 °C gelagert. Eine Überprüfung der Qualität der RNA-Präparationen wurde durch eine Elektrophorese im sterilen 1 %igen Agarosegel (2.8.5) und mittels RNase-ExitusPlus™ (AppliChem) behandelten Utensilien erreicht. Zur Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA wurden die Proben 1:200 oder 1:400 verdünnt und bei einer Wellenlänge von 260 nm am Photometer in einer Quarzküvette gemessen. Die Reinheit konnte anhand des Verhältnisses der Absorption bei OD₂₆₀ und OD₂₈₀ bestimmt werden. Ein Wert zwischen 1,7 und 2 deutete auf eine reine RNA Lösung hin (SAMBROOK *et al.*, 2001).

AE-Puffer

Na ₂ Acetat x 3 H ₂ O		272	mg
Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O		37,2	mg
A. dest.	<i>ad</i>	100	ml

Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren mit Eisessig auf 5,5 eingestellt.

Natriumacetat

Na ₂ Acetat x 3 H ₂ O		27,22	g
A. dest.	<i>ad</i>	100	ml

Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren mit Eisessig auf 5,2 eingestellt.

2.10 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreation (RT-PCR)

Um die Transkription eines Gens nachzuweisen oder deren Expression zu quantifizieren dient die RT-PCR. Dabei wird RNA in cDNA umgeschrieben, um diese dann als Template für die PCR nutzen zu können.

2.10.1 DNase Behandlung von RNA

Wie in 2.9.3 beschrieben wird die RNA-Isolierung bei niedrigem pH-Wert durchgeführt, dadurch reichert sich die DNA in der organischen und der Protein-Interphase an. Dies führt zu einer deutlichen Verringerung der DNA-Kontamination in den RNA-Isolaten (KIRBY, 1956). Für die Herstellung von cDNA ist es notwendig, dass das RNA-Isolat frei von DNA ist. Um dies zu gewährleisten wurde anschließend an die RNA-Isolierung eine DNase-Behandlung wie folgt durchgeführt:

1. Volumen mit DNase-Puffer auf 200 µl erhöhen
2. Zugabe von 5 µl DNase (50 U RNasefreie DNase)
3. Inkubation: 30 min bei 37 °C
4. Zugabe von 15 µl 2 M Natriumacetat (pH 5,2)
5. Zugaben von 500 µl Phenol-Lösung (pH 4), mischen
6. Zentrifugation: 15 min, 9000 x g, 4 °C
7. Abnahme der oberen wässrigen Phase
8. Fällung der RNA mit 2,5 Vol. Ethanol (96 % [v/v], reinst, eiskalt)
9. Inkubation: 2 h, -20 °C (oder über Nacht)
10. Zentrifugation: 1 h, 16000 x g, 4 °C

11. Waschen des Pellets mit Ethanol (70 % [v/v], reinst, eiskalt)
12. Trocknen des Pellets und Aufnahme in 15 µl TE-Puffer
13. Lagerung bei -70 °C
14. Konzentrationsbestimmung: siehe 2.10.2

Um auszuschließen, dass vorhandene DNA die Resultat der nachfolgenden PCR verfälscht, wurde ebenfalls die RNA als Template eingesetzt. Nachdem keine Fragmente amplifiziert wurden, ist davon auszugehen, dass keine DNA mehr vorhanden ist.

DNase-Puffer

Tris (40 mM)	0,48	g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O (6 mM)	0,12	g
<i>A. dest ad</i>	100	ml

Vor dem Autoklavieren pH mit HCl auf 7,5 einstellen

2.10.2 Herstellung von cDNA

Das Umschreiben der RNA in cDNA erfolgte indem von jeder RNA-Probe jeweils zweimal 25 µg RNA eingesetzt und wie folgt weiter bearbeitet:

1. Zugabe von 2 µl Primer-Gemisch (Primer Random p(dN)₆, 5 µg/µl; Roche) zu den 25 µg RNA und Auffüllen auf 11 µl mit RNase-freien *A. dest.*
2. Vorsichtiges Mischen der Probe und anschließende Anzentrifugation
3. Primer-Anlagerung im PCR-Zykler bei 70 °C für 10 min
4. Lagerung der Proben auf Eis
5. Zugabe der Komponenten aus dem SuperScript III Reverse Transkriptase Kit (Invitrogen):
 - 4 µl 5 x First Strand Puffer
 - 2 µl 0,1 M DTT
 - 1 µl SuperScript Reverse Transkriptase
 - 2 µl RT dNTP_s
6. Vorsichtiges Mischen der Probe und anschließende Anzentrifugation
7. Inkubation: 2 – 3 h bei 42 °C im PCR-Zykler
8. cDNA für die anschließende Aufreinigung sofort auf Eis bringen
9. Zugabe von 2 µl 2,5 M NaOH
10. Mischen (Vortexer) und Anzentrifugation
11. Inkubation: 15 min bei 37 °C
12. Neutralisierung der Reaktion erfolgte durch 10 µl 2 M HEPES (Säurefrei)

13. Erneutes Mischen (Vortexer) und Anzentrifugation

Danach erfolgte die Aufreinigung mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Quiagen), mit der Ausnahme, dass die Säule erneut mit dem Durchfluss beladen wurde, um die Ausbeute zu erhöhen. Zur Konzentrationsbestimmung der cDNA wurden die Proben 1:200 verdünnt und bei einer Wellenlänge von 260 nm am Photometer in einer Quarzküvette gemessen. Anschließend wurden 100 ng cDNA für die PCR eingesetzt. Die Wahl des PCR-Programms (2.8.2) und die Zyklenzahl orientierten sich an dem zu erwartendem Ergebnis. Ergänzend erfolgte zur Überprüfung der einheitlich eingesetzten cDNA-Menge die Amplifikation der 16S rRNA.

2.11 Transfer von Nukleinsäuren auf Membranen

2.11.1 DNA-Markierung

Die Erzeugung der Sonden erfolgte entsprechend der Herstellerangaben des „DIG-DNA Labeling Kits“ (Roche, Mannheim). Diese dienten im späteren Verlauf der Detektion von DNA-Fragmenten bei der Southern-Hybridisierung. Dabei wurde die Sonde durch den Einbau von Desoxyuridin-Nukleotiden (dUTPs) mit kovalent gebundenem Digoxigenin markiert. Die Synthese des neuen DNA-Strangs wurde durch das Klenowfragment der DNA-Polymerase I unter Verwendung von hexameren „random“-Primern ermöglicht. Als Matrize für die Markierungsreaktion dienten geeluierte (2.8.4.5) PCR-Produkte. Die Menge an DNA im Markierungsansatz betrug 100–500 ng. Zur Überprüfung der Markierung wurden 5 µl Kontroll-DNA mitgeführt. Die Behandlung erfolgte entsprechend der geeluierten DNA. Die Matrizen-DNA wurde für 10 min bei 100 °C im Heizblock denaturiert und sofort auf Eis überführt. Anschließend erfolgte die Zugabe der Komponenten des DIG DNA Labeling Kits auf Eis:

Hexanukleotid-Mix (10x)		2	µl
dNTP-Markierungs-Mix (10x)		2	µl
Klenow-Enzym (2 U/µl)		1	µl
<i>A. dest.</i>	ad	20	µl

Der vollständige Reaktionsansatz wurde gemischt, für 20 h bei 37 °C inkubiert und dann bei 65 °C für 10 min abgestoppt. Die Lagerung erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C.

2.11.1.2 Sondenquantifizierung

Um die Markierungseffizienz der DIG-markierten Sonde zu kontrollieren und quantifizieren wurde die hergestellte Sonde, die Kontroll-DNA und eine DIG-markierten Kontroll-DNA (1 ng/ μ l) entsprechend dem Verdünnungsschema des Protokolls („DIG-DNA Labeling Kits“ Roche) verdünnt. Von jeder Verdünnungsstufe wurde 1 μ l auf eine Nylonmembran aufgetragen und die DNA durch Bestrahlung mit 120 kJ UV-Licht einer Wellenlänge von 245 nm im UV-Illuminator kovalent fixiert. Die Visualisierung der Antikörperbindung erfolgte mit den Substraten NBT und BCIP und ermöglichte den Vergleich der Markierungseffizienz der Sonde mit der Kontroll-DNA.

2.11.2 Southern-Hybridisierung (SAMBROOK *et al.*, 2001)

Bei der Southern-Hybridisierung handelt es sich um eine Nachweismethode einer Gensequenz in einem komplexen DNA-Gemisch. Die zuvor hydrolysierte DNA (400 ng) wurde per Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Kapillarblotverfahren auf die Membranen übertragen. Dabei wird die denaturierte DNA durch vertikale Kapillarkräfte aus dem Agarosegel auf eine für Makromoleküle undurchlässige Nylonmembran transferiert.

2.11.2.1 DNA-Gelelektrophorese für Southern-Hybridisierung

Zu Beginn der Hybridisierung wurde die restriktierte chromosomale DNA sowie 100 ng DNA Molecular Weight Marker II (Roche) in einem 0,8 bzw. 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Die Behandlung des DNA-Gels geschah wie folgt:

1. Inkubation: 10 min in 0,25 N HCl, RT (Die Säure erzeugt Einzelstrangbrüche, wodurch der Transfer der DNA auf die Membran erleichtert wurde)
2. Inkubation: 30 min in Denaturierungspuffer, RT
3. Inkubation: 30 min in Neutralisierungspuffer, RT
4. Waschen des Gels in 2x SSC für 5 min, RT

Denaturierungspuffer

NaOH		35,06	g
NaCl		16	g
A. dest.	ad	1000	ml

Neutralisierungspuffer

NaCl		87,66	g
Tris		60,55	g
A. dest.	<i>ad</i>	1000	ml

Der Puffer wurde vor dem Autoklavieren mit konzentrierter HCl auf pH 7,5 eingestellt.

20x SSC-Puffer

NaCl		175	g
Na ₃ -Citrat x H ₂ O		88,2	g
A. dest.	<i>ad</i>	1000	ml

Der pH-Wert von 7,0 wurde mit konzentrierter HCl eingestellt.

2.11.2.2 Aufbau des Southern Blots

Als Grundlage für den Blot diente ein etwa 10 cm hoher Stapel aus Laborpapier. Darauf wurden vier gelgroße Lagen mit 2x SSC Puffer durchtränktem Whatman-Blotting Papier (Schleicher & Schuell) positioniert. Die Nylonmembran, die der Größe des Gels exakt entsprach, wurde ebenfalls in 2x SSC Puffer geschwenkt und luftblasenfrei auf dem Blotting Papier positioniert. Daraufhin erfolgte das Auflegen des vorbereiteten Agarosegels. Dabei durften keine Luftblasen zwischen der Membran und dem Gel zurückbleiben, weil dadurch der Transfer der DNA an dieser Stelle verhindert wurde. Anschließend wurde der Blot durch eine gereinigte Glasscheibe und einem zirka 250 g schweren Gewicht stabilisiert. Nach etwa 15-20 h erfolgte die Fixierung der DNA auf der Nylonmembran durch Bestrahlung mit 120 kJ UV-Licht bei einer Wellenlänge von 245 nm im UV-Illuminator. Zur Kontrolle eines erfolgreichen Transfers der DNA auf die Membran wurde das Gel noch im Ethidiumbromidbad angefärbt.

2.11.2.3 Hybridisierung

Um die kovalent an der Membran gebundene DNA für die Detektion vorzubehandeln, erfolgte die Vorhybridisierung und die Hybridisierung mit der markierten Sonde in Hybridisierungsröhrchen der Firma Ochs in einem Hybridisierungsofen (Biometra) bei 42 °C. Dazu wurde die Nylonmembran vorsichtig mit einer Pinzette in dem Hybridisierungsröhrchen positioniert und wie folgt behandelt:

1. Inkubation: 1 h mit Hybridisierungspuffer
2. Verwerfen des Hybridisierungspuffers

3. Zugabe der markierten Sonde zu 5 ml Hybridisierungspuffer
4. Denaturierung der Sonde durch 10-minütiges Kochen bei 100 °C
5. Zugabe der kochenden Sonde zur Membran (die Arbeitskonzentration der Sonde lag bei 60 ng/ml)
6. Hybridisierung über Nacht für mindestens 15 h
7. Abgießen der Sonde
8. Zweimaliges Waschen der Membran mit 2x SSC mit 0,1 % (w/v) SDS, für 15 min RT

Die Membran konnte anschließend direkt zur Detektion eingesetzt werden.

Hybridisierungspuffer

20x SSC- Puffer	12,5	ml
Formamid	25	ml
Blocking Reagenz	1	g
Laurylsarkosin (0,1 % [w/v])	250	µl
SDS (10 % [w/v])	100	µl
A. dest.	<i>ad</i>	50 ml

2x SSC mit 0,1 % (w/v) SDS

20x SSC	100	ml
10 % (w/v) SDS	10	ml
A. dest.	<i>ad</i>	1000 ml

2.11.2.4 Detektion Digoxigenin-markierter DNA

Die Detektion der Digoxigenin-markierten DNA erfolgte in einem Immunoassay durch BCIP und NBT. Dabei dient Digoxigenin im gebundenen Zustand als Hapten und wird von einem Anti-Digoxigenin-Antikörper (Roche) gebunden, der mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt ist. BCIP und NBT (Roche) sind Substrate der alkalischen Phosphatase und lösen eine Farbreaktion aus. Um nach der Hybridisierung die Digoxigenin-markierte DNA nachzuweisen wurde die Membran im Hybridisierungsröhrchen bei RT wie folgt behandelt:

1. Waschen der Membran: 1 min mit Puffer 1
2. Inkubation: 1-2 h in Puffer 2
3. Waschen der Membran: 5 min mit Puffer 1
4. Inkubation: 30 min mit 20 ml Antikörperkonjugatlösung
5. Zweimaliges Waschen der Membran: 15 min mit Puffer 1

6. Äquilibrierung der Membran: 2 min mit Puffer 3
7. Überführung der Membran aus dem Hybridisierungsröhrchen zwischen zwei Folien
8. Zugabe der Färbelösung direkt auf die Membran, Vermeidung von Luftblasen und Inkubation für mindestens 15 min im Dunkeln
9. Abbruch der Färbung durch Waschen der Membran mit *A. dest.*

Abschließend wurde die Nylonmembran fotografiert und lichtgeschützt aufbewahrt.

Puffer 1

Tris-HCl		100	ml
NaCl		8,76	g
<i>A. dest.</i>	<i>ad</i>	1000	ml

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

Puffer 2

Puffer 1 mit 0,5 % (w/v) Blocking Reagenz (Roche)

Puffer 3

Tris-HCl (1 M, pH 8)		100	ml
NaCl		5,84	g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O		10,17	g
<i>A. dest.</i>	<i>ad</i>	1000	ml

Der pH-Wert wurde mit konzentrierter HCl auf 9,5 eingestellt.

Antikörperkonjugatlösung

Puffer 1		20	ml
Anti-Digoxigenin-AP-Konjugat		4	µl

Färbelösung

Puffer 3		5	ml
NBT/BCIP-Lösung		40	µl

2.12 Erzeugung rekombinanter Organismen

2.12.1 DNA Transfer in *E. coli*

2.12.1.1 CaCl₂-vermittelte Transformation in *E. coli*

Für die Transformation von ligierten Plasmide wurden CaCl₂-kompetente *E. coli* DH5 α -Zellen (HANAHAN, 1983, mod.) zunächst auf Eis aufgetaut und dann 50 μ l der CaCl₂-kompetente *E. coli* DH5 α -Zellen zu 20 μ l Ligationsansatz gegeben. Daraufhin wurden die Proben für 30 min auf Eis inkubiert und dann für 90 s bei 42 °C einem Hitzeschock unterzogen. Nach der Überführung der Proben zurück auf Eis erfolgte die Zugabe von 250 μ l LB-Medium. Zur Regeneration schloss sich eine Inkubation für 1 h bei 37 °C und 500 Upm (Thermomixer 5436; Eppendorf) an. Abschließend wurden 50 μ l und 200 μ l des Transformationsansatzes im Doppelansatz auf LB-Nähragarplatten mit den für die Selektion erforderlichen Zusätzen (2.4.3) ausplattiert und ü. N. bei 37 °C angezogen. Die erfolgreiche Transformation wurde durch Überimpfen einer Einzelkolonie in 5-ml-Kulturen und anschließender Plasmid-Minipräparation (2.9.1.) überprüft.

2.12.1.2 Transformation von *E. coli* durch Elektroporation

Bei der Elektroporation wird durch die Pulse eines sich entladenden Kondensators kurzzeitig ein elektrisches Feld erzeugt, das mikroskopisch kleine Löcher in der Zellwand hervorruft, die sich sofort wieder schließen. Somit konnte mit der Methode nach (DOWER et al., 1988, mod.) Fremd-DNA in die Bakterienzelle geschleust werden. Die elektrokompetenten *E. coli*-Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut und anschließend mit 2 μ l einer 1:10 verdünnten Plasmidsuspension in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 0,2 cm) gegeben. Die Elektroporation erfolgte mittels GenePulserTMII (Bio-Rad) bei einer Kapazität von 25 μ F, einem Widerstand von 200 Ω und einer Spannung von 2,5 kV. Wodurch Zeitkonstanten von 4,18 ms bis 5,02 ms erreicht werden konnten. Nach dem Strompuls wurden die Zellen in 1 ml vorgewärmtem LB-Medium (37 °C) aufgenommen und für 1 h bei 37 °C erschütterungsfrei inkubiert. Anschließend wurden 10 μ l, 50 μ l und 100 μ l auf LB-Agar (2.4.1) mit Selektionszusätzen (Tab. 2.5) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Eine erfolgreiche Transformation wurde durch Animpfen einer Einzelkolonie und einer folgenden Plasmid-Minipräparation (2.9.1.) bestätigt. Die Elektroporation in *E. coli* wurde

verwendet um Plasmide für die Methylierung in *E. coli* Er2275 mit pAN-2 zu transformieren.

2.12.2 DNA Transfer in *C. acetobutylicum*

2.12.2.1 Transformation von *C. acetobutylicum* durch Elektroporation

Die Transformation von *C. acetobutylicum* erfolgte im Wesentlichen nach MERMELSTEIN, WELKER, & BENNETT, (1992). Für die Transformation wurden *in vivo* methylierte (2.12.1.2) Plasmide eingesetzt. Die Methylierung der Plasmide erfolgte, da die elektrokompetenter *E. coli*-Zellen bereits ein Plasmid (pAN-2) enthielten, welches eine Methylase exprimiert. Die mittels Plasmidisolierung (2.9.1.) erhaltenen Plasmide wurden durch die Elektroporation in einem GenePulser™II (Bio-Rad) unter anaeroben Bedingungen in *C. acetobutylicum* transformiert. Dazu wurde anfangs eine 50-ml-Hauptkultur mit 8 – 10 ml einer über Nacht gewachsene Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die weitere Behandlung der Zellen weitestgehend anaerob und auf Eis, nach folgendem Protokoll:

1. Inkubation für 30 min auf Eis
2. Zentrifugation: 5 min, 5.000 x g, 4 °C (3K30; Rotor 12150)
3. Aufnahme des Zellpellets in 10 ml Elektroporationspuffer
4. Zentrifugation: 5 min, 5.000 x g, 4 °C
5. Aufnahme des Zellpellets in 2 ml Elektroporationspuffer
7. Überführung 500 ng Plasmid-DNA in vorgekühlte Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 0,4 cm)
8. Zugabe von 350 µl resuspendierten *C. acetobutylicum*-Zellen
9. Inkubation der Küvette für 5 min auf Eis
10. Elektroporation bei einer Kapazität von 50 µF, bei einem Widerstand von 600 Ω und einer Spannung von 1,8 kV (Zeitkonstante: 14,8–29,4 ms)
11. Inkubation der Zellen für 3-4 h in 800 µl vorgewärmtem CGM-Medium (2.3.2)
12. Ausplattieren von 200 µl Zellsuspension sowie auftropfen von bis zu 500 µl auf RCA-Agar mit Thiamphenicolzusatz (15 µg/ml) beziehungsweise auf RCA-Agar Erythromycin (20 µg/ml) bei den Überexpressionsklonen
13. Inkubation anaerob über Nacht bei 37 °C für mindestens 2 Tage

Einzelkolonien einer erfolgreichen Transformation der mittels Clostron erzeugten pMTL007-Plasmide wurden in 500 µl CGM-Medium mit Thiamphenicolzusatz (7,5 µg/ml) resuspendiert und zuvor nochmals auf der entsprechenden Selektionplatte ausgestrichen. Nach etwa 4 Stunden anaerober Inkubation bei 37 °C erfolgte das Ausstreichen von 200 µl und Tropfen der CGM-Kultur auf RCA-Agar mit Erythromycin (20 µg/ml).

Natriumphosphat-Puffer (pH 7,4)

NaH ₂ PO ₄ (200 mM)	22,6	ml
Na ₂ HPO ₄ (200 mM)	77,4	ml

Elektroporationspuffer

Natriumphosphat-Puffer (pH 7,4)	150	µl
Saccharose (270 mM)	10	ml

2.13 Clostron® Insertionsmutante

2.13.1 Erzeugung der genspezifischen pMTL007C-E2 Vektoren

Zu Beginn wurde die Intron-DNA (350-Bp-Fragment) mit der SOE (Splicing by overlap extension) PCR (2.8.2.1) und den genspezifisch Oligonukleotiden (2.2) an das Zielgen angepasst. Die Restriktion des Plasmids und des 350-Bp-Fragments mit *Hind*III und *Bsp*1407I (Isoschizomer von *Bsr*GI) ermöglichte die Klonierung des genspezifischen 350-Bp-Fragment in das Plasmid, wodurch das *lacZ*alpha-Gen ersetzt wurde. Die Synthese der β-Galaktosidase erfolgte nicht mehr und folglich konnte das Chromogen (X-Gal) nicht mehr umgesetzt werden. Die dadurch bedingten weißen Kolonien wurden zur Überprüfung einer Kontrollrestriktion unterzogen und sequenziert (LGC Genomics, Berlin).

2.13.2 Transformation in *C. acetobutylicum*

Die Restriktionsendonuklease (*Cac*824I) in *C. acetobutylicum* mit der Erkennungssequenz (5'-GCNGC-3') macht die Verwendung von pMTL007C-E2 unmöglich, da diese Sequenz in Plasmiden häufig vorkommt die in *E. coli* eingesetzt werden. Erst mit der Entdeckung der ϕ3T I Methyltransferase des *B. subtilis* Phagen ϕ3T (MERMELSTEIN & PAPOUTSAKIS, 1993), konnte dieses Problem gelöst werden. Durch die Methyltransferase wird das Plasmid in *E. coli in vivo* methyliert und so vor der Degradation durch *C. acetobutylicum* geschützt. Deshalb erfolgte vor der Transformation in *C. acetobutylicum* die

Elektroporation des genspezifischen pMTL007C-E2 Vektors in *E. coli* ER2275. Dieser Stamm enthält das pAN-2 Plasmid, welches Tetracyclinresistenz vermittelt und das Gen ($\phi 3tI$) der Methyltransferasen aus dem *Bacillus subtilis* Phagen $\phi 3T$ exprimiert und somit die Plasmide spezifisch methylieren. Nach der Elektroporation in *E. coli* ER2275 (2.12.1.2) erfolgte die Selektion auf LB-Agar mit Tetracyclin (10 $\mu\text{g/ml}$) und Chloramphenicol (25 $\mu\text{g/ml}$) und nach der Plasmidpräparation die Testrestriktion mit *Fnu4HI*. Das Enzym erkennt unmethylierte Basensequenzen und schneidet diese, als Kontrolle diente deshalb immer ein unmethylierter Vektor.

Nach der *in vivo* Methylierung konnte die Elektroporation der genspezifisch angepassten pMTL007C-E2 Plasmide in *C. acetobutylicum* erfolgen. Zu diesem Zweck wurden der Wildtyp bzw. die Insertionsmutanten (ohne RAM-Kassette) in 50 ml CGM bis zu einer OD_{600} von ungefähr 1 bei 37 °C inkubiert und anschließend die Herstellung der elektrokompenten Zellen und die Elektroporation (2.12.2.1) durchgeführt. Nach der Inkubation von bis zu zwei Tagen auf RCA-Agar mit Thiamphenicol (15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) wurde 500 μl CGM-Medium mit Thiamphenicol (7,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) mit einer Kolonie inokuliert und nach 4 Stunden auf RCA-Platten mit Erythromycin (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) ausgestrichen. Die Selektion mittels Erythromycin konnte erfolgen, da nach korrekter Insertion des Gruppe II Introns der Marker ErmRAM aktiv wird. Um Mehrfachmutanten herstellen zu können, musste vor der Elektroporation des genspezifischen Vektors die Resistenz des bereits vorhandenen Gruppe II Introns entfernt werden (2.14).

2.13.3 Nachweis der Insertion

2.13.3.1 PCR-Nachweis

Die Selektion der Insertionsmutanten aufgrund ihrer Erythromycinresistenz ist nur ein Hinweis auf die Integration des Gruppe II Introns ins Chromosom, nicht aber der Nachweis für die Insertion in das Zielgen. Um Klone auf die richtige Insertion zu untersuchen, wurden PCR-Amplifikationen durchgeführt. Vorherrschend erfolgte die Verwendung der Gen-Primer (2.2), dabei konnte bei einer erfolgreichen Integration ein um das Gruppe II Intron (1780 Bp) vergrößertes Fragment amplifiziert werden. Ebenso erfolgt der Nachweis mit dem sogenannten Gen-Intron PCR, hierfür wurden ein Gen-Primer und ein Intron-Primer eingesetzt. Es konnte demnach nur ein Fragment amplifiziert werden, wenn sich das Intron im Zielgen befand. Die Wahl des Intron-

Oligonukleotids richtete sich danach, ob das Intron den „sense“ beziehungsweise in den „antisense“ Strang integriert war. Da die Insertionsmutanten aus dieser Arbeit alle in „sense“ orientiert waren, wurde der EBS Universal verwendet.

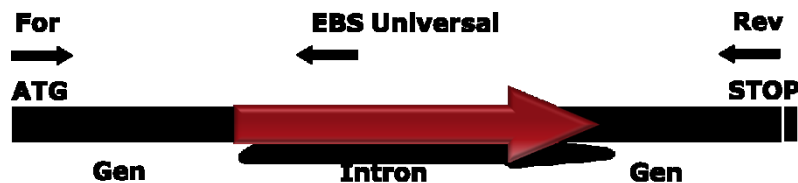


Abb. 2.1.: Schema zum Nachweis der genspezifischen Integration des Gruppe-II-Introns. Der Pfeil symbolisiert das Gruppe II Intron im Zielgen (schwarz). Die schwarzen kleinen Pfeile repräsentieren schematisch die Positionen der Oligonukleotide. Bei der Gen-PCR werden die Gen-Primer (For und Rev) und bei der Gen-Intron PCR der For-Primer sowie der EBS Universal eingesetzt.

Die Durchführung erfolgte wie unter 2.8.2.3 und 2.8.2.4 beschrieben. Für den Reaktionsansatz wurden die entsprechenden Oligonukleotide und Polymerasen verwendet. Als Matrize diente chromosomale DNA aus der zu untersuchenden Kolonie. Diese wurde dafür in 25 µl *A. dest.* aufgenommen und für 5 min bei 99 °C aufgeköcht. Zeigte diese Untersuchung die kalkulierte Fragmentgröße, so wurde dieses Ergebnis mittels DNA-Hybridisierung verifiziert.

2.13.3.1 Southern-Hybridisierung

Die abschließende Bestätigung der mittels PCR detektierten positiven Klone erfolgte durch die DNA-Hybridisierung. Diese Methode ermöglicht den Nachweis des Zielgens mit dem Gruppe II Introns in einem komplexen DNA-Gemisch. Zuvor durchgeführte *in silico* Analysen zeigten Restriktionsschnittstellen (Tab. 2. 6) auf, die in der unmittelbaren Umgebung des Zielgens lokalisiert waren (Abb. 2.2). Dann wurden gleiche DNA-Mengen (300 - 500 ng DNA) vom Wildtyp und der zu untersuchenden Mutante mit den jeweiligen Restriktionsenzymen hydrolysiert und wie unter 2.11.2 beschrieben die DNA-Hybridisierung durchgeführt. Um die Banden zu detektieren wurden Gen- und RAM-Sonden hergestellt. Die Herstellung der Sonden erfolgte mittels PCR und den entsprechenden Oligonukleotiden (2.2), anschließend wurde die Amplifikate mittels Gelelektion aufgereinigt und 150 ng für die Sondenherstellung (2.11.1) verwendet.



Abb. 2.2: Schematische Darstellung zum Nachweis mittels DNA-Hybridisierung. Der rote Pfeil symbolisiert das Gruppe II Intron im Zielgen (schwarz). Die umliegenden Gene sind grau dargestellt. Die schwarzen kleinen Pfeile deuten die möglichen Restriktionsschnittstellen in der Umgebung des Zielgens an.

2.14 Entfernen der RAM-Kassette von Insertionsmutanten

Die RAM-Kassette in der zweiten Generation des Clostron Systems ist von zwei flankierende FLP (Flippase) Erkennungsstellen (FRT) umgeben, die es gestatten die Resistenz zu entfernen und somit Mehrfachintegrationen zu ermöglichen (HEAP *et al.*, 2010; JIA *et al.*, 2011). Die vom pCLF1-1 Plasmid kodierte FLP (Flippase) Rekombinase erkennt diese Stellen und entfernt die RAM-Kassette. Der Verlust der Erythromycin-Resistenz gestattete nun eine erneute Insertion des kompletten Gruppe II Introns und die erneute Selektion mittels Erythromycin.

1. Elektroporation des pCLF1-1 Vektors (vermittelt Thiamphenicolresistenz) in die Insertionsmutante
2. Ausplattieren auf RCA mit Erythromycin (40 µg/µl) und Thiamphenicol (15 µg/µl)
3. Inkubation bei 37 °C für etwa 2 Tage
4. Inokulation von 4 ml CGM mit Thiamphenicol (15 µg/µl) und anaerobe Inkubation über Nacht, bei 30 °C
5. Herstellung von Verdünnungsstufen mit PBS bis 10⁻⁶
7. Ausplattieren von 100 µl der jeweiligen Verdünnungen auf RCA mit Thiamphenicol (15 µg/µl)
8. Anaerobe Inkubation für 3 Tage bei 30 °C
9. 50 Kolonien pro Stamm auf RCA mit Thiamphenicol (15 µg/µl) ausstreichen und für 2 Tage bei 30 °C inkubieren
10. Ausstreichen von 50 Kolonien auf RCA mit Erythromycin (10 µg/µl) und RCA mit Thiamphenicol (15 µg/µl)
11. Kontrolle nach 2 – 3 Tage ob Wachstum auf Erythromycin detektierbar ist
11. Kolonie-PCR-Screening
12. Herstellung einer Sporensuspension, damit Animpfen von CGM und Ausstreichen auf RCA

13. Ausstreichen auf RCA mit Thiamphenicol (15 µg/µl) zur Überprüfung auf pCLF1-1-Verlust
14. Verwendung der RAM-freien Stämme für eine erneute Gruppe II Insertion

2.15 Arbeiten mit Proteinen

2.15.1 Zellaufschluss mittels Ultraschall

Für die Untersuchung der Enzymaktivität wurden die Zellen der Insertionsmutanten sowie die des Wildtyps durch die Verwendung von Ultraschall aufgeschlossen. Diesbezüglich erfolgte das Animpfen einer CGM-Vorkultur (bei den Integranten wurde CGM mit Erythromycin (20 µg/ml) verwendet) und die Inkubation bei 37 °C über Nacht, mit anschließendem Überimpfen in eine MS-MES-Vorkultur. Die Vorkultur wurde dann in eine 100-ml bzw. 500-ml-MS-MES-Hauptkultur (mit Erythromycin) überführt um am nächsten Tag geerntet (5000 UpM bei 4 °C, für 10 Minuten (Sorvall RC5C; Rotor: SLA 3000)). Für die Messungen der acidogen exprimierten Gene erfolgte die Gewinnung des Zellpellets aus 100 ml CGM, bei einer optischen Dichte von 1. Bei anaeroben Assays wurden die Schritte soweit es möglich war in der Anaeroben Box durchgeführt. Das Zellpellet wurde in dem des Assays entsprechenden Puffer aufgenommen und entweder bei -70 °C in einem Hungate gelagert oder sofort für die Ultraschallbehandlung verwendet. Der Zellaufschluss mittels Ultraschall erfolgte in einem Glassmessbecher bzw. dem Volumen entsprechend in einem 2-ml-Reaktionsgefäß, auf Eis (Hielscher UP200S; Sonotrode S1 oder S3) für sechsmal 1,5 Minuten mit je einer Minute Pause, nach vier Minuten Abkühlung wurde erneut viermal 1,5 Minuten mit einer Minute Pause geschallt. Mittels Lichtmikroskopie erfolgte die Überprüfung der Ultraschalleffizienz. Anschließend wurde die Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976) und die entsprechenden Assays durchgeführt.

2.15.2 Protein-Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in wässriger Lösung nach BRADFORD (1976) wurden die aus dem Zellaufschluss (2.15.1) gewonnenen Überstände beziehungsweise Proteinsuspensionen für 30 min, 4 °C und 13000 UpM zentrifugieren und dann 1:10 bis 1:200 mit *A. dest* verdünnt und je 50 µl davon mit 1 ml Bradford-Reagenz versetzt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Messung der Absorption bei einer

Wellenlänge von 595 nm (Ultrospec 3000, Amersham Biosciences) in Plastikkuvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm. Die Proteinbestimmung erfolgte immer im Doppelansatz. Als Blindwert diente ein Ansatz mit 50 µl *A. dest.* anstelle der Proteinprobe. Anhand einer mittels BSA (Albumin Fraktion V; Roth) erstellten Eichreihe im Bereich von 0-0,15 mg/ml konnte die Konzentration des Proteins in der Lösung errechnet werden.

Bradford-Reagenz

Brillant-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.

2.15.3 Thiolase-Assay (HARTMANIS & GATENBECK, 1984)

Nach dem Zellaufschluss mittels Ultraschall (2.15.1) wurde die Proteinsuspension für 30 min, 4 °C und 13000 UpM zentrifugiert und der Überstand nach der Bradfordmessung (2.15.2) für die Bestimmung der Thiolaseaktivität (Acetyl-CoA:AcetylCoA C-Acetyltransferase, [EC 2.3.1.9]) genutzt. Die Messung der Reaktion erfolgt in Richtung der CoA-abhängigen Acetoacetyl CoA Spaltung. Während dieser Reaktion wird die Acetoacetat CoA-Abnahme bei 303 nm spektrophotometrisch bestimmt.

1. Messung der Proben bei Raumtemperatur und aerob
2. 450 µl Puffer (100 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, 10 mM MgCl₂, pH 8) in eine Quarzküvette
3. Zugabe von 2,5 µl Acetoacetyl CoA (10 mM) und 10 µl CoA (10 mM)
4. Starten der Reaktion mit dem zellfreien Extrakt, der entsprechend der Proteinkonzentration ein Volumen von bis zu 50 µl aufwies
5. Nach der Bestimmung der Extinktionsänderung wurde die spezifische Aktivität mit der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Spezifische Aktivität} = \frac{\Delta E \cdot V \cdot -1000}{\epsilon \cdot d \cdot v \cdot T_{Prot.}} \cdot VF \quad \left[\frac{U}{mg} \right] \quad (3)$$

Formel 3: Spezifische Aktivität, V: Volumen des Ansatzes; v: Volumen der Probe; ΔE: Extinktionsänderung; ε₃₀₃: Extinktionskoeffizient (14000 M⁻¹ cm⁻¹); d: Schichtdicke der Küvette (1cm); T_{Prot.}: Proteinkonzentration.

2.15.4 3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase-Assay (MADAN *et al.*, 1973, mod.)

Die 3-Hydroxybutyryl CoA Dehydrogenase (L-3-Hydroxyacyl-CoA:NAD⁺ Oxidoreduktase, [EC 1.1.1.35]) Aktivität wurde durch die NADH-Abnahme bestimmt. Die Vorbereitung des zellfreien Extraktes, sowie die Berechnung erfolgten wie in 2.15.3 beschrieben, mit der Ausnahme das der Extinktionskoeffizienten für NADH bei 6220 M⁻¹ cm⁻¹ liegt.

1. Messung bei 340 nm, Raumtemperatur und aerob
2. 480 µl Puffer (100 mM MOPS, pH 7) in die Quarzküvette
3. Zugabe von 5 µl NADH (10 mM) und 5 µl Acetoacetyl CoA (10 mM)
4. Zugabe von 5 µl zellfreien Extraktes

2.15.5 Crotonase-Assay (HARTMANIS & GATENBECK, 1984)

Die Crotonaseaktivität (L-3-Hydroxyacyl-CoA Hydrolyase, [EC 4.2.1.17]) kann durch die Absorptionsabnahme bei 263 nm, bedingt durch die Hydratation der konjugierten Doppelbindung von Crotonyl CoA, gemessen werden. Der zellfreie Extrakt wurde wie beim Thiolase-Assay (2.15.3) vorbereitet. Mit der erhaltenen Extinktionsänderung, dem Extinktionskoeffizient von Crotonyl-CoA (6700 M⁻¹ cm⁻¹) und der oben beschriebenen Formel 3 (2.14.3) konnte anschließend die spezifische Aktivität der Crotonase berechnet werden.

1. Spektrophotometrische Messung bei 263 nm, Raumtemperatur und aerob
2. 480 µl Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 7,6, Quarzküvette)
3. Zugabe von 7,5 µl Crotonyl-CoA (10 mM)
4. Zugabe von 5 - 10 µl zellfreien Extraktes

2.15.6 Butanol-Dehydrogenase-Assay (DÜRRE *et al.*, 1987)

Die Butanol Dehydrogenase {Butanol:NAD⁺ Oxidoreduktase [Alkohol Dehydrogenase] [EC 1.1.1.1], Butanol:NADP⁺ Oxidoreduktase [Alkohol Dehydrogenase (NADP⁺)] [EC 1.1.1.2]} Aktivität konnte durch die Oxidation von NADPH oder NADH (CLARK *et al.*, 1989) untersucht werden. Ebenso wurde die Alkohol Dehydrogenase Aktivität durch den Austausch von Butyraldehyd zu Acetaldehyd überprüft. Die gesamte Methodendurchführung wurde soweit es möglich war anaerob durchgeführt.

1. Spektrophotometrische Messung der NADPH/NADH-Abnahme (anaerob bei 340 nm, 37 °C)
2. 800 µl Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 7,6, Quarzküvette)

3. Zugabe von 2,3 μl NADPH/NADH (100 mM) und 1,5 μl Butyraldehyd (1 M)/ Acetaldehyd (1 M)
4. Zugabe von 50 - 200 μl zellfreien Extraktes

Die Berechnung erfolgte mit der Formel 3, wie unter 2.15.3 beschrieben.

2.15.7 Acetat- und Butyratkinase-Assay (ROSE, 1955)

Die Aktivitätsbestimmung der Acetatkinase [EC 2.7.2.1] und Butyratkinase [EC 2.7.2.7] im Zellextrakt erfolgte durch die Messung der Acylphosphatbildung aus Acetat beziehungsweise Butyrat. Dabei reagiert Acylphosphat mit Hydroxylamin zu Hydroxamic Säure. Diese Säure formt mit Eisen Ionen eine charakteristisch gelbe Farbe mit einer maximalen Absorption bei 540 nm. Die Enzymreaktion wurde wie zuvor beschrieben berechnet, basierend auf den Extinktionskoeffizienten $1,69 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

1. Herstellung der Stocklösung (3,2 M Ka-Acetat oder Na-Butyrat; 1 Tris-HCL Puffer, pH=7,4; 1 M MgCl_2 ; im Verhältnis 25:5:1) und Hydroxylamidlösung (28 % Hydroxylamid hydrochlorid und 4 M KOH; im Verhältnis 1:1) immer frisch
2. 300 μl Stocklösung, 350 μl Hydroxylamid, 100 μl 0,1 M ATP, 1 – 10 μl zellfreier Extrakt und Auffüllen mit *A. dest* auf 1 ml
3. Zugabe des zellfreien Extraktes startet die Reaktion, Inkubation bei 29 °C für 2 min
4. Abstoppen der Reaktion durch 1 ml 10 % Trichloracetat und Entfernen von eventuellen Präzipitaten durch Abzentrifugation
5. Farbreaktion durch Zugabe von 4 ml FeCl_3 -Reagenz (1,25 % FeCl_3 in 1N HCL), Absorbtiionsbestimmung bei 540 nm

2.15.8 Phosphotransbutyrylase Assay (Andersch *et al.*, 1983)

Die Messung der Aktivität der Phosphotransbutyrylase [EC 2.3.1.19] erfolgte aerob, bei Raumtemperatur in die Richtung der Butyrylphosphat-Bildung. Dabei wird die Bildung des Komplexes zwischen CoASH und 5,5'-Dithiobis(2-Nitrobenzoesäure) (DTNB) bei 412 nm gemessen.

1. 1-ml-Reaktionsansatz
- 2- Zugabe von 0,1 M Ka-Phosphatpuffer (pH 7) sowie 10 μl Butyryl-CoA (6 mM), 4 μl DTNB (1 M) und 1 - 100 μl zellfreier Extrakt
3. Starten der Reaktion durch Zugabe des zellfreien Extrakts
4. Messung bei 412 nm

Die Berechnung erfolgte wie unter 2.15.3 genannt und der verwendete Extinktionskoeffizient war $1,36 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.16 Bezugsquellen

Chemikalien ohne besonderen Vermerk wurden von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Carl Roth & Co. (Karlsruhe), Diagonal (Münster), Fluka/Riedel-de Haën (über Sigma-Aldrich), Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen), Merck (Darmstadt) und Serva Elektrophoresis (Heidelberg) bezogen. In der Regel hatten sie die Reinheitsgrade ‚reinst‘ oder ‚zur Analyse‘. Gase wurden von der Westfalen AG (Münster) geliefert.

Tab. 2.7: Bezugsquellen-Chemikalien

Firma	Produkte
Agilent Technologies GmbH, Böblingen, www.agilent.com	Agilent 7890A, Agilent 7820A, Chromosorb 101, CP-Carbobond, EZ Chrom Elite
AppliChem GmbH, Darmstadt www.applichem.de	EDTA, DMSO, Formaldehyd, Formamid, DNaseI, RNaseA, NBT, BCIP, NADPH, NADH, NADP, ATP, Erythromycin, Trypton, Hefeextrakt, Phenol pH 4,0, RNase-ExitusPlus™
Biomers.net GmbH, Ulm www.biomers.net	Oligonukleotide
CARL ROTH GmbH + CO.KG, Karlsruhe, www.carlroth.com	Lysozym, IPTG, Agarose, Ethidiumbromid, Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
Difco Laboratories, Hamburg	Agar-Agar
Fermentas GmbH, St. Leon-Rot www.fermentas.de	Restriktionsenzyme, GeneRuler 1kb DNA Ladder (SM0311), MassRuler (SM403), dNTP's, SAP, Rapid DNA Ligation Kit, 6x Loading Dye
Invitrogen™, Carlsbad www.invitrogen.com	SuperScript III Reverse Transkriptase Kit
Megazyme International Ltd., Wicklow, Irland, www.megazyme.com	D-Xylose Kit, D-Lactic Acid (D-Lactate) and L-Lactic Acid (L-Lactate) Kit
Merck KGaA, Darmstadt www.merckgroup.com	Proteinase K, Chloramphenicol
New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, www.neb.com	<i>Haell</i>
OXOID GmbH, Wesel www.oxid.com	Reinforced Clostridial Agar (RCA), Anaerobic Indicator BR55
PeqLab Biotechnologies GmbH, Erlangen, www.peqlab.de	peqGOLD Gel Extraction Kit, <i>Pwo</i> -Polymerase, 10x <i>Pwo</i> Puffer
Promega GmbH, Mannheim, www.promega.com	Butyryl-CoA
Roche GmbH, Mannheim www.roche.de	DNA Molecular Weight Marker II, DIG-labeled Blocking Reagenz, DIG DNA Labeling Kit, Hexokinase/Glukose-6-Phosphat-DH

SGE Analytical Science Pty Ltd, Milton Keynes, www.sge.com	GC Autosampler Spritze
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, www.sigma-aldrich.de	Ampicillin, Thiamphenicol, Oligonukleotide, TargeTron™ Gene Knockout System, DTNB, Natrium-Butyrat, TEMED, Crotonyl CoA

Tab. 2.8: Bezugsquellen-Geräte und Materialien

Firma	Produkte
AMERSHAM Buchler GmbH, Braunschweig, www.amershamhealth.de	Ultrospec 3000
Analytik Jena AG, Jena, www.analytik-jena.de	Spekol 1100, Spekol 1200
Biometra GmbH, Göttingen www.biometra.com	Power Pack P 25, Mini-Gelkammern, PCR-Zyklus, Hybridisierungssofen, Nitrozellulosemembran
BIORAD GmbH, München, www.bio-rad.de	Gene Pulser™II
Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, www.biozym.com	PCR-Zyklus
Braun AG, Melsungen www.bbraun.de	Sterile Spritzen
CARL ROTH GmbH & Co. KG, Karlsruhe, www.carlroth.com	Spritzen, Kanülen
Eppendorf AG, Hamburg www.eppendorf.de	Thermomixer comfort
Fisher Scientific GmbH, Schwerte www.de.fishersci.com	Vortex Gene-2
Heraeus Instruments GmbH, Osterode, www.heraeus.de	Biofuge Fresco, Biofuge 28 RS, Rotor 3746
Hielscher Ultrasonic GmbH, Teltow www.hielscher.com	Hielscher UP200S
Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, www.kendro.com	Sorvall RC 5C Plus Zentrifuge, Rotor SLA-3000, Sterilbank Herasafe
Meintrup DWS Laborgeräte GmbH, Löhden – Holte, www.meintrup-dws.de	MACS-MG-500/MG-1000-anaerobic workstation
New Brunswick Scientific, Enfield, CT, USA www.nbsc.com	Brutschrank innova 4230
Müller&Krempel AG, Bülach, www.muellerundkrempel.ch	Müller&Krempel Flaschen
OCHS Laborfachhandel e. K., Bovenden, www.labor-ochs.de	Hybridisierungs-, Hungaterörchen,
Olympus, Hamburg www.olympus.de	CH2-Phasenkontrastmikroskop IX-70-Mikroskop
SARSTEDT AG&Co, Nürnberg www.sarstedt.com	Petrischalen, 15-ml-Röhrchen, 50-ml-Röhrchen, Einmalspatel, Einmalimpföse, Sterilfilter Porengröße 0,2 µm
Sartorius AG, Göttingen, www.sartorius.de	BIOSTAT® B PLUS TWIN FERMENTOR
Schleicher und Schuell BioScience GmbH, Dassel	Whatman® Papier, Nylonmembran
Schütt Labortechnik GmbH, Göttingen, www.schuett-biotec.de	Wasserbad
SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH,	Rotor 121500

Taufkirchen, www.sigmaldrich.com

SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Osterode
am Harz, www.sigma-zentrifugen.de

TECHNE AG, Jahnsdorf www.biostep.de

WTW Wissenschaftlich-Technische
Werkstätten GmbH, Weilheim
www.wtw.de

METTLER TOLEDO GmbH; Giessen
www.mt.com

Tischkühlzentrifuge Sigma 3K-30

Techne CL-508 UV-Illuminator

pH Meter pH526

pH Meter Seven Easy

3 Ergebnisse

3.1 Mutationsstrategie

Das Prinzip des „Metabolic Engineering“ durch Modifikation des Stoffwechsels und damit biochemischen Reaktionen mit Hilfe der rekombinanten DNA-Technologie zu verändern beziehungsweise aufzuklären, ist der Grundgedanke dieser Arbeit. Um die Funktion eines Gens zu klären, ist es naheliegend dieses auszuschalten und den veränderten Phänotyp zu untersuchen. Die genetische Unzugänglichkeit von *C. acetobutylicum* machte dieses bis vor kurzem noch so gut wie unmöglich. Wie eingangs erwähnt, gab es zwar die Möglichkeit Transposons zu nutzen, jedoch ist deren Integration in das Genom rein zufällig (WOOLLEY *et al.*, 1989). So wie die homologe Rekombination, mit zeitweise instabilen Mutanten und einer geringen Integrationseffizienz, diese Lücke nicht füllen konnte (GREEN *et al.*, 1996), erwiesen sich antisense RNA Strategien, mit der Möglichkeit die Genexpression zu vermindern, nicht als das Mittel der Wahl (DESAI & PAPOUTSAKIS, 1999; KAIZHI *et al.*, 2011). Mit der Sequenzierung des kompletten Genoms von *C. acetobutylicum* im Jahr 2001 (NÖLLING *et al.*, 2001), eröffneten sich neue Möglichkeiten. Auf Grund der vorliegenden Sequenzinformation ließ sich 2007 die Anpassung des LI.LtrB Gruppe II Intron von *Lactococcus lactis* für die Verwendung einer direkten Geninaktivierung in *C. acetobutylicum* realisieren (HEAP *et al.*, 2007). Bei dem Gruppe II Intron handelt es sich um ein beachtenswertes mobiles Element, das sich in Protein- und RNA-kodierende Gene integriert und in Prokaryoten sowie in den Organellen von Eukaryoten vorkommt (KARBERG *et al.*, 2001). Der Mechanismus der selbständigen genspezifischen Insertion des mobilen Gruppe II Introns wird als Retrohoming bezeichnet (YAO *et al.*, 2005). Bestehend aus dem Intron-kodierten Protein (IEP), das eine Reverse Transkriptase-, eine RNA Splicing- sowie eine DNA Endonuklease-Aktivität aufweist, bildet das Gruppe II Intron zusammen mit der Intron RNA den Ribonukleoprotein (RNP) Komplex. Dieser ist notwendig für die Erkennung der DNA-Zielsequenz. Dabei erfasst das IEP zu Beginn eine geringe Anzahl von festen Positionen in der DNA und löst lokale DNA-Entwindungen aus. Dies ermöglicht der Intron RNA eine Basenpaarung mit den anliegenden 14 bis 16 Nukleotide einzugehen (ZHONG *et al.*, 2003). Mittels Reversen

Splicing integriert die Intron RNA direkt in den Einzelstrang der doppelsträngigen Wirts-DNA, während das IEP aufgrund der DNA Endonuklease Aktivität den komplementären Strang spaltet und das 3' Ende als Primer für die Reverse Transkription der inserierten Intron RNA nutzt (FRAZIER *et al.*, 2003). Abschließend erfolgt die Integration der Intron cDNA durch wirtseigene DNA Rekombinations- oder Reparaturenzyme (ESKES *et al.*, 1997; COUSINEAU *et al.*, 1998). Der offene Leserahmen der normalerweise für das IEP kodiert, besitzt keine strukturelle Funktion und konnte folglich innerhalb des Mutagenese-Vektors (Anhang, Abb.: 7.1) durch einen Retrotranspositionaktivierten selektiven Marker (RAM) ausgetauscht werden.

Tab. 3.1: Hergestellte Insertionsmutanten. Die in dieser Arbeit erstellten Integrierten sind in dieser tabel zusammengefasst. Die Zahl im Namen der Stämme deutet den Insertionsort des Gruppe II Introns im Zielgen an. Alle Integrierten konnte nach einmaliger Elektroporation erzielt werden, mit Ausnahme der *ptb*-Integrierte, die erst nach der zweiten Elektroporation detektiert werden konnte. Gene mit den Name CAC befinden sich auch dem Chromosom und CA_P auf dem Megaplasmid.

<i>C. acetobutylicum</i> Stämme	E-value	Zielgen	überprüften Ery ^R - <i>C. acetobutylicum</i> -Kolonien			Effizienz	Southern- Hybridisierung	RT- PCR
			Σ	Gen-Intron	Gen-Gen			
				PCR positiv	PCR positiv			
<i>hbd::int(69)</i>	0,026	CAC2708	75	3	3	4 %	✓	✓
<i>ptb::int(87)</i>	0,060	CAC3076	50	4	2	4 %	✓	✓
<i>pta::int(80)</i>	0,079	CAC1742	9	7	4	44,4 %	✓	✓
<i>ctfA::int(352)</i>	0,079	CA_P0163	14	7	1	7,1 %	✓	
<i>adc::int(180)</i>	0,010	CA_P0165	62	7	4	6,5 %	✓	
<i>pta::int(80)ΔRAM- ctfA::int(352)</i>	0,079/ 0,079	CAC1742/ CA_P0163	8	1	1	12,5 %	✓	
<i>pta::int(80)ΔRAM- adc::int(180)</i>	0,079/ 0,010	CAC1742/ CA_P0165	8	1	1	12,5 %	✓	
<i>adc::int(180)ΔRAM -pta::int(80)</i>	0,010/ 0,079	CA_P0165 /CAC1742	16	2	2	12,5 %	✓	
<i>ldh1::int(93)</i>	0,263	CAC0267	7	7	4	57,1 %	✓	
<i>ldh2::int(231)</i>	0,060	CAC3552	14	6	2	14,3 %	✓	
<i>adhE1::int(158)</i>	0,079	CA_P0162	6	5	3	50 %	✓	
<i>adhE2::int(114)</i>	0,087	CA_P0035	7	7	1	14,3 %	✓	

E-value ist das Maß für die theoretische Effizienz der Integration, die mit niedrigem E-Value steigt.

Bei dieser Strategie besitzt der selektive Marker seinen eigenen Promoter und ist durch ein *td* Gruppe I Intron unterbrochen, das die Resistenz inaktiviert. RAM ist in umgekehrter Richtung im Gruppe II Intron integriert. Während des Insertionsprozesses entsteht ein

RNA Intermediat, das dazu führt, dass das Gruppe I Intron in der richtigen Orientierung vorliegt um sich selbst aus der RNA herauszuspleißen. Beginnend mit der Insertion der Intron-mRNA in die Zielsequenz wird der codogene Strang synthetisiert. Jede daraus resultierende Erythromycin-resistente Kolonie ist eine Konsequenz der Insertion des Gruppe II Introns in das Chromosom beziehungsweise das Megaplasmid pSOI1 (ZHONG *et al.*, 2003). Gemäß der im Methodenteil beschriebenen Clostron-Methode konnten im Rahmen dieser Arbeit insgesamt 12 Integrationsstämme erzeugt werden. Die Effizienz der Insertion war dabei vergleichbar mit ähnlichen Forschungsergebnissen, die mindestens 2,5 % anführten (HEAP *et al.*, 2009). Wie aus der Tabelle 3.1 zu entnehmen ist, konnte kein Zusammenhang zwischen dem E-value und der Effektivität festgestellt werden, denn auch mit einem „schlechten“ E-value wurde bei der *ldh1*-Integrante eine Integrationswahrscheinlichkeit von über 50 % erzielt. Ebenso ist kein Unterschied zwischen chromosomalen und Megaplasmid-lokalisierten Genen ersichtlich. Alle Integranten konnten nach einmaliger Elektroporation detektiert werden. Bis auf die *ptb*-Integrante, dessen Herstellung erst nach der zweiten Elektroporation erfolgreich war. Alle Integranten wurde mittels Southern-Hybridisierung und einige ebenfalls mit der RT-PCR bestätigt. Davon ist *C. acetobutylicum hbd::int(69)* aufgrund seiner erstaunlichen Ethanolproduktion durch die Inaktivierung des C₄-Syntheseweges in eine Publikation miteingeflossen (LEHMANN & LÜTKE-EVERSLOH, 2011). Die Ergebnisse der Insertionsmutanten *C. acetobutylicum pta::int(80)*, *C. acetobutylicum ctfA::int(352)*, *C. acetobutylicum adc::int(180)* sind angesichts des Aceton-negativen und –reduzierten Phänotyps und der Erzeugung der Doppel-Integranten *C. acetobutylicum pta::int(80)ΔRAM-ctfA::int(352)* und *C. acetobutylicum pta::int(80)ΔRAM-adc::int(180)* in LEHMANN *et al.*, 2012 a veröffentlicht worden. Die Publikation des Butyrat-negative *C. acetobutylicum ptb::int(87)* Stammes erfolgte außerdem wegen der hohen ABE-Produktion durch pH-kontrollierte Fermentation in LEHMANN *et al.*, 2012 b.

3.2 Butyrat/Butanol negativer *C. acetobutylicum* Stamm

Butyrat und Butanol sind typische C₄-Produkte die während der Fermentation von *C. acetobutylicum* abgegeben werden. Zu Beginn wird Zucker über die Glykolyse zu Pyruvat abgebaut, dabei entstehen 2 mol ATP und 4 Elektronen in Form von NADH.

Pyruvat wird weiter zu Acetyl-CoA und CO₂ oxidiert. Die Verbindung Acetyl-CoA besitzt viel Energie und kann durch die Bildung von Acetat und Butyrat zusätzlich ATP liefern. Da Butyrat aus 2 Molekülen Acetyl-CoA entsteht, wird weniger ATP gewonnen. Jedoch kann über diesen Weg, zusätzlich zu der Produktion von H₂ über die Pyruvat Ferredoxin Oxidoreduktase (PFOR), NADH zu NAD⁺ reoxidiert werden. Während *C. acetobutylicum* in der exponentiellen Phase H₂, CO₂, Acetat und Butyrat produziert, sinkt der pH-Wert des Mediums (Acidogenese). Unter diesen Bedingungen, treten die Zellen in die stationäre Phase ein und es kommt im Metabolismus zum „Shift“ von der Säure- zur Lösungsmittelbildung (Solventogenese). Während der zweiten Phase der Fermentation werden die Säuren reassimiliert, was begleitend mit der ununterbrochenen Kohlenhydratnutzung in einem steigenden pH-Wert resultiert (JONES & WOODS, 1986). Während der Solventogenese enthalten die Reaktionsketten die an der Ethanol- und Butanolproduktion beteiligt sind, die reduzierenden Reaktionen um NADH zu reoxidieren (WANG *et al.*, 2010). Zum gleichen Zeitpunkt in dem die Solvetogenese einsetzt, wird die Sporulation initiiert. Die Signale oder molekularen Ereignisse für diesen scheinbar ineinandergreifende Prozess sind jedoch noch nicht aufgeklärt (GRIMMLER *et al.*, 2011). Somit scheint die Butyrat- und Butanolsynthese wichtige Aufgaben bei der Energiegewinnung, der Redoxbalance und möglicherweise auch Sporulation zu haben. Vor diesem Hintergrund erfolgte die Herstellung von *C. acetobutylicum hbd::int(69)*. Bei diesem Stamm ist die 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase (Hbd) inaktiviert um zu überprüfen wie essentiell die Bildung der C₄-Produkte für *C. acetobutylicum* sind.

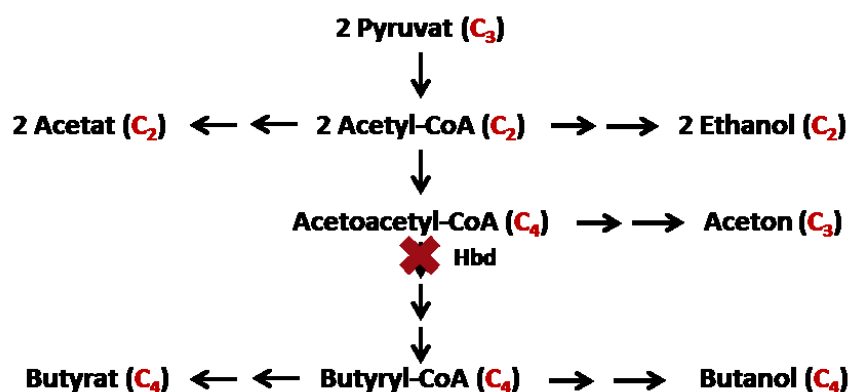


Abb. 3.1: Gärungsstoffwechsel von *Clostridium acetobutylicum*. Dargestellt sind die Fermentationsprodukte und den entsprechenden C-Körpern in rot. 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase (Hbd) ist in *C. acetobutylicum hbd::int(69)* inaktiviert (rotes Kreuz).

3.2.1 Herstellung einer *C. acetobutylicum hbd::int(69)* Integrierte

Um Hbd in *C. acetobutylicum* zu inaktivieren wurde das kürzlich etablierte ClosTron System (HEAP *et al.*, 2007) verwendet. Wie bereits beschrieben, erfolgte die Herstellung eines genspezifischen pMTL007C-E2-*hbd* Vektors, der nach der *in vivo* Methylierung (2.12.1.2) in *C. acetobutylicum* ATCC 824 elektroporiert wurde (2.12.2). Das PCR-Screening (2.13.3.1) ermöglichte eine adequate Überprüfung der Erythromycin-resistenten Kolonien. Bei der Gen-Intron PCR wurde der Hbd-Fw-Cfr9I und der Intron-spezifische EBS-Universal Primer verwendet. Die Insertion des Gruppe II Introns in das *hbd* Gen erfolgte nach dem 69. Bp mit einem E-Value von 0,026, da der EBS Universal Primer im Intron beim 254. Bp bindet, sollte bei der richtigen Integration ein Fragment von 323 Bp amplifiziert werden (Abb. 3.2A). Ebenso wurde eine Gen-Gen PCR durchgeführt, bei der genspezifische Primer (Hbd-Fw-Cfr9I und Hbd-Rev-BamHI) zur Anwendung kamen. Klone, bei denen es zu einer Integration des Gruppe II Introns kam, zeigten ein um dieses vergrößerte Fragment (2.6 kBp). Wohingegen die Amplifikation eines 849 Bp-Fragments die Größe des Wildtyp-Gen widerspiegelt (Abb. 3.2B). Insgesamt wurden im Zuge dieser Arbeit 75 Kolonien, aus einer Elektroporation, auf die Integration des Introns in das *hbd* Gen untersucht, jedoch konnte nur bei 3 Kolonien eine positive Gen-Intron und Gen-Gen PCR durchgeführt werden.

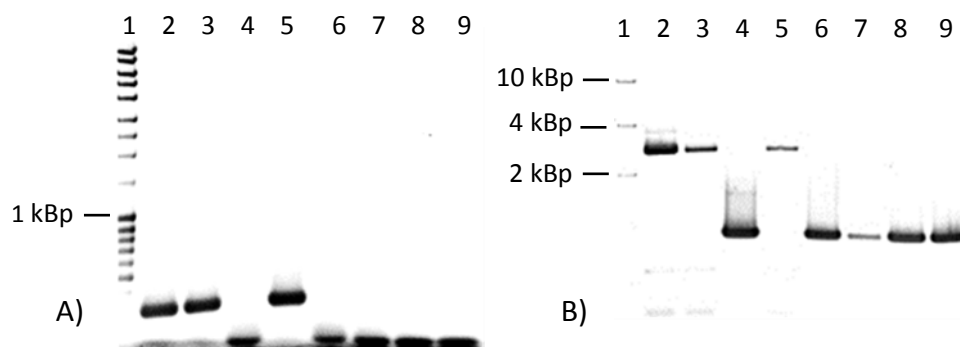


Abb. 3.2: Identifikation der Integration in *C. acetobutylicum hbd::int(69)* mittels PCR-Screening. A) Gen-Intron PCR. Spur 1: Größen- und Quantitätsmarker (MassRuler™ DNA Ladder-Mix); Spur 2 – 8: Erythromycin-resistente Klone; Spuren 2, 3 und 5: positive Klone. Spur 9: Wildtyp **B) Gen-Gen PCR** Spur 1: Größenmarker (FastRuler™ DNA Ladder High Range); Spur 2 – 9: siehe A.

Die Verifizierung der Ergebnisse erfolgte mittels Southern-Hybridisierung. *In silico*-Analysen zeigten für den Nachweis der Integration in das *hbd*-Gen Restriktionsschnittstellen der Enzyme *Ppu*MI oder *Ppu*MI in Kombination mit *Sac*I an. Nach der Isolierung der chromosomalen Wildtyp-DNA sowie der DNA von *C. acetobutylicum hbd::int(69)* (2.9.2) erfolgte die Hydrolyse mit den entsprechenden

Enzymen. Anschließend wurde dieser Restriktionsansatz in einem 1 %igem Agarosegel aufgetrennt und die Southern-Hybridisierung durchgeführt (2.11.2). Es konnten die durch *in silico*-Analyse angezeigten Fragmentgrößen durch Hybridisierung gegen eine genspezifische *hbd*-Sonde nachgewiesen werden. Für die Restriktion mit *Ppu*MI wurde demnach beim Wildtyp ein Fragment von 1,9 kBp und für die Integrate von 3,7 kBp detektiert; bei *Ppu*MI mit *Sac*I zeigte der Wildtyp ein Signal bei 1,5 kBp und *C. acetobutylicum hbd::int(69)* bei 3,3 kBp (Abb. 3.3). In der Tabelle 7.1 (Anhang) sind die verwendeten Restriktionsenzyme, Sonden und die *in silico* ermittelten Fragmentgrößen der einzelnen Southern-Hybridisierungen zusammengefasst. Der durch die Southern-Hybridisierung bestätigte *C. acetobutylicum hbd::int(69)* Stamm wurde für die weiteren Untersuchungen (RT-PCR, Wachstum, Enzymaktivitäten) verwendet. Um den Einfluss der Integration auf der Expressionsebene zu untersuchen wurde die RNA vom Wildtyp und der Integrate isoliert und eine Reverse Transkriptase PCR durchgeführt. Die Gen-Gen PCR mit der cDNA als Template zeigte, dass die mRNA des *hbd* Gens in *C. acetobutylicum hbd::int(69)* um das Gruppe II Intron vergrößert ist (Abb. 3.3B, Spur 7) und im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3.3B, Spur 6) nur eine sehr schwache Amplifikation aufweist.

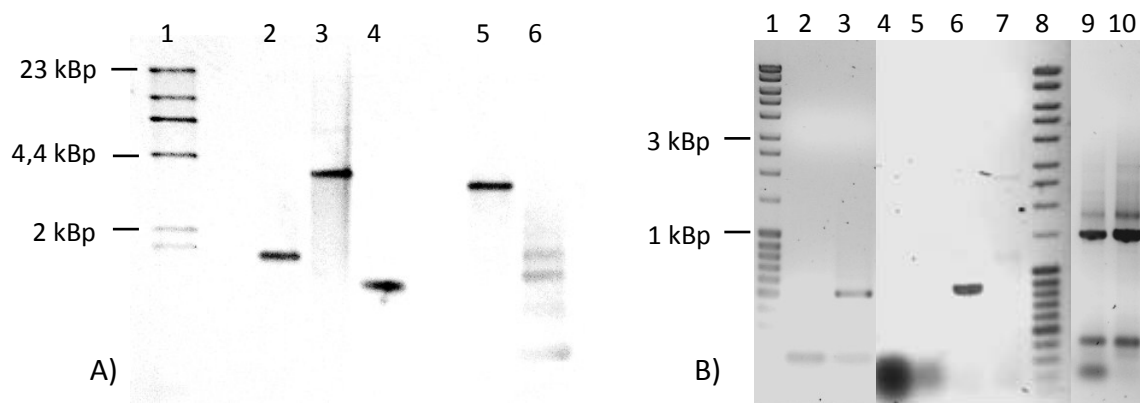


Abb. 3.3: Verifikation der Integration in *C. acetobutylicum hbd::int(69)* mittels A) Southern-Hybridisierung Spur 1: 100 ng DNA Molecular Weight Marker II (Roche); Spuren 2 und 3: chromosomale DNA des Wildtyps (2) und der *hbd*-Integrate (3) hydrolysiert mit *Ppu*MI; Spuren 4 und 5: Wildtyps (4) und *hbd*-Integrate (5) hydrolysiert mit *Ppu*MI und *Sac*I, Spur 6: *hbd* PCR Produkt. **B) Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)** Spuren 1 + 8: Größenmarker (MassRuler™ DNA Ladder-Mix); Spuren 2 und 3: Gen-Intron PCR mit cDNA des Wildtyps (2) und der *hbd*-Integrate (3); Spuren 4 und 5: Gen-Gen PCR mit RNA des Wildtyps (4) und der *hbd*-Integrate (5); Spuren 6 und 7: Gen-Gen PCR mit *hbd*-Oligonukleotiden und cDNA des Wildtyps (6) und der *hbd*-Integrate (7); Spuren 9 und 10: Eub-PCR mit cDNA des Wildtyps (9) und der *hbd*-Integrate (10).

Wie bei der Gen-Intron PCR wurden der genspezifische Hbd-Fw-Cfr9I und der intronspezifischen EBS-Universal Primer für die PCR mit der cDNA eingesetzt, was lediglich zur Amplifikation des Gen-Intron-Fragments bei der cDNA von *C. acetobutylicum hbd::int(69)* führte. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die Transkription durch das

Intron erschwert wird, jedoch prinzipiell erfolgt. Als Kontrolle diente zum einen die DNase behandelte RNA, um auszuschließen, dass die PCR-Resultate auf mitisolierte DNA zurückzuführen sind (Abb. 3.3B, Spur 4 und 5). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die RNA frei von DNA war und die Bandenintensität auf die Transkriptionsmenge des jeweiligen Gens zurückzuführen ist. Zum anderen kam es zur Verwendung von 16S rRNA-spezifischen Oligonukleotiden um zu gewährleisten, dass annähernd die gleiche Menge cDNA eingesetzt worden ist. Angesichts dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass es gelungen war die angestrebte *hbd*-Integrations-Mutante zu erzeugen.

3.2.2 Charakterisierung der 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase Integrationsmutante

3.2.2.1 Glucose Batch Fermentation

Die Inaktivierung der 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase im verifizierte *C. acetobutylicum hbd::int(69)* Stamm sollte einen veränderten Phänotyp hervorrufen, da zu vermuten ist, dass ohne eine aktive Hbd kein Butyrat oder Butanol gebildet wird. Für die Stammhaltung (2.5) wurde vor jeder physiologischen Charakterisierung eine Stammkultur der erzeugten Integrierte hergestellt. Da *C. acetobutylicum hbd::int(69)* Sporen bildet, erfolgte die Aufbewahrung der Sporensuspension im MS-MES Medium bei -20 °C und -80 °C. Diese diente als Ausgangsbasis für die Wachstumsversuche. Die 200-ml-MS-MES-Hauptkulturen wurden, wie unter 2.6 beschrieben inokuliert wobei in regelmäßigen Intervallen die Überprüfung der Parameter erfolgte (2.7). Besonders auffällig war dabei, dass sich *C. acetobutylicum hbd::int(69)* durch ein langsames Wachstum, gleichzeitig allerdings auch durch eine doppelt so hohe maximale optische Dichte stark vom Wildtyp unterschied (Tab.: 7.2). Es konnte aber keine veränderte Zellform festgestellt werden. Der pH-Verlauf beim Wildtyp zeichnete sich durch eine pH-Wert-Abnahme aufgrund der Säureproduktion während der exponentiellen Phase aus, anschließend kam es jedoch beim Übergang in die stationäre Phase durch die Reassimilation der Säuren und der Produktion der Lösungsmittel zu einem leichten pH-Anstieg. Dies wurde bei der *hbd*-Integrierten nur bedingt beobachtet (Abb.: 7.2). Wie beim Wildtyp stieg der pH-Wert wieder leicht an, sankt dann jedoch erneut ab. Die Analysen zeigten ein stark verändertes Produktspektrum.

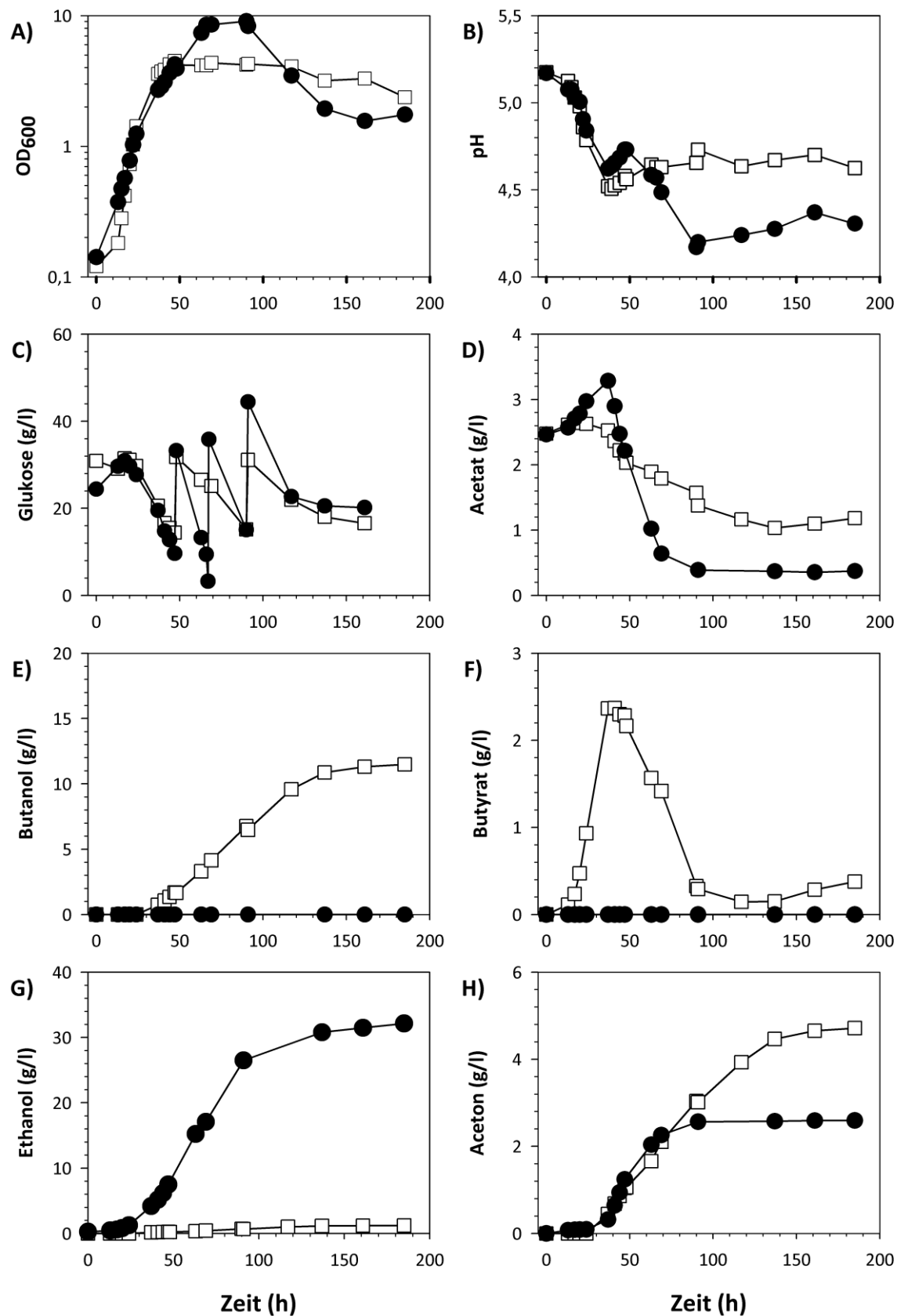


Abb. 3.4: Wachstumsphysiologische Charakterisierung von *C. acetobutylicum* ATCC 824 und *C. acetobutylicum* *hbd::int(69)* in einem Glukose-Fed-Batch-Kulturen (n=2). Die Kultivierung erfolgte in 200 ml MS-MES mit einer Ausgangskonzentration von 166 mM Glukose. In regelmäßigen Abständen wurde die optische Dichte und der pH-Wert bestimmt. □, *C. acetobutylicum* ATCC 824; ●, *C. acetobutylicum* *hbd::int(69)*.

Wie zu Beginn vermutet, konnte durch die Inaktivierung der Hbd die Bildung der C₄-Körper Butyrat und Butanol komplett inhibiert werden. Gleichzeitig wurde eine erhöhte Acetat-, nicht aber eine vermehrte Laktatproduktion (unter 1 mM) detektiert werden. Die ebenfalls detektierbare Acetatreassimilation schien mit der Bildung von Aceton zu korrelieren. Wie in der Abbildung 3.4 dargestellt, stagniert die Acetonbildung mit dem Ende der Acetatabnahme. *C. acetobutylicum hbd::int(69)* bildete ein Vielfaches an Ethanol (16,5 g/l im Vergleich zu 0,9 g/l beim Wildtyp) nicht aber an Aceton. Trotz der wahrscheinlichen Unterbrechung der C₄-Körper-Produktion im Gärungsstoffwechsel ist *C. acetobutylicum hbd::int(69)* weiterhin in der Lage zu wachsen, Aceton und Ethanol zu produzieren und zu sporulieren. Unter den gleichen Wachstumsbedingungen bildete der Wildtyp wie erwartet übliche Mengen an Butyrat und Butanol. Ebenso weicht das Produktspektrum nicht von den generellen Konzentrationen ab. Anhand der Glukosemessung ist in der Abbildung 7.2 ersichtlich, dass die Integrierte nach etwa 50 Stunden die komplette Energiequelle aufgebraucht hatte. Dies spiegelte sich in der Stagnation der Ethanol- und Acetonproduktion wieder. Zu diesem Zeitpunkt stieg beim Wildtyp die Lösungsmittelbildung noch weiter an. Mit Hilfe eines Fed-Batch-Versuches (2.6.2) sollte deshalb untersucht werden, ob die Ethanolproduktion von *C. acetobutylicum hbd::int(69)* durch Glukosezugabe während des Wachstums gesteigert werden kann. Zu diesem Zweck wurden 200-ml-Kulturen (MS-MES) mit einer Glukoseausgangskonzentration von 30 g/l mit dem Wildtyp und der Integrierte inokuliert. Wie zuvor erwähnt erfolgte eine regelmäßige Kontrolle der Parameter. Bei einer Konzentration von etwa 10 g/l Glukose wurde aus einer 50 %igen Stammlösung (w/v) erneut Glukose zugegeben um die Ausgangskonzentration (30 g/l) wieder zu erreichen. Dieser Versuchsverlauf schien keinen Einfluss auf die maximale optische Dichte zu haben und die pH-Entwicklung verlief, wie in den Experimenten zuvor, bei *C. acetobutylicum hbd::int(69)* abweichend vom Wildtyp. Die Wachstumsrate war bei beiden untersuchten Stämmen leicht verringert. Der Wildtyp zeigte unter den Fed-Batch Bedingungen kaum eine Veränderung im Produktspektrum, lediglich die Säurebildung steigerte sich von 3,7 g/l auf 5,1 g/l um fast 40 %, was vermutlich den pH-Wert auf 4,51 absenkte (Tab.: 7.2). Der Glukoseverbrauch war sogar niedriger als bei den normalen Batch Versuchen, was die Ausbeute der Lösungsmittel pro Glukose steigerte. Dahingegen konnte die Ethanolproduktion von *C. acetobutylicum hbd::int(69)* von 16,5 g/l auf 33.5 g/l verdoppelt

werden (Abb.: 3.4). Dies ging einher mit einem gleichzeitig erhöhten Glukoseverbrauch (von 56 auf 86 g/l). Wodurch keine Veränderungen in der Produktivität beziehungsweise Ausbeute festzustellen waren. Die ebenfalls untersuchten Acetat- und Acetonkonzentrationen während der Fed-Batch Fermentation zeigten eine geringe Zunahme. In der Abbildung 3.4 ist abermals die scheinbare Korrelation der Acetonbildung mit der Acetataufnahme ersichtlich, denn mit der Stagnation der Acetataufnahme nach 70 Stunden nimmt ebenfalls die Acetonbildung ab. Die Zugabe von Glukose während der Fed-Batch Fermentation zeigte beim Wildtyp keine signifikante Produktänderung. *C. acetobutylicum hbd::int(69)* nutzte die zusätzliche Glukose nicht um mehr Biomasse zu produzieren, sondern steigerte die Ethanolbildung um das Doppelte.

3.4.2.2 Kohlendioxid-/Wasserstoff-Messung

Vergleichbare Experimente ließen vermuten, dass durch den Eingriff in den Stoffwechsel nicht nur die Säure- und Lösungsmittelproduktion, sondern auch die Wasserstoff (H₂)- und Kohlendioxid (CO₂)-Bildung beeinflusst wurde (VASCONCELOS *et al.*, 1994; SHAW *et al.*, 2008). Infolgedessen erfolgte, in den der Arbeit zugrunde liegenden Versuchen, eine Gasvolumenbestimmung mittels Glaszylindern (2.7.9) und die Detektion von Wasserstoff und Kohlendioxid. Zusätzlich wurden wie üblich die anderen Parameter bestimmt (Abb.: 7.3). *C. acetobutylicum* ATCC 824 erreichte trotz einer geringeren maximalen optischen Dichte von 9, ein höheres Gesamt-Gasvolumen (730 ml) als die Integrierte *C. acetobutylicum hbd::int(69)*, welche trotz einer OD₆₀₀ von 11,6 nur 75 % des Gasvolumens bildeten (Abb.: 3.5). Nach etwa 45 Stunden blieb beim Wildtyp die produzierte Kohlendioxidmenge weitestgehend unverändert und erreichte nach 71 Stunden ihr Maximum (519 ml). Bei der Integrierten wurde erst nach 60 Stunden eine relativ konstante Konzentration gemessen und ebenfalls nach 71 Stunden konnte die Maximalkonzentration bei der Integrierten (424 ml) festgestellt werden. Die Kohlenstoffmenge der Integrierten entsprach demnach nur 80 % der Wildtypkonzentration. Ebenso wie die CO₂-Kurve im Vergleich zu *C. acetobutylicum* ATCC 824 einen flacheren Anstieg auf. Auffallender ist allerdings die geringe Wasserstoffmenge, die bei *C. acetobutylicum hbd::int(69)* detektiert werden konnte, diese entspricht mit maximal 75 ml nur etwa 35 % der vom Wildtyp produzierten Wasserstoffkonzentration. Zugleich unterscheidet sich der Verlauf der Wasserstoffproduktion. Bei *C. acetobutylicum* ATCC 824 war nach 15 Stunden Wachstum eine steigende Wasserstoffproduktion

messbar, welche nach circa 65 Stunden ihr Maximum von 211 ml H₂ erreichte und danach konstant blieb. Ursache für die geringe Abnahme war wahrscheinlich der Versuchsaufbau, da zum Ende der stationären Phase bei den Probenahmen Wasser aus den Zylindern in die Kultur gelangte. Die Wasserstoffproduktion bei *C. acetobutylicum hbd::int(69)* setzte ebenfalls nach circa 15 Stunden ein, jedoch konnte ein langsamerer Anstieg detektiert werden und der Höhepunkt der Wasserstoffproduktion war bereits nach 40 Stunden erreicht. Im Gegensatz zum Wildtyp kam es zu einer H₂-Abnahme, so dass nach 85 Stunden nur noch 20 ml Wasserstoff gemessen wurden.

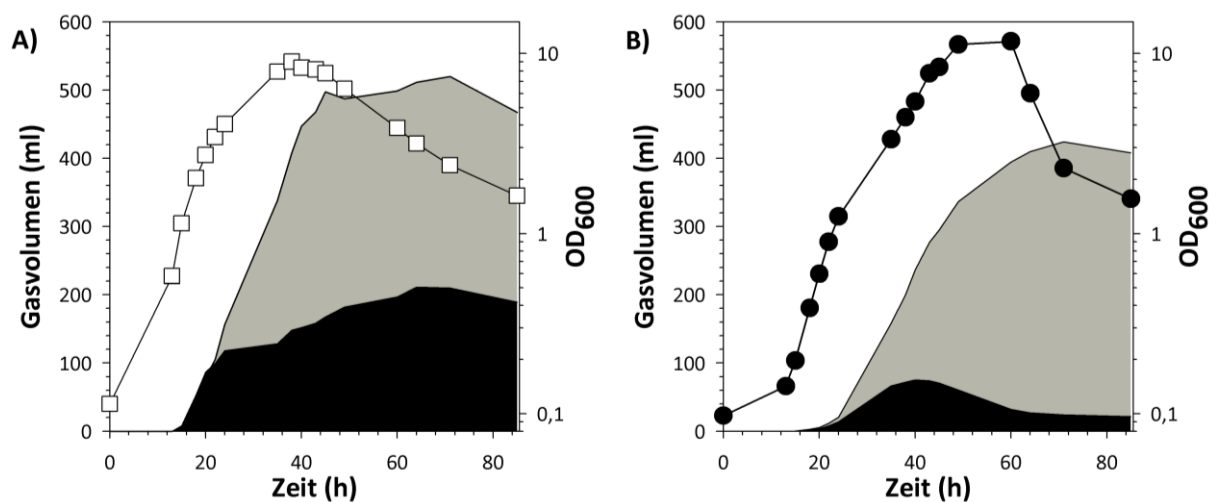


Abb. 3.5: H₂- und CO₂-Bildung bei *C. acetobutylicum* ATCC 824 und *C. acetobutylicum hbd::int(69)* in einer Glukose Batch Kultur (n=2). Das Gasvolumen der 100-ml-MS-MES-Kulturen wurde in Glaszylindern mittels Wasserverdrängung bestimmt. Die Detektion der Gase erfolgte gaschromatographisch. A) *C. acetobutylicum* ATCC 824; □,; schwarze Fläche, H₂; graue Fläche, CO₂; B) *C. acetobutylicum hbd::int(69)*; ●, OD₆₀₀; schwarze Fläche, H₂; graue Fläche, CO₂.

3.4.2.3 Xylose Batch Fermentation

Angesichts weltweiter Nahrungsknappheit ist die Alkoholproduktion aus Glukose fragwürdig und führt zu der Forderung nach alternativen C-Quellen. Lignocellulose ist ein weitverbreiteter erneuerbarer Rohstoff und die Verwendung von zum Beispiel Stroh oder landwirtschaftlicher Reste für die Biokraftstoffproduktion, hat hingegen einen geringen Einfluss auf die Lebensmittelversorgung hat. Neben Glukose ist Xylose reichlich in lignocellulosischer Biomasse vorhanden. (SIVAGNANAM *et al.*, 2011) Jedoch scheitert die effiziente Nutzung von Pflanzenresten derzeit an den wenigen Organismen, die Xylose fermentieren können.

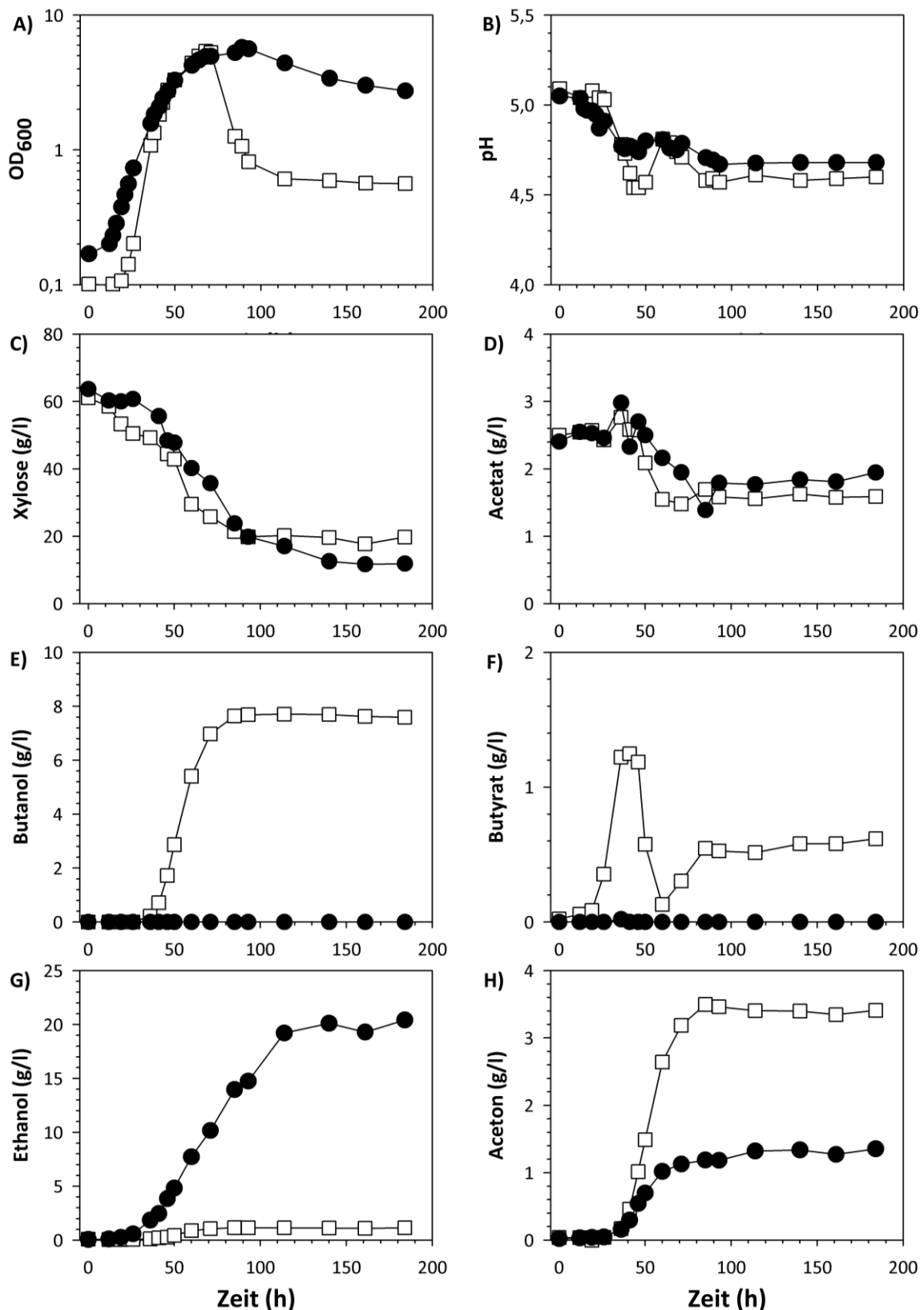


Abb. 3.6: Wachstumsphysiologische Charakterisierung von *C. acetobutylicum* ATCC 824 und *C. acetobutylicum* *hbd::int(69)* in einer Xylose-Batch-Kultur (n=3). Die Kultivierung erfolgte in 200 ml MS-MES mit einer Ausgangskonzentration von 60 g/l Xylose. In regelmäßigen Abständen erfolgte die Bestimmung der Parameter. □, *C. acetobutylicum* ATCC 824; ●, *C. acetobutylicum* *hbd::int(69)*.

Saccharomyces cerevisiae wird aufgrund der hohen Ethanolproduktion und Toleranz universell für die industrielle Ethanolbildung eingesetzt, dennoch können die nativen *S. cerevisiae* Stämme Xylose nicht nutzen (WATANABE *et al.*, 2007; KRAHULEC *et al.*, 2010). *C. acetobutylicum* ist hingegen eines der wenigen Mikroorganismen, das in der Lage ist Xylose als Energiequelle zu verwenden (OUNINE *et al.*, 1985).

Aufgrund der hohen detektierten Ethanolkonzentration in *C. acetobutylicum hbd::int(69)*, lag es nahe zu testen, ob bei Xylose als C-Quelle vergleichbare Werte erzielt werden können. Dazu wurden Wachstumsversuche in 200 ml MS-MES mit Xylose als C-Quelle durchgeführt. Der Wildtyp zeigte auf den ersten Blick keine Veränderung des Wachstums, obwohl nur Xylose als Energiequelle vorlag. Die optische Dichte und der minimale pH-Wert waren gering herabgesetzt. *C. acetobutylicum hbd::int(69)* erreichte jedoch mit Xylose nicht die maximalen optischen Dichten die mit Glukose erzielt werden konnten ($OD_{600} = 5,8$). Jedoch zeigte sich ein veränderter Wachstumsverlauf. Zuvor konnte beobachtet werden, dass nach dem Erreichen der maximalen optischen Dichte, diese in der stationären Phase drastisch abnahm (Vergleich, Abb.: 3.4A). Mit Xylose hingegen blieb die OD_{600} in der stationären Phase über den gesamten verbleibenden Wachstumsverlauf konstant. Im Gegensatz wurde diese Abnahme nun bei *C. acetobutylicum* ATCC 824 beobachtet (Abb.:3.6A). Ebenso zeigte der Wildtyp beim Wachstum in MS-MES mit Xylose einen anderen pH-Verlauf. Zuvor konnte nur bei *C. acetobutylicum hbd::int(69)* beobachtet werden, dass nach dem pH-Anstieg, bedingt durch die Reassimilation der Säuren, eine erneute pH-Abnahme eintrat. Mit Xylose als Energiequelle zeigte auch der Wildtyp dieses Erscheinungsbild. Dahingegen ist die Differenz der Abnahme bei der Integrierte (Abb.: 3.6A) nicht so groß wie beim Wildtyp oder bei den Batch-Kulturen mit Glukose. Die Acetat- und Butyratkonzentrationen sind bei *C. acetobutylicum* ATCC 824 und *C. acetobutylicum hbd::int(69)* vergleichbar mit denen, die in Glukose Batch Fermentation erzielt werden konnten (Tab.: 7.2 und 7.3). Auffallend war hingegen die Dezimierung der Aceton- und Butanolbildung um 20 % und 30 % beim Wildtyp, somit lag die Ausbeute bei 0,2 g Butanol/g Xylose. Im Gegensatz dazu stieg die Ethanolbildung bei *C. acetobutylicum hbd::int(69)* um 20 % von 16,5 g/l auf 20,5 g/l mit einer Ausbeute von 0,41 g/g Xylose. Der Wildtyp zeigte nur eine sehr geringe Ethanolzunahme von 0,9 g/l auf 1,2 g/l. Zusammenfassend konnte bewiesen werden, dass *C. acetobutylicum hbd::int(69)* unter den gewählten Bedingungen in der Lage ist ohne den

C₄-Pfad des Zentralenstoffwechsels die Acidogenese, die Aceton- und Ethanolbildung sowie die Sporulation durchzuführen. Dabei konnte in allen Untersuchungen der Butyrat- und Butanol-negative Phänotyp bestätigt werden, der immer mit einer drastisch erhöhten Ethanolproduktion einherging. Obwohl nur wenige Organismen fähig sind Xylose als C-Quelle zu nutzen, konnte bei *C. acetobutylicum hbd::int(69)* eine Ethanolsteigerung um 20 % detektiert werden. Der in der Industrie für die Ethanolherstellung verwendete Organismus *S. cerevisiae* ist, trotz der Erzeugung verschiedener rekombinanter *S. cerevisiae* Stämme, bisher nicht einsetzbar um aus Xylose als C-Quelle annähernd vergleichbare Ethanolmengen zu produzieren wie *C. acetobutylicum hbd::int(69)* (WATANABE *et al.*, 2007; KRAHULEC *et al.*, 2010).

3.2.3 Biochemische Charakterisierung

3.2.3.1 Charakterisierung auf Enzymebene

Um Vertiefend die Auswirkung der Inaktivierung von Hbd zu klären, erfolgten verschiedene Enzymaktivitätsmessungen. Zum einen war es erforderlich die Inaktivierung von *hbd* auch auf der Enzymebene nachzuweisen und dessen Einfluss auf die umgebenden Enzyme im Stoffwechsel zu klären, zum anderen sollte überprüft werden welche der zu untersuchenden Dehydrogenase (BdhA, BdhB, AdhE1, AdhE2) für die erhöhte Ethanolbildung verantwortlich sein könnte. Die Vorbereitung des zellfreien Proteinextraktes, die Konzentrationsbestimmung und die Aktivitätsbestimmung der verschiedenen Enzyme erfolgte wie unter 2.15 beschrieben. Dabei musste beachtet werden, dass die Messung der Ethanol und Butanol Dehydrogenaseaktivitäten im Gegensatz zur Thiolase-, Hbd- und Crotonaseaktivitäten anaerob zu erfolgen hatte (DÜRRE *et al.*, 1987; HARTMANIS & GATENBECK, 1984).

Anhand der erhaltenen Enzymdaten (Tab. 3.2) ist zu erkennen, dass die Aktivität von Hbd in *C. acetobutylicum hbd::Int(69)* im Vergleich zu *C. acetobutylicum* ATCC 824 (12,52 U/mg) um 99,6 % reduziert wurde und somit die Inaktivierung durch das Gruppe II Intron auch auf Proteinebene bestätigt werden konnte. Die restliche Aktivität von 0,05 U/mg könnte durch die ebenfalls im Genom vorkommende 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase (CAC2009) bedingt sein (NÖLLING *et al.*, 2001). Die Hbd-Inaktivierung scheint den Metabolitenfluss im Stoffwechsel negativ zu beeinflussen. So wurde für die Thiolase (Thl) eine Aktivitätsminderung um 98,7 % von 37,6 U/mg (Wildtyp) auf

0,48 U/mg in der Integrierte ermittelt und die Crotonaseaktivität (Crt) sank in *C. acetobutylicum hbd::Int(69)* um 99,8 % auf 0,16 U/mg, während im Wildtyp eine Aktivität von 100,84 U/mg detektiert werden konnte. Die möglichen Ursachen werden später diskutiert.

Ein besonderes Augenmerk galt der möglichen Ursache für die gesteigerte Ethanolbildung auf enzymatischer Ebene. Dabei war es wichtig die unterschiedlichen möglichen Aktivitäten mit Enzymtest differenziert zu erfassen. Zu diesem Zweck wurden C₂- und C₄-Alkohol-Dehydrogenasen unter Zugabe von NADPH oder NADH als Co-Substrat untersucht. Um die Ethanol-Dehydrogenase-Aktivität zu bestimmen, erfolgten die Verwendung von Acetaldehyd als Substrat und jeweils NADPH bzw. NADH als Co-Enzyme.

Tab. 3.2: Enzymaktivitäten von *C. acetobutylicum* ATCC 824 und *C. acetobutylicum hbd::Int(69)*. Die spezifische Aktivität (U/mg) wurde spektrophotometrisch aerob bzw. anaerob mit dem zellfreien Extrakt gemessen.

Enzyme	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	<i>C. acetobutylicum hbd::Int(69)</i>
	Spezifische Aktivität (U/mg)	Spezifische Aktivität (U/mg)
Thiolase (Acetyl-CoA Acetyltransferase) [EC 2.3.1.9]	37,6 ± 3,74	0,48 ± 0,06
3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase (Hbd) [EC 1.1.1.35]	12,52 ± 1,22	0,05 ± 0,02
Crotonase (L-3-Hydroxyacyl-CoA Hydrolyase) [EC 4.2.1.17]	100,84 ± 21,9	0,16 ± 0,1
Ethanol-Dehydrogenase, NADPH-abhängig [EC 1.1.1.2]	0,061 ± 0,027	0,062 ± 0,012
Ethanol-Dehydrogenase, NADH-abhängig [EC 1.1.1.1]	0,013 ± 0,014	0,059 ± 0,016
Butanol-Dehydrogenase, NADPH-abhängig [EC 1.1.1.2]	0,103 ± 0,041	0,098 ± 0,026
Butanol-Dehydrogenase, NADH-abhängig [EC 1.1.1.1]	0,015 ± 0,003	0,112 ± 0,018

Die Ethanol-Dehydrogenasen, die NADPH als Cofaktoren verwenden zeigten unter den gewählten Bedingungen keinen Unterschied bei *C. acetobutylicum hbd::Int(69)* (0,062 U/mg) im Vergleich zum Wildtyp (0,061 U/mg). Stattdessen wurde bei NADH spezifischen ADH-Aktivität eine Steigerung von 0,013 U/mg im Wildtyp auf 0,059 U/mg in *C. acetobutylicum hbd::Int(69)* festgestellt. Unter Berücksichtigung der Standardabweichung kann von einer Vervielfachung ausgegangen werden. Ein ähnliches Resultat zeigte sich bei den Aktivitätsbestimmungen der Butanol-Dehydrogenasen mit der Nutzung von Butyraldehyd als Substrat. Diente NADPH als Coenzym, wurde zwar eine

höhere Aktivität als bei den Ethanol-Dehydrogenasen sichtbar, jedoch gab es keine große Differenz zwischen *C. acetobutylicum* ATCC 824 (0,103 U/mg) und *C. acetobutylicum hbd::Int(69)* (0,098 U/mg). Indes konnte erneut eine große Divergenz zwischen Wildtyp und Integrierte bei der Nutzung des Coenzym NADH nachgewiesen werden. Dementsprechend zeigte *C. acetobutylicum hbd::Int(69)* eine 7-fach erhöhte Dehydrogenase-Aktivität (0,112 U/mg) als der Wildtyp (0,015 U/mg). Grundsätzlich konnte bei *C. acetobutylicum hbd::Int(69)* eine höhere NADH-abhängige Ethanol- als auch Butanol-Dehydrogenase-Aktivität nachgewiesen werden, während die Dehydrogenase-Aktivitäten mit NADPH keinen Unterschied zwischen *C. acetobutylicum* ATCC 824 und *C. acetobutylicum hbd::Int(69)* erkennen ließen.

3.2.3.2 Charakterisierung auf Translationsebene

Impliziert durch die vorangehenden Ergebnisse stellte sich die Frage, ob in *C. acetobutylicum hbd::Int(69)* bereits auf der Transkriptionsebene der untersuchten Enzyme ein Unterschied zum Wildtyp feststellbar war. Aus diesem Grunde wurden RT-PCRs mit isolierter und in cDNA umgeschriebener RNA durchgeführt. Die Probenahme erfolgte während einer Wachstumscharakterisierung bei einer optischen Dichte von 1, um die Transkriptionsmenge der Thiolase, Crotonase und der vier meist untersuchten Alkohol-Dehydrogenasen (*bdhA*, *bdhB*, *adhE1*, *adhE2*) in der exponentiellen Phase zu überprüfen. Darin konnten für die Thiolase, Crotonase und Butyryl-CoA-Dehydrogenase keine Veränderung auf der Transkriptionsebene festgestellt werden (Abb. 7.4). Bis auf geringfügige Abbauprozesse, die mehrfach bei der Thiolase beobachtet werden konnten (Abb.:7.4 A, Spur 3). Da bei den Aktivitätsmessungen (Tab. 3.2) eine starke Reduktion der Thiolase und Crotonaseaktivität bei *C. acetobutylicum hbd::Int(69)* im Vergleich zu *C. acetobutylicum* ATCC 824 festgestellt wurde, muss der Regulationsmechanismus auf Proteinebene stattfinden. Unterschiede in der Transkriptionsmenge zeigten sich im Falle der untersuchten Alkohol-Dehydrogenase-Gene. Während die Butanol-Dehydrogenase A (CAC3299) keine Veränderung des Transkriptionssignal zwischen *C. acetobutylicum* ATCC 824 und *C. acetobutylicum hbd::Int(69)* aufwies, zeigte die Transkriptmenge der Butanol-Dehydrogenase B (CAC3298) in der Integrierte eine leichte Verminderung (Abb. 7.4B, Spur 2 und 6). Auffallender sind dagegen die Transkriptionsunterschiede bei der Alkohol-Dehydrogenase E (CAP0162). Der Wildtyp zeigte zum Zeitpunkt der RNA-Probenahme ($OD_{600} = 1$) ein stark erhöhtes Transkriptionssignal des *adhE1* Gens, welches jedoch in

der Integrierte drastisch reduziert war. Demgegenüber konnte in *C. acetobutylicum* ATCC 824 in der exponentiellen Phase kein Transkriptionssignal der Alkohol-Dehydrogenase E2 (CAP0035) detektiert werden. Bei *C. acetobutylicum hbd::Int(69)* wurde überdies eine höhere Transkriptmenge von *adhE2* als bei *adhE1* nachgewiesen. Jedoch war dieses wesentlich schwächer als das der Gene *bdhA* und *bdhB*. Zusammenfassend konnte für *bdhA* und *bdhB* keine Transkriptionsdivergenz in *C. acetobutylicum hbd::Int(69)* vergleichend zum Wildtyp nachgewiesen werden. Interessant ist jedoch, dass das entsprechend starke Transkriptionssignal der NADPH-abhängigen AdhE1 des Wildtyps in der Integrierte komplett fehlt und im Gegensatz die NADH-abhängigen Alkohol Dehydrogenase (*BdhA*, *BdhB* und *AdhE2*) (WALTER *et al.*, 1992; FONTAINE *et al.*, 2002) in den Enzymmessungen ein stärkeres Signal wiedergaben, obwohl keine signifikante Erhöhung auf dem Transkriptionslevel in der Integrierten ersichtlich war.

3.3 Butyrat negativer *C. acetobutylicum* Stamm

Im vorangehenden Abschnitt konnte gezeigt werden, dass mit der Manipulation eines einzelnen Gens der C₄-Stoffwechsel komplett unterbrochen wurde. Aufbauend auf diesen Ergebnissen sollte nun untersucht werden, welchen Effekt die Inaktivierung der Synthese des C₄-Körpers Butyrat hat.

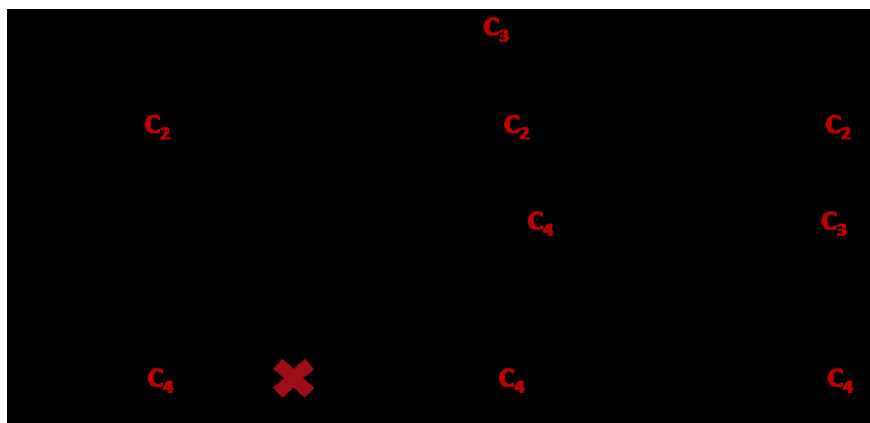


Abb. 3.7: Gärungsstoffwechsel von *Clostridium acetobutylicum*. Dargestellt sind die Fermentationsprodukte und den entsprechenden C-Körpern in rot. Phosphotransbutyrylase (Ptb) ist in *C. acetobutylicum ptb::int(87)* inaktiviert (rotes Kreuz).

Die in einem Operon organisierten Gene kodieren für Ptb (Phosphotransbutyrylase) und Buk (Butyratkinase). Diese Enzyme nutzen Butyryl-CoA, ein Schlüsselintermediat im primären Metabolismus von *C. acetobutylicum*, das sowohl für die Bildung von Butyrat aber auch Butanol verwendet wird (WALTER *et al.*, 1993). Im Folgenden sollte untersucht

werden, ob durch die Inaktivierung der Butyratsynthese die Butanolkonzentration gesteigert werden kann.

3.3.1 Herstellung einer *C. acetobutylicum ptb::int(87)* Integrate

Analog zu der Erzeugung der *hbd*-Integrate (s. 3.2.1) wurde ein *ptb*-spezifischer pMTL007C-E2 Vektor hergestellt. Nach der Elektroporation des Vektors in *C. acetobutylicum* ATCC 824, erfolgte das PCR-Screening möglicher Integrate unter Ausnutzung der *ptb*-spezifischen Primer (*ptb*-Fw und -Rev). Wie exemplarisch bei *C. acetobutylicum hbd::Int(69)* gezeigt, wurden Gen-Intron und Gen-Gen PCRs durchgeführt. Nach zwei unabhängigen Transformationen konnten durch das Screening zwei von 50 untersuchten Kolonien als Integrate detektiert werden (Abb. 7.5A). Der Integrationsnachweis einer dieser positiven Kolonien erfolgte auf DNA-(Southern-Hybridisierung) und RNA-Ebene (RT-PCR) (Abb. 7.6) und wird nachfolgend als *C. acetobutylicum ptb::int(87)* bezeichnet. Wie bei *C. acetobutylicum hbd::Int(69)* konnte in der *ptb*-Integrate durch die Southern-Hybridisierung und der RT-PCR ein um das Gruppe II Intron vergrößertes Fragment nachgewiesen werden (s. Abb.: 7.6A, B). In *C. acetobutylicum ptb::int(87)* zeigte das Amplifikat der RT-PCR im Gegensatz zur *hbd*-Integrate die gleiche Transkriptionsintensität wie das *ptb*-Gen im Wildtyp. Ergänzend wurde der Einfluss des Introns auf das mit im Operon lokalisierte *buk*-Gen untersucht. Dabei konnte keine signifikante Divergenz in der Transkription zwischen dem Wildtyp und der *ptb*-Integrate festgestellt werden. Die Resultate der Southern Hybridisierung und der RT-RNA bestätigen einerseits die Integration des Gruppe II Introns in *ptb*, jedoch nicht die Inaktivität.

Aus diesem Grund erfolgte ebenfalls die Aktivitätsbestimmung von Ptb und Buk. Wie in der Tabelle 3.3 ersichtlich, führte die Insertion zu einem drastischen Aktivitätsverlust der Ptb von über 99 % von 1,8 U/mg (Wildtyp) auf 0,013 U/mg. Ebenso konnte bei der Butyratkinase eine Aktivitätsminderung um 77 % von 31,17 U/mg auf 7,15 U/mg detektiert werden. Um sicherzustellen, dass die geringere Aktivität in *C. acetobutylicum ptb::Int(87)* nicht durch Fehler in der Herstellung des zellfreien Extrakts oder der Aktivitätsmessung bedingt waren, erfolgte die Aktivitätsmessung der Acetatkinase. Dieses Enzym katalysiert dieselbe Reaktion wie die Butyratkinase, jedoch mit Acetylphosphat als Substrat (Abb.: 1.1). Diese Messung zeigte eine vergleichbare Acetatkinase-Aktivität in *C. acetobutylicum* ATCC 824 und *C. acetobutylicum ptb::Int(87)*. Des Weiteren wurde die

Aktivität der Thl und Crt bestimmt um den Einfluss der Inaktivierung des Butyratweges auf die vorangehenden Enzyme zu untersuchen. Auffallend war die drastische Reduktion der Thiolase-Aktivität um 97 % und der Crotonase um 65 % (Tab.: 3.3).

Tab. 3.3: Enzymaktivität von *C. acetobutylicum* ATCC 824 und *C. acetobutylicum* *ptb::Int(87)*. Die spezifische Aktivität (U/mg) wurde spektrophotometrisch und aerob mit dem zellfreien Extrakt gemessen.

Enzyme	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 Spezifische Aktivität (U/mg)	<i>C. acetobutylicum</i> <i>ptb::Int(87)</i> Spezifische Aktivität (U/mg)
Thiolase (Acetyl-CoA Acetyltransferase) [EC 2.3.1.9]	37,6 ± 3,74	1,23 ± 0,2
Crotonase(L-3-Hydroxyacyl-CoA Hydrolyase) [EC 4.2.1.17]	100,84 ± 21,9	35,62 ± 5,66
Phosphotransbutyrylase [EC 2.3.1.19]	1,80 ± 0,59	0,013 ± 0,007
Butyratkinase [EC 2.7.2.7]	31,17 ± 3,32	7,15 ± 1,21
Acetatkinase [EC 2.7.2.1]	47,83 ± 3,03	43,42 ± 5,43

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass es gelungen ist im Zuge dieser Arbeit eine *C. acetobutylicum* *ptb::int(87)* Integrate herzustellen und diese mittels PCR, Southern-Hybridisierung und zusätzlich auf RNA sowie enzymatischer Ebene zu bestätigen.

3.3.2 Charakterisierung der Phosphotransbutyrylase Integrationsmutante

3.3.2.1 Glukose Batch Fermentation

Zur Analyse des Phänotyps wurden zu Beginn Glukose Batch Fermentationen in 200 ml MS-MES (mod.) durchgeführt. Um die Säureproduktion der Integrate optimal untersuchen zu können, wurde dem Medium kein Acetat zugesetzt. An diesen Ergebnissen ließen sich drastische Abweichungen zum Wildtyp detektieren. Zum einen zeigte *C. acetobutylicum* *ptb::Int(87)* ein reduziertes Wachstum ($0,15 \text{ h}^{-1}$) und erreichte lediglich eine optische Dichte von 3,1. Unter den gleichen Bedingungen wurden für den Wildtyp eine Wachstumsrate von $0,24 \text{ h}^{-1}$ und eine maximale optische Dichte von 7,2 bestimmt. Diese Diskrepanz spiegelte sich auch in dem um 60 % verringerten Glukoseverbrauch der *ptb*-Integrenten wieder. In ähnlichen Untersuchungen mit asRNA zeigte die Mutante keine so starke Wachstumsreduktion (DESAI *et al.*, 1999). Allerdings konnte bei der asRNA Mutante wie bei der *ptb*-Integrate eine stark verringerte

Lösungsmittelproduktion (Tab.: 7.4; Aceton: 0,1 g/l; Ethanol: 0,3 g/l; Butanol: 2,8 g/l) beobachtet werden. Daraus resultierte eine erhöhte Acetatproduktion von fast 4 g/l (Abb. 3.8). Durch die Inaktivierung von *Ptb* wurde keine Butyratproduktion, dafür aber eine gesteigerte Laktatbildung über die Acidogenese hinaus detektiert (Abb. 3.8). Der pH-Verlauf der *ptb*-Integrante war abweichend zu *C. acetobutylicum* ATCC 824 und zeigte keine pH-Zunahme sondern lediglich einen drastischen Abfall auf einen Wert von bis zu 4,43. Im Gegensatz zu vorangegangenen Experimenten mit nicht-replikativen Plasmiden (GREEN *et al.*, 1996) und asRNA (DESAI, *et al.*, 1999) ist es erstmalig gelungen, die Butyratbildung mit der Manipulation des *ptb* Gens komplett zum Erliegen zu bringen.

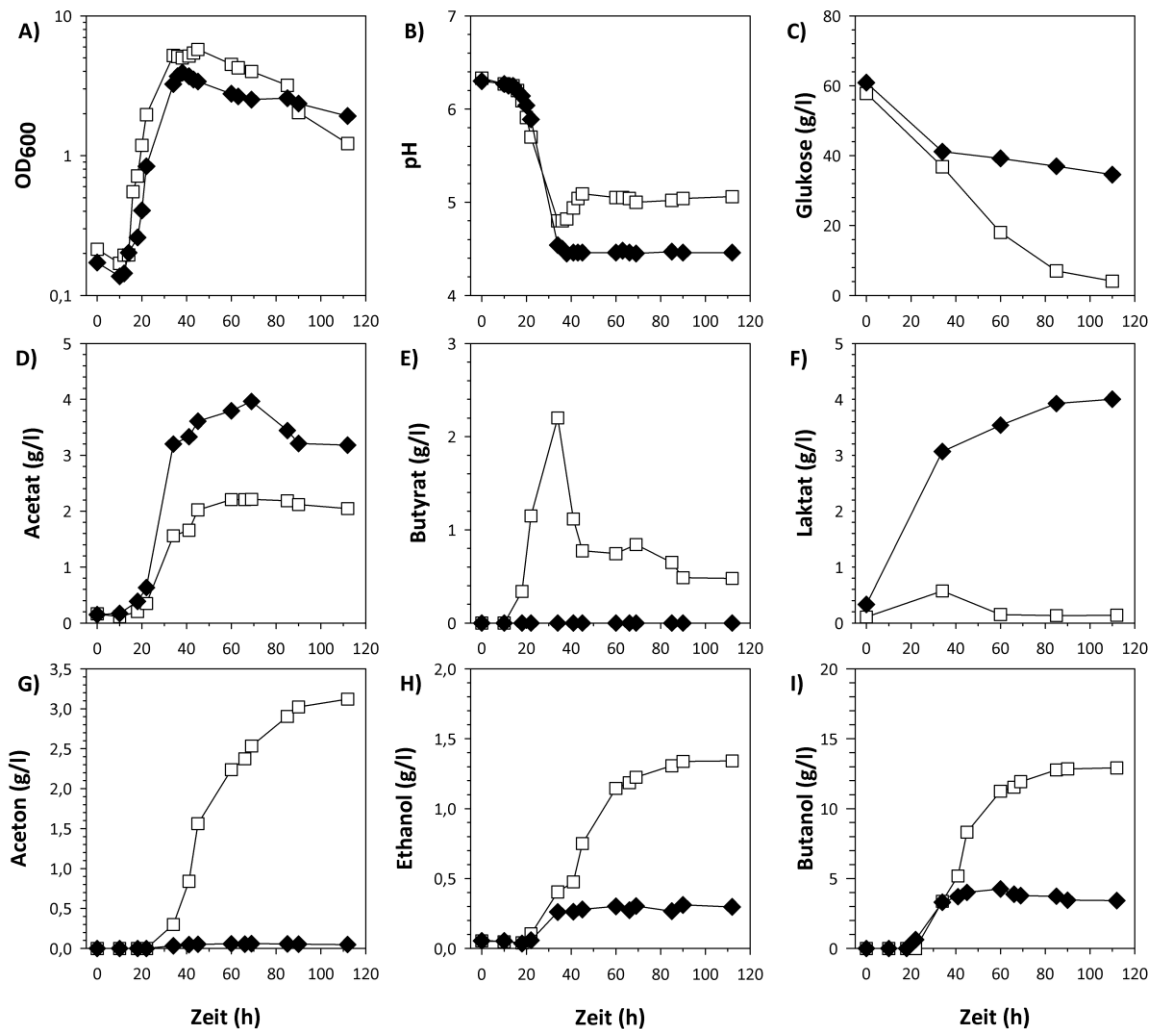


Abb. 3.8: Wachstumsphysiologische Charakterisierung von *C. acetobutylicum* ATCC 824 und *C. acetobutylicum ptb::int(87)* in einem Glukose-Batch-Versuch. Die Kultivierung erfolgte in 200 ml MS-MES ohne Acetat. In regelmäßigen Abständen wurde die optische Dichte und der pH-Wert bestimmt. Glukose- und Laktatkonzentrationsbestimmung erfolgte enzymatisch und die der Fermentationsprodukte gaschromatographisch. □, *C. acetobutylicum* ATCC 824; ◆, *C. acetobutylicum ptb::int(87)*.

3.3.2.2 pH-kontrollierte Fermentation

Wachstumsversuche im 200-ml-Maßstab mit manueller pH-Kontrolle ließen vermuten, dass die geringe Lösungsmittelbildung ein Resultat des sogenannten „Acid Crash“ ist, der überdies mit erhöhter Laktatkonzentration in Verbindung gebracht wurde (WANG, *et al.*, 2011). Bei einem „Acid Crash“ kommt es zu einem Übermaß an Säureproduktion ohne einen signifikanten „Switch“ zur solventogenen Phase (MADDOX, *et al.*, 2000). Wie aus der Abbildung 3.8 zu entnehmen ist, erfolgte während der physiologischen Charakterisierung der Nachweis von bis zu 4 g/l Laktat in der *ptb*-Integrante. Durch manuelle KOH-Zugabe nach Erreichen des pH-Minimums konnte die Butanol- um 24 % und die Ethanolproduktion um fast 150 % gesteigert werden (Abb. 7.7). Zur besseren pH-Kontrolle wurde die *ptb*-Integrante vergleichend mit dem Wildtyp in einem BIOSTAT® B PLUS TWIN FERMENTOR in 1,5 l MS-MES mit Acetat angezogen. Diese Durchführung gestattete eine kontinuierliche pH-Kontrolle und bietet die Möglichkeit ein pH-Minimum gezielt festzulegen. Die Kultur wurde mit einer in der exponentiellen Phase befindlichen 200 ml-MS-MES-Vorkultur angeimpft und der anfängliche pH-Wert auf 6,0 eingestellt. Zu Beginn erfolgte die Festlegung des pH-Minimums auf 5,5. Dies führte interessanterweise bei *C. acetobutylicum ptb::Int(87)* zu einer Erhöhung der Ethanolproduktion auf 11,1 g/l (Tab. 3.4), obwohl bei *C. acetobutylicum* ATCC 824 eine höhere Säure- und überdies eine geringere Lösungsmittelbildung beobachtet wurde als in 200-ml-MS-MES ohne pH-Kontrolle. Wie bereits in Phosphat-limitierten kontinuierlichen Kulturen gezeigt werden konnte bleibt die Kultur bei einem pH von 5,7 in der Acidogenese (JANSSEN, *et al.*, 2010). Aus diesem Grund wurde draufhin das pH-Minimum auf 5,0 festgelegt. Beim Wildtyp konnte dadurch die ABE-Konzentration von 10,1 g/l auf 20,8 g/l erhöht werden, desweiteren sank die Säureproduktion von 14,3 g/l auf 8,8 g/l. Das gleiche Phänomen wurde auch für die *ptb*-Integrante beobachtet. Durch die Festsetzung des pH-Minimums auf 5,0 konnte eine Ethanolproduktion von 13,3 g/l detektiert werden. Gleichzeitig wurde eine Zunahme in der Butanol- und Acetonbildung gemessen, die obendrein über der Konzentration des Wildtyps bei einem pH von 5,5 lag. Unter allen Bedingungen konnte in *C. acetobutylicum ptb::Int(87)* nie Butyrat gemessen werden. Anstelle dessen stiegen die Acetat- und Laktatkonzentrationen an. Im Gegensatz zu den Batch Versuchen ohne pH-Kontrolle respektive bei einem pH-Wert von 5,5 wurde bei 5,0 eine dem Wildtyp vergleichbare Reassimilation von Acetat in der *ptb*-Integrante nachgewiesen. In der 1,5 l

Batch Kultur der *ptb*-Integrierten war bereits nach 30 Stunden die komplette Glukose aufgebraucht, dies ging einher mit der Stagnation der Lösungsmittelproduktion. Um diesen limitierenden Faktor zu eliminieren erfolgte eine Fed-Batch Fermentation (Tab. 3,4; Anhang, Abb. 7,10) bei einem pH von mindestens 5,0. Sofern eine Glukosekonzentration von circa 20 g/l gemessen wurde, erfolgte eine Zugabe von weiteren 40 g/l. Glukose. Der erhöhte Glukoseverbrauch von *C. acetobutylicum ptb::Int(87)* (102 g/l) deutete auf eine gesteigerte Produktbildung hin, jedoch traf dies nur auf Laktat und Ethanol zu. Die Ethanolkonzentration stieg bis auf 32,5 g/l, wodurch eine Ausbeute von 0,32 $\text{g}_{\text{Ethanol}}/\text{g}_{\text{Glukose}}$ erzielt wurde. Unterdessen konnte eine Zunahme der maximalen optischen Dichte von 9,35 (ohne Fed-Batch) auf 11,7 beobachtet werden und dennoch wurde bei der Acetat-, Aceton- und Butanolkonzentration eine Abnahme verzeichnet. Trotz des Glukoseverbrauchs bis 130 Stunden nach Inokulation konnte nur bis zu 65 Stunden eine Ethanolzunahme nachgewiesen werden, nach 120 Stunden zeigte die Aceton- und Butanolkonzentration einen leichten Anstieg und bei den Säuren Laktat und Acetat wurde nach ungefähr 90 Stunden ein erneuter Mengenanstieg detektiert.

Tab. 3.4: Fermentation unter pH-Kontrolle. Dargestellt sind die wichtigsten Parameter der vergleichenden pH-kontrollierter Wachstumsversuche zwischen *C. acetobutylicum* ATCC 824 und *C. acetobutylicum ptb::Int(87)* (in der Tabelle mit *ptb::Int* und Aceton, Butanol, Ethanol mit ABE abgekürzt).

<i>C. acetobutylicum</i>	pH \geq 5,5		pH \geq 5,0		pH \geq 5,0; Fed-Batch	
	ATCC 824	<i>ptb::Int</i>	ATCC 824	<i>ptb::Int</i>	ATCC 824	<i>ptb::Int</i>
Parameter:						
Wachstumsrate μ (h^{-1})	0,3	0,13	0,24	0,16	0,28	0,16
max. OD ₆₀₀	11,3	10,2	8,2	9,35	10	11,7
max. Acetat (g/l)	5,7	7,9	4,3	5,7	3,6	4,8
max. Butyrat (g/l)	7,6	0	4,3	0	3,8	0
max. Laktat (g/l)	1,0	1,8	0,2	1,0	0,3	6,5
max. Aceton (g/l)	1,8	1,7	6,9	5,9	6,3	4,8
max. Ethanol (g/l)	1,2	11,1	2,0	13,3	1,9	32,5
max. Butanol (g/l)	7,1	6,9	11,9	8,4	12,4	7,9
ABE (g/l)	10,1	19,7	20,8	27,5	20,6	45,1
Glukoseverbrauch (g/l)	63	61	59	61	82	102
Ausbeute ($\text{g}_{\text{ABE}}/\text{g}_{\text{Glukose}}$)	0,161	0,322	0,355	0,454	0,252	0,444
Ausbeute ($\text{g}_{\text{Ethanol}}/\text{g}_{\text{Glukose}}$)	0,019	0,181	0,034	0,218	0,023	0,319
max. Produktivität ($\text{g}_{\text{Ethanol}}/\text{l/h}$)	0,089	0,519	0,060	0,971	0,060	1,097
Ausbeute ($\text{g}_{\text{Butanol}}/\text{g}_{\text{Glukose}}$)	0,113	0,113	0,204	0,139	0,152	0,077
max. Produktivität ($\text{g}_{\text{Butanol}}/\text{l/h}$)	0,548	0,430	0,900	0,535	0,765	0,487

Diese drastische Produktsteigerung konnte für den Wildtyp in der Fed-Batch Fermentation nicht beschrieben werden. Trotz erhöhter OD_{600} wurde für die Säure-, Aceton- und Ethanolbildung sowie für die Butanolmenge bezogen auf die optische Dichte eine Reduktion detektiert. Was sich ebenfalls in den Ausbeuten für die Lösungsmittel ($0,252 \text{ g}_{\text{ABE}}/\text{g}_{\text{Glukose}}$), für Ethanol ($0,023 \text{ g}_{\text{Ethanol}}/\text{g}_{\text{Glukose}}$) und Butanol ($0,152 \text{ g}_{\text{Butanol}}/\text{g}_{\text{Glukose}}$) in der Tabelle 3.4 widerspiegelt. Durch die externe pH-Kontrolle konnte bei *C. acetobutylicum ptb::int(87)* ein drastisches Absinken des pH-Wertes verhindert werden. Dadurch stieg die Konzentration der Lösungsmittel, was vermuten ließ, dass zuvor in den pH-unkontrollierten Batch-Versuchen ein „Acid Crash“ stattfand.

3.3.2.3 Butyrat Fed Batch Fermentation

Erstmalig ist es gelungen, neben der *hbd*-Integrante, durch die Integration eines Gruppe II Introns in das *ptb* Gen, die Butyratbildung vollständig zu inhibieren. Es stellte sich die Frage, inwiefern die Zugabe von externem Butyrat das Produktspektrum der *ptb*-Integrante beeinflussen würde, da das fehlende Buttersäuresignal den Wechsel von Acidogenese zu Solventogenese unterdrücken könnte (BAHL *et al.*, 1982). In früheren Experimenten konnte durch Butyratzugabe die Konzentration von Butanol und Aceton gesteigert werden (HÜSEMANN *et al.*, 1989) und auch TUMMALA *et al.* nutzte diese Vorgehensweise 2003 um die intrazelluläre Butyryl-CoA Konzentration und somit das Butanol/Ethanol Verhältnis zu erhöhen. Die Kultivierung erfolgte in 200 ml MS-MES mit Acetat, bei einer OD_{600} von annähernd 3 bis 4, wurden 10, 20, 30 beziehungsweise 40 mM Butyrat zugegeben. Dieser Zeitpunkt in der exponentiellen Phase wurde gewählt, da *C. acetobutylicum* ATCC 824 sich dann normalerweise in der Butyratproduktion befindet. Über den gesamten Wachstumsverlauf erfolgten Probenahmen um die optische Dichte, den pH-Wert sowie die Glukose-, Laktat- und Produktkonzentration bestimmen zu können. Dabei stellte sich heraus, dass sowohl beim Wildtyp (Abb.: 3.9) als auch bei der *ptb*-Integrante (Abb.: 3.10) eine Abnahme der Butyratkonzentration festgestellt werden konnte. Die Zugabe von 40 mM Butyrat schien hingegen einen toxischen Effekt auf die Zellen des Wildtyps und der *ptb*-Integrante zu haben. Infolgedessen kam es zu einem drastischen Abfall der optischen Dichte und der Stagnation der Reassimilation der Säuren und der Lösungsmittelproduktion. *C. acetobutylicum* ATCC 824 zeigte nach dem Puls von 10 mM bzw. 20 mM keine veränderte Reassimilation von Acetat, nach der Zugabe von 30 mM verringerte sich die Acetataufnahme fast um die Hälfte und die Aceton- als auch

die Butanolbildung verlangsamte sich. Bei *C. acetobutylicum ptb::int(87)* sankt mit zunehmender Butyratkonzentration die Reassimilation von Acetat und dennoch fiel der pH-Wert nach der Butyratzugabe von 10 mM (End-pH-Wert: 4,35) stärker ab als nach 30 mM (End-pH-Wert: 4,56).

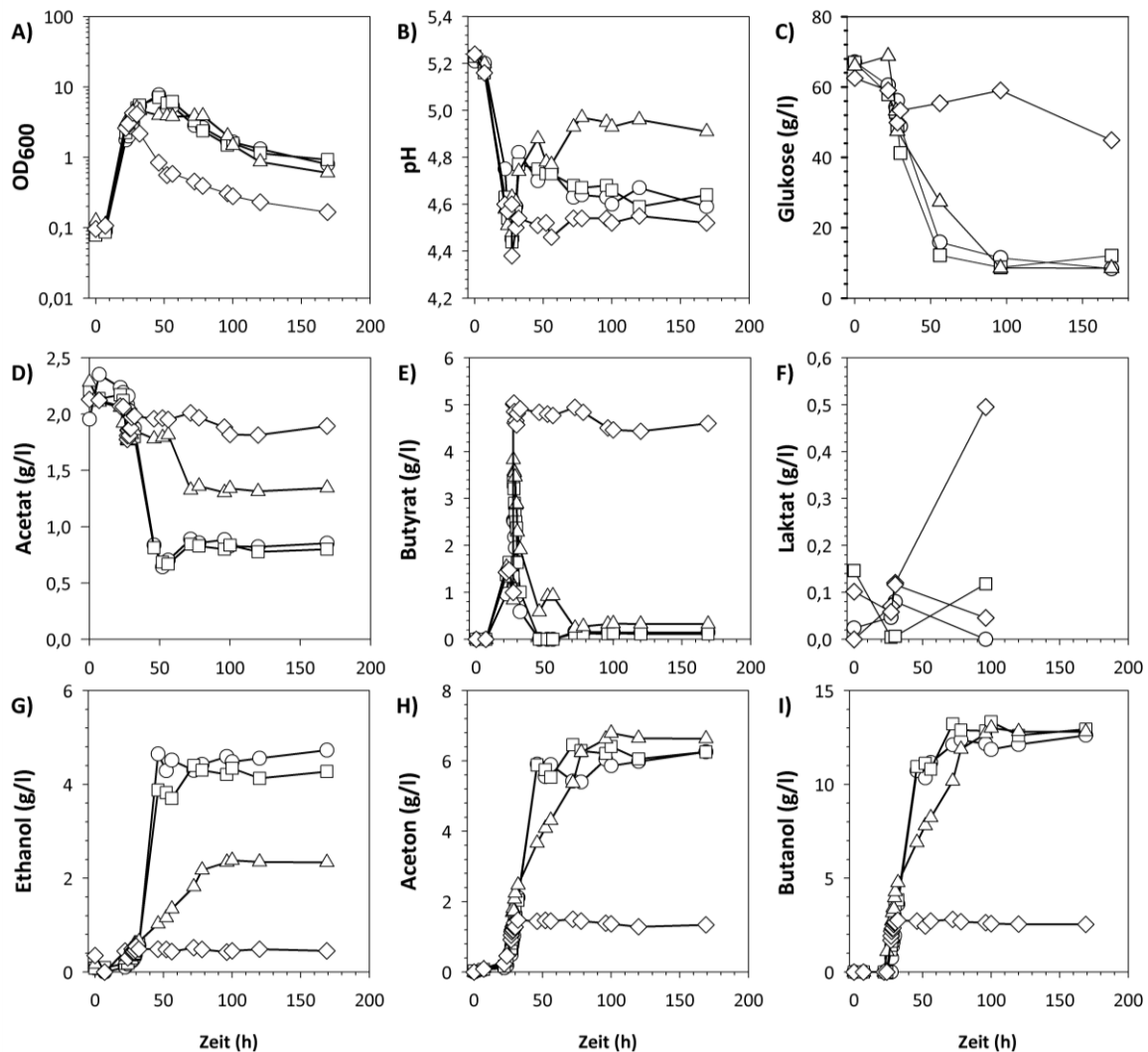


Abb. 3.9: Butyrat Fed Batch Fermentation von *C. acetobutylicum* ATCC 824 (n=1). Die Kultivierung erfolgte in 200 ml MS-MES mit Acetat. Bei einer OD₆₀₀ von 3 erfolgte die Zugabe von 10 mM Butyrat, ○; 20 mM Butyrat, □; 30 mM Butyrat, △; 40 mM Butyrat, ◇.

Das Hinzufügen von Butyrat führte mit zunehmender Konzentration außerdem zur Abnahme der maximalen optischen Dichte. Ebenso konnte beim Wildtyp eine Reduktion der Ethanol- und eine leichte Zunahme bei der Butanolproduktion nachgewiesen werden, was zu einem erhöhten Butanol/Ethanol-Verhältnis von 2,7/1 (10 mM Butyrat) auf 5,3/1 (30 mM Butyrat) führte (Tab. 7.5). Bei der *ptb*-Integrante kam es hingegen zu keiner Verschiebung des Butanol/Ethanol-Verhältnis. Erstaunlicherweise bewirkte alleine der Butyratimpuls bei *C. acetobutylicum ptb::int(87)* eine drastische Ethanolproduktion von

über 30 g/l, bezogen auf die abnehmende maximale optische Dichte war ebenfalls eine sehr geringe Konzentrationszunahme bei Butanol und Aceton zu verzeichnen. Schlussendlich konnte bei *C. acetobutylicum* *ptb::int(87)* durch pH-kontrollierte Fermentation die gleiche Menge an Lösungsmitteln (Tab. 3.4; Wildtyp: 19,7 g/l, *ptb*-Integrante: 20,6 g/l; ABE - Aceton, Butanol, Ethanol) und bei der Fed-Batch Fermentation sogar mehr als das doppelte erzielt werden (Wildtyp: 20,8 g/l, *ptb*-Integrante: 45,1 g/l). Durch einen einfachen Butyratpuls wurde eine fast doppelt so hohe ABE-Produktion (41,2 g/l) in *C. acetobutylicum* *ptb::int(87)* erzielt wie im Wildtyp (24 g/l).

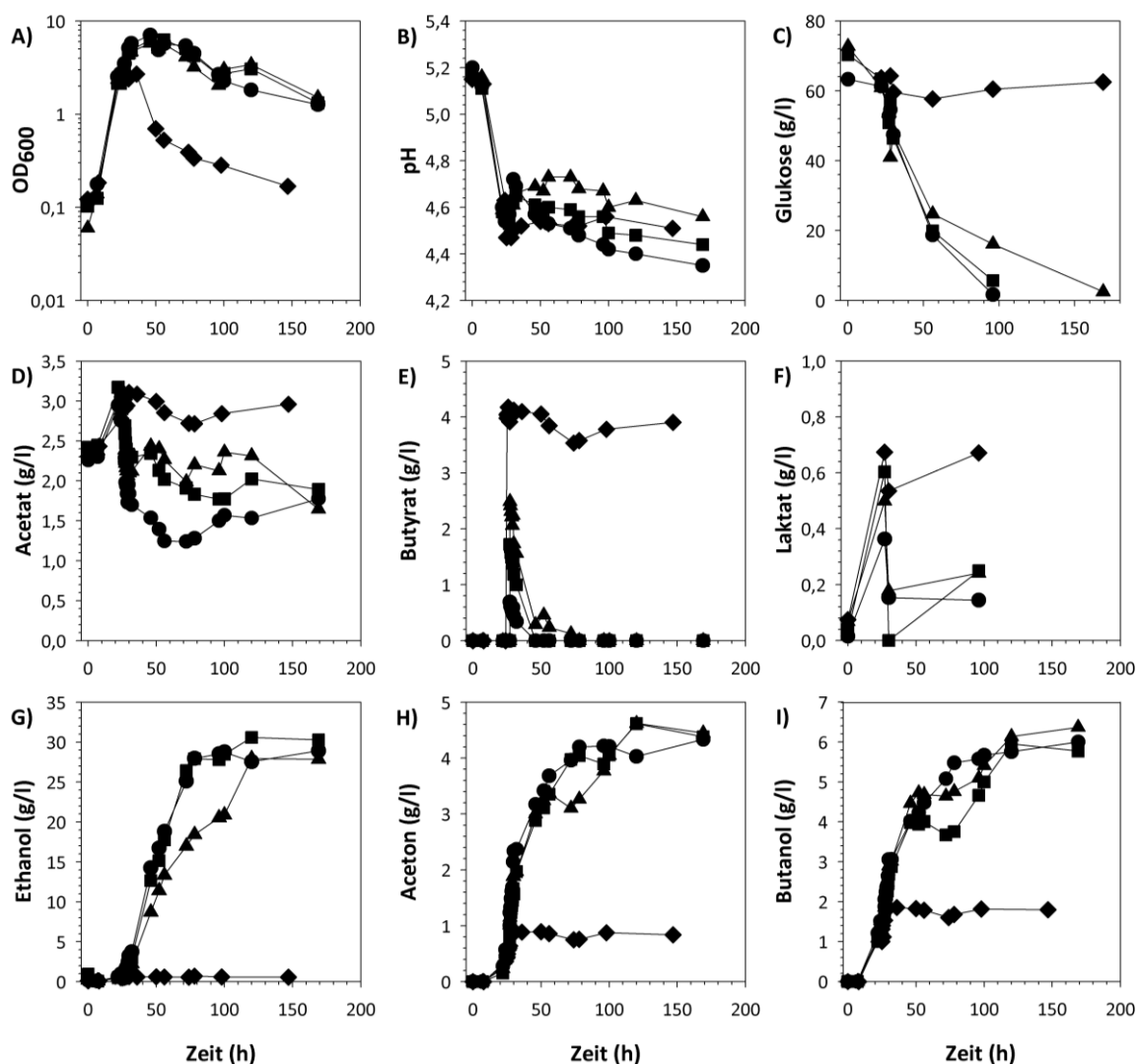


Abb. 3.10: Butyrat Fed Batch Fermentation von *C. acetobutylicum* *ptb::int(87)* (n=1). Die Kultivierung erfolgte in 200 ml MS-MES mit Acetat. Bei einer OD_{600} von 3 erfolgte die Zugabe von 10 mM Butyrat, ●; 20 mM Butyrat, ■; 30 mM Butyrat, ▲; 40 mM Butyrat, ◆.

3.4 Untersuchung des Acetat- und Aceton-Stoffwechsels

Der komplexe Gärungsstoffwechsel von *C. acetobutylicum* liefert aufgrund einer Vielzahl an Verzweigungen C₂- (Acetat und Ethanol) C₃- (Aceton) und C₄- Produkte (Butyrat und Butanol). Nachdem zuerst der C₄-Weg untersucht wurde, liegt nun der Fokus auf dem Syntheseweg zum C₂-Körper Acetat und dem C₃-Körper Aceton. Mit Hilfe der Integrationsmutanten soll geklärt werden, ob sich durch das Inaktivieren der Enzyme Phosphotransacetylase (Pta), Acetoacetyl-CoA:Acetat/Butyrat:CoA-Transferase (CtfA/B) oder Acetoacetat-Decarboxylase (Adc) ein Acetat- und Aceton-negativen Phänotyp erzeugen lässt und dies vielleicht die Steigerung der Butanolkonzentration ermöglicht.

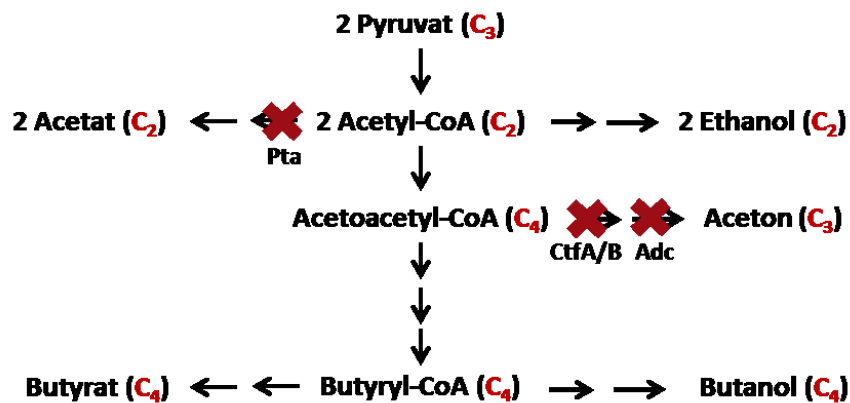


Abb. 3.11: Gärungsstoffwechsel von *Clostridium acetobutylicum*. Dargestellt sind die Fermentationsprodukte mit den entsprechenden C-Körpern in rot. Phosphotransacetylase (Ptb) ist in *C. acetobutylicum* *ptb::int(87)* inaktiviert (rotes Kreuz), Acetoacetyl-CoA:Acetat/Butyrat:CoA-Transferase (CtfA/B) ist in *C. acetobutylicum* *ctfA::int(352)* und Acetoacetat-Decarboxylase (Adc) ist in *C. acetobutylicum* *adc::int(180)* inaktiviert.

3.4.1 Herstellung von Acetat- und Aceton- negativen Integranten

Um die Acetatbildung genau untersuchen zu können, sollte eine Integrierte erstellt werden, die eine funktionslose Phosphotransacetylase aufweist. Zu diesem Zweck wurde zu Beginn ein *pta*-spezifischer pMTL007C-E2 Vektor angefertigt. Wie bei der *hbd*-Integrierte erfolgte nach der Elektroporation in *C. acetobutylicum* das PCR-Screening mittels Gen-Intron und Gen-Gen PCR (Abb.: 7.11) Von den vier positiv getesteten Kolonien wurde ein Klon weiter verwendet und durch Southern-Hybridisierung bestätigt (Abb.: 7.12A) Die per *in silico* Analyse ermittelten Restriktionsenzymen und per Sonde zu detektierende Fragment sind in der Tabelle 7.1 zusammengefasst. Welche Auswirkungen die Insertion auf die Transkription des *pta*-Gens und auf das im selben Operon befindlichen *buk*-Gen (Butyratkinase) hatte, wurde mit der RT-PCR (Abb.: 7.12B)

untersucht. Die Amplifikation mit den *pta*-spezifischen Oligonukleotiden detektierte für die Integrate eine sehr schwache circa 2,8 kbp-Bande und eine starke 1 kbp-Bande beim Wildtyp. In der *pta*-Integrate offenbarte die RT-PCR eine geringere *ack*-Transkriptmenge als im Wildtyp. Anhand dieser Resultate konnte die Integration auf DNA- und RNA-Ebene bestätigt werden. Zugleich ist ersichtlich, dass *pta* mit dem Clostron weiterhin exprimiert wird, jedoch in einem geringeren Ausmaß (Spur 5), außerdem scheint dies einen negativen Einfluss auf die Expression des *buk* Gens zu haben, welches sich im Operon „downstream“ von *pta* befindet.

C. acetobutylicum benötigt die CtfA/B und die Adc um aus Acetoacetyl-CoA Aceton herzustellen. Zur Untersuchung der jeweiligen Bedeutung der Einzelschritte auf die Acetonbildung wurden beide Gene mittels Clostron Insertion ausgeschaltet. Wie im Methodenteil beschrieben, erfolgte nach der Insertion des Gruppe II Intron in *C. acetobutylicum* ein PCR-Screening auf mögliche Integranen (Abb.: 7.14 und 7.15). Die Verifizierung erfolgte stets über Southern-Hybridisierung und ist exemplarisch bei *C. acetobutylicum hbd::int(69)* aufgeführt (3.2.1).

3.4.2 Charakterisierung der Insertionsmutanten

Unter den gewählten Wachstumsbedingungen konnten keine Unterschiede zwischen *C. acetobutylicum pta::int(80)* und *C. acetobutylicum* ATCC 824 festgestellt werden, weder bei der Wachstumsrate, noch bei der Lösungsmittelbildung (Abb.: 7.13). Nur in der Säureproduktion wurde eine marginale Abweichung detektiert. Die *pta*-Integrate bildete im Vergleich zum Wildtyp (2,4 g/l Acetat) nur 1,8 g/l Acetat, entgegengesetzt konnten bei *C. acetobutylicum pta::int(80)* 2,9 g/l Butyrat und beim Wildtyp nur 2,5 g/l gemessen werden. Die Laktatkonzentration lag sowohl bei der *pta*-Integranen (0,3 g/l) als auch beim Wildtyp (0,6 g/l) weit unter 1 g/l und ist deshalb nicht in der Abbildung 7.13 mit aufgeführt. Ein ähnlicher Phänotyp wurde bereits bei einer, mittels nicht-replikativen Integration hergestellten, *pta*-Mutante beschrieben (GREEN *et al.*, 1996).

Ein anderes Resultat ergaben Experimente mit *C. acetobutylicum ctfA::int(352)* und *C. acetobutylicum adc::int(180)*. Bei *C. acetobutylicum adc::int(180)* führte die Insertion zu einer drastische Acetonreduktion auf 0,5 g/l und bei *C. acetobutylicum ctfA::int(352)* konnte kein Aceton mehr detektiert werden (Abb.: 3.12). Durch die Manipulation des Stoffwechsels verringerten sich die Maximalwerte bei der optischen Dichte, der Glukoseverbrauch sank und die Butanol- und Ethanolbildung wurde reduziert. Bedingt

durch die niedrige Glukoseaufnahme ähnelten sich die Ausbeuten von Butanol bezogen auf Glukose bei den Integranten (*ctfA*-Integrante: $0,172 \text{ g}_{\text{Butanol}}/\text{g}_{\text{Glukose}}$; *adc*-Integrante: $0,232 \text{ g}_{\text{Butanol}}/\text{g}_{\text{Glukose}}$) im Vergleich zum Wildtyp ($0,23 \text{ g}_{\text{Butanol}}/\text{g}_{\text{Glukose}}$), obwohl diese weniger als die Hälfte (*ctfA*-Integrante: 4 g/l ; *adc*-Integrante: $5,1 \text{ g/l}$) dessen produzierten, was der Wildtyp ($11,8 \text{ g/l}$) während des Wachstums bildete (Tab.: 7.7).

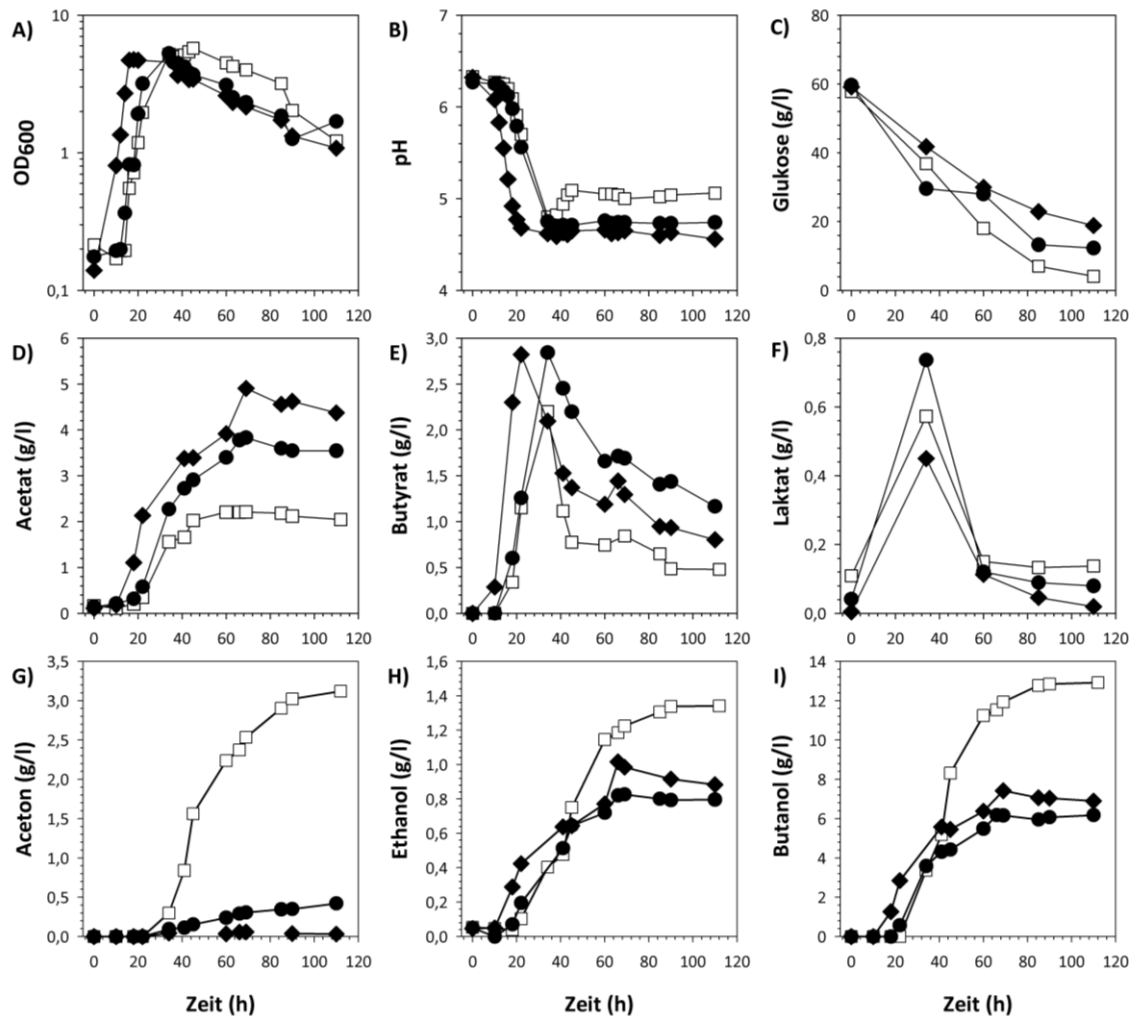


Abb. 3.12: Wachstumsphysiologische Charakterisierung von *C. acetobutylicum* ATCC 824, *C. acetobutylicum ctfA::int(352)* und *C. acetobutylicum adc::int(180)*. Die Kultivierung erfolgte in 200 ml MS-MES ohne Acetat. Der hier dargestellte Versuch spiegelt exemplarisch das Wachstum von \square , *C. acetobutylicum* ATCC 824; \blacklozenge , *C. acetobutylicum ctfA::int(352)*, und \bullet , *C. acetobutylicum adc::int(180)* wider.

Abgesehen von den geringen Ethanol- und Butanolemengen konnte eine bedeutend erhöhte Acetatproduktion von $2,2 \text{ g/l}$ im Wildtyp auf $6,2 \text{ g/l}$ bei *C. acetobutylicum ctfA::int(352)* und $4,2 \text{ g/l}$ bei *C. acetobutylicum adc::int(180)* detektiert werden, sowie eine geringfügig gesteigerte Butyratkonzentration von $1,8 \text{ g/l}$ im Wildtyp auf $2,1 \text{ g/l}$ bei der *ctfA*-Integrante (Tab.: 7.7). Die Lactatbildung zeigte weder bei

C. acetobutylicum *ctfA::int(352)* noch bei *C. acetobutylicum* *adc::int(180)* einen Unterschied zum Wildtyp.

Vergleichend mit den drastischen Veränderung die durch die Manipulationen des C₄-Weges erreicht wurden, konnte durch die Inaktivierung der Acetat-Synthese kein veränderter Phänotyp detektiert werden. Die Inaktivierung der einzelnen Enzyme des Acetonsyntheseweges führten zu einem Aceton-negativen (*C. acetobutylicum* *ctfA::int(352)*) und einem Aceton-reduzierten Phänotyp. Somit ist es gelungen, das Nebenprodukt Aceton zu eliminieren, was jedoch keine höhere Butanolkonzentration bedingte.

3.4.3 Herstellung von Doppel-Integrierten

Da die *ctfA*- und *adc*-Integrierte große Mengen an Acetat produziert und die *pta*-Integrierte eigentlich die Acetatproduktion senken soll, erfolgte die Herstellung sogenannter Doppel-Integrierten. Um *C. acetobutylicum* *pta::int(80)* für eine erneute Integration nutzen zu können, musste zu Beginn die Erythromycin-Resistenz beseitigt werden. Dies erfolgte indem die RAM-Kassette im *C. acetobutylicum* *pta::int(80)* Stamm wie unter 2.14 beschrieben entfernt wurde. Das PCR-Screening diente der Detektion von positiven Kolonien. War der Resistenzverlust durch die Eliminierung der RAM-Kassette (900 Bp) bedingt, konnte ein 1882 Bp-Fragment amplifiziert werden. Wie anhand der Abbildung 7.19 ersichtlich, verlief die Entfernung der RAM-Kassette erfolgreich und wird von nun an als *C. acetobutylicum* *pta::int(80)*ΔRAM bezeichnet. Der *C. acetobutylicum* *pta::int(80)*ΔRAM Stamm besaß weder eine Erythromycin-, noch eine Thiamphenicolresistenz und konnte somit für die Herstellung von *C. acetobutylicum* *pta::int(80)*ΔRAM-*ctfA::int(352)* und *pta::int(80)*ΔRAM-*adc::int(180)* mit den *ctfA*- und *adc*-spezifischen pMTL007C-E2 Vektoren verwendet werden (2.13). Anschließend erfolgte wie gewohnt das PCR-Screening (Gen-Gen PCR) zur Detektion positiver Kolonien. Wie bei den Integrierten zuvor, erfolgte die Bestätigung der Doppel-Integrierten ebenfalls über die Southern-Hybridisierung. Die Eliminierung der RAM-Kassette aus dem *pta*-Gen konnte zum einen über das verkleinerte *pta*-Fragment (2,8 kBp, bei der *pta*-Integrierten: 3,7 kBp) und zum anderen durch die Nutzung der RAM-spezifischen Sonde nachgewiesen werden (Abb.: 7.19 und 7.20). Für vergleichende Analysen erfolgte ebenfalls die Erzeugung einer *C. acetobutylicum* *adc::int(180)*ΔRAM-*pta::int(80)* Integrierten. Der Nachweis und die durchgeführten Experimente sind dem Anhang zu entnehmen. Zusammenfassend, ist es

in dieser Arbeit gelungen, mehrere Doppel-Integrianten herzustellen und diese über PCR-Screening und Southern-Hybridisierung zu verifizieren.

3.4.4 Charakterisierung der Doppel-Integrianten

Die Kombination der in dieser Arbeit erzeugten Doppel-Integrianten zielte darauf ab zu untersuchen, welche Effekte durch die Unterbrechung zweier Äste des Stoffwechsels auf die Butanolkonzentration und die mögliche Reduktion von Nebenprodukten erzielt werden kann. Die Verknüpfung des Aceton-negativen beziehungsweise –reduzierten Phänotyp der *ctfA*- und *adc*-Integriante mit der inaktivierten Pta der *pta*-Integriante führte zu einer drastischen Acetatreduktion. Wie in der Abbildung 3.13 zu erkennen ist, sank die Produktion bei *C. acetobutylicum pta::int(80)ΔRAM-ctfA::int(352)* um 80 % auf 0,5 g/l und bei *C. acetobutylicum pta::int(80)ΔRAM-adc::int(180)* um 67 % auf 0,9 g/l verglichen mit dem Wildtyp (2,7 g/l Acetat). Vor dem Hintergrund, dass die Einzel-Integrianten *C. acetobutylicum ctfA::int(352)* und *C. acetobutylicum adc::int(180)* unter den gleichen Bedingungen 12 bis 5 mal so viel Acetat (Abb.: 3.12; Tab.: 7.7) bildeten, wird der acetatreduzierende Effekt, ausgelöst durch die Doppelmutation, verdeutlicht. Gleichzeitig konnte eine erhöhte Butyratproduktion festgestellt werden, bei der *pta/ctfA*-Integriante steigerte sich die Konzentration auf 7,2 g/l und bei der *pta/adc*-Integriante auf 6,7 g/l. Das entspricht einer um mehr als das Doppelte gesteigerten Butyratbildung verglichen mit dem Wildtyp oder der Einzel-Integrianten. (Tab.: 7.7, 7.8) Auch wenn bereits bei *C. acetobutylicum pta::int(80)* (Tab.: 7.6) eine geringe Butyratzunahme nachgewiesen werden konnte, ist diese nicht annähernd so hoch wie in den Doppel-Integrianten. Gleichzeitig wurde eine Laktatzunahme festgestellt, die bei den beiden Doppel-Integrianten unterschiedlich verlief. Bei der *pta/adc*-Integriante nahm auch während der stationären Phase (bis circa 60 h) die Laktatkonzentration zu. Bei *C. acetobutylicum pta::int(80)ΔRAM-ctfA::int(352)* wurde das Laktatmaximum hingegen nach etwa 37 Stunden detektiert und danach konnte eine stetige Abnahme verzeichnet werden. Wie zuvor in den Einzel-Integrianten konnte bei der *pta/ctfA*-Integriante kein und bei der *pta/adc*-Integrianten (0,1 g/l) nur geringe Mengen Aceton nachgewiesen werden. Die Insertion in zwei Gene des Stoffwechsels hatte entgegen der Einzel-Integration eine stärkere Wirkung auf die Ethanolproduktion. Bei den Doppel-Integrianten konnte maximal 0,5 g/l Ethanol (Tab.: 7.8) detektiert werden, im Gegensatz dazu produzierte die *pta*-

Integrante 1,1 g/l, die *ctfA*-Integrante 1,2 g/l und die *adc*-Integrante 1,5 g/l Ethanol (Tab.: 7.6, 7.7). Wie bereits bei *C. acetobutylicum* *ctfA::int(352)* und *adc::int(180)* wurde auch bei den Doppel-Integranten eine drastische Butanolreduktion sowie eine Verringerung des Glukoseverbrauchs detektiert. Letztendlich führte die Kombination der Acetatreduktion durch die *pta*-Integrante und die fehlende Acetonproduktion der *ctfA*- und *adc*-Integranten nicht zur Verschiebung in Richtung Butanolbildung, sondern zu einer Erhöhung der Butyratkonzentration.

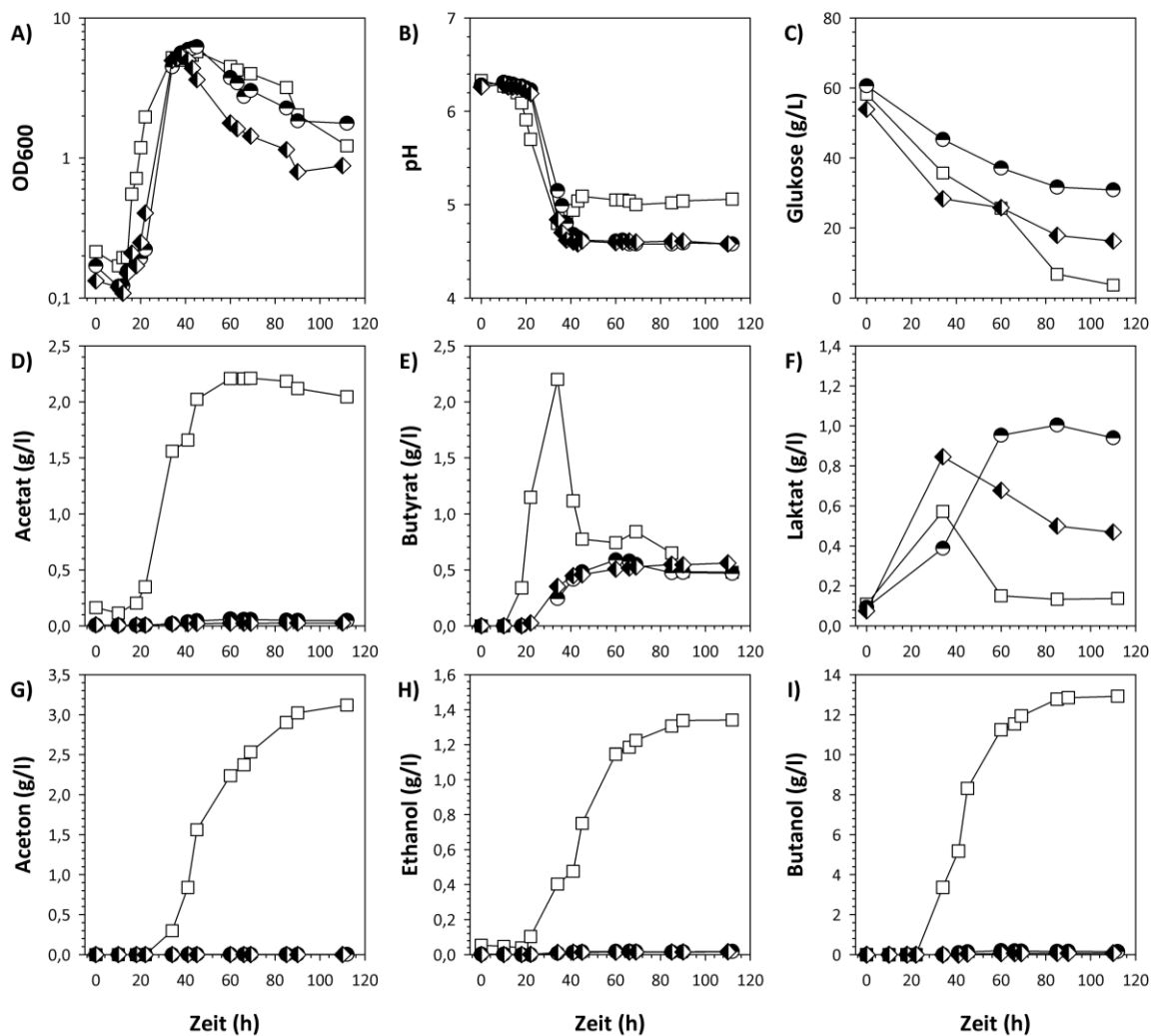


Abb. 3.13: Wachstumsphysiologische Charakterisierung von *C. acetobutylicum* ATCC 824, *C. acetobutylicum* *pta::int(80)ΔRAM-ctfA::int(352)* und *C. acetobutylicum* *pta::int(80)ΔRAM-adc::int(180)*. Die Kultivierung erfolgte in 200 ml MS-MES ohne Acetat. Der hier dargestellte Versuch spiegelt exemplarisch das Wachstum von *C. acetobutylicum* *pta::int(80)ΔRAM-ctfA::int(352)* und *C. acetobutylicum* *pta::int(80)ΔRAM-adc::int(180)* wider. □, *C. acetobutylicum* ATCC 824; ◇, *C. acetobutylicum* *pta::int(80)ΔRAM-ctfA::int(352)*; ●, *C. acetobutylicum* *pta::int(80)ΔRAM-adc::int(180)*.

4 Diskussion

Nach der Entdeckung von *C. acetobutylicum* änderte sich im Laufe der Jahre das Interesse an seinen Produkten. Anfänglich war Aceton das präferierte Lösungsmittel. Nachdem jedoch die Nutzbarkeit von Butanol für die Autolackindustrie entdeckt wurde, entwickelte sich Butanol zum bevorzugten Produkt. Aufgrund der billigeren petrochemischen Industrie kam der ABE Fermentationsprozess in Europa und Nordamerika bis zu den 60er Jahren komplett zum Erliegen (NI, et al., 2009). Bedingt durch den erhöhten Ölbedarf und die steigenden Preise für Öl, wächst das weltweite Interesse an der ABE-Fermentation erneut an. Dabei richtet sich der Fokus insbesondere auf Butanol, dem als alternativer Kraftstoff („Biobutanol“) bessere Eigenschaften als dem Bioethanol zugeschrieben werden (HUANG *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2008). Das Interesse ist so groß, dass mittlerweile wieder viele staatliche Forschungsförderungen und industrielle Projekte etabliert wurden, um Butanol aus erneuerbarer Biomasse herzustellen und zu kommerzialisieren. Ebenso sind eine Reihe biotechnologischer Unternehmen entstanden (wie z. B.: ButylFuel, Cathay Industrial, Biotech, Cobalt Biofuels, Green Biologics, Metabolic Explorer und Tetravita Bioscience), die neue Stämme oder Prozesslösungen bei der ABE-Fermentation für die Industrie generieren (NI, et al., 2009). Aufgrund dieser Nachfrage stieg das Interesse an *C. acetobutylicum* in den letzten Jahren stetig an und somit auch die Entscheidung aus diesem Organismus mittels „Metabolic Engineering“ optimierte Produktionsstämme zu erzeugen. Wie einleitend geschildert, wird dem gezielten Ausschalten von Genen des zentralen Stoffwechsels eine mögliche Schlüsselfunktion zugesprochen. Dabei stellte das Clostron® System (HEAP *et al.*, 2007) nach zahlreichen unbefriedigenden Versuchen eine neuartige Methodik zur Verfügung um den Stoffwechsel gezielt durch Geninaktivierung zu modifizieren.

4.1 Das Clostron®-System

Die Prozedur bei der die Inaktivierung des Zielgens durch das angepasste Gruppe II Intron und die Selektion mittels „Retrotransposition-activated Marker“ (RAM) erfolgt, wird als extrem effizient, schnell und mit geringen Aufwand für den Experimentator beschrieben (KUEHNE *et al.*, 2011). Aufgrund dieser Vorteile wurde das Clostron® System zur

Modifikation des Stoffwechsels von *C. acetobutylicum* ATCC 824 verwendet. Die obengenannte Aussage konnte im Zuge dieser Arbeit durch die Herstellung zahlreicher Integrianten bestätigt werden und ist in der Tabelle 3.1 zur Übersicht dargestellt.

4.1.1 Integriantenherstellung

Die Insertion des Gruppe II Introns erfolgte sowohl in Genen auf dem Chromosom (*hbd*, *pta*, *ptb*) als auch auf dem Megaplasmid pSOL1 (*ctfA*, *adc*). Wie der Tabelle 3.1 zu entnehmen ist, konnte kein Unterschied zwischen der Insertionseffizienz und der Genlokalisierung detektiert werden. Ebenso sprechen die Ergebnisse nicht zwangsläufig für eine bessere Integration bedingt durch einen niedrigen E-value. Die Insertionseffizienz (zusammengefasst in Tabelle 3.1) variierte stark von Gen zu Gen, dennoch wurden mit anderen Publikationen vergleichbare Werte erzielt. So konnte in *E. coli* eine Integrationseffizienz von 0,1 % bis 22 % (KARBERG *et al.*, 2001) aber auch bis 100 % (ZHONG *et al.*, 2003), in *L. lactis* von bis zu 100 % und bei *C. perfringens* eine Effizienz von 5 % erreicht werden (CHEN *et al.*, 2005) Für *C. acetobutylicum* wird im Allgemeinen eine Integrationseffizienz von mindestens 2,5 % genannt (HEAP *et al.*, 2009). Positive Klone die durch die Gen-Gen PCR ermittelt wurden, konnten immer durch die Southern-Hybridisierung bestätigt werden. Ebenfalls zeigte keine der untersuchten Integrianten eine ungewollte Doppelinsertion. Teilweise wurden Integrianten zusätzlich durch RT-PCR überprüft. Dabei konnte die Integration des Gruppe II Introns im Zielgen durch ein vergrößertes Fragment bestätigt werden, das meist eine stark reduzierte Transkriptmenge aufwies (Abb.: 3.3, 7.12B). Dies scheint allgemein jedoch nicht gültig zu sein, da JANSSEN 2010 die funktionelle Clostron®-Doppel-Knock-Out Mutante *cap0036_Int* auf Transkriptebene und durch DNA Micro Array Analysen bestätigte. Die Vermutung, dass trotz der Insertion des Introns in das Gen, die Transkription erfolgt, wird auch durch HEAP *et al.* (2009) beschrieben. Die Erklärung für die Inaktivierung wird durch die „Stop-Codons“ des Gruppe II Introns geliefert, die in allen 6 Leserahmen vorhanden sind und die Translation unterbrechen. Das Clostron® System hat sich während dieser Arbeit als adäquates Mutationswerkzeug dargestellt. Es wurden relativ zügig 12 Integrianten erzeugt (Tab.: 3.1), die aufgrund der Resistenz und mit Hilfe des PCR-Screenings leicht zu detektieren waren.

4.1.2 Inaktivierung des C₄-Weges

Ein Hauptanliegen des „Metabolic Engineering“ bei der Stammoptimierung ist in der Regel das Ausschalten ungewollter Nebenprodukte. In dem entsprechenden Abschnitt der Arbeit lag der Fokus in umgekehrter Denkweise darauf zu achten, was passiert, wenn der „Hauptzweig“ der größten Produktmoleküle in Form des Butyrats und des Butanols unterbrochen wird. Bisher war in der Literatur keine derartige Mutante von *C. acetobutylicum* beschrieben. Es stellte sich die Frage, ob es möglich ist die Bildung von C₄-Körpern vollständig durch Inaktivierung eines Enzyms zu unterbinden und ob darüber hinaus ein Stamm überlebensfähig sei. Zielgen war dabei *hbd* (Cac2708). Dieses Gen kodiert für die 3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase und stellt den Verzweigungspunkt zu dem sogenannten C₄-Weg dar (LEHMANN, et al., 2011). Die *C. acetobutylicum hbd::int(69)* Integrante weist einen sehr auffälligen Phänotyp auf. Charakteristisch ist ihre verminderte Wachstumsrate und das Unvermögen Butyrat und Butanol zu produzieren, offensichtlich anstelle einer erstaunlich hohen Ethanolbildung (Tab.: 7.2). Erstmals war es damit gelungen nachzuweisen, dass *C. acetobutylicum* ohne den C₄-Weg des Gärungsstoffwechsels einerseits lebensfähig ist, während andererseits die Lösungsmittelbildung unbeeinflusst bleibt (Aceton wird noch gebildet) und die Zellen ebenso in der Lage sind zu sporulieren. *C. acetobutylicum hbd::int(69)* produziert bis zu 33,5 g/l Ethanol und 2,6 g/l Aceton (Tab.: 7.2). Verglichen mit den üblichen 1,2 g/l Ethanol konnte mit der Unterbrechung des C₄-Weges eine fast 30-fach gesteigerte Ethanolproduktion erzeugt werden. Andere *Clostridien* wie *C. thermosaccharolyticum* oder *C. thermocellum* SS19 produzieren maximal 8,6 g/l beziehungsweise 3,2 g/l (MISTRY & COONEY, 1989; BALUSU et al., 2004), *Bacillus subtilis* erreicht 9 g/l und *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* ALK 2 (37 g/l) sowie *Escherichia coli* (42 g/l) bilden entsprechende Menge an Ethanol wie *C. acetobutylicum hbd::int(69)* (ROMERO et al., 2007; SHAW et al., 2008; DIEN et al., 2003). Aus biotechnologischer Sicht stellt sich natürlich die Frage, ob *C. acetobutylicum hbd::int(69)* als mutmaßlicher Ethanolproduzent kommerziell von Interesse sein kann. Im direkten Vergleich mit *Saccharomyces cerevisiae* müsste die Konzentration nahezu vervierfacht werden, bei den von ihr produzierten 120 g/l Ethanol (ALDIGUIER et al., 2004, PFROMM et al., 2010). Andererseits ist *C. acetobutylicum* eines der wenigen Organismen, das in der Lage ist beispielsweise Xylose aus landwirtschaftlichen Abfällen als Kohlenstoffquelle zu nutzen (OUNINE et al.,

1983). Der *S. cerevisiae* Wildtyp Stamm ist hingegen nicht in der Lage Xylose zu Ethanol zu fermentieren. Auch bereits durch „Metabolic Engineering“ veränderte Stämme produzieren nur geringe Mengen Ethanol (≤ 10 g/l) (KRAHULEC *et al.*, 2010). Wachstumsphysiologische Untersuchungen (3.2.2) mit Xylose zeigten sowohl bei *C. acetobutylicum* ATCC 824 als auch bei *C. acetobutylicum hbd::int(69)* eine verringerte Wachstumsrate und einen verlangsamten Metabolismus der beim Wildtyp eine verminderte Butanol- und Acetonproduktion bedingt. Dessen ungeachtet wurde bei der *hbd*-Integrierten erneut eine erhöhte Ethanolkonzentration detektiert (20,5 g/l, Tab.: 7.3), die beim Wildtyp nicht beobachtet wurde. Dieses Resultat kann darauf zurückzuführen sein, dass Butanol ab einer gewissen Menge eine inhibitorische Wirkung besitzt. In der Literatur wird für das Wachstum mit Glukose eine hemmende Konzentration von 14 g/l Butanol und bei Wachstum mit Xylose von 8 g/l angegeben (OUNINE *et al.*, 1985). Bei den wachstumsphysiologischen Untersuchungen mit *C. acetobutylicum* ATCC 824 im MS-MES mit Xylose konnte eine starke Abnahme der optischen Dichte nach Erreichen des Maximalwertes beobachtet werden, die wahrscheinlich durch die erreichte Butanolkonzentration von annähernd 8 g/l und der dem damit eintretenden toxischen Effekt zu erklären ist (Abb.: 3.6). In Anbetracht des Unvermögens der *hbd*-Integrierten Butanol zu bilden, kann eine Inhibition bedingt durch Butanol nicht eintreten. Bei Aceton und Ethanol führen erst höhere Konzentrationen von 70 g/l Aceton beziehungsweise 50 – 60 g/l Ethanol zu einer kompletten Wachstumshemmung (JONES & WOODS, 1986). Diese Konzentrationen werden in *C. acetobutylicum hbd::int(69)* nicht erreicht und können folglich keine hemmende Wirkung ausüben. Im Vergleich zum Wachstum mit Glukose verändert sich der Wachstumsverlauf der *hbd*-Integrierten mit Xylose als C-Quelle. Im Gegensatz zur vorher beobachteten OD₆₀₀-Abnahme nach Erreichen des Maximalwertes (Abb.: 7.2), bleibt diese mit Xylose konstant und könnte somit die erhöhte Ethanolbildung mit Xylose erklären.

4.1.2.1 Einfluss der Hbd-Inaktivierung auf der enzymatischen Ebene

Um zu begründen wie die Inaktivierung des C₄-Weges den veränderten Phänotyp bedingt, erfolgten molekulare und biochemische Charakterisierungen. Zu Beginn wurde die Insertion des Gruppe II Introns in das *hbd* Gen neben der Southern Hybridisierung auch mittels RT-PCR verifiziert. Die Ergebnisse zeigen, dass das Intron nicht nur im Gen integriert ist, sondern - wenn auch nur sehr schwach - transkribiert wird (Abb.: 3.3 B;

Spur 7) (HEAP *et al.*, 2009). Allerdings konnte die Inaktivierung der Hbd zweifelsfrei mittels Enzymaktivitätsmessungen nachgewiesen werden (Kapitel: 3.2.3.1). In *C. acetobutylicum hbd::int(69)* verringert sich die detektierbare Hbd-Aktivität um 99,6 % verglichen mit *C. acetobutylicum* ATCC 824. Die restliche Aktivität von 0,05 U/mg ist sehr wahrscheinlich auf Nebenaktivitäten anderer Enzyme wie zum Beispiel der 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase (CAC2009) zurückzuführen (NÖLLING *et al.*, 2001). Neben der Inaktivierung von Hbd sind die Aktivitäten der Thl und Crt auffällig gering, obwohl auf der Transkriptionsebene kein Unterschied zum Wildtyp festgestellt werden konnte (Abb.: 7.4). Bei der Thl und Crt handelt es sich um Enzyme, die die Hbd im Gärungsstoffwechsel flankieren (Abb.: 4.1).

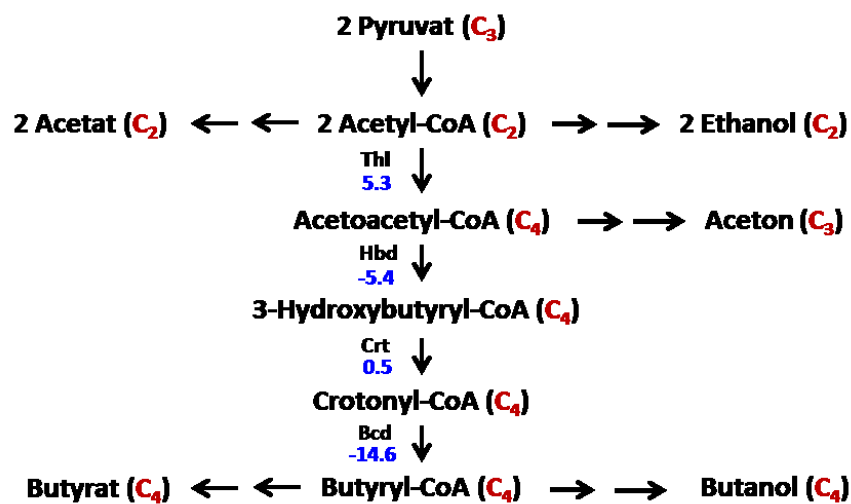


Abb. 4.1: Gärungsstoffwechsel von *Clostridium acetobutylicum*. Dargestellt sind die Fermentationsprodukte und den entsprechenden C-Körpern in rot. Die Zahlen in blau repräsentieren die freie Enthalpie der dazugehörigen Reaktion. Abkürzungen: Thl, Thiolase; Hbd, Crt, Crotonase; Bcd, Butyryl-CoA-Dehydrogenase.

Wie von NIELSON (2003) beschrieben, kann der Stoffwechselfluss durch eine gegebene biochemische Reaktion als Funktion aus drei Faktoren spezifiziert werden. Neben dem Aktivitätslevel und der Eigenschaften des Enzyms sowie möglicher Affektoren, besitzt auch die Konzentration der Metabolite, insbesondere der Edukte wie Produkte, einen Einfluss auf die Enzymaktivität. Die Crt schließt sich an die Reaktion von Hbd an und katalysiert die Dehydratation von 3-Hydroxybutyryl-CoA zu Crotonyl-CoA. Durch das Ausschalten von Hbd kann folglich aufgrund von Substratmangel kein 3-Hydroxybutyryl-CoA gebildet werden. Falls wie oben beschrieben, die Transkription des Gens gleichbleibt und sukzessiv die Proteinmenge ebenfalls als gleichbleibend postuliert

wird, so ist auf der Enzymebene ein Mechanismus zu vermuten, der die Aktivität bei Ausbleiben des Substrats hemmt. Diese Hypothese sollte in Zukunft auf Proteinebene überprüft werden.

Auch das Enzym, welches die der Hbd vorrausgehende Reaktion katalysiert zeigt kaum Aktivität. Ein näherer Blick auf die Umwandlung von Acetyl-CoA zu Butyryl-CoA könnte eine Erklärung liefern. Dieser Abschnitt des Gärungsstoffwechsels weist eine starke thermodynamische Stabilität auf ($\Delta_r G_m^0 = -14,2$ kcal/mol) (ZHENG *et al.*, 2009). Bei ΔG handelt es sich um die Freie Enthalpie. Das ist die Energie, die für eine Reaktion zur Verfügung steht. Ein Prozess läuft nur spontan ab, wenn ΔG negativ (exergon) ist (NELSON & COX, 2001). Die Bildung von Acetoacetyl-CoA durch die Thiolase wird als limitierender Schritt in diesem Prozess beschrieben, weil er thermodynamisch ungünstig ist und eine positive freie Enthalpie von $\Delta_r G_m^0 = 5,3$ kcal/mol aufweist (ZHENG *et al.*, 2009). Somit führt offenbar die Inaktivierung von Hbd zur Unterbrechung dieses normalerweise thermodynamisch stabilen Stoffwechselabschnitts, wodurch die Energiezufuhr durch die nachfolgenden Reaktionen fehlt.

4.1.2.2 NADH-abhängige Alkohol-Dehydrogenasen

Physiologisch zeichnet sich *C. acetobutylicum hbd::int(69)* vor allem durch die außergewöhnlich hohe Ethanolbildung aus. Aktivitätsmessungen der Ethanol- und Butanol-Dehydrogenasen mit den Coenzymen NADH und NADPH (Tab.: 3.2) zeigen klare Unterschiede zwischen *C. acetobutylicum* ATCC 824 und *C. acetobutylicum hbd::int(69)*. Während bei der Verwendung von NADPH weder bei der Ethanol noch bei der Butanol Dehydrogenase bedeutende Abweichungen detektierbar sind, konnte mit NADH bei der Ethanol Dehydrogenase eine 4,5-fache Aktivitätszunahme und bei der Butanol Dehydrogenase sogar eine 7,5-fache Steigerung in der *hbd*-Integrante festgestellt werden. Frühere Experimente offenbarten für BdhB eine 46-fach höhere Aktivität mit Butyraldehyd und für BdhA eine 2-fach höhere Aktivität als mit Acetaldehyd (WALTER *et al.*, 1992; CHEN, 1995). Ebenfalls werden AdhE1 und AdhE2 als Alkohol Dehydrogenasen mit Aktivität für Butanol und Ethanol beschrieben (DÜRRE *et al.*, 1987; WOODS, 1995; FONTAINE *et al.*, 2002). Die Tatsache, dass in der *hbd*-Integrante ein stärkere Aktivität mit NADH als Cofaktor detektiert wurde, lässt den Schluss zu, dass nicht die NADPH-abhängige AdhE1, sondern die NADH-abhängigen Dehydrogenasen (BdhA, BdhB und AdhE2) für die Ethanolbildung in *C. acetobutylicum hbd::int(69)* verantwortlich

ist. Die Butanol-Dehydrogenasen weisen ebenfalls eine wenn auch geringere Aktivität mit NADPH auf (WALTER *et al.*, 1992; GHESHLAGHI *et al.*, 2009). Dies kann eine Erklärung für die vergleichbaren NADPH-abhängigen Aktivitäten der Dehydrogenasen. Obwohl der Wildtyp ein deutlich stärkeres *adhE1*-Transkript aufweist als die *hbd*-Integrante. Des Weiteren zeigten Enzymmessungen bei so genannten alkohologenen Kulturen die Verwendung von NADH, wohingegen unter „normalen“ lösungsmittelbildenden Bedingungen NADPH als Co-Enzym dient (GIRBAL *et al.*, 1995).

Nachdem in *C. acetobutylicum hbd::int(69)* eine höhere Aktivität bei den NADH-abhängigen Alkohol-Dehydrogenasen festgestellt werden konnte und wie für die Alkoholgenese beschrieben, weniger Wasserstoff produziert wird, spricht vieles dafür, dass AdhE2 eine große Rolle bei der Ethanolproduktion in der *hbd*-Integrante spielt. Um mehr Beweise zu erhalten, erfolgte die Untersuchung des Expressionslevels der vier Alkohol-Dehydrogenasen (BdhA, BdhB, AdhE1 und AdhE2) während des exponentiellen Wachstums ($OD_{600} = 1$), kurz vor der Alkoholbildung (Abb.: 7.4B). Die Expression von *bdhB* und *adhE1* in *C. acetobutylicum* ATCC 824 weist zu dem Zeitpunkt der Probenahme die stärkste Expression auf, gefolgt von *bdhA*. Interessanterweise scheint *adhE2* nicht exprimiert zu werden. Vorrangehende Experimente offenbarten, dass *bdhA* bereits während der frühen Wachstumsphase exprimiert wird und das Transkriptionsmaximum erreicht sobald der pH-Wert absinkt. Sie wird deshalb für die früher eintretende Ethanolbildung verantwortlich gemacht. Kurze Zeit nachdem die Transkription des *bdhA* Gens einsetzt beginnt ebenfalls die Expression von *adhE1* gefolgt von *bdhB* (FEUSTEL *et al.*, 2004). In der Literatur gibt es widersprüchliche Angaben bezüglich der Reihenfolge der *adhE1*- und *bdhB*- Transkription (SAUER & DÜRRE, 1995; ALSAKER & PAPOUTSAKIS, 2005). Trotz unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen (DÜRRE, 2009) entsprechen diese Ergebnisse den Resultaten der RT-PCR für *C. acetobutylicum* ATCC 824 (Abb.: 7.4B). Die Untersuchung der Transkription von *bdhA*, *bdhB*, *adhE1* und *adhE2* in *C. acetobutylicum hbd::int(69)* deckt Unterschiede zu *C. acetobutylicum* ATCC 824 auf. Zum einen zeigten *bdhA* und *bdhB* die stärksten Expressionssignale, vergleichbar mit denen des Wildtyps. Zum anderen scheint *adhE1* in der *hbd*-Integranten jedoch am geringsten transkribiert zu werden. Im Gegensatz dazu zeigt *adhE1* in *C. acetobutylicum* ATCC 824 zum gleichen Zeitpunkt die intensivste Expression. Bemerkenswert ist die Transkription von *adhE2*, die beim Wildtyp nicht detektierbar ist, auch wenn das Signal

schwächer als bei *bdhA* und *bdhB* ist. Denn kürzlich wurde ein Repressor (Rex; CAC2713) in *C. acetobutylicum* beschrieben, der Veränderungen im Redoxstatus der Zelle erkennt und NADH-Dehydrogenasen reguliert (GYAN *et al.*, 2006; WIETZKE & BAHL, 2012). Dieser Repressor inhibiert die Gentranskription bei einem geringen NADH/NAD⁺ Verhältnis und dissoziiert von der Operatorstelle, sobald das Verhältnis steigt. (BREKASIS, *et al.*, 2003). Interessanterweise lassen sich diese sogenannten Rex-Boxen vor den Genen der *Thl*, *Crt* und *AdhE2* in *C. acetobutylicum* ATCC 824 finden (WIETZKE, *et al.*, 2012). Dies könnte dafür sprechen, dass die Expression von *adhE2* in *C. acetobutylicum hbd::int(69)* auf dem genetischen Level von Rex kontrolliert wird. Anscheinend führt die hohe NADH-Konzentration in *C. acetobutylicum hbd::int(69)* zur Dissoziation des Rex-Repressors von *adhE2* und somit zu einer gesteigerten Transkriptmenge. In *C. acetobutylicum* ATCC 824 war zum gleichen Zeitpunkt kein *adhE2*-Transkript nachweisbar. Daraus lässt sich vermuten, dass wahrscheinlich deshalb kein Unterschied zwischen der Integrationsmutante *C. acetobutylicum adhE2::int(114)* und *C. acetobutylicum* ATCC 824 detektierbar war, weil Rex die *adhE2*-Expression unter „normalen“ Bedingungen reprimiert (Abb.: 7.27). Ähnliche Ergebnisse zeigten, dass durch Methylviologen die Expression von *adhE2* um das 100-fache gesteigert und die Acetonproduktion vermindert wurde (HÖNICKE *et al.*, 2012). Weiterhin wird die Expression von *adhE2* für alkohologene und acidogene Kulturen beschrieben (FONTAINE *et al.*, 2002; GRIMMLER *et al.*, 2011).

4.1.2.2 Alkohologenese durch Hbd-Inaktivierung?

Der alkohologene Metabolismus wird durch die Fermentierung von Glycerol, Kohlenmonoxidbegasung oder Methylviologenzugabe erzielt und zeichnet sich durch eine erhöhte NADH- und Alkoholkonzentration, niedrigere Säure- und H₂-Produktion sowie durch die Abwesenheit von Aceton aus (DESAI & PAPOUTSAKIS, 1999; DÜRRE, 2009). Unter diesen Bedingungen wird verstärkt die NADH-abhängige *AdhE2* (CAP0035) exprimiert (FONTAINE *et al.*, 2002; HÖNICKE *et al.*, 2012). *C. acetobutylicum hbd::int(69)* weist ebenfalls eine verringerte Acetonbildung und aufgrund des fehlenden Butyrats konsequenterweise auch eine verringerte Gesamtsäureproduktion auf. Um zu überprüfen ob die *AdhE2* für die Ethanolbildung verantwortlich sein kann, erfolgte die Messung der H₂- und CO₂-Bildung. Die um 20 % verringerte CO₂-Produktion in der *hbd*-Integrante steht in Verbindung mit der geringeren Actoneproduktion, denn bei der Bildung von Aceton aus Acetoacetat wird CO₂ freigesetzt (Abb.: 1.1). Abgesehen davon, sticht die um 65 %

verminderte H₂-Bildung und ihr veränderter zeitlicher Verlauf hervor (Abb.: 3.5). Der Wildtyp zeichnet sich durch eine stetige H₂-Zunahme aus. Im Gegensatz dazu zeigt die *hbd*-Integrierte einen flacheren Anstieg und bereits nach 40 Stunden Wachstum eine drastische Abnahme von bis zu 70 % des gebildeten Wasserstoffs. Die Beobachtung, dass eine hohe Ethanolproduktion mit einer drastischen Reduzierung der H₂-Bildung einhergeht, ist auch für *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* ALK2 publiziert (SHAW *et al.*, 2008).

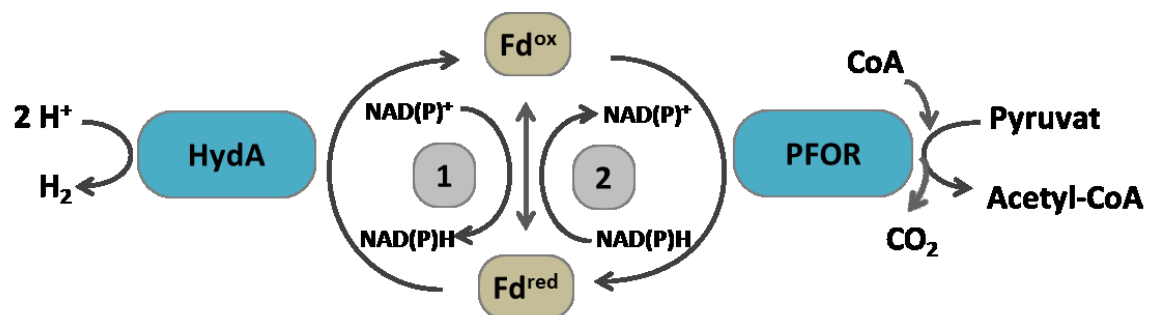


Abb. 4.2: Elektronenverteilung durch Ferredoxin in *Clostridium acetobutylicum*. Dargestellt ist ein Reaktionsabschnitt des Gärungsstoffwechsels. Abkürzungen: PFOR, Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase; HydA, Hydrogenase; Hbd, Fd, Ferredoxin; 1, Ferredoxin:NAD(P)-Oxidoreduktase; 2, Ferredoxin:NAD(P)H-Oxidoreduktase (nach VASCONCELOS *et al.*, 1994).

Darüber hinaus konnte in diesem Stamm eine erhöhte Ferredoxin:NAD(P)-Oxidoreduktase (FNOR) Aktivität festgestellt werden (SHAW *et al.*, 2008). Die FNOR spielt auch im Gärungsstoffwechsel von *C. acetobutylicum* eine wichtige Rolle. Die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat erfolgt zunächst maßgeblich durch die Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (PFOR). Dieses Enzym ist wichtig für die Aufrechterhaltung der Redoxbalance, aufgrund der Elektronendistribution über Ferredoxin in der Zelle. Während der Acidogenese überträgt Ferredoxin die Elektronen zum Großteil auf die Hydrogenase, die daraufhin molekularen Wasserstoff produziert. Demgegenüber kann bei der Alkoholbildung dem zunehmenden Bedarf an Reduktionskraft durch Elektronenübertragung mittels Ferredoxin auf NAD(P) entsprochen werden. (JONES & WOODS, 1986; LEHMANN & LÜTKE-EVERSLOH, 2011). Zwei Moleküle NAD(P)H werden benötigt, um aus einem Molekül Acetyl-CoA ein Molekül Ethanol herzustellen. Ein NAD(P)H stammt dabei aus der Glykolyse und das zweite NAD(P)H wird mit Hilfe der FNOR generiert. Diese Vermutung wurde aufgrund der erhöhten FNOR-Aktivität in *T. saccharolyticum* ALK2 aufgestellt (SHAW *et al.*, 2008) und kann ebenfalls auf *C. acetobutylicum* *hbd::int(69)* zutreffen. Da die *hbd*-Integrierte so große Mengen an

Ethanol produziert, wodurch ein beträchtlicher NAD(P)H-Bedarf entsteht. Dieser ist anscheinend so groß, dass sogar eine Wiederaufnahme von Wasserstoff wahrscheinlich ist (BLUSSON *et al.*, 1981; VASCONCELOS *et al.*, 1994; LEHMANN & LÜTKE-EVERSLOH, 2011). Eine weitere Option besteht möglicherweise in einer in *C. acetobutylicum* annotierten Pyruvat Dehydrogenase (CAP0025) (NÖLLING *et al.*, 2001), die in der Ethanolbildung durch die Spaltung von Pyruvat zu Acetaldehyd und CO₂ involviert sein könnte. Anschließend erfolgt die Reduktion von Acetaldehyd zu Ethanol durch die Ethanol-Dehydrogenase. Jedoch wird CAP0025 nur während der Phase des metabolischen Shift von der Acidogenese zur Solventogenese exprimiert (GRIMMLER *et al.*, 2011). Überdies müsste, basierend auf dieser Hypothese, die CO₂-Produktion zunehmen. Jedoch wurde bei *C. acetobutylicum hbd::int(69)* entgegengesetzt sogar 20 % weniger CO₂ gemessen. Außerdem zeigte die Pyruvat Dehydrogenase in anderen Untersuchungen bisher nur geringe Aktivität, was auf die Inhibition durch NADH und Pyruvat zurückgeführt wurde (KIM *et al.*, 2007).

Neben verstärkter NADH-abhängigen Ethanol und Butanol Dehydrogenase-Aktivität konnte für *C. acetobutylicum hbd::int(69)* ebenfalls eine verringerte Wasserstoff-, Säure- und Acetonproduktion nachgewiesen werden. Ebenfalls wurde das Transkript von *adhE2* detektiert während bei *C. acetobutylicum* ATCC 824 unter den gleichen Bedingungen und zum selben Zeitpunkt kein Transkript vorhanden war. Diese Hinweise deuten an, dass die Inaktivierung von *hbd* zu verringerten Redoxbedingungen (hohes NADH/NAD⁺ Verhältnis) führt, ähnlich wie in alkohologenen Kulturen.

4.1.3 Inaktivierung der Butyratsynthese

Mit Hilfe des *C. acetobutylicum hbd::int(69)* Stammes konnte bereits bewiesen werden, dass *C. acetobutylicum* auch ohne den C₄-Weg des Gärungsstoffwechsels lebensfähig ist und darüber hinaus große Mengen an Ethanol bildet (LEHMANN *et al.*, 2011). Welchen Einfluss nun aber im Einzelnen der Abwesenheit von Butyrat zugesprochen werden kann, sollte mit *C. acetobutylicum ptb::int(87)* geklärt werden. Das Ziel war die Inaktivierung der Phosphotransbutyrylase (Ptb). Dieses Enzym bildet zusammen mit der Butyratkinase (Buk) den Teil des Stoffwechsels, der *C. acetobutylicum* ermöglicht Butyryl-CoA in Butyrat umzuwandeln und dabei ATP zu produzieren (CARY *et al.*, 1988). Der in dieser Arbeit vorgestellte *C. acetobutylicum ptb::int(87)* Stamm wurde auf molekularer Ebene durch Southern Hybridisierung und RT-PCR sowie biochemischer Ebene durch

Enzymaktivitätsmessungen bestätigt. Die *ptb*-Integrante zeigt eine Ptb-Aktivitätsreduktion von über 99 %. Außerdem konnte eine Aktivitätsminderung um 77 % bei Buk nachgewiesen werden, obwohl das Transkript vorhanden war (Abb.: 7.6) und *buk* 8 Bp vor dem Genstartpunkt eine Shine Dalgarno Sequenz aufweist, weshalb die Translation von *buk* durch das Intron im *ptb* Gen nicht beeinflusst werden sollte (WALTER *et al.*, 1993; ZHANG *et al.* 2012). Für *C. acetobutylicum* sind in der zugänglichen Literatur bisher keine Mutanten der *ptb* und *buk* Gene beschrieben, die kein Butyrat mehr produzieren (GREEN *et al.*, 1996; GREEN & BENNETT, 1998; DESAI & PAPOUTSAKIS, 1999). All diese Mutationsstrategien führen zur Minimierung der Butyratbildung (GREEN *et al.*, 1996) oder, trotz verringerten Enzymaktivitäten, zu vergleichbaren Butyratkonzentration (DESAI & PAPOUTSAKIS, 1999). In dieser Arbeit kann erstmals eine Mutante beschrieben werden, die aufgrund der 99 %igen Reduktion der Ptb-Aktivität kein Butyrat mehr bildet (Abb.: 3.8). Im Vergleich zeigten bereits existierende Mutanten eine maximale Abnahme der Ptb- und Buk-Aktivität von höchstens 80 %, was folglich keinen Butyrat-negativen Phänotyp nach sich zog (GREEN *et al.*, 1996; DESAI & PAPOUTSAKIS, 1999, ZHANG *et al.*, 2012). Die hier beschriebene *ptb*-Integrante zeigt ebenfalls Ptb- und Buk-„Rest“-Aktivitäten von 1 % beziehungsweise 23 %. Wie in den Publikationen beschrieben, können mögliche Ptb und Buk Isoenzyme postuliert werden (GREEN *et al.*, 1996; ZHANG *et al.*, 2012), wie zum Beispiel die Butyratkinase II (CAC1660) in *C. acetobutylicum*, die erstmals 2000 beschrieben wurde (HUANG *et al.*, 2000, SULLIVAN, 2009). Trotz der Unterschiede weist *C. acetobutylicum ptb::int(87)* im Phänotyp gewisse Ähnlichkeiten zu den anderen Mutanten aber auch zu *C. acetobutylicum hbd::int(69)* auf. Folglich bedingt die Insertion des Introns bei *C. acetobutylicum ptb::int(87)* eine im Vergleich zum Wildtyp ($0,24 \text{ h}^{-1}$) verminderte Wachstumsrate ($0,15 \text{ h}^{-1}$). Dieser Effekt zeigt sich auch bei *C. acetobutylicum hbd::int(69)* ($0,18 \text{ h}^{-1}$) und dem pRD1-Stamm (DESAI & PAPOUTSAKIS, 1999). Der bereits erwähnte Butyrat-negative Phänotyp tritt ebenso bei *C. acetobutylicum hbd::int(69)* auf und scheint bei beiden Stämmen zu einer gesteigerten Acetatproduktion zu führen, um die Zelle ausreichend mit ATP zu versorgen (HARRIS *et al.*, 2000; LEHMANN & LÜTKE-EVERSLOH, 2011). Widersprechend zu diesen Beobachtungen wird die erhöhte Acetatbildung in der *ptb*-Mutante von *C. tyrobutyricum* mit einer verbesserten Wachstumsrate in Zusammenhang gebracht (ZHANG *et al.*, 2012). Auffallend ist die drastische Reduzierung der Acetonkonzentration ($0,1 \text{ g/l}$) bei *C. acetobutylicum*

ptb::int(87) verglichen mit *C. acetobutylicum* ATCC 824 (3,8 g/l) (Tab.: 7.4), die ebenso für den pRD1-Stamm beschrieben ist (DESAI & PAPOUTSAKIS, 1999). Für die Buk-Mutanten lassen sich hingegen widersprüchliche Aussagen finden. So wird für die PJCBK-Mutante eine Acetonreduktion und bei der asRNA Mutante (pRD4) eine Zunahme beschrieben. Diese unterschiedlichen Phänotypen sind höchstwahrscheinlich auf die Auswirkungen der verschiedenen Mutationsstrategien auf molekularer Ebene zurückzuführen. (DESAI & PAPOUTSAKIS, 1999). Ebenso zeigen die Buk-Mutanten und *C. acetobutylicum hbd::int(69)* eine erhöhte Alkohol- beziehungsweise Ethanolproduktion, während *C. acetobutylicum ptb::int(87)* und der pRD1-Stamm eine drastisch reduzierte Alkoholbildung aufweisen (GREEN *et al.*, 1996; DESAI & PAPOUTSAKIS, 1999; LEHMANN & LÜTKE-EVERSLOH, 2011). Bei *C. acetobutylicum ptb::int(87)* fällt darüber hinaus eine erhöhte Laktatkonzentration auf, die normalerweise unter den gewählten Bedingungen nicht auftritt (Tab.: 7.4) und auch bei der *ptb*-Mutante (pED1) benannt wird. Interessant ist vor allem die durchgehende Laktatbildung über die Acidogenese bis in die Solventogenese hinein. Das Produktspektrum von *C. acetobutylicum ptb::int(87)* mit der erhöhten Laktat- und auf ein Minimum reduzierten Acetonbildung, erinnert an die alkohologene Fermentation (MEYER *et al.*, 1986). Dementsprechend kann die Inaktivierung der Butyratsynthese einen negativen Einfluss auf die vorangehenden Enzyme im Gärungsstoffwechsel haben. Diese Vermutung ließ sich mit der Messung der um 97 % verminderten Thl- und um 65 % reduzierten Crt-Aktivität bekräftigen (Tab.: 3.3). Üblicherweise ist die Bildung von Butyrat aus Glukose redoxneutral, da das während der Glykolyse produzierte NADH bei der Butyratproduktion wieder verbraucht wird (JONES & WOODS, 1986). Die Ptb-Inaktivierung und der dadurch bedingten geringeren Aktivität der vorangehenden Enzyme (Abb.: 1.1) führt höchstwahrscheinlich zu einem gesteigerten NADH/NAD⁺ Verhältnis und gleichzeitig zur erhöhten Konzentration des Präkursors Pyruvat, wodurch eine vermehrte Laktatproduktion einsetzt (GREEN *et al.*, 1996; DESAI & PAPOUTSAKIS, 1999).

4.1.3.1 Vergleich der Ethanolproduzenten

Interessant ist insbesondere der Vergleich von *C. acetobutylicum hbd::int(69)* und *C. acetobutylicum ptb::int(87)*. Obwohl sie sich flüchtig betrachtet nur durch den Butyrat/Butanol negativen beziehungsweise Butyrat negativen Phänotyp unterscheiden, zeigen die beiden Stämme abgesehen von der enormen Ethanolproduktion kaum

Übereinstimmungen. Obwohl *C. acetobutylicum ptb::int(87)* und *C. acetobutylicum hbd::int(69)* kein Butyrat bilden, produziert nur die *ptb*-Integrante gesteigerte Laktatmengen. In der Literatur wird ein Zusammenhang zwischen der Butyratsynthese und der Aktivität der NADH-Oxidoreduktase und Hydrogenase als Regulationsmöglichkeit des Redoxgleichgewichtes (JONES & WOODS, 1986), sowie der aktivierende Einfluss von Acetyl-CoA auf beide Enzyme (JUNGERMANN *et al.*, 1971) beschrieben. Eine mögliche Erklärung für die Unterschiede in der Laktatproduktion von *C. acetobutylicum ptb::int(87)* und *C. acetobutylicum hbd::int(69)* könnten die unterschiedlichen Thl- und Crt-Aktivitäten sein. Da bei *C. acetobutylicum ptb::int(87)* noch 3 % Thl- beziehungsweise 35 % Crt- „Rest“-Aktivitäten vorhanden sind (Tab.: 3.2, 3.3), wird wahrscheinlich genug Acetyl-CoA umgesetzt und die Konzentration reicht nicht aus, um die Enzymaktivitäten der NADH-Oxidoreduktase und Hydrogenase ausreichend zu aktivieren. Eine Möglichkeit um NADH zu reoxidieren könnte in diesem Fall die erhöhte Laktatbildung darstellen. Bei *C. acetobutylicum hbd::int(69)* ist die Reduktion der Thl-Aktivität weitaus stärker (Tab.: 3.2), was zu einem hohen Acetyl-CoA Level führen könnte und somit die NADH-Oxidoreduktase und Hydrogenase aktiviert um das Redoxgleichgewicht während der Acidogenese aufrecht zu erhalten.

In der Solventogenese lassen sich ebenfalls Abweichungen im Produktspektrum von *C. acetobutylicum ptb::int(87)* und *C. acetobutylicum hbd::int(69)* erkennen. Bei beiden Stämmen kann unter Fed-Batch Bedingungen (zusätzliche pH-Kontrolle bei der *ptb*-Integrante) eine maximale Produktion von etwa 33 g/l Ethanol detektiert werden. Aufgrund der fehlenden Butanolproduktion und sehr geringen Acetonbildung (2,6 g/l) (Tab.: 7.2) ist die Gesamtlösungsmittelproduktion in *C. acetobutylicum hbd::int(69)* mit 36,1 g/l ABE geringer als bei *C. acetobutylicum ptb::int(87)* (Tab.: 3.4). Die *ptb*-Integrante produziert trotz der hohen Ethanolmengen zusätzlich 4,8 g/l Aceton und 7,9 g/l Butanol. Verglichen mit dem Wildtyp (6,3 g/l Aceton; 12,4 g/l Butanol; 1,9 g/l Ethanol) bildet *C. acetobutylicum ptb::int(87)* allerdings weniger Aceton und Butanol. Bei *C. acetobutylicum hbd::int(69)* konnten anhand der Ergebnisse Übereinstimmungen mit der alkohologenen Fermentation gefunden werden. Wie eingangs beschrieben definieren sich alkohologene Kulturen überwiegend durch ein hohes NADH/NAD⁺ Verhältnis, geringe H₂-Produktion und die ausschließliche Produktion von Ethanol und Butanol (GIRBAL *et al.*, 1995). In *C. acetobutylicum ptb::int(87)* werden allerdings vergleichbar hohe

Acetonmengen detektiert, was den Schluss nahelegt, dass es sich um den solventogenen Metabolismus handelt. Die geringeren Mengen an Butanol und Aceton verglichen mit dem Wildtyp sind wahrscheinlich auf die reduzierte Enzymaktivität der Thl und Crt zurückzuführen. Die dadurch gestiegene NADH-Menge und der eventuelle Rückstau von Acetyl-CoA können darüber hinaus zur drastischen Ethanolproduktion beitragen. Dies führt zu der Annahme, dass bei *C. acetobutylicum ptb::int(87)* Merkmale des alkohologenen als auch solventogenen Metabolismus auftreten. Um diese Hypothese bestätigen zu können sollte zum einen die H₂-Produktion und das NADH-Level bestimmt und zum anderen die Expression der Alkohol-Dehydrogenasen sowohl deren Enzymaktivität ermittelt werden.

4.1.3.2 Eintritt in die Lösungsmittelphase durch einen Butyratimpuls

Der Phänotyp von *C. acetobutylicum ptb::int(87)* offenbarte bereits, dass Butanol nicht zwangsläufig aus reassimilierten Butyrat synthetisiert wird. Unter pH-kontrollierten Wachstumsbedingungen produziert die *ptb*-Integrante bis zu 8 g/l Butanol (Tab.: 3.4). Um nun den Einfluss von extern zugegebenem Butyrat zu untersuchen, erfolgte die Durchführung sogenannter Butyrat Fed Batch Fermentationen (3.3.2.3). Die Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen (10, 20, 30 und 40 mM) sollte eventuelle Effekte des Butyrats aufdecken. Auffällig ist die plötzliche Acetataufnahme bei *C. acetobutylicum ptb::int(87)*. Im Gegensatz zum Wildtyp kann man bereits vor dem Butyratimpuls eine erhöhte Acetatproduktion erkennen. Danach setzt nicht nur die Reassimilation von Acetat und dem zugefügten Butyrat ein, sondern auch die von Laktat. Damit einhergehend steigt der pH-Wert, wie es bei *C. acetobutylicum* ATCC 824 beim „Shift“ zur Solventogenese üblich ist. Nachdem das zugefügte Butyrat in *C. acetobutylicum ptb::int(87)* komplett aufgenommen wurde, konnte eine erneute Zunahme von Laktat und Acetat festgestellt werden. Augenscheinlich führt dies wiederum zum Absinken des pH-Wertes am Ende des Wachstums. Die kontinuierliche Acetatproduktion in der Solventogenese ist bereits für *C. acetobutylicum* beschrieben und offeriert die Möglichkeit zusätzlich ATP zu generieren (DESAI *et al.*, 1999; KUIT *et al.*, 2012). Zudem lassen die Resultat der Butyrat Fed Batch Fermentation vermuten, dass Butyrat die Solventogenese auslöst, denn sofort nach der Zugabe nimmt die Acetat- und Laktatkonzentration ab und die Lösungsmittelproduktion setzt ein (BAHL *et al.*, 1982). Die detektierte Laktatabnahme steht im Widerspruch zu GHESHLAGHI *et al.* (2009). In dieser Publikation wird die Laktat Dehydrogenase (Ldh) im

Gegensatz zu der in *E. coli* als irreversibel bezeichnet. Dennoch ist in *C. tyrobutyricum* bereits eine NAD⁺-unabhängige Laktat-Dehydrogenase beschrieben, die für die Umwandlung von Laktat in Pyruvat verantwortlich ist (ZHU & YANG, 2004). Ebenfalls offenbarten Experimente mit C¹³-markiertem Laktat dessen Reassimilation und Umwandlung in Acetyl-CoA (AMADOR-NOGUEZ *et al.*, 2010). Verglichen mit der pH-kontrollierten Fermentation zeigt *C. acetobutylicum* *ptb::int(87)* kein verändertes Lösungsmittelspektrum. Die unterschiedlichen Butyratmengen hatten ebenfalls keinen Einfluss auf die Aceton- (im Durchschnitt: 4,6 g/l), Butanol- (~6 g/l) und Ethanolproduktion (~30 g/l). Demgegenüber stimmen die Beobachtungen bei *C. acetobutylicum* ATCC 824 entsprechend der Butyratimpulse mit früheren Experimenten überein. Mit zunehmender Butyratkonzentration steigt die Aceton- und Butanolproduktion, gleichzeitig sinkt die Ethanolbildung von 4,7 g/l bei 10 mM Butyrat auf 3,4 g/l bei 30 mM Butyrat. Dadurch stieg das Butanol/Ethanol Verhältnis 2,7/1 auf 5,3/1 (HÜSEMANN & PAPOUTSAKIS, 1985; TUMMALA *et al.*, 2003b). Seit langem wird die Reassimilation der Säure diskutiert. Zum einen wird der Umkehrmechanismus der eigentlichen Säureproduktion in Betracht gezogen und zum anderen wird die Reassimilation von Acetat und Butyrat direkt mit der Acetonproduktion verknüpft (HARTMANIS *et al.*, 1984; JONES & WOODS, 1986). Anhand der durch die Butyrat Fed Batch Fermentation erzielten Ergebnisse kann gezeigt werden, dass Butyrat wieder aufgenommen, in *C. acetobutylicum* *ptb::int(87)*, aber nicht zwangsläufig für die Produktion von Butanol verwendet wird.

4.1.4 Reduktion von Nebenprodukten

Biokraftstoffe bekommen aufgrund des weltweiten Interesses an erneuerbaren Energien immer mehr Aufmerksamkeit. Darunter befindet sich auch Butanol, das neben Aceton und Ethanol von *C. acetobutylicum* in einem Verhältnis 6:3:1 produziert wird (INUI *et al.*, 2008). Aceton eignet sich aufgrund seiner korrosiven Eigenschaften nicht als Biokraftstoff. Somit liegt der Fokus auf einer erhöhten Butanolproduktion. Die zuvor beschriebenen Stämme *C. acetobutylicum* *hbd::int(69)* und *C. acetobutylicum* *ptb::int(87)* zeigten insbesondere eine drastische Ethanolzunahme und machten auf den Einfluss der Reduktionskraft aufmerksam. Für die Bildung von Acetat und Aceton wird NADH nicht benötigt. Aufgabe dieser Arbeit war es, zu klären, wie sich der Phänotyp hinsichtlich der Butanolproduktion verändert, wenn genau diese Synthesewege inaktiviert sind. Bei der vergleichenden phänotypischen Untersuchung von *C. acetobutylicum* *pta::int(80)* mit

C. acetobutylicum ATCC 824 konnte kein Unterschied detektiert werden. Die geringen Abweichungen während der Säureproduktion stimmen mit Ergebnissen einer *pta*-Mutante (PJC4PTA) überein, die mittels homologer Rekombination erzeugt wurde (GREEN *et al.*, 1996). Eine anschließende Publikation mit der PJC4PTA Mutante beschrieb eine starke Butanolbildung, die bei *C. acetobutylicum pta::int(80)* nicht auftritt (ZHAO *et al.*, 2005). Leicht verringerte Acetatproduktion aber keine Veränderungen in der Lösungsmittelbildung wurden ebenfalls in der Ack-Mutante dokumentiert, die mittels Clostron® hergestellt wurde (KUIT *et al.*, 2012). Angesichts der geringen Substratspezifitäten von Ptb und Buk ist auch die Umsetzung von Acetyl-CoA zu Acetat durch diese Enzyme höchstwahrscheinlich. Normalerweise ermöglichen diese Enzyme die Bildung von Butyrat (Abb.: 1.1), dennoch sind sie ebenfalls befähigt Acetat zu bilden. Aktivitätsmessungen ergaben für Ptb eine relative Aktivität mit Acetyl-CoA von 2 % und für Buk eine Aktivität mit Acetat von 6 % gegenüber Butyryl-CoA und Butyrat (HARTMANIS, 1987; WIESENBORN *et al.*, 1989). Offensichtlich können Ptb und Buk die Pta-Inaktivierung kompensieren, dementsprechend zeigt *C. acetobutylicum pta::int(80)* keine übermäßige Laktatbildung, wie es bei *C. acetobutylicum ptb::int(87)* der Fall war, oder eine veränderte Lösungsmittelproduktion.

Einen interessanteren Phänotyp offenbarten *C. acetobutylicum ctfA::int(352)* und *C. acetobutylicum adc::int(180)*. Die Inaktivierung der Enzyme, die für die Acetonbildung von Bedeutung sind, führt zu einem Aceton-negativen (*C. acetobutylicum ctfA::int(352)*) und einem Aceton-reduzierten (maximal 0,5 g/l) Phänotyp (*C. acetobutylicum adc::int(180)*). Im Gegensatz zu den erzeugten *adc*-asRNA-Mutanten wird mit *C. acetobutylicum adc::int(180)* die Acetonproduktion drastisch reduziert (TUMMALA *et al.*, 2003) und ähnelte damit sehr stark dem Phänotyp der mittels TargeTron erzeugten *adc*-Mutante (JIANG *et al.*, 2009). *C. acetobutylicum ctfA::int(352)* ist aufgrund der Insertion des Clostrons in *ctfA* nicht mehr in der Lage, Aceton zu produzieren. Dieser Effekt entspricht der *ctfB*-asRNA-Mutante, einer von drei asRNA-Mutanten (TUMMALA *et al.*, 2003). Die physiologische Charakterisierung der Stämme erfolgte in MS-MES (2.3.2), das ohne Acetat hergestellt wurde, welches für die Sporenbildung verantwortlich ist (MONOT *et al.*, 1982). Alle Stämme produzierten Acetat, allerdings konnte weder bei *C. acetobutylicum* ATCC 824 noch bei den anderen Stämmen eine signifikante Reassimilation detektiert werden. Wachstumsversuche mit *C. acetobutylicum*

ctfA::int(352) und *C. acetobutylicum adc::int(180)* zeigten auch bei MS-MES mit Acetat keine Acetat-Reassimilation (Abb.:7.28). Infolge der spontan ablaufenden Decarboxylierung von Acetoacetat zu Aceton und CO₂, sind geringe Acetonmengen in *C. acetobutylicum adc::int(180)* messbar (BOYD *et al.*, 2004; HAN *et al.*, 2011). Die Reassimilation der Säuren scheint in *C. acetobutylicum ctfA::int(352)* und *C. acetobutylicum adc::int(180)* nicht mehr ausreichend zu funktionieren, weshalb weitaus höhere Endkonzentrationen als in *C. acetobutylicum* ATCC 824 gemessen werden können.

4.1.4.2 Reduktion von Nebenprodukten durch Doppelmutation

Angesichts der gesteigerten Acetatproduktion in *C. acetobutylicum ctfA::int(352)* und *C. acetobutylicum adc::int(180)* sowie dem, im Phänotyp unveränderten, *C. acetobutylicum pta::int(80)* Stamm erfolgte in dieser Arbeit erstmalig die Herstellung von Doppel-Integrierten in *C. acetobutylicum* durch die Nutzung des Clostron[®] Systems. Dazu wurde die RAM-Kassette in *C. acetobutylicum pta::int(80)* entfernt und dieser Stamm daraufhin anstelle von *C. acetobutylicum* ATCC 824 zur Herstellung der Doppel-Integrierten mit den entsprechenden Plasmiden (Tab.: 2.3) verwendet. Die physiologische Charakterisierung der Doppel-Integrierten offenbarte schließlich die reduzierte Acetatproduktion durch die Inaktivierung der Pta kombiniert mit der CtfA/B-beziehungsweise Adc-Inaktivierung. *C. acetobutylicum pta::int(80)ΔRAM-ctfA::int(352)* zeigte eine Acetatreduktion um 81 % und *C. acetobutylicum pta::int(80)ΔRAM-adc::int(180)* eine Reduktion um 67 %. Dementsprechend bewirkt die Kombination unter den gewählten Wachstumsbedingungen einerseits den erwarteten Acetatarmen und Aceton-reduzierten bis -negativen Phänotyp, bedauerlicherweise jedoch nicht die Verschiebung des Gärungsstoffwechsels in Richtung Butanol, sondern führt zu einer erhöhten Butyratproduktion. Durch die Inaktivierung des Acetonsyntheseweges scheint mehr Acetoacetyl-CoA zur Verfügung zu stehen, infolgedessen müssen Ptb und Buk mehr Butyryl-CoA und Butyrylphosphat umsetzen, für die diese Enzyme eine höhere Aktivität besitzen (WIESENBORN *et al.*, 1989). Das könnte ein Grund sein, warum in den Doppel-Integrierten weniger Acetat gebildet wird als in *C. acetobutylicum pta::int(80)*. Die leicht erhöhte Acetatbildung in der *pta/adc*-Integrante verglichen zur *pta/ctfA*-Integrante, kann vermutlich auf die geringe Acetonbildung und damit verbundene Acetoacetyl-CoA-Nutzung zurückgeführt werden. Dadurch steht der Ptb weniger Butyryl-CoA zur Verfügung

und sie kann aufgrund ihrer weiten Substratnutzung auch Acetyl-CoA umsetzen. Gegen diese Vermutung spricht jedoch die vergleichbare Butyratproduktion beider Doppel-Integrierten. Ein weiteres Indiz für eine gering vorhandene Funktionalität der CtfA/B in der Pta/adc-Integrante, ist die geringe Butyratabnahme am Ende der stationären Phase. Interessant ist auch die auftretende Laktatbildung, einhergehend mit dem verringerten Glukoseverbrauch, was zuvor bei *C. acetobutylicum* *ptb::int(87)* mit den „Acid Crash“ in Verbindung gebracht wurde (MADDOX *et al.*, 2000). Dies impliziert ein hohes NADH/NAD⁺ Verhältnis, welches ebenfalls ein Grund für die drastisch gesteigerte Butyratbildung sein kann. Um den Einfluss der entfernten RAM-Kassette auf eventuelle phänotypische Abweichungen zu untersuchen, erfolgte die Herstellung des *C. acetobutylicum* *adc::int(180)ΔRAM-ptb::int(87)* Stammes. In vergleichenden Wachstumsversuchen mit *C. acetobutylicum* *pta::int(80)ΔRAM-adc::int(180)* konnte keine drastische Veränderung detektiert werden (Abb.: 7.21). Die Ergebnisse lassen vermuten, dass durch die vermehrte Säureproduktion der „Shift“ zur Solventogenese nicht erfolgt und deshalb sehr geringe Mengen an Lösungsmitteln gebildet wurden. Das Produktprofil erinnert an *C. acetobutylicum* *ptb::int(87)*, wo durch pH-kontrollierte Fermentation eine starke Lösungsmittelzunahme erzielt wurde. Vielleicht führt die pH-Kontrolle bei den Doppel-Integrierten ebenfalls zu einer vermehrten Umsetzung des Butyrats in Butanol.

4.2 Einfluss der Mutationen auf den Gärungsstoffwechsel

4.2.1 Das „Acid Crash“-Phänomen

Wie bereits erwähnt führt die pH-kontrollierte Fermentation bei *C. acetobutylicum* *ptb::int(87)* zu einem veränderten Phänotyp. Das impliziert die Annahme, dass bei *C. acetobutylicum* *ptb::int(87)* bei pH-unkontrollierten Batch-Fermentationen ein sogenannter „Acid Crash“ auftritt. Dabei findet eine übermäßige Produktion von Acetat und Butyrat ohne den signifikanten „Switch“ zur Solventogenese statt. Durch die rasche Anhäufung der undissoziierten Säuren tritt dabei ein toxischer Effekt ein, bevor diese in der Solventogenese reassimiliert werden können (MADDOX *et al.*, 2000). Bisher ist es generell akzeptiert, dass Acetat und Butyrat den „Acid Crash“ auslösen. *C. acetobutylicum* *ptb::int(87)* bildet allerdings kein Butyrat und die erreichte Acetatkonzentration ist nicht entscheidend höher als in *C. acetobutylicum* ATCC 824. Demzufolge müsste Laktat den

gleichen Effekt wie Acetat und Butyrat haben. Formiat ist ebenfalls eine schwache Säure und wird in *C. acetobutylicum* durch die Pyruvat-Formiat Lyase (PFL; CAC0980) gebildet. Normalerweise wird Formiat als C₁-Donor verwendet. Untersuchungen konnten jedoch eher einen Einfluss von Formiat beim „Acid Crash“ in ABE-Fermentation zeigen, als für Acetat und Butyrat (WHANG *et al.*, 2011). Ob *C. acetobutylicum ptb::int(87)* allerdings erhöhte Mengen an Formiat bildet, ist nicht bekannt. Dennoch kann davon ausgegangen werden, dass auch Laktat in erhöhten Mengen einen „Acid Crash“ auslöst. Anaerobe Bakterien wie *C. acetobutylicum* sind außerstande einen konstanten pH-Wert aufrechtzuerhalten. Wenn es beispielsweise zur Abnahme des externen pH-Wertes kommt, sinkt parallel auch der interne pH-Wert ab. Dabei liegt der interne pH-Wert generell um eine pH-Einheit über dem externen pH-Wert (DÜRRE, 2009). Kulturen mit einem internen pH-Wert unter 5,5 sind nicht mehr in der Lage den „Shift“ zur Lösungsmittelphase durchzuführen, da dieser Schritt Enzymsynthesen oder zumindest Enzymaktivitäten benötigt, die unter diesen Voraussetzungen nicht mehr gegeben sind (GOTTWALD, *et al.*, 1985). Die Inaktivierung der Butyratsynthese führte zu einer vermehrten Bildung von Acetat und Laktat (Tab.: 7.4). Auch wenn in der Summe keine drastische Zunahme bei *C. acetobutylicum ptb::int(87)* (6 g/l Säuren) verglichen mit *C. acetobutylicum* ATCC 824 (5,1 g/l Säuren) detektierbar ist, so kam es dennoch zu einem drastischen pH-Abfall (pH = 4,43) gegenüber *C. acetobutylicum* ATCC 824 mit einem minimalen pH-Wert von 4,85. Folglich liegt der pH-Wert in *C. acetobutylicum ptb::int(87)* bei einer pH-unkontrollierten Batch-Fermentation unter dem kritischen Wert von 5,5 und kann erklären, warum die *ptb*-Integrierte auffallend wenig Lösungsmittel produzierte. In kontrollierten Batch-Fermentationen bei pH 5,5 weist die *ptb*-Integrierte ein vergleichbares Produktspektrum zu *C. acetobutylicum* ATCC 824 auf. Erstaunlicherweise zeigte nun der Wildtyp eine höhere Säureproduktion (14,3 g/l) als *C. acetobutylicum ptb::int(87)* (9,7 g/l) und trotz ähnlicher maximaler optischen Dichten, besitzt die *ptb*-Integrierte weiterhin eine geringere Wachstumsrate (0,13 h⁻¹). Bei der Aceton- und Butanolproduktion erreichten beide Stämme vergleichbare Konzentrationen (Tab.: 3.4), jedoch stieg plötzlich die Ethanolbildung von *C. acetobutylicum ptb::int(87)* um das 9-fache von der im Wildtyp erzielten Menge an. Durch die Herabsetzung des kontrollierten pH-Wertes auf mindestens 5,0 konnte die Lösungsmittelkonzentration in *C. acetobutylicum* ATCC 824 von 10,1 g/l ABE (Aceton, Butanol, Ethanol) auf 20,8 g/l ABE

mehr als verdoppelt werden, während bei *C. acetobutylicum ptb::int(87)* sich die Produktion von 19,7 g/l ABE auf 27,5 g/l steigerte. Gleiche Beobachtungen konnten bei der Buk-Mutante (PJC4BK) gemacht werden, die aufgrund der gebildeten Gesamtmenge von 23,7 g/l ABE als „solvent superproducer“ bezeichnet wurde. Dieser Terminus geht wahrscheinlich vielmehr auf die erhöhte Butanolmenge zurück (16,7 g/l) (HARRIS *et al.*, 2000), die leider in *C. acetobutylicum ptb::int(87)* nicht erzielt werden konnte (8,4 g/l Butanol). Die Vermutung, dass die *ptb*-Integrate aufgrund des fehlenden Buytrats 30 % weniger Butanol produziert als der Wildtyp, kann mit den Butyrat-Fed-Batch Versuchen widerlegt werden. Trotz externer Zugabe von Butyrat steigt die Butanolproduktion von *C. acetobutylicum ptb::int(87)* nicht. Möglicherweise führen die reduzierten ThI- und Crt-Aktivitäten (Tab.: 3.2) zu einer verminderten Butyryl-CoA-Produktion und somit zu einer geringeren Butanolbildung als im Wildtyp. Die Optimierung erfolgte durch Fed-Batch pH $\geq 5,0$ Fermentation, infolgedessen zeigt die *ptb*-Integrate eine maximale ABE-Produktion von 45,1 g/l, jedoch stieg die Butanolmenge (7,9 g/l) nicht. Dieser Steigerungseffekt konnte bei *C. acetobutylicum* ATCC 824 für die ABE-Produktion nicht beobachtet werden (20,6 g/l). Es wird generell angenommen, dass Butanol ab einer Konzentration von 12 - 14 g/l das Wachstum durch seinen Effekt auf die Zellmembran inhibieren (JONES & WOODS, 1986). Die kritische Butanolkonzentration kann ein Grund sein, warum bei *C. acetobutylicum* ATCC 824 trotz regelmäßig zugeführter Glukose keine Steigerung der Lösungsmittel sichtbar war. Im Fall von *C. acetobutylicum ptb::int(87)* ist die Ethanolproduktion (32,5 g/l) ausschlaggebend für die drastische ABE-Menge. Ethanol wirkt, wie bereits erwähnt, erst ab 50 - 60 g/l als wachstumshemmend (JONES & WOODS, 1986). Wahrscheinlich produziert *C. acetobutylicum ptb::int(87)* deshalb doppelt so viel Lösungsmittel wie *C. acetobutylicum* ATCC 824.

4.2.2 Mögliche Auslöser der Lösungsmittelproduktion

Seit Jahren wird über den Einfluss von Butyrat beziehungsweise dessen Vorstufen diskutiert. So wird davon ausgegangen, dass der „Shift“ zur Solventogenese erfolgt, um den inhibitorischen Effekt der auftritt, wenn die produzierten Säuren ein toxisches Level erreichen, entgegenzuwirken. Mehrere Veröffentlichungen zeigen, dass die Zugabe von Butyrat bei gleichbleibendem pH-Wert oder bestimmter Konzentrationen undissoziierter Buttersäure die Lösungsmittelbildung induziert (BAHL *et al.*, 1982; MONOT *et al.*, 1984; JONES & WOODS, 1986). Die Hypothese von FOND (1986), dass eine

Schwellenwertkonzentration undissoziierte Buttersäure mit entscheidend für den „metabolischen Shift“ von der Acidogenese zur Solventogenese verantwortlich ist, kann mit den hier erzielten Daten widerlegt werden, denn *C. acetobutylicum ptb::int(87)* zeigt eindeutig Butanol- sowie übereinstimmend mit *C. acetobutylicum hbd::int(69)* Ethanol- und Acetonbildung ohne das Butyrat produziert oder zugegeben wird. Seit kurzem wird nicht nur Butyrat, sondern auch dessen Vorstufen wie zum Beispiel Butyrylphosphat als ein Signal für den Switch zur Solventogenese diskutiert (HARRIS *et al.*, 2000; ZHAO *et al.*, 2005; PAREDES *et al.*, 2005). Diese Vermutung entsteht vor allem durch die Ergebnisse der Buk- und Ptb-Mutanten. Die Buk-Mutanten erzielen normale beziehungsweise erhöhte Butanolkonzentrationen, während bei den Ptb-Mutanten (*C. acetobutylicum ptb::int(87)* und pRD1) eine stark verminderte Lösungsmittelproduktion auftritt (GREEN *et al.*, 1996; DESAI & PAPOUTSAKIS, 1999). *C. acetobutylicum hbd::int(69)* hingegen zeigt trotz fehlendem Butyrylphosphat eine drastisch gesteigerte Ethanolbildung (LEHMANN & LÜTKE-EVERSLOH, 2011). Das führt zu der Annahme, dass Butyrylphosphat nicht als Phosphodonor für die Spo0A-Phosphorylierung fungiert und damit die Lösungsmittelproduktion auslöst, wie 2004 von ZHAO *et al.*, postuliert. Denn auch ohne Analyse der intrazellulären Metabolitenkonzentration kann davon ausgegangen werden, dass durch das vollständige Fehlen von Butyrat ebenso kein Butyrylphosphat in der Zelle gebildet wird. Viel mehr stehen andere Acylphosphate in der Zelle zur Verfügung. Jedoch ist damit noch immer nicht ausgeschlossen, dass Butyrylphosphat eine konzentrationsabhängige Kontrollfunktion zugesprochen werden kann, da bei der *hbd*-Integrante weder eine positive noch eine negative Kontrolle auftreten kann (PAREDES *et al.*, 2005).

Durch die pH-kontrollierte Batch-Fermentationen von *C. acetobutylicum ptb::int(87)* konnten plötzlich bis zu 32,5 g/l Ethanol sowie erhöhte Aceton- und Butanolkonzentrationen erzielt werden. Dementsprechend ist diese *ptb*-Integrante in der Lage auch ohne Butyrylphosphat in die Solventogenese einzutreten. Obwohl in anderen Publikationen gezeigt wurde, dass der Konzentrationspeak von Butyrylphosphat in den Buk-Mutanten perfekt mit der früher eintretenden Solventogenese korreliert. So wie auch DNA-Array Analysen von Buk- und M5-Mutanten darlegen konnten, dass ein hoher Butyrylphosphat-Level mit den hochregulierten lösungsmittelbildenden Genen interagiert (HARRIS *et al.*, 2000; PAREDES *et al.*, 2005). Dennoch spricht aufgrund des Phänotyps von

C. acetobutylicum *ptb::int(87)* vieles gegen Butyrylphosphat als alleinigen Phosphodonor für die Sporulation und Solventogenese, ebenso wie die Initiation der Lösungsmittelbildung durch hohe extrazellulären Butyratkonzentrationen. Auszuschließen ist allerdings nicht, dass in *C. acetobutylicum* ATCC 824 eine erhöhte Butyratkonzentration zur Akkumulation von Butyrylphosphat und Butyryl-CoA führt und somit die Lösungsmittelbildung auslöst (GOTTWALD *et al.*, 1985). In *C. acetobutylicum* *ptb::int(87)* könnte sich angesichts der Ptb-Inaktivierung Butyryl-CoA anhäufen und folglich den gleichen Effekt wie im Wildtyp haben. Andererseits sollte dann die Lösungsmittelproduktion früher einsetzen, dieser Effekt konnte jedoch nicht beobachtet werden (Abb.: 3.8). In früheren Studien werden bereits Acylphosphate wie Acetylphosphat als mögliche Phosphodonoren für regulatorische Proteine in *E. coli* genannt (McCLEARY *et al.*, 1993; WOLFE *et al.*, 2003;). Laut PAREDES *et al.* (2005) produzieren schätzungsweise 61 von 93 Clostridien Butyrat, bei den restlichen 32 Clostridien wird seit längerem Acetylphosphat eine vergleichbar regulatorische Rolle wie in *E. coli* und verschiedenen anderen Bakterien zugeschrieben (WOLFE, 2005). Ebenso beschrieben BEHRENS & DÜRRE (2000) beim Kalium-transportierendem Kdp-System (P-Typ ATPase) in *C. acetobutylicum* ebenfalls die Möglichkeit, dass Acetylphosphat den Response Regulator KdpR phosphorylieren könnte. Trotz vieler Indikationen hinsichtlich Acetylphosphat, kann dennoch eine konzentrationsabhängige Regulation von Butyrylphosphat beziehungsweise Butyryl-CoA nicht ausgeschlossen werden.

4.2.3 Säure-Reassimilation

In der Literatur werden zwei mögliche Wege zur Wiederaufnahme der Säuren diskutiert. Einerseits wird die Umkehrreaktion des Säuresyntheseweges für die Wiederaufnahme verantwortlich gemacht, andererseits soll die Acetoacetyl-CoA:Acetat/Butyrat:CoA Transferase (CtfA/B) bei der Acetonbildung und der gleichzeitiger Reassimilation der Säuren von Bedeutung sein (JONES & WOODS, 1986). Der Mechanismus der CoA Transferase ist energetisch sinnvoller als die ATP-verbrauchende Reaktion der Acetat- oder Butyratkinase beziehungsweise durch Acyl-CoA Synthetasen. Die Energie der Thioesterbindungen von Acetoacetyl-CoA kann ohne zusätzliches ATP auf die Säuren übertragen werden, dadurch entsteht Acetoacetat sowie Acetyl-CoA oder Butyryl-CoA. Bedingt durch die thermodynamisch eher nachteilige Reaktion ($\Delta_r G_m^0 = -0,2 \text{ kcal/mol}$) wird eine anschließende Reaktion benötigt, die die Synthese in Richtung Acetoacetat

antreibt. Diese Aufgabe wird bei *C. acetobutylicum* durch Acetoacetat-Decarboxylase (Adc) übernommen. Entsprechend der exergonen Reaktion ($\Delta_r G_m^0 = -6,5 \text{ kJ/mol}$), wird Adc auch als Schlüsselenzym der Acetonproduktion bezeichnet (HARTMANIS *et al.*, 1984; ZHENG *et al.*, 2009).

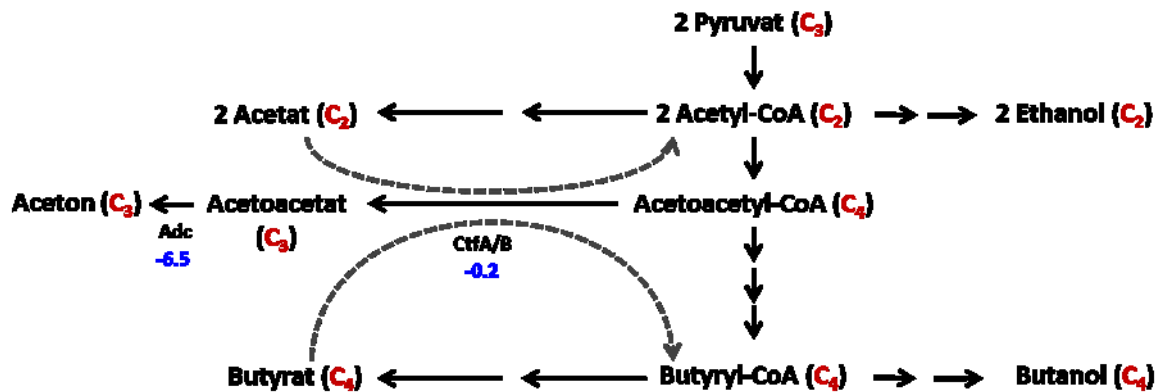


Abb. 4.3: Gärungsstoffwechsel von *Clostridium acetobutylicum*. Dargestellt sind die Fermentationsprodukte und den entsprechenden C-Körpern in rot. Die Zahlen in blau repräsentieren die freie Enthalpie der dazugehörigen Reaktion. Abkürzungen: CtfA/B, Acetoacetyl-CoA:Acetat/Butyrat:CoA Transferase; Adc Acetoacetat-Decarboxylase.

Dennoch scheint CtfA/B auch ohne Adc Acetoacetat zu produzieren, andernfalls wäre es nicht möglich geringe Acetonmengen in *C. acetobutylicum* *adc::int(180)* zu messen (LEHMANN *et al.*, 2012). Diese Annahme könnte ebenfalls die geringere Acetat-Endkonzentration in *C. acetobutylicum* *adc::int(180)* (4,2 g/l Acetat) verglichen mit *C. acetobutylicum* *ctfA::int(352)* (6,2 g/l Acetat) erklären. Durch die verringerte CtfA/B-Aktivität in *C. acetobutylicum* *adc::int(180)* können nur noch geringe Menge Acetat in Acetyl-CoA umgewandelt werden. Hinsichtlich der Inaktivierung von CtfA/B in *C. acetobutylicum* *ctfA::int(352)* kann Acetat nicht reassimiliert oder Aceton gebildet werden. Dieser Zusammenhang wurde bereits von ANDERSCH *et al.* (1983) beschrieben, demnach erfolgte erst nach der Induktion von Adc die Wiederaufnahme der Säuren Acetat und Butyrat. Demgegenüber weisen sowohl *C. acetobutylicum* *ctfA::int(352)* als auch *C. acetobutylicum* *adc::int(180)* eine Abnahme der Butyratkonzentration auf. Folglich muss *C. acetobutylicum* eine zusätzlich Möglichkeit haben um Butyrat zu reassimilieren. Dafür sprechen zusätzlich die Ergebnisse der Butyrat Fed Batch Fermentationen (3.3.2.3) mit *C. acetobutylicum* *ptb::int(87)*. Ungeachtet der Ptb-Inaktivierung ist *C. acetobutylicum* *ptb::int(87)* befähigt das zugeführte Butyrat aufzunehmen (LEHMANN *et al.*, 2012 b). Demzufolge können diese Ergebnisse einerseits für einen dritten Säure-Aufnahmeweg sprechen, andererseits kann es möglich sein, dass

CtfA/B und der umgekehrt Syntheseweg mittels Buk sowie der Ptb parallel ablaufen. Da bei einer inaktivierten, beziehungsweise aktivitätsverminderten CtfA/B kein Acetat aber Butyrat reassimiliert wird (Abb.: 3.12), jedoch trotz Ptb-Inaktivierung Acetat und Butyrat wieder aufgenommen werden (Abb.: 3.10), ist es denkbar, dass CtfA/B Acetat und Butyrat für die Synthese von Aceton verwendet und gleichzeitig Butyrat mittels Buk und Ptb unter ATP-Verbrauch aufgenommen werden. Dafür sprechen auch die detektierten Butyrylphosphat und Acetylphosphat Peaks in früheren Untersuchungen. Demnach wird der zweite Butyrylphosphat und der einzelne Acetylphosphat Peak der Wiederverwendung durch CtfA/B zugesprochen, wogegen der erste Peak von Butyrylphosphat höchstwahrscheinlich durch die Umkehrreaktion der Butyratsynthese entsteht. (ZHAO *et al.*, 2005). Angesichts der restlichen Buk-Aktivität (23 %) in *C. acetobutylicum ptb::int(87)* kann die Reassimilation von Butyrat mittels Buk und nicht ausgeschlossen werden. Die Bildung von Butyryl-CoA aus Butyrylphosphat kann vielleicht durch eine andere Phosphotransferase erfolgen. Wie die Substratspezifität von Pta gegenüber Butyrylphosphat ist, ist in der zugänglichen Literatur noch nicht beschrieben worden (GREEN *et al.*, 1996). Die vorhandenen Ergebnisse können jedoch die Annahme entkräften, dass Säuren nicht ohne Acetonbildung reassimiliert werden können (JONES & WOODS, 1986).

4.2.4 Stammoptimierung durch „Metabolic Engineering“

„Metabolic Engineering“ hat einen großen Stellenwert in der Optimierung von industriellen Stämmen und der Erzeugung neuer Stämme sowie für die Grundlagenforschung. Während dieser Arbeit wurden eine Vielzahl von *C. acetobutylicum* Stämmen erzeugt, mit dem Fokus auf die Butanolsteigerung und Nebenproduktreduktion. Neben der Herstellung von Butyrat- und Aceton- negativen Stämmen, konnte ebenso der Beweis erbracht werden, dass *C. acetobutylicum* ohne den C₄-Weg beachtliche Ethanolmengen produziert. Außerdem wurden erstmals Doppel-Integranten mit dem Clostron[®]-System in *C. acetobutylicum* erstellt. Jedoch konnte das Primärziel nicht erreicht werden. Wie sich herausstellte haben die Redoxbalance, die umgebenden Enzyme sowie die Wachstumsbedingungen einen zusätzlich wichtigen Einfluss auf den Phänotyp. Wie anhand von *C. acetobutylicum ptb::int(87)* gezeigt wurde, konnten durch pH-Kontrollen das Produktspektrum der Integrante, zu einer stark erhöhten Ethanolproduktion verändert werden. Interessant wäre diese Untersuchung ebenfalls für die Doppel-

Integranen. Alle Integranen unter verschiedensten Bedingungen physiologisch zu charakterisieren, ist ein sehr aufwendiges Vorhaben und sollte eher durch „Metabolic Flux“ Analysen (MFA) ersetzt werden. MFA ermöglicht die zelluläre Physiologie unter bestimmten Konditionen zu verstehen und Vorhersagen zum metabolischen Potenzial nach einer genetischen Manipulation zu treffen (LEE *et al.*, 2011).

5 Zusammenfassung

1. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 12 Insertionsmutanten mittels Clostron®-System hergestellt und durch Southern Hybridisierung bestätigt. Da bei Lag der Fokus auf der Analyse der Insertionsmutanten *C. acetobutylicum* *hbd::int(69)*, *C. acetobutylicum* *ptb::int(87)*, *C. acetobutylicum* *pta::int(80)*, *C. acetobutylicum* *ctfA::int(352)*, *C. acetobutylicum* *adc::int(180)*, *C. acetobutylicum* *pta::int(80)ΔRAM-ctfA::int(352)* und *C. acetobutylicum* *pta::int(80)ΔRAM-adc::int(180)*
2. Durch die Inaktivierung der 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase in *C. acetobutylicum* *hbd::int(69)* wurde erstmalig der komplette C₄-Stoffwechsel des Gärungsstoffwechsels ausgeschaltet und die Erkenntnis erlangt, dass diese Insertionsmutante trotz des massiven Eingriffs lebensfähig ist und enorme Mengen an Ethanol produziert.
3. *C. acetobutylicum* *ptb::int(87)* offenbarte einen zuvor noch nicht beschriebenen Butyrat-negativen Phänotyp, der zudem mittels Enzymaktivitätsmessungen bestätigt wurde. Durch pH-kontrollierten Fermentation und Butyrat-Fed-Batch Kultivierung konnte ebenfalls neben der Aceton- und leicht verminderten Butanolproduktion, eine erhöhte Ethanolproduktion nachgewiesen werden.
4. Aceton als Nebenprodukt der Butanolbildung wurde in den *C. acetobutylicum* *ctfA::int(352)* und *C. acetobutylicum* *adc::int(180)* Stämmen drastisch reduziert bzw. eliminiert.
5. Zum ersten Mal ist es gelungen Doppel-Integrianten mit dem Clostron®-System in *C. acetobutylicum* ATCC 824 zu erzeugen. *C. acetobutylicum* *pta::int(80)ΔRAM-ctfA::int(352)* und *C. acetobutylicum* *pta::int(80)ΔRAM-adc::int(180)* weisen beide einen Acetat-armen und jeweils einen Aceton-negativen bzw. -reduzierten Phänotyp auf.

Literaturverzeichnis

ABRAHAM L. J. und ROOD J. I. Identification of Tn4451 and Tn4452, chloramphenicol resistance transposons from *Clostridium perfringens*. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*. - 1987. - 1579-1584.

ALDIGUIER A. S. [et al.] Synergistic temperature and ethanol effect on *Saccharomyces cerevisiae* dynamic behaviour in ethanol bio-fuel production. *Bioprocess Biosyst Eng.* - 2004. - 217–222.

ALPER H. und STEPHANOPOULOS G. Engineering for biofuels: exploiting innate microbial capacity or importing biosynthetic potential? *NATURE REVIEWS | Microbiology*. - 2009. - 715-723.

ALSAKER K. V. und PAPOUTSAKIS E. T. Transcriptional Program of Early Sporulation and Stationary-Phase Events in *Clostridium acetobutylicum*. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*. - 2005. - 7103–7118.

AMADOR-NOGUEZ D. [et al.] Systems-Level Metabolic Flux Profiling Elucidates a Complete, Bifurcated Tricarboxylic Acid Cycle in *Clostridium acetobutylicum*. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*. - 2010. - 4452–4461.

ANDERSCH W., BAHL H. und GOTTSCHALK G. Level of enzymes involved in acetate, butyrate, acetone and butanol formation by *Clostridium acetobutylicum*. *European Journal Of Applied Microbiology*. - 1988. - 327-332.

ANDERSCH W., BAHL H. und GOTTSCHALK G. Level of Enzymes Involved in Acetate, Butyrate, Acetone and Butanol Formation by *Clostridium acetobutylicum*. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol*. - 1983. - 327-332.

BAHL H. [et al.] Effect of pH and Butyrate Concentration on the Production of Acetone and Butanol by *Clostridium acetobutylicum* Grown in Continuous Culture. *European J Appl Microbiol Biotechnol*. - 1982. - 17-20.

BAHL H. und DÜRRE P. Clostridia. - Weinheim : WILEY-VCH Verlag GmbH, 2001.

BALUSU R. [et al.] Production of Ethanol From Cellulosic Biomass by *Clostridium thermocellum* SS19 in Submerged Fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. - 2004. - 133-141.

BEHRENS M. und DÜRRE P. KdpE of *Clostridium acetobutylicum* is a Highly Specific Response Regulator Controlling only the Expression of the kdp Operon. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol*. - 2000. - 45-52.

BERGMEYER H. U. Methoden der enzymatischen Analyse. - Weinheim 2 Auflage Verlag Chemie GmbH, 1970.

- BERTRAM J.** Entwicklung eines Systems zum DNA-Transfer und zur Transposon-Mutagenese für *Clostridium acetobutylicum*. - Dissertation: Georg-August-Universität Göttingen, 1989.
- BIRNBAIM H. C. und DOLY J** A rapid extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.* - 1979. - 1513-1523.
- BLUSSON H., PETITDEMANGE H. und GAY R.** A New, Fast, and Sensitive Assay for NADH-Ferredoxin Oxidoreductase Detection in Clostridia. *Analytical Biochemistry.* - 1981. - 176-181.
- BOYD J. M., ELLSWORTH H. und ENSIGN S. A.** Bacterial Acetone Carboxylase Is a Manganese-dependent Metalloenzyme. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY.* - 2004. - 46644–46651.
- BRADFORD M. M.** A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem* 72. - 1976. - 248-254.
- BREKASIS D. und PAGET M. S.** A novel sensor of NADH/NAD⁺ redox poise in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *EMBO J.* - 2003. - 4856–4865.
- BREZNAK J. A. und COSTILOW R. N.** Physicochemical factors of growth. In: Gerhardt (ed). *Methods of general and molecular bacteriology.* American Society for Microbiology, Washington DC, USA, 137-154., 1994.
- BRÜGGEMANN H. und GOTTSCHALK, G.** Clostridia - Molecular Biology in the Post-genomic Era. - Norfolk, UK : Caister Academic Press, 2009.
- CARY J. W. [et al.]** Cloning and Expression of *Clostridium acetobutylicum* Phosphotransbutyrylase and Butyrate Kinase Genes in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology.* - 1988. - 4613-4618.
- CHEN J.-S.** Alcohol dehydrogenase: multiplicity and relatedness in the solvent-producing clostridia. *FEMS Microbiology Review.* - 1995. - 263-273.
- CHEN Y [et al.]** Construction of an Alpha Toxin Gene Knockout Mutant of *Clostridium perfringens* Type A by Use of a Mobile Group II Intron. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY.* - 2005. - 7542–7547.
- CHESTER N. und MARSHAK D. R.** Dimethyl sulfoxide-mediated primer T_m reduction: a method for analysing the role of renaturation temperature in the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 33. - 1993. - 39-45.
- CHIAREZZA M. [et al.]** The NanI and NanJ Sialidases of *Clostridium perfringens* Are Not Essential for Virulence. *INFECTON AND IMMUNITY.* - 2009. - 4421–4428.
- CLARK SANDRA W., BENNETT GEORGE N. und RUDOLPH FREDERICK B.** Isolation and Characterization of Mutants of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 Deficient in

Acetoacetyl-Coenzyme A:Acetate/Butyrate:Coenzyme A-Transferase(EC 2.8.3.9) and in Other Solvent Pathway Enzymes. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. - 1989. - 970-976.

COUSINEAU B. [et al.] Retrohoming of a Bacterial Group II Intron: Mobility via Complete Reverse Splicing, Independent of Homologous DNA Recombination. *Cell*. - 1998. - 451–462.

DESAI R. P. und PAPOUTSAKIS E. T: Antisense RNA Strategies for Metabolic Engineering of *Clostridium acetobutylicum*. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. - 1999. - 936–945.

DESAI R. P., NIELSON L. K. und PAPOUTSAKIS E. T. Stoichiometric modeling of *Clostridium acetobutylicum* fermentations with non-linear constraints. *Journal of Biotechnology*. - 1999. - 91–205.

DIEN B. S., COTTA M. A. und JEFFRIES T. W. Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. *Appl Microbiol Biotechnol*. - 2003. - 258–266.

DOWER W. J., MILLER J. F. und RAGSDALE C. W. High efficiency transformation of *Escherichia coli* by high voltage electroporation. *Nucl Acids Res*. - 1988. - 6127-6145.

DÜRRE P [et al.] Enzymatic investigations on butanol dehydrogenase and butyraldehyde dehydrogenase in extracts of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* - 1987. - 268-272.

DÜRRE P. [et al.] Enzymatic investigations on butanol dehydrogenase and butyraldehyde dehydrogenase in extracts of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Microbiol Biotechnol*. - 1987. - 268-272.

DÜRRE P. Metabolic Networks in *Clostridium acetobutylicum*: Interaction of Sporulation, Solventogenesis and Toxin Formation. *Clostridia - Molecular Biology in the Post-genomic Era / BRÜGGEMANN H. und GOTTSCHALK G.* - Norfolk, UK : Caister Academic Press, 2009.

DÜRRE P. New insights and novel developments in clostridial acetone/butanol/isopropanol fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol*. - 1998. - 639-648.

ESKES R. [et al.] Mobility of Yeast Mitochondrial Group II Introns: Engineering a New Site Specificity and Retrohoming via Full Reverse Splicing. *Cell*, Vol. 88. - 1997. - 865–874.

FEUSTEL L., NAKOTTE S. und DÜRRE P. Characterization and Development of Two Reporter Gene Systems for *Clostridium acetobutylicum*. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. - 2004. - 798–803.

FOND O. [et al.] The Acetone Butanol Fermentation on Glucose and Xylose. I. Regulation and Kinetics in Batch Cultures. *Biotechnology and Bioengineering*. - 1986. - 160-166.

FONTAINE L. [et al.] Molecular Characterization and Transcriptional Analysis of adhE2, the Gene Encoding the NADH-Dependent Aldehyde/Alcohol Dehydrogenase Responsible

for Butanol Production in Alcohologenic Cultures of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Journal Of Bacteriology* - 2002. - 821-830.

FRANKE A. E. und CLEWELL D. B. Evidence for a Chromosome-Borne Resistance Transposon (Tn916) in *Streptococcus faecalis* That Is Capable of "Conjugal" Transfer in the Absence of a Conjugative Plasmid. *Journal of Bacteriology*. - 1981. - 494-502.

FRAZIER C. L. [et al.] Genetic Manipulation of *Lactococcus lactis* by Using Targeted Group II Introns: Generation of Stable Insertions without Selection. *Applied And Environmental Microbiology*. - 2003. - 1121-1128.

GHESHLAGHI R. [et al.] Metabolic pathways of clostridia for producing butanol. *Biotechnology Advances*. - 2009. - 764-781.

GIRBAL L. [et al.] Regulation of metabolic shifts in *Clostridium acetobutylicum*. *FEMS Microbiology Review*. - 1995. - 287-297.

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

GREEN E. M. [et al.] Genetic manipulation of acid formation pathways by gene inactivation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Microbiology*. - 1996. - 2079-2086.

GREEN E. M. und BENNETT G. N. Genetic Manipulation of Acid And Solvent Formation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Biothechnology And Bioengineering*; Vol. 58 . - 1998. - 215-221.

GRIMMLER C. [et al.] Genome-Wide Gene Expression Analysis of the Switch between Acidogenesis and Solventogenesis in Continuous Cultures of *Clostridium acetobutylicum*. *J Mol Microbiol Biotechnol*. - 2011. - 1–15.

GYAN S. [et al.] Regulatory loop between redox sensing of the NADH/NAD(+) ratio by Rex (YdiH) and oxidation of NADH by NADH dehydrogenase Ndh in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*. - 2006. - 7062-7071.

HAN B., GOPALAN V. und EZEJI T. C. Acetone production in solventogenic *Clostridium* species: new insights from non-enzymatic decarboxylation of acetoacetate. *Appl Microbiol Biotechnol*. - 2011. - 565–576.

HANAHAN D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. - 1983. - 23-28.

HARRIS L. M. [et al.] Characterization of Recombinant Strains of the *Clostridium acetobutylicum* Butyrate Kinase Inactivation Mutant: Need for New Phenomenological Models for Solventogenesis and Butanol Inhibition? *Biotechnology And Bioengineering*. - 2000. - 1-11.

- HARRIS L. M., WELKER N. E. und PAPOUTSAKIS E. T.** Northern, Morphological, and Fermentation Analysis of spo0A Inactivation and Overexpression in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*. - 2002. - 3586–3597.
- HARTMANIS M. G. N.** Butyrate Kinase from *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of Biological Chemistry*. - 1987. - 617-621.
- HARTMANIS M. G. N. und GATENBECK S.** Intermediary Metabolism in *Clostridium acetobutylicum*: Levels of Enzymes Involved in the Formation of Acetate and Butyrate. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. - 1984. - 1277-1283.
- HARTMANIS M. G. N., KLASON T. und GATENBECK S.** Uptake and activation of acetate and butyrate in *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Microbiol Biotechnology*. - 1984. - 66-71.
- HEAP J .T. [et al.]** The Clostron: A universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*. *Journal of Microbiological Methods*. - 2007. - 452-464.
- HEAP J. T. [et al.]** Development of Genetic Knock-out Systems for Clostridia. - Clostridia - Molecular Biology in the Post-genomic Era / BRÜGGEMANN H. und GOTTSCHALK G.. - Norfolk, UK : Caister Academic Press, 2009.
- HEAP J. T. [et al.]** The Clostron: Mutagenesis in *Clostridium* refined and streamlined. *Journal of Microbiological Methods*. - 2010. - 49–55.
- HO S. N. [et al.]** Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*. - 1989. - 51-59.
- HÖNICKE D. [et al.]** Global transcriptional changes of *Clostridium acetobutylicum* cultures with increased butanol:acetone ratios. *New Biotechnology*. - 2012.
- HÖNICKE Daniel** Vergleichende Gentranskriptionsanalysen zur Butanolproduktion von „*Clostridium acetobutylicum*. - Universität Rostock : Diplomarbeit, 2009.
- HUANG K.-x. [et al.]** Identification and Characterization of a Second Butyrate Kinase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* - 2000. - 33-38.
- HUANG W.-C, RAMEY D. E. und YANG S.-T.** Continuous Production of Butanol by *Clostridium acetobutylicum* Immobilized in a Fibrous Bed Bioreactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. - 2004. - 887-898.
- HÜSEMANN H. W. und PAPOUTSAKIS E. T.** Comparison between in vivo and in vitro enzyme activities in continuous and batch fermentations of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Microbiol Biotechnol.* - 1989. - 585-595.
- HÜSEMANN M. H. W. und PAPOUTSAKIS E. T.** Comparison between in vivo and in vitro enzyme activities in continuous and batch fermentations of *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Microbiology Biotechnolog.* - 1985. - 585-595.

- INUI M. [et al.]** Expression of *Clostridium acetobutylicum* butanol synthetic genes in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol.* - 2008. - 1305-1316.
- JANSSEN H. [et al.]** A proteomic and transcriptional view of acidogenic and solventogenic steady-state cells of *Clostridium acetobutylicum* in a chemostat culture. *Appl Microbiol Biotechnol.* - 2010. - 2209-2226.
- JANSSEN H.** Das Proteom und Transkriptom von *Clostridium acetobutylicum* bei unterschiedlichen pH-Werten im Chemostaten. - Rostock : Dissertation, 2010.
- JIA K. [et al.]** Group II Intron-Anchored Gene Deletion in *Clostridium*. *PLoS ONE.* - 2011. - 1-10.
- JIANG Y. [et al.]** Disruption of the acetoacetate decarboxylase gene in solvent-producing *Clostridium acetobutylicum* increases the butanol ratio. *Metabolic engineering.* - 2009. - 284-291.
- JONES D. T. [et al.]** Bacteriophage Infections in the Industrial Acetone Butanol (AB) Fermentation Process. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* - 2000. - 21-26.
- JONES D. T. und WOODS D. R.** Acetone-Butanol Fermentation Revisited. *MICROBIOLOGICAL REVIEWS.* - 1986. - 484-524.
- JUNGERMANN K. [et al.]** Regulation of the Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide-Ferredoxin Reductase System in *Clostridium kluyveri*. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY.* - 1971. - 960-963.
- KAIZHI J. [et al.]** Group II Intron-Anchored Gene Deletion in *Clostridium acetobutylicum*. *PLoS ONE.* - 2011. - 1-10.
- KARBERG M. [et al.]** Group II introns as controllable gene targeting vectors for genetic manipulation of bacteria. *nature biotechnology* - 2001. - 1162-1167.
- KELLOGG S. T., CHATTERJEE D. K. und CHAKRABARTY A. M.** Plasmid-assisted molecular breeding: new technique for enhanced biodegradation of persistent toxic chemicals. *Science.* - 1981. - 1133-1135.
- KENNERKNECHT N. [et al.]** Metabolic Engineering: Entwicklung von Bakterienstämmen für die Lysinproduktion. *BIOspektrum.* - 2003. - 582-585.
- KIM Y., INGRAM L. O. und SHANMUGAM K. T.** Construction of an *Escherichia coli* K-12 Mutant for Homoethanologenic Fermentation of Glucose or Xylose without Foreign Genes. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY.* - 2007. - 1766-1771.
- KIRBY K. S.** A New Method for the Isolation of Ribonucleic Acids from Mammalian Tissues. *Biochem. J.* 64. - 1956. - 405-408.

KRAHULEC S. [et al.] Fermentation of mixed glucose-xylose substrates by engineered strains of *Saccharomyces cerevisiae*: role of the Coenzyme specificity of xylose reductase, and effect of glucose on xylose utilization. *Microbial Cell Factories*. - 2010. - 1-14.

KUEHNE S. A. [et al.] Clostron-Mediated Engineering of *Clostridium* - Strain Engineering Methods and Protocols / WILLIAMS J. A.. - New York : Springer, 2011.

KUIT W. [et al.] Disruption of the acetate kinase (ack) gene of *Clostridium acetobutylicum* results in delayed acetate production. *Appl Microbiol Biotechnol*. - 2012. - 729-741.

LEE S. Y. [et al.] Fermentative Butanol Production by Clostridia. *Biotechnology and Bioengineering*. - 2008. - 209-228.

LEE S. Y., PARK J. M. und KIM T. Y. Application of metabolic flux analysis in metabolic engineering. *Methods Enzymol*. - 2011. - 67-93..

LEE Y. [et al.] Metabolic Engineering of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 for Isopropanol-Butanol-Ethanol Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*. - 2011.

LEHMANN D. [et al.] Modifying the product pattern of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Microbiol Biotechnol*. - 2012 a. - 743-54.

LEHMANN D. und LÜTKE-EVERSLOH T. Switching *Clostridium acetobutylicum* to an ethanol producer by disruption of the butyrate/butanol fermentative pathway. *Metabolic Engineering*. - 2011. - 464-473.

LEHMANN D., RADOMSKI N. und LÜTKE-EVERSLOH T. New insights into the butyric acid metabolism of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Microbiol Biotechnol*. - 2012 b. - in press.

LIN W.-J. und JOHNSON E. A. Transposon Tn916 mutagenesis in *Clostridium botulinum*. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. - 1991. - 2946-2950.

LIYANAGE H. [et al.] *Clostridium beijerinckii* and *Clostridium difficile* Detoxify Methylglyoxal by a Novel Mechanism Involving Glycerol Dehydrogenase. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. - 2001. - 2004–2010.

LÜTKE-EVERSLOH T. und BAHL H. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum*: recent advances to improve butanol production. *Current Opinion in Biotechnology*. - 2011. - 1-14.

MACQUITTY J. J. Impact of biotechnology on the chemical industry. *ACS Symposium Series*. - 1988. - 11-29.

MADAN V. K., HILLMER P. und GOTTSCHALK G. Purification and Properties of NADP-Dependent L(+)-3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase from *Clostridium kluyveri*. *Eur. J. Biochem*. - 1973. - 51-56.

- MADDOX I. S. [et al.]** The Cause of "Acid Crash" and "Acidogenic Fermentations" During the Batch Acetone-Butanol-Ethanol (ABE-) Fermentation Process. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* - 2000. - 95-100.
- McCLEARY W. R., STOCK J. B. und NINFA A. J.** Is Acetyl Phosphate a Global Signal in *Escherichia coli*? *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*. - 1993. - 2793-2798.
- MERMELSTEIN L. D. und PAPOUTSAKIS E. T.** *In Vivo* Methylation in *Escherichia coli* by the *Bacillus subtilis* Phage +3T I Methyltransferase To Protect Plasmids from Restriction upon Transformation of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* - 1993. - 1077-1081.
- MERMELSTEIN L. D., WELKER N. E. und BENNETT G. N.** Expression of cloned homologous fermentative genes in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Bio/Technol.* - 1992. - 190-195.
- MEYER C. L., ROOS J. W. und PAPOUTSAKIS E. T.** Carbon monoxide gasing leads to alcohol production and butyrate uptake without acetone formation in continuous cultures of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Microbiol Biotechnol.* - 1986. - 159--167.
- MISTRY F. R. und COONEY C. L.** Production of Ethanol by *Clostridium thermosaccharolyticum*: 1. Effect of Cell Recycle and Environmental Parameters. *Biotechnology and Bioengineering*. - 1989. - 1295- 1304.
- MOHR G. [et al.]** Rules for DNA target-site recognition by a lactococcal group II intron enable retargeting of the intron to specific DNA sequences. *GENES & DEVELOPMENT*. - 2000. - 559--573.
- MONOT F. [et al.]** Acetone and butanol production by *Clostridium acetobutylicum* in a synthetic medium. *Appl Environ Microbiol* 44. - 1982. - 1318-1324.
- MONOT F., ENGASSER J. M. und PETITDEMANGE H.** Influence of pH and undissociated butyric acid on the production of acetone and butanol in batch cultures of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* - 1984. - 422-426.
- MURRAY W. D., WEMYSS K. B. und KHAN A. W.** Increased Ethanol Production and Tolerance by a Pyruvate-Negative Mutant of *Clostridium saccharolyticum**. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol.* - 1983. - 71-74.
- NELSON D. und COX M.** Lehninger Biochemie - Berlin : Springer, 2001.
- NEREM R. M.** Cellular Engineering. *Annals of BiomedicalEngineering*. - 1991. - 529-545.
- NI Y. und SUN Z.** Recent progress on industrial fermentative production of acetone-butanol-ethanol by *Clostridium acetobutylicum* in China. *Appl Microbiol Biotechnol.* - 2009. - 415--423.
- NIELSON J.** It Is All about Metabolic Fluxes. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*. - 2003. - 7031--7035.

- NÖLLING J. [et al.]** Genome Sequence and Comparative Analysis of the Solvent-Producing Bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*. - 2001. - 4823–4838.
- O`CONNOR J. R. [et al.]** Construction and analysis of chromosomal *Clostridium difficile* mutants. *Molecular Microbiology*. - 2006. - 1335–1351.
- OELMÜLLER U. [et al.]** Isolation of prokaryotic RNA and detection of specific mRNA with biotinylated probes. *J Microbiol Meth.* - 1990. - 73-81.
- OUNINE K. [et al.]** Acetone-Butanol Production from pentose by *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnology Letters*. - 1983. - 605-610.
- OUNINE K. [et al.]** Regulation and Butanol Inhibition of D-Xylose and D-Glucose Uptake in *Clostridium acetobutylicum*. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. - 1985. - 874-878.
- PAREDES C. J., ALSAKER K. V. und PAPOUTSAKIS E. T.** A Comparative Genomic View of Clostridial Sporulation and Physiology. *Nature Reviews Microbiology*. - 2005. - 1-10.
- PEGUIN S. und SOUCAILLE P.** Modulation of Carbon and Electron Flow in *Clostridium acetobutylicum* by Iron Limitation and Methyl Viologen. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. - 1995. - 403–405.
- PEI J. [et al.]** The mechanism for regulating ethanol fermentation by redox levels in *Thermoanaerobacter ethanolicus*. *Metabolic Engineering*. - 2011. - 186-193.
- PERUTKA J. [et al.]** Use of Computer-designed Group II Introns to Disrupt *Escherichia coli* DExH/D-box Protein and DNA Helicase Genes. *J. Mol. Biol.* 336. - 2004. - 421–439.
- PFROMM P. H. [et al.]** Bio-butanol vs. Bio-Ethanol: A technical and economic assessment for corn and switchgrass fermented by yeast or *Clostridium acetobutylicum*. *BIOMASS & BIOENERGY*. - 2010. - 515-524.
- RAJU D. und SARKER M. R.** Comparison of the Levels of Heat Resistance of Wild-Type, cpe Knockout, and cpe Plasmid-Cured *Clostridium perfringens* Type A Strains *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. - 2005. - 7618–7620.
- ROMERO S. [et al.]** Metabolic Engineering of *Bacillus subtilis* for Ethanol Production: Lactate Dehydrogenase Plays a Key Role in Fermentative Metabolism. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. - 2007. - 5190–5198.
- ROSE I. A.** Acetate Kinase of Bacteria (Acetokinase). *Methods in Enzymology*. - 1955. - 591-595.
- SAMBROOK J und RUSSEL D. W.** *Molecular cloning: a laboratory manual (3rd ed.)*. - New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. 2001.

- SAUER U. und DÜRRE P.** Differential induction of genes related to solvent formation during the shift from acidogenesis to solventogenesis in continuous culture of *Clostridium acetobutylicum*. *FEMS Microbiology Letters*. - 1995. - 115-120.
- SHAW A. J. [et al.]** Metabolic engineering of a thermophilic bacterium to produce ethanol at high yield PNAS. - 2008. - 13769–13774.
- SILLERS R., AL-HINAI M. A. und PAPOUTSAKIS E. T.** Aldehyde–Alcohol Dehydrogenase and/or Thiolase Overexpression Coupled With CoA Transferase Downregulation Lead to Higher Alcohol Titters and Selectivity in *Clostridium acetobutylicum* Fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*. - 2009. - 38-49.
- SIVAGNANAM K. [et al.]** Comparative shotgun proteomic analysis of *Clostridium acetobutylicum* from butanol fermentation using glucose and xylose. *Proteome Science* . - 2011. - 1-14.
- STEPHANOPOULOS G. [et al.]** Metabolic engineering: principles and methodologies. - San Diego : Elsevier Science (USA), 1998.
- STEPHANOPOULOS G. und VALLINO J. J.** Network Rigidity and Metabolic Engineering in Metabolite Overproduction. *SCIENCE*. - 1991. - 1675-1681.
- SULLIVAN L.** Molecular and Genomic Analyses in *Clostridium Acetobutylicum*. - Houston : Rice University, 2009.
- TIMMIS K. N., ROJO F. und RAMOS J. L.** Prospects for Laboratory Engineering of Bacteria. Environmental Biotechnology - Reducing Risks form Environmental Chemicals through Biotechnology / OMENN G. S.. - New York : Plenum Press, 1988.
- TONG I-T., LIAO H. H. und CAMERON D. C.** 1,3-Propanediol Production by *Escherichia coli* Expressing Genes from the *Klebsiella pneumoniae* dha Regulon. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. - 1991. - 3541-3546.
- TUMMALA S. B., JUNNE S. G. und PAPOUTSAKIS E. T.** Antisense RNA Downregulation of Coenzyme A Transferase Combined with Alcohol-Aldehyde Dehydrogenase Overexpression Leads to Predominantly Alcoholic *Clostridium acetobutylicum* Fermentations. *Journal of Bacteriology*. - 2003(b). - 3644-3653.
- TUMMALA S. B., WELKER N. E. und PAPOUTSAKIS E. T.** Design of Antisense RNA Constructs for Downregulation of the Acetone Formation Pathway of *Clostridium acetobutylicum*. *Journal Of Bacteriology*. - 2003(a). - S. 1923-1934.
- VASCONCELOS I., GIRBAL L. und SOUCAILLE P.** Regulation of Carbon and Electron Flow in *Clostridium acetobutylicum* Grown in Chemostat Culture at Neutral pH on Mixtures of Glucose and Glycerol. *Journal of Bacteriology*. - 1994. - 1443-1450.
- WALTER K. A. [et al.]** Sequence and arrangement of two genes of the butyrate-synthesis pathway of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 *Gene*. - 1993. - 107-111.

- WALTER K. A., BENNETT G. N. und PAPOUTSAKIS E. T.** Molecular Characterization of Two *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 Butanol Dehydrogenase Isozyme Genes. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*. - 1992. - 7149-7158.
- WANG L. K. [et al.]** Environmental Biotechnology (Handbook of Environmental Engineering) Volume 10. - New York : Human Press (Springer), 2010.
- WANG S. [et al.]** Formic Acid Triggers the "Acid Crash" of Acetone-Butanol-Ethanol Fermentation by *Clostridium acetobutylicum*. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. - 2011. - 1674–1680.
- WATANABE S. [et al.]** Ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing protein-engineered NADH-preferring xylose reductase from *Pichia stipitis*. *Microbiology*. - 2007. - 3044–3054.
- WIESENBORN D. P., RUDOLPH F. B. Rudolph und PAPOUTSAKIS E. T.** Thiolase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and its role in the synthesis of acids and solvents. *Applied Environmental Microbiology*. - 1988. - 2717-2722.
- WIESENBORN D. P., RUDOLPH F. B. und PAPOUTSAKIS E. T.** Phosphotransbutyrylase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and Its Role in Acidogenesis. *Applied and Environmental Microbiology*. - 1989. - 317-322.
- WIETZKE M. und BAHL H.** The redox--sensing protein Rex, a transcriptional regulator of solventogenesis in *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Microbiology Biotechnology*. - 2012. - doi: 10.1007/s00253-012-4112-2
- WILKINSON S. R. und YOUNG M.** Targeted integration of genes into the *Clostridium acetobutylicum* c chromosome. *Microbiology*. - 1994. - 89-95.
- WOLFE A. J. [et al.]** Evidence that acetyl phosphate functions as a global signal during biofilm development. *Molecular Microbiology*. - 2003. - 977–988.
- WOLFE A. J.** The Acetate Switch. *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS*. - 2005. - 12–50.
- WOODS D. R.** The genetic engineering of microbial solvent production. *Trends in Biotechnology*. - 1995. - 259-264.
- WOOLLEY R. C. [et al.]** Transfer of Tn 7 545 and Tn9 7 6 to *Clostridium acetobutylicum*. *PLASMID*. - 1989. - 169-174.
- YAO J., ZHONG J. und LAMBOWITZ A. M.** Gene targeting using randomly inserted group II introns (targetrons) recovered from an *Escherichia coli* gene disruption library. *Nucleic Acids Research*. - 2005. - 3351-3362.
- ZHANG Y., YU, M. und YANG S.-T.** Effects of ptb Knockout on Butyric Acid Fermentation by *Clostridium tyrobutyricum*. *Biotechnology Progress*. - 2012. - 52-59.

ZHAO Y. [et al.] Intracellular Butyryl Phosphate and Acetyl Phosphate Concentrations in *Clostridium acetobutylicum* and Their Implications for Solvent Formation. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. - 2005. - 530–537.

ZHENG Y.-N. [et al.] Problems with the microbial production of butanol. *J Ind Microbiol Biotechnol*. - 2009. - 1127–1138.

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

ZHU Y. und YANG S.-T. Effect of pH on metabolic pathway shift in fermentation of xylose by *Clostridium tyrobutyricum*. *Journal of Biotechnology*. - 2004. - 143–157

Anhang

Integrationsvektor

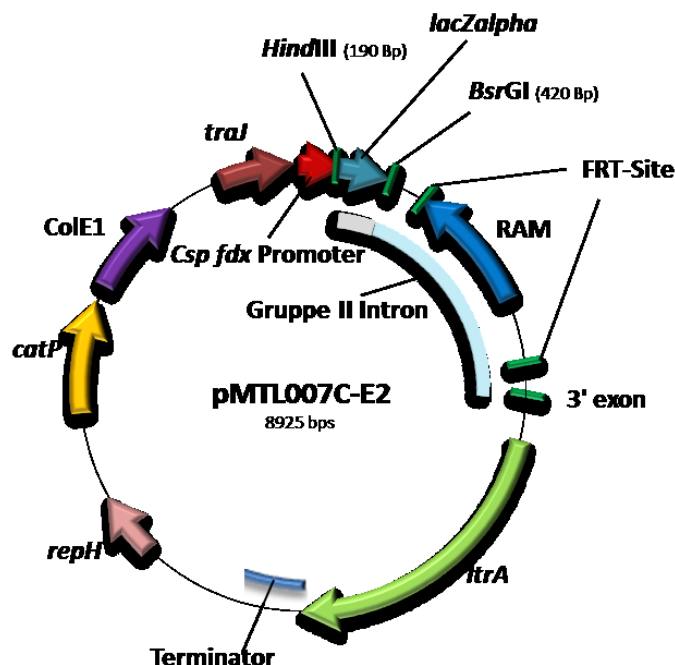


Abb. 7.1: Vektorkarte von pMTL007C-E2. Das Clostron Plasmid der zweiten Generation nutzt den starken konstitutiven *fdx*-Promotor (*C. sporogenes*) um die Expression des Gruppe II Introns zu steuern und besitzt FRT-Sites (FLP (Flippase) Erkennungsstellen), die RAM (Retrotranspositionaktivierten selektiven Marker) flankieren uns somit die Flippase-vermittelte Markerentfernung ermöglichen. Ebenso besitzt das Plasmid *repH* aus pIM13 als „origin of replication“ (ORI) für gram-positive Bakterien und den *ColE1* für *E. coli*. Das *lacZalpha* Gen ermöglicht das Blue-White-Screening mit Hilfe der Schnittstellen (*HindIII* und *BsrGI*) zum Einfügen der an das Zielgen angepassten 350-Bp-Intron-DNA.

Übersicht der durchgeführten Southern-Hybridisierungen

Tab. 7.1: Southern Hybridisation. Dargestellt sind die untersuchten Stämme und die für den Nachweis mittels Southern Hybridisation verwendeten Restriktionsenzymen, Sonden und durch *in silico* berechnete erwarteten Fragmentgrößen.

<i>C. acetobutylicum</i> Stamm	Restriktionsenzym	Größe (Bp)	Sonde	Seite/Abb./Spur
ATCC 824	<i>PpuMI</i>	1918	<i>hbd</i>	58/3.3A/2
	<i>PpuMI/SacI</i>	1532	<i>hbd</i>	58/3.3A/4
<i>hbd::int(69)</i>	<i>PpuMI</i>	3699	<i>hbd</i>	58/3.3A/3
	<i>PpuMI/SacI</i>	3313	<i>hbd</i>	58/3.3A/5
ATCC 824	<i>Alw441</i>	2913	<i>ptb</i>	128/7.6A/2
<i>ptb::int(87)</i>	<i>Alw442</i>	4693	<i>ptb</i>	128/7.6A/3
ATCC 824	<i>EcoRV</i>	2261	<i>pta</i>	131/7.12A/2

<i>pta::int(80)</i>	<i>EcoRV</i>	4041	<i>pta</i>	131/7.12A/3
ATCC 824	<i>Haell</i>	968	<i>ctfA</i>	136/7.14C/2
<i>ctfA::int(352)</i>	<i>Haell</i>	2748	<i>ctfA</i>	136/7.14C/3
	<i>Haell</i>	2748	<i>ctfA</i>	138/7.17B/3
	<i>Haell</i>	2748	RAM	138/7.17B/7
ATCC 824	<i>Gsul</i>	2545	<i>adc</i>	136/7.15C/2
	<i>Pcsi/SpeI</i>	3372	<i>adc</i>	138/7.18B/2
	<i>Pcsi/SpeI</i>	-	RAM	138/7.18B/7
<i>adc::int(180)</i>	<i>Gsul/Bsp119I</i>	3089	<i>adc</i>	136/7.15C/2
	<i>Pcsi/SpeI</i>	5153	<i>adc</i>	138/7.18B/3
	<i>Pcsi/SpeI</i>	5153	RAM	137/7.18B/8
<i>pta::int(80)ΔRAM-</i>	<i>EcoRV/PaeI</i>	2840	<i>pta</i>	138/7.17A/2
<i>ctfA::int(352)</i>	<i>EcoRV/PaeI</i>	keine 2840	RAM	138/7.17A/5
	<i>Haell</i>	2748	<i>ctfA</i>	138/7.17B/2
	<i>Haell</i>	2748	RAM	138/7.17B/6
<i>pta::int(80)ΔRAM-</i>	<i>EcoRV/PaeI</i>	2840	<i>pta</i>	138/7.18A/2
<i>adc::int(180)</i>	<i>EcoRV/PaeI</i>	keine 2840	RAM	138/7.18A/5
	<i>Pcsi/SpeI</i>	5153	<i>adc</i>	138/7.18B/4
	<i>Pcsi/SpeI</i>	5153	RAM	138/7.18B/9
ATCC 824	<i>Pcsi/SpeI</i>	3372	<i>adc</i>	140/7.20A/2
	<i>Pcsi/SpeI</i>	keine 3372	RAM	140/7.20A/7
	<i>EcoRV</i>	2261	<i>pta</i>	140/7.20B/2
	<i>EcoRV</i>	keine 2261	RAM	140/7.20B/6
<i>adc::int(180)ΔRAM-</i>	<i>Pcsi/SpeI</i>	4253	<i>adc</i>	140/7.20A/3
<i>pta::int(80)</i>	<i>Pcsi/SpeI</i>	keine 4253	RAM	140/7.20A/8
	<i>EcoRV</i>	4041	<i>pta</i>	140/7.20B/3
	<i>EcoRV</i>	4041	RAM	140/7.20B/7
ATCC 824	<i>PsuI</i>	2212	<i>ldh1</i>	142/7.22C/2
<i>ldh1::int(93)</i>	<i>PsuI</i>	3992	<i>ldh1</i>	142/7.22C/3
ATCC 824	<i>FaqI</i>	3476	<i>ldh2</i>	142/7.23C/2
<i>ldh2::int(231)</i>	<i>FaqI</i>	5256	<i>ldh2</i>	142/7.23C/3
ATCC 824	<i>CaiI/Clai</i>	3589	<i>adhE1</i>	144/7.25C/2
<i>adhE1::int(158)</i>	<i>CaiI/Clai</i>	5379	<i>adhE1</i>	144/7.25C/3
ATCC 824	<i>HindIII/SpeI</i>	3336	<i>adhE2</i>	144/7.26C/2
<i>adhE2::int(114)</i>	<i>HindIII/SpeI</i>	5117	<i>adhE2</i>	144/7.26C/3

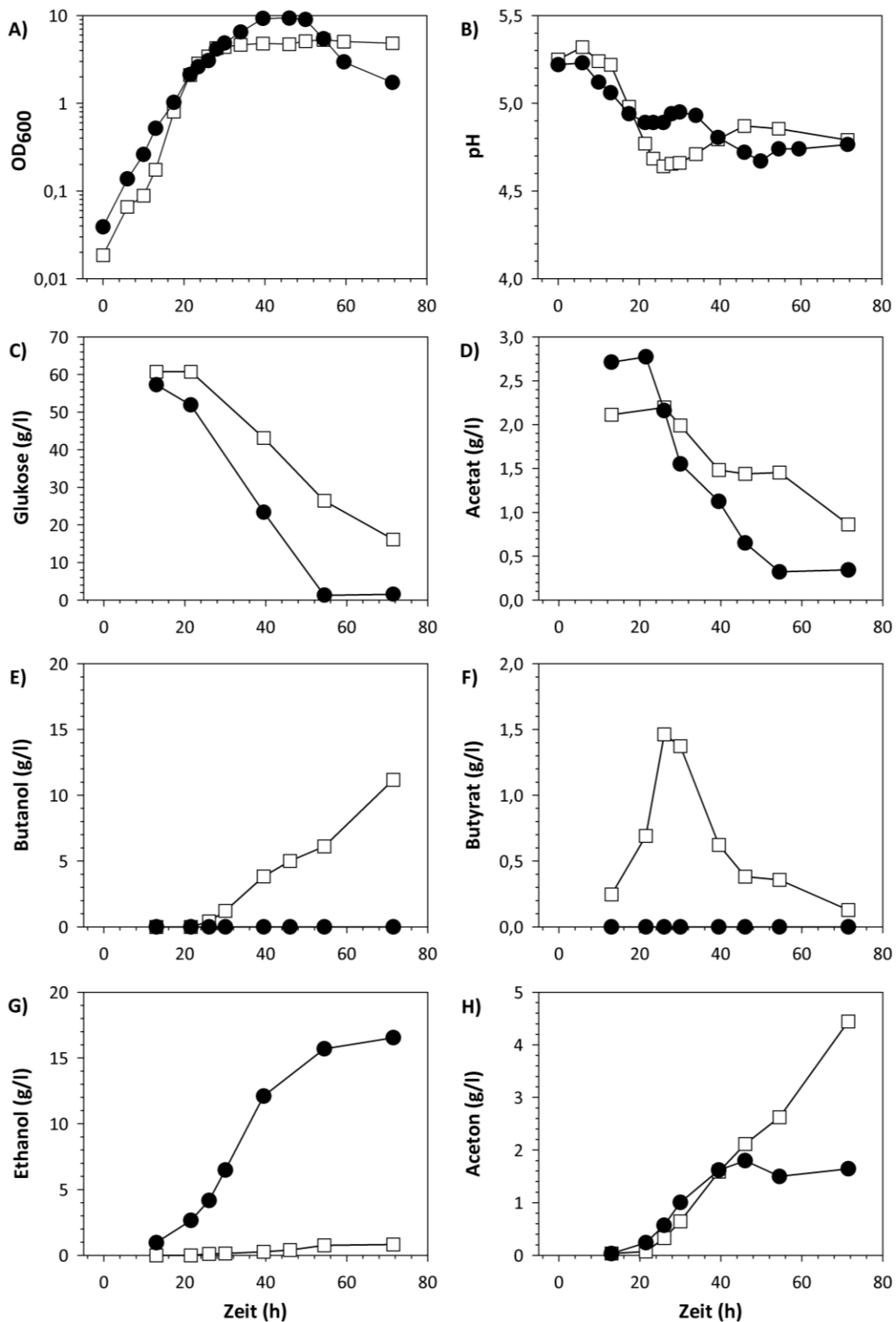
Abbildungen und Tabellen zu 3.2: *C. acetobutylicum hbd::int(69)*

Abb. 7.2: Wachstumsphysiologische Charakterisierung von *C. acetobutylicum* ATCC 824 und *C. acetobutylicum hbd::int(69)* in einer Batch-Kultur (n=2). Die Kultivierung erfolgte in 200 ml MS-MES. In regelmäßigen Abständen erfolgte die Bestimmung der optischen Dichte, des pH-Wertes, Glukosekonzentration (enzymatisch) und der Fermentationsprodukte (gaschromatographisch). In dieser Abbildung ist der Mittelwert von zwei Experimenten dargestellt. □, *C. acetobutylicum* ATCC 824; ●, *C. acetobutylicum hbd::int(69)*.

Tab. 7.2: Glukose Batch und Fed-Batch Fermentation. Die wichtigsten Parameter der vergleichenden Wachstumsversuche zwischen *C. acetobutylicum* ATCC 824 und *C. acetobutylicum hbd::Int(69)* in 200 ml MS-MES sind als Mittelwert (n=2) mit der entsprechenden Standardabweichung dargestellt.

Parameter:	Glukose Batch Fermentation		Glukose Fed-Batch Fermentation	
	<i>C.ac.</i> ATCC 824	<i>C.ac. hbd::Int(69)</i>	<i>C.ac.</i> ATCC 824	<i>C.ac. hbd::Int(69)</i>
Wachstumsrate μ (h^{-1})	0,3 \pm 0,02	0,18 \pm 0,001	0,2 \pm 0,004	0,11 \pm 0,002
max. OD ₆₀₀	5,4 \pm 0,6	9,4 \pm 0,5	4,5 \pm 0,5	9,3 \pm 1,3
min. pH-Wert	4,64 \pm 0,6	4,67 \pm 0,01	4,51 \pm 0,02	4,17 \pm 0,13
max. Acetat (g/l)	2,2 \pm 0,32	2,8 \pm 0,09	2,7 \pm 0,09	3,3 \pm 0,2
max. Butyrat (g/l)	1,5 \pm 0,05	0	2,4 \pm 0,14	0
max. Aceton (g/l)	4,4 \pm 0,04	1,8 \pm 0,04	4,8 \pm 0,22	2,6 \pm 0,4
max. Ethanol (g/l)	0,9 \pm 0,29	16,5 \pm 1,84	1,2 \pm 0,1	33,5 \pm 3,9
max. Butanol (g/l)	11,2 \pm 0,24	0	11,6 \pm 0,63	0
Glukoseverbrauch (g/l)	39,8 \pm 7,8	55,7 \pm 1,4	31,7 \pm 5,3	86,3 \pm 4,8
Ausbeute (g_{EtOH}/g_{Glu})	0,02 \pm 0,007	0,3 \pm 0,03	0,04 \pm 0,003	0,39 \pm 0,045
max. Produktivität ($g_{EtOH}/l/h$)	0,02 \pm 0,001	0,58 \pm 0,07	0,01 \pm 0,002	0,57 \pm 0,042
Ausbeute (g_{BuOH}/g_{Glu})	0,28 \pm 0,006	-	0,37 \pm 0,02	-
max. Produktivität ($g_{BuOH}/l/h$)	0,23 \pm 0,008	-	0,14 \pm 0,02	-

Tab. 7.3: Xylose Batch Fermentation (n=3). Die wichtigsten Parameter der vergleichenden Wachstumsversuche zwischen *C. acetobutylicum* ATCC 824 und *C. acetobutylicum hbd::Int(69)* in 200 ml MS-Mes mit 60 g/l Xylose.

Parameter	Xylose Batch Fermentation	
	<i>C.ac.</i> ATCC 824	<i>C.ac. hbd::Int(69)</i>
Wachstumsrate μ (h^{-1})	0,16 \pm 0,017	0,08 \pm 0,002
max. OD ₆₀₀	5,06 \pm 0,5	5,8 \pm 0,3
min. pH-Wert	4,54 \pm 0,007	4,67 \pm 0,02
max. Acetat (g/l)	2,8 \pm 0,04	2,9 \pm 0,03
max. Butyrat (g/l)	1,5 \pm 0,4	0
max. Aceton (g/l)	3,5 \pm 0,04	1,4 \pm 0,12
max. Ethanol (g/l)	1,2 \pm 0,13	20,5 \pm 2,53
max. Butanol (g/l)	7,8 \pm 0,11	0
Xyloseverbrauch (g/l)	39,4 \pm 2,4	50,4 \pm 3,4
Ausbeute (g_{EtOH}/g_{Xyl})	0,03 \pm 0,003	0,41 \pm 0,05
max. Produktivität ($g_{EtOH}/l/h$)	0,06 \pm 0,005	0,29 \pm 0,02
Ausbeute (g_{BuOH}/g_{Xyl})	0,2 \pm 0,003	-
max. Produktivität ($g_{BuOH}/l/h$)	0,29 \pm 0,03	-

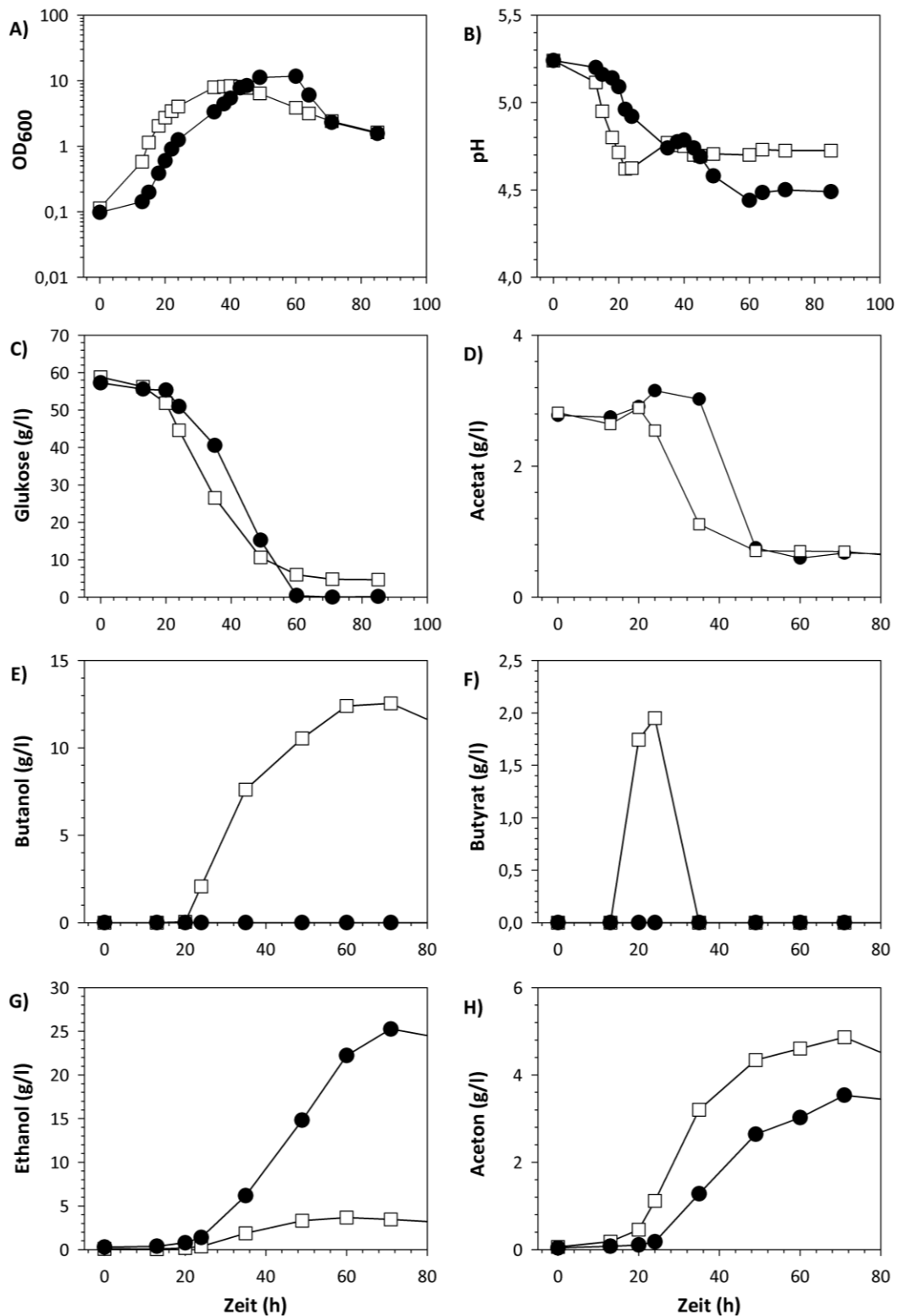


Abb. 7.3: Wachstumsphysiologische Charakterisierung von *C. acetobutylicum* ATCC 824 und *C. acetobutylicum* hbd::int(69) in einer Batch-Kultur (n=2). Die Kultivierung erfolgte in 100 ml MS-MES. In regelmäßigen Abständen erfolgte die Bestimmung der verschiedenen Parameter. □, *C. acetobutylicum* ATCC 824; ●, *C. acetobutylicum* hbd::int(69).

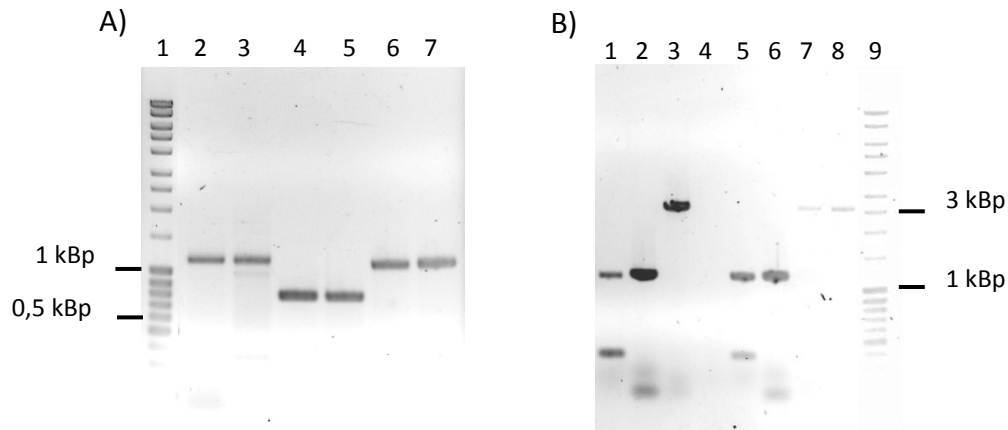


Abb. 7.4: Bestimmung der Transkriptionsmenge verschiedener Gene in *C. acetobutylicum hbd::int(69)* und *C. acetobutylicum* ATCC 824 mittels Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR). A) Transkription der Hbd flankierenden Enzyme. Spur 1: Größenmarker (MassRuler™ DNA Ladder-Mix); Spuren 2 und 3: Thiolase-spezifische Oligonukleotide (1179 Bp), cDNA von *C. acetobutylicum* ATCC 824 (2), *C. acetobutylicum hbd::int(69)* (3); Spuren 4 und 5: Crotonase-spezifische Oligonukleotide (786 Bp), cDNA des Wildtyps (4), Integranten (5). Spuren 6 und 7: Butyryl-CoA-Dehydrogenase spezifische Oligonukleotide (1140 Bp), cDNA des Wildtyps (6), Integrante (7). B) Transkription der Alkohol Dehydrogenasen. Spuren 1 und 5: *bdhA*-spezifische Oligonukleotide (1170 Bp), Wildtyp-cDNA (1), Integrante (5); Spuren 2 und 6: *bdhB*-spezifische Oligonukleotide 1145 Bp, Wildtyp (2), Integrante (6); Spuren 3 und 7: *adhE1*-spezifische Oligonukleotide (2589 Bp) Wildtyp (3), Integrante (7); Spuren 4 und 8: *adhE2*-spezifische Oligonukleotide (2577 Bp), Wildtyp (4), Integrante (8), Spur 9: Größenmarker (MassRuler™ DNA Ladder-Mix).

Abbildungen und Tabellen zu 3.3: *C. acetobutylicum ptb::int(87)*

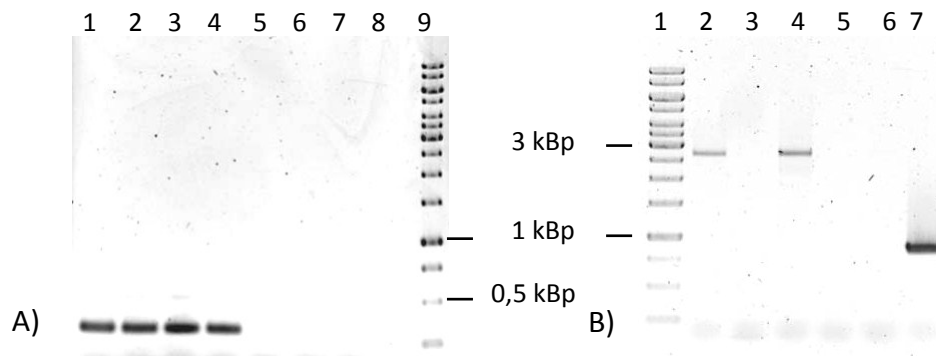


Abb. 7.5: Identifikation der Integration in *C. acetobutylicum ptb::int(87)* mittels PCR-Screening. A) Gen-Intron PCR. Spur 1 – 7: Erythromycin-resistente Klone; Spur 1 - 4: positive Klone (341 Bp); Spur 8: Wildtyp Spur 9: GeneRuler™ 1kb DNA Ladder B) Gen-Gen PCR Spur 1: GeneRuler™ 1kb DNA Ladder; Spur 2 – 6: Erythromycin-resistente Klone; Spur 2 und 4: positive Klone (2,7 kBp); Spur 7: Wildtyp (906 Bp).

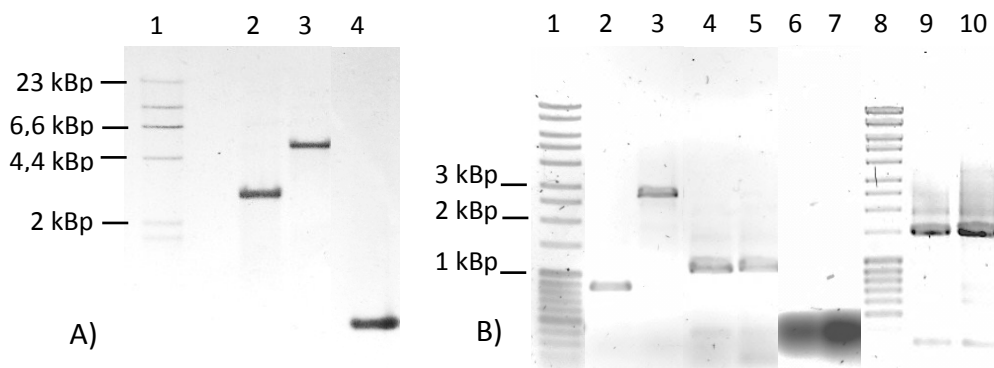


Abb. 7.6: Verifikation der Integration in *C. acetobutylicum ptb::int(87)* mittels A) DNA-Hybridisierung: Spur 1: 100 ng DNA Molecular Weight Marker II; Spuren 2 und 3 : chromosomale DNA des Wildtyps (2) und der *ptb*-Integrante (3) hydrolysiert mit *Alw44I*, Spur 4: *ptb* PCR Produkt. **B) Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)** Spur 1 + 8: Größenmarker (MassRuler™ DNA Ladder-Mix); Spuren 2 und 3: Gen-Gen PCR mit cDNA des Wildtyps (2) und der *ptb*-Integrante (3); Spuren 4 und 5: *buk*-spezifische Oligonukleotide (1068 Bp), cDNA vom Wildtyp (4), *ptb*-Integranten (5); Spuren 6 + 7: Gen-Gen PCR mit der RNA vom Wildtyp (6) und der Integrante (7); Spuren 9 und 10: Eub-PCR cDNA des Wildtyps (9) und der *ptb*-Integrante (10).

Tab. 7.4: Glukose Batch Fermentation (n=3). Die wichtigsten Parameter der vergleichenden Wachstumsversuche zwischen und *C. acetobutylicum ptb::Int(87)* in 200 ml MS-MES ohne Acetat sind in der Tabelle zusammengefasst.

Parameter:	Glukose Batch Fermentation	
	<i>C.ac.</i> ATCC 824	<i>C.ac. ptb::Int(87)</i>
Wachstumsrate μ (h^{-1})	0,24 \pm 0,04	0,15 \pm 0,02
max. OD ₆₀₀	7,2 \pm 1,6	3,1 \pm 0,7
min. pH-Wert	4,85 \pm 0,05	4,43 \pm 0,02
max. Acetat (g/l)	2,4 \pm 0,2	2,8 \pm 1
max. Butyrat (g/l)	2,5 \pm 0,2	0 \pm 0
max. Laktat (g/l)	0,2 \pm 0,02	3,2 \pm 1,1
max. Aceton (g/l)	3,8 \pm 0,7	0,1 \pm 0,06
max. Ethanol (g/l)	1,3 \pm 0,1	0,3 \pm 0,04
max. Butanol (g/l)	13,1 \pm 0,7	2,8 \pm 1,3
ABE (g/l)	18,2 \pm 0,8	3,2 \pm 1,2
Glukoseverbrauch (g/l)	52 \pm 2,7	20 \pm 5,8
Ausbeute ($g_{ABE}/g_{Glukose}$)	0,35 \pm 0,01	0,16 \pm 0,06
Ausbeute ($g_{Ethanol}/g_{Glukose}$)	0,02 \pm 0,002	0,02 \pm 0,002
max. Produktivität ($g_{Ethanol}/l/h$)	0,05 \pm 0,019	0,04 \pm 0,018
Ausbeute ($g_{Butanol}/g_{Glukose}$)	0,25 \pm 0,004	0,14 \pm 0,065
max. Produktivität ($g_{Butanol}/l/h$)	0,72 \pm 0,118	0,27 \pm 0,041

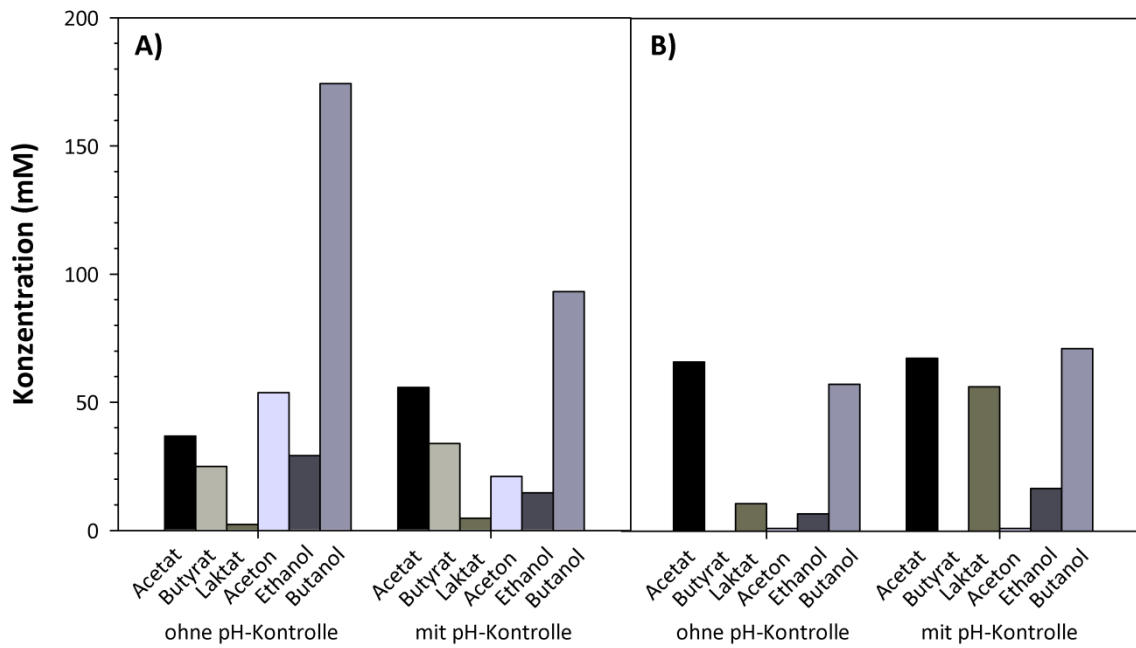


Abb. 7.7: Wachstumsphysiologische Charakterisierung von A) *C. acetobutylicum* ATCC 824 und B) *C. acetobutylicum* *ptb::int(87)* mit manueller pH-Kontrolle. Die Kultivierung erfolgte anaerob in einem BIOSTAT® B PLUS TWIN FERMENTOR, bei 37°C. In regelmäßigen Abständen wurde die optische Dichte, die Laktatkonzentration (enzymatisch) sowie die Fermentationsprodukte (gaschromatographisch) bestimmt. Nachdem das pH-Minimum erreicht wurde, erfolgte die manuell Einstellung (mittels KOH) des pH auf etwa 5,2.

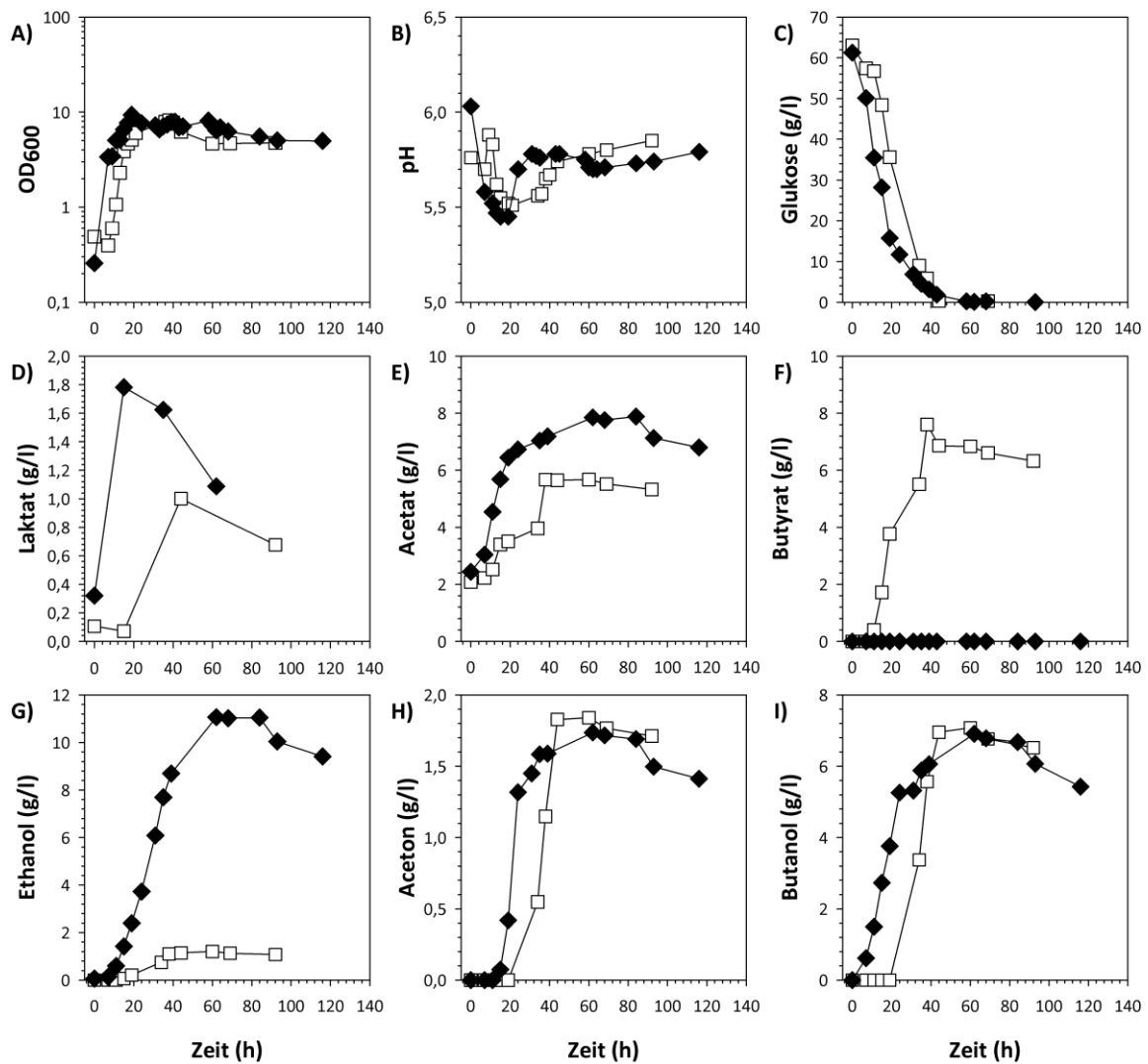


Abb. 7.8: Wachstumsphysiologische Charakterisierung von *C. acetobutylicum* ATCC 824 und *C. acetobutylicum* *ptb::int(87)* in 1,5 l MS-MES bei einem pH-Wert $\geq 5,5$. Die Kultivierung erfolgte anaerob in einem BIOSTAT® B PLUS TWIN FERMENTOR, bei 37°C. In regelmäßigen Abständen wurde die optische Dichte, die Glukose- und Laktatkonzentration (enzymatisch) sowie die Fermentationsprodukte (gaschromatographisch) bestimmt. Die pH-Kontrolle erfolgte automatisch mittels KOH und wurde zusätzlich extern kontrolliert. □, *C. acetobutylicum* ATCC 824; ◆, *C. acetobutylicum* *ptb::int(87)*.

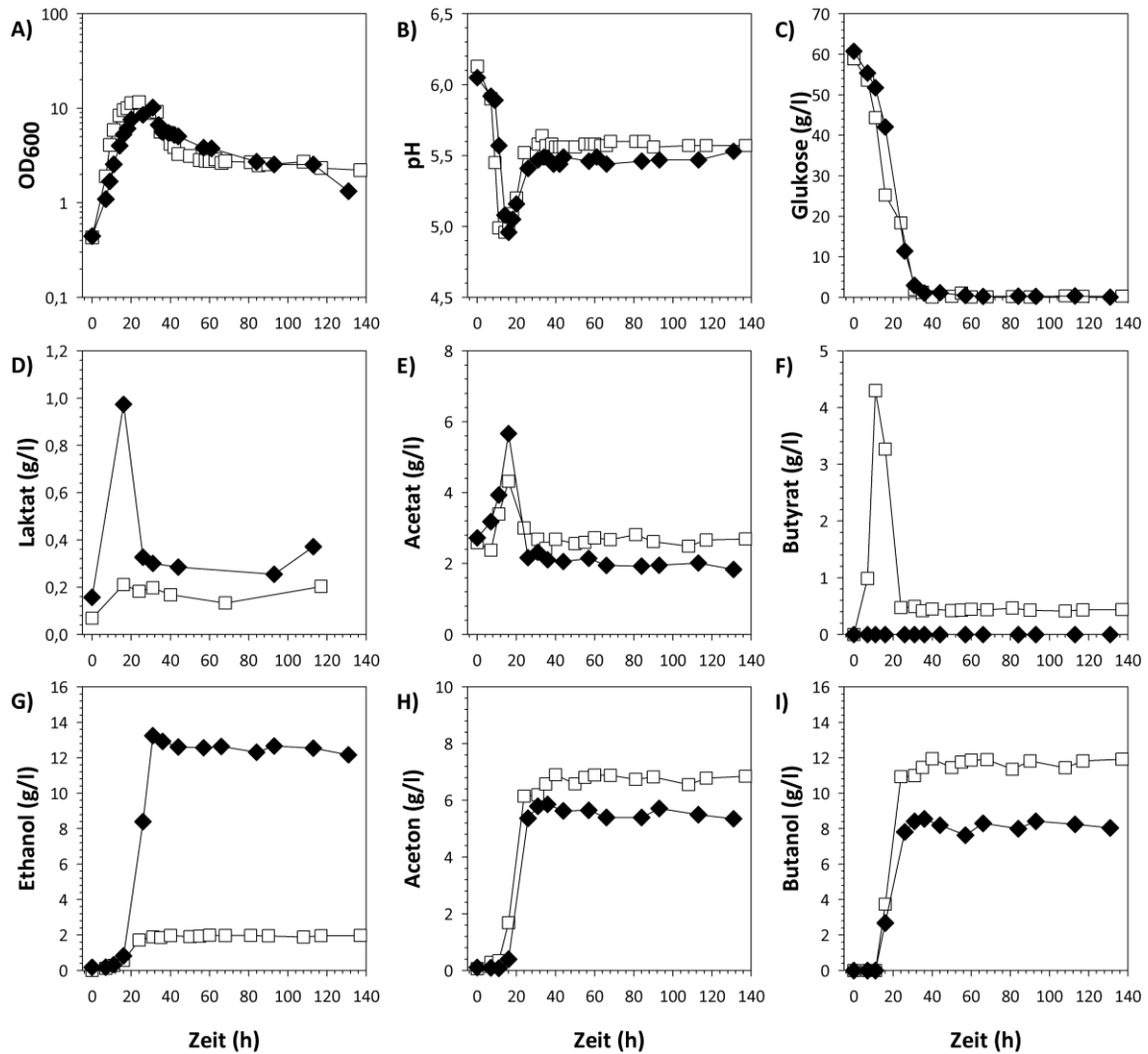


Abb. 7.9: Wachstumsphysiologische Charakterisierung von *C. acetobutylicum* ATCC 824 und *C. acetobutylicum* *ptb::int(87)* in 1,5 l MS-MES bei einem pH-Wert $\geq 5,0$. Die Kultivierung erfolgte anaerob in einem BIOSTAT® B PLUS TWIN FERMENTOR, bei 37°C. In regelmäßigen Abständen wurde die optische Dichte, die Glukose- und Laktatkonzentration (enzymatisch) sowie die Fermentationsprodukte (gaschromatographisch) bestimmt. Die pH-Kontrolle erfolgte automatisch mittels KOH und wurde zusätzlich extern kontrolliert. □, *C. acetobutylicum* ATCC 824; ◆, *C. acetobutylicum* *ptb::int(87)*.

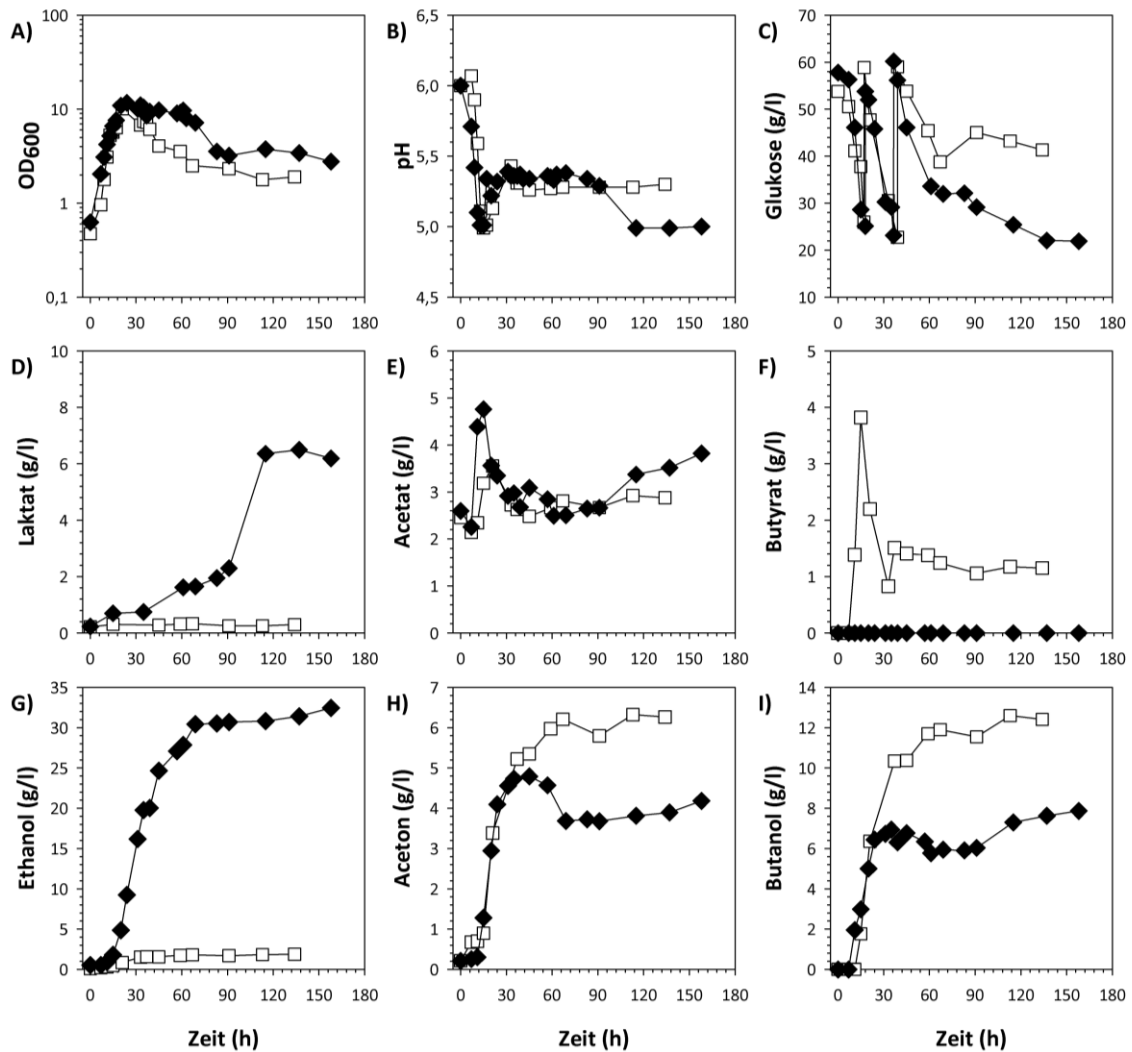


Abb. 7.10: Wachstumsphysiologische Charakterisierung von *C. acetobutylicum* ATCC 824 und *C. acetobutylicum* *ptb::int(87)* in einem Fed-Batch Versuch in 1,5 l MS-MES bei einem pH-Wert $\geq 5,0$. Die Kultivierung erfolgte anaerob in einem BIOSTAT® B PLUS TWIN FERMENTOR, bei 37°C. In regelmäßigen Abständen wurde die optische Dichte, die Glukose- und Laktatkonzentration (enzymatisch) sowie die Fermentationsprodukte (gaschromatographisch) bestimmt. Die pH-Kontrolle erfolgte automatisch mittels KOH und wurde zusätzlich extern kontrolliert. Bei einer ungefähren Glukosekonzentration von 20 g/l erfolgte eine erneute Zugabe von Glukose aus einer 50 %igen Stammlösung (w/v). □, *C. acetobutylicum* ATCC 824; ◆, *C. acetobutylicum* *ptb::int(87)*.

Tab. 7.5: Butyrat-Fed Batch (n=1). Dargestellt sind die wichtigsten Parameter der vergleichenden Wachstumsversuche zwischen *C. acetobutylicum* ATCC 824 und *C. acetobutylicum ptb::int(87)* in 200 ml MS-MES. Bei einer OD600 von 3 bis 4 erfolgte die Zugabe von 10, 20, 30 oder 40 mM Butyrat. (ABE - Aceton, Butanol, Ethanol)

Butyratzugabe:	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824				<i>C. acetobutylicum ptb::int(87)</i>			
	10 mM	20 mM	30 mM	40 mM	10 mM	20 mM	30 mM	40 mM
Parameter								
max. OD600	7,73	7,07	4,97	4,26	7,05	6,3	5,78	2,8
max. Acetat (g/l)	2,4	2,2	2,3	2,1	2,9	3,2	3,0	3,1
max. Butyrat (g/l)	2,5	3,4	3,8	5,0	0,7	1,7	2,5	4,0
min. Butyrat (g/l)	0	0	0,3	4,4	0,0	0,0	0,0	3,5
max. Laktat (g/l)	0,08	0,12	0,49	0,12	0,36	0,67	0,6	0,24
max. Aceton (g/l)	6,3	6,3	6,8	1,5	4,3	4,6	4,6	0,9
max. Ethanol (g/l)	4,7	4,4	2,4	0,5	28,9	30,6	27,9	0,7
max. Butanol (g/l)	12,6	13,3	12,8	2,8	6,0	6,0	6,4	1,9
ABE (g/l)	23,6	24,0	22,0	4,8	39,2	41,2	38,9	3,5
Glukoseverbrauch (g/l)	58,7	58,2	57,5	7,1	59,7	57,8	58,4	6
Ausbeute ($g_{ABE}/g_{Glukose}$)	0,4	0,41	0,38	0,68	0,66	0,71	0,67	0,58
Ausbeute ($g_{Ethanol}/g_{Glukose}$)	0,08	0,08	0,04	0,07	0,48	0,53	0,48	0,12
max. Produktivität ($g_{Ethanol}/l/h$)	0,056	0,044	0,047	0,000	0,751	0,691	0,461	0,001
Ausbeute ($g_{Butanol}/g_{Glukose}$)	0,21	0,23	0,22	0,39	0,1	0,1	0,11	0,32
max. Produktivität ($g_{Butanol}/l/h$)	0,509	0,507	0,546	0,005	0,068	0,079	0,044	0,007
Butanol/Ethanol-Verhältnis	2,7/1	3/1	5,3/1	5,6/1	1/4,8	1/5,1	1/4,35	2,7/1

Abbildungen und Tabellen zu 3.4: *C. acetobutylicum pta::int(80)*

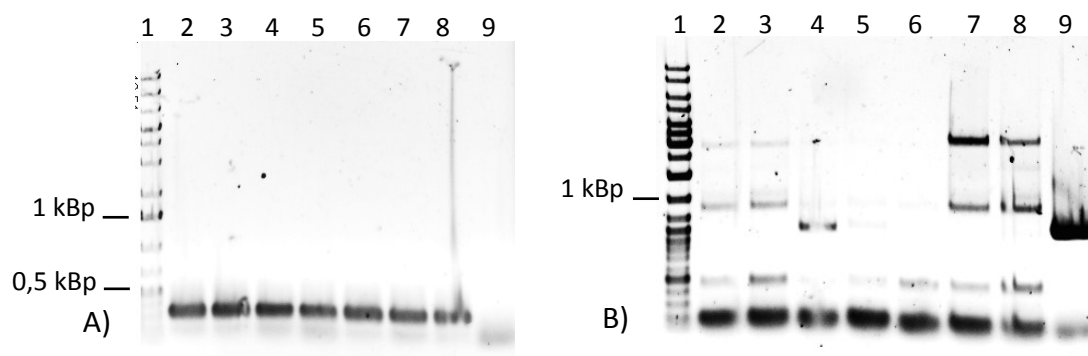


Abb. 7.11: Identifikation der Integration in *C. acetobutylicum pta::int(80)* mittels PCR-Screening. A) Gen-Intron PCR. Spur 1: Größenmarker (GeneRuler 1 kb DNA Ladder Plus); Spuren 2 – 8: Erythromycin-resistente Klone; Spuren 2 - 8: positive Klone (334 Bp); Spur 9: Wildtyp. **B) Gen-Gen PCR** Spur 1: GeneRuler DNA Ladder Mix; Spuren 2 – 8: Erythromycin-resistente Klone; Spuren 2,3, 7 und 8: positive Klone (2,8 kBp); Spur 7: Wildtyp (1002 Bp).

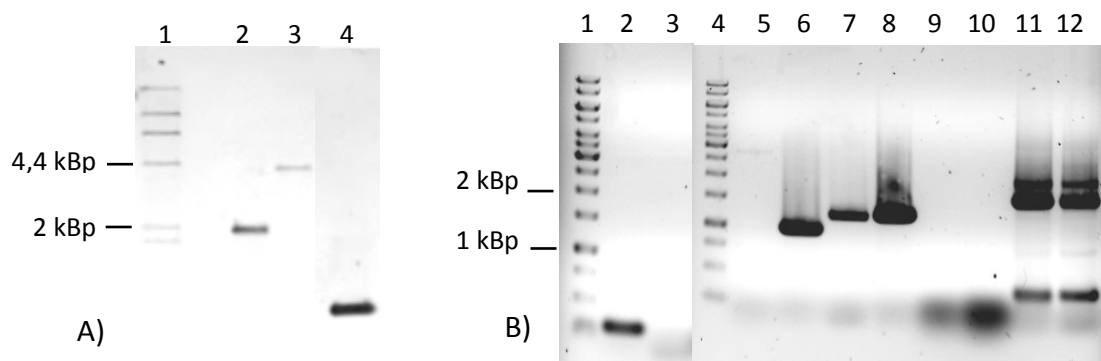


Abb. 7.12: Verifizierung von *C. acetobutylicum pta::int(80)* mittels Southern Hybridisierung und RT-PCR. A) Southern Hybridisierung mit einer genspezifischen *pta*-Sonde. Spur 1: 100 ng DNA Molecular Weight Marker II (Roche), Spuren 2 und 3: chromosomale DNA des Wildtyps (2) und Integrierte (3) hydrolysiert mit *EcoRV*, Spur 4: *pta* PCR Produkt. B) Reverse Transkriptase (RT-PCR). Spur 1 + 4: Größenmarker (GeneRuler™ 1 kp DNA Ladder), Spuren 2 und 3: Gen-Intron PCR mit cDNA des Wildtyps (2) und der Integrierte (3); Spuren 5 und 6: Gen-Gen PCR mit *pta*-Oligonukleotiden mit cDNA der Integrierte (5) und des Wildtyps (6); Spuren 7 und 8: *buk*-Oligonukleotide cDNA von der *pta*-Integrierten (7) und dem Wildtyp (8). Spuren 9 und 10: Gen-Gen PCR mit RNA von der *pta*-Integrierten (9) und dem Wildtyp (10); Spuren 11 und 12: Eub-PCR mit cDNA der *pta*-Integrierten (11) und dem Wildtyp (12).

Tab. 7.6: Glucose Batch Fermentation (n=3). Die wichtigsten Parameter der vergleichenden Wachstumsversuche zwischen *C. acetobutylicum* ATCC 824 und *C. acetobutylicum pta::Int(80)* in 200 ml MS-MES ohne Acetat-

Parameter	Glukose Batch Fermentation	
	<i>C.ac.</i> ATCC 824	<i>C.ac. pta::Int(80)</i>
Wachstumsrate μ (h^{-1})	0,26 \pm 0,01	0,27 \pm 0,05
max. OD600	7,2 \pm 1,6	6,1 \pm 0,9
min. pH-Wert	4,85 \pm 0,05	4,9 \pm 0,06
max. Acetat (g/l)	2,4 \pm 0,2	1,8 \pm 0,4
max. Butyrat (g/l)	2,5 \pm 0,2	2,9 \pm 0,3
max. Aceton (g/l)	3,8 \pm 0,7	3,6 \pm 0,8
max. Ethanol (g/l)	1,3 \pm 0,1	1,1 \pm 0,2
max. Butanol (g/l)	13,1 \pm 0,2	12 \pm 1,1
ABE (g/l)	18,2 \pm 0,9	16,7 \pm 1,6
Glukoseverbrauch (g/l)	51,7 \pm 2,0	51,2 \pm 0,9
Ausbeute ($g_{ABE}/g_{Glukose}$)	0,351 \pm 0,017	0,326 \pm 0,0310
Ausbeute ($g_{Ethanol}/g_{Glukose}$)	0,025 \pm 0,002	0,021 \pm 0,0037
max. Produktivität ($g_{Ethanol}/l/h$)	0,050 \pm 0,019	0,029 \pm 0,0039
Ausbeute ($g_{Butanol}/g_{Glukose}$)	0,254 \pm 0,005	0,235 \pm 0,0214
max. Produktivität ($g_{Butanol}/l/h$)	0,721 \pm 0,118	0,519 \pm 0,1004

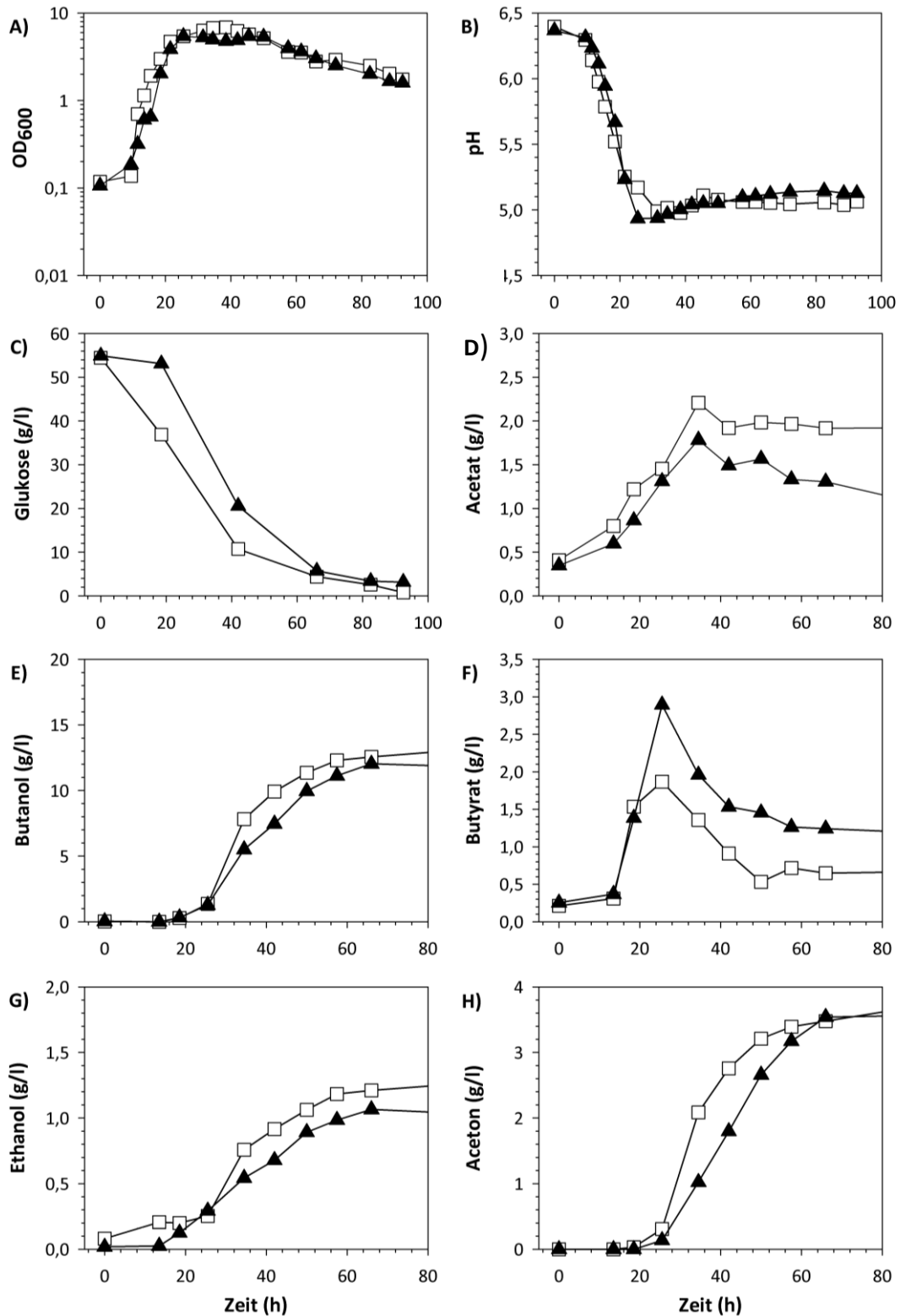


Abb. 7.13: Wachstumsphysiologische Charakterisierung von *C. acetobutylicum* ATCC 824 und *C. acetobutylicum pta::int(80)*. Die Kultivierung erfolgte anaerob in 200 ml MS-MES ohne Acetat, bei 37°C. In regelmäßigen Abständen wurde die optische Dichte, die Glukosekonzentration (enzymatisch) sowie die Fermentationsprodukte (gaschromatographisch) bestimmt. Die dargestellten Ergebnisse sind der Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen. □, *C. acetobutylicum* ATCC 824; ▲, *C. acetobutylicum pta::int(80)*.

Abbildungen und Tabellen zu 3.4: *C. acetobutylicum* *ctfA::int(352)* und *C. acetobutylicum* *adc::int(180)*

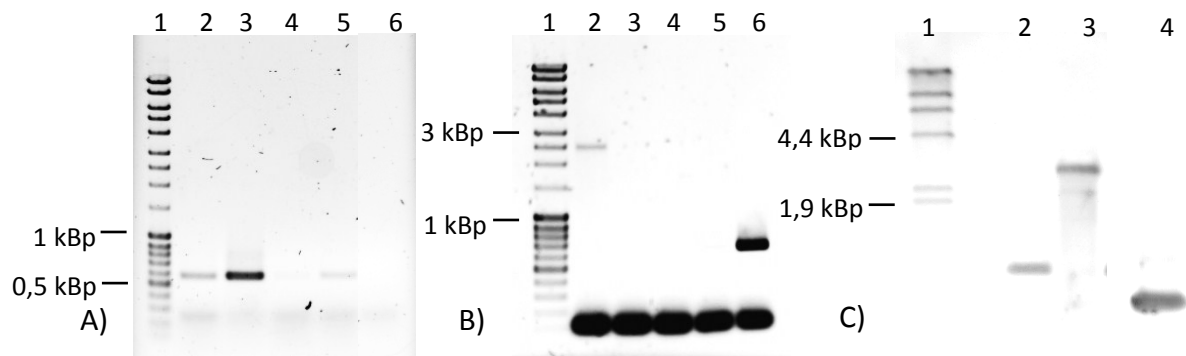


Abb. 7.14: Identifikation der Integration in *C. acetobutylicum* *ctfA::int(352)* mittels PCR-Screening und Southern Hybridisierung. A) Gen-Intron PCR. Spur 1: MassRuler™ DNA Ladder-Mix; Spur 2–5: Erythromycin-resistente Klone; Spur 2, 3 und 5: positive Klone (606 Bp); Spur 6: Wildtyp. B) Gen-Gen PCR Spur 1: MassRuler™ DNA Ladder-Mix; Spur 2–5: Erythromycin-resistente Klone; Spur 2: positive Klone (2,4 kBp); Spur 6: Wildtyp (657 Bp). C) Southern Hybridisierung mit einer genspezifischen *ctfA*-Sonde. Spur 1: 100 ng DNA Molecular Weight Marker II (Roche); Spur 2: Wildtyp-DNA (500 ng) hydrolysiert mit *Hae*II, Spur 3: *C.ac. ctfA::int(352)*-DNA (500 ng)/*Hae*II; Spur 6: Positivkontrolle (*ctfA* PCR Produkt).

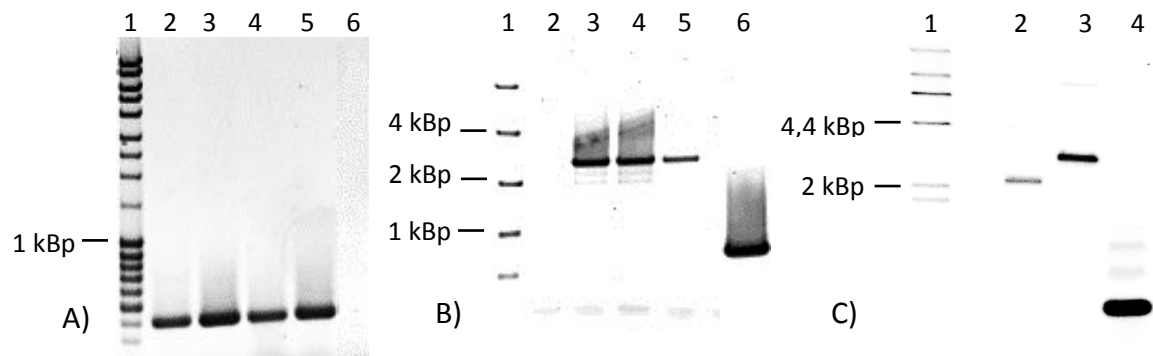


Abb. 7.15: Identifikation der Integration in *C. acetobutylicum* *adc::int(180)* mittels PCR-Screening und Southern Hybridisierung. A) Gen-Intron PCR. Spur 1: MassRuler™ DNA Ladder-Mix, Spur 2 - 5: mögliche *adc*-Mutanten, Ery^R, (Spur 2-5: positiver Integrationsnachweis – 434 Bp), Spur 6: Wildtyp.. B) Gen-Gen PCR Spur 1: FastRuler™ DNA Ladder High Range; Spur 2 – 5: Erythromycin-resistente Klone; Spur 3 -5: positive Klone (2,5 kBp); Spur 6: Wildtyp (735 Bp). C) Southern Hybridisierung mit einer genspezifischen *adc*-Sonde. Spur 1: 100 ng DNA Molecular Weight Marker II (Roche); Spur 2: Wildtyp-DNA (400 ng) hydrolysiert mit *Gsu*I, Spur 3: *Int(180)::adc*-DNA (400 ng) *Gsu*I/*Bsp*119I, Spur 4: Positivkontrolle (*adc* PCR Produkt).

Tab. 7.7: Glucose Batch Fermentation (n=3). Die wichtigsten Parameter der vergleichenden Wachstumsversuche zwischen *C. acetobutylicum* ATCC 824, *C. acetobutylicum* *ctfA::Int(352)* und *C. acetobutylicum* *adc::Int(180)* in 200 ml MS-MES ohne Acetat.

Parameter	Glukose Batch Fermentation		
	<i>C.ac.</i> ATCC 824	<i>C.ac. ctfA::Int(352)</i>	<i>C.ac. adc::Int(180)</i>
Wachstumsrate μ (h^{-1})	0,27 \pm 0,01	0,23 \pm 0,07	0,26 \pm 0,01
max. OD600	5,2 \pm 1,5	3,9 \pm 0,8	4,5 \pm 0,8
min. pH-Wert	4,63 \pm 0,14	4,42 \pm 0,12	4,55 \pm 0,11
max. Acetat (g/l)	2,2 \pm 0,2	6,2 \pm 1,1	4,2 \pm 0,3
max. Butyrat (g/l)	1,8 \pm 0,4	2,1 \pm 0,6	1,8 \pm 0,9
max. Aceton (g/l)	4,0 \pm 0,8	0 \pm 0	0,5 \pm 0,1
max. Ethanol (g/l)	1,2 \pm 0,2	1,0 \pm 0,1	1,0 \pm 0,2
max. Butanol (g/l)	11,8 \pm 1,0	4 \pm 2,2	5,1 \pm 1,2
ABE (g/l)	16,8 \pm 0,6	5,6 \pm 2,1	7,1 \pm 0,6
Glukoseverbrauch (g/l)	51,2 \pm 5,4	26,0 \pm 12,5	30,4 \pm 14,7
Ausbeute ($g_{ABE}/g_{Glukose}$)	0,327 \pm 0,012	0,216 \pm 0,082	0,232 \pm 0,018
Ausbeute ($g_{Ethanol}/g_{Glukose}$)	0,020 \pm 0,007	0,044 \pm 0,007	0,050 \pm 0,021
max. Produktivität ($g_{Ethanol}/l/h$)	0,038 \pm 0,026	0,028 \pm 0,011	0,078 \pm 0,033
Ausbeute ($g_{Butanol}/g_{Glukose}$)	0,230 \pm 0,020	0,172 \pm 0,084	0,232 \pm 0,018
max. Produktivität ($g_{Butanol}/l/h$)	0,483 \pm 0,259	0,193 \pm 0,180	0,221 \pm 0,042

Abbildungen und Tabellen zu 3.4.3: Herstellung der Doppel-Integrierten

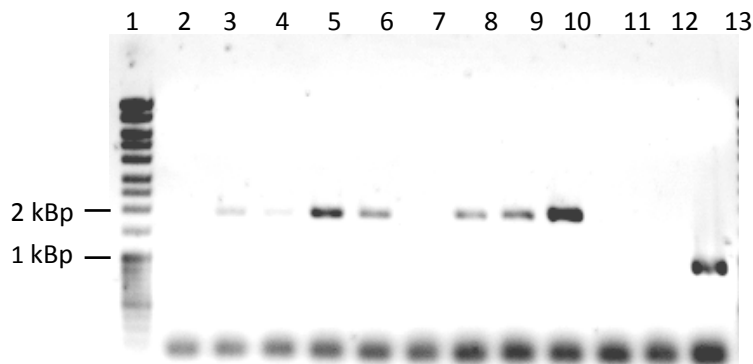


Abb. 7.16: Identifikation der *C. acetobutylicum* *pta::int(80)*ΔRAM mittels PCR-Screening. Spur 1 + 14: MassRuler™ DNA Ladder-Mix; Spur 2 – 12: Klone, die nicht mehr Erythromycin-resistent sind; Spur 3 – 6 und 8 - 10: positive Klone (1882 Bp); Spur 13: Wildtyp (1002 Bp).

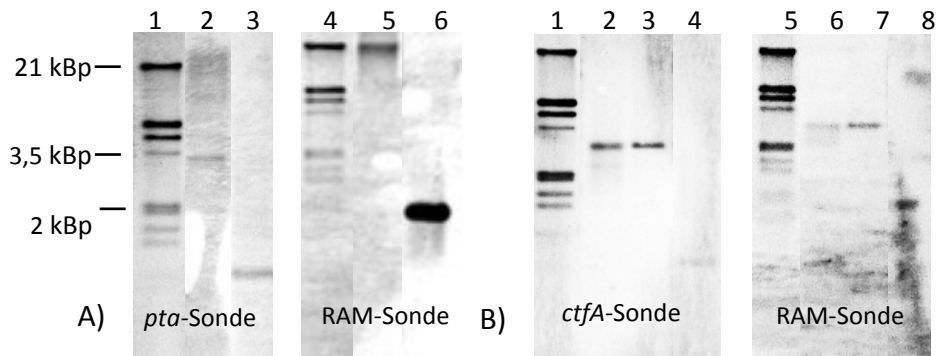


Abb. 7.17: Southern Hybridisierung bei *C. acetobutylicum pta::int(80)ΔRAM-ctfA::int(352)* **A) Untersuchung des *pta* Gens mit dem um die RAM-Kassette verkleinerten Gruppe II Introns.** Spur 1 + 4: 100 ng DNA Molecular Weight Marker III (Roche); Spur 2 + 5: 400 ng Integranten-DNA hydrolysiert mit *EcoRV/PaeI* und detektiert mittels *pta*-Sonde (Spur 2) und RAM-Sonde (Spur 5); Spur 3: Positivkontrolle (*pta* PCR Produkt); Spur 6: Positivkontrolle (RAM PCR Produkt).. **B) Untersuchung des *ctfA* Gens auf die Integration des Gruppe II Introns.** Spur 1 + 5: 100 ng DNA Molecular Weight Marker III (Roche); Spur 2 + 6: *C. acetobutylicum pta::int(80)ΔRAM-ctfA::int(352)* Restriktion mit *HaeII* (Spur 2: *ctfA*-Sonde, Spur 6: RAM-Sonde) ; Spur 3 + 7: *C. acetobutylicum ctfA::int(352)* Restriktion mit *HaeII* (Spur 3: *ctfA*-Sonde, Spur 7: RAM-Sonde). Spur 4: Positivkontrolle (*ctfA* PCR Produkt); Spur 8: Positivkontrolle (RAM PCR Produkt).

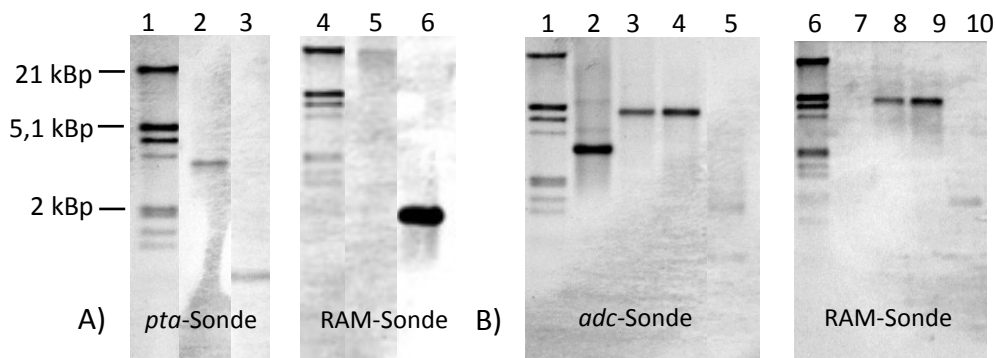


Abb. 7.18: Southern Hybridisierung bei *C. acetobutylicum pta::int(80)ΔRAM-adc::int(180)*. **A) Untersuchung des *pta* Gens mit dem um die RAM-Kassette verkleinerten Gruppe II Introns.** Spur 1 + 4: 100 ng DNA Molecular Weight Marker III (Roche); Spur 2 + 5: 400 ng Integranten-DNA hydrolysiert mit *EcoRV/PaeI* und detektiert mittels *pta*-Sonde (Spur 2) und RAM-Sonde (Spur 5); Spur 3: Positivkontrolle (*pta* PCR Produkt); Spur 6: Positivkontrolle (RAM PCR Produkt). **B) Untersuchung des *adc* Gens auf die Integration des Gruppe II Introns.** Spur 1 + 6: 100 ng DNA Molecular Weight Marker III (Roche); Spur 2 + 7: Wildtyp-DNA (400 ng) hydrolysiert mit *PcsI/SpeI*; Spur 3 + 8: *C. acetobutylicum adc::int(180)* Restriktion mit *PcsI/SpeI* (Spur 3: *adc*-Sonde, Spur 8: RAM-Sonde) ; Spur 4 + 9: *C. acetobutylicum pta::int(80)ΔRAM-adc::int(180)* Restriktion mit *PcsI/SpeI* (Spur 4: *adc*-Sonde, Spur 9: RAM-Sonde). Spur 5: Positivkontrolle (*pta* PCR Produkt); Spur 10: Positivkontrolle (RAM PCR Produkt).

Tab. 7.8: Glucose Batch Fermentation. Die wichtigsten Parameter der vergleichenden Wachstumsversuche zwischen *C. acetobutylicum* ATCC 824, *C. acetobutylicum* *pta::int(80)*ΔRAM-*ctfA::Int(352)* und *C. acetobutylicum* *pta::int(80)*ΔRAM-*adc::Int(180)* in 200 ml MS-MES ohne Acetat, sind als Mittelwert mit der entsprechenden Standardabweichung dargestellt.

Parameter	Glucose Batch Fermentation		
	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	<i>C. acetobutylicum</i> <i>pta::int(80)</i> ΔRAM- <i>ctfA::int(352)</i>	<i>C. acetobutylicum</i> <i>pta::int(80)</i> ΔRAM- <i>adc::int(180)</i>
Wachstumsrate μ (h^{-1})	0,26 ± 0,02	0,24 ± 0,03	0,25 ± 0,02
max. OD600	5,3 ± 0,7	5,32 ± 0,04	5,8 ± 0,7
min. pH-Wert	4,79 ± 0,02	4,62 ± 0,06	4,68 ± 0,13
max. Acetat (g/l)	2,7 ± 0,7	0,5 ± 0,1	0,9 ± 0,0
max. Butyrat (g/l)	2,3 ± 0,1	7,2 ± 1,1	6,7 ± 0,1
max. Laktat (g/l)	0,4 ± 0,2	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,2
max. Aceton (g/l)	3,4 ± 0,4	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,1
max. Ethanol (g/l)	1,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1
max. Butanol (g/l)	13,2 ± 0,4	1,7 ± 0,9	2,2 ± 0,6
ABE (g/l)	18,0 ± 0,9	2,1 ± 0,9	2,8 ± 0,5
Glukoseverbrauch (g/l)	54,1 ± 0,6	39,6 ± 2,9	26,6 ± 4,4
Ausbeute ($g_{ABE}/g_{Glukose}$)	0,333 ± 0,017	0,052 ± 0,024	0,104 ± 0,018
Ausbeute ($g_{Ethanol}/g_{Glukose}$)	0,027 ± 0,003	0,010 ± 0,002	0,017 ± 0,003
max. Produktivität ($g_{Ethanol}/l/h$)	0,053 ± 0,021	0,014 ± 0,009	0,017 ± 0,002
Ausbeute ($g_{Butanol}/g_{Glukose}$)	0,243 ± 0,006	0,042 ± 0,022	0,082 ± 0,024
max. Produktivität ($g_{Butanol}/l/h$)	0,849 ± 0,093	0,034 ± 0,022	0,134 ± 0,066

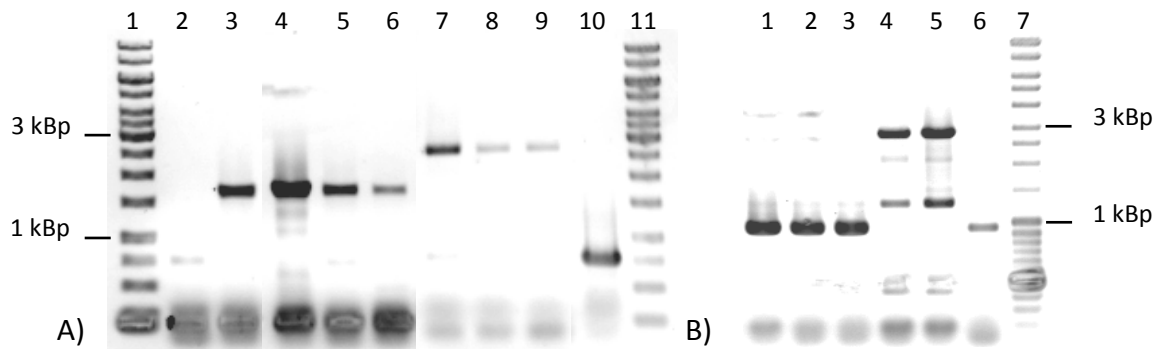
Doppel-Integrante *C. acetobutylicum* *adc::int(180)*ΔRAM-*pta::int(80)*

Abb.: 7.19: Identifikation der *C. acetobutylicum* *adc::int(180)*ΔRAM und *C. acetobutylicum* *adc::int(180)*ΔRAM-*pta::int(80)* mittels PCR-Screening. A) Nachweis der RAM-Eliminierung Spur 1 + 11: GeneRuler™ 1kb DNA Ladder; Spur 2 – 9: Klone, die nicht mehr Erythromycin-resistent sind; Spur 3 – 6: positive Klone (1,6 kBp); Spur 7 – 9: *C. acetobutylicum* *adc::int(180)* (2,5 kBp); Spur 10: Wildtyp (735 Bp). B) Nachweis der Insertion in das *pta*-Gen von *C. acetobutylicum* *adc::int(180)*ΔRAM-*pta::int(80)*. Spur: 1 – 5: Erythromycin-resistente Klone; Spur 4 + 5: positive Klone (2,8 kBp); Spur 6: Wildtyp (1002 Bp), Spur 7: MassRuler™ DNA Ladder-Mix.

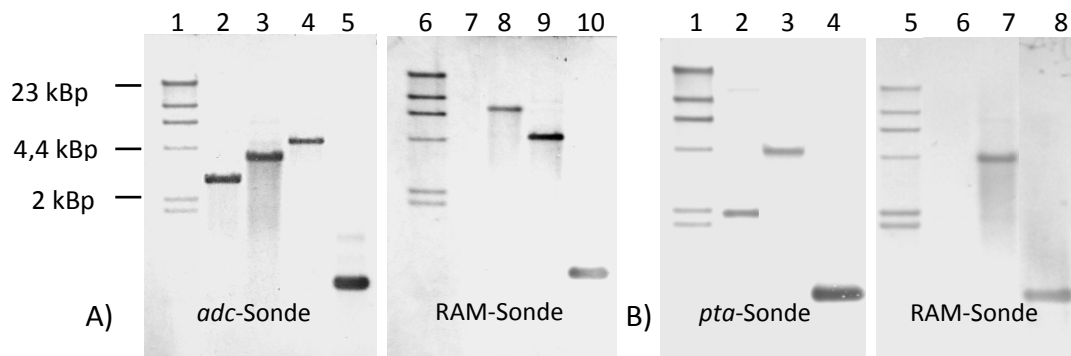


Abb. 7.20: Southern Hybridisierung bei *C. acetobutylicum* *adc::int(180)*ΔRAM-*pta::int(80)*. A) Untersuchung des *adc* Gens mit dem um die RAM-Kassette verkleinerten Gruppe II Introns. Spur 1 + 6: 100 ng DNA Molecular Weight Marker II (Roche); Spur 2 + 7: Wildtyp-DNA (500 ng) hydrolysiert mit *PciI/SpeI* detektiert mit der *adc*-Sonde (Spur 2) und der RAM-Sonde (Spur 7), Spur 3 + 8: 500 ng *C. acetobutylicum* *pta::int(80)*ΔRAM-*adc::int(180)* DNA hydrolysiert mit *PciI/SpeI* und detektiert mittels *adc*-Sonde (Spur 3) und RAM-Sonde (Spur 8); Spur 4 + 9: 500 ng *C. acetobutylicum* *adc::int(180)* DNA hydrolysiert mit *PciI/SpeI* und detektiert mittels *adc*-Sonde (Spur 4) und RAM-Sonde (Spur 9); Spur 5: Positivkontrolle (*pta* PCR Produkt); Spur 10: Positivkontrolle (RAM PCR Produkt). B) Untersuchung des *pta* Gens auf die Integration des Gruppe II Introns. Spur 1 + 5: 100 ng DNA Molecular Weight Marker II (Roche); Spur 2 + 6: Wildtyp-DNA (500 ng) hydrolysiert mit *EcoRV* (Spur: 2 *pta*-Sonde; Spur 6: RAM-Sonde) Spur 3 + 7: *C. acetobutylicum* *pta::int(80)*ΔRAM-*adc::int(180)* Restriktion mit *EcoRV* (Spur 3: *pta*-Sonde, Spur 7: RAM-Sonde); Spur 4: Positivkontrolle (*pta* PCR Produkt); Spur 8: Positivkontrolle (RAM PCR Produkt).

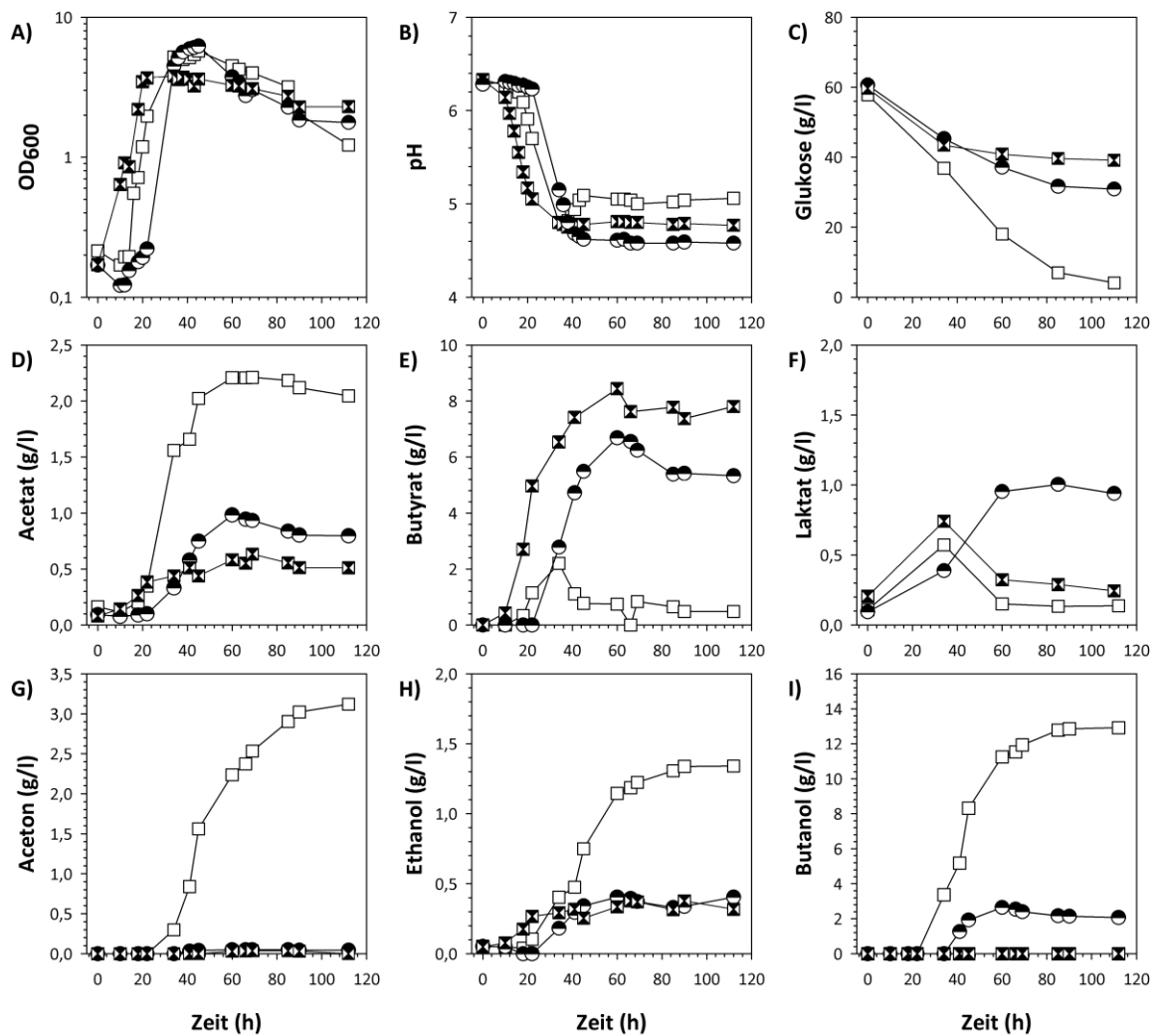


Abb. 7.21: Wachstumsphysiologische Charakterisierung von *C. acetobutylicum* ATCC 824, *C. acetobutylicum pta::int(80)-adc::int(180)* und *C. acetobutylicum adc::int(180)-pta::int(80)*. Die Kultivierung erfolgte anaerob in 200 ml MS-MES ohne Acetat, bei 37°C. In regelmäßigen Abständen wurde die optische Dichte, die Glukosekonzentration (enzymatisch) sowie die Fermentationsprodukte (gaschromatographisch) bestimmt. □, *C. acetobutylicum* ATCC 824; ●, *C. acetobutylicum pta::int(80)ΔRAM-adc::int(180)*; ✕, *C. acetobutylicum adc::int(180)ΔRAM-pta::int(80)*.

Abbildungen zu *C. acetobutylicum* *ldh1::int(93)* und *C. acetobutylicum* *ldh2::int(231)*

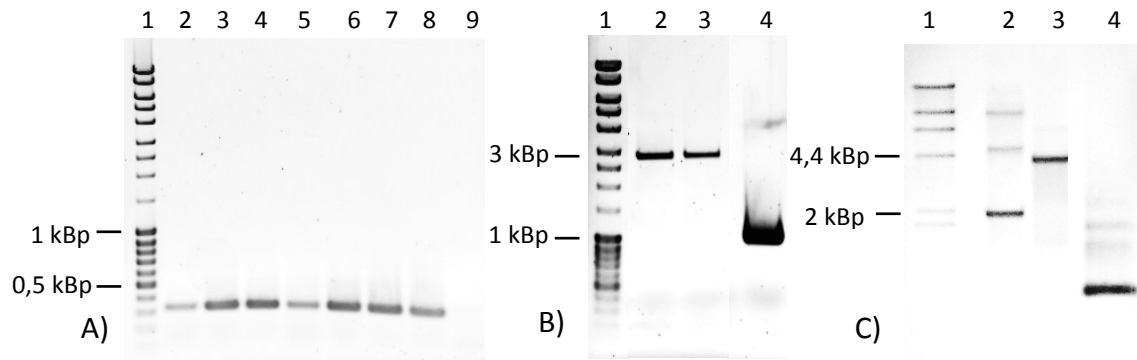


Abb. 7.22: Identifikation der Integration in *C. acetobutylicum* *ldh1::int(93)* mittels PCR-Screening und Southern Hybridisierung. A) Gen-Intron PCR. Spur 1: MassRuler™ DNA Ladder-Mix; Spur 2–8: Erythromycin-resistente Klone; Spur 2–8: positive Klone (347 Bp); Spur 9: Wildtyp. B) Gen-Gen PCR Spur 1: MassRuler™ DNA Ladder-Mix; Spur 2 + 3: Erythromycin-resistente Klone; Spur 2 + 3: positive Klone (2,7 kBp); Spur 4: Wildtyp (942 Bp). C) Southern Hybridisierung mit einer genspezifischen *ldh1*-Sonde. Spur 1: 100 ng DNA Molecular Weight Marker II (Roche); Spur 2: Wildtyp-DNA (400 ng) hydrolysiert mit *PsuI*, Spur 3: *C.ac. ldh1::int(93)*-DNA (400 ng)/*PsuI*; Spur 4: Positivkontrolle (*ldh1* PCR Produkt).

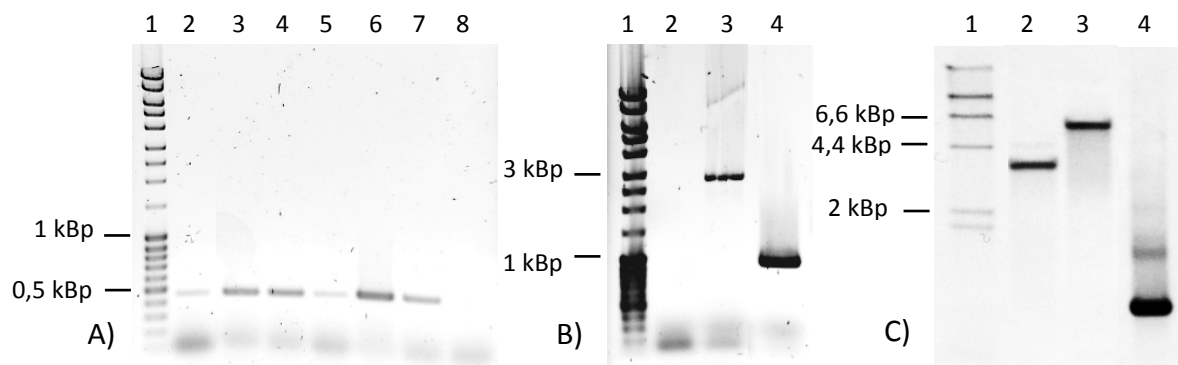


Abb. 7.23: Identifikation der Integration in *C. acetobutylicum* *ldh2::int(231)* mittels PCR-Screening und Southern Hybridisierung. A) Gen-Intron PCR. Spur 1: MassRuler™ DNA Ladder-Mix; Spur 2–7: Erythromycin-resistente Klone; Spur 2–7: positive Klone (485 Bp); Spur 8: Wildtyp. B) Gen-Gen PCR Spur 1: MassRuler™ DNA Ladder-Mix; Spur 2 + 3: Erythromycin-resistente Klone; Spur 3: positive Klone (2,7 kBp); Spur 4: Wildtyp (963 Bp). C) Southern Hybridisierung mit einer genspezifischen *ldh2*-Sonde. Spur 1: 100 ng DNA Molecular Weight Marker II (Roche); Spur 2: Wildtyp-DNA (400 ng) hydrolysiert mit *FaqI*, Spur 3: *C.ac. ldh2::int(231)*-DNA (400 ng)/*FaqI*; Spur 4: Positivkontrolle (*ldh2* PCR Produkt).

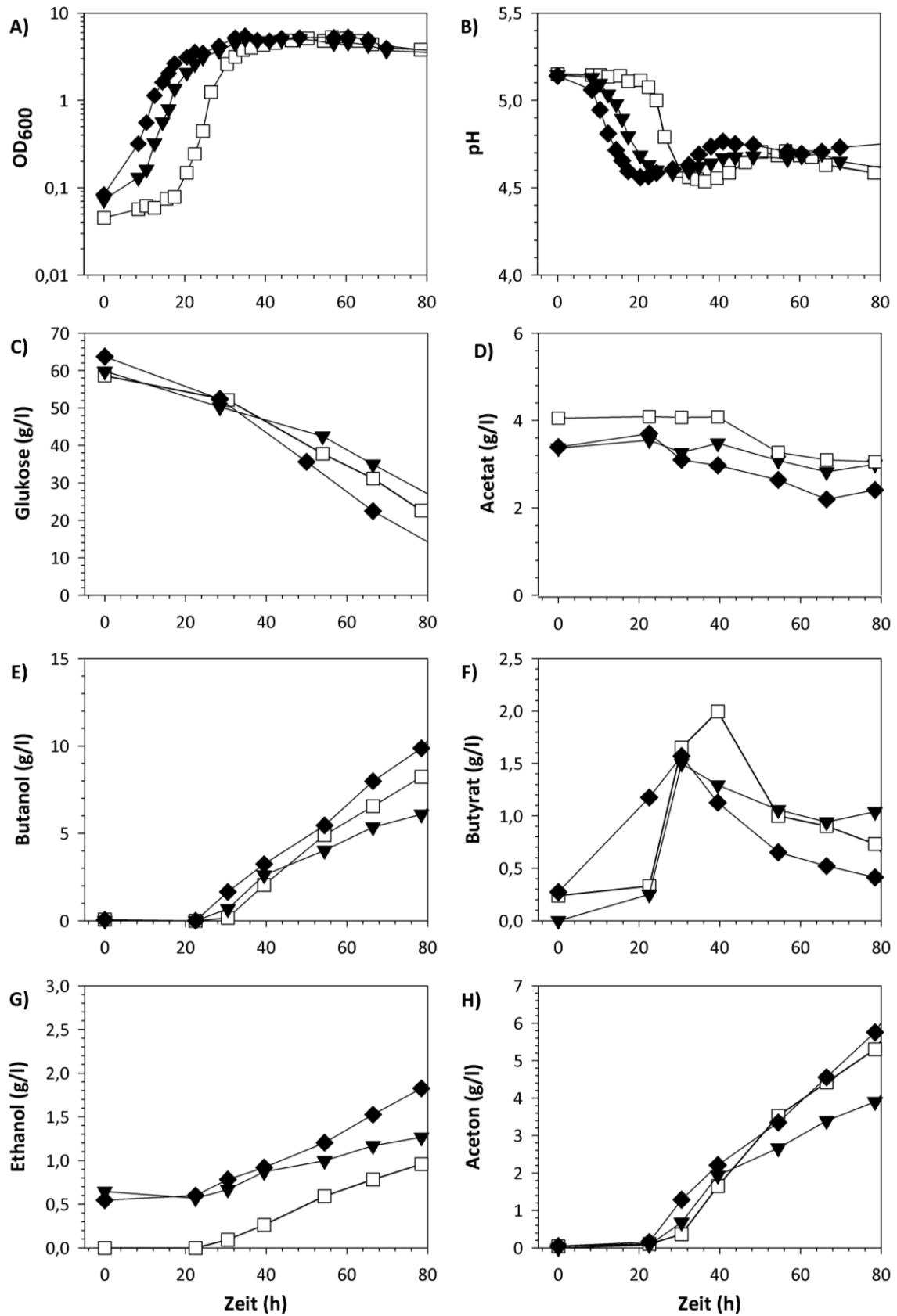


Abb. 7.24: Wachstumsphysiologische Charakterisierung von *C. acetobutylicum* ATCC 824 und *C. acetobutylicum* *ldh1::int(93)* und *C. acetobutylicum* *ldh2::int(231)* in einer Batch-Kultur (n=2). Die Kultivierung erfolgte in 200 ml MS-MES. In regelmäßigen Abständen erfolgte die Bestimmung der optischen Dichte, des pH-Wertes, Glukosekonzentration und der Fermentationsprodukte. □, *C. acetobutylicum* ATCC 824; ▼, *C. acetobutylicum* *ldh1::int(93)* und ◆, *C. acetobutylicum* *ldh2::int(231)*

Abbildungen zu *C. acetobutylicum adhE1::int(158)* und *C. acetobutylicum adhE2::int(114)*

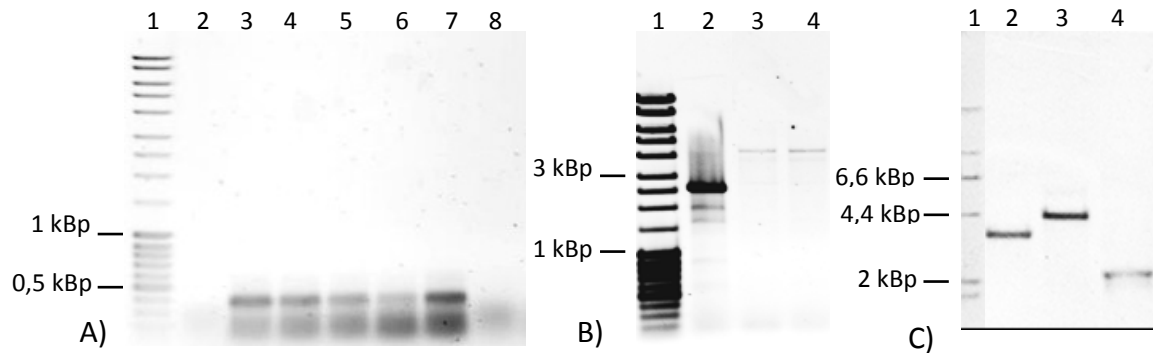


Abb. 7.25: Identifikation der Integration in *C. acetobutylicum adhE1::int(158)* mittels PCR-Screening und Southern Hybridisierung. A) Gen-Intron PCR. Spur 1: MassRuler™ DNA Ladder-Mix; Spur 2 – 7: Erythromycin-resistente Klone; Spur 3 - 7: positive Klone (412 Bp); Spur 8: Wildtyp. **B) Gen-Gen PCR** Spur 1: MassRuler™ DNA Ladder-Mix; Spur 2: Wildtyp (2589 Bp); Spur 3 + 4: Erythromycin-resistente Klone; Spur 3 + 4: positive Klone (4,4 kBp); **C) Southern Hybridisierung mit einer genspezifischen *adhE1*-Sonde.** Spur 1: 100 ng DNA Molecular Weight Marker II (Roche); Spur 2: Wildtyp-DNA (400 ng) hydrolysiert mit *CaiI/ClaiI*, Spur 3: *C.ac. adhE1::int(158)*-DNA (400 ng)/*CaiI/ClaiI*; Spur 4: Positivkontrolle (*adhE1* PCR Produkt).

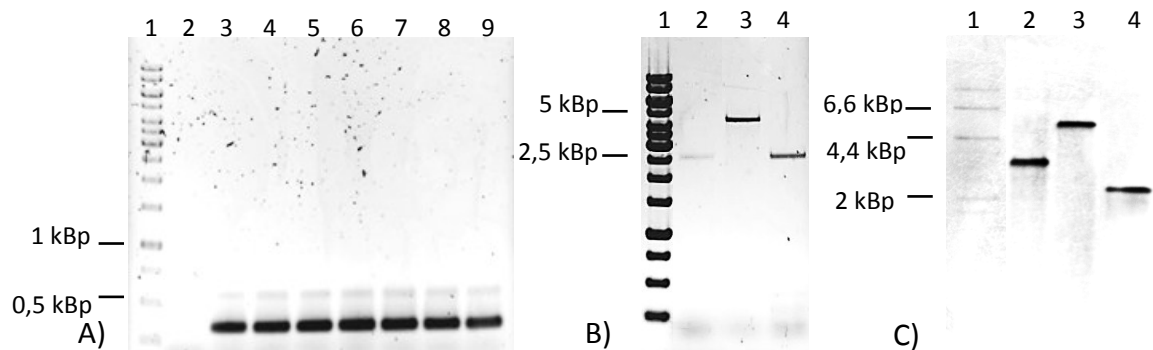


Abb. 7.26: Identifikation der Integration in *C. acetobutylicum adhE2::int(114)* mittels PCR-Screening und Southern Hybridisierung. A) Gen-Intron PCR. Spur 1: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder; Spur 3 – 9: Erythromycin-resistente Klone; Spur 3 - 9: positive Klone (368 Bp); Spur 2: Wildtyp. **B) Gen-Gen PCR** Spur 1: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder; Spur 2: Wildtyp (2577 Bp); Spur 3 + 4: Erythromycin-resistente Klone; Spur 3: positive Klone (4,4 kBp); **C) Southern Hybridisierung mit einer genspezifischen *adhE2*-Sonde.** Spur 1: 100 ng DNA Molecular Weight Marker II (Roche); Spur 2: Wildtyp-DNA (400 ng) hydrolysiert mit *HindIII/SpelI*; Spur 3: *C.ac. adhE2::int(114)*-DNA (400 ng)/*HindIII/SpelI*; Spur 4: Positivkontrolle (*adhE2* PCR Produkt).

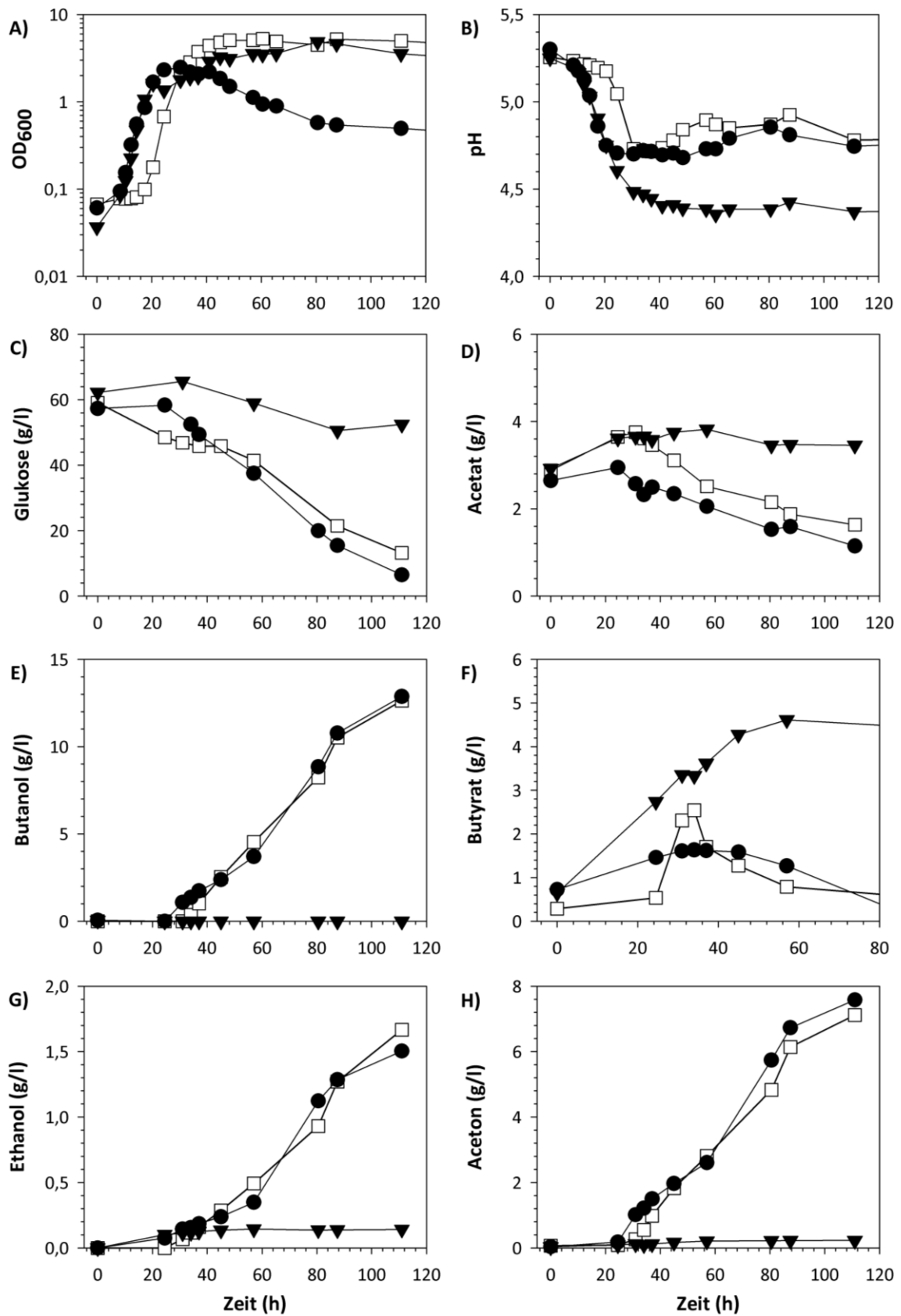


Abb. 7.27: Wachstumsphysiologische Charakterisierung von *C. acetobutylicum* ATCC 824 und *C. acetobutylicum* *adhE1::int(158)* und *C. acetobutylicum* *adhE2::int(114)* (n=2). Die Kultivierung erfolgte in 200 ml MS-MES. In regelmäßigen Abständen erfolgte die Bestimmung der optischen Dichte, des pH-Wertes, Glukosekonzentration und der Fermentationsprodukte. □, *C. acetobutylicum* ATCC 824; ▼, *C. acetobutylicum* *adhE1::int(158)*; ●, *C. acetobutylicum* *adhE2::int(114)*.

Abbildung zum Wachstumsverlauf von *C. acetobutylicum* *ctfA::int(352)* und *C. acetobutylicum* *adc::int(180)* in MS-MES mit Acetat

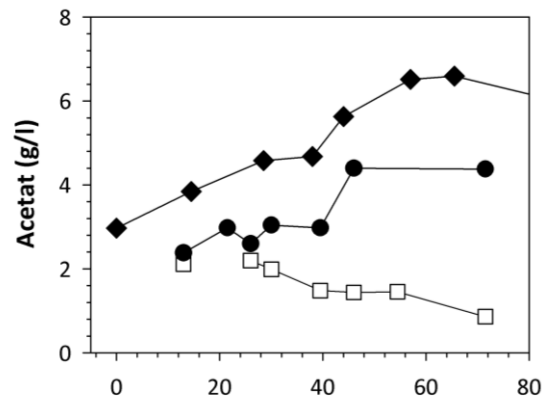


Abb. 7.28: Wachstumsphysiologische Charakterisierung von *C. acetobutylicum* ATCC 824, *C. acetobutylicum* *ctfA::int(352)* und *C. acetobutylicum* *adc::int(180)*. Die Kultivierung erfolgte in 200 ml MS-MES mit Acetat. Der hier dargestellte Versuch spiegelt exemplarisch das Wachstum von □, *C. acetobutylicum* ATCC 824; ◆, *C. acetobutylicum* *ctfA::int(352)*, und ●, *C. acetobutylicum* *adc::int(180)* wider.

Danksagung

Ich danke Frau Dr. Tina Lütke-Eversloh und Prof. Dr. Hubert Bahl, dass sie mir das Thema dieser Arbeit zur selbständigen Bearbeitung überlassen haben, und für die Unterstützung, die sie mir dabei zukommen ließen.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Ralf-Jörg Fischer für die aufmunternden Worte, zahlreichen Diskussionen und insbesondere für die Durchsicht dieser Arbeit und der Hilfe den Roten Faden zu finden.

Der größte Dank gebührt Miriam Mann, die mit mir die Höhen und Tiefen des Doktoranden-Dasein durchlebt hat, mir immer bei Seite stand und trotz anfänglicher Schwierigkeiten eine sehr gute Freundin geworden ist.

Ein großes Dankeschön gilt den Mitarbeitern der Abteilung Mikrobiologie: Ilona Boldt, Hella Goschke, Holger Janssen, Regina Karstädt, Henrique Machado, Antje May, Oliver Riebe, Michael Scheel, Franziska Schulz, Monika Timm, Daniela Wetzels, Mandy Wietzke und Katja Zimmermann für die Hilfsbereitschaft und gute Zusammenarbeit. Delyana Vasileva, Christine Voigt und Ronny Uhlig möchte ich außerdem für die Unterstützung im Labor, den Diskussionen und netten Gesprächen einen großen Dank aussprechen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern Peter und Karin Lehmann, ohne euch Beide wäre ich nie so weit gekommen.

Maxi Bergel danke ich besonders für die vielen Stunden, die sie die letzten Monate für mich da war und mit Lisa Pommerenke für das Korrekturlesen dieser Arbeit und den Zuspruch während der Schreibphase. Außerdem möchte ich mich zusätzlich bei Sina Caps, Alexander Hübner, Katja John und Annika Zülich für die sehr angenehmen Ablenkungen bedanken. Schließlich möchte ich auch allen hier nicht genannten danken, die zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

