

**Entwicklung und Anwendung eines Hochdurchsatz-Screenings
zur Optimierung der biotechnologischen Butanolproduktion**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

am Institut für Biowissenschaften
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock

Rostock, 2012

vorgelegt von:

Michael Scheel

aus Rostock

Gutachter:

1. Gutachter:

Prof. Dr. Hubert Bahl

Institut für Biowissenschaften

Universität Rostock

2. Gutachter:

Prof. Dr. Bernd Kreikemeyer

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene

Universität Rostock

Datum der Einreichung: 09. August 2012

Datum der Verteidigung: 16. November 2012

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
1.1. Aceton-Butanol-Ethanol-Fermentation	1
1.2. <i>Clostridium acetobutylicum</i>	2
1.3. Metabolic Engineering und Screening-Methoden	5
1.4. Zielstellung	8
2. Material und Methoden	9
2.1. Organismen	9
2.2. Kultivierung von <i>C. acetobutylicum</i>	10
2.2.1. Kulturmedien	10
2.2.2. Medienzusätze	12
2.2.3. Kultivierung in Flüssigmedien	13
2.2.4. Kultivierung auf Festmedien	13
2.3. Stammhaltung	14
2.4. Bestimmung physiologischer Parameter	14
2.4.1. Messung der Optischen Dichte und des pH-Werts	14
2.4.2. Bestimmung der Glucose-Konzentration	14
2.4.3. Gaschromatographie	16
2.4.3.1. Probenvorbereitung	16
2.4.3.2. Quantifizierung	16
2.4.3.3. Analysebedingungen	16
2.5. Visualisierung von Butanol	17
2.5.1. Chemische Derivatisierung mittels Kaliumdichromat	17
2.5.2. Chemische Derivatisierung mittels Kaliumpermanganat	17
2.5.3. Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)-Assay	17
2.6. Mutagenese von <i>C. acetobutylicum</i>	18
2.6.1. Bestimmung der Überlebensrate nach Exposition mit MNU	18
2.7. Bezugsquellen	19
3. Experimente und Ergebnisse	21
3.1. Kultivierung von <i>C. acetobutylicum</i> in Mikrotiterplatten	21
3.2. Entwicklung des Hochdurchsatz-Screenings	23
3.2.1. Visualisierung von Butanol	23

3.2.1.1. Chemische Derivatisierung mittels Kaliumdichromat.....	23
3.2.1.2. Chemische Derivatisierung mittels Kaliumpermanganat	26
3.2.1.3. Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)-Assay	30
3.3. Etablierung und Optimierung des NBT-Assays	40
3.3.1. NBT-Assay zur Stammdifferenzierung	40
3.3.2. Optimierung des NBT-Assays	43
3.3.3. Stammdifferenzierung mittels optimiertem Assay	47
3.3.3.1. Differenzierung im 10 ml-Maßstab	47
3.3.3.2. Differenzierung in Mikrotiterplatten.....	49
3.4. Anwendung des NBT-Assays als Screening-Methode	55
3.4.1. MNU-Mutagenese von <i>C. acetobutylicum</i> Wildtyp und Screening der Population.....	56
3.4.1.1. Bestimmung der Überlebensrate von <i>C. acetobutylicum</i> Wildtyp nach Exposition mit MNU	56
3.4.1.2. Erstellung der <i>C. acetobutylicum</i> Wildtyp-Mutantenpopulation.....	57
3.4.1.3. Screening der Population von <i>C. acetobutylicum</i> Wildtyp mittels NBT-Assay	58
3.4.1.4. Verifikation potentiell positiver <i>C. acetobutylicum</i> Wildtyp- MNU-Mutanten	59
3.4.1.5. Wachstumsphysiologische Charakterisierung selektierter MNU-Mutanten von <i>C. acetobutylicum</i> Wildtyp	64
3.4.2. Chemische Mutagenese von <i>C. acetobutylicum</i> <i>adc::Int(180)</i> und Screening der Population	68
3.4.2.1. Bestimmung der Überlebensrate von <i>C. acetobutylicum</i> <i>adc::Int(180)</i> nach Exposition mit MNU	68
3.4.2.2. MNU-Mutagenese von <i>C. acetobutylicum</i> <i>adc::Int(180)</i> und Screening der Mutantenpopulation mittels NBT-Assay.....	69
3.4.2.3. Verifikation potentiell positiver MNU-Mutanten von <i>C. acetobutylicum</i> <i>adc::Int(180)</i>	70
3.4.2.4. Wachstumsphysiologische Charakterisierung selektierter MNU- Mutanten von <i>C. acetobutylicum</i> <i>adc::Int(180)</i>	75
4. Diskussion	79
4.1. Kultivierung von <i>C. acetobutylicum</i> in Mikrotiterplatten	79
4.2. Entwicklung des Hochdurchsatz-Screenings	80
4.2.1. Visualisierung von Butanol	80
4.2.1.1. Chemische Derivatisierung	81
4.2.1.2. NBT-Assay	81

4.3. Etablierung und Optimierung des NBT-Assays	84
4.3.1. NBT-Assay zur Stammdifferenzierung	84
4.3.2. Optimierung des NBT-Assays	86
4.3.3. Stammdifferenzierung mittels optimiertem Assay	87
4.4. Anwendung des NBT-Assays als Screening-Methode	89
4.4.1. MNU-Mutagenese von <i>C. acetobutylicum</i> Wildtyp und Screening der Population.....	90
4.4.2. Physiologische Charakterisierung selektierter MNU-Mutanten von <i>C. acetobutylicum</i> Wildtyp.....	90
4.4.3. Chemische Mutagenese von <i>C. acetobutylicum</i> <i>adc::Int(180)</i> und Screening der Population.....	96
4.4.4. Physiologische Charakterisierung selektierter MNU-Mutanten von <i>C. acetobutylicum</i> <i>adc::Int(180)</i>	98
4.5. Evaluation der Screening-Strategien.....	102
5. Zusammenfassung.....	104
6. Literatur	106
Danksagung.....	119
Selbständigkeitserklärung.....	120

Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
A.	Aqua
Abb.	Abbildung
<i>ad</i>	auffüllen auf
ADP	Adenosin-5-diphosphat
ADH	Alkoholdehydrogenase
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bzw.	beziehungsweise
C.	<i>Clostridium</i>
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CFU	colony forming units
CGM	Clostridial Growth Medium
d	Schichtdicke
<i>dest.</i>	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E.	<i>Escherichia</i>
EMS	Ethylmethansulfonat
Erm ^R	Erythromycin-Resistenz
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> (und andere)
FID	Flammenionisationsdetektor
g	Gramm, Erdbeschleunigung
GC	Gaschromatographie
h	Stunde
Int	Integrante
k	kilo
l	Liter
μ	mikro (10 ⁻⁶), Wachstumsrate, Mittelwert
m	Meter, milli (10 ⁻³)
M	Molar
MES	2-(<i>N</i> -morpholino)-Ethansulfonsäure
MS	Medium Synthetique
min	Minute
mod.	modifiziert
MNU	N'-Methyl-N'-nitrosourea
MW	Molekulargewicht
n	nano (10 ⁻⁹)

N	Normal
nm	Nanometer
NAD ⁺	Nikotinamidadenindinukleotid
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NTA	Nitrilotriessigsäure
NTG	<i>N</i> -methyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidin
o. a.	oben angegeben
o. g.	oben genannt, oben gezeigt
OD	Optische Dichte
ox.	oxidiert
p	piko (10 ⁻¹²)
PABA	para-Aminobenzoesäure
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PMS	Phenazinmethosulfat
red.	reduziert
RCA	Reinforced Clostridial Agar
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
σ	Sigma, Standardabweichung
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
S.	<i>Saccharomyces</i>
Tab.	Tabelle
t _D	Verdopplungszeit
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminoethan
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
u. g.	unten gezeigt
ü. N.	über Nacht
u. U.	unter Umständen
UV	Ultraviolett
uv.	unverdünnt
V	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen
v. a.	vor allem
w/v	Masse pro Volumen
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1. Aceton-Butanol-Ethanol-Fermentation

Butanol ist ein aus vier Kohlenstoffatomen bestehender primärer Alkohol, der sich durch einen charakteristischen Geruch auszeichnet. Die farblose Flüssigkeit kann über diverse chemische Verfahren synthetisiert werden (Falbe, 1970; Bochman *et al.*, 1999, Lee *et al.*, 2008) und stellt in der chemischen Industrie ein wichtiges Lösungsmittel für die Herstellung von Lacken, Antibiotika, Vitaminen und Hormonen dar (Kirschner, 2006; Lee *et al.*, 2008). Eine zukunftssträchtige Anwendung des Butanols als Biotreibstoff ist möglich, da es petrochemische Kraftstoffe vollständig oder als Gemisch ersetzen kann, ohne dass technische Modifikationen der entsprechenden Verbrennungsmotoren notwendig sind. Im Hinblick auf den Einsatz als Treibstoff bzw. als Treibstoffzusatz birgt Butanol gegenüber Ethanol erhebliche Vorteile, da es im Vergleich einen höheren Energiegehalt und niedrigeren Dampfdruck sowie eine schlechtere Mischbarkeit mit Wasser und eine geringere Korrosivität aufweist. Zudem ist es kompatibel mit der bereits bestehenden Infrastruktur für Flüssigkraftstoffe (Dürre, 2007; Lee *et al.*, 2008; Dürre, 2011; Green, 2011).

In der ersten Hälfte des letzten Jahrhunderts nahm Butanol die Stellung eines überaus wichtigen biotechnologischen Industrieprodukts ein, das zusammen mit Aceton durch die mikrobielle Fermentation von Stärke, Melasse und anderen Substraten gewonnen wurde (Jones & Woods, 1986; Ezeji & Blaschek, 2007; Ezeji *et al.*, 2007a; Ezeji *et al.*, 2007b; Ezeji *et al.*, 2007c; Qureshi *et al.*, 2008). Dabei kam es insbesondere zur Verwendung von *Clostridium acetobutylicum*-Stämmen, die natürlicherweise die Gärungsendprodukte Aceton, Butanol und Ethanol im Verhältnis 3:6:1 bilden (Jones & Woods, 1986; Lee *et al.*, 2008). Die clostridielle Aceton-Butanol-Ethanol-(ABE)-Fermentation gilt als einer der ältesten und größten industriellen Fermentationsprozesse (Lütke-Eversloh & Bahl, 2011). Den Grundstein zur industriellen Anwendung der ABE-Fermentation legte Chaim Weizmann, dem zwischen 1912 und 1914 die Isolation von *Clostridium acetobutylicum* gelang. Der durch das Bakterium vermittelte Fermentationsprozess erlangte zu Beginn des Ersten Weltkriegs aufgrund des hohen Bedarfs an Aceton als Ausgangsstoff für die Munitionsherstellung enorme Bedeutung. Butanol entstand als Nebenprodukt, das zunächst keine Anwendung fand. Mit der raschen Expansion der Automobilindustrie nach dem Krieg und der einhergehenden Anwendung des Lösungsmittels innerhalb der Lackherstellung stieg der Bedarf an Butanol. Im Zweiten Weltkrieg diente die industrielle ABE-Fermentation ebenfalls hauptsächlich der Munitionsherstellung, so dass nach 1945 zwei Drittel des in den Vereinigten Staaten produzierten Butanols über

Fermentationsprozesse gewonnen wurden (Lee *et al.*, 2008). Nichtsdestotrotz war nach 1950 ein rapider Rückgang der industriellen fermentativen Butanolproduktion zu verzeichnen, da der biotechnologische Prozess durch weitaus wirtschaftlichere und effizientere petrochemische Verfahren ersetzt wurde (Jones & Woods, 1986; Dürre, 2007). Infolge der Ölkrise von 1970 nahmen das Interesse an biologischen Produktionsverfahren und die damit verbundenen Forschungsaktivitäten in Bezug auf die technischen Aspekte der Fermentation und die Physiologie und Genetik solventogener Clostridien erneut stark zu (Lütke-Eversloh & Bahl, 2011). Die in den letzten Jahren konstant steigenden Erdölpreise und zunehmenden Probleme der globalen Erderwärmung verlangen nach umweltfreundlichen und ressourcenschonenden Alternativen zu petrochemischen Kraftstoffen. Obwohl die Produktion von Biotreibstoffen durch die fermentative Konversion von nachwachsenden Rohstoffen derzeit noch nicht ökonomisch konkurrenzfähig zu chemischen Verfahren ist, bietet die biotechnologische Butanolproduktion eine aussichtsreiche Grundlage für die alternative Kraftstoffproduktion.

1.2. *Clostridium acetobutylicum*

Unter den solventogenen Clostridien gilt *Clostridium acetobutylicum* als Modellorganismus (Lee *et al.*, 2008; Papoutsakis, 2008). Das stäbchenförmige, sporenbildende und Gram-positive Bakterium, dessen Genom bereits vor mehr als zehn Jahren sequenziert wurde (Nölling *et al.*, 2001), gehört zu den strikt anaeroben Organismen. Die Fähigkeit der Clostridien die Lösungsmittel Aceton, Butanol und Ethanol zu synthetisieren, ist typischerweise mit einem biphasischen Fermentationsmetabolismus assoziiert, der wiederum mit zellmorphologischen Veränderungen verbunden ist (Abb. 1.1). Das Bakterium durchläuft einen Zellzyklus, bei dem es in der acidogenen Phase, also während des exponentiellen Wachstums, Kohlenhydrate zu den Säuren Acetat und Butyrat sowie zu Kohlenstoffdioxid und molekularem Wasserstoff metabolisiert. Solventogene Clostridien sind dabei in der Lage, diverse Kohlenhydrate als Ausgangsstoffe zu nutzen. Die Substratvielfalt erstreckt sich über Pentosen und Hexosen zu Oligosacchariden und Polysacchariden (Jones & Woods, 1986; Lee *et al.*, 2008; Lütke-Eversloh & Bahl, 2011). Die Ergebnisse kürzlich veröffentlichter Mutanten- und Transkriptionsanalysen lieferten ausführliche Einblicke in die clostridielle Verwertung der Kohlenhydrate und den zugrunde liegenden Regulationsmechanismen (Mitchell *et al.*, 1995; Servinsky *et al.*, 2010; Grimmier *et al.*, 2010; Ren *et al.*, 2010). Der Eintritt der vegetativen Zellen in die stationäre Phase und die Lösungsmittelproduktion werden von der Synthese der intrazellulären Speicherverbindung Granulose begleitet. Infolge einer Akkumulation der

Granulose entstehen "clostridial stages", die sich durch ihre charakteristische zigarrenartige Form von den vegetativen Zellen unterscheiden. Unter Nutzung der Granulose als Energie- und Kohlenstoffquelle kommt es zur Initiation des Sporulationsprozesses und damit zur Bildung von Vorsporen, die anschließend zu Endosporen reifen. Die Sporen zeigen ausgeprägte Resistenzen und sind somit zur Überdauerung langer Perioden ungünstiger Umwelteinflüsse fähig, bevor sie unter vorteilhaften Bedingungen erneut auskeimen (Jones *et al.*, 1982; Jones & Woods, 1986, Paredes *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2008).

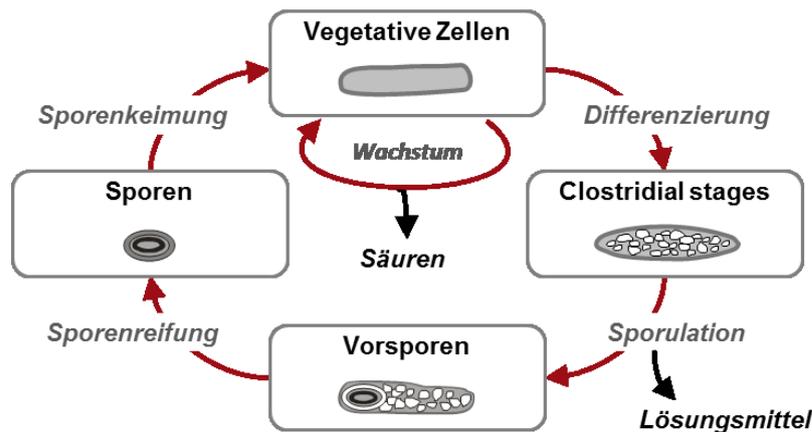


Abb. 1.1: Zellzyklus von *C. acetobutylicum* (modif. nach Lütke-Eversloh & Bahl, 2011). Dargestellt sind die mit der Lösungsmittelbildung und Sporulation einhergehenden zellmorphologischen Veränderungen.

Der biphasische Fermentationsmetabolismus von *C. acetobutylicum* gliedert sich der Bezeichnung entsprechend in zwei Phasen (Abb. 1.2) Innerhalb der acidogenen Phase wird die entsprechende Kohlenstoffquelle über den Emden-Meyerhof-Parnas-Weg zu Pyruvat umgesetzt. Dieses fungiert als Substrat für die Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase, die die Bildung von Acetyl-CoA katalysiert. Acetyl-CoA wird über die Phosphotransacetylase und die Acetat-Kinase zu Acetat umgesetzt. Die Acetat-Kinase-Reaktion liefert Energie in Form von ATP. Die Kondensation von zwei Molekülen Acetyl-CoA zu Acetoacetyl-CoA und die nachfolgende Reduktion zu Butyryl-CoA stellen die ersten Schritte der Butyrat- und Butanol-Synthese dar. Umwandlungen des Butyryl-CoA über die Phosphotransbutyrylase und die Butyrat-Kinase vervollständigen die Buttersäureproduktion und dienen ebenfalls der ATP-Generierung. Die Produktion von Acetat und Butyrat bringt ein Absinken des pH-Wertes in der Kultur mit sich. Um einer Zerstörung des essentiellen Protonengradienten an der Membran und damit dem durch die Säuren ausgelösten Stress entgegenzuwirken, erfolgt die Umstellung des Metabolismus von Acidogenese zu Solventogenese (Paredes *et al.*, 2005). Dieser "metabolic switch" wird von deutlichen Änderungen des

Genexpressionsmusters begleitet (Dürre *et al.*, 1987). Die Produktion der neutralen Lösungsmittel beginnt am Übergang zur stationären Wachstumsphase unter Reassimilation der Säuren mit Bildung der entsprechenden CoA-Derivate über die Acetoacetyl-CoA:Acyl-CoA-Transferase (Jones & Woods, 1986). Anschließend katalysieren unterschiedliche Aldehyd-/Alkoholdehydrogenasen die Metabolisierung von Butyryl-CoA zu Butyraldehyd und schließlich zu Butanol, dem Hauptfermentationsprodukt von *C. acetobutylicum*. Auch die Ethanolproduktion verläuft unter Dehydrogenase-vermittelten Reaktionen (Chen, 1995; Fontaine *et al.*, 2002; Grimmier *et al.*, 2011). Aceton entsteht nach einer Transferase-Reaktion des bei der Reassimilation der Säuren als CoA-Donor dienenden Acetoacetyl-CoA durch Decarboxylierung von Acetoacetat.

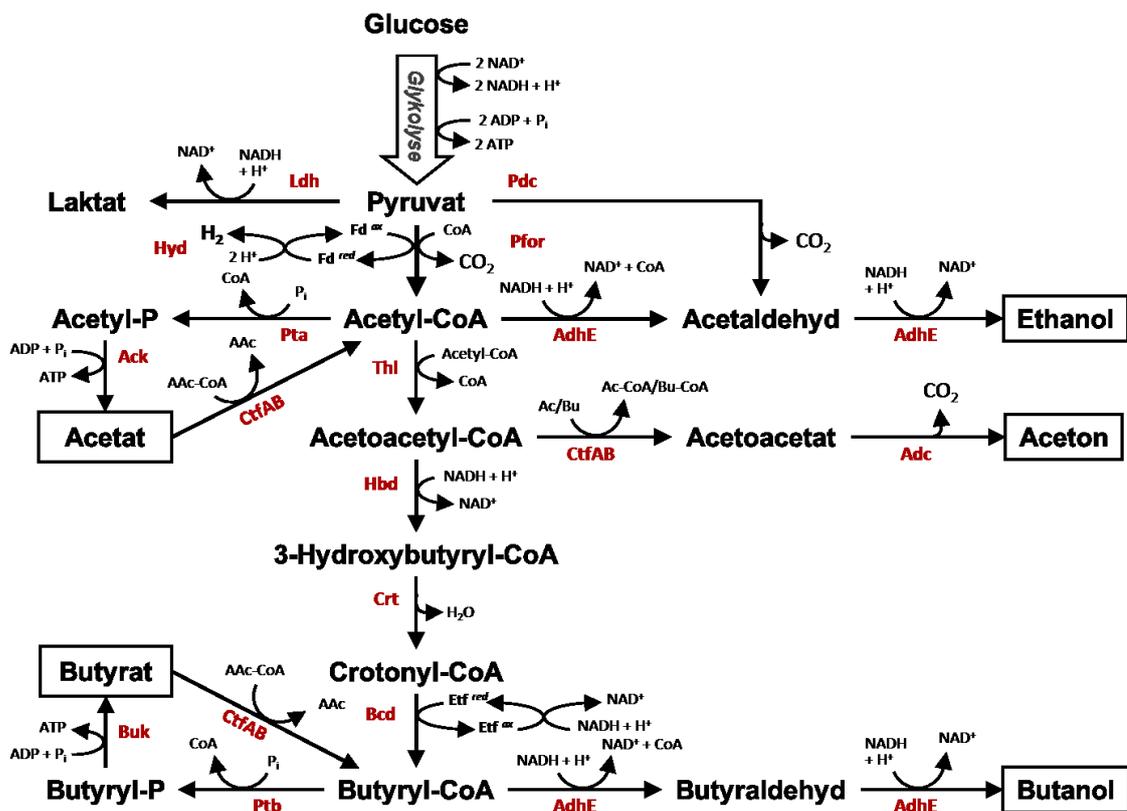


Abb. 1.2: Acidogenese und Solventogenese in *C. acetobutylicum* (modif. nach Lütke-Eversloh & Bahl, 2011). Gezeigt sind die für die Produktion der Säuren und Lösungsmittel nötigen metabolischen Reaktionen. Die roten Buchstaben geben die entsprechend involvierten Enzyme an. Ldh, Lactat-Dehydrogenase; Pdc, Pyruvat-Decarboxylase; Hyd, Hydrogenase; Pfor; Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase; Fd, Ferredoxin; Pta, Phosphotransacetylase; Ack, Acetat-Kinase; AdhE, Aldehyd/Alkohol-Dehydrogenase; CtfAB, Acetoacetyl-CoA:Acyl-CoA-Transferase; Adc, Acetoacetat-Decarboxylase; Thl, Thiolase; Hbd, 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase; Crt, Crotonase; Bcd, Butyryl-CoA-Dehydrogenase; Etf, Elektronen-Transfer-Flavoprotein; Ptub, Phosphotransbutyrylase; Buk, Butyrat-Kinase. AAC-CoA, acetoacetyl-CoA; Ac/Bu, Acetat/Butyrat; Ac-CoA/Bu-CoA, Acetyl-CoA/Butyryl-CoA; ox, oxidiert; red, reduziert.

1.3. Metabolic Engineering und Screening-Methoden

Solventogene Clostridien waren über einen langen Zeitraum genetisch nicht zugänglich, so dass zunächst keine Möglichkeit zur Aufklärung physiologischer und regulatorischer Mechanismen bestand. Ein stark gestiegenes Interesse an der ABE-Fermentation nach der Ölkrise brachte eine erhebliche Zunahme der Forschungsaktivitäten mit sich, deren Ergebnisse in den vergangenen 15 Jahren zur Überwindung der genetischen Unzugänglichkeit führten und der Entwicklung zahlreicher neuer Methoden des Metabolic Engineerings dienten (Lütke-Eversloh & Bahl, 2011). Der Begriff Metabolic Engineering (ME) bezeichnet die Verbesserung zellulärer Aktivitäten durch die gezielte, meist auf genetischer Ebene erfolgende Manipulation enzymatischer oder regulatorischer Funktionen zur Generierung bzw. Optimierung biotechnologischer Produktionsorganismen (Bailey, 1991). Klassische ME-Strategien basieren auf dem rationalen Design spezifischer Veränderungen des Stoffwechsels und setzen die Kenntnis des zu manipulierenden metabolischen Systems voraus (Bailey *et al.*, 2002; Lütke-Eversloh & Bahl, 2011). Obwohl das rationale ME im Zuge der Entwicklung zahlreicher Produktionsstämme für die biotechnologische Antibiotika-, Aminosäure- und Chemikalienproduktion Erfolge erzielte, ist diese systematische Strategie auch mit gewissen Limitierungen verbunden. So ergaben sich nach der genetischen Manipulation häufig unerwartete phänotypische Ausprägungen. Die Einschränkungen der rationalen ME-Verfahren sind auf die hohe Komplexität der metabolischen Netzwerke und darauf zurückzuführen, dass ein jeweiliger Phänotyp durch zahlreiche unbekannte Faktoren bestimmt wird (Bailey *et al.*, 2002; Lütke-Eversloh & Bahl, 2011). Um die mit dem systematischen ME assoziierten Grenzen zu umgehen, kann eine Anwendung kombinatorischer Methoden von Nutzen sein. Dabei gelingt die Isolation gewünschter Phänotypen respektive optimierter Produktionsstämme aus bestimmten, z. T. auch undefinierten Populationen auf der Basis geeigneter Selektionsverfahren. Die Analyse des genetischen Hintergrunds des entsprechenden Phänotyps führt idealerweise zur Identifikation des zum veränderten Merkmal beitragenden Faktors, der dann auf den Ursprungsorganismus übertragen werden kann. Derartige kombinatorische Strategien stellen den Ausgangspunkt für das inverse Metabolic Engineering dar, welches bereits in vorangegangenen Arbeiten erfolgreich innerhalb der Optimierung biotechnologischer Mikroorganismen eingesetzt wurde (Bailey *et al.*, 2002; Santos & Stephanopoulos, 2008).

Voraussetzung für die Umsetzung des inversen ME ist die Verfügbarkeit eines geeigneten Screening-Verfahrens. Einen zusammenfassenden Überblick über die bisher innerhalb des kombinatorischen ME solventogener Clostridien verwendeten Screening-Strategien (Tab. 1.1) gaben Lütke-Eversloh & Bahl (2011). Die

Nachahmung natürlicher Umweltsituationen stellt die Basis für die einfachste und in früheren Studien häufig angewandte Screening-Methode dar, bei der die phänotypische Selektion unter dem Einfluss bestimmter Bedingungen und anhand physiologischer Eigenschaften gelingt. Anwendungen dieser Prozedur erfolgten beispielsweise im Zuge der Isolation von *C. acetobutylicum*-Stämmen mit verbesserter Butanolproduktion, deren Anreicherung und Selektion nach chemischer Mutagenese durch Butanol-Exposition vermittelt wurde (Lemmel, 1985; Hermann *et al.*, 1985, Matta-el-Ammouri *et al.*; 1986). Die auf der Lösungsmitteltoleranz basierende Identifizierung jener verbesserten Butanolproduzenten war möglich, weil eine erhöhte Resistenz gegenüber Butanol als physiologisches Kriterium für eine gesteigerte Butanolproduktion gilt. Auch Mao *et al.* (2010) nutzten die Verbindung von Butanoltoleranz und -produktion. Sie konnten den Mutantenstamm Rh8 mittels Genome Shuffling und Butanol-Exposition selektieren. Dass eine erhöhte Butanoltoleranz allerdings nicht zwangsläufig zu einer verbesserten Butanolproduktion führt, konnte vor Kurzem anhand von Stressprotein-überexprimierenden Stämmen gezeigt werden (Mann *et al.*, 2012). Auch ohne den Einsatz Butanoltoleranz-basierender Selektionsverfahren gelang die Isolation optimierter Butanolproduzenten. In Gegenwart eines Glucose-Analogons gelang die Selektion eines Stammes von *C. beijerinckii*, der sich neben einer gesteigerten amylytischen Aktivität durch eine verbesserte Butanolbildung auszeichnete (Annous & Blaschek, 1991; Qureshi & Blaschek, 2001).

Screenings clostridieller Populationen unter Verwendung halogener Alkohol- und Säureanaloge, deren Abbauprodukte toxisch für die Zelle sind, brachten Stoffwechselmutanten hervor (Dürre *et al.*, 1986; Rothstein, 1986; Rogers & Palosaari, 1987; Junelles *et al.*, 1987; Abbad-Andaloussi *et al.*, 1996; Medkor *et al.*, 2010). Die Kombination des Brombutyrat-Resistenz-Screenings mit einem kolorimetrischen Alkohol-Nachweis resultierte in der Selektion Lösungsmittel-negativer Stämme von *C. acetobutylicum* und lieferte wichtige Einblicke in die Regulation der Lösungsmittelproduktion (Clark *et al.*, 1989). Andere Mutanten konnten auf Grundlage der in saurer Umgebung ablaufenden Reaktion halogener Natriumsalze zu toxischem Brom isoliert werden (Cueto & Mendez, 1990).

Neben der Anwendung chemischer Mutageneseverfahren ermöglichten Transposon-gestützte Methoden die Erzeugung verschiedener *C. acetobutylicum*-Populationen, aus denen Lösungsmittel-, Granulose- und Sporulations-Defektmutanten hervorgingen (Bertram & Dürre, 1989; Bertram *et al.*, 1990; Babb *et al.*, 1993; Mattsson & Rogers, 1994). Die Transposon-Mutagenese birgt den Vorteil der Generierung definierter Populationen, innerhalb derer sich der für den veränderten Phänotyp verantwortliche

Genotyp zurückverfolgen lässt (Lütke-Eversloh & Bahl, 2011). Die Erstellung weiterer definierter Populationen wurde durch die homologe Expression Plasmid-basierter genomischer Bibliotheken in *C. acetobutylicum* realisiert. Das Screening dieser Genbanken führte zur Identifikation von genetischen Elementen, die zur Lösungsmittel- und Säuretoleranz in *C. acetobutylicum* beitragen (Borden & Papoutsakis, 2007; Borden *et al.*, 2010).

Einen innovativen Screening-Ansatz verfolgten Tracy *et al.* (2008). Sie entwickelten einen Durchflusszytometrie-Assay, der eine phänotypische Selektion anhand Zellzyklus-assoziiertes morphologischer Merkmale im Hochdurchsatz erlaubt.

Tab. 1.1: Kombinatorisches Metabolic Engineering solventogener Clostridien. Die Tabelle fasst die in vorangegangenen Arbeiten angewandten Methoden zum Screening clostridieller Populationen zusammen. LM, Lösungsmittel; *C.ac.*, *Clostridium acetobutylicum*; AB, Antibiotika; FACS, fluorescence assisted cell sorting; ↑, gesteigert, ↓, verringert.

Screening	Population	Phänotyp	Referenz
Butanol-Toleranz	Chem. Mutagenese	↑ Butanol	Lemmel, 1985 Hermann <i>et al.</i> , 1985 Matta-el-Ammouri <i>et al.</i> , 1986
Butanol-Toleranz	Chem. Mutagenese, Genome Shuffling	↑ Butanol	Mao <i>et al.</i> , 2010
LM-Toleranz Säure-Toleranz	<i>C.ac.</i> -Genbank	↑ Toleranz, Analyse entspr. Genregionen	Borden & Papoutsakis, 2007 Borden <i>et al.</i> , 2010
Glucose-Analoga	Chem. Mutagenese	↑ amylolyt. Aktivität ↑ Butanol	Annous & Blaschek, 1991 Qureshi & Blaschek, 2001
Allylalkohol (AA)- Resistenz	Chem. Mutagenese	↓ LM, ↑ Säuren	Dürre <i>et al.</i> , 1986 Rogers & Palosaari, 1987 Abbad-Andaloussi <i>et al.</i> , 1996
Brombutyrat (BB)- Resistenz	Chem. Mutagenese	↓ LM, ↑ Acetat	Junelles <i>et al.</i> , 1987 Clark <i>et al.</i> , 1989
Fluoracetat-Resistenz	Chem. Mutagenese	↑ Ethanol	Rothstein, 1986
Brompropionat-, Bromisovalerat- Resistenz	Chem. Mutagenese	↑ Butanol	Medkor <i>et al.</i> , 2010
BB-/AB-Resistenz, NBT-Assay	Chem. Mutagenese	↓ LM	Clark <i>et al.</i> , 1989

Tab. 1.1 (Fortsetzung): Kombinatorisches Metabolic Engineering solventogener Clostridien.

Screening	Population	Phänotyp	Referenz
AA-/BB-Resistenz	Tn916-Mutagenese	↓ LM	Bertram & Dürre, 1989 Bertram <i>et al.</i> , 1990
AB-Resistenz	Tn916-Mutagenese	↓ LM, ↓ Granulose ↓ Sporulation	Babb <i>et al.</i> , 1993 Mattsson & Rogers, 1994
Flow Cytometry, FACS	Batch-Kulturen	Zelldifferenzierung, Sporulation	Tracy <i>et al.</i> , 2008 Tracy <i>et al.</i> , 2010

1.4. Zielstellung

Der Erfolg kombinatorischer Metabolic Engineering-Strategien hängt von der Eignung des eingesetzten Screenings ab. Die Wahl des Verfahrens wird dabei durch den zu identifizierenden Phänotyp bedingt. Im Hinblick auf eine Quantifizierung des von *C. acetobutylicum* produzierten Butanols können ein Screening und die phänotypische Selektion nur indirekt über entsprechende Visualisierungsmethoden erfolgen, da Butanol als farblose Substanz nicht direkt sichtbar ist (Dietrich *et al.*, 2010). Derartige quantitative Screening-Techniken sind für *C. acetobutylicum* und andere solventogene Clostridien bis dato nicht vorhanden (Lütke-Eversloh & Bahl, 2011). Dementsprechend bestanden die Ziele der vorliegenden Arbeit in der Entwicklung eines Hochdurchsatz-Screenings zur Visualisierung der Butanolproduktion von *C. acetobutylicum* und in der Anwendung dieses Verfahrens zur Isolation von Stämmen mit verbesserter Butanolproduktion.

2. Material und Methoden

2.1. Organismen

Die in der vorliegenden Arbeit genutzten Stämme sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Tab. 2.1: Verwendete Stämme. (*Stammsammlungs-Identifikationsnummer)

Stamm	Relevante Charakteristika	Referenz
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	Wildtyp	American Type Culture Collection
<i>C. acetobutylicum</i> DG1	pSOL1-negativ	Nair, 1995; Stim-Herndon <i>et al.</i> , 1996
<i>C. acetobutylicum</i> <i>adc</i> ::Int(180)	Insertion eines Gruppe II-Introns zwischen Bp 180 und 181 des <i>adc</i> -Gens (CAP0165), Erm ^R	Lehmann <i>et al.</i> , 2012a; (*330)
<i>C. acetobutylicum</i> <i>ctfA</i> ::Int(352)	Insertion eines Gruppe II-Introns zwischen Bp 352 und 353 des <i>ctfA</i> -Gens (CAP0163), Erm ^R	Lehmann <i>et al.</i> , 2012a; (*331)
<i>C. acetobutylicum</i> <i>pta</i> ::Int(80)	Insertion eines Gruppe II-Introns zwischen Bp 80 und 81 des <i>pta</i> -Gens (CAC1742), Erm ^R	Lehmann <i>et al.</i> , 2012a, (*328)
<i>C. acetobutylicum</i> <i>ptb</i> ::Int(87)	Insertion eines Gruppe II-Introns zwischen Bp 87 und 88 des <i>ptb</i> -Gens (CAC3076), Erm ^R	Lehmann <i>et al.</i> , 2012b; (*329)
<i>C. acetobutylicum</i> <i>hbd</i> ::Int(69)	Insertion eines Gruppe II-Introns zwischen Bp 69 und 70 des <i>hbd</i> -Gens (CAC2708), Erm ^R	Lehmann & Lütke-Eversloh, 2011; (*334)
<i>C. acetobutylicum</i> <i>adhE1</i> ::Int(158)	Insertion eines Gruppe II-Introns zwischen Bp 158 und 159 des <i>adhE1</i> -Gens (CAP0162), Erm ^R	Lehmann, 2012, Dissertation; (*332)
<i>C. acetobutylicum</i> <i>ldh1</i> ::Int(93)	Insertion eines Gruppe II-Introns zwischen Bp 93 und 94 des <i>ldh1</i> -Gens (CAC0267), Erm ^R	Lehmann, 2012, Dissertation; (*326)
<i>C. acetobutylicum</i> 2D8	nach chemischer Mutagenese des Wildtyps und Butanol-Exposition isolierter Stamm	diese Arbeit; (*379)

Tab. 2.1 (Fortsetzung): Verwendete Stämme.

Stamm	Relevante Charakteristika	Referenz
<i>C. acetobutylicum</i> 2E8	nach chemischer Mutagenese des Wildtyps und Butanol-Exposition isolierter Stamm	diese Arbeit; (*380)
<i>C. acetobutylicum</i> 3E8	nach chemischer Mutagenese des Wildtyps und Butanol-Exposition isolierter Stamm	diese Arbeit; (*381)
<i>C. acetobutylicum</i> 8F9	nach chemischer Mutagenese des Wildtyps und Butanol-Exposition isolierter Stamm	diese Arbeit; (*382)
<i>C. acetobutylicum</i> a13B5	durch chemische Mutagenese von <i>C. acetobutylicum adc::Int(180)</i> erzeugter Stamm	diese Arbeit; (*383)
<i>C. acetobutylicum</i> a14E6	durch chemische Mutagenese von <i>C. acetobutylicum adc::Int(180)</i> erzeugter Stamm	diese Arbeit; (*384)
<i>C. acetobutylicum</i> a20A7	durch chemische Mutagenese von <i>C. acetobutylicum adc::Int(180)</i> erzeugter Stamm	diese Arbeit; (*385)

2.2. Kultivierung von *C. acetobutylicum*

2.2.1. Kulturmedien

Die Kultivierung von *C. acetobutylicum* erfolgte in anaeroben Medien, die nach Breznak & Costilow (1994) hergestellt wurden. Nach Einstellung des pH-Wertes wurden die Medien in der Mikrowelle bis zum Farbumschlag des Redoxindikators Resazurin (Endkonzentration 0,1 % [w/v]) aufgekocht, um gelösten Sauerstoff zu entfernen. Während der Abkühlung der Nährmedien wurde mittels Stickstoffbegasung ein erneutes Lösen des Sauerstoffs verhindert. Im Anschluss wurden die Kulturgefäße luftdicht verschlossen und dann autoklaviert (20 min bei 121 °C). Im Fall des CGM-Mediums erfolgte der Glucose-Zusatz nach dem Autoklavieren aus einer sterilen und anaeroben Stammlösung (50 % [w/v]). Im Folgenden sind die Zusammensetzungen der verwendeten Kulturmedien dargestellt.

CGM (clostridial growth medium) (Wiesenborn *et al.*, 1989; mod.)

Glucose x H ₂ O (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	0,01	g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,01	g
Resazurin (0,1 % [w/v])	1	ml
<i>A. dest.</i> <i>ad</i>	1000	ml

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

Glucose x H ₂ O	60	g
K ₂ HPO ₄	0,55	g
KH ₂ PO ₄	0,55	g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,22	g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,011	g
Eisessig	2,3	ml
PABA (0,8 g/l)	10	ml
Biotin (0,008 g/l)	10	ml
MES	21,3	g
Resazurin (0,1 % [w/v])	1	ml
<i>A. dest.</i> <i>ad</i>	1000	ml

Die Zugabe von PABA (p-Aminobenzoesäure), Biotin und MES (2-(N-morpholino)-Ethansulfonsäure) erfolgte nach der Einstellung des pH-Wertes auf 6,6 mit NH₄OH.

CGM und MS-MES wurden nicht ausschließlich für die Anzucht von Flüssigkulturen (2.2.3.) genutzt, sondern bildeten außerdem die Grundlage zur Herstellung von Festmedien. Dafür wurden die Medien vor dem Autoklavieren mit 15 g/l bzw. 30 g/l Agar und je nach Verwendungszweck entweder mit 10 g/l CaCO₃ oder mit 21,3 g/l MES versetzt. Die Menge an zugegebenem Agar richtete sich dabei nach der Wahl der eingesetzten Puffersubstanz. MES-gepufferte Festmedien wurden grundsätzlich unter

Einsatz von 30 g/l Agar hergestellt, um eine ausreichende Festigkeit der Platten zu gewährleisten.

RCA (reinforced clostridial agar)

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

RCA wurde als Komplettmedium von der Firma Oxoid (Wesel) bezogen. Der pH-Wert lag ohne weitere Einstellung bei 6,8. Zur Erzeugung alternativer Festmedien wurde RCA mit 21,3 g/l MES oder mit 10 g/l CaCO₃ versetzt.

2.2.2. Medienzusätze

Im Bedarfsfall wurden den oben aufgeführten Kulturmedien verschiedene Zusätze beigelegt. Die Zugabe von 50-100 µl Titan-(III)-NTA-Lösung (1,3 M NaOH; 0,16 M NTA; 0,27 M Na₂CO₃; 1,3 % TiCl₃) diente der Entfernung restlichen Sauerstoffs vor der Inokulation von Flüssigkulturen. Zur Herstellung einer 100-mM-Titan-(III)-NTA-Lösung, wurden 5,73 g Nitrotriessigsäure (400 mM) in 30 ml *A. dest.* und 20 ml 5 M NaOH gelöst. Es folgte das Durchgasen dieser Lösung mit Stickstoff, um den vorhandenen Luftsauerstoff zu entfernen. Anschließend fand in der Anaerobenwerkbank (Meintrup DWS, Lähden-Holte) unter ständigem Rühren die Zugabe von 6,4 ml einer 15 %igen [w/v] TiCl₃-Lösung und 10 ml einer anaeroben 2 M Na₂CO₃-Lösung statt. Das Gemisch wurde mit anaerobem *A. dest.* aufgefüllt und sterilfiltriert (Sterilfilter, Porengröße 0,2 µm; Sarstedt AG & Co., Nürnberg).

Titan-(III)-NTA-Lösung

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

Für die Kultivierung von *C. acetobutylicum*-Insertionsmutanten (siehe Tab. 2.1) wurde den jeweiligen Flüssig- und Festmedien 25 µg/ml Erythromycin zugesetzt. Stammlösungen des Antibiotikums (50 mg/ml in Ethanol (reinst, 96 % [v/v])) wurden bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Zugabe des Erythromycins erfolgte steril nach Autoklavieren und Abkühlung der Medien unter 50 °C bzw. im Zuge der Inokulation von Flüssigkulturen.

Innerhalb der Generierung einer Mutantenpopulation von *C. acetobutylicum* (siehe Abschnitt 3.4.1.2.) diente die Verwendung Butanol-haltiger Agarplatten (15 g/l Butanol) der Selektion Butanol-toleranter Stämme. Zur Herstellung dieser Agarplatten wurde RCA (2.2.1.) nach dem Autoklavieren und Abkühlen unter 50 °C mit dem entsprechenden Volumen an Butanol versetzt.

2.2.3. Kultivierung in Flüssigmedien

Die Anzucht von *C. acetobutylicum* in Batch-Flüssigkulturen geschah anaerob unter abgeschlossener Stickstoffatmosphäre bei 37 °C in Hungate-Röhrchen (Ochs GmbH, Bovenden), Serumflaschen (Müller & Krempel AG, Bülach, Schweiz) oder in Mikrotiterplatten (Sarstedt AG & Co., Nürnberg). Als Inokulum wurden dabei bis zu 0,1 Vol. einer Stammkultur (2.3.) bzw. einer Vorkultur oder Zellmaterial eines auf Festmedien kultivierten Stamms genutzt. Die Inokulation mit Sporensuspensionen erforderte das Pasteurisieren (80 °C, 10 min) der Kultur vor der Inkubation, um eine Inaktivierung vegetativer Zellen zu gewährleisten.

Inokulationen, Beigaben der Medienzusätze und Probenahmen erfolgten unter Verwendung von Einwegspritzen und Einmalkanülen (Braun AG, Melsungen).

2.2.4. Kultivierung auf Festmedien

Die Anzucht von *C. acetobutylicum* auf Festmedien (2.2.1.) fand bei 37 °C in einer Anaerobenwerkbank (Meintrup DWS, Lähden-Holte) unter einer Atmosphäre aus 90 % Stickstoff und 10 % Wasserstoff statt. Zum Ausstreichen und Ausplattieren von Zellkolonien und Kulturen wurden Einwegimpfösen und Einwegspatel (Sarstedt AG & Co., Nürnberg) verwendet.

2.3. Stammhaltung

Um *C. acetobutylicum*-Stämme für den wiederholten Gebrauch zu konservieren, wurden verschiedene Verfahren eingesetzt. Eine kurzfristige Konservierung gelang durch Ausstreichen der Stämme auf RCA (2.2.1.) und Lagerung der Platten in der Anaerobenwerkbank (Meintrup DWS, Lähden-Holte). Längerfristige Stammhaltungen konnten durch die Erzeugung von Sporensuspensionen erreicht werden. Zu diesem Zweck wurden die Stämme in MS-MES (2.2.1.) inokuliert und bis zur Sporenbildung anaerob bei 37 °C inkubiert. Aliquots der Suspensionen wurden bei -70 °C gelagert.

Die Konservierung der in dieser Arbeit erstellten *C. acetobutylicum*-Mutantenpopulationen (3.4.1.2., 3.4.2.2.) erfolgte in Mikrotiterplatten. Dafür wurden exponentiell wachsende CGM-Mikrokulturen (900 µl) mit 100 µl Dimethylsulfoxid versetzt und bei -70 °C aufbewahrt. MS-MES-Mikrokulturen der entsprechenden Stämme wurden nach anaerober Inkubation (48 h, 37 °C) ebenfalls bei -70 °C konserviert.

2.4. Bestimmung physiologischer Parameter

Kultivierungsexperimente dienten der detaillierten Charakterisierung zu untersuchender Stämme. Die zur Analyse der verschiedenen wachstumsphysiologischen Parameter genutzten Vorgehensweisen sind in den folgenden Abschnitten aufgeführt.

2.4.1. Messung der Optischen Dichte und des pH-Werts

Um den Wachstumsverlauf von Flüssigkulturen verfolgen zu können, wurde die Optische Dichte (OD_{600}) der Zellkultur bei einer Wellenlänge von 600 nm gegen einen Leerwert (*A. dest.*) in einem Spektralphotometer (Ultrospec 3000 bzw. Spekol 1100, Tab. 2.3) bestimmt. Die Messung erfolgte in Plastikkuvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm. Ab einer Optischen Dichte von ca. 0,3 war zur Gewährleistung der Messgenauigkeit die Verdünnung der Zellsuspension erforderlich. Die Optische Dichte von Mikrokulturen wurde in 96-Well-Platten (Sarstedt AG & Co., Nürnberg) am Microplate-Reader (SpectraMax M2^e, Tab. 2.3) ermittelt.

Die Bestimmung des pH-Wertes entsprechender Kulturen erfolgte in Zellkulturaliquots unter Verwendung eines pH-Meters (pH 526, Tab. 2.3).

2.4.2. Bestimmung der Glucose-Konzentration (nach Bergmeyer, 1983)

Die Glucose-Konzentration in einer Kultur gab Auskunft über die Fähigkeit untersuchter Stämme zum Umsatz der Kohlenstoffquelle. Die Konzentration des Kohlenhydrats wurde unter Verwendung eines optisch-enzymatischen Hexokinase/Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Tests bestimmt. Die Hexokinase vermittelt dabei die ATP-abhängige Umsetzung von Glucose zu Glucose-6-Phosphat und ADP+P. Glucose-6-

Phosphat wird durch die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase unter NADP⁺-Verbrauch zu 6-Phosphogluconolacton und NADPH+H⁺ umgewandelt. Die Menge an entstehendem NADPH+H⁺ korreliert mit der Glucose-Konzentration der Probe. Das Absorptionsmaximum von NADPH+H⁺ liegt bei 340 nm, so dass die Extinktionsmessung bei dieser Wellenlänge erfolgte. Auf Grundlage der ermittelten Absorptionswerte ließ sich die Glucose-Konzentration berechnen.

Für den optisch-enzymatischen Test wurde zunächst ein Reaktionspuffer wie folgt hergestellt.

Reaktionspuffer:

Tris-HCl (0,2 M)		9,69	g
MgSO ₄ (0,002 M)		0,2	g
A. dest.	ad	400	ml

Anschließend wurde folgender Reaktionsansatz in eine Plastikzuvette überführt.

0,2 M Tris-HCl, 0,002 M MgSO ₄ (pH 7,6)	0,9	ml
NADP ⁺ (44 mg/ml)	10	µl
ATP (96 mg/ml)	10	µl
Probe (zellfreier Überstand)	10	µl

Der Reaktionsansatz wurde homogenisiert, um anschließend die Extinktion des Leerwertes (E1) bei 340 nm zu bestimmen (Ultrospec 3000). Anschließend wurden je Reaktionsansatz 10 µl Hexokinase/Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (3 mg/ml) hinzugegeben. Nach Mischen des Ansatzes und einer Inkubationszeit von 5 min bei Raumtemperatur erfolgte eine erneute Extinktionsmessung bei 340 nm (E2). Die Glucose-Konzentration wurde nach folgender Formel berechnet:

$$c = \frac{\Delta E \times V \times MW (\text{Gluc})}{\varepsilon \times d \times v}$$

ΔE = Differenz aus E2 und E1

V = Volumen des Ansatzes (940 µl)

v = Volumen der Probe (10 µl)

d = Schichtdicke der Zuvette (1 cm)

$\varepsilon = 0,63 \text{ l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1} = 6,3 \text{ l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

MW = 180,16 g/mol

2.4.3. Gaschromatographie

Zur Quantifizierung flüssiger Fermentationsprodukte wurden gaschromatographische Analysen unter Nutzung eines Agilent 7890A Gaschromatographen (Agilent Technologies, Böblingen) mit Flammenionisationsdetektor (FID) durchgeführt. Als Trägergas diente Stickstoff, welches über einen Feuchtigkeitsfilter und anschließend über einen Sauerstofffilter nachgereinigt wurde, um neben Wasser und Sauerstoff auch schweflige und chlorierte Substanzreste zurückzuhalten. Die eingesetzten FID-Brenngase, synthetische Luft und Wasserstoff wurden zur Entfernung organischer Substanzen über einen Aktivkohlefilter geführt.

2.4.3.1. Probenvorbereitung

Die zur Analyse vorgesehen Zellsuspensionen wurden in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt und bei 13000 Upm für 3 min zentrifugiert, um einen zellfreien Überstand zu erhalten. Jeweils 100 µl des Kulturüberstandes, 900 µl Wasser (UV-clear) und 100 µl interner Standard (55 mM Isobutanol in 2 M HCL und 1,5 M Acetoin) wurden in ein Rollrandgefäß (Fisher Scientific GmbH, Schwerte) überführt. Anschließend wurden die Gefäße mit Bördelkappen (Fisher Scientific GmbH, Schwerte) luftdicht verschlossen. Für die Analyse wurden 0,5 µl der Probe über einen automatisierten Probengeber in das System injiziert.

2.4.3.2. Quantifizierung

Mit Hilfe einer Eichlösung, die je 5 mM der zu quantifizierenden Produkte einschließlich des internen Standards enthielt, gelang die Erstellung eines Eichchromatogramms. Die Steuerung des Gaschromatographen und des Probengebers sowie die Auswertung der Signale erfolgte unter Anwendung des Programms EZChrom *Elite* (Agilent Technologies, Böblingen).

2.4.3.3. Analysebedingungen

Zur Detektion der Substanzen Acetat, Butyrat, Aceton, Butanol und Ethanol wurden folgende Analysebedingungen gewählt.

Chromatographiesäule:	2 m x 3 mm x 1,6 mm Chromosorb 101 (80/100 mesh)
Säulentemperatur:	155 - 195 °C
Trägergas:	N ₂ (23 ml/min total flow; 3 ml/min septum purge flow)
Injektor:	195 °C
Detektor:	FID, 230 °C
Probenvolumen:	0,5 µl

2.5. Visualisierung von Butanol

Das erste Ziel dieser Arbeit bestand in der Entwicklung einer Methode zur Visualisierung des von *C. acetobutylicum* produzierten Butanols. Dabei wurden unterschiedliche Verfahren evaluiert, deren methodische Vorgehensweisen nachfolgend dargestellt sind. Innerhalb der Anwendung der Nachweisverfahren dienten Aliquots alkoholischer Lösungen, von Zellkulturen oder von zellfreien Überständen als Proben. Zellfreie Überstände wurden durch entsprechende Zentrifugationsschritte (Biofuge Fresco bzw. SIGMA 2-16PK; Tab. 2.3) gewonnen.

2.5.1. Chemische Derivatisierung mittels Kaliumdichromat

Bei der chemischen Derivatisierung mit Kaliumdichromat wird der Nachweis von Alkoholen durch Reaktion mit der Reagenzlösung erreicht. Die Oxidation der Alkohole wird von einer Umsetzung des Kaliumdichromats zu Chrom(III)-sulfat und damit einhergehenden charakteristischen Farbumschlägen begleitet (3.2.1.1.). Das Versetzen der Proben mit 1 Vol. Reagenzlösung (s. u.) führte zur Visualisierung der enthaltenen Alkohole, die durch Absorptionsmessung bei 600 nm am Spektralphotometer (Ultrospec 3000, Tab. 2.3) quantifiziert werden konnten.

Reagenzlösung:

$K_2Cr_2O_7$ (0,4 N)	60 ml
H_2SO_4 (konz.)	5 ml

2.5.2. Chemische Derivatisierung mittels Kaliumpermanganat

Die Visualisierung von Alkoholen wird bei der chemischen Derivatisierung mit Kaliumpermanganat durch das in der Verbindung enthaltene Mangan bewirkt, das seine Farbe in Abhängigkeit der Oxidationsstufe ändert (3.2.1.2.). Die entsprechenden Proben wurden für den Alkoholnachweis mit 1 Vol. Reagenzlösung (s. u.) gemischt.

Reagenzlösung:

$KMnO_4$ (6 mM)	5 ml
$NaOH$ (1 M)	5 ml

2.5.3. Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)-Assay

In Anwendung des NBT-Assays gelingt die Detektion von Alkoholen über eine Alkoholdehydrogenase-gekoppelte Umsetzung von Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) zu Formazan (3.2.1.3.). Zur Visualisierung von Alkoholen in den jeweiligen Proben wurden diese mit 17 Vol. Assay-Lösung (s. u.) versetzt und inkubiert (10 min, RT),

bevor das Abstoppen der Reaktion mit 0,2 Vol. KH_2PO_4 (1 M, pH 6) folgte. Das bei der Reaktion entstehende Formazan fungierte als indirekter Nachweis der Alkohole und ließ sich durch Absorptionsmessung bei 580 nm am Spektralphotometer (Ultrospec 3000, Tab. 2.3) bzw. am Microplate-Reader (SpectraMax M2^e, Tab. 2.3) bestimmen.

Assay-Lösung:

NAD	25 µg/ml	} in Tris-HCl (100 mM, pH 8,6)
PMS	8 µg/ml	
NBT	172 µg/ml	
ADH (aus <i>S. cerevisiae</i>)	100 µg/ml	

Der Assay-Lösung wurden 0,1 % Gelatine zugesetzt, um das unlösliche Formazan in stabiler Suspension zu halten (Fibla & Gonzales-Duarte, 1993).

Die experimentellen Details der oben aufgeführten Visualisierungsmethoden sind ausführlich in den Abschnitten 3.2.1.1., 3.2.1.2. und 3.2.1.3. beschrieben.

2.6. Mutagenese von *C. acetobutylicum*

Im Zuge der vorliegenden Arbeit erfolgte die Generierung zweier Mutantenpopulationen von *C. acetobutylicum*. Zur Herstellung der Populationen wurde eine chemische Mutagenese unter Verwendung von N'-Methyl-N'-nitrosourea (MNU) gewählt. Als Ausgangsstämme wurden *C. acetobutylicum* ATCC 824 und *C. acetobutylicum* *adc::Int*(180) (Tab. 2.1) eingesetzt. Für die Mutagenese wurden exponentielle Kulturen der Stämme mit MNU in einer Konzentration von 500 µg/ml behandelt. Die detaillierten Vorgehensweisen zur Erstellung der jeweiligen Mutantenpopulationen sind in den Abschnitten 3.4.1.2. und 3.4.2.2. erläutert.

2.6.1. Bestimmung der Überlebensrate nach Exposition mit MNU

Im Vorfeld der Mutagenese war es notwendig, die Überlebensrate der Parentalstämme nach Exposition mit MNU zu ermitteln (3.4.1.1., 3.4.2.1.). Die Auswertung der Experimente gelang durch Bestimmung koloniebildender Einheiten (colony forming units, CFU) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollkultur. Die Ermittlung der CFU erfolgte nach:

$$\text{CFU/ml} = \text{CFU/Platte} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10$$

2.7. Bezugsquellen

Soweit nicht anders vermerkt, wurden die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien von den Firmen Carl Roth & Co. (Karlsruhe), Merck KGaA (Darmstadt), Applichem GmbH (Darmstadt) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München) bezogen. Gase wurden von der Westfalen AG (Münster) geliefert. Weitere Bezugsquellen sind in den Tabellen 2.2 und 2.3 aufgeführt.

Tab. 2.2: Bezugsquellen Chemikalien.

Hersteller	Produkte
APPLICHEM GmbH, Darmstadt	ATP, DMSO, NAD ⁺ , NBT, Erythromycin, Kaliumdichromat, Kaliumpermanganat, PMS
DIFCO Laboratories GmbH, Hamburg	Agar
MERCK KGaA, Darmstadt	Gelatine
OXOID GmbH, Wesel	Reinforced Clostridial Agar (RCA)
SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, München	Alkoholdehydrogenasen, MNU

Tab. 2.3: Bezugsquellen Geräte und Materialien.

Hersteller	Produkte
AGILENT Technologies GmbH, Böblingen	Gaschromatograph Agilent 7890A
AMERSHAM Buchler GmbH & Co. KG, Braunschweig	Ultrospec 3000
ANALYTIK JENA AG, Jena	Spekol 1100
EPPENDORF AG, Hamburg	Spitzen, Pipetten, Reaktionsgefäße
BRAUN AG, Melsungen	Einwegkanülen, Einmalspritzen
FISHER Scientific GmbH, Schwerte	Bördelkappen, Rollrandgefäße, Vortex
HERAEUS Instruments, Osterode	Biofuge Fresco
MEINTRUP DWS GmbH, Löhden-Holte	Anaerobenwerkbank MG1000
METTLER TOLEDO GmbH, Gießen	Analysewaage XA205 Dual Range
MOLECULAR Devices, Ismaning	Microplate-Reader SpectraMax M2 [®]

Tab. 2.3 (Fortsetzung): Bezugsquellen Geräte und Materialien.

Hersteller	Produkte
MÜLLER & KREMPEL AG, Bülach	Serumflaschen
OCHS GmbH, Bovenden	Hungate-Röhrchen
SARSTEDT AG & Co., Nürnbrecht	Mikrotiterplatten, 96-Well-Blöcke, Küvetten, Abdeckmatten, Petrischalen, Einwegspatel, Einmalimpfösen, Sterilfilter, Reagenzreservoirs
SCHÜTT Labortechnik GmbH, Göttingen	Wasserbad
SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Osterode	SIGMA 2-16PK, SIGMA 3K30
WTW GmbH, Weilheim	pH-Meter pH 526

3. Experimente und Ergebnisse

3.1. Kultivierung von *C. acetobutylicum* in Mikrotiterplatten

Der erste Schritt dieser Arbeit bestand in der Entwicklung eines Hochdurchsatz-Screenings zur Visualisierung von Butanol. Dabei stellte die Kultivierung von *C. acetobutylicum* im hohen Durchsatz die grundlegende Voraussetzung für die erfolgreiche Entwicklung und spätere Anwendung des Screening-Verfahrens dar, d. h. die Möglichkeit zur Untersuchung einer möglichst hohen Anzahl an entsprechenden *C. acetobutylicum*-Stämmen musste gewährleistet sein. Um dies zu realisieren, wurden nachfolgend dargestellte Experimente bezüglich der Anzucht und den Wachstumsbedingungen von *C. acetobutylicum* in Mikrotiterplatten durchgeführt.

Zunächst erfolgte die Kultivierung des Wildtyps von *C. acetobutylicum* in Mikrokulturen in unterschiedlichen Medien. Aliquots einer Flüssigkultur des Stamms wurden auf RCA (2.2.1.) ausplattiert und anaerob für 72 h bei 37 °C inkubiert. Je 200 µl CGM, CGM-MES und MS-MES (2.2.1.) wurden in mehreren Replikaten mit Einzelkolonien inokuliert. An die anaerobe Inkubation der Mikrotiterplatten für 48 h bei 37 °C schloss sich die Bestimmung der Optischen Dichte (OD_{600}) der Kulturen mittels Microplate-Reader (2.4.1.) an.

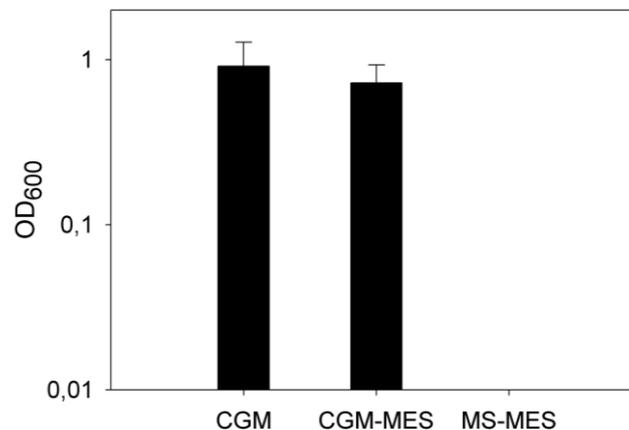


Abb. 3.1: Kultivierung von *C. acetobutylicum* Wildtyp in Mikrotiterplatten. Dargestellt sind die Werte der Optischen Dichte nach 48 h Wachstum in den unterschiedlichen Medien. Es sind Mittelwerte und entsprechende Standardabweichungen aus jeweils 32 Replikaten angegeben.

Wie aus Abbildung 3.1 ersichtlich wird, konnte der Wildtyp nach Inokulation mit Einzelkolonien erfolgreich in Mikrotiterplatten sowohl in CGM- als auch in CGM-MES-Medium kultiviert werden. Bei einem Vergleich der beiden Medien zeigte sich, dass die Optische Dichte in CGM höhere Werte erreichte, hier jedoch auch größere

Schwankungen als in CGM-MES auftraten. Eine Inokulation von MS-MES mit Einzelkolonien war nicht möglich, in den Kulturen konnte auch nach Verlängerung der Inkubationszeit kein Wachstum beobachtet werden.

In einem weiteren Versuch sollte die Möglichkeit zur Kultivierung von *C. acetobutylicum* in Mikrotiterplatten in einem größeren Maßstab überprüft werden. Für dieses Experiment wurden jeweils 96 Replikate des Wildtyps und der *C. acetobutylicum*-Stämme DG1 (Nair, 1995; Stim-Herndon *et al.*, 1996), *hbd::int(69)* (Lehmann & Lütke-Eversloh, 2011) und *adc::int(180)* (Lehmann *et al.*, 2012a) als Einzelkolonien von RCA-Festmedien (2.2.1.) in je 200 µl CGM (2.2.1.) inokuliert. Es folgten eine anaerobe Inkubation der Kulturen für 24 h bei 37 °C und Probenahmen zur Bestimmung der Optischen Dichte (2.4.1.). Abbildung 3.2 zeigt das Wachstum der einzelnen Stämme in den Mikrokulturen.

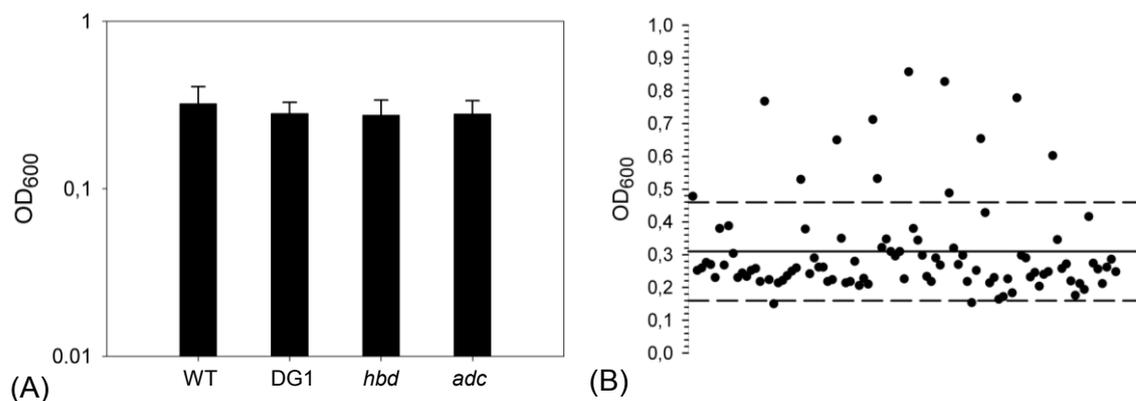


Abb. 3.2: Kultivierung verschiedener *C. acetobutylicum*-Stämme in Mikrotiterplatten. Dargestellt sind unter (A) die Werte der Optischen Dichte für die einzelnen Stämme (Mittelwerte aus je 96 Replikaten) und unter (B) die Streuung der Einzelwerte exemplarisch für *C. acetobutylicum* Wildtyp, die x-Achse repräsentiert dabei den OD₆₀₀-Mittelwert der 96 Kulturen, die gestrichelten Linien geben die Standardabweichung an. WT, *C. acetobutylicum* ATCC 824; DG1, *C. acetobutylicum* DG1; *hbd*, *C. acetobutylicum hbd::Int(69)*; *adc*, *C. acetobutylicum adc::Int(180)*.

Grundsätzlich war eine Kultivierung der hier verwendeten Stämme in Mikrotiterplatten auch im größeren Maßstab möglich. In allen mit Einzelkolonien inokulierten Mikrokulturen war deutlich Wachstum zu verzeichnen (Abb. 3.2 (A)). Die erreichten Werte der Optischen Dichte der einzelnen Stämme unterschieden sich mit wenigen Ausnahmen nur gering voneinander. In den Kulturen des Wildtyps wurde die höchste OD₆₀₀ von 0,32 gemessen. Die Werte der anderen Kulturen lagen zwischen 0,27 und 0,28. Wie in Abbildung 3.2 (B) exemplarisch für *C. acetobutylicum* Wildtyp gezeigt, schwankten einzelne Messwerte mitunter stark um den Mittelwert, 15 % der

OD₆₀₀-Werte lagen außerhalb der Standardabweichung. Diese Schwankungen traten bei allen Stämmen in ähnlichem Ausmaß auf.

3.2. Entwicklung des Hochdurchsatz-Screenings

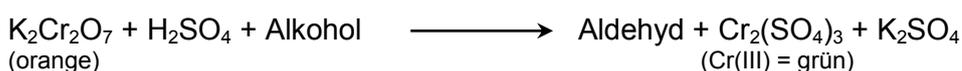
Nachdem die Möglichkeit der Kultivierung von *C. acetobutylicum* im Mikrotiterplatten-Format experimentell validiert wurde (3.1.), sollte im nächsten Schritt der Screening-Entwicklung ein geeignetes Verfahren zur Visualisierung der clostridiellen Butanol-ausscheidung im Hochdurchsatz gefunden werden. Dafür wurden unterschiedliche Assay-Methoden im Hinblick auf eine mögliche Anwendung als Butanol-Screening überprüft (3.2.1.).

3.2.1. Visualisierung von Butanol

Da Butanol farblos und somit nicht direkt sichtbar ist, erforderte dies ein entsprechendes indirektes Nachweisverfahren, bei dem die Möglichkeit zur schnellen, einfachen und quantitativen Butanolbestimmung gegeben sein musste. Bei der Evaluation der in diesem Abschnitt der Arbeit untersuchten Nachweismethoden sollten die Toxizität und Stabilität der eingesetzten Komponenten, die Substratspezifität und Sensitivität, die praktische Durchführbarkeit sowie die Anwendbarkeit in Kulturen von *C. acetobutylicum* geprüft werden. Als Ausgangsbasis dienten chemische Derivatisierungsreaktionen, wie die Oxidation von Alkoholen durch Kaliumdichromat bzw. Kaliumpermanganat und eine Alkoholdehydrogenase-gekoppelte Umsetzung von Nitroblautetrazoliumchlorid zu Formazan.

3.2.1.1. Chemische Derivatisierung mittels Kaliumdichromat

Zunächst wurde die chemische Derivatisierung von Alkoholen durch Kaliumdichromat (2.5.1.) in Bezug auf die Anwendbarkeit als Nachweisverfahren zur Visualisierung von Butanol untersucht. Ein Nachweis von Alkoholen wie Butanol und Ethanol wird bei dieser Methode durch die Reaktion mit der Reagenzlösung, bestehend aus Kaliumdichromat und konzentrierter Schwefelsäure, erreicht. Die entsprechenden Alkohole werden dabei oxidiert, während gleichzeitig eine Umsetzung des Kaliumdichromats zu Chrom(III)-sulfat erfolgt. Dies ruft einen Farbumschlag von orange zu grün hervor und erlaubt somit eine einfache und schnelle visuelle Detektion von Alkoholen ohne weitere technische Geräte. Die dem Kaliumdichromat-Assay zugrunde liegende chemische Reaktion ist nachfolgend aufgeführt.



Zur Bestimmung der Sensitivität des Kaliumdichromat-Assays wurden Verdünnungsreihen von Ethanol und Butanol im Konzentrationsbereich von 0 – 100 mM hergestellt und mit der Reagenzlösung (2.5.1.) versetzt. Für das bei der Reaktion entstehende Chrom(III)-sulfat konnte in vorangegangenen Vorversuchen (Ergebnisse nicht gezeigt) ein Absorptionsmaximum bei 600 nm ermittelt werden, so dass die Möglichkeit zur photometrischen Messung der Butanol- und Ethanolkonzentration bestand. Wie Abbildung 3.3 erkennen lässt, war es unter Verwendung des Kaliumdichromat-Assays möglich, sowohl Butanol als auch Ethanol zu visualisieren. Das Versetzen der alkoholischen Lösung mit der Reagenzlösung führte zu einem konzentrationsabhängigen Farbumschlag.

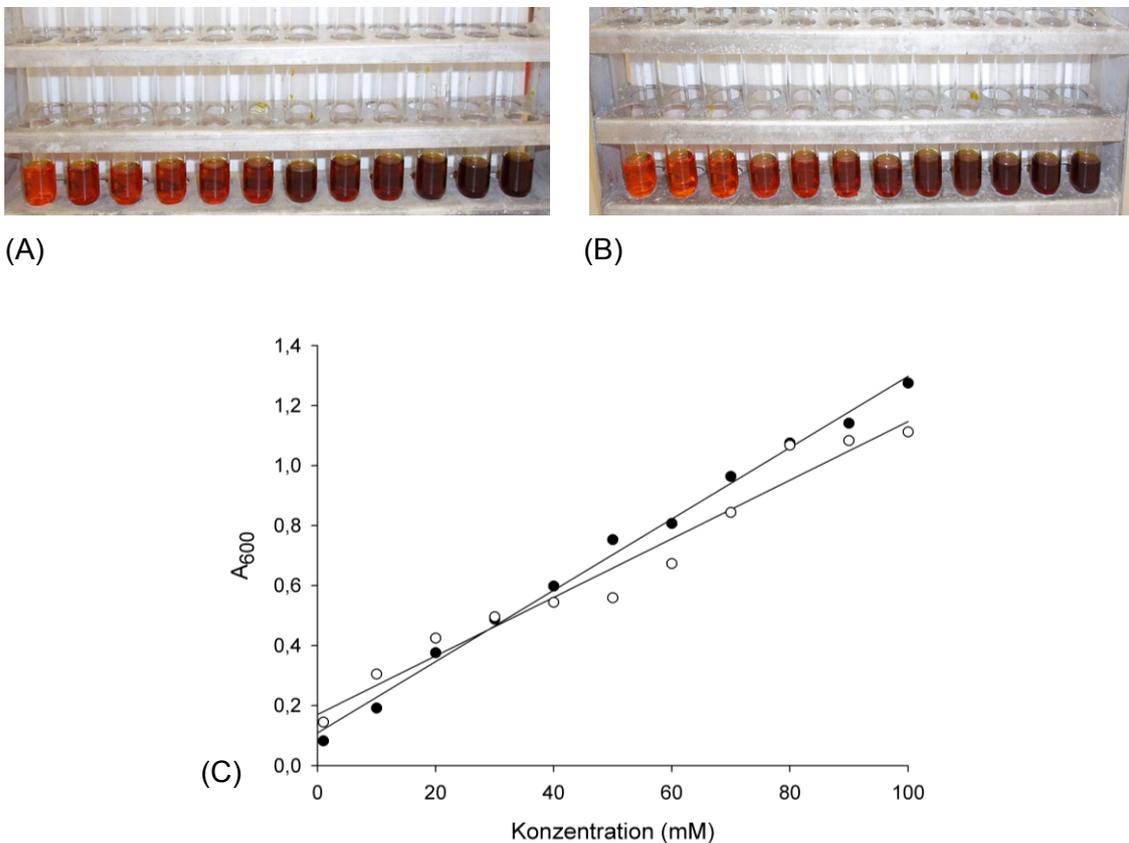


Abb. 3.3: Sensitivität des Kaliumdichromat-Assays. (A): Ethanol-Verdünnungsreihe (0 - 100 mM), (B): Butanol-Verdünnungsreihe (0 - 100 mM), (C) Konzentration und Absorption von Butanol (●) und Ethanol (○) bei 600 nm.

Nachdem in ersten Versuchen bestätigt werden konnte, dass mittels Kaliumdichromat-Assay die Visualisierung von Alkoholen prinzipiell möglich war, sollte die Eignung dieser Derivatisierungsmethode als Nachweisverfahren für die von *C. acetobutylicum* produzierten Alkohole überprüft werden. Dafür erfolgte die Anzucht von *C. acetobutylicum* Wildtyp und *C. acetobutylicum* DG1 (Nair, 1995; Stim-Herndon *et al.*, 1996) in je 10 ml CGM-Medium (2.2.1.). An die anaerobe Inkubation der Kulturen

bei 37 °C schlossen sich nach 24 h Probenahmen an. Aliquots der Proben wurden zur Gewinnung zellfreier Überstände einem Zentrifugationsschritt (13000 Upm, 2 min) unterzogen, bevor Kulturen bzw. Kulturüberstände der jeweiligen Stämme mit der Reaktionslösung (2.5.1.) gemischt wurden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.4 dargestellt.

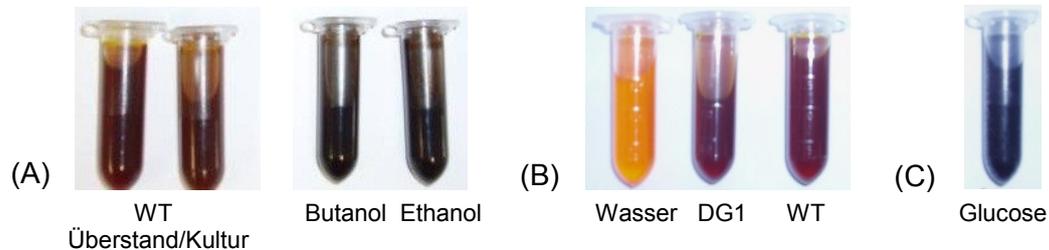
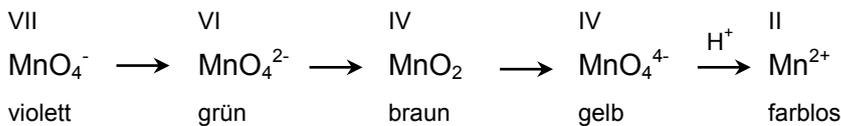


Abb. 3.4: Kaliumdichromat-Assay mit Kulturen von *C. acetobutylicum*. Farbreaktionen des Kaliumdichromat-Assays mit (A) Kulturen (rechts) und zellfreien Überständen (links) von *C. acetobutylicum* Wildtyp im Vergleich zu unverdünntem Butanol und Ethanol, (B) Wasser im Vergleich zu Kulturüberständen von *C. acetobutylicum* Wildtyp und *C. acetobutylicum* DG1 und (C) einer Glucose-Lösung.

Nach Zugabe der Reagenzlösung war in den Kulturen und zellfreien Überständen des Wildtyps ein Farbumschlag zu verzeichnen, der Nachweis von Alkoholen in *C. acetobutylicum*-Kulturen verlief positiv (Abb. 3.4 (A)). Es zeigte sich jedoch, dass in zellfreien Überständen sowohl von *C. acetobutylicum* DG1 als auch von *C. acetobutylicum* Wildtyp eine Farbreaktion auftrat (Abb. 3.4. (B)), obwohl der DG1-Stamm nicht zur Bildung von Lösungsmitteln fähig ist (Nair, 1995; Stim-Herndon *et al.*, 1996; Cornillot *et al.*, 1997). Eine Differenzierung beider Stämme hinsichtlich der Alkoholproduktion war folglich nicht möglich. Das Versetzen einer 50 %igen (w/v) Glucose-Lösung mit der Nachweisreagenz zeigte, dass die im Medium enthaltene Glucose Kreuzreaktionen mit der Assay-Lösung einging und falsch-positive Ergebnisse verursachte (Abb. 3.4 (C)). Um derartige unspezifische Reaktionen zu umgehen, wurden in einem weiteren Versuch Optimierungsansätze des Kaliumdichromat-Assays analysiert. Durch Applikation von mit der Nachweisreagenz getränktem Filterpapier sollte eine Trennung von Reaktionslösung und Zellkultur und somit eine spezifische Detektion flüchtiger Alkohole erreicht werden. Da das Filterpapier unmittelbar nach dem Kontakt mit der Reagenzlösung auch ohne den Einfluss flüchtiger Alkohole einen Farbumschlag zeigte, ließ sich dieser Ansatz der Assay-Anwendung ebenfalls nicht zur Bestimmung des Alkoholgehalts in Kulturen von *C. acetobutylicum* nutzen. Aus diesem Grund wurde der Kaliumdichromat-Assay innerhalb der Entwicklung des Butanol-Screenings nicht weiter genutzt.

3.2.1.2. Chemische Derivatisierung mittels Kaliumpermanganat

Eine weitere Ausgangsbasis zur Visualisierung von Butanol bzw. Ethanol und zur Entwicklung des Hochdurchsatz-Screenings lieferte die chemische Derivatisierung mit Kaliumpermanganat (2.5.2.). Wie im folgenden Reaktionsschema dargestellt, wird die Detektion der Alkohole hierbei durch das in der Verbindung enthaltene Mangan bewirkt, welches seine Farbe in Abhängigkeit der Oxidationsstufe von violett zu grün, über braun zu gelb und farblos ändert.



Für einen Nachweis der Butanol- und Ethanolbildung von *C. acetobutylicum* erfolgte zunächst die Inokulation entsprechender Kulturen in jeweils 10 ml CGM, CGM-MES und MS-MES (2.2.1.). Diese wurden anaerob bei 37 °C inkubiert, bis ein deutliches Zellwachstum zu verzeichnen war. Es folgte das Mischen der Kulturen bzw. der durch Zentrifugation (13000 Upm, 2 min) gewonnenen zellfreien Überstände mit der Reaktionslösung (2.5.2.). Als Kontrollen dienten Wasser und unterschiedlich konzentrierte Alkohollösungen (Abb. 3.5 (A), (B)). Zur Beurteilung der Differenzierungsmöglichkeiten des Assays im Hinblick auf die Alkoholproduktion verschiedener *C. acetobutylicum*-Stämme schloss sich eine vergleichende Analyse zellfreier Überstände von *C. acetobutylicum* Wildtyp und *C. acetobutylicum* DG1 an (Abb. 3.5 (C)).

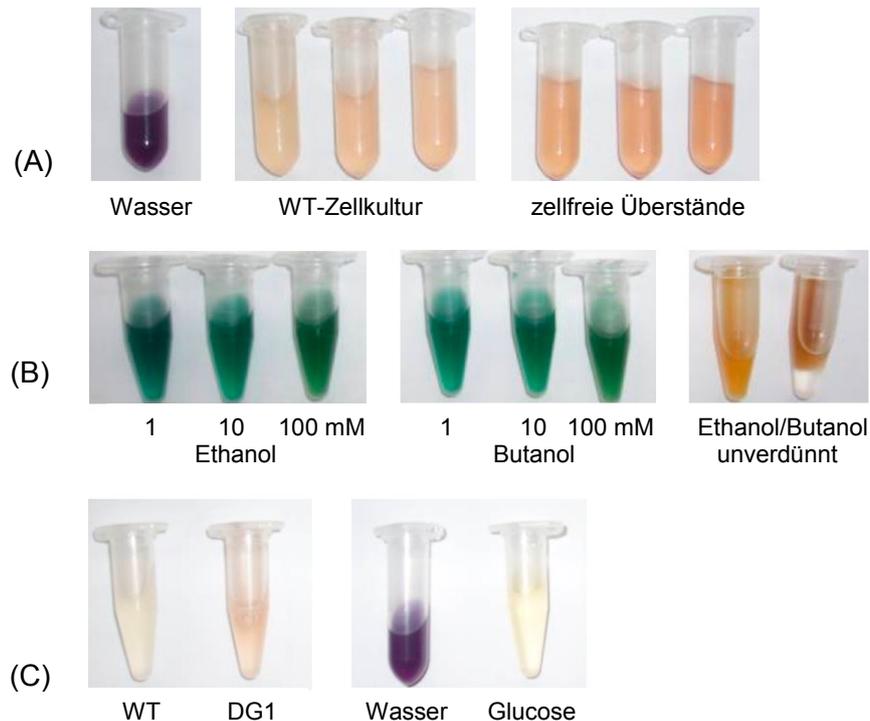


Abb. 3.5: Kaliumpermanganat-Assay mit Kulturen von *C. acetobutylicum*. Gezeigt sind Farbreaktionen des Kaliumpermanganat-Assays mit (A) Kulturen und zellfreien Überständen des Wildtyps von *C. acetobutylicum* im Vergleich zu Wasser, (B) unterschiedlich konzentrierten Lösungen von Ethanol bzw. Butanol und (C) *C. acetobutylicum* Wildtyp- und *C. acetobutylicum* DG1-Kulturüberständen im Vergleich zu Wasser und Glucose.

Mit dem Kaliumpermanganat-Assay konnten Alkohole in Zellkulturen und zellfreien Überständen von *C. acetobutylicum* nachgewiesen werden, es trat der für diese Methode charakteristische Farbumschlag ein (Abb. 3.5 (A)). Der Vergleich mit unterschiedlich konzentrierten alkoholischen Lösungen (Abb. 3.5. (B)) deutete auf konzentrationsabhängige Reaktionen der Assay-Lösung mit den Alkoholen hin. Die Wahl des Mediums bei der Inokulation des Wildtyps hatte keinen Einfluss auf die Ergebnisse, da medienunabhängige Färbungsintensitäten zu beobachten waren. Obwohl hinsichtlich des Alkoholnachweises in *C. acetobutylicum*-Kulturen positive Ergebnisse erzielt werden konnten, war die Differenzierung von *C. acetobutylicum* Wildtyp und *C. acetobutylicum* DG1 bezüglich der Alkoholproduktion durch die hier angewandte Nachweismethode nicht realisierbar, da sowohl Kulturüberstände des Lösungsmittel-negativen DG1-Stamms (Nair, 1995; Stim-Herndon *et al.*, 1996; Cornillot *et al.*, 1997) als auch des Wildtyps Farbumschläge der Reagenzlösung hervorriefen (Abb. 3.5 (C)). Die im Medium enthaltene Glucose führte auch hier zu Kreuzreaktionen mit der Assay-Lösung und falsch-positiven Ergebnissen, analog zu denen des Kaliumdichromat-Assays (s. o.). Zur Vermeidung dieser Kreuzreaktionen sollten in nachfolgenden Experimenten Ansätze zur Trennung von

Zellkultur und Reagenzlösung untersucht werden, um so die Detektion flüchtiger Alkohole in den Kulturen zu ermöglichen. Zu diesem Zweck wurden in einem Vorversuch Petrischalen mit Wasser und Ethanol- bzw. Butanol-Lösungen (1, 10, 100 mM und unverdünnt) befüllt. Anschließend wurde Filterpapier, das zuvor in Kaliumpermanganatlösung getränkt wurde, über den alkoholischen Lösungen bzw. der Kontrolle appliziert. Der Versuchsaufbau sowie die Ergebnisse zu diesem Vorversuch sind in der folgenden Abbildung (Abb. 3.6) dokumentiert.

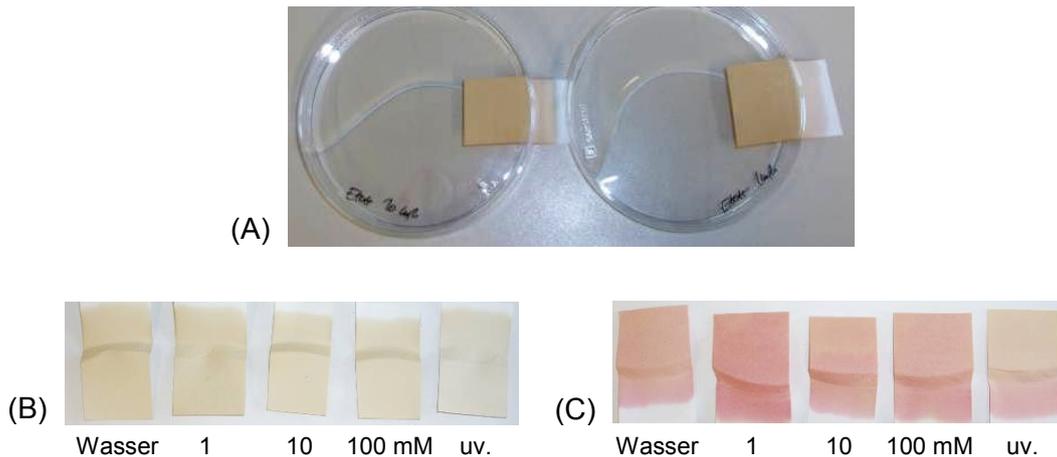


Abb. 3.6: Vorversuch zur Optimierung des Kaliumpermanganat-Assays zur Detektion flüchtiger Alkohole. (A) Versuchsaufbau: Applikation des in der Reagenzlösung getränkten Filterpapiers über den alkoholischen Lösungen. (B) zeigt die Ergebnisse des Vorversuchs mit Ethanol-Lösungen, (C) stellt die Resultate des Vorversuchs mit Butanol-Lösungen dar (uv., unverdünnt).

Nach Applikation des Filterpapiers über den alkoholischen Lösungen zeigte sich auf dem Trägermaterial ein Farbumschlag von violett zu hellbraun, d. h. der Nachweis flüchtiger Alkohole verlief ohne direkten Kontakt mit der Lösung mit Erfolg. Diese Detektion der flüchtigen Alkohole war jedoch nur mit Einschränkungen als positiv zu bewerten, da konzentrationsabhängige Unterschiede in der Intensität der Farbreaktion kaum erkennbar waren und auch das über der Negativkontrolle applizierte Filterpapier eine leichte Farbreaktion zeigte.

Eine Eignung des Kaliumpermanganat-Assays für die Detektion flüchtiger Alkohole in Zellkulturen von *C. acetobutylicum* wurde wie nachfolgend beschrieben getestet. Nach Inokulation von *C. acetobutylicum* Wildtyp in 10 ml CGM (2.2.1.) und anaerober Inkubation (37 °C, ü. N.) folgte die Anzucht des Stamms zu mehreren Replikaten in Mikrotiterplatten. Dafür wurden jeweils 10 µl aus der Vorkultur pro Mikrokultur (200 µl CGM) verwendet. Direkt im Anschluss an die Inokulation wurde die Mikrotiterplatte mit einer Folie überklebt. Die Folie wurde mit Hilfe von Kanülen über den Wells

eingestochen, bevor in Kaliumpermanganat-Lösung getränktes Filterpapier aufgelegt wurde. Anschließend erfolgte die anaerobe Inkubation der auf diese Weise präparierten Mikrotiterplatten für 48 h bei 37 °C.

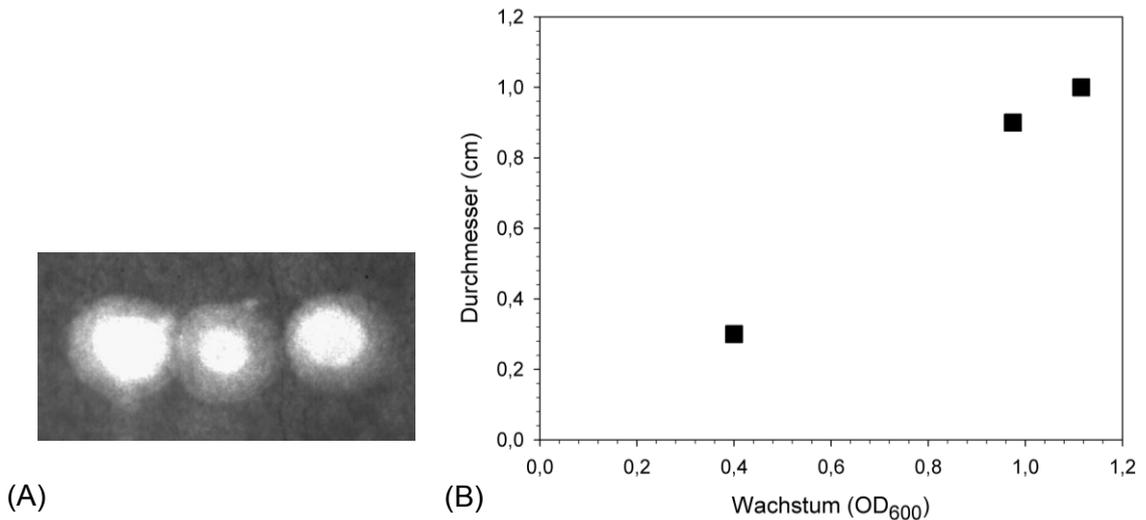


Abb. 3.7: Kaliumpermanganat-Assay zur Detektion flüchtiger Alkohole in Mikrokulturen von *C. acetobutylicum*. (A): Farbreaktionen des in Reagenzlösung getränkten Filterpapiers durch die Einwirkung flüchtiger Alkohole. (B): Abhängigkeit des Durchmessers der Farbreaktion von der Optischen Dichte in den Zellkulturen.

Auf dem mit der Reaktionslösung behandelten Filterpapier stellte sich bereits kurz nach dem Kontakt mit der Nachweisreagenz und unabhängig vom Einfluss flüchtiger Alkohole ein Farbumschlag von violett zu hellbraun ein. Nach der anaeroben Inkubation der Mikrotiterplatten zeigte das Filterpapier über den mit Zellkulturen gefüllten Wells eine Farbreaktion von hellbraun zu weiß, welche durch die in Kulturen gebildeten flüchtigen Alkohole ausgelöst wurde (Abb. 3.7 (A)). Es ließ sich bei einigen Proben eine Abhängigkeit des Durchmessers der Farbreaktion von der in der Zellkultur erreichten Optischen Dichte, d. h. eine wachstumsabhängige Zunahme des Durchmessers beobachten (Abb. 3.7 (B)). Obwohl mittels der hier verwendeten Optimierung des Kaliumpermanganat-Assays die Detektion flüchtiger Alkohole in Kulturen von *C. acetobutylicum* ohne Nebenreaktionen und falsch-positive Signale gelang, war die Möglichkeit zur Anwendung des Assays als Hochdurchsatz-Screeningverfahren nicht gegeben, da nur eine geringe Reproduzierbarkeit bezüglich der erzielten Resultate vorlag. Der Durchmesser der Farbreaktion korrelierte lediglich bei drei von 12 Kulturen mit der Optischen Dichte.

3.2.1.3. Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)-Assay

Der NBT-Assay (2.5.3.) stellte die dritte Grundlage für die Entwicklung eines Hochdurchsatz-Screenings zur Visualisierung der Butanolproduktion von *C. acetobutylicum* dar. Bei dieser nicht-toxischen Derivatisierungsmethode werden Butanol und Ethanol in einer Alkoholdehydrogenase- (ADH-) abhängigen Reaktion in Gegenwart von Phenazinmethosulfat (PMS), das als Elektronenüberträger dient, Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) und Nikotinamidadenindinukleotid (NAD^+) enzymatisch umgesetzt. In der ADH-gekoppelten Reaktion werden die Alkohole zum entsprechenden Aldehyd oxidiert, während NBT durch das dabei gebildete NADH reduziert wird. Die Reduktion von NBT führt zur Entstehung von unlöslichem Formazan, welches als blau-violetter Niederschlag ausfällt und sich durch Absorptionsmessung bei 580 nm bestimmen lässt (Abb. 3.8). Die Formazanbildung dient dabei als indirekter Nachweis der Alkohole (Clark *et al.*, 1989; Fibla & Gonzales-Duarte, 1993; Mayer & Arnold, 2002).

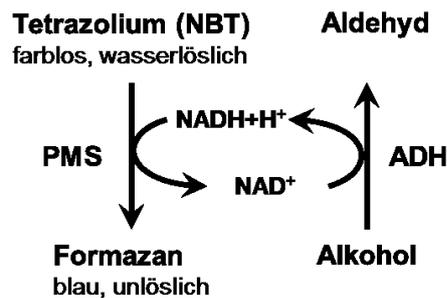


Abb. 3.8: Reaktionsschema des NBT-Assays. Das farblose und wasserlösliche Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) wird unter Zusatz von Phenazinmethosulfat (PMS), NAD^+ und dem Substrat (Alkohol) durch die Alkoholdehydrogenase (ADH) zu unlöslichem Formazan umgesetzt. Das Formazan fällt als blau-violetter Niederschlag aus und lässt sich durch Absorptionsmessung bei 580 nm nachweisen.

Im Folgenden sind Versuchsabläufe und Ergebnisse der Experimente dargestellt, die der Evaluation des NBT-Assays hinsichtlich der Eignung als Hochdurchsatz- und Butanol-Screeningverfahren dienen sollten.

Die Substratspezifität des NBT-Assays wurde mit aufsteigend konzentrierten Lösungen (0 - 100 mM) von Butanol, Ethanol, Isopropanol und Glycerin bestimmt. Jeweils 10 μl der entsprechenden Substratlösung wurden mit 170 μl Assay-Mix (2.5.3.) versetzt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, ehe die Reaktion mit je 36 μl KH_2PO_4 (1 M, pH 6) abgestoppt wurde. Es folgte die photometrische Bestimmung der Formazanbildung bei 580 nm (Abb. 3.9 (B)).

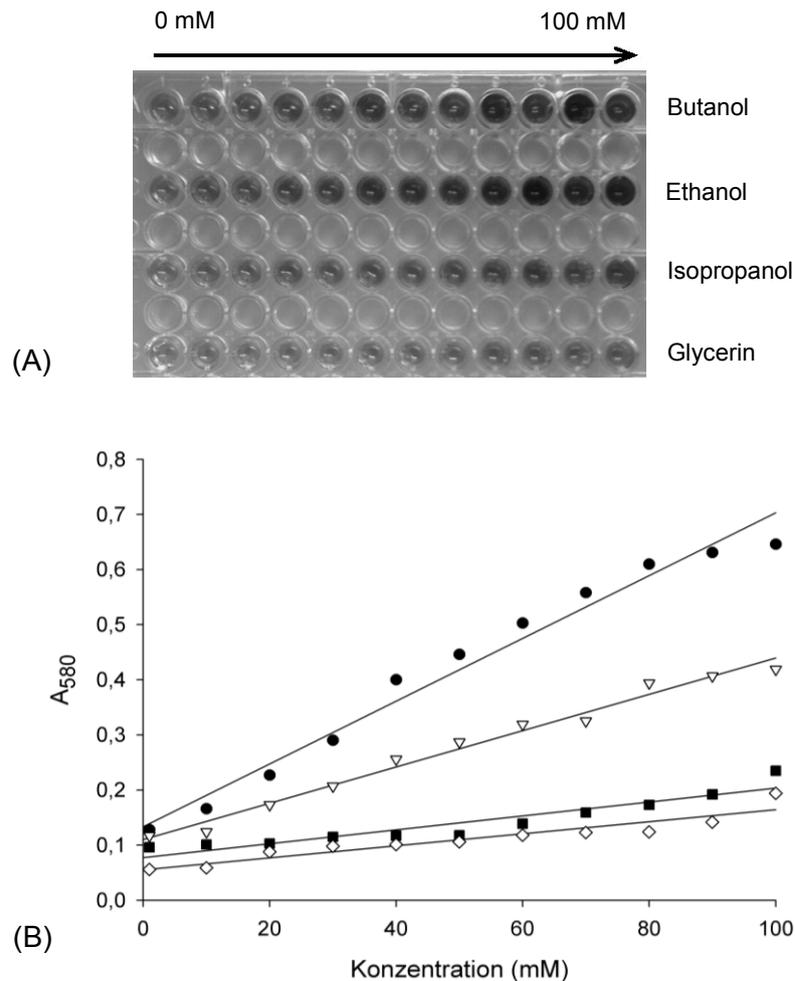


Abb. 3.9: Substratspezifität des NBT-Assays. (A): Formazanbildung mit Butanol, Ethanol, Isopropanol und Glycerin in Mikrotiterplatten. (B): Korrelation der Konzentration und Absorption der Alkohole bei 580 nm. ∇ : Butanol, \bullet : Ethanol, \blacksquare : Isopropanol, \diamond : Glycerin.

Wie Abbildung 3.9 zeigt, kam es bei allen Alkohol-Lösungen in Abhängigkeit der jeweiligen Substratkonzentration zur Bildung von Formazan. Eine lineare Beziehung von Formazanbildung und Alkoholkonzentration konnte dabei dokumentiert werden. Ethanol und Butanol riefen, erkennbar an der höchsten Intensität des Farbumschlags, die stärkste Reaktion hervor. Für die nachfolgenden Untersuchungen war wichtig, dass Ethanol einen intensiveren Farbumschlag als Butanol bei gleicher Konzentration hervorrief.

Nachdem die Eignung des NBT-Assays zum Nachweis von Butanol und Ethanol bestätigt werden konnte, sollte in einem weiteren Versuch überprüft werden, ob die spezifische Detektion der Alkohole in Zellkulturen von *C. acetobutylicum* ohne Nebenreaktionen mit der im Medium vorhandenen Glucose erfolgen kann. Um gleichzeitig erste Hinweise in Bezug auf das für das Hochdurchsatz-Screening am

besten geeignete Anzuchtmedium zu erhalten, wurden für das im Folgenden beschriebene Experiment verschiedene Medien genutzt. *C. acetobutylicum* Wildtyp wurde in mehreren Mikrokulturen in je 200 µl CGM, CGM-MES bzw. MS-MES (2.2.1.) kultiviert. Als Inokulum dienten für jede Mikrokultur 10 µl aus einer zuvor hergestellten Übernachtskultur (10 ml CGM) des Stamms. Nach der Inokulation und anaerober Inkubation der Mikrokulturen für 24 h bei 37 °C wurden Kulturaliquots mit der Assay-Lösung (2.5.3.) versetzt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Zusatz von KH_2PO_4 (2.5.3.) führte zum Abstoppen der Reaktion. Die Dokumentation der Formazanbildung ergab sich durch Absorptionsmessung bei 580 nm.

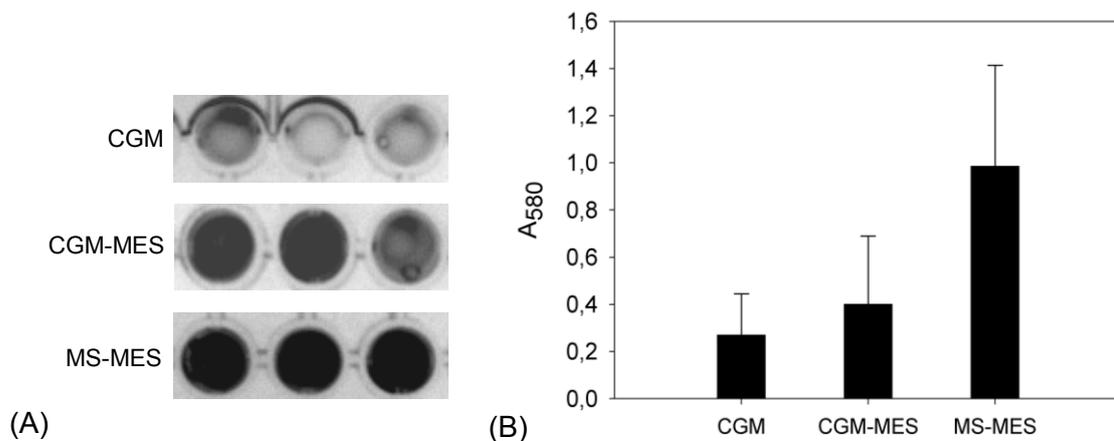


Abb. 3.10: NBT-Assay in Mikrotiterplatten unter Verwendung von *C. acetobutylicum*-Kulturen. (A): NBT-Assay mit Kulturen des Wildtyps nach Anzucht in verschiedenen Medien. (B): Quantitative Formazanbildung in den zur Anzucht verwendeten Medien. Gezeigt sind Mittelwerte aus je 12 Replikaten und entsprechende Standardabweichungen.

Das Versetzen der Kulturaliquots mit der Assay-Lösung hatte die Entstehung von Formazan zur Folge, welches als blauer Niederschlag sichtbar war (Abb. 3.10 (A)). Die von *C. acetobutylicum* produzierten Alkohole konnten folglich mit Hilfe des NBT-Assays visualisiert und photometrisch bestimmt werden. Innerhalb eines Vergleichs der zur Kultivierung verwendeten Medien ließen sich die höchsten Absorptionswerte für das MS-MES-Medium dokumentieren, die Formazanbildung war hier am intensivsten (Abb. 3.10 (B)).

Das oben angeführte Experiment lieferte erste Erkenntnisse zur Anwendung des NBT-Assays als Methode zur semi-quantitativen Alkohol-Messung in *C. acetobutylicum*-Kulturen, insbesondere im Hinblick auf die Wahl des Mediums zur Anzucht der zu überprüfenden Stämme. Es ließ sich eine Abhängigkeit der Formazanbildung von der Kultivierung erkennen. Um diese Abhängigkeit eingehender zu untersuchen, wurde der

Wildtyp erneut in Mikrotiterplatten in CGM und MS-MES (2.2.1.) kultiviert, die Inokulation des CGM-Mediums (je 200 μ l) erfolgte mit Einzelkolonien. Dafür musste im Vorfeld eine Flüssigkultur des Stamms auf RCA-Festmedium ausplattiert und für 48 h anaerob bei 37 °C inkubiert werden. Da die Anzucht von Einzelkolonien in MS-MES in vorangegangenen Versuchen nicht möglich war (3.1.), erfolgte die Inokulation der MS-MES-Kulturen (200 μ l) mit jeweils 10 μ l einer Flüssigkultur von *C. acetobutylicum* Wildtyp. Die Mikrokulturen wurden anaerob bei 37 °C inkubiert und nach 12, 24, 36, 48, 60 und 72 h beprobt. Es folgte die Bestimmung der Optischen Dichte mittels Microplate-Reader (2.4.1.), bevor der NBT-Assay (2.5.3.) durchgeführt wurde. Die anschließende Absorptionsmessung bei 580 nm diente der Dokumentation der Formazanbildung. Um einen etwaigen Einfluss der Optischen Dichte der Zellsuspensionen auf die Absorptionsmessung nicht unbeachtet zu lassen, wurde für die Auswertung dieses Experiments statt der absoluten Absorptionswerte das Verhältnis aus A_{580} zu OD_{600} herangezogen (Abb. 3.11.).

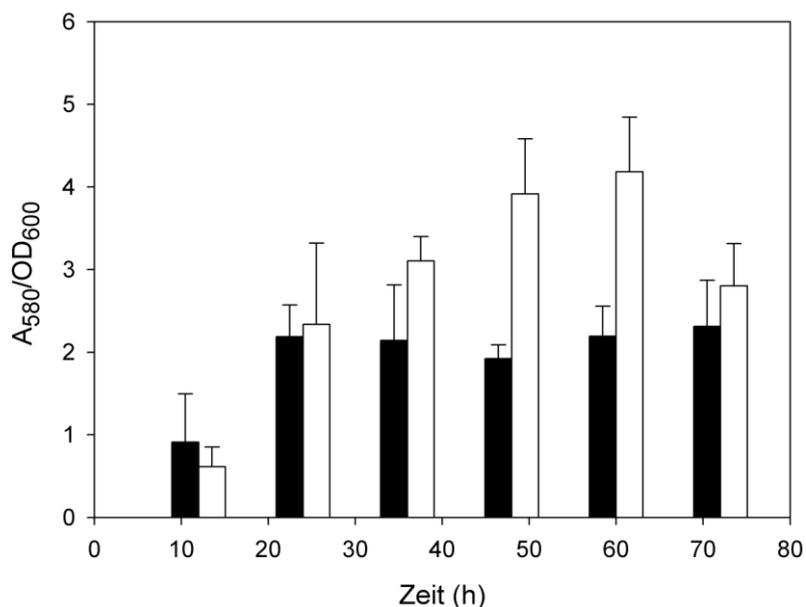


Abb. 3.11: Zeitverlauf der Formazanbildung. *C. acetobutylicum* Wildtyp wurde in CGM (schwarze Balken) bzw. MS-MES (weiße Balken) angezogen und zu festgelegten Zeitpunkten beprobt. Durch Bestimmung der OD_{600} in den Proben und anschließendem NBT-Assay mit Messung der A_{580} konnte das Verhältnis aus Optischer Dichte (Wachstum) und Absorption (Formazanbildung) errechnet werden. Dargestellt sind A_{580}/OD_{600} -Verhältnisse aus den Mittelwerten von je 12 Proben zu den entsprechenden Zeitpunkten der Kultivierungsdauer.

Das Verhältnis aus Absorption und Optischer Dichte, d. h. die Formazanbildung nahm sowohl in CGM als auch in MS-MES bis 24 h nach der Inokulation zu. Während sich die A_{580}/OD_{600} -Ratio in CGM im Zeitraum von 24 bis 72 h nur geringfügig änderte, stieg

das Verhältnis in MS-MES bis 60 h nach der Inokulation an. Insgesamt erreichte die Formazanbildung in MS-MES im Vergleich zum CGM-Medium höhere Werte.

Zur Bestimmung der Sensitivität des NBT-Assays wurde *C. acetobutylicum* Wildtyp in 200 ml MS-MES kultiviert und zwecks Aufnahme einer Wachstumskurve über 35 h zu festgelegten Zeitpunkten beprobt. Zellfreie Überstände wurden bezüglich der Alkoholproduktion im Wachstumsverlauf von *C. acetobutylicum* mittels NBT-Assay und gaschromatographischer Quantifizierung analysiert.

Um die gebildeten Butanol- und Ethanolmengen durch den NBT-Assay zu bestimmen, war zunächst die Erstellung einer Eichgeraden nötig. Zu diesem Zweck wurden Butanol und Ethanol entsprechend der bei der Alkoholproduktion von *C. acetobutylicum* nachgewiesenen Butanol/Ethanol-Ratio (Jones & Woods, 1986; Lee *et al.*, 2008) im Verhältnis 6:1 [v/v] gemischt und dem NBT-Assay (2.5.3.) unterzogen, bevor eine photometrische Absorptionsmessung bei 580 nm erfolgte. Im Anschluss konnte die eigentliche Bestimmung des Alkoholgehalts in den zellfreien Überständen durchgeführt werden. Dafür wurden die Proben analog der bei der Erstellung der Eichgeraden angewandten Vorgehensweise mittels NBT-Assay analysiert. Die Berechnung der Gesamtalkoholkonzentrationen in den Kulturüberständen gelang anschließend unter Zuhilfenahme der Eichgeraden. Die Ergebnisse der Assay-vermittelten Quantifizierung der Alkoholproduktion im Wachstumsverlauf von *C. acetobutylicum* sind im Vergleich zu den gaschromatographisch bestimmten Werten in Abbildung 3.12 dargestellt.

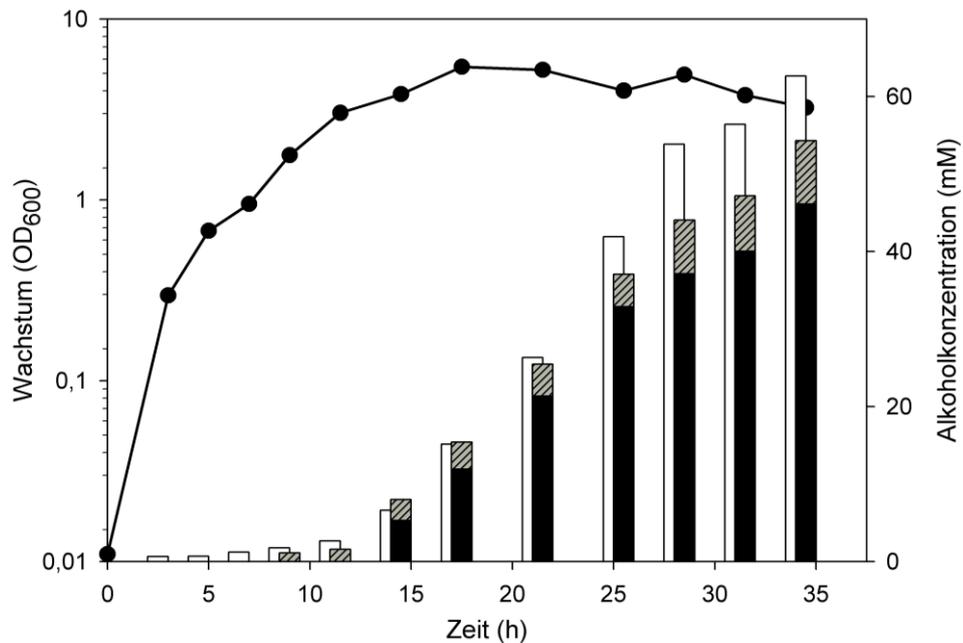


Abb. 3.12: Vergleich der mittels NBT-Assay und gaschromatographisch bestimmten Alkoholmengen in zellfreien *C. acetobutylicum*-Kulturüberständen. Gezeigt sind die Ergebnisse des NBT-Assays (weiße Balken) und die mittels GC gemessenen Butanol- (schwarze Balken) bzw. Ethanolkonzentrationen (schraffierte Balken) im zeitlichen Verlauf des Wachstums von *C. acetobutylicum* Wildtyp (Punkte/Linie). Das Wachstumsexperiment wurde nach 35 h beendet.

Die in Abbildung 3.12 dargestellten Resultate belegten eine wachstumsspezifische Alkoholproduktion von *C. acetobutylicum*, die sowohl unter Einsatz des NBT-Assays als auch durch GC-Analysen nachgewiesen werden konnte. Es zeigte sich eine sehr gute Korrelation der über den NBT-Assay ermittelten Gesamtmengen an Butanol und Ethanol mit den gaschromatographisch bestimmten Werten und somit eine hohe Sensitivität des NBT-Assays.

Die Eignung des NBT-Assays als Visualisierungsmethode für die von *C. acetobutylicum* produzierten Alkohole konnte im Vorfeld in mehreren Versuchen bestätigt werden. Im Hinblick auf eine Anwendung der Methode zur Identifizierung und Selektion von *C. acetobutylicum*-Stämmen mit erhöhter Butanolproduktion wurde im Folgenden evaluiert, ob die Differenzierung verschiedener Stämme bezüglich ihrer Alkoholproduktion möglich ist. Innerhalb eines ersten Differenzierungsexperiments sollte die Lösungsmittelproduktion von *C. acetobutylicum* Wildtyp im Vergleich zu *C. acetobutylicum* DG1 unter Verwendung des NBT-Assays analysiert werden. Als Basis für diese Analyse dienten MS-MES-Mikrokulturen (200 µl) der Stämme, die mit jeweils 10 µl einer CGM-Flüssigkultur inokuliert und anschließend für 24 h bei 37 °C anaerob inkubiert wurden. Die anschließende Durchführung des NBT-Assays erfolgte wie oben beschrieben. Der Wildtyp zeigte dabei eine deutliche Formazanbildung,

erkennbar an einer starken Blaufärbung. Im Gegensatz dazu stellte sich beim DG1-Stamm, welcher nicht zur Bildung von Lösungsmitteln fähig ist (Nair, 1995; Stim-Herndon *et al.*, 1996; Cornillot *et al.*, 1997), keine Farbreaktion und demnach keine Formazanbildung ein (Abb. 3.13). Eine Differenzierung verschiedener *C. acetobutylicum*-Stämme hinsichtlich ihrer Alkoholproduktion war somit möglich.

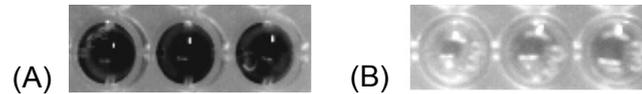


Abb. 3.13: Differenzierung verschiedener *C. acetobutylicum*-Stämme mittels NBT-Assay. *C. acetobutylicum* Wildtyp (A) und *C. acetobutylicum* DG1 (B) wurden in Mikrotiterplatten kultiviert. Zellkulturproben wurden anschließend mittels NBT-Assay analysiert. Dargestellt sind die Resultate nach Zugabe der Assay-Lösung und 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur.

Nach aussichtsreicher Anwendung des NBT-Assays in Flüssigkulturen von *C. acetobutylicum* und Verifikation der Spezifität und reproduzierbaren Genauigkeit wurde eine mögliche Applikation der Methode für Festmedien überprüft. Es sollte analysiert werden, ob eine Färbung von *C. acetobutylicum*-Kolonien prinzipiell erfolgen kann, die Differenzierung verschiedener *C. acetobutylicum*-Stämme auf diese Weise realisierbar ist und welches Festmedium sich für das Screening von Agarplatten am besten eignet.

In einem ersten experimentellen Schritt wurde der Wildtyp in 10 ml CGM (2.2.1.) inokuliert, über Nacht inkubiert (anaerob, 37 °C), auf unterschiedlichen Festmedien (CGM, CGM-MES, CGM-CaCO₃, MS-MES, MS-CaCO₃, RCA, RCA-MES und RCA-CaCO₃; 2.2.1.) ausplattiert und bis zur Koloniebildung in der Anaerobenwerkbank inkubiert. Nach Überschichten der bewachsenen Agarplatten mit jeweils 1 ml NBT-Assay-Mix (2.5.3.) und darauffolgendem Dekantieren der Lösung schloss sich die fotografische Dokumentation der Ergebnisse an (Abb. 3.14).

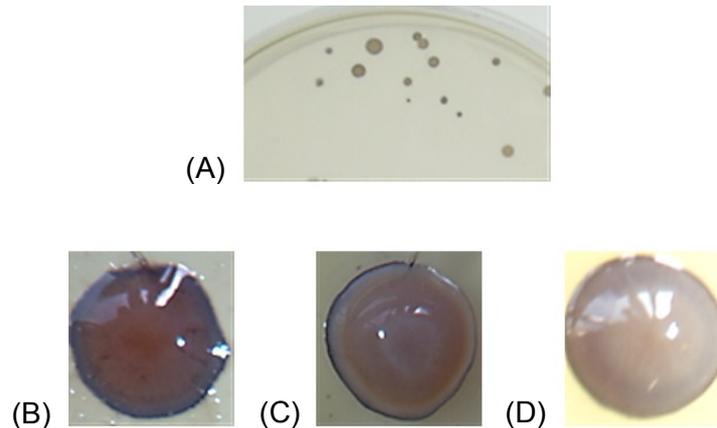


Abb. 3.14: Anwendung des NBT-Assays auf Festmedien. Kolonien von *C. acetobutylicum* wurden auf unterschiedlichen Medien angezogen und mit Assay-Lösung überschichtet, die anschließend wieder dekantiert wurde. (A): Ausschnitt einer RCA-MES-Agarplatte mit angefärbten Kolonien; gefärbte Einzelkolonien von *C. acetobutylicum* Wildtyp auf (B) RCA-MES, (C) RCA, (D) CGM-CaCO₃.

Es konnte eine blau-violette Färbung der Kolonien, folglich eine Formazanbildung dokumentiert werden. Diese fiel je nach verwendetem Medium unterschiedlich intensiv aus. Die erste Anwendung des NBT-Assays auf Festmedien verlief somit prinzipiell erfolgreich. Zudem zeigte sich, dass eine erneute Anzucht der gefärbten Kolonien möglich war, d. h. der Assay bzw. die eingesetzten Komponenten nicht toxisch für die Zellen waren.

Zur Auswahl des geeigneten Screening-Mediums für die Anwendung des NBT-Assays auf Agarplatten erfolgte die Anzucht von *C. acetobutylicum* Wildtyp und *C. acetobutylicum* DG1 (Nair, 1995; Stim-Herndon *et al.*, 1996) auf verschiedenen Festmedien (Tab. 3.1). Dafür wurde wie im zuvor aufgeführten Versuch vorgegangen. Die genutzten Medien sollten im Hinblick auf das Wachstum und die Koloniegröße der zu kultivierenden Stämme sowie hinsichtlich der Intensität der Formazanbildung evaluiert werden.

Tab. 3.1: Vergleich verwendeter Festmedien für den NBT-Assay. Zeitangaben beziehen sich auf die Inkubationszeiten, die bis zur deutlich sichtbaren Bildung von Kolonien nötig waren. Die Quantifizierung der Formazanbildung erfolgte visuell anhand der Farbintensität der Kolonien: -, keine Färbung; +, leichte, periphere Violettfärbung; ++, deutliche Violettfärbung; +++, starke Violettfärbung. Wildtyp, *C. acetobutylicum* ATCC 824; DG1, *C. acetobutylicum* DG1.

Medium	Stamm	Wachstum	Formazanbildung
CGM	Wildtyp	ca. 24 h	+++
CGM	DG1	ca. 48 h	++
CGM-MES	Wildtyp	ca. 48 h	+++
CGM-MES	DG1	ca. 48 h	+
CGM-CaCO ₃	Wildtyp	ca. 72 h	++

Tab. 3.1 (Fortsetzung): Vergleich verwendeter Festmedien für den NBT-Assay.

Medium	Stamm	Wachstum	Formazanbildung
CGM-CaCO ₃	DG1	ca. 96 h	+
RCA	Wildtyp	ca. 48 h	++
RCA	DG1	ca. 48 h	+
RCA-MES	Wildtyp	ca. 48 h	++
RCA-MES	DG1	ca. 48 h	+
RCA-CaCO ₃	Wildtyp	-	-
RCA-CaCO ₃	DG1	-	-
MS-CaCO ₃	Wildtyp	ca. 72 h	++
MS-CaCO ₃	DG1	-	-

Die Kultivierung beider Stämme verlief auf nahezu allen verwendeten Medien mit Erfolg. Eine Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit von der Art des Mediums war erkennbar. Beste Ergebnisse bezüglich des Wachstums und der Formazanbildung lieferte das MES-gepufferte CGM-Medium. Im Hinblick auf eine Differenzierung von *C. acetobutylicum*-Stämmen zeigte sich CGM-CaCO₃ als vorteilhaft, da das Erfassen von Unterschieden in der Formazanbildung aufgrund der hellen Färbung des Agars erleichtert war. Im Zuge der Auswertung dieses Experiments fiel auf, dass auch Kolonien des DG1-Stamms, der keine Lösungsmittel produziert (Nair, 1995; Stim-Herndon *et al.*, 1996; Cornillot *et al.*, 1997), Reaktionen mit der Assay-Lösung eingingen (Tab. 3.1). Die Färbung war im Vergleich zu der von *C. acetobutylicum* Wildtyp zwar geringer, konnte jedoch deutlich wahrgenommen werden und lieferte einen ersten Hinweis darauf, dass der NBT-Assay auf Festmedien weniger spezifisch als in Flüssigkulturen sein könnte.

Um zu überprüfen, ob eine Differenzierung von *C. acetobutylicum*-Stämmen bezüglich der Alkoholproduktion auf Festmedien realisierbar ist, erfolgte die Durchführung des nachstehend erläuterten Tests. *C. acetobutylicum* Wildtyp und *C. acetobutylicum* DG1 wurden zunächst in 10 ml CGM (2.2.1.) angezogen. Im Anschluss erfolgte das Ausplattieren der Stämme auf den im vorangegangenen Versuch herausgestellten Medien (CGM-MES und CGM-CaCO₃; 2.2.1.). Die Inkubation der Agarplatten in der Anaerobenwerkbank richtete sich nach dem zu kultivierenden Stamm bzw. dem verwendeten Medium und betrug gegebenenfalls bis zu 96 h. Sobald auf dem Agar eine deutliche Koloniebildung zu verzeichnen war, wurden die Platten mit jeweils 1 ml Assay-Lösung (2.5.3.) überschichtet, die anschließend dekantiert wurde. Da das NBT in vorangegangenen Versuchen als die für den Assay essentielle Komponente identifiziert werden konnte (Ergebnisse nicht gezeigt), wurden bei diesem Experiment Assay-Lösungen mit variierenden NBT-Konzentrationen (172, 100 und 50 µg/ml) genutzt. Auf diesem Weg sollten Spezifität und Differenzierungsmöglichkeiten des Assays gesteigert werden. Abbildung 3.15 dokumentiert die Resultate des Differenzierungsexperiments.

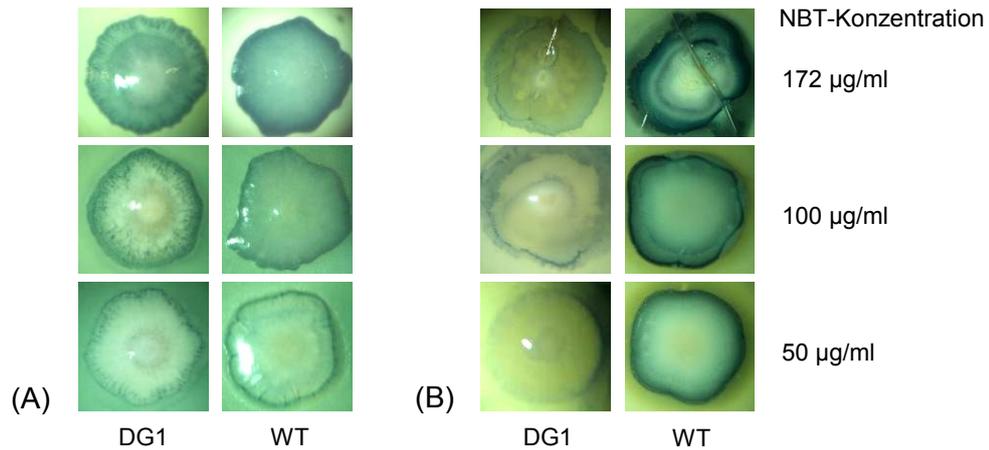


Abb. 3.15: NBT-Assay zur Differenzierung von *C. acetobutylicum*-Stämmen auf Festmedien. Gezeigt sind Ergebnisse des Assays nach Überschichten der Kolonien von *C. acetobutylicum* DG1 und *C. acetobutylicum* Wildtyp auf (A) CGM-MES und (B) CGM-CaCO₃ mit verschiedenen NBT-Konzentration im Assay-Mix, welche rechts angegeben sind.

Sowohl *C. acetobutylicum* Wildtyp als auch der Lösungsmittel-negative DG1-Stamm (Nair, 1995; Stim-Herndon *et al.*, 1996; Cornillot *et al.*, 1997) zeigten eine Reaktion mit der Assay-Lösung auf Agarplatten (Abb. 3.15). Es konnten zwar Unterschiede in der Farbintensität wahrgenommen werden, eine eindeutige und reproduzierbare Differenzierung der Stämme, wie sie in Flüssigkulturen mittels NBT-Assay gelang, war indes nicht realisierbar. Auch die Variation der NBT-Konzentration im Assay-Mix konnte nicht zu einer erfolgreichen Differenzierung beider Stämme und deren Alkoholproduktion beitragen, so dass der hier verwendete Ansatz für ein mögliches Screenings nicht weiter verfolgt wurde.

3.3. Etablierung und Optimierung des NBT-Assays

Im Zuge der Entwicklung des Screenings zur Visualisierung der Butanolproduktion von *C. acetobutylicum* konnte der NBT-Assay als geeignete Methode herausgestellt werden (3.2.). Im Gegensatz zu den Derivatisierungsreaktionen mit Kaliumdichromat (3.2.1.1.) und Kaliumpermanganat (3.2.1.2.) zeichnete sich der NBT-Assay als Alkoholnachweis durch ein hohes Maß an Spezifität und Sensitivität aus. Die Visualisierung von Butanol und Ethanol in Zellkulturen von *C. acetobutylicum* war ohne Nebenreaktionen möglich und auch erste Versuche zur Differenzierung verschiedener *C. acetobutylicum*-Stämme hinsichtlich ihrer Alkoholproduktion verliefen mit Erfolg. Zur Etablierung des NBT-Assays als Hochdurchsatz-Screening waren weitere Experimente nötig, die im Folgenden aufgeführt sind.

3.3.1. NBT-Assay zur Stammdifferenzierung

Zur Evaluation von Spezifität und Reproduzierbarkeit des NBT-Assays als Screening-Methode erfolgte eine Simulation mit definierten *C. acetobutylicum*-Mutanten. Dafür wurden neben dem Wildtyp mehrere Insertionsmutanten mit veränderten Produktspektren eingesetzt (Tab. 3.2).

Tab. 3.2: Phänotypen verwendeter Stämme. Die Tabelle zeigt die phänotypischen Merkmale der in der Screening-Simulation genutzten Stämme. Der Phänotyp bezieht sich auf die Alkoholproduktion der Mutanten in pH-unkontrollierten Batch-Fermentationen in MS-MES-Medium im Vergleich zum Wildtyp.

Insertionsmutante	Relevanter Phänotyp	Referenz
<i>hbd::Int(69)</i>	kein Butanol, hohe Mengen Ethanol	Lehmann & Lütke-Eversloh, 2011
<i>adc::Int(180)</i>	ca. 50 % Butanol	Lehmann <i>et al.</i> , 2012a
<i>ctfA::Int(352)</i>	ca. 50 % Butanol	Lehmann <i>et al.</i> , 2012a
<i>adhE1::Int(158)</i>	kein Butanol, < 10 % Ethanol	Lehmann, 2012, Dissertation
<i>ldh1::Int(93)</i>	kein signifikanter Phänotyp	Lehmann, 2012, Dissertation
<i>pta::Int(80)</i>	kein signifikanter Phänotyp	Lehmann <i>et al.</i> , 2012a
<i>ptb::Int(87)</i>	wenig Butanol, wenig Ethanol	Lehmann <i>et al.</i> , 2012b

Für die Screening-Simulation wurden der Wildtyp und die in Tabelle 3.2 aufgeführten *C. acetobutylicum*-Mutanten in Flüssigkulturen (2.2.3.) angezogen, anschließend auf RCA bzw. RCA_{Erythromycin} (2.2.1.) in den Verdünnungsstufen 10^{-2} bis 10^{-6} ausplattiert und in der Anaerobenwerkbank bei 37 °C für mindestens 48 h inkubiert. Es folgte die Inokulation von je 1 ml CGM in Mikrotiterplatten (96-well, 2,2 ml Gesamtvolumen) mit Einzelkolonien der entsprechenden Stämme. Nach Inkubation der Mikrotiterplatten für 24 h (37 °C, anaerob) wurden jeweils 10 µl der Kulturen zur Durchführung des NBT-Assays (2.5.3.) entnommen. An die Zugabe der Assay-Lösung und entsprechender Inkubation schloss sich die photometrische Bestimmung der Absorption bei 580 nm zur Dokumentation der Formazanbildung an. Zusätzlich erfolgten exemplarische Probenahmen, um Butanol und Ethanol gaschromatographisch (2.4.3.) zu quantifizieren (Abb. 3.16 (A)). Abgesehen von der eigentlichen Evaluierung der Differenzierungsmöglichkeiten im Hochdurchsatz sollte ferner der Einfluss des verwendeten Mediums auf die Ergebnisse des Assays untersucht werden. Dafür wurden die CGM-Mikrokulturen in je 1 ml MS-MES-Medium (2.2.1.) repliziert (20 µl Inokulum). Analog zur Behandlung der CGM-Kulturen erfolgten im Anschluss an die anaerobe Inkubation der 96-Well-Platten (48 h, 37 °C) Probenahmen für die Durchführung des NBT-Assays (2.5.3.) mit Absorptionsmessung bei 580 nm und die exemplarische Alkoholquantifizierung mittels GC-Analysen (2.4.3.) (Abb. 3.16 (B)).

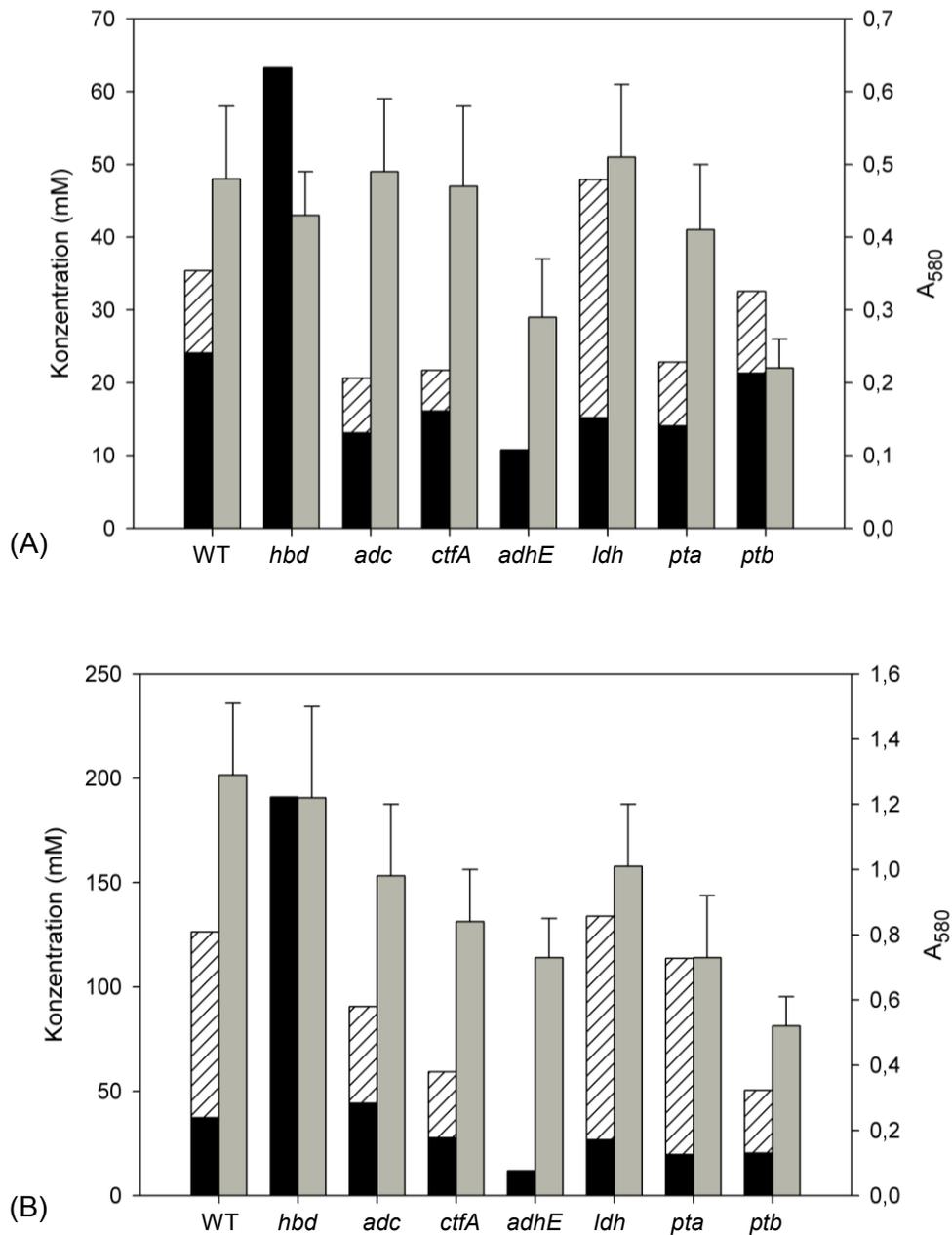


Abb. 3.16: Ergebnisse zur Differenzierung verschiedener *C. acetobutylicum*-Stämme in Mikrotiterplatten mittels NBT-Assay. Dargestellt sind die von den einzelnen Stämmen gebildeten Konzentrationen an Ethanol (schwarze Balken) und Butanol (schraffierte Balken). Die Quantifizierung der Alkohole erfolgte mittels GC-Analysen (Mittelwerte aus sechs Proben pro Stamm). Im Vergleich dazu wurden die erreichten Werte bezüglich der Formazanbildung (A_{580}) aufgetragen (graue Balken, Mittelwerte aus je 36 Replikaten). Gezeigt sind unter (A) die Resultate des Differenzierungsexperiments in CGM-Medium und unter (B) die Ergebnisse in MES-MES-Medium. WT, *C. acetobutylicum* ATCC 824; *hbd*, *C. acetobutylicum hbd::Int(69)*; *adc*, *C. acetobutylicum adc::Int(180)*; *ctfA*, *C. acetobutylicum ctfA::Int(352)*; *adhE1*, *C. acetobutylicum adhE1::Int(158)*; *ldh1*, *C. acetobutylicum ldh1::Int(93)*; *pta*, *C. acetobutylicum pta::Int(80)*; *ptb*, *C. acetobutylicum ptb::Int(87)*.

Die in Abbildung 3.16 dargestellten Alkoholspektren der untersuchten *C. acetobutylicum*-Insertionsmutanten korrelierten mit den Resultaten wachstumsphysiologischer Analysen im 200 ml-Maßstab (Tab. 3.2). Ein Vergleich der zur Kultivierung verwendeten Medientypen ließ eine deutlich gesteigerte Formazanbildung (A_{580}), also eine erhöhte Alkoholproduktion der Stämme in MS-MES erkennen. Die mitunter großen Differenzen der Stämme hinsichtlich ihrer Alkoholproduktion spiegeln sich nur bedingt in der Formazanbildung wider. So konnten beispielsweise zwischen den A_{580} -Werten des Wildtyps und *C. acetobutylicum hbd::Int(69)* bei diesem Experiment lediglich geringfügige Unterschiede dokumentiert werden. Demnach war die Differenzierung von *C. acetobutylicum*-Stämmen mittels NBT-Assay nur eingeschränkt möglich. Schnellere und stärkere Farbreaktionen ließen sich in entsprechenden Proben während der Durchführung des Assays visuell wahrnehmen, wurden im Ergebnis des Screenings allerdings nicht aufgezeigt. Ursächlich dafür waren mit großer Wahrscheinlichkeit die außerhalb des linearen Messbereichs des Microplate-Readers liegenden hohen Extinktionswerte und die hohen Alkohol-Gesamtkonzentrationen, die v. a. in MS-MES zu einer Sättigung des Assays führten. Um die genannten Probleme zu umgehen und die Differenzierung verschiedener *C. acetobutylicum*-Stämme im Hochdurchsatz zu ermöglichen, wurden nachfolgend Versuche zur Optimierung des Assays durchgeführt (3.3.2).

3.3.2. Optimierung des NBT-Assays

Obwohl die Detektion der von *C. acetobutylicum* produzierten Alkohole im größeren Maßstab spezifisch funktionierte und sehr gut mit GC-Analysen korrelierte (3.2.1.3.), war eine Anwendung des NBT-Assays zur Differenzierung unterschiedlicher *C. acetobutylicum*-Stämme im Hochdurchsatz nur eingeschränkt möglich (3.3.1.). Zur Erhöhung der Sensitivität und der Differenzierungsmöglichkeiten des Assays im 96-Well-Format sollte die Optimierung der Methode erfolgen. Die Vermeidung von Sättigungseffekten und die Steigerung der Reproduzierbarkeit galten dabei als vorrangige Ziele. Diese sollten durch Variation des Standardprotokolls (2.5.3.) in Bezug auf verschiedene Assay-Komponenten und -Bedingungen erreicht werden (Tab. 3.3). Um die Effekte der Variationen auf den Assay und dessen Resultate beurteilen zu können, erfolgte zunächst die Herstellung von definierten Butanol-Ethanol-Gemischen (6:1, [v/v]) mit Gesamtalkoholkonzentrationen bis zu 700 mM. Es schloss sich die Durchführung des NBT-Assays (2.5.3.) mit entsprechend variierenden Parametern an. Dabei wurden pro Alkoholkonzentration und Variation jeweils vier Replikate analysiert.

Tab. 3.3: Variationen zur Optimierung des NBT-Assays. Die Tabelle zeigt die Parameter des Assays, die im Hinblick auf eine Optimierung des Screening-Verfahrens verändert wurden. In der Spalte „Standard“ sind die ursprünglichen Parameter aufgeführt, während „Variation“ die vorgenommenen Änderungen darstellt. RT, Raumtemperatur; ADH, Alkoholdehydrogenase. Die optimalen Parameter sind fett gedruckt.

Parameter	Standard	Variation
ADH-Konzentration	100 µg/ml	50 µg/ml 10 µg/ml
PMS-Konzentration	8 µg/ml	4 µg/ml 2 µg/ml
NBT-Konzentration	172 µg/ml	100 µg/ml 50 µg/ml
Inkubation	10 min (RT)	8 min (RT) 5 min (RT) 10 min auf Eis
ADH	ADH <i>S. cerevisiae</i>	ADH <i>S. cerevisiae</i> mit NAD ⁺ und Puffersalzen ADH aus Pferdeleber

Die folgende Abbildung (Abb. 3.17) zeigt exemplarische Resultate, die im Zuge der Optimierung des NBT-Assays erzielt wurden.

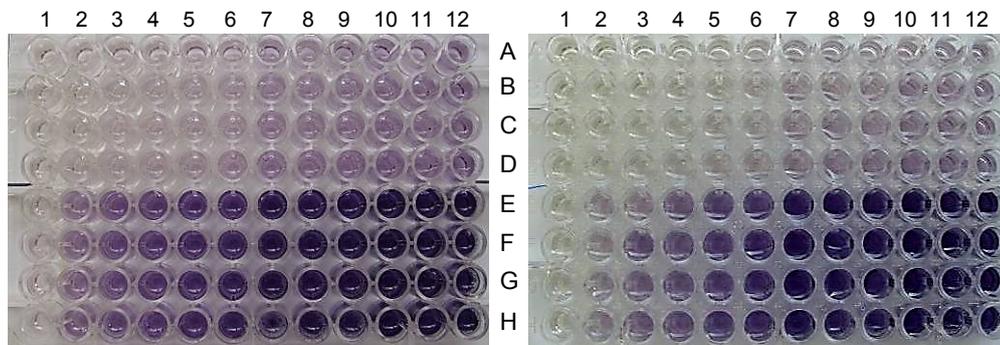


Abb. 3.17: Variation des NBT-Assays. Dokumentiert ist exemplarisch die konzentrationsabhängige Formazanbildung in Butanol-Ethanol-Gemischen nach NBT-Assay mit Variationen in der Präparation der Assay-Lösung oder der Vorgehensweise. Links: 4 µg/ml PMS, rechts: 5 min Inkubation. A, B, C, D 1-12: 0-70 mM Butanol/Ethanol (6:1, [v/v]); E, F, G, H 1-12: 0-700 mM Butanol/Ethanol (6:1, [v/v]).

Die Auswertung der Versuchsreihen gelang durch A_{580} -Messung am Microplate-Reader (2.7.). Die Absorptionswerte wurden anschließend mit den entsprechenden Alkoholkonzentrationen ins Verhältnis gesetzt (Abb. 3.18).

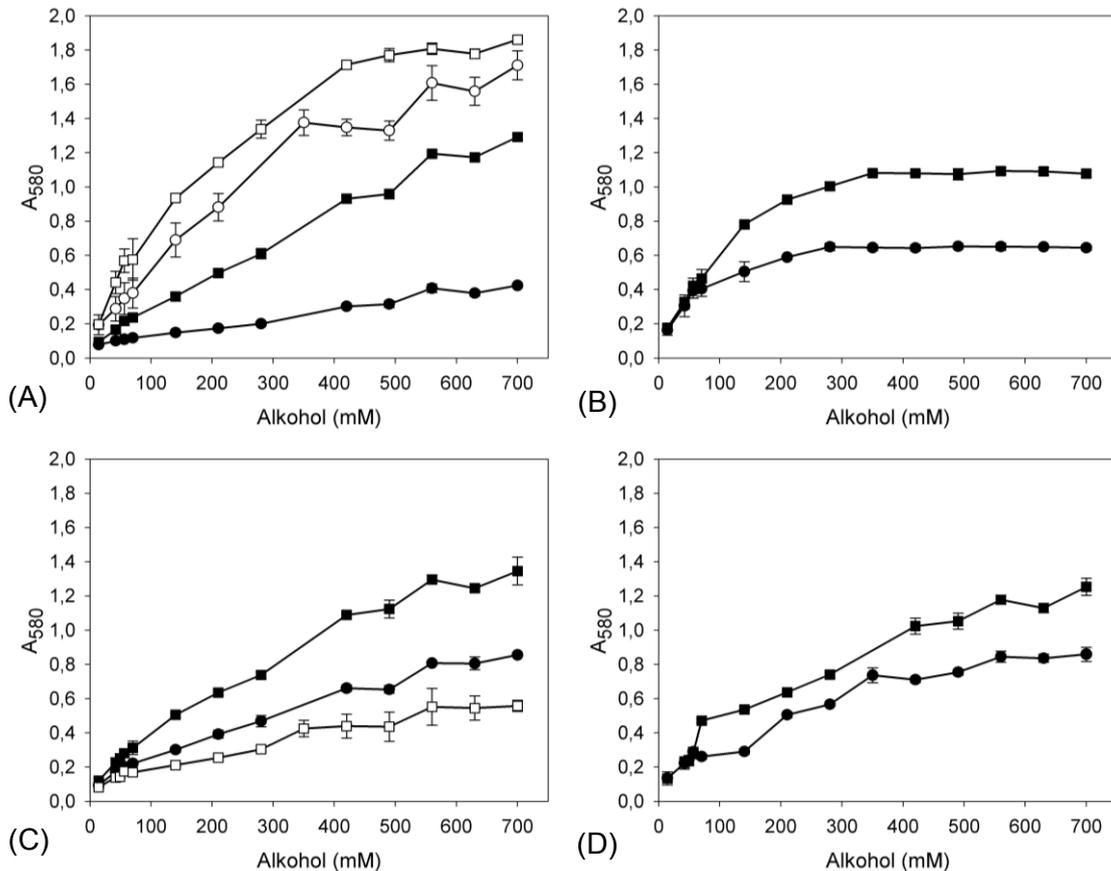


Abb. 3.18: Optimierung des NBT-Assays. Unter Verwendung von Butanol/Ethanol-Gemischen (6:1, [v/v]) definierter Konzentrationen erfolgte die Durchführung des NBT-Assays, bei dem im Vergleich zur Standardprozedur variierende Konzentrationen der Assay-Komponenten eingesetzt bzw. Inkubationsparameter verändert wurden. Die Diagramme stellen die in den unterschiedlichen Ansätzen erreichten Werte bezüglich der Absorption bei 580 nm (A_{580}) dar. Gezeigt sind Mittelwerte aus je vier Replikaten pro Alkoholkonzentration und Variation. (A): Variation der ADH-Konzentration bzw. Verwendung einer alternativen ADH (ADH2) aus *S. cerevisiae* mit NAD^+ und Puffersalzen (●: 10 $\mu\text{g/ml}$ ADH1, ■: 50 $\mu\text{g/ml}$ ADH1, ○: 100 $\mu\text{g/ml}$ ADH1, □: 100 $\mu\text{g/ml}$ ADH2). (B): Variation der NBT-Konzentration (●: 50 $\mu\text{g/ml}$, ■: 100 $\mu\text{g/ml}$). (C): Veränderung der Inkubationsparameter (●: 5 min, RT; ■: 8 min, RT; □: 10 min auf Eis). (D): Verwendung unterschiedlicher PMS-Konzentrationen (●: 2 $\mu\text{g/ml}$, ■: 4 $\mu\text{g/ml}$).

Die Variationen in Bezug auf die verwendete Alkoholdehydrogenase (ADH) zogen keine positiven Effekte auf den Assay bzw. die erzielten Resultate nach sich. Die ADH aus der Pferdeleber zeigte keine Reaktion, d. h. die grundlegende enzymatische Umsetzung der Alkohole fand nicht statt, so dass eine Formazanbildung unter Verwendung dieser Dehydrogenase photometrisch nicht gemessen werden konnte. Eine mit NAD^+ und Puffersalzen versetzte Alkoholdehydrogenase, die wie die im Standard-Protokoll genutzte ADH aus *Saccharomyces cerevisiae* stammte, führte zu einer Steigerung der Reaktion und höheren Absorptionswerten und damit zu einer im Vergleich zum Standardprotokoll noch rascheren Sättigung des Assays (Abb. 3.18 (A)). Verminderungen der ADH-Konzentration beeinflussten die Ergebnisse des Assays positiv. Die Absorptionswerte sanken mit reduzierter Enzymkonzentration und lagen auch bei höheren Alkoholkonzentrationen im linearen Messbereich (Abb. 3.18 (A)). Als vorteilhaft zeigte sich in diesem Zusammenhang v. a. allem die Reduktion der ADH-Konzentration auf 10 $\mu\text{g/ml}$. Jedoch war die visuelle Differenzierung auch von größeren Unterschieden in der Alkoholkonzentration bei dieser eingesetzten Enzymmenge nur schwer möglich. Da bei einer Anwendung des NBT-Assays als Hochdurchsatz-Screening auch die Möglichkeit zu einer schnellen visuellen Identifizierung von Phänotypen mit gesteigerter Butanolproduktion gegeben sein sollte, kam die Verringerung der ADH-Konzentration auf 10 $\mu\text{g/ml}$ für die Optimierung nicht in Betracht. Prinzipiell konnten durch Reduktion der Enzymkonzentration dennoch erste Tendenzen im Hinblick auf eine Verbesserung der Reproduzierbarkeit des Assays aufgezeigt werden.

Eine Veränderung des NBTs in der Assay-Lösung wirkte sich nachteilig aus. Erkennbar an einem auffällig veränderten Kurvenverlauf hatte die Reduzierung der NBT-Konzentration ein sehr schnelles Eintreten des Sättigungseffektes zur Folge (Abb. 3.18 (B)). Die Modifikation der NBT-Konzentration konnte somit nicht als Grundlage zur Steigerung der Assay-Sensitivität dienen.

Durch Verkürzung der Inkubationszeit ließen sich Erfolge hinsichtlich der Differenzierungsmöglichkeiten verzeichnen. Eine fünfminütige Inkubation der Ansätze resultierte in einem nahezu linearen Verlauf des Verhältnisses aus Absorption und Gesamtalkoholgehalt (Abb. 3.18 (C)). Zudem erleichterte die Variation der Inkubationszeit die visuelle Unterscheidung einzelner Alkoholkonzentrationen. Im Hinblick auf die praktische Durchführbarkeit erwies sich die Inkubation von 5 min als realisierbar. Ein noch geringeres Inkubationsintervall war nicht praktikabel. Die Durchführung des Assays auf Eis führte zu einer signifikant langsameren Reaktion, dokumentiert durch deutlich niedrigere Absorptionswerte (Abb. 3.18 (C)). Die

technische Umsetzung dieses Optimierungsansatzes gelang allerdings nicht, da die Bildung von Kondenswasser Probleme bei der Absorptionsmessung nach sich zog. Vom Herabsetzen der PMS-Konzentration gingen weitere positive Effekte aus. Die Formazanbildung (A_{580}) konnte verringert, die Linearität der Messwerte hingegen gesteigert werden (Abb. 3.18 (D)). Die Variation der in der Nachweisreaktion eingesetzten PMS-Konzentration bot sich dementsprechend ebenso zur Optimierung des Assays an wie die Reduktion der Inkubationszeit. Für weitere Anwendungen des Assays wurde dieser auf Grundlage der oben angeführten Ergebnisse wie folgt variiert. Die Konzentration des PMS in der Assay-Lösung wurde auf 4 $\mu\text{g/ml}$ und die Reaktionszeit auf 5 min bei Raumtemperatur festgelegt.

Innerhalb der in Abbildung 3.18 gezeigten Versuchsreihen traten mitunter stark schwankende Werte auf, so dass der Übergang zwischen linearem zu nicht-linearem Messbereich schwer zu identifizieren war. Alkoholkonzentrationen von mehr als 300 mM lagen jedoch definitiv außerhalb des linearen Bereichs.

3.3.3. Stammdifferenzierung mittels optimiertem Assay

In vorangegangenen Versuchen wurde im Ergebnis des Assays eine starke Hintergrundfärbung beobachtet, die zur Verminderung der Assay-Sensitivität und zu falsch positiven Resultaten führte (3.3.1.). Die Entwicklung eines neuen Assay-Standards auf Grundlage verringerter PMS-Konzentrationen und verkürzter Inkubationszeiten diente der Reduktion unspezifischer Farbreaktionen und ließ deutliche Verbesserungen bezüglich der Sensitivität erkennen (3.3.2.). Zwecks Prüfung der Anwendbarkeit des optimierten NBT-Assays waren nachstehend erläuterte Experimente zur Differenzierung der Alkoholproduktion definierter *C. acetobutylicum*-Stämme mit veränderten Produktspektren vorgesehen.

3.3.3.1. Differenzierung im 10 ml-Maßstab

Die erste Anwendung des modifizierten Assays fand im 10 ml-Maßstab statt. Dafür erfolgte zunächst die Anzucht des Wildtyps und der *C. acetobutylicum*-Stämme *hbd::Int(69)* (Lehmann & Lütke-Eversloh, 2011), *adc::Int(180)* (Lehmann *et al.* 2012a), und *adhE1::int(158)* (Lehmann, 2012, Dissertation) in je 10 ml CGM (2.2.1.). Nach anaerober Inkubation (37 °C, ü. N.) wurden die Stämme zu jeweils fünf Replikaten in 10 ml MS-MES (2.2.1.) inokuliert, anaerob bei 37 °C inkubiert und regelmäßig beprobt. Die entsprechenden Zellkulturproben wurden einem Zentrifugationsschritt (13000 Upm, 2 min) unterzogen, bevor sich die Analyse der zellfreien Überstände mittels optimiertem NBT-Assay anschloss. Nach Versetzen der Proben mit dem Assay-Mix

(4 µg/ml PMS) folgten die Inkubation der Ansätze (5 min, RT), die photometrische Bestimmung der Absorption bei 580 nm und gaschromatographische Quantifizierungen der Butanol- und Ethanolkonzentrationen (Abb. 3.19).

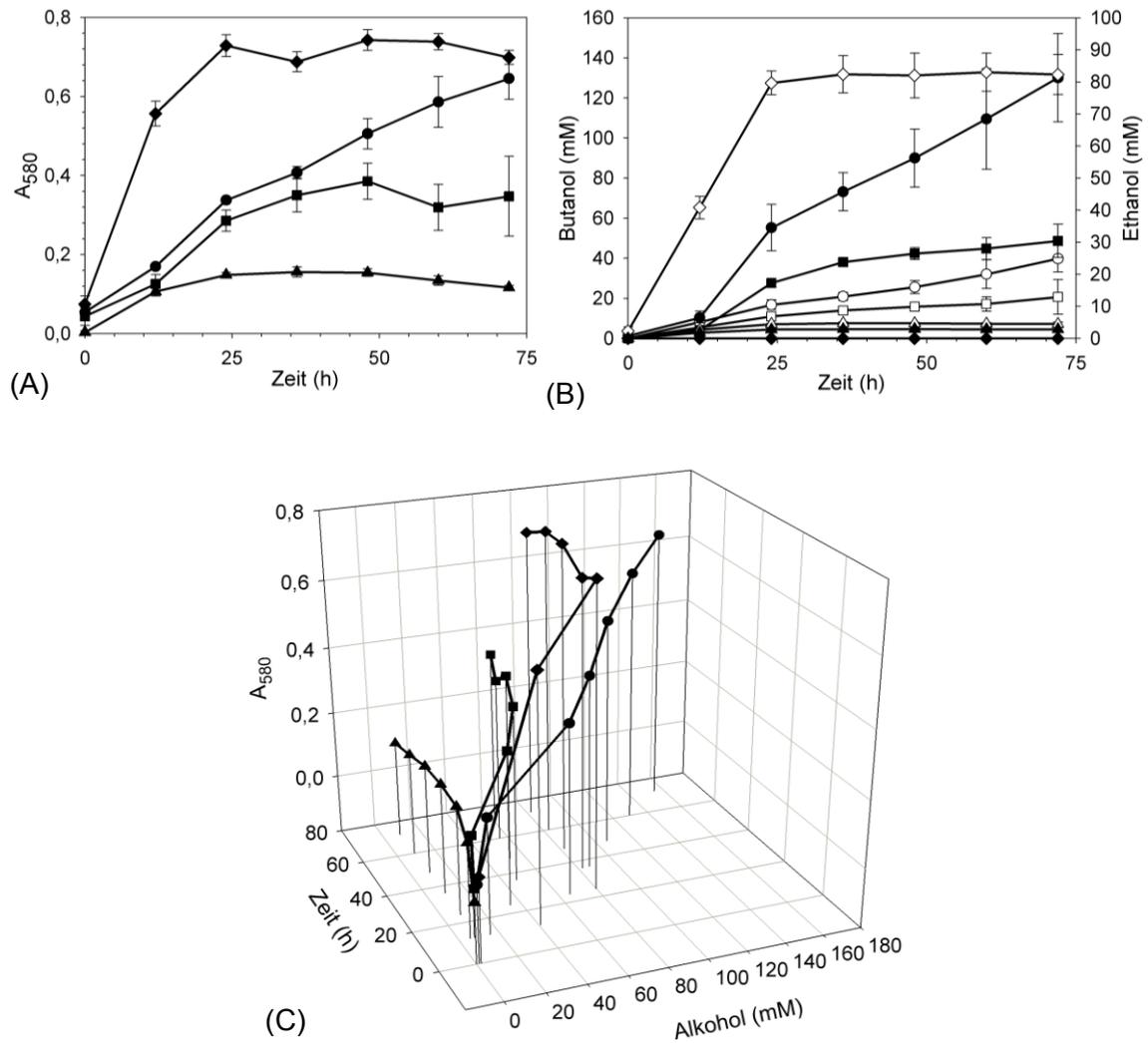


Abb. 3.19: Differenzierung von *C. acetobutylicum*-Stämmen mittels optimiertem NBT-Assay im 10 ml-Maßstab. Die zu untersuchenden Stämme wurden in MS-MES-Medium angezogen und regelmäßig beprobt. Zellfreie Überstände wurden zur Analyse mittels NBT-Assay verwendet. Außerdem erfolgte die gaschromatographische Bestimmung der Alkoholproduktion. Dargestellt sind unter (A) die erreichten Werte der Absorption bei 580 nm (A_{580}) über den Wachstumsverlauf der einzelnen Stämme und unter (B) die von den Stämmen gebildeten Konzentrationen an Butanol (geschlossene Symbole) und Ethanol (offene Symbole), die gaschromatographisch gemessen wurden. Gezeigt sind jeweils Mittelwerte aus fünf Replikaten pro Stamm und Probenzeitpunkt. (C) dokumentiert die Abhängigkeit der A_{580} von der gebildeten Gesamtalkoholkonzentration über den zeitlichen Verlauf. ●, ○: *C. acetobutylicum* Wildtyp; ■, □: *C. acetobutylicum* *adc::Int*(180); ◆, ◇: *C. acetobutylicum* *hbd::Int*(69); ▲, △: *C. acetobutylicum* *adhE1::Int*(158).

Wie Abbildung 3.19 erkennen lässt, gelang unter Anwendung des optimierten NBT-Assays die Differenzierung verschiedener *C. acetobutylicum*-Stämme hinsichtlich ihrer Alkoholproduktion. Die Unterscheidung war sowohl visuell als auch photometrisch möglich. Die dokumentierten Absorptionswerte schwankten nur gering, so dass eine hohe Reproduzierbarkeit vorlag. Stammkennzeichnende Unterschiede im Produktspektrum (Tab. 3.2) zeigten sich entsprechend den Erwartungen in der Formazanbildung (A_{580}) der jeweiligen Stämme. Zudem konnte ein linearer Bezug zwischen der Formazanbildung und den gaschromatographisch ermittelten Alkoholkonzentrationen festgestellt werden, die A_{580} -Werte korrelierten sehr gut mit den GC-Daten (Abb. 3.19 (A), (B)). Stammspezifische Butanol-Ethanol-Verhältnisse (Tab. 3.2) spiegelten sich in den Steigungen der jeweiligen Geraden wider (Abb. 3.19 (C)).

3.3.3.2. Differenzierung in Mikrotiterplatten

Nachdem der optimierte NBT-Assay erfolgreich im 10 ml-Maßstab zur Differenzierung der Alkoholproduktion unterschiedlicher *C. acetobutylicum*-Stämme angewandt werden konnte (3.2.3.1.), musste weiterhin überprüft werden, ob die Differenzierung ebenfalls im Hochdurchsatz reproduzierbar war. Zu diesem Zweck sollte die Analyse der *C. acetobutylicum*-Stämme *hbd::Int(69)* (Lehmann & Lütke-Eversloh, 2011), *adc::Int(180)* (Lehmann *et al.* 2012a), und *adhE1::int(158)* (Lehmann, 2012, Dissertation) mittels optimiertem NBT-Assay in Mikrotiterplatten vollzogen werden. In Vorbereitung dieser Screening-Simulation wurden die zu untersuchenden Stämme, wie unter 3.3.1. angegeben, zunächst in CGM (2.2.1.) in Mikrotiterplatten (96-Well, Gesamtvolumen 2,2 ml) kultiviert und anschließend in MS-MES-Medium (2.2.1.) repliziert. Die auf die anaerobe Inkubation (siehe 3.3.1.) der MS-MES-Mikrokulturen folgende Analyse von Zellkulturproben verlief unter Anwendung des optimierten NBT-Assays (3.3.2.) mit Bestimmung der A_{580} am Microplate-Reader. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Abbildung 3.20 dargestellt.

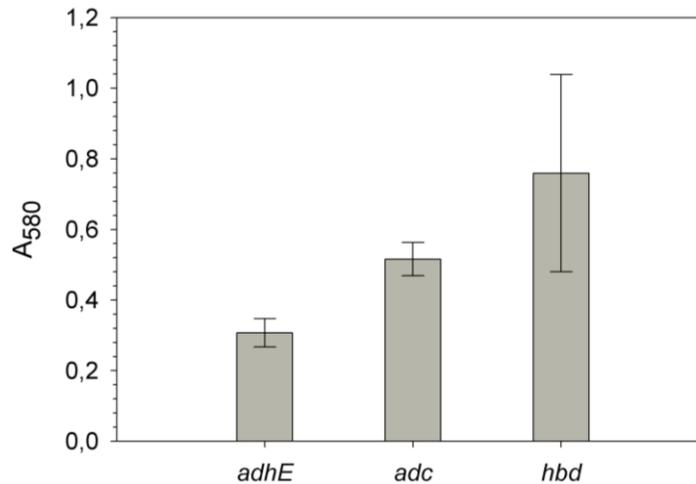


Abb. 3.20: Optimierter NBT-Assay zur Differenzierung verschiedener *C. acetobutylicum*-Stämme in Mikrotiterplatten. Die zu untersuchenden Stämme wurden in Mikrotiterplatten angezogen und mittels optimiertem NBT-Assay analysiert. Das Diagramm zeigt die von den einzelnen Stämmen erreichten Mittelwerte der Formazanbildung aus jeweils 96 Replikaten. *adhE*, *C. acetobutylicum adhE1::Int(158)*; *adc*, *C. acetobutylicum adc::Int(180)*; *hbd*, *C. acetobutylicum hbd::Int(69)*.

Zur Evaluation und statistischen Auswertung des Assays diente der von Zhang *et al.* (1999) beschriebene Z-Faktor, der nach u. g. Formel auf Grundlage der erreichten Mittelwerte der Formazanbildung und entsprechender Standardabweichungen berechnet wurde (Abb. 3.21). Die Möglichkeit zur Differenzierung verschiedener Proben wird dabei durch Z-Faktoren gekennzeichnet, die Werte zwischen 0 und 1 annehmen.

$$Z_{\text{(Zhang et al., 1999)}} = 1 - \frac{3\sigma_s + 3\sigma_c}{3\mu_s - 3\mu_c}$$

$3\sigma_s$: dreifache Standardabweichung der Probe

$3\sigma_c$: dreifache Standardabweichung der Kontrolle

μ_s : Mittelwert der Probe

μ_c : Mittelwert der Kontrolle

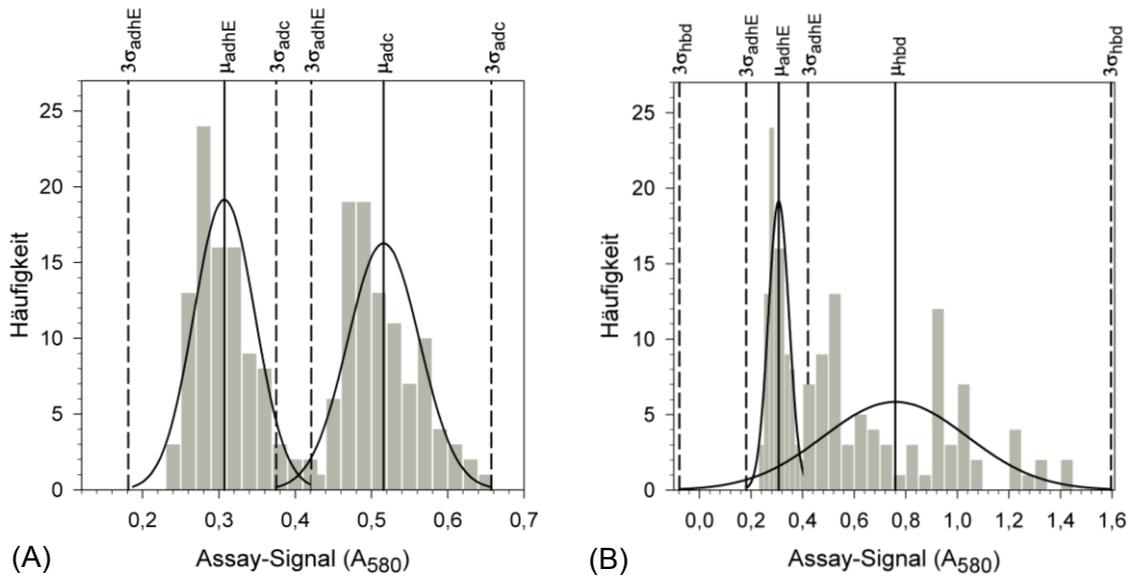


Abb. 3.21: Evaluierung der Differenzierungsexperimente mittels NBT-Assay. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung der Absorptionswerte und der entsprechenden Mittelwerte und Standardabweichungen nach Zhang *et al.* (1999). Die Berechnungen und die Erstellung der Diagramme wurden mit SigmaPlot durchgeführt. Dargestellt sind die Häufigkeitsverteilungen der Absorptionswerte und die entsprechenden Gauß-Verteilungen für *C. acetobutylicum adhE1::int(158)* im Vergleich zu *C. acetobutylicum adc::int(180)* (A) und für *C. acetobutylicum adhE1::int(158)* im Vergleich zu *C. acetobutylicum hbd::int(69)* (B). Balkendiagramme repräsentieren die Häufigkeitsverteilungen, Kurven stellen die Gauß-Verteilungen dar. Außerdem gezeigt sind die Mittelwerte bezüglich der Absorption der untersuchten Proben (μ) und die dreifachen Standardabweichungen (3σ).

Es ist zu erkennen, dass eine Differenzierung der untersuchten Stämme im Hochdurchsatz grundsätzlich möglich war. Für die einzelnen *C. acetobutylicum*-Mutanten konnte eine Formazanbildung (A_{580}) dokumentiert werden, die mit den in wachstumsphysiologischen Experimenten ermittelten Alkoholkonzentrationen korrelierte (Tab. 3.2). Gleichzeitig unterlagen die Absorptionswerte v. a. von *C. acetobutylicum hbd::int(69)* jedoch starken Schwankungen, die Folge eines ungleichmäßigen Wachstums während der Kultivierung waren. Diese Schwankungen wirkten sich auch auf die Evaluation des Screenings aus. Bei einem Vergleich von *C. acetobutylicum adhE1::int(158)* mit *C. acetobutylicum adc::int(180)* bzw. *C. acetobutylicum hbd::int(69)* ergaben sich Z-Faktoren (Zhang *et al.*, 1999) von -0,214 und -0,937. Die Datenbereiche der Stämme (entsprechende Absorptionsmittelwerte +/- dreifache Standardabweichung) ließen sich nicht voneinander abgrenzen, insbesondere die „data variability bands“ (Zhang *et al.*, 1999) von *C. acetobutylicum adhE1::int(158)* und *C. acetobutylicum adc::int(180)* überlappten erheblich (Abb. 3.21). Neben der beträchtlichen Streuung der Absorptionswerte erwies sich die Verwendung von Zellsuspensionen innerhalb des Assays als problematisch.

So wurden bei *C. acetobutylicum adhE1::int(158)*, der lediglich geringe Alkoholmengen produziert, unerwartet hohe Absorptionen detektiert (Abb. 3.20). Diese Resultate lassen sich auf Trübungen durch die in den Proben enthaltenen Zellen zurückführen. In nachfolgenden Experimenten sollte daher ein Zentrifugationsschritt eingefügt werden, um zellfreie Überstände statt Zellsuspensionen für die Messung einsetzen zu können.

In einem erneuten Differenzierungsexperiment im 96-Well-Format unter Verwendung zellfreier Überstände von *C. acetobutylicum* Wildtyp, *C. acetobutylicum adc::Int(180)* und *C. acetobutylicum adhE1::int(158)* wurden die Stämme mittels optimiertem NBT-Assay (3.3.2.) vergleichend und in Bezug zu einer Negativkontrolle (MS-MES-Medium) analysiert. Mit Ausnahme des vor der Durchführung des Assays eingefügten Zentrifugationsschritts (4000 Upm, 60 min) entsprachen die einzelnen Arbeitsschritte denen des zuvor aufgeführten Versuchs der Differenzierung verschiedener *C. acetobutylicum*-Stämme in Mikrotiterplatten (3.3.3.2.). Neben dem NBT-Assay mit photometrischer Bestimmung der A_{580} (Abb. 3.22 (A)) erfolgte eine exemplarische gaschromatographische Quantifizierung der von den untersuchten Stämmen produzierten Alkohole (Abb. 3.22 (B)).

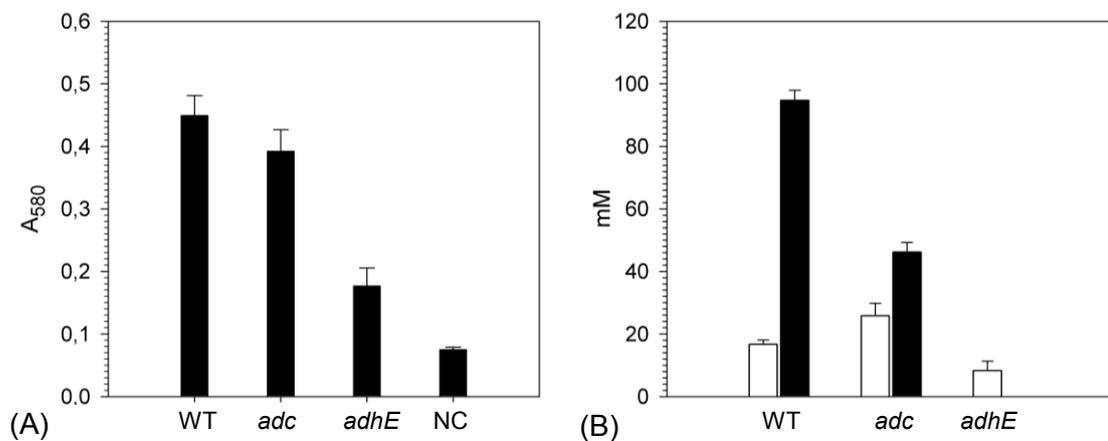


Abb. 3.22: Differenzierung verschiedener *C. acetobutylicum*-Stämme in 96-Well Platten.

Die zu untersuchenden Stämme wurden in Mikrotiterplatten angezogen und mittels optimiertem NBT-Assay unter Verwendung zellfreier Überstände im Vergleich zu einer Negativkontrolle analysiert. Dargestellt sind unter (A) die in den entsprechenden Proben erreichten Mittelwerte bezüglich der Formazanbildung (aus 96 Replikaten pro Stamm). Zusätzlich wurden zellfreie Überstände gaschromatographisch analysiert. (B) zeigt die von den Stämmen gebildeten Konzentrationen an Ethanol (weiße Balken) und Butanol (schwarze Balken, Mittelwerte aus jeweils 20 Replikaten). WT, *C. acetobutylicum* ATCC 824; *adc*, *C. acetobutylicum adc::Int(180)*; *adhE*, *C. acetobutylicum adhE1::Int(158)*; NC, Negativkontrolle (MS-MES).

Für die statistische Auswertung (Abb. 3.23) und Evaluierung des Experiments (Tab. 3.4) wurde der Z-Faktor nach o. a. Formel berechnet (Zhang *et al.*, 1999).

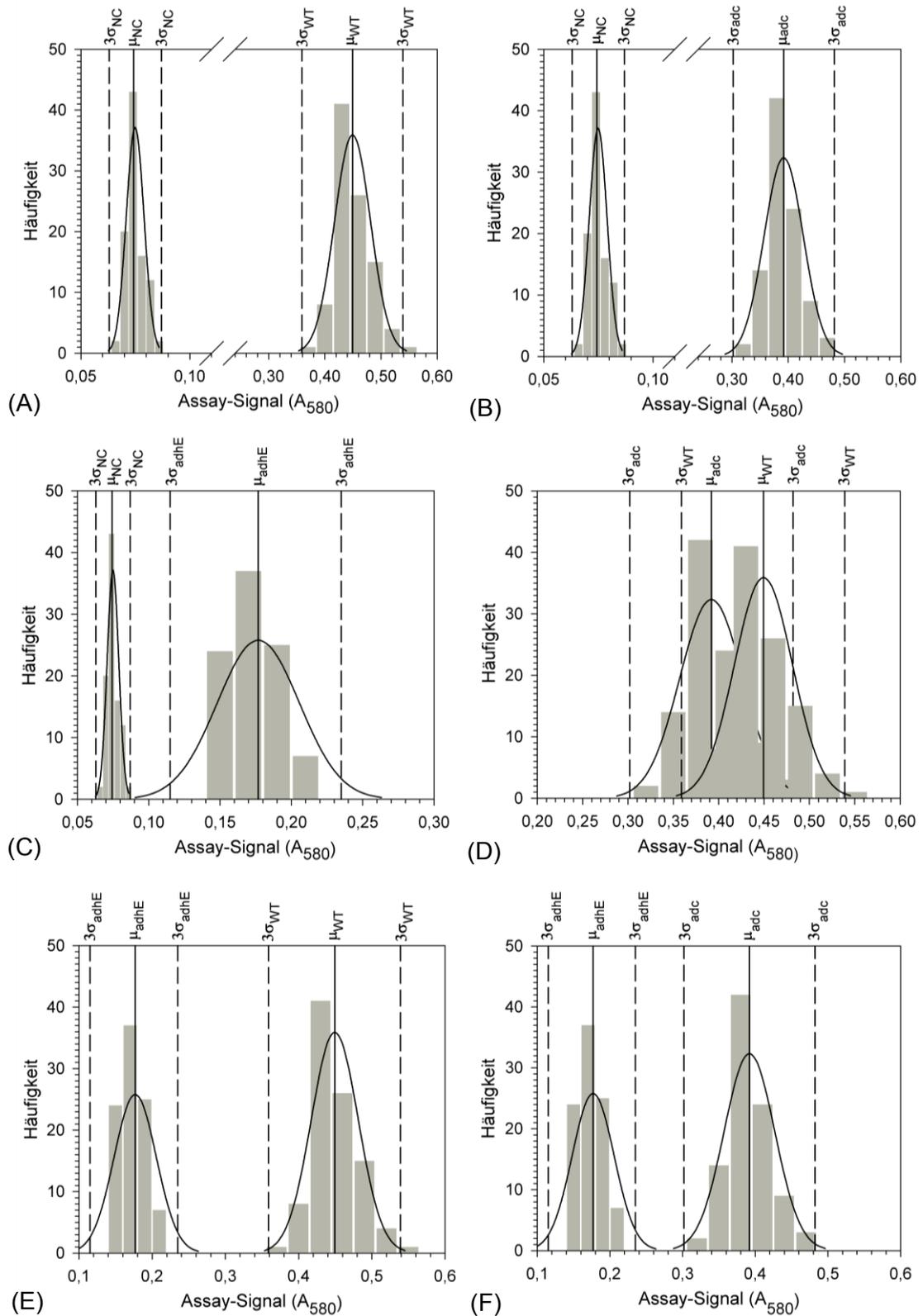


Abb. 3.23: Statistische Auswertung der Differenzierungsexperimente mittels NBT-Assay.

Abb. 3.23 (Fortsetzung): Statistische Auswertung der Differenzierungsexperimente mittels NBT-Assay. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung der Absorptionswerte, der entsprechenden Mittelwerte und Standardabweichungen nach Zhang *et al.* (1999). Die Berechnungen und die Erstellung der Diagramme wurden mit SigmaPlot durchgeführt. Dargestellt sind die Häufigkeitsverteilungen der Absorptionswerte und die entsprechenden Gauß-Verteilungen für *C. acetobutylicum* Wildtyp im Vergleich zur Negativkontrolle (A), für *C. acetobutylicum adc::Int(180)* im Vergleich zur Negativkontrolle (B), für *C. acetobutylicum adhE1::Int(158)* im Vergleich zur Negativkontrolle (C), für *C. acetobutylicum adc::Int(180)* im Vergleich zu *C. acetobutylicum* Wildtyp (D), für *C. acetobutylicum adhE1::int(158)* im Vergleich zu *C. acetobutylicum* Wildtyp (E) und für *C. acetobutylicum adhE1::int(158)* im Vergleich zu *C. acetobutylicum adc::int(180)* (F). Balkendiagramme repräsentieren die Häufigkeitsverteilungen, Kurven stellen die Gauß-Verteilungen dar. Außerdem gezeigt sind die Mittelwerte bezüglich der Absorption der untersuchten Proben (μ) und die dreifachen Standardabweichungen (3σ).

Die folgende Tabelle (Tab. 3.4) stellt Z-Faktoren (Zhang *et al.*, 1999) dar, die aus den Ergebnissen der oben aufgeführten Differenzierungsexperimente errechnet wurden und der Evaluation des NBT-Assays dienen.

Tab. 3.4: Z-Faktoren zur Evaluation der Differenzierungsexperimente. Auf Grundlage der Mittelwerte und Standardabweichungen bezüglich der nach NBT-Assay in den untersuchten Proben erreichten Absorptionswerte erfolgte die Berechnung von Z-Faktoren (Zhang *et al.*, 1999). Dabei wurden die Ergebnisse der untersuchten Stämme mit denen der Negativkontrolle (NC) und untereinander in Beziehung gesetzt.

Vergleich der Proben	Z-Faktor
<i>C. acetobutylicum</i> Wildtyp / NC	0,728
<i>C. acetobutylicum adc::Int</i> / NC	0,678
<i>C. acetobutylicum adhE::Int</i> / NC	0
<i>C. acetobutylicum</i> Wildtyp / <i>C. acetobutylicum adc::Int</i>	< 0
<i>C. acetobutylicum</i> Wildtyp / <i>C. acetobutylicum adhE::Int</i>	0,338
<i>C. acetobutylicum adhE::Int</i> / <i>C. acetobutylicum adc::Int</i>	0,163

C. acetobutylicum Wildtyp und *C. acetobutylicum adc::Int(180)* ließen sich jeweils eindeutig von der Negativkontrolle differenzieren. Eine Abgrenzung der Datenbereiche beider Stämme von dem der Negativkontrolle war deutlich zu erkennen (Abb. 3.23 (A), (B)). Es ergaben sich offensichtliche „separation bands“ (Zhang *et al.*, 1999) und positive Z-Faktoren ($Z_{\text{Wildtyp/NC}} = 0,728$ bzw. $Z_{\text{adc/NC}} = 0,678$). Die Differenzierung von Negativkontrolle und *C. acetobutylicum adhE1::Int(158)* war nur bedingt realisierbar ($Z_{\text{adhE1/NC}} = 0$; Abb. 3.23 (C)). Da sich *C. acetobutylicum* Wildtyp und *C. acetobutylicum adc::Int(180)* bezüglich der Alkoholproduktion in Mikrotiterplatten nur geringfügig unterscheiden (Abb. 3.22 (B)), überlappten deren Datenbereiche deutlich (Abb. 3.23

(D)), so dass die Abgrenzung beider Stämme untereinander nicht möglich war ($Z_{\text{Wildtyp}/\text{adc}} < 0$). Bei einem Vergleich von *C. acetobutylicum adhE1::Int(158)* und *C. acetobutylicum* Wildtyp respektive *C. acetobutylicum adc::Int(180)* zeigten sich die Unterschiede in der Alkoholproduktion auch in den Resultaten des Assays ($Z_{\text{Wildtyp}/\text{adhE1}} = 0,338$; $Z_{\text{adc}/\text{adhE1}} = 0,163$; Abb. 3.23 (E), (F)). *C. acetobutylicum adhE1::Int(158)* konnte folglich sowohl von *C. acetobutylicum* Wildtyp als auch von *C. acetobutylicum adc::Int(180)* differenziert werden.

3.4. Anwendung des NBT-Assays als Screening-Methode

Im Anschluss an die Entwicklung (3.2.) und Optimierung (3.3.) des Butanol-Screeningverfahrens sollte im letzten Schritt dieser Arbeit der „proof of principle“ der Methode, d. h. der Nachweis zur Eignung anhand von Anwendungsbeispielen erbracht werden. Dafür war vorgesehen, in unbestimmten *C. acetobutylicum*-Populationen durch Einsatz des NBT-Assays Mutanten zu identifizieren, die eine im Vergleich zum Parentalstamm gesteigerte Butanolproduktion aufwiesen. Für die Herstellung der zu screenenden Populationen wurde eine chemische Mutagenese unter Verwendung von N'-Methyl-N'-nitrosourea (MNU) gewählt. MNU gehört zu einer Gruppe DNA-reaktiver Substanzen, die bereits in früheren Studien intensiv hinsichtlich ihrer Wirkung als Karzinogene und Mutagene untersucht wurden (Singer & Kusmieriek, 1982; Lawley, 1984). Die Mutagenität des MNU geht aus der Fähigkeit des Stoffes zur Alkylierung von DNA-Molekülen hervor. In Folge der Alkylierungsreaktionen bilden sich DNA-Addukte, die zu Basentransitionen und so zu Fehlpaarungen und Leserasterverschiebungen bei der Replikation führen (Newbold *et al.*, 1980; Singer & Grunberger, 1983; Singer *et al.*, 1986; Richardson *et al.*, 1987). Die entstehenden Mutationen verteilen sich dabei zufällig im Genom, da das MNU an diversen DNA-Positionen angreift (Yarosh, 1985; Lord *et al.*, 1990).

Unter Berücksichtigung der Resultate, die innerhalb der Entwicklung und der Optimierung des Screenings erzielt wurden, erfolgte der "proof of principle" des NBT-Assays gemäß der in Abbildung 3.24 dargestellten Vorgehensweise. Der entsprechende Ausgangsstamm wurde mittels MNU chemisch mutagenisiert und auf RCA (2.2.1.) ausplattiert. Zur Erstellung der Mutantenpopulation wurden Einzelkolonien in Mikrotiterplatten zunächst in Komplexmedium (CGM), nach anaerober Inkubation in Minimalmedium (MS-MES) kultiviert. Die Replikation in MS-MES war nötig, da sich in der Entwicklung des Screenings zeigte, dass die Kultivierung der zu untersuchenden Stämme in diesem Medium die intensivste Formazanbildung zur Folge hatte (3.2.1.3.), eine direkte Inokulation des Minimalmediums mit Einzelkolonien jedoch nicht möglich war (3.1.). Es schloss sich das Screening der Population mittels NBT-Assay an, um

positive Mutanten, d. h. Klone mit gesteigerter Formazanbildung zu identifizieren und zu isolieren. Putativ positive Stämme durchliefen weitere Verifikationsexperimente, mit Hilfe derer eine verbesserte Butanolproduktion bestätigt oder widerlegt werden sollte.

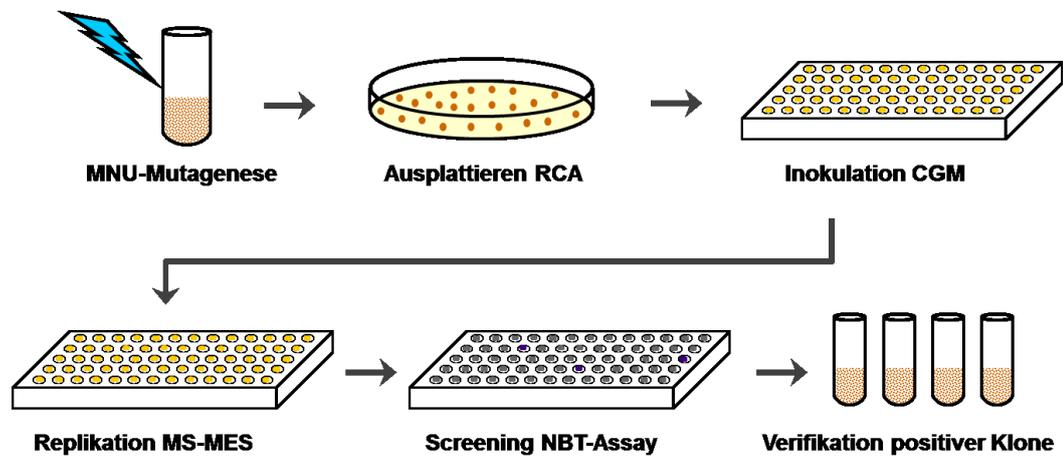


Abb. 3.24: Vorgehensweise zur Anwendung des NBT-Assays als semi-quantitatives Butanol-Screening. Nach chemischer Mutagenese des entsprechenden Parentalstamms und Erzeugung der Mutantenpopulation erfolgte ein Screening der Population mittels NBT-Assay. Potentiell positive Stämme (Mutanten mit gesteigerter Formazanbildung) wurden weiteren Experimenten unterzogen, um eine gesteigerte Butanolproduktion zu verifizieren.

3.4.1. MNU-Mutagenese von *C. acetobutylicum* Wildtyp und Screening der Population

Für die erste Anwendung des NBT-Assays zur Isolation von Mutanten mit gesteigerter Butanolproduktion wurde der Wildtyp von *C. acetobutylicum* als Ausgangsstamm für die Generierung einer Mutantenpopulation eingesetzt.

3.4.1.1. Bestimmung der Überlebensrate von *C. acetobutylicum* Wildtyp nach Exposition mit MNU

Im Vorfeld der eigentlichen Mutagenese war es notwendig, die Überlebensrate des Stamms nach Exposition mit N'-Methyl-N'-nitrosourea (MNU) zu ermitteln, um die Toxizität des mutagenen Stoffs zu bestimmen und dementsprechend die für den Mutationsschritt zu wählende Expositionszeit festlegen zu können. Zu diesem Zweck erfolgte zunächst die Inokulation von *C. acetobutylicum* Wildtyp in 10 ml CGM (2.2.1.). Nach anaerober Inkubation (37 °C, ü. N.) wurde ein Aliquot dieser Vorkultur zur Anzucht einer Hauptkultur (50 ml CGM) genutzt. Diese wurde wiederum anaerob bei 37 °C bis zum Erreichen einer Optischen Dichte von 1 inkubiert, nachfolgend zentrifugiert (5000 x g, 5 min) und dann in 40 ml CGM (ohne Glucose) resuspendiert.

An einen weiteren Zentrifugationsschritt (5000 x g, 5 min) schlossen sich die Aufnahme des Zellpellets in 25 ml CGM (ohne Glucose) und die Zugabe von 500 µg/ml MNU an. Die derart behandelte Kultur wurde nach 5, 10, 20, 45, 60 und 90 min beprobt und auf RCA (2.2.1.) ausplattiert. Die Auswertung dieses Experiments erfolgte durch Bestimmung der Anzahl koloniebildender Einheiten (colony forming units, CFU; 2.6.1.) im Vergleich zur CFU der Kultur vor der MNU-Zugabe (Abb. 3.25).

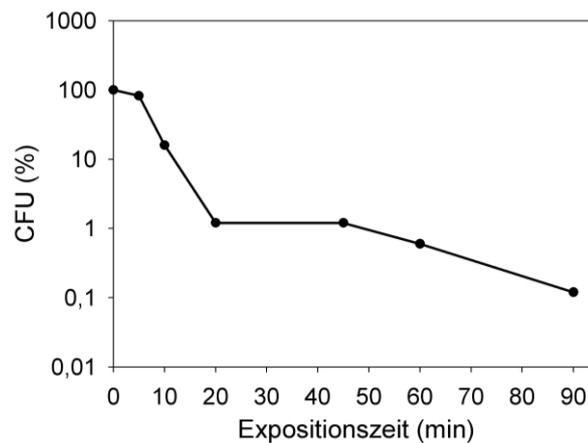


Abb. 3.25: Bestimmung der Überlebensrate von *C. acetobutylicum* Wildtyp nach Exposition mit MNU. Dargestellt sind die prozentualen Werte bezüglich der Anzahl koloniebildender Einheiten (colony forming units, CFU) der mit MNU behandelten Kultur von *C. acetobutylicum* Wildtyp im Vergleich zu den CFU-Werten vor MNU-Zugabe zu unterschiedlichen Expositionszeiten.

Die Behandlung der Wildtyp-Kultur mit MNU führte bereits innerhalb kurzer Zeitintervalle zu einer rapiden Abnahme der CFU-Werte. Nach fünfminütiger Exposition der Zellen mit dem mutagenen Stoff sank die CFU um ca. 20 %. Eine Expositionszeit von 10 min hatte eine Verringerung der koloniebildenden Einheiten um 85 % zur Folge. Die Inkubation mit MNU über 20 min ließ die CFU der Kultur auf ca. 1 % der Ausgangswerte fallen.

3.4.1.2. Erstellung der *C. acetobutylicum* Wildtyp-Mutantenpopulation

Nachdem die Zytotoxizität des MNU ermittelt werden konnte (3.3.1.1.), lag der nächste Schritt innerhalb des "proof of principles" des NBT-Assays in der Generierung einer Population, welche in Anwendung des Screenings analysiert werden sollte. Die Vorgehensweise zur Erstellung der Mutantenpopulation wurde auf Grundlage der von Murray *et al.* (1983) und Clark *et al.* (1989) beschriebenen Mutagenese-Prozeduren entwickelt und ist nachfolgend aufgeführt. *C. acetobutylicum* Wildtyp wurde ausgehend von einer Übernachtskultur in 50 ml CGM (2.2.1.) inokuliert und anaerob bei 37 °C inkubiert. Die exponentiell wachsende Kultur ($OD_{600} = 1$) wurde einem

Zentrifugationsschritt (5000 x g, 5 min) unterzogen, anschließend in 40 ml CGM (ohne Glucose) resuspendiert und erneut zentrifugiert (5000 x g, 5 min). Es folgten die Aufnahme des Zellpellets in 40 ml CGM (ohne Glucose) und eine zweistündige Inkubation der Zellsuspension (37 °C, anaerob), um einen Verbrauch endogener Nährstoffreserven durch die Zellen sicherzustellen, bevor MNU in einer Konzentration von 500 µg/ml zugegeben wurde. Die Mutagenese erfolgte über einen Zeitraum von 30 min. Diese Expositionszeit wurde unter Beachtung der in 3.4.1.1. erzielten Resultate festgelegt, um eine ca. 1 %ige Überlebensrate zu erzielen. Nach Zentrifugation der Zellsuspension (5000 x g, 5 min) und zweimaligem Waschen des Pellets in je 40 ml CGM (ohne Glucose) wurden die Zellen in 10 ml CGM (mit 5 % Glucose [w/v]) aufgenommen und zur Regeneration ü. N. inkubiert (37 °C, anaerob). An die Regenerationsphase, die der phänotypischen Expression von Mutanten dienen und eine hohe Ausbeute an mutierten Stämmen gewährleisten sollte, reihte sich das Ausplattieren der Mutantenkultur auf Agarplatten. Dabei kam es zur Verwendung aufkonzentrierter Zellsuspensionen, d. h. Kulturaliquots (1,5 ml) wurden vor dem Ausplattieren zentrifugiert (13000 Upm, 2 min) und in je 150 µl CGM resuspendiert, um eine Kolonienzahl von ca. 50 pro Platte zu erreichen. Da in früheren Arbeiten ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Toleranz gegenüber Butanol und einer gesteigerten Butanolproduktion aufgezeigt wurde (Lemmel, 1985; Hermann *et al.*, 1985; Matta-el-Ammouri *et al.*, 1986), erfolgte an diesem Punkt der Populationsgenerierung die Integration eines zusätzlichen Selektionsschritts. Durch die Nutzung Butanol-haltiger Agarplatten sollte eine Vorselektion Butanol-toleranter Mutanten und so eine Reduktion der zu untersuchenden Populationsgröße ermöglicht werden. Die mutagenisierte Kultur wurde auf mit Butanol versetzten RCA-Platten (15 g/l Butanol) ausplattiert, bevor sich die Inkubation der Agarplatten in der Anaerobenbox für mindestens 48 h bei 37 °C anschloss. Stämme, die zum Wachstum auf Butanol-haltigen Medien fähig waren, bildeten die zu screenende Population, die Gesamtgröße der erzeugten Population belief sich auf 760 Klone (Abb. 3.28).

3.4.1.3. Screening der Population von *C. acetobutylicum* Wildtyp mittels NBT-Assay

Die MNU-generierten Mutanten sollten nachfolgend mittels NBT-Assay untersucht werden, um Klone mit erhöhter Butanolproduktion zu isolieren. Dafür wurden die einzelnen Kolonien zunächst in je 1 ml CGM (2.2.1.) in Mikrotiterplatten inokuliert (96-well, Gesamtvolumen 2,2 ml). Im Anschluss an die anaerobe Inkubation der 96-Well-Platten (24 h, 37 °C) wurden die CGM-Mikrokulturen in MS-MES-Medium (2.2.1.) repliziert (1 ml Kulturvolumen, 20 µl Inokulum) und wiederum für 48 h inkubiert

(anaerob, 37 °C). Die darauffolgende Analyse von Zellkulturproben (10 µl) fand unter Anwendung des optimierten NBT-Assays (3.3.2.) statt. Die Identifikation putativ positiver Klone gelang zunächst anhand visueller Differenzierung der Formazanbildung, die anschließend photometrisch bei 580 nm am Microplate-Reader bestimmt wurde. Mutanten, die im Ergebnis des Assays eine vergleichend zum Parentalstamm starke Blaufärbung bzw. eine erhöhte Absorption (A_{580}) aufzeigten, wurden isoliert und Verifikationsexperimenten unterzogen (3.4.1.4.).

Von insgesamt 760 Butanol-toleranten Mutanten (s. o.) zeichneten sich innerhalb des Screenings in 96-Well-Mikrotiterplatten 21 Klone durch eine im Vergleich zum Parentalstamm um mindestens 100 % gesteigerte Formazanbildung aus (Abb. 3.28).

3.4.1.4. Verifikation potentiell positiver *C. acetobutylicum* Wildtyp-MNU-Mutanten

Um eine gesteigerte Butanolproduktion der vorselektierten Mutanten (3.4.1.3.) zu bestätigen, durchliefen die Stämme die im Folgenden aufgeführten Verifikationsexperimente. Zunächst erfolgte die Anzucht putativ positiver Stämme in je 10 ml CGM (2.2.1.). Nach anaerober Inkubation (37 °C, ü. N.) wurden die Mutanten in jeweils 10 ml MS-MES (2.2.1.) inokuliert, anaerob bei 37 °C inkubiert und nach 72 h beprobt. Die entsprechenden Zellkulturproben wurden einem Zentrifugationsschritt (13000 Upm, 2 min) unterzogen, bevor sich die Analyse der zellfreien Überstände mittels NBT-Assay anschloss. An das Versetzen der Proben mit dem Assay-Mix reihten sich die Inkubation der Ansätze für 5 min bei Raumtemperatur und die photometrische Bestimmung der Absorption bei 580 nm (Abb. 3.26 (A)). Darauffolgende gaschromatographische Analysen (2.4.3.) der Kulturüberstände ermöglichten die Quantifizierung der von den Stämmen produzierten Alkoholmengen (Abb. 3.26 (B)).

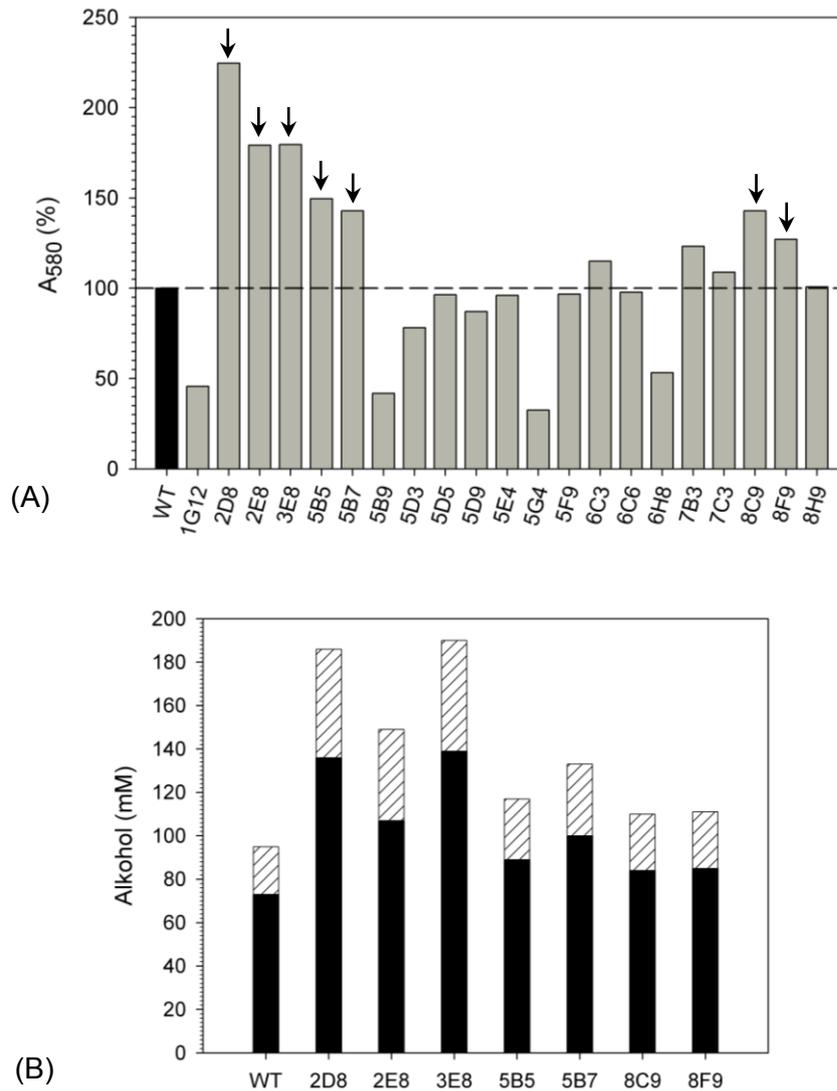


Abb. 3.26: Prozentuale Formazanbildung und Alkoholproduktion analysierter MNU-Mutanten im Vergleich zu *C. acetobutylicum* Wildtyp. (A): Die vom parental Stamm (Wildtyp, schwarzer Balken) nach NBT-Assay erreichte Absorption bei 580 nm wurde als Bezugsgröße festgelegt (100 %, gestrichelte Linie) und die Formazanbildung der zu überprüfenden Mutanten (graue Balken) prozentual dazu ins Verhältnis gesetzt. Die durch Pfeile markierten Stämme zeigten eine um mindestens 25 % gesteigerte Absorption. (B): Zellfreie Überstände der Stämme wurden gaschromatographisch im Vergleich zum Parentalstamm (Wildtyp, WT) untersucht. Das Diagramm zeigt die in den Proben quantifizierte Gesamtalkoholkonzentration, sowie die Konzentrationen an Butanol (schwarze Balken) und Ethanol (schraffierte Balken) nach 72 h Wachstum in 10 ml MS-MES.

In der folgenden Tabelle (Tab. 3.5) sind die über gaschromatographische Analysen ermittelten Konzentrationen der Gärungsprodukte der putativ positiven MNU-Mutanten im Vergleich zu *C. acetobutylicum* Wildtyp aufgeführt.

Tab. 3.5: Produktkonzentrationen des Parentalstamms *C. acetobutylicum* Wildtyp und der potentiell positiven Mutanten. Zellfreie Überstände der innerhalb des Screenings selektierten Mutanten wurden gaschromatographisch analysiert. Die Tabelle zeigt die Konzentrationen der von den Stämmen gebildeten Gärungsprodukte nach einer Inkubationszeit von 72 h. Die schließlich als positiv bewerteten Klone mit einer um mindestens 20 % gesteigerten Butanolproduktion sind fett gedruckt.

Stamm	Produkte (mM)				
	Acetat	Butyrat	Aceton	Ethanol	Butanol
Wildtyp	31	8	43	22	73
1G12	40	22	15	14	30
2D8	21	3	85	50	136
2E8	24	1	53	42	107
3E8	16	1	72	51	139
5B5	32	5	65	28	89
5B7	29	3	66	33	100
5B9	34	16	16	13	39
5D3	42	14	29	19	59
5D5	38	11	30	20	57
5D9	42	12	29	19	54
5E4	38	12	29	17	54
5G4	36	21	14	17	40
5F9	37	11	33	20	57
6C3	35	10	33	19	60
6C6	30	11	38	14	46
6H8	44	20	22	16	42
7B3	38	10	40	23	70
7C3	40	12	32	21	62
8C9	29	6	51	26	84
8F9	28	3	47	26	85
8H9	31	12	20	16	48

Innerhalb dieses ersten Verifikationsexperiments zeigten sieben von den 21 im Screening selektierten potentiell positiven Mutanten (3.4.1.3.) eine um mindestens 25 % erhöhte Formazanbildung (A_{580}) im Vergleich zum Parentalstamm. Für vier Stämme ließ sich darüber hinaus eine Steigerung der Absorption um mehr als 50 % dokumentieren (Abb. 3.26 (A)). Die gaschromatographische Quantifizierung der gebildeten Gärungsprodukte verifizierte sieben Stämme als positiv, die eine vergleichend zum parentalen Stamm um mindestens 20 % gesteigerte Butanolproduktion zeigten (Abb. 3.26 (B), Tab. 3.5).

In einem weiteren Experiment sollte die gesteigerte Butanolproduktion der selektierten Mutanten nochmals verifiziert werden. Zu diesem Zweck wurden die isolierten Stämme und der Parentalstamm (*C. acetobutylicum* Wildtyp) zu jeweils fünf Replikaten in 10 ml

MS-MES kultiviert. Im Anschluss an die anaerobe Inkubation bei 37 °C über 72 h erfolgten Probenahmen, bevor zellfreie Überstände gaschromatographischen Messungen (2.4.3.) unterzogen wurden. Die Resultate dieser Analysen sind in Tabelle 3.6 dargestellt.

Tab. 3.6: Gärungsprodukte des Parentalstamms *C. acetobutylicum* Wildtyp und der selektierten MNU-Mutanten. Die Tabelle stellt die von den Stämmen gebildeten Konzentrationen an Acetat, Butyrat, Aceton, Ethanol und Butanol nach 72 h Wachstum in 10 ml MS-MES dar. Gezeigt sind Mittelwerte aus je fünf Replikaten pro Stamm mit entsprechenden Standardabweichungen. Mutanten, bei denen eine um mindestens 20 % gesteigerte Butanolproduktion verifiziert werden konnte, sind fett gedruckt.

Stamm	Produkte (mM)				
	Acetat	Butyrat	Aceton	Ethanol	Butanol
Wildtyp	31 ± 3	8 ± 2	36 ± 3	23 ± 1	71 ± 4
2D8	22 ± 2	6 ± 4	38 ± 3	30 ± 6	97 ± 8
2E8	28 ± 2	3 ± 2	41 ± 4	25 ± 3	90 ± 9
3E8	21 ± 3	2 ± 1	46 ± 3	32 ± 3	96 ± 9
5B5	26 ± 1	3	41 ± 5	29 ± 3	83 ± 6
5B7	26 ± 2	3 ± 1	38 ± 3	29 ± 1	83 ± 5
8C9	32 ± 1	8 ± 1	32 ± 2	21 ± 2	68 ± 3
8F9	26 ± 1	4 ± 2	38 ± 4	40 ± 2	97 ± 6

Für vier der im vorangegangenen Verifikationsexperiment als positiv bewerteten Mutantenstämme (Tab. 3.5) ließ sich eine 20 %ige Steigerung der Butanolproduktion reproduzierbar verifizieren (Tab. 3.6, Abb. 3.27).

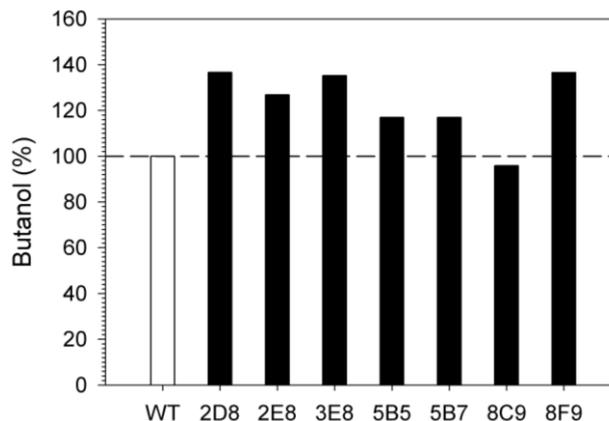


Abb. 3.27: Butanolproduktion untersuchter MNU-Mutanten vergleichend zum Parentalstamm *C. acetobutylicum* Wildtyp. Die Mutanten und der Wildtyp-Parentalstamm (WT) wurden jeweils in 10 ml MS-MES kultiviert und nach 72 h beprobt. Zellfreie Überstände wurden gaschromatographisch vermessen. Das Diagramm gibt die prozentuale Butanolproduktion von Parentalstamm und untersuchten Mutanten wider. Die vom parentalen Stamm gebildete Butanolkonzentration wurde dabei als Bezugsgröße festgelegt (100 %) und die der untersuchten Mutanten prozentual dazu ins Verhältnis gesetzt.

Eine Zusammenfassung des Screenings der Mutantenpopulation von *C. acetobutylicum* Wildtyp zeigt die folgende Abbildung (Abb. 3.28).

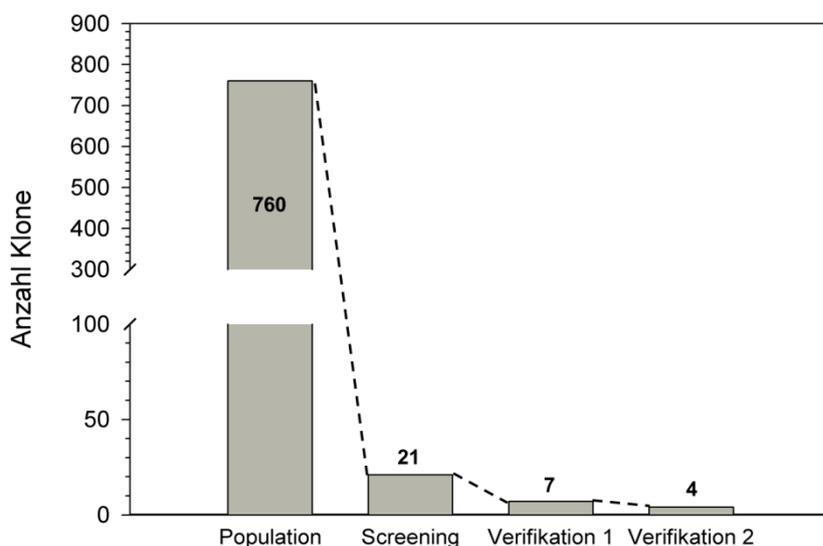


Abb. 3.28: NBT-Assay zur Identifikation von Stämmen mit gesteigerter Butanolproduktion in einer Mutantenpopulation von *C. acetobutylicum* Wildtyp: Verlauf des semi-quantitativen Butanol-Screenings. Die Abbildung zeigt die Gesamtgröße der nach MNU-Mutagenese von *C. acetobutylicum* Wildtyp und Vorselektion auf Butanol-haltigen Agarplatten erstellten Population, die Anzahl der Klone, die mittels Screening in 96-Well-Mikrotiterplatten selektiert wurden und die Zahl der Mutanten die nach erneutem NBT-Assay und GC-Analysen (Verifikation 1) und darauffolgenden gaschromatographischen Untersuchungen mehrerer Replikate (Verifikation 2) als positiv charakterisiert wurden.

3.4.1.5. Wachstumsphysiologische Charakterisierung selektierter MNU-Mutanten von *C. acetobutylicum* Wildtyp

Die positiven Mutanten wurden im Anschluss an die Verifikationsexperimente (3.4.1.4.) detailliert hinsichtlich des Wachstumsverhaltens und des von ihnen gebildeten Produktspektrums in Gegenüberstellung zu *C. acetobutylicum* Wildtyp charakterisiert. Dafür erfolgten anaerobe Kultivierungen der Stämme in je 200 ml MS-MES (2.2.1.) bei 37 °C und Probenahmen, um die Optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) und den pH-Wert der Kulturen zu messen (2.4.1.). Zellfreie Überstände dienten der gaschromatographischen Bestimmung (2.4.3.) der Gärungsprodukte Acetat, Butyrat, Aceton, Ethanol und Butanol sowie der Ermittlung des Glucose-Umsatzes (2.4.2.). Tabelle 3.7 fasst die Ergebnisse der wachstumsphysiologischen Analysen zusammen.

Tab. 3.7: Physiologische Parameter der *C. acetobutylicum*-Mutanten 2D8, 2E8, 3E8 und 8F9 im Vergleich zu *C. acetobutylicum* Wildtyp. Die Tabelle zeigt Wachstumsraten (μ) und Verdopplungszeiten (t_D), die von den Stämmen gebildeten Konzentrationen der Gärungsprodukte, sowie den Glucose-Verbrauch. Dokumentiert sind jeweils Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchsreihen.

Parameter	<i>C. acetobutylicum</i> -Stamm				
	Wildtyp	2D8	2E8	3E8	8F9
μ (h^{-1})	0,174	0,138	0,136	0,137	0,15
t_D (min)	240	300	309	303	279
Acetat (58 h, mM)	30	20	15	30	20
Acetat (90 h, mM)	22	18	16	17	18
Butyrat (58 h, mM)	8	3	0	8	3
Butyrat (90 h, mM)	3	3	1	0	4
Aceton (58 h, mM)	40	58	53	41	69
Aceton (90 h, mM)	79	66	59	70	79
Ethanol (58 h, mM)	21	39	55	21	39
Ethanol (90 h, mM)	23	43	62	43	42
Butanol (58 h, mM)	65	122	113	66	122
Butanol (90 h, mM)	130	146	139	134	137
Glucose-Umsatz ($g \cdot l^{-1}$)	44	56	45	51	56
Butanol-Produktivität (24 – 58 h, $g \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$)	0,14	0,24	0,24	0,14	0,25

In der folgenden Abbildung (Abb. 3.29) sind die in den Kultivierungsexperimenten ermittelten wachstumsphysiologischen Parameter der untersuchten Stämme grafisch dargestellt.

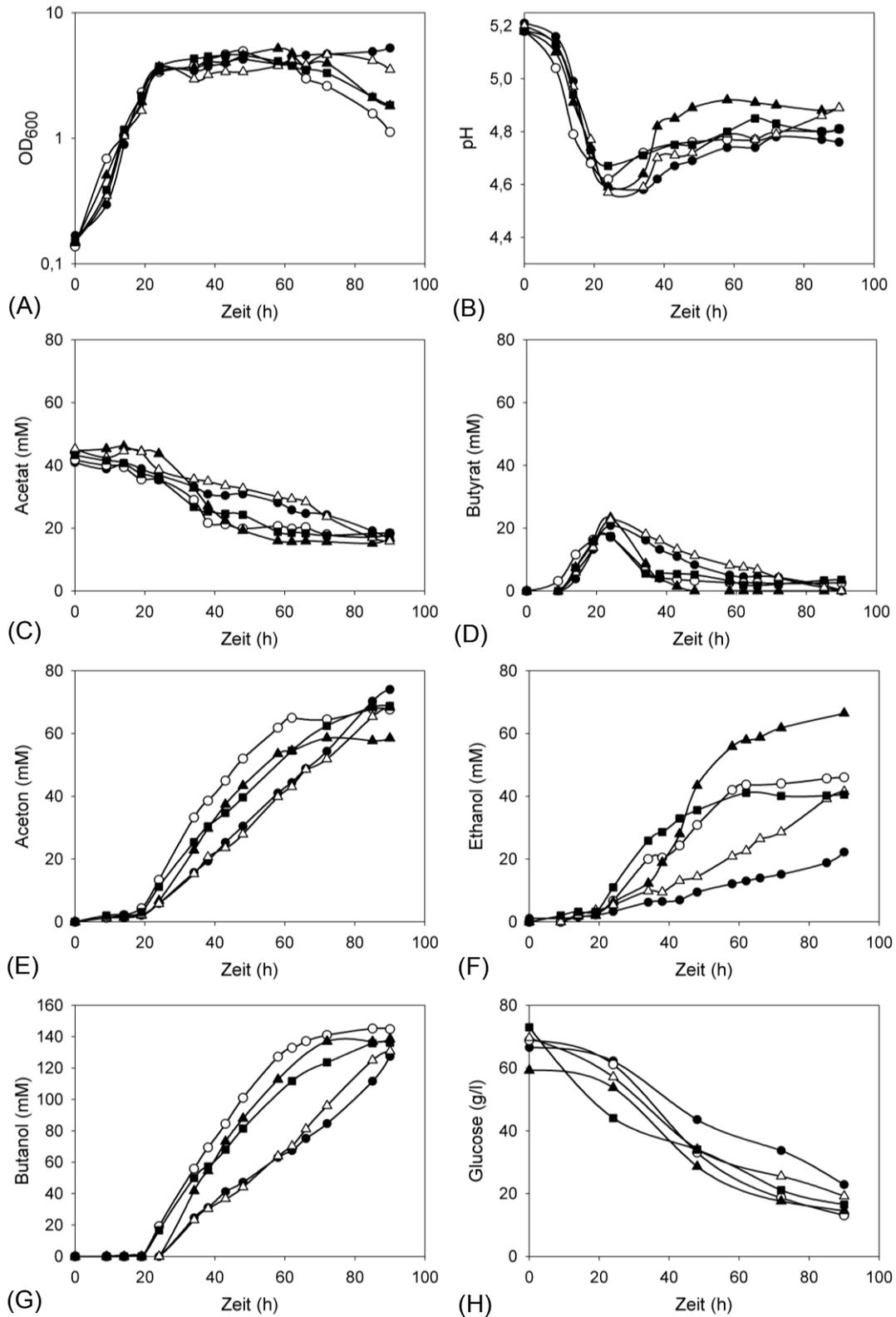


Abb. 3.29: Wachstumsphysiologische Charakterisierung selektierter MNU-Mutanten im Vergleich zum Parentalstamm *C. acetobutylicum* Wildtyp. Dargestellt ist der Verlauf der Optischen Dichte (A) und des pH-Wertes (B), die Konzentrationen an Acetat (C), Butyrat (D), Aceton (E), Ethanol (F) und Butanol (G), sowie der Glucose-Verbrauch (H). Die Kultivierungen erfolgten im 200 ml-Maßstab in jeweils zwei unabhängigen Experimenten pro Stamm. Gezeigt sind exemplarisch die Ergebnisse eines Wachstumsversuchs der *C. acetobutylicum*-Stämme Wildtyp (●), 2D8 (○), 2E8 (▲), 3E8 (△) und 8F9 (■).

Alle in diesen Kultivierungsexperimenten untersuchten Mutantenstämme zeigten im Vergleich zum Parentalstamm *C. acetobutylicum* Wildtyp niedrigere Wachstumsraten und damit einhergehende erhöhte Verdopplungszeiten (Tab. 3.7). Während für den Wildtyp eine Zunahme der Optischen Dichte bis zum Ende des Versuchs beobachtet werden konnte, nahm die OD_{600} in den Mutantenkulturen im späteren Verlauf der stationären Phase stetig ab. Die geringsten Werte wurden hierbei für die *C. acetobutylicum*-Stämme 2D8, 2E8 und 8F9 dokumentiert. Die Optische Dichte dieser Stämme fiel nach 90-stündiger Inkubation unter 2 (Abb. 3.29 (A)).

Kennzeichnend für den biphasischen Fermentationsmetabolismus von *C. acetobutylicum* (Andersch *et al.*, 1983; Hartmanis & Gatenbeck, 1984; Dürre *et al.*, 1987) sank der pH-Wert in der Kultur des parentalen Stamms und in denen der Mutanten innerhalb des exponentiellen Wachstums und stieg mit Beginn der stationären Phase an. Bezüglich des pH-Verlaufs waren zwischen Mutanten und Wildtyp trotz der beobachteten, für *C. acetobutylicum* typischen Tendenz mitunter deutliche Unterschiede erkennbar. Die Zunahme des pH-Wertes setzte bei *C. acetobutylicum* 2D8, *C. acetobutylicum* 2E8 und *C. acetobutylicum* 8F9 zu einem früheren Zeitpunkt des Wachstumsverlaufs ein und lief vor allem bei *C. acetobutylicum* 2E8 signifikant schneller ab. Dies drückte sich in einem im Vergleich zum Parentalstamm steileren Anstieg der pH-Kurve aus. Zudem ließen sich für alle Mutantenstämme vergleichend zu *C. acetobutylicum* Wildtyp höhere pH-Endwerte dokumentieren. So lag der Wert beispielsweise für *C. acetobutylicum* 2E8 bei 4,92, in der Kultur des Wildtyps hingegen bei 4,78 (Abb. 3.29 (B))

Die Unterschiede zwischen Mutanten und Wildtyp im pH-Verlauf spiegelten sich im Fermentationsprofil der Stämme wider. Mutanten, in deren Kulturen ein frühzeitiger Anstieg des pH-Werts zu verzeichnen war, zeigten auch eine rascher beginnende Assimilation der Säuren Butyrat und Acetat. *C. acetobutylicum* 2D8, *C. acetobutylicum* 2E8 und *C. acetobutylicum* 8F9 reassimilierten Butyrat bereits nach einer Inkubationszeit von 48 h annähernd vollständig. Die Acetatkonzentration der Stämme 2D8 und 8F9 fiel nach 58 h auf die Hälfte des Ausgangswerts. In zellfreien Überständen von *C. acetobutylicum* 2E8 wurden zu diesem Zeitpunkt nur noch 15 mM Acetat detektiert (Abb. 3.29 (C), (D)).

Hinsichtlich der Lösungsmittelproduktion konnten bei dem Vergleich von *C. acetobutylicum* Wildtyp und MNU-Mutanten weitere Unterschiede aufgezeigt werden. Die Stämme *C. acetobutylicum* 2D8, *C. acetobutylicum* 2E8 und *C. acetobutylicum* 8F9 waren durch eine zunächst verstärkte Acetonbildung gekennzeichnet, d. h. sie produzierten in kürzerer Zeit größere Mengen an Aceton als der parentale Stamm. Zum Ende der Fermentation relativierten sich die Unterschiede

in der Acetonproduktion wieder. Die Mutanten bildeten Aceton-Endkonzentrationen, die denen des Wildtyps ähnlich oder wie im Fall von *C. acetobutylicum* 2E8 um 25 % verringert waren (Abb. 3.29 (E)).

Weiterhin zeichneten sich alle hier analysierten Mutanten durch eine deutlich erhöhte Ethanolproduktion aus. Diese war bei *C. acetobutylicum* 2D8, *C. acetobutylicum* 3E8 und *C. acetobutylicum* 8F9 vergleichend zum Parentalstamm verdoppelt. Die von *C. acetobutylicum* 2E8 gebildete Endkonzentration an Ethanol erreichte nahezu dreifach höhere Werte als die des Wildtyps (Abb. 3.29 (F)).

Die Butanolproduktion der Stämme 2D8, 2E8 und 8F9 setzte im Verhältnis zu der von *C. acetobutylicum* Wildtyp zu einem früheren Zeitpunkt der Kultivierung ein. Außerdem zeigten die Stämme zu Beginn der stationären Wachstumsphase eine signifikant erhöhte Butanol-Produktivität. Die maximale Produktivität der Mutanten 2D8, 2E8 und 8F9 nahm Werte zwischen 0,24 und 0,25 g Butanol·l⁻¹·h⁻¹ ein, während die des Wildtyps bei 0,14 g Butanol·l⁻¹·h⁻¹ lag (Tab. 3.7). Die Steigerung der Butanol-Produktivität drückte sich ebenfalls in den absoluten Konzentrationen aus. Die Butanolkonzentration der drei Mutantenstämme erreichte nach 58 h Werte zwischen 113 und 122 mM, die Konzentration des vom Parentalstamm produzierten Butanols belief sich zu diesem Zeitpunkt auf nur 65 mM. Obwohl die Butanolproduktion der o. g. Mutanten zu Beginn der stationären Phase beschleunigt war, kam es im weiteren Verlauf der Kultivierung zu einer Annäherung der Butanolemengen von Wildtyp und Mutantenstämmen, so dass sich bezüglich der Endkonzentrationen lediglich geringe Unterschiede ergaben (Abb. 3.29 (G)). Eine 20 %ige Steigerung der Butanolproduktion, welche für die MNU-Mutanten in zuvor durchgeführten Experimenten (3.4.1.4.) dokumentiert wurde, konnte nicht bestätigt werden.

Weitere Unterschiede zwischen Wildtyp und MNU-Mutanten ergaben sich in Bezug auf den Glucose-Verbrauch. Die Mutanten setzten die Glucose innerhalb des Wachstumsverlaufs schneller um als der Parentalstamm (Abb. 3.29 (F)), so dass für die analysierten Mutanten im Vergleich zum Wildtyp niedrigere Glucose-Endkonzentrationen gemessen wurden.

3.4.2. Chemische Mutagenese von *C. acetobutylicum* *adc::Int(180)* und Screening der Population

Innerhalb eines zweiten Anwendungsbeispiels sollte der NBT-Assay erneut genutzt werden, um in einer durch chemische Mutagenese erstellten *C. acetobutylicum*-Population Mutanten mit einer vergleichend zum Parentalstamm gesteigerten Butanolproduktion zu isolieren. Die Herstellung der zu screenenden Populationen erfolgte ebenfalls unter Verwendung von N'-Methyl-N'-nitrosourea (MNU). Als Ausgangsstamm diente *C. acetobutylicum* *adc::Int(180)*, ein Acetat-Decarboxylase-negativer Stamm, der im Rahmen einer anderen Arbeit mittels CloStron-System erstellt wurde (Heap *et al.*, 2007, 2010; Lehmann, 2012, Dissertation). Die Insertion eines Gruppe II-Introns in das *adc*-Gen führte im Produktspektrum des Stamms zu einer deutlichen Reduktion des bei der industriellen Butanolherstellung unerwünschten Nebenprodukts Aceton, wirkte sich jedoch auch negativ auf die Butanolproduktion aus. So bildete *C. acetobutylicum* *adc::Int(180)* lediglich ca. 50 % der für *C. acetobutylicum* Wildtyp dokumentierten Konzentration an Butanol (Lehmann *et al.*, 2012a). In Anwendung des entwickelten Assays sollten in der von *C. acetobutylicum* *adc::Int(180)* abgeleiteten Population Mutanten identifiziert werden, die sich neben der verringerten Acetonbildung durch eine weniger stark beeinträchtigte Butanolproduktion auszeichneten. Die allgemeine Vorgehensweise für die hier vorgesehene zweite Anwendung des NBT-Assays ist unter 3.4. und in Abbildung 3.24 beschrieben. Details zu einzelnen experimentellen Schritten im Hinblick auf die Generierung der Mutantenpopulation und die Isolation entsprechender positiver Stämme sind im Folgenden erläutert.

3.4.2.1. Bestimmung der Überlebensrate von *C. acetobutylicum* *adc::Int(180)* nach Exposition mit MNU

Der vorbereitende Schritt zur Erstellung der Mutantenpopulation lag in der Bestimmung der Zytotoxizität des MNU. Dafür wurde eine exponentiell wachsende Kultur von *C. acetobutylicum* *adc::Int(180)* mit 500 µg/ml MNU (500 µg/ml) versetzt. Es folgten Probenahmen nach festgelegten Expositionszeiten und das Ausplattieren von Kulturaliquots auf RCA (2.2.1.). Die Auswertung dieses Versuchs gelang durch Bestimmung der Anzahl koloniebildender Einheiten (colony forming units, CFU; 2.6.1.) im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollkultur (Abb. 3.30).

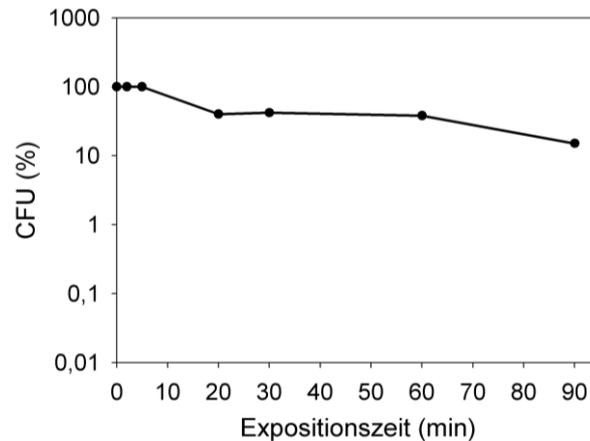


Abb. 3.30: Bestimmung der Überlebensrate von *C. acetobutylicum* *adc::Int(180)* nach Exposition mit MNU. Dargestellt sind die prozentualen Werte bezüglich der Anzahl koloniebildender Einheiten (colony forming units, CFU) der mit MNU behandelten Kultur von *C. acetobutylicum* *adc::Int(180)* im Vergleich zur unbehandelten Kontrollkultur zu unterschiedlichen Expositionszeiten.

Die Behandlung der Kultur von *C. acetobutylicum* *adc::Int(180)* mit MNU hatte innerhalb kurzzeitiger Expositionsintervalle keinen Einfluss auf die CFU-Werte. So ergaben sich nach fünfminütiger Exposition der Zellen mit dem mutagenen Stoff bezüglich der CFU keine Unterschiede zwischen der mit MNU versetzten Kultur und der unbehandelten Kontrollkultur. Eine toxische Wirkung des MNU ließ sich erst infolge verlängerter Expositionszeiten erkennen. Die Inkubation mit MNU über 20 min zog eine Verringerung der koloniebildenden Einheiten um 60 % nach sich. Eine Inkubationszeit von 90 min führte zur Abnahme der CFU-Werte der MNU-behandelten Kultur auf 15 %. Für die anschließende chemische Mutagenese von *C. acetobutylicum* *adc::Int(180)* (3.4.2.2.) wurde die MNU-Expositionszeit auf 60 min festgelegt, um eine Überlebensrate von ca. 40 % zu gewährleisten.

3.4.2.2. MNU-Mutagenese von *C. acetobutylicum* *adc::Int(180)* und Screening der Mutantenpopulation mittels NBT-Assay

Im Anschluss an die Bestimmung der Überlebensrate von *C. acetobutylicum* *adc::Int(180)* nach MNU-Exposition (3.4.2.1.) erfolgte die Generierung einer Mutantenpopulation, welche in darauffolgenden Experimenten unter Anwendung des NBT-Assays analysiert werden sollte. Zu diesem Zweck wurde eine exponentiell wachsende Kultur des Stamms mit 500 µg/ml MNU für 60 min anaerob bei 37 °C inkubiert, bevor sich das Ausplattieren der derart behandelten Zellsuspension auf $RCA_{\text{Erythromycin}}$ (2.2.1.) anschloss. Einzelkolonien bildeten die Grundlage zur Erstellung der zu screenenden Population, die insgesamt 4390 Klone umfasste (Abb. 3.33).

Auf die Erstellung der Mutantenpopulation von *C. acetobutylicum adc::Int(180)* folgte das Screening mittels NBT-Assay, um Mutanten mit einer verbesserten Butanolproduktion zu identifizieren. Die diesbezüglich angewandten experimentellen Schritte sind unter 3.4.1.3. nachzuvollziehen.

Von insgesamt 4390 analysierten Mutanten wurden 93 Klone innerhalb des Screenings in 96-Well-Mikrotiterplatten als potentiell positiv charakterisiert (Abb. 3.33). Sie zeigten eine im Vergleich zum Parentalstamm um mindestens 50 % gesteigerte Formazanbildung.

3.4.2.3. Verifikation potentiell positiver MNU-Mutanten von *C. acetobutylicum adc::Int(180)*

Zur Bestätigung der gesteigerten Butanolproduktion der unter Anwendung des NBT-Assays in Mikrotiterplatten als potentiell positiv identifizierten Stämme (3.4.2.2.), wurden die entsprechenden Mutanten mehreren Verifikationsexperimenten unterzogen. Die experimentellen Abläufe entsprachen den innerhalb der Verifikation putativ positiver Wildtyp-Mutantenstämme genutzten Versuchsschritten und sind in Abschnitt 3.4.1.4. erläutert. Die folgende Abbildung (Abb. 3.31) dokumentiert die Resultate der Verifikationsexperimente.

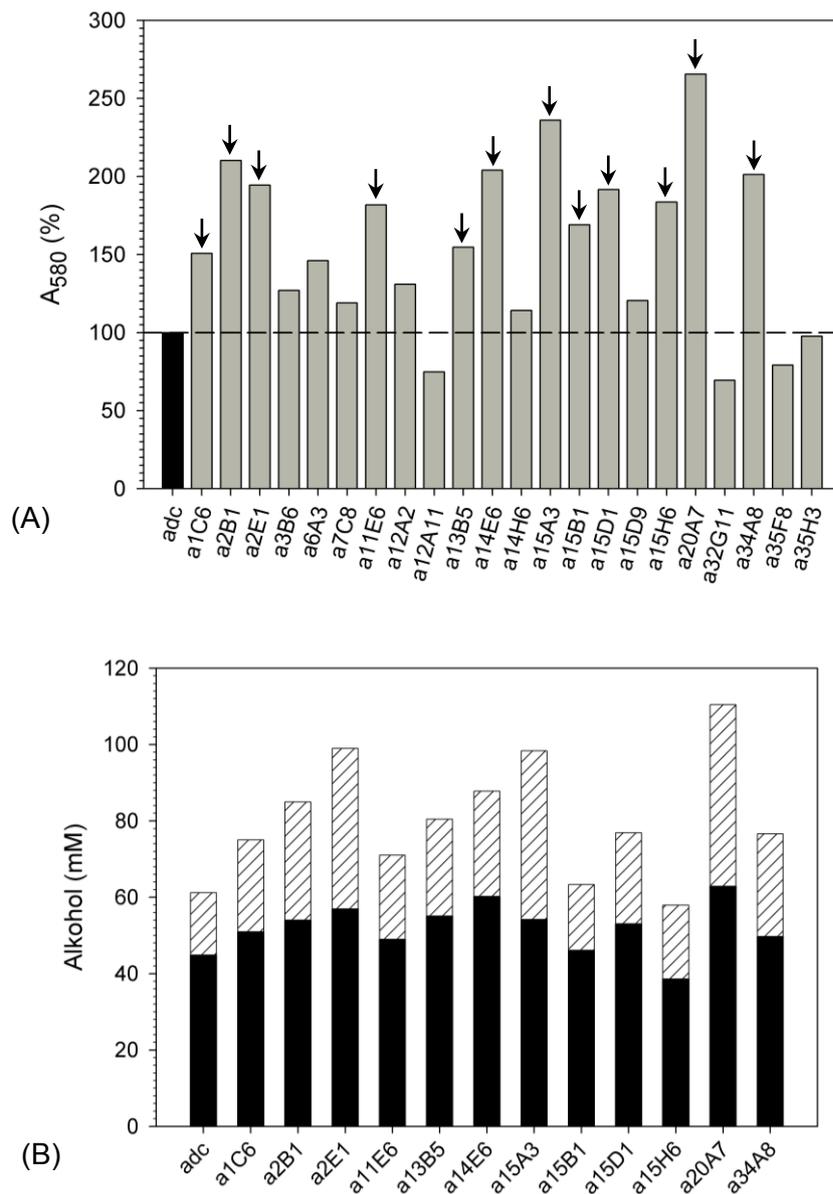


Abb. 3.31: Prozentuale Formazanbildung des Parentalstamms *C. acetobutylicum* *adc::Int(180)* und untersuchter MNU-Mutanten. (A): Die vom parental Stamm (*adc*, schwarzer Balken) nach NBT-Assay erreichte Absorption bei 580 nm wurde als Bezugsgröße festgelegt (100 %, gestrichelte Linie) und die Formazanbildung der zu überprüfenden Mutanten (graue Balken) prozentual dazu ins Verhältnis gesetzt. Gezeigt sind exemplarisch die Ergebnisse für 23 der zuvor isolierten 93 potentiell positiven Mutanten. Die durch Pfeile markierten Stämme zeigten eine um mindestens 50 % gesteigerte Absorption. (B): Die zellfreien Überstände der positiven Mutanten wurden gaschromatographisch untersucht. Das Diagramm zeigt die in den Proben quantifizierte Gesamtalkoholkonzentration, sowie die Konzentrationen an Butanol (schwarze Balken) und Ethanol (schraffierte Balken) nach 72 h Wachstum.

In der nachfolgenden Tabelle (Tab. 3.8) sind die über gaschromatographische Analysen ermittelten Konzentrationen der Gärungsprodukte der putativ positiven MNU-Mutanten im Vergleich zu *C. acetobutylicum adc::Int(180)* aufgeführt.

Tab. 3.8: Produktkonzentrationen des Parentalstamms *C. acetobutylicum adc::Int(180)* und der potentiell positiven Mutanten. Die Tabelle zeigt die Konzentrationen der von den putativ positiven Stämmen gebildeten Gärungsprodukte nach einer Inkubationszeit von 72 h. Die schließlich als positiv bewerteten Klone mit einer um mindestens 20 % gesteigerten Butanolproduktion sind fett gedruckt.

Stamm	Produkte (mM)				
	Acetat	Butyrat	Aceton	Ethanol	Butanol
<i>adc::Int(180)</i>	62	0	6	16	45
a1C6	71	0	8	24	51
a2B1	68	0	9	31	54
a2E1	69	0	8	42	57
a11E6	64	0	7	22	49
a13B5	68	0	6	25	55
a14E6	56	0	4	28	60
a15A3	62	0	6	44	54
a15B1	64	0	5	17	46
a15D1	69	0	3	24	53
a15H6	69	0	6	19	39
a20A7	64	0	8	48	63
a34A8	59	0	5	27	50

Die Verifikationsexperimente bestätigten für 12 der im Screening isolierten 93 potentiell positiven Mutanten eine um mindestens 50 % gesteigerte Formazanbildung (Abb. 3.31 (A)). GC-Analysen ergaben für sechs dieser Mutanten eine im Vergleich zum Parentalstamm erhöhte Butanolproduktion um mindestens 20 % (Abb. 3.31 (B), Tab. 3.8).

In einem weiteren Versuch, sollte die gesteigerte Butanolproduktion der selektierten Mutanten reproduziert werden. Zu diesem Zweck wurden die isolierten Stämme und der Parentalstamm *C. acetobutylicum adc::Int(180)* zu jeweils fünf Replikaten in 10 ml MS-MES (2.2.1.) kultiviert. Im Anschluss an die anaerobe Inkubation (37 °C) über 72 h erfolgten Probenahmen und gaschromatographische Messungen (2.4.3) zellfreier Überstände. Die Resultate dieser Analysen sind in Tabelle. 3.9 dargestellt.

Tab. 3.9: Gärungsprodukte des Parentalstamms *C. acetobutylicum* *adc::Int(180)* und analysierter MNU-Mutanten. Die Tabelle stellt die von den Stämmen gebildeten Konzentrationen an Acetat, Butyrat, Aceton, Ethanol und Butanol nach 72 h Wachstum in 10 ml MS-MES dar. Gezeigt sind Mittelwerte aus je fünf Replikaten pro Stamm mit entsprechenden Standardabweichungen. Mutanten, bei denen eine um mindestens 20 % gesteigerte Butanolproduktion verifiziert werden konnte, sind fett gedruckt.

Stamm	Produkte (mM)				
	Acetat	Butyrat	Aceton	Ethanol	Butanol
<i>adc::Int(180)</i>	68 ± 2	0	7	19 ± 2	50 ± 2
a2B1	58 ± 5	0	8 ± 1	27 ± 7	58 ± 5
a2E1	71 ± 1	0	8 ± 1	36 ± 15	61 ± 12
a13B5	67 ± 1	0	7	39 ± 5	66 ± 2
a14E6	64 ± 2	0	7	35 ± 5	72 ± 4
a15A3	66 ± 3	0	7	31 ± 10	54 ± 4
a20A7	66 ± 3	0	7	36 ± 10	65 ± 4

Für drei der im vorangegangenen Verifikationsexperiment als positiv bewerteten Mutantenstämme (Tab. 3.8) konnte eine 20 %ige Steigerung der Butanolproduktion reproduzierbar verifiziert werden (Tab. 3.9, Abb. 3.32).

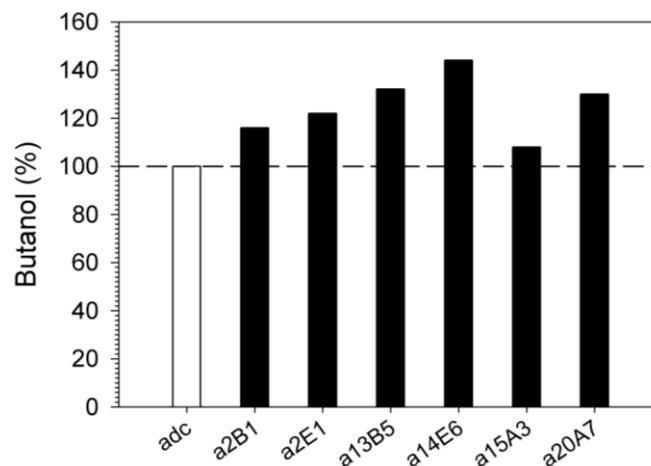


Abb. 3.32: Butanolproduktion untersuchter MNU-Mutanten im Vergleich zum Parentalstamm *C. acetobutylicum* *adc::Int(180)*. Die Mutanten und der Parentalstamm *C. acetobutylicum* *adc::Int(180)* (*adc*) wurden jeweils in 10 ml MS-MES kultiviert und nach 72 h beprobt. Zelfreie Überstände wurden gaschromatographisch vermessen. Das Diagramm gibt die prozentuale Butanolproduktion von Parentalstamm und untersuchten Mutanten wider. Die vom parentalen Stamm gebildete Butanolkonzentration wurde dabei als Bezugsgröße festgelegt (100 %) und die Butanolproduktion der untersuchten Stämme prozentual dazu ins Verhältnis gesetzt.

Eine Zusammenfassung des Screenings der Mutantenpopulation von *C. acetobutylicum* *adc::Int(180)* ist in der folgenden Abbildung (Abb. 3.33) gezeigt.

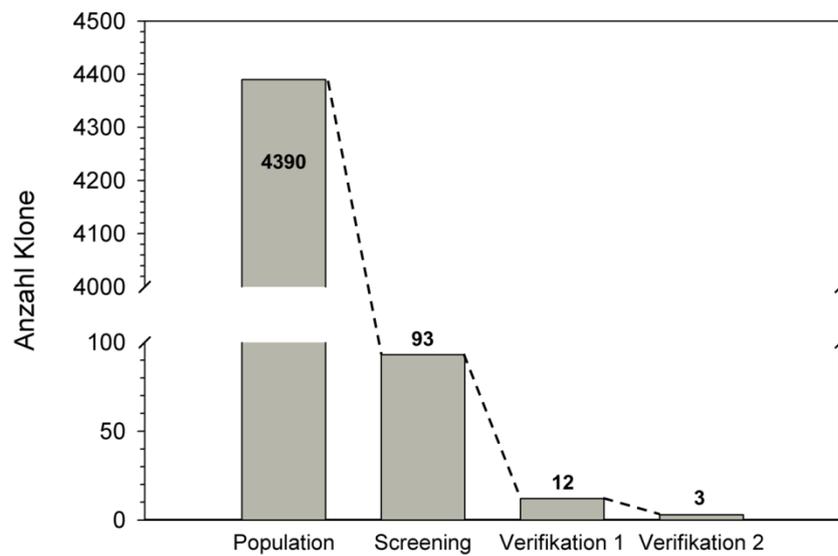


Abb. 3.33: NBT-Assay zur Identifikation von Stämmen mit gesteigerter Butanolproduktion in einer Mutantenpopulation von *C. acetobutylicum* *adc::Int(180)*: Verlauf des semi-quantitativen Butanol-Screenings. Die Abbildung zeigt die Gesamtgröße der nach MNU-Mutagenese von *C. acetobutylicum* *adc::Int(180)* erstellten Population, die Anzahl der Klone, die mittels Screening in 96-Well-Mikrotiterplatten selektiert wurden und die Zahl der Mutanten die nach erneutem NBT-Assay und GC-Analysen (Verifikation 1) und darauffolgenden gaschromatographischen Untersuchungen mehrerer Replikate (Verifikation 2) als positiv charakterisiert wurden.

3.4.2.4. Wachstumsphysiologische Charakterisierung selektierter MNU-Mutanten von *C. acetobutylicum* *adc::Int(180)*

Die positiven Mutanten wurden im Anschluss an die Verifikationsexperimente (3.4.2.3.) detailliert bezüglich des Wachstumsverhaltens und des Produktspektrums in Gegenüberstellung zu *C. acetobutylicum* *adc::Int(180)* und *C. acetobutylicum* Wildtyp charakterisiert. Dafür erfolgten die anaerobe Kultivierung der Stämme in je 200 ml MS-MES (2.2.1.) bei 37 °C und Probenahmen, um die Optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) und den pH-Wert der Kulturen zu messen (2.4.1.). Zellfreie Überstände dienten der gaschromatographischen Bestimmung der Gärungsprodukte Acetat, Butyrat, Aceton, Ethanol und Butanol (2.4.3.). Tabelle 3.10 fasst die Ergebnisse der wachstumsphysiologischen Analysen zusammen.

Tab. 3.10: Physiologische Parameter der *C. acetobutylicum*-Mutanten 13B5, 14E6 und 20A7 im Vergleich zu *C. acetobutylicum* Wildtyp und *C. acetobutylicum* *adc::Int(180)*. Die Tabelle zeigt Wachstumsraten (μ) und Verdopplungszeiten (t_D), sowie die von den Stämmen gebildeten Konzentrationen an Acetat, Butyrat, Aceton, Ethanol und Butanol. Dokumentiert sind jeweils Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchsreihen und entsprechende Standardabweichungen. Die BE/A-Ratio gibt das Verhältnis der Alkohole Butanol und Ethanol zu Aceton an.

Parameter	<i>C. acetobutylicum</i> -Stamm				
	Wildtyp	<i>adc::Int</i>	a13B5	a14E6	a20A7
μ (h^{-1})	0,172	0,151	0,164	0,169	0,16
t_D (min)	242	276	254	246	260
Acetat (90 h, mM)	23 \pm 5	71 \pm 4	67 \pm 10	62 \pm 7	74 \pm 4
Butyrat (90 h, mM)	5 \pm 3	0	0	0	0
Aceton (90 h, mM)	74 \pm 8	10 \pm 1	9 \pm 2	10 \pm 2	9 \pm 1
Ethanol (90 h, mM)	21 \pm 3	45 \pm 10	36 \pm 6	65 \pm 14	36 \pm 8
Butanol (90 h, mM)	124 \pm 11	68 \pm 3	66 \pm 6	86 \pm 4	72 \pm 7
BE/A-Ratio	2	11	11	15	12

In der folgenden Abbildung (Abb. 3.34) sind die in den Kultivierungsexperimenten ermittelten wachstumsphysiologischen Parameter der untersuchten Stämme grafisch dargestellt.

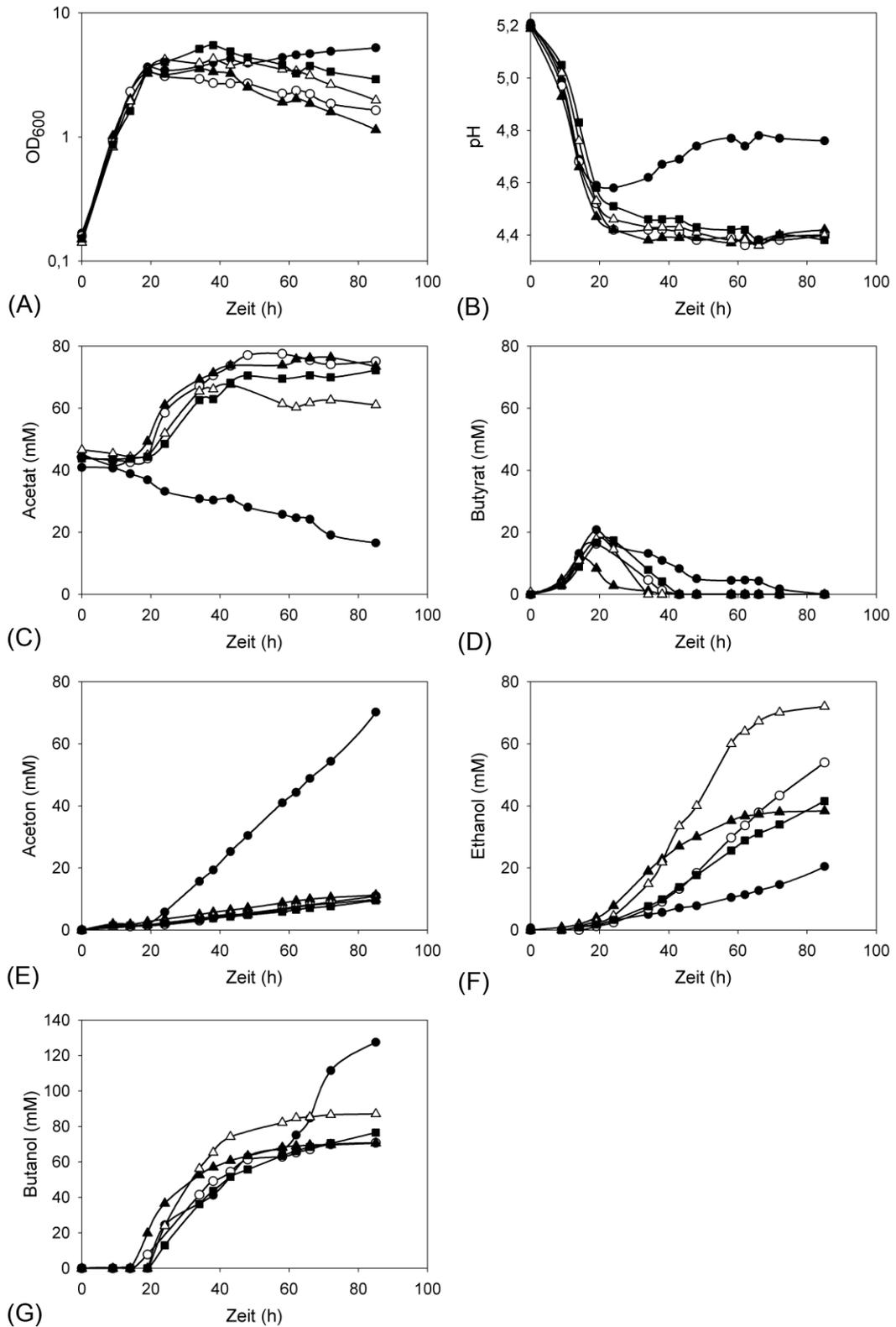


Abb. 3.34: Wachstumsphysiologische Charakterisierung selektierter MNU-Mutanten im Vergleich zum Parentalstamm *C. acetobutylicum* *adc::Int(180)*, sowie zum Wildtyp. Dargestellt ist der Verlauf der Optischen Dichte (A) und des pH-Wertes (B), sowie die Konzentrationen an Acetat (C), Butyrat (D), Aceton (E), Ethanol (F) und Butanol (G). Die Kultivierungen erfolgten im 200 ml-Maßstab in jeweils drei unabhängigen Experimenten pro Stamm. Gezeigt sind exemplarisch die Ergebnisse eines Wachstumsversuchs der *C. acetobutylicum*-Stämme Wildtyp (●), *adc::Int(180)* (○), a13B5 (▲), a14E6 (△) und a20A7 (■).

Für *C. acetobutylicum* *adc::Int(180)* und die aus diesem Stamm erzeugten Mutanten ergaben sich innerhalb der oben dargestellten Kultivierungsexperimente bezüglich des Wachstumsverlaufs im Vergleich zu *C. acetobutylicum* Wildtyp unterschiedliche Resultate. *C. acetobutylicum* *adc::Int(180)* und die *C. acetobutylicum*-Mutanten a13B5 und a20A7 zeigten niedrigere Wachstumsraten und dementsprechend höhere Verdopplungszeiten. *C. acetobutylicum* a14E6 erreichte Werte, die denen des Wildtyps ähnlich waren (Tab. 3.10). Die Optische Dichte in der Kultur von *C. acetobutylicum* Wildtyp nahm bis zum Ende des Versuchs zu, für *C. acetobutylicum* *adc::Int(180)* und die Mutantenstämme hingegen wurde eine stetige Abnahme der OD₆₀₀ im späteren Verlauf der stationären Phase beobachtet (Abb. 3.34 (A)).

Der aus dem biphasischen Fermentationsmetabolismus (Andersch *et al.*, 1983; Hartmanis & Gatenbeck, 1984; Dürre *et al.*, 1987) der Clostridien hervorgehende typische pH-Verlauf ließ sich anhand der in der Kultur des Wildtyps gemessenen pH-Werte erkennen. Diese sanken innerhalb des exponentiellen Wachstums, um dann mit Beginn der stationären Phase wieder anzusteigen. Ein derartiger pH-Verlauf konnte für *C. acetobutylicum* *adc::Int(180)* und die untersuchten MNU-Mutanten nicht verzeichnet werden. In deren Kulturen nahmen die pH-Werte zwar in der exponentiellen Phase ab, blieben während der stationären Phase jedoch auf einem konstant niedrigen Niveau und lagen nach 90-stündiger Inkubation zwischen 4,38 und 4,41. Vergleichend dazu wurde in der Kultur von *C. acetobutylicum* Wildtyp zum entsprechenden Zeitpunkt ein pH-Wert von 4,78 gemessen (Abb. 3.34 (B)).

Die für die analysierten Stämme dokumentierten pH-Verläufe standen im direkten Zusammenhang mit den von ihnen gebildeten Gärungsprodukten. Dies zeigte sich vor allem in Bezug auf die Produktion und Reassimilation der Säuren. Während Butyrat über den Wachstumsverlauf von allen Stämmen vollständig reassimiliert wurde, waren *C. acetobutylicum* *adc::Int(180)* und die MNU-Mutanten im Gegensatz zu *C. acetobutylicum* Wildtyp nicht zur Reassimilation von Acetat fähig. Darüber hinaus wurde bei allen Mutanten eine deutliche Acetatproduktion detektiert, die nicht für den Wildtyp beobachtet wurde. Die in Kulturüberständen von *C. acetobutylicum* a14E6 detektierten Acetatkonzentrationen waren etwas geringer als die von *C. acetobutylicum* *adc::Int(180)* und der anderen Mutantenstämme (Abb. 3.34 (C), (D)).

Auch im Hinblick auf die Lösungsmittelproduktion zeigten sich Unterschiede zwischen den zu charakterisierenden Stämmen. Die für *C. acetobutylicum* *adc::Int(180)* im Vergleich zum Wildtyp beschriebene verminderte Acetonproduktion (Lehmann *et al.*, 2012a) ließ sich ebenfalls für die MNU-Mutanten nachweisen. Die Acetonproduktion der Stämme und des Parentalstamms war in Gegenüberstellung zum Wildtyp um mehr als 85 % reduziert (Abb. 3.34 (E)).

C. acetobutylicum *adc::Int(180)* und die entsprechenden Mutantenstämme zeichneten sich durch eine zum Wildtyp erhöhte Ethanolproduktion aus. In zellfreien Überständen von *C. acetobutylicum* a14E6 wurden besonders hohe Ethanolkonzentrationen gemessen. Die von diesem Stamm nach 90 h der Kultivierung gebildete Ethanol-Endkonzentration erreichte dreifach höhere Werte als die des Wildtyps und war in Bezug auf die Endkonzentration des parentalen *adc*-negativen Stamms um 44 % gesteigert (Abb. 3.34 (F)).

Im Vergleich zu *C. acetobutylicum* Wildtyp wurde für *C. acetobutylicum* *adc::Int(180)* und die MNU-Mutanten eine signifikant reduzierte Butanolproduktion dokumentiert. Dabei wies *C. acetobutylicum* a14E6 interessanterweise eine weniger drastisch verminderte Butanolbildung auf. Die für diesen Stamm gemessenen Butanolemengen lagen zwar unter denen des Wildtyps, erlangten jedoch deutlich höhere Werte als die von *C. acetobutylicum* *adc::Int(180)*. Die Butanolproduktion von *C. acetobutylicum* a14E6 war gegenüber dem Parentalstamm um 26 % gesteigert (Abb. 3.34 (G)). Dies bedeutet, dass der bereits in vorangegangenen Verifikationsexperimenten (3.4.2.3.) als positiv charakterisierte Stamm auch im 200 ml-Maßstab als verbesserter Butanolproduzent bestätigt werden konnte. Demzufolge wurde das im Rahmen dieser Arbeit etablierte Screening-Verfahren erfolgreich zur Identifikation von Stämmen mit gesteigerter Butanolproduktion angewandt.

4. Diskussion

Im Gegensatz zu anderen Modellorganismen stehen für solventogene Clostridien kaum genetische Werkzeuge zur Verfügung, so dass Strategien des Metabolic Engineerings für diese Bakteriengruppe nur begrenzt angewendet werden können (Papoutsakis, 2008; Lütke-Eversloh & Bahl, 2011). Das klassische Metabolic Engineering basiert auf dem rationalen Design spezifischer Veränderungen des Stoffwechsels. Dabei liegt der Fokus vordergründig auf einer Reduktion der Nebenproduktbildung, um eine Steigerung der Butanolproduktion zu erzielen (Gu *et al.*, 2011). In vorangegangenen Arbeiten resultierte die Generierung entsprechender Defektmutanten von *Clostridium acetobutylicum* und *Clostridium beijerinckii* beispielsweise in der Verminderung der Acetonbildung (Tummala *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2009; Han *et al.*, 2011; Lehmann *et al.*, 2012a). Allerdings führten solche Anwendungen des klassischen Metabolic Engineerings nur bedingt zum Erfolg, da die gewünschte Eliminierung bzw. Reduktion der Nebenprodukte auch von einer negativ beeinflussten Butanolproduktion begleitet wurde (Jiang *et al.*, 2009; Lehmann *et al.*, 2012a). Derartige Ergebnisse demonstrieren die hohe physiologische Komplexität solventogener Clostridien und dokumentieren außerdem, dass ein jeweiliger Phänotyp von zahlreichen unbekanntem Parametern bestimmt wird. Aus diesem Grund können inverse Methoden von Nutzen sein, um einen interessanten Phänotyp zu selektieren. Die grundlegende Voraussetzung für den Einsatz solcher kombinatorischen Metabolic Engineering-Strategien ist das Vorhandensein einer geeigneten Screening-Methode zur Identifizierung des entsprechenden Phänotyps im Hochdurchsatz. Aus diesem Grund bestand ein Ziel dieser Arbeit in der Entwicklung eines semi-quantitativen Assays zur Visualisierung der Butanolproduktion in Kulturen von *C. acetobutylicum*.

4.1. Kultivierung von *C. acetobutylicum* in Mikrotiterplatten

Um eine spätere Anwendung des zu entwickelnden Screening-Verfahrens zu gewährleisten, war es zunächst nötig, die Kultivierbarkeit von *C. acetobutylicum* im hohen Durchsatz zu untersuchen. Die Möglichkeit zur Anzucht des Bakteriums in Mikrokulturen musste gegeben sein, um die Analyse einer Vielzahl an entsprechenden *C. acetobutylicum*-Stämmen zu ermöglichen.

Die Kultivierung unterschiedlicher Stämme von *C. acetobutylicum* in Mikrotiterplatten verlief unter Verwendung von Komplexmedien mit Erfolg (3.1., Abb. 3.1). Dabei traten bezüglich der in den Mikrokulturen erreichten Optischen Dichten mitunter starke Schwankungen auf (Abb. 3.2). Da für die Inokulation der Kulturen Einzelkolonien genutzt wurden, sind die schwankenden Werte hauptsächlich auf unterschiedliche

Mengen an eingesetztem Zellmaterial zurückzuführen. Die beobachteten Schwankungen dürfen innerhalb der Anwendung des Screenings nicht unberücksichtigt bleiben, da ein voranschreitendes Wachstum entsprechend des Fermentationsmetabolismus von *C. acetobutylicum* (Andersch *et al.*, 1983; Hartmanis & Gatenbeck, 1984; Dürre *et al.*, 1987) die Erhöhung der Alkoholkonzentration mit sich bringt. Dieser Umstand könnte im Ergebnis des Assays zu falsch-positiven Signalen führen.

In früheren Arbeiten konnte nachgewiesen werden, dass *C. acetobutylicum* in dem synthetischen MS-MES-Medium den gesamten biphasischen Fermentationsprozess durchläuft sowie im Vergleich zu Komplexmedien erhöhte Konzentrationen an Lösungsmitteln produziert (Monot *et al.*, 1982). Unter Beachtung dieser Ergebnisse sollte das Minimalmedium bei einer Anwendung des Screenings bevorzugt zur Anzucht der zu untersuchenden Stämme eingesetzt werden. Die Resultate der Kultivierungsversuche in Mikrotiterplatten wiesen jedoch darauf hin, dass das Minimalmedium nicht als Ausgangspunkt dienen konnte, da eine direkte Inokulation von MS-MES mit Einzelkolonien nicht möglich war (Abb. 3.1). Im Hinblick auf die Anwendung des Screening-Verfahrens bedeutete dies wiederum, dass die Inokulation der zur Analyse vorgesehenen Population vorab in Komplexmedien und eine anschließende Replikation der Kulturen in MS-MES erfolgen mussten, um das entsprechend favorisierte Medium für die Alkoholbestimmung in *C. acetobutylicum*-Kulturen nutzen zu können.

4.2. Entwicklung des Hochdurchsatz-Screenings

Nachdem die Kultivierbarkeit von *C. acetobutylicum* in Mikrokulturen experimentell überprüft und positiv bewertet werden konnte (3.1.), bestand der erste Schritt der Screening-Entwicklung in der Auswahl einer geeigneten Assay-Methode zur Visualisierung der clostridiellen Butanolausscheidung (3.2.).

4.2.1. Visualisierung von Butanol

Die Tatsache, dass Butanol in das Außenmedium abgegeben wird und als farblose Substanz nicht sichtbar ist, erforderte eine indirekte Nachweismethode, die die Möglichkeit zur schnellen quantitativen Butanolbestimmung liefern sollte. Im Zuge der Entwicklung des Visualisierungsverfahrens wurden unterschiedliche Assay-Methoden auf ihre Eignung überprüft.

4.2.1.1. Chemische Derivatisierung

Als erste Ausgangspunkte zur Entwicklung der indirekten Nachweismethode dienten chemische Derivatisierungen mittels Kaliumdichromat (3.2.1.1.) und Kaliumpermanganat (3.2.1.2.). Die Visualisierung von Butanol und Ethanol war in Anwendung beider Verfahren prinzipiell möglich. Das Versetzen alkoholischer Lösungen mit den entsprechenden Reagenzlösungen führte zu charakteristischen und konzentrationsabhängigen Farbumschlägen (Abb. 3.3, Abb. 3.5). Die Methoden waren zum Nachweis der durch *C. acetobutylicum* produzierten Alkohole in Kulturen jedoch nur bedingt einsetzbar, da sich unspezifische Reaktionen mit der im Kulturmedium enthaltenen Glucose ergaben (Abb. 3.4., Abb. 3.5). Dies hatte zur Folge, dass sowohl in zellfreien Überständen von *C. acetobutylicum* Wildtyp als auch des Lösungsmittel-negativen *C. acetobutylicum* DG1-Stamms (Nair, 1995; Stim-Herndon *et al.*, 1996; Cornillot *et al.*, 1997) Farbreaktionen auftraten und somit eine Differenzierung verschiedener *C. acetobutylicum*-Stämme hinsichtlich ihrer Alkoholproduktion nicht realisiert werden konnte (Abb. 3.4., Abb. 3.5). Zur Vermeidung der unspezifischen Signale sollte durch die Trennung von Zellkultur und Nachweisreagenz eine Spezifikation der Assays im Hinblick auf die Detektion flüchtiger Alkohole erfolgen. Der Kaliumdichromat-Assay erwies sich dabei aufgrund unspezifischer Farbreaktionen als ungeeignet. Die Applikation von mit Kaliumpermanganat-Lösung getränktem Filterpapier über Mikrotiterplatten resultierte in wachstumsabhängigen Farbreaktionen (Abb. 3.7). Allerdings waren die erzielten Ergebnisse häufig ungenau und nur in geringem Maße reproduzierbar, so dass sich auch diese Methode nicht als Basis für ein Butanol-Screening eignete.

4.2.1.2. NBT-Assay

Einen vielversprechenden Ansatz zur Entwicklung der indirekten Nachweismethode für die Butanolproduktion von *C. acetobutylicum* lieferte der NBT-Assay (3.2.1.3.), der bereits in mehreren vorangegangenen Arbeiten Anwendung fand. Der Assay diente der Aktivitätsbestimmung verschiedenster Enzyme (Fibla & Gonzales-Duarte, 1993; Manchenko, 1994; El Hawrani *et al.*, 1996; Mayer & Arnold, 2002) und wurde außerdem zur Selektion von *C. acetobutylicum*-Mutanten genutzt (Clark *et al.*, 1989). Das Prinzip der Methode beruht auf der reversiblen, Alkohol-Dehydrogenase-katalysierten Oxidation eines Alkohols zum entsprechenden Aldehyd. Der indirekte Alkoholnachweis gelingt in Gegenwart von Phenazinmethosulfat (PMS) über die Reaktion von Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) mit dem durch die Dehydrogenase gebildeten NADH zu blau-violetter Formazan (Abb. 3.8).

Im Verlauf der in der vorliegenden Arbeit angestrebten Screening-Entwicklung zeigten sich unter Nutzung des NBT-Assays bereits früh positive Tendenzen, weil hier keine Nebenreaktionen mit der im Kulturmedium vorhandenen Glucose auftraten. Die Methode konnte erfolgreich für kolorimetrische Alkoholmessungen eingesetzt werden, da die Formazanbildung zur Alkoholkonzentration proportional war (Abb. 3.9). Es stellte sich außerdem heraus, dass mittels NBT-Assay neben Butanol auch Ethanol detektiert wird. Verantwortlich dafür ist das breite Substratspektrum der im Assay-Mix verwendeten Alkoholdehydrogenase von *Saccharomyces cerevisiae*. Das Enzym setzt nicht nur Ethanol spezifisch um (Heick *et al.*, 1969; Wills, 1976; Thomson *et al.*, 2005), sondern ist ebenfalls zur Oxidation aller primären Alkohole mit Kettenlängen von bis zu zehn Kohlenstoffatomen fähig (Schöpp & Aurich, 1976; de Smidt *et al.*, 2008). Somit können bei einem Einsatz dieser Methode für ein Hochdurchsatz-Screening von *C. acetobutylicum*-Populationen nur Aussagen über den Gesamtalkoholgehalt der jeweiligen Kulturen getroffen werden. Da das Butanol-Ethanol-Verhältnis im Produktspektrum von *C. acetobutylicum* 6:1 beträgt (Jones & Woods, 1986; Lee *et al.*, 2008), ist dieser Kompromiss jedoch durchaus akzeptabel.

Nachdem das Prinzip des NBT-Assays experimentell bestätigt, d. h. ein auf dem Assay basierender Nachweis von Butanol und Ethanol erbracht werden konnte, gelang eine spezifische Detektion der Alkohole ebenfalls in Zellkulturen von *C. acetobutylicum*. In Kulturliquots, die mit der Assay-Lösung versetzt wurden, war eine entsprechende Formazanbildung zu verzeichnen (Abb. 3.9, Abb. 3.10). Der NBT-Assay stellte somit eine geeignete Grundlage zur Visualisierung der clostridiellen Alkoholproduktion dar. Innerhalb dieser ersten Versuche, die der Evaluation des Assays hinsichtlich der Verwendbarkeit als Butanol-Screeningverfahren dienen sollten, wurde neben einer Korrelation von Formazanbildung und Alkoholkonzentration ein Einfluss der Kultivierungsparameter auf die Assay-Ergebnisse beobachtet. So wirkte sich beispielsweise die Kultivierungsdauer auf die Intensität der Formazanbildung aus. Eine längere Inkubation der zu untersuchenden Kulturen führte zu einem stärkeren Assay-Signal, d. h. einer erhöhten Bildung von Formazan (Abb. 3.11). Dies steht im Zusammenhang damit, dass *C. acetobutylicum* erst im späteren Verlauf seines biphasischen Fermentationsmetabolismus infolge einer Änderung des Genexpressionsmusters (Dürre *et al.*, 1987) mit der Produktion von Lösungsmitteln beginnt und die Alkoholkonzentration in der Zellkultur dementsprechend mit fortschreitendem Wachstum steigt. Auch dem zur Anzucht verwendeten Kulturmedium kam in Bezug auf die erzielten Assay-Resultate eine wichtige Rolle zu. Die Formazanbildung erreichte unter Verwendung des MS-MES-Mediums die höchste Intensität (Abb. 3.10, Abb. 3.11), was sich auf eine gesteigerte Alkoholproduktion von

C. acetobutylicum in diesem synthetischen Medium (Monot *et al.*, 1982) und auf die proportionale Abhängigkeit der Formazanbildung von der Alkoholkonzentration (Abb. 3.9) zurückführen lässt.

Der NBT-Assay zeichnete sich in Bezug auf die Quantifizierung der durch *C. acetobutylicum* gebildeten Alkohole durch ein hohes Maß an Sensitivität aus. Die wachstumsspezifische Alkoholproduktion von *C. acetobutylicum* konnte unter Einsatz des NBT-Assays dokumentiert werden (Abb. 3.12). Dabei drückte sich die Zunahme der in der Kultur enthaltenen Gesamtalkoholkonzentration über den Wachstumsverlauf in einer steigenden Formazanbildung aus (Abb. 3.12). Die über den Assay ermittelten Gesamtmengen an Butanol und Ethanol korrelierten sehr gut mit gaschromatographisch bestimmten Werten. Dies bewies erneut die Eignung der Methode als spezifisches Butanol/Ethanol-Detektionsverfahren.

Die Spezifität des Assays für Butanol und Ethanol in Kulturen von *C. acetobutylicum* konnte außerdem durch erste Experimente zur Differenzierung verschiedener Stämme hinsichtlich ihrer Alkoholproduktion belegt werden. Den Erwartungen entsprechend wurden in Kulturen des Wildtyps deutliche Assay-Signale verzeichnet, während Farbreaktionen in den Proben von *C. acetobutylicum* DG1, der nicht zur Bildung von Alkoholen bzw. Lösungsmitteln fähig ist (Nair, 1995; Stim-Herndon *et al.*, 1996; Cornillot *et al.*, 1997), nicht auftraten (Abb. 3.13). Die Differenzierung beider Stämme war folglich ohne unspezifische Reaktionen mit der im Medium enthaltenen Glucose möglich. Bereits Clark *et al.* (1989) nutzten die Differenzierungsmöglichkeiten des NBT-Assays, um Lösungsmittel-negative Mutanten von *C. acetobutylicum* zu isolieren. Nachdem sich aufzeigen ließ, dass die Möglichkeit zur Anwendung des NBT-Assays in Flüssigkulturen von *C. acetobutylicum* bestand und die Spezifität des Nachweisverfahrens verifiziert werden konnte, wurde eine Applikation der Methode auf Festmedien überprüft. Dieser experimentelle Ansatz bezog sich auf die Resultate früherer Publikationen, in denen Tetrazoliumsalz-basierende Färbungen von Zellkolonien angewendet wurden, um Fermentationsmutanten von *Escherichia coli* zu isolieren, Respirations-negative Mutanten von *Saccharomyces cerevisiae* zu selektieren oder die Stoffwechselaktivität verschiedener Stämme von *Salmonella typhimurium* zu visualisieren (Lederberg, 1948; Nagai *et al.*, 1961; Hopwood, 1970; Bochner & Savageau, 1977). Grundsätzlich gelang die NBT-vermittelte Färbung von *C. acetobutylicum*-Kolonien in der vorliegenden Arbeit (Abb. 3.14). Trotz dieses zunächst positiven Ergebnisses und der Tatsache, dass Hopwood (1970) und Bochner & Savageau (1977) die Möglichkeit zur Differenzierung verschiedener Stämme auf Tetrazoliumsalz-Indikatorplatten anhand mehrerer Beispiele darstellen konnten, war die Differenzierung von *C. acetobutylicum*-Stämmen

in Bezug auf die Alkoholproduktion nicht realisierbar. Sowohl Kolonien des Wildtyps als auch die des DG1-Stamms gingen Reaktionen mit der Assay-Lösung ein (Abb. 3.15). Ferner waren im Umfeld der Kolonien keine deutlichen Farbreaktionen erkennbar, obwohl dies bei einer Alkohol-Ausscheidung der Zellen zu erwarten wäre. Der NBT-Assay zeigte sich auf Festmedien somit weniger spezifisch als in Flüssigkulturen. Jener Umstand ist vermutlich auf den lipophilen Charakter der Kolonieoberflächen zurückzuführen, der eine unspezifische Einlagerung des Formazans mit sich bringt.

4.3. Etablierung und Optimierung des NBT-Assays

Innerhalb der Screening-Entwicklung stellte sich der NBT-Assay als geeignete Methode zur Visualisierung der Butanolproduktion von *C. acetobutylicum* heraus (3.2.). Das Nachweisverfahren zeichnete sich durch ein hohes Maß an Spezifität und Sensitivität aus, da die Detektion von Butanol und Ethanol in Zellkulturen von *C. acetobutylicum* ohne Nebenreaktionen möglich war. Für die Etablierung des NBT-Assays als Hochdurchsatz-Screening waren weitere Experimente notwendig, deren Resultate nachfolgend diskutiert werden.

4.3.1. NBT-Assay zur Stammdifferenzierung

Im Hinblick auf die Anwendung des Assays im Hochdurchsatz erfolgte die Evaluation der Differenzierungsmöglichkeiten anhand einer Screening-Simulation (3.3.1.). Obwohl die Produktspektren der dabei analysierten Stämme denen vorhergehender Untersuchungen entsprachen (Lehmann & Lütke-Eversloh, 2011; Lehmann *et al.*, 2012a; Lehmann *et al.*, 2012b; Lehmann, 2012, Dissertation) und sich deutliche Differenzen bezüglich der Alkoholproduktion ergaben, ließen sich die Unterschiede im Ergebnis des Assays nicht immer aufzeigen (Abb. 3.16). So konnten beispielsweise zwischen den Assay-Signalen von *C. acetobutylicum* Wildtyp und *C. acetobutylicum hbd::Int(69)* nur geringfügige Unterschiede dokumentiert werden, obgleich sich *C. acetobutylicum hbd::Int(69)* durch eine stark erhöhte Ethanolproduktion auszeichnet (Lehmann & Lütke-Eversloh, 2011) und sich dies in einer zum Wildtyp beträchtlich gesteigerten Formazanbildung auswirken sollte. Ursächlich für die mangelhafte Differenzierung der Stämme mittels NBT-Assay waren vor allem die insgesamt sehr hohen Alkoholkonzentrationen. Diese führten zu hohen Extinktionswerten, die die Sensitivität des Assays überschritten und somit eine Sättigung bewirkten. Eine lineare Abhängigkeit der Assay-Signale von der Alkoholkonzentration war folglich nicht mehr gegeben, so dass bei allen Stämmen im Ergebnis des Assays vergleichbar hohe Alkoholmengen detektiert wurden, die mitunter drastisch von den

gaschromatographisch ermittelten Werten abwichen. Zudem erwies sich die Verwendung von Zellsuspension innerhalb des Assays als problematisch, da die in den Proben auftretenden Zelltrübungen eine zusätzliche Steigerung der Assay-Signale hervorriefen und die Sensitivität ebenfalls negativ beeinflussten. Ferner ging ein durch die Zellen ausgelöster negativer Einfluss vermutlich aus der Fähigkeit dieser hervor, Tetrazoliumsalze zu Formazan zu reduzieren. Dabei lagert sich das entstehende Formazan in die bakterielle Zellwand ein und färbt die Zellen. Vor allem NBT ist unter den Tetrazoliumsalzen diesbezüglich sehr aktiv, es bewirkt eine intensive Färbung der Organismen und der Umgebung (Eidus *et al.*, 1959). Somit ist davon auszugehen, dass innerhalb des Assays eine vom Alkoholgehalt der Probe unabhängige Hintergrundfärbung auftrat, die eine Abnahme der Sensitivität des Verfahrens bedingte. Als weitere zur Sättigung beitragende mögliche Faktoren sind Evaporationseffekte zu nennen, die wahrscheinlich auf das geringe Probenvolumen zurückzuführen sind.

Neben der Evaluierung der Stamm-Differenzierungsmöglichkeiten im Hochdurchsatz wurde nochmals der Einfluss des zur Kultivierung verwendeten Mediums auf die Assay-Ergebnisse analysiert. Den Aussagen von Monot *et al.* (1982) entsprechend, ließ ein Vergleich der verwendeten Medientypen eine deutlich gesteigerte Alkoholproduktion der untersuchten Stämme in MS-MES erkennen, die sich in einer stark erhöhten Formazanbildung äußerte (Abb. 3.16). Dieses Resultat wurde bereits innerhalb der Screening-Entwicklung dokumentiert und bestätigte wiederholt die Zweckmäßigkeit des Mediums für die angestrebte Applikation des NBT-Assays zur Isolation interessanter Phänotypen. Für die spätere Anwendung nur geringfügig relevant war folgende im Zuge des Medienvergleichs beobachtete Auffälligkeit: Obwohl alle untersuchten Stämme die zu erwartenden Produktspektren zeigten, lagen die über gaschromatographische Analysen quantifizierten Gesamtalkoholmengen deutlich unter den im größeren Maßstab ermittelten Werten (Lehmann & Lütke-Eversloh, 2011; Lehmann *et al.*, 2012a; Lehmann *et al.*, 2012b; Lehmann, 2012, Dissertation). Eine im Vergleich zu größeren Kulturvolumina geringere Gesamt-Lösungsmittelkonzentration in kleineren Batch-Kulturen beschrieben auch Wong & Bennet (1996). Ausgehend von einem direkten Zusammenhang zwischen der in der Kultur erreichten Zelldichte und dem Lösungsmittelertrag postulierten sie einen Effekt der Optischen Dichte, die im kleinen Kulturmaßstab prinzipiell nur geringe Werte erreicht, so dass daraus folgend die Ausbeute an Lösungsmitteln sinkt. In Verbindung mit der Zelldichte einer Kultur steht auch das Quorum Sensing, dem möglicherweise ebenfalls eine Rolle in Bezug auf die Lösungsmittelproduktion zukommt. Ein Einfluss des Quorum Sensing kann jedoch an dieser Stelle nur vermutet werden, da entsprechende Gene im Genom solventogener Clostridien zwar identifiziert wurden, die molekularen und

regulatorischen Mechanismen des Quorum Sensing bei dieser Bakteriengruppe bis heute allerdings weitgehend unerforscht sind (Papoutsakis, 2008). Dennoch konnten Kosaka *et al.* (2007) erste Hinweise auf eine Beziehung von Quorum Sensing und Lösungsmittelbildung herausarbeiten. Sie schrieben die Induktion der Lösungsmittelproduktion in *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* einem extrazellulären Signalmolekül zu, das jedoch nicht näher charakterisiert wurde.

4.3.2. Optimierung des NBT-Assays

Da erste Experimente zur Differenzierung unterschiedlicher *C. acetobutylicum*-Stämme im Hochdurchsatz mittels NBT-Assay nur bedingt erfolgreich verliefen (3.3.1.), war eine Optimierung der Methode notwendig. Dabei sollten Variationen des Standardprotokolls eine Steigerung der Assay-Sensitivität ermöglichen (3.3.2.). Die eingesetzten Veränderungen hatten dabei unterschiedliche Auswirkungen auf die Resultate des Assays (Abb. 3.18).

Die Verwendung alternativer Alkoholdehydrogenasen (ADHs) zog keine positiven Effekte nach sich. Im Gegensatz zur Pferdeleber-ADH, die in einer früheren Studie für den Assay genutzt wurde (Clark *et al.*, 1989), war die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte ADH aus der Pferdeleber trotz entsprechender Anwendung der durch Clark *et al.* (1989) beschriebenen Reaktionsparameter nicht zur Umsetzung der Alkohole fähig. Eine spezifisch gepufferte ADH aus *Saccharomyces cerevisiae* führte zu einer noch rascheren Sättigung des Assays und wirkte sich dementsprechend nachteilig auf die Sensitivität aus (Abb. 3.18). Ein schnelleres Eintreten des Sättigungseffektes ging auch von der Reduktion der NBT-Konzentration aus. Dies war an auffällig veränderten Reaktionsverläufen erkennbar, die außerdem bestätigten, dass das NBT für die grundlegende Reaktion des Assays essentiell ist (Abb. 3.18). Als grundsätzlich vorteilhaft erwiesen sich Variationen bezüglich der ADH- und PMS-Konzentration und Veränderungen der Inkubationsbedingungen. Reduzierte ADH-Konzentrationen brachten eine Ausdehnung des linearen Messbereichs mit sich (Abb. 3.18), erschwerten allerdings gleichzeitig die visuelle Differenzierung unterschiedlich intensiver Assay-Signale. Die Inkubation der Reaktionsansätze auf Eis resultierte in signifikant geringeren Assay-Signalen und damit in einer Verminderung von Sättigungseffekten (Abb. 3.18), war jedoch aufgrund der Bildung von Kondenswasser technisch nicht realisierbar. Deutliche Verbesserungen der Assay-Sensitivität gingen aus einer Verringerung der PMS-Konzentration und der Inkubationszeit hervor, da eine Steigerung der Linearität der Messwerte erreicht werden konnte und sich die in zuvor durchgeführten Differenzierungsexperimenten auftretende Hintergrundfärbung drastisch senken ließ (Abb. 3.18). Zudem versprach die Reduktion der Inkubationszeit

im Hinblick auf die Anwendung des Assays einen zeitsparenden Effekt und offenbarte damit hinsichtlich der Untersuchung großer Populationen einen nicht unerheblichen Vorteil gegenüber der ursprünglichen Prozedur. Das Herabsetzen der Inkubationszeit bot sich folglich ebenso zur Modifikation des Assays an wie die Verminderung der PMS-Konzentration, so dass eine Kombination beider veränderter Parameter für nachfolgende Anwendungen der Methode eingesetzt wurde.

Im Rahmen dieser Versuche zur Optimierung zeigte sich auch, dass die Grenze zwischen linearem und nicht-linearem Messbereich des Assays bei ca. 300 mM eines Butanol-Ethanol-Gemisches im Verhältnis 6:1 (v/v) lag, der Assay bei Alkoholkonzentrationen von mehr als 300 mM also weniger sensitiv war. Dieser Wert wird jedoch in *C. acetobutylicum*-Kulturen deutlich unterschritten, so dass dieses Ergebnis einen weiteren Beleg für die Eignung des NBT-Assays als semi-quantitatives Alkohol-Screeningverfahren in *C. acetobutylicum*-Populationen lieferte.

4.3.3. Stammdifferenzierung mittels optimiertem Assay

In zuvor durchgeführten Experimenten zur Differenzierung der Alkoholproduktion verschiedener *C. acetobutylicum*-Stämme traten während des Assays unspezifische Farbreaktionen auf, die die Sensitivität des Verfahrens negativ beeinflussten (3.3.1.). Ein neu entwickelter Assay-Standard führte zur Reduktion der Hintergrundfärbung und zu einer erkennbaren Sensitivitätssteigerung (3.3.2.). Um die Anwendbarkeit des optimierten Assays zu prüfen, erfolgten mehrere Differenzierungsexperimente (3.3.3.). Im 10 ml-Maßstab konnten definierte *C. acetobutylicum*-Stämme mit einer hohen Reproduzierbarkeit sowohl visuell als auch photometrisch bezüglich ihrer Alkoholproduktion differenziert werden (3.3.3.1.). Es ließ sich eine klare lineare Beziehung zwischen den Assay-Signalen und den gaschromatographisch ermittelten Alkoholkonzentrationen dokumentieren (Abb. 3.19). Außerdem zeigte sich in den Resultaten des Assays eine deutliche Korrelation der Formazanbildung mit den stammspezifischen Butanol-Ethanol-Verhältnissen. So war z. B. für *C. acetobutylicum hbd::Int(69)* innerhalb der Kultivierung ein rascher Anstieg der Formazanbildung zu beobachten (Abb. 3.19), der auf die im Vergleich zum Wildtyp stark erhöhte Ethanolproduktion dieses Stamms (Lehmann & Lütke-Eversloh, 2011) zurückzuführen ist. Sehr deutlich stellte sich die Korrelation von Assay-Signalen und stammspezifischen Alkoholspektren auch in den für *C. acetobutylicum adhE1::Int(158)* erzielten Assay-Resultaten dar. Die drastisch reduzierte Alkoholproduktion des Stamms (Lehmann, 2012, Dissertation) resultierte in einer über den Wachstumsverlauf konstant geringen Formazanbildung (Abb. 3.19).

Die Differenzierung im 96-Well-Format (3.3.3.2.) war zunächst trotz Einsatz des optimierten Assays nicht problemlos möglich. Die jeweiligen Assay-Signale korrelierten zwar grundsätzlich mit den in vorangegangenen Arbeiten beschriebenen stammspezifischen Alkoholspektren (Lehmann & Lütke-Eversloh, 2011; Lehmann *et al.*, 2012a; Lehmann, 2012, Dissertation), unterlagen jedoch, infolge eines ungleichmäßigen Wachstums der Stämme, teilweise starken Schwankungen, die sich auf die Evaluation des Assays auswirkten (Abb. 3.20). Die Datenbereiche der zu differenzierenden Stämme konnten nicht klar voneinander abgegrenzt werden (Abb. 3.21), so dass sich negative Z-Faktoren ergaben, die zunächst gegen eine Anwendung des NBT-Assays zur Differenzierung der clostridiellen Alkoholproduktion im Hochdurchsatz sprachen (Zhang *et al.*, 1999). Wie bereits im Zuge des ersten Differenzierungsexperiments in Mikrotiterplatten beobachtet (3.3.1.), zog die Verwendung von Zellsuspensionen innerhalb des Assays auch hier negative Einflüsse auf die Differenzierungsmöglichkeiten nach sich. Trübungseffekte und die Fähigkeit der Zellen Tetrazoliumsalze zu Formazan umzusetzen (Eidus *et al.*, 1959; siehe Abschnitt 4.3.1.) führten v. a. bei *C. acetobutylicum adhE1::Int(158)*, der aufgrund seines Butanol-negativen Phänotyps (Lehmann, 2012, Dissertation) als Negativkontrolle dienen sollte, zu unerwartet hohen Assay-Signalen (Abb. 3.20, Abb. 3.21).

Um die durch die Zellen ausgelösten störenden Einflüsse zu umgehen, wurde ein nachfolgendes Differenzierungsexperiment im 96-Well-Format mit zellfreien Überständen durchgeführt (3.3.3.2.). Diese Modifikation wirkte sich vorteilhaft auf die Assay-Ergebnisse aus, da eine im Vergleich zum vorhergehenden Differenzierungsexperiment reduzierte Streuung der Assay-Signale erkennbar war, die eine grundlegend erleichterte Differenzierung zur Folge hatte (Abb. 3.22). *C. acetobutylicum* Wildtyp und *C. acetobutylicum adc::Int(180)* konnten jeweils eindeutig von der Negativkontrolle differenziert werden. Die jeweiligen Datenbereiche waren deutlich voneinander abgegrenzt, so dass sich entsprechend deutlich positive Z-Faktoren ergaben (Abb. 3.23, Tab. 3.4). Laut Zhang *et al.* (1999) wäre das NBT-Screening auf alleiniger Grundlage dieser Z-Faktoren als "exzellenter" Assay zu charakterisieren. Eine exakte Klassifizierung des NBT-Assays anhand der von Zhang *et al.* (1999) angegebenen Richtlinien ist insgesamt jedoch sehr schwierig, da die Differenzierung zwischen *C. acetobutylicum adhE1::Int(158)* und *C. acetobutylicum* Wildtyp bzw. *C. acetobutylicum adc::Int(180)* zwar ebenfalls realisiert werden konnte, die diesbezüglich errechneten Z-Faktoren indes geringere Werte annahmen (Abb. 3.23, Tab. 3.4). Größere Einschränkungen der Differenzierungsmöglichkeiten offenbarten sich innerhalb der angestrebten Abgrenzung zwischen der Negativkontrolle und *C. acetobutylicum adhE1::Int(158)* sowie zwischen *C. acetobutylicum* Wildtyp und

C. acetobutylicum *adc::Int(180)* (Abb. 3.23, Tab. 3.4). Letztere Differenzierung war nicht möglich, weil sich beide Stämme bezüglich ihrer Alkoholproduktion in Mikrotiterplatten nur geringfügig unterschieden. Es ist folglich davon auszugehen, dass das Gelingen des NBT-Assay-basierten Screenings signifikant von den zugrunde liegenden Diskrepanzen im Alkoholgehalt abhängt, d. h. die Aussichten auf eine erfolgreiche Differenzierung zweier Proben mit zunehmenden Konzentrationsunterschieden steigen.

Obwohl die Verwendung zellfreier Überstände erhebliche Verbesserungen hinsichtlich einer Differenzierung verschiedener *C. acetobutylicum*-Stämme mit sich brachte, war diese Modifikation des Assays im Hinblick auf ein Screening sehr großer Populationen technisch nicht umsetzbar. Die Erzeugung zellfreier Überstände war aufgrund des zusätzlich nötigen Zentrifugationsschritts und des Umstandes, dass die Trennung von Zellen und Überstand durch eine erhöhte Schleimbildung in den Mikrokulturen enorm erschwert war, mit einem beträchtlichen Aufwand verbunden. Dementsprechend wurde innerhalb nachfolgender Anwendungen auf den Einsatz zellfreier Überstände verzichtet, stattdessen erfolgte der Alkoholnachweis mittels NBT-Assay mit Zellsuspensionen ohne vorherige Zentrifugation.

4.4. Anwendung des NBT-Assays als Screening-Methode

Im Verlauf der Entwicklung (3.2.) und Optimierung des Screening-Verfahrens (3.3.) erwies sich der NBT-Assay als geeignete Methode zur Visualisierung der Butanolproduktion von *C. acetobutylicum*. Die Nachweismethode war spezifisch für Butanol und Ethanol und zeichnete sich durch eine hohe Sensitivität aus (3.2.1.3.). Außerdem konnte mittels NBT-Assay die Differenzierung verschiedener Stämme bezüglich der Alkoholproduktion realisiert werden (3.3.).

Der letzte Schritt dieser Arbeit bestand darin, den "proof of principle" der Methode zu erbringen. Dafür sollte der NBT-Assay innerhalb konkreter Anwendungsbeispiele genutzt werden, um *C. acetobutylicum*-Mutanten mit einer im Vergleich zum Parentalstamm gesteigerten Butanolproduktion zu identifizieren (3.4.). Die Generierung der zu screenenden Populationen erfolgte durch chemische Zufallsmutagenese unter Verwendung von N'-Methyl-N'-nitrosourea (MNU). Im ersten Anwendungsbeispiel diente *C. acetobutylicum* Wildtyp als Ausgangsstamm für die Erstellung der Mutantenpopulation (3.4.1.).

4.4.1. MNU-Mutagenese von *C. acetobutylicum* Wildtyp und Screening der Population

Im Vorfeld der Mutagenese von *C. acetobutylicum* Wildtyp wurde die zytotoxische Wirkung des MNU bestimmt (3.4.1.1.). Die Exposition von *C. acetobutylicum* Wildtyp mit der mutagenen Verbindung hatte bereits innerhalb kurzer Zeitintervalle einen erheblichen Einfluss auf die Überlebensrate des Stamms. Somit offenbarte sich eine hohe Toxizität des Stoffs, die bereits für *Salmonella typhimurium* dokumentiert wurde (Zimmer & Bhuyan, 1976). Auch eine Gegenüberstellung zu Ethylmethansulfonat (EMS), das wie MNU zu den DNA-alkylierenden Agenzien zählt und in zahlreichen vorangegangenen Studien zur Mutagenese genutzt wurde, belegt die starke toxische Aktivität des MNU. So wurden vergleichbare zytotoxische Effekte des EMS in Konzentrationsbereichen beschrieben, die um ein Vielfaches höher lagen als die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte MNU-Konzentration (Allcock *et al.*, 1981; Long *et al.*, 1984; Lemmel, 1985).

Die MNU-Mutagenese und die anschließende Vorselektion auf Butanol-haltigen Agarplatten führten zur Erzeugung einer Mutantenpopulation mit einer Gesamtgröße von 760 Klonen (3.4.1.2.). Mittels NBT-Screening dieser Population und darauffolgenden Verifikationsexperimenten konnten vier Mutanten selektiert werden, deren Butanolproduktion vergleichend zum Parentalstamm um mindestens 20 % gesteigert war (3.4.1.3.). In Bezug auf die Gesamtgröße der Population ergab sich ein prozentualer Anteil an positiven Mutanten von 0,5 %. Diese relativ hohe Rate an positiven Mutanten ist auf den Einsatz Butanol-haltiger Agarplatten als Vorselektionsschritt zurückzuführen, da ein vorhandener phänotypischer Selektionsdruck eine höhere Wahrscheinlichkeit zur Isolation positiver Mutanten aus einer vergleichsweise kleinen Population mit sich bringt. Mittels Kombination aus chemischer Mutagenese, Vorselektion Butanol-toleranter Mutanten (3.4.1.2.) und Anwendung des NBT-Assays (3.4.1.3.) gelang die Identifikation von Mutanten mit einer zum Ausgangsstamm verbesserten Butanolproduktion (3.4.1.4.). Die Eignung des NBT-Assays als Butanol-Screeningverfahren wurde bestätigt, so dass der erste "proof of principle" für den NBT-Assay erbracht werden konnte.

4.4.2. Physiologische Charakterisierung selektierter MNU-Mutanten von *C. acetobutylicum* Wildtyp

Innerhalb der ersten Anwendung des NBT-Assays (3.4.1.) konnten aus einer durch chemische Mutagenese erstellten Population Mutanten mit einer zum Parentalstamm gesteigerten Butanolproduktion isoliert werden. Dabei wurde unmittelbar nach der

MNU-Mutagenese ein zusätzlicher Selektionsschritt eingeführt. Unter Verwendung von Butanol-haltigen Agarplatten wurde eine Vorselektion Butanol-toleranter Mutanten ermöglicht, da die Kombination aus chemischer Mutagenese und Butanoltoleranz-Screenings bereits in vorangegangenen Studien mit Erfolg angewendet werden konnte und ein direkter Zusammenhang zwischen einer gesteigerten Toleranz gegenüber Butanol und einer erhöhten Butanolproduktion postuliert wurde (Lemmel, 1985; Hermann *et al.*, 1985; Matta-el-Ammouri *et al.*, 1986). Die Isolation Butanol-toleranter Mutanten, die sich gleichzeitig durch eine verbesserte Butanolbildung auszeichneten, gelang in der Vergangenheit nicht nur mittels chemischer Mutagenese. Die sogenannte "serial enrichment procedure", bei der Kulturen des entsprechenden Bakteriums konsekutiv zunehmenden Alkoholkonzentrationen ausgesetzt werden, diente der Erzeugung Alkohol-toleranter Stämme von *Clostridium thermocellum*, *Clostridium thermohydrosulfuricum* und *Clostridium acetobutylicum* (Herrero & Gomez, 1980; Lovitt, 1989; Lin & Blaschek, 1983; Baer *et al.*, 1987). Von Lösungsmitteln bzw. Alkoholen geht eine toxische Wirkung auf die Zellen aus, so dass Fermentationsprozesse durch die Lösungsmitteltoxizität im Allgemeinen limitiert werden. Die limitierende Gesamt-Lösungsmittelkonzentration liegt für *C. acetobutylicum* bei 20 g/l (Ryden *et al.*, 1958; Moreira *et al.*, 1981), Butanol inhibiert Fermentationen in Konzentrationen von 10-13 g/l (Ryden *et al.*, 1958; Moreira *et al.*, 1981; Lin & Blaschek, 1983; Qureshi & Blaschek, 2001). Unter den von *C. acetobutylicum* produzierten Lösungsmitteln weist Butanol die höchste Toxizität auf und erreicht daher als einziges inhibitorische Konzentrationen bereits während der natürlichen Fermentation (Pinazo *et al.*, 1993). Die toxische Wirkung von Butanol und anderen Alkoholen geht daraus hervor, dass sie direkt mit der Lipiddoppelschicht der Zellmembran interagieren, Änderungen in der Phospholipidzusammensetzung induzieren und die Lipiddoppelschicht letztlich zerstören (Ingram, 1976; Lin & Blaschek, 1983; Costa & Moreira, 1983; Inoue & Horikoshi, 1989; Sikkema *et al.*, 1994; Sikkema *et al.*, 1995). Die Toxizität wird dabei durch die Konzentration des Lösungsmittels in der es in der Membran akkumuliert, bestimmt (De Bont, 1998; Isken & De Bont, 1998). Infolge des destruktiven Einflusses der Lösungsmittel auf die Membran ist die Zelle nicht länger fähig, die pH-Homöostase aufrechtzuerhalten. Nährstofftransportmechanismen und membranständige Energiegewinnungssysteme kommen zum Erliegen und der gesamte Stoffwechsel bricht zusammen, so dass das Zellwachstum stark inhibiert wird (Jones & Woods, 1986; Ezeji *et al.*, 2010). Eine Verminderung des Wachstums in Anwesenheit organischer Lösungsmittel beobachteten auch Ramos *et al.* (1997) und Isken *et al.* (1999) und führten die Reduktion der Zellmasse auf Energie-verbrauchende Anpassungsmechanismen

zurück. Derartige Anpassungsmechanismen schließen Änderungen in der Membranzusammensetzung ein, die für *C. acetobutylicum* in mehreren Publikationen beschrieben wurden. Während der exponentiellen Phase, in der das Bakterium die organischen Säuren Acetat und Butyrat produziert, nehmen die ungesättigten Fettsäuren in der Membran einen größeren Anteil gegenüber den gesättigten Fettsäuren ein. Innerhalb der stationären Phase erfolgt die Produktion von Lösungsmitteln und der Anteil gesättigter Fettsäuren steigt (Vollherbst-Schneck *et al.*, 1984; Baer *et al.*, 1987; Lepage *et al.*, 1987; Zhao *et al.*, 2003). Die Zelle ist folglich in der Lage, die Membranstruktur zu ändern, um den toxischen Effekten entgegenzuwirken (Hermann *et al.*, 1985).

Die in dieser Arbeit nach chemischer Mutagenese und NBT-Assay selektierten Mutanten zeigten hinsichtlich der physiologischen Eigenschaften Unterschiede aber auch zahlreiche Parallelen zu den in vorangegangenen Studien isolierten Stämmen (3.4.1.5.). Die durch Lin & Blaschek (1983), Hermann *et al.* (1985) und Matta-el-Ammouri (1986) untersuchten Stämme zeichneten sich durch verbesserte Wachstumseigenschaften, eine höhere Lösungsmitteltoleranz sowie durch eine gesteigerte Lösungsmittelproduktion aus. So wurden für die *C. acetobutylicum*-Stämme SA-1 und 77 im Vergleich zum Wildtypstamm *C. acetobutylicum* ATCC 824 höhere Wachstumsraten bzw. signifikant kürzere Generationszeiten beschrieben (Lin & Blaschek, 1983; Matta-el-Ammouri *et al.*, 1986). Außerdem zeigten die Stämme eine rascher beginnende Butanolbildung. Auch die Lösungsmittelproduktion von *C. acetobutylicum* 2D8, *C. acetobutylicum* 2E8 und *C. acetobutylicum* 8F9, die innerhalb der vorliegenden Arbeit isoliert wurden, setzte im Verhältnis zu der von *C. acetobutylicum* Wildtyp zu einem früheren Zeitpunkt der Kultivierung ein (Abb. 3.29). Dieser Sachverhalt lässt sich mit einer schnelleren Glucose-Aufnahme bzw. einem gesteigerten Glucose-Umsatz begründen, der zu einem früheren Übergang von Acidogenese zu Solventogenese führt (Fond *et al.*, 1984; Fond *et al.*, 1985). Zudem besteht ein Zusammenhang zwischen der Steigerung des Glucose-Umsatzes, der eine kurzfristig erhöhte Säureproduktion nach sich zieht und einer verbesserten Lösungsmittelproduktion, da sich höhere Säurekonzentrationen bis zu einem gewissen Grad positiv auf den Ertrag an Lösungsmittel auswirken (Gottschal & Morris, 1981; Bahl *et al.*, 1982). Einen Beweis für die direkte Verbindung von erhöhter Glucose-Aufnahme und Steigerung der Lösungsmittelproduktion lieferten Lee *et al.* (2005), die einen effizienteren Transport des Kohlenhydrats über einen alternativen, Phosphotransferasesystem-unabhängigen Mechanismus bei *C. beijerinckii* BA 101 nachwies. Jener Stamm zeichnete sich durch eine verbesserte Butanolbildung aus (Annous & Blaschek, 1991; Formanek *et al.*, 1997). Ein schnellerer Glucose-Umsatz

und damit eine raschere Säureproduktion ließen sich ebenfalls bei den MNU-Mutanten beobachten, die eine früher einsetzende Produktion von Lösungsmitteln zur Folge hatten (Abb. 3.29). Neben der zügiger beginnenden Lösungsmittelbildung konnte für die *C. acetobutylicum*-Stämme 2D8, 2E8, 3E8 und 8F9 eine zum Wildtyp stark erhöhte Ethanolproduktion dokumentiert werden (Abb. 3.29). Die erhöhte Butanoltoleranz der Stämme schien somit auch einen Effekt auf die Bildung von Ethanol zu besitzen. Dies lässt wiederum darauf schließen, dass sich die auf der Butanolresistenz basierende Selektion positiv auf die Lösungsmitteltoleranz und die Produktion von Lösungsmitteln allgemein auswirkt. Die gesteigerte Resistenz gilt folglich nicht nur spezifisch für Butanol, sondern auch für andere Alkohole wie Ethanol. Die Mutation, die zu einer verbesserten Toleranz führt, ist dementsprechend genereller Natur und erfolgt, beeinflusst durch die Lösungsmittel, aufgrund einer Änderung der Membranzusammensetzung (Fried & Novick, 1973; Ingram, 1977; Clark & Beard, 1979; Rigomier *et al.*, 1980).

Trotz eines erkennbaren schnelleren Glucose-Umsatzes, konnten verbesserte Wachstumseigenschaften für die in dieser Arbeit selektierten Mutanten im Gegensatz zu den in vorangegangenen Studien (Lin & Blaschek, 1983; Matta-el-Ammouri *et al.*, 1986) generierten Stämme nicht dokumentiert werden. Die physiologische Charakterisierung offenbarte für alle durch MNU-Mutagenese erzeugten Stämme niedrigere Wachstumsraten im Vergleich zum Parentalstamm (Tab. 3.7). Ein Grund für diese in Gegenüberstellung zu anderen Arbeiten abweichende Beobachtung kann in unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen liegen. Eine ähnliche Aussage trafen auch Hermann *et al.* (1985), die abweichende Resultate bei der physiologischen Charakterisierung verschiedener Mutanten mit variierenden Wachstumsbedingungen begründeten.

Hinsichtlich der Wachstumseigenschaften zeigten die MNU-Mutanten ein weiteres auffälliges Merkmal: Die Optische Dichte nahm in den Mutantenkulturen in der stationären Phase entgegen der OD_{600} in der Kultur des Parentalstamms stetig ab (Abb. 3.29). Eine sinkende Optische Dichte ist mit der Produktion des Glycoproteins Autolysin assoziiert, die zu Beginn der stationären Phase eintritt (Barber *et al.*, 1979; Webster *et al.*, 1981; Westhuizen *et al.*, 1982). Experimentelle Nachweise der Autolyse gelangen für zahlreiche Gram-positive (Shockman *et al.*, 1961; Mohan *et al.*, 1965; Ogata & Hongo, 1974; Kawata *et al.*, 1986) und Gram-negative Organismen (Hebeler & Young, 1975; Wegener *et al.*, 1977; Leduc & van Heijenoort, 1980). Die zur Autolyse führenden physiologischen Bedingungen in *C. acetobutylicum* blieben jedoch anfangs nur unvollständig geklärt. Erst die Aufreinigung involvierter Enzyme trug letztlich zur vollständigen Charakterisierung des autolytischen Mechanismus bei (Webster *et al.*,

1981; Croux *et al.*, 1992). Demzufolge wurde postuliert, dass die autolytische Aktivität mit hohen Butanolkonzentrationen bzw. mit der Toxizität von Butanol verbunden ist, so dass eine hohe Konzentration an Butanol die Freisetzung des Autolysins auslöst (Barber *et al.*, 1979; Westhuizen *et al.*, 1982). Unter Beachtung dieser Aussage lässt sich die im Vergleich zum Wildtyp frühzeitige Abnahme der Optischen Dichte in den Mutantenkulturen erklären. Darüber hinaus setzte die Butanol- bzw. Lösungsmittelproduktion bei den MNU-Mutanten vor der des Parentalstamms ein. Die Mutantenstämme waren zeitiger dem Lösungsmittel-Stress ausgesetzt und bildeten folglich zu einem früheren Zeitpunkt Autolysin, was zu einer schnelleren Zellyse führte.

Obwohl eine Beziehung zwischen mikrobieller Alkoholtoleranz und Konzentration der während der Fermentation gebildeten Alkohole in mehreren Publikationen belegt wurde und auch in dieser Arbeit erkennbar war, wird ein direkter Zusammenhang von Alkoholtoleranz und Alkoholproduktion in der Literatur kontrovers diskutiert. Murray *et al.* (1983) gelang die Isolation eines Mutantenstamms von *C. saccharolyticum*, der vergleichend zum Parentalstamm sowohl mehr Ethanol produzierte als auch eine gesteigerte Ethanoltoleranz zeigte. Demgegenüber stehen weitere Mutanten von *C. saccharolyticum*, für die sich trotz einer gesteigerten Ethanoltoleranz keine Korrelation zwischen Resistenz und Ethanolbildung belegen ließ (Asther & Khan; 1985). Dieser Umstand wurde auf die hohe Komplexität der beteiligten Resistenzmechanismen zurückgeführt, die sich beispielsweise dadurch belegen lässt, dass an der Alkoholtoleranz von *Saccharomyces cerevisiae* mehr als 250 Gene beteiligt sind (Aguilera *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2007). Auch im Hinblick auf die Butanolproduktion wurde beschrieben, dass Butanol-tolerante Mutanten nicht zwingend bessere Butanolproduzenten als Stämme mit geringerer Toleranz sein müssen (Baer *et al.*, 1987; Ezeji *et al.*, 2004; Mann *et al.*, 2012). Die Stämme SA-1 und SA-2 wiesen zwar eine gesteigerte Butanoltoleranz auf, bildeten jedoch nur minimal erhöhte Butanol-Ausbeuten (Lin & Blaschek, 1983; Baer *et al.*, 1987). Andererseits war *C. acetobutylicum* 904 in Bezug auf die Butanoltoleranz nur minimal verbessert, zeigte aber eine signifikant erhöhte Lösungsmittelproduktion (Hermann *et al.*, 1985). Auch die homologe Überexpression von Stressprotein-codierenden Genen führte in *C. acetobutylicum* zu unterschiedlichen Ergebnissen: Während die Überexpression von *groESL* in einer verbesserten Butanolproduktion resultierte, wurde bei gesteigerter Expression von *htpG* und *grpE* kein positiver Effekt auf die Butanolbildung beobachtet, obwohl bei allen Stämmen eine verbesserte Lösungsmitteltoleranz festgestellt wurde (Tomas *et al.*, 2003; Mann *et al.*, 2012). Ein weiteres Beispiel dafür, dass die Butanoltoleranz nicht gleichzeitig eine Steigerung der Butanol-Ausbeute bedingen

muss, lieferte eine kürzlich publizierte Studie: Die Inaktivierung zweier Protein-Untereinheiten, für die angenommen wird, dass sie die Alkohol-Sensitivität vermitteln, führte zu einer gesteigerten Toleranz, brachte aber keine Änderung des Fermentationsprofils von *C. acetobutylicum* mit sich (Jia *et al.*, 2012). Auch die homologe Überexpression des Fettsäure-Synthase-codierenden Gens *cfa*, ließ im Ergebnis keine Verbindung von Toleranz und Produktion erkennen. Die durch die gesteigerte Expression des Gens vermittelte Änderung der Membranstruktur wirkte sich positiv auf die Butanolresistenz von *C. acetobutylicum* aus, hatte jedoch gleichzeitig einen negativen Effekt auf die Lösungsmittelproduktion (Zhao *et al.*, 2003). In ihrer Gesamtheit lassen diese Ergebnisse den Schluss zu, dass die Toleranz nicht der einzig limitierende Faktor des Butanol-Ertrags ist (Ezeji *et al.*, 2004).

Wie eingangs erläutert, wurden Lösungsmittel-tolerante Stämme von *C. acetobutylicum* klassischerweise mittels Butanol-Exposition isoliert. Mit Hilfe einer Technik zum genetischen Transfer durch Elektrotransformation (Mermelstein & Papoutsakis, 1993) gelang die Generierung Butanol-toleranter Stämme ohne den Einsatz spezifischer, auf Butanoltoleranz-basierenden Selektionsverfahren. Durch Inaktivierung des Butyrat-Kinase-Gens und zusätzlicher Überexpression des Alkohol-Dehydrogenase-Gens *aad* wurden die *C. acetobutylicum*-Stämme PJC4BK und PJC4BK(pTAAD) erzeugt (Green *et al.*, 1996; Harris *et al.*, 2000). Beide produzierten Butanolmengen, die über dem Schwellenwert der Toxizität für den Wildtyp lagen. Diese Resultate liefern ein weiteres Argument dafür, dass die Butanolproduktion nicht direkt mit der Butanoltoleranz korrelieren muss und Steigerungen der Butanoltoleranz und der Butanolproduktion erreicht werden können, ohne dass im Vorfeld Butanol-spezifische Selektionsverfahren erfolgen müssen. Ungeachtet der Tatsache, dass in vorangegangenen Studien bezüglich der Beziehung zwischen Alkoholresistenz und einer erhöhten Alkoholbildung gegensätzliche Aussagen getroffen wurden, zeigte sich in dieser Arbeit auch ein Zusammenhang zwischen der Butanoltoleranz und einer gesteigerten Produktion an Butanol respektive Lösungsmitteln. Insgesamt vier Stämme, die in Anwesenheit von für den Wildtyp toxischen Butanolmengen zum Wachstum auf Agarplatten befähigt waren, zeichneten sich auch durch eine zum Parentalstamm verbesserte Butanolbildung aus. Grundsätzlich muss der hier gewählte Selektionsschritt folglich als positiv bewertet werden, da die Größe der zu screenenden Population reduziert werden konnte und dennoch verbesserte Butanolproduzenten identifiziert wurden. Andererseits zeigten nur vier von 760 Butanol-toleranten Mutanten eine tatsächlich gesteigerte Butanolproduktion. Somit ist nicht davon auszugehen, dass eine erhöhte Butanoltoleranz zwangsläufig auch eine Steigerung der Butanolbildung impliziert.

4.4.3. Chemische Mutagenese von *C. acetobutylicum* *adc::Int(180)* und Screening der Population

Auch innerhalb des zweiten Anwendungsbeispiels wurde der NBT-Assay eingesetzt, um Mutanten mit einer im Vergleich zum Parentalstamm verbesserten Butanolproduktion zu isolieren (3.4.2.). Für die MNU-vermittelte Erstellung der zu screenenden Mutantenpopulation stellte sich *C. acetobutylicum* *adc::Int(180)* als geeigneter Ausgangsstamm dar. Dieser zeichnete sich in wachstumsphysiologischen Analysen durch eine deutlich reduzierte Acetonproduktion aus, die jedoch mit einer verringerten Bildung von Butanol einherging (Lehmann *et al.*, 2012a). Deshalb sollten aus der Mutantenpopulation Stämme mit einer ähnlich niedrigen Acetonproduktion aber gleichzeitig weniger stark beeinflussten Butanolproduktion selektiert werden. Bei dieser Strategie wurde somit eine mögliche Limitierung der Butanolproduktion aufgrund toxischer Effekte ausgeschlossen, da der Ausgangsstamm nur ca. 50 % der Butanolkonzentration des Wildtyps zeigte (Lehmann *et al.*, 2012a).

Ehe die Populationsgenerierung erfolgte, zeigte sich im Zuge der Bestimmung der MNU-Zytotoxizität eine weniger toxische Wirkung des Stoffes auf als dies in den vorbereitenden Experimenten zur Erstellung der Mutantenpopulation von *C. acetobutylicum* Wildtyp der Fall war (3.4.2.1.). Die Exposition der Kultur von *C. acetobutylicum* *adc::Int(180)* mit MNU hatte innerhalb der ersten Zeitintervalle nur einen geringen Einfluss auf die Überlebensrate des Stamms. Die starke Toxizität des MNU, die in vorangegangenen Arbeiten für *Salmonella typhimurium* dokumentiert wurde (Zimmer & Bhuyan, 1976) und sich ebenfalls anhand der Resultate des für den Wildtyp durchgeführten Zytotoxizitätsexperiments belegen ließ, wurde nicht bestätigt. Es ist jedoch nicht von einer erhöhten Resistenz von *C. acetobutylicum* *adc::Int(180)* gegenüber MNU auszugehen. Die scheinbar höhere Überlebensrate des Stammes ist allein auf die voneinander abweichenden experimentellen Vorgehensweisen der jeweiligen Zytotoxizitätsexperimente zurückzuführen. Während für den Wildtyp vor Zugabe des MNU die im Anzuchtmedium enthaltene Glucose durch entsprechende Waschschriffe entfernt wurde, erfolgte dies für *C. acetobutylicum* *adc::Int(180)* nicht. Die *adc*-negative Mutante konnte demnach im Gegensatz zu *C. acetobutylicum* Wildtyp die Kohlenstoffquelle auch während der MNU-Exposition zur Biomasseproduktion nutzen, so dass sich der Einfluss des Mutagens in geringerem Maße auf die Überlebensrate auswirkte.

Die mittels MNU erzeugte Mutantenpopulation von *C. acetobutylicum* *adc::Int(180)* umfasste 4390 Mutanten, von denen im NBT-basierten Screening insgesamt 93 Klone eine erhöhte Alkoholproduktion zeigten (3.4.2.2.). In den zwei nachfolgenden Verifikationsexperimenten wurden schließlich drei Mutanten als reproduzierbar positiv

charakterisiert (3.4.2.3., Abb. 3.33). Sie zeichneten sich durch eine im Vergleich zum Parentalstamm um mindestens 20 % gesteigerte Butanolproduktion aus. Der prozentuale Anteil positiver Mutanten an der Gesamtpopulation betrug somit 0,07 %. Dieser Prozentsatz ist verglichen mit dem Anteil der positiven Stämme, der innerhalb des Screenings der Wildtyp-Population erreicht wurde, deutlich geringer. Die niedrigere Rate positiver Mutanten entspricht hier allerdings den Erwartungen, da bei der Erstellung der Mutantenpopulation von *C. acetobutylicum* *adc::Int(180)* kein phänotypischer Selektionsdruck eingesetzt wurde und dementsprechend die Analyse einer größeren Gesamtmenge an Klonen nötig war, um die gewünschten Mutanten isolieren zu können. Dies entspricht auch den Aussagen von Lemmel (1985), der postulierte, dass die Mutationseffizienz und die zu erwartende Anzahl gewünschter Mutanten stark vom Vorhandensein eines selektiven Drucks abhängen. Demgegenüber stehen die Beobachtungen von Malaviya *et al.* (2011). Sie erreichten nach chemischer Mutagenese von *Clostridium pasteurianum* auch ohne den Einsatz eines selektiven Verfahrens eine im Vergleich zu den Resultaten des Screenings der *C. acetobutylicum* *adc::Int(180)*-Population weitaus höhere Rate an positiven Mutanten. Die in der vorliegenden Arbeit dokumentierte geringe Rate an positiven Stämmen könnte möglicherweise durch eine geringe Mutagenität des MNU bedingt sein. Dies kann jedoch nur vermutet werden, da sich Hinweise zur mutagenen Effizienz von MNU in *C. acetobutylicum* in der Literatur nicht finden lassen. Ausführlicher sind dessen Effekte hingegen für andere Organismen charakterisiert. In *Salmonella typhimurium* wurde MNU eine hohe Mutagenität zugeschrieben (Zimmer & Bhuyan, 1976; Shanabruch *et al.*, 1983). Dieser Sachverhalt spricht zunächst gegen die mutmaßlich geringe Mutagenität von MNU in *C. acetobutylicum*. Es darf jedoch nicht unbeachtet bleiben, dass die Effektivität eines Mutagens für jeden zu mutierenden Organismus einzeln bestimmt werden muss und sich die entsprechenden Charakteristika des mutagenen Stoffes nicht ohne weiteres von einer Art auf eine andere übertragen lassen (Reed, 1988). Im Zusammenhang damit steht die Aussage, dass die chemische Mutagenese von *C. acetobutylicum* und allgemein in anaeroben Organismen durch das Vorhandensein effizienter Reparaturmechanismen erschwert ist (Lemmel, 1985; Reed, 1988). Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass MNU in *C. acetobutylicum* nur niedrige Mutationsraten auslöst. Möglichkeiten zur Steigerung der Mutagenität von MNU lägen in der Erhöhung der eingesetzten MNU-Konzentration oder in längeren Expositionszeiten. Diese Optionen können aufgrund der hohen Toxizität von MNU (s. o.) allerdings nicht unbegrenzt angewendet werden. Weiterhin hätten höhere Mutationsfrequenzen innerhalb dieser Arbeit eventuell durch die Verwendung eines alternativen Mutagens erreicht werden können. In früheren Studien

gelang die Erzeugung clostridieller Mutanten unter Einsatz von *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin (NTG; Hermann *et al.*, 1985; Bowring & Morris, 1985; Matta-el-Ammouri *et al.*, 1986; Junelles *et al.*, 1987; Clark *et al.*, 1989; Cueto und Mendez, 1990; Annous & Blaschek, 1991; Medkor *et al.*, 2010; Malaviya *et al.*, 2011) und Ethylmethansulfonat (EMS; Allcock *et al.*, 1981; Jones *et al.*, 1982; Long *et al.*, 1984; Bowring & Morris, 1985; Jones *et al.*, 1985; Lemmel, 1985; Reysenbach *et al.*, 1986). Reed (1988) fasste die bis dato erfolgten Beispiele zur Anwendung der beiden Stoffe zusammen und charakterisierte EMS als effektivste Verbindung für die Mutation von Clostridien. Es zeigte sich jedoch auch, dass die durch EMS und NTG vermittelten Mutageneseverfahren unterschiedlich erfolgreich waren. So konnte Lemmel (1985) unter Verwendung von EMS Mutanten erzeugen, kennzeichnete NTG hingegen als unwirksam. Hermann *et al.* (1988) trafen gegensätzliche Aussagen und schrieben NTG gegenüber EMS eine höhere Effektivität zu. Rogers & Palosaari (1987) dokumentierten, dass weder EMS noch NTG eine Steigerung der Mutationsraten bewirkten. Trotz der voneinander abweichenden Resultate zur Wirksamkeit von EMS und NTG stellen beide Mutagene mit großer Wahrscheinlichkeit geeignete Alternativen zu MNU dar. Folglich sollte der Einsatz einer alternativen mutagenen Verbindung Bestandteil zukünftiger Arbeiten im Hinblick auf die Erstellung von Mutantenpopulationen sein, um neue Grundlagen für weitere Anwendungen des NBT-Assays und das kombinatorische Metabolic Engineering zu schaffen.

4.4.4. Physiologische Charakterisierung selektierter MNU-Mutanten von *C. acetobutylicum* *adc::Int(180)*

Im Zuge des zweiten Anwendungsbeispiels für den NBT-Assay war es möglich, aus einer durch chemische Mutagenese erstellten Population Mutanten zu isolieren, die im Vergleich zum Parentalstamm *C. acetobutylicum* *adc::Int(180)* eine um mindestens 20 % gesteigerte Butanolproduktion aufzeigten (3.4.2.). An die Verifikationsexperimente (3.4.2.3.), innerhalb derer die erhöhte Butanolproduktion für drei Stämme reproduzierbar bestätigt wurde, schlossen sich wachstumsphysiologische Analysen an (3.4.2.4.). Diese dienten der detaillierten Charakterisierung der Mutantenstämme.

Für die *C. acetobutylicum*-Stämme a13B5, a14E6 und a20A7 ergaben sich in den physiologischen Untersuchungen Wachstumsraten, die zwar vergleichend zu *C. acetobutylicum* Wildtyp geringer, in Gegenüberstellung zum Parentalstamm *C. acetobutylicum* *adc::Int(180)* jedoch erhöht waren (Tab. 3.10). Die Mutantenstämme zeigten demnach ein in Bezug auf den Ausgangstamm verbessertes Wachstum. Diese Beobachtung deckt sich mit den Resultaten vorangegangener Arbeiten, in denen nach

chemischer Mutagenese Stämme von *Clostridium saccharolyticum* und *Clostridium pasteurianum* isoliert wurden, die sich durch verbesserte Wachstumseigenschaften auszeichneten (Murray *et al.*, 1983; Malaviya *et al.*, 2011). In anderen Studien, in denen chemische Mutagenese mit Butanoltoleranz-basierenden Selektionsverfahren kombiniert wurden, konnten entsprechende Ergebnisse für Mutantenstämme von *Clostridium acetobutylicum* dokumentiert werden (Lin & Blaschek, 1983; Hermann *et al.*, 1985; Matta-el-Ammouri *et al.*, 1986). Eine Steigerung der Wachstumsraten geht mit einer effizienteren Glucose-Aufnahme bzw. einem erhöhten Glucose-Umsatz einher. Dies hat zur Folge, dass der Übergang von Acidogenese zu Solventogenese schneller eintritt (Fond *et al.*, 1984; Fond *et al.*, 1985). Die in der vorliegenden Arbeit selektierten Mutanten zeigten höhere Wachstumsraten als der Parentalstamm und setzten die Glucose folglich effizienter zur Biomassenbildung um, so dass von einem erhöhten Verbrauch der Kohlenstoffquelle grundsätzlich auszugehen ist. Andererseits ließ sich für die MNU-Mutanten keine frühere Transition von Acidogenese zu Solventogenese dokumentieren, die laut Fond *et al.* (1984, 1985) stets mit einem gesteigerten Glucose-Umsatz verbunden ist. Die im Vergleich zum Parentalstamm gesteigerte Glucose-Aufnahmerate kann für die MNU-Mutanten somit lediglich vermutet werden. Eine endgültige Aussage diesbezüglich ist nicht möglich, zumal entsprechende Messungen innerhalb der wachstumsphysiologischen Analysen nicht erfolgten.

Im Verlauf der Kultivierungsexperimente wurde in den Kulturen von *C. acetobutylicum* *adc::Int(180)* und in denen der chemisch generierten Mutanten eine stetige Abnahme der Optischen Dichte während der stationären Phase beobachtet. Im Gegensatz dazu ließ sich in der Kultur von *C. acetobutylicum* Wildtyp eine sinkende OD₆₀₀ bis zum Ende der Fermentation nicht feststellen (Abb. 3.34). Eine Abnahme der Optischen Dichte kann auf die Produktion des Glycoproteins Autolysin zurückzuführen sein. Sie setzt mit dem Eintritt der Zellen in die stationäre Phase ein und steht in Zusammenhang mit der Toxizität von Butanol, da hohe Konzentrationen an Butanol die Freisetzung des Autolysins auslösen (Barber *et al.*, 1979; Webster *et al.*, 1981; Westhuizen *et al.*, 1982). Die Butanolproduktion der mittels chemischer Mutagenese erstellten Stämme war, wie für den Parentalstamm *C. acetobutylicum* *adc::Int(180)* beschrieben, im Vergleich zu *C. acetobutylicum* Wildtyp stark reduziert (Lehmann *et al.*, 2012a), so dass hohe Butanolkonzentrationen bzw. die Butanol-Toxizität nicht ursächlich für das Sinken der Optischen Dichte in den Kulturen von *C. acetobutylicum* *adc::Int(180)* und der MNU-Mutanten sein können. Vielmehr kann hier von schädigenden Effekten organischer Säuren ausgegangen werden. Die *C. acetobutylicum*-Stämme *adc::Int(180)*, a13B5, a14E6 und a20A7 waren über den

Wachstumsverlauf nicht zur Reassimilation von Acetat fähig (Abb. 3.34). Dies hatte eine Akkumulation der Säure zur Folge, die sich darin äußerte, dass der auf dem biphasischen Fermentationsmetabolismus von *C. acetobutylicum* gründende pH-Verlauf (Andersch *et al.*, 1983; Hartmanis & Gatenbeck, 1984; Dürre *et al.*, 1987) für den *adc*-negativen Stamm und die MNU-Mutanten nicht verzeichnet werden konnte. So blieben die pH-Werte der Kulturen während der stationären Phase auf konstant niedrigem Niveau (Abb. 3.34). Schädigende Effekte organischer Säuren auf den Stoffwechsel und das Wachstum von Bakterien, die aus der Übersäuerung des Zellinneren hervorgehen (Terracciano & Kashket, 1986), wurden in zahlreichen früheren Publikationen thematisiert. Beispielsweise wird das Wachstum von *Clostridium thermoaceticum* inhibiert, wenn der interne pH-Wert unter einen für die Zelle tolerierbaren Grenzwert fällt (Baronofsky *et al.*, 1984; Wang & Wang, 1984). Herrero *et al.* (1985) dokumentierten den negativen Einfluss von Acetat auf *Clostridium thermocellum*. Bezug nehmend auf die Aussage, dass der zellinterne pH-Wert während eines Fermentationsprozesses über dem externen pH-Wert liegt (Booth & Morris, 1975; Riebeling *et al.*, 1975; Herrero, 1983) charakterisierten sie Acetat und andere Säuren als Entkoppler des pH-Gradienten und führten die inhibierende Wirkung organischer Säuren auf eine aus der Entkopplung entstehende Beeinträchtigung membrangebundener Transportprozesse zurück. Der Effekt der Membran-Entkopplung wird vor allem durch dissoziierte Säuren, die nicht frei durch die Membran diffundieren und somit in der Zelle akkumulieren, ausgelöst (Baronofsky *et al.*, 1984; Herrero *et al.*, 1985; Hüsemann & Papoutsakis, 1986; Kashket, 1987). In DNA-Microarray-basierten Transkriptionsanalysen konnte für *C. acetobutylicum* gezeigt werden, dass Acetat einen starken Stressfaktor darstellt und der Metabolismus des Bakteriums durch die Säure signifikant inhibiert wird (Alsaker *et al.*, 2010). Die innerhalb der wachstumsphysiologischen Analysen beobachtete Akkumulation von Acetat in den Kulturen der MNU-Mutanten und von *C. acetobutylicum adc::Int(180)* führte nicht nur zu einer vergleichend zum Wildtyp früheren Abnahme der Optischen Dichte, sondern wirkte sich gleichzeitig auch auf die Lösungsmittelproduktion der Stämme aus. So zeigten die Mutantenstämme eine gehemmte Bildung der entsprechenden Fermentationsprodukte, die sich im Vergleich zu *C. acetobutylicum* Wildtyp in geringeren Lösungsmittel-Gesamtkonzentrationen ausdrückte (Abb. 3.34). Die verminderte Acetonproduktion, die für *C. acetobutylicum adc::Int(180)* bereits in vorangegangenen Studien beschrieben wurde und durch die Inaktivierung des *adc*-Gens hervorgerufen wird (Lehmann *et al.*, 2012a), konnte auch für die aus diesem Stamm erstellten Mutanten nachgewiesen werden (Tab. 3.10, Abb. 3.34). Dies lässt an dieser Stelle den Schluss zu, dass die genetische Grundlage des Parentalstamms,

also der "knock out" des *adc*-Gens, in den chemisch generierten Mutanten erhalten blieb. Auch die Butanolproduktion war bei *C. acetobutylicum adc::Int(180)* und den MNU-Mutanten in Gegenüberstellung zu *C. acetobutylicum* Wildtyp reduziert (Tab. 3.10, Abb. 3.34). Verantwortlich für die Inhibierung der Lösungsmittelproduktion ist ein drastischer Abfall des pH-Wertes bzw. eine Akkumulation von Säuren. Dieser Sachverhalt ist wiederum damit verbunden, dass der interne pH-Wert von *C. acetobutylicum* im Verlauf des Wachstums aufgrund einer durch eine membrangebundene ATPase katalysierten Protonentranslokation (Booth & Morris, 1975; Riebeling *et al.*, 1975; Herrero, 1983) über dem externen pH liegt und ein cytoplasmatischer pH-Wert unter 5,5 den Übergang zur Solventogenese verhindert (Hartmanis & Gatenbeck, 1984; Gottwald & Gottschalk, 1985; Terracciano & Kashket, 1986). Im Zusammenhang mit einem niedrigen pH-Wert der Kultur und einer Säure-Akkumulation steht ein als "acid crash" bezeichnetes Phänomen. Dieses setzt in solchen Kulturen ein, in denen die Konzentration an undissoziierten Säuren einen kritischen Schwellenwert (57 - 60 mM) erreicht. Wird dieser Wert überschritten, unterbleiben die Glucose-Aufnahme und die Lösungsmittelproduktion. Der "acid crash" tritt häufig auf, wenn Glucose als alleinige Kohlenstoffquelle eingesetzt wird und der pH-Wert der Kultur keiner externen Kontrolle unterliegt (Maddox *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2011). Obwohl die Lösungsmittelproduktion der hier beschriebenen Stämme nicht vollständig ausblieb, war der negative Einfluss des in den Kulturen akkumulierten Acetats auf den Ertrag an Butanol deutlich erkennbar. Daraus ergibt sich ein interessanter experimenteller Ansatz, da in vorangegangenen Studien gezeigt werden konnte, dass die Lösungsmittelproduktion von *C. acetobutylicum* durch die externe Kontrolle des pH-Werts signifikant verändert werden kann. So resultierte die pH-regulierte Kultivierung von *C. acetobutylicum ptb::Int(87)*, dessen Lösungsmittelbildung in Fermentationsexperimenten ohne pH-Regulation aufgrund hoher Acetat-konzentrationen stark eingeschränkt war, in einer erheblichen Steigerung der Butanol- bzw. Ethanolproduktion (Lehmann *et al.*, 2012b). Demzufolge ist zu erwarten, dass die pH-kontrollierte Kultivierung der MNU-Mutanten ebenfalls zu einer gesteigerten Lösungsmittelproduktion der Stämme führt. Dies sollte in zukünftigen Arbeiten überprüft werden.

Trotz der insgesamt inhibierten Lösungsmittelbildung, die auf die Inaktivierung des *adc*-Gens und die Beeinträchtigung durch die Acetat-Akkumulation zurückzuführen ist, ließ sich für die MNU-Mutanten eine erhöhte Ethanolproduktion verzeichnen (Tab. 3.10, Abb. 3.34). Im Vergleich zum Wildtyp von *C. acetobutylicum*, in dessen Produktspektrum Ethanol das Lösungsmittel ist, das in den geringsten Konzentrationen gebildet wird (Lee *et al.*, 2008), zeigten die mittels chemischer Mutagenese erstellten

Stämme somit eine signifikant verbesserte Alkoholproduktion (Tab. 3.10). Dieser Sachverhalt belegt nochmals eine hohe Ähnlichkeit der MNU-Mutanten zum Ausgangstamm *C. acetobutylicum* *adc::Int(180)*, der in dieser Arbeit und in vorangegangenen Studien ebenfalls durch erhöhte Alkohol-Aceton-Verhältnisse charakterisiert werden konnte (Lehmann *et al.*, 2012a). Im Hinblick auf die biotechnologische Produktion alternativer Treibstoffe besitzt v. a. *C. acetobutylicum* a14E6 mit seinem deutlich erhöhten Alkohol-Aceton-Verhältnis einen Vorteil gegenüber *C. acetobutylicum* Wildtyp, da Aceton im Gegensatz zu Butanol und Ethanol nicht als Treibstoff eingesetzt werden kann und somit als unerwünschtes Nebenprodukt der clostridiellen Fermentation gilt (Lee *et al.*, 2012).

Obwohl die untersuchten Mutanten im 200 ml-Maßstab eine im Vergleich zu *C. acetobutylicum* Wildtyp leicht reduzierte Butanolproduktion zeigten, zeichnete sich *C. acetobutylicum* a14E6 durch eine zum Parentalstamm *C. acetobutylicum* *adc::Int(180)* um 26 % erhöhte Bildung von Butanol aus. Damit wies der in dieser Arbeit mittels NBT-Assay selektierte Stamm eine ähnlich hohe Zunahme der Butanolproduktion auf wie die durch Hermann *et al.* (1985) isolierte Mutante *C. acetobutylicum* 904, die im Verhältnis zum entsprechenden Ausgangstamm bezüglich der produzierten Menge an Butanol um 30 % verbessert war. Für weitere durch chemische Mutagenese generierte *C. acetobutylicum*-Mutanten wurden Steigerungen der Butanolproduktion um 13 % (*C. acetobutylicum* SA-1), 7 % (*C. acetobutylicum* 77) und 23 % (*C. acetobutylicum* Rh8) dokumentiert (Lin & Blaschek, 1983; Matta-el-Ammouri *et al.*, 1986; Mao *et al.*, 2010).

4.5. Evaluation der Screening-Strategien

Im Rahmen der Anwendung der in dieser Arbeit entwickelten Screening-Methode wurden zwei Strategien genutzt, die zu unterschiedlichen Ergebnissen führten. Die erste Strategie bestand darin, das NBT-Assay-basierte Screening einer chemisch generierten Wildtyp-Mutantenpopulation mit einem Vorselektionsschritt zu kombinieren, der die Isolation von Butanol-toleranten Mutanten ermöglichen sollte (3.4.1.). Dieses Verfahren basierte darauf, dass in vorangegangenen Arbeiten ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Butanoltoleranz und einer gesteigerten Butanolproduktion postuliert wurde und die fermentative Butanolproduktion durch die Toxizität des Lösungsmittels limitiert wird (Lemmel, 1985; Hermann *et al.*, 1985; Matta-el-Ammouri *et al.*, 1986; Lee *et al.*, 2008; Ezeji *et al.*, 2010). Demgegenüber stand die zweite Strategie, bei der der voroptimierte *C. acetobutylicum* *adc::Int(180)* als Ausgangstamm zur Generierung einer Mutantenpopulation diente, die anschließend dem NBT-Assay unterzogen wurde (3.4.2.).

Die Vorteile der ersten Strategie, die durch den Einsatz eines phänotypischen Selektionsdrucks erreicht wurden, lagen in einer geringeren Populationsgröße und einem höheren Anteil an positiven Mutanten (Abb. 3.28). Wachstumsphysiologische Analysen der positiven Mutanten offenbarten eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Butanol-Produktivität und einen gesteigerten Butanol-Titer zu Beginn der stationären Phase (Tab. 3.7, Abb. 3.29). Die zweite Strategie zeichnete sich dadurch aus, dass die Limitierung der Butanolproduktion durch toxische Effekte von vornherein ausgeschlossen werden konnte, da die vom Parentalstamm gebildete Butanolkonzentration lediglich ca. 50 % der für den Wildtyp dokumentierten Konzentration betrug (Lehmann *et al.*, 2012a). Damit bestand außerdem die Möglichkeit, die Butanolproduktion bei gleichbleibend reduzierter Acetonbildung auf das Wildtyp-Level zu steigern. Im Ergebnis der zweiten Anwendung des NBT-Assays wurde ein Stamm isoliert, dessen Butanolproduktion zwar im Vergleich zum Wildtyp verringert, in Gegenüberstellung zum Parentalstamm *C. acetobutylicum adc::Int(180)* jedoch deutlich erhöht war. Außerdem zeigte der Stamm ein signifikant verbessertes Alkohol-Aceton-Verhältnis (Tab. 3.10, Abb. 3.34). Bei einem Vergleich der beiden Screening-Strategien lässt sich herausstellen, dass die zweite Verfahrensweise bezüglich der Optimierung der biotechnologischen Butanolproduktion trotz des höheren Screening-Aufwands größere Erfolgsaussichten verspricht. Neben dem Vorteil, dass eine Toxizitäts-Limitierung u. U. ausgeschlossen werden kann, bietet ein voroptimierter Parentalstamm eine noch geeignetere Grundlage, um das Produktspektrum unter Einsatz der Screening-Strategie weiterführend zu modifizieren.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass beide Anwendungsbeispiele des NBT-Assays erfolgreich verliefen, d. h. optimierte Mutantenstämme mit Hilfe des Screenings identifiziert werden konnten und sich die Eignung der Methode als Screening-Verfahren bestätigen ließ. Eine Nutzung des entwickelten Assay-Systems in weiteren Forschungsbereichen ist denkbar und eröffnet neue Perspektiven für die Umsetzung kombinatorischer Metabolic Engineering-Strategien.

5. Zusammenfassung

Innerhalb dieser Arbeit erfolgte die Anwendung kombinatorischer Metabolic Engineering-Strategien in *C. acetobutylicum*. Die Entwicklung eines Hochdurchsatz-Screenings diente der Visualisierung der clostridiellen Butanolausscheidung und der Isolation von *C. acetobutylicum*-Stämmen mit verbesserter Butanolproduktion.

1. Im Hinblick auf eine mögliche Anwendung als Butanol-Screening wurden unterschiedliche Assay-Methoden überprüft. Chemische Derivatisierungen mit Kaliumdichromat und Kaliumpermanganat waren als Screening-Verfahren nicht einsetzbar, da Reaktionen mit der im Kulturmedium enthaltenen Glucose auftraten.
2. Der Kaliumdichromat-Assay erwies sich auch unter Trennung von Zellkultur und Reagenzlösung aufgrund unspezifischer Farbreaktionen als ungeeignet. Die Applikation von in Kaliumpermanganatlösung getränktem Filterpapier auf Mikrotiterplatten resultierte in wachstumsabhängigen Farbreaktionen, die jedoch durch eine geringe Reproduzierbarkeit gekennzeichnet waren.
3. Der Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)-Assay stellte sich als geeignetes Verfahren zur Visualisierung der Butanolproduktion in *C. acetobutylicum* dar. Die semi-quantitative Methode war spezifisch für die durch das Bakterium produzierten Alkohole und zeichnete sich durch eine hohe Sensitivität und Reproduzierbarkeit aus.
4. Mittels NBT-Assay werden sowohl Butanol als auch Ethanol detektiert. Somit konnte in Kulturen von *C. acetobutylicum* der wachstumsabhängige Gesamtalkoholgehalt gemessen werden.
5. Der NBT-vermittelte Alkoholnachweis gelang in Zellkulturen und zellfreien Überständen von *C. acetobutylicum*. Eine Anwendung des Assays auf Festmedien war nicht realisierbar.
6. Nach der Optimierung des NBT-Assays, die zu einer deutlichen Reduktion von Sättigungseffekten führte, war die Differenzierung verschiedener *C. acetobutylicum*-Stämme bezüglich ihrer Alkoholproduktion im 10 ml-Maßstab und in Mikrotiterplatten reproduzierbar möglich.

7. Die Eignung des NBT-Assays als Hochdurchsatz-Screeningverfahren konnte anhand zweier Anwendungsbeispiele bestätigt werden. Das Screening einer Butanol-toleranten Mutantenpopulation von *C. acetobutylicum* ATCC 824 mittels NBT-Assay brachte vier Stämme mit einer zum Wildtyp um 20 % gesteigerten Butanolproduktion hervor. Die Analyse einer mittels chemischer Mutagenese erzeugten Population von *C. acetobutylicum* *adc::Int(180)*, die 4390 Mutanten umfasste, führte zur Identifikation von drei Stämmen, deren Butanolproduktion im Vergleich zum Parentalstamm signifikant gesteigert war.
8. Die in dieser Arbeit entwickelte Screening-Methode eröffnet neue Perspektiven zur Umsetzung neuer, innovativer Strategien für das Metabolic Engineering solventogener Clostridien.

6. Literatur

- Abbad-Andaloussi, S., J. Amine, P. Gerard, E. Petitdemange, H. Petitdemange.** 1996. Properties of Allyl Alcohol-Resistant Mutants of *Clostridium butyricum* Grown on Glycerol. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 3499-501.
- Aguilera, F., R. A. Peinado, C. Millán, J. M. Ortega, J. C. Mauricio.** 2006. Relationship between ethanol tolerance, H⁺-ATPase activity and the lipid composition of the plasma membrane in different wine yeast strains. *International Journal of Food Microbiology* **110**: 34-42.
- Allcock, E. R., S. J. Reid, D. T. Jones, D. R. Woods.** 1981. Autolytic Activity and an Autolysis-Deficient Mutant of *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology* **42**: 929-35.
- Alsaker, K. V., C. Paredes, E. T. Papoutsakis.** 2010. Metabolite Stress and Tolerance in the Production of Biofuels and Chemicals: Gene-Expression-Based Systems Analysis of Butanol, Butyrate, and Acetate Stresses in the Anaerobe *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnology and Bioengineering* **105**: 1131-47.
- Andersch, W., H. Bahl, G. Gottschalk.** 1983. Level of Enzymes Involved in Acetate, Butyrate, Acetone and Butanol Formation by *Clostridium acetobutylicum*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* **18**: 327-332.
- Annous, B. A., H. P. Blaschek.** 1991. Isolation and Characterization of *Clostridium acetobutylicum* Mutants with Enhanced Amyolytic Activity. *Applied and Environmental Microbiology* **57**: 2544-8.
- Babb, B. L., H. J. Collett, S. J. Reid, D. R. Woods.** 1993. Transposon mutagenesis of *Clostridium acetobutylicum* P262: isolation and characterization of solvent deficient and metronidazole resistant mutants. *FEMS Microbiology Letters* **114**: 348-343.
- Baer, S. H., H. P. Blaschek, T. L. Smith.** 1987. Effect of Butanol Challenge and Temperature on Lipid Composition and Membrane Fluidity of Butanol-Tolerant *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology* **53**: 2854-61.
- Bahl, H., W. Andersch, K. Braun, G. Gottschalk.** 1982. Effect of pH and Butyrate Concentration on the Production of Acetone and Butanol by *Clostridium acetobutylicum* Grown in Continuous Culture. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* **14**: 17-20.
- Bailey, J.** 1991. Toward a Science of Metabolic Engineering. *Science* **252**: 1668-1675.
- Bailey, J. E., A. Sburlati, V. Hatzimanikatis, K. Lee, W. A. Renner, P. S. Tsai.** 2002. Inverse Metabolic Engineering: A Strategy for Directed Genetic Engineering of Useful Phenotypes. *Biotechnology and Bioengineering* **79**: 568-79.
- Barber, J. M., F. T. Robb, J. R. Webster, D. R. Woods.** 1979. Bacteriocin Production by *Clostridium acetobutylicum* in an Industrial Fermentation Process. *Applied and Environmental Microbiology* **37**: 433-7.

- Baronofsky, J. J., W. J. Schreurs, E. R. Kashket.** 1984. Uncoupling by Acetic Acid Limits Growth of and Acetogenesis by *Clostridium thermoaceticum*. *Applied and Environmental Microbiology* **48**: 1134-9.
- Bergmeyer, H. U.** 1983. *Methods in Enzymatic Analyses*. Verlag Chemie, Weinheim.
- Bertram, J., P. Dürre.** 1989. Conjugal transfer and expression of streptococcal transposons in *Clostridium acetobutylicum*. *Archives of Microbiology* **151**: 551-557.
- Bertram, J., A. Kuhn, P. Dürre.** 1990. Tn916-induced mutants of *Clostridium acetobutylicum* defective in regulation of solvent formation. *Archives of Microbiology* **153**: 373-377.
- Bochman, M., F. A. Cotton, C. A. Murillo, G. Wilkinson.** 1999. *Advanced inorganic chemistry*. John Wiley & Sons, Inc., USA.
- Bochner, B. R., M. Savageau.** 1977. Generalized Indicator Plate for Genetic, Metabolic, and Taxonomic Studies with Microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* **33**: 434-44.
- Booth, I. R., J. G. Morris.** 1975. Proton-motive force in the obligately anaerobic bacterium *Clostridium pasteurianum*: a role in galactose and gluconate uptake. *FEBS Letters* **59**: 153-157.
- Borden, J. R., S. W. Jones, D. Indurthi, Y. Chen, E. T. Papoutsakis.** 2010. A genomic-library based discovery of a novel, possibly synthetic, acid-tolerance mechanism in *Clostridium acetobutylicum* involving non-coding RNAs and ribosomal RNA processing. *Metabolic Engineering* **12**: 268-81.
- Borden, J. R., E. T. Papoutsakis.** 2007. Dynamics of Genomic-Library Enrichment and Identification of Solvent Tolerance Genes for *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 3061-8.
- Bowring, S. N., J. G. Morris.** 1985. Mutagenesis of *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of Applied Microbiology* **58**: 577-584.
- Breznak, J. A., R. N. Costilow.** 1994. Physicochemical factors in growth. In: Gerhardt, P., R. G. E. Murray, W. A. Wood, N. R. Krieg, editors. *Methods for General and Molecular Bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA.
- Chen, J. S.** 1995. Alcohol dehydrogenase: multiplicity and relatedness in the solvent-producing clostridia. *FEMS Microbiology Reviews* **17**: 263-273.
- Clark, D. P., J. P. Beard.** 1979. Altered Phospholipid Composition in Mutants of *Escherichia coli* Sensitive or Resistant to Organic Solvents. *Journal of General Microbiology* **113**: 267-74.
- Clark, S. W., G. N. Bennett, F. B. Rudolph.** 1989. 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* **55**: 970-6.

- Cornillot, E., R. V. Nair, E. T. Papoutsakis, P. Soucaille.** 1997. The Genes for Butanol and Acetone Formation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 Reside on a Large Plasmid Whose Loss Leads to Degeneration of the Strain. *Journal of Bacteriology* **179**: 5442-7.
- Costa, J. M., A. R. Moreira.** 1983. Growth Inhibition Kinetics for the Acetone-Butanol Fermentation. In: Blanch, H. W., E. T. Papoutsakis, G. Stephanopoulos, editors. *Foundations of Biochemical Engineering*. American Chemical Society, Washington, DC, USA, pp. 501-512.
- Croux, C., B. Canard, G. Goma, P. Soucaille.** 1992. Autolysis of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Journal of General Microbiology* **138**: 861-869.
- Cueto, P. H., B. S. Méndez.** 1990. Direct Selection of *Clostridium acetobutylicum* Fermentation Mutants by a Proton Suicide Method. *Applied and Environmental Microbiology* **56**: 578-80.
- De Bont, J.** 1998. Solvent-tolerant bacteria in biocatalysis. *Trends in Biotechnology* **16**: 493-499.
- De Smidt, O., J. C. Du Preez, J. Albertyn.** 2008. The alcohol dehydrogenases of *Saccharomyces cerevisiae*: a comprehensive review. *FEMS Yeast Research* **8**: 967-78.
- Dietrich, J. A., A. E. McKee, J. D. Keasling.** 2010. High-Throughput Metabolic Engineering: Advances in Small-Molecule Screening and Selection. *Annual Review of Biochemistry* **79**: 563-90.
- Dürre, P., A. Kuhn, G. Gottschalk.** 1986. Treatment with allyl alcohol selects specifically for mutants of *Clostridium acetobutylicum* defective in butanol synthesis. *FEMS Microbiology Letters* **36**: 77-81.
- Dürre, P.** 2007. Biobutanol: an attractive biofuel. *Biotechnology Journal* **2**: 1525-34.
- Dürre, P.** 2011. Fermentative production of butanol-the academic perspective. *Current Opinion in Biotechnology* **22**: 331-336.
- Dürre, P., A. Kuhn, M. Gottwald, G. Gottschalk.** 1987. Enzymatic investigations on butanol dehydrogenase and butyraldehyde dehydrogenase in extracts of *Clostridium acetobutylicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **26**: 268-272.
- Eidus, L., B. B. Diena, L. Greenberg.** 1959. Observations on the use of tetrazolium salts in the vital staining of bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* **5**: 245-50.
- Ezeji, T. C., N. Qureshi, H. P. Blaschek.** 2004. Butanol Fermentation Research: Upstream and Downstream Manipulations. *Chemical Record (New York, N.Y.)* **4**: 305-14.
- Ezeji, T. C., N. Qureshi, H. P. Blaschek.** 2007a. Production of acetone butanol (AB) from liquefied corn starch, a commercial substrate, using *Clostridium beijerinckii* coupled with product recovery by gas stripping. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **34**: 771-7.

- Ezeji, T. C., N. Qureshi, H. P. Blaschek.** 2007b. Butanol Production from Agricultural Residues: Impact of Degradation Products on *Clostridium beijerinckii* Growth and Butanol Fermentation. *Biotechnology and Bioengineering* **97**: 1460-1469.
- Ezeji, T. C., N. Qureshi, H. P. Blaschek.** 2007c. Bioproduction of butanol from biomass: from genes to bioreactors. *Current Opinion in Biotechnology* **18**: 220-7.
- Ezeji, T., C. Milne, N. D. Price, H. P. Blaschek.** 2010. Achievements and perspectives to overcome the poor solvent resistance in acetone and butanol-producing microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* **85**: 1697-712.
- Falbe, J.** 1970. Carbon monoxide in organic synthesis. Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York.
- Fibla, J., R. González-Duarte.** 1993. Colorimetric assay to determine alcohol dehydrogenase activity. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **26**: 87-93.
- Fond, O., E. Petitdemange, H. Petitdemange, R. Gay.** 1984. Effect of glucose flow on the acetone butanol fermentation in fed batch culture. *Biotechnology Letters* **6**: 13-18.
- Fond, O., G. Matta-el-Ammouri, H. Petitdemange, J. M. Engasser.** 1985. The role of acids on the production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **22**: 195-200.
- Fontaine, L., I. Meynial-Salles, L. Girbal, X. Yang, C. Croux, P. Soucaille.** 2002. Molecular Characterization and Transcriptional Analysis of *adhE2*, the Gene Encoding the NADH-Dependent Aldehyde/Alcohol Dehydrogenase Responsible for Butanol Production in Alcoholic Cultures of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Journal of Bacteriology* **184**: 821-30.
- Formanek, J., R. Mackie, H. P. Blaschek.** 1997. Enhanced Butanol Production by *Clostridium beijerinckii* BA101 Grown in Semidefined P2 Medium Containing 6 Percent Maltodextrin or Glucose. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 2306-10.
- Fried, V. A., A. Novick.** 1973. Organic Solvents as Probes for the Structure and Function of the Bacterial Membrane: Effects of Ethanol on the Wild Type and an Ethanol-Resistant Mutant of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* **114**: 239-48.
- Gottschal, J. C., J. G. Morris.** 1981. The induction of acetone and butanol production in cultures of *Clostridium acetobutylicum* by elevated concentrations of acetate and butyrate. *FEMS Microbiology Letters* **12**: 385-389.
- Gottwald, M., G. Gottschalk.** 1985. The internal pH of *Clostridium acetobutylicum* and its effect on the shift from acid to solvent formation. *Archives of Microbiology* **143**: 42-46.
- Green, E. M., Z. L. Boynton, L. M. Harris, F. B. Rudolph, E. T. Papoutsakis, G. N. Bennett.** 1996. Genetic manipulation of acid formation pathways by gene inactivation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Microbiology (Reading, England)* **142**: 2079-86.

- Green, E. M.** 2011. Fermentative production of butanol-the industrial perspective. *Current Opinion in Biotechnology* **22**: 337-343.
- Grimmler, C., C. Held, W. Liebl, A. Ehrenreich.** 2010. Transcriptional analysis of catabolite repression in *Clostridium acetobutylicum* growing on mixtures of D-glucose and D-xylose. *Journal of Biotechnology* **150**: 315-23.
- Grimmler, C., H. Janssen, D. Krausse, R.-J. Fischer, H. Bahl, P. Dürre, W. Liebl, A. Ehrenreich.** 2011. Genome-Wide Gene Expression Analysis of the Switch between Acidogenesis and Solventogenesis in Continuous Cultures of *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **20**: 1-15.
- Gu, Y., Y. Jiang, H. Wu, X. Liu, Z. Li, J. Li, H. Xiao, Z. Shen, H. Dong, Y. Yang, Y. Li, W. Jiang, S. Yang.** 2011. Economical challenges to microbial producers of butanol: Feedstock, butanol ratio and titer. *Biotechnology Journal* **6**: 1348-57.
- Han, B., V. Gopalan, T. C. Ezeji.** 2011. Acetone production in solventogenic *Clostridium* species: new insights from non-enzymatic decarboxylation of acetoacetate. *Applied Microbiology and Biotechnology* **91**: 565-76.
- Harris, L. M., R. P. Desai, N. E. Welker, E. T. Papoutsakis.** 2000. 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* **67**: 1-11.
- Hartmanis, M. G., S. Gatenbeck.** 1984. Intermediary Metabolism in *Clostridium acetobutylicum*: Levels of Enzymes Involved in the Formation of Acetate and Butyrate. *Applied and Environmental Microbiology* **47**: 1277-83.
- El Hawrani, A. S., R. B. Sessions, K. M. Moreton, J. J. Holbrook.** 1996. Guided Evolution of Enzymes with New Substrate Specificities. *Journal of Molecular Biology* **264**: 97-110.
- Heap, J. T., S. A. Kuehne, M. Ehsaan, S. T. Cartman, C. M. Cooksley, J. C. Scott, N. P. Minton.** 2010. The ClosTron: Mutagenesis in *Clostridium* refined and streamlined. *Journal of Microbiological Methods* **80**: 49-55.
- Heap, J. T., O. J. Pennington, S. T. Cartman, G. P. Carter, N. P. Minton.** 2007. The ClosTron: A universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*. *Journal of Microbiological Methods* **70**: 452-64.
- Hebeler, B. H., F. E. Young.** 1976. Mechanism of Autolysis of *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Bacteriology* **126**: 1186-93.
- Heick, H. M. C., J. Willemot, N. Begin-Heick.** 1969. The subcellular localization of alcohol dehydrogenase activity in baker's yeast. *Biochimica et Biophysica Acta - Enzymology* **191**: 493-501.
- Hermann, M., F. Fayolle, R. Marchal, L. Podvin, M. Sebald, J. P. Vandecasteele.** 1985. Isolation and Characterization of Butanol-Resistant Mutants of *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology* **50**: 1238-43.

- Herrero, A. A., R. F. Gomez.** 1980. Development of Ethanol Tolerance in *Clostridium thermocellum*: Effect of Growth Temperature. *Applied and Environmental Microbiology* **40**: 571-7.
- Herrero, A. A.** 1983. End-product inhibition in anaerobic fermentations. *Trends in Biotechnology* **1**: 49-53.
- Herrero, A. A., R. Gomez, B. Snedecor, C. Tolman, M. Roberts.** 1985. Growth inhibition of *Clostridium thermocellum* by carboxylic acids: A mechanism based on uncoupling by weak acids. *Applied Microbiology and Biotechnology* **22**: 53-62.
- Hopwood, D. A.** 1970. The isolation of mutants. In: Norris, J. R., D. W. Robbins, editors. *Methods in Microbiology* Vol. 3A. New York, USA: Academic Press Inc., pp. 363-433.
- Hu, X. H., M. H. Wang, T. Tan, J. R. Li, H. Yang, L. Leach, R. M. Zhang, Z. W. Luo.** 2007. Genetic Dissection of Ethanol Tolerance in the Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **175**: 1479-87.
- Huesemann, M., E. T. Papoutsakis.** 1986. Effect of acetoacetate, butyrate, and uncoupling ionophores on growth and product formation of *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnology Letters* **8**: 37-42.
- Ingram, L. O.** 1976. Adaptation of membrane lipids to alcohols. *Journal of Bacteriology* **125**: 670-8.
- Ingram, L. O.** 1977. Changes in Lipid Composition of *Escherichia coli* Resulting from Growth with Organic Solvents and with Food Additives. *Applied and Environmental Microbiology* **33**: 1233-6.
- Inoue, A., K. Horikoshi.** 1989. A *Pseudomonas* thrives in high concentrations of toluene. *Nature* **338**: 264-266.
- Isken, S., A. Derks, P. F. Wolffs, J. A. de Bont.** 1999. Effect of Organic Solvents on the Yield of Solvent-Tolerant *Pseudomonas putida* S12. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 2631-5.
- Isken, S., J. A. M. de Bont.** 1998. Bacteria tolerant to organic solvents. *Extremophiles* **2**: 229-238
- Jia, K., Y. Zhang, Y. Li.** 2012. Identification and Characterization of Two Functionally Unknown Genes Involved in Butanol Tolerance of *Clostridium acetobutylicum*. *PLoS one* **7**: e38815.
- Jiang, Y., C. Xu, F. Dong, Y. Yang, W. Jiang, S. Yang.** 2009. Disruption of the acetoacetate decarboxylase gene in solvent-producing *Clostridium acetobutylicum* increases the butanol ratio. *Metabolic Engineering* **11**: 284-91.
- Jones, D. T., W. A. Jones, D. R. Woods.** 1985. Production of Recombinants after Protoplast Fusion in *Clostridium acetobutylicum* P262. *Microbiology* **131**: 1213-1216.

- Jones, D. T., A. van der Westhuizen, S. Long, E. R. Allcock, S. J. Reid, D. R. Woods.** 1982. Solvent Production and Morphological Changes in *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology* **43**: 1434-9.
- Jones, D. T., D. R. Woods.** 1986. Acetone-Butanol Fermentation Revisited. *Microbiological Reviews* **50**: 484-524.
- Jones, S. W., C. J. Paredes, B. Tracy, N. Cheng, R. Sillers, R. S. Senger, E. T. Papoutsakis.** 2008. The transcriptional program underlying the physiology of clostridial sporulation. *Genome Biology* **9**: R114.
- Junelles, A.-M., R. Janati-Idrissi, A. Kanouni, H. Petitdemange, R. Gay.** 1987. Acetone-butanol fermentation by mutants selected for resistance to acetate and butyrate halogen analogues. *Biotechnology Letters* **9**: 175-178.
- Kashket, E.** 1987. Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiology Letters* **46**: 233-244.
- Kawata, T., K. Takumi, S. Sato, H. Yamashita.** 1968. Autolytic formation of spheroplasts and autolysis of cell walls in *Clostridium botulinum* type A. *Japanese Journal of Microbiology* **12**: 445-55.
- Kirschner, M.** 2006. n-Butanol. Chemical Market Reporter January 30 – February 5 ABI/INFORM Global, p. 42.
- Kosaka, T., S. Nakayama, K. Nakaya, S. Yoshino, K. Furukawa.** 2007. Characterization of the *sol* Operon in Butanol-Hyperproducing *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* Strain N1-4 and Its Degeneration Mechanism. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **71**: 58-68.
- Lawley, P. D.** 1984. Carcinogenesis by alkylating agents. In: Searle, C. E., editor. *Chemical carcinogens* 2nd ed. American Chemical Society, Washington, DC. pp. 326-384.
- Lederberg, J.** 1948. Detection of Fermentative Variants with Tetrazolium. *Journal of Bacteriology* **56**: 695.
- Leduc, M., J. van Heijenoort.** 1980. Autolysis of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **142**: 52-9.
- Lee, J., W. J. Mitchell, M. Tangney, H. P. Blaschek.** 2005. Evidence for the Presence of an Alternative Glucose Transport System in *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 and the Solvent-Hyperproducing Mutant BA101. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 3384-7.
- Lee, J., Y.-S. Jang, S. J. Choi, J. A. Im, H. Song, J. H. Cho, D. Y. Seung, E. T. Papoutsakis, G. N. Bennett, S. Y. Lee.** 2012. Metabolic Engineering of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 for Isopropanol-Butanol-Ethanol Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* **78**: 1416-23.
- Lee, S. Y., J. H. Park, S. H. Jang, L. K. Nielsen, J. Kim, K. S. Jung.** 2008. Fermentative Butanol Production by Clostridia. *Biotechnology and Bioengineering* **101**: 209-28.

- Lehmann, D.** 2012. Neue Einblicke in den Gärungsstoffwechsel von *Clostridium acetobutylicum*. Dissertation, Universität Rostock.
- Lehmann, D., D. Hönicke, A. Ehrenreich, M. Schmidt, D. Weuster-Botz, H. Bahl, T. Lütke-Eversloh.** 2012a. Modifying the product pattern of *Clostridium acetobutylicum*: Physiological effects of disrupting the acetate and acetone formation pathways. *Applied Microbiology and Biotechnology* **94**: 743-754.
- Lehmann, D., T. Lütke-Eversloh.** 2011. Switching *Clostridium acetobutylicum* to an ethanol producer by disruption of the butyrate/butanol fermentative pathway. *Metabolic Engineering* **13**: 464-73.
- Lehmann, D., N. Radomski, T. Lütke-Eversloh.** 2012b. New insights into the butyric acid metabolism of *Clostridium acetobutylicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. DOI 10.1007/s00253-012-4109-x
- Lemmel, S. A.** 1985. Mutagenesis in *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnology Letters* **7**: 711-716.
- Lepage, C., F. Fayolle, M. Hermann, J. P. Vandecasteele.** 1987. Changes in Membrane Lipid Composition of *Clostridium acetobutylicum* during Acetone-Butanol Fermentation: Effects of Solvents, Growth Temperature and pH. *Microbiology* **133**: 103-110.
- Lin, Y. L., H. P. Blaschek.** 1983. Butanol Production by a Butanol-Tolerant Strain of *Clostridium acetobutylicum* in Extruded Corn Broth. *Applied and Environmental Microbiology* **45**: 966-73.
- Long, S., D. Jones, D. Woods.** 1984. Initiation of solvent production, clostridial stage and endospore formation in *Clostridium acetobutylicum* P262. *Applied Microbiology and Biotechnology* **20**: 256-261.
- Lord, H. L., P. D. Josephy, V. A. Snieckus.** 1990. Reevaluation of the Effect of Ellagic Acid on N-methyl-N-nitrosourea DNA Alkylation and Mutagenicity. *Chemical Research in Toxicology* **3**: 195-8.
- Lovitt, R. W., G. J. Shen, J. G. Zeikus.** 1988. Ethanol Production by Thermophilic Bacteria: Biochemical Basis for Ethanol and Hydrogen Tolerance in *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *Journal of Bacteriology* **170**: 2809-15.
- Lütke-Eversloh, T., H. Bahl.** 2011. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum*: recent advances to improve butanol production. *Current Opinion in Biotechnology* **22**: 634-47.
- Maddox, I. S., E. Steiner, S. Hirsch, S. Wessner, N. A. Gutierrez, J. R. Gapes, K. C. Schuster.** 2000. The Cause of "Acid-Crash" and "Acidogenic Fermentations" During the Batch Acetone-Butanol-Ethanol (ABE-) Fermentation Process. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **2**: 95-100.
- Malaviya, A., Y.-S. Jang, S. Y. Lee.** 2012. Continuous butanol production with reduced byproducts formation from glycerol by a hyper producing mutant of *Clostridium pasteurianum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **93**: 1485-94.

- Manchenko, G. P.** 1994. Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels. 2nd ed. CRC Press, Inc., Boca Raton.
- Mann, M. S., Z. Dragovic, G. Schirmmacher, T. Lütke-Eversloh.** 2012. Over-expression of stress protein-encoding genes helps *Clostridium acetobutylicum* to rapidly adapt to butanol stress. *Biotechnology Letters*. DOI: 10.1007/s10529-012-0951-2
- Mao, S., Y. Luo, T. Zhang, J. Li.** 2010. Proteome Reference Map and Comparative Proteomic analysis between a Wild Type *Clostridium acetobutylicum* DSM 1731 and its Mutant with Enhanced Butanol. *Journal of Proteome Research* **9**: 3046-3061.
- Matta-el-Ammouri, G., R. Janati-Idrissi, J.-M. Rambourg, H. Petitdemange, R. Gay.** 1986. Acetone Butanol Fermentation by a *Clostridium acetobutylicum* Mutant with High Solvent Productivity. *Biomass* **10**: 109-119.
- Mattsson, D. M., P. Rogers.** 1994. Analysis of Tn916-induced mutants of *Clostridium acetobutylicum* altered in solventogenesis and sporulation. *Journal of Industrial Microbiology* **13**: 258-68
- Mayer, K. M., F. H. Arnold.** 2002. A Colorimetric Assay to Quantify Dehydrogenase Activity in Crude Cell Lysates. *Journal of Biomolecular Screening* **7**: 135-140.
- Medkor, N., I. Zerdani, S. Sattar.** 2010. Isolation of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 Mutants Using Propionic and Isovaleric Acid Halogen Analogues as Suicide Substrates. *International Journal of Microbiological Research* **1**: 22-25.
- Mermelstein, L. D., E. T. Papoutsakis.** 1993. In Vivo Methylation in *Escherichia coli* by the *Bacillus subtilis* Phage Φ 3T I Methyltransferase To Protect Plasmids from Restriction upon Transformation of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 1077-81.
- Mitchell, W. J., K. A. Albasheri, M. Yazdani.** 1995. Factors affecting utilization of carbohydrates by clostridia. *FEMS Microbiology Reviews* **17**: 317-329.
- Mohan, R. R., D. P. Kronish, R. S. Pianotti, R. L. Epstein, B. S. Schwartz.** 1965. Autolytic Mechanism for Spheroplast Formation in *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **90**: 1355-64.
- Monot, F., J. R. Martin, H. Petitdemange, R. Gay.** 1982. Acetone and Butanol Production by *Clostridium acetobutylicum* in a Synthetic Medium. *Applied and Environmental Microbiology* **44**: 1318-24.
- Moreira, A. R., D. C. Ulmer, J. C. Linden.** 1981. Butanol toxicity in the butylic fermentation. *Biotechnol. Bioeng. Symp.; (United States)* **11**: 567-579.
- Murray, W. D., K. B. Wemyss, A. W. Khan.** 1983. Increased Ethanol Production and Tolerance by a Pyruvate-Negative Mutant of *Clostridium saccharolyticum*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* **18**: 71-74.
- Nagai, S., N. Yanagishima, H. Nagai.** 1961. Advances in the study of respiration-deficient (RD) mutation in yeast and other microorganisms. *Bacteriological Reviews* **25**: 404-26.

- Nair, R. V.** 1995. Molecular characterization and regulation of a multifunctional aldehyde/alcohol dehydrogenase gene from and its use for the metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824; Northwestern University, Evanston, IL.
- Newbold, R. F., W. Warren, A. S. Medcalf, J. Amos.** 1980. Mutagenicity of carcinogenic methylating agents is associated with a specific DNA modification. *Nature* **283**: 596-599.
- Nölling, J., G. Breton, M. V. Omelchenko, K. S. Makarova, Q. Zeng, R. Gibson, H. M. Lee, J. Dubois, D. Qiu, J. Hitti, Y. I. Wolf, R. L. Tatusov, F. Sabathe, L. Doucette-Stamm, P. Soucaille, M. J. Daly, G. N. Bennett, E. V. Koonin, D. R. Smith.** 2001. Genome Sequence and Comparative Analysis of the Solvent-Producing Bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of Bacteriology* **183**: 4823-38.
- Ogata, S., M. Hongo.** 1974. Lysis Induced by Sodium Ion and Its Relation to Lytic Enzyme Systems in *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*. *Journal of General Microbiology* **81**: 315-23.
- Papoutsakis, E. T.** 2008. Engineering solventogenic clostridia. *Current Opinion in Biotechnology* **19**: 420-9.
- Paredes, C. J., K. V. Alsaker, E. T. Papoutsakis.** 2005. A comparative genomic view of clostridial sporulation and physiology. *Nature Reviews. Microbiology* **3**: 969-78.
- Pinazo, A., L. Puigjaner, L. Coderch, M. Vinas.** 1993. Butanol resistant mutants of *Clostridium acetobutylicum*: isolation and partial characterization. *Microbios* **73**: 93-104.
- Qureshi, N., H. P. Blaschek.** 2001. Recent advances in ABE fermentation: hyperbutanol producing *Clostridium beijerinckii* BA101. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **27**: 287-91.
- Qureshi, N., T. C. Ezeji, J. Ebener, B. S. Dien, M. A. Cotta, H. P. Blaschek.** 2008. Butanol production by *Clostridium beijerinckii*. Part I: use of acid and enzyme hydrolyzed corn fiber. *Bioresource Technology* **99**: 5915-22.
- Ramos, J. L., E. Duque, J. J. Rodríguez-Herva, P. Godoy, A. Haïdour, F. Reyes, A. Fernández-Barrero.** 1997. Mechanisms for Solvent Tolerance in Bacteria. *The Journal of Biological Chemistry* **272**: 3887-90.
- Reed, W. M.** 1988. Mutation and genetic engineering of anaerobic bacteria. In: Erickson, L. E., D. V. C. Fung, editors. *Handbook on Anaerobic Fermentations* 3rd ed. Dekker, New York, USA, pp. 27-58.
- Ren, C., Y. Gu, S. Hu, Y. Wu, P. Wang, Y. Yang, C. Yang, S. Yang, W. Jiang.** 2010. Identification and inactivation of pleiotropic regulator CcpA to eliminate glucose repression of xylose utilization in *Clostridium acetobutylicum*. *Metabolic Engineering* **12**: 446-54.
- Reysenbach, A. L., N. Ravenscroft, S. Long, D. T. Jones, D. R. Woods.** 1986. Characterization, Biosynthesis, and Regulation of Granulose in *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology* **52**: 185-90.

- Richardson, K. K., F. C. Richardson, R. M. Crosby, J. A. Swenberg, T. R. Skopek.** 1987. DNA base changes and alkylation following *in vivo* exposure of *Escherichia coli* to N-methyl-N-nitrosourea or N-ethyl-N-nitrosourea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**: 344-8.
- Riebeling, V., R. K. Thauer, K. Jungermann.** 1975. The Internal Alkaline pH Gradient, Sensitive to Uncoupler and ATPase Inhibitor, in Growing *Clostridium pasteurianum*. *European Journal of Biochemistry / FEBS* **55**: 445-53.
- Rigomier, D., J. P. Bohin, B. Lubochinsky.** 1980. Effects of Ethanol and Methanol on Lipid Metabolism in *Bacillus subtilis*. *Journal of General Microbiology* **121**: 139-49.
- Rogers, P., N. Palosaari.** 1987. *Clostridium acetobutylicum* Mutants That Produce Butyraldehyde and Altered Quantities of Solvents. *Applied and Environmental Microbiology* **53**: 2761-6.
- Rothstein, D. M.** 1986. *Clostridium thermosaccharolyticum* Strain Deficient in Acetate Production. *Journal of Bacteriology* **165**: 319-20.
- Ryden, R.** 1958. Development of anaerobic fermentation processes: acetone butanol. In: Steel, R., editor. *Biochemical Engineering*. Heywood and Co. Ltd., London, GB, pp. 123-148.
- Santos, C. N. S., G. Stephanopoulos.** 2008. Combinatorial engineering of microbes for optimizing cellular phenotype. *Current Opinion in Chemical Biology* **12**: 168-76.
- Schöpp, W., H. Aurich.** 1976. Kinetics and Reaction Mechanism of Yeast Alcohol Dehydrogenase with Long-Chain Primary Alcohols. *The Biochemical Journal* **157**: 15-22.
- Servinsky, M. D., J. T. Kiel, N. F. Dupuy, C. J. Sund.** 2010. Transcriptional analysis of differential carbohydrate utilization by *Clostridium acetobutylicum*. *Microbiology (Reading, England)* **156**: 3478-91.
- Shanabruch, W. G., R. P. Rein, I. Behlau, G. C. Walker.** 1983. Mutagenesis, by Methylating and Ethylating Agents, in *mutH*, *mutL*, *mutS*, and *uvrD* Mutants of *Salmonella typhimurium* LT2. *Journal of Bacteriology* **153**: 33-44.
- Shockman, G. D., M. J. Conover, J. J. Kolb, P. M. Phillips, L. S. Riley, G. Toennies.** 1961. Lysys of *Streptococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology* **81**: 36-43.
- Sikkema, J., J. A. de Bont, B. Poolman.** 1995. Mechanisms of Membrane Toxicity of Hydrocarbons. *Microbiological Reviews* **59**: 201-22.
- Sikkema, J., J. A. de Bont, B. Poolman.** 1994. Interactions of Cyclic Hydrocarbons with Biological Membranes. *The Journal of Biological Chemistry* **269**: 8022-8.
- Singer, B., D. Grunberger.** 1983. *Molecular Biology of Mutagens and Carcinogens*. Springer.
- Singer, B., J. T. Kusmierk.** 1982. Chemical mutagenesis. *Annual Review of Biochemistry* **52**: 655-693.

- Singer, B., S. J. Spengler, H. Fraenkel-Conrat, J. T. Kuśmierk.** 1986. O⁴-Methyl, -ethyl, or -isopropyl substituents on thymidine in poly(dA-dT) all lead to transitions upon replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**: 28-32.
- Stim-Herndon, K. P., R. Nair, E. T. Papoutsakis, G. N. Bennett.** 1996. Analysis of Degenerate Variants of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Anaerobe* **2**: 11-18.
- Terracciano, J. S., E. R. Kashket.** 1986. Intracellular Conditions Required for Initiation of Solvent Production by *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology* **52**: 86-91.
- Thomson, J. M., E. A. Gaucher, M. F. Burgan, D. W. De Kee, T. Li, J. P. Aris, S. A. Benner.** 2005. Resurrecting ancestral alcohol dehydrogenases from yeast. *Nature Genetics* **37**: 630-5.
- Tomas, C. A., N. E. Welker, E. T. Papoutsakis.** 2003. Overexpression of *groESL* in *Clostridium acetobutylicum* Results in Increased Solvent Production and Tolerance, Prolonged Metabolism, and Changes in the Cell's Transcriptional Program. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 4951-65.
- Tracy, B. P., S. M. Gaida, E. T. Papoutsakis.** 2008. Development and Application of Flow-Cytometric Techniques for Analyzing and Sorting Endospore-Forming Clostridia. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 7497-506.
- Tracy, B. P., S. M. Gaida, E. T. Papoutsakis.** 2010. Flow cytometry for bacteria: enabling metabolic engineering, synthetic biology and the elucidation of complex phenotypes. *Current Opinion in Biotechnology* **21**: 85-99.
- Tummala, S. B., N. E. Welker, E. T. Papoutsakis.** 2003. Design of Antisense RNA Constructs for Downregulation of the Acetone Formation Pathway of *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of Bacteriology* **185**: 1923-34.
- Van Der Westhuizen, A., D. T. Jones, D. R. Woods.** 1982. Autolytic Activity and Butanol Tolerance of *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology* **44**: 1277-81.
- Vollherbst-Schneck, K., J. A. Sands, B. S. Montencourt.** 1984. Effect of butanol on lipid composition and fluidity of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Applied and Environmental Microbiology* **47**: 193-4.
- Wang, G., D. I. Wang.** 1984. Elucidation of Growth Inhibition and Acetic Acid Production by *Clostridium thermoaceticum*. *Applied and Environmental Microbiology* **47**: 294-8.
- Wang, S., Y. Zhang, H. Dong, S. Mao, Y. Zhu, R. Wang, G. Luan, Y. Li.** 2011. Formic Acid Triggers the "Acid Crash" of Acetone-Butanol-Ethanol Fermentation by *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology* **77**: 1674-80.
- Webster, J. R., S. J. Reid, D. T. Jones, D. R. Woods.** 1981. Purification and Characterization of an Autolysin from *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology* **41**: 371-4.

- Wegener, W. S., B. H. Hebeler, S. A. Morse.** 1977. Cell envelope of *Neisseria gonorrhoeae*: relationship between autolysis in buffer and the hydrolysis of peptidoglycan. *Infection and Immunity* **18**: 210-9.
- Wiesenborn, D. P., F. B. Rudolph, E. T. Papoutsakis.** 1989. Coenzyme A transferase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and its role in the uptake of acids. *Applied and Environmental Microbiology* **55**: 323-9.
- Wills, C.** 1976. Production of yeast alcohol dehydrogenase isoenzymes by selection. *Nature* **261**: 26-29.
- Wong, J., G. N. Bennett.** 1996. Recombination-Induced Variants of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 with Increased Solvent Production. *Current Microbiology* **32**: 349-356.
- Yarosh, D. B.** 1985. The role of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in cell survival, mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Research* **145**: 1-16.
- Zhang, J.-H., T. D. Y. Chung, K. R. Oldenburg.** 1999. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *Journal of Biomolecular Screening* **4**: 67-73.
- Zhao, Y., L. A. Hindorff, A. Chuang, M. Monroe-Augustus, M. Lyristis, M. L. Harrison, F. B. Rudolph, G. N. Bennett.** 2003. Expression of a Cloned Cyclopropane Fatty Acid Synthase Gene Reduces Solvent Formation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 2831-2841.
- Zheng, Y.-N., L.-Z. Li, M. Xian, Y.-J. Ma, J.-M. Yang, X. Xu, D.-Z. He.** 2009. Problems with the microbial production of butanol. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **36**: 1127-38.
- Zimmer, D. M., B. K. Bhuyan.** 1976. Mutagenicity of streptozotocin and several other nitrosourea compounds in *Salmonella typhimurium*. *Mutation Research* **40**: 281-8.

Danksagung

Herrn **Prof. Dr. Hubert Bahl** danke ich für die Möglichkeit der Promotion in der von ihm geleiteten Abteilung.

Ich danke Frau **Dr. Tina Lütke-Eversloh** für die Betreuung dieser Arbeit, die konstruktiven Gespräche und Anregungen, die Diskussionsbereitschaft und die Durchsicht dieser Arbeit.

Danke an **Cindy Kunze** und **Manja Schilke** für die tatkräftige Mitarbeit innerhalb wichtiger Abschnitte dieser Arbeit.

Ebenso bedanke ich mich bei **Dörte Lehmann** für die Bereitstellung der von ihr generierten Mutantenstämme.

Ein großes Dankeschön gilt den Mitarbeitern der Abteilung Mikrobiologie, insbesondere **Ilona Boldt, Dr. Ralf-Jörg Fischer, Hella Goschke, Dr. Holger Janssen, Dr. Antje May, Dr. Oliver Riebe, Monika Timm, Christine Voigt und Mandy Wietzke** für die Hilfsbereitschaft und die angenehme Zusammenarbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei **Franziska Schulz** für die Kraft und Motivation, die vielen aufbauenden Worte, die Unterstützung innerhalb und außerhalb des Labors und die schöne gemeinsame Zeit bedanken. Weiterhin danke ich ihr für das Korrekturlesen und die große Hilfe bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Schließlich danke ich meinen Eltern **Sabine und Wolfgang Scheel** herzlichst für den Rückhalt in jeder Lebenslage, die moralische und finanzielle Unterstützung und das mir entgegengebrachte Vertrauen. Bei meinem Bruder **Andreas Scheel** bedanke ich mich für die zahlreichen Gespräche und Aktivitäten, die mich den Stress der Promotion so manches Mal vergessen lassen haben.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Rostock, August 2012

Michael Scheel