

Genetische Veränderung von *Clostridium ljungdahlii*
zur Produktion von 1-Butanol aus Synthesegas

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat.

der Fakultät für Naturwissenschaften

der Universität Ulm

vorgelegt von

Michael Köpke

aus Hamburg

Ulm, 2009

Die vorliegende Arbeit wurde in dem Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie der
Universität Ulm, unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Peter Dürre angefertigt.

| | |
|--------------------|-----------------------|
| Amtierender Dekan: | Prof. Dr. P. Bächerle |
| Erstgutachter: | Prof. Dr. P. Dürre |
| Zweitgutachter: | Prof. Dr. B. Eikmanns |
| Tag der Promotion: | 08.06.2009 |

Im Andenken an meinen Vater

*“Der Mensch hat dreierlei Wege klug zu handeln:
Erstens durch nachdenken, das ist der edelste,
zweitens durch nachahmen, das ist der leichteste,
und drittens durch Erfahrung, das ist der bitterste.“*

Konfuzius

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| 1. Einleitung..... | 1 |
| 2. Material und Methoden..... | 9 |
| 2.1. Materialien..... | 9 |
| 2.1.1. Gase | 9 |
| 2.1.2. Chemikalien..... | 10 |
| 2.1.3. Enzyme | 15 |
| 2.1.4. Molekularbiologische Hilfsmittel..... | 16 |
| 2.1.5. Geräte..... | 17 |
| 2.1.6. Verbrauchsmaterialien..... | 20 |
| 2.2. Bakterienstämme | 21 |
| 2.3. Plasmide..... | 23 |
| 2.4. Oligodesoxynukleotide | 28 |
| 2.5. Zellanzucht | 31 |
| 2.5.1. Nährmedien..... | 31 |
| 2.5.1.1. LB (Luria Bertani)-Medium | 33 |
| 2.5.1.2. TB (Terrific Broth)-Medium | 33 |
| 2.5.1.3. SOB-Medium..... | 34 |
| 2.5.1.4. SOC-Medium..... | 34 |
| 2.5.1.5. TM3a/Glucose-Medium..... | 35 |
| 2.5.1.6. RCM (“Reinforced Clostridial Medium“)..... | 36 |
| 2.5.1.7. Wilkins-Chalgren-Medium..... | 36 |
| 2.5.1.8. ATCC-Medium 1754 (PETC-Medium)..... | 36 |
| 2.5.1.9. DSMZ-Medium 879 (<i>Clostridium ljungdahlii</i> -Medium) | 38 |
| 2.5.1.10. Designed-Medium | 40 |
| 2.5.1.11. AC-11-Medium | 41 |
| 2.5.2. Medienzusätze | 42 |
| 2.5.2.1. Reduktionsmittel..... | 42 |
| 2.5.2.2. Antibiotika | 44 |
| 2.5.2.3. Sonstige Medienzusätze..... | 44 |
| 2.5.3. Anzuchtbedingungen | 45 |
| 2.5.4. Stammhaltung..... | 45 |
| 2.5.4.1. Stammhaltung von <i>E. coli</i> | 45 |
| 2.5.4.2. Stammhaltung von Clostridien | 46 |

| | | |
|----------|--|----|
| 2.5.5. | Bestimmung von Wachstums- und Stoffwechselfparametern | 47 |
| 2.5.5.1. | Trübungsmessung | 47 |
| 2.5.5.2. | Messung des externen pH-Wertes | 48 |
| 2.5.5.3. | Gaschromatographische Analytik des Produktspektrums..... | 48 |
| 2.6. | Arbeiten mit Nukleinsäuren..... | 49 |
| 2.6.1. | Behandlung von Lösungen und Geräten..... | 49 |
| 2.6.2. | Wässrige Lösungen und Puffer..... | 50 |
| 2.6.3. | Isolierung von Nukleinsäuren aus Bakterien | 50 |
| 2.6.3.1. | Isolierung von Gesamt-DNA aus <i>E. coli</i> | 50 |
| 2.6.3.2. | Isolierung von Gesamt-DNA aus Clostridien | 51 |
| 2.6.3.3. | Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> | 52 |
| 2.6.3.4. | Isolierung von Plasmid-DNA aus Clostridien | 54 |
| 2.6.3.5. | Isolierung von RNA aus Clostridien..... | 54 |
| 2.6.4. | Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren | 56 |
| 2.6.4.1. | Phenol-Chloroform-Extraktion..... | 56 |
| 2.6.4.2. | Ethanol-fällung..... | 56 |
| 2.6.4.3. | Isopropanol-fällung | 57 |
| 2.6.4.4. | Dialyse von DNA-Lösungen | 57 |
| 2.6.4.5. | Reinigung und Konzentrierung von DNA aus Lösungen mit molekularbiologischen Hilfsmitteln..... | 57 |
| 2.6.4.6. | Reinigung von DNA aus Agarose-Gelen mit molekularbiologischen Hilfsmitteln | 58 |
| 2.6.4.7. | Reinigung von radioaktiv markierter DNA mit molekularbiologischen Hilfsmitteln | 58 |
| 2.6.5. | Fraktionierung von Nukleinsäuren | 59 |
| 2.6.5.1. | Nicht-denaturierende Agarose-Gelelektrophorese..... | 59 |
| 2.6.5.2. | Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese..... | 60 |
| 2.6.6. | Färbung von Nukleinsäuren in Agarose-Gelen..... | 61 |
| 2.6.7. | Größenbestimmung von Nukleinsäuren | 61 |
| 2.6.8. | Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren | 62 |
| 2.6.8.1. | Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren im Spektralphotometer | 62 |
| 2.6.8.2. | Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren im Agarose-Gel | 63 |
| 2.6.9. | Vakuumtransfer von RNA auf Nylonmembranen (“Northern Blot“)... .. | 63 |
| 2.6.10. | Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten | 64 |
| 2.6.11. | Hybridisierung von RNA mit radioaktiv markierten DNA-Sonden | 65 |
| 2.6.12. | Detektion radioaktiv markierter DNA-Sonden..... | 66 |

| | | |
|-----------|---|----|
| 2.6.13. | Enzymatische Modifikation von DNA | 66 |
| 2.6.13.1. | Restriktionsspaltung von DNA..... | 66 |
| 2.6.13.2. | Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten | 67 |
| 2.6.13.3. | Ligation von DNA-Fragmenten | 68 |
| 2.6.14. | Amplifikation von DNA durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 68 |
| 2.6.14.1. | Herstellung synthetischer Oligodesoxynukleotide | 68 |
| 2.6.14.2. | Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 69 |
| 2.6.14.3. | Einfügen von Restriktionsschnittstellen | 71 |
| 2.6.14.4. | TA-Klonierung von PCR-Produkten..... | 72 |
| 2.6.15. | Sequenzierung von DNA | 72 |
| 2.6.16. | Metagenombanken..... | 73 |
| 2.6.16.1. | Herstellung von Metagenombanken..... | 73 |
| 2.6.16.2. | Durchmusterung von Metagenombanken..... | 73 |
| 2.7. | Transfer von DNA in Bakterien..... | 74 |
| 2.7.1. | Transformation von <i>E. coli</i> | 74 |
| 2.7.1.1. | Transformation durch chemisch kompetente Zellen..... | 74 |
| 2.7.1.2. | Transformation durch Elektroporation | 75 |
| 2.7.1.3. | Blau-Weiß-Selektion rekombinanter <i>E. coli</i> -Klone..... | 76 |
| 2.7.2. | Transformation von Clostridien..... | 77 |
| 2.7.2.1. | Methylierung von Plasmid-DNA..... | 77 |
| 2.7.2.2. | Transformation durch Elektroporation | 78 |
| 2.7.2.3. | Transformation durch Konjugation..... | 81 |
| 2.8. | Arbeiten mit Proteinen..... | 82 |
| 2.8.1. | Herstellung von Protein-Rohextrakten | 82 |
| 2.8.2. | Heterologe Überproduktion plasmidkodierter Proteine in <i>E. coli</i> | 82 |
| 2.8.2.1. | pET-Expressionssystem..... | 83 |
| 2.8.2.2. | pQE-Expressionssystem | 84 |
| 2.8.3. | Reinigung von Proteinen | 85 |
| 2.8.3.1. | Affinitätschromatographie an Nickel-Nitrilotriessigsäure..... | 85 |
| 2.8.3.2. | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) | 87 |
| 2.8.4. | Konzentrierung und Entsalzung von Protein-Lösungen | 87 |
| 2.8.4.1. | Dialyse von Protein-Lösungen..... | 87 |
| 2.8.4.2. | Konzentrierung und Entsalzung von Protein-Lösungen mit molekularbiologischen Hilfsmitteln..... | 88 |
| 2.8.5. | Konzentrationsbestimmung von Protein-Lösungen..... | 88 |
| 2.8.6. | Bestimmung von Enzymaktivitäten und Enzymkinetiken..... | 89 |
| 2.8.6.1. | Getestete Reaktionen | 90 |

| | | |
|----------|---|-----|
| 2.8.6.2. | Testansätze..... | 90 |
| 2.8.6.3. | Bestimmung von spezifischen Enzymaktivitäten | 92 |
| 2.8.6.4. | Bestimmung von Enzymkinetiken..... | 92 |
| 2.8.6.5. | Bestimmung weiterer enzymatischer Parameter..... | 93 |
| 2.8.7. | Fraktionierung von Proteinen | 93 |
| 2.8.7.1. | Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) | 93 |
| 2.8.7.2. | Nicht-denaturierende (native) Polyacrylamid-Gelelektrophorese | 95 |
| 2.8.8. | Färbung von Proteinen..... | 96 |
| 2.8.8.1. | Silber-Färbung | 96 |
| 2.8.8.2. | Kolloidale Coomassie-Färbung | 97 |
| 2.8.8.3. | Aktivitätsfärbung | 99 |
| 2.8.9. | Bestimmung der molekularen Masse von Proteinen | 99 |
| 2.8.10. | Massenspektrometrische Analyse von Proteinen..... | 100 |
| 3. | Ergebnisse | 101 |
| 3.1. | Wachstumsstudien von <i>C. ljungdahlii</i> | 101 |
| 3.1.1. | Vergleich verschiedener Nährmedien..... | 101 |
| 3.1.2. | Wachstum auf Fructose | 102 |
| 3.1.3. | Wachstum auf Synthesegas | 103 |
| 3.1.4. | Wachstum auf CO ₂ + H ₂ | 104 |
| 3.1.5. | Wachstum in Gegenwart von 1-Butanol..... | 105 |
| 3.1.6. | Wachstum in Gegenwart verschiedener Antibiotika | 106 |
| 3.1.7. | Wachstum bei Natriummangel | 107 |
| 3.2. | Konstruktion eines Butanol-Synthese-Operons..... | 108 |
| 3.3. | Synthese von 1-Butanol in <i>E. coli</i> | 109 |
| 3.4. | Synthese von 1-Butanol in <i>C. ljungdahlii</i> | 110 |
| 3.4.1. | Elektronentransfer-Flavoproteine von <i>C. ljungdahlii</i> | 110 |
| 3.4.2. | Einbringen des Butanol-Synthese-Operons in <i>C. ljungdahlii</i> | 111 |
| 3.4.3. | Wachstumsversuche von <i>C. ljungdahlii</i> mit dem Butanol-Synthese-Operon..... | 112 |
| 3.4.3.1. | Synthese von 1-Butanol aus Fructose | 113 |
| 3.4.3.2. | Synthese von 1-Butanol aus Synthesegas | 114 |
| 3.4.4. | Verstoffwechselung von 1-Butanol durch <i>C. ljungdahlii</i> | 115 |
| 3.4.5. | Expression der Butanol-Synthese-Gene in <i>C. ljungdahlii</i> | 116 |
| 3.5. | Verbesserung des Butanol-Synthese-Operons..... | 120 |
| 3.6. | Versuche mit <i>C. carboxidivorans</i> als alternativer Produktionsorganismus zu <i>C. ljungdahlii</i> | 123 |

| | | |
|----------|---|-----|
| 3.7. | Charakterisierung von neuen potentiellen Butanol-Dehydrogenasen aus Metagenombanken | 124 |
| 3.7.1. | Charakterisierung des Genprodukts von pAK110 <i>orf14</i> | 126 |
| 3.7.1.1. | Vergleich mit bekannten Proteinen..... | 126 |
| 3.7.1.2. | Bestimmung der molekularen Masse..... | 128 |
| 3.7.1.3. | Enzymkinetiken | 128 |
| 3.7.1.4. | Co-Substrat und Co-Faktoren | 129 |
| 3.7.1.5. | Substratspektrum | 130 |
| 3.7.1.6. | pH-Optimum..... | 131 |
| 3.7.2. | Charakterisierung des Genprodukts von pAK115 <i>orf22</i> | 131 |
| 3.7.2.1. | Vergleich mit bekannten Proteinen..... | 131 |
| 3.7.2.2. | Bestimmung der molekularen Masse..... | 132 |
| 3.7.2.3. | Enzymkinetiken | 133 |
| 3.7.2.4. | Co-Substrat und Co-Faktoren | 134 |
| 3.7.2.5. | Substratspektrum | 134 |
| 3.7.2.6. | pH-Optimum..... | 134 |
| 3.7.3. | Charakterisierung des Genprodukts von pTWB3 <i>orf2</i> | 135 |
| 3.7.3.1. | Vergleich mit bekannten Proteinen..... | 135 |
| 3.7.3.2. | Bestimmung der molekularen Masse..... | 136 |
| 3.7.3.3. | Enzymkinetiken | 137 |
| 3.7.3.4. | Co-Substrat und Co-Faktoren | 138 |
| 3.7.3.5. | Substratspektrum | 139 |
| 3.7.3.6. | pH-Optimum..... | 139 |
| 3.7.4. | Charakterisierung des Genprodukts von pTWB4 <i>orf5</i> | 140 |
| 3.7.4.1. | Vergleich mit bekannten Proteinen..... | 140 |
| 3.7.4.2. | Bestimmung der molekularen Masse..... | 140 |
| 3.7.4.3. | Enzymkinetiken | 141 |
| 3.8. | Autotrophes Wachstum von <i>C. difficile</i> | 149 |
| 4. | Diskussion..... | 150 |
| 5.a. | Zusammenfassung..... | 184 |
| 5.b. | Summary | 186 |
| 6. | Literatur..... | 188 |

Abkürzungen

| | |
|-----------------|--|
| A | Adenin |
| α | Alpha |
| APS | Ammoniumperoxidsulfat |
| Ap ^r | Ampicillin-Resistenz |
| As | Aminosäuren |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| AU | “Absorption Unit(s)“ (Absorptionseinheit(en)) |
| β | Beta |
| BAC | “Bacterial Artificial Chromosome“ (künstliches Bakterienchromosom) |
| Bp | Basenpaar(e) |
| c | “Centi“ (Präfix Hunderstel; 10^{-2}) |
| C | Cytosin |
| C | Kohlenstoff |
| C. | <i>Clostridium</i> |
| °C | Grad Celsius |
| C/I | Chloroform/Isoamylalkohol |
| Cm ^r | Chloramphenicol |
| CO | Kohlenmonoxid |
| CO ₂ | Kohlendioxid |
| CoA | Coenzym A |
| CTAB | Hexadecyltrimethylammoniumbromid |
| D- | “Dexter“ (rechts) |
| Da | Dalton |
| DMF | N,N-Dimethylformamid |
| DMSO | <i>di</i> -Methylsulfoxid |
| DNA | “Deoxyribonucleic Acid“ (Desoxyribonukleinsäure) |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| dNTP | Desoxynukleosid-5'-triphosphat |
| DSMZ | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen |
| E. | <i>Escherichia</i> |
| EDTA | Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure |
| Em ^r | Erythromycin |
| g | Gramm |
| G | Guanin |

| | |
|------------------------|--|
| G | Gravitationskraft |
| G+C-Gehalt | Gehalt an Guanin und Cytosin in einer DNA-Sequenz |
| <i>et al.</i> | “Et alii“ (und andere) |
| F | Farad |
| FID | Flammenionisationsdetektor |
| h | “Hekto“ (Präfix Hundert; 10^2) |
| h | Stunde(n) |
| H ₂ | Wasserstoff |
| H ₂ O | Wasser |
| HCl | Hydrochlorid (Salzsäure) |
| HEPES | <i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)piperazin- <i>N'</i> -(2-ethansulfonsäure) |
| HPLC | “High Performance Liquid Chromatography“ (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) |
| INT | Iodnitrotetrazoliumchlorid |
| IPTG | Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid |
| J | Joule |
| k | “Kilo“ (Präfix Tausend; 10^3) |
| Km ^r | Kanamycin-Resistenz |
| l | Liter |
| L- | “Laevis“ (links) |
| M | “Mega“ (Präfix Million; 10^6) |
| M | Molar (mol/l) |
| m | Meter |
| m | “Milli“ (Präfix Tausendstel; 10^{-3}) |
| mesh | Maschengröße |
| mol | Mol (Stoffmenge; $6,022 \times 10^{23}$ Teilchen) |
| μ | “Mikro“ (Präfix Millionstel; 10^{-6}) |
| min | Minute(n) |
| N | Äquivalentkonzentration |
| n | “Nano“ (Präfix Milliardstel; 10^{-9}) |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NAD ⁺ | β -Nicotinamidadeninucleotid |
| NADH + H ⁺ | β -Nicotinamidadeninucleotid (reduziert) |
| NADP ⁺ | β -Nicotinamidadeninucleotid-2'-phosphat |
| NADPH + H ⁺ | β -Nicotinamidadeninucleotid-2'-phosphat (reduziert) |
| NaOH | Natronlauge |
| NBT | Nitroblau-Tetrazoliumchlorid |
| Ω | Ohm |
| <i>o</i> - | “Ortho“ (aufrecht; Position des Zweitsubstituenten) |

| | |
|---------------------|---|
| OD _{600nm} | Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm |
| <i>orf</i> | “Open Reading Frame“ (Offener Leserahmen) |
| <i>ori</i> | “Origin of Replication“ (Replikationsursprung) |
| <i>p-</i> | “Para“ (gegen; Position des Zweitsubstituenten) |
| P | “Piko“ (Präfix Billionstel; 10 ⁻¹²) |
| Pa | Pascal |
| <i>p. a.</i> | “Pro analysi“ (zur Analyse) |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| P/C/I | Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol |
| PCR | “Polymerase Chain Reaction“ (Polymerase-Ketten-Reaktion) |
| pH | Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration |
| PMS | Phenazinmethosulfat |
| RBS | Ribosomen-Bindungsstelle |
| RNA | “Ribonucleic Acid“ (Ribonukleinsäure) |
| RNase | Ribonuklease |
| rRNA | Ribosomale RNA |
| RT | Raumtemperatur |
| s | Sekunde(n) |
| S | Siemens |
| S | Svedberg |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| Sp ^r | Spectinomycinresistenz |
| T | Thymin |
| <i>Taq</i> | Abkürzung für <i>Thermus aquaticus</i> |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethyldiamin |
| U | Enzymeinheit(en) (1 U = Enzymmenge, die 1 µmol Substrat pro Minute umsetzt) |
| ÜN | Über Nacht |
| Upm | Umdrehungen pro Minute |
| UV | Ultraviolettes Licht |
| V | Volt |
| Vol. | Volumen |
| (v/v) | Volumen pro Volumen |
| WT | Wild-Typ |
| (w/v) | Gewicht pro Volumen |
| X-Gal | 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-D-galactosid |

1. Einleitung

Butanol (auch 1-Butanol, *n*-Butanol oder Butylalkohol genannt) ist ein primärer Alkohol bestehend aus vier Kohlenstoffatomen (Abb. 1). Es handelt sich um eine brennbare, farblose, klare Flüssigkeit mit einem charakteristischen Geruch, welche mit organischen Lösungsmitteln beliebig mischbar, in Wasser jedoch nur begrenzt löslich ist. Die wichtigsten Eigenschaften sind in Tab. 1 zusammengefasst.

Tab. 1: Eigenschaften von 1-Butanol

| | |
|---------------------------------------|------------------------|
| Molekulare Masse: | 74,12 g/mol |
| Dichte ¹⁾ : | 0,81 g/cm ³ |
| Löslichkeit in Wasser ¹⁾ : | 90 g/l |
| Schmelzpunkt: | -89 °C |
| Siedepunkt: | 118 °C |
| Flammpunkt: | 35 °C |
| Zündpunkt: | 340 °C |

¹⁾ bei 20 °C

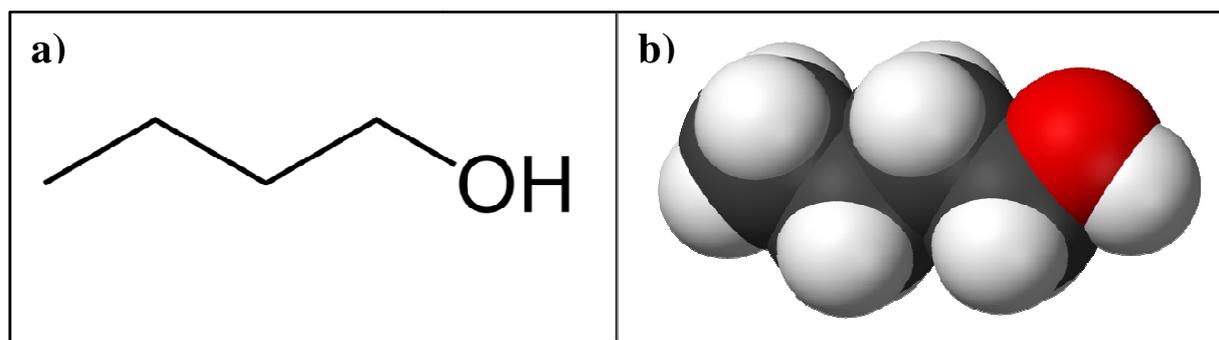


Abb. 1: Struktur von 1-Butanol ([http:// en.wikipedia.org/wiki/N-Butanol](http://en.wikipedia.org/wiki/N-Butanol)):

a) Skelettformel, b) Kalottenmodell

Weltweit werden derzeit jährlich ca. 4,5-5,5 Millionen Tonnen Butanol auf chemischem Weg hergestellt (Donaldson *et al.*, 2007). Rund die Hälfte davon wird in Butylacrylat und Butylmethacrylatester umgewandelt, welche hauptsächlich als Polymere in Oberflächenbeschichtungen und Lacken verwendet werden. Etwa ein Viertel wird zu Butylglykol umgesetzt, welches als Lösungsmittel für Industrie-Beschichtungen und Putzmittel, aber auch in der Elektronik Verwendung findet. Ein weiteres wichtiges Derivat ist Butylacetat, das sowohl in Farben und Tinte als auch als synthetischer Aromastoff eingesetzt wird. Darüber hinaus wird Butanol auch direkt als Lösungsmittel sowie in Hydraulik- und Bremsflüssigkeiten verwendet oder dient als Extraktionsmittel bei der Produktion von Medikamenten und natürlichen Substanzen wie Alkaloiden, Antibiotika, Hormonen und Vitaminen. In der Kosmetik- und Textilbranche wird Butanol ebenfalls eingesetzt (Dürre, 2005; 2008).

Es gibt verschiedene Möglichkeiten Butanol chemisch zu synthetisieren (Abb. 2). Heutzutage wird fast ausschließlich die 1938 von Otto Roelen entdeckte Oxo-Synthese (auch Hydroformylierung genannt) genutzt. Dabei handelt es sich um einen Zwei-Schritt-Prozess. Zuerst wird Propen mit Synthesegas (einem Gemisch aus CO und H₂) und der Hilfe eines Katalysators (Kobalt oder Rhodium), Hitze sowie Druck zu einem Aldehydgemisch umgesetzt, welches aus etwa 65-75 % Butyraldehyd besteht (je nach Prozess-Bedingungen). Dieses wird anschließend mit einem Nickel- oder Kupfer-Katalysator zu Butanol hydriert (Abb. 2a; Bahrmann und Bach, 2005; Weißermel und Arpe, 2003). Über einen 1942 von Walter Reppe für BASF entwickelten Prozess kann Propen auch direkt zu Butanol (je nach Bedingungen etwa 85 % Butanol und 15 % Isobutanol) umgesetzt werden (Abb. 2b). Möglich macht dies ein Eisenpentacarbonyl-Katalysator. Aufgrund zu hoher Kosten wurde dieser Prozess allerdings 1984 wieder eingestellt (von Kutepow und Kindler, 1960; Weißermel und Arpe, 2003).

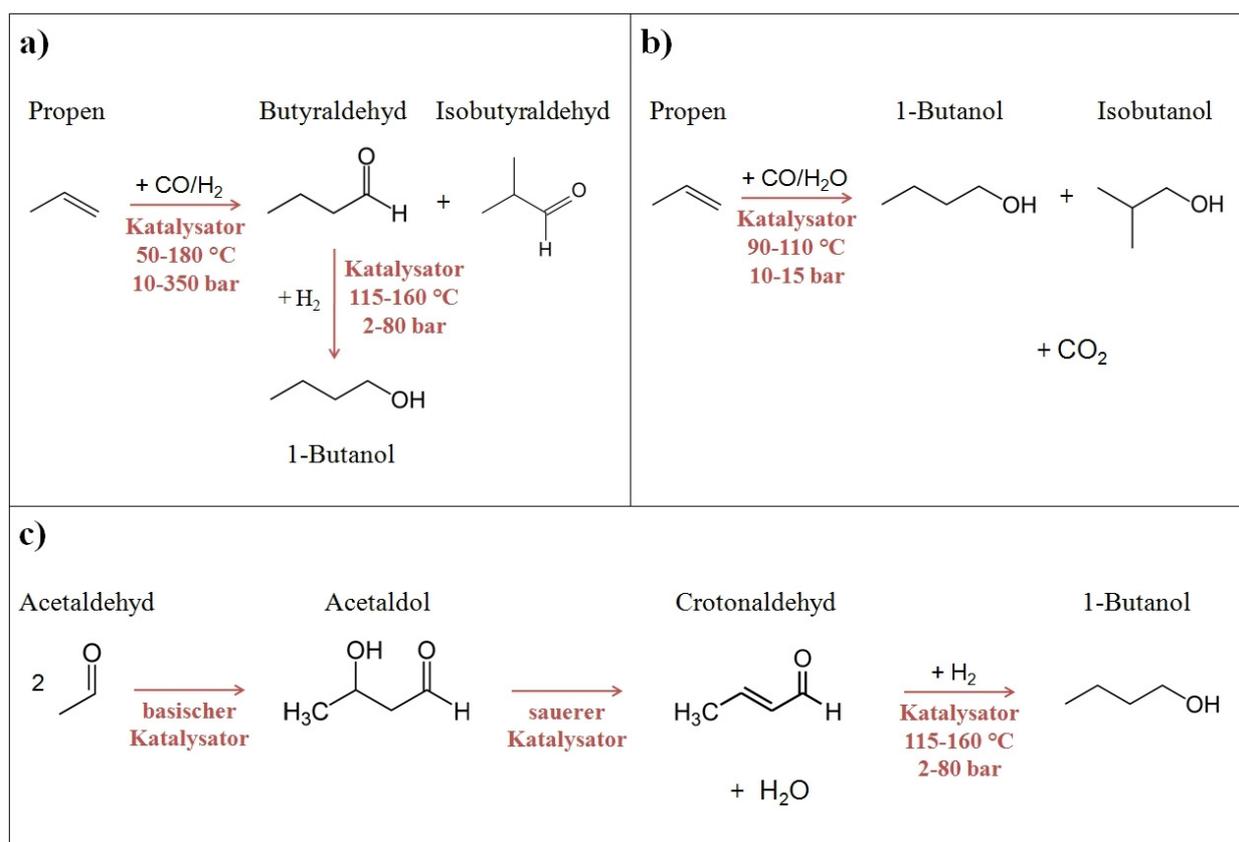


Abb. 2: Chemische Herstellung von 1-Butanol:

a) Oxo-Synthese (Hydroformylierung), b) Reppe-Prozess,

c) Acetaldol-Kondensation mit anschließender Crotonaldehyd-Hydrierung

Ohnehin jedoch sind Synthesen mit Propen als Ausgangsstoff nicht zukunftsträchtig, da dieses durch "cracken" von Erdöl gewonnen wird, welches immer knapper und somit auch teurer wird (Abb. 3). Schon während der ersten Ölkrise 1973 machte der Preis der Substrate Propen und Synthesegas bei der Oxo-Synthese zusammen etwa 75 % des Endproduktes Butanol aus (Frohning und Kohlschreiber, 1996). Die einzige chemische Alternative, eine Synthese ausgehend von Acetaldehyd (Abb. 2c), ist jedoch aufwendig und zudem entstehen erhebliche Mengen giftiges Abwasser. Deshalb findet dieser Prozess ausschließlich in Ländern wie Brasilien statt, welche über große Mengen Ethanol und infolgedessen auch Acetaldehyd verfügen (Weißermel und Arpe, 2003).

Butanol kann allerdings auch auf biotechnologischem Weg über die sogenannte ABE (Aceton-Butanol-Ethanol)-Fermentation mit einigen Clostridien gewonnen werden (zur Übersicht: Noack *et al.*, 2009; Dürre, 2005; 2007; 2008; Jones und Woods, 1986). Dabei handelt es sich um den volumenmäßig größten biotechnologischen Prozess hinter der Ethanol-Fermentation. Die erste industrielle Anwendung erfolgte bereits 1913 durch das britische Unternehmen Strange & Graham, Ltd.

Bereits einige Jahre zuvor wurden Auguste Fernbach und Moïse Schoen vom Institut Pasteur in Paris sowie William Perkins und Charles Weizmann von der Universität Manchester mit dem Ziel einen Butanol-produzierenden Organismus zu isolieren engagiert. Während Fernbach bereits kurz darauf erfolgreich war und entsprechende Patente anmeldete (Fernbach und Strange 1911ab; 1912), beendete Weizmann die Kooperation im Jahr 1912. Er führte seine Untersuchungen allerdings trotzdem fort und isolierte 1913 schließlich einen Organismus, welcher deutlich höhere Mengen an Butanol und Aceton produzierte und später als *Clostridium acetobutylicum* bekannt werden sollte (McCoy *et al.*, 1926). 1915 meldete auch Weizmann seinen Prozess zum Patent an (Weizmann, 1915).

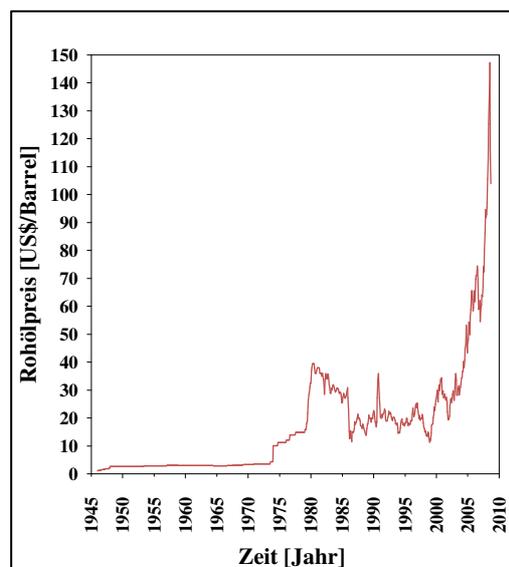


Abb. 3: Entwicklung des Rohölpreises der Marke West Texas Intermediate (WTI; Texas Light Sweet) von 1946 bis zum Einbruch der Finanzmärkte im Oktober 2008

Als 1914 der Erste Weltkrieg ausbrach, stand plötzlich das eigentliche Nebenprodukt der ABE-Fermentation, Aceton, im Mittelpunkt, weil es in großen Mengen für die Produktion von Kordit (ein rauchschwaches Schießpulver) benötigt wurde. Da Großbritannien dieses nun nicht mehr aus Österreich oder Deutschland importieren konnte, wurde Strange & Graham kontaktiert. Deren Produktion von etwa 440 kg Aceton pro Woche war der britischen Regierung jedoch zu wenig, weshalb sie sich 1916 deren Fabrik aneignete und die Produktion auf den Weizmann-Prozess umstellte. So konnten etwa 1000 kg Aceton pro Woche hergestellt werden. Später wurden auch in Kanada, den USA und Frankreich neue Produktionsanlagen errichtet (Gabriel, 1928). Der beständige Nachschub an Aceton war ein maßgeblicher Faktor für den Sieg der Alliierten im Ersten Weltkrieg. Weizmann, der mittlerweile seinen Vornamen von Charles in Chaim geändert hatte, lehnte allerdings alle Belohnungen und Auszeichnungen der britischen Regierung ab. Als Zionist machte er jedoch klar, dass die Schaffung einer neuen Heimat für das jüdische Volk in Palästina sein größter Wunsch wäre. Zweifelslos beeinflusste dies den britischen Außenminister zur Balfour-Deklaration und führte im späteren Verlauf zur Gründung Israels, dessen erster Präsident Chaim Weizmann schließlich 1949 wurde (Noack *et al.*, 2009; Dürre, 2007; Jones und Woods, 1986).

Nach dem Krieg ersteigerte die neu gegründete Commercial Solvents Corporation (CSC) die Rechte am Weizmann-Prozess sowie eine der Fabriken (Gabriel, 1928). Auch Strange & Graham nahmen ihre Geschäfte wieder auf, gingen jedoch kurz darauf nach einem verlorenen Rechtsstreit mit CSC in Konkurs. Dabei handelte es sich um den ersten Rechtsstreit über einen biotechnologischen Prozess in Großbritannien (Ross, 1961). Als 1936 das Patent für den Weizmann-Prozess auslief, wurden etliche neu isolierte Stämme patentiert sowie Anlagen in den USA, Großbritannien, Puerto Rico, Südafrika, Australien, der früheren Sowjetunion, Indien, China und der ehemaligen japanischen Kolonie Formosa (dem heutigen Taiwan) errichtet (Jones und Woods, 1986; McCutchan und Hickey, 1954). Während des Zweiten Weltkrieges stand erneut die Aceton-Produktion im Fokus. Noch bis 1950 wurden etwa zwei Drittel des weltweit produzierten Butanols biotechnologisch hergestellt (Rose, 1961), kurz darauf aber in den meisten westlichen Ländern die Anlagen stillgelegt. Aufgrund der steigenden Substratpreise für die ABE-Fermentation und von preiswertem Öl aus dem Mittleren Osten (Abb. 3), war die petrochemische Herstellung (Abb. 2) von nun an im Vorteil. Die ABE-Fermentation wurde lediglich noch in politisch isolierten Staaten, wie der ehemaligen Sowjetunion (Zverlov *et al.*, 2006), der Volksrepublik China (Chiao und Sun, 2007), Ägypten, oder dem von einem Apartheid-Regime geführten Südafrika (Jones, 2001) fortgeführt.

Durch die Ölkrise 1973 wurde erstmals wieder das Interesse an der ABE-Fermentation geweckt. Mittlerweile, da der Ölpreis explodiert (Abb. 3) und gleichzeitig Unklarheit über die restlichen Ölreserven unserer Erde und somit über das globale Ölfördermaximum herrscht, werden in vielen Staaten wie Großbritannien (http://www2.dupont.com/EMEA_Media/en_GB/newsreleases/article20070626.html), Brasilien (Afschar *et al.*, 1990), Frankreich (Nimcevic und Gapes, 2000; Nativel *et al.*, 1992) und Österreich (Gapes, 2000; Nimcevic und Gapes, 2000) neue Anlagen errichtet. Auch China hat seine Fermentations-Anlagen wieder geöffnet (Chiao und Sun, 2007). Das Interesse an der mikrobiellen Butanol-Produktion ist größer denn je.

Ein wichtiger Grund hierfür ist, dass biologisch produziertes Butanol, sogenanntes Biobutanol, als Biotreibstoff eingesetzt werden kann. Es kann mit normalem Benzin in jeder beliebigen Konzentration gemischt oder sogar pur in herkömmlichen Motoren verwendet werden (www.butanol.com), da es sehr ähnliche Eigenschaften wie normales Benzin hat (Tab. 2; Noack *et al.*, 2009; Dürre, 2007). Bioethanol, welches schon seit Jahrzehnten als Biokraftstoff eingesetzt wird, hat im Vergleich dazu deutlich ungünstigere Eigenschaften. So hat Ethanol nur etwa zwei Drittel der Energiedichte von Butanol und Benzin, was zu einer deutlich geringeren Laufleistung führt. Zu dieser trägt auch bei, dass Ethanol ein niedriges Luft-Treibstoff-Verhältnis besitzt und somit in reicheren Gemischen gefahren werden muss, um dieselbe Motorkraft zu erreichen. Weitere Nachteile sind der höhere Dampfdruck, was die Handhabung gefährlicher macht, und die doppelt so hohe Verdampfungsenergie, welche zu einer unvollständigen Verbrennung im Motor und somit zu Problemen bei Kaltstarts führt. Zudem ist Ethanol sowohl korrosiv als auch hygroskopisch, was die Distribution deutlich erschwert und auch nur ein Mischungsverhältnis von maximal 85 % mit Benzin erlaubt (Noack *et al.*, 2009; Dürre, 2007).

Tab. 2: Vergleich der Eigenschaften von Benzin, Butanol und Ethanol

| Benzin | Butanol | Ethanol |
|------------------------------------|----------------|----------------|
| Energiedichte [MJ/l] | | |
| 32-35 | 29,2 | 19,6 |
| Laufleistung [%] | | |
| 100 | 83-91 | 61-66 |
| Luft-Treibstoff-Verhältnis | | |
| 14,6 | 11,2 | 9,0 |
| Research-Oktanzahl (ROZ) | | |
| 91-99 | 96 | 129 |
| Motor-Oktanzahl (MOZ) | | |
| 81-89 | 78 | 102 |
| Verdampfungsenergie [MJ/kg] | | |
| 0,36 | 0,43 | 0,92 |

Im Juni 2006 haben zwei der weltweit größten Konzerne, BP und DuPont, eine Kooperation über die Herstellung von Biobutanol abgeschlossen. Die Markteinführung wird noch vor 2010 erwartet. In Zusammenarbeit mit British Sugar sollen zukünftig jährlich etwa 30000 Tonnen Biobutanol in einer Fermentations-anlage in Wisington produziert werden (www.bp.com/liveassets/bp_internet/globalbp/STAGING/global_assets/downloads/B/Bio_bp_dupont_fact_sheet_jun06.pdf). Auch die Virgin Gruppe zusammen mit Gevo, Inc. (www.gevo.com/what.php), sowie eine Reihe kleinerer Unternehmen, wie Cobalt Biofuels (www.cobaltbiofuels.com/), Green Biologics, Ltd. (www.greenbiologics.com/biofuels.asp) oder METabolic EXplorer (www.metabolic-explorer.com/contenu.php?rub=product&ssrub=2) planen, Biobutanol herzustellen.

Allerdings werden alle bisher kommerziell verwendeten Biokraftstoffe aus Nutzpflanzen hergestellt. Für die industrielle ABE-Fermentation wird, ähnlich wie zur Herstellung von Bioethanol, entweder Zucker aus Melassen oder Stärke aus Getreide (hauptsächlich aus Mais) und Berichten zufolge in China auch aus Süßkartoffeln als Substrat verwendet (Ezeji *et al.*, 2005b). Der Preis für diese Substrate, welcher jahrelang relativ stabil geblieben war, ist in den letzten drei Jahren rapide gestiegen (Abb. 4). Ein Bericht der Development Prospects Group (DECPG) der Weltbank führt diese extreme Preissteigerung auf die vermehrte Biotreibstoff-Produktion zurück, da andere Nahrungsmittel im Vergleich dazu nur geringfügig teurer geworden sind (Mitchell, 2008). Die Konsequenz aus den gestiegenen Preisen ist jedoch nicht nur die Verteuerung der Biotreibstoff-Produktion, es führt vielmehr auch zu Hunger in ärmeren Ländern. So gab es deswegen bereits in etlichen Ländern Proteste und Unruhen (Abb. 4). Als erstes gingen im Januar 2007 tausende Mexikaner auf die Straße, um gegen die Preise für Maismehl, den Grundstoff von Tortillas, ihrer Nationalspeise, zu protestieren. Daraufhin entschloss sich die mexikanische Regierung, den Mais noch stärker als schon bisher zu subventionieren. Ärmere Länder können sich solche Maßnahmen hingegen nicht leisten und so kam es im April 2008 in Haiti zu den bisher heftigsten Unruhen, bei denen vier Menschen starben und mehrere verletzt wurden. Viele Staaten haben inzwischen Exportbeschränkungen verhängt (Abb. 4). Biokraftstoffe aus Nutzpflanzen können demnach nicht die (dauerhafte) Lösung des Energieproblems sein.

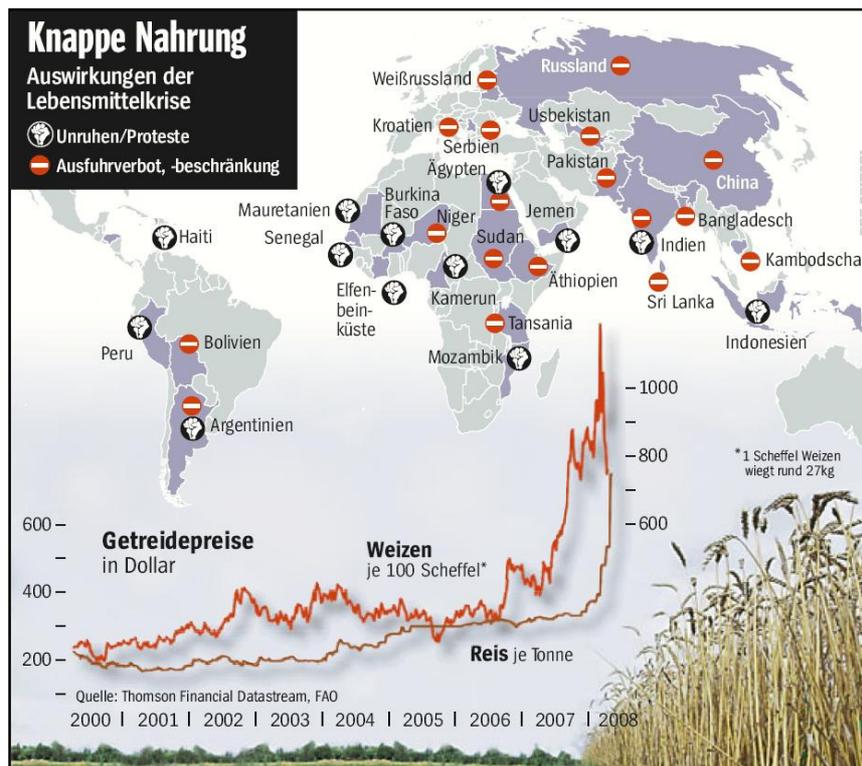


Abb. 4: Entwicklung der Getreidepreise (am Bsp. Weizen und Reis) und deren Auswirkungen in verschiedenen Ländern (Falksohn *et al.*, 2008)

Einige Gruppen an Mikroorganismen sind jedoch in der Lage, sehr einfache Substrate, welche im Überfluss vorhanden sind, zu nutzen. So können etwa die sogenannten acetogenen Organismen (Drake *et al.*, 2006; Drake, 1994) autotroph auf gasförmigen Substraten wie $\text{CO}_2 + \text{H}_2$ oder manche auch auf CO wachsen (Wood, 1991). Letzterers bildet den Hauptbestandteil von Synthesegas (oft auch Syngas genannt), welches preiswert und relativ einfach auf verschiedene Arten herzustellen ist. Am verbreitetsten ist die Kohlevergasung, bei der Wasserdampf über heiße Kohlen geleitet wird. Es kann aber auch durch chemisches Recycling von Plastik oder sogar durch Verschwelung von Biomasse sowie städtischen Abfällen produziert werden (Weißermel und Arpe, 2003). Je nach Herstellung enthält Synthesegas allerdings relativ viel CO_2 , Schwefelgase (Schwefelwasserstoff und Carbonylsulfid) und Teer (Weißermel und Arpe, 2003), was beim Einsatz in chemischen Prozessen, wie der Oxo- (Abb. 2a) oder der Fischer-Tropsch-Synthese (zur Herstellung von "Biomass-to-liquid (BtL)"-Kraftstoffen (Noack *et al.*, 2009)) zu erheblichen Problemen führt, da diese Substanzen die Reaktionen stören und die teuren Katalysatoren vergiften. Acetogene Bakterien sind dagegen jedoch überaus tolerant (Vega *et al.*, 1990; Ragauskas *et al.*, 2006; Bredwell *et al.*, 1999). Zu dieser inhomogenen Gruppe aus 21 Gattungen (Imkamp und Müller, 2007; Drake *et al.*, 2006) zählen auch einige Clostridien (Drake und Küsel, 2005).

Aufgrund der nahen Verwandtschaft könnte es möglich sein, die bereits identifizierten Gene für die Butanol-Produktion aus *C. acetobutylicum* (Dürre, 2005) in eines dieser acetogenen Clostridien einzubringen und dort zu exprimieren. Somit könnte aus Synthesegas über Acetyl-CoA, welches sowohl das Hauptintermediat des acetogenen Stoffwechsels als auch das Ausgangsintermediat für die Butanol-Bildung in *C. acetobutylicum* bildet, Butanol produziert werden. In der vorliegenden Arbeit sollte dies mit *C. ljungdahlii* (Abb. 5; Tanner *et al.*, 1993) erreicht werden. Zudem sollte nach neuen Butanol-Dehydrogenasen aus Metagenombanken gesucht werden, welche den Prozess schließlich optimieren könnten.

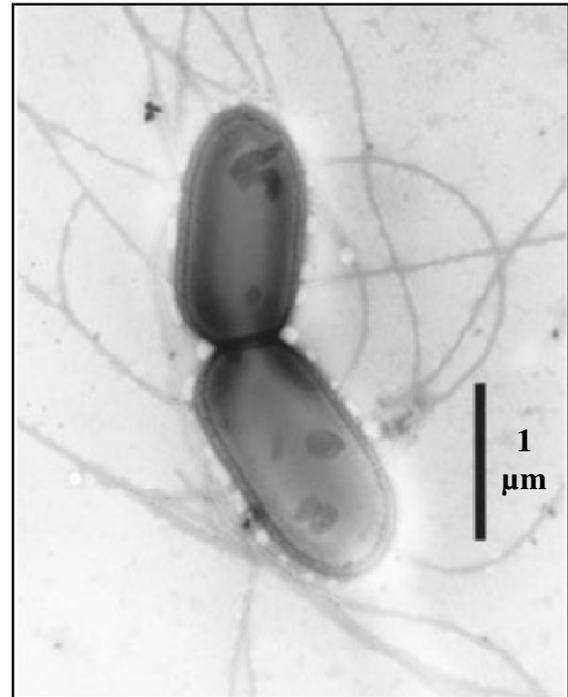


Abb. 5: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *C. ljungdahlii* (Drake *et al.*, 2006)

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Gase

Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Gase und Gasgemische wurden von der MTI Industriegase AG, Neu-Ulm bezogen und sind Tabelle 3 zu entnehmen.

Tab. 3: Verwendete Gase und Gasgemische

| Gas(gemisch) | Zusammensetzung | Reinheit | Verwendung |
|----------------------------------|--------------------------------------|----------|---|
| Formiergas | 95 % Stickstoff (N ₂) | k. A. | Anaerobenkammer |
| | 5 % Wasserstoff (H ₂) | k. A. | |
| CO ₂ + H ₂ | 80 % Wasserstoff (H ₂) | 5.0 | Substrat für die Bakterien |
| | 20 % Kohlendioxid (CO ₂) | 4.5 | |
| Stickstoff (N ₂) | | 5.0 | Anaerobes Arbeiten, Trägergas Gaschromatograph |
| Synthesegas | 50 % Kohlenmonoxid (CO) | 1.8 | Substrat für die Bakterien |
| | 45 % Wasserstoff (H ₂) | 3.0 | |
| | 5 % Kohlendioxid (CO ₂) | 4.5 | |
| Synthetische Luft | 79 % Stickstoff (N ₂) | k. A. | FID Gaschromatograph |
| | 21 % Sauerstoff (O ₂) | k. A. | |
| Wasserstoff (H ₂) | | 5.0 | FID Gaschromatograph |

k. A. = Keine Angabe des Herstellers.

2.1.2. Chemikalien

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien besaßen *p. a.*-Qualität und sind in Tab. 4 alphabetisch aufgelistet.

Tab. 4: Verwendete Chemikalien

| Chemikalie | Lieferant |
|---|--|
| Acetaldehyd | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| Acetoin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| Aceton | Merck KGaA, Darmstadt |
| Acrolein | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| Agar "Bacteriological No. 1" (Oxoid) | Otto Nordwald GmbH, Hamburg |
| Agarose | SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg |
| <i>p</i> -Aminobenzoesäure (Vitamin B ₁₀) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| Ammoniumeisen(III)-citrat | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| Ammoniaklösung (32 % (v/v)) | Merck KGaA, Darmstadt |
| Ammoniumchlorid | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| Ammoniumeisen(II)-sulfat Hexahydrat | Merck KGaA, Darmstadt |
| <i>di</i> -Ammoniumhydrogenphosphat | Merck KGaA, Darmstadt |
| Ammoniumperoxidsulfat (APS) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| Ammoniumsulfat | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| Ampicillin Natriumsalz | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| "Bacto [®] " Agar (Becton Dickinson) | Otto Nordwald GmbH, Hamburg |
| "Bacto [®] " Hefeextrakt (Becton Dickinson) | Otto Nordwald GmbH, Hamburg |
| "Bacto [®] " Trypton (Becton Dickinson) | Otto Nordwald GmbH, Hamburg |
| Biuret | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| Biotin (Vitamin H) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| Borsäure | Mallinckrodt Baker, Griesheim |
| 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-D-galactosid (X-Gal) | GERBU Biochemicals GmbH, Gaiberg |
| Bromphenolblau | Merck KGaA, Darmstadt |
| 1-Butanol | Merck KGaA, Darmstadt |
| Butyraldehyd | Merck KGaA, Darmstadt |

Tab. 4: Fortsetzung

| Chemikalie | Lieferant |
|---|--|
| Calciumchlorid Dihydrat | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| D-Calcium-Pantothersäure (Vitamin B ₅) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| Cellobiose | Merck KGaA, Darmstadt |
| Chloramphenicol | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Citronensäure Monohydrat | Merck KGaA, Darmstadt |
| Clarithromycin | Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden |
| Colistin Natrium-Methansulfonat (aus <i>Bacillus colistinus</i>) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| Coomassie Brillant Blau G-250 | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| Cyanocobalamin (Vitamin B ₁₂) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| L-Cystein-HCl Monohydrat | Merck KGaA, Darmstadt |
| Dextransulfat Natriumsalz (von <i>Leuconostoc spp.</i>) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| N,N-Dimethylformamid (DMF) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| Eisen(II)-chlorid Tetrahydrat | Merck KGaA, Darmstadt |
| Eisen(II)-sulfat Heptahydrat | Merck KGaA, Darmstadt |
| Erythromycin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| Essigsäure (100 % (v/v); Eisessig) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| Ethanol (absolut) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| Ethanol (99,8 % (v/v)) vergällt | Apotheke des Universitätsklinikums Ulm |
| Ethidiumbromidlösung (1 % (w/v)) | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure- Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA) | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| Folsäure (Vitamin B₉) | Merck KGaA, Darmstadt |
| Formaldehyd (37 % (v/v)) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| D-(-)-Fructose | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| D-(+)-Glucose Monohydrat | Merck KGaA, Darmstadt |
| D-(+)-Glucose (wasserfrei) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| Glycin | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| Glycerin | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |

Tab. 4: Fortsetzung

| Chemikalie | Lieferant |
|--|--|
| Harnstoff | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| Hexadecyltrimethylammoniumbromid (CTAB) | Merck KGaA, Darmstadt |
| Hexanal | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| 1-Hexanol | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| <i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)piperazin- <i>N'</i> -(2-ethansulfonsäure) (HEPES) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| Iodnitrotetrazoliumchlorid (INT) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| Imidazol | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| Isoniazid | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| Isobutanol | Merck KGaA, Darmstadt |
| Isopropanol | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Kaliumaluminiumsulfat Dodecahydrat | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| Kaliumchlorid | Merck KGaA, Darmstadt |
| Kaliumdihydrogenphosphat wasserfrei | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| <i>di</i> -Kaliumhydrogenphosphat wasserfrei | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| Kaliumhydroxid | Merck KGaA, Darmstadt |
| Kanamycinsulfat | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Kobaltchlorid Hexahydrat | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| Kupfer(II)-chlorid Dihydrat | Merck KGaA, Darmstadt |
| Kupfer(II)-sulfat Pentahydrat | Merck KGaA, Darmstadt |
| Liponsäure | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| Magnesiumchlorid Hexahydrat | Merck KGaA, Darmstadt |
| Magnesiumsulfat Heptahydrat | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| Malonamid | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| Manganchlorid Tetrahydrat | Merck KGaA, Darmstadt |
| Mangansulfat Monohydrat | Merck KGaA, Darmstadt |
| Methanol | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| 2-Mercaptoethanol | Merck KGaA, Darmstadt |
| <i>di</i> -Methylsulfoxid (DMSO) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| 2-(<i>N</i> -Morpholino)-ethansulfonsäure (MES) | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| 3-(<i>N</i> -Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS) | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |

Tab. 4: Fortsetzung

| Chemikalie | Lieferant |
|---|--|
| Natriumacetat | Merck KGaA, Darmstadt |
| Natriumbutyrat | Merck KGaA, Darmstadt |
| Natriumcarbonat wasserfrei | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| Natriumchlorid | Merck KGaA, Darmstadt |
| <i>tri</i> -Natriumcitrat Dihydrat | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Natriumhydrogencarbonat | Merck KGaA, Darmstadt |
| Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat | Merck KGaA, Darmstadt |
| <i>di</i> -Natriumhydrogenphosphat Dodecahydrat | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| Natriumhydroxid (Natronlauge) | Merck KGaA, Darmstadt |
| Natriumhydroxidplättchen | Merck KGaA, Darmstadt |
| Natriumcarbonat wasserfrei | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| Natriummalonat | Merck KGaA, Darmstadt |
| <i>di</i> -Natriummolybdat Dihydrat | Merck KGaA, Darmstadt |
| <i>di</i> -Natriumphosphat Dihydrat | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| Natriumperchlorat Monohydrat | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| Natriumselenit Pentahydrat | Merck KGaA, Darmstadt |
| Natriumsulfid Nonahydrat | Merck KGaA, Darmstadt |
| Natriumthiosulfat Pentahydrat | Merck KGaA, Darmstadt |
| Natriumwolframat Dihydrat | Merck KGaA, Darmstadt |
| Nickel(II)-chlorid Hexahydrat | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| Nitrilotriessigsäure | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| Nickel-Nitrilotriessigsäure Agarose | QIAGEN GmbH, Hilden |
| β -Nicotinamidadenindinukleotid (NAD ⁺) | GERBU Biochemicals GmbH, Gaiberg |
| β -Nicotinamidadenindinukleotid (reduziert)- Dinatriumsalz (NADH + H ⁺) | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| β -Nicotinamidadenindinukleotid-2'-phosphat (NADP ⁺) | GERBU Biotechnik GmbH, Gaiberg |
| β -Nicotinamidadenindinukleotid-2'-phosphat (reduziert)-Tetranatriumsalz (NADPH + H ⁺) | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Nicotinsäureamid (Vitamin PP) | Merck KGaA, Darmstadt |
| Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| 1-Pentanol | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| Phenazinmethosulfat (PMS) | SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg |

Tab. 4: Fortsetzung

| Chemikalie | Lieferant |
|--|--|
| <i>o</i> -Phosphorsäure (85 % (v/v)) | Merck KGaA, Darmstadt |
| Piperazin-N,N'-bis-[2-Ethan-Sulfonsäure] (PIPES) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| 1-Propanol | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| Propionaldehyd | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| Pyridoxin-HCl (Vitamin B ₆) | SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg |
| “Reinforced Clostridial Medium“ (Difco™) | Otto Nordwald GmbH, Hamburg |
| Resazurin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| Riboflavin (Vitamin B ₂) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| “Roti [®] -Aqua-P/C/I“ (25:24:1) | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| “Roti [®] -Aqua-Phenol“ | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| “Roti [®] -C/I“ (24:1) | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| “Roti [®] -P/C/I“ (25:24:1) | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| “Roti [®] -Phenol“ | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| “Rotiphorese [®] Gel 40“ (29:1) | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| D-(+)-Saccharose | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| Salzsäure (32 % (v/v)) | Merck KGaA, Darmstadt |
| Semicarbazid-HCl | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| Silbernitrat | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Spectinomycin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| Tetracyclin-HCl | Merck KGaA, Darmstadt |
| N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| Thiamin-HCl (Vitamin B ₁) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| Thiamphenicol | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| DL-Threonin | Merck KGaA, Darmstadt |
| Titan(III)-chlorid-Lösung (15 % (w/v)) | Merck KGaA, Darmstadt |
| Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) | USB Corporation, Cleveland, OH |
| Valeraldehyd | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| “Wilkins-Chalgren Anaerobe Broth“ (Oxoid) | Otto Nordwald GmbH, Hamburg |
| Xylencyanol FF | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| Zinksulfat Heptahydrat | Merck KGaA, Darmstadt |

2.1.3. Enzyme

Alle in der vorliegenden Arbeit benutzten Restriktionsendonukleasen (2.6.13.1.) wurden von der Fermentas GmbH, St. Leon-Rot bezogen. Weitere verwendete Enzyme sind in Tab. 5 dargestellt.

Tab. 5: Eingesetzte Enzyme und deren Verwendungszweck

| Enzym | Lieferant | Verwendungszweck |
|--|---|-----------------------------------|
| Lysostaphin aus <i>Staphylococcus staphylolyticus</i> (564 U/mg) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf | Zelllyse |
| Lysozym aus Henneneiweiß (84.468 U/mg) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf | |
| Proteinase K (2,5 U/mg) | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim | Verdau von Proteinen |
| RNase A (5 U/μl) | Fermentas GmbH, St. Leon-Rot | Verdau von RNA |
| RNase-freie DNase I (1 U/μl) | Fermentas GmbH, St. Leon-Rot | Verdau von DNA (2.6.3.5.) |
| RNase-freie DNase I (2 U/μl) | GE Healthcare Europe GmbH, München | |
| “Failsafe™ PCR System“ | Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf | PCR (2.6.14.2.) |
| “illustra™ PuReTaq Ready-To-Go™ PCR Beads“ | GE Healthcare Europe GmbH, München | |
| “Power Script DNA Polymerase Short“ (4 U/μl) | PAN-Biotech GmbH, Aidenbach | |
| Taq-DNA-Polymerase (rekombinant; 5 U/μl) | Fermentas GmbH, St. Leon-Rot | |
| “Antarctic Phosphatase“ (5 U/μl) | New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main | Dephosphorylierung (2.6.13.2.) |
| “Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)“ (1 U/μl) | Fermentas GmbH, St. Leon-Rot | |
| “Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)“ (1 U/μl) | Fermentas GmbH, St. Leon-Rot | |
| T4-DNA-Ligase (1 U/μl) | Fermentas GmbH, St. Leon-Rot | DNA-Ligation (2.6.13.3.) |

2.1.4. Molekularbiologische Hilfsmittel

In dieser Arbeit wurden für verschiedene Arbeiten molekularbiologische “Kits“ als Hilfsmittel eingesetzt (Tab. 6).

Tab. 6: Verwendete “Kits“

| “Kit“ | Lieferant | Verwendungszweck |
|---|---|--|
| “peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I“ | PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen | Isolation von Plasmid-DNA (2.6.3.3. und 2.6.3.4.) |
| “Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit“ | HiSS Diagnostics GmbH, Freiburg | |
| “HexaLabel™ Plus DNA Labeling Kit“ | Fermentas GmbH, St. Leon-Rot | Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten (2.6.10.) |
| “QIAGEN PCR Cloning Kit“ | QIAGEN GmbH, Hilden | TA-Klonierung von PCR-Fragmenten (2.6.14.4.) |
| “DNA Clean & Concentrator™-5“ | HiSS Diagnostics GmbH, Freiburg | |
| “Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit“ | HiSS Diagnostics GmbH, Freiburg | Reinigung von DNA (2.6.4.5.-2.6.4.7.) |
| “illustra™ MicroSpin G-25 Columns“ | GE Healthcare Europe GmbH, München | |
| “HIS-Select® Spin Columns“ | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf | Reinigung von Proteinen (2.8.3.1.) |
| “His-Spin Protein Miniprep™ Kit“ | HiSS Diagnostics GmbH, Freiburg | |
| “Microcon® Centrifugal Units“ (YM-10; -30; -50 ; -100) | Milipore GmbH, Schwalbach | Konzentrierung von DNA- bzw. Protein-Lösungen (2.6.4.5. bzw. 2.8.4.2.) |
| “PD-10 Desalting Columns“ | GE Healthcare Europe GmbH, München | Konzentrierung von Protein- Lösungen (2.8.4.2.) |
| “BCA Protein Assay Kit“ | Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn | Konzentrationsbestimmung von Protein (2.8.5.) |

2.1.5. Geräte

Alle für die vorliegende Arbeit verwendeten Geräte sind in Tab. 7 alphabetisch erfasst.

Tab. 7: Verwendete Geräte

| Gerät | Hersteller |
|--|---|
| Agarose-Gelelektrophorese-Kammer | Technische Werkstatt der Universität Ulm |
| Anaerobenkammer | Technische Werkstatt der Universität Ulm |
| Blotting-Apperatur "VacuGene™ XL" | GE Healthcare Europe GmbH, München |
| Brutschrank "B 5050 T" | Heraeus Holding GmbH, Hanau |
| Eismaschine "Scotsman AF 200" | William Wurzbach Co., North Highlands, CA (USA) |
| Elektrophorese-Netzteil "EPS 601" | GE Healthcare Europe GmbH, München |
| Elektrophorese-Netzteil "ST 606" | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| Elektroporationsgerät "Gene-Pulser® II mit Pulse Controler Plus" | Bio-Rad Laboratories GmbH, München |
| Feinwaage "AE 16S" | Mettler-Toledo GmbH, Giessen |
| Filmentwickler "CURIX 60" | Agfa-Gevaert AG, Mortsel (Belgien) |
| Fotodokumentationsanlage "Gelprint 2000i" | MWG Biotech AG, Ebersberg |
| "FRENCH® Pressure Cell Press" | SelectScience Ltd., Bath (Großbritannien) |
| Gaschromatograph "CP 9001" | Chrompack GmbH, Berlin |
| Heizblock | Technische Werkstatt der Universität Göttingen |
| Heizpilz (2 l) | Tyco Thermal Controls GmbH, Heidelberg |
| Heizpilz (4 l) | Heraeus Holding GmbH, Hanau |
| HPLC "ÄKTApurifier™" | GE Healthcare Europe GmbH, München |
| Hybridisierungsöfen "BFD 53" | WTB Binder Labortechnik GmbH, Tuttlingen |
| Inkubationsschüttler "HT" | Infors GmbH, Einsbach |
| Inkubationsschüttler für Reagenzgläser "G24 Environmental Incubation Shaker" | New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen |
| Kohlenmonoxid-Messgerät "MICRO III" | GfG Gesellschaft für Gerätebau mbH, Dortmund |
| Kühlregal | SÜMAK Kältetechnik GmbH, Leonberg |
| Kühlschränke | Liebherr-Holding GmbH, Biberach a. d. Riß |

Tab. 7: Fortsetzung

| Gerät | Hersteller |
|--|---|
| Kühlzentrifuge "3K30" | Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz |
| Kühlzentrifuge "5402" | Eppendorf AG, Hamburg |
| Kühlzentrifuge "5804 R" | Eppendorf AG, Hamburg |
| Kühlzentrifuge "Universal 320R" | Andreas Hettich GmbH & Co. KG |
| Kühlzentrifuge "Z 231M" | HERMLE Labortechnik, Wehingen |
| Kühlzentrifuge "ZK 401" | HERMLE Labortechnik, Wehingen |
| Magnetrührer "MR 1000" | Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach |
| Magnetrührer "IKAMAG® RCT" | IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen |
| Mikrotiterplattenphotometer "htIII" | anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld |
| Mikroskop "Axioskop" | Carl Zeiss AG, Oberkochen |
| Mikrowellengerät "Moulinex OPTIQUICK" | SAMOU GmbH, Eigeltingen |
| pH-Messgerät "WTW pH 521" | WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim |
| Pipette (10 µl; 1000 µl) | ABIMED GmbH, Langenfeld |
| Pipette (200 µl) | Gilson International B.V. Deutschland, Limburg-Offheim |
| Polyacrylamid-Gelelektrophorese-Kammer | Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen |
| Reagenzglasschüttler "REAX 2000" | Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach |
| Reinstwasseranlage "ELGASTAT Maxima" | ELGA LabWater, Celle |
| Reinstwasseranlage "Optima Plus" | ELGA LabWater, Celle |
| Reinstwasseranlage "PURELAB Classic" | ELGA LabWater, Celle |
| Sauerstoff- und Wasserstoff-Messgerät | COY Laboratory Products Inc., Grass Lake, MI (USA) |
| Spektralphotometer "Ultrospec® 2100 pro" | GE Healthcare Europe GmbH, München |
| Spektralphotometer "Ultrospec® 3000" | GE Healthcare Europe GmbH, München |
| Spektralphotometer für Röhrchen "GENESYS 10" | VWR International GmbH, Darmstadt |
| Spektralphotometer für Röhrchen "NOVASPEC" | GE Healthcare Europe GmbH, München |
| Spektralphotometer für Röhrchen "Spectronic 501" | Milton Roy, Ivyland, PA (USA) |

Tab. 7: Fortsetzung

| Gerät | Hersteller |
|--|---|
| Taumler | Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach |
| Tiefkühlschränke (-20°C) | Liebherr-Holding GmbH; Biberach a. d. Riß |
| Tiefkühlschrank (-85°C) | Heraeus Holding GmbH, Hanau |
| Thermocycler "PTC-200 [®] " | MJ Research, Inc., Waltham, MA (USA) |
| Thermocycler "Techne" | biostep GmbH, Jahnsdorf |
| Tischautoklav "Systek 2540 EL" | Tuttnauer Europe B.V., Breda (Niederlande) |
| Tischzentrifuge "5415 C" | Eppendorf AG, Hamburg |
| Tischzentrifuge "Biofuge A" | Heraeus Holding GmbH, Hanau |
| Tischzentrifuge "Biofuge <i>pico</i> " | Heraeus Holding GmbH, Hanau |
| Tischzentrifuge "Mini Spin [®] " | Eppendorf AG, Hamburg |
| Ultraschallbad | Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin |
| Ultrazentrifuge "L8-60M" | Beckman Coulter GmbH, Krefeld |
| UV-Crosslinker | GE Healthcare Europe GmbH, München |
| UV-Transilluminator "BIO View" | biostep GmbH, Jahnsdorf |
| Vakuumpumpe | ABM Greiffenberger Antriebstechnik GmbH, Marktredwitz |
| Vakuumbzentrifuge "Speed Vac Concentrator" | Bachofer GmbH, Reutlingen |
| Waage "BP 2100 S" | Sartorius AG, Göttingen |
| Waage "BP 8100" | Sartorius AG, Göttingen |
| Wandautoklav | Fisher Scientific GmbH, Schwerte |
| Wasserbad | GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel |
| Wasserbad | Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach |
| Wasserbad für Spektralphotometer | MWG Biotech GmbH, Ebersberg |
| Zentrifuge für Hungate-Röhrchen "EBA 20" | Andreas Hettich GmbH & Co. KG |
| Zentrifuge für Hungate-Röhrchen "EBA 3S" | Andreas Hettich GmbH & Co. KG |

2.1.6. Verbrauchsmaterialien

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien sind alphabetisch geordnet Tab. 8 zu entnehmen.

Tab. 8: Verwendete Verbrauchsmaterialien

| Verbrauchsmaterial | Lieferant |
|---|--|
| Bördelkappen "R11-1.0" | Chromatographie Service GmbH, Langerwehe |
| Dialyseschläuche "VISKING [®] MWCO 12000-14000" (16 mm) | SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg |
| Desinfektionsspray "Biozidal ZF TM " | WAK – Chemie Medical GmbH, Steinbach |
| Einmalküvetten "1/2 Mikro" (1,6 ml Volumen; 1 cm Schichtdicke) | VWR International GmbH, Darmstadt |
| Einwegimpfösen | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen |
| Elektroporationsküvetten (2 mm; 4 mm Elektrodenabstand) | Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf |
| Eppendorf Reaktionsgefäße (0,2 ml; 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml) | Sarstedt AG & Co., Nümbrecht |
| Falcon Reaktionsgefäße (15 ml; 50 ml) | Sarstedt AG & Co., Nümbrecht |
| Gas-Speicherbeutel (500 ml; <i>Cali-5-BondTM</i>) | Ritter Apparatebau GmbH & Co. KG |
| Kanülen "Neolus 100" (0,6 x 30 mm) | TERUMO Deutschland GmbH, Eschborn |
| Kanülen "SUPRA" (0,9 x 100 mm) | Erhardt Medizinprodukte GmbH, Geislingen |
| Mikrotiterplatten "Microtiter [®] System" | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen |
| Nitrocellulose-Filterplättchen | Milipore GmbH, Schwalbach |
| Nylonmembran "Biodyne [®] A" | Pall GmbH, Bad Kreuznach |
| Pasteurpipetten | BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim |
| Parafilm "M" | American International Can Co., Chicago, IL (USA) |
| Petrischalen | Sarstedt AG & Co., Nümbrecht |
| pH-Indikatorstäbchen (Universalindikator; pH 1-14) | Merck KGaA, Darmstadt |
| pH-Indikatorstäbchen (Spezialindikator; pH 5,2-7,2) | Merck KGaA, Darmstadt |

Tab. 8: Fortsetzung

| Gerät | Hersteller |
|--|--|
| Pipettenspitzen (10 µl; 200 µl; 1000 µl) | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Pipettenspitzen gestopft (10 µl; 200 µl; 1000 µl) | Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf |
| RNase-ExitusPlus™ | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| Rollrandgefäße (R1) | Chromatographie Service GmbH, Langerwehe |
| Röntgenfilm (CRONEX 5) | Agfa-Gevaert AG, Mortsel (Belgien) |
| Schraubdeckelröhrchen (2 ml) | VWR International GmbH, Darmstadt |
| Spritzen (1 ml; 2 ml; 5 ml; 10 ml; 20 ml) | CODAN ARGUS AG, Baar (Schweiz) |
| Spritzen (2 ml; 5 ml; 10 ml; 20 ml) | Nipro Europe N.V., Zaventem (Belgien) |
| Spritzen (50 ml) | Dispomed Witt oHG, Gelnhausen |
| Sterilfilter (Porengröße: 0,2 µm) | Sartorius AG, Göttingen |

2.2. Bakterienstämme

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tab. 9 aufgeführt.

Tab. 9: Bakterienstämme

| Stamm | Relevanter Geno- oder Phänotyp | Herkunft/Referenz |
|------------------------------------|-------------------------------------|--|
| <i>Clostridium carboxidivorans</i> | | |
| P7 (DSM 15243 = ATCC BAA624™) | Typstamm | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig |
| <i>Clostridium difficile</i> | | |
| 630 (ATCC BAA-1382™) | Klinisches Isolat, Zürich (Schweiz) | American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA (USA) |
| <i>Clostridium ljungdahlii</i> | | |
| PETC (DSM 13528 = ATCC 55383™) | Typstamm | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig |

Tab. 9: Fortsetzung

| Stamm | Relevanter Geno- oder Phänotyp ¹⁾ | Herkunft/Referenz |
|---------------------------|--|-------------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | | |
| BL21(DE3) | <i>E. coli</i> B F ⁻ <i>dcm ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal λ</i> (DE3) | Stratagene, La Jolla, CA (USA) |
| CA434 [R702] | F ⁻ <i>thi-1 hsdS20</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻) <i>supE44 recA13 ara-14 leuB6 proA2 lacY1 galK2 rpsL20</i> (Str ^r) <i>xyl-5 mtl-1</i> [R702, Tra ⁺ , Mob ⁺ , Tc ^r , Sm ^r , Su ^r , Hg ^r] | Purdy <i>et al.</i> , 2002 |
| DH5α | F ⁻ ϕ80 <i>lacI^qZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺) <i>phoA supE44 λ thi-1 gyrA96 relA1</i> | Hanahan, 1983 |
| ER2275 | <i>trp-31 his-1 tonA2 rpsL104 supE44 xyl-7 mtl-2 metB1 e14⁻ Δ(lac)U169 endA1 recA1</i> R(zbgZ10::Tn10) Tc ^s Δ(<i>mcr-hsd-mrr</i>)114::1510 [F ⁻ <i>proAB traD36 laqI^q ΔM15 zcf::mini Tn10</i> (Km ^r)] | Mermelstein und Papoutsakis, 1993 |
| HB101 | F ⁻ <i>thi-1 hsdS20</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻) <i>supE44 recA13 ara-14 leuB6 proA2 lacY1 galK2 rpsL20</i> (Str ^r) <i>xyl-5 mtl-1</i> | Boyer und Roulland-dussoix, 1969 |
| JM109 | Δ(<i>lac-proAB</i>) <i>glnV44 e14⁻ gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi hsdR17</i> [F ⁻ <i>traD36 proA⁺B⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15</i>] | Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985 |
| M15 [pREP4] | <i>lac,ara,gal,mtl,recA⁺,uvr⁺</i> [pREP4, <i>lacI</i> , Km ^r] | QIAGEN GmbH, Hilden |
| SURE® | <i>e14⁻ (McrA⁻) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5</i> (Km ^r) <i>uvrC</i> [F ⁻ <i>proAB lacI^qZΔM15 Tn10</i> (Tet ^r)] | Stratagene, La Jolla, CA (USA) |
| WL3 | <i>adhC81 fadR adhE</i> [F ⁺ <i>mel supF</i>] | Lorowitz und Clark, 1982 |
| XL1-Blue | <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F ⁻ <i>proAB lacI^qZΔM15 Tn10</i> (Tet ^r)] | Stratagene, La Jolla, CA (USA) |
| XL1-Blue MRF ⁺ | Δ(<i>mcrA</i>)183 Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> [F ⁻ <i>proAB lacI^qZΔM15 Tn10</i> (Tet ^r)] | Stratagene, La Jolla, CA (USA) |
| XL2-Blue | <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F ⁻ <i>proAB lacI^qZΔM15 Tn10</i> (Tet ^r) Amy Cam ^r] | Stratagene, La Jolla, CA (USA) |

¹⁾ Für die Genotyp Abkürzungen siehe: Berlyn *et al.*, 1996; Bachmann, 1990.

2.3. Plasmide

Die im Rahmen dieser Arbeit benutzten und konstruierten Plasmide sind in Tab. 10 und 11 dargestellt.

Tab. 10: Verwendete Vektoren

| Vektor | Größe [Bp] | Eigenschaften | Herkunft/Referenz |
|---|------------|--|---|
| pBluescript SK+ | 2958 | <p>Klonierungsvektor</p> <p><u>Replikation:</u> pMB1/ColE1 <i>ori (rep)</i>, <i>f1 ori</i></p> <p><u>Resistenz:</u> Ap^r (<i>bla</i>)</p> <p><u>Sonstiges:</u> Blau-Weiß-Selektion möglich (<i>lacPOZ'</i>)</p> | Stratagene, La Jolla, CA (USA) |
| pCR[®] 2.1-TOPO[®] | 3931 | <p>linearisierter Vektor zur direkten TA-Klonierung von PCR-Produkten</p> <p><u>Replikation:</u> pMB1/ColE1 <i>ori (rep)</i>, <i>f1 ori</i></p> <p><u>Resistenz:</u> Ap^r (<i>bla</i>), Km^r (<i>aph</i>)</p> <p><u>Sonstiges:</u> Blau-Weiß-Selektion möglich (<i>lacPOZ'</i>)</p> | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| pDrive | 3851 | <p>linearisierter Vektor zur direkten TA-Klonierung von PCR-Produkten</p> <p><u>Replikation:</u> pMB1/ColE1 <i>ori (rep)</i>, <i>f1 ori</i></p> <p><u>Resistenz:</u> Ap^r (<i>bla</i>), Km^r (<i>aph</i>)</p> <p><u>Sonstiges:</u> Blau-Weiß-Selektion möglich (<i>lacPOZ'</i>)</p> | QIAGEN GmbH, Hilden |
| pET-29a(+) | 5371 | <p>Überexpressionsvektor</p> <p><u>Replikation:</u> pMB1/ColE1 <i>ori (rep)</i>, <i>f1 ori</i></p> <p><u>Resistenz:</u> Km^r (<i>aph</i>)</p> <p><u>Sonstiges:</u> <i>lac</i>-Repressor (<i>lacI</i>), T7-Promoter und -Terminator (zur Überexpression), "His-Tag"-kodierende Sequenz (zur C-terminalen Fusion)</p> | Merck KGaA, Darmstadt |
| pIMP1 | 4695 | <p><i>E. coli</i>/Clostridien-Schaukelvektor</p> <p><u>Replikation:</u> pMB1/ColE1 <i>ori (rep)</i>, pIM13 <i>ori (repL)</i></p> <p><u>Resistenz:</u> Ap^r (<i>bla</i>), Em^r (<i>ermC'</i>)</p> | Mermelstein <i>et al.</i> , 1992 |
| pIMP oriTori2 | 5505 | <p><i>E. coli</i>/Clostridien-Schaukelvektor</p> <p><u>Replikation:</u> pMB1/ColE1 <i>ori (rep)</i>, pIM13 <i>ori (repL)</i>, <i>oriT (traJ)</i></p> <p><u>Resistenz:</u> Ap^r (<i>bla</i>), Em^r (<i>ermC'</i>)</p> | Nigel Minton, University of Nottingham (UK) |

Tab. 10: Fortsetzung

| Vektor | Größe [Bp] | Eigenschaften | Herkunft/Referenz |
|---------|------------|---|---------------------------|
| pMTL007 | 11845 | <i>E. coli</i>/Clostridien-Schaukelvektor <u>Replikation:</u> pMB1/ColeE1 <i>ori (rep)</i> , pCB102 <i>ori (orfH)</i> , <i>oriT (traJ)</i> <u>Resistenz:</u> Cm ^r (<i>catP</i>) <u>Sonstiges:</u> <i>lac</i> -Repressor (<i>lacI</i>), <i>fac</i> -Promoter, Gruppe II Intron (<i>ltrAB</i>) | Heap <i>et al.</i> , 2007 |
| | | Überexpressionsvektor <u>Replikation:</u> pMB1/ColeE1 <i>ori (rep)</i> <u>Resistenz:</u> Ap ^r (<i>bla</i>) <u>Sonstiges:</u> T5-Promoter und -Terminator (zur Überexpression), "His-Tag"-kodierende Sequenz (zur N-terminalen Fusion) | |
| pUC18 | 2686 | Klonierungsvektor <u>Replikation:</u> pMB1/ColeE1 <i>ori (rep)</i> <u>Resistenz:</u> Ap ^r (<i>bla</i>) <u>Sonstiges:</u> Blau-Weiß-Selektion möglich (<i>lacPOZ'</i>) | Vieira und Messing, 1982 |
| pUC19 | 2686 | Klonierungsvektor <u>Replikation:</u> pMB1/ColeE1 <i>ori (rep)</i> <u>Resistenz:</u> Ap ^r (<i>bla</i>) <u>Sonstiges:</u> Blau-Weiß-Selektion möglich (<i>lacPOZ'</i>) | Vieira und Messing, 1982 |

Tab. 11: Hergestellte und verwendete Plasmide

| Plasmid | Größe [Bp] | Eigenschaften | Herkunft/Referenz |
|---------|------------|---|--------------------------------|
| pAK110 | 7478 | rekombinantes Plasmid aus einer Metagenombank <u>Vektor:</u> pCR [®] 2.1-TOPO [®] <u>Insert:</u> Umwelt-DNA aus dem Sediment des Solar Lake (Ägypten) | Knietsch <i>et al.</i> , 2003a |
| pAK115 | 8087 | rekombinantes Plasmid aus einer Metagenombank <u>Vektor:</u> pCR [®] 2.1-TOPO [®] <u>Insert:</u> Umwelt-DNA aus der Erde eines Zuckerrübenfeldes bei Göttingen | Knietsch <i>et al.</i> , 2003a |

Tab. 11: Fortsetzung

| Plasmid | Größe [Bp] | Eigenschaften | Herkunft/Referenz |
|-----------------------|------------------------|---|-----------------------------------|
| pAN1 | ca. 7000 ¹⁾ | Methylierungsplasmid <u>Replikation:</u> pACYC184/p15A <i>ori</i> (<i>rep</i>) <u>Resistenz:</u> Cm ^r (<i>cat</i>) <u>Sonstiges:</u> Methyltransferase-Gen des Phagen Φ 3T I | Mermelstein und Papoutsakis, 1993 |
| pANS1 | ca. 6200 ¹⁾ | Methylierungsplasmid <u>Replikation:</u> pACYC184/p15A <i>ori</i> (<i>rep</i>) <u>Resistenz:</u> Sp ^r (<i>spcE</i>) <u>Sonstiges:</u> Methyltransferase-Gen des Phagen Φ 3T I | Böhringer, 2002 |
| pDrive-aldA | 5310 | <u>Vektor:</u> pDrive <u>Insert:</u> PCR-Produkt <i>aldA</i> (aus <i>E. coli</i> WL3) | diese Arbeit |
| pDrive-dnaK | 5786 | <u>Vektor:</u> pDrive <u>Insert:</u> PCR-Produkt <i>dnaK</i> (aus <i>E. coli</i> WL3) | diese Arbeit |
| pDrive-tufA | 5055 | <u>Vektor:</u> pDrive <u>Insert:</u> PCR-Produkt <i>tufA</i> (aus <i>E. coli</i> WL3) | diese Arbeit |
| pET29-115orf22 | 5988 | Überexpressionsplasmid von pAK115 <i>orf22</i> x 6 <i>His</i>-Fusion <u>Vektor:</u> pET-29a(+) <u>Insert:</u> <i>orf22</i> (pAK115) über <i>NdeI/NotI</i> | diese Arbeit |
| pET29-B3orf2 | 6228 | Überexpressionsplasmid von pTWB3 <i>orf2</i> x 6 <i>His</i>-Fusion <u>Vektor:</u> pET-29a(+) <u>Insert:</u> <i>orf2</i> (pTWB3) über <i>NdeI/HindIII</i> | diese Arbeit |
| pET29-B4orf2 | 6261 | Überexpressionsplasmid von pTWB4 <i>orf2</i> x 6 <i>His</i>-Fusion <u>Vektor:</u> pET-29a(+) <u>Insert:</u> <i>orf2</i> (pTWB4) über <i>NdeI/XhoI</i> | diese Arbeit |
| pET29-B4orf5 | 5939 | Überexpressionsplasmid von pTWB4 <i>orf5</i> x 6 <i>His</i>-Fusion <u>Vektor:</u> pET-29a(+) <u>Insert:</u> <i>orf5</i> (pTWB4) über <i>NdeI/XhoI</i> | Köpke, 2004 |

¹⁾ Teile der Sequenz sind nicht bekannt.

Tab. 11: Fortsetzung

| Plasmid | Größe [Bp] | Eigenschaften | Herkunft/Referenz |
|-----------------------|------------|---|-------------------|
| pET29-clpB | 7809 | Überexpressionsplasmid von <i>clpB</i> x 6 His-Fusion Vektor: pET-29a(+) <u>Insert:</u> <i>clpB</i> (aus <i>E. coli</i> WL3) über <i>NdeI/XhoI</i> | diese Arbeit |
| pET29-dnaJ | 6366 | Überexpressionsplasmid von <i>dnaJ</i> x 6 His-Fusion Vektor: pET-29a(+) <u>Insert:</u> <i>dnaJ</i> (aus <i>E. coli</i> WL3) über <i>NdeI/XhoI</i> | diese Arbeit |
| pET29-groEL | 6882 | Überexpressionsplasmid von <i>groL</i> x 6 His-Fusion Vektor: pET-29a(+) <u>Insert:</u> <i>groL</i> (aus <i>E. coli</i> WL3) über <i>NdeI/XhoI</i> | diese Arbeit |
| pET29-groES | 5529 | Überexpressionsplasmid von <i>groS</i> x 6 His-Fusion Vektor: pET-29a(+) <u>Insert:</u> <i>groS</i> (aus <i>E. coli</i> WL3) über <i>NdeI/XhoI</i> | diese Arbeit |
| pET29-grpE | 5829 | Überexpressionsplasmid von <i>grpE</i> x 6 His-Fusion Vektor: pET-29a(+) <u>Insert:</u> <i>grpE</i> (aus <i>E. coli</i> WL3) über <i>NdeI/XhoI</i> | diese Arbeit |
| pET29-tig | 6534 | Überexpressionsplasmid von <i>tig</i> x 6 His-Fusion Vektor: pET-29a(+) <u>Insert:</u> <i>tig</i> (aus <i>E. coli</i> WL3) über <i>NdeI/XhoI</i> | diese Arbeit |
| pET29-tufB | 6420 | Überexpressionsplasmid von <i>tufB</i> x 6 His-Fusion Vektor: pET-29a(+) <u>Insert:</u> <i>tufB</i> (aus <i>E. coli</i> WL3) über <i>NdeI/XhoI</i> | diese Arbeit |
| pQE30-110orf14 | 4597 | Überexpressionsplasmid von pAK110 <i>orf14</i> x 6 His-Fusion Vektor: pQE-30 <u>Insert:</u> <i>orf14</i> (pAK110) über <i>PaeI/PstI</i> | diese Arbeit |

Tab. 11: Fortsetzung

| Plasmid | Größe [Bp] | Eigenschaften | Herkunft/Referenz |
|-----------------------|------------|---|-------------------------------|
| pQE30-115orf22 | 4171 | Überexpressionsplasmid von pAK115 <i>orf22 x 6 His</i>-Fusion Vektor: pQE-30 Insert: <i>orf22</i> (pAK115) über <i>Bam</i> HI/ <i>Pst</i> I | diese Arbeit |
| pQE30-B3orf2 | 4397 | Überexpressionsplasmid von pTWB3 <i>orf2 x 6 His</i>-Fusion Vektor: pQE-30 Insert: <i>orf2</i> (aus pTWB3) über <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III | diese Arbeit |
| pQE30-B4orf5 | 4118 | Überexpressionsplasmid von pTWB4 <i>orf5 x 6 His</i>-Fusion Vektor: pQE-30 Insert: <i>orf5</i> (pTWB4) über <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III | diese Arbeit |
| pSOBP _{bdhA} | 14346 | Butanolsyntheseoperon Vektor: pIMP1 Insert: P _{bdhA} , <i>bcd</i> , <i>hbd</i> , <i>crt</i> , <i>thlA</i> , <i>bdhA</i> , <i>adhE</i> (aus <i>C. acetobutylicum</i> DSM792), Cm ^r (<i>catP</i> aus pJIR750) | Sandra Hujer, Universität Ulm |
| pSOBP _{ptb} | 14346 | Butanolsyntheseoperon Vektor: pIMP1 Insert: P _{ptb} , <i>bcd</i> , <i>hbd</i> , <i>crt</i> , <i>thlA</i> , <i>bdhA</i> , <i>adhE</i> (aus <i>C. acetobutylicum</i> DSM792), Cm ^r (<i>catP</i> aus pJIR750) | Sandra Hujer, Universität Ulm |
| pSOB18ptb | 7693 | Vektor: pIMP1 Insert: P _{ptb} , <i>bcd</i> , <i>hbd</i> , <i>crt</i> (aus <i>C. acetobutylicum</i> DSM792) | Sandra Hujer, Universität Ulm |
| pSUC19.5 | 9339 | Vektor: pUC19 Insert: P _{ptb} , <i>thlA</i> , <i>bdhA</i> , <i>adhE</i> (aus <i>C. acetobutylicum</i> DSM792), Cm ^r (<i>catP</i> aus pJIR750) | Sandra Hujer, Universität Ulm |
| pSUC19.6 | 6760 | Vektor: pSUC19 Insert: P _{ptb} , <i>adhE</i> , Cm ^r (<i>catP</i>) (aus pSUC19.5) | diese Arbeit |
| pSUC19.7 | 9163 | Vektor: pUC19 Insert: P _{ptb} , <i>thlA</i> , <i>bdhB</i> (aus pUC19+ptb_thlA4_bdhB1), <i>adhE</i> , Cm ^r (<i>catP</i>) (aus pSUC19.5) | diese Arbeit |

Tab. 11: Fortsetzung

| Plasmid | Größe [Bp] | Eigenschaften | Herkunft/Referenz |
|----------------------------|------------|---|------------------------------------|
| pTWB3 | 5654 | rekombinantes Plasmid aus einer Metagenombank Vektor: pBluescriptSK+ Insert: Umwelt-DNA aus Komposterde | Waschkowitz, 2006 |
| pTWB4 | 6277 | rekombinantes Plasmid aus einer Metagenombank Vektor: pBluescriptSK+ Insert: Umwelt-DNA aus Komposterde | Waschkowitz, 2006 |
| pUC19+ptb_thlA 4_bd hB1 | 5242 | Vektor: pUC19 Insert: P _{ptb} und <i>bdhB</i> (aus <i>C. acetobutylicum</i> DSM792), <i>thlA</i> (aus <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824) | Stefanie Schuster, Universität Ulm |

2.4. Oligodesoxynukleotide

Alle in der vorliegenden Arbeit für Polymerase-Kettenreaktionen oder Sequenzierungen benutzten Oligodesoxynukleotide stammen von der biomers.net GmbH, Ulm und sind in Tab. 12 aufgelistet. Eventuell eingefügte Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme sind hervorgehoben. Die Oligodesoxynukleotide wurden jeweils mit sterilem Wasser aus der Reinstwasseranlage auf eine Konzentration von 100 pmol/μl eingestellt und anschließend bei -20 °C gelagert.

Tab. 12: Verwendete Oligodesoxynukleotide

| Bezeichnung | Sequenz (5' → 3') |
|-------------|--|
| 27f C.1 | AGAGTTTGATCCTGGCTCAG |
| C.1 16sr | CTAACCCACCTTCGGCCGCG |
| adhEfXhoI | ATAA CTCGAG AGAAAGAAGTGTATATTTATG |
| adhEr | GGTT CTGCAG CCCGGG GATATC GAAATATGAAGGTTTAAGGTTG |

Tab. 12: Fortsetzung

| Bezeichnung | Sequenz (5' → 3') |
|---------------------------|--|
| aldA-F-NdeI | GGAGTCG CATATG TCAGTACCCGTT |
| aldA-R-XhoI | GCTTTCAC CTCGAG TTAAGACTGTAA |
| B3orf2-HindIII-R | CGAATTGGGC AAGCTT GATGCATGCTC |
| B3orf2-pET29-NdeI-F | ATCGTTCCG CATATG GCGACGACTAAG |
| B3orf2-pQE30-BamHI-F | ATCGTTCCG GGATCC GCGACGACTAAG |
| B4orf2-pET29-NdeI-F | GCGGCTGTCC CATATG TCATTTGCGCG |
| B4orf2-pET29-XhoI-R | GCGAGAATTC CTCGAG CCATGTAGTAG |
| B4orf5-pQE30-BamHI-F | CGTCACGAA GGATCC GTAGTACGTATT |
| B4orf5-pQE30-HindIII-R | GCCTACGAA AAGCTT TCAAACACGCTT |
| B4orf5gtg-pQE30-BamHI-F | CCCTTCCATGTA GGATCC CCGCTGGCGCAT |
| B4orf5gtg-pQE30-HindIII-R | AGCAAGCGTGTT AAGCTT CGATTTCGTAGGC |
| bcdNotf | ATAA GCGGCCGC ATGGATTTTAATTTAACAAG |
| Bubcdr | TGGCCGAC GTCGAC TTAACCTCCTTAAATTATC |
| bdhArXhoIPstI | GGTT CTGCAG AT CTCGAG AGTGAGGCGTTAGAAC |
| BubdhAf | ACGC GTCGAC TAGGAGGTAAGAAGTATGC |
| Bucrtf | CG GGATCC TAGGAGGATTAGTCATGGG |
| Bucrtr | TC CCCCGGG GATATC CCTATCTATTTTGAAGCC |
| Buhbdfneu | ACGC GTCGAC GGTGTAAATGCATTGATAG |
| Buhbdr | GC GGATCC TTATTTTGAATAATCGTAG |
| ButhlAr | TGGCCGAC GTCGAC GAAATTGAACTGTCTTTAG |
| thlANotIf | ATAA GCGGCCGC ATGAAAGAAGTTGTAATAGC |
| catpPstIf | AAAA CTGCAG CGAGTGAAAAAGTGTCCTAGCG |
| catpPstIr | AACC CTGCAG CATATG GTTACAGACAAACCTGAAGTTAA |
| Clj-ack-Sonde-F | CAGACAATGCCAGATTATGC |
| Clj-ack-Sonde-R | TCACTGCTTACTCCTGATAC |

Tab. 12: Fortsetzung

| Bezeichnung | Sequenz (5' → 3') |
|---------------------|---|
| clpB-F-NdeI | GGAGGA CATATG CGTCTGGATCGT |
| clpB-R-XhoI | GTTTTAT CTCGAG CTGGACGGCGAC |
| dnaJ-F-NdeI | GTAAAA CATATG GCTAAGCAAGAT |
| dnaJ-R-XhoI | GTGGGG CTCGAG GCGGGTCAGGTC |
| dnaK-F-NdeI | GACGTT CATATG GGTAAAATAATT |
| dnaK-R-XhoI | GTAGGG CTCGAG TTTTTTGTCTTT |
| groL-F-NdeI | GTAAAG CATATG GCAGCTAAAGAC |
| groL-R-XhoI | GCAGGG CTCGAG CATCATGCCGCC |
| groS-F-NdeI | GAGTTA CATATG AATATTCGTCCA |
| groS-R-XhoI | GTGCGC CTCGAG CGCTTCAACAAT |
| grpE-F-NdeI | GAGAAA CATATG AGTAGTAAAGAA |
| grpE-R-XhoI | GAGCAG CTCGAG AGCTTTTGCTTT |
| fd1 | CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG |
| rP2 | CCCGGGATCCAAGCTTACGGCTACCTTGTTACGACTT |
| M13 rev (-29) | CAGGAAACAGCTATGACC |
| M13 rev (-49) | GAGCGGATAACAATTTACACAGG |
| M13 uni (-21) | TGTAAAACGACGGCCAGT |
| M13 uni (-43) | AGGGTTTTCCCAGTCACGACGTT |
| orf14-pQE30-PaeI-F | AGGGAACGA GCATGC AACAACTTTAATC |
| orf14-pQE30-PstI-R | TGAGGTGAA CTGCAG TTAGCGCGCCGC |
| orf22-pET29-NdeI-F | CGGGGTC CATATG CATATCGATCTGACAGG |
| orf22-pET29-NotI-R | ATACAACGT GCGGCCGC GGCATTCAAAC |
| orf22-pQE30-BamHI-F | TCACGGGGTC GGATCC CATATCGATCTG |
| orf22-pQE30-PstI-R | ATACAACGTTA CTGCAG GGCATTCAAACC |
| pQE for | GTATCACGAGGCCCTTTCGTCT |
| pQE rev | CATTACTGGATCTATCAACAGGAG |

Tab. 12: Fortsetzung

| Bezeichnung | Sequenz (5' → 3') |
|------------------------|------------------------------|
| pSOB-adhE-Sonde-F | GTCGGACAGTCAGCTTATAC |
| pSOB-adhE-Sonde-R | GGACCAACATTCTCGGAAAC |
| pSOB-thlA-Sonde-F | GTTTGTGGTTCAGGACTTAG |
| pSOB-thlA-Sonde-R | TAGGGTGCTCATCTGTATC |
| pSOBPptbneu-F-NotIXhoI | CCGCGGCCGC TGCTCGAG AAAGAAGC |
| pSOBPptbneu-R-BshTI | AAGCCCAT ACCGGT TTCC |
| T7 | TAATACGACTCACTATAGGG |
| T7 term | CTAGTTATTGCTCAGCGGT |
| tig-F-NdeI | GGTAAC CATATG CAAGTTTCAGTT |
| tig-R-XhoI | CTCCGT CTCGAG CGCCTGGTTCAT |
| tufA-F-NdeI | GAATATA CATATG TCTAAAGAAAAA |
| tufA-R-XhoI | GACGTG CTCGAG GCCCAGAACTTT |
| tufB-F-NdeI | GGACAA CATATG TCTAAAGAAAAG |
| tufB-R-XhoI | GTTATCGC CTCGAG GCTCAGAACTTT |

2.5. Zellanzucht

2.5.1. Nährmedien

Zur Herstellung von Flüssigmedien wurden die jeweiligen Chemikalien eingewogen und in Wasser aus der Reinstwasseranlage gelöst. Anschließend wurden der pH-Wert und das Endvolumen eingestellt.

Anaerobe Medien wurden zusätzlich noch mit dem für Bakterien nicht-toxischen pH- und Redox-Indikator Resazurin in einer Konzentration von 1 mg/l versetzt, um später das Redoxpotential und somit den Sauerstoffgehalt überprüfen zu können. Danach wurde das Medium nach der von Breznak und Costilow (1994) beschriebenen Methode im Heizpilz kurz aufgeköcht und während des Abkühlens im Eisbad mit Stickstoff begast, um gelösten Sauerstoff zu entfernen. Resazurin wird dabei irreversibel zu Resorufin reduziert, welches dann in einem zweiten, reversiblen Schritt zu *di*-Hydroresorufin reduziert werden kann. Dieses Redoxpaar ist bei einem Redoxpotential unter -110 mV farblos und erlangt ab einem Redoxpotential von über -51 mV seine ursprüngliche pinke (bei saurem pH), violette (bei neutralem pH) bzw. blaue (bei alkalischem pH) Farbe zurück (www.dsmz.de/microorganisms/files/Cultivation_of_Anaerobes.pdf). Das Medium wurde schließlich in die Anaerobenkammer eingeschleust, abgefüllt und luftdicht verschlossen. Wenn anstelle von Stickstoff eine andere Gasphase verwendet werden sollte, fand im Anschluss noch ein Gasaustausch statt. Dazu wurde das entsprechende Gas mit einer langen Kanüle für einige Zeit durch das Medium geleitet. Abschließend wurde ein leichter Überdruck (normalerweise etwa 0,6-0,8 bar) angelegt.

Alle Medien wurden bei 121 °C und 1,2 bar für mindestens 15 min autoklaviert. Um chemische Reaktionen einzelner Komponenten untereinander zu verhindern, wurden bestimmte Medienbestandteile separat autoklaviert und das Medium erst vor Gebrauch komplettiert. Hitzelabile Komponenten wurden gelöst, sterilfiltriert und dem abgekühlten, autoklavierten Medium vor Benutzung zugesetzt.

Anaerobe Medien wurden kurz vor Gebrauch mit einem Reduktionsmittel (2.5.2.1.) nochmals reduziert. Medien, welche auch danach nicht farblos waren, wurden aussortiert.

Für die Herstellung von festen Medien wurde den entsprechenden Nährlösungen vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) "Bacto[®]" Agar zugegeben (festen Medien für *C. ljungdahlii* wurden 1 % (w/v) Agar "Bacteriological No.1" zugegeben). Direkt nach dem Autoklavieren wurden diese dann in Petrischalen gegossen. Bei der Herstellung von festen, anaeroben Medien erfolgte dieser Schritt in der Anaerobenkammer. Eventuell verwendete Antibiotika (2.5.2.2.) wurden den jeweiligen Nährlösungen steril nach dem Autoklavieren zugegeben, nachdem diese schon etwas abgekühlt waren (auf etwa 50 °C). Nach dem Gießen wurden die Platten einige Tage lang getrocknet und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

Versuche mit *E. coli* wurden entweder in den Komplexmedien LB (2.5.1.1.; Tab. 13), TB (2.5.1.2.; Tab. 14), SOB (2.5.1.3.; Tab. 15) oder SOC (2.5.1.4.; Tab. 15) sowie in TM3a/Glucose-Medium (2.5.1.5.; Tab. 17) durchgeführt, während für die in dieser Arbeit verwendeten Clostridien (Tab. 9) die beiden Komplexmedien RCM (2.5.1.6.; Tab. 19) und Wilkins-Chalgren-Medium (2.5.1.7.; Tab. 20) sowie das ATCC-Medium 1754 (2.5.1.8.; Tab. 21), das DSMZ-Medium 879 (2.5.1.9.; Tab. 24), das Designed-Medium (2.5.1.10.; Tab. 26) und das AC-11-Medium (2.5.1.11.; Tab. 29) verwendet wurden.

2.5.1.1. LB (Luria Bertani)-Medium

Tab. 13: Herstellung von LB-Medium (Sambrook und Russell, 2001)

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|----------------------|-------------------|---------------|
| “Bacto®“ Trypton | 10 g | 1 % (w/v) |
| “Bacto®“ Hefeextrakt | 5 g | 0,5 % (w/v) |
| Natriumchlorid | 10 g | 171 mM |
| H ₂ O | <i>ad</i> 1000 ml | |
| pH 7,0 | | |

2.5.1.2. TB (Terrific Broth)-Medium

Tab. 14: Herstellung von TB-Medium (Tartoff und Hobbs, 1987)

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|--|-------------------|---------------|
| “Bacto®“ Trypton | 12 g | 1,2 % (w/v) |
| “Bacto®“ Hefeextrakt | 24 g | 2,4 % (w/v) |
| Kaliumdihydrogenphosphat wasserfrei | 2,2 g | 16 mM |
| <i>di</i> -Kaliumhydrogenphosphat wasserfrei | 9,4 g | 54 mM |
| Glycerin | 8 ml | 109 mM |
| H ₂ O | <i>ad</i> 1000 ml | |
| pH 7,2 | | |

Die Kaliumphosphatlösung wurde separat hergestellt sowie autoklaviert und nach dem Abkühlen in das restliche Medium überführt.

2.5.1.3. SOB-Medium

Tab. 15: Herstellung von SOB-Medium (Sambrook und Russell, 2001)

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|-----------------------------------|-------------------|---------------|
| “Bacto [®] “ Trypton | 20 g | 2 % (w/v) |
| “Bacto [®] “ Hefeextrakt | 5 g | 0,5 % (w/v) |
| Natriumchlorid | 0,59 g | 10 mM |
| Kaliumchlorid | 0,19 g | 2,5 mM |
| Magnesiumchlorid Hexahydrat | 2,03 g | 10 mM |
| Magnesiumsulfat Heptahydrat | 2,46 g | 10 mM |
| H ₂ O | <i>ad</i> 1000 ml | |
| pH 7,0 | | |

Die Magnesium-Salze wurden getrennt hergestellt und autoklaviert. Die Zugabe zum übrigen Medium erfolgte kurz vor Gebrauch.

2.5.1.4. SOC-Medium

Tab. 16: Herstellung von SOC-Medium (Sambrook und Russell, 2001)

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|-----------------------------------|-------------------|---------------|
| “Bacto [®] “ Trypton | 20 g | 2 % (w/v) |
| “Bacto [®] “ Hefeextrakt | 5 g | 0,5 % (w/v) |
| Natriumchlorid | 0,59 g | 10 mM |
| Kaliumchlorid | 0,19 g | 2,5 mM |
| Magnesiumchlorid Hexahydrat | 2,03 g | 10 mM |
| Magnesiumsulfat Heptahydrat | 2,46 g | 10 mM |
| D-(+)-Glucose Monohydrat | 3,96 g | 20 mM |
| H ₂ O | <i>ad</i> 1000 ml | |
| pH 7,0 | | |

Die Magnesium-Salze wurden getrennt hergestellt und autoklaviert. Die Zugabe zum übrigen Medium erfolgte kurz vor Gebrauch.

2.5.1.5. TM3a/Glucose-Medium

Tab. 17: Herstellung von TM3a/Glucose-Medium (Donaldson *et al.*, 2007)

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|---|-------------------|---------------|
| D-(+)-Glucose (wasserfrei) | 10 g | 55 mM |
| Kaliumdihydrogenphosphat wasserfrei | 13,6 g | 100 mM |
| Citronensäure Monohydrat | 2 g | 9,5 mM |
| Ammoniumsulfat | 3 g | 23 mM |
| Magnesiumsulfat Heptahydrat | 2 g | 8 mM |
| Calciumchlorid Dihydrat | 0,2 g | 1,5 mM |
| Ammoniumeisen(III)-citrat | 0,33 g | 1 mM |
| Thiamin-HCl (Vitamin B ₁) | 1 mg | 3 µM |
| “Bacto [®] “ Hefeextrakt | 0,5 g | 0,05 % (w/v) |
| Spurenelementlösung (Tab. 18) | 10 ml | 1 % (v/v) |
| H ₂ O | <i>ad</i> 1000 ml | |
| pH 6,8 (mit Ammoniaklösung eingestellt) | | |

Die Glucose wurde separat autoklaviert und kurz vor Gebrauch zugegeben.

Tab. 18: Herstellung der Spurenelementlösung für das TM3a/Glucose-Medium (Donaldson *et al.*, 2007)

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|-------------------------------------|-------------------|---------------|
| Citronensäure Monohydrat | 4 g | 19 mM |
| Mangansulfat Monohydrat | 3 g | 18 mM |
| Natriumchlorid | 1 g | 17 mM |
| Eisen(II)-sulfat Heptahydrat | 0,1 g | 0,35 mM |
| Kobaltchlorid Hexahydrat | 0,1 g | 0,4 mM |
| Zinksulfat Heptahydrat | 0,1 g | 0,35 mM |
| Kupfer(II)-sulfat Pentahydrat | 10 mg | 40 µM |
| Borsäure | 10 mg | 0,16 mM |
| <i>di</i> -Natriummolybdat Dihydrat | 10 mg | 40 µM |
| H ₂ O | <i>ad</i> 1000 ml | |
| pH 2,7 | | |

Für die Herstellung der Spurenelementlösung wurde zuerst die Citronensäure und dann die restlichen Substanzen zugegeben. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

2.5.1.6. RCM (“Reinforced Clostridial Medium“)

Tab. 19: Herstellung von RCM (Hirsch und Grinstead, 1954)

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|---------------------------------|-------------------|---------------|
| “Reinforced Clostridial Medium“ | 38 g | 3,8 % (w/v) |
| H ₂ O | <i>ad</i> 1000 ml | |
| pH 6,8 | | |

2.5.1.7. Wilkins-Chalgren-Medium

Tab. 20: Herstellung von Wilkins-Chalgren-Medium (Wilkins und Chalgren, 1976)

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|-----------------------------------|-------------------|---------------|
| “Wilkins-Chalgren Anaerobe Broth“ | 33 g | 3,3 % (w/v) |
| Natriumhydrogencarbonat | 1 g | 12 mM |
| H ₂ O | <i>ad</i> 1000 ml | |
| pH 6,0 | | |

2.5.1.8. ATCC-Medium 1754 (PETC-Medium)

Tab. 21: Herstellung von ATCC-Medium 1754

(www.lgcstandards-atcc.org/Attachments/ 2940.pdf)

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|-------------------------------------|-------|---------------|
| Ammoniumchlorid | 1 g | 19 mM |
| Kaliumchlorid | 0,1 g | 1,35 mM |
| Magnesiumsulfat Heptahydrat | 0,2 g | 0,8 mM |
| Natriumchlorid | 0,8 g | 14 mM |
| Kaliumdihydrogenphosphat wasserfrei | 0,1 g | 0,7 mM |
| Calciumchlorid Dihydrat | 20 mg | 0,15 mM |
| “Bacto [®] “ Hefeextrakt | 1 g | 0,1 % (w/v) |

Tab. 21: Fortsetzung

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|---------------------------------|-------------------|---------------|
| Spurenelementlösung (Tab. 22) | 10 ml | 1 % (v/v) |
| Wolfe's Vitaminlösung (Tab. 23) | 10 ml | 1 % (v/v) |
| Natriumhydrogencarbonat | 2 g | 24 mM |
| D-(-)-Fructose | 5 g | 28 mM |
| H ₂ O | <i>ad</i> 1000 ml | |
| pH 5,9 | | |

Vor der Zugabe von Natriumhydrogencarbonat wurde der pH-Wert auf 5,5 eingestellt. Die Fructose wurde separat autoklaviert. Die Zugabe zum übrigen Medium erfolgte zusammen erst kurz vor Gebrauch. Wenn Gase als Substrat verwendet werden sollten, wurde die Fructose weggelassen.

Tab. 22: Herstellung der Spurenelementlösung für das ATCC-Medium 1754

(www.lgcstandards-atcc.org/Attachments/2940.pdf)

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|---|-------------------|---------------|
| Nitrilotriessigsäure | 2 g | 10,5 mM |
| Mangansulfat Monohydrat | 1 g | 6 mM |
| Ammoniumeisen(II)-sulfat-Hexahydrat | 0,8 g | 2 mM |
| Kobaltchlorid Hexahydrat | 0,2 g | 0,85 mM |
| Zinksulfat Heptahydrat | 0,2 mg | 0,7 µM |
| Kupfer(II)-chlorid Dihydrat | 20 mg | 0,12 mM |
| Nickel(II)-chlorid Hexahydrat | 20 mg | 80 µM |
| <i>di</i> -Natriummolybdat Dihydrat | 20 mg | 80 µM |
| Natriumselenit Pentahydrat | 20 mg | 80 µM |
| Natriumwolframat Dihydrat | 20 mg | 60 µM |
| H ₂ O | <i>ad</i> 1000 ml | |
| pH 6,0 (mit Kaliumhydroxid eingestellt) | | |

Zur Herstellung der Spurenelementlösung wurde die Nitrilotriessigsäure vollständig in Wasser gelöst und dabei der pH-Wert mit Kaliumhydroxid auf 6,0 eingestellt. Erst danach wurden die restlichen Substanzen darin gelöst. Die Lagerung fand bei 4 °C statt.

Tab. 23: Herstellung von Wolfe's Vitaminlösung (Wolin *et al.*, 1963)

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|--|-------------------|---------------|
| Biotin (Vitamin H) | 2 mg | 8 μ M |
| Folsäure (Vitamin B ₉) | 2 mg | 4,5 μ M |
| Pyridoxin-HCl (Vitamin B ₆) | 10 mg | 49 μ M |
| Thiamin-HCl (Vitamin B ₁) | 5 mg | 15 μ M |
| Riboflavin (Vitamin B ₂) | 5 mg | 13 μ M |
| Nicotinsäureamid (Vitamin PP) | 5 mg | 41 μ M |
| D-Calcium-Pantothersäure (Vitamin B ₅) | 5 mg | 10,5 μ M |
| Cyanocobalamin (Vitamin B ₁₂) | 0,1 mg | 74 nM |
| <i>p</i> -Aminobenzoessäure (Vitamin B ₁₀) | 5 mg | 36 μ M |
| Liponsäure | 5 mg | 24 μ M |
| H ₂ O | <i>ad</i> 1000 ml | |
| pH 4,3 | | |

2.5.1.9. DSMZ-Medium 879 (*Clostridium ljungdahlii*-Medium)**Tab. 24: Herstellung von DSMZ-Medium 879**

(www.dsmz.de/microorganisms/html/ media/medium000879.html)

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|-------------------------------------|--------|---------------|
| Ammoniumchlorid | 1 g | 19 mM |
| Kaliumchlorid | 0,1 g | 1,35 mM |
| Magnesiumsulfat Heptahydrat | 0,2 g | 0,8 mM |
| Natriumchlorid | 0,8 g | 14 mM |
| Kaliumdihydrogenphosphat wasserfrei | 0,1 g | 0,7 mM |
| Calciumchlorid Dihydrat | 20 mg | 0,15 mM |
| “Bacto [®] “ Hefeextrakt | 1 g | 0,1 % (w/v) |
| Spurenelementlösung (Tab. 25) | 10 ml | 1 % (v/v) |
| Natriumwolframat Dihydrat | 0,2 mg | 0,6 μ M |
| Wolfe's Vitaminlösung (Tab. 23) | 10 ml | 1 % (v/v) |

Tab. 24: Fortsetzung

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|-------------------------|-------------------|---------------|
| D-(-)-Fructose | 5 g | 28 mM |
| Natriumhydrogencarbonat | 1 g | 24 mM |
| H ₂ O | <i>ad</i> 1000 ml | |
| pH 5,9 | | |

Die Fructose wurde getrennt autoklaviert und dem Medium kurz vor Gebrauch zugegeben. Wenn Gase als Substrat verwendet werden sollten, wurde auf die Fructose verzichtet.

Tab. 25: Herstellung der Spurenelementlösung für das DSMZ-Medium 879

(www.dsmz.de/microorganisms/html/media/medium000141.html)

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|---|-------------------|---------------|
| Nitrilotriessigsäure | 1,5 g | 10,5 mM |
| Magnesiumsulfat Heptahydrat | 3 g | 12 mM |
| Mangansulfat Monohydrat | 0,5 g | 3 mM |
| Ammoniumeisen(II)-sulfat-Hexahydrat | 0,8 g | 2 mM |
| Natriumchlorid | 1 g | 17 mM |
| Eisen(II)-sulfat Heptahydrat | 0,1 g | 0,35 mM |
| Kobaltchlorid Hexahydrat | 0,18 g | 0,8 mM |
| Calciumchlorid Dihydrat | 0,1 g | 0,75 mM |
| Zinksulfat Heptahydrat | 0,18 g | 0,6 mM |
| Kupfer(II)-sulfat Pentahydrat | 10 mg | 40 µM |
| Kaliumaluminiumsulfat Dodecahydrat | 20 mg | 40 µM |
| Borsäure | 10 mg | 0,16 mM |
| <i>di</i> -Natriummolybdat Dihydrat | 10 mg | 40 µM |
| Nickel(II)-chlorid Hexahydrat | 25 mg | 0,1 mM |
| Natriumselenit Pentahydrat | 0,3 mg | 1 µM |
| H ₂ O | <i>ad</i> 1000 ml | |
| pH 7,0 (mit Kaliumhydroxid eingestellt) | | |

Für die Herstellung der Spurenelementlösung wurde die Nitrilotriessigsäure bei pH 6,5 vollständig gelöst und erst dann nacheinander alle anderen Substanzen zugesetzt. Die Lösung konnte mehrere Monate bei 4 °C gelagert werden.

2.5.1.10. Designed-Medium

Tab. 26: Herstellung von Designed-Medium (Phillips *et al.*, 1993)

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|--------------------------------------|-------------------|---------------|
| Magnesiumsulfat Heptahydrat | 0,5 g | 2 mM |
| Natriumchlorid | 0,2 g | 3,5 mM |
| Calciumchlorid Dihydrat | 0,2 g | 1,5 mM |
| Spurenelementlösung (Tab. 27) | 10 ml | 1 % (v/v) |
| Vitaminlösung (Tab. 28) | 10 ml | 1 % (v/v) |
| <i>di</i> -Ammoniumhydrogenphosphat | 2 g | 15 mM |
| <i>o</i> -Phosphorsäure (85 % (v/v)) | 0,95 ml | 15 mM |
| Kaliumchlorid | 0,15 g | 2 mM |
| D-(-)-Fructose | 5 g | 28 mM |
| H ₂ O | <i>ad</i> 1000 ml | |
| pH 5,9 | | |

Die Fructose wurde separat autoklaviert und erst kurz vor dem Gebrauch in das restliche Medium überführt. Wenn Gase als Substrat verwendet werden sollten, wurde keine Fructose zugegeben.

Tab. 27: Herstellung der Spurenelementlösung für das Designed-Medium (Phillips *et al.*, 1993)

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|-------------------------------------|-------------------|---------------|
| Zinksulfat Heptahydrat | 0,1 g | 0,35 mM |
| Mangan(II)-chlorid Tetrahydrat | 30 mg | 0,15 mM |
| Borsäure | 0,3 g | 5 mM |
| Kobaltchlorid Hexahydrat | 0,2 g | 0,85 mM |
| Kupfer(II)-chlorid Dihydrat | 10 mg | 60 µM |
| Nickel(II)-chlorid Hexahydrat | 20 mg | 80 µM |
| <i>di</i> -Natriummolybdat Dihydrat | 30 mg | 0,12 mM |
| Eisen(II)-chlorid Tetrahydrat | 1,5 g | 7,5 mM |
| Natriumselenit Pentahydrat | 10 mg | 40 µM |
| H ₂ O | <i>ad</i> 1000 ml | |
| pH 5,9 | | |

Die Komponenten wurden unter geringer Wärmezufuhr der Reihe nach einzeln gelöst.

Tab. 28: Herstellung der Vitaminlösung für das Designed-Medium (Phillips *et al.*, 1993)

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|--|-------------------|---------------|
| Biotin (Vitamin H) | 10,6 mg | 42 μ M |
| Folsäure (Vitamin B ₉) | 0,5 mg | 1 μ M |
| Pyridoxin-HCl (Vitamin B ₆) | 0,25 mg | 0,8 μ M |
| Liponsäure | 1,5 mg | 7 μ M |
| Riboflavin (Vitamin B ₂) | 1,25 mg | 3 μ M |
| Thiamin-HCl (Vitamin B ₁) | 26,6 mg | 80 μ M |
| D-Calcium-Pantothersäure (Vitamin B ₅) | 41,3 mg | 87 μ M |
| Cyanocobalamin (Vitamin B ₁₂) | 1,25 mg | 0,9 μ M |
| <i>p</i> -Aminobenzoessäure (Vitamin B ₁₀) | 1,25 mg | 9 μ M |
| Nicotinsäureamid (Vitamin PP) | 1,25 mg | 10 μ M |
| H ₂ O | <i>ad</i> 1000 ml | |
| pH 5,9 | | |

2.5.1.11. AC-11-Medium

Tab. 29: Herstellung von AC-11-Medium (Breznak und Switzer, 1986)

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|---------------------------------------|-------------------|---------------|
| Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4; 150 mM) | 50 ml | 7,5 mM |
| Ammoniumchlorid | 0,4 g | 9,4 mM |
| Natriumchlorid | 0,14 g | 2,4 mM |
| Kaliumchlorid | 0,16 g | 2,2 mM |
| Magnesiumsulfat Heptahydrat | 20 mg | 80 μ M |
| Calciumchlorid Dihydrat | 10 mg | 70 μ M |
| Natriumwolframatlösung (3 mM) | 100 μ l | 0,3 μ M |
| Spurenelementlösung (Tab. 30) | 10 ml | 1 % (v/v) |
| Wolfe's Vitaminlösung (Tab. 23) | 5 ml | 0,5 % (v/v) |
| “Bacto [®] “ Hefeextrakt | 0,5 g | 0,05 % (w/v) |
| Natriumhydrogencarbonat | 5,96 g | 71 mM |
| H ₂ O | <i>ad</i> 1000 ml | |
| pH 7,4 | | |

Tab. 30: Herstellung der Spurenelementlösung für das AC-11-Medium 1754 (Breznak und Switzer, 1986; Wolin *et al.*, 1963)

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|-------------------------------------|-------------------|---------------|
| Nitrilotriessigsäure | 1,5 g | 10,5 mM |
| Magnesiumsulfat Heptahydrat | 3 g | 12 mM |
| Mangansulfat Monohydrat | 0,5 g | 3 mM |
| Natriumchlorid | 1 g | 17 mM |
| Eisen(II)-sulfat Heptahydrat | 0,1 g | 0,35 mM |
| Calciumchlorid Dihydrat | 0,1 g | 0,75 mM |
| Kobaltchlorid Hexahydrat | 0,1 g | 0,4 mM |
| Zinksulfat Heptahydrat | 0,1 g | 0,35 mM |
| Kupfer(II)-sulfat Pentahydrat | 10 mg | 40 μ M |
| Kaliumaluminiumsulfat Dodecahydrat | 10 mg | 20 μ M |
| Borsäure | 10 mg | 0,16 mM |
| <i>di</i> -Natriummolybdat Dihydrat | 10 mg | 40 μ M |
| Nickel(II)-chlorid Hexahydrat | 10 mg | 40 μ M |
| Natriumselenit Pentahydrat | 10 mg | 40 μ M |
| H ₂ O | <i>ad</i> 1000 ml | |
| pH 7,4 | | |

Zur Herstellung der Spurenelementlösung wurde erst die Nitrilotriessigsäure vollständig gelöst, bevor die restlichen Substanzen zugegeben wurden. Die Lagerung fand bei 4 °C statt.

2.5.2. Medienzusätze

2.5.2.1. Reduktionsmittel

Allen verwendeten anaeroben Medien wurden kurz vor Gebrauch Reduktionsmittel zugegeben, um das Redoxpotential nochmals zu senken und so den Organismen optimale Bedingungen zu verschaffen. In dieser Arbeit wurden überwiegend die beiden Reduktionsmittel Cystein-HCl (Tab. 31) und Natriumsulfid (Tab. 32) verwendet. Die Endkonzentration an Reduktionsmitteln im Medium betrug dabei zwischen 6-8 mg/l (0,006-0,008 % (w/v)). Da Cystein-HCl einen sauren und Natriumsulfid einen alkalischen pH-Wert besitzt, wurde normalerweise eine Kombination beider Reduktionsmittel verwendet, damit

der pH-Wert des Mediums konstant blieb. Durch die Wahl des Reduktionsmittels konnte dieser aber auch (innerhalb gewisser Grenzen) bewusst beeinflusst werden.

Tab. 31: Herstellung einer Cystein-HCl-Stammlösung

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|--------------------------|------------------|---------------|
| L-Cystein-HCl Monohydrat | 4 g | 228 mM |
| H ₂ O | <i>ad</i> 100 ml | |
| pH 1,5 | | |

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

Tab. 32: Herstellung einer Natriumsulfid+Cystein-HCl-Stammlösung

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|--------------------------|------------------|---------------|
| Natriumhydroxidplättchen | 0,9 g | 225 mM |
| Natriumsulfid Nonahydrat | 4 g | 166,5 mM |
| L-Cystein-HCl Monohydrat | 4 g | 228 mM |
| H ₂ O | <i>ad</i> 100 ml | |
| pH 10 | | |

Zuerst wurde die Natronlauge anaerobisiert, danach das Cystein-HCl und anschließend das Natriumsulfid darin gelöst und die gesamte Lösung autoklaviert.

Als Alternative zu den beiden Schwefelverbindungen Cystein-HCl und Natriumsulfid diene eine Titan(III)-NTA-Lösung (Tab. 33), welche ein stark negatives Redoxpotential $E^0 [Ti^{3+}/Ti^{4+}]$ von -480 mV besitzt.

Tab. 33: Herstellung einer Titan(III)-NTA-Lösung

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|--|-----------------|---------------|
| Natronlauge (5 M) | 20 ml | 1,33 M |
| Nitrilotriessigsäure | 5,73 g | 400 mM |
| Titan(III)-chlorid-Lösung (15 % (w/v)) | 6,4 ml | 16 mM |
| Natriumcarbonat-Lösung (2 M) | 10 ml | 266 mM |
| H ₂ O | <i>ad</i> 75 ml | |

Zuerst wurde die Natronlauge zusammen mit 30 ml H₂O anaerobisiert, danach die Nitriloessigsäure darin gelöst und anschließend die TiCl₃- sowie die Natriumcarbonat-Lösung gleichzeitig und unter ständigem Rühren zugegeben. Schließlich wurde die Titan(III)-NTA-Lösung sterilfiltriert.

2.5.2.2. Antibiotika

Sämtliche verwendeten Antibiotika (Tab. 34) wurden als 1000-fach konzentrierte Stammlösungen angesetzt und den Medien kurz vor Gebrauch zugegeben. Alle Lösungen wurden sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.

Für *E. coli* und die verschiedenen Clostridien wurden dabei unterschiedliche Antibiotika eingesetzt. So wurde für Clostridien Clarithromycin anstelle von Erythromycin eingesetzt, da letzteres nicht säurestabil ist. Zudem wurde Thiamphenicol statt Chloramphenicol benutzt, da gezeigt werden konnte, dass wachsende Clostridien-Kulturen dazu in der Lage sind, die Aryl-Nitrogruppe von Chloramphenicol zu reduzieren, wodurch dieses seine Wirkung verliert (O'Brien und Morris, 1971).

Tab. 34: Verwendete Antibiotika

| Antibiotikum | Stammlösung [mg/ml] | Arbeitskonzentration [µg/ml] | Verwendung |
|-----------------|--|---------------------------------|----------------|
| Ampicillin | 100 (in H ₂ O) | 100 | |
| Chloramphenicol | 30 (in 96 % (v/v) Ethanol) | 30 | |
| Colistin | 10 (in H ₂ O) | 10 | |
| Erythromycin | 25 (in 50 % (v/v) Ethanol) | 250 | <i>E. coli</i> |
| Kanamycin | 50 (in H ₂ O) | 50 | |
| Rifampicin | 200 (in H ₂ O) | 200 | |
| Spectinomycin | 50 (in H ₂ O) | 40 | |
| Clarithromycin | 5 (in H ₂ O ¹⁾) | 5 | Clostridien |
| Thiamphenicol | 20 (in DMF) ²⁾ | 20 | |

¹⁾ Bei der Herstellung wurde Clarithromycin in mit HCl angesäuertem Wasser (pH 2) gelöst und anschließend mit NaOH neutralisiert (auf etwa pH 6,5; ein zu alkalischer pH-Wert führt zum Ausfallen).

²⁾ Lösung ist lichtempfindlich.

2.5.2.3. Sonstige Medienzusätze

Für eine Blau-Weiß-Selektion (2.7.1.3.) wurden die entsprechenden Agarplatten vor dem Ausplattieren der Kulturen mit 40 µl einer X-Gal- sowie 20 µl einer IPTG-Stammlösung behandelt (Tab. 35) und danach für etwa eine halbe Stunde bei 37 °C inkubiert, sodass die verwendeten Lösungsmittel verdampfen konnten.

Tab. 35: Sonstige Medienzusätze

| Zusatz | Stammlösung [mg/ml] | Arbeitskonzentration [$\mu\text{g/ml}$] |
|--------|----------------------------|---|
| IPTG | 24 (in 96 % (v/v) Ethanol) | 24 |
| X-Gal | 20 (in DMF) ¹⁾ | 40 |

¹⁾ Lösung ist lichtempfindlich.

2.5.3. Anzuchtbedingungen

Die Anzucht aller in der vorliegenden Arbeit verwendeten Organismen erfolgte stets bei 37 ° C, was der optimalen Wachstumstemperatur dieser Bakterien entspricht.

Aerobes Wachstum erfolgte bis zu einem Volumen von 5 ml in Reagenzgläsern und bei größeren Volumina in Erlenmeyerkolben mit Schikanen auf einem Inkubationsschüttler bei 120-200 Upm bzw. auf Agarplatten im Brutschrank.

Anaerobes Wachstum wurde bis zu einem Volumen von 5 ml in Hungate-Röhrchen (Bellco Glass Inc., Vineland, NJ (USA); importiert durch: Dunn Labortechnik GmbH, Asbach) mit Butyl-Gummistopfen (Ochs GmbH, Bovenden) und Schraubdeckeln und bei größeren Volumina in Kulturflaschen (Müller+Krempel AG, Bülach (Schweiz)) mit Naturgummistopfen (Maag Technic GmbH, Göppingen) und Edelstahldeckeln im Brutschrank durchgeführt. Wachstum auf Agarplatten fand im Brutschrank in der Anaerobenkammer oder unter Stickstoffatmosphäre im Anaerobentopf statt.

2.5.4. Stammhaltung

2.5.4.1. Stammhaltung von *E. coli*

Zur Stammhaltung von *E. coli*-Stämmen wurden nach der von Gherna (1994) beschriebenen Methode Glycerinkulturen angelegt und diese dann tiefgefroren. Dazu wurden 300 μl einer logarithmisch wachsenden Kultur in LB-Medium (2.5.1.1.) zu 700 μl sterilem 50 %-igen (v/v) Glycerin (Endkonzentration: 35 % (v/v)) in einem 2-ml-Schraubdeckelröhrchen gegeben, suspendiert und bei -85 °C gelagert. Glycerin, welches auch in hohen Konzentrationen nicht

toxisch ist, wirkt dabei als Gefrierschutzmittel, indem es die Zellwand passieren kann und in der Zelle den osmotischen Druck und die Bildung von Eiskristallen reduziert (Meryman, 1971).

2.5.4.2. Stammhaltung von Clostridien

Für *C. ljungdahlii* gibt es bisher keine etablierte Methode zur Stammhaltung, abgesehen von anaerobem Lyophilisieren (Gefriertrocknen), welches von den Stammsammlungen DSMZ bzw. ATCC genutzt wird. Da dies allerdings technisch im Labor nicht möglich war, mussten andere Wege zur Stammhaltung gefunden werden.

Die kurzfristige Stammhaltung erfolgte durch regelmäßigen Transfer der Kulturen in neues Medium. Wurde Fructose als Substrat eingesetzt, erfolgte der Transfer in der Regel alle zwei Tage. Wurde Synthesegas als Substrat verwendet, war ein Transfer erst nach 1-3 Wochen nötig (abhängig vom Volumen der Gasphase).

Zur langfristigen Stammhaltung wurden *C. ljungdahlii*-Zellen tiefgefroren. Dazu wurde eine 300-ml-Übernachtskultur in ATCC-Medium 1754 mit Fructose (2.5.1.8.) in der Anaerobenkammer zentrifugiert und das Sediment anschließend in 0,5 ml frischem Medium aufgenommen und in ein steriles Hungate-Röhrchen überführt. Danach wurde dieses entweder zentrifugiert und der Überstand entfernt oder 0,5 ml der Gefrierschutzmittel Glycerin (Endkonzentration: 7,5 % (v/v)), DMSO (Endkonzentration; 5 % (v/v)) oder Saccharose (Endkonzentration: 12 % (v/v)) zugefügt. DMSO hat als Gefrierschutzmittel denselben Effekt wie Glycerin (siehe oben), während der Mechanismus von Saccharose noch unbekannt ist (Meryman, 1971; Redway und Lapage, 1974). Für die Arbeiten wurden ausschließlich sterile, gestopfte Spitzen verwendet. Das Hungate-Röhrchen wurde anschließend mit Parafilm umhüllt und bei -85 °C eingefroren. Wurde die Kultur wieder benötigt, wurden das Hungate-Röhrchen aufgetaut und 5 ml frisches, vorgewärmtes Medium hinzugefügt. Zudem wurde eine 1:10- und eine 1:100-Verdünnung angelegt und das Wachstum im Spektralphotometer für Röhrchen verfolgt. Außerdem wurden die Kulturen über PCR mit den Oligodesoxynukleotiden "fD1" und "rP2" (Weisburg *et al.*, 1990) oder "27f C.1" und "C.1 16sr" mit anschließender Sequenzierung (2.6.15.) auf ihre 16s rRNA-Gensequenz hin untersucht.

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit erstellte Stammkulturen konnten auch gegen Ende noch immer frisch angezogen werden. Dabei spielte es keine Rolle, ob nur das Sediment, oder eine Suspension mit einem der Gefrierschutzmittel eingefroren wurde. Zellen, die bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren wurden, konnten jedoch nicht wieder frisch angezogen werden.

Von vielen Clostridien können auch Sporenpräparationen zur Stammhaltung hergestellt werden, allerdings sporuliert *C. ljungdahlii* nur unregelmäßig, wodurch es nicht möglich war, eine geeignete Sporenpräparation herzustellen.

Die Stammhaltung von *C. carboxidivorans* und *C. difficile* wurde analog zu der für *C. ljungdahlii* beschriebenen Methode durchgeführt. Allerdings wurde anstelle einer 300-ml-Übernachtskultur bei *C. carboxidivorans* nur eine 100-ml-Übernachtskultur in Wilkins-Chalgren-Medium (2.5.1.7.) und bei *C. difficile* nur eine 50-ml-Übernachtskultur (RCM) verwendet. Im Falle von *C. carboxidivorans* war es auch möglich, die Zellen bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ einzufrieren und danach wieder anzuziehen.

2.5.5. Bestimmung von Wachstums- und Stoffwechselfparametern

2.5.5.1. Trübungsmessung

Der Wachstumsverlauf einer Bakterienkultur wurde anhand der Optischen Dichte mit Hilfe eines Spektralphotometers bei einer Wellenlänge von 600 nm verfolgt ($\text{OD}_{600\text{nm}}$). Das entsprechende Medium diente dabei als Leerwert und wurde gegebenenfalls auch zum Herstellen einer Verdünnung benutzt. Dies war ab einer Optischen Dichte von 0,3 nötig, um die Linearität zwischen Extinktion und Zellzahl zu bewahren.

Zusätzlich zur Messung in Küvetten bestand für Bakterienkulturen in Hungate-Röhrchen auch die Möglichkeit, die Optische Dichte direkt im Spektralphotometer zu messen. Die dabei gemessenen Werte stellten jedoch nur einen Anhaltspunkt dar, da nicht verdünnt werden konnte.

2.5.5.2. Messung des externen pH-Wertes

Um den pH-Wert von Kulturüberständen zu bestimmen, wurde ein Präzisions-pH-Meter verwendet. Um eine Verschmutzung der Elektrode durch Bakterienzellen zu vermeiden, wurde der Kulturüberstand zuvor 10 Minuten bei 10000 x g zentrifugiert.

2.5.5.3. Gaschromatographische Analytik des Produktspektrums

Zur quantitativen Analyse des Produktspektrums einer Bakterienkultur wurden jeweils 2-ml-Proben entnommen. Falls die Messung nicht sofort stattfand, wurden diese bei -20 °C eingefroren. Die Proben wurden zuerst zentrifugiert (10000 x g, 10 min), um eine Verschmutzung der gepackten Säule zu verhindern. 1 ml des Überstandes wurde dann in ein Rollrandgefäß überführt, mit 100 µl interner Standardlösung versetzt und mit einer Bördelkappe abgedichtet. Als interner Standard diente 110 mM Isobutanol gelöst in 2 N Salzsäure. Der Auftrag auf die Säule wurde von einem automatischen Probengeber (Varian Deutschland GmbH, Darmstadt) übernommen.

Folgende Bedingungen wurden zur Analyse gewählt:

| | |
|----------------------|--|
| Probevolumen | 1 µl |
| Injektionstemperatur | 195 °C |
| Säule | Glas, gepackt |
| Innendurchmesser | 2 mm |
| Länge | 2 m |
| Material | “Chromosorb 101“ (80 bis 100 mesh) |
| Trägergas | Stickstoff (15 ml/min) |
| Temperaturprofil | 130 °C für 1 min 130 °C bis 200 °C mit 4 °C/min 200 °C für 3 min |
| Detektor | FID “Mikro-TCD“ |
| Temperatur | 230 °C |
| FID-Gase | Wasserstoff (30 ml/min) Synthetische Luft (25 ml/min) |

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Analyseprogramms “Maestro Sampler II, Version 2.5“ (Chrompack GmbH, Berlin). Um eine Quantifizierung der Proben zu ermöglichen, wurden Kalibrierläufe mit bekannten Konzentrationen (5 mM) an Ethanol, Aceton, Acetat, 1-Butanol, Acetoin und Butyrat (aufgelistet nach der Reihenfolge ihrer Elution) durchgeführt. Für eine aussagekräftige Auswertung durfte also auch die Konzentration der einzelnen Substanzen in den Kulturüberständen 5 mM nicht übersteigen. Die Kulturüberstände wurden deshalb bei Bedarf mit Wasser entsprechend verdünnt. Die automatische Auswertung beruhte letztendlich auf der vergleichenden Signalflächenberechnung der Kalibrierung und des internen Standards, welcher natürlich nicht in den Kulturüberständen vorkommen durfte.

2.6. Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.6.1. Behandlung von Lösungen und Geräten

Alle hitzestabilen Geräte und Lösungen wurden für 20 min bei 121 °C und 1,2 bar autoklaviert, um Nukleasen zu inaktivieren und Kontaminationen zu verhindern. Nicht-autoklavierbare Materialien wurden mit 70 % (v/v) Ethanol ausgespült oder abgewischt. Kleingeräte aus Metall und Gegenstände wie Drigalski-Spatel wurden vor Gebrauch abgeflammt und hitzelabile Lösungen wurden sterilfiltriert.

Die für das Arbeiten mit RNA benötigten Geräte und Reagenzien wurden doppelt autoklaviert und gesondert gelagert, um Kontaminationen mit RNasen zu verhindern. Falls diese Behandlung nicht möglich war, wurden Geräte und Arbeitsflächen mit 0,1 % (v/v) SDS und 0,1 M NaOH oder “RNase-ExitusPlus™“ behandelt. Weiter wurde bei allen Arbeitsschritten grundsätzlich mit sterilen, gestopften Pipettenspitzen sowie Einweghandschuhen gearbeitet. Die Lagerung RNA-haltiger Lösungen erfolgte bei -85 °C.

2.6.2. Wässrige Lösungen und Puffer

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Lösungen und Puffer wurden mit demineralisiertem Wasser aus einer Reinstwasseranlage, welche als Ionenaustauscher fungiert und das Wasser zusätzlich noch mit UV-Licht bestrahlt, hergestellt. Im Folgenden wird dieses meist nur mit H₂O bezeichnet. Tab. 36 zeigt die Zusammensetzung von TE-Puffer, welcher zur Lagerung von Nukleinsäuren eingesetzt wurde. Die Herstellung anderer Puffer und Lösungen ist jeweils im Kapitel der entsprechenden Methodik angegeben.

Tab. 36: Herstellung von TE-Puffer

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|----------------------|-----------|---------------|
| Tris-HCl (1 M; pH 8) | 1 ml | 10 mM |
| EDTA | 38 mg | 1 mM |
| H ₂ O | ad 100 ml | |
| pH 7,8 | | |

2.6.3. Isolierung von Nukleinsäuren aus Bakterien

2.6.3.1. Isolierung von Gesamt-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung der Gesamt-DNA aus *E. coli* erfolgte nach der Methode von Ausubel *et al.* (1987). Da Gram-negative Bakterien große Mengen Exopolysaccharide enthalten, welche bei Reaktionen mit den meisten molekularbiologischen Enzymen stören, beruht diese Methode auf einer Bindung mit Hexadecyltrimethylammoniumbromid (CTAB). Die dabei gebildeten Komplexe können anschließend extrahiert werden.

Es wurden 1,5 ml einer über Nacht gewachsenen *E. coli*-Kultur für 5 min bei 6000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in 567 µl TE-Puffer (Tab. 36) suspendiert und anschließend 30 µl einer SDS-Lösung (10 % (w/v)), 3 µl einer Proteinase K-Lösung (20 mg/ml) und 6 µl RNase A zugegeben. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C wurden 100 µl 5 M NaCl-Lösung zugesetzt, damit CTAB nicht unerwünscht Nukleinsäuren präzipitiert. Daraufhin wurden 80 µl einer 10 %-igen CTAB/NaCl-Lösung (Tab. 37) zugefügt, der Ansatz gemischt und für 10 min bei 65 °C inkubiert.

Es folgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion (2.6.4.1.), bis keine Protein-Interphase mehr zu erkennen war, und schließlich eine Isopropanolfällung (2.6.4.3.).

Die getrocknete DNA wurde in 50-200 µl H₂O aufgenommen und bei 4 °C gelagert. Zusätzlich wurde eine Konzentrationsbestimmung (2.6.8.1.) durchgeführt und die DNA auf ein nicht-denaturierendes Agarose-Gel (2.6.5.1.) aufgetragen.

Tab. 37: Herstellung einer 10 %-igen CTAB/NaCl-Lösung

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|------------------|-----------|---------------|
| CTAB | 10 g | 274 mM |
| Natriumchlorid | 4,1 g | 702 mM |
| H ₂ O | ad 100 ml | |
| pH 7,8 | | |

2.6.3.2. Isolierung von Gesamt-DNA aus Clostridien

Sowohl für die Isolierung der Gesamt-DNA aus *C. ljungdahlii* als auch aus *C. carboxidivorans* wurde nach einem Protokoll von Bertram und Dürre (1989) in modifizierter Form vorgegangen.

Während *C. ljungdahlii* für 48 h in 100-200 ml ATCC-Medium 1754 mit Fructose (2.5.1.8.) kultiviert wurde, erfolgte die Anzucht von *C. carboxidivorans* in 50-100 ml Wilkins-Chalgren-Medium (2.5.1.7.) für mindestens 24 h. Daraufhin wurden die Zellen durch Zentrifugation (6000 x g, 15 min, 4 °C) geerntet, das Sediment mit Kaliumphosphatpuffer (10 mM, pH 7,5) gewaschen und in 3,8 ml STE-Puffer (Tab. 38) aufgenommen. Diese Suspension wurde nun gleichmäßig auf zwei 15-ml-Falcon-Reaktionsgefäße verteilt, wobei sich alle weiteren Schritte je Reaktionsgefäß verstehen. Der Aufschluss der Zellen geschah durch Zugabe von 300 µl LysozymbLösung (30 mg/ml) bei 37 °C für 30 min und anschließender Zugabe von 280 µl einer SDS-Lösung (10 % (w/v)) mit darauffolgender 10-minütiger Inkubation. Danach wurden 240 µl einer EDTA-Lösung (0,5 M, pH 8) zur Inhibierung clostridieller DNasen und 20 µl Tris-HCl (1 M, pH 7,5) hinzu pipettiert und der Ansatz vorsichtig durchmischt. Durch Zugabe von 10 µl RNase A sowie einer 30-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte der Verdau unerwünschter RNA und dann eine Proteolyse mit 100 µl Proteinase K-Lösung (2,5 mg/ml) für 1-3 h bei 37 °C im Wasserbad mit gelegentlichem Schwenken.

Schließlich wurden 600 µl einer 5 M Na-Perchloratlösung zugegeben und es folgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion (2.6.4.1.) bis keine Protein-Interphase mehr zu erkennen war, sowie eine Isopropanolfällung (2.6.4.3).

Die getrocknete DNA wurde in 50-200 µl H₂O aufgenommen. Die Lagerung fand bei 4 °C statt. Außerdem wurden eine Konzentrationsbestimmung (2.6.8.1.) durchgeführt und die Qualität der isolierten DNA im nicht-denaturierenden Agarose-Gel (2.6.5.1.) überprüft.

Tab. 38: Herstellung von STE-Puffer

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|----------------------|-----------|---------------|
| Tris-HCl (1 M; pH 8) | 5 ml | 50 mM |
| EDTA | 38 mg | 1 mM |
| Saccharose | 6,85 g | 200 mM |
| H ₂ O | ad 100 ml | |
| pH 7,8 | | |

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

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit einer modifizierten Methode nach Birnboim und Doly (1979).

Hierfür wurden 2-4 ml einer ÜN-Kultur zentrifugiert (12000 x g, 30 s) und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in 300 µl Puffer I (Tab. 39) vollständig suspendiert und 300 µl Puffer II (Tab. 40) zugegeben. Anschließend wurde der Versuchsansatz für 5 min bei RT inkubiert und gelegentlich vorsichtig invertiert, so dass es zur möglichst vollständigen alkalischen Lyse der Zellen sowie zur Denaturierung der linearen DNA kam. Nach dem Zellaufschluss wurden dem Ansatz 300 µl Puffer III (Tab. 41) zugegeben und alles durch erneutes Invertieren gründlich gemischt. Die Entfernung der bei der Lyse angefallenen Zellwandfragmente und Proteine sowie der chromosomalen DNA erfolgte durch eine Zentrifugation (12000 x g, 10 min). Der klare Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Er enthielt die Plasmid-DNA, welche schließlich durch Isopropanol gefällt werden konnte (2.4.4.3.).

Tab. 39: Herstellung von Puffer I

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|----------------------|------------------|---------------|
| Tris-HCl (1 M; pH 8) | 5 ml | 50 mM |
| EDTA | 0,19 g | 5 mM |
| RNase A | 1 ml | 1 % (v/v) |
| H ₂ O | <i>ad</i> 100 ml | |
| pH 7,8 | | |

Puffer I wurde bei 4 °C gelagert.

Tab. 40: Herstellung von Puffer II

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|------------------|------------------|---------------|
| SDS (10 % (w/v)) | 10 ml | 40 mM |
| NaOH (10 M) | 2 ml | 200 mM |
| H ₂ O | <i>ad</i> 100 ml | |
| pH 13,15 | | |

Puffer II war etwa eine Woche bei RT haltbar.

Tab. 41: Herstellung von Puffer III

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|-----------------------------------|------------------|---------------|
| Natriumacetat | 24,6 g | 3 M |
| H ₂ O | <i>ad</i> 100 ml | |
| pH 4,8 (mit Eisessig eingestellt) | | |

Puffer III wurde bei RT gelagert.

Alternativ konnte die Plasmid-DNA aus *E. coli* auch mit Hilfe von molekularbiologischen “Kits“ isoliert werden. Während mit der Methode nach Birnboim und Doly (1979) höhere Plasmid-Ausbeuten erzielt werden konnten, war es mit Hilfe der molekularbiologischen “Kits“ möglich, in nur kurzer Zeit sehr saubere Plasmid-DNA zu isolieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde sowohl der “peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I“ als auch der “Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit“ verwendet, welche ebenfalls auf einer alkalischen Lyse basieren, in Kombination mit der Reinigung der Plasmid-DNA über eine reversible Bindung an einer Silica-Matrix.

Die Durchführung erfolgte dabei mit jeweils 2-4 ml Kulturvolumen nach den Angaben des Herstellers, wobei die optionalen Waschschrirte immer ausgeführt wurden.

Die isolierte Plasmid-DNA wurde in schließlich in 30-50 µl H₂O oder TE-Puffer (Tab. 36) aufgenommen und bei -20 °C gelagert. Zusätzlich konnte noch die Konzentration der Plasmid-DNA bestimmt (2.6.8.1.) sowie ein Restriktionsverdau (2.6.13.1.) und eine Überprüfung im nicht-denaturierenden Agarose-Gel (2.6.5.1.) durchgeführt werden.

2.6.3.4. Isolierung von Plasmid-DNA aus Clostridien

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus *C. ljungdahlii* erfolgte analog zu *E. coli* (2.6.3.3.). Aufgrund der hohen Nuklease-Aktivitäten von Clostridien (Burchhardt und Dürre, 1990), war die Qualität als auch die Quantität der dabei gewonnen Plasmid-DNA jedoch deutlich schlechter. Dadurch war ein Nachweis des Plasmides mit einem Restriktionsverdau (2.6.13.1.) oder auch eine Sequenzierung des Plasmides (2.6.14.5.) unmöglich. Der Nachweis des Plasmides mit einer spezifischen PCR (2.6.14.2.) war allerdings zumeist möglich.

Zusätzlich konnte eine "Rettung" des Plasmides ("Plasmid Rescue"; Perucho *et al.*, 1980) durchgeführt werden. Dazu wurden 1-5 µl der präparierten Plasmid-DNA in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen transformiert (2.7.1.1.), aus denen dann schließlich die entsprechende Plasmid-DNA in ausreichender Qualität und Quantität isoliert werden konnte (2.6.3.3.).

2.6.3.5. Isolierung von RNA aus Clostridien

Die Isolierung von RNA aus *C. ljungdahlii* wurde nach einer Methode von Oelmüller *et al.* (1990) in modifizierter Form durchgeführt.

Dafür wurden *C. ljungdahlii* in ATCC-Medium 1754 (2.5.1.8.) bis zum gewünschten Zeitpunkt kultiviert und dann je 2 ml Kulturüberstand in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (12000 g, 1 min, 4 °C). Um der geringen biologischen Halbwertszeit von RNA Rechnung zu tragen, wurde das Sediment entweder sofort verarbeitet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -85 °C bis zur Verarbeitung gelagert. Jedem Reaktionsgefäß wurden 300 µl AE-Puffer (Tab. 42) zugegeben und die Zellsedimente

darin gelöst. Anschließend wurden die Suspensionen aus je 2 Reaktionsgefäßen vereinigt und in eine 65 °C heiße, saure Phenol-SDS-Lösung (15 µl einer 25 %-igen (w/v) SDS-Lösung in 1,2 ml “Roti[®]-Aqua-Phenol“, pH 4,5-5) transferiert. Es folgte eine 10-minütige Inkubation bei 65 °C unter wiederholtem Mischen. Nach einer Zentrifugation (9000 x g, 15 min, 4 °C) wurde die obere, wässrige Phase in ein frisches 2-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Danach wurden 100 µl 2 M Natriumacetat (pH 5,2, eingestellt mit Eisessig) zugegeben und eine Phenol-Chloroform-Extraktion (2.6.4.1.) solange durchgeführt, bis keine Protein-Interphase mehr zu erkennen war. Die RNA wurde anschließend mit Ethanol gefällt (2.6.4.2.) und in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Das getrocknete Sediment wurde in 160 µl H₂O aufgenommen.

Um die RNA-Isolation auch DNA-frei zu bekommen, erfolgte ein Deoxyribonuklease-Verdau mit RNase-freier DNase I. Hierfür wurden dem Ansatz je 20 µl des entsprechenden Enzyms sowie dem dazugehörigen 10 x Puffer zugegeben. Die Inkubation erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers und wurde mit einer nochmaligen Phenol-Chloroform-Extraktion (2.6.4.1.) gestoppt. Nach einer darauffolgenden Ethanol-Fällung (2.6.4.2.) wurde das Sediment in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 30-50 µl H₂O suspendiert.

Mit einer spezifischen PCR (2.6.14.2.) wurde überprüft, ob die isolierte RNA auch DNA-frei war, wobei als Positivkontrolle chromosomale DNA als Matrize eingesetzt wurde. Der Deoxyribonuklease-Verdau wurde so oft wiederholt, bis kein Produkt mehr amplifiziert werden konnte.

Die Qualität und Quantität der isolierten RNA wurde photometrisch bestimmt (2.6.8.1.) sowie im nicht-denaturierenden Agarose-Gel kontrolliert (2.6.5.1.). Die Lagerung fand bis zum weiteren Gebrauch bei -85 °C statt.

Tab. 42: Herstellung von AE-Puffer

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|------------------|------------------|---------------|
| Natriumacetat | 0,27 g | 20 mM |
| EDTA | 38 mg | 1 mM |
| H ₂ O | <i>ad</i> 100 ml | |
| pH 5,5 | | |

2.6.4. Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren

2.6.4.1. Phenol-Chloroform-Extraktion

Zur Abtrennung von Proteinen aus Nukleinsäurelösungen wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion nach Sambrook und Russell (2001) in modifizierter Form durchgeführt.

Noch vor der Extraktion wurde die Ionenkonzentration erhöht, um eine bessere Denaturierung der Proteine zu erreichen (Wallace, 1987). Die eigentliche Extraktion erfolgte dann mit 1 Vol. einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung mit dem Mischungsverhältnis von 25:24:1 (v/v/v). Für Arbeiten mit DNA wurde eine "Roti[®]-P/C/I-Lösung" benutzt, während für Extraktionen von RNA eine saure, wassergesättigte "Roti[®]-Aqua-P/C/I-Lösung" (pH 4,5-5) verwendet wurde. Die Ansätze wurden gut durchmischt und zur Trennung zentrifugiert (9000 x g, 15 min, DNA bei RT und RNA bei 4°C). Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Prozedur so oft wiederholt, bis keine Proteininterphase mehr zu erkennen war. Die Entfernung des Phenols erfolgte durch Zugabe von 1 Vol. eines "Roti[®]-C/I"-Gemisches (24:1 (v/v)) und erneuter Zentrifugation.

Nach einer optionalen Wiederholung dieses Schrittes wurde die obere wässrige Phase schließlich einer Ethanol- (2.6.4.2.) oder Isopropanolfällung (2.6.4.3.) unterzogen.

2.6.4.2. Ethanolfällung

Der Nukleinsäurelösung wurden 2,5 Vol. eiskaltes Ethanol (absolut) zugegeben und die Lösung für 2 h bei -20 °C gefällt. Hierbei sind hohe Konzentrationen von monovalenten Kationen förderlich, da diese zusammen mit Nukleinsäuren im Alkoholmilieu einen unlöslichen Niederschlag bilden. Sollten solche Bedingungen nicht schon gegeben sein, konnte eine 3 M Natriumacetatlösung (pH 5,2, eingestellt mit Eisessig) bis zu einer Endkonzentration von 0,2-0,3 M zugegeben werden. Nach einer Zentrifugation (16000 g, 1 h, 4 °C) wurde das Sediment mit eiskaltem 70 %-igem (v/v) Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (16000 g, 15 min, 4 °C). Das Sediment wurde anschließend in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in H₂O oder TE-Puffer aufgenommen.

2.6.4.3. Isopropanolfällung

Zur Fällung der Nukleinsäurelösung wurden 0,7-1 Vol. Isopropanol zugegeben und der Ansatz vorsichtig gemischt. Da Isopropanol in stärkerem Maße als Ethanol zur Kopräzipitation von Salzen führt, erfolgte hier keine Zugabe von Natriumacetat. Die ausgefallenen Nukleinsäuren konnten nun auf unterschiedliche Arten aus der Lösung gewonnen werden. Entweder konnten sie mit einer Pasteurpipette, welche in der Bunsenbrennerflamme geschmolzen und zu einem kleinen Häckchen geformt wurde, geangelt oder durch Zentrifugation (12000 x g, 10 min) sedimentiert werden. Schließlich wurden die Nukleinsäuren luftgetrocknet und in einem geeigneten Volumen H₂O oder TE-Puffer gelöst.

2.6.4.4. Dialyse von DNA-Lösungen

Die Dialyse wurde eingesetzt, wenn eine Plasmid-DNA-Lösung mit hoher Salzkonzentration für eine Transformation durch Elektroporation (2.7.1.2.) benutzt werden sollte. Hohe Salzkonzentrationen führen zu einer erhöhten Leitfähigkeit und somit während der Elektroporation zu einer höheren Stromdichte, was zum Misslingen der Transformation und sogar zu einem Funkenschlag führen kann.

Für die Dialyse wurde ein Nitrocellulose-Filterplättchen in eine mit Wasser gefüllte Petrischale gelegt und die DNA-Lösung vorsichtig darauf pipettiert. Nach etwa 30 min konnte die DNA-Lösung wieder abgenommen und in die Transformation eingesetzt werden.

2.6.4.5. Reinigung und Konzentrierung von DNA aus Lösungen mit molekularbiologischen Hilfsmitteln

Sowohl zur Reinigung von PCR-Produkten (2.6.14.2.; Entfernung von Oligodesoxynukleotiden, der Polymerase und nicht eingebauten dNTPs), Restriktionsverdauen (2.6.13.1.) oder Ligationen (2.6.13.3.), als auch zur Konzentrierung, zum Entsalzen oder zum Pufferaustausch von DNA-Lösungen wurden molekularbiologische "Kits" als Hilfsmittel benutzt.

Anwendung fanden der “DNA Clean & Concentrator™-5-Kit“, der auf einer Reinigung der DNA über eine reversible Bindung an einer Silica-Matrix beruht, und die “Microcon® YM-100 Centrifugal Units“, bei denen es sich um Filtereinheiten mit einer Cellulosemembran und einem speziellen Umkehrzentrifugationsverfahren handelt.

Die Durchführung erfolgte dabei jeweils nach den Angaben des Herstellers.

2.6.4.6. Reinigung von DNA aus Agarose-Gelen mit molekularbiologischen Hilfsmitteln

Um ein spezifisches DNA-Fragment aus einer Lösung mit mehreren verschiedenen DNA-Fragmenten zu reinigen, wurde die DNA-Lösung über ein nicht-denaturierendes Agarose-Gel (2.6.5.1.) fraktioniert und anschließend daraus gereinigt. So konnte etwa ein PCR-Produkt (2.6.14.2.) von unspezifischen Nebenprodukten befreit oder ein bestimmtes Fragment aus einem Restriktionsverdau (2.6.13.1.) gereinigt werden.

Dazu wurden die entsprechenden Ansätze zusammen mit einem Größenstandard auf ein nicht-denaturierendes 0,8 oder 2 %-iges Agarose-Gel (2.6.5.1.) aufgetragen, in Ethidiumbromid gefärbt (2.6.6.) und mit einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht. Hierfür wurde ein UV-Transilluminator mit einer Wellenlänge von 365 nm benutzt, um die DNA (welche ihr Hauptabsorptionsmaximum eigentlich bei einer Wellenlänge von 260 nm hat) nicht zu beschädigen. Das gewünschte Fragment konnte dann mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit dem “Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit“ gereinigt werden. Dabei wird die Agarose aufgeschmolzen und die freigesetzte DNA über eine reversible Bindung an einer Silica-Matrix gereinigt. Die Durchführung verlief den Angaben des Herstellers entsprechend.

2.6.4.7. Reinigung von radioaktiv markierter DNA mit molekularbiologischen Hilfsmitteln

Nach einer radioaktiven Markierung von DNA-Fragmenten (2.6.10) wurden “illustra™ MicroSpin G-25 Columns“ verwendet, um nicht eingebaute, radioaktiv markierte dNTPs zu entfernen. Dies geschah durch eine Gelfiltration an einer Sephadex-Matrix.

Dabei werden Moleküle (ab 100 Bp), welche größer sind als die Poren der Sephadex-Matrix, ausgegrenzt und deshalb zuerst eluiert. Kleinere Moleküle hingegen dringen in die Poren der Matrix ein und werden deshalb verzögert eluiert. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.6.5. Fraktionierung von Nukleinsäuren

2.6.5.1. Nicht-denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese werden DNA- oder RNA-Fragmente in einem elektrischen Feld ihrer Größe nach aufgetrennt. Bei den während der Elektrophorese vorherrschenden pH-Werten sind die Phosphatgruppen der Nukleinsäure-Moleküle negativ geladen und wandern deshalb zur Anode. Die Agarose ist elektrisch neutral und fungiert als Gelmatrix, durch die kleine Fragmente schneller wandern können als große (Sambrook und Russell, 2001).

Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente wurde eine Agarose-Konzentration von 0,8 % (w/v) (für Fragmente größer 1000 Bp) oder 2 % (w/v) (für Fragmente kleiner 1000 Bp) gewählt. Die Agarose wurde jeweils unter Erhitzen in 1 x TAE-Puffer (Tab. 43) gelöst, der gleichzeitig auch als Laufpuffer diente. Die aufgekochte Agarose wurde in horizontale Gelkammern (Gelgröße: 100 x 70 x 3 mm) gegossen. Die späteren Ladetaschen wurden dabei durch einen ins Gel eingebrachten Kamm ausgespart. Nach Polymerisation des Gels wurde dieses mit Laufpuffer überschichtet und mit den Proben, welche mit 0,2 Vol. Ladepuffer versetzt wurden, geladen. Der Ladepuffer wurde benutzt, um die Proben zu beschweren (durch das darin enthaltene Glycerin) sowie die Lauffront zu markieren (Bromphenolblau verhält sich in einem 0,8-2 %-igen (w/v) Agarose-Gel wie ein lineares Fragment von etwa 300 Bp und Xylencyanol FF wie eines von ca. 4000 Bp). Der Ladepuffer wurde entweder selbst hergestellt (Tab. 44) oder von der Fermentas GmbH, St. Leon-Rot ("6 x DNA Loading Dye" oder "6 x Orange Loading Dye" für DNA und "2 x RNA-Loading Dye" für RNA) bezogen. Die Elektrophorese wurde bei Raumtemperatur mit einer konstanten Spannung von 60-135 V durchgeführt und dauerte zwischen 30 min und 1 h. Abschließend wurde das Gel in einer Ethidiumbromidlösung gefärbt (2.6.6.).

Tab. 43: Herstellung von 50 x TAE-Stammlösung (Sambrook und Russell, 2001)

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|------------------|-------------------|---------------|
| Tris | 242 g | 2 M |
| Eisessig | 57 ml | 1 M |
| EDTA | 18,7 g | 50 mM |
| H ₂ O | <i>ad</i> 1000 ml | |
| pH 7,5 | | |

Tab. 44: Herstellung von 6 x Ladepuffer

| | | |
|------------------------------|------------------|---------|
| Tris | 0,12 g | 10 mM |
| Glycerin | 60 ml | 8,2 M |
| EDTA | 2,28 g | 60 mM |
| Bromphenolblau | 30 mg | 0,45 mM |
| Xylencyanol FF | 30 mg | 0,55 mM |
| H ₂ O | <i>ad</i> 100 ml | |
| pH 7,6 (mit HCl eingestellt) | | |

2.6.5.2. Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

Da das Laufverhalten von Nukleinsäurepolymeren im allgemeinen stark von ihrer Sekundärstruktur beeinflusst wird, erfolgte die elektrophoretische Auftrennung von RNA für Hybridisierungszwecke (2.6.11.) in denaturierenden, formaldehydhaltigen Agarose-Gelen.

Für die Herstellung eines 1 %-igen (w/v) Geles wurden 1,5 g Agarose in 108 ml Wasser durch 20-minütiges Autoklavieren gelöst. Nach dem Abkühlen auf etwa 60 °C wurde die Agaroselösung mit 27 ml 37 %-igem (v/v) Formaldehyd sowie 15 ml 10 x MAE-Puffer (Tab. 45) versetzt und in eine zuvor mit 0,1 M NaOH gewaschene Gelkammer (25 x 20 x 1 cm) gegossen. Die Polymerisation erfolgte über Nacht bei 4 °C.

Die Proben (ca. 10 µg RNA) wurden mit 0,5 Volumen "2 x RNA-Loading Dye" von der Fermentas GmbH versehen und für 10 min bei 70 °C inkubiert, um eventuelle Sekundärstrukturen zu lösen. Danach wurden die Proben auf Eis gestellt und vor dem Auftragen auf das Gel noch kurz zentrifugiert. Der verwendete Größenstandard wurde auf dieselbe Weise vorbereitet.

Der Gellauf erfolgte bei 4 °C in 1 x MAE-Puffer (Tab. 45) für etwa 5 h bei konstanten 90 V. Anschließend wurde das Gel in der Fotodokumentationsanlage zusammen mit einem angelegten Lineal fotografiert (Ethidiumbromid war bereits im Auftragspuffer enthalten), bevor der Transfer der RNA auf eine Nylonmembran (2.6.9.) sowie die Hybridisierung (2.6.11.) folgte.

Tab. 45: Herstellung von 10 x MAE-Puffer

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|------------------|-------------------|---------------|
| MOPS | 41,9 g | 200 mM |
| Natriumacetat | 4,1 ml | 50 mM |
| EDTA | 1,87 g | 50 mM |
| H ₂ O | <i>ad</i> 1000 ml | |
| pH 7,0 | | |

2.6.6. Färbung von Nukleinsäuren in Agarose-Gelen

Zu Färbung von DNA und RNA wurde Ethidiumbromid benutzt, da dieses in Nukleinsäuren interkalieren und anschließend zu Fluoreszenz im sichtbaren Bereich angeregt werden kann.

Die Anfärbung erfolgte nach der Agarose-Gelelektrophorese (2.6.5.1.) in einem Ethidiumbromid-Bad (15 µl einer 1 %-igen (w/v) Ethidiumbromidlösung in 200 ml 1 x TAE-Puffer (Tab. 43)) für 5-10 min. Nach Abwaschen des überschüssigen Ethidiumbromids konnten die Nukleinsäuren im Agarose-Gel auf einem UV-Transilluminator mit einer Wellenlänge von 265 nm sichtbar gemacht und mit Hilfe der Fotodokumentationsanlage fotografiert werden.

2.6.7. Größenbestimmung von Nukleinsäuren

Die Größenbestimmung von DNA-Fragmenten erfolgte im Agarose-Gel, indem neben den Spuren mit den Proben ein DNA-Größenstandard aufgetragen wurde. Alle verwendeten Größenstandards wurden von der Fermentas GmbH, St. Leon-Rot bezogen. Für DNA wurde, je nach Fragmentgröße, entweder der "GeneRuler™ DNA Ladder Mix" (Abb. 6a; 100-10000

Bp) oder der “GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder“ (Abb. 6b; 100-1000 Bp) und für RNA der “RiboRuler™ High Range RNA Ladder“ (Abb. 6c) benutzt.

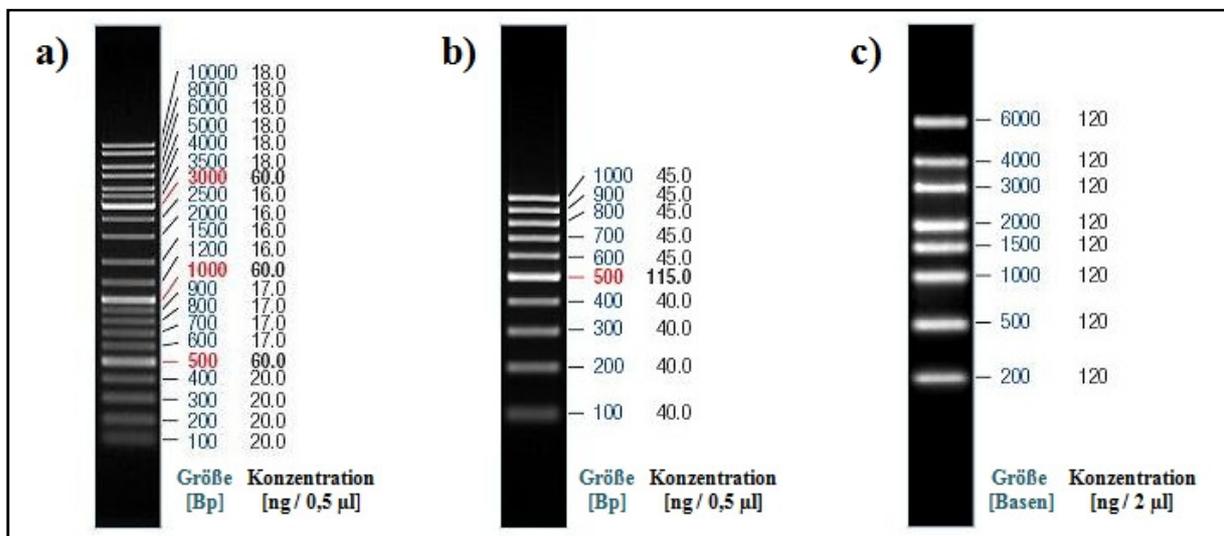


Abb. 6: Nukleinsäuren-Größenstandards (www.fermentas.com/):

- a) “GeneRuler™ DNA Ladder Mix“ (0,5 µl in einem 1 %-igem (w/v) Agarosegel)
- b) “GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder“ (0,5 µl in einem 1 %-igem (w/v) Agarosegel)
- c) “RiboRuler™ High Range RNA Ladder“ (2 µl in einem 1 %-igem (w/v) Agarosegel)

2.6.8. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

2.6.8.1. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren im Spektralphotometer

Da die aromatischen Ringe von Nukleinsäuren ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm besitzen, ist es möglich, DNA- oder RNA-Konzentration im Spektralphotometer zu bestimmen. Eine Extinktion von 1 entspricht bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50 µg/ml und bei RNA einer Konzentration von 40 µg/ml.

Zusätzlich ist es möglich, den Reinheitsgrad der Nukleinsäurelösungen über den Quotienten der Absorption bei 260 nm und der bei 280 nm abzuschätzen. Für reine Nukleinsäurelösungen liegt dieser Quotient zwischen 1,8 und 2 (bei DNA) bzw. zwischen 2 und 2,2 (bei RNA) (Sambrook und Russell, 2001).

Die Messung fand in einer 100- μ l-Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm und einer Verdünnung von 1:50 oder 1:25 statt.

2.6.8.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren im Agarose-Gel

Anhand des bei der Agarose-Gelelektrophorese benutzten Größenstandards (2.6.7.) ließ sich nicht nur die Größe, sondern auch die Konzentration der Nukleinsäure-Proben abschätzen. Dies erfolgte durch Vergleich der Intensität der Banden (Abb. 6).

2.6.9. Vakuumtransfer von RNA auf Nylonmembranen (“Northern Blot“)

Für die Übertragung von RNA aus einem denaturierenden Agarose-Gel (2.6.5.2.) auf eine Nylonmembran wurde das “Amersham VacuGene™ XL Vacuum Blotting System“ verwendet.

Dazu wurde die Trägerplatte der “Blotting“-Apparatur mit Wasser benetzt und darauf eine 0,2 μ m dicke “Biodyne® A Transfer Nylonmembran“ gelegt. Darüber kam eine Plastikmaske, deren Ränder knapp die Membran überlappten. Hierauf wurde das Agarose-Gel passgenau und luftblasenfrem positioniert und mit 5 x SSC-Puffer (Tab. 46) überschichtet (Abb. 7).

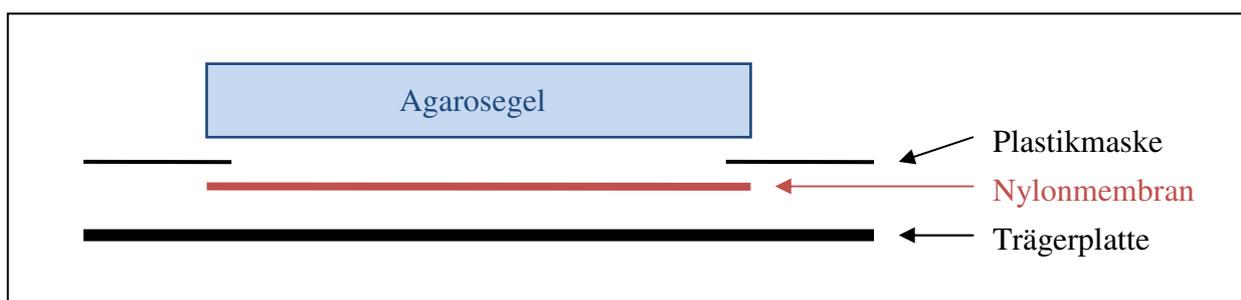


Abb. 7: Aufbau der “Blotting“-Apparatur

Durch Anlegen eines Unterdrucks von ca. 50 mbar für 2-3 h erfolgte der Transfer der RNA auf die Membran. Dabei wurde etwa alle 15 min frischer 5 x SSC-Puffer (Tab. 46) auf das Gel gegeben.

Der Transfer der RNA wurde durch Kontrolle des Geles in der Fotodokumentationsanlage bestätigt. Waren keine Banden mehr zu sehen, war der Transfer erfolgreich. Anschließend wurde die Membran luftgetrocknet und die RNA in einem "UV-Crosslinker" bei einer Wellenlänge von 254 nm und einer Energiedichte von 120 mJ/cm² kovalent an die Nylonmembran gebunden.

Tab. 46: Herstellung von 5 x SSC-Puffer (Thomas, 1980)

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|------------------------------------|-------------------|---------------|
| NaCl | 43,8 g | 750 mM |
| <i>tri</i> -Natriumcitrat Dihydrat | 22,1 g | 75 mM |
| H ₂ O | <i>ad</i> 1000 ml | |
| pH 11,5 | | |

2.6.10. Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Für eine Detektion von RNA (2.6.12.) wurden zuvor amplifizierte PCR-Produkte (2.6.14.2.) mit γ -ATP (GE Healthcare Europe GmbH, München) radioaktiv markiert und als DNA-Sonden benutzt. Dazu wurde der "HexaLabel™ Plus DNA Labeling Kit" verwendet. Hierbei werden die zu markierenden DNA-Fragmente mit Hexadesoxynukleotiden zufälliger Sequenz hybridisiert und in einer anschließenden Polymerasereaktion die radioaktiv markierten dNTPs eingebaut, welche dem Reaktionsansatz zugesetzt wurden.

Etwa 1 μ g der zu markierenden DNA wurde mit 10 μ l "Hexanucleotide in 5 x Reaction Buffer" und H₂O auf 50 μ l aufgefüllt, für 10 min bei 95 °C inkubiert und dann auf Eis gekühlt. Es folgte die Zugabe von 3 μ l "Mix A", 1 μ l "Klenow Fragment, exo" und 6 μ l [α -³²P] γ -ATP (50 μ Ci) und eine 10 minütige Inkubation bei 37 °C. Danach wurden 4 μ l "dNTP Mix" zugefügt. Nach einer weiteren Inkubation für 5 min bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 μ l einer 0,25 M EDTA-Lösung gestoppt.

Nicht gebundene Radioaktivität wurde anschließend abgetrennt (2.4.6.7.) und die markierten DNA-Sonden bei 4 °C gelagert und kurz vor dem Gebrauch für 15 min bei 95° C inkubiert.

2.6.11. Hybridisierung von RNA mit radioaktiv markierten DNA-Sonden

Die Hybridisierung von RNA mit radioaktiv markierten DNA-Sonden (2.6.10.) fand nach einer Methode von Thomas (1980) in modifizierter Form statt.

Die mit RNA beladene Nylonmembran (2.6.9.) wurde mit 20 ml Prähybridisierungslösung (Tab. 47) für 3 h bei 60 °C in einem Hybridisierungsröhrchen (Hybaid HB-OV-BM; Fischer Scientific GmbH, Schwerte) im Hybridisierungssofen inkubiert, um unspezifische Bindestellen zu blocken. Danach wurde die Prähybridisierungslösung gegen 10 ml frische Lösung zusammen mit der radioaktiv markierten DNA-Sonde ausgetauscht. Nach einer Inkubation bei 60 °C ÜN wurde die Nylonmembran je 2 x 5 min bei 60 °C mit 10 ml vorgewärmten Waschpuffer I (Tab. 48) und schließlich noch einmal mit 10 ml Waschpuffer II (Tab. 49) bei RT gespült. Anschließend wurde die Membran in Haushaltsfolie eingeschlagen und für die Detektion verwendet.

Tab. 47: Herstellung von Prähybridisierungslösung (Thomas, 1980)

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|-------------------------------------|-------|---------------|
| 5 x SSC-Puffer (Tab. 46) | 20 ml | 20 % (v/v) |
| Dextransulfat-Lösung (16,6 % (w/v)) | 60 ml | 60 % (v/v) |
| SDS (10 % (w/v)) | 10 ml | 40 mM |
| NaCl-Lösung (20 mM) | 10 ml | 2 mM |

Tab. 48: Herstellung von Waschpuffer I für die Hybridisierung (Thomas, 1980)

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|--------------------------|------------------|---------------|
| 5 x SSC-Puffer (Tab. 46) | 40 ml | 40 % (v/v) |
| SDS (10 % (w/v)) | 1 ml | 4 mM |
| H ₂ O | <i>ad</i> 100 ml | |

Tab. 49: Herstellung von Waschpuffer II für die Hybridisierung (Thomas, 1980)

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|--------------------------|------------------|---------------|
| 5 x SSC-Puffer (Tab. 46) | 2 ml | 2 % (v/v) |
| SDS (10 % (w/v)) | 1 ml | 4 mM |
| H ₂ O | <i>ad</i> 100 ml | |

2.6.12. Detektion radioaktiv markierter DNA-Sonden

Die Nylonmembran mit den hybridisierten radioaktiven DNA-Sonden (2.6.11.) wurde über Nacht zusammen mit einem Röntgenfilm in eine lichtundurchlässige Kassette gegeben und der Film schließlich in einer Dunkelkammer entwickelt und ausgewertet. Bei Bedarf konnte ein neuer Röntgenfilm eingelegt und je nach Signalstärke kürzer oder länger exponiert werden, wobei darauf zu achten war, dass die Signalstärke mit zunehmender Dauer abnimmt.

Trat ein zu starker Hintergrund durch unspezifische Hybridisierungssignale auf, so konnten die Hybridisierungs- bzw. Waschschrte unter stringenteren Bedingungen (etwa durch Erhöhung der Temperatur) durchgeführt werden.

2.6.13. Enzymatische Modifikation von DNA

2.6.13.1. Restriktionsspaltung von DNA

Die Sequenz-spezifische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen wurde zu analytischen und präparativen Zwecken durchgeführt.

Die Durchführung erfolgte dabei gemäß den Angaben des Herstellers in einem Volumen von 20-50 µl für mindestens 1 h, wobei pro µg DNA maximal 10 U des Restriktionsenzym eingesetzt wurden.

Es wurde immer der für das jeweilige Enzym optimale Puffer verwendet. Bei Restriktionsansätzen mit mehreren Enzymen wurde darauf geachtet, dass alle Enzyme in dem gemeinsamen Puffer eine Aktivität von mindestens 50-100 % hatten.

Ansonsten erfolgte zuerst eine Inkubation mit dem Enzym mit Aktivität im Puffer geringerer Salzkonzentration. Anschließend wurde die Salzkonzentration erhöht und die einfach geschnittene DNA für eine zweite Restriktion mit dem entsprechenden Enzym im Puffer mit höherer Salzkonzentration inkubiert. War auch dies nicht möglich, wurden einzelne Restriktionsverdau durchgeführt und die einfach geschnittene DNA dazwischen gereinigt (2.6.4.5.). Dieses Prinzip wurde auch angewendet, falls die Restriktionsenzyme unterschiedliche Inkubationstemperaturen für ihre Aktivität benötigten oder die Restriktionsschnittstellen für einen Doppelverdau zu nah zusammen lagen (www.fermentas.com/techinfo/re/ddpuc19mcs.htm), da die Enzyme jeweils einen bestimmten Nukleotidüberhang benötigen, um effizient schneiden zu können. Die optimalen Bedingungen und Puffer für Restriktionsverdau mit zwei Enzymen konnten auch auf der Internetseite des Herstellers abgefragt werden (www.fermentas.com/doubledigest/index.html).

Weiterhin war zu beachten, dass Glycerin in Konzentrationen von über 5 % (v/v) bei einigen Restriktionsendonukleasen zur sogenannten Stern-Aktivität ("Star Activity") führt, wodurch auch ähnliche Erkennungssequenzen geschnitten werden können und es somit zu einer unspezifischen Restriktion der DNA kommt (Nasri und Thomas, 1986). Da die Lagerungspuffer der Enzyme etwa 50 % (v/v) Glycerin enthalten, wurde den Ansätzen nie mehr als 0,1 Vol. Enzym zugesetzt.

Die Überprüfung der Restriktion fand mit Hilfe von nicht-denaturierender Agarose-Gelelektrophorese (2.6.5.1.) statt. Bei Bedarf konnten die meisten Restriktionsenzyme hitzeinaktiviert und die Restriktionsverdau bei -20 °C gelagert werden.

2.6.13.2. Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um bei einer Ligation (2.6.13.3.) das Religieren der Vektor-DNA zu verhindern, wurde nach dem Restriktionsverdau (2.6.13.1.) der Phosphatrest am 5'-Ende hydrolysiert.

Die Durchführung fand in einem Volumen von 30-50 µl nach den Angaben des Herstellers statt. Während die "Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)" sowie die "Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)" in denselben Puffern aktiv sind, in denen auch der Restriktionsverdau stattfand, wurde der Restriktionsansatz vor Benutzung der "Antarctic Phosphatase" gereinigt (2.6.4.5.).

Die dephosphorylierte DNA konnte sofort weiter verwendet oder bei -20 °C gelagert werden. Der Erfolg der Dephosphorylierung konnte überprüft werden, indem bei der Ligation (2.6.13.3.) ein zusätzlicher Ansatz erstellt wurde, welchem keine Insert-DNA zugegeben wurde. Durch die nachfolgende Transformation (2.7.1.) konnte dann die Anzahl an Religanten bestimmt werden.

2.6.13.3. Ligation von DNA-Fragmenten

Alle Ligationen von DNA-Fragmenten geschahen mit einer T4 -Ligase, welche ATP-abhängig doppelsträngige DNA-Moleküle durch die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen freien 3`-Hydroxyl- und freien 5`-Phosphat-Gruppen verknüpft (Weiß *et al.*, 1968).

Die Durchführung erfolgte jeweils in einem Volumen von 20 µl. Vektor- und Insert-DNA wurden in einem variablen Mengenverhältnis eingesetzt, wobei immer ein deutlicher Überschuss an Insert-DNA verwendet wurde. Nach einer mindestens einstündigen Ligation bei 22 °C folgte eine Inkubation für 15 min bei 65 °C, um das Enzym zu inaktivieren, was die Effizienz der anschließenden Transformation (2.7.1.) deutlich erhöht (Michelsen, 1995).

2.6.14. Amplifikation von DNA durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.6.14.1. Herstellung synthetischer Oligodesoxynukleotide

Für die Durchführung einer PCR wurden spezifische Oligodesoxynukleotide ("Primer") benötigt (2.4.; Tab. 12). Deren Herstellung erfolgte unter Beachtung bestimmter Parameter, um eine erfolgreiche PCR zu gewährleisten.

Die Länge der Oligodesoxynukleotide lag idealerweise bei 18-22 Nukleotiden. Für eine optimale Hybridisierung an die Ziel-DNA wurde darauf geachtet, dass der G+C-Gehalt der Oligodesoxynukleotide bei ca. 40-60 % und die daraus resultierende Schmelztemperatur (T_m) bei etwa 50-60 °C lagen. Zudem sollte es innerhalb eines Oligodesoxynukleotid-Paares keine großen Abweichungen dieser Parameter geben.

Am 3'-Ende der Oligodesoxynukleotide wurden mindestens 1-2 Guanin- oder Cytosin-Basen eingefügt. Diese sogenannte GC-Klammer ("GC-Glump") führt zu einer verbesserten Bindung an die Ziel-DNA. Weiterhin wurde darauf geachtet, dass die Oligodesoxynukleotid-Sequenzen möglichst wenige Wiederholungen aufwiesen, sodass sich keine internen Sekundärstrukturen oder Dimere bilden können. Darüber hinaus sollte die Stabilität des 5'-Endes höher als die des 3'-Endes sein, da ansonsten die Wahrscheinlichkeit falscher Bindungen erhöht wird.

Die Analyse der Oligodesoxynukleotide auf die angesprochenen Parameter erfolgte mit den Programmen "Clone Manager 7.11" (Scientific & Educational Software, Cary, NJ (USA)) und "OligoCalc" (www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html; Kibbe, 2007).

2.6.14.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von spezifischen DNA-Fragmenten erfolgte mit einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR; "Polymerase Chain Reaction"). Dabei handelt es sich um eine von Kary Mullis entwickelte Methode, für welche er 1993 mit dem Nobelpreis für Chemie geehrt wurde (Saiki *et al.*, 1985). In dieser Arbeit wurde die PCR zur Herstellung von DNA-Fragmenten für Klonierungen und DNA-Sonden für "Northern Blot"-Experimente sowie zum Nachweis von bestimmten Plasmiden und Organismen (anhand ihrer 16s rRNA-Gene) verwendet.

Im ersten Schritt der PCR wird der DNA-Doppelstrang der Matrize ("Template") und der Oligodesoxynukleotide ("Primer") durch Hitze denaturiert (Abb. 8). An die entstandenen Einzelstränge können daraufhin bei einer geeigneten Anlagerungstemperatur ("Annealing"-Temperatur) spezifische Oligodesoxynukleotide (2.6.14.1.) binden (Abb. 8). Anschließend kann eine DNA-Polymerase ausgehend vom 5'-Ende dieser kurzen doppelsträngigen Abschnitte die fehlenden Stränge mit dNTPs in 3'-Richtung auffüllen (Abb. 8). Nach dieser Elongationsphase erfolgt eine erneute Denaturierung und der Zyklus wird wiederholt, wobei die Anzahl der Zyklen n die Anzahl der Kopien (2^n) der zu amplifizierenden Sequenz bestimmt.

Die Durchführung der PCR erfolgte in einem Volumen von 25-50 μ l. Tab. 50 zeigt die Zusammensetzung eines typischen PCR-Ansatzes und Tab. 51 einen standardmäßigen Reaktionszyklus.

Tab. 50: Zusammensetzung einer Standard-PCR

| Zusammensetzung | Konzentration |
|--|---------------|
| Matrizen-DNA ("Template") | 0,1-1 µg |
| Oligodesoxynukleotid ("Primer") A (100 pM) | 2 pM |
| Oligodesoxynukleotid ("Primer") B (100 pM) | 2 pM |
| dNTP-Gemisch (10 mM) | 0,2 mM |
| Magnesiumchlorid (25 mM) | 1,5 mM |
| Polymerase | 1-2 U |
| Reaktionspuffer | |
| H ₂ O | |

Tab. 51: Programm einer Standard-PCR

| Schritt | Temperatur | Zeit | |
|------------------------------|------------------------|------------------------|-------------|
| Initiale Denaturierung | 95 °C | 5 min | |
| Denaturierung | 95 °C | 45 s | } 32 Zyklen |
| Hybridisierung ("Annealing") | variabel ¹⁾ | 45 s | |
| Elongation | 72 °C | variabel ²⁾ | |
| Finale Elongation | 72 °C | 5 min | |

¹⁾ Die Hybridisierungstemperatur richtete sich nach der berechneten Schmelztemperatur (T_m) der Oligodesoxynukleotide (2.6.14.1.). Die Hybridisierung erfolgte 5-10 °C unter der Schmelztemperatur.

²⁾ Die Elongationszeit richtete sich nach der Länge des zu amplifizierenden Fragmentes. Je 1000 Bp erfolgte 1 min Elongationszeit.

Als Matrize wurde entweder isolierte Plasmid-DNA (2.6.3. und 2.6.4.) oder Gesamt-DNA (2.6.1. und 2.6.2.) eingesetzt. Konnte bei einer PCR kein Produkt amplifiziert werden oder traten unspezifische Nebenprodukte auf, konnte die Hybridisierungstemperatur oder die Magnesiumionen-Konzentration variiert werden.

Je nach Anwendung wurden unterschiedliche Polymerasen verwendet. Während für analytische Arbeiten die "Taq-DNA-Polymerase" ausreichend war, wurde für präparative Zwecke die "Power Script DNA Polymerase Short" oder das "Failsafe™ PCR System" genutzt. Diese zeichnen sich im Gegensatz zur "Taq-DNA-Polymerase" durch eine 3'→5'-Exonukleasefunktion ("Proof Reading") aus, was zu einer geringeren Fehlerrate (1×10^{-5} gegenüber 1×10^{-4}) führt.

Ebenfalls Verwendung fanden die “illustra™ PuReTaq Ready-To-Go™ PCR Beads“. Hier liegt die *Taq*-DNA-Polymerase zusammen mit den dNTPs und Magnesiumchlorid als lyophilisiertes Kügelchen in einem Reaktionsgefäß vor. Es muss lediglich noch die Matrizen-DNA, das entsprechende Oligodesoxynukleotid-Paar und H₂O zugegeben sowie das Kügelchen vollständig gelöst werden.

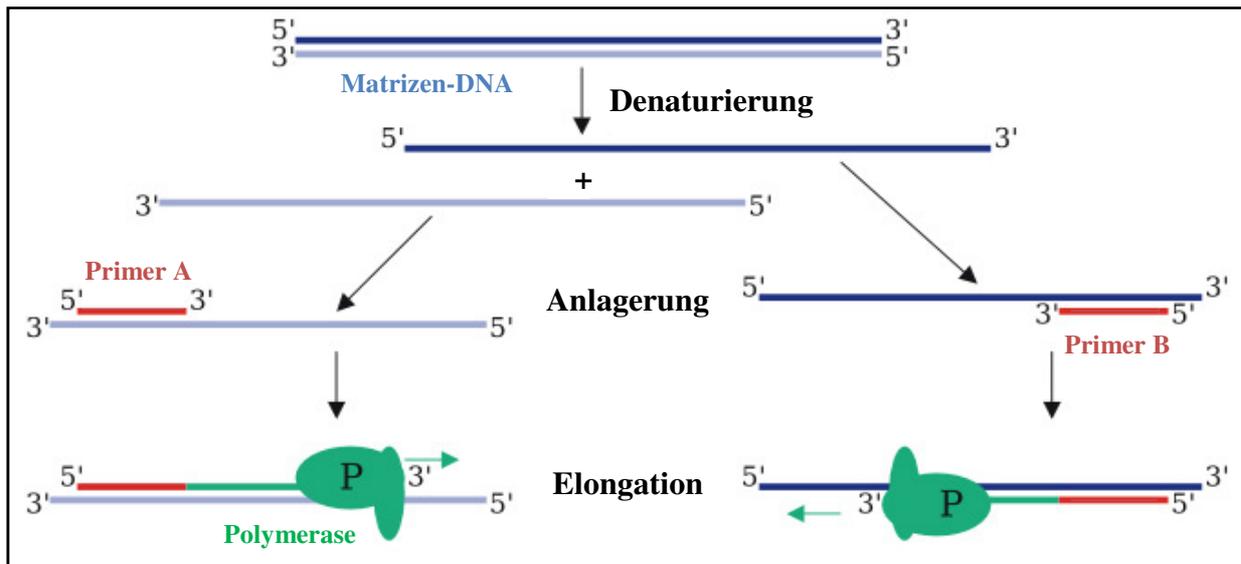


Abb. 8: Schematische Darstellung eines PCR-Zyklus

(http://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction; modifiziert)

2.6.14.3. Einfügen von Restriktionsschnittstellen

Um amplifizierte PCR-Fragmente in einer Klonierung einsetzen zu können, wurden diesen oft Erkennungssequenzen für ausgesuchte Restriktionsenzyme angefügt. Dies geschah mit Hilfe spezieller Oligodesoxynukleotide (2.4.), welche an den 3'-Enden zwar komplementär zur eingesetzten Matrizen-DNA waren, im 5'-Bereich jedoch einige Basen so verändert hatten, dass diese von spezifischen Restriktionsendonukleasen erkannt werden konnten. Aufgrund dieser nicht paarenden Sequenzbereiche wurde bei der PCR eine etwas niedrigere Hybridisierungstemperatur gewählt.

2.6.14.4. TA-Klonierung von PCR-Produkten

Bei schwierigen Klonierungen oder bei geringer PCR-Effizienz war es vorteilhaft, das PCR-Produkt ohne Restriktionsverdau direkt zu klonieren. Hierfür wurde das "QIAGEN PCR Cloning Kit" mit dem linearisierten Vektor pDrive, welcher an den 3'-Enden ungepaarte Thymidinbasen besitzt, verwendet. Viele DNA-Polymerasen erzeugen an den 5'-Enden überhängende Adeninbasen, welche nun direkt mit dem pDrive-Vektor ligiert werden können. Der Erfolg der Ligation kann zusätzlich über eine Blau-Weiß-Selektion (2.7.1.3.) überprüft werden.

Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. In die Ligation wurden ca. 100 ng gereinigtes PCR-Produkt eingesetzt und die Transformation erfolgte in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen (2.7.1.1.).

2.6.15. Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von hergestellten Plasmiden oder amplifizierten 16s rRNA-Genen erfolgte durch Eurofins MWG Operon, Ebersberg. Anhand der Sequenzierung sollte überprüft werden, ob das hergestellte Plasmid mutationsfrei vorliegt bzw. von welchem Organismus das 16s rRNA-Gen stammt.

Hierfür wurde ein passendes Oligodesoxynukleotid (2.6.14.1.) ausgewählt, von dem die Sequenzierung starten konnte. Dieses wurde zusammen mit der DNA-Probe an Eurofins MWG Operon, Ebersberg versandt. Die erhaltene Sequenz hatte in der Regel eine Länge von ungefähr 1000 Bp und konnte dann mit der Wunschsequenz (mit Hilfe des Programms "Clone Manager 7.11" (Scientific & Educational Software, Cary, NJ (USA)) bzw. mit der Datenbank "Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool (BLASTN)" (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?PAGE=Nucleotides&PROGRAM=blastn; McGinnis und Madden, 2004; Altschul *et al.*, 1990) verglichen werden.

Die Sequenzierung des Genoms von *C. ljungdahlii* wurde vom Göttingen Genomics Laboratory (Georg-August-Universität Göttingen) durchgeführt. Es wurde die Gesamt-DNA von *C. ljungdahlii* isoliert (2.6.3.2.) und anschließend an das Göttingen Genomics Laboratory versandt.

Dort wurde die DNA mit einem "Hydroshear" (Genomic Solutions[®] Inc., Ann Arbor, MI (USA)) in 2,5-kBp-Fragmente geschnitten und eine Genbank mit dem Vektor pCR4-TOPO (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) erstellt. Die Sequenzierung erfolgte nach Sanger *et al.* (1977) mit einem "3730-xl" (Applied Biosystems, Carlsbad, CA (USA)) sowie einem "MegaBACE 4000" (GE Healthcare Europe GmbH, München). Zusätzlich erfolgte eine Pyrosequenzierung mit einem "Genome Sequencer 20" (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). Einzelne Lücken wurden durch "Primer Walking" geschlossen. Die Assemblierung und Auswertung erfolgte mit "Phred" (www.phrap.org) sowie dem "Staden Software Package" (Staden *et al.*, 2000).

Die Sequenzierung der Inserts aus den Metagenombanken (2.6.16.) wurde ebenfalls vom Göttingen Genomics Laboratory übernommen (Knietsch *et al.*, 2003a; Waschkowitz, 2006).

2.6.16. Metagenombanken

2.6.16.1. Herstellung von Metagenombanken

Die Herstellung der Metagenombanken wurde von der Arbeitsgruppe von PD Dr. Rolf Daniel (Georg-August-Universität Göttingen) durchgeführt. Als Vektoren wurden pBluescript SK+ und pCR[®] 2.1-TOPO[®] und als Wirtstamm *E. coli* DH5 α verwendet (Knietsch *et al.*, 2003a; Waschkowitz, 2006).

2.6.16.2. Durchmusterung von Metagenombanken

Auch die Durchmusterung ("Screening") der hergestellten Metagenombanken (2.6.15.1.) erfolgte durch die Arbeitsgruppe von PD Dr. Rolf Daniel (Georg-August-Universität Göttingen). Es wurde ein auf Enzymaktivität basierendes Verfahren, der Aldehyd-Indikator-Plattentest, nach einer modifizierten Methode von Conway *et al.* (1987) angewendet. Als Wirtstamm wurde *E. coli* WL3 und als Substrat 1-Butanol verwendet (Knietsch *et al.*, 2003a; Waschkowitz, 2006). Die Inserts der Plasmide aus den positiven Klonen wurden anschließend sequenziert (2.6.15.).

2.7. Transfer von DNA in Bakterien

2.7.1. Transformation von *E. coli*

2.7.1.1. Transformation durch chemisch kompetente Zellen

Chemisch kompetente *E. coli*-Zellen zeichnen sich durch eine hohe Transformationseffizienz ($1-3 \times 10^9$ Transformanten/ μg pBR322 Plasmid-DNA; Inoue *et al.*, 1990) aus. Da eine Transformation selbst bei hohen Salzkonzentrationen oder Verunreinigungen der Plasmid-DNA noch möglich war, wurden Ligationen (2.6.13.3.) hauptsächlich in chemisch kompetente Zellen transformiert. Die Herstellung erfolgte nach Inoue *et al.* (1990) in modifizierter Form.

Dazu wurden 250 ml SOB-Medium (2.5.1.3.) mit einem entsprechenden *E. coli*-Stamm beimpft und unter leichtem Schütteln bis zu einer $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von 0,6-0,8 bei 18 °C kultiviert. Die Kultur wurde 10 min auf Eis gestellt und die Zellen zentrifugiert (3000 x g, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 80 ml eiskaltem PIPES-Puffer (Tab. 52) suspendiert. Die Zellen wurden nochmals für 10 min auf Eis inkubiert und nach einer erneuten Zentrifugation in 20 ml eiskaltem PIPES-Puffer aufgenommen. Danach wurde tropfenweise 1,5 ml DMSO (Endkonzentration: 7 % (v/v)) zugegeben. Nach einer weiteren 10-minütigen Inkubation auf Eis waren die Zellen kompetent. Sie wurden in 200- μl -Aliquots aufgeteilt und konnten entweder direkt benutzt oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für mehrere Monate bei -85 °C gelagert werden. Für die Transformation wurden sie dann auf Eis wieder aufgetaut.

Wurden von einem gewissen *E. coli*-Stamm nur einmalig kompetente Zellen benötigt, fand die Herstellung mit Hilfe einer simpleren Methode statt. Die kompetenten Zellen mussten allerdings innerhalb von einigen Stunden verwendet werden, da eine Lagerung nicht möglich war.

Hierfür wurde eine 5-ml-ÜN-Kultur des entsprechenden Rezipienten in 25 ml vorgewärmtes LB-Medium (2.5.1.1.) überführt und bei 37 °C bis zu einer $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von 0,6-0,8 kultiviert. Die Zellen wurden für 10 min auf Eis abgekühlt und anschließend zentrifugiert (3000 x g, 10 min, 4 °C).

Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 20 ml eiskalter 0,1 M Magnesiumchloridlösung suspendiert und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden in 10 ml eiskalter 0,1 M Calciumchloridlösung aufgenommen und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das Sediment schließlich in 1 ml eiskalter 0,1 M Calciumchloridlösung suspendiert. Die Zellen waren nun kompetent und wurden in 50- μ l-Aliquots aufgeteilt.

Für die Transformation wurde je ein Aliquot von kompetenten Zellen mit 20 μ l des Ligationsansatzes bzw. mit 100-400 ng des zu transformierenden Plasmides versetzt. Nach einer 30-minütigen Inkubation erfolgte ein Hitzeschock für 60 s bei 42 °C. Anschließend wurden die Zellen für 5-10 min auf Eis abgekühlt, mit 800 μ l SOC-Medium (2.5.1.4.) versetzt und für 45 min bei 37 °C regeneriert. Schließlich wurden die Zellen sedimentiert (6000 g, 1 min) und 600 μ l des Überstands verworfen. Die Zellen wurden im restlichen Medium resuspendiert und auf Selektivmedium ausplattiert.

Tab. 52: Herstellung von PIPES-Puffer

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|---------------------------|-----------|---------------|
| PIPES | 3,03 g | 10 mM |
| Calciumchlorid Dihydrat | 1,68 g | 15 mM |
| Kaliumchlorid | 18,64 g | 250 mM |
| Manganchlorid Tetrahydrat | 6,88 g | 55 mM |
| H ₂ O | ad 500 ml | |
| pH 6,7 | | |

PIPES und Calciumchlorid wurden getrennt von Kaliumchlorid und Manganchlorid autoklaviert und vor Gebrauch zusammengegeben.

2.7.1.2. Transformation durch Elektroporation

Die Transformation von *E. coli* durch Elektroporation ist ebenfalls sehr effizient (10^9 - 10^{10} Transformanten/ μ g pUC18 oder pBR322 Plasmid-DNA; Dower et al., 1988). Hohe Salzkonzentrationen oder Verunreinigungen der Plasmid-DNA führen jedoch zum Misslingen der Transformation. Deshalb war eine Dialyse (2.6.4.4.) der DNA nötig, falls Ligationen in elektrokompente Zellen transformiert werden sollten. Elektrokompente Zellen konnten relativ einfach und schnell nach einer Methode von Dower *et al.* (1988) in modifizierter Form hergestellt werden.

Hierfür wurde der entsprechende *E. coli*-Stamm in 250 ml LB-Medium (2.5.1.1.) bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,8 angezogen und anschließend für 20 min auf Eis abgekühlt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (4000 x g, 10 min, 4 °C) geerntet und das Sediment zweimal mit 250 ml eiskaltem H₂O gewaschen. Es erfolgten weitere Waschschrte mit 50 ml eiskaltem 10 % (v/v) Glycerin (Zentrifugation bei 5000 x g) und 30 ml eiskaltem 10 % (v/v) Glycerin (Zentrifugation bei 6000 x g). Die Zentrifugationsgeschwindigkeit musste mit jedem Waschschrte erhöht werden, da die Zellen mit sinkendem Salzgehalt immer schlechter sedimentierten. Das Sediment wurde schließlich in 1 ml 10 % (v/v) Glycerin aufgenommen und in 50-µl-Aliquots in Reaktionsgefäße überführt. Danach wurden die einzelnen Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und konnten bei -85 °C für mehrere Monate aufbewahrt werden.

Für die Transformation wurden die elektro-kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, mit 100-400 ng der Plasmid-DNA bzw. dem dialysierten Ligationsansatz versetzt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte bei einer Spannung von 2,5 kV, einem Widerstand von 600 Ω und einer Kapazität von 25 µF, wodurch eine Feldstärke von 12,5 kV/cm und eine Zeitkonstante von maximal 5,0 ms erreicht wurden. Nach der Elektroporation wurden die Zellen in 800 µl SOC-Medium (2.5.1.4.) aufgenommen und zur Regeneration 45 min bei 37 °C inkubiert. Schließlich wurden die Zellen zentrifugiert (6000 g, 1 min) und 600 µl des Überstands abgenommen. Die Zellen wurden resuspendiert und auf Selektivmedium ausplattiert.

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

Durch Blau-Weiß-Selektion können rekombinante *E. coli*-Klone auf Insertionen in die multiple Klonierungsstelle des transformierten Vektors überprüft werden.

Allerdings sind dafür nicht alle verwendeten Stämme und Vektoren geeignet, da das Testprinzip darauf beruht, dass die *E. coli*-Stämme aufgrund der chromosomal lokalisierten Deletion *lacI^fZΔM15* keine funktionsfähige β-Galactosidase bilden können. Dieser Defekt kann durch einen plasmidkodierten Genort (*lacPOZ'*) ausgeglichen werden. Ist dieser allerdings in der multiplen Klonierungsstelle des Vektors lokalisiert, so kann ein inserierendes Fragment das Gen inaktivieren, sodass keine funktionierende β-Galactosidase mehr entsteht.

Dies kann durch Zugabe des Substratanalogons X-Gal überprüft werden. Ist eine aktive β -Galactosidase vorhanden, wird X-Gal zu Galactose und 5-Brom-4-Chlor-Indoxyl hydrolysiert, welches wiederum vom Luftsauerstoff zu einem blauen Farbstoff oxidiert wird, der die Kolonien anfärbt.

Eine Blau-Weiß-Selektion war mit den *E. coli*-Stämmen DH5 α , JM109, SURE[®], XL1-Blue, XL1-Blue MRF' und XL2-Blue sowie den Vektoren pBluescript SK+, pCR[®]2.1-TOPO[®], pDrive, pUC18 und pUC19 möglich. Für die Durchführung des Tests wurden Selektiv-Agarplatten, wie in 2.5.2.3. beschrieben, vorbereitet.

2.7.2. Transformation von Clostridien

2.7.2.1. Methylierung von Plasmid-DNA

Clostridien verfügen über sequenzspezifische Restriktionssysteme durch Endonukleasen. Diese sorgen dafür, dass fremde DNA degradiert wird. Ungeschützte Plasmid-DNA würde deshalb unmittelbar nach der Transformation wieder abgebaut werden.

Aus diesem Grund wurde eine Methyltransferase aus dem *Bacillus subtilis*-Phagen Φ 3T I (Tran-Betcke *et al.*, 1986; Noyer-Weidner *et al.*, 1985, Noyer-Weidner *et al.*, 1983) verwendet, um die Plasmid-DNA zu schützen. Die Methyltransferase kann die Sequenzen 5'-GGCC-3' und 5'-GCNGC-3' am innengelegenen Cytosin methylieren (Balganesh *et al.*, 1987). Dadurch können clostridielle Restriktionsendonukleasen, welche genau diese Sequenzen erkennen (Mermelstein und Papoutsakis, 1993), nicht mehr schneiden. Während diese Sequenzen in clostridieller DNA nur selten vorkommen, sind sie häufig in Plasmiden zu finden, welche für *E. coli* verwendet werden (Mermelstein und Papoutsakis, 1993).

Die Methylierung der Plasmid-DNA erfolgte *in vivo* in *E. coli*. Dazu wurden die Stämme ER2275, XL1-Blue MRF' oder SURE[®] verwendet, da diese die Restriktionssysteme McrA, McrBC und Mrr nicht besitzen, welche DNA schneiden, bei der das Cytosin der Sequenz 5'-CG-3' methyliert ist (Kelleher und Raleigh, 1991). Die Expression der Methyltransferase erfolgte von einem zusätzlichen Plasmid mit einem alternativen Replikationsursprung (pACYC184/p15A *ori*). Es wurden die Plasmide pAN1 (Cm^r) und pANS1 (Sp^r) verwendet, welche sich durch ihre Resistenzgene unterscheiden.

Da diese Plasmide in Clostridien nicht replizieren können, mussten sie nicht extra aus den Plasmid-Präparationen entfernt werden. Die Methylierung konnte durch einem Restriktionsverdau (2.6.13.1.) mit den Enzymen *Bsu*RI (Erkennungssequenz: 5'-GG*CC-3') oder *Sat*I (Erkennungssequenz: 5'-GC*NGC-3') überprüft werden.

2.7.2.2. Transformation durch Elektroporation

Sowohl für *C. ljungdahlii* als auch für *C. carboxidivorans* ist bisher keine Transformationsmethode etabliert. Deshalb wurden verschiedene Transformationsprotokolle (Tab. 53), welche hauptsächlich für andere Clostridien bzw. Acetogene entwickelt wurden, getestet. Diese wurden entsprechend des Wachstums von *C. ljungdahlii* bzw. *C. carboxidivorans* modifiziert. Zudem wurden verschiedene Parameter variiert (Tab. 54). Die Kultivierung von *C. ljungdahlii* erfolgte in ATCC-Medium 1754 mit Fructose (2.5.1.8.) und von *C. carboxidivorans* in Wilkins-Chalgren-Medium (2.5.1.7.). Die Herstellung der kompetenten Zellen wurde in der Anaerobenkammer durchgeführt. Für die Transformation wurden die Plasmide pIMP1 und pSOBP_{ptb} verwendet, welche jeweils methyliert vorlagen (2.7.2.1.). Die Regeneration der Zellen erfolgte solange, bis die OD_{600nm} der entsprechenden Kultur wieder zunahm. Die Zellen wurden anschließend sowohl auf festem als auch auf flüssigem Selektivmedium kultiviert.

Tab. 53: Getestete Transformationsprotokolle

| Organismus | Referenz |
|---|------------------------------------|
| <i>Acetobacterium woodii</i> | Strätz et al., 1994 |
| <i>C. acetobutylicum</i> | Mermelstein et al., 1992 |
| <i>C. acetobutylicum</i> | Nakotte et al., 1998 |
| <i>C. acetobutylicum</i> | Tyurin et al., 2000 |
| <i>C. beijerinckii</i> | Birrer et al., 1994 |
| <i>C. cellolyticum</i> | Jennert et al., 2000 |
| <i>C. perfringens</i> | Scott und Rodd, 1989 |
| <i>C. perfringens</i> | Allen und Blaschek, 1988 |
| <i>C. thermocellum</i> | Tyurin et al., 2004 |
| <i>C. tyrobutyricum</i> | Zhu et al., 2005; Liu et al., 2006 |
| <i>Propionibacterium freudenreichii</i> | Jore et al., 2001 |

Tab. 54: Wachstumsbedingungen und Parameter für die Transformation

| Parameter | Variationen |
|--|--|
| Medienzusatz ¹⁾ (um die Zellwand zu "schwächen") | kein Zusatz Glycin (50-100 mM) DL-Threonin (20-100 mM) Isoniazid (20 µg/ml) Lysostaphin (0,5-2 U/ml) |
| Wachstumsphase | 0,25-0,8 (frühe bis mittlere exponentielle Phase) |
| Elektroporationspuffer | Saccharose 270-500 mM ETB-Puffer 270 mM Saccharose, 5 mM Natriumphosphat; pH 7,4 ETM-Puffer 270 mM Saccharose, 5 mM Natriumphosphat, 10 mM MgCl ₂ ; pH 6 HEB-Puffer 270 mM Saccharose, 7 mM HEPES, 1 mM MgCl ₂ ; pH 7,3 SMP-Puffer 270 mM Saccharose, 7 mM Natriumphosphat, 1 mM MgCl ₂ ; pH 7,4 |
| Elektroporationsküvette | 0,2 oder 0,4 mm Elektrodenabstand |
| Spannung | 1,5, 1,8, 2 oder 2,5 kV |
| Widerstand | 100, 200, 400 oder 600 Ω |
| Kapazität | 25 oder 50 µF |
| Kühlung | mit oder ohne Kühlung der Zellen nach der Transformation |

¹⁾ zu Beginn oder während der frühen logarithmischen Wachstumsphase

Während alle Versuche, *C. carboxidivorans* zu transformieren scheiterten, gelang die Transformation von *C. ljungdahlii* schließlich nach einem modifizierten Protokoll für *C. tyrobutyricum* (Zhu *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006).

Hierfür wurde eine Kultur von *C. ljungdahlii* in 50 ml ATCC-Medium 1754 mit Fructose (2.5.1.8.) an 2-3 aufeinanderfolgenden Tagen jeweils einmal in frisches Medium inokuliert. Anschließend wurde diese Kultur benutzt um 50 ml frisches Medium, welchem 40 mM DL-Threonin zugesetzt wurden, zu beimpfen ($OD_{600nm} \sim 0,05-0,1$). Nach Wachstum über Nacht (12-15 h; $OD_{600nm} \sim 0,3-0,7$) wurde die Kultur in die Anaerobenkammer eingeschleust, zentrifugiert (10 min, 6000 x g, 4 °C) und zweimal mit eiskaltem SMP-Puffer (Tab. 55) gewaschen. Das Sediment wurde schließlich in 0,6 ml SMP-Puffer (Tab. 55) aufgenommen und in eine gekühlte Elektroporationsküvette mit einem Elektrodenabstand von 0,4 cm überführt, in welcher bereits 0,1-1,5 µg methylierte Plasmid-DNA (2.7.2.1.) vorgelegt waren. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei 4 °C erfolgte die Transformation bei einer Spannung von 2,5 kV, einem Widerstand von 600 Ω und einer Kapazität von 25 µF. Sofort darauf wurden die Zellen in ein Hungate-Röhrchen mit 5 ml vorgewärmtem Medium überführt und solange bei 37 °C kultiviert, bis ein deutliches Wachstum, welches im Spektralphotometer für Hungate-Röhrchen verfolgt wurde, erkennbar war. Schließlich wurden verschiedene Volumina dieser Kultur in 5 ml vorgewärmtes Selektivmedium inokuliert (0,5-1 ml Aliquots) bzw. auf Selektivmedium ausplattiert (200 µl Aliquots).

Für die Arbeiten in der Anaerobenkammer wurden ausschließlich sterile, gestopfte Spitzen verwendet. Um einen Gasaustausch der Zentrifugenröhrchen und Elektroporationsküvetten (in der gasdurchlässigen Verpackung) zu ermöglichen, wurden diese bereits zuvor eingeschleust. Die Kühlung der Zentrifugenröhrchen und Elektroporationsküvetten erfolgte in speziell angefertigten Kühlblöcken aus Metall. Zudem wurde darauf geachtet, dass die Plasmid-DNA-Lösungen keine hohen Salzkonzentrationen enthielten bzw. vorher dialysiert wurden (2.6.4.4.). Dies konnte überprüft werden, indem der Widerstand der Lösung vor der Elektroporation mit Hilfe des Elektroporationsgerätes bestimmt wurde.

Tab. 55: Herstellung von SMP-Puffer (Zhu *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006)

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|-------------------------------------|------------------|---------------|
| D-(+)-Saccharose | 46,2 g | 270 mM |
| Magnesiumchlorid Hexahydrat | 0,1 g | 1 mM |
| <i>di</i> -Natriumphosphat Dihydrat | 0,62 g | 7 mM |
| H ₂ O | <i>ad</i> 500 ml | |
| pH 7,4 | | |

2.7.2.3. Transformation durch Konjugation

Parallel zur Transformation durch Elektroporation wurde auch versucht, *C. ljungdahlii* durch Konjugation nach einer Methode von Purdy *et al.* (2002) zu transformieren, was jedoch erfolglos war.

Es wurde der *E. coli*-Donorstamm CA434, der das zu übertragende Plasmid (entweder pIMPoriTori2 oder pMTL007) enthielt, in 5 ml LB-Medium (2.5.1.1.) über Nacht angezogen. Anschließend wurde ein 1-ml-Aliquot davon in der Anaerobenkammer zentrifugiert (12000 x g, 1 min) und das Zellsediment vorsichtig (um ein Abscheren der konjugativen Pili zu verhindern) in 1 ml sterilem, anaeroben PBS-Puffer (Tab. 56) gelöst. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert und das Sediment in 200 µl einer *C. ljungdahlii*-Kultur, welche etwa 24 h in ATCC-Medium 1754 mit Fructose (2.5.1.8.) gewachsen war, suspendiert. Von dieser Suspension wurden 10-µl-Aliquots auf eine gut getrocknete Agarplatte (ATCC-Medium 1754 mit Fructose) verteilt und für mindestens 7 h Stunden oder über Nacht bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen 2-3-mal mit 0,5 ml sterilem PBS-Puffer von der Agarplatte geschwemmt. Dieses Konjugationsgemisch wurde zentrifugiert (12000 x g, 1 min), der Überstand bis auf 200 µl abgenommen, das Sediment darin resuspendiert und auf Selektivmedium ausplattiert. Die Selektion gegen *E. coli* erfolgte mit Colistin, welches in der verwendeten Arbeitskonzentration unwirksam gegen Clostridien ist, *E. coli* jedoch hemmt.

Tab. 56: Herstellung von PBS-Puffer (Purdy *et al.*, 2002)

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|---|-------------------|---------------|
| Kaliumdihydrogenphosphat wasserfrei | 0,2 g | 1,5 mM |
| <i>di</i> -Natriumhydrogenphosphat Dodecahydrat | 1,5 g | 4,2 mM |
| Natriumchlorid | 8 g | 137 mM |
| Kaliumchlorid | 0,2 g | 2,7 mM |
| H ₂ O | <i>ad</i> 1000 ml | |
| pH 7,4 | | |

2.8. Arbeiten mit Proteinen

2.8.1. Herstellung von Protein-Rohextrakten

Die Herstellung von Protein-Rohextrakten fand durch Zellaufschluss mit einer “FRENCH[®] Pressure Cell Press“ statt. Dabei handelt es sich um ein mechanisches Verfahren, bei dem die Zellen mit hohem Druck durch ein Ventil gepresst und somit zerrissen werden.

Die Zellanzucht fand in der Regel in einem Volumen von 500 ml statt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (6000 x g, 10 min, 4 °C) geerntet, zweimal mit Tris-HCl (0,1 M und gewünschtem pH Wert) gewaschen und das Sediment anschließend in 5-20 ml Tris-HCl aufgenommen. Diese Suspension wurde entweder bei -85 °C bis zum Zellaufschluss gelagert oder sofort aufgeschlossen. Der Zellaufschluss erfolgte in einer vorgekühlten “FRENCH[®] Pressure Cell“. Je nach Volumen wurde eine 4-ml- oder eine 35-ml-Zelle verwendet. Auf die 4-ml-Zelle wurde ein hydraulischer Druck von 6 MPa und auf die 35-ml-Zelle von 12 MPa angelegt, was einem Arbeitsdruck von 150 bzw. 300 MPa entsprach. Die Zellen wurden schließlich durch vorsichtiges Öffnen des Ventils und die langsame Entnahme der Zellsuspension aufgeschlossen. Die Vollständigkeit des Aufschlusses wurde mikroskopisch verfolgt, wobei bis zum vollständigen Aufschluss von *E. coli* zumeist 2-3 Durchgänge erforderlich waren. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (15000 x g, 30 min, 4 °C) oder Ultrazentrifugation (150000 x g, 1-2 h, 4 °C) abgetrennt.

2.8.2. Heterologe Überproduktion plasmidkodierter Proteine in *E. coli*

Die heterologe Überproduktion plasmidkodierter Proteine in *E. coli* erfolgte entweder durch Verwendung des pET- (Merck KGaA, Darmstadt; 2.8.2.1.) oder des pQE- (QIAGEN GmbH, Hilden; 2.8.2.2.) Expressionssystems. Beide Expressionssysteme ermöglichen darüber hinaus die C- oder N-terminale Fusion einer Sequenz aus 6 Histidinen (“His-Tag“) mit den rekombinanten Proteinen, um diese später reinigen zu können (2.8.3.1.).

2.8.2.1. pET-Expressionssystem

Das pET-Expressionssystem zeichnet sich durch eine sehr starke, induzierbare Expression des Ziel-Genes sowie die Möglichkeit zur Fusionierung eines C-terminalen "His-Tags" (bei pET-29a(+)) aus. Ein weiterer Vorteil ist die geringe Hintergrundexpression durch das Zusammenwirken des pET-Expressionsvektors und des Expressionsstamms *E. coli* BL21 (DE3). Der für die Expression verwendete T7lac-Promoter ist abhängig von der RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7, deren Gen auf dem Chromosom von *E. coli* BL21 (DE3) eingebracht wurde und dort unter der Kontrolle des *lacUV5*-Promoters steht, welcher wiederum durch IPTG induziert werden kann.

Sowohl der T7lac- als auch der *lacUV5*-Promoter besitzen eine *lac*-Operator-Sequenz (*lac o*). Zusätzlich zur Kopie auf dem Chromosom von *E. coli* befindet sich auch auf dem Vektor stromabwärts des T7lac-Promoters das Gen für den *lac*-Repressor (*lacI*). In Abwesenheit von IPTG wird der *lac*-Repressor konstitutiv exprimiert und verhindert somit durch Bindung an die *lac*-Operator-Sequenz sowohl die Expression des T7lac-Promoters, als auch die Bildung der T7 RNA-Polymerase (Abb. 9; Dubendorff und Studier, 1991; Studier *et al.*, 1990).

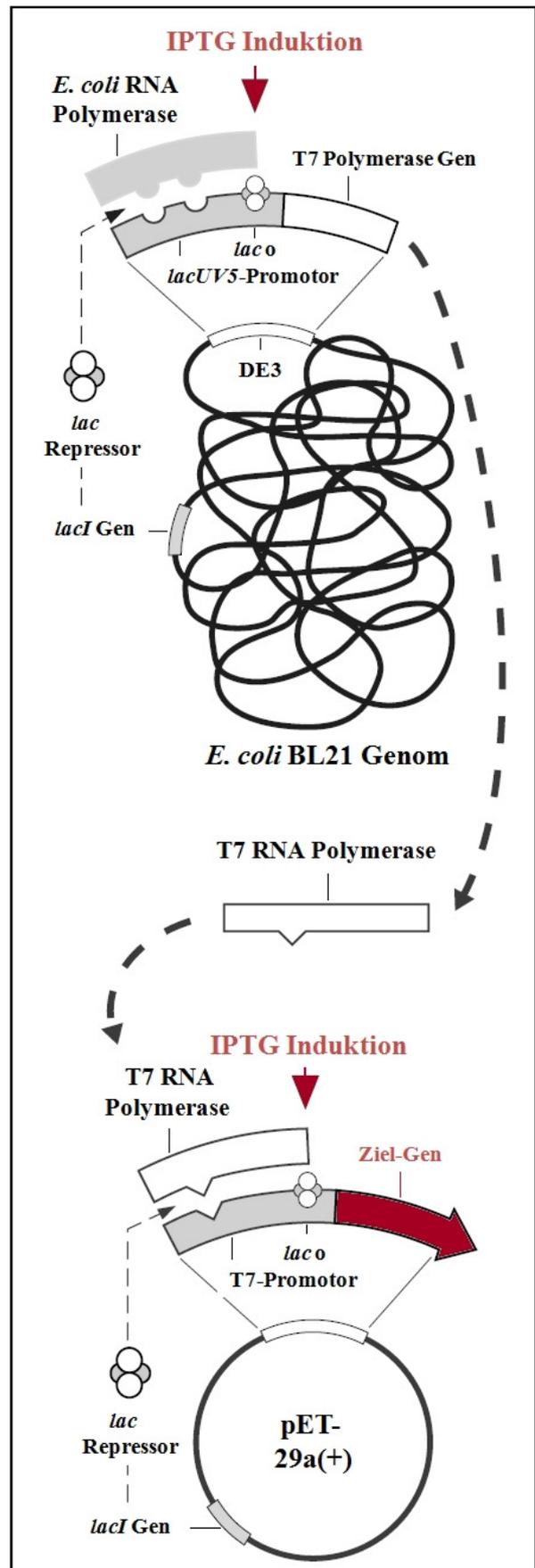


Abb. 9: Das pET-Expressionssystem (pET System Manual, 11th Edition; modifiziert)

Das entsprechende Ziel-Gen wurde mit einer, über eine PCR (2.6.14) anstelle des Startcodons eingebauten *NdeI*-Restriktionsschnittstelle so in den pET 29a(+)-Vektor kloniert, dass es unter Kontrolle des *T7lac*-Promoters steht. Zusätzlich wurde eine zweite Restriktionsschnittstelle (*XhoI*, *NotI* bzw. *HindIII*) anstelle des Stoppcodons eingebaut, um das Gen mit einer 3'-"His-Tag"-Sequenz zu fusionieren.

Die Überexpression erfolgte in 500 ml TB-Medium (2.5.1.2.). Bei Erreichen einer OD_{600nm} von 0,6-0,8 wurde IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben. Eine halbe Stunde später konnte optional Rifampicin zugegeben werden, welches nur auf die *E. coli*-RNA-Polymerase und nicht auf die T7 RNA-Polymerase, die zu diesem Zeitpunkt schon in genügendem Ausmaß gebildet worden sein sollte, wirkt. Etwa 4 h nach der Induktion mit IPTG wurden die Zellen geerntet und ein Protein-Rohextrakt erstellt (2.8.1.). Das überproduzierte Protein konnte anschließend aus dem Rohextrakt über die "His-Tag"-Sequenz gereinigt werden (2.8.3.1.).

2.8.2.2. pQE-Expressionssystem

Das pQE-Expressionssystem basiert auf einem starken, induzierbaren Promoter des Phagen T5 (Gentz und Bujard, 1985), welcher von der *E. coli* RNA-Polymerase erkannt werden kann, in Verbindung mit einer synthetischen Ribosomenbindungsstelle, welche für hohe Translationsraten sorgt. Der T5-Promoter enthält zwei *lac*-Operator-Sequenzen, um eine verstärkte Bindung des *lac*-Repressors zu gewährleisten. Zusätzlich trägt der Expressionsstamm *E. coli* M15 das Plasmid pREP4, welches das Gen für den *lac*-Repressor (*lacI*) enthält, um eine kontrollierte Expression des Ziel-Gens zu gewährleisten. Dies ist nötig, da die Genexpression aufgrund der optimierten Promoter-Operator-Region sehr effizient ist und nur in Gegenwart hoher *lac*-Repressorkonzentrationen wirksam reprimiert werden kann. Die Expression des Ziel-Gens kann schließlich durch Zugabe von IPTG induziert werden. Darüber hinaus bietet das pQE-Expressionssystem die Möglichkeit zur Fusionierung eines N-terminalen "His-Tags" (bei pQE-30).

Das entsprechende Ziel-Gen wurde mit einer PCR (2.6.14.) amplifiziert, wobei Start- und Stoppcodon durch Restriktionsschnittstellen (*BamHI* bzw. *PaeI* und *HindIII* bzw. *PstI*) ersetzt wurden, über welche dann die Klonierung in den Vektor pQE-30 erfolgte. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die Klonierung des Ziel-Gens im Leserahmen zum neuen Startcodon und der 5'-"His-Tag"-Sequenz auf dem Vektor erfolgte.

Die Überexpression erfolgte analog zum pET-Expressionssystem (2.8.2.1.), jedoch ohne die optionale Zugabe von Rifampicin.

2.8.3. Reinigung von Proteinen

2.8.3.1. Affinitätschromatographie an Nickel-Nitrilotriessigsäure

Über Affinitätschromatographie an Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarose war es möglich, überproduzierte Proteine (2.8.2.), welche mit einem C- oder N-terminalen "His-Tag" fusioniert waren, aus Rohextrakten (2.8.1.) zu reinigen. Die an die Gelmatrix gebundene Nitrilotriessigsäure besetzt dabei 4 der 6 Koordinationsstellen eines Ni^{2+} -Ions sehr stabil (Hochuli, 1989). An die beiden freien Koordinationsstellen können nun hoch affin zwei benachbarte Histidin-Reste eines Proteins binden (Abb. 10). Diese Bindung ist umso stärker, je mehr benachbarte Histidine in einem Protein enthalten sind. Deshalb werden bevorzugt Proteine gebunden, welche mit einem "His-Tag", also einer Sequenz aus 6 aufeinanderfolgenden Histidinen, fusioniert sind. Durch das Histidin-Strukturanalogon Imidazol können die "His-Tag"-fusionierten Proteine anschließend wieder von der Agarose eluiert werden (Janknecht *et al.*, 1991; Schmitte *et al.*, 1993).

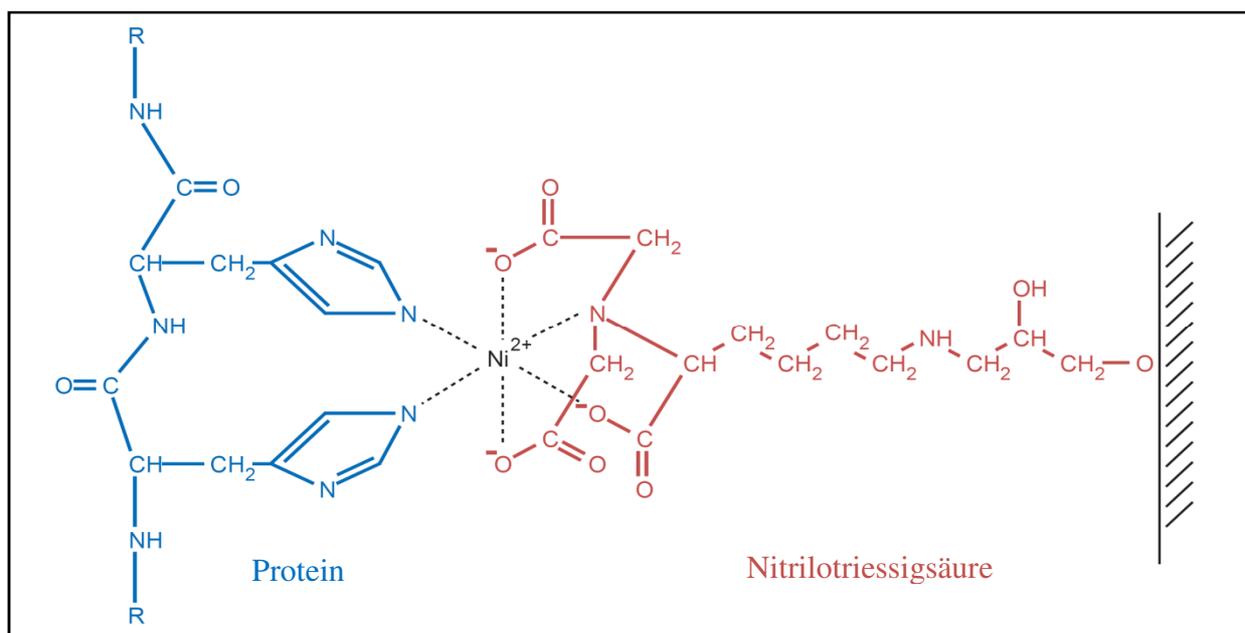


Abb. 10: Affinitätschromatographie an Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarose
(The QIAexpressionist™, 5th Edition; modifiziert)

Hierfür wurde 1 ml Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarose in eine leere 10-ml-Plastiksäule, die gegen das Auslaufen des Säulenmaterials mit einem Filterplättchen gesichert war, gegeben und mit 30 ml 10 mM Imidazol-Puffer (Tab. 57) äquilibriert. Danach wurde der Rohextrakt (2.8.1.) auf die nun verschlossene Säule gegeben und unter wiederholtem Mischen für 30-60 min bei 4 °C inkubiert. Durch Öffnen der Säule wurde der Rohextrakt abgelassen und anschließend mit 30 ml 20-50 mM Imidazol-Puffer (Tab. 57) gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine von der Säule zu lösen. Bei spezifischen Bindungen geschieht die Verdrängung der Proteine erst bei Konzentrationen ab etwa 75 mM Imidazol. Die Elution der Proteine erfolgte durch Zugabe von je 1 ml Imidazol-Puffer (Tab. 57) mit aufsteigenden Imidazol-Konzentrationen zwischen 75-250 mM. Die Säule konnte für die Reinigung des gleichen Proteins wiederverwendet werden. Dazu wurde sie mit 20 ml 250 mM Imidazolpuffer gewaschen und bis zur nächsten Verwendung mit 20 %-igem (v/v) Ethanol überschichtet und bei 4 °C gelagert.

Tab. 57: Herstellung von Imidazol-Puffer

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|--------------------------------------|------------|---------------|
| Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat | 6,9 g | 50 mM |
| Natriumchlorid | 17,54 g | 300 mM |
| Imidazol | 0,68-17 g | 10-250 mM |
| H ₂ O | ad 1000 ml | |
| pH 8,0 | | |

Die Reinigung über Affinitätschromatographie an Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarose konnte auch mit den HIS-Select[®] Spin Columns oder dem His-Spin Protein Miniprep[™] Kit erfolgen. Diese hatten zwar eine niedrigere maximale Protein-Ausbeute, stellten dafür aber eine zeitsparende Alternative dar und eigneten sich vor allem für die parallele Reinigung mehrerer Proteine. Die Durchführung verlief gemäß den Angaben der Hersteller mit einem zusätzlichen Elutionsschritt.

Bei der Reinigung der potentiellen Butanol-Dehydrogenasen wurde den Puffern eine Spurenelement-Lösung bzw. eine Lösung mit dem jeweiligen Co-Faktor zugegeben. Die Kontrolle der Eluate der Affinitätschromatographie erfolgte in einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel (2.8.7.1.). Das Imidazol konnte entweder durch Dialyse (2.8.4.1.) oder mit Hilfe von molekularbiologischen "Kits" (2.8.4.2.) abgetrennt werden.

2.8.3.2. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC; "High Performance Liquid Chromatography") mit einem "ÄKTApurifier™" konnten Proteine aus Rohextrakten (2.8.1.) gereinigt sowie anhand ihres Molekulargewichts getrennt werden.

Die Reinigung von Proteinen erfolgte über Ionenaustausch-Chromatographie. Hierfür wurden die starken Anionenaustausch-Säulen "HiTrap™ Q Sepharose XL" und "Mono Q™ 5/50 GL", sowie die starke Kationenaustausch-Säule "HiTrap™ SP Sepharose XL" verwendet. Alle Säulen hatten ein Bettvolumen von 1 ml und stammen von der GE Healthcare Europe GmbH, München. Die Reinigung fand über einen Salz-Gradienten (1 M Natriumchlorid) in 0,05 M Phosphatpuffer bei einem pH von 6,5 oder 7,5 mit einer Durchflußrate von 1 ml/min statt.

Die Trennung anhand des Molekulargewichtes wurde über Ausschluss-Chromatographie an einer "HiLoad 16/60 Superdex™ 200 prep grade"-Säule mit einem Bettvolumen von 120 ml (GE Healthcare Europe GmbH, München) und einer Durchflußrate von 1 ml/min durchgeführt.

Zudem konnten Protein-Lösungen umgepuffert und entsalzen werden. Dazu wurde eine "HighPrep™ 26/10 Desalting"-Sephadex-Säule (GE Healthcare Europe GmbH, München) mit einem Volumen von 15 ml verwendet. Die Durchflußrate betrug 8 ml/min.

2.8.4. Konzentrierung und Entsalzung von Protein-Lösungen

2.8.4.1. Dialyse von Protein-Lösungen

Über Dialyse konnten Protein-Lösungen sowohl entsalzen sowie unerwünschte Substanzen wie Imidazol abgetrennt, als auch konzentriert werden.

Die Dialyseschläuche wurden direkt vor der Verwendung für je 10 min in 2 % (w/v) Natriumcarbonat, H₂O, 1 mM EDTA und nochmals zweimal in H₂O gekocht, um eventuelle Verunreinigungen durch Schwermetalle zu entfernen. Nachdem die Dialyse-Schläuche abgekühlt waren, wurden die Proben eingefüllt und die Dialyseschläuche an beiden Enden mit Klammern verschlossen.

Die Dialyse fand unter langsamem Rühren im 1000-fachen Probevolumen Dialysepuffer (Tab. 58) bei 4 °C über Nacht statt. Sollten die Proben konzentriert werden, wurde dem Dialysepuffer Glycerin zugegeben (Tab. 58).

Tab. 58: Herstellung von Dialysepuffer

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|----------------------|-------------------|---------------|
| PBS-Puffer (Tab. 56) | 100 ml | 10 % (w/v) |
| Glycerin | 100 ml | 1,37 M |
| H ₂ O | <i>ad</i> 1000 ml | |
| pH 7,4 | | |

2.8.4.2. Konzentrierung und Entsalzung von Protein-Lösungen mit molekularbiologischen Hilfsmitteln

Zur Entsalzung und Konzentrierung von Proteinen-Lösungen fanden verschiedene molekularbiologische Hilfsmittel Anwendung. Durch Verwendung von “PD-10 Desalting Columns“ konnte ein Pufferwechsel von Protein-Lösungen durchgeführt und somit unerwünschte Substanzen wie Imidazol abgetrennt werden. Dabei handelt es sich um eine Gelfiltration an einer Sephadex-Matrix. Mit Hilfe der Mikrokonzentratoren “Microcon[®] Centrifugal Units“ konnten Protein-Lösungen konzentriert und entsalzen werden. Zudem war es durch Verwendung verschiedener Ausschlussgrößen (10, 30, 50 und 100 kDa) möglich, bestimmte Proteine anhand ihres Molekulargewichtes abzutrennen. Die Durchführung erfolgte jeweils gemäß den Angaben des Herstellers.

2.8.5. Konzentrationsbestimmung von Protein-Lösungen

Die Konzentrationsbestimmung von Protein-Lösungen fand mit dem “BCA Protein Assay Kit“ statt. Dabei handelt es sich um eine sehr einfache und schnelle Methode, welche die von Lowry *et al.* (1951) beschriebene Biuret-Reaktion, also die Reduktion von Cu²⁺ zu Cu¹⁺ durch Proteine in alkalischem Milieu, mit der hoch sensitiven Detektion von Cu¹⁺ durch Nutzung des Bicinchoninsäure (BCA)-Reagenz (Smith *et al.*, 1985) kombiniert. Das blau gefärbte Reaktionsprodukt, ein Komplex aus zwei Molekülen Bicinchoninsäure und einem Kupferion, zeigt eine starke Absorption bei einer Wellenlänge von 540 nm, welche sich linear zur Proteinkonzentration (bis 2000 µg/ml) verhält.

Die Durchführung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers entweder in Röhrchen mit 0,1 ml Probenvolumen und einem Arbeitsbereich von 20-2000 $\mu\text{g/ml}$ bzw. 5-250 $\mu\text{g/ml}$ (je nach verwendetem Protokoll) oder in Mikrotiterplatten mit 25 μl Probevolumen und einem Arbeitsbereich von 20-2000 $\mu\text{g/ml}$. Dabei war zu beachten, dass die Proben keine reduzierenden Substanzen, Chelatbildner sowie starke Säuren oder Basen enthielten, da diese den Test beeinflussen könnten. Es wurden stets Mehrfachbestimmungen durchgeführt und gleichzeitig immer eine Kalibriergerade erstellt, da es sich bei der zu Grunde liegenden Reaktion nicht um eine Endpunktbestimmung handelt. Dies erforderte zudem zügiges Arbeiten. Die Auswertung fand im Photometer für Röhrchen bzw. Mikrotiterplatten bei einer Wellenlänge von 562 nm statt. Die Proteinkonzentration konnte anschließend in Abhängigkeit der erstellten Kalibriergerade ermittelt werden.

2.8.6. Bestimmung von Enzymaktivitäten und Enzymkinetiken

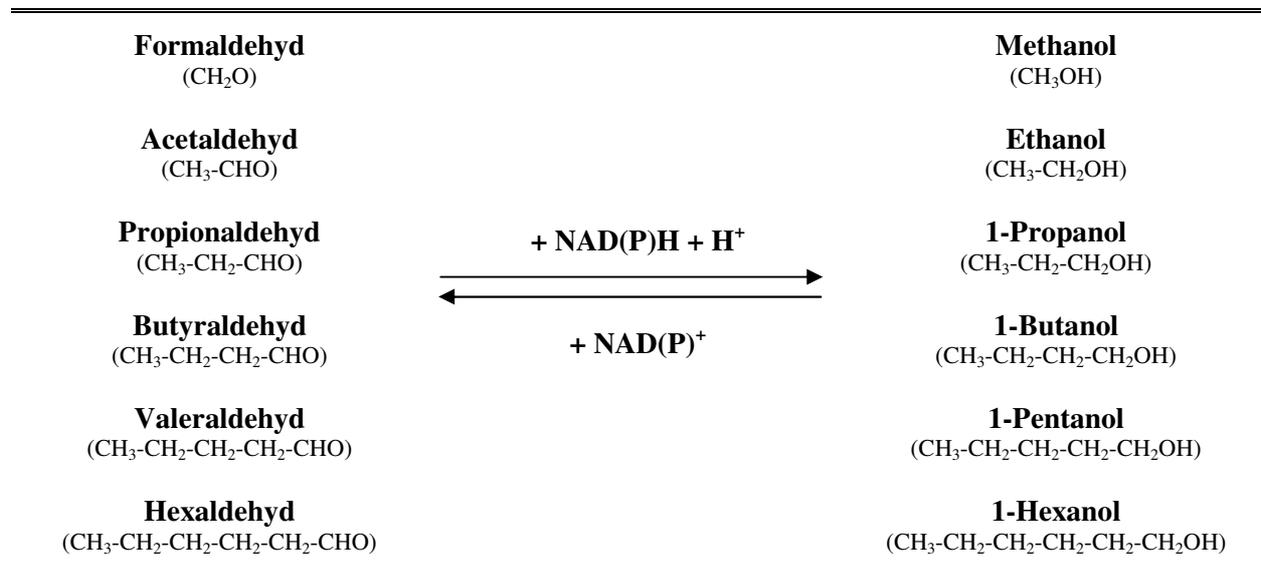
In der vorliegenden Arbeit sollten die Alkohol-Dehydrogenase-Enzymaktivitäten sowie die Enzymkinetiken von potentiellen Butanol-Dehydrogenasen untersucht werden. Dies geschah nach einer Methode von Dürre *et al.* (1987) über die Messung des Verbrauchs von NAD(P)^+ bzw. $\text{NAD(P)H} + \text{H}^+$, welche ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 365 nm haben, im Spektralphotometer “Ultrospec[®] 2100 *pro*“ oder “Ultrospec[®] 3000“.

Hierfür wurden entweder Protein-Rohextrakte (2.8.1.) oder gereinigte Proteine (2.8.3.) als Probe eingesetzt. Als Substrat für die Reaktionen wurden verschiedene Alkohole bzw. Aldehyde und als Co-Substrat NAD(P)^+ bzw. $\text{NAD(P)H} + \text{H}^+$ verwendet (2.8.6.1.). Gereinigten Proteinen (2.8.3.) wurde zusätzlich noch eine Spurenelement-Lösung (Tab. 22) zugegeben, um eventuelle Co-Faktoren, welche bei der Reinigung verloren gegangen sein könnten, zu ersetzen.

Die entsprechenden Testansätze (2.8.6.2.) wurden in einer Küvette im Spektralphotometer bei 37 °C solange inkubiert, bis eine konstante Absorption gemessen werden konnte. Anschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe des Substrats gestartet und für 5-10 min bei 37 °C und einer Wellenlänge von 365 nm verfolgt. Als Negativ-Kontrolle diente ein Testansatz, der H_2O anstelle des Proteins enthielt, sowie ein Testansatz, dem H_2O anstelle des Substrats zugegeben wurde.

2.8.6.1. Getestete Reaktionen

Folgende Reaktionen wurden jeweils in beide Richtungen getestet:



2.8.6.2. Testansätze

Für die Messungen wurden vier verschiedene Testansätze (Tab. 59-62) verwendet, um alle möglichen Kombinationen aus Substrat (Alkohol bzw. Aldehyd) und Co-Substrat (NAD(P)⁺ bzw. NAD(P)H + H⁺) abzudecken.

Hierfür wurden verschiedene Stammlösungen und Puffer hergestellt:

| | | |
|--|-----|----|
| Aldehyd (Formaldehyd, Acetaldehyd, Propionaldehyd, Butyraldehyd, Valeraldehyd, Hexaldehyd ¹⁾) | 0,1 | M |
| Alkohol (Methanol, Ethanol, 1-Propanol, 1-Butanol, 1-Pentanol ²⁾ , 1-Hexanol ³⁾) | 0,5 | M |
| Reduktionsäquivalente (NAD ⁺ , NADP ⁺ , NADH + H ⁺ , NADPH + H ⁺) | 10 | mM |
| Semicarbazid-HCl (pH 7) | 0,5 | M |
| Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,2) | 1 | M |
| Tris-HCl (pH 6) | 1 | M |
| Tris-HCl (pH 7,8) | 1 | M |

¹⁾ Hexaldehyd ist bis zu einer Konzentration von maximal 60 mM in Wasser löslich (bei 20 °C), weshalb eine Stammlösung mit 50 mM hergestellt wurde. Dementsprechend wurde das doppelte Volumen in die Testansätze eingesetzt.

²⁾ 1-Pentanol besitzt eine maximale Löslichkeit von 250 mM in Wasser (bei 20 °C). Deshalb wurde eine Stammlösung mit 0,25 M Pentanol hergestellt und das doppelte Volumen in die Testansätze eingesetzt.

³⁾ 1-Hexanol lässt sich bis zu einer Konzentration von 55 mM in Wasser lösen (bei 20 °C). Aus diesem Grund wurde eine Stammlösung mit 50 mM hergestellt und das 5-fache Volumen in die Testansätze eingesetzt.

Tab. 59: Testansatz A (Gerckens *et al.*, 1980; modifiziert)

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|---|-----------------------------|---------------|
| Substrat: Aldehyd | 68 μl | 8 mM |
| Co-Substrat: NADH + H ⁺ | 29 μl | 0,34 mM |
| Tris-HCl (pH 6) | 72 μl | 85 mM |
| Probe | x μl | |
| H ₂ O | <i>ad</i> 850 μl | |

Tab. 60: Testansatz B (Dürre *et al.*, 1987)

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|--|-----------------------------|---------------|
| Substrat: Aldehyd | 95 μl | 11 mM |
| Co-Substrat: NADPH + H ⁺ | 20 μl | 0,23 mM |
| Tris-HCl (pH 7,8) | 66 μl | 77 mM |
| Probe | x μl | |
| H ₂ O | <i>ad</i> 860 μl | |

Tab. 61: Testansatz C (Petitdemange *et al.*, 1969)

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|--------------------------------------|-----------------------------|---------------|
| Substrat: Alkohol | 32,5 μl | 19,6 mM |
| Co-Substrat: NAD ⁺ | 32 μl | 0,39 mM |
| Semicarbazid-HCl (pH 7) | 122 μl | 73,5 mM |
| Tris-HCl (pH 7,8) | 57 μl | 68,8 mM |
| Probe | x μl | |
| H ₂ O | <i>ad</i> 830 μl | |

Tab. 62: Testansatz D (Petitdemange *et al.*, 1969; modifiziert)

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|---------------------------------------|-----------------------------|---------------|
| Substrat: Alkohol | 33,5 μl | 20 mM |
| Co-Substrat: NADP ⁺ | 18 μl | 0,2 mM |
| Semicarbazid-HCl (pH 7) | 123 μl | 73,5 mM |
| Kaliumphosphatpuffer (pH 7,2) | 42 μl | 50 mM |
| Probe | x μl | |
| H ₂ O | <i>ad</i> 840 μl | |

2.8.6.3. Bestimmung von spezifischen Enzymaktivitäten

Um spezifische Enzymaktivitäten von Protein-Rohextrakten (2.8.1.) oder gereinigten Proteinen (2.8.3.) bestimmen zu können, fand zuerst eine Konzentrationsbestimmung der Probe (2.8.5.) statt. Von der Probe wurden anschließend unterschiedliche Konzentrationen in die jeweiligen Testansätze (2.8.6.2.) eingesetzt. Die spezifische Aktivität sollte dabei immer dieselbe sein und lässt sich wie folgt berechnen:

$$\text{Spezifische Aktivität [U/mg]} = \frac{\Delta E/\text{min} \times V \times VF}{\varepsilon \times d \times v \times PG}$$

| | | |
|-----------------------|---|--|
| $\Delta E/\text{min}$ | = | Extinktionsänderung pro Zeiteinheit [min^{-1}] |
| V | = | Gesamtvolumen des Testansatzes |
| VF | = | Verdünnungsfaktor der Probe |
| ε | = | spezifischer Extinktionskoeffizient [$\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$] (für NADPH + H^+ bei 365 nm: $\varepsilon = 3,40 \text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$) |
| d | = | Schichtdicke der Küvette [cm] |
| v | = | Probevolumen [μl] |
| PG | = | Proteingehalt [mg/ml] |

2.8.6.4. Bestimmung von Enzymkinetiken

Für die Bestimmung von Enzymkinetiken von gereinigten Proteinen (2.8.3.) wurden den Testansätzen verschiedene Substratkonzentrationen zugegeben und die jeweiligen spezifischen Enzymaktivitäten bestimmt (2.8.6.3.). Anschließend konnte die maximale Reaktionsgeschwindigkeit V_{max} und die Michaelis-Menten-Konstante K_m sowohl graphisch als auch rechnerisch mit Hilfe der Methode der kleinsten Fehlerquadrate ("Least Squares"; Björk, 1996) anhand der Michaelis-Menten-Gleichung (Michaelis und Menten, 1913; Briggs und Haldane, 1925) bestimmt werden:

$$\text{Reaktionsgeschwindigkeit } v = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m + [S]}$$

| | | |
|-----------|---|-----------------------------------|
| V_{max} | = | maximale Reaktionsgeschwindigkeit |
| [S] | = | Substratkonzentration |
| K_m | = | Michaelis-Menten-Konstante |

2.8.6.5. Bestimmung weiterer enzymatischer Parameter

Für die Bestimmung des pH-Optimums oder von eventuellen Co-Faktoren der Proteine mussten diese gereinigt vorliegen (2.8.3.).

Die Testansätze (2.8.6.2.) wurden dann auf verschiedene pH-Werte (pH 1,5; pH 3; pH 5; pH 6; pH 7; pH 8; pH 10; pH 11,5) eingestellt bzw. mit einer Spurenelement-Lösung (Tab. 22) sowie verschiedener Lösungen von zweiwertigen Ionen (Eisen, Kupfer, Kobalt, Nickel, Zink, Magnesium, Mangan) komplementiert. Anschließend wurden die spezifischen Enzymaktivitäten gemessen und verglichen.

2.8.7. Fraktionierung von Proteinen

2.8.7.1. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen erfolgte nach einer modifizierten Methode von Lämmli *et al.* (1970) und diente zur Kontrolle von Überproduktion (2.8.2.) und Reinigung (2.8.3.), zur Molekularmassenbestimmung (2.8.9.) sowie zur Probenvorbereitung für eine massenspektrometrische Analyse (2.8.10.).

Damit die Trennung allein von der Größe des Moleküls abhängt, darf die individuelle Ladung der Proteine keinen Einfluss mehr haben. Dies wird durch die Verwendung des Detergenz SDS erreicht, welches die Struktur von Proteinen zerstört, indem es sich mit seinem 12-C-Atome langen hydrophoben Ende an die Proteine lagert. Da bei den angewandten pH-Werten die Natrium-Ionen von den SDS-Molekülen dissoziieren, werden die Proteine so proportional zu ihrer Größe und damit zu ihrer molekularen Masse mit negativen Ladungen versehen. Um zudem störende Disulfidbrücken zu reduzieren, wird das Protein gleichzeitig mit Mercaptoethanol inkubiert.

Die SDS-PAGE wurde in einer Plattengelapparatur durchgeführt. Die Gele hatten eine Größe von 11 x 7 x 0,1 cm und setzten sich jeweils aus einem etwa 1 cm langen Sammelgel sowie einem Trenngel zusammen. Der Acrylamidanteil wurde dabei je nach erwarteter molekularer Masse der Proteine variiert (Tab. 63).

Tab. 63: Herstellung von Sammel- und Trenngel einer SDS-PAGE (Lämmli *et al.*, 1970)

| Zusammensetzung | Sammelgel | Trenngel | | |
|---------------------------|-----------|----------|---------|---------|
| | 4 % | 8 % | 10 % | 12 % |
| H ₂ O | 3,25 ml | 4,58 ml | 4,17 ml | 3,25 ml |
| Sammelgelpuffer (Tab. 64) | 1,25 ml | - | - | - |
| Trenngelpuffer (Tab. 65) | - | 2,08 ml | 2,08 ml | 2,08 ml |
| Rotiphorese® Gel 40 | 0,5 ml | 1,67 ml | 2,08 ml | 2,5 ml |
| 10 % (w/v) APS | 30 µl | 75 µl | 75 µl | 75 µl |
| TEMED | 15 µl | 7,5 µl | 7,5 µl | 7,5 µl |

Zunächst wurden alle Komponenten des jeweiligen Gels bis auf APS und das TEMED zusammengegeben und gut gemischt. Anschließend wurde die Polymerisation durch APS- und TEMED-Zugabe gestartet, die Lösung für das Trenngel zügig zwischen die gereinigten und abgedichteten Platten bis ca. 1 cm unter den Rand der Ohrenplatte gefüllt und vorsichtig mit Wasser überschichtet. Nach erfolgreicher Polymerisation wurde das Wasser abgenommen, das Sammelgel bis zur Kante der Ohrenplatte gegossen und ein Kamm zur Aussparung der Geltaschen eingesetzt. Fertig gegossene und auspolymerisierte Gele konnten in Frischhaltefolie gewickelt für einige Wochen bei 4 °C gelagert werden.

Tab. 64: Herstellung von Sammelgelpuffer (Lämmli *et al.*, 1970)

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|------------------------------|-------------------|---------------|
| Tris | 60,57 g | 0,5 M |
| SDS | 4 g | 14 mM |
| H ₂ O | <i>ad</i> 1000 ml | |
| pH 6,8 (mit HCl eingestellt) | | |

Tab. 65: Herstellung von Trenngelpuffer (Lämmli *et al.*, 1970)

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|------------------|-------------------|---------------|
| Tris | 181,71 g | 1,5 M |
| SDS | 4 g | 14 mM |
| H ₂ O | <i>ad</i> 1000 ml | |
| pH 8,8 | | |

Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel im Verhältnis 4:1 mit Ladepuffer (Tab. 66) versetzt, 5 min bei 95 °C denaturiert, auf Eis abgekühlt und mit Hilfe einer Spritze in die zuvor gespülten Geltaschen aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 35 mA mit 1 x SDS-Laufpuffer (Tab. 67).

Tab. 66: Herstellung von 4 x Ladepuffer

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|------------------------------|-----------------|---------------|
| Tris | 1,51 g | 0,25 M |
| SDS | 3 g | 200 mM |
| Glycerin | 20 ml | 5,5 M |
| Bromphenolblau | 20 mg | 0,6 mM |
| 2-Mercaptoethanol | 10 ml | 2,87 M |
| H ₂ O | <i>ad</i> 50 ml | |
| pH 6,8 (mit HCl eingestellt) | | |

Die Lagerung fand bei 4 °C statt.

Tab. 67: Herstellung von 10 x SDS-Laufpuffer

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|------------------|-------------------|---------------|
| Tris | 30,3 g | 0,25 M |
| SDS | 10 g | 35 mM |
| Glycin | 114 ml | 1,92 M |
| H ₂ O | <i>ad</i> 1000 ml | |
| pH 8,8 | | |

2.8.7.2. Nicht-denaturierende (native) Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die nicht-denaturierende bzw. native Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde verwendet, um eine Aktivitätsfärbung von Proteinen im Gel (2.8.8.3.) durchzuführen. Die Trennung der Proteine erfolgt hier zwar nach Größe und Ladung, dafür sind die Proteine jedoch auch nach Beendigung der Gelelektrophorese noch aktiv.

Die Durchführung erfolgte analog zur denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2.8.7.1.), allerdings ohne Aufkochen der Proben und Verwendung der Detergenzien SDS und 2-Mercaptoethanol im Polyacrylamid-Gel sowie Lauf- und Ladepuffer.

2.8.8. Färbung von Proteinen

2.8.8.1. Silber-Färbung

Die Silberfärbung (modifiziert nach Blum *et al.*, 1987) wurde standardmäßig sowohl für denaturierende (2.8.7.1.) als auch native (2.8.7.2.) Polyacrylamid-Gele benutzt, da es sich um eine sehr sensitive Methode handelt, mit der sich Proteine bereits ab 1-2 ng pro Proteinbande nachweisen lassen. Dabei lagern sich zunächst Silberionen an die Proteine an, welche anschließend zu elementarem Silber reduziert werden können und somit sichtbar werden.

Die Polyacrylamid-Gele wurden im Anschluss an die Elektrophorese für mindestens 30 min oder über Nacht in Fixierlösung (Tab. 68) inkubiert, zweimal 10 min mit 50 % (v/v) Ethanol gewaschen und 1 min in einer Thiosulfatlösung (Tab. 69) geschwenkt. Nach dreifachem Waschen mit H₂O für 30 s und 15 min Inkubation in einer Silbernitratlösung (Tab. 70) wurde das Gel zweimal für 30 s mit H₂O gewaschen. Durch Zugabe von Entwicklerlösung (Tab. 71) erfolgte die Entwicklung der Banden, die durch kurzes Spülen in H₂O und Schwenken in einer Stopp-Lösung (Tab. 72) abgebrochen werden konnte. Danach wurden die Gele mit Hilfe der Fotodokumentationsanlage fotografiert.

Tab. 68: Herstellung von Fixierlösung

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|------------------------------------|-------------------|---------------|
| Methanol | 500 ml | 12,33 M |
| Essigsäure (100 % (v/v); Eisessig) | 120 ml | 2,10 M |
| Formaldehyd (37 % (v/v)) | 0,5 ml | 5 mM |
| H ₂ O | <i>ad</i> 1000 ml | |

Die Fixierlösung konnte bei RT gelagert werden.

Tab. 69: Herstellung von Thiosulfatlösung

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|-------------------------------|-------------------|---------------|
| Natriumthiosulfat Pentahydrat | 0,2 g | 810 μM |
| H ₂ O | <i>ad</i> 1000 ml | |

Die Thiosulfatlösung konnte bei RT gelagert werden.

Tab. 70: Herstellung von Silbernitratlösung

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|--------------------------|------------------|---------------|
| Silbernitrat | 0,2 g | 12 mM |
| Formaldehyd (37 % (v/v)) | 75 µl | 7,5 µM |
| H ₂ O | <i>ad</i> 100 ml | |

Die Silbernitratlösung wurde vor Gebrauch frisch angesetzt.

Tab. 71: Herstellung von Entwicklerlösung

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|----------------------------|-------------------|---------------|
| Natriumcarbonat wasserfrei | 60 g | 566 mM |
| Thiosulfatlösung (Tab. 69) | 20 ml | 2 % (v/v) |
| Formaldehyd (37 % (v/v)) | 0,5 ml | 5 µM |
| H ₂ O | <i>ad</i> 1000 ml | |

Die Entwicklerlösung konnte bei RT gelagert werden.

Tab. 72: Herstellung von Stopp-Lösung

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|------------------|-------------------|---------------|
| EDTA | 14,6 g | 50 mM |
| H ₂ O | <i>ad</i> 1000 ml | |

Die Stopp-Lösung konnte bei RT gelagert werden.

2.8.8.2. Kolloidale Coomassie-Färbung

Zur Färbung von denaturierenden Polyacrylamid-Gelen (2.8.7.1.) für eine massenspektrometrische Analyse (2.8.10) wurde kolloidales Coomassie verwendet (Neuhoff *et al.*, 1988). Durch die kolloidalen Eigenschaften bindet der verwendete Farbstoff Coomassie Brillant Blau G-250 mit hoher Spezifität an Proteine und nur wenig an die Gelmatrix. Dadurch lassen sich Proteine bereits ab 15 ng pro Proteinbande nachweisen.

Die Polyacrylamid-Gele wurden nach der Elektrophorese für 1-2 h in 40 % (v/v) Ethanol und 10 % (v/v) Essigsäure fixiert und dann zweimal für 10 min mit H₂O gewaschen. Anschließend erfolgte die Färbung in kolloidaler Coomassie-Lösung (CCS; Tab. 73) für 24 h. Danach wurden je zwei Waschschrte in 20 % (v/v) Methanol für je 15 min und H₂O für je 1 h durchgeführt.

Tab. 73: Herstellung von kolloidaler Coomassie-Lösung (CCS)

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|---|--------|---------------|
| Kolloidale Coomassie Färbelösung (CCD; Tab. 74) | 200 ml | 80 % (v/v) |
| Methanol | 50 ml | 4,93 M |

Die kolloidale Coomassie-Lösung (CCS) wurde vor Gebrauch frisch angesetzt.

Tab. 74: Herstellung von kolloidaler Coomassie-Färbelösung (CCD)

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|---|------------------|---------------|
| Ammoniumsulfat | 50 g | 378 mM |
| <i>o</i> -Phosphorsäure (85 % (v/v)) | 6 ml | 28 mM |
| Coomassie Brillant Blau-Lösung (CBB; Tab. 75) | 10 ml | 1,2 mM |
| H ₂ O | <i>ad</i> 500 ml | |

Die kolloidale Coomassie-Färbelösung (CCD) konnte bei RT gelagert werden.

Tab. 75: Herstellung von kolloidaler Coomassie Brillant Blue-Lösung (CCB)

| Zusammensetzung | Menge | Konzentration |
|-------------------------------|------------------|---------------|
| Coomassie Brillant Blau G-250 | 5 g | 59 mM |
| H ₂ O | <i>ad</i> 100 ml | |

Die kolloidale Coomassie Brillant Blau-Lösung (CCD) konnte bei RT gelagert werden.

2.8.8.3. Aktivitätsfärbung

Um herauszufinden, welches Protein aus einer Mischung mehrerer Proteine Alkohol-Dehydrogenase-Aktivität vermittelt, wurde eine Aktivitätsfärbung durchgeführt (Graf, 2002; Bériault *et al.*, 2005).

Das entsprechende Protein-Gemisch wurde in einem nativen Polyacrylamid-Gel (2.8.7.2.) aufgetrennt. Die Auftragung erfolgte dabei doppelt, sodass eine Hälfte des Gels für die Aktivitätsfärbung und die andere Hälfte zum Vergleich für eine Silber- (2.8.8.1.) oder kolloidale Coomassie-Färbung (2.8.8.2.) verwendet werden konnte. Der Test auf Enzymaktivität im Polyacrylamid-Gel wurde wie bereits beschrieben durchgeführt (2.8.6.). Es wurden die Testansätze C (Tab. 61) und D (Tab. 62) mit dem Substrat 1-Butanol verwendet (2.8.6.2.). Die Detektion erfolgte allerdings nicht photometrisch, sondern über eine Aktivitätsfärbung. Hierfür wurde den Testansätzen je 1 mM Phenazinmethosulfat (PMS) und Iodnitrotetrazoliumchlorid (INT) bzw. Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) zugegeben. Die bei der Oxidation von 1-Butanol entstehenden Reduktionsäquivalente (NADH bzw. NADPH) werden dabei vom Elektronenüberträger PMS auf das Tetrazolium-Salz (INT bzw. NBT) übertragen, welches dann als unlösliches Salz (Formazan) ausfällt und so die Proteinbande violett bzw. blau anfärbt.

2.8.9. Bestimmung der molekularen Masse von Proteinen

Die Bestimmung der molekularen Masse eines Proteins erfolgte mit Hilfe einer SDS-PAGE (2.8.7.1.). Dabei wurde die relative Beweglichkeit von Proteinen in Bezug auf Standardproteine mit bekannter molekularer Masse verglichen. Hierfür dienten die beiden Proteinstandards “PAGE Ruler™ Prestained Protein Ladder“ (Abb. 11a) und “PAGE Ruler™ Unstained Protein Ladder“ (für genauere Größenbestimmungen; Abb. 11b), welche von der Fermentas GmbH, St. Leon-Rot bezogen wurden.

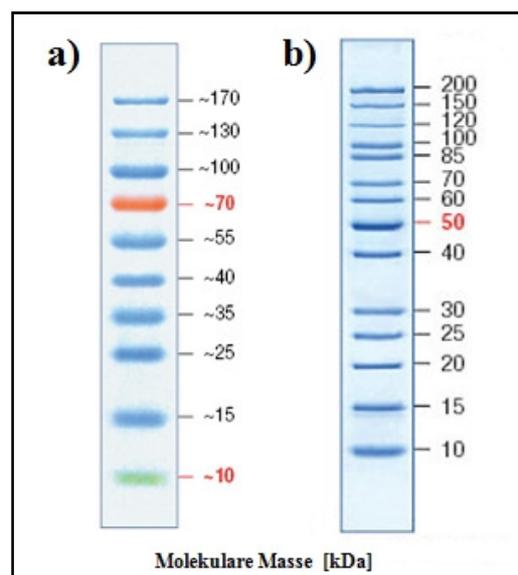


Abb. 11: “PAGE Ruler™ Protein Ladder“-Proteinstandards (<http://www.fermentas.com/>): a) “Prestained“ und b) “Unstained“

2.8.10. Massenspektrometrische Analyse von Proteinen

Die massenspektrometrische Analyse von Proteinen wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Uwe Völker (Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald) durchgeführt.

Hierfür wurde die entsprechende Proteinprobe mit einer SDS-PAGE (2.8.7.1.) aufgetrennt, anschließend mit kolloidalem Coomassie (2.8.8.2.) gefärbt, luftdicht in Klarsichtfolie verpackt und an die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Uwe Völker versandt. Dort wurden die Proteine aus den Gelbanden mit Trypsin verdaut, aus dem Gel extrahiert und mit Hilfe einer "Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC)" getrennt. Die Detektion erfolgte mit einem "LTQ-Orbitrap-Massenspektrometer" (Thermo Fisher Scientific Germany Ltd. & Co. KG, Bonn). Die Identifizierung erfolgte mit der Datenbank "SwissProt" (www.expasy.ch/sprot/) und dem Programm "Bioworks, Version 3.2" (Thermo Fisher Scientific Germany Ltd. & Co. KG, Bonn).

3. Ergebnisse

3.1. Wachstumsstudien von *C. ljungdahlii*

Um herauszufinden, ob sich *C. ljungdahlii* als Wirtsorganismus für die Produktion von 1-Butanol aus Synthesegas eignet, wurden verschiedene Wachstumsstudien durchgeführt. Zu Beginn wurden verschiedene Medien getestet, um herauszufinden welches Medium sich am besten für die weiterführenden Versuche eignet (3.1.1.). Anschließend wurde das Wachstum auf Synthesegas (3.1.3.) sowie auf den alternativen Substraten Fructose (3.1.2.) und CO₂ + H₂ (3.1.4.) untersucht. Zusätzlich wurde überprüft, ob *C. ljungdahlii* in der Lage ist, 1-Butanol zu verstoffwechseln bzw. wie tolerant der Organismus gegenüber 1-Butanol ist (3.1.5.). Darüber hinaus wurde das Wachstum in Gegenwart verschiedener Antibiotika (3.1.6.), welche für eine Selektion nach einer Transformation verwendet werden können, sowie das Wachstum unter Natriummangel (3.1.7.), was Aufschluss über die Art der Energiekonservierung von *C. ljungdahlii* geben könnte, untersucht.

3.1.1. Vergleich verschiedener Nährmedien

Es wurden die von den Stammsammlungen DSMZ bzw. ATCC empfohlenen Nährmedien DSMZ-Medium 879 (*Clostridium ljungdahlii*-Medium; 2.1.5.9.) bzw. das ATCC-Medium 1754 (PETC-Medium; 2.1.5.8.), sowie das von Phillips *et al.* (1993) entwickelte Designed-Medium (2.1.5.9.) verglichen. Bei diesen Medien handelt es sich um verbesserte Varianten des für die Isolation von *C. ljungdahlii* (Barik *et al.*, 1988) benutzten Basal-Mediums nach Pfennig (McInerney *et al.*, 1979; Sharak Genthner *et al.*, 1981). Die Entwicklung des Designed-Medium erfolgte anhand der elementaren Zusammensetzung von *E. coli* (Bailey und Ollis, 1986). Hierfür wurde zuvor ein chemisch definiertes Medium ohne Hefeextrakt entwickelt (Phillips *et al.*, 1993), während das DSMZ-Medium 879 und das ATCC-Medium 1754 jeweils 0,1 % (w/v) Hefeextrakt enthalten.

C. ljungdahlii zeigte in allen drei Nährmedien sowohl auf Fructose, als auch auf Synthesegas als Energie- und Kohlenstoffquelle gutes Wachstum (3.1.2. und 3.1.3.). Die höchsten Zelldichten und Wachstumsraten wurden in ATCC-Medium 1754 erreicht, weshalb dieses Medium für die nachfolgenden Experimente verwendet wurde. Wurde ein Medium ohne Hefeextrakt benötigt, wurde das Designed-Medium verwendet.

3.1.2. Wachstum auf Fructose

Abb. 12 zeigt den typischen Wachstumsverlauf von *C. ljungdahlii* auf Fructose als Energie- und Kohlenstoffquelle. Während des logarithmischen Wachstums betrug die Verdopplungszeit t_D 2,5 h und die Wachstumsrate μ dementsprechend $0,28 \text{ h}^{-1}$. Am Ende des Wachstums wurden Zelldichten bis zu einer $OD_{600\text{nm}}$ von ca. 1,8 sowie ein pH-Wert von knapp unter 4 erzielt und ungefähr 30 mM Acetat und 15 mM Ethanol produziert.

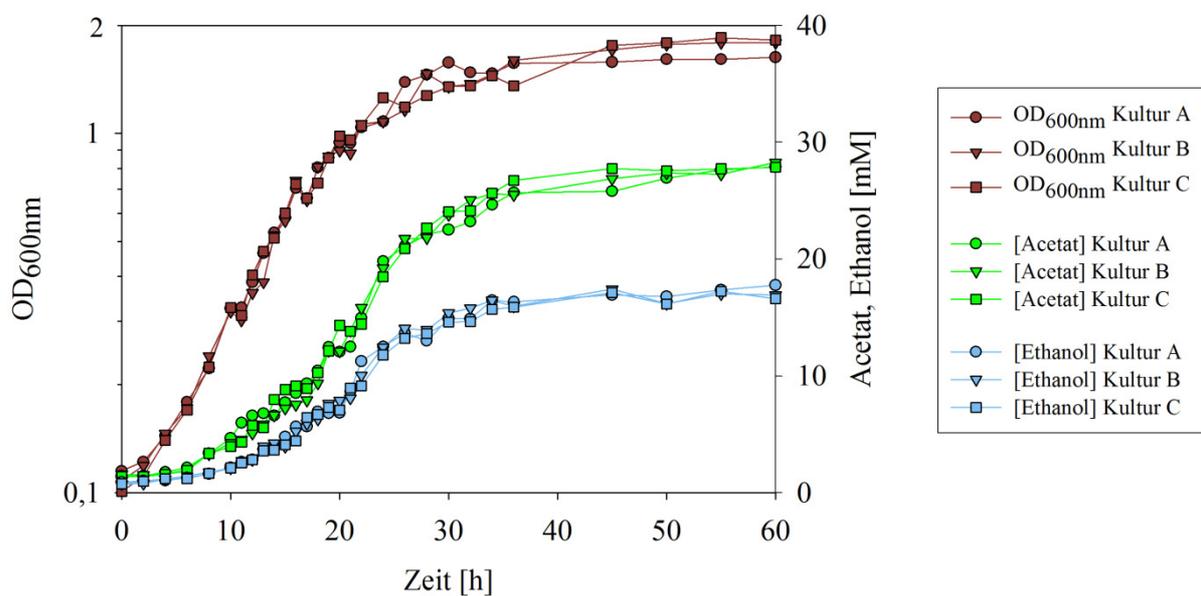


Abb. 12: Wachstum von *C. ljungdahlii* in 500 ml ATCC-Medium 1754 mit Fructose

3.1.3. Wachstum auf Synthesegas

Das Wachstum von *C. ljungdahlii* auf Synthesegas als Energie- und Kohlenstoffquelle ist von verschiedenen Faktoren abhängig.

Zum einen ist es möglich, *C. ljungdahlii* an das autotrophe Wachstum auf Synthesegas zu adaptieren. So haben Kulturen, welche bereits zuvor auf Synthesegas kultiviert wurden, bessere Wachstumsraten und eine deutlich kürzere "Lag-Phase" als Kulturen, die zuvor auf Fructose gewachsen waren und erreichen zudem höhere Zelldichten.

Zum anderen ist das Verhältnis des Volumens der Gasphase zum Volumen des Mediums entscheidend für das Wachstum. Je größer dieses Verhältnis (und somit auch die Gasphase) ist, desto stärker ist das Wachstum (Abb. 13).

Ford *et al.* (2008) beschrieben zudem verbessertes Wachstum von *C. ljungdahlii* unter Verwendung von Gas-Speicherbeuteln anstatt der herkömmlichen Kulturflaschen. Dieser Effekt konnte allerdings nicht bestätigt werden (Abb. 13) und ist wahrscheinlich auch in der entsprechenden Studie auf das unterschiedliche Volumen der Gasphase zurückzuführen, da dort 40-ml-Glasflaschen mit 500-ml-Gasbeuteln verglichen wurden.

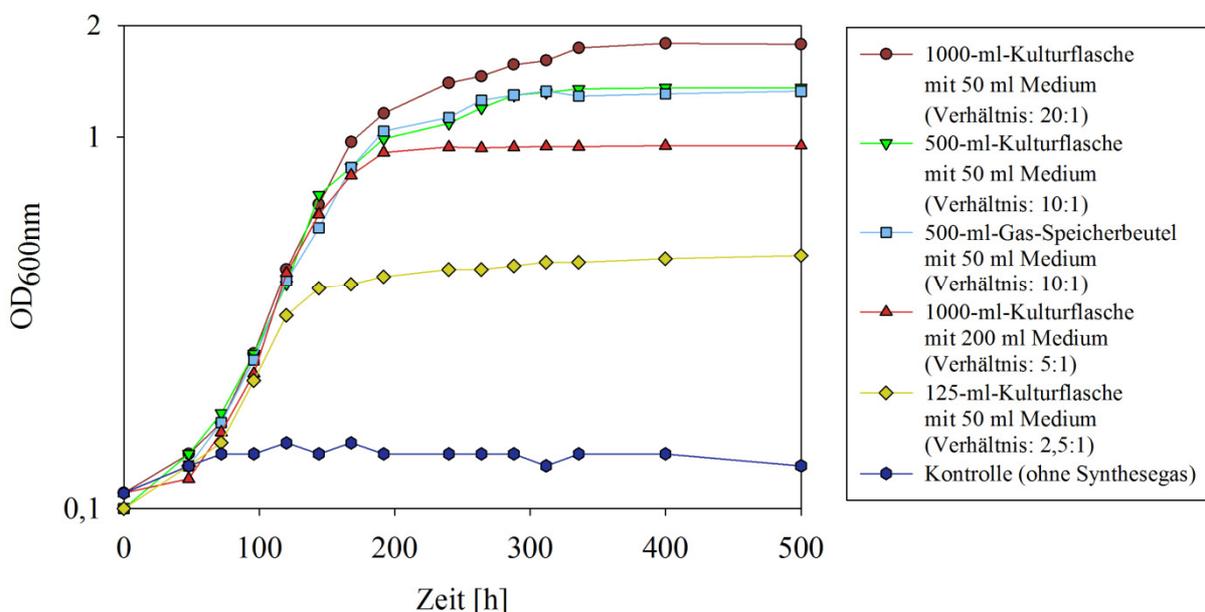


Abb. 13: Wachstum von *C. ljungdahlii* auf Synthesegas in ATCC-Medium 1754 mit verschiedenen Volumen-Verhältnissen zwischen Gasphase und Medium

Für Wachstumsversuche von *C. ljungdahlii* auf Synthesegas wurden deshalb immer 1000-ml-Kulturflaschen und bereits adaptierte Kulturen verwendet. In Abb. 14 ist der Wachstumsverlauf entsprechender Kulturen in 200 ml ATCC-Medium 1754 genauer dargestellt. Unter diesen Bedingungen betrug die Verdopplungszeit t_D während des exponentiellen Wachstums 8 h und demzufolge die Wachstumsrate μ $0,09 \text{ h}^{-1}$. Es wurde eine maximale $OD_{600\text{nm}}$ von fast 1 erreicht und ungefähr 30 mM Acetat und 15 mM Ethanol produziert. Der pH sinkt während des Wachstums auf einen Wert von knapp unter 4.

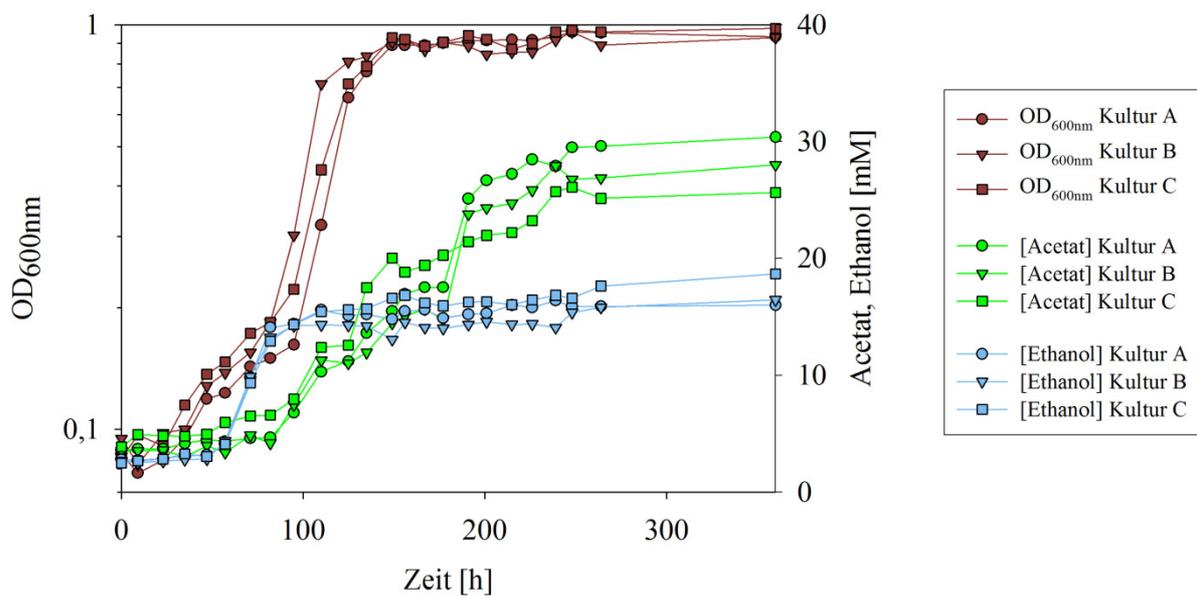


Abb. 14: Wachstum von *C. ljungdahlii* in 200 ml ATCC-Medium 1754 und 1000-ml-Kulturflaschen mit Synthesegas

3.1.4. Wachstum auf $\text{CO}_2 + \text{H}_2$

Neben Synthesegas kann *C. ljungdahlii* auch auf einem Gasgemisch aus $\text{CO}_2 + \text{H}_2$ als Energie- und Kohlenstoffquelle autotroph wachsen, wobei dieselben Faktoren (siehe 3.1.3.) für das Wachstum ausschlaggebend sind.

Die erreichten Zelldichten ($OD_{600\text{nm}} \sim 0,3-0,5$) und Wachstumsraten waren auf diesem Substrat jedoch signifikant geringer als auf Synthesegas und zudem wurde fast kein Ethanol ($\sim 5 \text{ mM}$) gebildet (Abb. 15). Das verwendete Gasgemisch von 20 % CO_2 und 80 % H_2 ist allerdings auch nicht optimal für acetogene Organismen, welche idealerweise ein Verhältnis von einem Drittel CO_2 zu zwei Drittel H_2 benötigen.

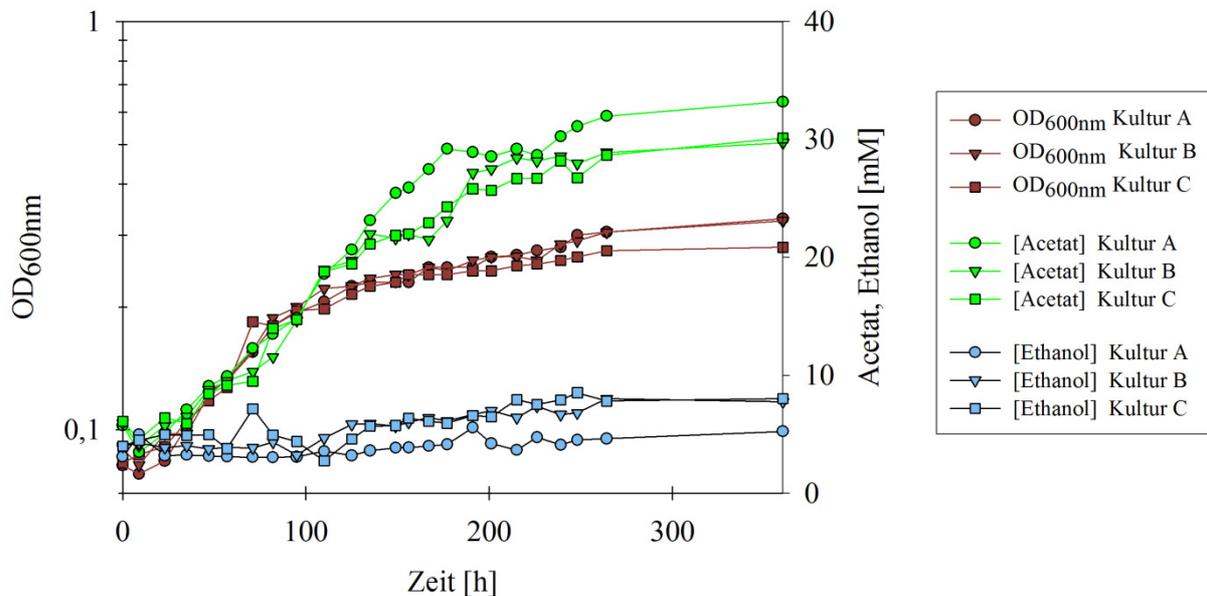


Abb. 15: Wachstum von *C. ljungdahlii* in 200 ml ATCC-Medium 1754 und 1000-ml-Kulturflaschen mit einem Gasmisch aus 20 % CO₂ und 80 % H₂

3.1.5. Wachstum in Gegenwart von 1-Butanol

Um festzustellen, ob *C. ljungdahlii* fähig ist, 1-Butanol zu verstoffwechseln, wurden dem ATCC-Medium 1754 verschiedene Butanol-Konzentrationen (5, 10, 20, 28 und 50 mM) als einzige Energie- und Kohlenstoffquellen zugesetzt und dieses mit *C. ljungdahlii* inokuliert. Es konnte jedoch kein Wachstum beobachtet werden. *C. ljungdahlii* ist somit also nicht in der Lage, auf 1-Butanol zu wachsen.

Um die Butanol-Toleranz von *C. ljungdahlii* zu testen, wurden einer wachsenden *C. ljungdahlii*-Kultur während der frühen logarithmischen Wachstumsphase verschiedene Butanol-Konzentrationen (0,05, 0,3, 0,6, 0,9, 1,5 und 3 % (v/v)) zugegeben, und das Wachstum mit einer Kultur verglichen, welcher kein Butanol zugesetzt wurde (Abb. 16).

Während bei Zugabe von bis zu 0,05 % (v/v) (5 mM) 1-Butanol kein Effekt zu erkennen war, waren die Wachstumsraten bei Butanol-Konzentration von 0,3-0,9 % (v/v) (33-98 mM) etwas geringer, wobei am Ende des Wachstums ungefähr dieselbe Zelldichte erreicht wurde. Ab einer Konzentration von 1,5 % (v/v) (164 mM) war ein deutliches Wachstumsdefizit zu sehen und bei Zugabe von 3 % (v/v) (163 mM) Butanol stoppte das Wachstum nach kurzer Zeit vollständig (Abb. 16).

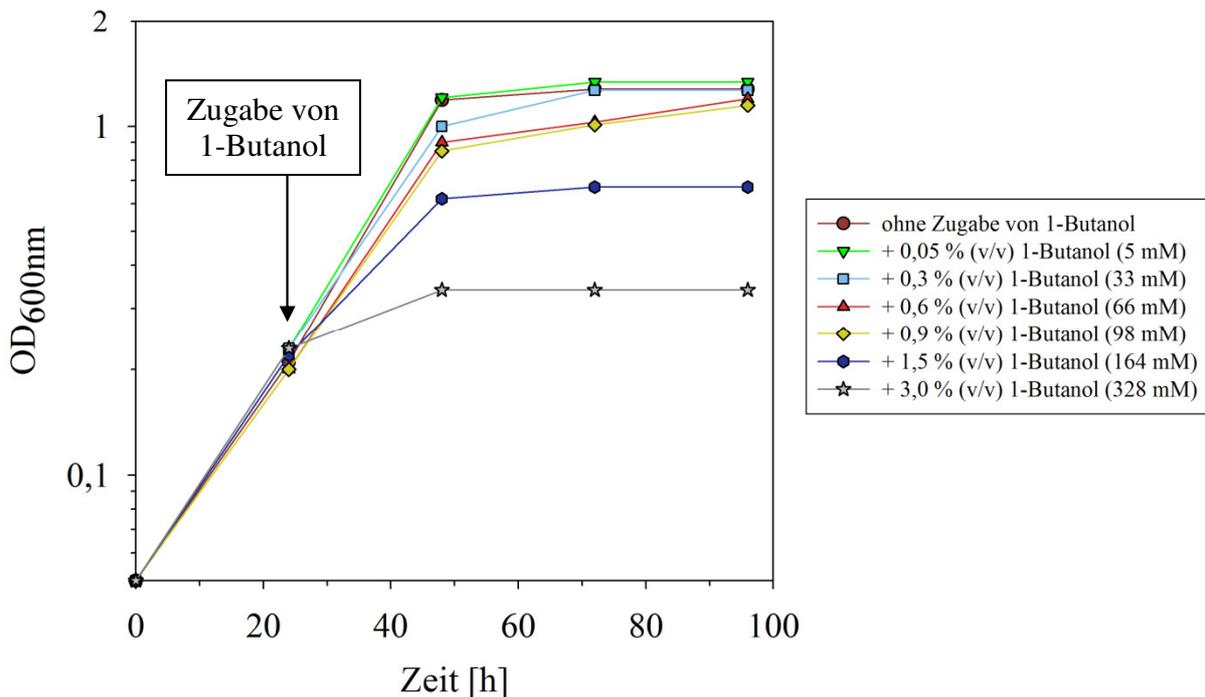


Abb. 16: Wachstum von *C. ljungdahlii* in 50 ml ATCC-Medium 1754 mit Fructose sowie verschiedenen Butanol-Konzentrationen

Die Butanol-Toleranz von *C. ljungdahlii* ist somit ähnlich zu der von *C. acetobutylicum*, welches bei Zugabe von 1,1 % (v/v) (120 mM) eine um 50 % erniedrigte Wachstumsrate aufweist und bei einer Butanol-Konzentration von 1,5 % (v/v) (164 mM) nur noch sehr geringes Wachstum zeigt (Vollherbst-Schneck *et al.*, 1984; Baer *et al.*, 1987).

3.1.6. Wachstum in Gegenwart verschiedener Antibiotika

Für die Transformation von *C. ljungdahlii* wurden die entsprechenden Plasmide mit Antibiotika-Resistenz-Kassetten versehen. Dadurch konnte nach der Transformation eine Selektion positiver Klone anhand dieser Antibiotika-Resistenzen erfolgen. Hierfür musste zunächst allerdings getestet werden, ob der WT von *C. ljungdahlii* auch sensitiv gegen diese Antibiotika ist. Dabei stellte sich heraus, dass der WT von *C. ljungdahlii* sowohl sensitiv gegen Clarithromycin (bei einer Arbeitskonzentration von 5 µg/ml), als auch gegen Thiamphenicol (bei einer Arbeitskonzentration von 20 µg/ml) ist.

Bei der Konjugation musste eine zusätzliche Selektion gegen *E. coli* durchgeführt werden. Dies erfolgte mit Colistin, welches in einer Arbeitskonzentration von 10 µg/ml zu keiner Hemmung von *C. ljungdahlii* führt.

3.1.7. Wachstum bei Natriummangel

Acetogene Organismen werden anhand des Mechanismus ihrer Energiekonservierung in zwei Gruppen eingeteilt (Müller, 2003). Während H⁺-abhängige Acetogene wie *Moorella thermoacetica* und *M. thermoautotrophica* Energie über einen Protonengradienten konservieren, benötigen Na⁺-abhängige Acetogene wie *Acetobacterium woodii*, *Blautia producta* und *Thermoanaerobacter kivui* Natrium zur Energiekonservierung während des autotrophen Wachstums (Heise *et al.*, 1989; Geerlings *et al.*, 1989; Yang und Drake, 1990). Diese Organismen bauen einen Na⁺-Gradienten auf und besitzen eine Na⁺ F₁F₀ ATPase (Müller *et al.*, 2001).

Um herauszufinden, ob das Wachstum von *C. ljungdahlii* abhängig von Natrium ist, wurde ATCC-Medium 1754 mit verschiedenen Natrium-Konzentrationen hergestellt. Das ursprüngliche Medium enthält 38 mM Natrium in Form von Natriumchlorid und Natriumhydrogenphosphat (Tab. 21), sowie Spuren (0,24 µM) von Natrium in der Spurenelementlösung (Tab. 22). Hiervon wurden nun durch Substitution von Natriumchlorid mit Kaliumchlorid und Natriumhydrogenphosphat mit Kaliumhydrogenphosphat Varianten mit niedrigeren Natrium-Konzentrationen (14, 7, 3,5 und 1,4 mM) erstellt. Aufgrund der geringen Konzentration wurde das Natrium in der Spurenelementlösung nicht ersetzt. Anschließend wurden Wachstumsversuche mit *C. ljungdahlii* sowohl auf Fructose als Substrat, als auch auf Synthesegas oder CO₂ + H₂ als Substrat durchgeführt. Der Verlauf des Wachstums war jedoch bei allen verwendeten Natrium-Konzentrationen derselbe. *C. ljungdahlii* ist folglich also nicht Na⁺-abhängig.

Im Vergleich dazu konnte bei autotrophen Wachstum von *A. woodii* bereits ab Natrium-Konzentrationen unter 5 mM ein deutlicher Effekt und bei Natrium-Konzentrationen unter 2,5 mM kein Wachstum mehr nachgewiesen werden (Heise *et al.*, 1989).

3.2. Konstruktion eines Butanol-Synthese-Operons

Um mit *C. ljungdahlii* 1-Butanol aus Synthesegas herstellen zu können, wurde von Sandra Hujer (Universität Ulm) ein künstliches Butanol-Synthese-Operon in *E. coli* konstruiert, welches die Gene der Thiolase (*thlA*), 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase (*hbd*), Crotonase (*crt*), Butyryl-CoA-Dehydrogenase (*bcd*), Butanol-/Butyraldehyd-Dehydrogenase (*adhE*) und Butanol-Dehydrogenase (*bdhA*) aus *C. acetobutylicum* beinhaltet.

Diese Gene werden durch den Promoter P_{ptb} des Phosphotransbutyrylase/Butyrat-Kinase-Operons von *C. acetobutylicum* kontrolliert. Zudem wurde eine alternative Variante unter Kontrolle des Butanol-Dehydrogenase A-Promoters P_{bdhA} von *C. acetobutylicum* hergestellt. Die Termination erfolgte bei beiden Varianten durch den bidirektionalen Terminator der Acetacetat-Decarboxylase T_{adc} von *C. acetobutylicum*.

Für die Konstruktion dieses Butanol-Synthese-Operons wurden die entsprechenden Gene von der chromosomalen DNA von *C. acetobutylicum* DSM 792 (ATCC 824) amplifiziert, dann in *E. coli* in den Vektoren pUC18 und pUC19 sukzessive zusammengefügt und anschließend in den *E. coli*/Clostridien-Schaukelvektor pIMP1 kloniert. Die fertigen Butanol-Synthese-Plasmide (plasmid Synthesis Of Butanol) pSOBP_{ptb} (Abb. 17a) und pSOBP_{bdhA} (Abb. 17b) wurden sequenziert und liegen fehlerfrei in *E. coli* SURE[®] vor (Sandra Hujer, unveröffentlicht).

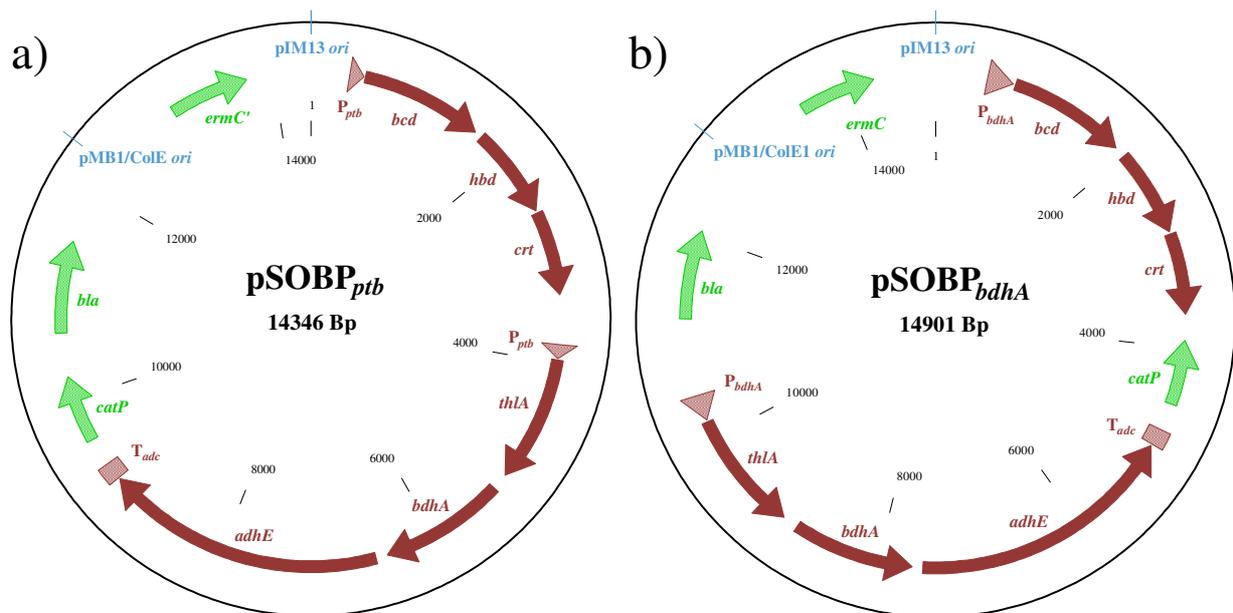


Abb. 17: Plasmidkarte von: a) pSOBP_{ptb} und b) pSOBP_{bdhA}

3.3. Synthese von 1-Butanol in *E. coli*

Bevor das Butanol-Synthese-Operon in *C. ljungdahlii* eingebracht wurde, sollte es noch auf Funktionalität im Zwischenwirt *E. coli* getestet werden.

Hierfür wurden die Plasmide pSOBP_{ptb} und pSOBP_{bdhA} sowie das Kontrollplasmid pIMP1 neben in *E. coli* SURE[®] auch noch in andere *E. coli*-Stämme (BL21(DE3), DH5 α , ER2275, HB101, JM109, M15 [pREP4], WL3, XL1-Blue, XL1-Blue MRF' und XL2-Blue) transformiert, da sich bei der Synthese von Aceton in *E. coli* mit Enzymen aus *C. acetobutylicum* zeigte, dass die Produktion in verschiedenen *E. coli*-Stämmen deutlich variiert (Bermejo *et al.*, 1998).

Anschließend wurden Wachstumsversuche unter aeroben, anaeroben sowie semi-anaeroben Bedingungen in TB-Medium (2.5.1.2.) durchgeführt. Es wurden Proben während des exponentiellen Wachstums und am Ende des Wachstums genommen und danach gaschromatographisch analysiert.

Dabei konnten geringe Butanol-Konzentrationen detektiert werden, aber nicht nur in den *E. coli*-Stämmen, welche die Butanol-Synthese-Plasmide pSOBP_{ptb} bzw. das pSOBP_{bdhA} trugen, sondern auch in den Stämmen, welche das Kontrollplasmid pIMP1 oder kein Plasmid enthielten. *E. coli* kann jedoch 1-Butanol weder als Metabolit noch als Endprodukt bilden. Kalscheuer *et al.* (2006) konnten allerdings nachweisen, dass in "Bacto[®]" Trypton 1-Butanol enthalten sein kann, welches während dessen Herstellung als Extraktionsmittel eingesetzt wird. In dem, in diesem Versuch verwendeten, TB-Medium (2.5.1.2.) kommen große Mengen "Bacto[®]" Trypton vor (12 g/l). Bei Analyse des TB-Mediums im Gaschromatograph stellte sich heraus, dass auch hier 1-Butanol enthalten war.

Deshalb wurde der Versuch mit dem chemisch definierten TM3a/Glucose-Medium (2.5.1.5.) wiederholt, welches kein "Bacto[®]" Trypton enthält. In diesem Medium war gaschromatographisch kein 1-Butanol mehr nachweisbar. Allerdings war sowohl in den Proben der Stämme ohne Plasmid bzw. mit dem Kontrollplasmid pIMP1, als auch in den Proben der Stämme, welche die Butanol-Synthese-Plasmide pSOBP_{ptb} bzw. pSOBP_{bdhA} enthielten, kein 1-Butanol messbar. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass die Butyryl-CoA-Dehydrogenase Bcd in *E. coli* ohne die Elektronentransfer-Flavoproteine EtfA/B aus *C. acetobutylicum* nicht aktiv ist (Inui *et al.*, 2007).

In den Proben des anaeroben und semi-anaeroben Wachstums von *E. coli* WL3 mit den Butanol-Synthese-Plasmiden pSOBP_{ptb} oder pSOBP_{bdhA} konnte hingegen eine höhere Konzentration an Ethanol (1,3-1,5 mM) nachgewiesen werden als in den Proben von *E. coli* WL3 ohne Plasmid oder mit dem Kontrollplasmid pIMP1 (0,4-0,6 mM). *E. coli* WL3 zeichnet sich durch eine mutierte und somit inaktive Alkohol-Dehydrogenase AdhE aus (Lorowitz und Clark, 1982). Die Butanol-/Butyraldehyd-Dehydrogenase AdhE von *C. acetobutylicum*, deren Gen sich auf den Plasmiden pSOBP_{ptb} und pSOBP_{bdhA} befindet, hat jedoch eine 56 %-ige Identität zu diesem Enzym und kann neben Butyraldehyd auch Acetaldehyd als Substrat umsetzen (Nair et al., 1994). Zusätzlich besitzt die Butanol-Dehydrogenase BdhA (bzw. BdhI) von *C. acetobutylicum*, deren Gen ebenfalls auf den Plasmiden pSOBP_{ptb} und pSOBP_{bdhA} liegt, eine hohe unspezifische Aktivität mit Acetaldehyd von etwa 50 % gegenüber der Aktivität mit Butyraldehyd (Welch et al., 1989; Petersen et al., 1991).

3.4. Synthese von 1-Butanol in *C. ljungdahlii*

3.4.1. Elektronentransfer-Flavoproteine von *C. ljungdahlii*

In *E. coli* war es trotz des Einbringens des Butanol-Synthese-Operons nicht möglich, 1-Butanol zu produzieren, was vermutlich am Fehlen der Elektronentransfer-Flavoproteine EtfA/B aus *C. acetobutylicum* liegt (3.3.).

In der Genomsequenz von *C. ljungdahlii* konnten jedoch über das Programm "Clone Manager 7.11" (Scientific & Educational Software, Cary, NJ (USA)) Gene für fünf verschiedene Paare an Elektronentransfer-Flavoproteinen gefunden werden, von denen vier sowohl in der Nukleotid- als auch in der resultierenden Aminosäuresequenz hohe Homologie zu *etfA/B* bzw. EtfA/B von *C. acetobutylicum* aufweisen (Abb. 18). Das fünfte gefundene Elektronentransfer-Flavoprotein-Paar zeigt hingegen nur zu entsprechenden Genen bzw. Proteinen von *C. kluyveri* Homologie.

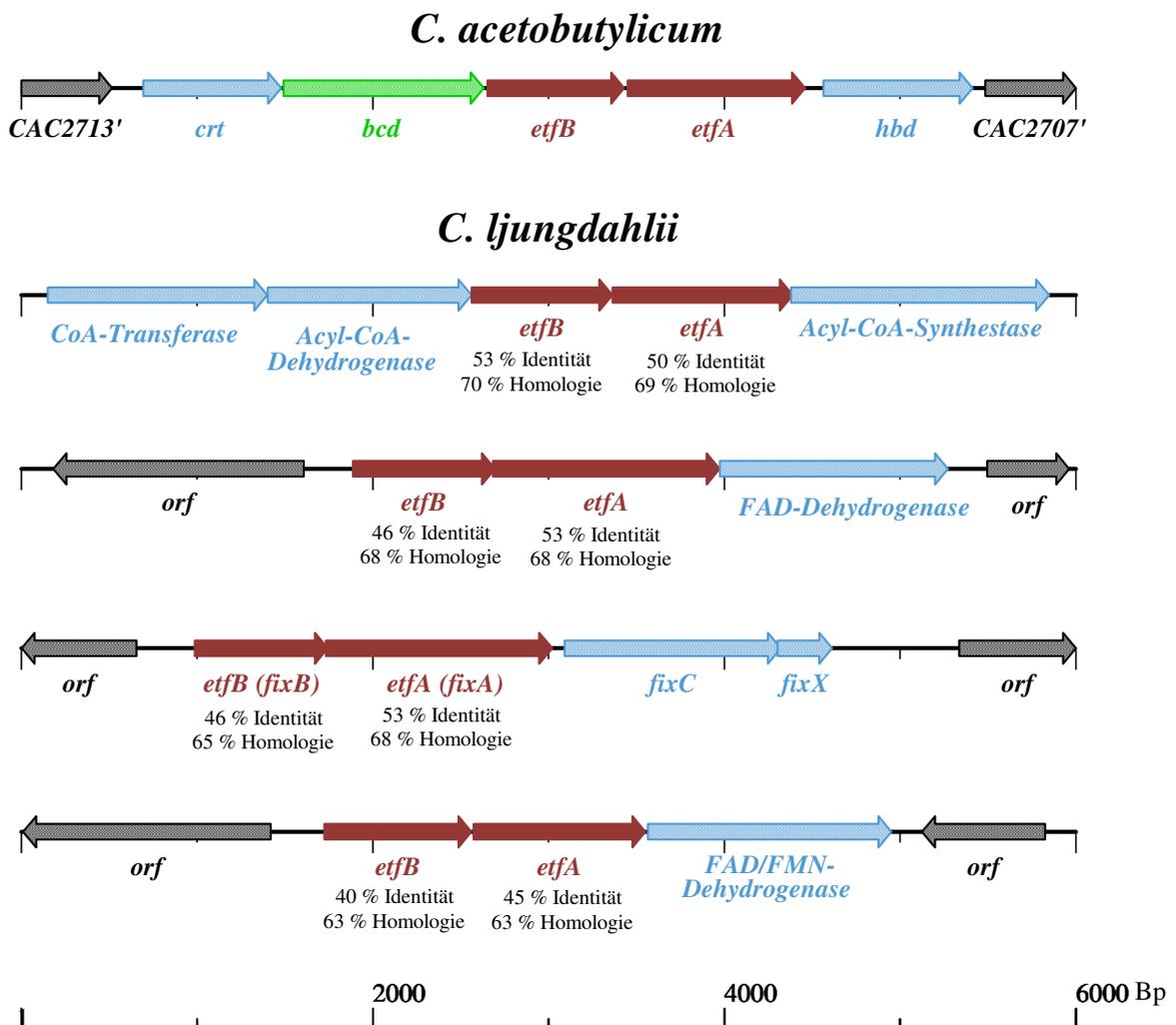


Abb. 18: Vergleich der Gene der Elektronentransfer-Flavoproteine EtfA/B von *C. acetobutylicum* mit *C. ljungdahlii* (die angegebenen Identitäten und Homologien beziehen sich auf die entsprechenden Proteine über deren Gesamtlänge)

3.4.2. Einbringen des Butanol-Synthese-Operons in *C. ljungdahlii*

Um das Butanol-Synthese-Operon in *C. ljungdahlii* einbringen zu können, musste zuerst ein Transformationsprotokoll entwickelt werden (2.7.2.), da hierfür bislang keine Methode etabliert war.

Dies stellte sich jedoch als schwierig heraus, da *C. ljungdahlii* neben der dicken Gram-positiven Zellwand zusätzlich noch eine interne Membranstruktur besitzt (The United States Department of Energy, 1992b) und die Zellen von einer 0,1-0,2 µm dicken Schicht unbekanntem Materials umgeben sind (Tanner *et al.*, 1993) (Abb. 5).

Die Transformation wurde sowohl über Elektrotransformation (2.7.2.2.) als auch über Konjugation (2.7.2.3.) versucht und war schließlich mit einem modifizierten Elektrotransformations-Protokoll für *C. tyrobutyricum*, einem der am nächsten verwandten Organismen von *C. ljungdahlii* (Drake *et al.*, 2006; Collins *et al.*, 1994), erfolgreich (2.7.2.2.). Dabei wurde der Kultur zu Beginn des Wachstums DL-Threonin zugegeben, um die Zellwand durch einen bisher unbekanntem Mechanismus zu "schwächen" (McDonald *et al.*, 1995).

Der Nachweis des Plasmides erfolgte über PCR auf die Butanol-Synthese-Gene unter Verwendung der Oligodesoxynukleotide "adhEfXhoI" und "adhEr" (für *adhE*), "bcdNotI" und "bubcdr" (für *bcd*), "bdhArXhoIPstI" und "BubdhAf" (für *bdhA*), "Bucrtr" und "Bucrtr" (für *crt*), "Buhbdfneu" und "Buhbdr" (für *hbd*), "ButhlAr" und "thlANotI" (für *thlA*), sowie über Restriktionsverdau nach "Plasmid Rescue" (2.6.3.4.).

3.4.3. Wachstumsversuche von *C. ljungdahlii* mit dem Butanol-Synthese-Operon

Nachdem das Butanol-Synthese-Plasmid pSOBP_{ptb} sowie das Kontrollplasmid pIMP1 in *C. ljungdahlii* transformiert waren, wurden Wachstumsversuche auf Fructose (3.4.3.1.) und Synthesegas (3.4.3.2.) als Energie- und Kohlenstoffquelle in 200 bzw. 500 ml ATCC-Medium 1754 (2.1.5.8.) mit 5 µg/ml Clarithromycin in 1000-ml-Kulturflaschen durchgeführt.

Es wurden über den Verlauf des gesamten Wachstums Proben genommen und diese schließlich gaschromatographisch analysiert. Im ATCC-Medium 1754 selbst (ohne Kultur von *C. ljungdahlii*) konnte dabei kein 1-Butanol gemessen werden.

3.4.3.1. Synthese von 1-Butanol aus Fructose

Abb. 19 zeigt den Verlauf des Wachstums sowie die Konzentration an gebildeten Produkten von *C. ljungdahlii* mit dem Kontrollplasmid pIMP1 (Abb. 19a) bzw. mit dem Butanol-Synthese-Plasmid pSOBP_{ptb} auf Fructose (Abb. 19b).

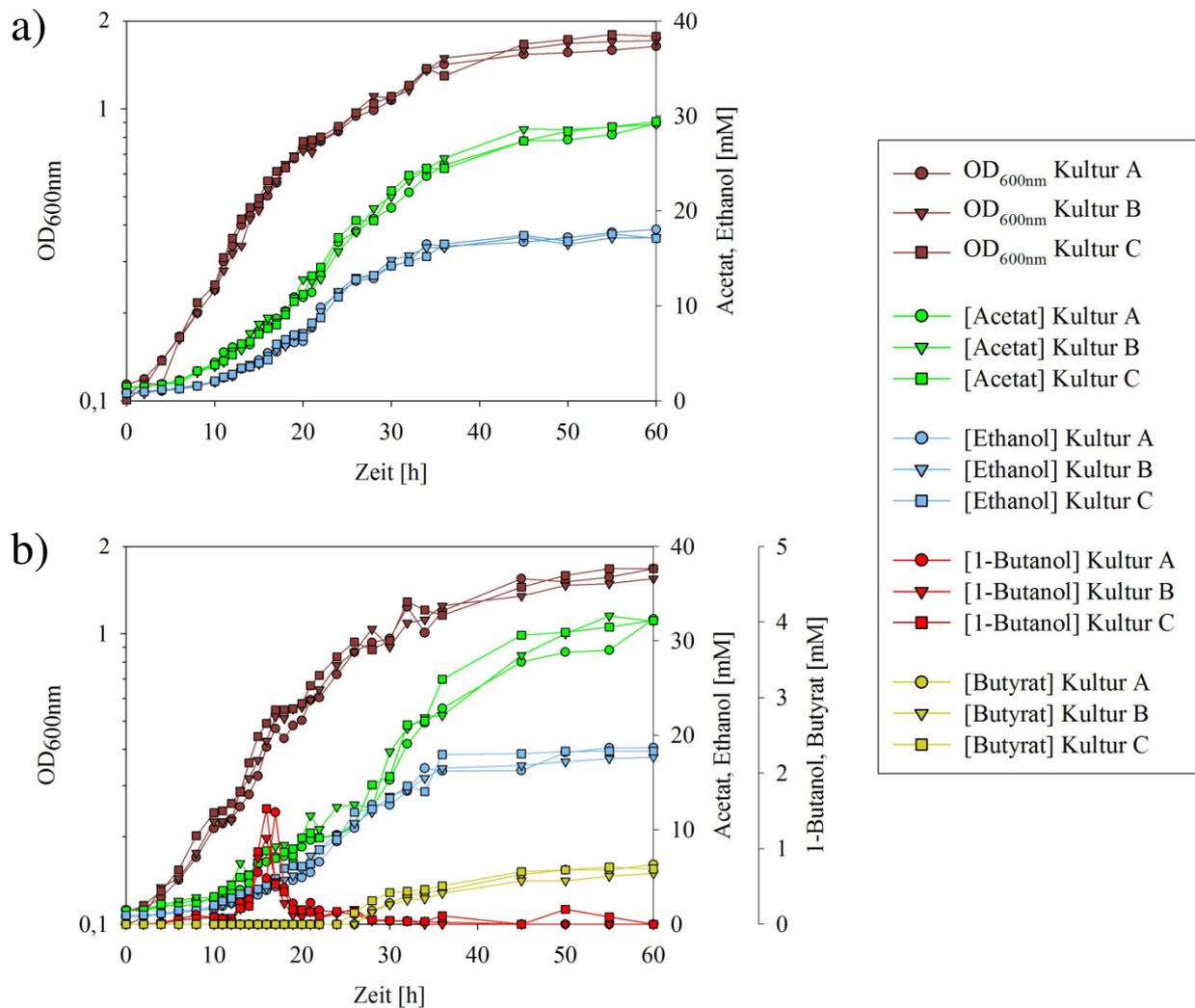


Abb. 19: Wachstum von *C. ljungdahlii* mit a) pIMP1 und b) pSOBP_{ptb} in 500 ml ATCC-Medium 1754 mit Fructose und 5 µg/ml Clarithromycin

Während der WT-Stamm von *C. ljungdahlii* (Abb. 12) und auch der Stamm, welcher den Kontrollvektor pIMP1 trägt (Abb. 19a), kein 1-Butanol aus Fructose produzieren können, kommt es in der mittleren exponentiellen Phase des Wachstums von *C. ljungdahlii* auf Fructose mit dem Butanol-Synthese-Plasmid pSOBP_{ptb} (Abb. 19b) zur Bildung von etwa 1,5 mM 1-Butanol (in weiteren Versuchen konnten bis zu maximal 2 mM 1-Butanol detektiert werden). Die Butanol-Konzentration nimmt jedoch anschließend wieder auf 0,1-0,2 mM ab und stattdessen wird ca. 0,6-0,8 mM Butyrat produziert.

3.4.3.2. Synthese von 1-Butanol aus Synthesegas

Abb. 20 zeigt den Wachstumsverlauf sowie die Produktkonzentrationen von *C. ljungdahlii*, welcher das Kontrollplasmid pIMP1 (Abb. 20a) bzw. das Butanol-Synthese-Plasmid pSOBP_{ptb} trägt, auf Synthesegas (Abb. 20b).

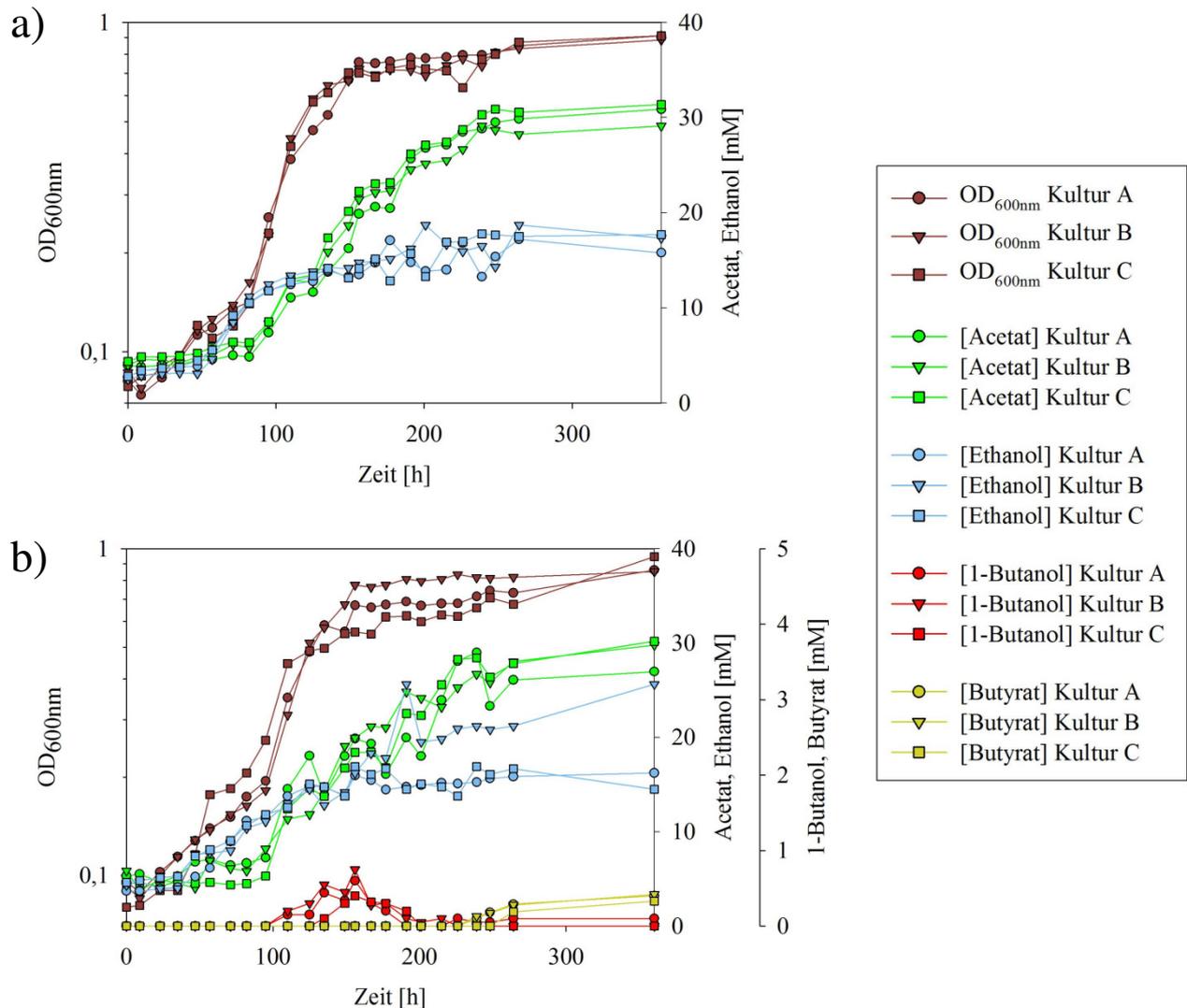


Abb. 20: Wachstum von *C. ljungdahlii* mit a) pIMP1 und b) pSOBP_{ptb} in 200 ml ATCC-Medium 1754 mit Synthesegas und 5 µg/ml Clarithromycin

Weder der WT-Stamm von *C. ljungdahlii* (Abb. 14), noch der der Stamm mit dem Kontrollvektor pIMP1 (Abb. 20a) können 1-Butanol aus Synthesegas produzieren. Der Stamm, welcher das Butanol-Synthese-Plasmid pSOBP_{ptb} enthält, kann hingegen in der Mitte bzw. am Ende des logarithmischen Wachstums knapp 1 mM 1-Butanol bilden (Abb. 20b). Die Butanol-Konzentration geht danach auf ca. 0,1 mM zurück, während etwa 0,4-0,5 mM Butyrat produziert werden.

3.4.4. Verstoffwechslung von 1-Butanol durch *C. ljungdahlii*

In den Vorversuchen konnte bereits gezeigt werden, dass *C. ljungdahlii* nicht auf 1-Butanol als alleinige Energie- und Kohlenstoffquelle wachsen kann (3.1.5.). Allerdings berichteten Huhnke *et al.* (2008), dass *C. ljungdahlii* Butanol verstoffwechseln kann und auch in den Wachstumsversuchen von *C. ljungdahlii* mit dem Butanol-Synthese-Operon (3.4.3.) machte es den Anschein, als wäre der Organismus in der Lage, das produzierte 1-Butanol wieder aufzunehmen und daraus Butyrat zu bilden. Möglicherweise kann *C. ljungdahlii* 1-Butanol in Kombination mit einer anderen Energie- und Kohlenstoffquelle verstoffwechseln.

Um dies zu überprüfen, wurden einer *C. ljungdahlii*-Kultur verschiedene 1-Butanol Konzentrationen (5, 10 und 20 mM) in Verbindung mit Fructose als zusätzliche Energie- und Kohlenstoffquelle zugegeben (Abb. 21).

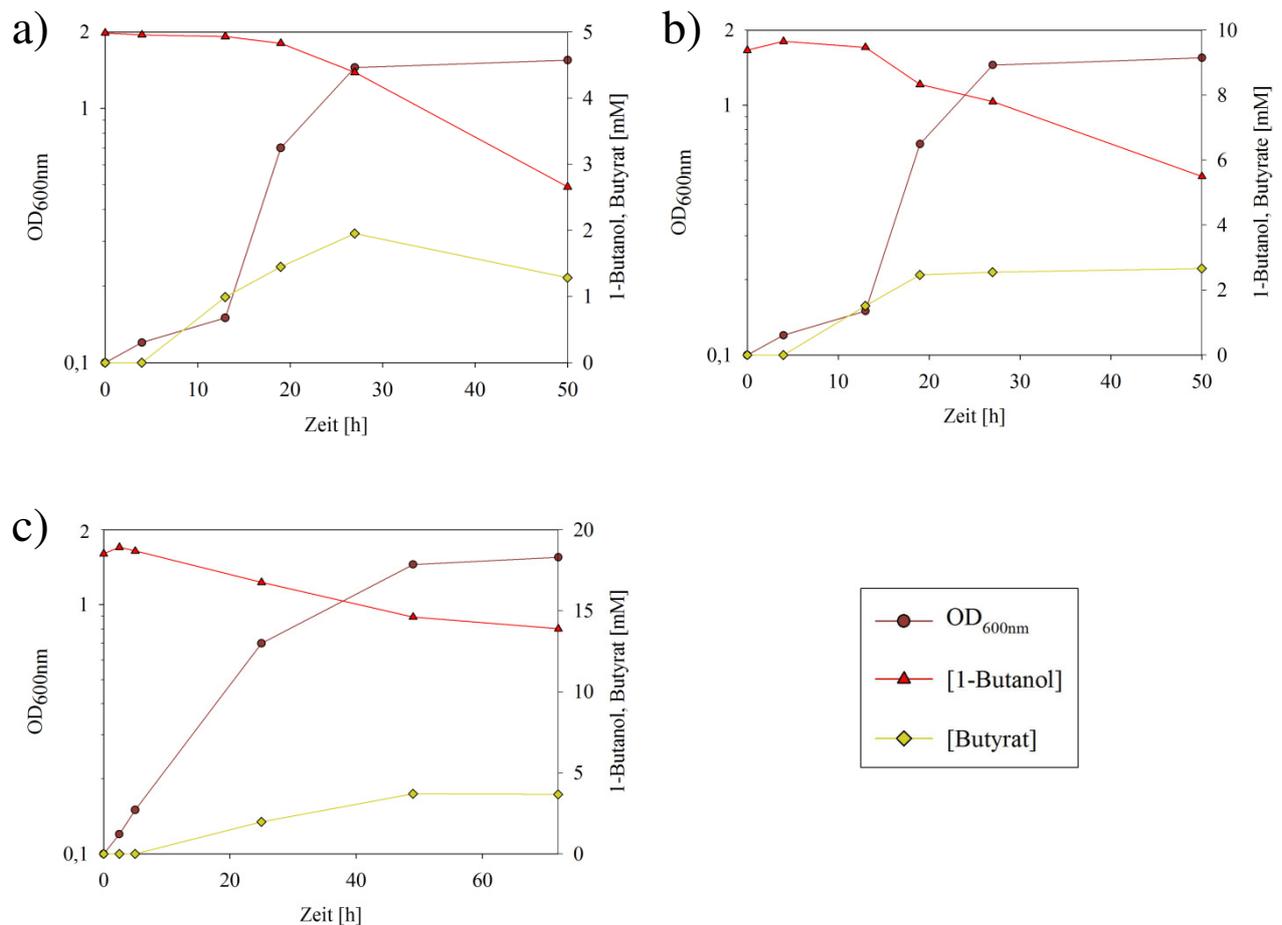


Abb. 21: Wachstum von *C. ljungdahlii* in 50 ml ATCC-Medium 1754 mit Fructose und a) 5 mM 1-Butanol, b) 10 mM 1-Butanol und c) 20 mM 1-Butanol

In Abb. 21 ist zu erkennen, dass jeweils die Konzentration des zugegebenen 1-Butanols während des Verlaufs des Wachstums von *C. ljungdahlii* abnimmt und stattdessen Butyrat gebildet wird. Zur Kontrolle wurden dieselben Konzentrationen an 1-Butanol nur in Medium unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Hier kam es weder zur Abnahme der Butanol-Konzentration, noch zur Bildung von Butyrat.

C. ljungdahlii ist also in der Lage, 1-Butanol zu verstoffwechseln (Abb. 21), allerdings nur in Kombination mit einer anderen Energie- und Kohlenstoffquelle (3.1.5.). Das Verhältnis an verbrauchtem 1-Butanol zu gebildetem Butyrat entspricht dabei etwa 1,5-1,8 (Abb. 21). Dies korreliert mit der Verstoffwechslung des produzierten 1-Butanols zu Butyrat in den Wachstumsversuchen mit *C. ljungdahlii* und dem Butanol-Synthese-Operon (3.4.3.).

3.4.5. Expression der Butanol-Synthese-Gene in *C. ljungdahlii*

Bei genauerer Analyse der Butanol-Synthese-Plasmide pSOBP_{ptb} und pSOBP_{bdhA} (Abb. 17) mit dem Programm "Clone Manager 7.11" (Scientific & Educational Software, Cary, NJ (USA)) wurden Haarnadelstrukturen stromaufwärts der Gene *bdhA* bzw. *adhE* entdeckt (Abb. 22).

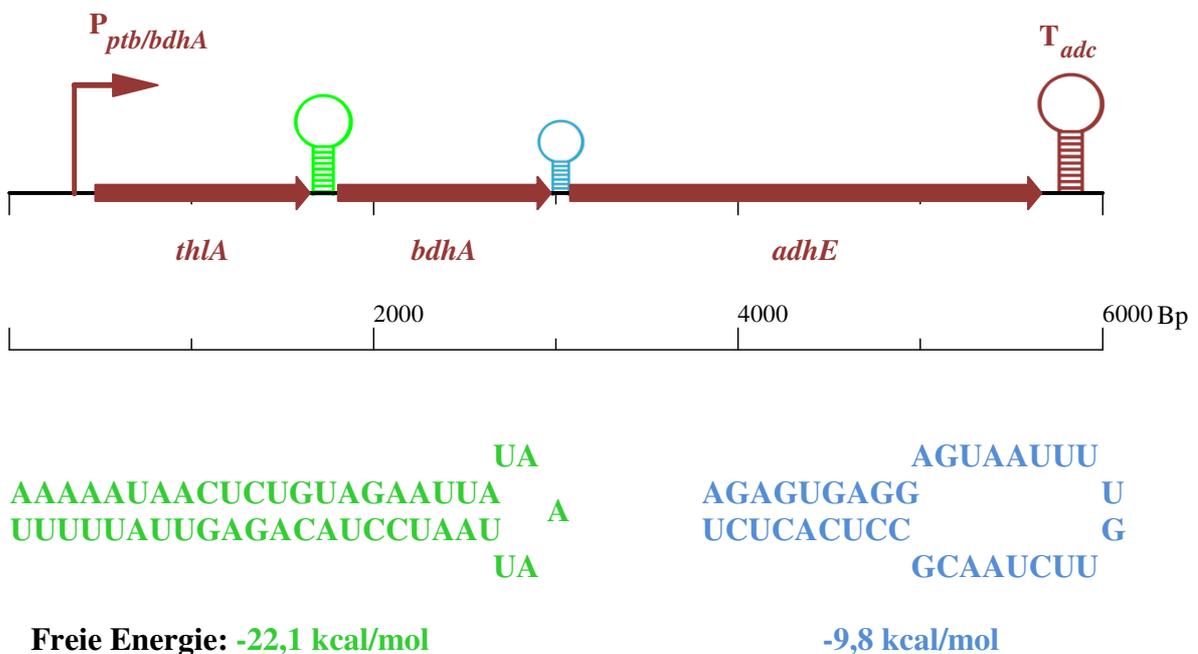


Abb. 22: Darstellung des *thlA*-*bdhA*-*adhE*-Fragmentes des Butanol-Synthese-Operons mit den beiden Haarnadelstrukturen sowie deren Sequenz und Energiegehalt

Bei diesen Strukturen handelt es sich um Teile der abgeleiteten *thlA*- (Stim-Herndon *et al.*, 1995) bzw. *bdhA*- (Walter *et al.*, 1992) Terminator-Sequenzen, wobei jeweils der untere Teil des Stammes sowie die komplette Poly-A-Region fehlen. Diese Haarnadelstrukturen könnten zu einem Stopp der Transkription vor *bdhA* oder *adhE* führen. Dagegen spricht allerdings, dass mit dem Butanol-Synthese-Operon in *E. coli* WL3 Ethanol (3.3.) und in *C. ljungdahlii* 1-Butanol (3.4.3.) produziert wird. Dennoch könnte die Expression des *bdhA*- bzw. *adhE*-Gens negativ beeinflusst sein.

Um dies zu untersuchen, wurden "Northern Blot"-Experimente (2.6.9.) mit *thlA* und *adhE* durchgeführt. Als Kontrolle diente das Acetat-Kinase-Gen *ack* von *C. ljungdahlii*, welches aufgrund der hohen Homologie zu anderen Clostridien relativ einfach mit Hilfe des Programms "Clone Manager 7.11" (Scientific & Educational Software, Cary, NJ (USA)) in der Genomsequenz von *C. ljungdahlii* identifiziert werden konnte (Abb. 23). Die Acetat-Kinase katalysiert den letzten Schritt (von Acetyl-Phosphat zu Acetat) bei der Bildung des Hauptproduktes Acetat, weshalb ihr Gen stark exprimiert werden sollte.

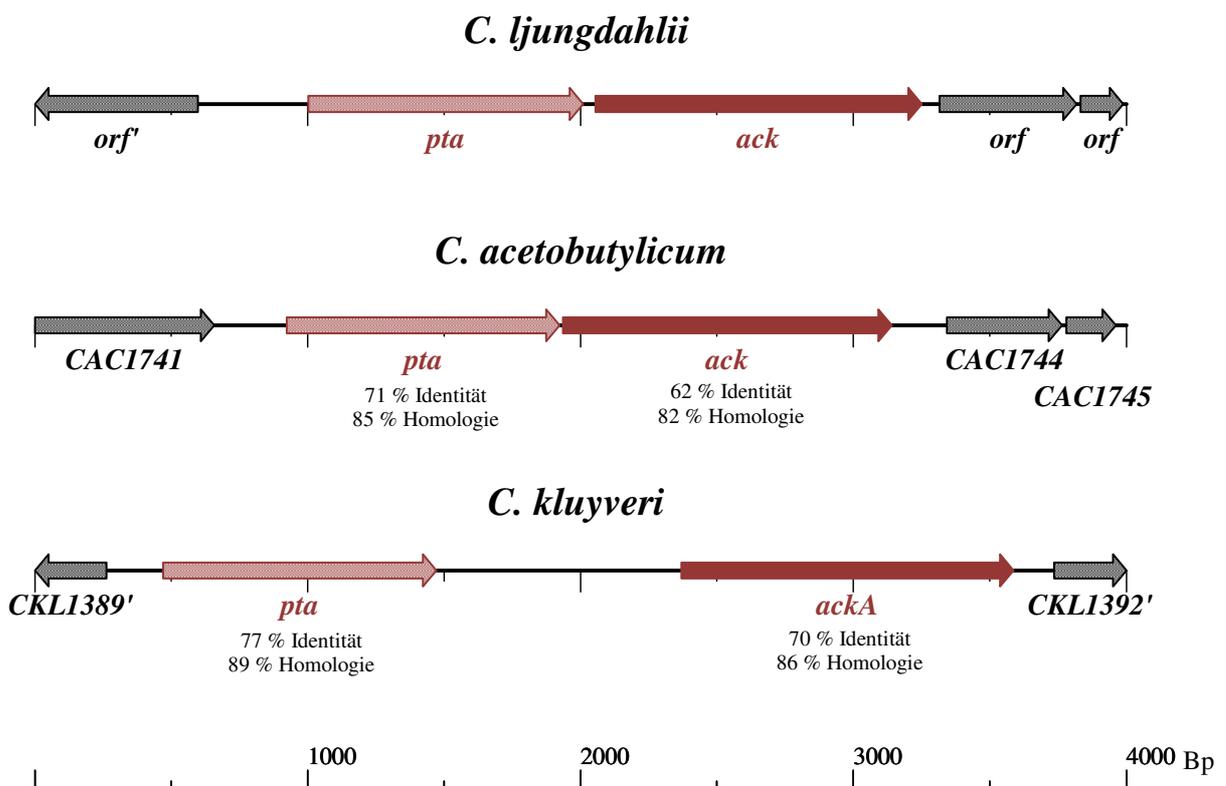


Abb. 23: Vergleich der Gene für die Phosphotransacetylase (*pta*) und die Acetat-Kinase (*ack*) von *C. ljungdahlii* mit anderen Clostridien. (die angegebenen Identitäten und Homologien beziehen sich auf die entsprechenden Proteine über deren Gesamtlänge)

Von den entsprechenden Genen (*thlA*, *adhE* und *ack*) wurden über PCR von pSOBP_{ptb}-Plasmid-DNA bzw. chromosomaler DNA von *C. ljungdahlii* etwa 500 Bp große DNA-Sonden mit den Oligodesoxynukleotiden “pSOB-*thlA*-Sonde-F“ und “pSOB-*thlA*-Sonde-R“ (für die *thlA*-Sonde), “pSOB-*adhE*-Sonde-F“ und “pSOB-*adhE*-Sonde-R“ (für die *adhE*-Sonde) sowie “Clj-*ack*-Sonde-F“ und “Clj-*ack*-Sonde-R“ (für die *ack*-Sonde) amplifiziert. Diese DNA-Sonden wurden anschließend radioaktiv markiert (2.6.10.). Danach wurde einer Kultur von *C. ljungdahlii* mit dem Plasmid pSOBP_{ptb} in ATCC-Medium 1754 mit Fructose jeweils eine Probe während des exponentiellen Wachstums und der stationären Phase entnommen. Daraus wurde die RNA isoliert (2.6.3.5.), welche dann auf eine Nylonmembran transferiert (2.6.9.) und mit den radioaktiv markierten DNA-Sonden hybridisiert (2.6.11.) wurde. Die Detektion (2.6.12.) erfolgte auf einem Röntgenfilm (Abb. 24).

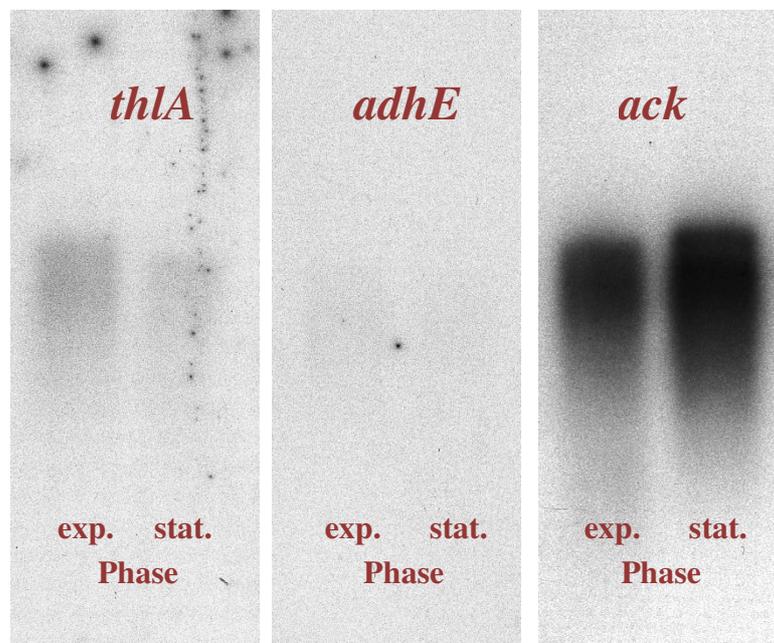


Abb. 24: Expression des *thlA*- und *adhE*-Gens (von Plasmid pSOBP_{ptb}) sowie des *ack*-Gens in *C. ljungdahlii* während der exponentiellen (exp.) und stationären (stat.) Phase

Anhand der “Northern Blot“-Experimente in *C. ljungdahlii* (Abb. 24) sieht man, dass das *adhE*-Gen (und somit auch das davor gelegene *bdhA*-Gen) trotz der beiden stromaufwärts gelegenen Haarnadelstrukturen (Abb. 22) transkribiert wird, wenngleich die Höhe der Expression signifikant geringer ist als jene von *thlA*. Die beiden Haarnadelstrukturen schwächen die Expression also deutlich ab.

Darüber hinaus geht aus Abb. 24 hervor, dass das als Kontrolle verwendete *ack*-Gen von *C. ljungdahlii* um ein vielfaches stärker exprimiert wird als das plasmidkodierte *thlA*-Gen (wobei die Kopienzahl von Plasmiden mit pIM13-Replikationsursprung in *C. acetobutylicum* bei etwa 7-10 Kopien pro Zelle liegt (Lee *et al.*, 1993)). Der Promoter des Acetat-Kinase-Gens *ack* (welches wahrscheinlich, wie auch in *C. acetobutylicum* (Boynton *et al.*, 1996b), mit dem stromaufwärts liegenden Phosphotransacetylase-Gen *pta* (Abb. 23) ein Operon bildet) ist also deutlich stärker als der für die Expression des Butanol-Synthese-Operons verwendete Promoter P_{ptb} aus *C. acetobutylicum*.

Desweiteren ist in Abb. 24 zu erkennen, dass der *ptb*-Promoter in *C. ljungdahlii* während der exponentiellen Wachstumsphase aktiver ist als in der stationären Phase. Dies korreliert mit dem Verlauf der Butanol-Bildung in *C. ljungdahlii* mit dem Butanol-Synthese-Operon (3.4.3.), welches unter Kontrolle von eben diesem Promoter steht, sowie mit dem Aktivitätsprofil des *ptb*-Promoters (Feustel *et al.*, 2004) und dem Expressionsprofil des *ptb*-Gens (Alsaker und Papoutsakis, 2005) in *C. acetobutylicum*.

Bei einem Vergleich der *ptb*-Promoter-Sequenz mit der Genomsequenz von *C. ljungdahlii* über das Programm "Clone Manager 7.11" (Scientific & Educational Software, Cary, NJ (USA)) konnte ein homologer Bereich direkt vor einem *orf* entdeckt werden (Abb. 25).

C. acetobutylicum *ptb*-Promoter-Region:

```

      -35          -10
ATTTTCTAAAAAC-----TAACTTCATGTGAAAAGT-----TTGT TAAATATAAA
TAAAAGATTTTTTG-----AATTGAGTACACTTTTCA-----AACAAATTTATATTT

+1          RBS          Start
TGAGCACGTTAATCATTTAACATAGATAATTAATAGTAAAAGGGAGTGTACGACCA GTG
ACTCGTGCAATTAGTAAATTGTATCTATTAATTTATCATTTTCCCTCACATGCTGGT CAC

```

Homologe Region in *C. ljungdahlii*:

```

      -35          -10
ATTTT TGAAAA GCAATTTCTAAGTGTATG-CAAAAGTAAGTTACTT-TTCTATTATAAA
TAAAAC TTTTT CGTTAAAGATTCA CATA C-GTTTTCATTCAATGAA-AAGATAATATTT

+1          RBS          Start
TTA-CACG-----ATTTAAT-TAATAATTAATGTAAAAGGGAG-GAAAAGT-ATG
AAT-GTGC-----TAAATTA-ATTATTAATTTACATTTTCCCTC-CTTTTTCA-TAC

```

Abb. 25: Vergleich der *ptb*-Promoter-Region von *C. acetobutylicum* (Walter *et al.*, 1993) mit der Genomsequenz von *C. ljungdahlii*

Beim Vergleich des Genprodukts dieses *orf* mit der Datenbank “Protein Basic Local Alignment Search Tool (BLASTP)” (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?PAGE=Proteins&PROGRAM=blastp&BLAST_PROGRAMS=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome; McGinnis und Madden, 2004; Altschul *et al.*, 1990) konnte über die gesamte Aminosäuresequenz eine 62 %-ige Identität und eine 76 %-ige Homologie mit einer Allophanat-Hydrolase von *Pelotomaculum thermopropionicum* (welches ebenfalls zur Klasse *Clostridia* gehört) gefunden werden.

Möglicherweise kann die Expression des potentiellen Allophanat-Hydrolase-Gens von *C. ljungdahlii* durch Zugabe des entsprechenden Substrates induziert bzw. gesteigert werden. Aufgrund der hohen Homologie des Promoter-Bereiches (Abb. 25) könnte dadurch eventuell auch die Aktivität des *ptb*-Promoters gesteigert werden. Dies wurde in Wachstumsversuchen und durch “Northern Blot“-Experimente (2.6.9.) untersucht. Da Allophanat sehr teuer ist, wurden stattdessen die Struktur-Analoga Biuret, Malonat oder Malonamid verwendet (Shapir *et al.*, 2006). Zusätzlich wurde noch Harnstoff eingesetzt, da beschrieben ist, dass Allophanat-Hydrolasen am Harnstoff-Metabolismus beteiligt sind (Kanamori *et al.*, 2004). Die Substanzen wurden Kulturen von *C. ljungdahlii* mit dem Butanol-Synthese-Plasmid pSOBP_{ptb} in verschiedenen Konzentrationen (1, 5 und 10 mM) zugesetzt und anschließend die Butanol-Konzentrationen bzw. die Expression der Gene mit Kulturen verglichen, bei denen keine Zugabe erfolgte. Dabei war einmalig ein Effekt zu erkennen, welcher allerdings nicht reproduzierbar war.

3.5. Verbesserung des Butanol-Synthese-Operons

Da die Expression des *bdhA*- und *adhE*-Gens auf dem Butanol-Synthese-Plasmid pSOBP_{ptb} in *C. ljungdahlii* aufgrund der beiden Haarnadelstrukturen deutlich abgeschwächt ist (3.4.5.), wurde versucht, diese Haarnadelstrukturen zu entfernen. Es wurde nach geeigneten Schnittstellen gesucht, um ein Fragment mit den beiden Haarnadelstrukturen sowie das dazwischengelegene *bdhA*-Gen herauszuschneiden (Abb. 17). Anschließend könnte ein entsprechendes Fragment ohne die Haarnadelstrukturen in den geschnittenen Vektor ligiert werden.

Im Rahmen dieser Klonierung könnte zudem das Butanol-Dehydrogenase-Gen *bdhA* gegen *bdhB* ausgetauscht werden, da dessen Genprodukt BdhB (bzw. BdhII) eine höhere Aktivität

und Spezifität mit Butyraldehyd hat als BdhA (bzw. BdhI) (Walter *et al.*, 1992; Petersen *et al.*, 1991; Welch *et al.*, 1989).

Auf dem Butanol-Synthese-Plasmid pSOBP_{ptb} konnten jedoch keine passenden Schnittstellen gefunden werden, welche nicht auch noch an einer anderen Stelle im Plasmid schneiden. Zudem wurde eine geeignete *XhoI*-Schnittstelle vor *adhE* während der Klonierung des Butanols-Synthese-Operons (3.2.) zerstört (Sandra Hujer, unveröffentlicht).

Deshalb wurde die Klonierung eines verbesserten Butanol-Synthese-Operons (Abb. 26) ausgehend von Plasmid pSUC19.5 (einer Vorläuferstufe des Butanol-Synthese-Plasmides pSOBP_{ptb}; Sandra Hujer, unveröffentlicht), welches den Bereich P_{ptb}-*thlA*-*bdhA*-*adhE*-T_{adc} ebenfalls enthält, durchgeführt. Auf diesem Plasmid konnten passende Erkennungssequenzen gefunden werden, über die sich ein entsprechendes Fragment mit den beiden Haarnadelstrukturen (allerdings auch den Genen *thlA* und *bdhA* sowie einem Teil des *adhE*-Gens) durch die Restriktionsenzyme *NotI* und *BshTI* herausschneiden ließ. Der fehlende Teil des *adhE*-Gens wurde danach über eine PCR mit den Oligodesoxynukleotiden "pSOBP_{ptb}neu-F-NotIXhoI" und "pSOBP_{ptb}neu-R-BshTI" von Plasmid pSOBP_{ptb} amplifiziert, mit den Restriktionsendonukleasen *NotI* und *BshTI* verdaut und in das Plasmid pSUC19.5 ligiert (Bezeichnung des neuen Plasmides: pSUC19.6). Mit Hilfe der PCR wurde zusätzlich noch eine *XhoI*-Schnittstelle eingebaut, über welche anschließend ein Fragment mit den Genen *thlA* und *bdhB* aus Plasmid pUC19+*ptb*_*thlA4*_*bdhB1* (Stefanie Schuster, unveröffentlicht) eingefügt werden konnte. Aus dem daraus entstandenen Plasmid pSUC19.7 kann anschließend der komplette Bereich P_{ptb}-*thlA*-*bdhB*-*adhE*-T_{adc} (inklusive Chloramphenicol-Resistenzkassette *catP* zur Selektion) mit der Restriktionsendonuklease *BbeI* ausgeschnitten werden und ungerichtet in das Plasmid pSOB18_{ptb} (Sandra Hujer, unveröffentlicht), welches bereits den Bereich P_{ptb}-*bcd*-*hbd*-*crt* im Vektor pIMP1 enthält, zu einem neuen, verbesserten Butanol-Synthese-Plasmid pSOBP_{ptb}2.0 ligiert werden (Abb. 26).

Die Klonierung von pSUC19.6 und pSUC19.7 wurde erfolgreich durchgeführt. Während pSUC19.6 mutationsfrei vorliegt, konnten allerdings bei der Sequenzierung verschiedener Klone mit Plasmid pSUC19.7 Mutationen in den Genen *thlA* und *bhdB*, welche in einer geänderten Aminosäuresequenz der entsprechenden Enzyme ThlA und BdhB (bzw. BdhII) resultieren, gefunden werden. Dieser Klonierungsschritt muss daher nochmals wiederholt werden. Danach steht noch die Klonierung des Bereichs P_{ptb}-*thlA*-*bdhB*-*adhE*-T_{adc}-*catP* von pSUC19.7 in pSOB18_{ptb} zu pSOBP_{ptb}2.0 aus (Abb. 26).

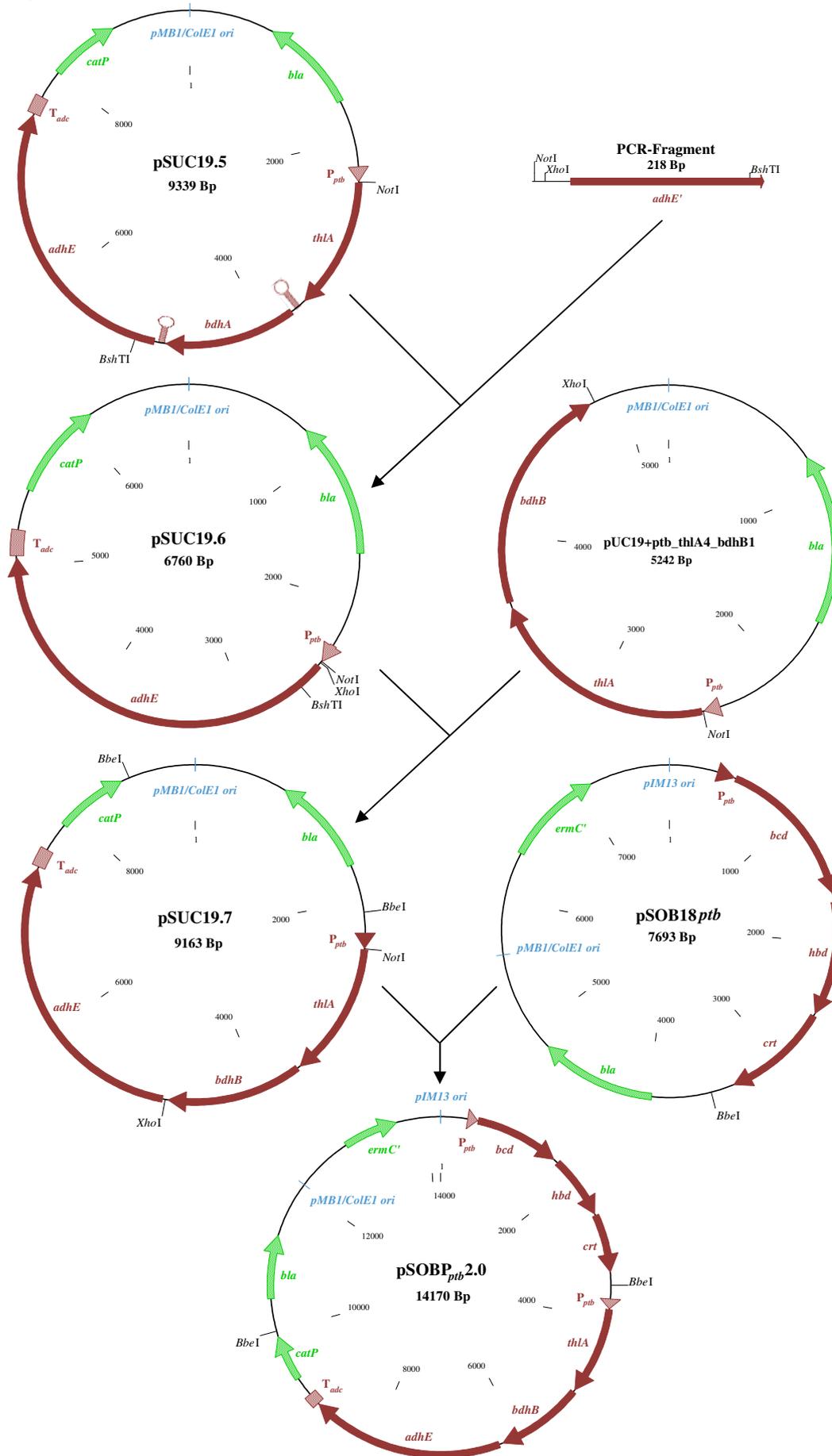


Abb. 26: Klonierungsschema eines verbesserten Butanol-Synthese-Operons

3.6. Versuche mit *C. carboxidivorans* als alternativer Produktionsorganismus zu *C. ljungdahlii*

Im Laufe der vorliegenden Arbeit wurde ein neues acetogenes *Clostridium*, welches nahe verwandt mit *C. ljungdahlii* ist, beschrieben (Liou *et al.*, 2005). Der Organismus wurde *C. carboxidivorans* genannt und zeichnet sich, wie der Name bereits vermuten lässt, durch gutes Wachstum auf CO aus (Verdopplungszeit $t_D = 4,3$ h und Wachstumsrate $\mu = 0,16$ h⁻¹). Darüber hinaus ist bereits der WT von *C. carboxidivorans* in der Lage, neben Acetat und Ethanol auch 1-Butanol zu produzieren (Liou *et al.*, 2005).

Es wurden Versuche durchgeführt, ob sich dieser Organismus als alternativer Produktionsorganismus zu *C. ljungdahlii* für die Synthese von 1-Butanol aus Synthesegas eignet. Zum einen wurde das Wachstum auf Synthesegas untersucht und zum anderen versucht, eine Methode zur Transformation zu entwickeln, da auch für diesen Organismus bisher keine entsprechende Methode etabliert ist.

Es wurden mehrere verschiedene Transformationsprotokolle (2.7.2.2.) getestet, jedoch war keine der Transformationen erfolgreich. Allerdings wurde ausschließlich Elektrotransformation angewandt. Möglicherweise ist bei diesem Organismus eine Konjugation erfolgversprechender.

Überdies ist es bisher nicht gelungen, *C. carboxidivorans* auf Synthesegas zu adaptieren. Die Anzucht erfolgte wie von der Stammsammlung DSMZ beschrieben in Wilkins-Chalgren-Medium (2.5.1.7.). Dieses Medium enthält jedoch große Mengen an Komplexbestandteilen (10 g/l Trypton, 10 g/l Gelatinepepton und 5 g/l Hefeextrakt; Wilkins und Chalgren, 1976; http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0643&c=UK&lang=EN). Nach Transfer von diesem Medium in ATCC-Medium 1754 (2.5.1.8.), welches für das Isolieren von *C. carboxidivorans* benutzt wurde (Liou *et al.*, 2005; Rajagopalan *et al.*, 2002), konnte, unabhängig von der verwendeten Kohlenstoff- und Energiequelle (ob Synthesegas oder Glucose), kein Wachstum beobachtet werden. Auch in anderen acetogenen Medien, wie dem DSMZ-Medium 879 (2.5.1.9.) oder dem AC-11-Medium (2.5.1.11.) war kein Wachstum erkennbar. Möglicherweise bedarf es einer schrittweisen Adaption an diese Medien, durch abnehmende Zugabe von Komplexbestandteilen.

3.7. Charakterisierung von neuen potentiellen Butanol-Dehydrogenasen aus Metagenombanken

Im Zuge der Diplomarbeit (Köpke, 2004) wurden neue potentielle Butanol-Dehydrogenasen, welche eventuell das Butanol-Synthese-Operon verbessern könnten, identifiziert.

Es wurden drei Metagenombanken (2.6.16.1.) aus dem Sediment des "Solar Lake" (Ägypten), einem Zuckerrübenfeld bei Göttingen sowie aus Komposterde nach Aktivität durchmustert (2.6.16.2.). Von über 100000 getesteten Klonen zeigten vier eine positive Reaktion. Diese Klone enthielten die Plasmide pAK110 und pAK115 (Knietsch *et al.*, 2003a) sowie pTWB3 und pTWB4 (Waschkowitz, 2006) (Abb. 27).

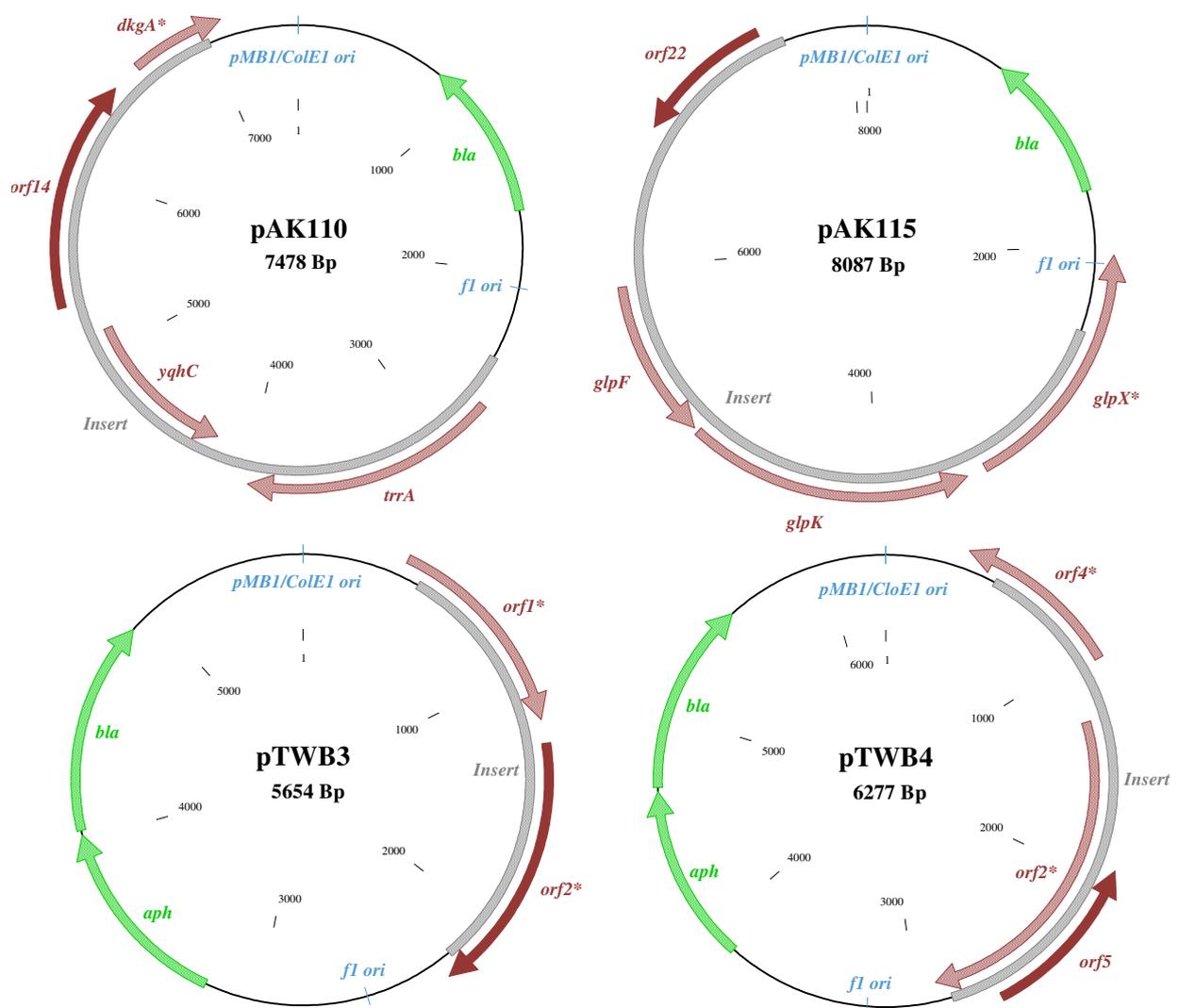


Abb. 27: Plasmidkarte von a) pAK110, b) pAK115, c) pTWB3 und d) pTWB4 (die Aktivität vermittelnden offenen Leserahmen (*orf*) sind hervorgehoben)

Die Sequenzen dieser Plasmide wurden mit den Programmen “Clone Manager 7.11“ (Scientific & Educational Software, Cary, NJ (USA)) und “MetaGeneAnnotator“ (<http://metagene.cb.k.u-tokyo.ac.jp/metagene/>; Noguchi *et al.*, 2006) nach offenen Leserahmen durchsucht, welche anschließend auf eine passende Ribosomenbindungsstelle hin geprüft wurden. Dabei konnten in jedem Insert mehrere offene Leserahmen (*orf*) gefunden werden, von denen einige durch die Vektorsequenz vervollständigt werden (Abb. 27). Zwei dieser offenen Leserahmen überlappen sich zudem komplett, was jedoch in vielen Bakterien vorkommt (Sakharkar *et al.*, 2005).

Durch Subklonierung der einzelnen offenen Leserahmen in einen pUC18-Vektor und anschließende Bestimmung der Enzymaktivität in *E. coli* WL3 konnte herausgefunden werden, dass die offenen Leserahmen pAK110 *orf14*, pAK115 *orf22*, pTWB3 *orf2* und pTWB4 *orf5* die Butanol-Dehydrogenase-Aktivität vermitteln (Köpke, 2004).

Die entsprechenden Genprodukte dieser offenen Leserahmen sollten nun genauer charakterisiert werden. Zum einen erfolgte ein Vergleich mit bekannten Proteinen und zum anderen wurden die molekulare Masse, Enzymkinetiken, Co-Substrat und mögliche Co-Faktoren bestimmt sowie das Substratspektrum und das pH-Optimum untersucht.

Dafür mussten die Proteine gereinigt und in ausreichender Konzentration vorliegen. Um dies zu erreichen, wurden das pET- (2.8.2.1.) und das pQE- (2.8.2.2.) Expressionssystem verwendet. Die offenen Leserahmen pAK110 *orf14*, pAK115 *orf22*, pTWB3 *orf2* und pTWB4 *orf5* wurden in die Überexpressionsvektoren pET-29a(+) und pQE-30 kloniert und mit einer C- bzw. N-terminalen “His-Tag“-kodierenden Sequenz fusioniert (die Klonierung von pAK110 *orf14* erfolgte nur in pQE-30, da in pET29-a(+)keine passenden Schnittstellen vorhanden waren). Danach konnten die offenen Leserahmen in *E. coli* überexprimiert (2.8.2.) und deren Genprodukte anschließend anhand des fusionierten “His-Tags“ gereinigt (2.8.3.1.) werden. Die molekulare Masse konnte durch eine SDS-PAGE bestimmt werden (2.8.9.) und die weitere Charakterisierung erfolgte durch Enzymtests (2.8.6.).

Der Vergleich mit bekannten Proteinen geschah über die Datenbank “Protein Basic Local Alignment Search Tool (BLASTP)” (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?PAGE=Proteins&PROGRAM=blastp&BLAST_PROGRAMS=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome; McGinnis und Madden, 2004; Altschul *et al.*, 1990) und die Suche nach Motiven oder Domänen in der Aminosäuresequenz mit dem Programm “Motif Scan” (http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan; Pagni *et al.*, 2007; Hulo *et al.*, 2008). Die Vorhersage der molekularen Masse wurde mit dem Programm “Clone Manager 7.11” (Scientific & Educational Software, Cary, NJ (USA)) durchgeführt.

3.7.1. Charakterisierung des Genprodukts von pAK110 *orf14*

3.7.1.1. Vergleich mit bekannten Proteinen

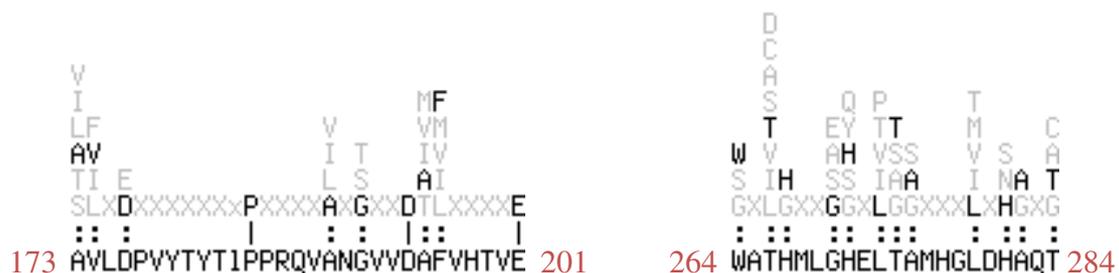
Das Genprodukt von pAK110 *orf14* hat eine Gesamtlänge von 387 Aminosäuren und zeigt hohe Identität zu bekannten Alkohol-Dehydrogenasen von verschiedenen Enterobakterien (Tab. 76). Von diesen Enzymen ist bisher nur die Alkohol-Dehydrogenase YqhD von *E. coli* näher untersucht worden (Pérez *et al.*, 2008; Sulzenbacher *et al.*, 2004). Dieses NADP⁺-abhängige Enzym zeigt Aktivität mit Acetaldehyd, Malondialdehyd, Propanaldehyd, Butanaldehyd und Acrolein (Pérez *et al.*, 2008) sowie höheren Alkoholen (Sulzenbacher *et al.*, 2004). Darüber hinaus wurde dieses Enzym von Donaldson *et al.* (2007) bei der Produktion von 1-Butanol mit *E. coli* als Butanol-Dehydrogenase eingesetzt.

Überdies konnte auch eine Homologie zwischen dem Genprodukt von pAK110 *orf14* und drei Butanol-Dehydrogenasen von *C. acetobutylicum* gefunden werden (Tab. 76).

Tab. 76: Vergleich des Genprodukts von pAK110 *orf14* mit bekannten Proteinen

| Organismus | Protein | Identität | Homologie |
|-----------------------------------|---|----------------------|----------------------|
| <i>Citrobacter koseri</i> | hypothetisches Protein | 94 % (367/387 As) | 97 % (377/387 As) |
| <i>Salmonella enterica</i> | Alkohol-Dehydrogenase YqhD | 90 % (351/387 As) | 95 % (370/387 As) |
| <i>Salmonella typhimurium</i> | Alkohol-Dehydrogenase YqhD | 90 % (349/387 As) | 95 % (368/387 As) |
| <i>Escherichia fergusonii</i> | NAD(P)-abhängige Alkohol-Dehydrogenase | 90 % (351/387 As) | 94 % (365/387 As) |
| <i>Escherichia coli</i> | Alkohol-Dehydrogenase YqhD | 89 % (345/387 As) | 94 % (365/387 As) |
| <i>Clostridium acetobutylicum</i> | Butanol-Dehydrogenase CAC3392 | 55 % (217/388 As) | 70 % (274/388 As) |
| | Butanol-Dehydrogenase BdhB (BdhII) | 39 % (147/375 As) | 57 % (216/357 As) |
| | Butanol-Dehydrogenase BdhA (BdhI) | 35 % (139/392 As) | 55 % (219/392 As) |

Zudem konnte in der Aminosäuresequenz eine Eisen-abhängige Alkohol-Dehydrogenase-Familien-Domäne an Position 9-374 gefunden werden, welche zwei deutliche Eisen-abhängige Alkohol-Dehydrogenase-Motive (Abb. 28) an den Positionen 173-201 und 264-284 aufweist.

**Abb. 28: Alkohol-Dehydrogenase-Motive des Genprodukts von pAK110 *orf14***

3.7.1.2. Bestimmung der molekularen Masse

In Abb. 29 ist die Kontrolle der Überproduktion und der Reinigung des Genprodukts von pAK110 *orf14* in einer SDS-PAGE dargestellt. Daraus kann man entnehmen, dass das Genprodukt von pAK110 *orf14* inklusive des fusionierten "His-Tags" eine molekulare Masse von 40 kDa hat. Dies korreliert mit der berechneten molekularen Masse von 42 kDa (ohne "His-Tag") bzw. 44 kDa (mit "His-Tag").

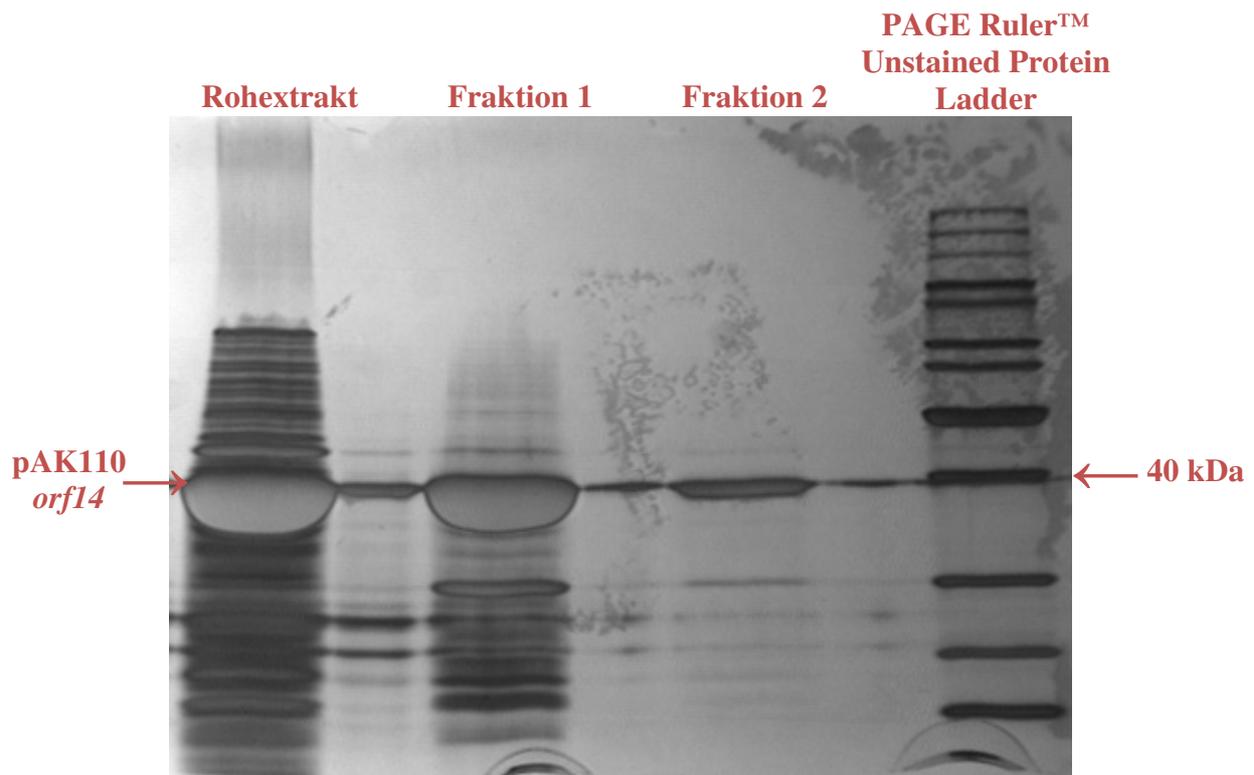


Abb. 29: Kontrolle der Überproduktion und der Reinigung des Genprodukts von pAK110 *orf14* (mit N-terminalem "His-Tag") in einer SDS-PAGE:

Fraktion 1: 100 mM Imidazol, Fraktion 2: 200 mM Imidazol

3.7.1.3. Enzymkinetiken

Das gereinigte Genprodukt von pAK110 *orf14* (mit einer N-terminalen "His-Tag"-Fusion) zeigte deutliche Enzymaktivität mit Butyraldehyd als Substrat. Dabei konnte eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit V_{\max} von 0,205 U/mg und eine Michaelis-Menten-Konstante K_m von 11 mM ermittelt werden (Abb. 30).

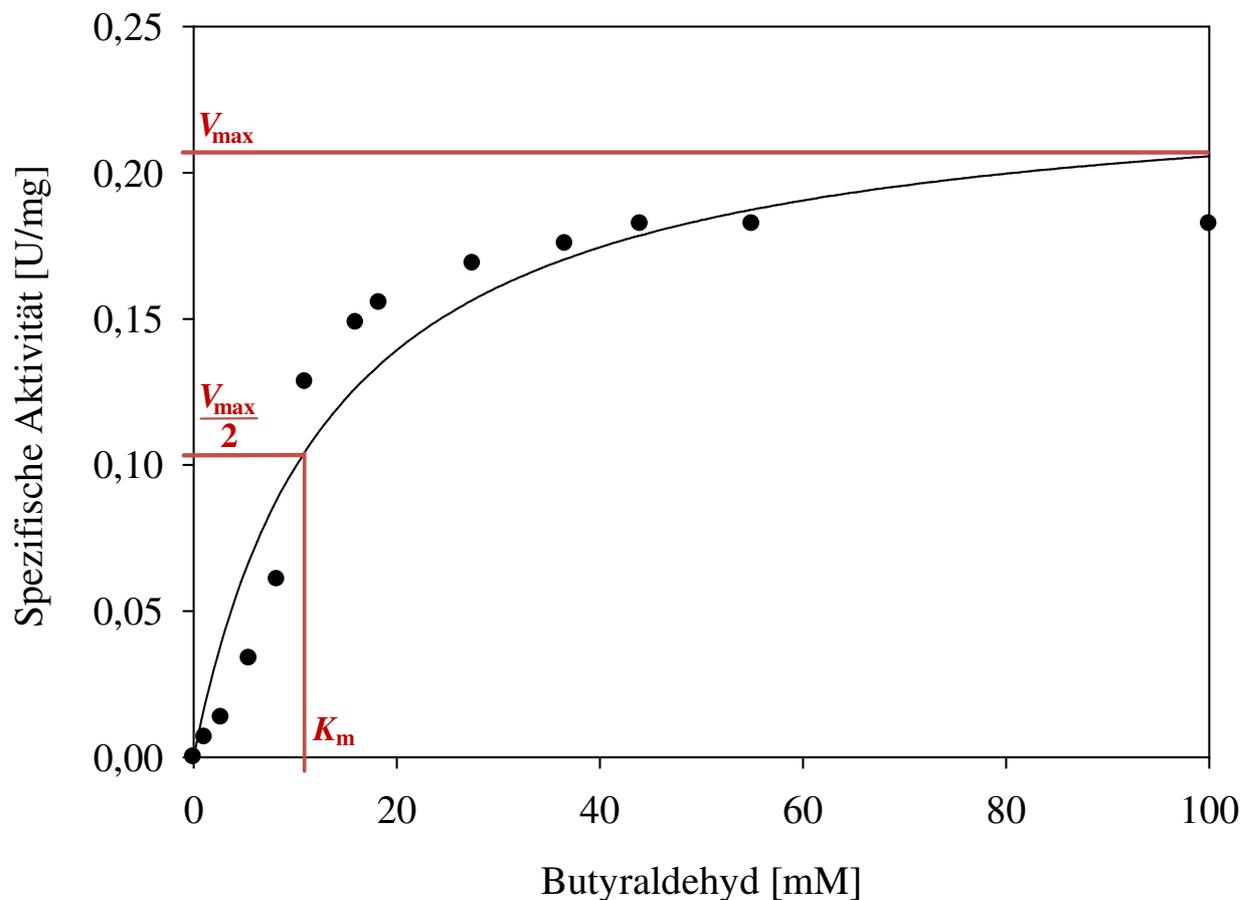


Abb. 30: Enzymkinetik des Genprodukts von pAK110 *orf14* mit Butyraldehyd als Substrat und NADPH + H⁺ als Co-Substrat

Mit 1-Butanol als Substrat konnten hingegen nur geringe Enzymaktivitäten gemessen werden. Die physiologische Reaktionsrichtung dieses Enzyms verläuft dementsprechend von Aldehyd zu Alkohol.

3.7.1.4. Co-Substrat und Co-Faktoren

Das Genprodukt von pAK110 *orf14* kann sowohl NADPH + H⁺ als auch als NADH + H⁺ als Co-Substrat nutzen, wobei mit letzterem die Enzymaktivität um etwa 50 % niedriger ist.

Als Co-Faktor wird Eisen (Fe^{2+}) benötigt, was mit den Ergebnissen der Motiv- und Domänen-Suche (3.7.1.1.) übereinstimmt. Alternativ kann auch Kobalt (Co^{2+}) verwendet werden, die Aktivität beträgt dann allerdings nur etwa 20 %.

3.7.1.5. Substratspektrum

Neben Butyraldehyd (3.7.1.3.) kann das Genprodukt von pAK110 *orf14* auch Propionaldehyd als Substrat nutzen. Die spezifische Enzymaktivität mit Propionaldehyd beträgt ca. 80 % von der mit Butyraldehyd (Abb. 31).

Die verwandte Alkohol-Dehydrogenase YqhD aus *E. coli* (3.7.1.3.) kann auch Acetaldehyd und Acrolein als Substrat verwerten (Sulzenbacher *et al.*). Während das Genprodukt von pAK110 *orf14* keine Aktivität mit Acetaldehyd zeigt, ist die Enzymaktivität mit Acrolein (= Acrylaldehyd) dreifach höher als mit Butyraldehyd (Abb. 31).

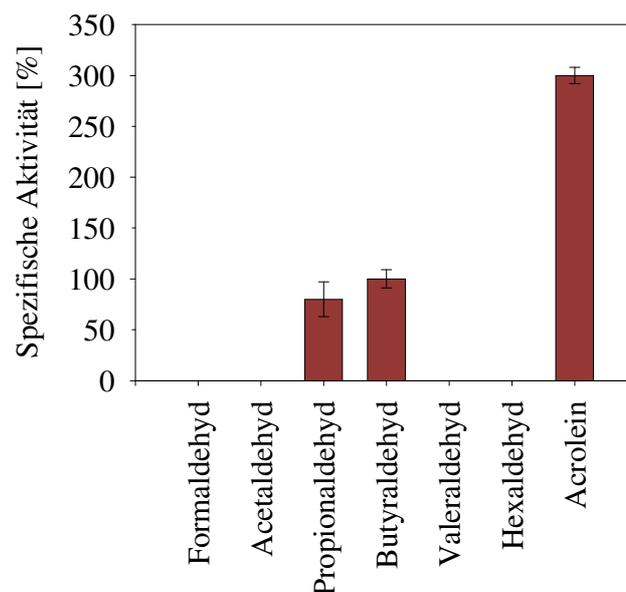


Abb. 31: Substratspektrum des Genprodukts von pAK110 *orf14*

Von den getesteten Substraten konnte das Genprodukt von pAK110 *orf14* ausschließlich C_3 - und C_4 -Körper verwenden, die höchste Enzymaktivität wurde mit Acrolein erzielt (Abb. 31).

Mit 3-Hydroxypropionaldehyd, einem weiteren C_3 -Aldehyd welches nach Hall und Stern (1950) aus Acrolein hergestellt wurde, konnte hingegen keine Aktivität gemessen werden.

3.7.1.6. pH-Optimum

Das Genprodukt von pAK110 *orf14* ist über einen breiten pH-Bereich aktiv, wobei das Optimum bei pH 6-7 liegt (Abb. 32).

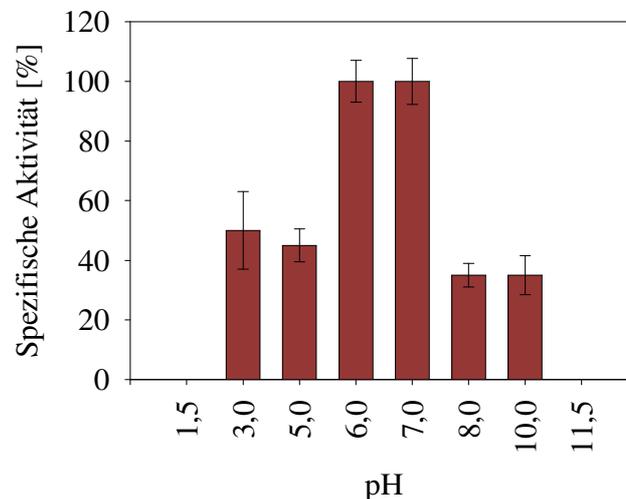


Abb. 32: pH-Optimum des Genprodukts von pAK110 *orf14*

3.7.2. Charakterisierung des Genprodukts von pAK115 *orf22*

3.7.2.1. Vergleich mit bekannten Proteinen

Das Genprodukt von pAK115 *orf22* ist 247 Aminosäuren lang und weist hohe Identität zu Oxidoreduktasen von drei Enterobakterien auf. Auch zu einer Reduktase bzw. zwei Dehydrogenasen von *C. acetobutylicum* besteht eine Homologie (Tab. 77). Keines dieser Enzyme wurde bisher allerdings näher untersucht.

Bei einer Motiv- und Domänen-Suche konnte eine kurzkettenige Alkohol-Dehydrogenase-Familien-Domäne an Position 8-175 in der Aminosäuresequenz gefunden werden. Zusätzlich konnte zwischen Position 10 und 244 eine NAD⁺-abhängige Epimerase/Dehydratase-Familien-Domäne entdeckt werden. Eindeutige Motive konnten hingegen nicht gefunden werden.

Tab. 77: Vergleich des Genprodukts von pAK115 *orf22* mit bekannten Proteinen

| Organismus | Protein | Identität | Homologie |
|-----------------------------------|--|----------------------|----------------------|
| <i>Enterobacter sp.</i> | kurzkettige Dehydrogenase/Reduktase | 90 % (224/247 As) | 96 % (239/247 As) |
| <i>Enterobacter cancerogenus</i> | hypothetisches Protein | 88 % (219/247 As) | 95 % (235/247 As) |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | putative kurzkettige Alkohol-Dehydrogenase | 86 % (213/247 As) | 93 % (232/247 As) |
| <i>Clostridium acetobutylicum</i> | 3-Ketoacyl-Reduktase | 39 % (98/251 As) | 55 % (139/251 As) |
| | 2-Deoxy-D-Gluconat-3-Dehydrogenase | 34 % (87/251 As) | 52 % (133/251 As) |
| | kurzkettige Alkohol-Dehydrogenase | 33 % (81/245 As) | 49 % (122/245 As) |

3.7.2.2. Bestimmung der molekularen Masse

Das Genprodukt von pAK115 *orf22* hat inklusive des fusionierten “His-Tags“ eine molekulare Masse von 30 kDa (Abb. 33). Diese stimmt gut mit der theoretischen molekularen Masse von 25 kDa (ohne “His-Tag“) bzw. 27 kDa (mit “His-Tag“) überein.

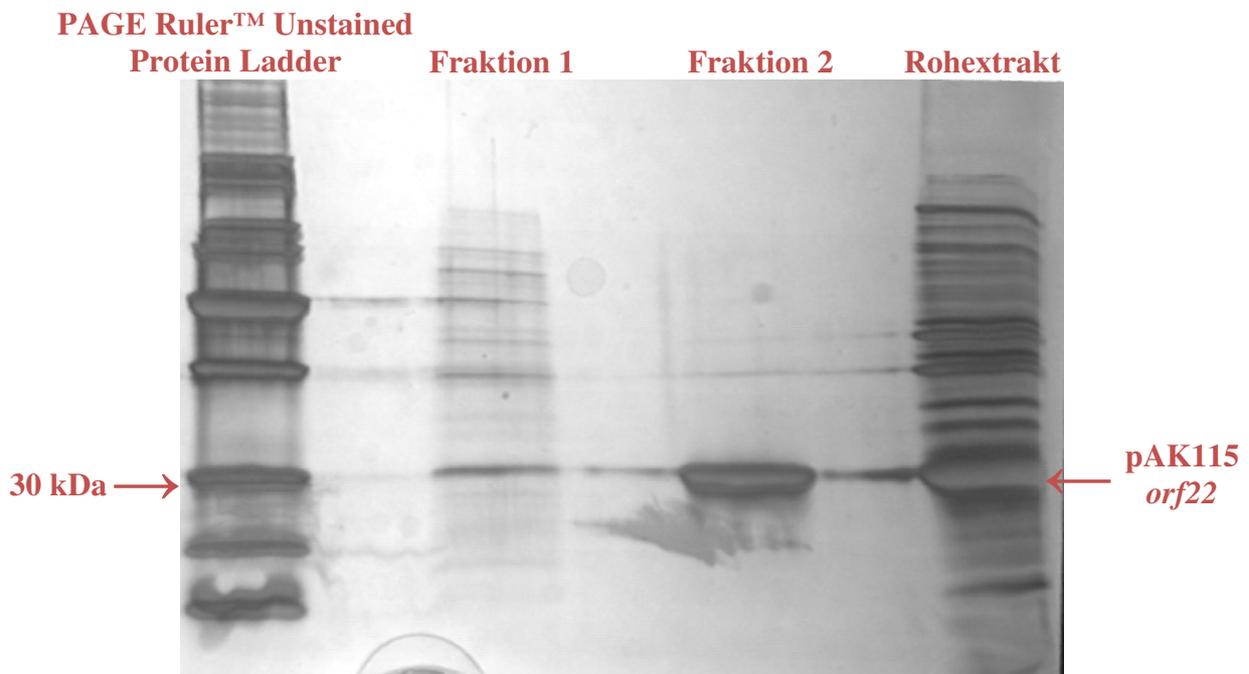


Abb. 33: Kontrolle der Überproduktion und Reinigung des Genprodukts von pAK115 *orf22* (mit N-terminalem “His-Tag“) in einer SDS-PAGE:
Fraktion 1: 100 mM Imidazol, Fraktion 2: 200 mM Imidazol

3.7.2.3. Enzymkinetiken

Das gereinigte Genprodukt von pAK115 *orf22* zeigte sowohl mit einer N-terminalen, als auch mit einer C-terminalen "His-Tag"-Fusion Enzymaktivität mit Butyraldehyd als Substrat. Es konnte eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit V_{\max} von 0,115 U/mg und eine Michaelis-Menten-Konstante K_m von 4 mM gemessen werden (Abb. 34).

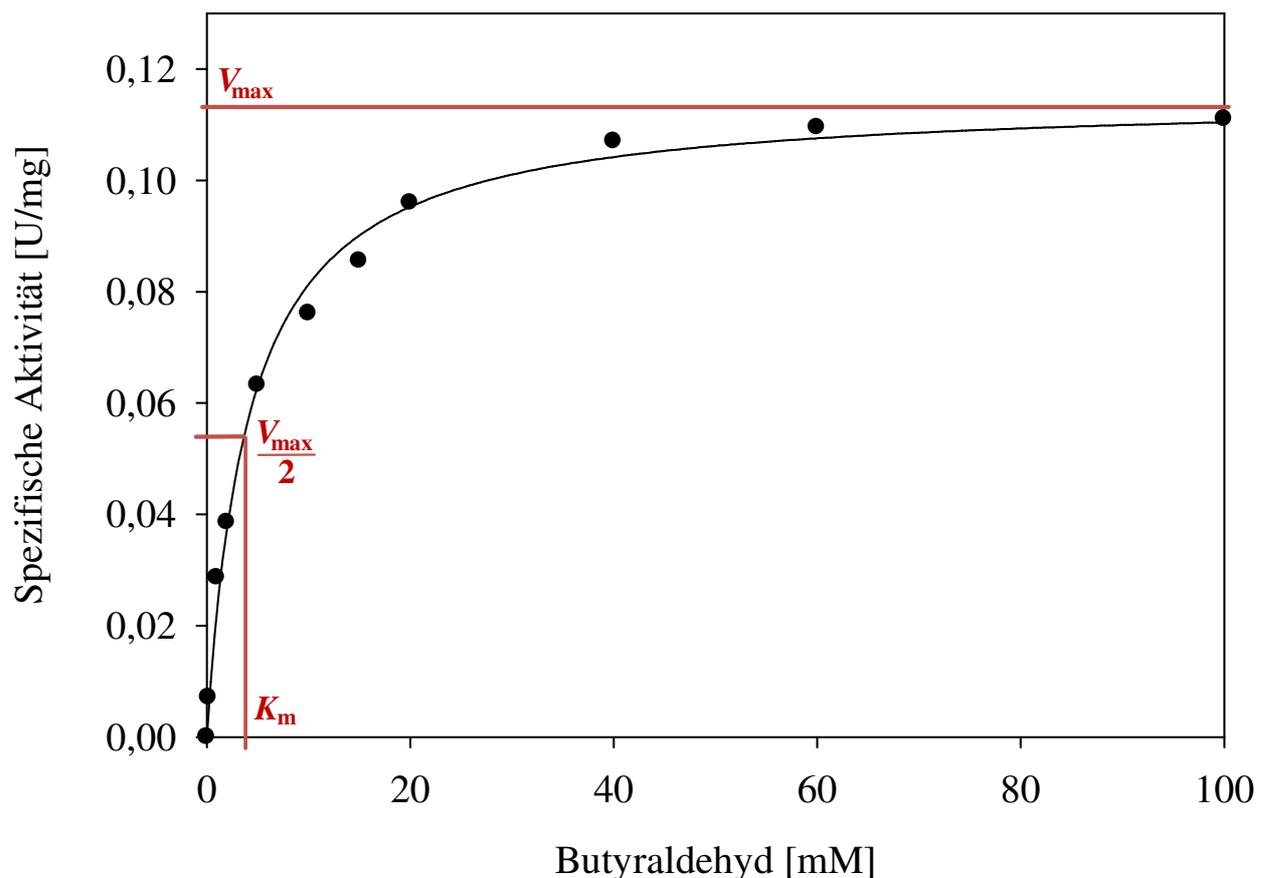


Abb. 34: Enzymkinetik des Genprodukts von pAK115 *orf22* mit Butyraldehyd als Substrat und NADPH + H⁺ als Co-Substrat

Bei der umgekehrten Reaktion, mit 1-Butanol als Substrat, betrug die spezifische Aktivität nur noch etwa 10 % von der mit Butyraldehyd. Die physiologische Reaktionsrichtung dieses Enzyms ist demzufolge von Butyraldehyd zu 1-Butanol.

3.7.2.4. Co-Substrat und Co-Faktoren

Das Genprodukt von pAK115 *orf22* benötigt NADPH + H⁺ als Co-Substrat und Zink (Zn²⁺) als Co-Faktor. Mit NADH + H⁺ als Co-Substrat oder anderen Co-Faktoren war keine Aktivität messbar.

3.7.2.5. Substratspektrum

Das Genprodukt von pAK115 *orf22* kann verschieden lange Aldehyde verwerten. Die höchsten spezifischen Aktivitäten werden mit Acetaldehyd und Butyraldehyd erzielt (Abb. 35).

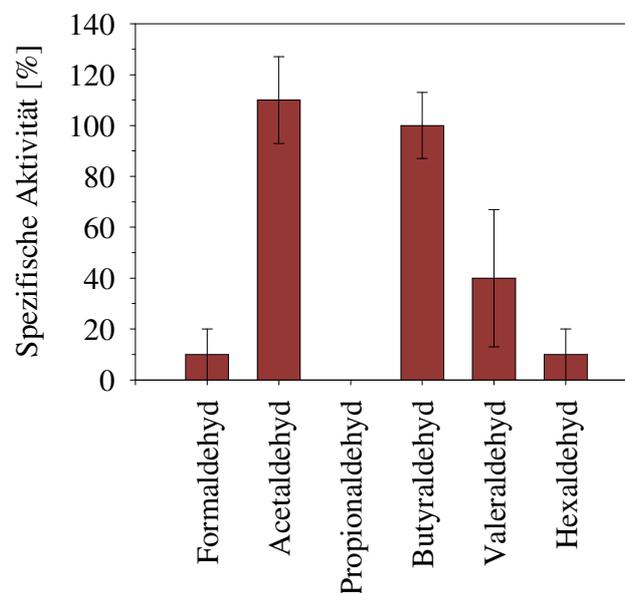


Abb. 35: Substratspektrum des Genprodukts von pAK115 *orf22*

3.7.2.6. pH-Optimum

Das Genprodukt von pAK115 *orf14* ist über einen breiten pH-Bereich aktiv, wobei das Optimum im sauren Bereich zwischen pH 3 und pH 6 liegt (Abb. 36).

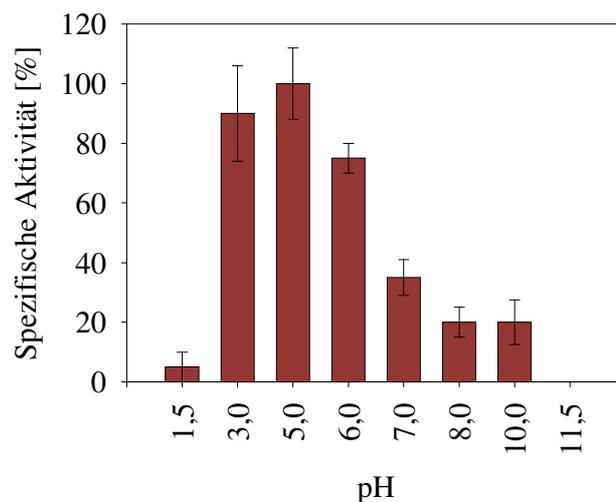


Abb. 36: pH-Optimum des Genprodukts von pAK115 *orf22*

3.7.3. Charakterisierung des Genprodukts von pTWB3 *orf2*

3.7.3.1. Vergleich mit bekannten Proteinen

Das Genprodukt von pTWB3 *orf2* hat eine Gesamtlänge von 325 Aminosäuren, wovon die letzten 18 Aminosäuren allerdings durch die Vektorsequenz und nicht durch die Insertsequenz des Plasmides kodiert werden.

Es konnten Homologien zu Oxidoreduktasen von Myxobakterien sowie zu einer Epimerase von *C. acetobutylicum* festgestellt werden (Tab. 78). Keines dieser Enzyme ist jedoch bisher näher untersucht worden.

In der Aminosäuresequenz konnte eine NAD⁺-abhängige Epimerase/Dehydrogenase-Familien-Domäne an Position 44-271, sowie eine NAD⁺-Binde-Domäne an Position 46-72 und auch eine kurzkettenige Alkohol-Dehydrogenase-Familien-Domäne an Position 42-166 gefunden werden. Eindeutige Motive konnten jedoch keine gefunden werden.

Tab. 78: Vergleich des Genprodukts von pTWB3 *orf2* mit bekannten Proteinen

| Organismus | Protein | Identität | Homologie |
|--|--|----------------------|----------------------|
| <i>Myxococcus xanthus</i> | NAD ⁺ -abhängige Epimerase/Dehydratase | 52 % (138/262 As) | 68 % (180/262 As) |
| <i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i> | NAD ⁺ -abhängige Epimerase/Dehydratase | 53 % (141/262 As) | 68 % (181/262 As) |
| <i>Sorangium cellulosum</i> | Dihydrokaempferol- 4-Reduktase | 51 % (134/262 As) | 65 % (172/262 As) |
| <i>Stigmatella aurantiaca</i> | putative Dihydroflavanol- 4-Reduktase | 49 % (129/262 As) | 66 % (174/262 As) |
| <i>Plesiocystis pacifica</i> | NAD ⁺ -abhängige Epimerase/Dehydratase | 39 % (105/262 As) | 55 % (150/262 As) |
| <i>Clostridium acetobutylicum</i> | Nukleosid-Diphosphat- Zucker Epimerase | 29 % (73/246 As) | 46 % (114/246 As) |

3.7.3.2. Bestimmung der molekularen Masse

Abb. 37 zeigt das gereinigte Genprodukt von pTWB3 *orf2* in einer SDS-PAGE. Unabhängig davon, ob der "His-Tag" C- oder N-terminal fusioniert wurde, konnten stets zwei Banden bei knapp 35 kDa und zwischen 35 und 40 kDa beobachtet werden. Während beim C-terminalen Fusionsprotein die obere Bande stärker war, war beim N-terminalen Fusionsprotein die untere Bande ausgeprägter.

Wahrscheinlich handelt es sich bei den zwei Banden um unterschiedliche Formen des Genprodukts von pTWB3 *orf2*. Möglicherweise könnte bei der einen Form der "His-Tag" abgespalten (was gut mit der Differenz in der molekularen Masse korrelieren würde) oder das Protein auf andere Weise prozessiert worden sein.

Beide Banden befinden sich im Rahmen der theoretisch berechneten molekularen Masse von 34,5 kDa ohne "His-Tag" und 36,5 kDa mit "His-Tag".

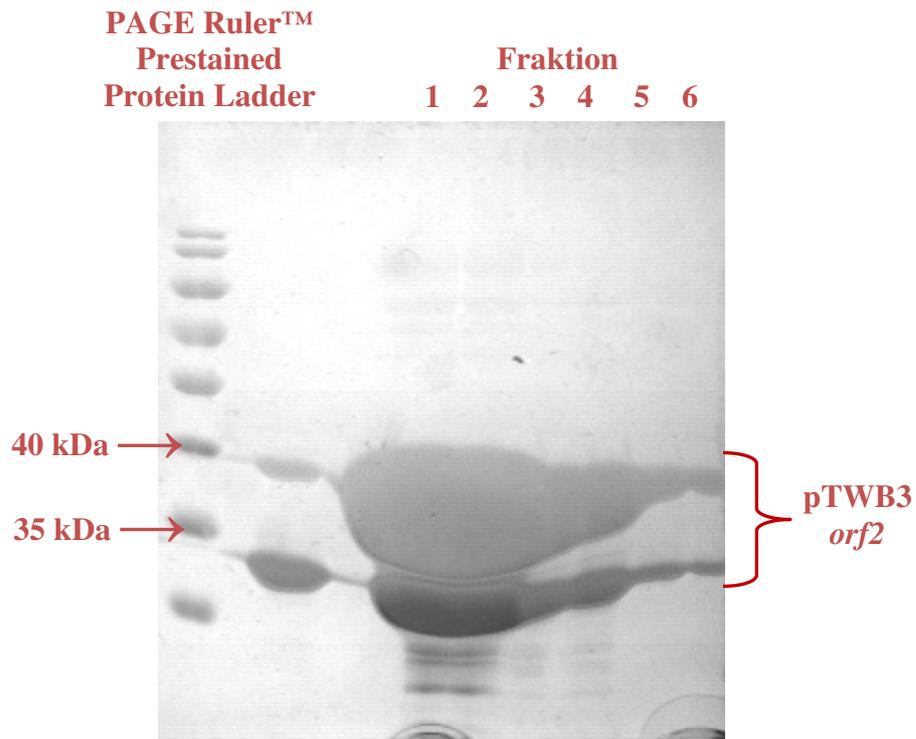


Abb. 37: Kontrolle der Reinigung des Genprodukts von pTWB3 *orf2* (mit C-terminalem “His-Tag“):
Fraktionen 1 und 2: 100 mM Imidazol
Fraktionen 3 und 4: 150 mM Imidazol
Fraktion 5 und 6: 200 mM Imidazol

3.7.3.3. Enzymkinetiken

Auch das gereinigte Genprodukt von pTWB3 *orf2* hat eine physiologische Reaktionsrichtung vom Aldehyd zum Alkohol.

Mit Butyraldehyd als Substrat konnte sowohl mit dem C-terminalen als auch mit dem N-terminalen Fusionsprotein eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit V_{\max} von 0,255 U/mg und eine Michaelis-Menten-Konstante K_m von 18,5 mM mit NADH + H⁺ als C-Substrat ermittelt werden (Abb. 38).

Mit 1-Butanol als Substrat konnten hingegen nur minimale Enzymaktivitäten gemessen werden.

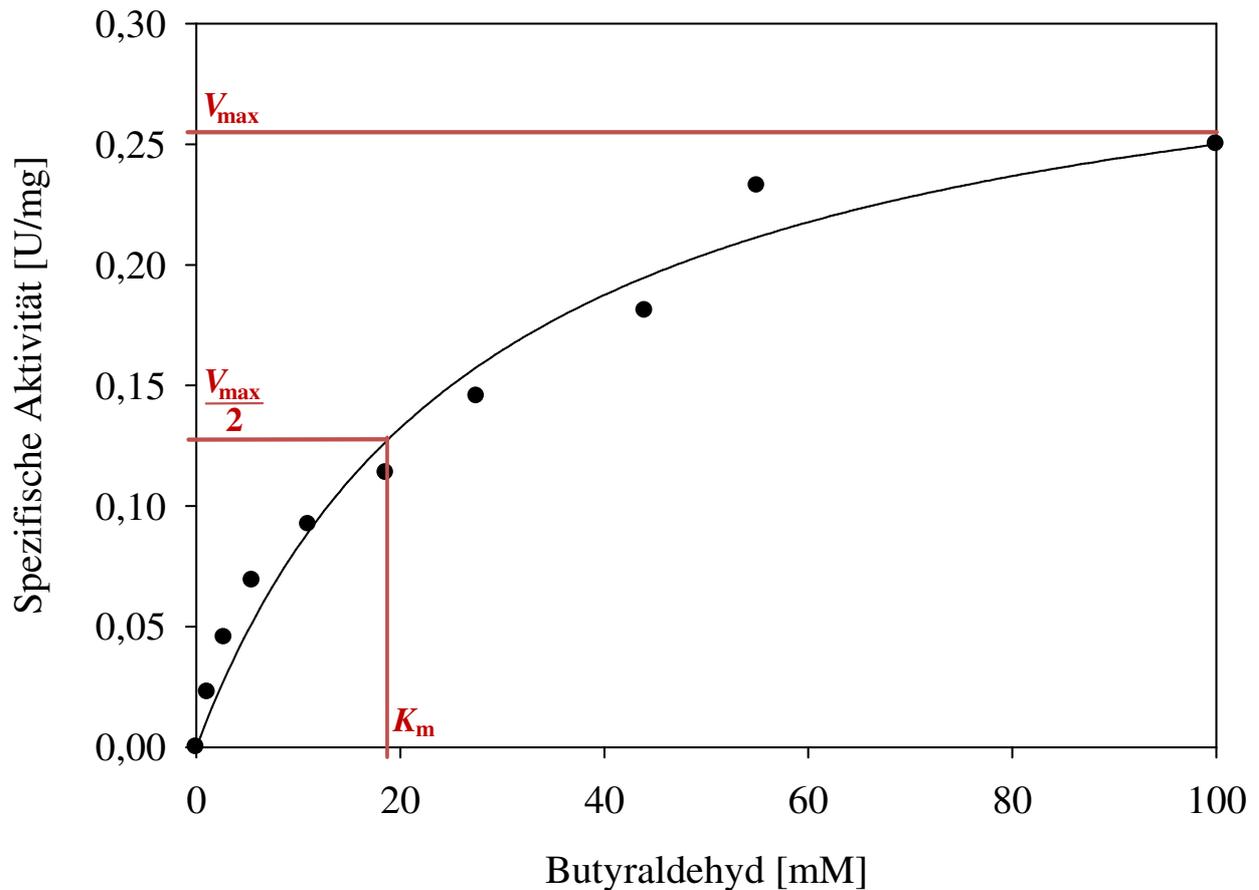


Abb. 38: Enzymkinetik des Genprodukts von pTWB3 *orf2* mit Butyraldehyd als Substrat und NADH + H⁺ als Co-Substrat

3.7.3.4. Co-Substrat und Co-Faktoren

Das Genprodukt von pTWB3 *orf2* kann sowohl NADH + H⁺ als auch als NADPH + H⁺ als Co-Substrat nutzen. Mit letzterem beträgt die Enzymaktivität allerdings nur etwa 50 %.

Das Protein kann mehrere verschiedene Co-Faktoren nutzen. Volle Enzymaktivität wird jedoch nur mit Kobalt (Co²⁺) erreicht. Mit Nickel (Ni²⁺) wird ungefähr die Hälfte der Aktivität erreicht, während mit Magnesium (Mg²⁺) etwa 20 % und mit Mangan (Mn²⁺) nur noch ca. 10 % der Enzymaktivität erzielt werden.

3.7.3.5. Substratspektrum

Das Genprodukt von pTWB3 *orf2* kann verschiedene höhere Aldehyde als Substrat verwenden, während mit Formaldehyd und Acetaldehyd keine Enzymaktivität messbar war (Abb. 39).

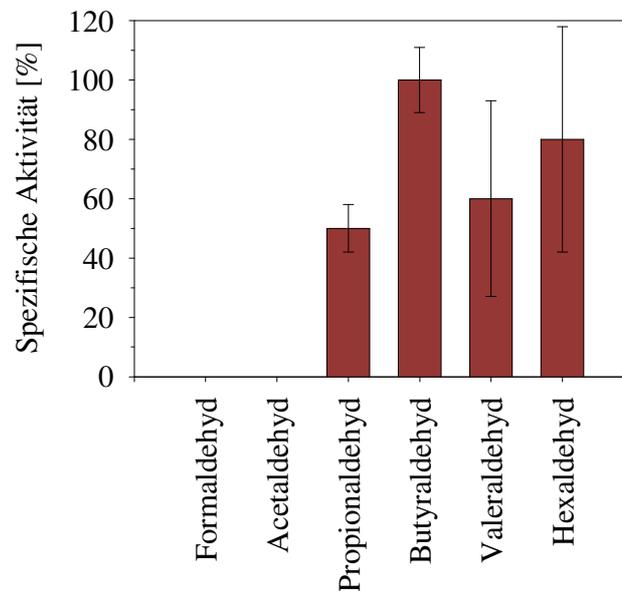


Abb. 39: Substratspektrum des Genprodukts von pTWB3 *orf2*

3.7.3.6. pH-Optimum

Das Protein ist nur innerhalb eines engen pH-Bereiches zwischen pH 5-6 aktiv (Abb. 40).

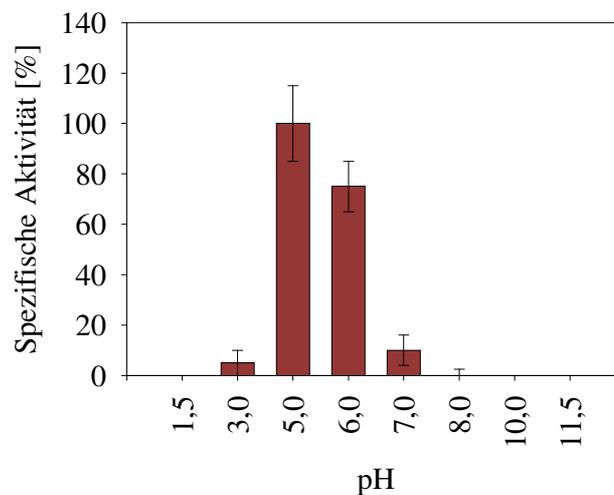


Abb. 40: pH-Optimum des Genprodukts von pTWB3 *orf2*

3.7.4. Charakterisierung des Genprodukts von pTWB4 *orf5*

3.7.4.1. Vergleich mit bekannten Proteinen

Das Genprodukt von pTWB4 *orf5* hat eine Gesamtlänge von 234 Aminosäuren, von denen nur sehr kurze Bereiche geringe Homologie zu drei bekannten Proteinen unterschiedlicher Funktion (eine Reverse Transkriptase und zwei potentielle Hydrolasen) aufweisen (Tab. 79). Diese Proteine wurden allerdings noch nicht näher untersucht.

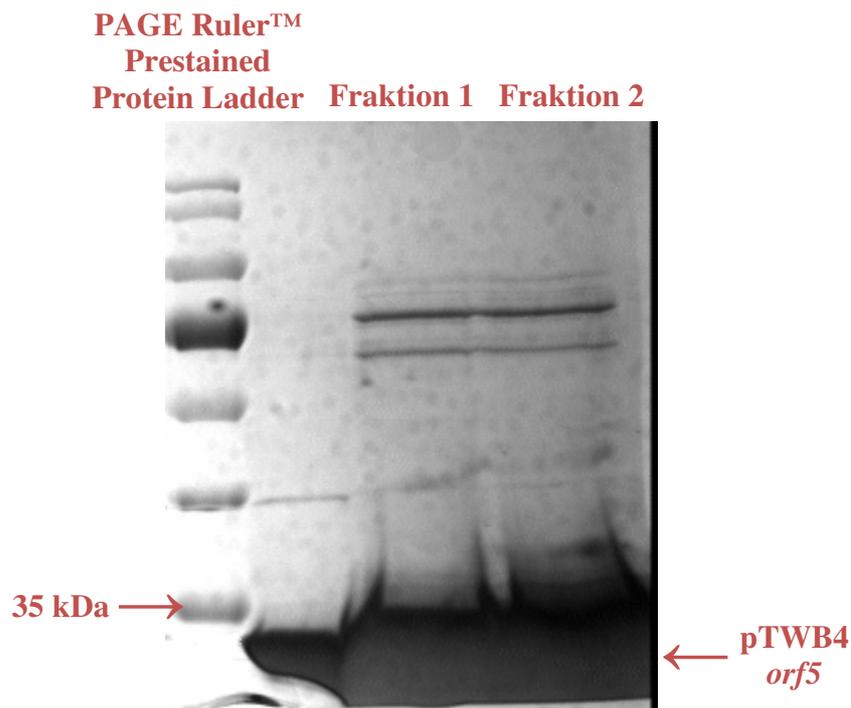
Darüber hinaus konnten in der Aminosäuresequenz des Genprodukts von pTWB4 *orf5* keine eindeutigen Domänen oder Motive gefunden werden. Allerdings konnte eine Region entdeckt werden, die aus übermäßig viel Arginin besteht, welches insgesamt knapp 15 % der kompletten Aminosäuresequenz ausmacht.

Tab. 79: Vergleich des Genprodukts von pTWB4 *orf5* mit bekannten Proteinen

| Organismus | Protein | Identität | Homologie |
|-------------------------------|---|---------------------|---------------------|
| <i>Burkholderia ambifaria</i> | α/β Hydrolase gefaltetes Protein ("α/β hydrolase fold") | 33 % (24/72 As) | 51 % (37/72 As) |
| <i>Phytophthora sojae</i> | Reverse Transkriptase | 37 % (25/67 As) | 47 % (32/67 As) |
| <i>Idiomarina baltica</i> | Carboxynorspermidin- Decarboxylase | 25 % (32/128 As) | 41 % (53/128 As) |

3.7.4.2. Bestimmung der molekularen Masse

In Abb. 41 ist das Genprodukt von pTWB4 *orf5* nach der Reinigung in einer SDS-PAGE dargestellt. Daraus kann man entnehmen, dass das Genprodukt von pTWB4 *orf5* (inklusive des C- bzw. N-terminal fusionierten "His-Tags") eine molekulare Masse von unter 35 kDa, jedoch über 25 kDa hat. Dies korreliert mit der berechneten molekularen Masse von 27 kDa (ohne "His-Tag") bzw. 29 kDa (mit "His-Tag").



**Abb. 41: Kontrolle der Reinigung des Genprodukts von pTWB4 *orf5* (mit C-terminalem “His-Tag“):
Fraktion 1: 100 mM Imidazol, Fraktion 2: 200 mM Imidazol**

3.7.4.3. Enzymkinetiken

Das Genprodukt von pTWB4 *orf5* zeigte nach Reinigung keine Enzymaktivität. Bei Zugabe eines Rohextraktes von *E. coli* WL3, welcher aufgrund einer mutierten und dadurch inaktiven Alkohol-Dehydrogenase AdhE (Lorowitz und Clark, 1982) nahezu keine Aktivität in den verwendeten Enzym-Testansätzen aufweist (Köpke, 2004), konnte allerdings eine deutliche Enzymaktivität gemessen werden. Dabei war die Aktivität umso stärker, je mehr *E. coli* WL3-Rohextrakt zugegeben wurde (bis zu einer gewissen Sättigung).

Um zu überprüfen, ob ein Co-Faktor aus diesem *E. coli* WL3-Rohextrakt für die Aktivität benötigt wird, wurde zusätzlich noch EDTA zugegeben, was jedoch nur zu einer minimalen Hemmung führte. Auch die Zugabe von Spurenelementlösungen (Tab. 22 und 25) oder Lösungen von einzelnen zweiwertigen Metallionen (Eisen, Kupfer, Kobalt, Nickel, Zink, Magnesium, Mangan) anstatt des *E. coli* WL3-Rohextrakts brachte keinen Effekt. Somit handelt es sich um keinen Co-Faktor aus dem *E. coli* WL3-Rohextrakt, welcher die Enzymaktivität vermittelt.

Durch Ultrazentrifugation wurde der *E. coli* WL3-Rohextrakt in Cytoplasma- und Membranfraktion getrennt. Nur die Cytoplasmafraktion war in der Lage, Enzymaktivität zu vermitteln. Wurde diese allerdings für 15 Minuten bei 95 °C gekocht, so war kein Effekt mehr erkennbar. Daraus lässt sich schließen, dass ein cytoplasmatisches Protein aus dem Rohextrakt von *E. coli* WL3 für die Aktivität des gereinigten Genprodukts von pTWB4 *orf5* nötig ist.

Um herauszufinden, um welches Protein es sich handelt, wurde die cytoplasmatische Fraktion des *E. coli* WL3-Rohextrakts über Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (2.8.3.2.) gereinigt.

Diese wurde zuerst über eine "HiTrap™ Q Sepharose XL"-Anionenaustausch-Säule bei pH 7,5 getrennt (Abb. 42). Die erhaltenen 1-ml-Fractionen wurden anschließend zusammen mit dem gereinigten Genprodukt von pTWB4 *orf5* in Enzymtests (2.8.6.) eingesetzt, wobei die Fractionen A12-B3 Enzymaktivität vermittelten. Diese Fractionen wurden vereinigt und es folgte ein zweiter Reinigungsschritt über die Kationenaustausch-Säule "HiTrap™ SP Sepharose XL" mit einem Stufengradienten (5 %, 30 %, und 100% 1 M NaCl) bei pH 7,5 (Abb. 43). Allerdings banden nur wenige Proteine an diese Säule, von denen keines Aktivität vermittelte. Deshalb wurde mit dem Durchlauf (Fraction A1 und A2) weitergearbeitet.

Nach einer Umpufferung zur Entfernung des Salzes über eine "HighPrep™ 26/10 Desalting"-Sephadex-Säule (Abb. 44) erfolgte ein dritter Reinigungsschritt über eine "HiTrap™ Q Sepharose XL"-Anionenaustausch-Säule bei pH 6,5 mit einem Stufengradienten (5 %, 30 %, und 100% 1 M NaCl) (Abb. 45). Die erhaltenen Fractionen C4 und C5 vermittelten in Verbindung mit dem gereinigten Genprodukt von pTWB4 *orf5* Enzymaktivität. Von diesem Reinigungsschritt wurden insgesamt 6 Läufe durchgeführt und danach die entsprechenden Fractionen vereinigt. Diese Mischung wurde im Anschluss über eine "Mono Q™ 5/50 GL"-Anionenaustausch-Säule bei pH 6,5 aufgetrennt, wobei das gesuchte, Aktivität vermittelnde Protein im Durchfluß zu finden war. Allerdings konnten etliche andere Proteine abgetrennt werden (Abb. 46).

Schließlich wurde eine Ausschluss-Chromatographie an einer "HiLoad 16/60 Superdex™ 200 prep grade"-Säule durchgeführt (Abb. 47). Die Fractionen zwischen einem Elutionsvolumen von 66 und 70 ml vermittelten zusammen mit dem gereinigten Genprodukt von pTWB4 *orf5* Enzymaktivität. Ein Elutionsvolumen von 61 ml entsprach dabei einer molekularen Masse von ca. 260 kDa und ein Elutionsvolumen von 69 ml einer molekularen Masse von etwa 130 kDa.

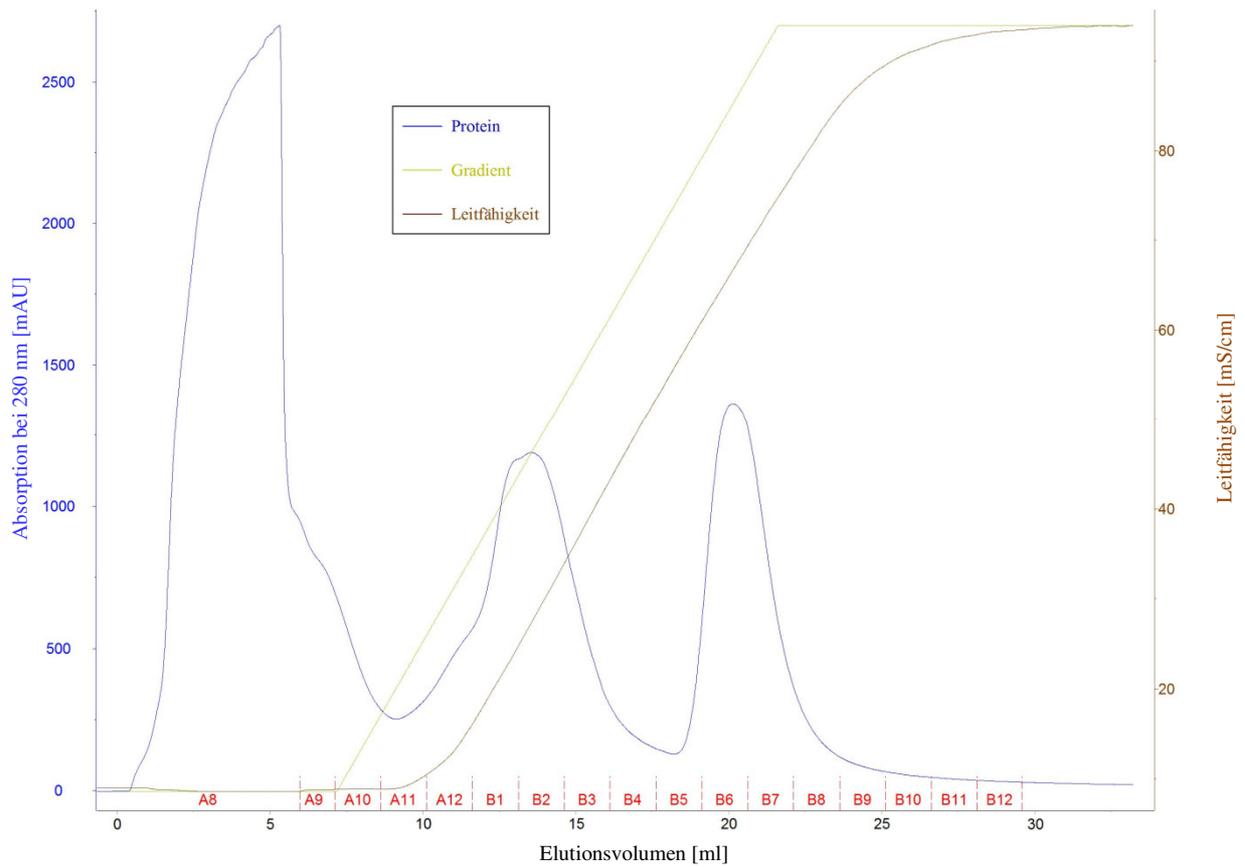


Abb. 42: Erster Reinigungsschritt über eine “HiTrap™ Q Sepharose XL“-Säule

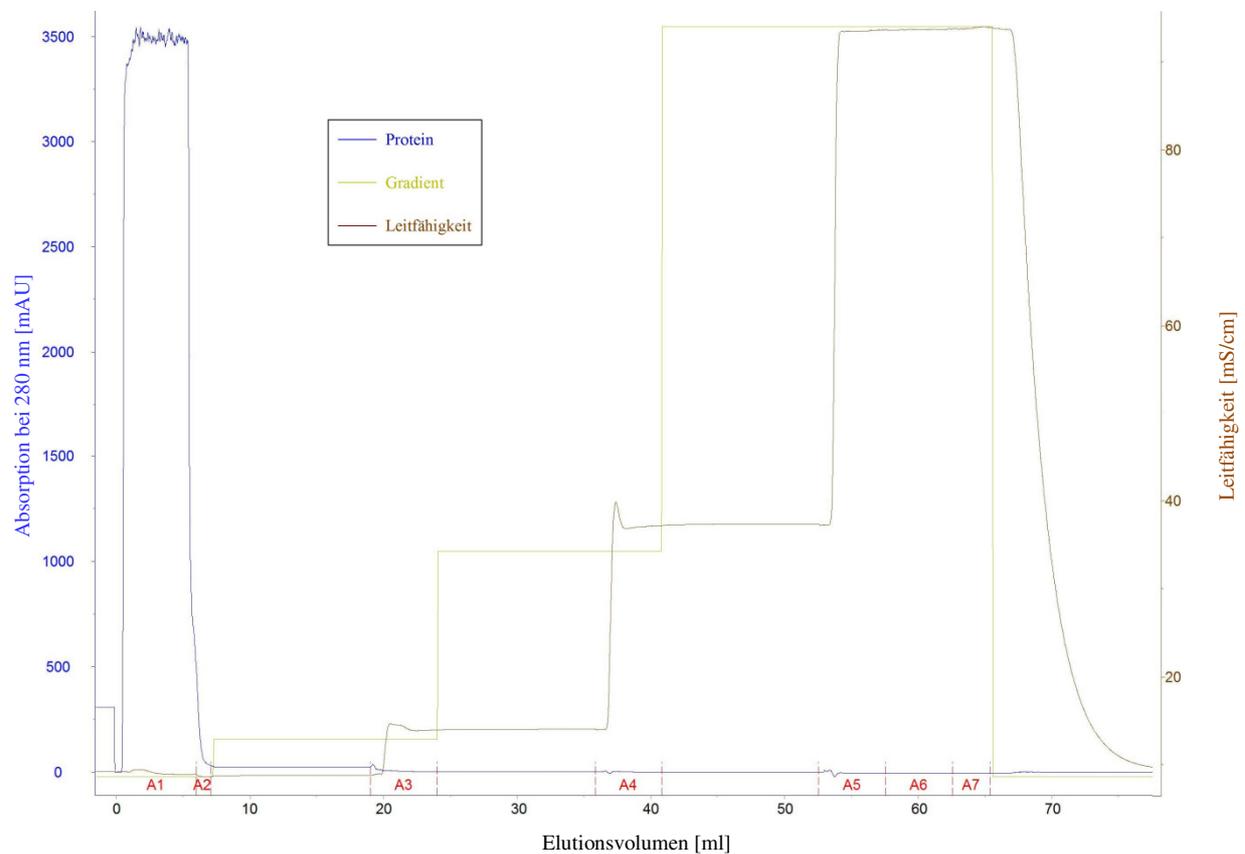


Abb. 43: Zweiter Reinigungsschritt über eine “HiTrap™ SP Sepharose XL“-Säule

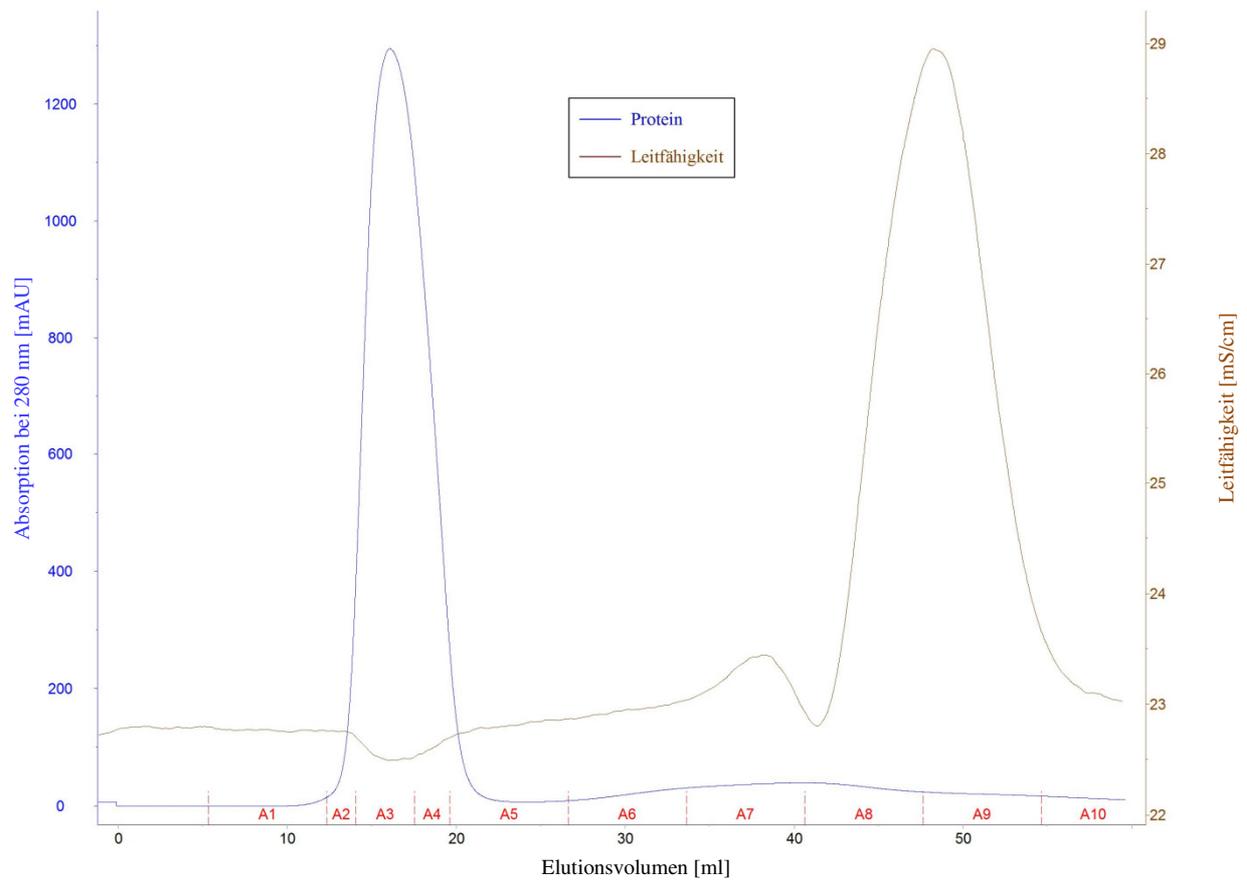


Abb. 44: Umpufferung über eine “HighPrep™ 26/10 Desalting“-Sephadex-Säule

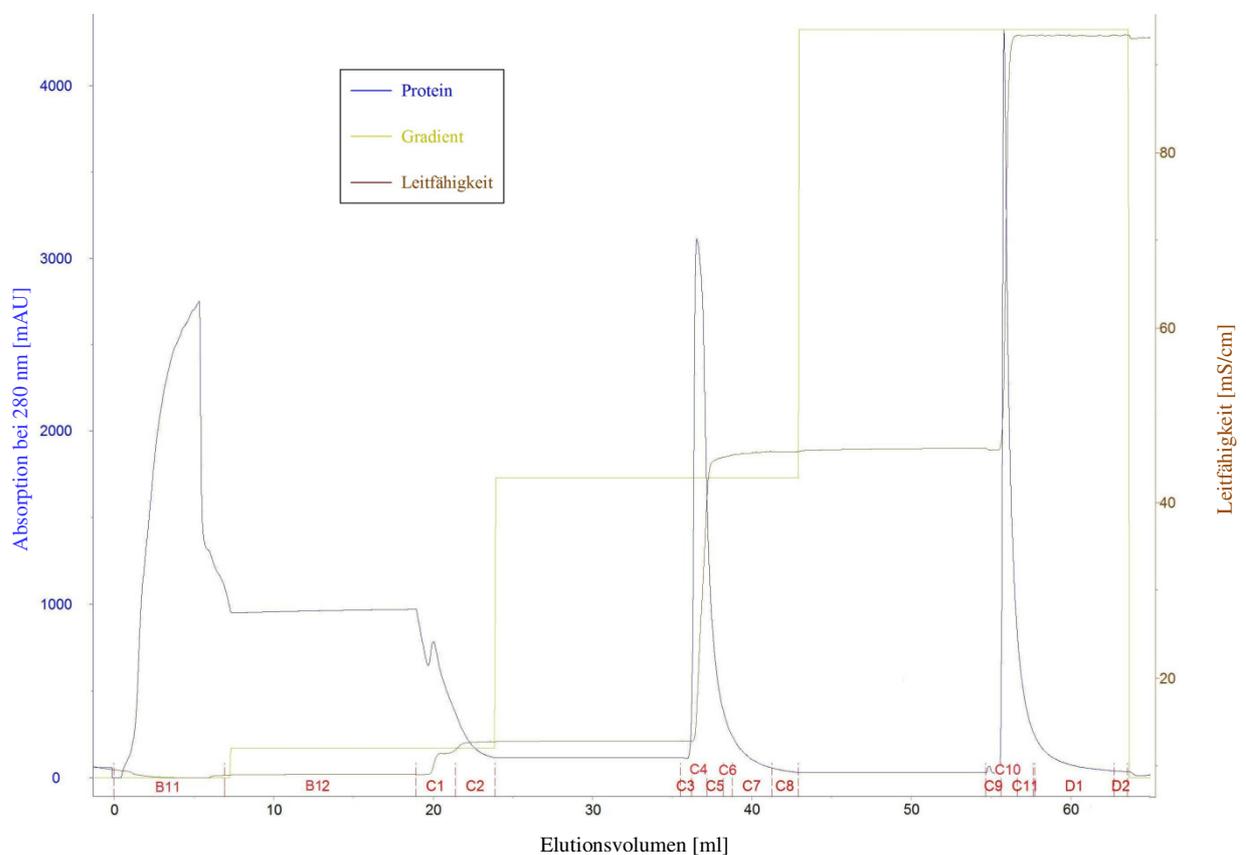


Abb. 45: Dritter Reinigungsschritt über eine “HiTrap™ SP Sepharose XL“-Säule

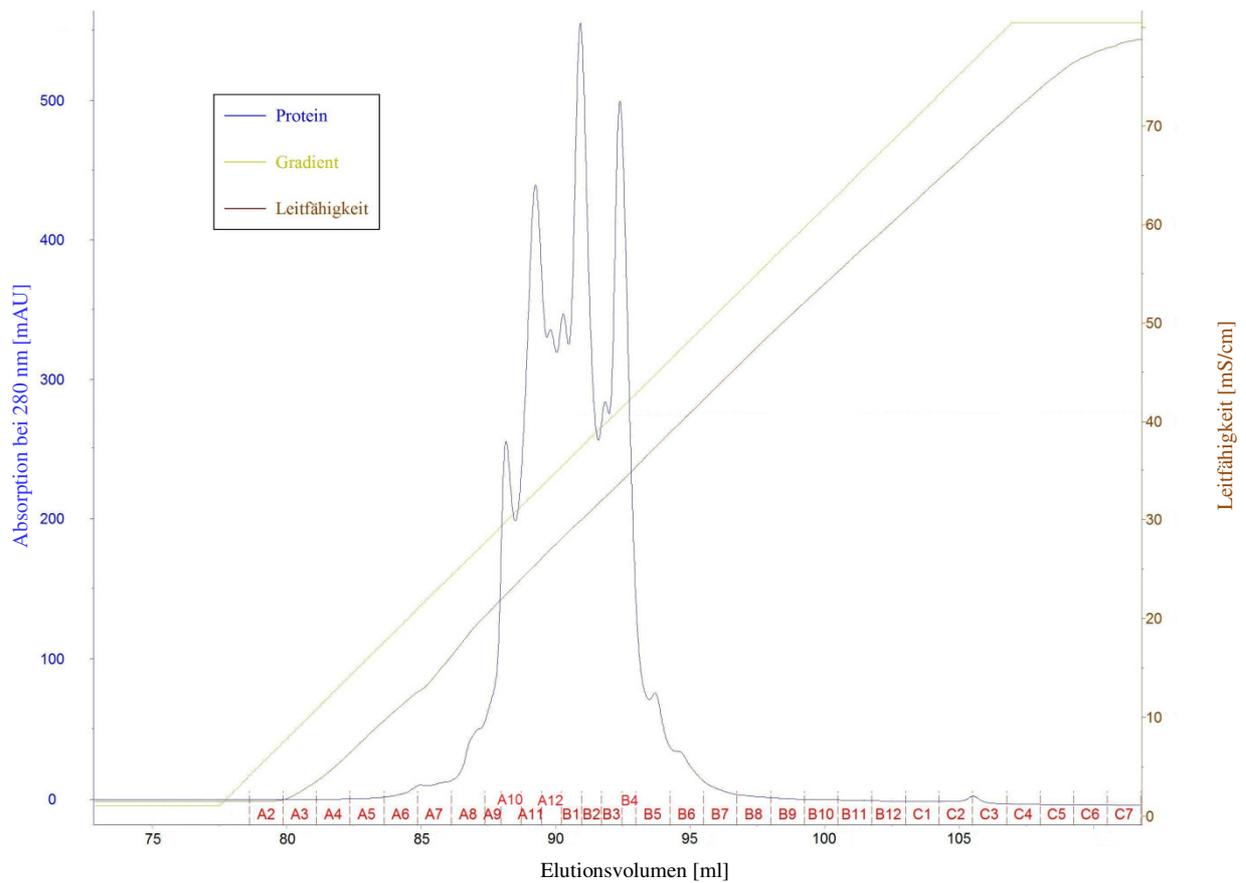


Abb. 46: Vierter Reinigungsschritt über eine “Mono Q™ 5/50 GL“-Säule

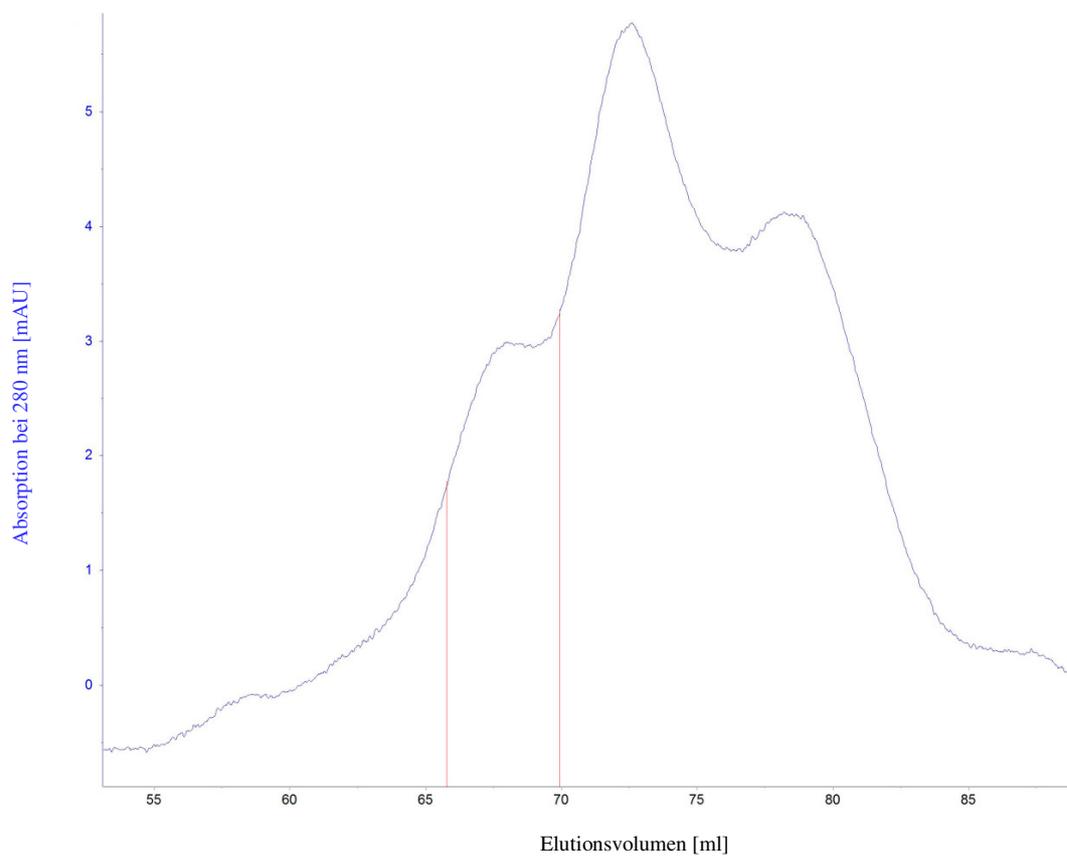


Abb. 47: Ausschluss-Chromatographie über eine “HiLoad 16/60 Superdex™“-Säule

Durch diesen Reinigungsprozess konnte der Rohextrakt von *E. coli* WL3 auf eine Fraktion eingengt werden, welche in einer SDS-PAGE nur noch etwa 10 Protein-Banden enthält (Abb. 48), dennoch aber in Verbindung mit dem Genprodukt von pTWB4 *orf5* Enzymaktivität vermittelt.

Es wurde nun über Aktivitätsfärbung (2.8.8.3.) im nativen Gel versucht herauszufinden, welches von diesen Proteinen für die Enzymaktivität verantwortlich ist.

Dabei war es jedoch nicht möglich, nur eine einzelne Bande anzufärben. Wurde die Fraktion des *E. coli* WL3-Rohextraktes im Gel getrennt und befand sich das Genprodukt von pTWB4 *orf5* in der Testansatz-Lösung, wurde das komplette Gel (anschließend auch die Lösung) gefärbt. Im umgekehrten Fall wurde stattdessen sofort die gesamte Lösung blau bzw. violett.

Aus diesem Grund wurde die gereinigte Fraktion des *E. coli* WL3-Rohextraktes massenspektrometrisch analysiert (2.8.10.). Es wurden 6 Bereiche des Gels ausgeschnitten (Abb. 48) und anschließend untersucht.

Es konnten einige Proteine gefunden werden, welche mit hoher Sequenzabdeckung nachgewiesen werden konnten (Tab. 80). Allerdings konnte auch ein umfangreicher Hintergrund von Proteinen, welche in wahrscheinlich geringerer Menge vorhanden sind, nachgewiesen werden. Außerdem traten Proteine auf, die im Gel nur unzureichend getrennt wurden und daher in mehreren bzw. allen Banden vorkamen.



Abb. 48: Gereinigte Fraktion des *E. coli* WL3-Rohextraktes, welche in Verbindung mit dem Genprodukt von pTWB4 *orf5* Butanol-Dehydrogenase Enzymaktivität zeigt. Die gekennzeichneten Bereiche 1-6 wurden massenspektrometrisch untersucht (Tab. 80).

Tab. 80: Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse von der gereinigten Fraktion des *E. coli* WL3-Rohextraktes

| Protein | Anzahl an einzigartigen Proteinen | | | | | | |
|--|-----------------------------------|--------------------------|----|----|---|---|---|
| | Gesamt | in Bereich ¹⁾ | | | | | |
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Elongationsfaktor Tu | 42 | 9 | 7 | 12 | 9 | 3 | 2 |
| Chaperon DnaK | 27 | 9 | 12 | 3 | 1 | 2 | |
| Chaperonin GroEL | 23 | 6 | 5 | 10 | 1 | | 1 |
| β-Lactamase-Precursor BlaT | 23 | 1 | 2 | 4 | 3 | 7 | 6 |
| Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase A | 22 | 2 | 2 | 4 | 6 | 7 | 1 |
| Chaperon ClpB | 21 | 15 | 6 | | | | |
| Transaldolase B | 15 | | 2 | 3 | 3 | 7 | |
| Aspartokinase/Homoserin-Dehydrogenase II | 14 | 8 | 3 | 2 | | 1 | |
| Malat-Dehydrogenase | 14 | 2 | 2 | 2 | 4 | 4 | |
| Transketolase A | 12 | 1 | 10 | | | | 1 |
| Tryptophanase | 12 | 4 | 1 | 5 | 3 | | |
| Uridin-Phosphorylase | 11 | | | 1 | 4 | | 6 |
| Enolase | 10 | | 1 | 4 | 5 | | |
| N-Acetylneuraminat-Lyase | 10 | | | | | 9 | 1 |
| Isocitrat-Dehydrogenase | 8 | | | 2 | 6 | | |
| Elongationsfaktor G | 8 | 8 | | | | | |
| Elongationsfaktor Ts | 8 | | | 1 | 3 | 4 | |
| Chaperon HtpG | 7 | 5 | 2 | | | | |
| Formiat-Acyltransferase | 6 | 6 | | | | | |
| Hitze-Schock-Protein GrpE | 5 | | | 1 | 2 | 1 | 1 |
| Lactaldehyd-Dehydrogenase AldA | 4 | | | 3 | | 1 | |
| Chaperon Trigger-Faktor Tig | 4 | | | 4 | | | |
| Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase | 4 | | | 4 | | | |
| Transketolase B | 3 | | 3 | | | | |
| Histidinol-Dehydrogenase HisD | 3 | 1 | 1 | 1 | | | |
| Histidinol-Phosphat-Aminotransferase | 1 | | | 1 | | | |
| ATP-abhängige Protease HslV | 1 | | | | | 1 | |
| 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase | 1 | | | 1 | | | |
| Glucose-6-Phosphat-Isomerase | 1 | | | 1 | | | |

¹⁾ siehe Abb. 48.

In der gereinigten Fraktion des *E. coli* WL3-Rohextraktes konnten verschiedene Proteine gefunden werden (Tab. 80).

Die höchste Sequenzabdeckung hatte dabei der Elongationsfaktor Tu, welcher in allen Banden entdeckt werden konnte.

Sehr häufig traten zudem die Chaperone DnaK, GroEL und ClpB auf. Auch weitere Chaperone wie HtpG und GrpE sowie der Chaperon Trigger-Faktor Tig konnten gefunden werden.

Außerdem sind zahlreiche Dehydrogenasen vertreten, unter anderem auch eine Alkohol- (Histidinol-Dehydrogenase HisD) und eine Aldehyd-Dehydrogenase (Lactaldehyd-Dehydrogenase AldA).

Ziel weiterer Arbeiten muss es sein, diese Proteine einzeln überzuproduzieren und anschließend zu reinigen, um dann einen *in vitro* Enzymtest mit dem Genprodukt von pTWB4 *orf5* durchzuführen und so herauszufinden, welches dieser Proteine für die Enzymaktivität benötigt wird.

Hierfür sollten die Gene des Elongationsfaktors Tu (*tufA* oder *tufB*), der Chaperone (*dnaK*, *dnaJ*, *grpE*, *clpB*, *groEL*, *groES*) sowie des Chaperon Trigger-Faktors (*tig*) und der Lactaldehyd-Dehydrogenase (*aldA*) in den Überexpressionsvektor pET29a(+) kloniert sowie mit einer C-terminalen "His-Tag"-kodierenden Sequenz fusioniert werden, um anschließend gereinigt werden zu können.

Die Klonierung der Gene *tufB*, *dnaJ*, *grpE*, *clpB*, *groEL*, *groES* und *tig* ist abgeschlossen, während die noch fehlenden Gene *dnaK* und *aldA* mutationsfrei in dem Klonierungsvektor pDrive vorliegen.

Eine Überproduktion und Aufreinigung der entsprechenden Proteine wurde bisher noch nicht vorgenommen, da die Klonierung von *dnaK*, dessen Genprodukt die zentrale Rolle im Chaperon-System einnimmt (Ziętkiewicz *et al.*, 2004; Ben-Zvi & Goloubinoff, 2001), und von *aldA* noch aussteht.

3.8. Autotrophes Wachstum von *C. difficile*

Bei der von Claudia Held (TU München) durchgeführten Annotation des Genoms von *C. ljungdahlii* konnte die gleiche Anordnung der Gene des "Wood-Ljungdahl-Wegs" (Abb. 50) gefunden werden, wie sie in der Genomsequenz von *C. difficile* vorkommt.

C. difficile gilt allerdings nicht als acetogener Organismus und wurde bisher auch noch nicht auf autotrophes Wachstum untersucht. Lediglich von einem nah verwandten Isolat aus dem Pansen ist autotrophes Wachstum auf $\text{CO}_2 + \text{H}_2$ beschrieben (Rieu-Lesme *et al.*, 1998).

Die Anzucht von *C. difficile* erfolgte in RCM-Komplexmedium (2.5.1.6.). Anschließend wurde der Organismus in ATCC-Medium 1754 (2.5.1.8.) und AC-11-Medium (2.5.1.11.), welches auch in der Studie von Rieu-Lesme *et al.* (1998) verwendet wurde, mit einer $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von 0,1 inokuiert. Als Energie- und Kohlenstoffquelle diente entweder Glucose, Synthesegas oder $\text{CO}_2 + \text{H}_2$. Zudem erfolgte eine Kontrolle ohne Zugabe einer Energie- und Kohlenstoffquelle.

Während unter allen anderen Bedingungen nur eine maximale $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von etwa 0,2 erreicht wurde, wurde in ATCC-Medium 1754 mit $\text{CO}_2 + \text{H}_2$ als Substrat eine $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von 0,3-0,35 erreicht. Zugleich wurde deutlich mehr Acetat (etwa 5 mM anstatt 1,5-2 mM) und dafür etwas weniger Ethanol (0,2 mM anstatt 1-1,5 mM) gebildet. Die Konzentration an gebildetem Butyrat (knapp 1 mM) blieb ungefähr gleich. Bei einem weiteren Transfer in frisches ATCC-Medium 1754 mit $\text{CO}_2 + \text{H}_2$ war allerdings kein Wachstum mehr erkennbar.

Es sieht so aus, als ob *C. difficile* autotroph auf $\text{CO}_2 + \text{H}_2$ wachsen könnte. Das Wachstum ist jedoch sehr gering. Es bedarf also noch einer besseren Adaption an diese Bedingungen, zumal *C. difficile* davor in einem Medium kultiviert wurde, welches große Mengen an Komplexbestandteilen aufweist (5 g/l pankreatisch verdautes Casein, 5 g/l Pepton, 10 g/l Fleischextrakt, 3 g/l Hefeextrakt; Hirsch und Grinstead, 1954; http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/Reinforced_Clostridial_Medium.pdf). Zudem handelt es sich bei dem verwendeten Stamm um ein klinisches Isolat (Sebahia *et al.*, 2006). Natürliche Stämme sind möglicherweise besser dazu in der Lage, unter diesen Bedingungen zu wachsen.

4. Diskussion

Die mikrobielle Butanol-Synthese wurde erstmals im Jahr 1862 vom französischen Wissenschaftler Louis Pasteur beschrieben (Pasteur, 1862). Bei seinem Organismus “*Vibrio butyrique*“ handelte es sich aber vermutlich um eine Mischkultur. Eine erste Reinkultur wurde wenig später von Albert Fitz isoliert (Fitz, 1876; 1877; 1878; 1882). In der Folgezeit isolierten unter anderem auch die beiden bekannten Mikrobiologen Martinus Beijerinck und Sergei Winogradsky weitere Reinkulturen (Dürre und Bahl, 1996; Ross, 1961; McCutchan und Hickey, 1954).

Bis heute kennt man nur wenige verschiedene Mikroorganismen, welche in der Lage sind, 1-Butanol zu produzieren (Tab. 81; Abb. 49; Dürre, 2005; Dürre und Bahl, 1996; Sauer *et al.*, 1993). Es handelt sich dabei ausschließlich um anaerobe Organismen, die überwiegend zur Gattung *Clostridium* zählen. Weitere Butanol-produzierende Organismen sind *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, welches früher ebenfalls den Clostridien zugeordnet wurde (Collins *et al.*, 1994), *Butyribacterium methylotrophicum* und sogar das Archaeon *Hyperthermus butylicus*.

Tab. 81: Mikrobielle Butanolproduzenten

| Genus | Species | Referenz |
|-------------------------------------|----------------------------------|--|
| <i>Butyribacterium</i> | | |
| | <i>methylotrophicum</i> | Grethlein <i>et al.</i> , 1991 |
| <i>Clostridium</i> | | |
| | | Keis <i>et al.</i> , 2001 |
| | <i>acetobutylicum</i> | George <i>et al.</i> , 1983 McCoy <i>et al.</i> , 1926 |
| | <i>aurantibutyricum</i> | George <i>et al.</i> , 1983 |
| | <i>beijerinckii</i> | Keis <i>et al.</i> , 2001 George <i>et al.</i> , 1983 |
| | <i>butyricum</i> | Zoutberg <i>et al.</i> , 1989 |
| | <i>cadaveris</i> | George <i>et al.</i> , 1983 |
| | <i>carboxidivorans</i> | Liou <i>et al.</i> , 2005 |
| | <i>chauvoei</i> | Cortiñas <i>et al.</i> , 1994 Brooks <i>et al.</i> , 1976 |
| | <i>felsineum</i> | McClung und McCoy, 1935 |
| | <i>pasteurianum</i> | Harris <i>et al.</i> , 1986; George <i>et al.</i> , 1983 |
| | <i>puniceum</i> | Holt <i>et al.</i> , 1988 |
| | <i>roseum</i> | McCoy und McClung, 1935 |
| | <i>saccharobutylicum</i> | Keis <i>et al.</i> , 2001 |
| | <i>saccharoperbutyl-aceticum</i> | Keis <i>et al.</i> , 2001 |
| | <i>septicum</i> | Brooks <i>et al.</i> , 1976 |
| | <i>sporogenes</i> | George <i>et al.</i> , 1983 |
| | <i>tetanomorphum</i> | Gottwald <i>et al.</i> , 1984 |
| <i>Hyperthermus</i> | | |
| | <i>butylicus</i> | Zillig <i>et al.</i> , 1990 |
| <i>Thermoanaerobacterium</i> | | |
| | <i>thermosaccharolyticum</i> | Freier-Schröder <i>et al.</i> , 1989 |

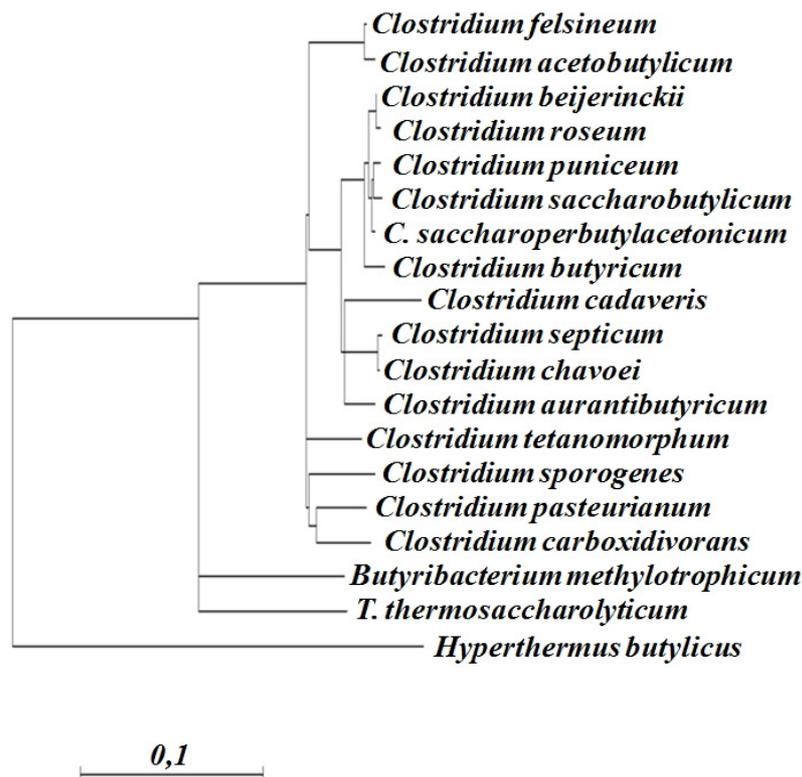


Abb. 49: Phylogenetische Verwandtschaft zwischen den bekannten mikrobiellen Butanolproduzenten anhand ihrer 16s rRNA-Gensequenzen
Diagramm erstellt mit "Ribosomal Database Project (RDP)"
(<http://rdp.cme.msu.edu/>; Cole *et al.*, 2007)

Während bei diesen Organismen der Mechanismus der Butanol-Synthese jedoch noch unklar ist (Brügger *et al.*, 2007; Grethlein *et al.*, 1991), ist die Butanol-Synthese in Clostridien bereits ausgiebig beschrieben. Als Modellorganismus gilt *C. acetobutylicum*. Das Genom dieses Organismus ist komplett sequenziert (Nölling *et al.*, 2001), und die für die Butanol-Produktion benötigten Enzyme und deren Gene sind bereits identifiziert und großteils auch schon charakterisiert (zur Übersicht: Noack *et al.*, 2009; Dürre, 2005; 2007; 2008; Dürre und Bahl, 1996; Jones und Woods, 1986).

C. acetobutylicum zeichnet sich durch einen biphasischen Stoffwechsel aus (Abb. 50; zur Übersicht: Noack *et al.*, 2009; Dürre, 2005; 2007; 2008; Dürre und Bahl, 1996; Jones und Woods, 1986). Zu Beginn des Wachstums, in der sogenannten acidogenen Phase bzw. Säurephase, werden hauptsächlich die organischen Säuren Acetat und Butyrat (sowie geringe Mengen an Ethanol, Acetoin und unter bestimmten Bedingungen auch Lactat) gebildet und in das umgebende Medium abgegeben, wo die Anhäufung dieser Säuren zu einer starken Absenkung des pH-Wertes führt.

Da anaerobe Bakterien jedoch nicht dazu in der Lage sind, den internen pH-Wert konstant zu halten, nimmt dieser parallel zum externen pH-Wert ab, wobei der interne pH-Wert dabei in der Regel immer um etwa eine Einheit höher ist als der externe pH-Wert (Gottwald und Gottschalk, 1985; Huang *et al.*, 1985; Dürre *et al.*, 1988). Ab einem externen pH-Wert von unter 4,5 liegen signifikante Mengen an undissoziierten Säuren vor (die Säurekonstante pK_S von Acetat beträgt 4,75 und von Butyrat 4,82), welche dann über die Zellwand ins Cytoplasma diffundieren können. Aufgrund des höheren pH-Werts in der Zelle können diese dort dann wieder in das entsprechende Salz und Protonen dissoziieren und würden somit zu einem Zusammenbruch des essentiellen Protonengradienten, welcher für Energiekonservierung und Transportvorgänge benötigt wird, führen.

Um dies zu verhindern, vollzieht *C. acetobutylicum* am Ende des logarithmischen Wachstums eine drastische Umstellung des Stoffwechsels ("Shift"). Der Organismus nimmt die organischen Säuren Acetat und Butyrat wieder auf und wandelt sie während der sogenannten solventogenen Phase bzw. Lösungsmittelphase in Aceton und 1-Butanol um. Diese Lösungsmittel, insbesondere 1-Butanol, sind zwar in höheren Konzentrationen für die Zellen toxisch, da zum einen die Fluidität der Zellmembran erhöht wird (Ingram, 1976; Vollherbst-Schneck *et al.*, 1984; Baer *et al.*, 1987; Baer *et al.*, 1989) und zum anderen Membranproteine wie Transporter (Bowles und Ellefson, 1985; Ounine *et al.*, 1985; Moreira *et al.*, 1981) oder ATPasen (Terracciano und Kashket, 1986) inhibiert werden, allerdings gewinnt die Zelle genügend Zeit, um die Endosporenbildung zu initiieren und somit ein langzeitiges Überleben zu gewährleisten.

Das Ausgangs-Intermediat für die Butanol-Synthese in *C. acetobutylicum* bildet Acetyl-CoA. Zwei Moleküle dieses Stoffes werden von der Thiolase ThlA zu Acetacetyl-CoA kondensiert, welches wiederum von der 3-(bzw. β -)Hydroxy-Butyryl-CoA-Dehydrogenase Hbd zu 3-(bzw. β -)Hydroxy-Butyryl-CoA, anschließend von der Crotonase Crt (bzw. Crotonyl-CoA-Hydratase Cch) zu Crotonyl-CoA und danach von der Butyryl-CoA-Dehydrogenase Bcd zu Butyryl-CoA umgewandelt wird (Abb. 50).

Aus den organischen Säuren Acetat und Butyrat wird über die Acetacetyl-CoA:Acetat/Butyrat-Coenzym A-Transferase (CoA-Transferase) CtfA/B ebenfalls Acetyl- und Butyryl-CoA gebildet. Butyryl-CoA wird dann durch die bifunktionelle Butyraldehyd-/Butanol-Dehydrogenase AdhE (bzw. Aad) zu Butyraldehyd und schließlich zu 1-Butanol reduziert. Die Reaktion von Butyraldehyd zu 1-Butanol wird zusätzlich von den beiden Butanol-Dehydrogenasen BdhA/B (bzw. BdhI/II) katalysiert (Abb. 50).

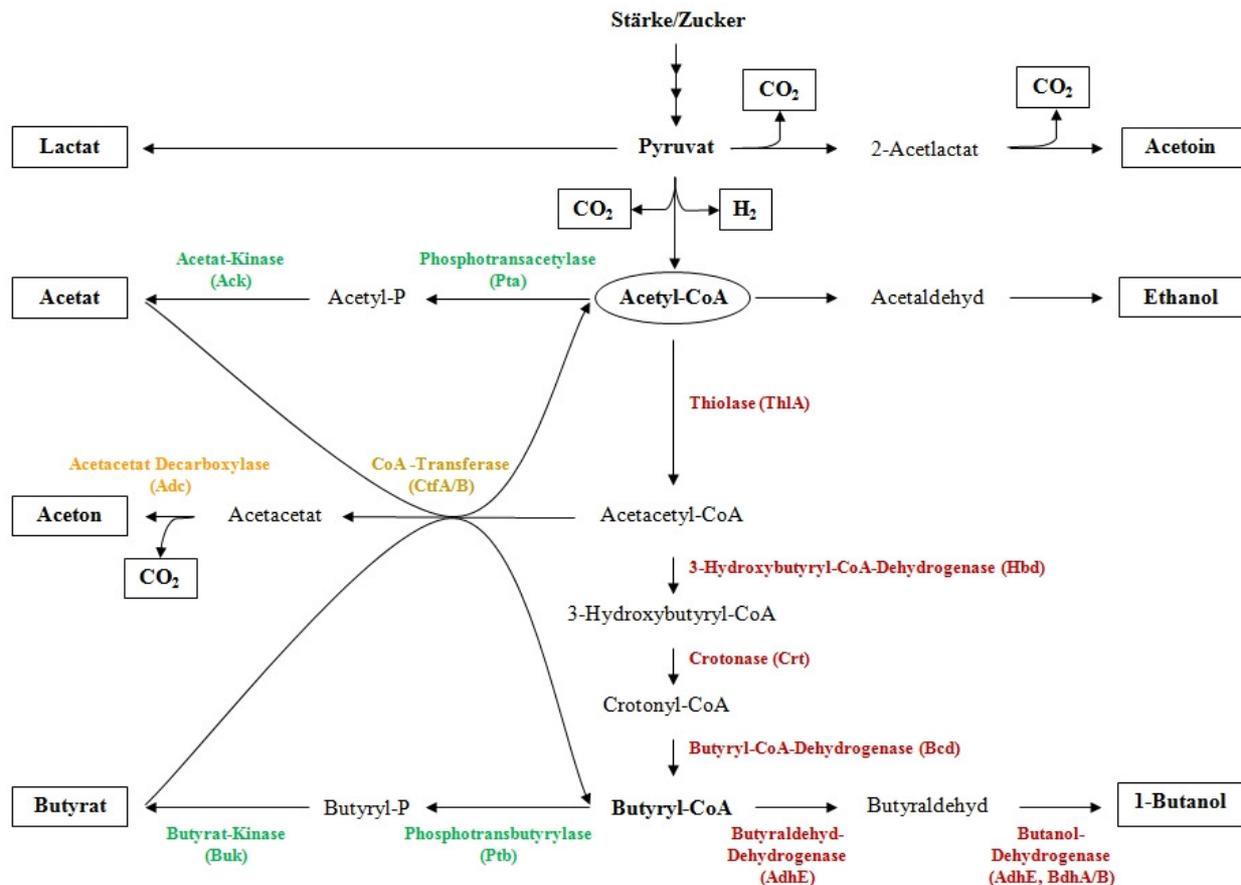


Abb. 50: Schema des Metabolismus von *C. acetobutylicum*

Zudem verfügt *C. acetobutylicum* noch über eine zweite bifunktionelle Butyraldehyd-/Butanol-Dehydrogenase AdhE2 (Fontaine *et al.*, 2002), welche jedoch nur unter bestimmten Bedingungen (bei neutralem pH und gleichzeitigem Überschuss an NAD(P)H) gebildet wird. Solche Bedingungen können bei Wachstum auf reduzierten Substraten, wie einer Mischung aus Glycerin und Glucose (Fontaine *et al.*, 2002), oder durch Zugabe bestimmter Reduktionsmittel, wie Methylviologen (Rao und Mutharasan, 1986 und 1987), erzeugt werden. Diese sogenannten alkohologenen Kulturen von *C. acetobutylicum* produzieren nur noch Ethanol und 1-Butanol, jedoch kein Aceton mehr.

Als Substrat kann *C. acetobutylicum* entweder Zucker oder Stärke nutzen. Stärke hat allerdings den Nachteil, dass sie beim Hitzesterilisieren geliert und dann beim Erkalten stabile Oligomere bildet, welche den enzymatischen Abbau erschweren (Ezeji *et al.*, 2005a). Bei der industriellen ABE-Fermentationen mit *C. acetobutylicum*, oder den ebenfalls genutzten *C. beijerinckii*, *C. saccharobutylicum* und *C. saccharoperbutylacetonicum* (Jones und Keis, 1995; Keis *et al.*, 2001) werden Melassen (überwiegend aus Zuckerrüben oder Zuckerrohr)

oder Getreide (hauptsächlich Mais) als Substrat verwendet (Ezeji *et al.*, 2005b). Der Einsatz dieser Substrate für industrielle Fermentationen ist jedoch aufgrund der unmittelbaren Konkurrenz zur Nahrungsmittelindustrie äußerst umstritten und kann keine dauerhafte Lösung darstellen. Deshalb wird schon seit Jahrzehnten nach alternativen Substraten gesucht. So wurden bereits Fermentationen mit Süßkartoffeln, Kartoffeln, Topinambur (Marchal *et al.*, 1985), Molke (Maddox *et al.*, 1993), Apfeltrester (Voget *et al.*, 1985) und anderen Substraten erfolgreich durchgeführt (Dürre, 1998; Ezeji *et al.*, 2005b). Allerdings steht auch die Verwendung dieser Substrate im direkten oder indirekten Wettbewerb zur Nahrungsmittelindustrie, und zudem ist die Butanol-Ausbeute auf einigen dieser Substrate deutlich geringer.

Die Verwertung von Cellulose (oder gar Lignocellulose) würde eine attraktive Alternative darstellen. In der Genomsequenz von *C. acetobutylicum* konnten sogar Gene für Cellulose-abbauende Enzyme gefunden werden (Sabathé *et al.*, 2002; Nölling *et al.*, 2001). Obwohl diese nach heterologer Überexpression in *E. coli* zu funktionellen Proteinen und auch zur Bildung eines Minicellulosoms führen (Sabathé und Soucaille, 2003; Lopéz-Contreras *et al.*, 2003; Schwarz, 2001), ist *C. acetobutylicum* nicht in der Lage, Cellulose zu verwerten. Hierfür ist eine Vorbehandlung der Cellulose vonnöten. Diese kann entweder thermochemisch (Gray *et al.*, 2006), enzymatisch (Gray *et al.*, 2006) oder durch Verwendung einer Co-Kultur eines cellulolytischen Organismus (Demain *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 1985) erfolgen. Wegen des erheblichen Zeitaufwandes und der hohen Kosten ist dieser Prozess jedoch nicht rentabel.

Darüber hinaus wird bereits seit Jahren versucht, Gene für die Enzyme des Cellulose-Abbaus aus verwandten cellulolytischen Clostridien (Leschine, 2005) wie *C. cellulolyticum* (Desvaux, 2005; Bélaich *et al.*, 1997) oder *C. thermocellum* (Demain *et al.*, 2005; Béguin *et al.*, 1987) in *C. acetobutylicum* einzubringen und dort zu exprimieren, um somit ein funktionierendes Cellulosom bilden zu können. Obwohl schon erste kleine Teilerfolge wie die Bildung eines Minicellulosoms erzielt werden konnten (Perret *et al.*, 2004; Mingardon, 2005), stellt sich dies als äußerst schwieriges Unterfangen dar, da für die Bildung eines funktionellen Cellulosoms 11-26 verschiedene Gene benötigt werden (Papoutsakis, 2008). Auch beim Einführen von anderen Stoffwechselwegen, wie etwa dem "Wood-Ljungdahl-Weg" (siehe unten; Abb. 51), in *C. acetobutylicum* mit dem Ziel einer verbesserten Substratnutzung wären ähnliche Probleme zu erwarten.

Daher erscheint die umgekehrte Variante, das Einbringen der für die Butanol-Synthese benötigten Gene aus *C. acetobutylicum* in einen Organismus, welcher geeignetere Substrate verwerten kann, erfolgsversprechender. Das Substrat sollte dabei kostengünstig, einfach und im Überfluss vorhandenen sein und weder mit der Nahrungsmittelindustrie konkurrieren, noch auf fossilem Ursprung beruhen. Der entsprechende Organismus sollte darauf effektiv wachsen können und daraus ein Intermediat bzw. Produkt in hinreichender Konzentration bilden, welches als Ausgangsstoff für die Butanol-Synthese über eine möglichst geringe Anzahl an eingebrachten Genen bzw. Enzymen von *C. acetobutylicum* dienen kann. Zusätzlich sollte der Organismus eine hohe Toleranz gegenüber 1-Butanol haben, dieses aber gleichzeitig nicht verstoffwechseln können. Überdies sollten die Handhabung sowie die Wachstumsbedingungen des Organismus nicht zu anspruchsvoll bzw. aufwendig für eine biotechnologische Nutzung sein. Außerdem wäre es von Vorteil, wenn der Organismus nahe verwandt zu *C. acetobutylicum*, sowie die Genomsequenz bereits bekannt ist.

Die Butanol-Synthese-Gene aus *C. acetobutylicum* könnten beispielsweise in ein cellulolytisches *Clostridium* (Leschine, 2005) wie *C. cellulolyticum* oder *C. thermocellum* eingebracht werden, welche Cellulose effektiv verwerten können. Der Cellulose-Abbau aus pflanzlichem Material ist allerdings sehr zeitintensiv und zudem sind diese Organismen extrem empfindlich, weshalb sich eine biotechnologische Verwendung als schwierig gestalten würde. Überdies handelt es sich bei *C. thermocellum* um einen thermophilen Organismus. Aus diesen Gründen wurde bisher auch noch keine entsprechende Arbeit durchgeführt, obwohl die Transformation für *C. cellulolyticum* (Tardif *et al.*, 2001) und *C. thermocellum* (Tyurin *et al.*, 2004) schon etabliert ist.

Eine hoffnungsvolle Alternative zu den cellulolytischen Organismen könnte die Gruppe der Acetogenen (zur Übersicht: Drake *et al.*, 2006; Drake, 1994; Imkamp und Müller, 2007) darstellen, welche autotroph auf verschiedenen einfachen C₁-Körpern wie Kohlenmonoxid (CO), Kohlendioxid plus Wasserstoff (CO₂ + H₂), Methanol oder Formiat wachsen (Diekert und Wolfarth, 1994). Diese Substrate werden über den "(Reduktiven) Acetyl-CoA-Weg" bzw. "Wood-Ljungdahl-Weg" (in Anerkennung an Harland G. Wood und Lars G. Ljungdahl für die Aufklärung der meisten beteiligten Enzyme im Modellorganismus *Moorella thermoacetica*) (Abb. 51) zu dem zentralen Intermediat Acetyl-CoA umgewandelt. Acetyl-CoA kann dann sowohl für den Anabolismus (zur Bildung von Zellmasse), als auch für den Katabolismus (zur Energiegewinnung durch Bildung von Acetat und teilweise auch anderen Produkten) verwendet werden.

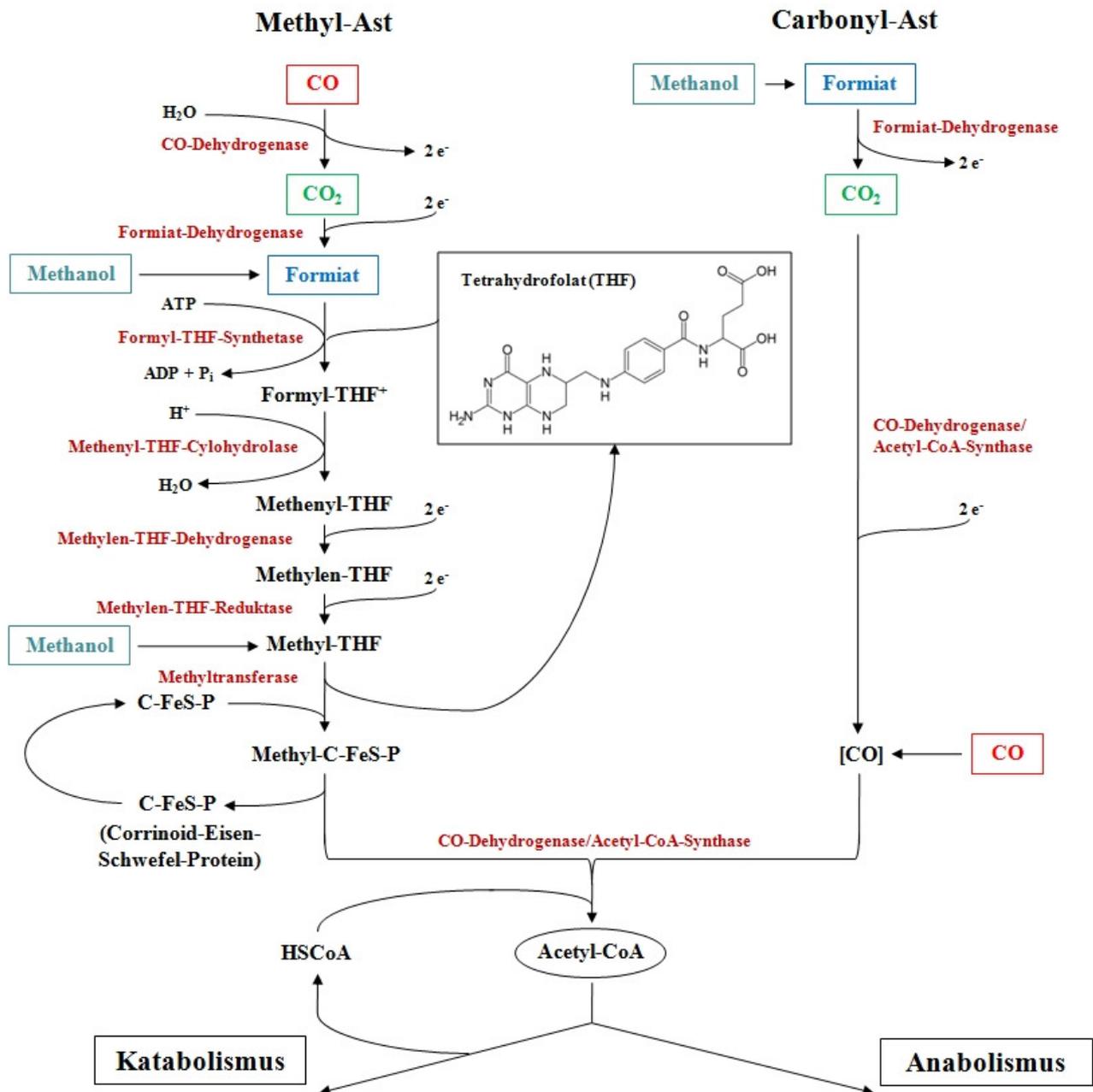


Abb. 51: “Acetyl-CoA-Weg“ bzw. “Wood-Ljungdahl-Weg“

Ausgehend von Acetyl-CoA sollte es schon mit 5-6 eingebrachte Genen bzw. Enzymen aus *C. acetobutylicum* möglich sein, 1-Butanol zu produzieren (Abb. 50). Dafür nötig wären eine Thiolase, eine 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase, eine Crotonase, eine Butyryl-CoA-Dehydrogenase und eine Butyraldehyd- sowie Butanol-Dehydrogenase. Hierfür wurde in einer vorangegangenen Arbeit (Hujer, unveröffentlicht) ein Butanol-Synthese-Plasmid mit den entsprechenden Genen konstruiert (3.2.).

Von den möglichen acetogenen Substraten sind besonders CO oder CO₂ + H₂ für industrielle Zwecke interessant, da entsprechende Gasgemische, wie etwa Synthesegas (welches in der Regel aus etwa 50-65 % CO, 30-45 % H₂, 2-5 % CO₂ besteht), relativ einfach und preiswert aus verschiedenen Quellen wie Kohle, Rohöl, Erdgas, aber auch Biomasse oder Hausmüll, erzeugbar sind (Weißermel und Arpe, 2003) und auch keine Konkurrenz zur Nahrungsmittelindustrie darstellen. Es bestehen bereits eine Vielzahl entsprechender Anlagen, in denen jährlich ca. 53,3 Millionen m³ Synthesegas produziert werden (Halmann und Steinfeld, 2006).

Aus den insgesamt etwa 100 verschiedenen bekannten acetogenen Spezies (Drake *et al.*, 2006; Imkamp und Müller, 2007) sollte nun ein geeigneter Produktionsstamm ausgewählt werden, welcher auf CO₂ + H₂ und insbesondere auf CO (dem Hauptbestandteil von Synthesegas) gut wachsen kann. Es sind allerdings nicht alle Acetogenen in der Lage, auf diesen beiden Substraten zu wachsen. Sämtliche dazu befähigten Organismen, welche in den Stammsammlungen DSMZ bzw. ATCC geführt werden, sind in Tab. 82 aufgelistet.

Zwei dieser Organismen können sogar, über einen noch nicht aufgeklärten Mechanismus, 1-Butanol zu produzieren (Tab. 82). Während *Butyribacterium methylotrophicum* nur geringe Mengen (0,08 g/l bzw. 1,08 mM) an Butanol bilden kann (Grethlein *et al.*, 1991) und zugleich auch nach Adaption (Lynd *et al.*, 1982) nur sehr langsam auf CO wächst (Tab. 83; Verdopplungszeit t_D = 13,9 h), zeigt *C. carboxidivorans* auf diesem Substrat gutes Wachstum (Tab. 83; t_D = 4,3 h) und kann dabei aus 600 mmol CO etwa 24 mmol Butanol herstellen (Liou *et al.*, 2005). Dieser Organismus kann Butanol jedoch auch (wieder) verstoffwechseln (Liou *et al.*, 2005) und darüber hinaus ist es im Rahmen der vorliegenden Arbeit weder gelungen, diesen Organismus auf Synthesegas wachsen zu lassen, noch erfolgreich zu transformieren (3.6.).

Von allen acetogenen Organismen existiert bisher lediglich für *Acetobacterium woodii* ein Transformationsprotokoll für das Einbringen fremder DNA (Strätz *et al.*, 1994). Dieser Organismus wächst jedoch ebenso langsam auf CO wie *Butyribacterium methylotrophicum* (Tab. 83).

Etwas besseres Wachstum auf CO zeigen *Moorella thermoautotrophica* und *M. thermoacetica* (Tab. 83; t_D = 7-9 h). Von letzterem ist seit kurzem sogar, als bisher einzigem acetogenen Organismus, die komplette Genomsequenz veröffentlicht (Pierce *et al.*, 2008). Allerdings handelt es sich bei *Moorella* um eine thermophile Gattung (Tab. 82), wodurch die Kosten für einen Fermentationsprozess steigen würden.

Tab. 82: Acetogene Organismen mit Wachstum auf CO oder CO₂ + H₂

| Organismus | Wachstum auf | | Produkt(e) | T _{opt} [°C] | Stämme | Referenz |
|---|--------------|----------------------------------|--------------------|--------------------------|--|--|
| | CO | CO ₂ + H ₂ | | | | |
| <i>Acetitomaculum ruminis</i> | + | + | Acetat | 38 | 139B ^T (DSM 5522 = ATCC 43876) | Greening und Leedle, 1989 |
| <i>Acetoanaerobium noterae</i> | n. b. | + | Acetat | 37 | NOT-3 ^T (ATCC 35199) | Sleat <i>et al.</i> , 1985 |
| <i>Acetobacterium bakii</i> | + | + | Acetat | 20 | Z-4391 ^T (DSM 8239) | Kotsyurbenko <i>et al.</i> , 1995 |
| <i>Acetobacterium carbinolicum</i> ssp. <i>kysingese</i> | n. b. | + | Acetat | 27 | WoProp1 ^T (DSM 2925) | Eichler und Schink, 1984 |
| | n. b. | + | Acetat | 27 | KoMac1 (DSM 5193) | Schuppert und Schink, 1990 |
| | + | + | Acetat | 29 | SyrA5 ^T (DSM 16427 = ATCC BAA-990) | Paarup <i>et al.</i> , 2005 |
| <i>Acetobacterium dehalogenans</i> | + | + | Acetat | 25 | MC ^T (DSM 11527) | Traunecker <i>et al.</i> , 1991 |
| <i>Acetobacterium fimetarium</i> | + | + | Acetat | 30 | Z-4290 ^T (DSM 8238) | Kotsyurbenko <i>et al.</i> , 1995 |
| <i>Acetobacterium malicum</i> | n. b. | + | Acetat | 30 | MuME1 ^T (DSM 4132 = ATCC 51201) | Tanaka und Pfennig, 1989 |
| <i>Acetobacterium paludosum</i> | + | + | Acetat | 20 | Z-4092 ^T (DSM 8237) | Kotsyurbenko <i>et al.</i> , 1995 |
| <i>Acetobacterium sp.</i> | n. b. | + | Acetat | 25-30 | LuPhet1 (DSM 9077) LuTria3 (DSM 8909) | Frings und Schink, 1994 Frings <i>et al.</i> , 1994 |
| <i>Acetobacterium tundrae</i> | + | + | Acetat | 20 | Z-4493 ^T (DSM 9173) | Simankova <i>et al.</i> , 2000 |
| <i>Acetobacterium wieringae</i> | n. b. | + | Acetat | 30 | DSM 1911 ^T = ATCC 43740 | Braun und Gottschalk, 1982 |
| <i>Acetobacterium woodii</i> | + | + | Acetat | 30 | WB1 ^T (DSM 1030 = ATCC 29683) Gra EG 12 (DSM 2396) | Balch <i>et al.</i> , 1977 Sharak Genthner und Bryant, 1987 Schink und Stieb, 1983 |
| <i>Acetohalobium arabaticum</i> | + | + | Acetat | 38-40 | Z-7288 ^T (DSM 5501 = ATCC 49924) | Zhilina und Zavarzin, 1990 |
| <i>Acetonema longum</i> | n. b. | + | Acetat, Butyrat | 30-33 | APO-1 ^T (DSM 6540 = ATCC 51454) | Kane und Breznak, 1991 |

T_{opt} = optimale Wachstumstemperatur; n. b. = nicht beschrieben; ^T = Typstamm

Tab. 82: Fortsetzung

| Organismus | Wachstum auf CO CO ₂ + H ₂ | | Produkt(e) | T _{opt} [°C] | Stämme | Referenz |
|---|---|---|--|--------------------------|--|--|
| <i>Blautia hydrogenotrophica</i> ¹⁾ | n. b. | + | Acetat | 35-37 | DSM 10507 ^T | Bernalier <i>et al.</i> , 1996 |
| <i>Blautia producta</i> ²⁾ | + | + | Acetat | 37 | U-1 (DSM 3507 = ATCC 35244) Marburg (ATCC 43917) | Lorowitz und Bryant, 1984 Geerlings <i>et al.</i> , 1987 |
| <i>Blautia schinkii</i> ³⁾ | n. b. | + | Acetat | 39 | DSM 10518 ^T | Rieu-Lesme <i>et al.</i> , 1996 |
| <i>Butyribacterium methylotrophicum</i> ⁴⁾ | + ⁵⁾ | + | Acetat, Ethanol, Butyrat, Butanol | 37 | Marburg ^T (DSM 3468 = ATCC 33266) | Zeikus <i>et al.</i> , 1980 Lynd <i>et al.</i> , 1982 Grethlein <i>et al.</i> , 1991 |
| <i>Clostridium aceticum</i> | + | + | Acetat | 30 | DSM 1496 ^T = ATCC 35044 | Wieringa, 1936 Adamse, 1980 Lux und Drake, 1992 |
| <i>Clostridium autoethanogenum</i> ⁶⁾ | + | + | Acetat, Ethanol | 37 | JA1-1 ^T (DSM 10061) | Abrini <i>et al.</i> , 1994 |
| <i>Clostridium carboxidivorans</i> | + | + | Acetat, Ethanol, Butyrat, Butanol | 37-40 | P7 ^T (DSM 15243 = ATCC BAA-624) | Rajagopalan <i>et al.</i> , 2002 Liou <i>et al.</i> , 2005 |
| <i>Clostridium drakei</i> ⁷⁾ | + | + | Acetat, Butyrat | 37 | SL1 ^T (DSM 12750 = BAA-623) FP (DSM 14770) | Küsel <i>et al.</i> , 2000 Liou <i>et al.</i> , 2005 Gößner <i>et al.</i> , 2008 |

T_{opt} = optimale Wachstumstemperatur; n. b. = nicht beschrieben; ^T = Typstamm

¹⁾ frühere Bezeichnung: *Ruminococcus hydrogenotrophicus* (Liu *et al.*, 2008)

²⁾ frühere Bezeichnungen: *Ruminococcus productus* (Liu *et al.*, 2008) und *Peptostreptococcus productus* (Ezaki *et al.*, 1994)

³⁾ frühere Bezeichnung: *Ruminococcus schinkii* (Liu *et al.*, 2008)

⁴⁾ *Butyribacterium methylotrophicum* und *Eubacterium limosum* könnten zur selben Spezies gehören, da sie nahezu dieselben Eigenschaften haben und phylogenetisch identisch sind (Abb. 52; Jansen und Hansen, 2001; Tanner & Woese, 1994; Sharak Genthner *et al.*, 1981; Tanner *et al.*, 1981; Zeikus *et al.*, 1980; Moore und Cato, 1965)

⁵⁾ Das Wachstum auf CO erfolgte erst nach Adaption des Organismus (Lynd *et al.*, 1982)

⁶⁾ *C. autoethanogenum* ist phylogenetisch nicht von *C. ljungdahlii* unterscheidbar (Abb. 52) und bildet somit wohlmöglich keine eigene Spezies (Stackebrandt *et al.*, 1999)

⁷⁾ frühere Bezeichnung: *Clostridium scatologenes* SL1 (Liou *et al.*, 2005)

Tab. 82: Fortsetzung

| Organismus | Wachstum auf CO CO ₂ + H ₂ | | Produkt(e) | T _{opt} [°C] | Stämme | Referenz |
|---------------------------------------|---|---|--------------------|--------------------------|---|---|
| <i>Clostridium formicoaceticum</i> | + | - | Acetat, Formiat | 37 | A1 ^T (DSM 92 = ATCC 27076) DSM 93 = ATCC 23439 ⁸⁾ 5(1)b (DSM 94 = ATCC 27077) 12(1)c (DSM 95) 12(3)b (DSM 96) 26(1)a (DSM 97) 29(2)b (DSM 98 = ATCC 27078) 32(1)b (DSM 99) 34(1)a (DSM 100) | El Ghazzawi, 1967 Lux und Drake, 1992 Andreesen <i>et al.</i> , 1970 |
| <i>Clostridium glycolicum</i> | n. b. | + | Acetat | 37-40 | 22 (ATCC 29797) RD-1 (DSM 13865) | Ohwaki und Hungate, 1977 Küsel <i>et al.</i> , 2001 |
| <i>Clostridium ljungdahlii</i> | + | + | Acetat, Ethanol | 37 | PETC ^T (DSM 13583 = ATCC 55383) ERI-2 (ATCC 55380) O-52 (ATCC 55989) C-01 (ATCC 55988) | Barik <i>et al.</i> , 1988 Tanner <i>et al.</i> , 1993 Gaddy, 1997 Gaddy, 2002 |
| <i>Clostridium magnum</i> | n. b. | + | Acetat | 29 | DSM 2767 ^T = ATCC 49199 | Schink, 1984 Bomar <i>et al.</i> , 1993 |
| <i>Clostridium mayombeii</i> | n. b. | + | Acetat | 33 | DSM 6539 ^T = ATCC 51428 | Kane <i>et al.</i> , 1991 |
| <i>Clostridium methoxybenzovorans</i> | n. b. | + | Acetat, Formiat | 37 | SR3 ^T (DSM 12182 = ATCC 700855) | Mechichi <i>et al.</i> , 1999 |
| <i>Clostridium ragsdalei</i> | + | + | Acetat, Ethanol | 37 | P11 ^T (ATCC PTA-7826) | Huhnke <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>Clostridium scatologenes</i> | + | + | Acetat, Ethanol | 37-40 | DSM 757 ^T = ATCC 25775 | Liou <i>et al.</i> , 2005 |

T_{opt} = optimale Wachstumstemperatur; n. b. = nicht beschrieben; ^T = Typstamm

⁸⁾ frühere Bezeichnung: *Clostridium aceticum* (El Ghazzawi, 1967)

| Organismus | Wachstum auf CO CO ₂ + H ₂ | | Produkt(e) | T _{opt} [°C] | Stämme | Referenz |
|---|---|---|--------------------|--------------------------|--|--|
| <i>Eubacterium aggregans</i> | n. b. | + | Acetat, Formiat | 35 | SR12 ^T (DSM 12183) | Mechichi <i>et al.</i> , 1998 |
| <i>Eubacterium limosum</i> ⁴⁾ | + | + | Acetat | 39 | DSM 20543 ^T = ATCC 8486 L34 (ATCC 51976) | Sharak Genthner <i>et al.</i> , 1981 Bryant <i>et al.</i> , 1958 |
| <i>Moorella mulderi</i> | n. b. | + | Acetat | 65 | TMS ^T (DSM 14980 = ATCC BAA-608) | Balk <i>et al.</i> , 2003 |
| <i>Moorella thermoacetica</i> ⁹⁾ | + | + | Acetat | 55-60 | DSM 521 ^T = DSM 2955 = ATCC 35608 | Fontaine <i>et al.</i> , 1942 Kerby und Zeikus, 1983 |
| | | | | | ATCC 39073 99-78-22 (ATCC 31490) C5-2 (ATCC 39289) G-20 (DSM 6867 = ATCC 49707) DSM 11768 ET-5a (DSM 12797) | Andreesen <i>et al.</i> , 1973 Schwartz und Keller, 1982 Reed, 1985 Parekh und Cheryan, 1991 Gößner <i>et al.</i> , 1999 |
| <i>Moorella thermoautotrophica</i> ¹⁰⁾ | + | + | Acetat | 56-60 | JW701/3 ^T (DSM 1974 = ATCC 33924) Inf1 (DSM 7417) | Wiegel <i>et al.</i> , 1981 Savage <i>et al.</i> , 1987 van Rijssel <i>et al.</i> , 1992 |
| <i>Oxobacter pfennigii</i> ¹¹⁾ | + | + | Acetat, Butyrat | 36-38 | V5-2 ^T (DSM 3222 = ATCC 43583) | Krumholz und Bryant, 1985 |

T_{opt} = optimale Wachstumstemperatur; n. b. = nicht beschrieben; ^T = Typstamm

⁴⁾ *Butyribacterium methylotrophicum* und *Eubacterium limosum* könnten zur selben Spezies gehören, da sie nahezu dieselben Eigenschaften haben und phylogenetisch identisch sind (Abb. 52; Jansen und Hansen, 2001; Tanner & Woese, 1994; Sharak Genthner *et al.*, 1981; Tanner *et al.*, 1981; Zeikus *et al.*, 1980; Moore und Cato, 1965)

⁹⁾ frühere Bezeichnung: *Clostridium thermoaceticum* (Collins *et al.*, 1994)

¹⁰⁾ frühere Bezeichnung: *Clostridium thermoautotrophicum* (Collins *et al.*, 1994)

¹¹⁾ frühere Bezeichnung: *Clostridium pfennigii* (Collins *et al.*, 1994)

| Organismus | Wachstum auf | | Produkt(e) | T _{opt} [°C] | Stämme | Referenz |
|--|--------------|----------------------------------|------------|--------------------------|---|--|
| | CO | CO ₂ + H ₂ | | | | |
| <i>Sporomusa acidovorans</i> | n. b. | + | Acetat | 35 | DSM 3132 ^T = ATCC 49682 | Ollivier <i>et al.</i> , 1985 |
| <i>Sporomusa aerivorans</i> | n. b. | + | Acetat | 30 | TmAO3 ^T (DSM 13326 = ATCC BAA-625) | Boga <i>et al.</i> , 2003 |
| <i>Sporomusa malonica</i> | n. b. | + | Acetat | 28-32 | WoG12 ^T (DSM 5090 = ATCC 49648) | Dehning <i>et al.</i> , 1989 |
| <i>Sporomusa ovata</i> | n. b. | + | Acetat | 34-39 | H1 ^T (DSM 2662 = ATCC 35899) H6 (DSM 2663) Nile (DSM 3300) | Möller <i>et al.</i> , 1984 |
| <i>Sporomusa paucivorans</i> | n. b. | + | Acetat | 34 | X ^T (DSM 3697) | Herrmann <i>et al.</i> , 1987 |
| <i>Sporomusa rhizae</i> | - | + | Acetat | 35 | RS ^T (DSM 16652 = BAA-1028) | Gößner <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>Sporomusa silvacetica</i> | - | + | Acetat | 30 | DG-1 ^T (DSM 10669) | Kuhner <i>et al.</i> , 1997 |
| <i>Sporomusa sphaeroides</i> | n. b. | + | Acetat | 35-39 | E ^T (DSM 2875 = ATCC 35900) | Möller <i>et al.</i> , 1984 |
| <i>Sporomusa termitida</i> | + | + | Acetat | 30 | JDN-2 ^T (DSM 4440 = ATCC 49633) | Breznak <i>et al.</i> , 1998 |
| <i>Thermacetogenium phaeum</i> | n. b. | + | Acetat | 58 | PB ^T (DSM 12270) | Hattori <i>et al.</i> , 2000 |
| <i>Thermoanaerobacter kivui</i> ¹²⁾ | - | + | Acetat | 66 | LKT-1 ^T (DSM 2030 = ATCC 33488) | Leigh <i>et al.</i> , 1981 Leigh und Wolfe, 1983 Daniel <i>et al.</i> , 1990 |
| <i>Treponema primitia</i> | - | + | Acetat | 30 | ZAS-2 ^T (DSM 12427 = ATCC BAA-887) ZAS-1 (DSM 12426) | Graber <i>et al.</i> , 2004 Graber und Breznak, 2004 |

T_{opt} = optimale Wachstumstemperatur; n. b. = nicht beschrieben; ^T = Typstamm
¹²⁾ frühere Bezeichnung: *Acetogenium kivui* (Rainey *et al.*, 1993; Collins *et al.*, 1994)

Tab. 83: Verdopplungszeit und Wachstumsraten einiger acetogener Organismen auf CO

| Organismus/Stamm | Verdopplungszeit t_D [h] | Wachstumsrate μ [h^{-1}] | Referenz |
|---|----------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|
| <i>Blautia producta</i> U-1 | 1,5 | 0,46 | Lorowitz und Bryant, 1984 |
| <i>Blautia producta</i> Marburg | 3 | 0,23 | Geerlings <i>et al.</i> , 1987 |
| <i>Clostridium ljungdahlii</i> PETC ^T | 3,8 | 0,18 | Henstra <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>Clostridium ragsdalei</i> P11 ^T | 4 | 0,175 | Huhnke <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>Clostridium carboxidivorans</i> P7 ^T | 4,3 | 0,16 | Liou <i>et al.</i> , 2005 |
| <i>Clostridium drakei</i> SL1 ^T | 5,8 | 0,12 | Liou <i>et al.</i> , 2005 |
| <i>Moorella thermoautotrophica</i> JW701/3 ^T | 7 | 0,10 | Savage <i>et al.</i> , 1987 |
| <i>Clostridium scatologenes</i> DSM 757 ^T | 7,7 | 0,09 | Liou <i>et al.</i> , 2005 |
| <i>Moorella thermoacetica</i> ATCC 39073 | 9 | 0,08 | Daniel <i>et al.</i> , 1990 |
| <i>Eubacterium limosum</i> RF | 9 | 0,08 | Sharak Genthner und Bryant, 1982 |
| <i>Acetobacterium woodii</i> WB1 ^T | 13 | 0,05 | Sharak Genthner und Bryant, 1987 |
| <i>Butyribacterium methylotrophicum</i> Marburg ^T | 13,9 ¹⁾ | 0,05 | Lynd <i>et al.</i> , 1982 |
| <i>Oxobacter pfennigii</i> V5-2 ^T | 13,9 ²⁾ | - | Krumholz und Bryant, 1985 |
| <i>Moorella thermoacetica</i> DSM 2955 | 16 | 0,04 | Kerby und Zeikus, 1983 |

^T = Typstamm

¹⁾ Das Wachstum auf CO erfolgte erst nach Adaption des Organismus (Lynd *et al.*, 1982)

²⁾ Generationszeit g anstatt Verdopplungszeit t_D

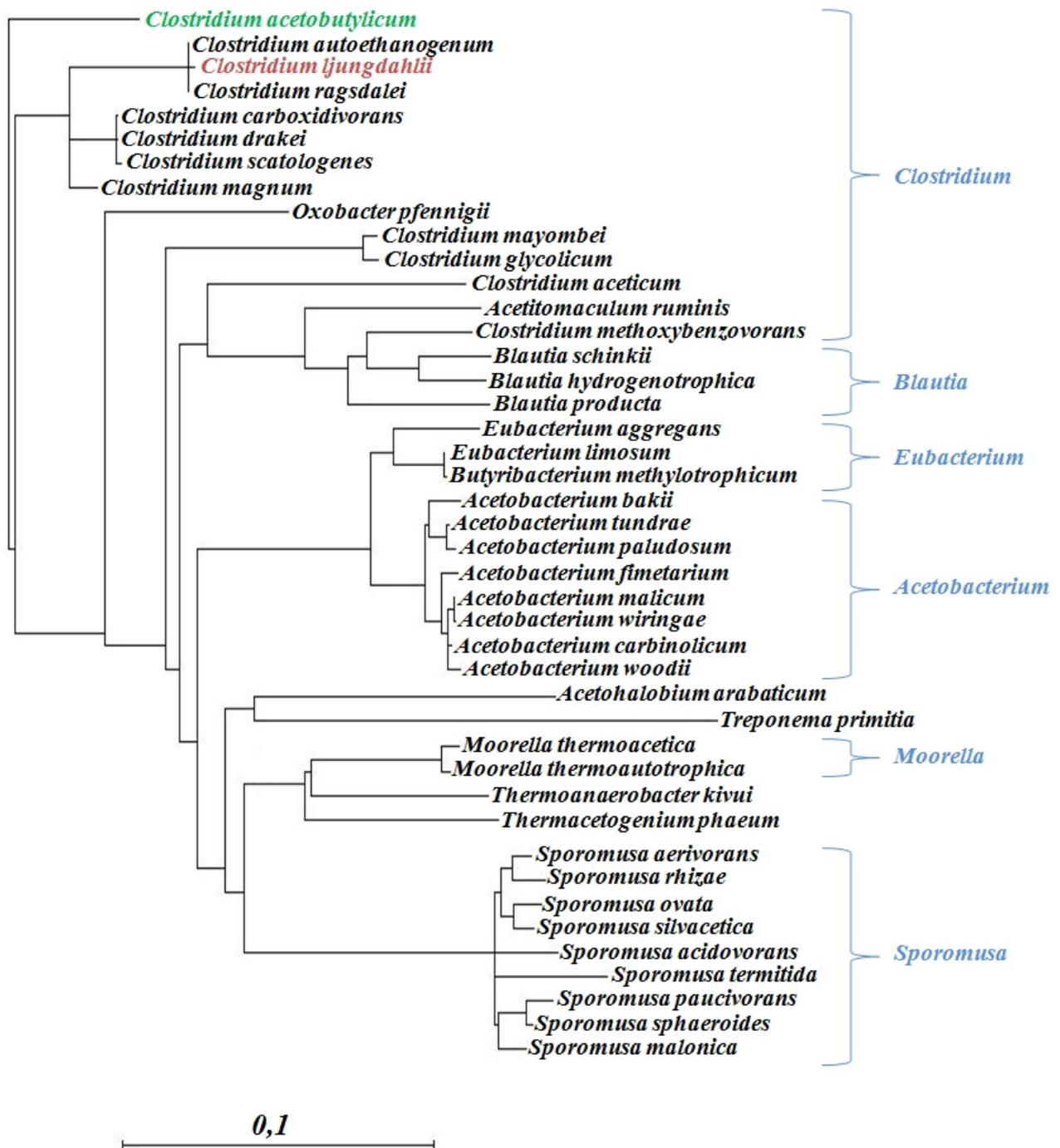


Abb. 52: Phylogenetische Verwandtschaft von *C. acetobutylicum* zu verschiedenen Acetogenen anhand von 16s rRNA-Gensequenzen
Diagramm erstellt mit dem "Ribosomal Database Project (RDP)"
(<http://rdp.cme.msu.edu/>; Cole *et al.*, 2007)

Das beste Wachstum auf CO ist für zwei Stämme (U-1 und Marburg) von *Blautia producta* beschrieben (Tab. 83; $t_D = 1,5-3$ h). Diese Stämme sind jedoch nur entfernt verwandt mit *C. acetobutylicum* (Abb. 52) und haben zudem einen deutlich höheren G+C-Gehalt von etwa 45-46 mol % gegenüber 31 mol %, sodass die Expression der Butanol-Synthese-Gene aus *C. acetobutylicum* ungewiss wäre. Überdies ist unklar, ob sich die bekannten Schaukelvektoren in *Blautia producta* überhaupt replizieren ließen. Gleiches trifft auch für die oben genannten *Moorella*- (G+G-Gehalt = 53-56 mol %), *Acetobacterium*- (35-48 mol %) sowie *Eubacterium*-Stämme bzw. *Butyribacterium methylotrophicum* (48-55 mol %) zu (Abb. 52; Collins *et al.*, 1994).

Eine nahe Verwandtschaft zu *C. acetobutylicum* wäre auch deshalb notwendig, da im konstruierten Butanol-Synthese-Operon die Gene für die Elektronentransfer-Flavoproteine EtfA/B aus *C. acetobutylicum* fehlen (3.2.). Diese sind jedoch für die Aktivität der Butyryl-CoA-Dehydrogenase Bcd essentiell (Inui *et al.*, 2007), sodass es nach Einbringen des Butanol-Synthese-Plasmides in *E. coli* nicht möglich war, 1-Butanol zu produzieren (3.3.). Elektronentransfer-Flavoproteine sind zwar weitverbreitet (Tsai und Saier, 1995) und kommen auch in *E. coli* vor, allerdings weisen diese nur sehr geringe Homologien zu EtfA/B von *C. acetobutylicum* auf. Elektronentransfer-Flavoproteine mit hoher Identität konnten jedoch in mehreren Clostridien sowie *Moorella thermoacetica* gefunden werden (3.4.1.), welche eventuell auch deren Funktion übernehmen könnten. Ob dies bei *Blautia*, *Acetobacterium* oder *Eubacterium* ebenfalls so ist, ist hingegen unklar.

Neben diesen Organismen gibt jedoch auch einige acetogene Clostridien (Abb. 52; Drake und Küsel, 2005), welche wie *C. acetobutylicum* der *Clostridium*-Gruppe I (Collins *et al.*, 1994) angehören und sehr effektiv auf CO wachsen können (Tab. 83). Dazu zählen *C. ljungdahlii*, *C. ragsdalei*, *C. drakei* und *C. scatologenes*. Das beste Wachstum dieser Organismen zeigt dabei *C. ljungdahlii* ($t_D = 3,8$ h; Henstra *et al.*, 2007), welches auch schon von BRI Energy, LLC und Bioengineering Resources, Inc. für die industrielle Herstellung von Bioethanol aus Hausmüll genutzt wird (<http://www.brienergy.com>; Gaddy, 2000) und sich daher gut als Produktionsstamm für die Herstellung von 1-Butanol über eingebrachte Gene bzw. Enzyme aus *C. acetobutylicum* eignen sollte.

C. ljungdahlii wurde 1988 von Barik *et al.* aus Hühnermist isoliert und anschließend von Tanner *et al.* (1993) charakterisiert. Der in Anerkennung der Arbeit von Lars G. Ljungdahl benannte Organismus bildet in der Regel 0,6 x 2-3 μm lange Stäbchen (Abb. 5), sporuliert unregelmäßig und produziert außer Acetat auch noch Ethanol. Neben CO und $\text{CO}_2 + \text{H}_2$ kann *C. ljungdahlii* unter anderem Fructose, Pyruvat, Ethanol und nach Adaption auch Glucose verwerten. Zusätzlich zum Typstamm PETC wurden später noch die Stämme ERI-2 (Gaddy, 1997) sowie O-52 und C-01 (Gaddy, 2002) isoliert. Auch *C. autoethanogenum* (Abrini *et al.*, 1994) könnte zur Spezies *C. ljungdahlii* gehören (Stackebrandt *et al.*, 1999; Abb. 52).

Es wurden bereits zahlreiche Fermentationsstudien (Vega *et al.*, 1989; Klasson *et al.*, 1990 und 1992; The United States Department of Energy, 1992a; 1993abc; 1995; Arora *et al.*, 1995; 1996; 1997; Bredwell *et al.*, 1999; Younesi *et al.*, 2005; 2006; Najafpour und Younesi, 2006; Cotter *et al.*, 2009) mit *C. ljungdahlii* durchgeführt, allerdings existiert bisher noch keine Transformationsmethode. Daher musste zuerst ein entsprechendes Transformationsprotokoll etabliert werden (2.7.2.2.). Darüber hinaus wurde eine Methode zur Stammhaltung entwickelt (2.5.4.2.) und das Wachstum auf Fructose und insbesondere auf CO optimiert (3.1.). Zudem wurde gezeigt, dass der Organismus nicht in der Lage ist, auf 1-Butanol zu wachsen und eine ähnliche Butanol-Toleranz wie *C. acetobutylicum* aufweist (3.1.5.).

Parallel dazu wurde am Göttingen Genomics Laboratory (Georg-August-Universität Göttingen) das Genom von *C. ljungdahlii* sequenziert (2.6.15.). Dieses stellt mit ca. 4,63 MBp eines der größten clostridiellen Genome dar (Brüggemann und Gottschalk, 2008) und hat wie jenes von *C. acetobutylicum* einen G+C-Gehalt von etwa 31 mol %. Momentan erfolgt die Annotation der Genomsequenz. Dabei wurde eine ähnliche Anordnung der Gene für die Enzyme des "Wood-Ljungdahl-Wegs" (Abb. 51) wie in der Genomsequenz von *C. difficile*, welcher jedoch nicht als acetogener Organismus beschrieben ist, gefunden. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit *C. difficile* auf autotrophes Wachstum auf CO oder $\text{CO}_2 + \text{H}_2$ getestet, wobei schwaches Wachstum auf $\text{CO}_2 + \text{H}_2$ als Substrat nachgewiesen werden konnte (3.8.).

Bei der Annotation des Genoms fiel desweiteren auf, dass in der Genomsequenz von *C. ljungdahlii* keine Gene für Cytochrome und Quinone bzw. deren Biosynthese vorhanden sind, gleichzeitig aber eine H^+ -abhängige anstelle einer Na^+ -abhängigen ATPase identifiziert werden konnte. Dies ist überraschend, da es sich mit keiner der beiden bekannten Arten der Energiekonservierung von acetogenen Organismen deckt (Müller, 2003).

So generieren H^+ -abhängige Acetogene wie *Moorella thermoacetica* und *M. thermoautotrophica* einen Protonengradienten über eine membranständige Elektronentransportkette (Das und Ljungdahl, 2003) mit den Cytochromen b_{559} und b_{554} sowie dem Menaquinon MK7 (Das *et al.*, 1989) und konservieren Energie über eine H^+ -abhängige F_1F_0 -ATPase (Ivey und Ljungdahl, 1986; Das *et al.*, 1997). Na^+ -abhängige Acetogene wie *Acetobacterium woodii* (Heise *et al.*, 1989), *Blautia producta* (Geerlings *et al.*, 1989) und *Thermoanaerobacter kivui* (Yang und Drake, 1990) bauen im Gegensatz dazu über einen bisher unbekanntem Mechanismus einen Na^+ -Gradienten auf. Anstelle von Cytochromen und Quinonen besitzen diese Organismen Corrinnoide (Dangel *et al.*, 1987). Die Energiekonservierung erfolgt über eine Na^+ -abhängige F_1F_0 -ATPase (Müller *et al.*, 2001).

Es wurde getestet, ob *C. ljungdahlii* ebenfalls Natrium für die Energiegewinnung benötigt, indem dieses aus dem Medium entfernt wurde. Es trat jedoch weder mit Fructose als Substrat, noch bei autotrophem Wachstum auf CO oder $CO_2 + H_2$ eine Hemmung des Wachstums auf (3.1.7.). *C. ljungdahlii* repräsentiert also einen neuen Typ der Energiegewinnung unter den acetogenen Bakterien. Im Vergleich zu den H^+ -abhängigen Acetogenen konnten bei *C. ljungdahlii* keine Cytochrome bzw. Quinone entdeckt werden, und im Unterschied zu den Na^+ -abhängigen Acetogenen benötigt *C. ljungdahlii* für das autotrophe Wachstum kein Natrium und die ATPase weist keine Na^+ -Koordinationsstelle auf (Müller *et al.*, 2001; Meier *et al.*, 2006).

Über den Mechanismus der Energiegewinnung kann allerdings nur spekuliert werden. Auch bei den Na^+ -abhängigen Acetogenen ist dieser Mechanismus noch nicht komplett aufgeklärt. Für *Acetobacterium woodii* wird angenommen, dass ein Rnf-Komplex am Aufbau des Natriumgradienten beteiligt ist (Müller *et al.*, 2008). *C. ljungdahlii* besitzt einen solchen membranständigen Komplex ebenfalls. Es handelt sich dabei um eine Ferredoxin: NAD^+ -Oxidoreduktase, welche Elektronen von einem reduzierten Ferredoxin auf NAD^+ überträgt und gleichzeitig durch Ausschleusen von Protonen bzw. Ionen einen Gradienten aufbauen kann, welcher dann für die Energiekonservierung über eine ATPase genutzt werden kann (Abb. 53; Müller *et al.*, 2008). Das reduzierte Ferredoxin kann über die Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (bei heterotrophem Wachstum auf Zuckern), die Hydrogenase (bei autotrophem Wachstum auf $CO_2 + H_2$) oder die CO -Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthase (bei autotrophem Wachstum auf CO) erzeugt werden (Abb. 53; Ragsdale, 2004; 2008). Das entstehende $NADH + H^+$ könnte schließlich im "Methyl-Ast" des "Wood-Ljungdahl-Weges" wieder reoxidiert werden (Abb. 51).

Im "Methylen-Ast" des "Wood-Ljungdahl-Weges" werden jedoch auch zwei Reaktionen, von Methylen-THF zu Methyl-THF über die Methylen-THF-Reduktase und die darauffolgende Übertragung des Methylgruppe auf das Corrinoid-Eisen-Schwefel-Protein über die Methyltransferase (Abb. 51), aufgrund des stark negativen Redoxpotentials bzw. der freien Reaktionsenergie mit der Energiekonservierung assoziiert (Drake *et al.*, 2006; Müller, 2003; Müller *et al.*, 2001; Wolfarth und Diekert, 1991). So weist Methylen-THF zu Methyl-THF ein Reduktionspotential E^0 von etwa -200 mV (Wolfarth und Diekert, 1991) und die dazugehörige Reaktion eine freie Energie G_r^0 von ca. -22 kJ/mol mit $\text{NADH} + \text{H}^+$ als Elektronendonator auf (Wolfarth und Diekert, 1991; Drake *et al.*, 2006). Für das entsprechende Enzym, die Methylen-THF-Reduktase, wird, wie auch bei *C. formicoaceticum* (Clark und Ljungdahl, 1984), ein Eisen-Schwefel-Zentrum vorhergesagt, allerdings scheint es sich dabei um ein lösliches Enzym zu handeln, weshalb eine direkte Beteiligung am Aufbau eines Gradienten zur Energiekonservierung ausgeschlossen werden kann.

Als Überträger könnten Elektronentransfer-Flavoproteine dienen (Abb. 53), von welchen *C. ljungdahlii* 5 Paare besitzt (3.4.1.; Abb. 18). Für den sehr nahe mit *C. ljungdahlii* verwandten Organismus *C. kluyveri* (Collins *et al.*, 1994) wird ein ähnliches Modell vermutet (Herrmann *et al.*, 2008; Seedorf *et al.*, 2008). Auch hier liegen alle an der Energiekonservierung beteiligten Enzyme löslich im Cytoplasma vor und als einzige membrangebundene Komponenten existieren ein Rnf-Komplex sowie eine F_1F_0 -ATPase (Seedorf *et al.*, 2008). Der energieliefernde Schritt in *C. kluyveri* ist wahrscheinlich die Reaktion von Crotonyl-CoA zu Butyryl-CoA über einen Komplex aus der Butyryl-CoA-Dehydrogenase Bcd und einem Paar an Elektronentransfer-Flavoproteinen Etf. Dabei werden die beiden Elektronen von $\text{NADH} + \text{H}^+$ über die Elektronentransfer-Flavoproteine aufgeteilt, wobei das eine Elektron an den positiveren Elektronenakzeptor Bcd und schließlich auf Crotonyl-CoA und das andere Elektron auf den negativeren Elektronenakzeptor (oxidiertes) Ferredoxin ($\text{Fd} \rightarrow \text{Fd}^-$) übertragen wird. Das nächste $\text{NADH} + \text{H}^+$ liefert dann das jeweils zweite Elektron für die Reduktion von Crotonyl-CoA zu Butyryl-CoA bzw. zu reduziertem Ferredoxin (Fd^- zu Fd^{2-}). Letzteres kann anschließend über den Rnf-Komplex reoxidiert werden (bei gleichzeitiger Reduktion von NAD^+ zu $\text{NADH} + \text{H}^+$), wodurch ein Protonen- bzw. Ionengradient erzeugt wird, durch welchen dann über die F_1F_0 -ATPase Energie konserviert werden kann (Herrmann *et al.*, 2008; Seedorf *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008). Analog zu dem Modell aus *C. kluyveri* könnte auch in *C. ljungdahlii* über die Methylen-THF-Reduktase in Verbindung mit den Elektronentransfer-Flavoproteinen, dem Rnf-Komplex und der F_1F_0 -ATPase Energie konserviert werden (Abb. 53).

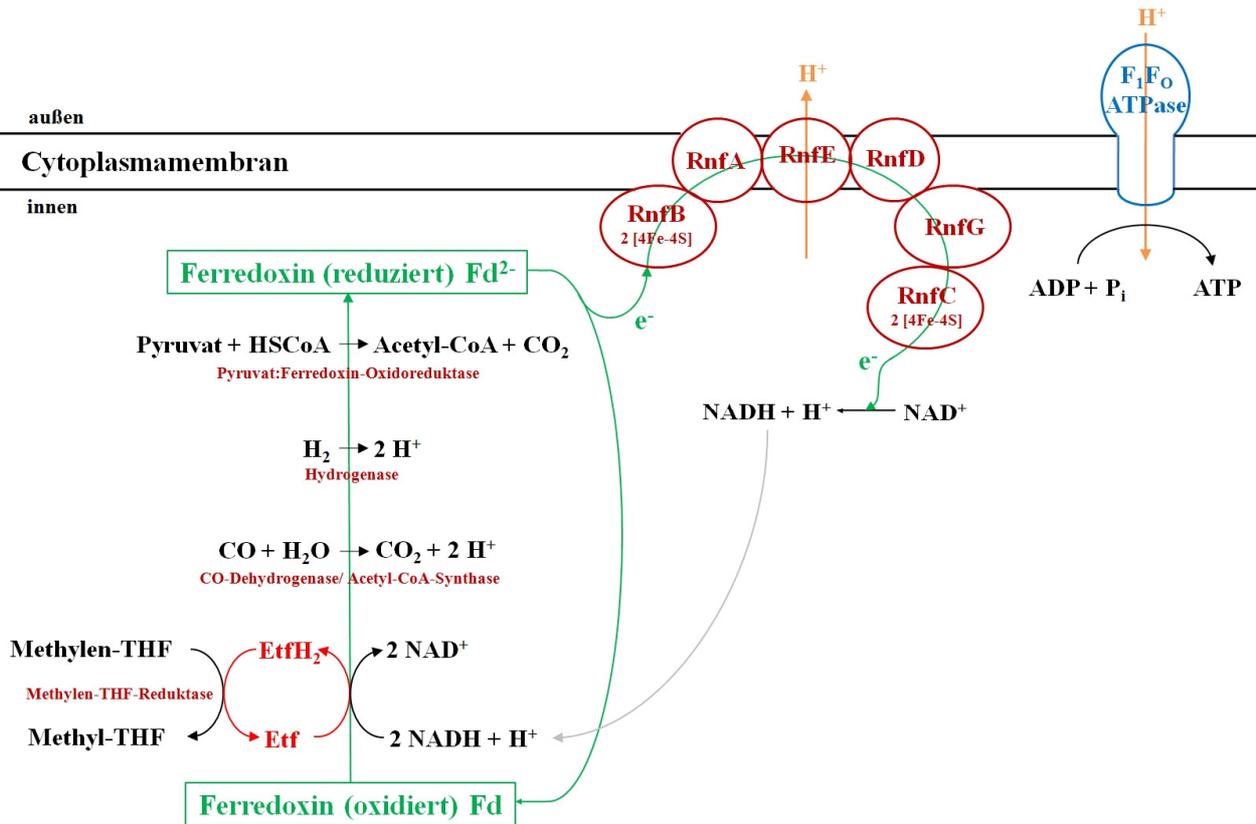


Abb. 53: Hypothetisches Modell der Energiekonservierung in *C. ljungdahlii*

Der Rnf-Komplex aus *C. ljungdahlii* (RnfABCDEG) zeigt große Homologie zu demjenigen aus dem α -Proteobakterium *Rhodobacter capsulatus*, welches auch namensgebend für den Rnf-Komplex ist (Rnf = *Rhodobacter capsulatus* nitrogen fixation). In diesem Organismus läuft der Elektronentransport jedoch umgekehrt ab. Da für die Stickstofffixierung ein redoxnegativeres Reduktionsäquivalent als $\text{NADH} + \text{H}^+$ benötigt wird, erfolgt eine NADH-abhängige Reduktion von oxidiertem Ferredoxin ($\text{Fd} \rightarrow \text{Fd}^{2-}$) über den Rnf-Komplex, angetrieben von einem Protonengradienten (Saeki und Kumagai, 1998; Schmehl *et al.*, 1993). Andere phototrophe Stickstofffixierer wie *Rhodospirillum rubrum* besitzen statt des Rnf-Komplexes einen FixABCX-Komplex. Dieser membrangebundene Komplex, welcher in *C. ljungdahlii* ebenfalls vorkommt (Abb. 18), ist in der Lage, Elektronen zwischen löslichen Dehydrogenasen und Ubiquinonen zu übertragen. Der genaue Mechanismus ist jedoch noch unklar (Edgren und Nordlund, 2006; Herrmann *et al.*, 2008). Bei FixAB handelt es sich wiederum um Elektronentransfer-Flavoproteine und bei FixCX um eine Elektronentransfer-Flavoprotein:Ubiquinon-Oxidoreduktase. Möglicherweise ist auch dieser Komplex an der Energiekonservierung von *C. ljungdahlii* beteiligt.

Neben der möglichen Funktion bei der Energiekonservierung sind Elektronentransfer-Flavoproteine auch an der Synthese von Butyryl-CoA, einem Intermediat bei der Butanol-Synthese (Abb. 50), beteiligt. Wie beschrieben bilden Elektronentransfer-Flavoproteine in *C. kluyveri* einen festen Komplex mit der Butyryl-CoA-Dehydrogenase (Herrmann *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008), welcher Elektronen auf Ferredoxin und dann auf den Rnf-Komplex überträgt. In *C. acetobutylicum* existiert zwar kein Rnf-Komplex, dennoch scheint auch hier die Butyryl-CoA-Dehydrogenase Bcd einen Komplex mit den Elektronentransfer-Flavoproteinen EtfA/B zu bilden. So sind die entsprechenden Gene in einem Operon lokalisiert (Boynton *et al.*, 1996a) und darüber hinaus zeigt Bcd von *C. acetobutylicum* bei heterologer Expression in *E. coli* nur dann Aktivität, wenn EtfA/B aus *C. acetobutylicum* ebenfalls exprimiert werden. Werden Bcd und EtfA/B getrennt voneinander exprimiert und danach *in vitro* zusammengegeben, kann hingegen keine Aktivität gemessen werden (Inui *et al.*, 2008).

Auf dem konstruierten Butanol-Synthese-Plasmid fehlen jedoch diese Elektronentransfer-Flavoproteine aus *C. acetobutylicum* (3.2.). In *E. coli* war es deshalb auch nicht möglich 1-Butanol zu bilden (3.3.), obwohl die eingebrachten Butanol-Synthese-Gene wahrscheinlich exprimiert werden (da in *E. coli* WL3 geringe Mengen Ethanol gebildet werden konnten, was vermutlich das Resultat einer unspezifischen Reaktion der plasmidkodierten AdhE und BdhA ist). Im Gegensatz zu *E. coli* besitzt *C. ljungdahlii* jedoch mehrere Paare an Elektronentransfer-Flavoproteinen, welche hohe Identität zu EtfA/B von *C. acetobutylicum* haben und deren Funktion übernehmen könnten (3.4.1.; Abb. 18). Dadurch war es nach Einbringen des Butanol-Synthese-Plasmids pSBOP_{ptb} in *C. ljungdahlii* möglich, 1-Butanol zu produzieren. Auf Fructose als Substrat konnten maximal 2 mM Butanol gemessen werden (3.4.3.1.), während bei autotrophem Wachstum auf Synthesegas etwa 1 mM Butanol synthetisiert wurde (3.4.3.2.). Der Beweis der Durchführbarkeit ist somit erbracht.

Die Butanol-Synthese startet während der Mitte bzw. zum Ende des logarithmischen Wachstums und somit etwas früher als in *C. acetobutylicum*, allerdings dem Aktivitätsprofil des verwendeten *ptb*-Promoters (Feustel *et al.*, 2004) bzw. Expressionsprofil des *ptb*-Gens (Alsaker und Papoutsakis, 2005) in *C. acetobutylicum* entsprechend. Untypischerweise gab es jedoch keine Produktionsphase. Stattdessen nahm die Butanol-Konzentration im Medium wieder ab und es wurde Butyrat gebildet, welches entweder aus überschüssigem Butyryl-CoA oder aus wiederaufgenommenem 1-Butanol entsteht. Später konnte gezeigt werden, dass der Wild-Typ von *C. ljungdahlii* in Verbindung mit einer anderen Energie- und Kohlenstoffquelle in der Lage ist, 1-Butanol zu Butyrat zu verstoffwechseln (3.4.4.).

Im Vergleich zu natürlichen Butanol-Produzenten wie *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. saccharobutylicum* oder *C. saccharoperbutylacetonicum* ist die mit *C. ljungdahlii* erzielte Butanol-Ausbeute allerdings nur gering. In entsprechenden Mutanten-Stämmen oder durch Überexpression bzw. Inaktivierung von bestimmten Genen, wie dem Glycosylase-/Deglycosylase-Gen (Thormann *et al.*, 2002) *orf5* (Harris *et al.*, 2001), den Chaperon-Genen *groESL* (Tomas *et al.*, 2003) oder dem Butyrat-Kinase-Gen *buk* (Harris *et al.*, 2000), können bis nahezu 250 mM (~ 23 g/l) Butanol produziert werden (Tab. 85).

Die Butanol-Ausbeute von *C. ljungdahlii* mit dem Plasmid pSOBP_{ptb} ist aber durchaus vergleichbar zu ähnlichen Studien in *E. coli* (Tab. 85). Dort konnte nach Einbringen derselben Gene, welche sich auch auf dem Butanol-Synthese-Plasmid pSOBP_{ptb} befinden, zuzüglich *EtfA/B* eine Butanol-Produktion von 4,2 mM gemessen werden (Inui *et al.*, 2007). Bei Verwendung von *adhE2* anstelle von *adhE* ließ sich diese sogar auf 16,2 mM steigern (Inui *et al.*, 2007), während in einer anderen Arbeit nach Einbringen derselben Gene nur 1,9 mM Butanol erzielt wurden (Atsumi *et al.*, 2008a). Statt der Butyryl-CoA-Dehydrogenase Bcd kann auch eine Trans-2-Enoyl-CoA-Reduktase Ter aus dem Augentierchen *Euglena gracilis* sowie eine Butyraldehyd-Dehydrogenase Ald aus *C. beijerinckii* anstelle von AdhE verwendet werden, wobei die Butanol-Ausbeute in *E. coli* nur 1,03 mM beträgt. In *Bacillus subtilis* konnten mit denselben Enzymen hingegen nur 0,19 mM und in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* lediglich 20 µM 1-Butanol gebildet werden (Donaldson *et al.*, 2007). Auch in einer anderen Studie konnten in *Saccharomyces cerevisiae* nur maximal 27 µM Butanol produziert werden (Steen *et al.*, 2008). In *E. coli* ist es auch möglich, 1-Butanol nicht-fermentativ aus 2-Ketovalerat, einem Intermediat des Norvalin-Biosyntheseweges, über die eingebrachte 2-Ketosäure-Decarboxylase KivD aus *Lactococcus lactis* sowie die Alkohol-Dehydrogenase Adh2 aus *Saccharomyces cerevisiae* herzustellen (Atsumi *et al.*, 2008b).

Während *C. ljungdahlii* jedoch in der Lage ist, autotroph zu wachsen, benötigen sowohl *E. coli*, *Bacillus subtilis* und *Saccharomyces cerevisiae* als auch die solventogenen Clostridien Zucker (bzw. Stärke) als Substrat.

Überdies ist fraglich, ob die Butanol-Ausbeute in diesen Organismen überhaupt noch signifikant erhöht werden kann. In den natürlichen Butanol-Produzenten dürfte dies nur schwer möglich sein, da 1-Butanol in Konzentrationen von 250 mM extrem toxisch für die Zellen ist (3.1.5.). Aktuelle Studien zielen deshalb vielmehr darauf ab, die Substratnutzung (siehe oben), Butanol-Toleranz oder Lösungsmittelabtrennung zu verbessern sowie die Nebenprodukte der Fermentation zu eliminieren (Noack *et al.*, 2009; Dürre, 2007; 2008).

Tab. 85: Butanol-Ausbeuten in verschiedenen (genetisch modifizierten) Organismen

| Organismus | Modifikation | maximale Butanol-Ausbeute [mM] | Referenz |
|---------------------------------|---|--------------------------------------|----------------------------------|
| <i>C. acetobutylicum</i> | Inaktivierung von <i>orf5 (solR)</i> und Überexpression von <i>adhE</i> | 238 | Harris <i>et al.</i> , 2001 |
| | Überexpression von <i>groESL</i> | 231 | Tomas <i>et al.</i> , 2003 |
| | Inaktivierung von <i>buk</i> und Überexpression von <i>adhE</i> | 226 | Harris <i>et al.</i> , 2000 |
| | Überexpression von <i>adc</i> und <i>ctfAB</i> | 177 | Mermelstein <i>et al.</i> , 1993 |
| | Wild-Typ-Stamm ATCC 824 | 130-160 | alle oben genannten |
| <i>C. beijerinckii</i> | Mutanten-Stamm BA101 | 229 | Qureshi und Blaschek, 2001 |
| | Wild-Typ-Stamm NCIMB 8052 | 98 | |
| <i>E. coli</i> | Einbringen von <i>thlA, hbd, crt, bcd, EtfA/B</i> und <i>adhE2</i> aus <i>C. acetobutylicum</i> | 16,2 | Inui <i>et al.</i> , 2007 |
| | Einbringen von <i>kivD</i> aus <i>Lactococcus lactis</i> und <i>adh2</i> aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sowie Überexpression von <i>ilvA</i> und <i>leuABCD</i> und Deletion von <i>ilvD</i> | 9 | Atsumi <i>et al.</i> , 2008b |
| | Einbringen von <i>thlA, hbd, crt, bcd, EtfA/B</i> und <i>adhE</i> aus <i>C. acetobutylicum</i> | 4,2 | Inui <i>et al.</i> , 2007 |
| | Einbringen von <i>thlA, hbd, crt, bcd, EtfA/B</i> und <i>adhE2</i> aus <i>C. acetobutylicum</i> | 1,9 | Atsumi <i>et al.</i> , 2008a |
| | Einbringen von <i>thlA, hbd</i> und <i>crt</i> aus <i>C. acetobutylicum</i> , <i>ter</i> aus <i>Euglena gracilis</i> und <i>ald</i> aus <i>C. beijerinckii</i> sowie Überexpression von <i>yqhD</i> | 1,03 | Donaldson <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | Einbringen von <i>thlA, hbd, crt</i> und <i>bdhB</i> aus <i>C. acetobutylicum</i> , <i>ter</i> aus <i>Euglena gracilis</i> und <i>ald</i> aus <i>C. beijerinckii</i> | 0,19 | Donaldson <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Einbringen von <i>hbd, crt</i> und <i>adhE2</i> aus <i>C. beijerinckii</i> , <i>ccr</i> aus <i>Streptomyces collinus</i> und Überexpression von <i>erg10</i> | 0,03 | Steen <i>et al.</i> , 2008 |
| | Einbringen von <i>thlA, hbd</i> und <i>crt</i> aus <i>C. acetobutylicum</i> , <i>ter</i> aus <i>Euglena gracilis</i> und <i>ald</i> aus <i>C. beijerinckii</i> | 0,02 | Donaldson <i>et al.</i> , 2007 |

Ob es hingegen in *E. coli*, *Bacillus subtilis* oder *Saccharomyces cerevisiae* jemals möglich sein wird, Butanol-Ausbeuten wie in Clostridien zu erzielen ist zweifelhaft. So brachte eine Optimierung des *E. coli*-Produktionsstammes von Atsumi *et al.* (2008a) durch Deletion des Alkohol-Dehydrogenase-Gens *adhE*, des Lactat-Dehydrogenase-Gens *ldhA*, der Fumarat-Reduktase-Gene *frdBC*, des Phosphotransacetylase-Gens *pta* und des Pyruvat-Dehydrogenase-Regulator-Gens *fnr* lediglich eine Steigerung der Butanol-Ausbeute auf 5 mM. Die Optimierung des Butanol-Synthese-Operons mit alternativen Butyryl-CoA-Dehydrogenase-Genen (*bcd* und *EtfA/B* aus *Megasphaera elsdenii* oder *ccr* aus *Streptomyces coelicolor*) brachte darüber hinaus keine Verbesserung (Atsumi *et al.*, 2008a). Auch in *Saccharomyces cerevisiae* war es trotz Einbringen unterschiedlicher Thiolase-Gene (*atoB* aus *E. coli*, *erg10* aus *Saccharomyces cerevisiae* oder *phaA* aus *Ralstonia eutropha*), 3-Hydroxy-Butyryl-CoA-Dehydrogenase-Gene (*hbd* aus *C. beijerinckii* oder *phaB* aus *Ralstonia eutropha*) und Butyryl-CoA-Dehydrogenase-Genen (*bcd* und *EtfA/B* aus *C. beijerinckii* oder *ccr* aus *Streptomyces collinus*) nur möglich, maximal 27 μ M 1-Butanol zu produzieren.

Die vorliegende Arbeit birgt hingegen noch reichlich Potential für Verbesserungen zur Steigerung der Butanol-Ausbeute. Dies kann sowohl durch Optimierung des Butanol-Synthese-Plasmides als auch durch Verbesserung des *C. ljungdahlii*-Stammes sowie der Fermentationsbedingungen geschehen.

Am erfolgversprechendsten erscheint dabei die Optimierung des Butanol-Synthese-Plasmides pSOBP_{ptb} durch Entfernung der entdeckten Haarnadelstrukturen vor *bdhA* und *adhE* (Abb. 22) zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass diese Haarnadelstrukturen die Transkription der Gene signifikant abschwächen (3.4.5.; Abb. 24), sodass nur geringe Mengen an Butyraldehyd- und Butanol-Dehydrogenase gebildet werden, welche vermutlich nicht ausreichen, um das gebildete Butyryl-CoA vollständig zu 1-Butanol umzuwandeln. Möglicherweise wird das nicht verbrauchte Butyryl-CoA dann stattdessen sogar von *C. ljungdahlii* zu Butyrat umgewandelt, welches im Laufe der Fermentation mit dem Plasmid pSOBP_{ptb} ebenfalls entsteht (3.4.3.). Durch Entfernung der Haarnadelstrukturen könnte demnach nicht nur die Butanol-Produktion deutlich gesteigert werden, sondern eventuell auch die Bildung des Nebenprodukts Butyrat verhindert werden. Es wurde bereits mit der Klonierung zur Entfernung der Haarnadelstrukturen begonnen (3.5.), allerdings traten dabei immer wieder Mutationen auf, sodass das Plasmid nicht fertiggestellt werden konnte.

Das erhöhte Auftreten von Mutationen ist vermutlich darin begründet, dass sowohl 1-Butanol als auch einige der Intermediate des Butanol-Synthese-Weges (Abb. 50) für *E. coli* toxisch sind. Außerdem könnte die starke Expression eines Proteins von *C. acetobutylicum* zu einem Konflikt mit einem der *E. coli*-Proteine (wie etwa AdhE) führen bzw. den Stoffwechsel von *E. coli* störend beeinflussen. Hierfür würde ein Promoter benötigt werden, welcher im Gram-negativen Zwischenwirt *E. coli* inaktiv ist und gleichzeitig im Produktionsstamm *C. ljungdahlii* eine dauerhaft hohe Aktivität hat. Ein solcher Promoter ist jedoch nicht bekannt und auch der verwendete Promoter P_{ptb} des Phosphotransbutyrylase/Butyrat-Kinase-Operons aus *C. acetobutylicum* ist in *E. coli* aktiv.

In *C. ljungdahlii* zeigt der *ptb*-Promoter ebenfalls deutliche Aktivität, besonders während der logarithmischen Phase (Abb. 24). Allerdings ist diese bei Weitem nicht so stark wie die des Promoters der Acetat-Kinase von *C. ljungdahlii* (Abb. 24). Die Verwendung dieses Promoters (oder eines anderen starken Promoters aus *C. ljungdahlii*) für die Expression der Butanol-Synthese-Gene könnte die Butanol-Ausbeute ebenfalls stark verbessern. Hierfür müsste allerdings zuvor untersucht werden, ob das Acetat-Kinase-Gen *ack*, wie auch in anderen Bakterien (3.4.5.; Abb. 23), ein Operon mit dem Phosphotransacetylase-Gen *pta* bildet sowie der entsprechende Transkriptionsstartpunkt bestimmt werden. Zusätzlich zum Butanol-Synthese-Plasmid $pSOBP_{ptb}$ existiert auch noch eine zweite Variante des Butanol-Synthese-Operons unter Kontrolle des Butanol-Dehydrogenase A-Promoters P_{bdhA} von *C. acetobutylicum* (3.2.). Das entsprechende Plasmid $pSOBP_{bdhA}$ wurde jedoch bisher nicht in *C. ljungdahlii* transformiert, da auch hier dieselben beiden Haarnadelstrukturen vorhanden sind wie in $pSOBP_{ptb}$ und der *bdhA*-Promoter in *C. acetobutylicum* schwächer ist als der *ptb*-Promoter (Feustel *et al.*, 2004), was allerdings in *C. ljungdahlii* nicht auch der Fall sein muss.

Darüber hinaus könnte das Butanol-Synthese-Plasmid auch durch Verwendung von alternativen Genen bzw. Enzymen optimiert werden. Die Butanol-Ausbeute hängt dabei von dem Enzym des Butanol-Synthese-Weges mit der geringsten Aktivität ab. Es ist jedoch unklar, welches Enzym dies unter den entsprechenden Bedingungen in *C. ljungdahlii* ist. Dazu müssten die intrazellulären Konzentrationen der jeweiligen Intermediate zu verschiedenen Wachstumszeitpunkten bestimmt werden (Steen *et al.*, 2008; Shimazu *et al.*, 2004). Das Enzym mit der niedrigsten Aktivität könnte dann ersetzt werden.

Das neue Gen sollte idealerweise aus verwandten Organismen stammen, damit Codongebrauch und GC-Gehalt übereinstimmen, wobei es auch möglich wäre, die Gene künstlich zu synthetisieren und die Codons dann für *C. ljungdahlii* zu optimieren. Die Gene bzw. Enzyme aus *C. kluyveri* erscheinen als Alternative besonders geeignet, da es sich dabei um einen der am nächsten verwandten Organismen von *C. ljungdahlii* (Collins *et al.*, 1994) handelt und dessen Genomsequenz mittlerweile komplett sequenziert ist (Seedorf *et al.*, 2008). Dieser Organismus produziert zwar kein 1-Butanol, dafür aber Butyrat, sodass die Enzyme für die Bildung von Butyryl-CoA aus Acetyl-CoA vorhanden sind. Während es hierfür auch noch mehrere andere Enzyme gibt, sind nur wenige Butyraldehyd- bzw. Butanol-Dehydrogenasen bekannt, wie etwa von *C. beijerinckii*, dessen Genomsequenz ebenfalls frei zugänglich ist (http://genome.jgi-psf.org/finished_microbes/clobe/clobe.home.html).

Insbesondere die Thiolase ist ein ubiquitär in Pro- und Eukaryoten vorkommendes Enzym, wobei zwischen abbauenden und biosynthetischen Thiolasen unterschieden wird (Meng und Li, 2006). Letztere katalysieren die sogenannte Claisen-Reaktion von zwei Molekülen Acetyl-CoA zu Acetacetyl-CoA, welche auch den ersten Schritt des Butanol-Synthese-Weges bildet (Abb. 50). Auf dem Butanol-Synthese-Plasmid befindet sich das Gen *thlA* (Stim-Herndon *et al.*, 1995) aus *C. acetobutylicum* (Abb. 17). Das entsprechende Enzym ThlA wurde bereits charakterisiert (Wiesenborn *et al.*, 1988) und scheint sich aufgrund seiner Eigenschaften gut zu eignen. Zusätzlich konnte in *C. acetobutylicum* auch noch eine zweite Thiolase (ThlB) entdeckt werden (Winzer *et al.*, 2000). Thiolasen aus *C. kluyveri* (Hartmanis und Sliwkowski, 1985; Hartmanis und Stadtman, 1982) und *C. pasteurianum* (Meng und Li, 2006; Berndt und Schlegel, 1975) wurden ebenfalls bereits charakterisiert, während über die Thiolase von *C. beijerinckii* noch wenig bekannt ist. Eine andere Alternative wäre AtoB aus *E. coli* (Jenkins und Nunn, 1987) oder PhaA aus *Ralstonia eutropha*, welche bereits erfolgreich für die Butanol-Produktion in *E. coli* bzw. *Saccharomyces cerevisiae* verwendet wurden (Atsumi *et al.*, 2008a; Steen *et al.*, 2008). Es ist jedoch zweifelhaft, ob diese Enzyme in *C. ljungdahlii* eine höhere Aktivität zeigen als entsprechende clostridiellen Enzyme.

Da alle bekannten Thiolasen auch die entsprechende Rückreaktion katalysieren können (Meng und Li, 2006), ist eine effektive 3-Hydroxy-Butyryl-CoA-Dehydrogenase, welche Acetacetyl-CoA zu 3-Hydroxy-Butyryl-CoA umwandelt (Abb. 50), vonnöten. Dieses kann anschließend über eine Crotonase und eine Butyryl-CoA-Dehydrogenase zu Butyryl-CoA umgewandelt werden. Die entsprechenden Gene *hbd*, *crt* und *bcd* sind in *C. acetobutylicum* in einem Operon lokalisiert (Abb. 18; Boynton *et al.*, 1996) und befinden sich auch auf dem konstruierten Butanol-Synthese-Plasmid (Abb. 17).

Zusätzlich gehören noch die Gene der Elektronentransfer-Flavoproteine EtfA/B zu diesem Operon, welche auf dem Butanol-Synthese-Plasmid allerdings weggelassen wurden. Für die Aktivität von Bcd wird EtfA/B jedoch benötigt (siehe oben). In *C. ljungdahlii* gibt es zwar homologe Proteine (Abb. 18), welche diese Funktion übernehmen können, möglicherweise ist aber die Aktivität von Bcd dadurch eingeschränkt, sodass durch Einfügen von *EtfA/B* aus *C. acetobutylicum* in das Butanol-Synthese-Operon die Butanol-Ausbeute gesteigert werden könnte.

Homolog zu *C. acetobutylicum* existiert auch in *C. kluyveri* und *C. beijerinckii* ein Operon aus *crt*, *bcd*, *etfBA* und *hbd*. Für *C. kluyveri* wird vermutet, dass über Bcd und EtfA/B mit Hilfe eines Rnf-Komplexes Energie konserviert wird (siehe oben). Da auch *C. ljungdahlii* einen solchen Komplex besitzt, könnte nach Einbringen von Bcd und EtfA/B aus *C. kluyveri* anstatt aus *C. acetobutylicum* bei der Butanol-Synthese zusätzliche Energie konserviert werden und somit die Butanol-Ausbeute bzw. das Wachstum verbessert werden. Unter Umständen könnte ein solcher Eingriff in den Energiehaushalt von *C. ljungdahlii* aber auch negative Folgen haben. In *E. coli*, *Bacillus subtilis* bzw. *Saccharomyces cerevisiae* wurde die Synthese von 1-Butanol auch mit PhaB aus *Ralstonia eutropha* anstelle von Hbd und entweder Ccr aus *Streptomyces coelicolor* bzw. *S. collinus*, Ter aus *Euglena gracilis* oder Bcd und EtfA/B aus *Megasphaera elsdenii* anstatt dem clostridiellen Bcd und EtfA/B demonstriert (Atsumi *et al.*, 2008; Steen *et al.*, 2008; Donaldson *et al.*, 2007). Die dabei erzielten Butanol-Ausbeuten waren jedoch nur gering, weshalb diese Enzyme keine geeignete Alternative darstellen.

Für die Synthese von 1-Butanol aus Butyryl-CoA ist schließlich Butyraldehyd- und Butanol-Dehydrogenase-Aktivität nötig. Dazu befinden sich die Gene der bifunktionellen Butyraldehyd-/Butanol-Dehydrogenase AdhE und der Butanol-Dehydrogenase BdhA aus *C. acetobutylicum* auf dem Butanol-Synthese-Plasmid. Das *adhE*-Gen (manchmal auch als *aad* bezeichnet) aus *C. acetobutylicum* bildet zusammen mit *ctfAB* (den Genen für die CoA-Transferase) das sogenannte *sol* (für "solvents")-Operon (Fischer *et al.*, 1993), welches auf dem 192 kBp großen Megaplasmid pSOL1 liegt. Das entsprechende Enzym AdhE (bzw. Aad) zeichnet sich durch zwei funktionelle Bereiche aus, eine N-terminale Aldehyd-Dehydrogenase-Domäne und eine C-terminale Alkohol-Dehydrogenase-Domäne. Das Protein hat eine molekulare Masse von 95,5 kDa und eine hohe Identität von 56 % bzw. Homologie von 75 % zu der multifunktionellen AdhE von *E. coli* (Nair *et al.*, 1994).

Bei Überproduktion von AdhE in *C. acetobutylicum* konnte eine NAD⁺-abhängige Butyraldehyd- und Acetaldehyd-Dehydrogenase-Aktivität sowie eine NADH-abhängige Butanol- und minimale Ethanol-Dehydrogenase-Aktivität gemessen werden (Nair *et al.*, 1994). Nach Reinigung zeigte das Enzym zwar eine spezifische Butyraldehyd-Dehydrogenase-Aktivität von 0,06 U/mg, aber keine Butanol-Dehydrogenase-Aktivität (Thormann, 2001). Eine heterologe Überproduktion von AdhE in *E. coli* resultierte in einem nahezu inaktiven Protein (Lorenz, 1997; Nair *et al.*, 1994).

In *E. coli* konnte jedoch die Butanol-Ausbeute durch Ersetzen von AdhE durch die sekundäre Butyraldehyd-/Butanol-Dehydrogenase AdhE2 von *C. acetobutylicum* deutlich von 4,2 mM auf 16,2 mM gesteigert werden (Inui *et al.*, 2007). Die beiden Enzyme weisen zueinander eine 66 %-ige Identität sowie eine 81 %-ige Homologie auf und auch AdhE2 besitzt eine N-terminale Aldehyd- und eine C-terminale Alkohol-Dehydrogenase-Domäne. Das Enzym hat überdies eine ähnliche molekulare Masse von etwa 94 kDa und ist ebenfalls NAD⁺- bzw. NADH-abhängig. Im Gegensatz zu AdhE zeigt AdhE2 aber auch nach heterologer Überproduktion und Reinigung vollständige Aktivität. Die spezifische Butyraldehyd-Dehydrogenase-Aktivität liegt bei 0,74 U/mg und die Butanol-Dehydrogenase-Aktivität bei 0,18 U/mg (Fontaine *et al.*, 2002). Das entsprechende Gen *adhE2* ist in einem monocistronischen Operon etwa 47 kbp entfernt von *adhE* auf dem Megaplasmid pSOL1 lokalisiert (Fontaine *et al.*, 2002). Analog zu den in *E. coli* durchgeführten Studie von Inui *et al.* (2007) könnte die Verwendung von *adhE2* anstelle von *adhE* im Butanol-Synthese-Operon auch in *C. ljungdahlii* zu einer Erhöhung der Butanol-Produktion führen.

Diese könnte durch den Austausch der Butanol-Dehydrogenase BdhA durch das Isoenzym BdhB noch weiter erhöht werden, da gezeigt wurde, dass BdhB eine 46-fach höhere Aktivität mit Butyraldehyd als mit Acetaldehyd hat, während diese bei BdhA nur doppelt so hoch ist (Walter *et al.*, 1992; Petersen *et al.*, 1991). BdhA und BdhB (bzw. BdhI und BdhII) haben eine Identität von 73 % sowie eine Homologie von 88 % zueinander und sind jeweils Homodimere aus 42 kDa-Untereinheiten (Walter *et al.*, 1992). Beide Isoenzyme konnten bereits gereinigt werden, wobei Zink als Co-Faktor benötigt wird. BdhB hat mit Butyraldehyd als Substrat und NADH + H⁺ als Co-Substrat eine spezifische Aktivität von 7,1 U/mg sowie ein pH-Optimum zwischen pH 5,5-6 und mit NADPH + H⁺ eine Aktivität von 2,6 U/mg sowie ein Optimum um pH 8 (Welch *et al.*, 1989). Die Aktivität der Rückreaktion ist 50-fach niedriger. Der *K_m*-Wert mit Butyraldehyd als Substrat beträgt für BdhA 3,6 mM und für BdhB 14-16 mM (Welch *et al.*, 1989; Petersen *et al.*, 1991).

Die entsprechenden Gene *bdhA* und *bdhB* liegen zwar direkt nebeneinander auf dem Genom von *C. acetobutylicum*, bilden aber jeweils monocistronische Operons. Dabei wird *bdhA* bereits in der frühen Wachstumsphase induziert, während *bdhB* erst in der Lösungsmittelphase exprimiert wird (Feustel *et al.*, 2004; Alsaker und Papoutsakis, 2005). In Kombination mit der Spezifität der jeweiligen Enzyme spricht dies dafür, dass BdhA hauptsächlich an der Ethanol-Bildung beteiligt ist, während BdhB für die Butanol-Bildung verantwortlich ist. Daneben konnte in der Genomsequenz von *C. acetobutylicum* noch eine weitere potentielle NADH-abhängige Butanol-Dehydrogenase CAC3392 gefunden werden (Nölling *et al.*, 2001), welche 38 % Identität und 59 % Homologie zu BdhA bzw. BdhB hat. Dieses Enzym wurde jedoch noch nicht näher untersucht.

In der Genomsequenz von *C. beijerinckii* sind ebenfalls drei Gene als Butanol-Dehydrogenasen annotiert, nämlich Cbei1722, Cbei2181 und Cbei2421. Das Genprodukt von letzterem hat eine Identität von 60 % und eine Homologie von 79 % zu BdhA bzw. BdhB. Bei diesen Enzymen könnte es sich um die von Chen (1995) aus *C. beijerinckii* gereinigten Butanol-Dehydrogenasen handeln. Zudem konnte ein Protein mit einer Identität von 66 % und einer Homologie von 81 bzw. 83 % zu AdhE bzw. AdhE2 von *C. acetobutylicum* entdeckt werden, welches auch schon erfolgreich für die Butanol-Produktion in *Saccharomyces cerevisiae* genutzt wurde (Steen *et al.*, 2008). Das entsprechende Gen befindet sich allerdings nicht wie bei *C. acetobutylicum* im *sol*-Operon. Dort befindet sich stattdessen ein *ald*-Gen, welches für eine Butyraldehyd-Dehydrogenase kodiert. Darüber hinaus ist auch das Gen für die Acetacetat-Decarboxylase Adc Teil des *sol*-Operons. Dieselbe Anordnung findet sich auch in *C. saccharobutylicum* und *C. saccharoperbutylacetonicum* (Toth *et al.*, 1999). Das Ald-Enzym wurde bereits aus den *C. beijerinckii*-Stämmen NRRL B592 (Yan und Chen, 1990) und NRRL B593 (Toth *et al.*, 1999) und aus *C. saccharobutylicum* NRRL B643 (Palosaari und Rogers, 1988; der Organismus wurde damals noch als *C. acetobutylicum* B643 bezeichnet) gereinigt und charakterisiert. Bei allen drei Enzymen handelt es sich um Homodimere aus etwa 55 kDa großen Untereinheiten mit ähnlichen Eigenschaften. Das bevorzugte Substrat ist jeweils Butyryl-CoA, es kann aber auch Acetyl-CoA umgesetzt werden. Als Co-Substrat kann entweder NADH + H⁺ oder mit geringerer Aktivität auch NADPH + H⁺ genutzt werden und keines der Enzyme besitzt Alkohol-Dehydrogenase-Aktivität. Ald aus *C. beijerinckii* wurde auch bereits zur Butanol-Produktion in *E. coli*, *Bacillus subtilis* und *Saccharomyces cerevisiae* verwendet (Donaldson *et al.*, 2007).

Eine weitere, NADP-abhängige Butanol-Dehydrogenase (Adh1) konnte auch noch in *C. saccharobutylicum* NCP262 entdeckt werden (Youngleson *et al.*, 1988; 1989; der Organismus wurde damals noch als *C. acetobutylicum* P262 bezeichnet).

Abgesehen von den clostridiellen Enzymen sind jedoch keine Butyraldehyd- und Butanol-Dehydrogenasen bekannt, welche eine physiologische Richtung hin zu 1-Butanol zeigen. In Rohextrakten von *Butyribacterium methylotrophicum* wurde zwar entsprechende Aktivität nachgewiesen (Shen *et al.*, 1999), die dazugehörigen Gene bzw. Enzyme wurden jedoch noch nicht entdeckt. Dies gilt auch für die Gene der Butanol-Synthese von *Hyperthermus butylicus*, obwohl dieser Organismus mittlerweile komplett sequenziert ist (Brügger *et al.*, 2007).

Ein Grund hierfür ist, dass nur ein minimaler Bruchteil, von weit unter einem Prozent, der schätzungsweise 1-100 Millionen verschiedenen prokaryotischen Arten mit den üblichen Standardtechniken kultivierbar ist (Amann *et al.*, 1995). So sind bisher nur etwa 5000 verschiedene Spezies isoliert und beschrieben worden (Pace, 1997). Die Metagenomik (zur Übersicht: Daniel, 2004; 2005; Schmeisser *et al.*, 2007; Langer *et al.*, 2006; Streit *et al.*, 2004; Riesenfeld, 2004) bietet jedoch einen alternativen Zugang zu neuen Genen, welcher unabhängig von der Kultivierbarkeit ist. Zur Herstellung einer Metagenombank wird die gesamte genomische DNA einer Umweltprobe (das Metagenom) isoliert, gereinigt, fraktioniert, in ein Plasmid bzw. Cosmid oder BAC kloniert und dann in einen geeigneten Wirtstamm transformiert (Abb. 54). Die Metagenombank kann anschließend nach Aktivität durchmustert bzw. sequenziert und mit bekannten Sequenzen verglichen werden. So stammen mittlerweile bereits mehr als 75 % aller hinterlegten 16S rDNA-Sequenzen von unkultivierten Bakterien (Riesenfeld, 2004). Darüber hinaus konnten bereits etliche Gene gefunden werden, welche für neuartige Enzyme verschiedener Art kodieren (zur Übersicht: Schmeisser *et al.*, 2007; Daniel, 2005). So konnten schon mehrere Oxidoreduktasen entdeckt werden, unter anderem auch einige Dehydrogenasen (Henne *et al.*, 1999; Knietsch *et al.*, 2003ab; Wexler *et al.*, 2005). Eine dieser Dehydrogenasen, AdhE_{Meta}, welche aus einer Metagenombank von einem Faulbecken einer Kläranlage stammt, hat sogar eine hohe Identität von 61 % zu der AdhE von *C. acetobutylicum* und zeigt sowohl mit Ethanol als auch mit 1-Butanol als Substrat Enzymaktivität. Die Reaktion in die andere Richtung, hin zu Butanol, wurde allerdings nicht getestet (Wexler *et al.*, 2005).

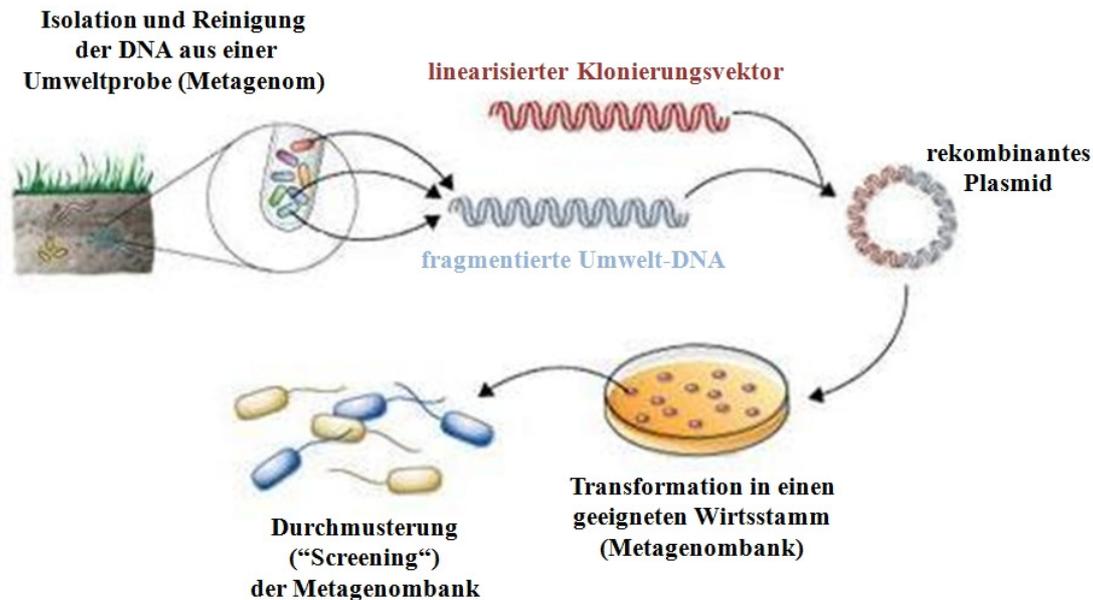


Abb. 54: Herstellung einer Metagenombank (<http://www.scq.ubc.ca/wp-content/uploads/2006/08/metagenomic%5B1%5D.jpg>; modifiziert)

In drei Metagenombanken, aus dem Sediment des “Solar Lake“ (Ägypten), einem Zuckerrübenfeld bei Göttingen sowie aus Komposterde, konnten ebenfalls Gene für vier potentielle Butanol-Dehydrogenasen gefunden werden (Köpke, 2004; Knietsch *et al.*, 2003a; Waschowitz, 2006), welche im Rahmen dieser Arbeit genauer charakterisiert wurden (3.7.). Drei der Gene (pAK110 *orf14*, pAK115 *orf22* und pTWB3 *orf2*) bzw. deren Genprodukte zeigen Homologie zu bekannten Alkohol-Dehydrogenasen bzw. anderen Oxidoreduktasen (Tab. 76-78) und besitzen auch entsprechende Domänen bzw. Motive. Das Genprodukt von pAK110 *orf14* hat sogar Ähnlichkeit zu den Butanol-Dehydrogenasen CAC3392, BdhA und BdhB aus *C. acetobutylicum* (Tab. 76) sowie eine sehr hohe Identität von 90 % zu YqhD aus verschiedenen Enterobakterien, welches bereits als Alkohol-Dehydrogenase für der Butanol-Produktion in *E. coli* genutzt wurde (Donaldson *et al.*, 2007).

Alle drei Proteine zeigten nach Reinigung (Abb. 29, 33 und 35) deutliche Butanol-Dehydrogenase-Aktivität mit einer physiologischen Richtung von Butyraldehyd zu 1-Butanol. Die Genprodukte von pAK110 *orf14*, pAK115 *orf22* und pTWB3 *orf2* haben eine maximale spezifische Aktivität V_{\max} von 0,205, 0,115 bzw. 0,255 U/mg (Abb. 30, 34 und 38) und nutzen als Co-Faktor Eisen, Zink bzw. Kobalt. Während die Genprodukte von pAK110 *orf14* und pTWB3 *orf2* sowohl $\text{NADPH} + \text{H}^+$ als auch $\text{NADH} + \text{H}^+$ als Co-Substrat verwenden können, ist das Genprodukt von pAK115 *orf22* ausschließlich NADH-abhängig.

Im Vergleich zu diesen Proteinen hat AdhE2 eine ähnliche Butanol-Dehydrogenase-Aktivität von 0,18 U/mg mit NADH + H⁺, während BdhB eine deutlich höhere Enzymaktivität von 7,1 U/mg mit NADH + H⁺ bzw. 2,6 U/mg mit NADPH + H⁺ aufweist. Die entsprechende Michaelis-Menten-Konstante K_m von BdhB, welche 14-16 mM beträgt, ist hingegen vergleichbar zu der von den Genprodukten von pAK110 *orf14* und pB3 *orf2*, welche bei 11 bzw. 18,5 mM liegt. Das Genprodukt von pAK115 *orf22* besitzt indessen genauso wie BdhA einen K_m -Wert von etwa 4 mM. Falls für die Butanol-Synthese in *C. ljungdahlii* eine Alternative zu BdhA bzw. BdhB benötigt werden würde, könnten sich die Genprodukte von pAK110 *orf14*, pAK115 *orf22* und pTWB3 *orf2* durchaus eignen, wenngleich diese Enzyme neben Butyraldehyd auch noch weitere Substrate verwerten können (Abb. 31, 35 und 39). So zeigt etwa das Genprodukt von pAK110 *orf14* eine 3-fach höhere Aktivität mit Acrolein, welches wohl das eigentliche Substrat dieser Dehydrogenase darstellt. Das Genprodukt von pAK115 *orf22* kann hingegen zusätzlich auch Acetaldehyd als Substrat nutzen, während das Genprodukt von pTWB3 *orf2* neben Butyraldehyd auch noch höhere Aldehyde umsetzen kann. Zusätzlich wurde noch das pH-Optimum der drei Proteine bestimmt (Abb. 32, 36 und 40). Bei den während einer Fermentation mit *C. ljungdahlii* zu erwartenden internen pH-Werten wären alle drei Enzyme nahezu 100 % aktiv.

Das vierte potentielle Butanol-Dehydrogenase-Gen pTWB4 *orf5* bzw. das dazugehörige Protein weist nahezu keine Homologie zu bekannten Genen bzw. Proteinen auf (Tab. 79) und es konnten auch keine Domänen bzw. Motive gefunden werden. Darüber hinaus zeigt das Protein, welches eine molekulare Masse von etwa 30 kDa hat, nach Reinigung (Abb. 41) keinerlei Enzymaktivität. In Verbindung mit einem ansonsten inaktiven Rohextrakt von *E. coli* WL3 konnte allerdings deutliche Butanol-Dehydrogenase-Aktivität nachgewiesen werden. Es konnte demonstriert werden, dass dies das Ergebnis einer Interaktion mit einem Protein aus dem *E. coli* WL3-Rohextrakt sein muss (3.7.4.3.). Deshalb wurde dieser Rohextrakt bis zu einer Fraktion gereinigt (Abb. 42-47), welche nur noch etwa 10 Protein-Banden enthielt (Abb. 48). Diese wurden anschließend massenspektrometrisch untersucht, wobei die Fraktion überwiegend den Elongationsfaktor Tu sowie mehrere Chaperone (DnaK, GroEL und ClpB, HtpG und GrpE) enthielt (Tab. 80).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Chaperon-Komplexe Hsp70 (DnaK, DnaJ und GrpE), Hsp100 (ClpB) sowie GroEL-GroES dazu in der Lage sind, Proteine umzufalten sowie Protein-Aggregate aufzulösen (Ziętkiewicz *et al.*, 2006; Ziętkiewicz *et al.*, 2004; Ben-Zvi & Goloubinoff, 2001). Dies ermöglicht die Wiederherstellung von zuvor inaktivierten Proteinen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* (Zzaman *et al.*, 2004; Zavilgelsky *et al.*, 2002; Konieczny und Liberek, 2002). Eine heterologe Überproduktion von rekombinanten Proteinen führt oft zu einer falschen Faltung oder zur Aggregation des entsprechenden Proteins, was durch gleichzeitige Überproduktion dieser Chaperon-Komplexe verhindert werden kann (Haacke *et al.*, 2009; de Marco *et al.*, 2007). Möglicherweise kam es auch bei der Überproduktion des Genprodukts von pTWB4 *orf5* zu einer falschen Faltung oder zur Aggregation des Proteins kommen, was durch die Inkubation mit den Chaperonen im Rohextrakt von *E. coli* WL3 vor den jeweiligen Enzymtests rückgängig gemacht werden konnte.

Zusätzlich zum Elongationsfaktor Tu sowie den verschiedenen Chaperonen konnten in der Fraktion auch einige Dehydrogenasen gefunden werden, welche allerdings eine geringere Sequenzabdeckung hatten (Tab. 80). Die meisten dieser Dehydrogenasen nutzen jedoch vollkommen andere Substratklassen (Glycerinaldehyd-3-phosphat, Homoserin, Malat, Isocitrat, Glucose-6-Phosphat oder 6-Phosphogluconat). Es konnte jedoch auch eine Alkohol- (Histidinol-Dehydrogenase HisD) und eine Aldehyd-Dehydrogenase (Lactaldehyd-Dehydrogenase AldA) gefunden werden. Letztere ist in der Lage, verschiedene Hydroxyaldehyde, welche strukturelle Ähnlichkeit zu Butyraldehyd haben, zu verwerten (Baldoma und Aguilar, 1987; Sridhara und Wu, 1969). Möglicherweise interagiert das Genprodukt von pTWB4 *orf5* auch mit einer dieser Dehydrogenasen und vermittelt so die Butanol-Dehydrogenase-Aktivität.

Um den Mechanismus aufzuklären, könnten die entsprechenden Proteine (TufB, DnaJ, DnaK, GrpE, ClpB, GroEL, GroES, Tig und AldA) überproduziert und gereinigt werden, um dann zusammen mit dem Genprodukt von pTWB4 *orf5* in einem *in vitro*-Enzymtest eingesetzt werden. Abgesehen von *dnaK* und *aldA* ist die Klonierung in den Überexpressionsvektor pET29a(+) sowie die gleichzeitige Fusion mit einer "His-Tag"-kodierenden Sequenz für eine spätere Reinigung abgeschlossen. Zur Verbesserung des Butanol-Synthese-Operons und somit der Butanol-Ausbeute in *C. ljungdahlii* ist diese potentielle Butanol-Dehydrogenase aufgrund des ungeklärten Mechanismus jedoch nicht geeignet.

Neben der Optimierung des Butanol-Synthese-Plasmides könnte auch der verwendete *C. ljungdahlii*-Stamm verbessert werden, da parallel zu dieser Arbeit das Genom komplett sequenziert wurde (2.6.15.). Mit Hilfe des "ClosTron"-Systems, einem universellen System zum Inaktivieren von Genen in Clostridien über Integration (Heap *et al.*, 2007), könnten beispielsweise gezielt Gene ausgeschaltet werden. Es wurde jedoch noch nicht getestet, ob der dabei verwendete Vektor pMTL007 auch in *C. ljungdahlii* replizieren kann. Mit Hilfe des "ClosTron"-Systems könnte etwa das Nebenprodukt Ethanol eliminiert werden. Darüber hinaus könnte auch das Gen bzw. Enzym inaktiviert werden, welches für die Verstoffwechslung von 1-Butanol sorgt, wozu *C. ljungdahlii* in Kombination mit einer anderen Energie- und Kohlenstoffquelle offenbar in der Lage ist (3.4.3. und 3.4.4.). Hierfür müsste dieses jedoch zuvor identifiziert werden, was durch "Microarray"-Experimente erfolgen könnte.

In einem kontinuierlichen Fermentationsprozess auf Synthesegas mit Gas-Recycling könnte das gebildete 1-Butanol jedoch auch, bevor es überhaupt wieder verstoffwechselt werden kann, aus der Fermentationslösung ausgetrieben und durch "Gas-Stripping" abgetrennt werden. In kontinuierlicher Kultur könnten überdies höhere Butanol-Ausbeuten erzielt werden, als dies in statischen Kulturen, welche in der vorliegenden Arbeit ausschließlich verwendet wurden, möglich ist. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass das Redoxpotential einen erheblichen Einfluss auf die Konzentration an gebildetem Ethanol hat (Gaddy *et al.*, 2007). Möglicherweise könnte durch die Wahl bzw. Konzentration der verwendeten Reduktionsmittel die Butanol-Ausbeute ebenfalls beeinflusst werden.

Im Vergleich zur Butanol-Synthese mit *E. coli*, *Bacillus subtilis* oder *Saccharomyces cerevisiae* besteht für die Butanol-Produktion in *C. ljungdahlii* in mehreren Bereichen noch großes Potential zur Verbesserung der Butanol-Ausbeute. Falls diese noch deutlich gesteigert werden könnte, würde die Butanol-Produktion in *C. ljungdahlii*, insbesondere durch die vorteilhafte Substratnutzung, welche unabhängig von fossilen Ressourcen ist und nicht in Wettbewerb zur Nahrungsmittelindustrie steht, ein konkurrenzfähiges System zur ABE-Fermentation von *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. saccharobutylicum* oder *C. saccharoperbutylacetonicum* bzw. der chemischen Butanol-Synthese darstellen.

5.a. Zusammenfassung

1. Es wurden neue, grundlegende Methoden für das acetogene Bakterium *C. ljungdahlii* etabliert. Dazu gehört eine effektive Methode zur Stammhaltung (2.5.4.2.) und ein Transformationsprotokoll durch Elektroporation (2.7.2.). Zudem konnte das Wachstum optimiert werden (3.1.).
2. Durch Einbringen eines Butanol-Synthese-Operons mit den Genen *thlA*, *hbd*, *crt*, *bcd*, *adhE* und *bdhA* aus *C. acetobutylicum*, welche für eine Thiolase, eine 3-Hydroxy-Butyryl-CoA-Dehydrogenase, eine Crotonase, eine Butyryl-CoA-Dehydrogenase, eine bifunktionelle Butyraldehyd-/Butanol-Dehydrogenase und eine weitere Butanol-Dehydrogenase kodieren, in *C. ljungdahlii* war es möglich, 1-Butanol aus Synthesegas zu produzieren (3.4.3.).
3. Es konnte gezeigt werden, dass *C. ljungdahlii* einen neuen Typ der Energiekonservierung in acetogenen Bakterien darstellt. Bisher wurde zwischen H^+ -abhängigen und Na^+ -abhängigen Organismen unterschieden. Während *C. ljungdahlii* im Vergleich zu den Na^+ -abhängigen Acetogenen für das autotrophe Wachstum kein Natrium benötigt (3.1.7.), konnten in der Genomsequenz von *C. ljungdahlii* keine Gene für Cytochrome bzw. Menaquinone gefunden werden, welche in den H^+ -abhängigen Acetogenen am Aufbau eines Protonengradienten über eine Elektronentransportkette beteiligt sind. Es wurde ein hypothetisches Modell der Energiekonservierung in *C. ljungdahlii* über Elektronentransfer-Flavoproteine und einen Rnf-Komplex aufgestellt (Abb. 53).
4. Es wurden drei potentielle Butanol-Dehydrogenasen aus Metagenombanken gereinigt und charakterisiert. Alle drei zeigten deutliche Butanol-Dehydrogenase-Aktivität mit einer physiologischen Richtung hin zu 1-Butanol. Es wurden die jeweiligen Enzymkinetiken sowie die benötigten Co-Faktoren und Co-Substrate, das Substratspektrum und das pH-Optimum bestimmt (3.7.).

5. Eine weitere potentielle Butanol-Dehydrogenase aus diesen Metagenombanken zeigte hingegen nach Reinigung nur in Verbindung mit einem ansonsten inaktiven Rohextrakt von *E. coli* WL3 Enzymaktivität. Es konnte demonstriert werden, dass es sich dabei um eine Interaktion mit einem oder mehreren Proteinen, wahrscheinlich einem Chaperon-Komplex oder einer Dehydrogenase aus diesem Rohextrakt handeln muss (3.7.4.). Der genaue Mechanismus ist jedoch noch unklar.

6. Da in der Genomsequenz von *C. difficile* Gene für die Enzyme des “Wood-Ljungdahl-Weges“ gefunden werden konnten, wurde dieser Organismus auf autotrophes Wachstum auf CO bzw. CO₂ + H₂ als Energie- und Kohlenstoffquelle überprüft. Während auf CO kein Wachstum zu erkennen war, konnte auf CO₂ + H₂ geringes Wachstum nachgewiesen werden (3.8.).

5.b. Summary

1. New fundamental methods were established for the acetogenic bacterium *C. ljungdahlii*. Methods were developed for long-time preservation (2.5.4.2.) and transformation by electroporation (2.7.2.). Additionally, media and growth conditions were optimized (3.1.).
2. *C. ljungdahlii* was metabolically engineered to produce 1-butanol from synthesis gas (3.4.3.) by transformation with a butanol-synthesis-plasmid containing the genes for a thiolase (*thlA*), a 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase (*hbd*), a crotonase (*crt*), a butyryl-CoA dehydrogenase (*bcd*), a bifunctional butyraldehyde/butanol dehydrogenase (*adhE*), and another butanol dehydrogenase (*bdhA*) from *C. acetobutylicum*.
3. *C. ljungdahlii* represents a new type of energy conservation in acetogenic bacteria. So far, acetogens have been classified into two groups, the H⁺-dependent organisms, generating a proton gradient to couple autotrophic growth and energy metabolism by a membrane bound electron transport chain containing cytochromes and menaquinones, and the Na⁺-dependent organisms, requiring sodium for autotrophic growth, creating a sodium motive force by a yet unidentified mechanism. However, neither cytochromes nor menaquinone genes can be identified in the genome sequence of *C. ljungdahlii*, nor is sodium required for autotrophic growth (3.1.7.). A model is proposed for energy conservation in *C. ljungdahlii* including electron transferring flavoproteins and a Rnf-complex (Fig. 53).
4. Three putative butanol dehydrogenases from metagenomic libraries were purified and then characterized. All three enzymes showed distinct butanol dehydrogenase activity with a physiological reaction direction towards 1-butanol. Enzyme kinetics, co-substrate, co-factors, substrate spectrum, and pH optimum were determined (3.7.).

5. Another putative butanol dehydrogenase from a metagenomic library was purified. However, butanol dehydrogenase activity could only be observed when an inactive crude extract of *E. coli* WL3 was added to the enzyme assay. It could be demonstrated that an interaction with one or more proteins from this crude extract, probably a chaperone complex or a dehydrogenase, is needed for enzyme activity (3.7.4.). The mechanism is still unknown.

6. A cluster of “Wood-Ljungdahl pathway” genes similar to those of *C. ljungdahlii* was found in the genome sequence of *C. difficile*. Therefore, this organism was tested for autotrophic growth on CO or CO₂ + H₂ as energy and carbon source. While no growth occurred on CO, *C. difficile* was able to grow slightly on CO₂ + H₂ (3.8.).

6. Literatur

- Abrini, J., H. Naveau und E.-J. Nyns.** 1994. *Clostridium autoethanogenum*, sp. nov., an anaerobic bacterium that produces ethanol from carbon monoxide. *Arch. Microbiol.* **161**: 345-351.
- Adamse, A. D.** 1980. New isolation of *Clostridium aceticum* (Wieringa). *Ant. v. Leeuwenhoek* **46**: 523-531.
- Afschar, A. S., C. E. Vaz Rossell und K. Schaller.** 1990. Bacterial conversion of molasses to acetone and butanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 168-171.
- Allen, S. P., und H. P. Blaschek.** 1988. Electroporation-induced transformation of intact cells of *Clostridium perfringens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 2322-2324.
- Alsaker, K. V., und E. T. Papoutsakis.** 2005. Transcriptional program of early sporulation and stationary-phase events in *Clostridium acetobutylicum*. *J. Bacteriol.* **187**: 7103-7118.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers und D. J. Lipman.** 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.
- Amann, R. I., W. Ludwig und K. H. Schleifer.** 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**: 143-169.
- Andreesen, J. R., A. Schaupp, C. Neurauter, A. Brown und L. G. Ljungdahl.** 1973. Fermentation of glucose, fructose, and xylose by *Clostridium thermoaceticum*: effect of metals on growth yield, enzymes, and the synthesis of acetate from CO₂. *J. Bacteriol.* **114**: 743-751.
- Andreesen, J. R., G. Gottschalk und H. G. Schlegel.** 1970. *Clostridium formicoaceticum* nov. spec. isolation, description and distinction from *C. aceticum* and *C. thermoaceticum*. *Arch. Microbiol.* **72**: 154-174.
- Arora, D., R. Basu, J. R. Phillips, C. V. Wikstrom, E. C. Clausen und J. L. Gaddy.** 1995. Production of ethanol from refinery waste gases. Phase III. Technology development. *Energy Conservation* **1995**: 1-56.
- Arora, D., R. Basu, J. R. Phillips, C. V. Wikstrom, E. C. Clausen und J. L. Gaddy.** 1996. Production of ethanol from refinery waste gases. Phase III. Engineering development. *Energy Conservation* **1996**: 1-23.
- Arora, D., R. Basu, J. R. Phillips, C. V. Wikstrom, E. C. Clausen und J. L. Gaddy.** 1997. Production of ethanol from refinery waste gases. *Energy Conservation* **1997**: 1-96.
- Atsumi, S., A. F. Cann, M. R. Connor, C. R. Shen, K. M. Smith, M. P. Brynildsen, K. J. Y. Chou, T. Hanai und J. C. Liao.** 2008a. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol production. *Metab. Eng.* **10**: 305-311.
- Atsumi, S., T. Hanai und J. C. Liao.** 2008b. Non fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels. *Nature* **451**: 86-89.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith und K. Struhl.** 1987. Current protocols in molecular biology, vol. 1. John Wiley & Sons, Ltd., Hoboken, NJ (USA).

- Bachmann, B. J.** 1990. Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 8. *Microbiol. Rev.* **54**: 130-197.
- Baer, S. H., D. L. Bryant und H. P. Blaschek.** 1989. Electron spin resonance analysis of the effect of butanol on the membrane fluidity of intact cells of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 2729-2731.
- Baer, S. H., H. P. Blaschek und T. L. Smith.** 1987. Effect of butanol challenge and temperature on lipid composition and membrane fluidity of butanol-tolerant *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 2854-2861.
- Bahrman, H., und H. Bach.** 2005. Oxo synthesis. In: Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim: Online (www.mrw.interscience.wiley.com/emrw/9783527306732/ueic/article/a18_321/current/abstract).
- Bailey, J. E., und D. F. Ollis.** 1986. Biochemical engineering fundamentals, 2nd edition. McGraw Hill Co., New York, NY (USA): 28.
- Balch, W. E., S. Schoberth, R. S. Tanner und R. S. Wolfe.** 1977. *Acetobacterium*, a new genus of hydrogen-oxidizing, carbon dioxide-reducing, anaerobic bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **27**: 355-361.
- Baldoma, L., und J. Aguilar.** 1987. Involvement of lactaldehyde dehydrogenase in several metabolic pathways of *Escherichia coli* K12. *J. Biol. Chem.* **262**: 13991-13996.
- Balganesh, T. S., L. Reiners, R. Lauster, M. Noyer-Weidner, K. Wilke und T. A. Trautner.** 1987. Construction and use of chimeric SPR/Φ3T DNA methyltransferases in the definition of sequence recognizing enzyme regions. *EMBO J.* **6**: 3543-3549.
- Balk, M., J. Weijma, M. W. Friedrich und A. J. M. Stams.** 2003. Methanol utilization by a novel thermophilic homoacetogenic bacterium, *Moorella mulderi* sp. nov., isolated from a bioreactor. *Arch. Microbiol.* **179**: 315-320.
- Barik, S., S. Prieto, S. B. Harrison, E. C. Clausen und J. L. Gaddy.** 1988. Biological production of alcohols from coal through indirect liquefaction. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **18**: 363-378.
- Béguin, P., J. Millet und J. P. Aubert.** 1987. The cloned *cel* (cellulose degradation) genes of *Clostridium thermocellum* and their products. *Microbiol. Sci.* **4**: 277-280.
- Bélaich, J.-P., C. Tardif, A. Bélaich und C. Gaudin.** 1997. The cellulolytic system of *Clostridium cellulolyticum*. *J. Biotechnol.* **57**: 3-14.
- Ben-Zvi, A. P., und P. Goloubinoff.** 2001. Review: mechanisms of disaggregation and refolding of stable protein aggregates by molecular chaperones. *J. Struct. Biol.* **135**: 84-93.
- Bériault, R., D. Chénier, R. Singh, J. Middaugh, R. Mailloux und V. Appanna.** 2005. Detection and purification of glucose 6-phosphate dehydrogenase, malic enzyme, and NADP-dependent isocitrate dehydrogenase by blue native polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis* **26**: 2892-2897.
- Berlyn, M. K., K. B. Low und K. E. Rand.** 1996. Linkage map of *Escherichia coli* K12. In: F. C. Neidhardt, R. Curtiss, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter und H. E. Umbarger (Hrsg.), *Escherichia coli* and *Salmonella*, 9th edition. American Society for Microbiology, Washington, DC (USA): 1715-1816.
- Bermejo, L. L., N. E. Welker und E. T. Papoutsakis.** 1998. Expression of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 genes in *Escherichia coli* for acetone production and acetate detoxification. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1079-1085.

- Bernalier, A., A. Willems, M. Leclerc, V. Rochet und M. D. Collins.** 1996. *Ruminococcus hydrogenotrophicus* sp. nov., a new H₂/CO₂-utilizing acetogenic bacterium isolated from human feces. *Arch. Microbiol.* **166**: 176-183.
- Berndt, H., und H. G. Schlegel.** 1975. Kinetics and properties of β -ketothiolase from *Clostridium pasteurianum*. *Arch. Microbiol.* **103**: 21-30.
- Bertram, J., und P. Dürre.** 1989. Conjugal transfer and expression of streptococcal transposons in *Clostridium acetobutylicum*. *Arch. Microbiol.* **151**: 551-557.
- Birnboim, H.C., und J. Doly.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1522.
- Birrer, G. A., W. R. Chesbro und R. M. Zsigray.** 1994. Electro-transformation of *Clostridium beijerinckii* NRRL B-592 with shuttle plasmid pHR106 and recombinant derivatives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **41**: 32-38.
- Björk, Å.** 1996. Numerical methods for least squares problems. *SIAM*, Philadelphia, PA (USA).
- Blum, H., H. Beier und H. J. Gross** 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**: 93-99.
- Boga, H. I., W. Ludwig und A. Brune.** 2003. *Sporomusa aerivorans* sp. nov., an oxygenreducing homoacetogenic bacterium from the gut of a soil-feeding termite. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 1397-1404.
- Böhringer, M.** 2002. Molekularbiologische und enzymatische Untersuchungen zur Regulation des Gens der Acetacetat-Decarboxylase von *Clostridium acetobutylicum*. Dissertation, Universität Ulm.
- Bomar, M., H. Hippe und B. Schink.** 1991. Lithotrophic growth and hydrogen metabolism by *Clostridium magnum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **83**: 347-350.
- Bowles, L. K., und W. I. Ellefson.** 1985. Effects of butanol on *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 1165-1170.
- Boyer, H. W., und D. Roulland-Dussoix.** 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **41**: 459-472.
- Boynton, Z. L., G. N. Bennett und F. B. Rudolph.** 1996a. Cloning, sequencing, and expression of clustered genes encoding β -hydroxybutyryl-coenzyme A (CoA) dehydrogenase, crotonase, and butyryl-CoA dehydrogenase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J. Bacteriol.* **178**: 3015-3024.
- Boynton, Z. L., G. N. Bennett und F. B. Rudolph.** 1996b. Cloning, sequencing, and expression of genes encoding phosphotransacetylase and acetate kinase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2758-2766.
- Braun, M., und G. Gottschalk.** 1982. *Acetobacterium wieringae* sp. nov., a new species producing acetic acid from molecular hydrogen and carbon dioxide. *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig.* **C3**: 368-376.
- Bredwell, M. D., P. Srivastava und R. M. Worden.** 1999. Reactor design issues for synthesis-gas fermentations. *Biotechnol. Prog.* **15**: 834-844.
- Breznak, J. A., J. M. Switzer und H.-J. Seitz.** 1988. *Sporomusa termitida* sp. nov., an H₂/CO₂-utilizing acetogen isolated from termites. *Arch. Microbiol.* **150**: 282-288.
- Breznak, J. A., und J. M. Switzer.** 1986. Acetate synthesis from H₂ plus CO₂ by termite gut microbes. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 623-630.

- Breznak, J. A., und R. Costilow.** 1994. Physicochemical factors in growth. In: P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood und N. R. Krieg (Hrsg.), *Methods for general and molecular bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, DC (USA): 137-154.
- Briggs, G. E., und J. B. S. Haldane.** 1925. A note on the kinetics of enzyme action. *Biochem. J.* **19**: 338-339.
- Brooks, J. B., M. J. Selin und C. C. Alley.** 1976. Electron capture gas chromatography study of the acid and alcohol products of *Clostridium septicum* and *Clostridium chauvoei*. *J. Clin. Microbiol.* **3**: 180-185.
- Brüggemann, H., und G. Gottschalk.** 2008. Comparative genomics of clostridia: link between the ecological niche and cell surface properties. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1125**: 73-81.
- Brügger, K., L. Chen, M. Stark, A. Zibat, P. Redder, A. Ruepp, M. Awayez, Q. She, R. A. Garrett und H. P. Klenk.** 2007. The genome of *Hyperthermus butylicus*: a sulfur-reducing, peptide fermenting, neutrophilic crenarchaeote growing up to 108 °C. *Archaea* **2**: 127-135.
- Bryant, M. P., N. Small, C. Bouma und I. Robinson.** 1958. Studies on the composition of the ruminal flora and fauna of young calves. *J. Dairy Sci.* **41**: 1747-1767.
- Burchhardt, G., und P. Dürre.** 1990. Isolation and characterization of DNase-deficient mutants of *Clostridium acetobutylicum*. *Curr. Microbiol.* **21**: 307-311.
- Chen, J.-S.** 1995. Alcohol dehydrogenase: Multiplicity and relatedness in the solvent-producing clostridia. *FEMS Microbiol. Rev.* **17**: 263-273.
- Chiao, J.-S., und Z.-H. Sun.** 2007. History of the acetone-butanol-ethanol fermentation industry in China: development of continuous production technology. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **13**: 12-14.
- Clark, J. E., und L. G. Ljungdahl.** 1984. Purification and properties of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase, an iron-sulfur flavoprotein from *Clostridium formicoaceticum*. *J. Biol. Chem.* **259**: 10845-10849.
- Cole, J. R., B. Chai, R. J. Farris, Q. Wang, A. S. Kulam-Syed-Mohideen, D. M. McGarrell, A. M. Bandela, E. Cardenas, G. M. Garrity und J. M. Tiedje.** 2007. The ribosomal database project (RDP-II): introducing *myRDP* space and quality controlled public data. *Nucleic Acids Res.* **35**: D169-D172.
- Collins, M. D., P. A. Lawson, A. Willems, J. J. Cordoba, J. Fernandez-Garayzabal, P. Garcia, J. Cai, H. Hippe und J. A. E. Farrow.** 1994. The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**: 812-826.
- Conway, T., G. W. Sewell, Y. A. Osman und L. O. Ingram.** 1987. Cloning and sequencing of the alcohol dehydrogenase II gene from *Zymomonas mobilis*. *J. Bacteriol.* **169**: 2591-2597.
- Cortiñas, T. I., B. Micalizzi und A. M. de Guzman.** 1994. Influence of culture conditions on growth and protective antigenicity of *Clostridium chauvoei*. *J. Appl. Bacteriol.* **77**: 382-387.
- Cotter, J. L., M. S. Chinn und A. M. Grunden.** 2009. Ethanol and acetate production by *Clostridium ljungdahlii* and *Clostridium autoethanogenum* using resting cells. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* **32**: 369-380.
- Dangel, W., H. Schulz, G. Diekert, H. König und G. Fuchs.** 1987. Occurrence of corrinoid containing membrane proteins in anaerobic bacteria. *Arch. Microbiol.* **148**: 52-56.
- Daniel, R.** 2004. The soil metagenome - A rich resource for the discovery of novel natural products. *Curr. Opin. Biotechnol.* **15**: 199-204.

- Daniel, R.** 2005. The metagenomics of soil. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 470-478.
- Daniel, S. L., T. Hsu, S. I. Dean und H. L. Drake.** 1990. Characterization of the H₂- and CO-dependent chemolithotrophic potentials of the acetogens *Clostridium thermoaceticum* and *Acetogenium kivui*. *J. Bacteriol.* **172**: 4464-4471.
- Das, A., D. M. Ivey und L. G. Ljungdahl.** 1997. Purification and reconstitution into proteoliposomes of the F₁F₀ ATP synthase from the obligately anaerobic gram-positive bacterium *Clostridium thermoautotrophicum*. *J. Bacteriol.* **179**: 1714-17-20.
- Das, A., J. Hugenholtz, H. van Halbeek und L. G. Ljungdahl.** 1989. Structure and function of a menaquinone involved in electron transport in membranes of *Clostridium thermoautotrophicum* and *Clostridium thermoaceticum*. *J. Bacteriol.* **171**: 5823-5829.
- Das, A., und L. G. Ljungdahl.** 2003. Electron-transport system in acetogens. In: L. G. Ljungdahl, M. W. Adams, L. L. Barton, J. G. Ferry und M. K. Johnson (Hrsg.), *Biochemistry and physiology of anaerobic bacteria*. Springer, New York, NY (USA): 191-204.
- de Marco, A., E. Deuerling, A. Mogk, T. Tomoyasu und B. Bukau.** 2007. Chaperone-based procedure to increase yields of soluble recombinant proteins produced in *E. coli*. *BMC Biotechnol.* **7**: 32.
- Dehning, I., M. Stieb und B. Schink.** 1989. *Sporomusa malonica* sp. nov., a homoacetogenic bacterium growing by decarboxylation of malonate or succinate. *Arch. Microbiol.* **151**: 421-426.
- Demain, A. L., M. Newcomb und J. H. Wu.** 2005. Cellulase, clostridia, and ethanol. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**: 124-154.
- Desvaux, M.** 2005. *Clostridium cellulolyticum*: model organism of mesophilic cellulolytic clostridia. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**: 741-764.
- Diekert, G., und G. Wolfarth.** 1994. Energetics of acetogenesis from C₁ units. In: H. L. Drake, (Hrsg.), *Acetogenesis*. Chapman & Hall, New York, NY (USA): 157-179.
- Donaldson, G. K., L. L. Huang, L. A. Maggio-Hall, V. Nagarajan, C. E. Nakamura und W. Suh** 2007. Fermentative production of four carbon alcohols. Internationales Patent WO2007/041269.
- Dower, W. J., J. F. Miller und C. W. Ragsdale.** 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**: 6127-6145.
- Drake, H. L.** 1994. Acetogenesis, acetogenic bacteria, and the acetyl-CoA „Wood/Ljungdahl“ pathway: past and current perspectives. In: H. L. Drake (Hrsg.), *Acetogenesis*. Chapman & Hall, New York, NY (USA): 3-60.
- Drake, H. L., K. Küsel und C. Matthies.** 2006. Acetogenic prokaryotes. In: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer und E. Stackebrandt (Hrsg.), *The Prokaryotes*, 3rd edition, **vol. 2** (Ecophysiology and biochemistry). Springer, New York, NY (USA): 354-420.
- Drake, H. L., und K. Küsel.** 2005. Acetogenic clostridia. In: P. Dürre (Hrsg.), *Handbook on clostridia*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL (USA): 719-746.
- Dubendorff, J. W., und F. W. Studier.** 1991. Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with *lac* repressor. *J. Mol. Biol.* **219**: 45-59.
- Dürre, P.** 1998. New insights and novel developments in clostridial acetone/butanol/isopropanol fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**: 639-648.
- Dürre, P.** 2005. Formation of solvents in clostridia. In: P. Dürre (Hrsg.), *Handbook on clostridia*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL (USA): 671-693.

- Dürre, P.** 2007. Biobutanol: an attractive biofuel. *Biotechnol. J.* **2**: 1525-1534.
- Dürre, P.** 2008. Fermentative butanol production: bulk chemical and biofuel. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1125**: 353-362.
- Dürre, P., A. Kuhn, M. Gottwald und G. Gottschalk.** 1987. Enzymatic investigations on butanol dehydrogenase and butyraldehyde dehydrogenase in extracts of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 268-272.
- Dürre, P., H. Bahl und G. Gottschalk.** 1988. Membrane processes and product formation in anaerobes. In: L. E. Erickson und D. Y.-C. Fung (Hrsg.), Handbook on anaerobic fermentations. Marcel Dekker, Ltd., New York, NY (USA): 187-206.
- Dürre, P., und H. Bahl.** 1996. Microbial production of acetone/butanol/isopropanol. In: M. Roehr (Hrsg.), *Biotechnology*, 2nd edition, vol. 6. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim: 229-268.
- Edgren, T., und S. Nordlund.** 2006. Two pathways of electron transport to nitrogenase in *Rhodospirillum rubrum*: the major pathway is dependent on the fix gene products. *FEMS Microbiol. Lett.* **260**: 30-35.
- Eichler, B., und B. Schink.** 1984. Oxidation of primary aliphatic alcohols by *Acetobacterium carbinolicum* sp. nov., a homoacetogenic anaerobe. *Arch. Microbiol.* **140**: 147-152.
- El Ghazzawi, E.** 1967. Neuisolierung von *Clostridium formicoaceticum* Wieringa und stoffwechselfysiologische Untersuchungen. *Arch. Mikrobiol.* **57**: 1-19.
- Ezaki, T., N. Li, Y. Hashimoto, H. Miura und H. Yamamoto.** 1994. 16S ribosomal DNA sequences of anaerobic cocci and proposal of *Ruminococcus hansenii* comb. nov. and *Ruminococcus productus* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**: 130-136. Erratum in: *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**: 598.
- Ezeji, T. C., N. Qureshi und H. P. Blaschek.** 2005a. Continuous butanol fermentation and feed starch retrogradation: butanol fermentation sustainability using *Clostridium beijerinckii* BA101. *J. Biotechnol.* **115**: 179-187.
- Ezeji, T. C., N. Qureshi und H. P. Blaschek.** 2005b. Industrially relevant fermentations. In: P. Dürre (Hrsg.), Handbook on clostridia. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL (USA): 797-812.
- Falksohn, R., A. El Ahl, J. Glüsing, A. Jung, P. Rao, T. Thielke, V. Windfuhr, B. Zand.** 2008. Die Wut der Armen. *Der Spiegel* **16**: 114-116.
- Fernbach, A., und E. H. Strange.** 1911a. Improvements in the manufacture of products of fermentation. Britisches Patent 15203.
- Fernbach, A., und E. H. Strange.** 1911b. Improvement in the manufacture of higher alcohols. Britisches Patent 15204.
- Fernbach, A., und E. H. Strange.** 1912. Improvements connected with fermentation processes for the production of acetone, and higher alcohols, from starch, sugars, and other carbohydrate materials. Britisches Patent 21073.
- Feustel, L., S. Nakotte und P. Dürre.** 2004. Characterization and development of two reporter gene systems for *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 798-803.
- Fischer, R. J., J. Helms und P. Dürre.** 1993. Cloning, sequencing, and molecular analysis of the *sol* operon of *Clostridium acetobutylicum*, a chromosomal locus involved in solventogenesis. *J. Bacteriol.* **175**: 6959-6969.

- Fitz, A.** 1876. Ueber die Gährung des Glycerins. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **9**: 1348-1352.
- Fitz, A.** 1877. Ueber Schizomyceten-Gährungen II [Glycerin, Mannit, Stärke, Dextrin]. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **10**: 276-283.
- Fitz, A.** 1878. Ueber Schizomyceten-Gährungen III. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **11**: 42-55.
- Fitz, A.** 1882. Ueber Spaltpilzgahrungen. VII. Mittheilung. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **15**: 867-880.
- Fontaine, F. E., W. H. Peterson, E. McCoy, M. J. Johnson und G. J. Ritter.** 1942. A new type of glucose fermentation by *Clostridium thermoaceticum*. *J. Bacteriol.* **43**: 701-715.
- 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 alcohologenic cultures of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J. Bacteriol.* **184**: 821-830.
- Ford, J., W. T. French, R. Hernandez, E. Easterling, M. Zappi, C. Morrison, M. Licha und L. R. Brown.** 2008. Development and comparisons of efficient gas-cultivation systems for anaerobic carbon monoxide-utilizing microorganisms. *Bioresour. Technol.* **99**: 638-643.
- Freier-Schröder, D., J. Wiegel und G. Gottschalk.** 1989. Butanol formation by *Clostridium thermosaccharolyticum* at neutral pH. *Biotechnol. Lett.* **11**: 831-836.
- Frings, J., C. Wondrak und B. Schink.** 1994. Fermentative degradation of triethanolamine by a homoacetogenic bacterium. *Arch. Microbiol.* **162**: 103-107.
- Frings, J., und B. Schink.** 1994. Fermentation of phenoxyethanol to phenol and acetate by a homoacetogenic bacterium. *Arch. Microbiol.* **162**: 199-204.
- Frohning, C. D., und C. W. Kohlpaintner.** 1996. In: B. Cornilis und W. A. Herrmann (Hrsg.), Applied homogeneous catalysis with organometallic compounds, vol. 2, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim: 64.
- Gabriel, G. L.** 1928. Butanol fermentation process. *Ind. Eng. Chem.* **20**: 1063-1067.
- Gaddy, J. L.** 1997. *Clostridium* strain which produces acetic acid from waste gases. US Patent 5593886.
- Gaddy, J. L.** 2000. Biological production of ethanol from waste gases with *Clostridium ljungdahlii*. US Patent 6136577.
- Gaddy, J. L.** 2002. Biological production of products from waste gases. US Patent 6340581.
- Gaddy, J. L., D. K. Arora, C.-W. Ko, J. R. Phillips, R. Basu, C. V. Wikstrom und E. C. Clausen.** 2007. Methods for increasing the production of ethanol from microbial fermentation. US Patent 72485402.
- Gapes, R.** 2000. The history of the acetone-butanol project in Austria. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2**: 5-8.
- Geerlings, G., H. C. Aldrich, W. Harder und G. Diekert.** 1987. Isolation and characterization of a carbon monoxide utilizing strain of the acetogen *Peptostreptococcus productus*. *Arch. Microbiol.* **148**: 305-313.
- Geerlings, G., P. Schonheit und G. Diekert.** 1989. Sodium dependent acetate formation from CO₂ in *Peptostreptococcus productus* (strain Marburg). *FEMS Microbiol. Lett.* **48**: 253-257.

- Gentz, R., und H. Bujard.** 1985. Promoters recognized by *Escherichia coli* RNA polymerase selected by function: highly efficient promoters from bacteriophage T5. *J. Bacteriol.* **164**: 70-77.
- George, H. A., J. L. Johnson, W. E. C. Moore, L. V. Holdeman und J. S. Chen.** 1983. Acetone, isopropanol, and butanol production by *Clostridium beijerinckii* (syn. *Clostridium butylicum*) and *Clostridium aurantibutyricum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 1160-1163.
- Gerckens, B.** 1980. Untersuchungen zum Wachstum und zur Lösungsmittelproduktion von *C. acetobutylicum*. Diplomarbeit, Georg-August-Universität Göttingen.
- Gherna, R. L.** 1994. Culture preservation. In: P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood und N. R. Krieg (Hrsg.), Methods for general and molecular bacteriology. American Society for Microbiology, Washington, DC (USA): 278-292.
- Gößner, A. S., F. Picardal, R. S. Tanner und H. L. Drake.** 2008. Carbon metabolism of the moderately acid-tolerant acetogen *Clostridium drakei* isolated from peat. *FEMS Microbiol. Lett.* **287**: 236-242.
- Gößner, A. S., K. Küsel, D. Schulz, S. Trenz, G. Acker, C. R. Lovell und H. L. Drake.** 2006. Trophic interaction of the aerotolerant anaerobe *Clostridium intestinale* and the acetogen *Sporomusa rhizae* sp. nov. isolated from roots of the black needlerush *Juncus roemerianus*. *Microbiology* **152**: 1209-1219.
- Gößner, A. S., R. Devereux, N. Ohnemüller, G. Acker, E. Stackebrandt und H. L. Drake.** 1999. *Thermicanus aegyptius* gen. nov., sp. nov., isolated from oxic soil, a fermentative microaerophile that grows commensally with the thermophilic acetogen *Moorella thermoacetica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 5124-5133.
- Gottwald, M., H. Hippe und G. Gottschalk.** 1984. Formation of *n*-butanol from D-glucose by strains of the "*Clostridium tetanomorphum*" group. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 573-576.
- Gottwald, M., und G. Gottschalk, G.** 1985. The internal pH of *Clostridium acetobutylicum* and its effect on the shift from acid to solvent formation. *Arch. Microbiol.* **143**: 42-46.
- Graber, J. R., J. R. Leadbetter und J. Breznak.** 2004. Description of *Treponema azotonutricium* sp. nov. and *Treponema primitia* sp. nov., the first spirochetes isolated from termite guts. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 1315-1320.
- Graber, J. R., und J. Breznak.** 2004. Physiology and nutrition of *Treponema primitia*, an H₂/CO₂-acetogenic spirochete from termite hindguts. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 1307-1314.
- Graf, R.** 2002. Enzymatische und genetische Untersuchungen zur Aktivität der Butyraldehyd-Dehydrogenase und der 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase (Crotonase) in *Clostridium acetobutylicum* (DSM 792). Dissertation, Universität Ulm.
- Gray, K. A., L. Zhao und M. Emptage.** 2006. Bioethanol. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **10**: 141-146.
- Greening, R. C., und J. A. Z. Leedle.** 1989. Enrichment and isolation of *Acetitomaculum ruminis*, gen. nov., sp. nov.: acetogenic bacteria from the bovine rumen. *Arch. Microbiol.* **151**: 399-406.
- Grethlein, A. J., R. M. Worden, M. K. Jain und R. Datta.** 1991. Evidence for production of *n*-butanol from carbon monoxide by *Butyribacterium methylotrophicum*. *J. Ferment. Bioeng.* **72**: 58-60.
- Haacke, A., G. Fendrich, P. Ramage und M. Geiser.** 2009. Chaperone over-expression in *Escherichia coli*: apparent increased yields of soluble recombinant protein kinases are due mainly to soluble aggregates. *Protein Expr. Purif.* **64**: 185-193.

- Hall, R. H., und E. S. Stern.** 1950. Acid-catalysed hydration of acraldehyde. Kinetics of the reaction and isolation of 3-HPA. *J. Chem. Soc.* **1950**: 490-498.
- Halmann, M., und A. Steinfeld.** 2006. Production of lime, hydrogen, and methanol by the thermo-neutral combined calcination of limestone with partial oxidation of natural gas or coal. *Energy* **31**: 1533-1541.
- Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
- Harris, J., R. Mulder, D. B. Kell, R. P. Walter und J. G. Morris.** 1986. Solvent production by *Clostridium pasteurianum* in media of high sugar content. *Biotechnol. Lett.* **8**: 889-892.
- Harris, L. M., L. Blank, R. P. Desai, N. E. Welker und E. T. Papoutsakis.** 2001. Fermentation characterization and flux analysis of recombinant strains of *Clostridium acetobutylicum* with an inactivated *solR* gene. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 322-328.
- Harris, L. M., R. P. Desai, N. E. Welker und 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? *Biotechnol. Bioeng.* **67**: 1-11.
- Hartmanis, M. G., und M. X. Sliwowski.** 1985. Selenomethionine-containing thiolase and 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase from *Clostridium kluyveri*. *Curr. Top. Cell. Regul.* **27**: 479-486.
- Hartmanis, M. G., und T. C. Stadtman.** 1982. Isolation of a selenium-containing thiolase from *Clostridium kluyveri*: identification of the selenium moiety as selenomethionine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 4912-4916.
- Hattori, S., Y. Kamagata, S. Hanada und H. Shoun.** 2000. *Thermoacetogenium phaeum* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic, thermophilic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 1601-1609.
- Heap, J. T., O. Pennington, S. T. Cartman, G. P. Carter und N. P. Minton.** 2007. The ClosTron: a universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*. *J. Microbiol. Methods* **70**: 452-464.
- Heise, R., V. Müller und G. Gottschalk.** 1989. Sodium dependence of acetate formation by the acetogenic bacterium *Acetobacterium woodii*. *J. Bacteriol.* **171**: 5473-5478.
- Henne, A., R. Daniel, R. A. Schmitz und G. Gottschalk.** 1999. Construction of environmental DNA libraries in *Escherichia coli* and screening for the presence of genes conferring utilization of 4-hydroxybutyrate. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3901-3907.
- Henstra, A. M., J. Sipma, A. Rinzema und A. J. M. Stams.** 2007. Microbiology of synthesis gas fermentation for biofuel production. *Curr. Opin. Biotechnol.* **18**: 200-206.
- Hermann, M., M.-R. Popoff und M. Sebald.** 1987. *Sporumusa paucivorans* sp. nov., a methylophilic bacterium that forms acetic acid from hydrogen and carbon dioxide. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**: 93-101.
- Herrmann, G., E. Jayamani, G. Mai und W. Buckel.** 2008. Energy conservation via electron-transferring flavoprotein in anaerobic bacteria. *J. Bacteriol.* **190**: 784-791.
- Hirsch, A., und E. Grinstead.** 1954. Methods for the growth and enumeration of anaerobic spore-formers from cheese with observations on the effect of nisin. *J. Dairy Res.* **21**: 101-110.
- Hochuli, E.** 1989. Genetically designed affinity chromatography using a novel metal chelate absorbent. In: U. P. Schlunegger (Hrsg.), *Biologically active molecules*. Springer, Berlin: 217-239.

- Holt, R. A., A. J. Cairns und J. G. Morris.** 1988. Production of butanol by *Clostridium puniceum* in batch and continuous culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 319-324.
- Huang, L., L. N. Gibbins und C. W. Forsberg.** 1985. Transmembrane pH gradient and membrane potential in *Clostridium acetobutylicum* during growth under acetogenic and solventogenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 1043-1047.
- Hulo, N., A. Bairoch, V. Bulliard, L. Cerutti, B. A. Cuche, E. de Castro, C. Lachaize, P. S. Langendijk-Genevaux und C. J. Sigrist.** 2008. The 20 years of PROSITE. *Nucleic Acids Res.* **36**: D245-D249.
- Hunhke, R., R. S. Lewis und R. S. Tanner.** 2008. Isolation and characterization of novel clostridial species. Internationales Patent WO2008/028055.
- Imkamp, F., und V. Müller.** 2007. Acetogenic bacteria. In: Encyclopedia of life science. John Wiley & Sons, Ltd., Hoboken, NJ (USA): Online (<http://mrw.interscience.wiley.com/emrw/9780470015902/els/article/a0020086/current/abstract>).
- Ingram, L. O.** 1976. Adaptation of membrane lipids to alcohols. *J. Bacteriol.* **125**: 670-678.
- Inoue, H., H. Nojima und H. Okayama.** 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28.
- Inui, M., M. Suda, S. Kimura, K. Yasuda, H. Suzuki, H. Toda, S. Yamamoto, S. Okino, N. Suzuki und H. Yukawa.** 2007. Expression of *Clostridium acetobutylicum* butanol synthetic genes in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **77**: 1305-1316.
- Ivey, D. M., und L. G. Ljungdahl.** 1986. Purification and characterization of the F₁-ATPase from *Clostridium thermoaceticum*. *J. Bacteriol.* **165**: 252-257.
- Janknecht, R., G. de Martynoff, J. Lou, R. A. Hipskind, A. Nordheim und H. G. Stunnenberg.** 1991. Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 8972-8976.
- Jansen, M., und T. A. Hansen.** 2001. Non-growth-associated demethylation of dimethylsulfoniopropionate by (homo)acetogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 300-306.
- Jenkins, L. S. und W. D. Nunn.** 1987. Genetic and molecular characterization of the genes involved in short-chain fatty acid degradation in *Escherichia coli*: The *ato* system. *J. Bacteriol.* **169**: 42-52.
- Jennert, K. C. B., C. Tardif, D. I. Young und M. Young.** 2000. Gene transfer to *Clostridium cellulolyticum* ATCC 35319. *Microbiology* **146**: 3071-3080.
- Jones, D. T.** 2001. Applied acetone-butanol fermentation. In: H. Bahl und P. Dürre (Hrsg.), Clostridia. Biotechnology and medical applications. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim: 125-168.
- Jones, D. T., und D. R. Woods.** 1986. Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiol. Rev.* **50**: 484-524.
- Jones, D. T., und S. Keis.** 1995. Origins and relationships of industrial solvent-producing clostridial strains. *FEMS Microbiol. Rev.* **17**: 223-232.
- Jore, J. P. M., N. van Luijk, R. G. M. Luiten, M. J. van der Werf und P. H. Pouwels.** 2001. Efficient transformation system for *Propionibacterium freudenreichii* based on a novel vector. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 499-503.

- Kalscheuer, R., T. Stöveken, H. Luftmann, U. Malkus, R. Reichelt und A. Steinbüchel.** 2006. Neutral lipid biosynthesis in engineered *Escherichia coli*: Jojoba oil-like wax esters and fatty acid butyl esters. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 1373-1379.
- Kanamori, T., N. Kanou, H. Atomi und T. Imanaka.** 2004. Enzymatic characterization of a prokaryotic urea carboxylase. *J. Bacteriol.* **186**: 2532-2539.
- Kane, M. D., A. Brauman und J. A. Breznak.** 1991. *Clostridium mayombei* sp. nov., an H₂/CO₂ acetogenic bacterium from the gut of the african soil-feeding termite, *Cubitermes speciosus*. *Arch. Microbiol.* **156**: 99-104.
- Kane, M. D., und J. A. Breznak.** 1991. *Acetonema longum* gen. nov. sp. nov., an H₂/CO₂ acetogenic bacterium from the termite, *Pterotermes occidentis*. *Arch. Microbiol.* **156**: 91-98.
- Keis, S., R. Shaheen und D. T. Jones.** 2001. Emended descriptions of *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*, and descriptions of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* sp. nov. and *Clostridium saccharobutylicum* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 2095-2103.
- Kelleher, J. E. und E. A. Raleigh.** 1991. A novel activity in *Escherichia coli* K-12 that directs restriction of DNA modified at CG dinucleotides. *J. Bacteriol.* **173**: 5220-5223.
- Kerby, R., und J. G. Zeikus.** 1983. Growth of *Clostridium thermoaceticum* on H₂/CO₂ or CO as energy source. *Curr. Microbiol.* **8**: 27-30.
- Kibbe, W. A.** 2007. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res.* **35**: W43-W46.
- Klasson, K. T., B. B. Elmore, J. L. Vega, M. D. Ackerson, E. C. Clausen und J. L. Gaddy.** 1990. Biological production of liquid and gaseous fuels from synthesis gas. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **24/25**: 857-873.
- Klasson, K. T., M. D. Ackerson, E. C. Clausen und J. L. Gaddy.** 1992. Bioconversion of synthesis gas into liquid or gaseous fuels. *Enzyme Microb. Technol.* **14**: 602-608.
- Knietsch, A., T. Waschowitz, S. Bowien, A. Henne und R. Daniel** 2003a. Construction and screening of metagenomic libraries derived from enrichment cultures: generation of a gene bank for genes conferring alcohol oxidoreductase activity on *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 1408-1416.
- Knietsch, A., T. Waschowitz, S. Bowien, A. Henne und R. Daniel** 2003b. Metagenomes of complex microbial consortia derived from different soils as sources for novel genes conferring formation of carbonyls from short-chain polyols on *Escherichia coli*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **5**: 46-56.
- Konieczny, I., und K. Liberek.** 2002. Cooperative action of *Escherichia coli* ClpB protein and DnaK chaperone in the activation of a replication initiation protein. *J. Biol. Chem.* **277**: 18483-18488.
- Köpke, M.** 2004. Analyse der Aktivität von Butanol-Dehydrogenase-Genen und deren Genprodukten aus Metagenombanken. Diplomarbeit, Universität Ulm.
- Kotsyurbenko, O. R., M. V. Simankova, A. N. Nozhevnikova, T. N. Zhilina, N. P. Bolotina, A. M. Lysenko und G. A. Osipov.** 1995. New species of psychrophilic acetogens: *Acetobacterium bakii* sp. nov., *A. paludosum* sp. nov., *A. fimetarium* sp. nov. *Arch. Microbiol.* **163**: 29-34.
- Krumholz, L. R., und M. P. Bryant.** 1985. *Clostridium pfennigii* sp. nov. uses methoxyl groups of monobenzenoids and produces butyrate. *Int. J. Sys. Bacteriol.* **35**: 454-456.

- Küsel, K., A. Karnholz, T. Trinkwalter, R. Devereux, G. Acker und H. L. Drake.** 2001. Physiological ecology of *Clostridium glycolicum* RD-1, an aerotolerant acetogen isolated from sea grass roots. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 4734-4741.
- Küsel, K., T. Dorsch, G. Acker, E. Stackebrandt und H. L. Drake.** 2000. *Clostridium scatologenes* strain SL1 isolated as an acetogenic bacterium from acidic sediments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 537-546.
- Kuhner, C. H., C. Frank, A. Griebhammer, M. Schmittroth, G. Acker, A. Göbner und H. L. Drake.** 1997. *Sporomusa silvacetica* sp. nov., an acetogenic bacterium isolated from aggregated forest soil. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**: 352-358.
- Lämmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Langer, M., E. M. Gabor, K. Liebeton, G. Meurer, F. Niehaus, R. Schulze, J. Eck und P. Lorenz.** 2006. Metagenomics: an inexhaustible access to nature's diversity. *Biotechnol. J.* **1**: 815-821.
- Lee, S. Y., L. D. Mermelstein und E. T. Papoutsakis.** 1993. Determination of plasmid copy number and stability in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *FEMS Microbiol. Lett.* **108**: 319-324.
- Leigh, J. A., F. Mayer und R. S. Wolfe.** 1981. *Acetogenium kivui*, a new thermophilic hydrogen-oxidizing, acetogenic bacterium. *Arch. Microbiol.* **129**: 275-280.
- Leigh, J. A., und R. S. Wolfe.** 1983. *Acetogenium kiuvi* gen. nov., sp. nov., a thermophilic acetogenic bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **33**: 886.
- Leschine, S.** 2005. Degradation of polymers: cellulose, xylan, pectin, starch. In: P. Dürre (Hrsg.), Handbook on clostridia. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL (USA): 101-132.
- Li, F., J. Hinderberger, H. Seedorf, J. Zhang, W. Buckel und R. K. Thauer.** 2008. Coupled ferredoxin and crotonyl coenzyme A (CoA) reduction with NADH catalyzed by the butyryl-CoA dehydrogenase/Etf complex from *Clostridium kluyveri*. *J. Bacteriol.* **190**: 843-850.
- Liou, J. S.-C., D. L. Blakwill, G. R. Drake und R. S. Tanner.** 2005. *Clostridium carboxidivorans* sp. nov., a solvent-producing clostridium isolated from an agricultural settling lagoon, and reclassification of the acetogen *Clostridium scatologenes* strain SL1 as *Clostridium drakei* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 2085-2091.
- Liu, C., S. M. Finegold, Y. Song und P. A. Lawson.** 2008. Reclassification of *Clostridium coccoides*, *Ruminococcus hansenii*, *Ruminococcus hydrogenotrophicus*, *Ruminococcus luti*, *Ruminococcus productus* and *Ruminococcus schinkii* as *Blautia coccoides* gen. nov., comb. nov., *Blautia hansenii* comb. nov., *Blautia hydrogenotrophica* comb. nov., *Blautia luti* comb. nov., *Blautia producta* comb. nov., *Blautia schinkii* comb. nov. and description of *Blautia wexlerae* sp. nov., isolated from human faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**: 1896-1902.
- Liu, X., Y. Zhu und S.-T. Yang.** 2006. Construction and characterization of *ack* deleted mutant of *Clostridium tyrobutyricum* for enhanced butyric acid and hydrogen production. *Biotechnol. Prog.* **22**: 1265-1275.
- Lopéz-Contreras, A. M., A. A. Martens, N. Szijarto, H. Mooibroek, P. A. M. Claassen, J. van der Oost und W. M. de Vos.** 2003. Production by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 of CelG, a cellulosomal glycoside hydrolase belonging to family 9. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 869-877.
- Lorenz, K.** 1997. Gezielte Mutagenese des *sol*-Operons und physiologische Untersuchungen zur enzymatischen Aktivität der Alkohol/Aldehyd-Dehydrogenase E aus *Clostridium acetobutylicum*. Dissertation, Universität Ulm.

- Lorowitz, W. H., und M. P. Bryant.** 1984. *Peptostreptococcus productus* strain that grows rapidly with CO as the energy source. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 961-964.
- Lorowitz, W., und D. Clark** 1982. *Escherichia coli* mutants with a temperature-sensitive alcohol dehydrogenase. *J. Bacteriol.* **152**: 935-938.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr und R. J. Randall.** 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Lux, M. F. und H. L. Drake.** 1992. Re-examination of the metabolic potentials of the acetogens *Clostridium acetivum* and *Clostridium formicoaceticum*: chemolithoautotrophic and aromatic-dependent growth. *FEMS Microbiol. Lett.* **95**: 49-56.
- Lynd, L., R. Kerby und J. G. Zeikus.** 1982. Carbon monoxide metabolism of the methylotrophic acidogen *Butyribacterium methylotrophicum*. *J. Bacteriol.* **149**: 255-263.
- Maddox, I. S., N. Qureshi und N. A. Gutierrez.** 1993. Utilization of whey by clostridia and process technology. In: D. R. Woods (Hrsg.), *The clostridia and biotechnology*. Butterworth-Heinemann, Stoneham, MA (USA): 343-369.
- Marchal, R., D. Blanchet und J. P. Vandecasteele.** 1985. Industrial optimization of acetone-butanol fermentation: a study of the utilization of Jerusalem artichokes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 92-98.
- McClung, L. S., und E. McCoy.** 1935. Studies on anaerobic bacteria. VII. The serological reactions of *Clostridium acetobutylicum*, *Cl. felsineum* and *Cl. roseum*. *Arch. Mikrobiol.* **6**: 239-249.
- McCoy, E., E. B. Fred, W. H. Peterson und E. G. Hastings.** 1926. A cultural study of the acetone butyl alcohol organism. *J. Infect. Dis.* **39**: 457-484.
- McCoy, E., und L. S. McClung.** 1935. Studies on anaerobic bacteria. IV. The nature and systematic position of a new chromogenic *Clostridium*. *Arch. Mikrobiol.* **6**: 230-238.
- McCutchan, W. N., und R. J. Hickey.** 1954. The butanol-acetone fermentations. *Ind. Ferment.* **1**: 347-388.
- McDonald, I. R., P. W. Riley, R. J. Sharp und A. J. McCarthy.** 1995. Factors affecting the electroporation of *Bacillus subtilis*. *J. Appl. Bacteriol.* **79**: 213-218.
- McGinnis, S., und T. L. Madden.** 2004. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **35**: W20-W25.
- McInerney, M. J., M. P. Bryant und N. Pfennig.** 1979. Anaerobic bacterium that degrades fatty acids in syntrophic association with methanogens. *Arch. Mikrobiol.* **122**: 129-135.
- Mechichi, T., M. Labat, B. K. C. Patel, T. H. S. Woo, P. Thomas und J.-L. Garcia.** 1999. *Clostridium methoxybenzovorans* sp. nov., a new aromatic O-demethylating homoacetogen from an olive mill wastewater treatment digester. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**: 1201-1209.
- Mechichi, T., M. Labat, T. H. S. Woo, P. Thomas, J.-L. Garcia und B. K. C. Patel.** 1998. *Eubacterium aggregans* sp. nov., a new homoacetogenic bacterium from olive mill wastewater treatment digester. *Anaerobe* **4**: 283-291.
- Meier, T., S. A. Ferguson, G. M. Cook, P. Dimroth und J. Vonck.** 2006. Structural investigations of the membrane-embedded rotor ring of the F-ATPase from *Clostridium paradoxum*. *J. Bacteriol.* **188**: 7759-7764.
- Meng, Y., und J. Li.** 2006. Cloning, expression and characterization of a thiolase gene from *Clostridium pasteurianum*. *Biotechnol. Lett.* **28**: 1227-1232.

- Mermelstein, L. D., E. T. Papoutsakis, D. J. Petersen und G. N. Bennett.** 1993. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 for increased solvent production by enhancement of acetone formation enzyme activities using a synthetic acetone operon. *Biotechnol. Bioeng.* **42**: 1053-1060.
- Mermelstein, L. D., N. E. Welker, G. N. Bennett und E. T. Papoutsakis.** 1992. Expression of cloned homologous fermentative genes in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Biotechnology (NY)* **10**: 190-195.
- Mermelstein, L. D., und E. T. Papoutsakis.** 1993. In vivo methylation in *Escherichia coli* by the *Bacillus subtilis* phage Φ 3TI to protect plasmids from restriction upon transformation of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1077-1081.
- Meryman, H. T.** 1971. Cryoprotective agents. *Cryobiology* **8**: 173-183.
- Michaelis, L., und M. L. Menten.** 1913. Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem. Z.* **4**: 333-369.
- Michelsen, B. K.,** 1995. Transformation of *Escherichia coli* increases 260-fold upon inactivation of T4 DNA ligase. *Anal. Biochem.* **225**: 172-174.
- Mingardon, F., S. Perret, A. Bélaich, C. Tardif, J.-P. Bélaich und H. P. Fierobe.** 2005. Heterologous production, assembly, and secretion of a minicellulosome by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 1215-1222.
- Mitchell, D.** 2008. A note on rising food prices. Policy research working paper 4682. The world bank development prospects group.
- Möller, B., R. Obmer, B. H. Howard, G. Gottschalk und H. Hippe.** 1984. *Sporomusa*, a new genus of Gram-negative anaerobic bacteria including *Sporomusa sphaeroides* spec. nov. and *Sporomusa ovata* spec. nov. *Arch. Microbiol.* **139**: 388-396.
- Moore, W. E. C., und E. P. Cato.** 1965. Synonymy of *Eubacterium limosum* and *Butyribacterium rettgeri*. *Int. Bull. Bacteriol. Nomen. Taxon.* **15**: 69-80.
- Moreira, A. R., D. C. Ulmer und J. C. Linden.** 1981. Butanol toxicity in the butylic fermentation. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **11**: 567-579.
- Müller, V.** 2003. Energy conservation in acetogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 6345-6353.
- Müller, V., F. Imkamp, E. Biegel, S. Schmidt und S. Dilling.** 2008. Discovery of a ferredoxin:NAD⁺-oxidoreductase (Rnf) in *Acetobacterium woodii*: a novel potential coupling site in acetogens. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1125**: 137-146.
- Müller, V., S. Aurfurth und S. Rahlfs.** 2001. The Na⁺ cycle in *Acetobacterium woodii*: identification and characterization of a Na⁺ translocating F₁F₀-ATPase with a mixed oligomer of 8 and 16 kDa proteolipids. *Biochim. Biophys. Acta.* **1505**: 108-120.
- Nair, R. V., G. N. Bennett und E. T. Papoutsakis.** 1994. Molecular characterization of an aldehyde/alcohol dehydrogenase gene from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J. Bacteriol.* **176**: 871-885.
- Najafpour, G., und H. Younesi.** 2006. Ethanol and acetate synthesis from waste gas using batch culture of *Clostridium ljungdahlii*. *Enzyme Microb. Technol.* **38**: 223-228.
- Nakotte, S., S. Schaffer, M. Böhringer und P. Dürre.** 1998. Electroporation of, plasmid isolation from and plasmid conservation in *Clostridium acetobutylicum* DSM 792. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**: 564-567.

- Nasri, M., und D. Thomas** 1986. Relaxation of recognition sequence of specific endonuclease *Hind*III. *Nucleic Acids Res.* **14**: 811-821.
- Nativel, F., J. Pourquié, D. Ballerini, J. P. Vandecasteele und P. Renault.** 1992. The biotechnology facilities at Soustons for biomass conversion. *Int. J. Solar Energy* **11**: 219-229.
- Neuhoff, V., N. Arold, D. Taube und W. Ehrhardt.** 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**: 255-262.
- Nimcevic, D., und R. Gapes.** 2000. The acetone-butanol fermentation in pilot plant and pre-industrial scale. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2**: 15-20.
- Noack, S., M. Köpke und P. Dürre.** 2009. Microbially produced fuels and other biofuels. In: J. H. Wright und D. A. Evans (Hrsg.), *New research on biofuels*, Nova Science Publishers, Hauppauge, NY (USA): im Druck.
- Noguchi, H., J. Park und T. Takagi.** 2006. MetaGene: Prokaryotic gene finding from environmental genome shotgun sequences. *Nucleic Acids Res.* **34**: 5623-5630.
- Nölling, J., G. Breton, M. V. Omelchenko, K. S. Makarova, Q. Zeng, R. Gibson, H. M. Lee, J. Dubois, D. Qiu, J. Hitti, GTC Sequencing Center Production, Finishing and Bioinformatics Teams, Y. I. Wolf, R. L. Tatusov, F. Sabathe, L. Doucette-Stamm, P. Soucaille, M. J. Daly, G. N. Bennett, E. V. Koonin und D. R. Smith.** 2001. Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *J. Bacteriol.* **183**: 4823-4838.
- Noyer-Weidner, M., S. Jentsch, B. Pawlek, U. Günthert und T. A. Trautner.** 1983. Restriction and modification in *Bacillus subtilis*: DNA methylation potential of the related bacteriophages Z, SPR, SPβ, Φ3T, and ρ11. *J. Virol.* **46**: 446-453.
- Noyer-Weidner, M., S. Jentsch, J. Kupsch, M. Bergbauer und T. A. Trautner.** 1985. DNA methyltransferase genes of *Bacillus subtilis* phages: structural relatedness and gene expression. *Gene* **35**: 143-150.
- O'Brien, R. W., und J. G. Morris.** 1971. The ferredoxin-dependent reduction of chloramphenicol by *Clostridium acetobutylicum*. *J. Gen. Microbiol.* **67**: 265-271.
- Oelmüller, U., N. Krüger, A. Steinbüchel und C. G. Friedrich.** 1990. Isolation of prokaryotic RNA and detection of specific mRNA with biotinylated probes. *J. Microbiol. Methods* **11**: 73-84.
- Ohkawi, K., und R. E. Hungate.** 1977. Hydrogen utilization by clostridia in sewage sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**: 1270-1274.
- Ollivier, B., R. Cordruwisch, A. Lombardo und J.-L. Garcia.** 1985. Isolation and characterization of *Sporomusa acidovorans* sp. nov., a methylotrophic homoacetogenic bacterium. *Arch. Microbiol.* **142**: 307-310.
- Ounine, K., H. Petitdemange, G. Raval und R. Gay** 1985. Regulation and butanol inhibition of D-xylose and D-glucose uptake in *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 874-878.
- Paarup, M., M. W. Friedrich, B. J. Tindall und K. Finster.** 2005. Characterization of the psychrotolerant acetogen strain SyrA5 and the emended description of the species *Acetobacterium carbinolicum*. *Ant. v. Leeuwenhoek* **89**: 55-69.
- Pace, N. R.** 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* **276**: 734-740.

- Pagni, M., V. Ioannidis, L. Cerutti, M. Zahn-Zabal, C. V. Jongeneel, J. Hau, O. Martin, D. Kuznetsov und L. Falquet.** 2007. MyHits: improvements to an interactive resource for analyzing protein sequences. *Nucleic Acids Res.* **35**: W433-W437.
- Palosaari, N. R., und P. Rogers.** 1988. Purification and properties of the inducible coenzyme A-linked butyraldehyde dehydrogenase from *Clostridium acetobutylicum*. *J. Bacteriol.* **170**: 2971-2976.
- Papoutsakis, E. T.** 2008. Engineering solventogenic clostridia. *Curr. Opin. Biotechnol.* **19**: 420-429.
- Parekh, S. R., und M. Cheryan.** 1991. Production of acetate by mutant strains of *Clostridium thermoaceticum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 384-387.
- Pasteur, L.** 1862. Quelques résultats nouveaux relatifs aux fermentations acétique et butyrique. *Bull. Soc. Chim. Paris* **May 1862**: 52-53.
- Pérez, J. M., F. A. Arenas, G. A. Pradenas, J. M. Sandoval und C. C. Vásquez.** 2008. *Escherichia coli* YqhD exhibits aldehyde reductase activity and protects from the harmful effect of lipid peroxidation-derived aldehydes. *J. Biol. Chem.* **283**: 7346-7353.
- Perret, S., L. Casalot, H.-P. Fierobe, C. Tardif, F. Sabathé, J.-P. Belaich und A. Belaich.** 2004. Production of heterologous and chimeric scaffoldins by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J. Bacteriol.* **186**: 253-257.
- Perucho, M., D. Hanahan, L. Lipsich und M. Wigler.** 1980. Isolation of the chicken thymidine kinase gene by plasmid rescue. *Nature* **285**: 207-210.
- Petersen, D. J., R. W. Welch, F. B. Rudolph und G. N. Bennett.** 1991. Molecular cloning of an alcohol (butanol) dehydrogenase gene cluster from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J. Bacteriol.* **173**: 1831-1834.
- Petitedemange, H., J. Desbordes, M. Maugras und R. Gay.** 1969. Étude de la formation du n-butanol chez *Clostridium acetobutylicum*. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **51**: 157-165.
- Phillips, J. R., K. T. Klasson, E. C. Clausen und J. L. Gaddy.** 1993. Biological production of ethanol from coal synthesis gas - medium development studies. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **39/40**: 559-571.
- Pierce, E., G. Xie, R. D. Barabote, E. Saunders, C. S. Han, J. C. Detter, P. Richardson, T. S. Brettin, A. Das, L. G. Ljungdahl und S. W. Ragsdale.** 2008. The complete genome sequence of *Moorella thermoacetica* (f. *Clostridium thermoaceticum*). *Environ. Microbiol.* **10**: 2550-2573.
- Purdy, D., T. A. T. O'Keeffe, M. Elmore, M. Herbert, A. McLeod, M. Bokori-Brown, A. Ostrowski und N. P. Minton.** 2002. Conjugative transfer of clostridial shuttle vectors from *Escherichia coli* to *Clostridium difficile* through circumvention of the restriction barrier. *Mol. Microbiol.* **46**: 439-452.
- Qureshi, N., und H. P. Blaschek.** 2001. Recent advances in ABE fermentation: hyper-butanol producing *Clostridium beijerinckii* BA101. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 287-291.
- Ragauskas, A. J., C. K. Williams, B. H. Davison, G. Britovsek, J. Cairney, C. A. Eckert, W. J. Frederick, Jr., J. P. Hallett, D. J. Leak, C. L. Liotta, J. R. Mielenz, R. Murphy, R. Templer und T. Tschaplinski.** 2006. The path forward for biofuels and biomaterials. *Science* **311**: 484-489.
- Ragsdale, S. W.** 2004. Life with carbon monoxide. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **39**:165-195.
- Ragsdale, S. W.** 2008. Enzymology of the Wood-Ljungdahl pathway of acetogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1125**: 129-136.

- Rainey, F. A., N. L. Ward, H. W. Morgan, R. Toalster und E. Stackebrandt.** 1993. Phylogenetic analysis of anaerobic thermophilic bacteria: aid for their reclassification. *J. Bacteriol.* **175**: 4772–4779.
- Rajagopalan, S., R. P. Datar und R. S. Lewis.** 2002. Formation of ethanol from carbon monoxide via a new microbial catalyst. *Biomass and Bioenergy* **23**: 487- 493.
- Rao, G., und R. Mutharasan.** 1986. Alcohol production by *Clostridium acetobutylicum* induced by methyl viologen. *Biotechnol. Lett.* **8**: 893-896.
- Rao, G., und R. Mutharasan.** 1987. Altered electron flow in continuous cultures of *Clostridium acetobutylicum* induced by viologen dyes. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 1232–1235.
- Redway, K. F., und S. P. Lapage.** 1974. Effect of carbohydrates and related compounds on the long-term preservation of freeze-dried bacteria. *Cryobiology* **11**: 73-79.
- Reed, W. M.** 1985. Production of organic acids by a continuous fermentation process. US Patent 4506012.
- Riesenfeld, C. S., P. D. Schloss und J. Handelsman.** 2004. Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annu. Rev. Genet.* **38**: 525-552.
- Rieu-Lesme, F., B. Morvan, M. D. Collins, G. Fonty und A. Willems.** 1996. A new H₂/CO₂-using acetogenic bacterium from the rumen: description of *Ruminococcus schinkii* sp. nov. *FEMS Microbiol. Lett.* **140**: 281-286.
- Rieu-Lesme, F., C. Dauga, G. Fonty und J. Dore.** 1998. Isolation from the rumen of a new acetogenic bacterium phylogenetically closely related to *Clostridium difficile*. *Anaerobe* **4**: 89-94.
- Rose, A. H.** 1961. Industrial microbiology. Butterworth & Co., London (UK): 160.
- Ross, D.** 1961. The acetone-butanol fermentation. *Prog. Ind. Microbiol.* **3**: 73-85.
- Sabathé, F. und P. Soucaille.** 2003. Characterization of the CipA scaffolding protein and in vivo production of a minicellulosome in *Clostridium acetobutylicum*. *J. Bacteriol.* **185**: 1092-1096.
- Sabathé, F., A. Bélaich und P. Soucaille.** 2002. Characterization of the cellulolytic complex (cellulosome) of *Clostridium acetobutylicum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **217**: 15-22.
- Saeki, K. und H. Kumagai.** 1998. The *rnf* gene products in *Rhodobacter capsulatus* play an essential role in nitrogen fixation during anaerobic DMSO-dependent growth in the dark. *Arch. Microbiol.* **169**: 464-467.
- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich und N. Arnheim** 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354.
- Sakharkar, K. R., M. K. Sakharkar, C. Verma und V. T. Chow.** 2005. Comparative study of overlapping genes in bacteria, with special reference to *Rickettsia prowazekii* and *Rickettsia conorii*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 1205-1209.
- Sambrook, J., und D. W. Russell** 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (USA).
- Sanger, F., S. Nickler und A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- Sauer, U., R. Fischer und P. Dürre.** 1993. Solvent formation and its regulation in strictly anaerobic bacteria. *Curr. Top. Mol. Genet.* **1**: 337-351.

- Savage, M. D., Z. Wu, S. L. Daniel, L. L. Lundie, Jr. und H. L. Drake.** 1987. Carbon monoxide-dependent chemolithotrophic growth of *Clostridium thermoautotrophicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 1902-1906.
- Schink, B.** 1984. *Clostridium magnum* sp. nov., a nonautotrophic homoacetogenic bacterium. *Arch. Microbiol.* **137**: 250-255.
- Schink, B., und M. Stieb.** 1983. Fermentative degradation of polyethylene glycol by a strictly anaerobic, Gram-negative, nonsporeforming bacterium, *Pelobacter venetianus* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 1905-1913.
- Schmehl, M., A. Jahn, A. Meyer zu Vilsendorf, S. Hennecke, B. Masepohl, M. Schuppler, M. Marxer, J. Oelze und W. Klipp.** 1993. Identification of a new class of nitrogen fixation genes in *Rhodobacter capsulatus*: a putative membrane complex involved in electron transport to nitrogenase. *Mol. Gen. Genet.* **241**: 602-615.
- Schmeisser, C., H. Steele und W. R. Streit.** 2007. Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **75**: 955-962.
- Schmitt, J., H. Hess und H. G. Stunnenberg.** 1993. Affinity purification of histidine-tagged proteins. *Mol. Biol. Reports* **18**: 223-230.
- Schuppert, B., und B. Schink.** 1990. Fermentation of methoxyacetate to glycolate and acetate by newly isolated strains of *Acetobacterium* sp. *Arch. Microbiol.* **153**: 200-204.
- Schwartz, R. D., und F. A. Keller, Jr.** 1982. Isolation of a strain of *Clostridium thermoaceticum* capable of growth and acetic acid production at pH 4.5. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**: 117-123.
- Schwarz, W. H.** 2001. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**: 634-649.
- Scott, P. T., und J. I. Rood.** 1989. Electroporation-mediated transformation of lysostaphin-treated *Clostridium perfringens*. *Gene* **82**: 327-333.
- Sebaihia, M., B. W. Wren, P. Mullany, N. F. Fairweather, N. Minton, R. Stabler, N. R. Thomson, A. P. Roberts, A. M. Cerdeño-Tárraga, H. Wang, M. T. G. Holden, A. Wright, C. Churcher, M. A. Quail, S. Baker, N. Bason, K. Brooks, T. Chillingworth, A. Cronin, P. Davis, L. Dowd, A. Fraser, T. Feltwell, Z. Hance, S. Holroyd, K. Jagels, S. Moule, K. Mungall, C. Price, E. Rabinowitsch, S. Sharp, M. Simmonds, K. Stevens, L. Unwin, S. Whithead, B. Dupuy, G. Dougan, B. Barrell und J. Parkhill.** 2006. The multidrug-resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly mobile, mosaic genome. *Nat. Gen.* **7**: 779-786.
- Seedorf, H., W. F. Fricke, B. Veith, H. Brüggemann, H. Liesegang, A. Strittmatter, M. Miethke, W. Buckel, J. Hinderberger, F. Li, C. Hagemeyer, R. K. Thauer und G. Gottschalk.** 2008. The genome of *Clostridium kluyveri*, a strict anaerobe with unique metabolic features. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**: 2128-2133.
- Shapir, N., G. Cheng, M. J. Sadowsky und L. P. Wackett.** 2006. Purification and characterization of TrzF: biuret hydrolysis by allophanate hydrolase supports growth. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 2491-2495.
- Sharak Genthner, B. R., C. L. Davis und M. P. Bryant.** 1981. Features of rumen and sewage sludge strains of *Eubacterium limosum*, a methanol- and H₂-CO₂-utilizing species. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**: 12-19.
- Sharak Genthner, B. R., und M. P. Bryant.** 1982. Growth of *Eubacterium limosum* with carbon monoxide as the energy source. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**: 70-74.

- Sharak Genthner, B. R., und M. P. Bryant.** 1987. Additional characteristics of one-carbon-compound utilization by *Eubacterium limosum* and *Acetobacterium woodii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 471-476.
- Shen, G.-J., J.-S. Shieh, A. J. Grethlein und M. K. Jain** 1999. Biochemical basis for carbon monoxide tolerance and butanol production by *Butyribacterium methylotrophicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**: 827-832.
- Shimazu, M., L. Vetcher, J. L. Galazzo, P. Licari und D. V. Santi.** 2004. A sensitive and robust method for quantification of intracellular short-chain coenzyme A esters. *Anal. Biochem.* **328**: 51-59.
- Simankova, M. V., O. R. Kotsyurbenko, E. Stackebrandt, N. A. Kostrikina, A. M. Lysenko, G. A. Osipov und A. N. Nozhevnikova.** 2000. *Acetobacterium tundrae* sp. nov., a new psychrophilic acetogenic bacterium from tundra soil. *Arch. Microbiol.* **174**: 440-447.
- Sleat, R., R. A. Mah und R. Robinson.** 1985. *Acetoanaerobium noterae* gen. nov., sp. nov.: an anaerobic bacterium that forms acetate from H₂ and CO₂. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **35**: 10-15.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson und D. C. Klenk.** 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**: 76-85. Erratum in: *Anal. Biochem.* **163**: 279.
- Sridhara, S., und T. T. Wu.** 1969. Purification and properties of lactaldehyde dehydrogenase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **244**:5233-5238.
- Stackebrandt, E., I. Kramer, J. Swiderski und H. Hippe.** 1999. Phylogenetic basis for a taxonomic dissection of the genus *Clostridium*. *FEMS Immun. Med. Microbiol.* **24**: 253-258.
- Staden, R., K. F. Beal und J. K. Bonfield.** 2000. The Staden package, 1998. *Methods Mol. Biol.* **132**: 115-130.
- Steen, E. J., R. Chan, N. Prasad, S. Myers, C. J. Petzold, A. Redding, M. Ouellet und J. D. Keasling.** 2008. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of n-butanol. *Microb. Cell Fact.* **7**: 36.
- Stim-Herndon, K. P., D. J. Petersen und G. N. Bennett.** 1995. Characterization of an acetyl-CoA C-acetyltransferase (thiolase) gene from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Gene* **154**: 81-85.
- Strätz, M., U. Sauer, A. Kuhn und P. Dürre.** 1994. Plasmid transfer into the homoacetogen *Acetobacterium woodii* by electroporation and conjugation. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1033-1037.
- Streit, W. R., R. Daniel und K.-E. Jaeger.** 2004. Prospecting for biocatalysts and drugs in the genomes of non-cultured microorganisms. *Curr. Opin. Biotechnol.* **15**: 285-290.
- Studier, F. W., A. H. Rosenberg, J. J. Dunn und J. W. Dubendorff.** 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **185**: 60-89.
- Sulzenbacher, G., K. Alvarez, R. H. van Den Heuvel, C. Versluis, S. Spinelli, V. Campanacci, C. Valencia, C. Cambillau, H. Eklund und M. Tegoni.** 2004. Crystal structure of *E. coli* alcohol dehydrogenase YqhD: evidence of a covalently modified NADP coenzyme. *J. Mol. Biol.* **342**: 489-502.
- Tanaka, K., und N. Pfennig.** 1988. Fermentation of 2-methoxyethanol by *Acetobacterium malicum* sp. nov. and *Pelobacter venetianus*. *Arch. Microbiol.* **149**: 181-187.
- Tanner, R. S., L. M. Miller und D. Yang.** 1993. *Clostridium ljungdahlii* sp. nov., an acetogenic species in clostridial rRNA homology group I. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**: 232-236.

- Tanner, R. S., und C. R. Woese.** 1994. A phylogenetic assessment of the acetogens. In: H. L. Drake (Hrsg.), *Acetogenesis*. Chapman & Hall, New York, NY (USA): 254-269.
- Tardif, C., H. Maamar, M. Balfin und J.-P. Bélaich.** 2001. Electrotransformation studies in *Clostridium cellulolyticum*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 271-274.
- Tartoff, K. D., und C. A. Hobbs** 1987. Improved media for growing plasmid and cosmid clones. *Bethesda Res. Lab. Focus* **9**: 12.
- Terracciano, J. S., und E. R. Kashket.** 1986. Intracellular conditions required for initiation of solvent production by *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 86-91.
- The United States Department of Energy.** 1992a. Biological production of ethanol from coal. Task 4 report: Continuous reactor studies. Technical report DOE/PC/89876-T17.
- The United States Department of Energy.** 1992b. Biological production of ethanol from coal. Task 5 report: Economic evaluation. Technical report DOE/PC/89876-T16.
- The United States Department of Energy.** 1993a. High pressure synthesis gas conversion. Task 2: Determination of maximum operating pressure. Topical report DOE/PC/91028-T1.
- The United States Department of Energy.** 1993b. High pressure synthesis gas conversion. Task 3: High pressure profiles. Topical report DOE/PC/91028-T6.
- The United States Department of Energy.** 1993c. High pressure synthesis gas conversion. Final report DOE/PC/91028-T5.
- The United States Department of Energy.** 1995. Bench-scale demonstration of biological production of ethanol from coal synthesis gas. Topical report DOE/PC/92118-T14.
- Thomas, P. S.** 1980. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 5201-5205.
- Thormann, K.** 2001. Untersuchungen zur Regulation des *sol*-Operons von *Clostridium acetobutylicum*. Dissertation, Universität Ulm.
- Thormann, K., L. Feustel, K. Lorenz, S. Nakotte und P. Dürre.** 2002. Control of butanol formation in *Clostridium acetobutylicum* by transcriptional activation. *J. Bacteriol.* **184**: 1966-1973.
- Tomas, C. A., N. E. Welker und 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. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 4951-4965.
- Toth, J., A. A. Ismaiel und J.-S. Chen.** 1999. The *ald* gene, encoding a coenzyme A-acylating aldehyde dehydrogenase, distinguishes *Clostridium beijerinckii* and two other solvent-producing clostridia from *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4973-4980.
- Tran-Betcke, A., B. Behrens, M. Noyer-Weidner und T. A. Trautner.** 1986. DNA methyltransferase genes of *Bacillus subtilis* phages: comparison of their nucleotide sequences. *Gene* **42**: 89-96.
- Traunecker, J., A. Preuß und G. Dieckert.** 1991. Isolation and characterization of a methyl chloride utilizing, strictly anaerobic bacterium. *Arch. Microbiol.* **156**: 416-421.
- Tsai, M. H., und M. H. Saier, Jr.** 1995. Phylogenetic characterization of the ubiquitous electron transfer flavoprotein families ETF- α and ETF- β . *Res. Microbiol.* **146**: 397-404.
- Tyurin, M. V., S. G. Desai und L. R. Lynd.** 2004. Electrotransformation of *Clostridium thermocellum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 883-890.

- Tyurin, M., R. Padda, K.-X. Huang, S. Wardwell, D. Caprette und G. N. Bennett.** 2000. Electrotransformation of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 using high-voltage radio frequency modulated square pulses. *J. Appl. Microbiol.* **88**: 220-227.
- van Rijssel, M., I. van der Veen und T. A. Hansen.** 1992. A lithotrophic *Clostridium* strain with extremely thermoresistant spores isolated from a pectin-limited continuous culture of *Clostridium thermosaccharolyticum* strain Haren. *FEMS Microbiol. Lett.* **192**: 171-176.
- Vega, J. L., K. T. Klasson, D. E. Kimmel, E. C. Clausen und J. L. Gaddy.** 1990. Sulfur gas tolerance and toxicity of CO-utilizing and methanogenic bacteria. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **24/25**: 329-340.
- Vega, J. L., S. Prieto, B. B. Elmore, E. C. Clausen und J. L. Gaddy.** 1989. Biological production of ethanol from synthesis gas. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **20/21**: 781-797.
- Vieira, J., und J. Messing.** 1982. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**: 259-268.
- Voget, C. E., C. F. Mignone und R. J. Ertola.** 1985. Butanol production from apple pomace. *Biotechnol. Lett.* **7**: 43-46.
- Vollherbst-Schneck, K., J. A. Sands und B. S. Montencourt** 1984. Effect of butanol on lipid composition and fluidity of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 193-194.
- von Kutepow, N., und H. Kindler.** 1960. Die Alkoholsynthese nach W. Reppe. *Angew. Chem.* **22**: 802-805.
- Wallace, D. M.** 1987. Precipitation of nucleic acids. *Methods Enzymol.* **152**: 41-48.
- Walter, K. A., G. N. Bennett und E. T. Papoutsakis.** 1992. Molecular characterization of two *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 butanol dehydrogenase isozyme genes. *J. Bacteriol.* **174**: 7149-7158.
- Walter, K. A., R. V. Nair, J. W. Cary, G. N. Bennett und E. T. Papoutsakis.** 1993. Sequence and arrangement of two genes of the butyrate-synthesis pathway of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Gene* **134**: 107-111.
- Waschkowitz, T.** 2006. Identifizierung und Charakterisierung von Genen und korrespondierenden Genprodukten aus Metagenombanken, die Butanol-Dehydrogenase-Aktivität oder proteolytische Aktivität vermitteln. Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen.
- Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier und D. J. Lane.** 1990. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173**: 697-703.
- Weiß, B., A. Jacquemin-Sablon, T. R. Live, G. C. Fareed und C. C. Richardson.** 1968. Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VI. Further purification and properties of polynucleotide ligase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T4. *J. Biol. Chem.* **243**: 4543-4555.
- Weißermel, K., und H.-J. Arpe.** 2003. Industrial organic chemistry, 4th edition. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Weizmann, C.** 1915. Improvements in the bacterial fermentation of carbohydrates and in bacterial cultures for the same. Britisches Patent 4845.

- Welch, R. W., F. B. Rudolph und E. T. Papoutsakis.** 1989. Purification and characterization of the NADH-dependent butanol dehydrogenase from *Clostridium acetobutylicum* (ATCC 824). *Arch. Biochem. Biophys.* **273**: 309-318.
- Wexler, M., P. L. Bond, D. J. Richardson und A. W. B. Johnston.** 2005. A wide host-range metagenomic library from a waste water treatment plant yields a novel alcohol/aldehyde dehydrogenase. *Environ. Microbiol.* **7**: 1917-1926.
- Wiegel, J., Braun, M. und Gottschalk, G.** 1981. *Clostridium thermoautotrophicum* species novum, a thermophile producing acetate from molecular hydrogen and carbon dioxide. *Curr. Microbiol.* **5**: 255-260.
- Wieringa, K. T.** 1936. Over het verdwijnen van waterstof en koolzuur onder anaerobe voorwaarden. *Ant. v. Leeuwenhoek* **3**: 263-273.
- Wiesenborn, D. P., F. B. Rudolph und E. T. Papoutsakis.** 1988. Thiolase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and its role in the synthesis of acids and solvents. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 2717-2722.
- Wilkins T. D., und S. Chalgren.** 1976. Medium for use in antibiotic susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **10**: 926-928.
- Winzer, K., K. Lorenz, B. Zickner und P. Dürre.** 2000. Differential regulation of two thiolase genes from *Clostridium acetobutylicum* DSM 792. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2**: 531-541.
- Wohlfarth, G., und G. Diekert.** 1991. Thermodynamics of methylenetetrahydrofolate reduction to methyltetrahydrofolate and its implications for the energy metabolism of homoacetogenic bacteria. *Arch. Microbiol.* **155**: 378-381.
- Wolin, E. A., M. J. Wolin und R. S. Wolfe.** 1963. Formation of methane by bacterial extracts. *J. Biol. Chem.* **238**: 2882-2886.
- Wood, H. G.** 1991. Life with CO or CO₂ and H₂ as a source of carbon and energy. *FASEB J.* **5**: 156-163. Erratum in: *FASEB J.* **5**: 2216.
- Yang, H. C., und H. L. Drake.** 1990. Differential effects of sodium on hydrogen- and glucose-dependent growth of the acetogenic bacterium *Acetogenium kivui*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 81-86.
- Yang, R.-T., und J.-S. Chen.** 1990. Coenzyme A-acylating aldehyde dehydrogenase from *Clostridium beijerinckii* NRRL B592. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2591-2599.
- Yanisch-Perron, C., J. Vieira und J. Messing.** 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.
- Younesi, H., G. Najafpour und A. R. Mohamed.** 2005. Ethanol and acetate production from synthesis gas via fermentation processes using anaerobic bacterium, *Clostridium ljungdahlii*. *Biochem. Bioeng. J.* **27**: 110-119.
- Younesi, H., G. Najafpour und A. R. Mohamed.** 2006. Liquid fuel production from synthesis gas via fermentation process in a continuous tank bioreactor (CSTBR) using *Clostridium ljungdahlii*. *Iranian J. Biotechnol.* **4**: 45-53.
- Youngleson, J. S., J. D. Santangelo, D. T. Jones und D. R. Woods.** 1988. Cloning and expression of a *Clostridium acetobutylicum* alcohol dehydrogenase gene in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 676-682.

- Youngleson, J. S., W. A. Jones, D. T. Jones und D. R. Woods.** 1989. Molecular analysis and nucleotide sequence of the *adh1* gene encoding an NADPH-dependent butanol dehydrogenase in the Gram-positive anaerobe *Clostridium acetobutylicum*. *Gene* **78**: 355-364.
- Yu, E. K. C., M. K.-H. Chan und J. N. Saddler.** 1985. Butanol production from cellulosic substrates by sequential co-culture of *Clostridium thermocellum* and *C. acetobutylicum*. *Biotechnol. Lett.* **7**: 509-514.
- Zavilgelsky, G. B., V. Y. Kotova, M. M. Mazhul' und I. V. Manukhov.** 2002. Role of Hsp70 (DnaK–DnaJ–GrpE) and Hsp100 (ClpA and ClpB) chaperones in refolding and increased thermal stability of bacterial luciferases in *Escherichia coli* cells. *Biochemistry (Moskau)* **67**: 986-992.
- Zeikus, J. G., L. H. Lynd, T. E. Thompson, J. A. Krzycki, P. J. Weimer und P. W. Hegge.** 1980. Isolation and characterization of a new, methylotrophic, acidogenic anaerobe, the Marburg strain. *Curr. Microbiol.* **3**: 381-386.
- Zhilina, T. N., und G. A. Zavarzin.** 1990. Extremely halophilic, methylotrophic, anaerobic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **87**: 315-322.
- Zhu, Y., X. Liu und S.-T. Yang.** 2005. Construction and characterization of *pta* gene-deleted mutant of *Clostridium tyrobutyricum* for enhanced butyric acid fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* **90**: 154-166.
- Ziętkiewicz, S., A. Lewandowska, P. Stocki und K. Liberek.** 2006. Hsp70 chaperone machine remodels protein aggregates at the initial step of Hsp70-Hsp100-dependent disaggregation. *J. Biol. Chem.* **281**: 7022-7029.
- Ziętkiewicz, S., J. Krzewska und K. Liberek.** 2004. Successive and synergistic action of the Hsp70 and Hsp100 chaperones in protein disaggregation. *J. Biol. Chem.* **279**: 44376-44383.
- Zillig, W., I. Holz, D. Janekovic, H.-P. Klenk, E. Imself, J. Trent, S. Wunderl, V. H. Forjaz, R. Coutinho, T. Ferreira.** 1990. *Hyperthermus butylicus*, a hyperthermophilic sulfur-reducing archaeobacterium that ferments peptides. *J. Bacteriol.* **172**: 3959-3965.
- Zoutberg, G. R., R. Willemsberg, G. Smit, M. J. Teixeira de Mattos und O. M. Neijssel.** 1989. Solvent production by an aggregate-forming variant of *Clostridium butyricum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**: 22-26.
- Zverlov, V. V., O. Berezina, G. A. Velikodvorskaya und W. H. Schwarz.** 2006. Bacterial acetone and butanol production by industrial fermentation in the Soviet Union: use of hydrolyzed agricultural waste for biorefinery. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **71**: 587-597.
- Zzaman, S., J. M. Reddy und D. Bastia.** 2004. The DnaK-DnaJ-GrpE chaperone system activates inert wild type π initiator protein of R6K into a form active in replication initiation. *J. Biol. Chem.* **279**: 50886-50894.

Danksagung

Danke.

Herrn Prof. Dr. Peter Dürre

-

Für die Überlassung des interessanten Themas und die Ermöglichung eines sehr eigenverantwortlichen und selbständigen wissenschaftlichen Arbeitens. Das stetige Interesse am Fortgang dieser Arbeit sowie die Ermunterung und Geduld in weniger erfolgreichen Phasen. Die Durchsicht und die Vorschläge zur Korrektur des Manuskripts.

Herrn Prof. Dr. Bernhard Eikmanns

-

Für die Übernahme des Koreferats dieser Arbeit.

Herrn PD Dr. Rolf Daniel

-

Für die Überlassung der Plasmide aus seinen Metagenombanken.

Herrn Prof. Dr. Uwe Völker und Dr. Anette Dreisbach

-

Für die massenspektrometrische Analyse der Proteinfraction.

Danke.

337-fachen Dank an **alle Laborkollegen** (die kamen und gingen):

Lothar, Christoph, Niki, Simone, Sonja, Bettina, Thiemo

und alle Praktikanten (insbesondere **Manu, Daniel, Michael L. und Katha**)

-

Für die einmalige Laboratmosphäre, ohne die der Laboralltag sicherlich nur halb so angenehm gewesen wäre!

Natürlich auch der **restliche Arbeitsgruppe** und dem **ganzen Institut**

-

Für das freundschaftliche Miteinander und die Hilfsbereitschaft
(insbesondere Gerd für die Hilfe mit der ÄKTA-Anlage)

Brigitte und Brigitte

-

Ihr habt mir im Labor vieles vereinfacht!

Speziellen Dank an **Steffi S.** (Knusperhase), **Simone** (Bunny) und **Sonja** (Hase)

-

Für das "Brainstorming" während der Hin- und Rückfahrt zur "Clostridium 10"-Tagung in Wageningen. Ohne Eure "Hilfe" wäre mein Material-Teil bestimmt nicht soooooo umfangreich ausgefallen ;) !

Danke.

All meinen **Freunden**

-

Für die nötige Abwechslung und den Ausgleich vom Laboralltag.

Meiner Mutter

-

Ohne Dich wäre ich nicht hier. Vielen Dank für Deine Unterstützung!

Meinem Vater

-

Hoffe Du wärst stolz auf mich.

Und zu guter Letzt:

Sandra

-

Für die "Starthilfe" bei dieser Arbeit und vieles, vieles mehr
(würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen)!

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet, sowie Zitate kenntlich gemacht habe.

Ulm, den

Michael Köpke