

**Produktion von Plattformchemikalien
auf Zucker- und CO₂-Basis
mit dem Knallgasbakterium *Cupriavidus necator* H16**

Zur Erlangung des akademischen Grades einer

DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

Carina Windhorst

1. Referent: Prof. Dr. Johannes Gescher

2. Referent: Prof. Dr. Tilman Lamparter

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Juli 2019



Dieses Werk ist lizenziert unter einer Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz (CC BY 4.0): <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe. Alle Ausführungen, die anderen Schriften wörtlich oder sinngemäß entnommen wurden, sind von mir durch die Angabe der Quelle kenntlich gemacht. Diese Arbeit ist in gleicher oder ähnlicher Fassung noch nicht Bestandteil einer Prüfungsleistung. Beim Anfertigen dieser Arbeit habe ich alle Regeln der „Satzung zur Sicherung der guter wissenschaftlicher Praxis am Karlsruher Institut für Technologie (KIT)“ von 2018 beachtet und die Primärdaten gemäß Abschnitt 1 § 3 am Institut für Angewandte Biowissenschaften – Abteilung Angewandte Biologie archiviert. Weiterhin versichere ich, dass die elektronische Form mit der schriftlichen Form dieser Arbeit übereinstimmt.

Die Experimente zur vorliegenden Arbeit wurden von August 2016 bis Mai 2019 am Institut für Angewandte Biowissenschaften der Fakultät für Chemie- und Biowissenschaften am Karlsruher Institut für Technologie unter der Leitung von Professor Johannes Gescher durchgeführt.

Karlsruhe, den

Carina Windhorst

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung	I
Inhaltsverzeichnis.....	II
Zusammenfassung.....	V
Abkürzungen.....	VII
Abkürzungen der Stämme	VIII
Liste der Abbildungen.....	IX
Liste der Formeln	XI
Liste der Tabellen	XII
1. Einleitung	1
1.1. Plattformchemikalien.....	1
1.1.1. Acetoin	2
1.1.2. 2,3-Butandiol	3
1.2. <i>Cupriavidus necator</i>	4
1.2.1. Taxonomie von <i>C. necator</i> H16	5
1.2.2. Metabolismus von <i>C. necator</i> H16	5
1.3. Verfügbarkeit von chemolithoautotrophen Gasen.....	9
1.3.1. H ₂ -Produktion aus Rohstoffen.....	9
1.3.2. Wasserspaltung zur H ₂ -Produktion	11
1.4. Zielsetzung.....	13
2. Material und Methoden	14
2.1. Material	14
2.1.1. Bakterienstämme	14
2.1.2. Plasmide	17
2.1.3. DNA-Fragmente.....	18
2.1.4. Oligonukleotide	18
2.1.5. Kits.....	21
2.1.6. Chemikalien und Enzyme	21

2.1.7.	Geräte.....	21
2.1.8.	Aufbau einer Elektrolyse-Zelle	22
2.2.	Methoden.....	27
2.2.1.	Mikrobiologische Methoden	27
2.2.2.	Molekularbiologische Methoden	31
2.2.3.	Analytische Methoden	42
2.2.4.	Berechnung der Ausbeuten.....	45
2.2.5.	Elektrochemische Methoden	46
3.	Ergebnisse	48
3.1.	Acetoin-Produktion mit <i>C. necator</i> H16	48
3.1.1.	Bestimmung der optimalen Induktorkonzentrationen	49
3.1.2.	Acetoin-Produktion ausgehend von drei verschiedenen Promotoren	51
3.2.	Einfluss der PHB-Synthasen.....	52
3.2.1.	Einfluss der PHB-Synthasen auf den Metabolismus.....	52
3.2.2.	Acetoin-Produktion in den PHB-Mutanten unter heterotrophen Bedingungen	55
3.2.3.	Acetoin-Produktion in den PHB-Mutanten unter autotrophen Bedingungen.....	63
3.3.	2,3-Butandiol-Produktion mit <i>C. necator</i> H16.....	71
3.4.	H ₂ -Produktion mithilfe einer Elektrolyse-Zelle.....	76
4.	Diskussion	81
4.1.	Einflüsse auf die Acetoin-Produktion	81
4.1.1.	Konstitutive Acetoin-Produktion auf Fructose-Basis	82
4.1.2.	Induzierbare Acetoin-Produktion auf Fructose-Basis.....	84
4.1.3.	H ₂ - und CO ₂ -basierte Acetoin-Produktion	85
4.1.4.	Einfluss der PHB-Synthasen auf die Acetoin-Produktion	87
4.1.5.	Acetoin-Produktion im Vergleich	87
4.2.	Produktion von 2,3-Butandiol	89
4.3.	Produktion von Chemikalien mithilfe von <i>C. necator</i>	93

5. Ausblick.....	98
5.1. Produktion von Chemikalien in <i>C. necator</i>	98
5.2. Weiterentwicklung der Elektrolyse-Zelle	99
6. Literaturverzeichnis	100
Anhang	i
Abbildungen im Anhang	i
Sequenzen im Anhang.....	iii
Tabelle im Anhang.....	vii
Wissenschaftliche Veröffentlichungen	xii

Zusammenfassung

Die Vorkommen der fossilen Energiereserven neigen sich dem Ende zu. Daher ist es notwendig, dass die Menschheit lernt alternative Energie- und Kohlenstoffquellen zu nutzen.

Insbesondere die chemische Industrie muss unabhängig von fossilen Rohstoffen werden, in dem Plattformchemikalien verwendet werden. Diese Plattformchemikalien sollen aus Biomasse hergestellt werden und dienen als Vorläufer für viele weitere Endprodukte der chemischen Industrie. Unter anderem wurden Acetoin und 2,3-Butandiol als Plattformchemikalien identifiziert. Nicht nur das weite Anwendungsspektrum sondern auch der prognostizierte steigende Umsatz lenken das Interesse auf diese beiden Chemikalien.

Für die Produktion von Acetoin und 2,3-Butandiol wurde das Knallgasbakterium *Cupriavidus necator* für diese Arbeit ausgewählt, da es sowohl als Modelorganismus für chemolithoautotrophes Wachstum gilt, als auch in der Industrie bereits als Produzent für Bioplastik (Polyhydroxybutyrat, PHB) eingesetzt wird. Nach der Deletion des *acoABC*-Operons, welches für den Acetoin-Metabolismus notwendig ist, wurden die Gene *alsSD* (Acetolactat-Synthase und Acetolactat-Decarboxylase) vom Plasmid aus exprimiert. Dafür wurden drei verschiedene Promotoren getestet: ein Arabinose-induzierbarer Promotor, ein Rhamnose-induzierbarer Promotor und ein konstitutiver Promotor, der nativ für die Produktion von PHB zuständig ist. Des Weiteren wurden die Gene für die beiden beschriebenen PHB-Synthasen *PhaC1* und *PhaC2* deletiert, um den Kohlenstofffluss in Richtung Acetoin-Produktion zu verschieben. Dabei hat sich herausgestellt, dass die zweite Synthase keinen direkten Einfluss auf die Produktion von PHB hatte.

Die Acetoin-Produktion dieser zwölf verschiedenen Stämme wurde unter heterotrophen und autotrophen Bedingungen untersucht. Bei der Kultivierung in Minimal-Medium mit Fructose als einzige Kohlenstoffquelle weist der Stamm mit der Deletion von *acoABC* und dem Rhamnose-induzierten Plasmid die höchste Acetoin-Ausbeute mit 69% auf. Mit nur fünf Prozentpunkten weniger erreichten die Stämme mit dem konstitutiven Promotor und den zusätzlichen Deletionen von *phaC2* und *phaC1_phaC2* eine Ausbeute von 64%. Ausgehend von Fructose als Kohlenstoffquelle wurde das theoretische Maximum der Ausbeute von 100% (mol Acetoin/mol Fructose) ermittelt. Bei der Kultivierung mit CO₂ hingegen liegt dieses Maximum der Ausbeute bei 25% (mol Acetoin/mol CO₂). Das Maximum von 25% erreichten zwei Stämme bei der Kultivierung mit H₂ (Elektronendonator), O₂ (Elektronenakzeptor) und CO₂ (Kohlenstoffquelle). Beide Stämme trugen die Deletion von *acoABC* und *phaC1* sowie das Plasmid mit dem Rhamnose-induzierten oder mit dem konstitutiven Promotor. Dabei war *phaC2* in dem Stamm mit dem konstitutiven Promotor zusätzlich deletiert. Der Stamm ohne diese zusätzliche Deletion von *phaC2* erreichte eine Ausbeute von 19%.

Neben der Acetoin-Produktion wurde ebenfalls die Produktion von 2,3-Butandiol getestet, dafür wurde in den Acetoin produzierenden Stämmen zusätzlich das Gen *budC* (2,3-Butandiol Dehydrogenase) exprimiert. In allen Versuchen wurden niedrigere Ausbeuten für die kombinierte Produktion gegenüber der reinen Acetoin-Produktion festgestellt. Die höchste 2,3-Butandiol-Ausbeute wurde unter heterotrophen Bedingungen (theoretisch maximale Ausbeute 100%) für den Stamm mit dem Rhamnose-induzierten Promotor am Ende des Versuches mit 48% berechnet, zu diesem Zeitpunkt wurden ebenfalls noch 10% Acetoin detektiert. Unter autotrophen Bedingungen (theoretisch maximale Ausbeute 25%) produzierte der Stamm mit dem konstitutiven Promotor 1% Acetoin und 7% 2,3-Butandiol.

Für die chemolithoautotrophe Produktion von Plattformchemikalien sind drei Gase (H_2 , O_2 und CO_2) notwendig. Sowohl O_2 als auch CO_2 sind dafür in unserer Luft ausreichend vorhanden. Da die H_2 -Konzentration von etwa 0,5 ppm in der Luft nicht ausreichend für lithotrophes Wachstum ist, ist eine externe Zugabe notwendig. H_2 kann über verschiedene Wege produziert werden. Um dabei die Freisetzung von CO und CO_2 zu verhindern, kann eine elektrolytische Spaltung von Wasser in H_2 und O_2 durchgeführt werden. Um die zusätzlich benötigte Spannung hinzuzufügen, wurde ein Potentiostat an eine Elektrolyse-Zelle angebracht. In dieser Arbeit wurde eine Elektrolyse-Zelle aus überwiegend handelsüblichen Materialien aufgebaut, die in einem Versuch über 14 d mit einer angelegten Spannung von -1 V vs. Ag/AgCl im Durchschnitt 0,75 A verbrauchte. Für diese Zeitspanne wurde eine Produktivität von $3,55 \text{ cm}^3 H_2/h$ berechnet.

Abkürzungen

Δ	Deletion
CBB-Zyklus	Calvin-Benson-Bassham-Zyklus
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
GC	Gaschromatographie
HPLC	high performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
OD ₆₀₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
PHA	Polyhydroxyalkanoat
PHB	Polyhydroxybutyrat
qRT-PCR	quantitative real-time PCR
SDS	sodium dodecyl sulphate (Natriumdodecylsulfat)
vs. Ag/AgCl	gegen Silber/Silberchlorid-Referenzelektrode
vs. SHE	versus standard hydrogen electrode (gegen Standardwasserstoffelektrode)

Abkürzungen der Stämme

$\Delta C1$ -...	<i>C. necator</i> H16_ΔacoABC_ΔphaC1_..., keine PHB-Produktion
$\Delta C2$ -...	<i>C. necator</i> H16_ΔacoABC_ΔphaC2_...
$\Delta C1$ - $\Delta C2$ -...	<i>C. necator</i> H16_ΔacoABC_ΔphaC1_ΔphaC2_..., keine PHB-Produktion
ara-Acetoin	<i>C. necator</i> H16_ΔacoABC_pKRara-alsSD, Acetoin-Gene hinter dem Arabinose-Promotor, nicht-induziert
Ara-Acetoin	<i>C. necator</i> H16_ΔacoABC_pKRara-alsSD, Acetoin-Gene hinter dem Arabinose-Promotor, induziert durch 1,5 mM Arabinose
rha-Acetoin	<i>C. necator</i> H16_ΔacoABC_pKRrha-alsSD, Acetoin-Gene hinter dem Rhamnose-Promotor, nicht-induziert
Rha-Acetoin	<i>C. necator</i> H16_ΔacoABC_pKRrha-alsSD, Acetoin-Gene hinter dem Rhamnose-Promotor, induziert durch 1 mM Rhamnose
phb-Acetoin	<i>C. necator</i> H16_ΔacoABC_pKRphb-alsSD, Acetoin-Gene hinter dem konstitutiven Promotor des <i>phaCAB</i> -Operons
ara-Butandiol	<i>C. necator</i> H16_ΔacoABC_pKRara-alsSD-budC, Acetoin-Gene und 2,3-Butandiol-Gen hinter dem Arabinose-Promotor, nicht-induziert
rha-Butandiol	<i>C. necator</i> H16_ΔacoABC_pKRrha-alsSD-budC, Acetoin-Gene und 2,3-Butandiol-Gen hinter dem Rhamnose-Promotor, nicht-induziert
phb-Butandiol	<i>C. necator</i> H16_ΔacoABC_pKRphb-alsSD-budC, Acetoin-Gene und 2,3-Butandiol-Gen hinter dem konstitutiven Promotor des <i>phaCAB</i> -Operons

Liste der Abbildungen

Abb. 1: Strukturformel von Acetoin.	2
Abb. 2: Produktion von Acetoin ausgehend von Pyruvat.	2
Abb. 3: Reduktion von Acetoin zu 2,3-Butandiol.	3
Abb. 4: Stereoisomere von 2,3-Butandiol.	4
Abb. 5: Metabolismus von <i>C. necator</i> H16 unter heterotrophen (A) und lithoautotrophen (B) Bedingungen.	6
Abb. 6: Produktion von PHB in <i>C. necator</i> H16.	8
Abb. 7: Abbau von PHB in <i>C. necator</i> H16.	9
Abb. 8: H ₂ -Produktion in einer Elektrolyse-Zelle.	12
Abb. 9: Glasdeckel für die Elektrolyse-Zelle.	24
Abb. 10: Aufbau der Elektrolyse-Zelle Version I.	25
Abb. 11: Aufbau der Elektrolyse-Zelle Version II.	26
Abb. 12: Schematische Aufsicht auf die verschiedenen Versionen der Elektrolyse-Zelle.	27
Abb. 13: Wachstum von <i>C. necator</i> H16 wt und der Deletionsmutante <i>C. necator</i> H16_Δ <i>acoABC</i>	48
Abb. 14: Bestimmung der optimalen Arabinose-Konzentration als Induktor für das Plasmid pKRara- <i>alsSD</i>	50
Abb. 15: Bestimmung der optimalen Rhamnose-Konzentration als Induktor für das Plasmid pKRrha- <i>alsSD</i>	51
Abb. 16: Acetoin-Produktion ausgehend von drei verschiedenen Promotoren.	52
Abb. 17: Einfluss der PHB-Synthasen auf das Wachstum.	53
Abb. 18: Nilrot-Emission der PHB-Mutanten.	54
Abb. 19: Fluoreszenz-Aufnahmen von DAPI- und Nilrot-gefärbten Zellen.	55
Abb. 20: Acetoin-Produktion ausgehend vom Arabinose-induzierbaren Promotor in den PHB-Mutanten.	56
Abb. 21: Acetoin-Produktion ausgehend vom Rhamnose-induzierbaren Promotor in den PHB-Mutanten.	58
Abb. 22: Acetoin-Produktion ausgehend vom konstitutiven <i>phb</i> -Promotor in den PHB-Mutanten.	59
Abb. 23: Wachstum nach 20 h der PHB-Mutanten mit und ohne Induktor.	60
Abb. 24: Analyse der mRNA Level in den Stämmen mit dem Plasmid pKRrha- <i>alsSD</i>	61
Abb. 25: Analyse der mRNA Level in den Stämmen mit dem Plasmid pKR <i>phb-alsSD</i>	62
Abb. 26: Boxplot zur Bestimmung der optimalen O ₂ -Konzentration.	64
Abb. 27: Acetoin-Produktion ausgehend vom Arabinose-induzierbaren Promotor in den PHB-Mutanten unter autotrophen Bedingungen.	66
Abb. 28: Acetoin-Produktion ausgehend vom Rhamnose-induzierbaren Promotor in den PHB-Mutanten unter autotrophen Bedingungen.	68
Abb. 29: Acetoin-Produktion ausgehend vom konstitutiven <i>phb</i> -Promotor in den PHB-Mutanten unter autotrophen Bedingungen.	70
Abb. 30: Acetoin-Produktion im Fermenter unter autotrophen Bedingungen.	71
Abb. 31: 2,3-Butandiol-Produktion unter heterotrophen Bedingungen.	73
Abb. 32: 2,3-Butandiol-Produktion unter autotrophen Bedingungen.	76
Abb. 33: Messungen der Elektrolyse-Zelle Version I mit allen Elektroden.	77

Abb. 34: Messungen der Elektrolyse-Zelle Version I mit reduzierter Elektrodenoberfläche.	78
Abb. 35: Verhalten der pH-Werte in der Elektrolyse-Zelle Version I.	79
Abb. 36: Messung der Elektrolyse-Zelle Version II.	79
Abb. 37: Messung des Stroms und der H ₂ -Produktion in der Elektrolyse-Zelle Version II.	80

Liste der Formeln

Formel 1: Berechnung der Wachstumsrate μ	45
Formel 2: Berechnung der Ausbeute unter heterotrophen Bedingungen.	45
Formel 3: Berechnung der Ausbeute unter autotrophen Bedingungen.	46

Liste der Tabellen

Tab. 1: Alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme.	14
Tab. 2: In dieser Arbeit verwendeten Plasmide.	17
Tab. 3: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide.	18
Tab. 4: Zusammensetzung des LB-Mediums.	28
Tab. 5: Zusammensetzung des Minimal-Mediums 81.	28
Tab. 6: Zusammensetzung der 10x Lösung B.	28
Tab. 7: Zusammensetzung des 25x Phosphat-Puffers.	28
Tab. 8: Zusammensetzung der 100x FeNH ₄ -Citrat-Lösung.....	29
Tab. 9: Zusammensetzung der 100x NaHCO ₃ -Lösung.	29
Tab. 10: Zusammensetzung der 200x Vitamin-Lösung.	29
Tab. 11: Zusammensetzung der Spurenelemente-Lösung SL-6.	29
Tab. 12: Zusätze für Medien.	30
Tab. 13: Verwendete Gasgemische und Gasdurchflüsse im Fermenter.	31
Tab. 14: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes mit der HiFi Polymerase.	32
Tab. 15: Zyklisches Protokoll für die Amplifikation von DNA mittels der HiFi Polymerase.	32
Tab. 16: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes mit dem MangoMix.	33
Tab. 17: Zyklisches Protokoll für die Amplifikation von DNA mittels des MangoMixes.	33
Tab. 18: Zusammensetzung eines Restriktionsansatzes.	34
Tab. 19: Zusammensetzung eines Dephosphorylierungsansatzes.	35
Tab. 20: Zusammensetzung des TAE-Puffers.	35
Tab. 21: Zusammensetzung des 6x DNA-Ladepuffers.	35
Tab. 22: Zusammensetzung der isothermalen <i>in vitro</i> Ligation nach Gibson et al. [82].	36
Tab. 23: Zusammensetzung des Gibson Master Mixes.	36
Tab. 24: Zusammensetzung des 5x isothermalen Reaktionspuffers.....	36
Tab. 25: Zusammensetzung des Lagerpuffers für die T5 Exonuklease.	37
Tab. 26: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für eine qRT-PCR.	39
Tab. 27: Zyklisches Protokoll für die Amplifikation von DNA mittels des SsoAdvanced universal SYBR Green Supermix.....	39
Tab. 28: Zusammensetzung der Bradfordreagenz.	40
Tab. 29: Zusammensetzung des 5x Laemmli-Puffers.	40
Tab. 30: Zusammensetzung des Laufpuffers.....	41
Tab. 31: Lösung für den Acetoin-Test nach Voges und Proskauer [87] und optimiert durch Barritt [88].	43
Tab. 32: Methode der GC.	44
Tab. 33: Zusammensetzung der PBS-Lösung.	44
Tab. 34: Medium für die Elektrolyse-Zelle.	46
Tab. 35: Zuordnung der unterschiedlichen Proteine in Kategorien.	63

Tab. 36: Acetoin-Ausbeuten unter heterotrophen und autotrophen Bedingungen.	84
Tab. 37: Vergleich von Acetoin-produzierenden Bakterien.	89
Tab. 38: Ausbeuten von der kombinierten Produktion von Acetoin (Ac) und 2,3-Butandiol (2,3-BD).	90
Tab. 39: Vergleich von 2,3-Butandiol-produzierenden Bakterien.	92
Tab. 40: Produktion von Chemikalien mit <i>C. necator</i>	94
Tab. 41: Vergleich der Elektrolyse-Zelle Version II zu alkalische Elektrolyse-Zelle (AEZ) und Protonenaustauschmembran-Elektrolyse-Zelle (PAMEZ).	97

1. Einleitung

Das Vorkommen fossiler Brennstoffe wie Erdöl, Erdgas und Kohle ist endlich. Den statistischen Berechnungen der Firma BP zufolge, reichen die Erdöl-Reserven für weitere 50 Jahre, Erdgas-Reserven für weitere 53 Jahre und die der Kohle für immerhin 134 Jahre [1]. Dies bedeutet, dass spätestens in einer Generation die Verwertung von erneuerbaren Ressourcen eine hohe Effizienz erreicht haben muss, um in der Lage zu sein, einen entscheidenden Anteil der Energieerzeugung zu übernehmen. Diese Berechnungen basieren allerdings auf dem Verbrauch von 2017, zu dem das Wachstum der Weltbevölkerung und die weitergehende Industrialisierung der meisten Länder hinzugerechnet werden muss. Allein eine steigende Nutzung erneuerbarer Energien, sowie die effizientere Verwendung endlicher Energieträger können diesen Zeitraum zusätzlich verlängern. Die Minimierung limitierter Rohstoffe ist ein essentieller Bestandteil einer nachhaltigen Energie-Politik. Die biotechnologische Produktion von Plattformchemikalien aus Biomasse bietet die Möglichkeit, erneuerbare Rohstoffe zu nutzen und einen wichtigen Beitrag zur Reduktion der Nutzung fossiler Energieträger bzw. Rohstoffe zu leisten.

1.1. Plattformchemikalien

Um bei der Herstellung von Produkten auf Erdöl und Erdgas verzichten zu können, muss eine Strategie zur Herstellung dieser Produkte entwickelt werden. Eine solche Strategie liegt in der Verwendung von Biomasse als regenerativer Energie- und Kohlenstoffquelle. Um nicht für jedes Endprodukt einen eigenen Weg aus Biomasse etablieren zu müssen, existiert die Strategie der Herstellung von Plattformchemikalien. Plattformchemikalien dienen als Zwischenprodukten, welche in großen Mengen effizient und kostensparend produziert werden können. Dabei kann sowohl der Weg über chemische Reaktionen als auch über Biokatalysatoren und Mikroorganismen eingeschlagen werden [2]. Diese Zwischenprodukte werden anschließend in bereits existierenden Produktionsstraßen zur Herstellung der gewünschten Endprodukte eingesetzt.

Das Ziel besteht darin, die gesamte chemische Industrie auf Basis von einigen wenigen Plattformchemikalien aufbauen zu können. Das Ergebnis einer Studie erbrachte bereits 1981 den Vorschlag, Ethanol, Isopropanol, n-Butanol und 2,3-Butandiol aus Biomasse herzustellen [3]. Dahingegen definierte 2004 die amerikanische Behörde für Energie (U.S. Department of Energy) 30 wertsteigernde Chemikalien für die Biomasse-basierte Herstellung, worunter Kohlenmonooxid, Glycerin, Acetoin, organische C₃/C₄/C₅-Säuren und Aminosäuren, wie Serin, Threonin, Prolin und Lysin fallen [4].

Aufgrund des steigenden Absatzmarktes und des breite Anwendungsspektrums konzentriert sich diese Arbeit auf die beiden Plattformchemikalien Acetoin und 2,3-Butandiol.

1.1.1. Acetoin

Acetoin (3-Hydroxy-2-butanon, Abb. 1) ist eine farblose Flüssigkeit mit einem butterähnlichen Geruch. Acetoin wird natürlicherweise von verschiedenen Bakterienarten, wie z. B. *Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *Lactococcus lactis* und *Serratia marcescens* produziert [5].

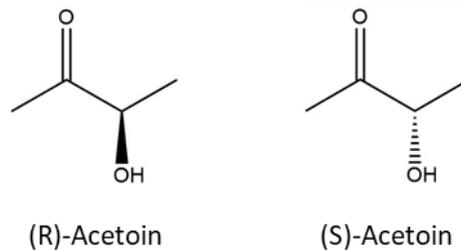


Abb. 1: Strukturformel von Acetoin. C3 ist ein stereogenes Zentrum, wodurch entweder (R)-Acetoin oder (S)-Acetoin entsteht.

Für die Produktion von Acetoin aus Pyruvat sind zwei Enzyme notwendig, die Acetolactat-Synthase (AlsS) und die Acetolactat-Decarboxylase (AlsD) (Abb. 2). Dabei werden zwei Moleküle Pyruvat zu einem Molekül Acetolactat - mit der einhergehenden Freisetzung von einem Molekül CO_2 - verbunden. Pyruvat ist ein zentrales Stoffwechsel-Intermediat und kann unter anderem durch den Abbau von Zuckern über die Glykolyse, den Entner-Doudoroff-Weg oder bei der Fixierung von CO_2 über den Calvin-Benson-Bassham-Zyklus (CBB-Zyklus) und die sich anschließende Glykolyse entstehen. Bei der anschließenden Umsetzung von Acetolactat zu Acetoin wird ein weiteres Molekül CO_2 freigesetzt. Die heterologe Expression der *alsSD* Gene führte bei Kultivierungen mit *Escherichia coli* in komplexen Medien (mit zusätzlicher Glucose) zu einer Acetoin-Produktion von 60 g/l [6].

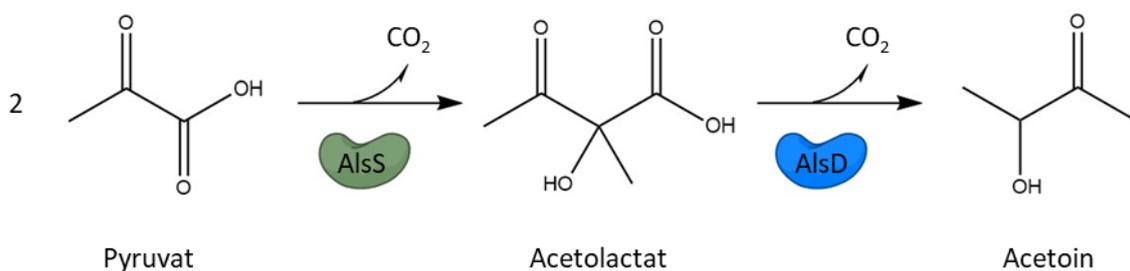


Abb. 2: Produktion von Acetoin ausgehend von Pyruvat. AlsS: Acetolactat-Synthase, AlsD: Acetolactat-Decarboxylase.

Acetoin hat ein großes Anwendungsspektrum, welches von Geschmacks- und Geruchsverstärkern in der Lebensmittel-, Kosmetik- und Zigarettenindustrie, über Schutz vor pathogenen Infektionen für Pflanzen bis zur Vorstufe für die Produktion von zyklischen Heteroaromaten und Butandiol-Derivaten

reicht [5]. Vor allem durch die Verwendung von Acetoin als Geschmacks- und Geruchszusatz konsumiert jede Person weltweit 2 bis 4 mg Acetoin pro Tag [7]. Dies resultiert in einem jährlichen Verbrauch von mehreren tausend Tonnen reinem Acetoin (5 bis 11 t/Jahr). Der gesamte Verbrauch soll bis 2023 jährlich um 5,79% steigen [8]. Aufgrund der steigenden Nachfrage und des breiten Anwendungsspektrums wurde Acetoin unter den 30 wichtigsten Plattformchemikalien eingegliedert [4] und stellt somit eine interessante Plattformchemikalie dar, die mithilfe von Mikroorganismen aus erneuerbaren Rohstoffen produziert werden kann.

1.1.2. 2,3-Butandiol

2,3-Butandiol, die reduzierte Form von Acetoin, ist eine leicht viskose, farblose Flüssigkeit. Die Produktion von 2,3-Butandiol ist in den ersten Schritten identisch zur Produktion von Acetoin. Daran schließt sich eine Reduktion durch eine allgemeine Alkohol-Dehydrogenase oder eine spezifische 2,3-Butandiol Dehydrogenase (BudC) an (Abb. 3). Natürliche Produzenten wie zum Beispiel *Klebsiella pneumoniae* [9, 10] und *Serratia marcescens* [11] zeigten eine 2,3-Butandiol-Produktion von bis zu 150 g/l ausgehend von Glucose bzw. Saccharose [12, 13].

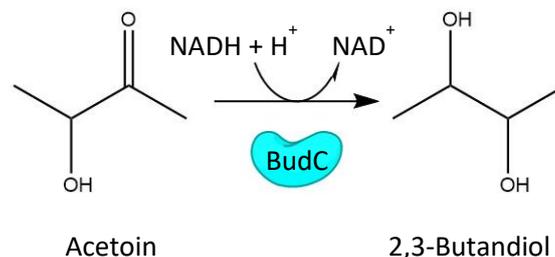


Abb. 3: Reduktion von Acetoin zu 2,3-Butandiol. Die Produktion zu Acetoin ausgehend von Pyruvat ist in Abb. 2 abgebildet. BudC: 2,3-Butandiol Dehydrogenase.

2,3-Butandiol gehört zu den Alkoholen mit zwei chiralen Zentren. Durch diese beiden Stereozentren an C2 und C3 kann 2,3-Butandiol drei Stereoisomere aufweisen: (R,R)-2,3-Butandiol, (S,S)-2,3-Butandiol und meso-2,3-Butandiol (Abb. 4). Diese Stereoisomere unterscheiden sich in ihrer Siedetemperatur (177°C bis 182°C) [14]. Die unterschiedlichen Stereoisomere werden durch selektive Enzyme synthetisiert. So produziert das Enzym BdhA von *B. subtilis* nur (R,R)-Isomere [15], wohingegen Bdh aus *Brevibacterium saccharolyticum* das (S,S)-Isomer [16] und BudC von *K. pneumoniae* das meso-Isomer produziert [17]. Allerdings stellen die natürlichen Produzenten meist ein Gemisch aus zwei Stereoisomeren her, wie z. B. *K. pneumoniae* (meso- und (S,S)-2,3-Butandiol) oder *B. amyloliquefaciens* (meso- und (R, R)-2,3-Butandiol) [18–20].

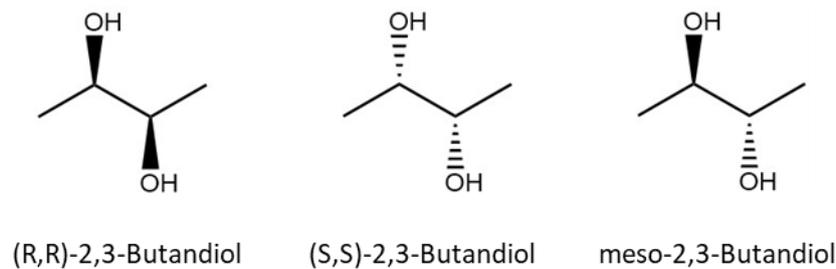


Abb. 4: Stereoisomere von 2,3-Butandiol.

2,3-Butandiol wurde bereits 1981 als wichtige Chemikalie eingestuft, die aus Biomasse hergestellt werden kann [3]. Neben der direkten Anwendung als Gefrierschutzmittel [21], dient es auch als Vorstufe für die Produktion von Methyl-Ethyl-Ketonen (Lösungsmittel) [22], von 2-Butanon (Zusatzstoff für Flüssigkraftstoffe) [23], von Acetoin und Diacetyl (Geschmacks- und Geruchszusatz) [24] und besonders von 2,3-Butadien als Monomer für Synthesekautschuk [25].

Laut einer Studie von NXTGEN Reports soll der jährliche Umsatz von 2,3-Butandiol bis 2023 um 94,6% steigen [26], dies unterstreicht die Bedeutung der Herstellung von 2,3-Butandiol mithilfe von Mikroorganismen aus erneuerbaren Rohstoffen.

1.2. *Cupriavidus necator*

Um ein möglichst großes Spektrum an Rohstoffen verwerten zu können, ist der Einsatz von Mikroorganismen und Biokatalysatoren ein klarer Vorteil gegenüber der chemischen Herstellung. Für die Verwendung von CO₂ als Rohstoff ist eine Fixierung von CO₂ durch Pflanzen oder Cyanobakterien notwendig. Allerdings sind diese Systeme lichtabhängig und haben damit einen Nachteil bzgl. des Oberfläche-Volumen-Verhältnisses. Dieser Nachteil kann mithilfe von lichtunabhängigen Bakterien, wie z. B. Knallgasbakterien, umgangen werden.

Ein bekannter Vertreter dieser Gruppe ist das Bakterium *Cupriavidus necator* H16. Dieses Gram-negative Bakterium wurde in der Umgebung von Göttingen, aufgrund seiner Eigenschaft unter autotrophen Bedingungen wachsen zu können, aus Schlammproben isoliert [27]. Das stäbchenförmige Bakterium ist peritrich begeißelt und weiß-cremefarbig [28]. Mit einer Gesamtgröße von 7,4 Mb [29] liegt das Genom von *C. necator* H16 deutlich über dem bakteriellen Mittelwert von 3,87 Mb [30]. Das Genom besteht aus drei DNA-Replikons: zwei Chromosomen und einem Megaplasmid. Das Chromosom 1 ist dabei das größte Replikon mit 4,1 Mb und weist einen GC-Gehalt von 66,4% auf, das zweite Chromosom hat einen etwas höheren GC-Gehalt von 66,7% und 2,9 Mb. Das Megaplasmid hingegen hat einen geringeren GC-Gehalt von 62,3% [31] und auch eine deutlich geringere Größe 0,45 Mb [29].

C. necator H16 ist vor allem für seine Fähigkeit Polyhydroxybutyrat (PHB) herzustellen bekannt. PHB gehört zu den Polyhydroxyalkanoaten (PHA), die wie Polypropylen und Polyethylen ein thermisch verformbares Plastikmaterial darstellen. Im Gegensatz zu konventionellen Plastikmaterialien sind PHA biologisch abbaubar. Zusätzlich ist dieses Bakterium dafür bekannt, dass es fakultativ chemolithoautotroph leben kann und unter diesen Bedingungen ebenfalls PHB herstellt.

1.2.1. Taxonomie von *C. necator* H16

Der isolierte Stamm H16 wurde ursprünglich der Gattung *Hydrogenomonas*, aufgrund seiner Fähigkeit H₂ zu oxidieren, zugeordnet [27].

Davis et al. beschäftigen sich ein paar Jahre später mit der Zuordnung von 56 Stämmen zu der Gattung *Hydrogenomonas*, da die Zuordnung aufgrund der Fähigkeit zur H₂-Oxidation nicht ausreichend sei. Aufgrund dessen wurde der Stamm der Art *Alcaligenes eutrophus* zugeordnet, welche nicht-pigmentierte und peritrich begeißelte Stämme zusammenfasst. [28]

Aufgrund neuer Analyse-Methoden wurden zwei *Burkholderia* Gattungen und die Art *A. eutrophus* zu der neuen Gattung *Ralstonia* zusammengefasst. Die neuen Analyse-Methoden fanden Ähnlichkeiten und Übereinstimmungen bzgl. dem Phänotyp, der Lipid- und Fettsäuren-Zusammensetzung, der 16S rDNA Sequenz und der rRNA-DNA Hybridisierungen. Seit 1995 wurde der Stamm *R. eutropha* genannt. [32]

Vanechoutte et al. belegten 2004 durch 16S rDNA Sequenzen, phänotypische Merkmale, wie die Begeißelung, Wachstum auf Glucose und Colistin, dass in der Gattung *Ralstonia* zwei verschiedene Linien zusammengefasst wurden. Daher wurde die *R. eutropha*-Linie in *Wautersia* gen. nov. umbenannt und *R. eutropha* H16 sollte von nun an *W. eutropha* H16 heißen. [33]

Im selben Jahr wurde die neu benannte Gattung *Wautersia* in *Cupriavidus* umbenannt, da *W. eutropha* ein Synonym für die von Makkar und Casida [34] benannte Art *C. necator* ist [35]. Diese Übereinstimmung wurde über DNA-DNA-Hybridisierungen, phänotypische Merkmale, GC-Gehalt der Genome und 16S rRNA nachgewiesen [35]. Laut den Regeln des International Code of Nomenclature of Bacteria hat die zuerst definierte Gattung Priorität [36], sodass *W. eutropha* H16 in *C. necator* H16 umbenannt wurde [35].

Bis heute zählt *C. necator* H16 zu den β -Proteobakterien und gehört der Familie Burkholderiaceae an.

1.2.2. Metabolismus von *C. necator* H16

Generell ist *C. necator* H16 in der Lage, mit der Ausnahme von Co-Enzym B₁₂, alle Co-Faktoren und Vitamine selbst herzustellen [31] und aromatische Verbindungen wie Benzoat und Phenol abzubauen

[37]. Des Weiteren kann *C. necator* H16 sowohl heterotroph als auch lithoautotroph leben (Abb. 5) und erreicht unter beiden Bedingungen hohe Zelldichten.

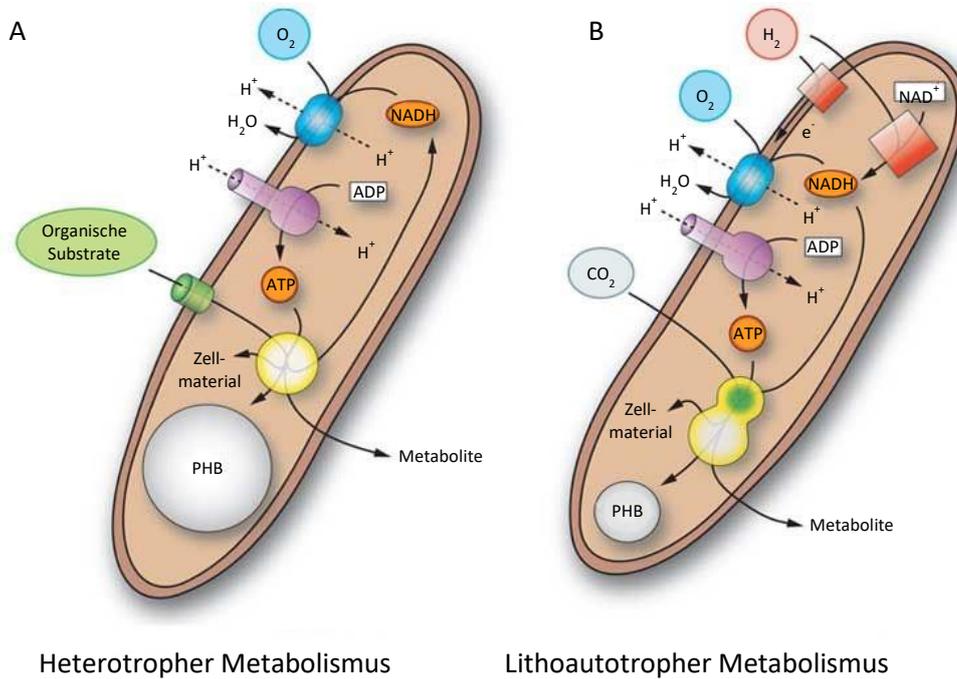


Abb. 5: Metabolismus von *C. necator* H16 unter heterotrophen (A) und lithoautotrophen (B) Bedingungen. Die gelben Kreise stellen den zentralen Metabolismus, der gelb/grüne Kreis stellt den Calvin-Benson-Bassham-Zyklus für die Fixierung von CO_2 dar (verändert nach [31]).

1.2.2.1. Heterotrophe Lebensweise

Als heterotrophe Kohlenstoff- und Energiequelle kann *C. necator* H16 eine Vielzahl an Substraten nutzen. Dazu gehören Öle [38, 39], Fettsäuren [40], organische Säure [27] und Aminosäuren [41]. Die Fähigkeit zur Zuckerverwertung ist allerdings auf Fructose, Gluconat und N-Acetylglucosamin beschränkt, eine Verwendung von Glucose, Arabinose und Rhamnose als Kohlenstoffquelle ist nicht möglich [41, 42]. Für die Verwertung von Glucose fehlt *C. necator* H16 ein Glucose-Transporter [31]. Trotz des fehlenden Schlüsselenzyms Phosphofruktokinase für die Glykolyse ist ein Wachstum auf Glucose möglich, wenn ein Glucose-Transporter exprimiert wird [31, 41, 43]. In diesem Fall wird Glucose über den phosphorylierten Entner-Doudoroff-Weg abgebaut, für diesen Weg konnten alle Gene im Genom nachgewiesen werden [31]. Dieser Abbauweg wird ebenfalls für die Verwertung von Fructose verwendet [41]. Die umgekehrte Reaktion zum Aufbau von Zuckermolekülen kann über die Gluconeogenese stattfinden, deren Gene ebenfalls vollständig im Genom von *C. necator* H16 vorhanden sind.

Aufgrund wechselnder O_2 -Konzentrationen in seinem natürlichen Habitat ist *C. necator* H16 in der Lage, zwischen aerober und anaerober Respiration zu wechseln. Allerdings ist es nicht dazu befähigt, zu gären [44]. Als Elektronenakzeptoren können O_2 , NO_3^- und NO_2^- verwendet werden [27, 29, 31, 45].

1.2.2.2. Autotrophe Lebensweise

Die Flexibilität in Bezug auf Elektronendonoren und Kohlenstoffquellen wird durch die Fähigkeit zu fakultativ chemolithoautotrophem Wachstum von *C. necator* noch erweitert. Dafür wird H_2 als Elektronendonator, O_2 als schon bekannter Elektronenakzeptor und CO_2 als neue Kohlenstoffquelle verwendet.

H_2 kann von zwei O_2 -toleranten Hydrogenasen oxidiert werden, eine Membran gebundene und eine lösliche Hydrogenase. Damit eine Oxidation von H_2 überhaupt möglich ist, müssen die Hydrogenasen zunächst exprimiert werden. Diese Expression wird von einer regulatorischen Hydrogenase gesteuert, wobei die Bindung von H_2 an das NiFe Cluster des Regulators über zwei weitere Proteine die Expression der Hydrogenasen induziert [46]. Die Membran-gebundene Hydrogenase ist in Richtung des periplasmatischen Raums gerichtet. Die bei der Oxidation entstehenden Elektronen werden über das *b*-Typ Cytochrom zur Atmungskette transportiert und somit die ATPase angetrieben [47]. Die lösliche Hydrogenase im Cytoplasma kann durch die Oxidation von H_2 zu Protonen NADH Äquivalente aufbauen, wobei auch die Rückreaktion zu H_2 unter NADH-Verbrauch stattfinden kann [47]. Alle Gene für diese drei Hydrogenasen befinden sich auf dem Megaplasmid [29]. Eine weitere O_2 -unempfindliche Hydrogenase wurde ebenfalls auf dem Megaplasmid gefunden [48]. Schäfer et al. [48] kamen zu dem Schluss, dass diese Hydrogenase kein Wachstum unter lithoautotrophen Bedingungen fördert, weiterhin wäre es möglich, dass dieses Enzym nicht in der Lage sei, die vollständige Funktionalität zu erreichen.

Die Fixierung von CO_2 als Kohlenstoffquelle findet über den Calvin-Benson-Bassham-Zyklus (CBB-Zyklus) statt [49]. Das Schlüsselenzym dieses Zyklus ist die Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RubisCO), die aus einem Molekül CO_2 und einem Molekül Ribulose-1,5-bisphosphat zwei Moleküle Phosphoglycerat synthetisiert. Ein großes Problem der RubisCO ist die Nebenreaktion mit O_2 anstelle von CO_2 durch die Oxygenase-Aktivität. Durch diese Aktivität entstehen ein Molekül Phosphoglycerat und ein Molekül 2-Phosphoglycolat, welches über Umwege weiter metabolisiert werden kann. Um die O_2 -Konzentration im Bereich der RubisCO möglichst gering zu halten, besitzt *C. necator* H16 vier Carboanhydrasen, die die RubisCO mit CO_2 versorgen [31, 50]. Dies wird vor allem bei niedrigen CO_2 -Konzentrationen relevant [51].

Die Gene für den CBB-Zyklus sind in dem Genom vom *C. necator* H16 sowohl auf dem Chromosom 2 als auch auf dem Megaplasmid zu finden [49]. Beide Operons werden von dem aktivierenden Regulator

CbbR auf Chromosom 2 gesteuert [29], wobei dieser bei einer Phosphoenolpyruvat-Konzentration ab 0,2 mM auch als Inhibitor fungieren kann [49, 52].

1.2.2.3. Produktion von Polyhydroxybutyrat

Die Produktion von PHB ist nicht alleine Bakterien vorbehalten [53, 54], sondern findet auch in eukaryotischen Zellen statt [55–57]. PHB gehört zu der großen Klasse der PHA, die den Bakterien natürlicherweise als Kohlenstoff- und Energiereserve dienen. Durch den Einbau diverser Hydroxycarbonsäuren können sowohl thermoplastische als auch elastomere Materialien mit Schmelztemperaturen zwischen 40 und 180°C entstehen. Der bekannteste Vertreter der PHA ist wohl PHB, dieses wird aus Hydroxybutyrat-Einheiten aufgebaut. PHB ist vergleichbar zu Polypropylen, allerdings ist PHB härter und spröder, diese Eigenschaften können durch den Einbau von anderen Hydroxycarbonsäuren ausgeglichen werden [58, 59]. Je nach Zusammensetzung der PHAs ist es denkbar, dass Polypropylen und andere konventionelle Kunststoffe durch PHAs vollständig ersetzt werden. Der Vorteil besteht nicht nur darin, dass PHAs biologisch abbaubar sind, sondern auch darin, dass sie ebenfalls biologisch hergestellt werden können und dafür auf die Verwendung von endlichen Rohstoffen wie Erdöl verzichtet werden kann. Die industrielle Produktion von PHA findet bereits seit den 1980er Jahren statt [60].

Der wahrscheinlich bekannteste Produzent von PHB ist *C. necator* H16. Bis zu 87% der Zelltrockenmassen können bei diesem Organismus aus PHB bestehen [61]. Für die PHB-Produktion werden zwei Moleküle Acetyl-CoA durch eine β -Ketothiolase zu einem Molekül Acetoacetyl-CoA unter Abspaltung eines CoA-Restes kondensiert (Abb. 6). Die Reduktion zu 3-Hydroxybutyryl-CoA findet durch eine NADPH-abhängige Acetoacetyl-CoA Reduktase statt. Die anschließende Polymerisation erfolgt durch die PHB Synthase. Die Gene für diese drei Enzyme sind in dem Operon *phaCAB* (PhaC1: PHB Synthase, PhaA: β -Ketothiolase, PhaB: Acetoacetyl-CoA Reduktase) angeordnet [31]. Der Promotor des *phaCAB* Operons wird als konstitutiver Promotor mit einer mittleren Expressionsstärke beschrieben [62, 63], wobei die Produktion von PHB bei wachstumslimitierenden Nährstoffen (z. B. Stickstoff-Mangel) und einem Überschuss der Kohlenstoffquelle gesteigert werden kann [54, 64, 65]. Neben diesen drei Enzymen wurde für jedes Enzym weitere Isoenzyme gefunden: Für PhaA gibt es 37 und für PhaB 15 Isoenzyme. Für PhaC wurde ein weiteres Isoenzym (PhaC2) entdeckt [31].

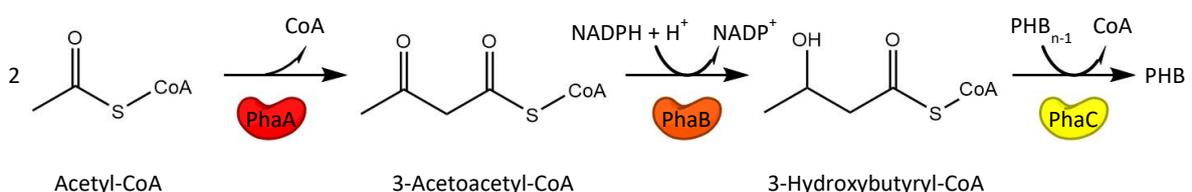


Abb. 6: Produktion von PHB in *C. necator* H16. PhaA: β -Ketothiolase, PhaB: Acetoacetyl-CoA Reduktase, PhaC: PHB Synthase.

Für die Bildung der wasserunlöslichen PHB-Granula werden Phasin Proteine benötigt, die sowohl die Größe, als auch die Anzahl der Granula regulieren [29, 31]. Für die Wiederverwendung der Kohlenstoffquelle wird PHB mittels Depolymerasen in Crotonyl-CoA gespalten. Insgesamt wurden sieben solcher Depolymerasen (PhaZ1 bis PhaZ7) gefunden [31, 66, 67] (Abb. 7). Crotonyl-CoA wird anschließend über die β -Oxidation in zwei Acetyl-CoA umgewandelt, womit sich der Kreislauf zur Speicherung von Kohlenstoff in PHB schließt [67].

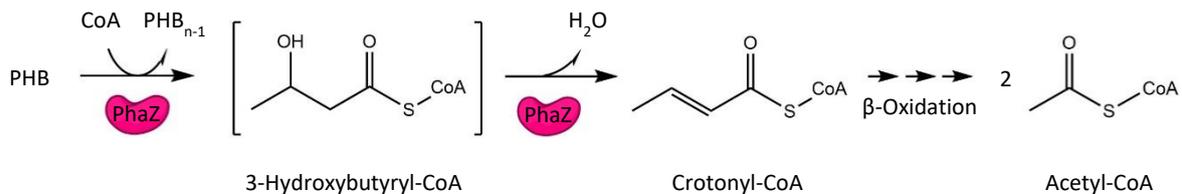


Abb. 7: Abbau von PHB in *C. necator* H16. Das Intermediat 3-Hydroxybutyryl-CoA wird wahrscheinlich nicht aus dem Enzym PhaZ freigelassen. PhaZ: PHB Depolymerase (verändert nach [67]).

1.3. Verfügbarkeit von chemolithoautotrophen Gasen

Um bei der biotechnologischen Produktion von diversen Chemikalien nicht mit den knappen Nahrungsmittelressourcen zu konkurrieren, besteht die Möglichkeit, diese Chemikalien unter lithoautotrophen Bedingungen herzustellen. Dafür werden die drei Gase CO₂, O₂ und H₂ benötigt.

CO₂ entsteht bei der Verbrennung von Kohlenstoff-Verbindungen mit ausreichend O₂. Dies passiert sowohl bei der Zellatmung als auch bei der aktiven Verbrennung von Holz, Kohle, Erdgas und -öl.

O₂ entsteht überwiegend bei der Photosynthese durch Pflanzen. Mit einem Gehalt von etwa 21% in der Luft ist genügend O₂ für die biologische Knallgasreaktion vorhanden.

H₂ ist zwar das häufigste Element der Erde, kommt aber in elementarer Form nur in Spuren in vulkanischen Gasen, zuweilen in Erdgas und in unserer Atmosphäre mit etwa 0,5 ppm vor [68]. H₂ ist von großer Bedeutung, da diese Verbindung einen hohen Energiegehalt aufweist und bei dessen Verbrennung kein CO oder CO₂ frei wird. Somit ist H₂ ein guter Energiespeicher.

Bei der Herstellung von H₂ wird zwischen zwei Substratgruppen unterschieden: In der ersten Gruppe werden alle Kohlenstoff-Verbindungen und ähnliche Verbindungen zur H₂-Produktion verwendet und in der zweiten Gruppe wird aus Wasser H₂ produziert.

1.3.1. H₂-Produktion aus Rohstoffen

Für die Generierung von H₂ aus Kohlenstoff-Verbindungen können verschiedene Verfahren genutzt werden [69]. Das wirtschaftlichste und am weitesten verbreitete Verfahren ist die

Dampfreformierung¹. Bei diesem Verfahren werden die diversen Kohlenstoff-Verbindungen unter Zugabe von Wasserdampf in CH_4 , H_2 , CO und CO_2 aufgespalten [70]. Je nach Ausgangssubstrat müssen Schwefel- und Halogenverbindungen entfernt werden [71], um anschließend eine Methanumsetzung mit Wasserdampf zu CO_2 und H_2 durchzuführen [70].

Eine weitere Methode ist die partielle Oxidation, bei diesem Verfahren werden vor allem Erdgas und schwere Kohlenwasserstoffe in einem exothermen Prozess unter O_2 -Mangel zu H_2 und CO umgesetzt [70].

Bei der autothermen Reformierung wird die Dampfreformierung mit der partiellen Oxidation gekoppelt, um sowohl die höheren H_2 -Konzentrationen als auch die Bereitstellung der Wärme durch die exotherme Reaktion durch eine genaue Dosierung der Luft und Wasserdampfungabe zu kombinieren [71].

Bei all diesen Verfahren findet im Anschluss eine Gasaufbereitung statt. Wenn das Produkt noch Anteile von CO hat, kann die H_2 -Ausbeute durch die Umsetzung von CO mit Wasserdampf zu CO_2 und H_2 gesteigert werden. Anschließend werden CO , CO_2 und CH_4 durch spezielle Reinigungsverfahren bis auf wenige ppm entfernt [70].

1.3.1.1. H_2 -Produktion aus Biomasse

Im Gegensatz zu anderen Rohstoffen besteht Biomasse hauptsächlich aus Kohlenhydraten, diese können ebenfalls mit allen oben genannten Methoden zu H_2 umgesetzt werden, wobei auf die Zufuhr von O_2 fast vollständig verzichtet werden kann, da Biomasse einen hohen O_2 -Anteil hat.

Aufgrund der einheitlicheren Struktur gibt es noch weitere Methoden für die Produktion von H_2 aus Biomasse, wie die kombinierte Pyrolyse-Dampfreformierung. Bei der Pyrolyse entstehen vor allem Primärgase, Koks und Methanol, welche anschließend mithilfe der Dampfreformierung in H_2 , CH_4 , CO und CO_2 umgesetzt werden.

Eine weitere Methode der Biomasseverwendung besteht darin, anaerobe Mikroorganismen zur H_2 -Produktion einzusetzen. Dafür werden die Photosysteme von Cyanobakterien genutzt, durch die Verwendung eines Hydrogenase-Photosystem-Komplexes kann die Produktivität von H_2 erhöht werden [72].

¹ https://www.linde-engineering.com/de/process_plants/hydrogen_and_synthesis_gas_plants/gas_generation/steam_reforming/index.html

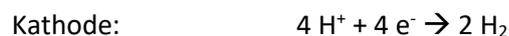
Bei all diesen Verfahren werden Kohlenstoff-Verbindungen zur H₂-Produktion gespaltet und einhergehend werden CO und CO₂ freigesetzt. Um diese Freisetzung zu vermeiden, kann auch H₂O in H₂ und O₂ gespaltet werden.

1.3.2. Wasserspaltung zur H₂-Produktion

Es existieren unterschiedliche Verfahren für die Wasserspaltung. Bei einer thermischen Dissoziation zerfällt Wasserdampf in H₂ und O₂, bei einer Temperatur von etwa 3000°C stehen Wasserdampf und H₂ in einem äquivalenten Gleichgewicht. Durch die Zugabe von z. B. Metalloxiden kann diese Temperatur auf unter 1200°C gesenkt werden, in dem das Metalloxid zunächst mit einer sehr hohen Temperatur behandelt wird, dabei spaltet sich O₂ ab. Dieses entstehende Metall reagiert anschließend bei niedrigeren Temperaturen mit H₂O, wodurch das Metalloxid wieder entsteht und H₂ erzeugt wird. Diese Methode wird thermochemisches Verfahren genannt. [71]

Weiterhin gibt es Verfahren zur Spaltung von H₂O durch Photonen, diese können entweder direkt oder durch die Photosysteme von Mikroorganismen genutzt werden, wobei die Energie nicht zum Biomasseaufbau dienen soll, sondern zur Spaltung von H₂O [69, 71].

Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung von elektrischem Strom, um die H₂O Spaltung als auch die Produktion von H₂ zu unterstützen (Abb. 8). Dafür wird ein Gefäß mit Wasser und einem leitfähigen Elektrolyt gefüllt und mit zwei Elektroden ausgestattet. Wird ein Potential zwischen den beiden Elektroden aufgebaut, kann die Spaltung von H₂O zu H₂ und O₂ stattfinden. Folgende Reaktionen finden dabei an der Anode und an der Kathode statt:



Je nach verwendeter Energie- oder Stromquelle kann auf die Freisetzung von CO und CO₂ bei der Wasserspaltung vollständig verzichtet werden.

Um den benötigten Strom zu reduzieren, gibt es die Möglichkeit mit Chemikalien oder mit exoelektrogenen Bakterien zu arbeiten. Dabei können diese Bakterien genutzt werden um z. B. Abwasser aufzubereiten, in dem sie die enthaltenen Kohlenstoff-Verbindungen zu CO₂ metabolisieren. Dabei werden Elektronen und Protonen abgeben. Die Elektronen wandern aufgrund der Potentialdifferenz zur Kathode und reagieren dort mit den diffundierenden Protonen zusammen zu H₂. Klassische Elektrolyse-Zellen werden mit einer Spannung von mindestens 2,1 V vs. SHE betrieben, bei

sogenannten mikrobiellen Elektrolyse-Zellen werden häufig Spannungen zwischen 0,2 und 0,8 V vs. SHE verwendet, dies entspricht einer Reduktion der Strommenge von 61 bis 82% [73].

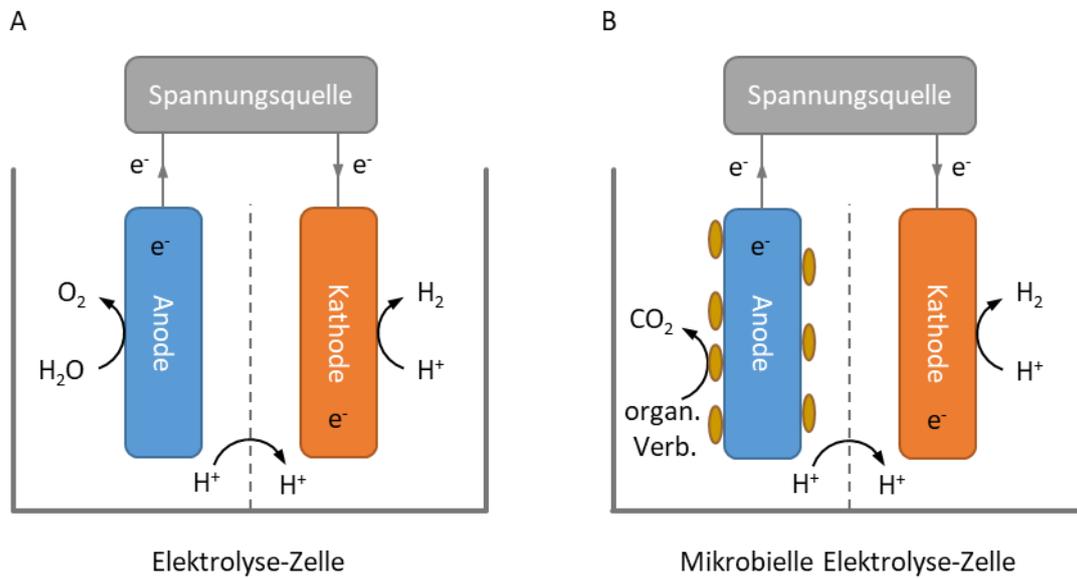


Abb. 8: H₂-Produktion in einer Elektrolyse-Zelle. Das klassische Modell (A) und der Einsatz von Mikroorganismen (braune Ellipse) (B) werden gezeigt. Die gestrichelte Linie zwischen den beiden Elektroden stellt die Protonenaustausch-Membran da, die Protonen können auch ohne diese Membran zur Kathode diffundieren, in diesem Fall ist eine Trennung der Reaktionsräume nicht mehr möglich. organ. Verb. steht für organische Verbindungen.

1.4. Zielsetzung

In dieser Arbeit soll gezeigt werden, dass es möglich ist, mithilfe von drei Gasen Plattformchemikalien herzustellen. Dafür sollten H_2 als Elektronendonator, O_2 als sein Antagonist mit der Funktion des Elektronenakzeptors und CO_2 als Kohlenstoffquelle verwendet werden. Als Modellorganismus für die Verwendung dieser drei Gase wurde *C. necator* H16 als Produzent ausgewählt. Um die Produktpanspannbreite von diesem sogenannten Knallgasbakterium zu erweitern, sollte die genetische Information angepasst werden und zu diesem Zweck ein genetisches System im Labor von Prof. Dr. Johannes Gescher etabliert werden.

Mithilfe dieses Systems sollten die Gene *alsSD* für die Acetoin-Produktion und das zusätzliche Gen *budC* für die anschließende Reduktion zu 2,3-Butandiol von Plasmiden aus exprimiert werden. Für die Überexpression von Genen werden klassischerweise induzierbare Promotorsysteme verwendet, zusätzlich sollte in dieser Arbeit ein nativer Promotor von *C. necator* getestet werden. Dieser native Promotor exprimiert normalerweise die Gene für die Polyhydroxybutyrat-Produktion und wurde als konstitutiver Promotor beschrieben [62, 63].

Da die Polyhydroxybutyrat-Produktion einen großen Einfluss auf die Nutzung von Energie- und Kohlenstoffquellen haben kann, sollte der Einfluss dieser Produktion auf die Herstellung der Plattformchemikalien Acetoin und 2,3-Butandiol untersucht werden. Dafür sollten die zwei beschriebenen PHB-Synthasen deletiert und deren Einfluss unter zwei Wachstumsbedingungen beobachtet werden: Unter heterotrophen Bedingungen sollte den Mutanten Fructose als Elektronen- und Kohlenstoffquelle und O_2 als Elektronenakzeptor zur Verfügung gestellt werden. Für die zweite Bedingung sollten die Bakterienstämme keine organischen Kohlenstoffquellen bekommen, sondern deren Verhalten unter chemolithoautotrophen Bedingungen analysiert werden.

Des Weiteren war es Ziel dieser Arbeit, eine Elektrolyse-Zelle zu konstruieren. Dabei wurde auf die Verwendung von handelsüblichem Material und auch auf die Ausbaufähigkeit zu einer mikrobiellen Elektrolyse geachtet. Die H_2 -Produktivität sollte mithilfe einer Gaschromatographie analysiert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Bakterienstämme

In dieser Arbeit wurden die in Tab. 1 aufgeführten Bakterienstämme verwendet.

Tab. 1: Alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme. Diese Stämme sind mit der Nummer der Stammsammlung der Arbeitsgruppe Gescher, Bezeichnung, relevanten Genotyp und der Quelle aufgeführt. In der Spalte „relevanter Genotyp“ verweisen die Nummern JG XX auf den Genotyp mit der entsprechenden Stammmnummer. Die Stämme mit einem Asterisk (*) wurden bereits in der Publikation von Windhorst und Gescher [74] aufgeführt.

Nummer	Bezeichnung (in dieser Arbeit)	relevanter Genotyp	Quelle
JG 22	<i>E. coli</i> DH5 α ZI	<i>aci q</i> , PN25- <i>tetR</i> , <i>spR</i> , <i>deoR</i> , <i>supE44</i> , Δ (<i>lacZYAargFV169</i>), Phi80, <i>lacZDM15</i>	[75]
JG 23	<i>E. coli</i> S-17_pMQ150	<i>km^R</i> , R6K, <i>sacB</i>	[76]
JG 98	<i>E. coli</i> WM3064	<i>thrB1004</i> , <i>pro</i> , <i>thi</i> , <i>rpsL</i> , <i>hdsS</i> , <i>lacZ</i> , Δ M15RP4–1360, Δ (<i>araBAD</i>)567, Δ <i>dapA1341::[erm pir(wt)]</i>	W. Metcalf, Universität Illinois
JG 310	<i>E. coli</i> K12_pBAD- <i>prpE-adhE2</i>	<i>km^R</i> , <i>araC</i> , P _{ara}	Annemarie Schmidt
JG 1070	<i>C. necator</i> H16	<i>acoABC</i>	DSM 428, [27]
JG 1075	<i>E. coli</i> NB_pT7- <i>budC</i>	<i>amp^R</i> , <i>budC</i>	diese Arbeit
JG 1079	<i>E. coli</i> NB_pT7- <i>alsSD</i> II	<i>amp^R</i> , <i>alsSD</i> ₉₀₁₋₂₅₄₅	diese Arbeit *
JG 1085	<i>E. coli</i> DH5 α _pMAT- <i>alsSD</i> I	<i>amp^R</i> , <i>alsSD</i> ₁₋₉₅₀	diese Arbeit *
JG 1141	<i>E. coli</i> WM3064_pMQ150- Δ <i>acoABC</i>	JG 98, <i>km^R</i> , R6K, <i>sacB</i> , 500 bp upstream <i>acoABC</i> + <i>XhoI</i> + 500 bp downstream <i>acoABC</i>	diese Arbeit *
JG 1142	<i>C. necator</i> H16_ Δ <i>acoABC</i>	Δ <i>acoABC</i>	diese Arbeit *
JG 1163	<i>E. coli</i> DH5 α _pKRrha-eGFP	JG 22, <i>tc^R</i> , <i>mob</i> , RSF1010 ori, <i>par</i> , <i>rhaR</i> , <i>rhaS</i> , P _{rha} -eGFP	[77]
JG 1201	<i>E. coli</i> WM3064_pKRrha- <i>alsSD</i>	JG 98, <i>tc^R</i> , <i>mob</i> , RSF1010 ori, <i>par</i> , <i>rhaR</i> , <i>rhaS</i> , P _{rha} - <i>alsSD</i>	diese Arbeit *

JG 1202	<i>E. coli</i> WM3064_pKRrha-alsSD-budC	JG 98, <i>tc^R</i> , <i>mob</i> , RSF1010 ori, <i>par</i> , <i>rhaR</i> , <i>rhaS</i> , P _{rha-alsSD} - <i>budC</i>	diese Arbeit
JG 1205	<i>C. necator</i> H16_ΔacoABC_pKRrha-alsSD (rha-Acetoin)	ΔacoABC, <i>tc^R</i> , <i>mob</i> , RSF1010 ori, <i>par</i> , <i>rhaR</i> , <i>rhaS</i> , P _{rha-alsSD}	diese Arbeit *
JG 1206	<i>C. necator</i> H16_ΔacoABC_pKRrha-alsSD-budC (rha-Butandiol)	ΔacoABC, <i>tc^R</i> , <i>mob</i> , RSF1010 ori, <i>par</i> , <i>rhaR</i> , <i>rhaS</i> , P _{rha-alsSD-budC}	diese Arbeit
JG 1214	<i>E. coli</i> WM3064_pMQ150-ΔphaC1	JG 98, <i>km^R</i> , R6K, <i>sacB</i> , 500 bp upstream <i>phaC1</i> + <i>XhoI</i> + 500 bp downstream <i>phaC1</i>	diese Arbeit *
JG 1215	<i>E. coli</i> WM3064_pMQ150-ΔphaC2	JG 98, <i>km^R</i> , R6K, <i>sacB</i> , 500 bp upstream <i>phaC2</i> + <i>EcoRI</i> + 500 bp downstream <i>phaC2</i>	diese Arbeit *
JG 1216	<i>E. coli</i> WM3064_pKRara-alsSD	JG 98, <i>tc^R</i> , <i>mob</i> , RSF1010 ori, <i>par</i> , <i>araC</i> , P _{ara-alsSD}	diese Arbeit *
JG 1217	<i>C. necator</i> H16_ΔphaC2	ΔphaC2	diese Arbeit
JG 1218	<i>C. necator</i> H16_ΔacoABC_pKRara-alsSD (ara-Acetoin)	ΔacoABC, <i>tc^R</i> , <i>mob</i> , RSF1010 ori, <i>par</i> , <i>araC</i> , P _{ara-alsSD}	diese Arbeit *
JG 1226	<i>E. coli</i> WM3064_pKRphb-alsSD	JG 98, <i>tc^R</i> , <i>mob</i> , RSF1010 ori, <i>par</i> , P _{phb-alsSD}	diese Arbeit *
JG 1227	<i>C. necator</i> H16_ΔacoABC_ΔphaC2	ΔacoABC, ΔphaC2	diese Arbeit *
JG 1228	<i>C. necator</i> H16_ΔacoABC_ΔphaC1	ΔacoABC, ΔphaC1	diese Arbeit *
JG 1229	<i>C. necator</i> H16_ΔacoABC_pKRphb-alsSD (phb-Acetoin)	ΔacoABC, <i>tc^R</i> , <i>mob</i> , RSF1010 ori, <i>par</i> , P _{phb-alsSD}	diese Arbeit *
JG 1230	<i>C. necator</i> H16_ΔphaC1_ΔphaC2	ΔphaC1, ΔphaC2	diese Arbeit
JG 1231	<i>C. necator</i> H16_ΔphaC1	ΔphaC1	diese Arbeit
JG 1232	<i>C. necator</i> H16_ΔacoABC_ΔphaC1_ΔphaC2	ΔacoABC, ΔphaC1, ΔphaC2	diese Arbeit *
JG 1233	<i>C. necator</i> H16_ΔacoABC_ΔphaC1_ΔphaC2_pKRphb-alsSD (ΔC1-ΔC2-phb-Acetoin)	ΔacoABC, ΔphaC1, ΔphaC2, <i>tc^R</i> , <i>mob</i> , RSF1010 ori, <i>par</i> , P _{phb-alsSD}	diese Arbeit *

JG 1241	<i>C. necator</i> H16_ΔacoABC_ΔphaC1_ΔphaC2_ pKRara-alsSD (ΔC1-ΔC2-ara-Acetoin)	ΔacoABC, ΔphaC1, ΔphaC2, <i>tc^R</i> , <i>mob</i> , RSF1010 ori, <i>par</i> , <i>araC</i> , P _{ara} -alsSD	diese Arbeit
JG 1242	<i>C. necator</i> H16_ΔacoABC_ΔphaC1_ΔphaC2_ pKRrha-alsSD (ΔC1-ΔC2-rha-Acetoin)	ΔacoABC, ΔphaC1, ΔphaC2, <i>tc^R</i> , <i>mob</i> , RSF1010 ori, <i>par</i> , <i>rhaR</i> , <i>rhaS</i> , P _{rha} -alsSD	diese Arbeit
JG 1296	<i>E. coli</i> WM3064_pKRphb-alsSD-budC	JG 98, <i>tc^R</i> , <i>mob</i> , RSF1010 ori, <i>par</i> , P _{phb} -alsSD-budC	diese Arbeit
JG 1297	<i>E. coli</i> WM3064_pKRara-alsSD-budC	JG 98, <i>tc^R</i> , <i>mob</i> , RSF1010 ori, <i>par</i> , <i>araC</i> , P _{ara} -alsSD-budC	diese Arbeit
JG 1303	<i>C. necator</i> H16_ΔacoABC_ pKRara-alsSD-budC (ara-Butandiol)	ΔacoABC, <i>tc^R</i> , <i>mob</i> , RSF1010 ori, <i>par</i> , <i>araC</i> , P _{ara} -alsSD-budC	diese Arbeit
JG 1401	<i>C. necator</i> H16_ΔacoABC_ΔphaC1_ pKRrha-alsSD-budC (ΔC1-rha-Butandiol)	ΔacoABC, ΔphaC1, <i>tc^R</i> , <i>mob</i> , RSF1010 ori, <i>par</i> , <i>rhaR</i> , <i>rhaS</i> , P _{rha} -alsSD-budC	diese Arbeit
JG 1402	<i>C. necator</i> H16_ΔacoABC_ΔphaC2_ pKRphb-alsSD (ΔC2-phb-Acetoin)	ΔacoABC, ΔphaC2, <i>tc^R</i> , <i>mob</i> , RSF1010 ori, <i>par</i> , P _{phb} -alsSD	diese Arbeit *
JG 1403	<i>C. necator</i> H16_ΔacoABC_ΔphaC1_ pKRphb-alsSD (ΔC1-phb-Acetoin)	ΔacoABC, ΔphaC1, <i>tc^R</i> , <i>mob</i> , RSF1010 ori, <i>par</i> , P _{phb} -alsSD	diese Arbeit *
JG 1404	<i>C. necator</i> H16_ΔacoABC_ΔphaC2_ pKRara-alsSD (ΔC2-ara-Acetoin)	ΔacoABC, ΔphaC2, <i>tc^R</i> , <i>mob</i> , RSF1010 ori, <i>par</i> , <i>araC</i> , P _{ara} - alsSD	diese Arbeit
JG 1405	<i>C. necator</i> H16_ΔacoABC_ΔphaC1_ pKRara-alsSD (ΔC1-ara-Acetoin)	ΔacoABC, ΔphaC1, <i>tc^R</i> , <i>mob</i> , RSF1010 ori, <i>par</i> , <i>araC</i> , P _{ara} - alsSD	diese Arbeit
JG 1406	<i>C. necator</i> H16_ΔacoABC_ΔphaC2_ pKRrha-alsSD (ΔC2-rha-Acetoin)	ΔacoABC, ΔphaC2, <i>tc^R</i> , <i>mob</i> , RSF1010 ori, <i>par</i> , <i>rhaR</i> , <i>rhaS</i> , P _{rha} -alsSD	diese Arbeit
JG 1407	<i>C. necator</i> H16_ΔacoABC_ΔphaC1_ pKRrha-alsSD (ΔC1-rha-Acetoin)	ΔacoABC, ΔphaC1, <i>tc^R</i> , <i>mob</i> , RSF1010 ori, <i>par</i> , <i>rhaR</i> , <i>rhaS</i> , P _{rha} -alsSD	diese Arbeit

JG 1442	<i>C. necator</i> H16_Δ <i>acoABC</i> _Δ <i>phaC1</i> _Δ <i>phaC2</i> _ pKR <i>phb-alsSD-budC</i> (Δ <i>C1</i> -Δ <i>C2</i> - <i>phb</i> -Butandiol)	Δ <i>acoABC</i> , Δ <i>phaC1</i> , Δ <i>phaC2</i> , <i>tc^R</i> , <i>mob</i> , RSF1010 ori, <i>par</i> , P _{<i>phb</i>} - <i>alsSD-budC</i>	diese Arbeit
---------	---	--	--------------

2.1.2. Plasmide

In dieser Arbeit wurden die in Tab. 2 aufgeführten Plasmide verwendet.

Tab. 2: In dieser Arbeit verwendeten Plasmide. Alle Plasmide sind mit der Bezeichnung, relevanten Genotyp und der Quelle aufgeführt. Die Plasmide mit einem Asterisk (*) wurden bereits in der Publikation von Windhorst und Gescher [74] aufgeführt.

Bezeichnung	relevanter Genotyp	Quelle
pBAD- <i>prpE-adhE2</i>	<i>km^R</i> , <i>araC</i> , P _{<i>ara</i>}	Annemarie Schmidt
pMAT- <i>alsSD</i> I	<i>amp^R</i> , <i>alsSD</i> ₁₋₉₅₀	Invitrogen, Karlsruhe
pMQ150	<i>km^R</i> , R6K, <i>sacB</i>	[76]
pMQ150-Δ <i>acoABC</i>	<i>km^R</i> , R6K, <i>sacB</i> , 500 bp upstream <i>acoABC</i> + <i>Xho</i> I + 500 bp downstream <i>acoABC</i>	diese Arbeit *
pMQ150-Δ <i>phaC1</i>	<i>km^R</i> , R6K, <i>sacB</i> , 500 bp upstream <i>phaC1</i> + <i>Xho</i> I + 500 bp downstream <i>phaC1</i>	diese Arbeit *
pMQ150-Δ <i>phaC2</i>	<i>km^R</i> , R6K, <i>sacB</i> , 500 bp upstream <i>phaC2</i> + <i>Eco</i> RI + 500 bp downstream <i>phaC2</i>	diese Arbeit *
pKR <i>rara-alsSD</i>	<i>tc^R</i> , <i>mob</i> , RSF1010 ori, <i>par</i> , <i>araC</i> , P _{<i>ara</i>} - <i>alsSD</i>	diese Arbeit *
pKR <i>rara-alsSD-budC</i>	<i>tc^R</i> , <i>mob</i> , RSF1010 ori, <i>par</i> , <i>araC</i> , P _{<i>ara</i>} - <i>alsSD-budC</i>	diese Arbeit
pKR <i>phb-alsSD</i>	<i>tc^R</i> , <i>mob</i> , RSF1010 ori, <i>par</i> , P _{<i>phb</i>} - <i>alsSD</i>	diese Arbeit *
pKR <i>phb-alsSD-budC</i>	<i>tc^R</i> , <i>mob</i> , RSF1010 ori, <i>par</i> , P _{<i>phb</i>} - <i>alsSD-budC</i>	diese Arbeit
pKR <i>rha-alsSD</i>	<i>tc^R</i> , <i>mob</i> , RSF1010 ori, <i>par</i> , <i>rhaR</i> , <i>rhaS</i> , P _{<i>rha</i>} - <i>alsSD</i>	diese Arbeit *
pKR <i>rha-alsSD-budC</i>	<i>tc^R</i> , <i>mob</i> , RSF1010 ori, <i>par</i> , <i>rhaR</i> , <i>rhaS</i> , P _{<i>rha</i>} - <i>alsSD-budC</i>	diese Arbeit
pKR <i>rha-eGFP</i>	<i>tc^R</i> , <i>mob</i> , RSF1010 ori, <i>par</i> , <i>rhaR</i> , <i>rhaS</i> , P _{<i>rha</i>} -eGFP	[77]
pT7- <i>alsSD</i> II	<i>amp^R</i> , <i>alsSD</i> ₉₀₁₋₂₅₄₅	diese Arbeit *
pT7- <i>budC</i>	<i>amp^R</i> , <i>budC</i>	diese Arbeit

2.1.3. DNA-Fragmente

In dieser Arbeit wurden drei Codon-optimierte Gene von Invitrogen (Karlsruhe) synthetisiert. Dabei handelte es sich um die Gene *alsSD* und *budC*. Für die heterologe Expression der Genen *alsSD* aus *Bacillus subtilis* PY79 und dem Gen *budC* aus *Klebsiella pneumoniae* IAM1063 wurden die Codons entsprechend nach Nkamura et al. [78] optimiert. Die DNA-Sequenz von *alsSD* wurde in zwei Codons (String I: 1 bis 950 bp, String II: 901 bis 2545 bp) mit einem Überlapp von 50 bp synthetisiert, *budC* wurde in einem String synthetisiert. Die Codon-optimierten Sequenzen sind im Anhang zu finden.

2.1.4. Oligonukleotide

In dieser Arbeit wurden die in Tab. 3 aufgeführten Oligonukleotide verwendet. Diese Oligonukleotide wurde als Primer für Polymerase-Ketten-Reaktionen (polymerase chain reaction, PCR) und für Sequenzierungsanalysen verwendet. Oligonukleotide wurden bei Sigma-Aldrich (Merck, Darmstadt) bestellt.

Tab. 3: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide. Alle Oligonukleotide sind mit der Nummer der Oligonukleotid-Sammlung der Arbeitsgruppe Gescher, Bezeichnung und Sequenz in 5'-3' Richtung aufgeführt.

Nummer	Bezeichnung	Sequenz
41	pMQ150for	CTGGCGAAAGGGGGATGTG
42	pMQ150rev	CATTAGGCACCCCAGGCTTTAC
72	<i>rpsL</i> for	TTAAGCCTTAGGACGCTTCA
188	pRSF1010 rev	GGCGGCAATGGATGCGTAC
323	pUC19 test rev	GGCACGACAGGTTTCCCG
331	27 F	GAGTTTGATCCTGGCTCA
370	pT7blue for	CGGCTCGTATGTTGTGTGG
371	pt7blue rev	GGATGTGCTGCAAGGCGAT
506	Universal 1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT
678	intern <i>KanR</i> for	CAGGATGATCTGGACGAAG
725	pCHAP8071 rev	ATTTGATGCCTGGCAGTTCC
755	T7 Forward	TAATACGACTCACTATAGGG
797	pmQ125 test rev	TTAAGTTGGGTAACGCCAGG
952	Chl Scel Vitro for	GCTTAGTACGTACTATCAACA
1002	Chl end rev	GCATGATGAACCTGAATCG
1058	pIND4 for	CATTTCCCCGAAAAGTGCC
1532	G,m,pk18mob rev	GGAAGGCAGTACACCTTG

2166	test pSCVAM <i>mtrABs</i> defekt for	CTATCAACAGGTTGAACTGC
2248	Neu down rev Int Cas9 60grad	CCAAGCTTGCATGCC
2313	pCas Test 12	GCTGAAATGCGGCTGGTG
2581	500 up <i>acoABC</i> rev	CAAAGACCTTGACGGTTGCTCTCGAGGTCTGTCTCCTTCGTT TTCAGG
2582	<i>acoABC</i> down 3 rev	GCAGGAATACCGGACATCC
2583	<i>acoABC</i> down rev	CAACCTCCGGATAGCAACG
2585	<i>acoABC</i> up 3 for	AATGCCTACCCGAAATGC
2587	<i>acoABC</i> up for	TTTCGCCGCGATATTGC
2588	<i>alsSD-I</i> rev	TGGTCGATGTCTGCGATG
2589	<i>alsSD-II</i> for	GGCGACCGCACCATC
2590	<i>alsSD</i> -seq rev	CGCAGACGGTAGAATTCACC
2596	delta <i>acoABC</i> pMQ150 for	TAAACAAAAGAGTTTGTAGAAACGAAAAAGGCCATCCGTC AGGATGGC
2597	delta <i>acoABC</i> pMQ150 rev	TGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTAAATTGT AAGCGTTATGAGCGCATCGAAGTACG
2636	500 down <i>acoABC</i> for	CCTGAAAACGAAGGAGACAGACCTCGAGAGCAACCGTCAAGG TCTTTG
2638	<i>phaCAB</i> up 3 for	TACCTTGCCGACATCTATGC
2641	Rha-Promotor for	CTCCTGATGTCGTCAACACG
2649	<i>alsD</i> for	GGCGACCGCACCATCATC
2650	<i>alsD</i> rev	GGCTGAAAATCTTCTCTCATCCG
2653	Seq <i>alsSD</i> Primer fwd	CACCGAAGCTGGGTCCTGC
2657	<i>alsSD</i> fwd pjeM1	ATGAACAATTCTTAAGAAGGAGATATACATATGCTGACCAAG GCCACC
2658	<i>alsSD</i> rev pKRrha	TCTTCTCTCATCCGCCAAAACAGCCAAGCTTTATTTCAGGCGA GCCTTCG
2682	<i>phaC1</i> 500 up for	AGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGTGATCGCCATC ATCAGC
2683	<i>phaC1</i> 500 down rev	ACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAGCTTGGCATCG CCC
2684	<i>phaC1</i> 500 down for	CGGCAGAGAGACAATCAAATCCTCGAGCGCTTGCATGAGTGC C

2685	<i>phaC1</i> 500 up rev	GGCACTCATGCAAGCGCTCGAGGATTTGATTGTCTCTCTGCC G
2686	<i>phaC1</i> vrev	AACTCGTCGGTCTTGAAGG
2687	<i>phaC2</i> 500 up for	AGCTTGCATGCCTGCAGGTCTAGAGGTCGACGTGACG GACTTCG
2688	<i>phaC2</i> 500 down for	CGGGCAACACCTGCAGAATTCCTCTTGTTCACTGTGCTGCG
2689	<i>phaC2</i> 500 up rev	CGCAGCACAGTGAACAAGAGGGAATTCTGCAGGTGTTGCCCG
2690	<i>phaC2</i> 500 down rev	ACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGTCTGAAGGGGAC ATGGGTTT
2691	<i>phaC2</i> vfor	CGAAATGTTTCGACAACGTTCG
2692	<i>phaC2</i> vrev	CACGATCCCCTGATGAAGC
2693	pKR Teil 2 rev	GCATAAAACTGTTGTAATTCATTAAGCATTC
2694	pKR Teil 2 for	TGGTCGCGTTCAAGGTACG
2695	phbPromotor pKR rev	CTTCTGTTCCCTGGTGGCCTTGGTCAGCATGATTTGATTGTC TCTCTGCC
2696	phb Promotor pKR for	ATGCTTAATGAATTACAACAGTTTTTATGCGTGTGGGGCCGC ACC
2697	araPromotor pKR for	ATGCTTAATGAATTACAACAGTTTTTATGCTTATGACAACCTT GACGGCTA
2698	ara Promotor pKR rev	CTTCTGTTCCCTGGTGGCC
2699	Promotor vrev	GGCTGCGTTCTGTTCGTGG
2700	Promotor vfor	CGCTGCGAACACCACTACG
2701	<i>alsS</i> for	ATGCTGACCAAGGCCACCAAG
2795	phb Promotor seq rev	CCATTGGCTGGCTCTACG
2796	phb Promotor seq for	GATGTGCAAGCTGGAGACC
2797	pKR-TeilB	CCGGGTGATGTCGTACTIONTGC
2802	phb Promotor seq	ATCCGCGTGCATTTTCGAGTC
2902	qPCR <i>alsD</i> for	GCGAATCGAACATCCAGG
2903	qPCR <i>alsD</i> rev	GGGTGAAGAAGGTGAACG
2904	qPCR <i>alsS</i> for	AAGAAGTACAACCGCACC
2905	qPCR <i>alsS</i> rev	GACCTTCTGCGTTCATGC
2908	qPCR <i>qyrB</i> for	ACGACGCTAGATGTGACCC
2909	qPCR <i>qyrB</i> rev	TCAAACATCAATATTCGCGCC
2910	qPCR neg for	CGCCGTTGTGTTCCCTTACC
2911	qPCR neg rev	AACTTCCGTGCTCTTCGC

2.1.5. Kits

Je nach Verwendungszweck wurden unterschiedliche Kits der Firma Promega (Mannheim) verwendet. Für die Isolation von Plasmid-DNA wurde das Kit *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* oder *PureYield Plasmid Midiprep System* benutzt. Für die Isolation von genomischer DNA wurde das *Wizard Genomic DNA Purification* Kit verwendet. DNA-Fragmente wurden mithilfe des Kits *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* aus einem Agarose-Gel aufgereinigt. DNA-Fragmente wurde mithilfe des *Perfectly Blunt Cloning* Kits von Novagen (Merck Millipore, Darmstadt) gesichert. Für die Isolierung und anschließende Aufreinigung von RNA wurde das *RNeasy Mini* Kit von Qiagen (Hilden) und das *Ambion DNA-free DNAase Treatment and Removal Reagents Kit* (Thermo Fisher, Schwerte) benutzt. Die gereinigte DNA wurde mithilfe des Kits *iScript Select cDNA Synthesis* (Bio-Rad, München) in cDNA umgeschrieben.

2.1.6. Chemikalien und Enzyme

Alle Chemikalien wurden von den Firmen Amresco (Solon, Ohio, USA), AppliChem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Promega (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma-Aldrich (München) bezogen. In dieser Arbeit eingesetzte Enzyme stammten von den Firmen Applichem (Darmstadt), Biotin (Luckenwalde), Bio-Rad (München), New England Biolabs (Schwalbach) oder PCR Biosystems/NIPPON Genetics Europe (Düren).

2.1.7. Geräte

Für die Zentrifugation von Proben und die damit einhergehende Trennung von Partikeln und Flüssigkeit wurden die Tischzentrifuge 5418 (Eppendorf, Hamburg), die temperierbare Tischzentrifuge 5810R (Eppendorf, Hamburg) und die Standzentrifuge Avanti J-26XP (Beckman Coulter, Krefeld) verwendet.

Zur Messung von Zelldichten bei 600 nm wurden die Proben für das Photometer Genesys 20 spectrophotometer (Thermo Spectronic/Thermo Fisher Scientific, Darmstadt) auf eine Zelldichte von maximal 0,3 verdünnt. In dem Ultrospec 10 Cell Density Meter (Biochrom/Merck, Darmstadt) wurden Kulturen mit einer maximalen OD_{600} (optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm) von 2,0 in Reagenzgläsern direkt gemessen.

DNA- und RNA-Konzentrationen wurden mithilfe des Nanodrops 2000 (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt) und der Software Nanodrop 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt) bestimmt. Das eingesetzte Probenvolumen entsprach 1,5 μ l.

Zur Messung der pH-Werte wurden das pH-Messgerät FE20/EL20 (Mettler Toledo, Gießen) und das pH-Messgerät pHenomenal pH 1000L (VWR, Darmstadt) verwendet.

2.1.8. Aufbau einer Elektrolyse-Zelle

Die Konstruktion einer Elektrolyse-Zelle wurde mit möglichst einfachen und handelsüblichen Werkstoffen angestrebt. Als Grundbasis für die Elektrolyse-Zelle wurde eine Kiste aus Polypropylen (Auer Packaging, Amerang) verwendet. Diese Kiste hatte die Außenmaße 40 cm x 30 cm x 27 cm (Länge x Breite x Höhe) und Innenmaße 37 cm x 27 cm x 26,5 cm. Zur Stabilisierung wurde der Boden mit zwei 4 mm starken Polystyrol-Platten (Hornbach, Neustadt) verstärkt. Der Einbau von Metallplatten als Elektroden und von Ton-Platten als Separatoren erfolgte über die Fixierung von U-Profilen an der Seitenwand und dem Boden der Plastikkiste, dabei wurden schmale U-Profile (200 cm x 1 cm x 1 cm, mit einem Lichthof von 0,8 cm, Hornbach, Neustadt) für die Metallplatten und breite U-Profile (200 cm x 1,4 cm x 1 cm, mit einem Lichthof von 1,2 cm, Hornbach, Neustadt) für die Ton-Platten auf die entsprechende Länge zugeschnitten und mithilfe von Heißkleber befestigt.

Um die Metallplatten austauschen oder modifizieren zu können, wurden diese nicht eingeklebt, sondern mithilfe von Klemmprofilen (200 cm x 0,9 cm x 1,5 cm, Hornbach, Neustadt) in die U-Profile gesteckt. Es wurden zwei Arten von Metallplatten für die Elektroden verwendet, für die Anoden wurden Metallplatten aus Edelstahl in der Ausführung 1.4571 (34 cm x 24 cm x 0,15 cm, Gemmel Metalle, Berlin) verwendet. Für die Kathoden wurde Edelstahl in der Ausführung 1.4944 (34,5 cm x 24,5 cm x 0,32 cm, Jäckel Edelstahl, Schöneck) verwendet, da dieser Edelstahl im Vergleich zu weiteren Edelstahl-Varianten die höchste H₂-Produktion zeigte [79].

Um Flüssigkeit entlang der Elektroden durch die Elektrolyse-Zelle pumpen zu können, wurden in den Seitenwänden Gewindetüllen mit einem konischen M5-Außengewinde (Esska, Hamburg) mit passenden Sechskantmuttern (Esska, Hamburg) verschraubt. Mithilfe der Gewindetüllen wurde ein Schlauch (Innendurchmesser 0,32 cm, Cole-Parmer, Wertheim) an der Elektrolyse-Zelle befestigt. Damit ein Pumpen vom Flüssigkeitsreservoir bzw. zum Auffangbehälter ermöglicht wurde, wurde ein Schlauch (Innendurchmesser 0,165 cm, Cole-Parmer, Wertheim) für die Schlauchpumpe MCP-MS/CA 4-12 (Cole-Parmer, Wertheim) mithilfe von reduzierenden Schlauchverbindern (Schlauch-Innendurchmesser von 0,15 cm auf 0,3 cm, Cole-Parmer, Wertheim) zwischengeschaltet.

Um diese Konstruktion als Elektrolyse-Zelle zu betreiben, wurden die Elektroden mit dem Potentiostat (PGSTAT 204, Metrohm Autolab, Utrecht/Niederlande) und einem Booster (10 A current Booster, Metrohm Autolab, Utrecht/Niederlande) verbunden. Dafür wurden an den Elektroden Abgreifklemmen (Conrad, Hirschau) angebracht, welche wiederum mit 28-adrigen Kupferkabeln (Conrad, Hirschau) durch Büschelstecker (Conrad, Hirschau) verbunden wurden. Die Kupferkabeln wurden durch die Seitenwand der Plastikkiste geführt, damit außerhalb der Elektrolyse-Zelle alle Kupferkabeln von der Anode bzw. von der Kathode zu einem „Anoden“-Kupferkabel und einem

„Kathoden“-Kupferkabel mittels Lötens zusammengefasst werden konnten. Diese beiden verbleibenden Kupferkabel wurden mit je einem Polstecker (Conrad, Hirschau) verbunden. Für die zusätzliche Verbindung der Ag/AgCl-Referenzelektrode (Potential +0,230 V vs. SHE, Sensortechnik Meinsberg, Ziegra-Knobelsdorf) wurde die Referenzelektrode mittels einem Büschelstecker, Kupferkabel und Polstecker zum Potentiostat verbunden.

Um die Elektrolyse-Zelle zu verschließen und die produzierten Gase auffangen zu können, wurde ein Glasdeckel (Glasarbeiten, Karlsruhe) konstruiert (Abb. 9). Der Glasdeckel besteht aus drei Pyramiden, die aneinandergesetzt wurden, um die unterschiedlichen Bereiche bzgl. der Gasproduktion überwachen zu können. An der Spitze jeder Pyramide wurde ein Edelstahl-Rohr (Edelstahlrohre Sawade, Außendurchmesser 0,6 cm, Innendurchmesser 0,45 cm) befestigt, um mittels einer Verjüngung (Swagelok, Ohio/USA) ein Edelstahl-Rohr (Außendurchmesser 1/16 Zoll, Innendurchmesser 0,075 cm, SCP Seitz Chromatographie Produkte, Weiterstadt) an die Gasanalytik anschließen zu können. Dieser Glasdeckel wurde auf den Rand der Elektrolyse-Zelle aufgesetzt und mithilfe einer Schaumstoffdichtung (600 cm x 0,9 cm x 0,4 cm, Hornbach, Neustadt) abgedichtet.

Alle Kontaktstellen zwischen zwei Bauteilen wurden mit Silikon (Hornbach, Neustadt) abgedichtet, um ein Auslaufen von Flüssigkeit zu unterbinden. Ausgenommen hiervon wurden alle flexiblen Steckverbindungen.

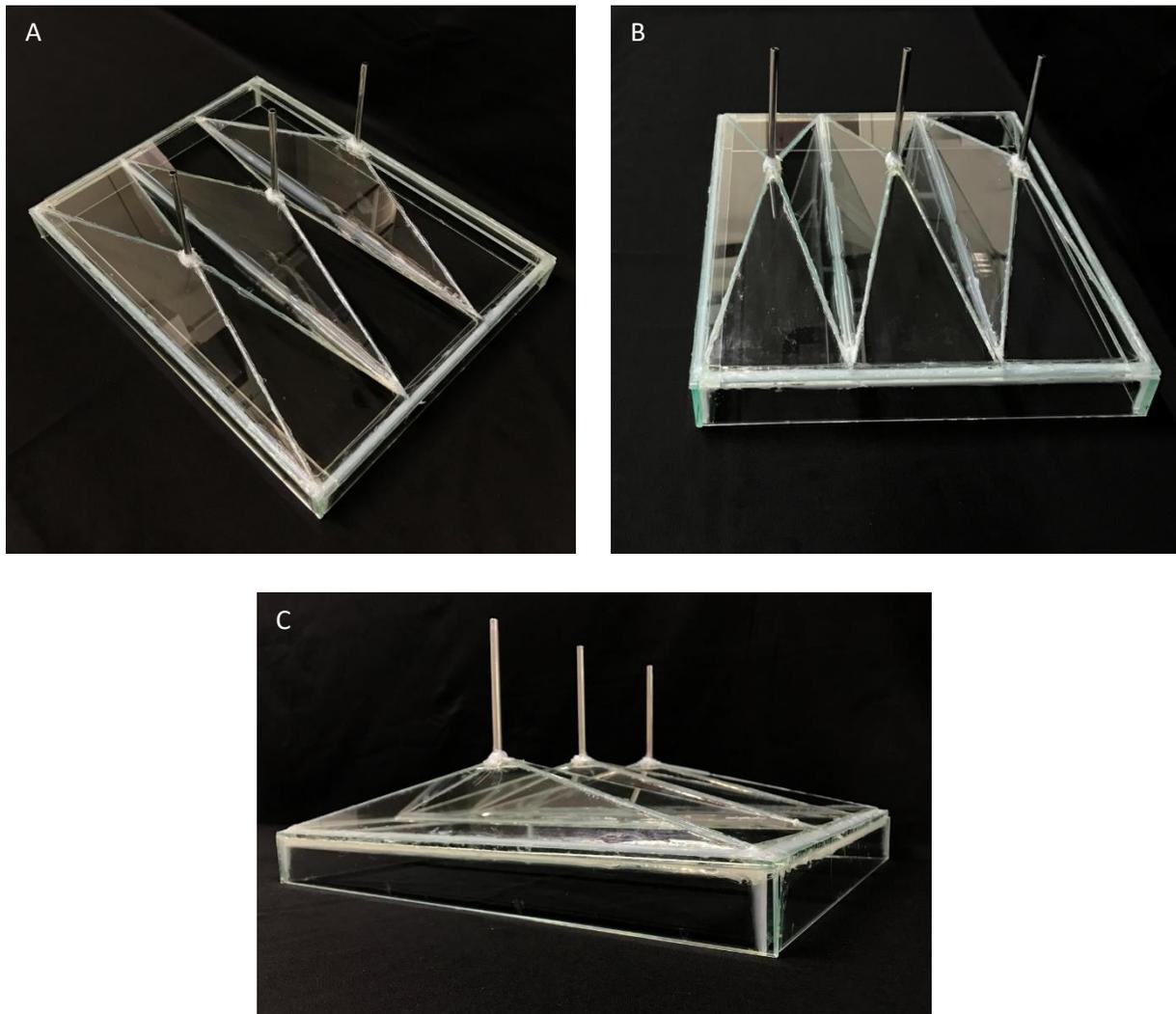


Abb. 9: Glasdeckel für die Elektrolyse-Zelle. A-C zeigen unterschiedliche Perspektiven auf den Glasdeckel. Der Glasdeckel wurde auf den Rand der Elektrolyse-Zelle aufgesetzt, so dass die seitlichen Glasscheiben sich außerhalb der Elektrolyse-Zelle befanden und somit ein Verrutschen des Glasdeckels vermieden. Die Metallrohre an den Spitzen der Pyramiden wurden als Verbindung vom Gasraum zur Gasanalytik verwendet, somit konnte die Gaszusammensetzung in den drei unterschiedlichen Bereichen überwacht werden.

2.1.8.1. Version I

Die erste Version der Elektrolyse-Zelle wurde mit drei Halbzellen konstruiert. Um den Abstand zwischen Anode und Kathode möglichst gering zu halten, wurde eine Halbzelle mit Kathoden mittig und jeweils eine Halbzelle mit Anoden rechts bzw. links von der Kathode angeordnet. Um die Halbzellen räumlich voneinander trennen zu können, wurden zwei Ton-Platten als Separatoren (Hantwerck, Regensburg; zugeschnitten von Natursteine Freidinger, Karlsruhe) eingebaut. In einigen Studien wird Ton als Separator als Alternative zur klassischen Protonenaustauschmembranen verwendet [80], da so der Preis von Membranen um den Faktor 20 reduziert werden kann [81]. In den beiden Halbzellen mit Anoden wurden jeweils bis zu zwei Elektroden eingebaut, in der mittleren Halbzelle konnten bis zu vier Kathoden eingesetzt werden. Die Elektroden wurden so positioniert, dass

eine mäanderförmige Fließbewegung entstand, um somit eine möglichst große Oberfläche der Elektroden zu erreichen. Die Referenzelektrode wurde so positioniert, dass sie in der Mitte der Elektrolyse-Zelle zwischen zwei Kathoden misst. Die Gewindetülle für den Zufluss wurde auf mittlerer Höhe für alle drei Halbzellen positioniert. Für den Abfluss wurden zwei Positionen auf minimaler und maximaler Höhe gewählt, um bei einer Verstopfung des unteren Schlauches ein Überlauf der Flüssigkeit zu vermeiden. Aufgrund der Trennung der Halbzellen und der Pumpsysteme besteht die Möglichkeit, die Halbzellen mit unterschiedlichen Medien zu betreiben. Jede Halbzelle hatte ein Fassungsvermögen von 6 l, daraus ergibt sich ein Gesamtvolumen von 18 l für die erste Version der Elektrolyse-Zelle. (Abb. 10)

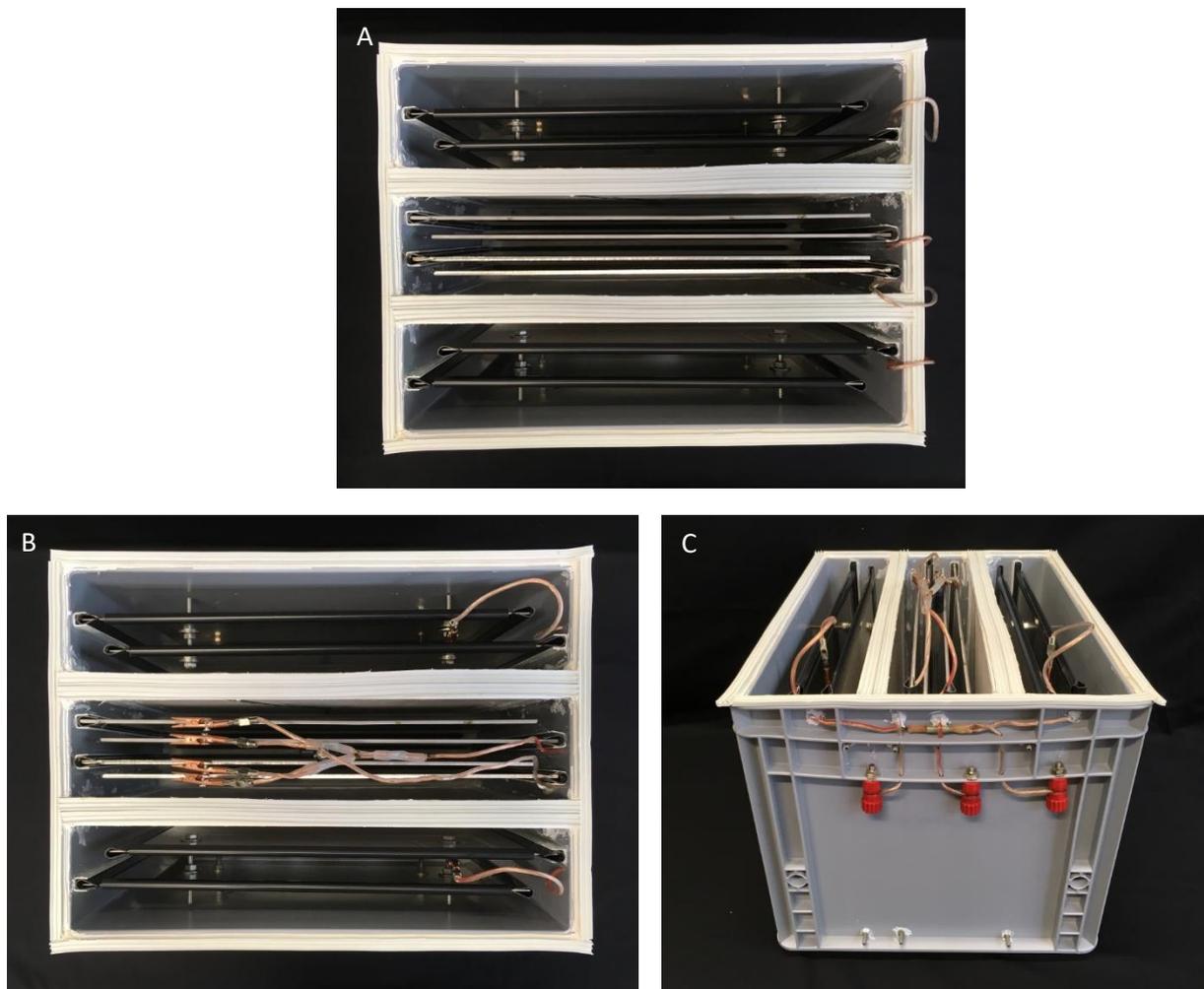


Abb. 10: Aufbau der Elektrolyse-Zelle Version I. A. Aufsicht. B. Aufsicht mit angeschlossenen Kabeln. C. Ansicht von der Kurzseite mit Schlauchtüllen und angeschlossenen Kabeln.

2.1.8.2. Version II

Die Elektrolyse-Zelle in der Version II wurde ohne Membran aufgebaut, somit war es möglich die Anoden und Kathoden alternierend einzusetzen (Abb. 11). Insgesamt bestand diese Version aus fünf Anoden und vier Kathoden. Die Referenzelektrode konnte in diesem Aufbau im vorderen Drittel, im

mittleren Bereich oder im hinteren Drittel installiert werden, um so Potentialunterschiede feststellen zu können. Die Gewindetüllen wurden, wie in Version I für eine Halbzelle erwähnt, positioniert. Ein Gesamtvolumen von 20 l konnte erreicht werden.

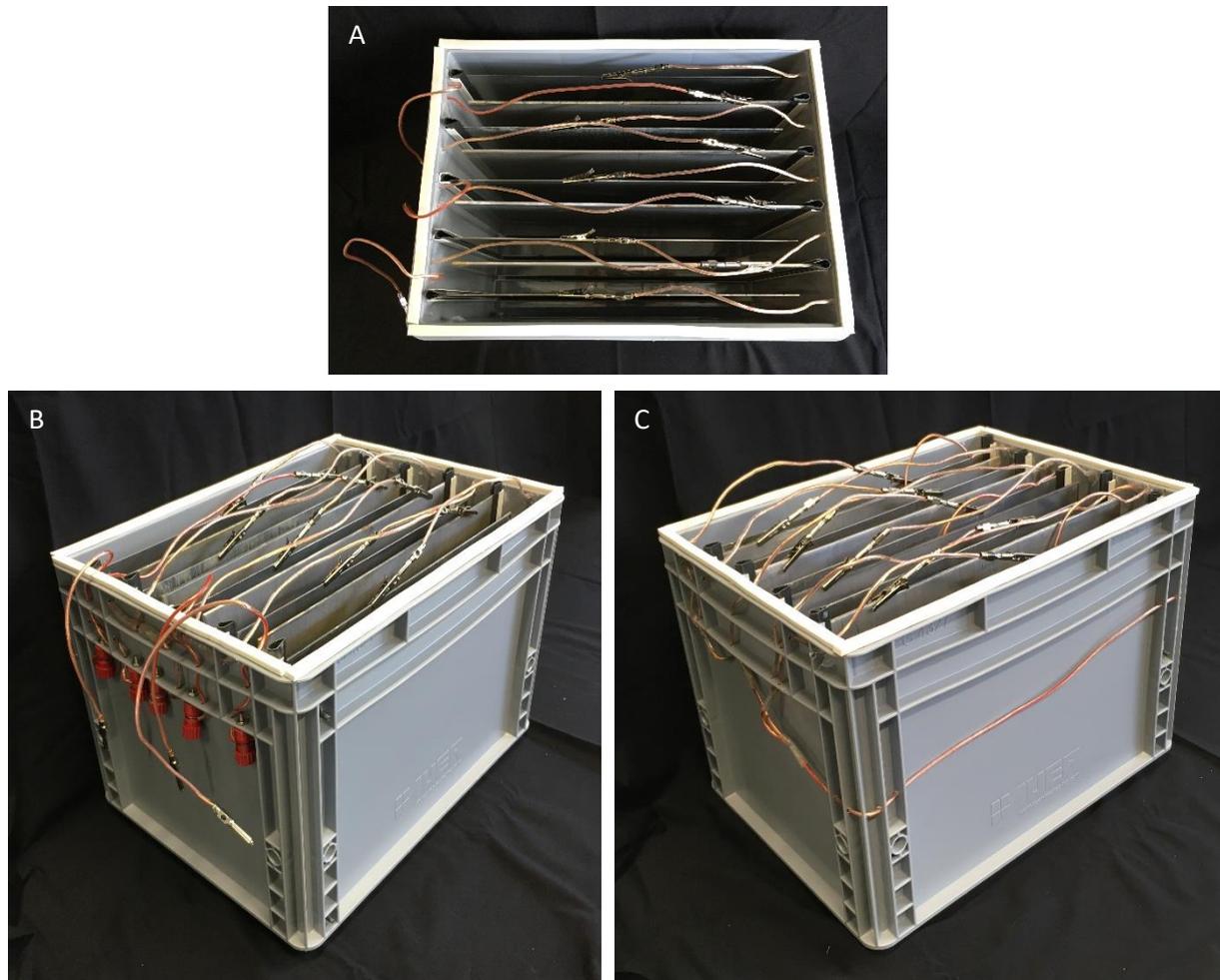


Abb. 11: Aufbau der Elektrolyse-Zelle Version II. A. Aufsicht. B. Ansicht auf die vordere und rechte Seite. C. Ansicht auf die hintere und linke Seite. In A und B sind die drei Anschlussmöglichkeiten für die Referenzelektrode erkennbar (Kupferkabel mit Büschelstecker).

In Abb. 12 werden die schematische Aufsicht der verschiedenen Versionen der Elektrolyse-Zelle dargestellt.

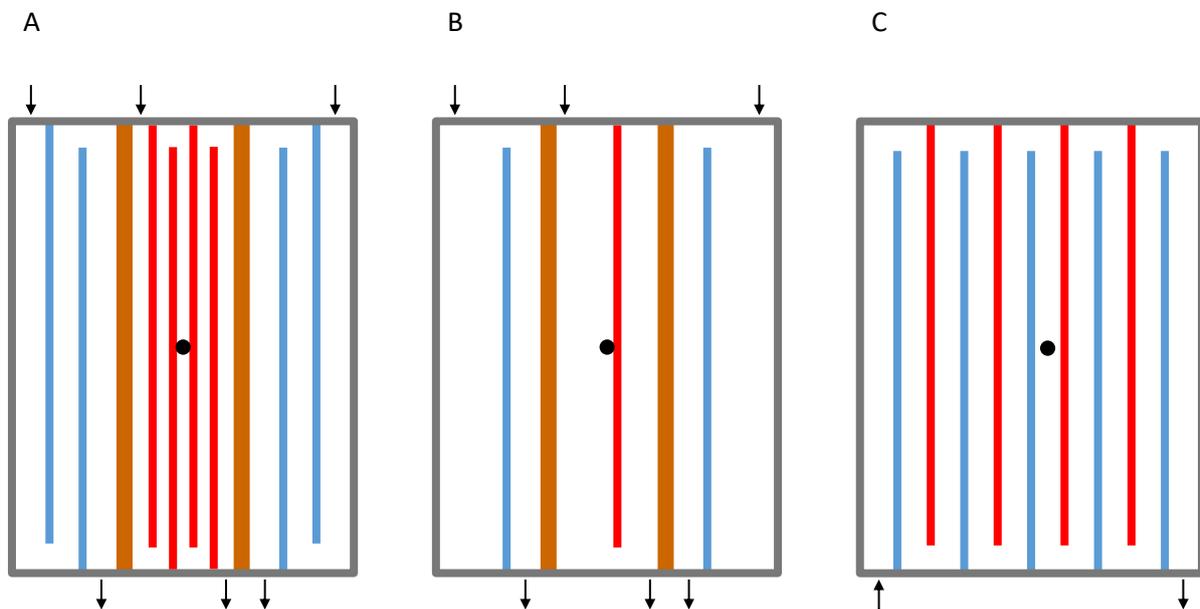


Abb. 12: Schematische Aufsicht auf die verschiedenen Versionen der Elektrolyse-Zelle. Die Abbildung zeigt die Elektrolyse-Zelle Version I (A), Elektrolyse-Zelle Version I mit reduzierter Elektroden-Oberfläche (B) und Elektrolyse-Zelle Version II (C). Dabei werden die Umrisse der Plastikkiste (graues Rechteck), die Ton-Platten als Separator (braue, dicke Linie), die Anoden (blaue Linie), die Kathoden (rot, dünne Linie), die Referenzelektrode (schwarzer Punkt) und die Zu- und Abflüsse (schwarze Pfeile) dargestellt.

2.2. Methoden

2.2.1. Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1. Kultivierung

Allgemeine Kultivierung

Die in Tab. 1 aufgelisteten *E. coli* Bakterienstämme wurden bei 37°C und die *C. necator* Stämme bei 30°C inkubiert, alle Flüssigkulturen wurden bei 180 rpm geschüttelt. Zur Kultivierung auf Agar-Platten wurden dem Medium 2% Agar-Agar hinzugegeben.

Alle Kultivierungen von *E. coli* fanden in LB (lysogeny broth, Tab. 4) statt. In diesem heterotrophen Medium wurde ebenfalls *C. necator* während der Klonierung und als Vorkultur angezogen.

Tab. 4: Zusammensetzung des LB-Mediums. Dieses Medium diente zur heterotrophen Kultivierung von *E. coli* und *C. necator*.

Substanz	Menge für 1 l
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
Trypton	10 g

In Produktionskulturen wurde *C. necator* in Minimal-Medium 81 (Mineral medium for chemolithotrophic growth (H-3) von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen), Tab. 5 bis Tab. 11) unter heterotrophen und autotrophen Bedingungen kultiviert.

Tab. 5: Zusammensetzung des Minimal-Mediums 81. Angepasst nach dem Minimal-Medium 81 (Mineral medium for chemolithotrophic growth (H-3)) von der DSMZ. Dieses Medium diente zur autotrophen und heterotrophen Kultivierung von *C. necator*. Die Zusammensetzung der verschiedenen Lösungen ist in Tab. 6 bis Tab. 10 aufgelistet.

Lösung	Volumen für 1 l
10x Lösung B	100 ml
25x Phosphat-Puffer	40 ml
100x FeNH ₄ -Citrat-Lösung	10 ml
100x NaHCO ₃ -Lösung	10 ml
200x Vitamin-Lösung	5 ml

Tab. 6: Zusammensetzung der 10x Lösung B. Die Zusammensetzung der Spurenelemente SL-6 ist in Tab. 11 aufgelistet.

Substanz	Menge für 1 l
NH ₄ Cl	10 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	5 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,1 g
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0,05 g
NaVO ₃ x H ₂ O	0,05 g
Spurenelemente SL-6	50 ml

Tab. 7: Zusammensetzung des 25x Phosphat-Puffers.

Substanz	Menge für 100 ml
KH ₂ PO ₄	5,75 g
Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O	7,25 g

Tab. 8: Zusammensetzung der 100x FeNH₄-Citrat-Lösung.

Substanz	Menge für 100 ml
FeNH ₄ -Citrat	0,5 g

Tab. 9: Zusammensetzung der 100x NaHCO₃-Lösung.

Substanz	Menge für 100 ml
NaHCO ₃	5 g

Tab. 10: Zusammensetzung der 200x Vitamin-Lösung.

Substanz	Menge für 100 ml
Riboflavin	10 mg
Thiamin-HCl x 2 H ₂ O	50 mg
Nicotinsäure	50 mg
Pyridoxin-HCl	50 mg
Ca-Pantothenat	50 mg
Biotin	0,1 mg
Folsäure	0,2 mg
Vitamin B12	1 mg

Tab. 11: Zusammensetzung der Spurenelemente-Lösung SL-6. Verwendet nach dem Medium 27 (*Rhodospirillaceae* medium (modified)) von der DSMZ.

Substanz	Menge für 1 l
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,1 g
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0,03 g
H ₃ BO ₄	0,3 g
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,2 g
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	0,01 g
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0,02 g
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,03 g

Je nach Anwendungszweck wurden weitere Zusätze wie Antibiotika, Induktoren, Kohlenstoffquellen oder Substanzen zur Komplementierung von Auxotrophien dem Medium hinzugefügt (Tab. 12).

Tab. 12: Zusätze für Medien. Hierbei handelte es sich um Antibiotika, Induktoren, Kohlenstoffquellen oder weiteren Zusätze. Angegeben ist die finale Konzentration im Medium. Tetracyclin wurde in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst, alle anderen Substanzen in ddH₂O.

Zusätze	finale Konzentration
Ampicillin	100 µg/ml
Arabinose	1 µM bis 10 mM
DAP	0,3 mM
Fructose	10 mM
Kanamycin	50 µg/ml
Rhamnose	1 µM bis 1,5 mM
Saccharose	25%
Tetracyclin	15 µg/ml

Autotrophe Kultivierung

Für alle Kultivierungen unter autotrophen Bedingungen wurde das Minimal-Medium 81 (Tab. 5 bis Tab. 11) verwendet.

Für die Kultivierungen im Batch wurden 1 l Schottflaschen mit je einem Stopfen Gas-dicht verschlossen. Die Gasphase in der Flasche wurde mittels einer Anaerobisierungsanlage (abwechselnde Zyklen von N₂-Begasung und Erzeugung eines Unterdruckes) gegen N₂ ausgetauscht und im Vakuum-Zyklus von der Anlage entfernt. Anschließend wurden die Flaschen für 3 bis 4 h an den Gasmischer EL-FLOW (Bronkhorst, Ruurlo/Niederlande) angeschlossen. Dabei wurde die Einstellung von 80% H₂: 25% CO₂: 75% O₂ (insgesamt 6 l/h) verwendet. Dies entsprach schlussendlich einer Konzentration von 80% H₂: 5% CO₂: 15% O₂ in den Flaschen. Alle 24 h wurde der Druck in den Flaschen wieder auf Normaldruck eingestellt, dafür wurde eine Kanüle schräg in die Flasche gesteckt, so dass beim Hinlegen der Flasche die Kanülenspitze in der Flüssigkeit war. An diese Kanüle wurden zuvor ein Sterilfilter und ein geschlossener Drei-Wege-Hahn angebracht. Bei Öffnen des Drei-Wege-Hahns strömte bei einem Unterdruck steril gefilterte Luft durch die Kanüle in die Flüssigkeit und es entstanden Luftblasen in der Flasche. Die Flasche wurde solange mit Luft ausgeglichen, bis keine Luftblasen mehr entstanden, an diesem Punkt herrschte wieder Normaldruck in der Flasche.

Des Weiteren wurden *C. necator* Stämme nicht nur in Flaschen unter autotrophen Bedingungen, sondern auch in Fermentern kultiviert. Dafür wurden 1 l Biostat A Fermenter von Sartorius (Göttingen)

verwendet. Verschiedene Gasverhältnisse (Tab. 13) wurden mittels des Gasmischers kontinuierlich zugeführt. Die Rührgeschwindigkeit lag bei 400 rpm und die Temperatur wurde auf 30°C eingestellt.

Tab. 13: Verwendete Gasgemische und Gasdurchflüsse im Fermenter. Diese Einstellungen wurden verwendet um *C. necator* unter autotrophen Bedingungen zu kultivieren. Die Konzentrationen zeigen die realen Verhältnisse bei einer Begasungsrate von 4 bzw. 5,2 l/h an.

4 l/h			5,2 l/h		
H ₂ [%]	CO ₂ [%]	O ₂ [%]	H ₂ [%]	CO ₂ [%]	O ₂ [%]
90	5	5	76,9	19,2	3,8
85	5	10	76,9	11,5	11,5
80	5	15	76,9	3,9	19,2
75	5	20	85	5	10
70	5	25	75	5	20
			65	5	30

2.2.1.2. Dauerkulturen

Alle hergestellten Stämme wurden als Dauerkultur eingelagert. 1 ml einer Übernachtskultur des entsprechenden Stammes wurden mit 500 µl 50% Glycerin vermischt. Das Cryo-Röhrchen mit der Kultur wurde in flüssigem N₂ eingefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Um einen Stamm zu reaktivieren, wurde mit einer sterilen Pipettenspitze etwas aus der gefrorenen Kultur entnommen und auf einen Agar-Platte ausgestrichen.

2.2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1. DNA-Methoden

polymerase chain reaction (PCR)

Eine PCR dient zur Amplifikation von spezifischen DNA-Fragmenten, dabei können Gene oder DNA-Bereiche für die Klonierung vervielfältigt, aber auch die erfolgreiche Klonierung verifiziert werden. Dafür wurden die in Tab. 3 aufgelisteten Oligonukleotide als Primer verwendet.

Für präparative PCR-Produkte wurde die HiFi Polymerase (PCR Biosystems/Nippon Genetics Europe, Düren) verwendet. Diese Polymerase besitzt eine 3'-5' Exonukleaseaktivität, welche die Mutationsrate während der Amplifikation reduziert. Je nach Anwendungszweck wurden PCRs in 15 µl oder 50 µl Ansätze (Tab. 14) in PCR-Zyklern (Bio-Rad, München) mit speziellen Programmen durchgeführt (Tab. 15).

Tab. 14: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes mit der HiFi Polymerase.

Komponente	15 µl Ansatz	50 µl Ansatz
5x Reaktionspuffer	3 µl	10 µl
2 µM Primer I	3 µl	10 µl
2 µM Primer II	3 µl	10 µl
DNA (10 ng/µl)	0,3 µl	1 µl
DMSO	0,5 µl	1,5 µl
HiFi Polymerase	0,15 µl	0,5 µl
ddH ₂ O	5,05 µl	17 µl

Tab. 15: Zyklisches Protokoll für die Amplifikation von DNA mittels der HiFi Polymerase. Die Temperatur des Schrittes Primer Anlagerung wurde mit dem T_m Rechner von Thermo Fisher² bestimmt, dabei wurde die Einstellung „Phusion or Phire DNA polymerase“ ausgewählt.

Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	1 min 30 s	1
Denaturierung	95°C	15 s	35
Primer Anlagerung	50-72°C	15 s	
Elongation	72°C	30 s/kb	
finale Elongation	72°C	5 min	1
Ende	4°C	∞	1

Für analytische PCRs wurde der MangoMix von Bionline (Luckenwalde) verwendet, welcher auf einer Taq-Polymerase basiert. Es wurden 15 µl Ansätze mit isolierter DNA oder mit Kolonien (Tab. 16) verwendet. Bei einer sogenannten Kolonie-PCR wurde eine Kolonie mit einer sterilen Pipettenspitze von einer Agar-Platte entnommen, auf einer Sicherungsplatte ausgestrichen und anschließend in einem PCR-Ansatz resuspendiert. Die DNA wurde in diesen PCR-Ansätzen mittels eines zyklischen Programmes (Tab. 17) amplifiziert. Für analytische PCRs mit einer erwarteten Größe von mehr als 3 kb wurde der Ansatz mit der HiFi Polymerase verwendet.

² <https://www.thermofisher.com/de/de/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html>

Tab. 16: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes mit dem MangoMix.

Komponente	15 µl Ansatz
2x MangoMix	7,5 µl
2 µM Primer I	3,375 µl
2 µM Primer II	3,375 µl
DNA	Kolonie oder 10 ng
DMSO	0,75 µl

Tab. 17: Zyklisches Protokoll für die Amplifikation von DNA mittels des MangoMixes. Die Temperatur des Schrittes Primer Anlagerung wurde mit dem T_m Rechner von Thermo Fisher² bestimmt, dabei wurde im ersten Schritt die „DreamTaq DNA polymerase or other Taq-based DNA polymerase“ ausgewählt.

Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	5 min	1
Denaturierung	95°C	30 s	35
Primer Anlagerung	45-72°C	30 s	
Elongation	72°C	30 s/kb	
finale Elongation	72°C	5 min	1
Ende	4°C	∞	1

Isolierung von genomischer DNA

Zur Isolierung von genomischer DNA wurde das *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega, Mannheim) verwendet. Die Isolierung erfolgte nach Herstellerangaben.

Isolierung von Plasmiden

Zur Isolierung von Plasmiden wurde entweder das Kit *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega, Mannheim) oder das Kit *PureYield Plasmid Midiprep System* (Promega, Mannheim) verwendet. Um die Konzentration zu erhöhen, wurden die isolierten Plasmide in 30 µl ddH₂O (*Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System*) oder in 200 bis 400 µl ddH₂O (*PureYield Plasmid Midiprep System*) aufgenommen. Die Elution isolierter Plasmide (*PureYield Plasmid Midiprep System*) erfolgte nicht mithilfe von Vakuum oder Zentrifugation, sondern mithilfe von Überdruck, in dem die PureYield Binding Column verschlossen wurde und mithilfe einer Spritze und Kanüle Luft hineingedrückt wurde. Alle anderen Schritte erfolgten nach Herstellerangaben.

Aufreinigung von DNA-Produkten

Die Aufreinigung von DNA-Produkten erfolgte mittels dem Kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Mannheim). Um die Konzentration zu erhöhen, wurden die aufgereinigten DNA-Produkte in 30 µl ddH₂O aufgenommen. Alle anderen Schritte erfolgten nach Herstellerangaben.

Sequenzierung

Für die Sequenzierung von genomischer DNA wurden diese zunächst mithilfe der HiFi Polymerase amplifiziert und anschließend aufgereinigt. Für die Sequenzierung von Plasmiden wurden diese isoliert. Anschließend wurde das gereinigte DNA-Fragment oder isolierte Plasmid mit dem erforderlichen Primer nach Herstellerangaben (Mix2Seq Kit) zu Eurofins Genomics (Ebersberg) gesandt. Die Auswertung der Sequenzierungsergebnisse erfolgte im Vergleich zu der *in silico* Sequenz mithilfe der CLC Main Workbench (Version 8.0, Qiagen, Aarhus/Dänemark).

Restriktion

Für die gezielte Restriktion in einem DNA-Fragment wurden Restriktionsenzyme (New England Biolabs, Schwalbach) in einem Restriktionsansatz (Tab. 18) eingesetzt. Der Restriktionsansatz inkubierte für 1 h, die Inkubationstemperatur wurde nach Herstellerangaben gewählt.

Tab. 18: Zusammensetzung eines Restriktionsansatzes. Der Puffer und die Inkubationstemperatur wurden nach Herstellerangaben ausgewählt. Der Ansatz wurde für 1 h inkubiert.

Komponente	Menge
10x Puffer	5 µl
Plasmid	1-5 µg
Restriktionsenzym	je Enzym: 1 µl/µg Plasmid
ddH ₂ O	add 50 µl

Im Anschluss an den Restriktionsverdau konnte eine Dephosphorylierung der 3'- und 5'- Enden des DNA-Fragmentes durchgeführt werden, dafür wurde bei Verwendung des CutSmart-Puffers nach 45 min Inkubationszeit 1 µl CIP (Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal, New England Biolabs, Schwalbach) hinzugegeben und für weitere 15 min gemeinsam mit den Restriktionsenzymen bei 37°C inkubiert. Bei Verwendung eines anderen Puffersystems wurde der Restriktionsansatz zunächst mithilfe des Kits *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* aufgereinigt und anschließend ein Dephosphorylierungsansatz (Tab. 19) angesetzt, welcher für 30 min bei 37°C inkubiert wurde.

Tab. 19: Zusammensetzung eines Dephosphorylierungsansatzes. Dieser Ansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert.

Komponente	Menge
10x CutSmart Puffer	2 µl
DNA	1 pmol
CIP	1 µl
ddH ₂ O	add 20 µl

Agarose-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von unterschiedlich großen DNA-Fragmenten bzw. für einen Größenvergleich wurde die Methode der Gelelektrophorese gewählt. Hierfür wurde Agarose (0,8% für Fragmentgrößen größer als 10 kb, 1% für Fragmentgrößen von 500 bp bis 10 kb und 2% für Fragmentgrößen von kleiner als 500 bp) in 1x TAE-Puffer (TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)-Acetat-EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)-Puffer, Tab. 20) mittels Aufkochen gelöst und anschließend mit 0,5 µg/µl Midori-Green (Nippon Genetics, Düren) versetzt. Nach Aushärten des Gels wurden die DNA-Proben und der DNA-Marker als Größenvergleich (GeneRuler 1 kb, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt oder 50 bp DNA Ladder, New England Biolabs, Schwalbach) mit 6x DNA-Ladepuffer (Tab. 21) versetzt. Für die Auftrennung der DNA entlang eines elektrischen Feldes wurde eine konstante Spannung von 120 V für 20 bis 40 min angelegt.

Tab. 20: Zusammensetzung des TAE-Puffers. Der pH-Wert wurde mit Acetat auf 8,0 eingestellt.

Komponente	Konzentration (1x)	Konzentration (50x)
TRIS	4,85 g/l	242,5 g/l
EDTA	0,37 g/l	18,5 g/l

Tab. 21: Zusammensetzung des 6x DNA-Ladepuffers. Die Zusammensetzung des 50x TAE-Puffers kann der Tab. 20 entnommen werden.

Komponente	Menge für 15 ml
Xylene cyanol	0,05 g
Orange G	0,05 g
Glycerin	12 ml
50x TAE-Puffer	1,5 ml

Aufgetrennte DNA-Fragmente wurden unter dem Blautisch (FastGene B/G LED Trans Luminator, Nippon Genetics, Düren) oder unter dem Gel Doc XR System mit der Software Image Lab (Biorad, München) visualisiert.

Isothermale *in vitro* Ligation

Bei einer isothermalen *in vitro* Ligation nach Gibson et al. [82] werden DNA-Fragmente zusammen mit drei verschiedenen Enzymen inkubiert (Tab. 22 bis Tab. 25), dabei müssen die DNA-Fragmente 30 bis 50 bp identische DNA-Sequenzen aufweisen. Zunächst bildet die Exonuklease mit einer 5'-3' Aktivität ssDNA-Bereiche, welche komplementär zueinander binden können. Die Polymerase synthetisiert die entstandenen ssDNA zu dsDNA, damit im letzten Schritt der Reaktion die Ligase das Rückgrat der DNA verknüpfen kann. Diese Reaktionen werden für 90 min bei 50°C inkubiert.

Tab. 22: Zusammensetzung der isothermalen *in vitro* Ligation nach Gibson et al. [82]. Dieser Ansatz wurde für 90 min bei 50°C inkubiert. Die Zusammensetzung des Gibson Master Mixes kann aus Tab. 23 entnommen werden.

Komponente	Menge
Gibson Master Mix	15 µl
äquimolare DNA-Fragmente	5 µl (maximal 100 ng)

Tab. 23: Zusammensetzung des Gibson Master Mixes. Die Zusammensetzung des 5x isothermalen Reaktionspuffers ist der Tab. 24 zu entnehmen. Die T5 Exonuklease wurde mit Lagerpuffer (Tab. 25) verdünnt. Der Gibson Mastermix wurde in 15 µl aliquotiert.

Komponente	Menge für 400 µl
5x isothermale Reaktionspuffer	80 µl
iProof Polymerase (2 U/µl)	5 µl
taq DNA-Ligase (40 U/µl)	40 µl
T5 Exonuklease (0,1 U/µl)	16 µl
ddH ₂ O	259 µl

Tab. 24: Zusammensetzung des 5x isothermalen Reaktionspuffers.

Komponente	Menge für 250 µl
1 M Tris/HCl pH 7,5	125 µl
1 M MgCl ₂	12,5 µl
10 mM dNTPs	25 µl
1 M DTT	12,5 µl
0,1 M NAD	12,5 µl
PEG-8000	62,5 mg
ddH ₂ O	62,5 µl

Tab. 25: Zusammensetzung des Lagerpuffers für die T5 Exonuklease.

Komponente	Menge für 10 ml
1 M Tris/HCl pH 7,5	500 µl
1 M DTT	1 ml
1 M NaCl	10 µl
50 mM EDTA	20 µl
Triton X-100	10 mg
ddH ₂ O	8,47 ml

Sicherung von DNA-Fragmenten

Synthetisierte DNA-Fragmente wurden mittels des *Perfectly Blunt Cloning Kits* (Novagen/Merck Millipore, Darmstadt) in einem pT7-Vektor gesichert. Das Protokoll wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

Transformation

Die Transformation von Zellen erfolgte durch Elektroporation. Dafür wurde der entsprechende Stamm zunächst aus einer Übernachtskultur in frisches LB-Medium überimpft und für 2 bis 3 h inkubiert. Nach einer anschließenden Inkubation von 30 min auf Eis wurde für jeden Transformationsansatz 1 bis 2 ml entnommen und dreimal mit eiskaltem ddH₂O gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Zellpellet in 50 µl eiskaltem ddH₂O aufgenommen und der zu transformierende DNA-Ansatz hinzugefügt. Dieser Transformationsansatz wurde in vorgekühlte Elektroporationsküvetten (Gene Pulser Küvetten mit einem Elektrodenabstand von 1 mm, Bio-Rad, München) gegeben. Mittels der angelegten Hochspannung (1,5 kV, 5 ms) im MikroPulser (Biorad, München) wurde die Membran der Zellen depolarisiert und die externe DNA konnte in die Zellen gelangen. Nach diesem Puls wurden die Zellen in 1 ml LB-Medium für 1 h regenerieren, anschließend wurden sie auf Agar-Platten mit dem gewünschten Selektionsdruck ausplattiert.

Für die Transformation eines isothermalen *in vitro* Ligationsansatzes wurde der Ansatz zunächst für 30 min auf einer Dialyse-Membran (MF-Milipore Membran aus Cellulosemischestern mit einer Porengröße von 0,025 µm, Merck Milipore, Darmstadt) von Salzen befreit.

Die Transformaten wurden mittels einer analytischen PCR auf das Plasmid getestet, bei einer Transformation eines isothermalen *in vitro* Ligationsansatzes wurde die relevanten Bereiche des Plasmides zusätzlich sequenziert.

Konjugation

Für den Transfer von Plasmiden in einen nicht-konjugationsfähigen Stamm oder zum Zwecke der Manipulation genomischer DNA wurde die Konjugationsmethode gewählt. Hierfür wurde der Donorstamm *E. coli* WM3064 und der Empfängerstamm *C. necator* H16 zunächst auf Agar-Platten kultiviert. Anschließend wurden beide Stämme auf einer LB-Agarplatte mit DAP übereinander ausgestrichen, wodurch Zell-Zell-Kontakte durch die Ausbildung von Pili ermöglicht wurde. Nach einer Inkubation von 24 h bei 30°C wurden die Zellen von der Platte abgenommen und mit LB-Medium gewaschen. Von dieser Resuspensionslösung wurden 10 µl, 50 µl und 200 µl auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert. Auf diesen Platten war nur der Empfängerstamm mit einem erfolgreich transferierten Plasmid oder erfolgreich integriertem Plasmid in das Genom in der Lage zu wachsen. Für die markerlose Deletion von Genen wurde das Plasmid in der ersten homologen Rekombination in das Genom an der entsprechenden Position eingebaut, dies konnte vor oder nach dem zu deletierendem Gen stattfinden. Für die zweite homologe Rekombination, bei der das Plasmid wieder aus dem Genom entfernt wurde, wurde der Stamm mit dem integrierten Plasmid in LB-Medium mit 25% Saccharose ohne Antibiotika über Nacht inkubiert. Von dieser Kultur wurden ebenfalls 10 µl, 50 µl und 200 µl auf LB-Agarplatten mit 25% Saccharose ohne Antibiotika ausplattiert. In Theorie können während der zweiten homologen Rekombination 50% Revertanten und 50% Deletionsmutanten entstehen.

Sowohl der Transfer des Plasmides als auch die erste und zweite homologe Rekombination wurden mittels PCR verifiziert. Die erfolgreiche Deletion eines Genes wurde zusätzlich über eine Sequenzierung bestätigt.

2.2.2.2. RNA-Methoden

Für die Isolierung von RNA aus Bakterienstämmen wurde das *RNeasy Mini* Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben verwendet. Um die Probe mit der isolierten RNA von DNA-Fragment zu reinigen, wurde anschließend diese Verunreinigung durch das *Ambion DNA-free DNAase Treatment and Removal Reagents* Kit (Thermo Fisher, Schwerte) entfernt, in dem die Inkubation bis auf 14 h ausgedehnt wurde. Die Entfernung von DNA-Verunreinigung wurde solange wiederholt, bis keine DNA in einer analytischen PCR nachgewiesen werden konnte. 5 µl der DNA-freien RNA wurde mithilfe des Kits *iScript Select cDNA Synthesis* (Bio-Rad, München) in cDNA umgeschrieben, dabei wurden die random Primer des Kits verwendet.

Für die quantitative real-time PCR (qRT-PCR) wurde der SsoAdvanced universal SYBR Green Supermix (Biorad, München) verwendet. Hierfür wurde cDNA in einem PCR-Ansatz (Tab. 26) amplifiziert. Um die Fluoreszenz vom SYBR Green messen zu können, wurde der PCR-Zykler CFX96 Real-Time PCR

Detektionssystem (BioRad, München) und einem speziellen Programm (Tab. 27) verwendet. Die Auswertung der Fluoreszenz-Daten fand mit der Software CFX-Manager, Biorad, München) statt.

Tab. 26: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für eine qRT-PCR. Als Template wurde cDNA, isolierte genomische DNA, isoliertes Plasmid oder ddH₂O als negative Kontrolle verwendet.

Komponente	Menge
2x SsoAdvanced universal SYBR Green Supermix	10 µl
4 µM Primer I	2,5 µl
4 µM Primer II	2,5 µl
Template	2 µl
ddH ₂ O	3 µl

Tab. 27: Zyklisches Protokoll für die Amplifikation von DNA mittels des SsoAdvanced universal SYBR Green Supermix.

Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
initiale Denaturierung	98°C	3 min	1
Denaturierung	98°C	15 s	30
Primer Anlagerung + Elongation	60°C	30 s	
Messung der Fluoreszenz			
Fluoreszenzmessung während der Schmelzkurve	65°C bis 95°C	0,5°C in 5s	1
Ende	4°C	∞	1

2.2.2.3. Protein-Methoden

Zellaufschluss

Für die Analyse von Proteinen in Bakterienzellen wurden zunächst die gewünschten Bakterienstämme kultiviert, anschließend bei 4°C und 9000 x g für 10 min pelletiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml 25 mM TRIS-Puffer (pH 6,8) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mit Ultraschall (Digital Sonifier 250, Branson, Danbury/USA), dafür wurden 5 ml Zellen in einem 15 ml Reaktionsgefäß im Eisbad für 0,5 s mit Ultraschall behandelt und anschließend wurde für 2,5 s pausiert. Die Zellen wurden insgesamt für dreimal 2 min mit Ultraschall behandelt. Um nicht-aufgeschlossene Zellen und restliche Zellbestandteile aus der Probe zu entfernen, wurde die Probe zweimal bei 4°C und 9000 x g für 10 min zentrifugiert und das Pellet verworfen.

Bestimmung der Protein-Konzentration

Die Protein-Konzentration wurde nach Bradford [83] bestimmt, dafür wurden verschiedene Verdünnungen der Proben mit einem Rinderserumalbumin-Standard (0, 20, 40, 60, 80 und 100 µg/ml) verglichen. Sowohl die Proben als auch die Standards wurden 1:10 mit dem Bradfordreagenz (Tab. 28) versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurde die Absorption bei 595 nm gemessen (iMark Microplate Reader und Microplate Manager 6 Software, Bio-Rad, München). Anhand einer Standardkurve ließ sich die Protein-Konzentration der Proben bestimmen.

Tab. 28: Zusammensetzung der Bradfordreagenz. Die einzelnen Bestandteile müssen in der angegebenen Reihenfolge (von oben nach unten) gemischt werden.

Komponente	Menge
Coomassie-Brilliant-Blau G-250	100 mg
85% Phosphorsäure	100 ml
96% Ethanol	50 ml
H ₂ O	add 1000 ml

Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte über eine diskontinuierliche SDS (Natriumdodecylsulfat)-Polyacrylamid Elektrophorese nach Laemmli [84]. Für jede Probe wurden 20 µg Proteine mit 5x Laemmli-Puffer (Tab. 29) gemischt und für 10 min bei 95°C inkubiert.

Tab. 29: Zusammensetzung des 5x Laemmli-Puffers.

Komponente	Menge
0,5 M Tris/HCl (pH 6,8)	5 ml
SDS	2 g
Glycerin	4 g
β-Mercaptoethanol	5 ml
1% Bromophenol Blau	1,25 ml
ddH ₂ O	add 20 ml

In die Laufkammer wurde das SDS-Gel (Mini-PROTEAN TGX Precast Polyacrylamide Gels, Biorad, München) eingespannt und die Kammer mit Laufpuffer (Tab. 30) befüllt. Anschließend wurde das SDS-Gel mit den Proben (20 µg) und dem Blue Prestained Protein Marker (Nippon Genetics Europe, Düren) als Größenvergleich beladen und eine Spannung von zunächst 100 V angelegt. Nach Erreichen des Trenngels wurde die Spannung auf 150 V erhöht.

Tab. 30: Zusammensetzung des Laufpuffers.

Komponente	Menge
Tris/HCl (pH 8,8)	3 g/l
SDS	1 g/l
Glycerin	14,4 g/l

Coomassie-Färbung

Nach der Auftrennung der Proteine im Polyacrylamid-Gel wurde die Proteine mit dem Coomassie-Brilliant-Blau-Farbstoff angefärbt [85]. Dazu wurde das Gel mit der Lösung Instant Blue (Expedeon/Biozol Diagnostica, Echingen) für 15 min bis 16 h inkubiert. Während dieser Inkubation wurden Fotoaufnahmen (Gel Doc XR System mit der Software Image Lab, Biorad, München) gemacht.

Proteomics

Die Proteom-Analysen wurden von der Kooperationspartnerin Julia Novion Ducassou (Exploring the Dynamics of Proteomes, Grenoble/Frankreich) durchgeführt.

Vorbereitung und in-Gel Verdau der Proteine: Extrahierte Proteine wurden in Laemmli Puffer (Tab. 29) gelöst und anschließend in einem 4-12% NuPAGE Gel (Invitrogen, Illkirch-Grafenstaden/Frankreich) aufgetrennt. Nach der Färbung mit R-250 Coomassie Blau (Biorad, Schiltigheim/Frankreich) wurden die gefärbten Protein-Banden ausgeschnitten und mit 25 mM NH_4HCO_3 für 15 min gewaschen. Nach dreimaligen Waschen mit 25mM NH_4HCO_3 und 50% (v/v) Acetonitril für 15 min wurden die Gelstücke mit 100% Acetonitril dehydriert. Darauf folgten zwei Inkubationsschritte, zunächst für 45 min bei 53°C mit 10 mM Dithiothreitol in 25 mM NH_4HCO_3 und für 35 min im Dunkeln mit 55 mM Iodacetamid in 25 mM NH_4HCO_3 . Die Alkylierungsreaktion wurde mit 10 mM Dithiothreitol in 25 mM NH_4HCO_3 durch eine 10 minütige Inkubation gestoppt. Anschließend wurden die Gelstücke mit 25 mM NH_4HCO_3 gewaschen und zwei Mal mit 100% Acetonitril dehydriert. Trypsin (modifiziert, Sequenzierungsreinheit, Promega, Charbonnières les Bains/Frankreich) in 25 mM NH_4HCO_3 wurde vor der Inkubation über Nacht bei 37°C hinzugefügt. Die Peptide wurden aus den Gelstücken durch wiederholende Extraktionsschritte (je 15 min) extrahiert: 30 μl 50% Acetonitril, 30 μl 5% Ameisensäure und zwei Mal 30 μl 100% Acetonitril (vier Zyklen). Die zusammengefassten Überstände wurden mit Vakuum getrocknet.

Analyse mittels nanoLC-MS/MS: Die getrockneten Peptide wurden in 5% Acetonitril und 0,1% Trifluoressigsäure resuspendiert und anschließend durch die online nanoLC-MS/MS (Ultimate 3000 RSLCnano und Q-Exactive HF, Thermo Scientific, Illkirch-Grafenstaden/Frankreich) und einen

180 min Gradient analysiert. Hierfür wurden die Peptide in einer Vorsäule (300 µm x 5 mm PepMap C18, Thermo Scientific, Illkirch-Grafenstaden/Frankreich) gesammelt und in einer 75 µm x 250 mm C18 Säule (Reprosil-Pur 120 C18-AQ, 1,9 µm, Dr. Maisch, Ammerbuch-Entringen) separiert. Die MS- und MS/MS-Daten wurden durch Xcalibur (Version 4.1.31.9 Thermo Scientific, Illkirch-Grafenstaden/Frankreich) erfasst. Peptide und Proteine wurde durch Mascot (Version 2.6.0) mit der Uniport Datenbank (*Cupriavidus necator* H16, Stamm ATCC 17699 / H16 / DSM 428 / Stanier 337), einer Datenbank mit zwei Proteinen von *B. subtilis* (Q04777 und A0A164VDR0), einer eigenen Kontaminations-Datenbank und den dazugehörigen reversen Datenbank identifiziert. Die Software Proline³ (Version 2.0) wurden für die Aufstellung, Gruppierung und Filtern der Ergebnisse (Konservierung der Proteine auf Platz 1, Peptidlänge ≥ 7 Aminosäuren, Peptididentifikation FDR $< 1\%$ der berechneten Peptid-Wert durch die reverse Datenbank-Strategie, Minimum der Peptid-Werte 25, Minimum der spezifischen Peptide pro identifizierte Protein-Gruppe 1) verwendet.

Statistische Auswertung: Diese Auswertung wurde mithilfe der Software ProStar (Version 1.14) [86] durchgeführt. Kontaminationen und Proteine mit einem Quantifikations-Wert < 3 in einer Bedingung wurden entfernt. Nach der \log_2 -Umrechnung wurden die Werte der Häufigkeit durch die vsn Methode normalisiert. Die statistischen Berechnungen wurden mit *limma* durchgeführt, wobei unterschiedlich exprimierte Proteine nach der p-Wert-Berechnung mit der Benjamini-Hochberg Methodik (FDR 1%) bestimmt wurden.

2.2.3. Analytische Methoden

2.2.3.1. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Mithilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, englisch: high performance liquid chromatography) können Substanzen in einer Probe voneinander getrennt und mithilfe von Standards quantifiziert werden. Für die Bestimmung der Konzentration von Fructose, Acetoin und 2,3-Butandiol wurden die Proben für die HPLC-Analyse vorbereitet, dafür wurden die Proben zunächst für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit (Tischzentrifuge 5418, Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert. 150 µl des Überstandes wurden mittels einer 0,2 µm PTFE Membran (VWR, Darmstadt) gefiltert und in einer 96 Well-Platte mit 15 µl 0,5 M Schwefelsäure angesäuert. Die Probe wurde auf einer Aminex HPX-87H Säule (BioRad, München) bei 60°C aufgetrennt. 5 mM Schwefelsäure wurde als Laufmittel mit einem

³ <http://proline.profi-proteomics.fr>

Fluss von 0,6 ml/min verwendet. Der Detektor für den Brechungsindex RefractoMax 520 (ERC, Riemerling) in der Dionex UltiMate 3000 HPLC (Thermo Scientific, Waltham/USA) wurde für die Analyse für Fructose, Acetoin und 2,3-Butanediol verwendet. Die Chromatogramme wurde mithilfe der Software Chromeleon 7 (Thermo Scientific, Waltham/USA) und Standards (0, 1, 3, 5, 10 und 20 mM) für die alle Substanzen ausgewertet.

2.2.3.2. Acetoin-Test

Die Konzentration von Acetoin konnte auch mittels einer Farbreaktion nach Voges und Proskauer [87] und optimiert durch Barritt [88] bestimmt werden, wenn in den Proben kein 2,3-Butanediol vorhanden war. Dafür wurde von den pelletierten Proben 20 µl des Überstandes in eine 96 Well-Platte pipettiert und 140 µl der Lösung (Tab. 31) dazugeben. Diese Reaktion inkubierte für 20 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Absorption bei 490 nm (iMark Microplate Reader und Microplate Manager 6 Software, Bio-Rad, München) gemessen. Anhand einer Standardkurve (0, 0,5, 1, 3, 5 mM) ließ sich die Acetoin-Konzentration der Proben bestimmen.

Tab. 31: Lösung für den Acetoin-Test nach Voges und Proskauer [87] und optimiert durch Barritt [88]. Die einzelnen Bestandteile müssen in der angegebenen Reihenfolge (von oben nach unten) gemischt werden. Die α -Naphthol-Ethanol-Lösung wurden für jede 96 Well-Platte frisch angesetzt.

Komponente	Menge
ddH ₂ O	10 ml
10 mg/ml L-Arginin	1,4 ml
50 mg/ml α -Naphthol in Ethanol	1 ml
40% KOH	1 ml

2.2.3.3. Gaschromatographie

Mithilfe der Gaschromatographie (GC) können Gase und verdampfbare Substanzen getrennt und mithilfe von Standards quantifiziert werden. In dieser Arbeit wurden mittels der GC Gas-Zusammensetzungen bestimmt. Dafür wurden aus einem Gasraum Proben mittels einer Pumpe auf die zwei Säulen (10 m MS5A und 10 m PPQ, Agilent Technologies Deutschland, Waldbronn) der 490 Micro GC (Agilent Technologies Deutschland, Waldbronn) transportiert. Mittels der in Tab. 32 beschriebenen Methoden wurden die Konzentrationen der Gase H₂, O₂, N₂, CO₂ und CH₄ bestimmt. Nach einer Stabilisierungszeit von 5 s wurden für 20 s (autotrophe Flaschen) oder für 120 s (Elektrolyse-Zelle) Proben angepumpt. Die Temperatur der Messgasleitung und des Injektors lagen bei 110°C und die Injektordauer wurde auf 50 ms eingestellt. Mithilfe der Software MikroGC (online) (Agilent Technologies Deutschland, Waldbronn) und den Standards (H₂: 0%, 1% und 80%, O₂: 0% und 21%, N₂: 0%, 78%, 80%, 97% und 100%, CH₄: 0% und 1%, CO₂: 0%, 1% und 20%) wurden die Chromatogramme

ausgewertet. Es war zu beachten, dass nur Proben entnommen wurden, wenn der Druck im Gefäß auf Normaldruck eingestellt wurde.

Tab. 32: Methode der GC.

Parameter	10 m MS5A-Säule	10 m PPQ-Säule
analysierbare Gase	H ₂ , O ₂ , N ₂	CO ₂ , CH ₄
Trägergas	Argon	Helium
Temperatur der Säule	70°C	45°C
Druck der Säule	150 kPa	150 kPa

2.2.3.4. Analyse von PHB

Für die relative Analyse von PHB wurden zwei Methoden gewählt, eine photometrische Messung mithilfe einer Nilrot Färbung und eine bildgebende Methode. Für die photometrische Analyse wurden 150 µl Zellsuspension mit einer OD₆₀₀ von 1,0 mit 50 µl Nilrot-Lösung (2 µg/ml in DMSO) für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Zelldichte der Proben wurde bei 600 nm überprüft. Für die Nilrot-Messung wurden die Proben mit einer Wellenlänge von 530 nm angeregt und die Emission bei 575 nm gemessen. Dafür wurde das photometrische Plattenlesegerät infinite M200 Pro (Tecan, Männedorf/Schweiz) und die Software iControl (Tecan, Männedorf/Schweiz) verwendet.

Für die bildgebende Methode wurde 1 ml einer Bakterienkultur pelletiert und in 150 µl PBS-Lösung (Tab. 33) aufgenommen. Nach einer Inkubation mit 50 µl Nilrot (2 µg/ml in DMSO) für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln wurden 40 µl 4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, 10 µg/ml) hinzugefügt und für weitere 10 min unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 150 µl PBS gewaschen. Die Proben wurden mithilfe eines Leica DM 5500B Mikroskop (Objektivlinse 100x: HCX PL FLUOTAR, 1.4, Ölimmersion; Okularlinse 10x: HC PLAN s (25) M; Leica, Wetzlar) analysiert. Bilder wurde mit der Kamera Leica DFC 360 FX (Leica, Wetzlar) und der dazugehörigen Software Leica LAS AF Lite (Leica, Wetzlar) gemacht.

Tab. 33: Zusammensetzung der PBS-Lösung.

Komponente	Konzentration
NaCl	138 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
KH ₂ PO ₄	1,7 mM

2.2.4. Berechnung der Ausbeuten

2.2.4.1. Wachstumsrate

Wachstumsraten wurden anhand der Formel 1 berechnet, dafür wurde für das Wachstum der PHB-Mutanten der Zeitraum von 7 bis 17 h gewählt und für die Ansätze im Fermenter zur Bestimmung der optimalen O₂-Konzentration der Zeitraum von 15 bis 24 h mit Begasung der jeweiligen Gasmischung.

Formel 1: Berechnung der Wachstumsrate μ . Für den Inhalt der eckigen Klammern wurden die ermittelten Werte eingesetzt, der Zeitpunkt nach der eckigen Klammer dient der Erklärung, zu welchem Zeitpunkt der Wert genommen wurde.

$$\mu = \frac{[\ln(OD_{600})]_{t_1} - [\ln(OD_{600})]_{t_0}}{[t_1 \text{ in h}] - [t_0 \text{ in h}]}$$

2.2.4.2. Kohlenstoff-Ausbeute unter heterotrophen Bedingungen

Unter heterotrophen Bedingungen wurde 1 mol Fructose über 2 mol Pyruvat in 1 mol Acetoin und 2 mol CO₂ umgesetzt. Unter der Annahme, dass die RubisCO nur schwach exprimiert wird [89], ist eine Verwertung von dem entstandenen CO₂ nicht berücksichtigt. Daher wurde bei einer optimalen Umsetzung davon ausgegangen, dass aus 1 mol Fructose 1 mol Acetoin entsteht (Formel 2). Bei der 100%igen Reduktion von Acetoin in 2,3-Butandiol ist ebenfalls von einer Umsetzung von 1:1 auszugehen.

Formel 2: Berechnung der Ausbeute unter heterotrophen Bedingungen. Produkt steht dabei für Acetoin, 2,3-Butandiol oder für beide Endprodukte. t_0 steht für die Werte bei dem ersten Zeitpunkt und t_{ENDE} für die Messwerte beim letzten Zeitpunkt dieses Experimentes. Für weitere Erklärungen siehe Beschreibung Formel 1.

$$Ausbeute = \frac{[Produkt \text{ in mM}]}{[theoretisches Produktmaximum \text{ in mM}]}$$

$$Produkt \text{ in mM} = [Produkt \text{ in mM}]_{t_{ENDE}} - [Produkt \text{ in mM}]_{t_0}$$

$$theoretisches Produktmaximum \text{ in mM} = [Fructose \text{ in mM}]_{t_0} - [Fructose \text{ in mM}]_{t_{ENDE}}$$

2.2.4.3. Kohlenstoff-Ausbeute unter autotrophen Bedingungen

Unter autotrophen Bedingungen werden 6 mol CO₂ fixiert, um 2 mol Pyruvat zu produzieren. Diese 2 mol Pyruvat werden in 1 mol Acetoin bzw. 1 mol 2,3-Butandiol und 2 mol CO₂ umgewandelt. Unter autotrophen Bedingungen wurde davon ausgegangen, dass das entstandene CO₂ wieder fixiert wurde (Formel 3).

Formel 3: Berechnung der Ausbeute unter autotrophen Bedingungen. Für V_{Medium} wurden 0,05 l eingesetzt und für V_{Gas} 1,051 l. 24,5 l/mol ist die Annahme von idealen Gasen unter Standardbedingungen. Der Faktor 1000 ist für die Umrechnung von mol in mmol. Für weitere Erklärungen siehe Beschreibung Formel 2.

$$\text{Ausbeute} = \frac{[\text{Produkt in mmol}]}{[\text{verbrauchtes CO}_2 \text{ in mmol}]}$$

$$\text{Produkt in mmol} = ([\text{Produkt in mM}] t_{\text{ENDE}} - [\text{Produkt in mM}] t_0) \times V_{\text{Medium}}$$

$$\text{verbrauchtes CO}_2 \text{ in mmol} = \frac{([\text{CO}_2 \text{ in \%}] t_0 - [\text{CO}_2 \text{ in \%}] t_n) \times V_{\text{Gas}} \times 1000}{24,5 \frac{\text{l}}{\text{mol}}}$$

2.2.5. Elektrochemische Methoden

Für elektrochemische Methoden wurden der Potentiostat PGSTAT 204 (Metrohm Autolab, Utrecht/Niederlande) mit dem 10 A current Booster (Metrohm Autolab, Utrecht/Niederlande) verwendet und mithilfe der Software Nova 2.1 (Metrohm Autolab, Utrecht/Niederlande) gesteuert und die Messdaten ausgewertet. Dabei wurden die Anoden als Gegenelektrode und die Kathoden als Arbeitselektroden angeschlossen. Die Elektrolyse-Zelle wurde mit Medium (Tab. 34) gefüllt.

Tab. 34: Medium für die Elektrolyse-Zelle. Der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt.

Komponente	Konzentration
KH ₂ PO ₄	0,42 g/l
K ₂ HPO ₄	0,22 g/l
NH ₄ Cl	0,2 g/l
KCl	0,38 g/l
NaCl	0,36 g/l
Na ₂ CO ₃	0,5 g/l

2.2.5.1. Linearer Sweep

Um die Stromproduktion bzw. den Stromverbrauch in Abhängigkeit des Potentials zu verfolgen, wurde ein linearer Sweep durchgeführt. Folgende Einstellungen wurden für den linear sweep voltammetry potentiostatic verwendet: Autolab control (mode: potentiostatic, current range: 10 A, bandwidth: high stability), Apply 0 V (vs. V_{REF}), Cell on, wait 5 s, LSV staircase (start potential 0 V vs. V_{REF} , end potential -2 V vs. V_{REF} , scan rate 5E -05 V/s, step 0,00244 V, options automatic current range WE(1) disabled), Cell off.

2.2.5.2. Chronoamperometrie

Um die Stromproduktion bzw. den Stromverbrauch bei einem konstanten Potential über einen Zeitraum verfolgen zu können, wurde die Methode der Chronoamperometrie angewandt. Dabei wurden folgende Einstellungen festgelegt: Autolab control (mode: potentiostatic, current range: 10 A, bandwidth: high stability), Apply -1 V (vs. V_{REF}), Cell on, Record signals (duration 86400 s, interval time 10 s, options automatic current range WE(1) disabled), Cell off.

3. Ergebnisse

3.1. Acetoin-Produktion mit *C. necator* H16

Um eine hinreichende Effektivität von *C. necator* H16 als Produzent der Plattformchemikalie Acetoin sicherzustellen, wurde in einem ersten Experiment die Verwendung von Acetoin als Kohlenstoffquelle durch den Stamm getestet. Dafür wurde *C. necator* H16 wt in Minimal-Medium mit 10 mM Acetoin kultiviert. In einem Kontrollexperiment wurden 10 mM Fructose als Referenzkohlenstoffquelle eingesetzt. Die OD_{600} wurde zu Beginn des Wachstums auf 0,05 eingestellt. Der auf Fructose wachsende Wildtyp-Stamm zeigte nach einer lag-Phase von 7 h ein exponentielles Wachstum bis zu einer OD_{600} von 2,0 (Abb. 13). Derselbe Stamm zeigte mit Acetoin als einzige Kohlenstoffquelle eine verlängerte lag-Phase und erreichte nach etwa 21 h eine OD_{600} von knapp 1,5.

Diese Wachstumsverhalten mit Acetoin als Kohlenstoffquelle ließ sich auf die Enzyme AcoABC zurückführen, welche Acetoin in Acetaldehyd und Acetyl-CoA umwandeln [31, 44, 90]. Aufgrund dessen wurde das Operon *acoABC* mithilfe des Suizidvektors pMQ150 deletiert und das Wachstumsverhalten der Deletionsmutante erneut mit den beiden Kohlenstoffquellen untersucht. Der Stamm mit der Deletion von *acoABC* zeigte beim Wachstum mit Fructose als einziger Kohlenstoffquelle eine ähnlich Zunahme der Zelldichte wie der Wildtyp Stamm, wohingegen die Deletionsmutante in Minimal-Medium mit Acetoin nach 24 h kein Wachstum zeigte (Abb. 13).

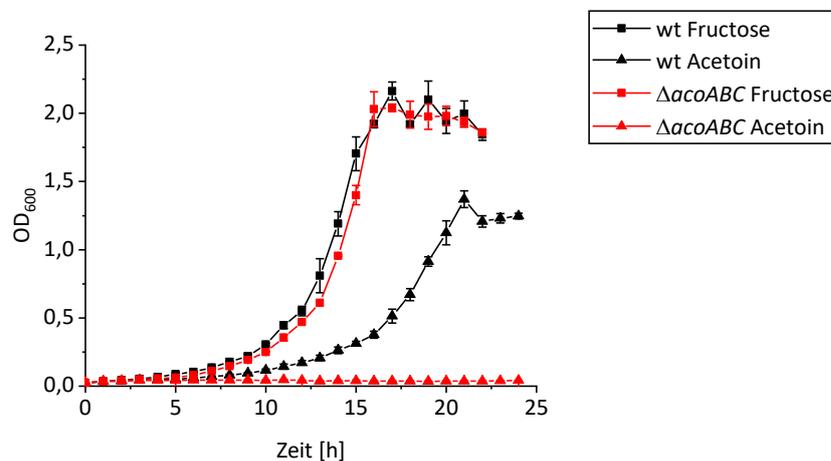


Abb. 13: Wachstum von *C. necator* H16 wt und der Deletionsmutante *C. necator* H16_ΔacoABC. Diese Stämme wurden in Erlenmeyerkolben mit 100 ml Minimal-Medium 81 mit 10 mM Fructose oder 10 mM Acetoin bei 30°C und 180 rpm kultiviert. Die Standardabweichung der Triplikate ist mithilfe der Fehlerbalken dargestellt. Schwarzes Quadrat: *C. necator* H16 wt mit Fructose, Schwarzes Dreieck: *C. necator* H16 wt mit Acetoin, rotes Quadrat: *C. necator* H16_ΔacoABC mit Fructose, rotes Dreieck: *C. necator* H16_ΔacoABC mit Acetoin (verändert nach [74]).

Um möglichst hohe Ausbeuten bei der Acetoin-Produktion zu erreichen, war es notwendig, mit einem Stamm zu arbeiten, der nicht mehr in der Lage war, Acetoin zu metabolisieren. Dies wurde durch die Deletion von *acoABC* erreicht. Als Produktionsstrategie für Acetoin wurde die Überexpression der Gene *alsSD* vom Plasmid gewählt, um möglichst hohe Enzym-Konzentrationen zu erhalten, die zielgerichtet das zentrale Stoffwechselintermediat Pyruvat in Acetoin umsetzen. Für diesen Zweck wurde das Plasmid pKRrha-eGFP von Sydow et al. gewählt, da es bereits erfolgreich in *C. necator* H16 eingesetzt wurde [77]. Dieses Plasmid besaß neben einer *mobility* Region und *origin of replication* Region von dem broad-host-range Plasmid RSF1010, eine Tetrazyklin-Resistenz und ein Rhamnose-induzierbares GFP. Hinter den Rhamnose-induzierbaren Promotor wurden die für *C. necator* Codon-optimierten Gene *alsSD* anstelle des GFPs mittels isothermaler *in vitro* Ligation nach Gibson et al. [82] kloniert, um das Plasmid pKRrha-*alsSD* zu erhalten. Um die Acetoin-Produktion in Abhängigkeit des Promotors untersuchen zu können, wurden sowohl der Rhamnose-induzierbare Promotor als auch seine beiden Regulatoren RhaSR durch zwei weitere Promotorsysteme ausgetauscht. Das zweite Promotorsystem konnte durch den Induktor Arabinose gesteuert werden. Hierfür wurde der Promotorbereich und der Repressor AraC vom pBAD Plasmid amplifiziert und ersetzte den vollständigen Rhamnose-induzierbaren Promotorbereich, um so das Plasmid pKRara-*alsSD* zu erhalten. Der dritte Promotor ist ein nativer Promotor von *C. necator* H16, welcher natürlicherweise für die Expression der Gene für die PHB-Produktion (*phaCAB*) zuständig ist. Dieser Promotor ist als konstitutiv beschrieben [62, 63]. Um das dritte Expressionsplasmid pKRphb-*alsSD* zu erhalten, wurden 2000 bp vor dem Operon *phaCAB* amplifiziert und als Promotorbereich vor die Gene *alsSD* auf das Plasmid kloniert.

In den folgenden Versuchen wird der Stamm *C. necator* H16_Δ*acoABC*_pKRara-*alsSD* mit „ara-Acetoin“ für den nicht-induzierten Arabinose-Promotor vor den Acetoin-Genen abgekürzt, wobei derselbe Stamm mit dem induzierten Promotor mit „Ara-Acetoin“ abgekürzt wird. Dieses Prinzip wird sowohl auf den Stamm mit dem Rhamnose-induzierbaren Promotor („rha-Acetoin“ bzw. „Rha-Acetoin“) als auch mit dem konstitutiven Promotor („phb-Acetoin“) übertragen.

3.1.1. Bestimmung der optimalen Induktorkonzentrationen

Bei induzierbaren Promotorsystemen hängt die Expression der Gene von der Induktor-Konzentration ab. Um die optimale Induktor-Konzentration für die Expression der Gene *alsSD* zu bestimmen, wurden unterschiedliche Konzentrationen getestet.

Für das Arabinose-induzierbare System wurden Konzentrationen zwischen 0 und 10 mM Arabinose getestet, in dem der Stamm ara-Acetoin in Reagenzgläsern mit 5 ml Minimal-Medium und 10 mM Fructose kultiviert wurde. Die Start-OD₆₀₀ betrug jeweils 0,6. Die Kulturen mit geringen

Induktorkonzentrationen (1 μM , 5 μM und 10 μM) zeigten kein verändertes Verhalten im Vergleich zu dem Stamm mit dem nicht-induzierten Promotor (0 μM) (Abb. 14). Die drei Stämme mit einer Induktorkonzentration zwischen 50 und 500 μM zeigten ein reduziertes Wachstum und eine gesteigerte Acetoin-Produktion im Vergleich zu den Stämmen mit den „nicht-induzierten“ Promotoren. Die höchsten Acetoin-Konzentrationen wurden für die Kulturen mit Arabinose-Konzentrationen zwischen 1 und 10 mM gemessen, dabei zeigten die Stämme ein minimales Wachstum. Aufgrund dessen wurde 1,5 mM Arabinose als optimaler Induktor für das Plasmid pKRara-*alsSD* ausgewählt und alle weiteren Experimente mit diesem Plasmid dementsprechend induziert.

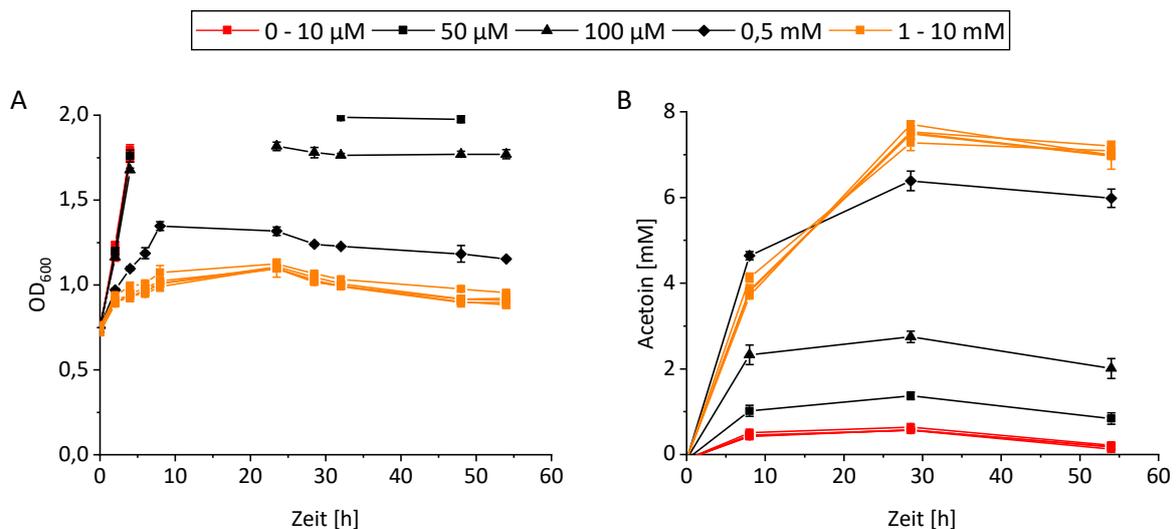


Abb. 14: Bestimmung der optimalen Arabinose-Konzentration als Induktor für das Plasmid pKRara-*alsSD*. Der Stamm *ara-Acetoin* wurde in Reagenzgläsern mit 5 ml Minimal-Medium 81 und 10 mM Fructose bei 30°C und 180 rpm kultiviert. Die OD₆₀₀-Messung fand mit dem Photometer Ultrospec 10 Cell Density Meter statt, in dem zwar eine direkte Messung möglich war, allerdings nur bis zu einer maximalen OD₆₀₀ von 2,0. Die Standardabweichung der Triplikate ist mithilfe der Fehlerbalken dargestellt. Die Abbildung zeigt das Wachstum (A) und die Acetoin-Produktion (B). Rotes Quadrat: 0 μM , 1 μM , 5 μM , 10 μM Arabinose, schwarzes Quadrat: 50 μM Arabinose, schwarzes Dreieck: 100 μM Arabinose, schwarze Raute: 0,5 mM Arabinose, oranges Quadrat: 1 mM, 1,5 mM, 3 mM, 5 mM, 10 mM Arabinose (verändert nach [74]).

Für das zweite induzierbare Promotorsystem wurden Rhamnose-Konzentrationen von 0 bis 1,5 mM getestet, dabei wurde der Stamm *rha-Acetoin* ebenfalls in Reagenzgläsern mit 5 ml Minimal Medium und 10 mM Fructose inkubiert. Rhamnose-Konzentrationen bis zu 10 μM entsprachen dem Verhalten des nicht-induzierten Stammes (Abb. 15). Die beiden Stämme mit einer Konzentration von 50 und 100 μM zeigten ein geringeres Wachstum und eine gesteigerte Acetoin-Produktion. Die Stämme mit den vollinduzierten Promotoren (0,5 bis 1,5 mM Rhamnose) zeigten das geringste Wachstum und korrelierend dazu die höchste Acetoin-Konzentration. Somit stellte sich als optimale Rhamnose-Konzentration 1 mM für die Induktion des Promotors auf dem Plasmid pKRrha-*alsSD* heraus. In allen weiteren Experimenten wurde dieser Promotor mit 1 mM Rhamnose induziert.

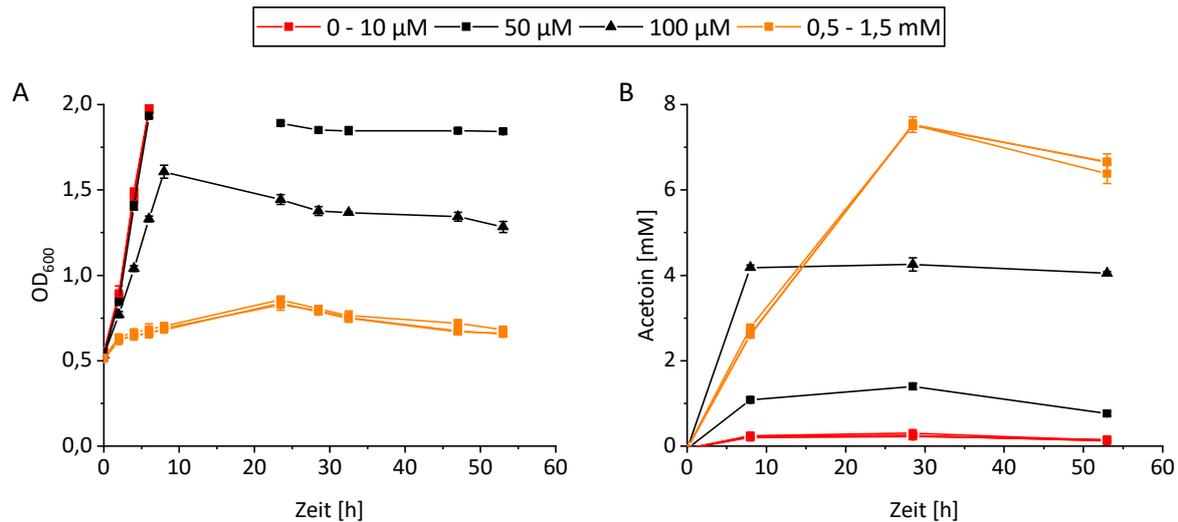


Abb. 15: Bestimmung der optimalen Rhamnose-Konzentration als Induktor für das Plasmid pKRrha-*alsSD*. Der Stamm rha-Acetoin wurde in Reagenzgläsern mit 5 ml Minimal-Medium 81 und 10 mM Fructose bei 30°C und 180 rpm kultiviert. Die OD₆₀₀-Messung fand mit dem Photometer Ultrospec 10 Cell Density Meter statt, in dem zwar eine direkte Messung möglich war, allerdings nur bis zu einer maximalen OD₆₀₀ von 2,0. Die Standardabweichung der Triplikate ist mithilfe der Fehlerbalken dargestellt. Die Abbildung zeigt das Wachstum (A) und die Acetoin-Produktion (B). Rotes Quadrat: 0 µM, 1 µM, 5 µM, 10 µM Rhamnose, schwarzes Quadrat: 50 µM Rhamnose, schwarzes Dreieck: 100 µM Rhamnose, oranges Quadrat: 0,5 mM, 1 mM, 1,5 mM Rhamnose (verändert nach [74]).

3.1.2. Acetoin-Produktion ausgehend von drei verschiedenen Promotoren

Der Einfluss der unterschiedlichen Promotoren auf die Acetoin-Produktion wurde in dem Stamm *C. necator* H16_Δ*acoABC* untersucht. Dafür wurden die drei Plasmide pKRphb-*alsSD*, pKRara-*alsSD* und pKRrha-*alsSD* in dem Deletionsstamm in Minimal-Medium mit Fructose kultiviert. Die beiden induzierbaren Promotoren wurden sowohl ohne als auch mit Induktor analysiert. Die Start-OD₆₀₀ wurde auf 0,6 eingestellt. Für das Wachstum zeigten die beiden Stämme ara-Acetoin und rha-Acetoin als auch der Stamm phb-Acetoin ein sehr ähnliches Verhalten: Alle drei Stämme erreichten eine OD₆₀₀ von über 2,0, wohingegen die Acetoin-Konzentration von den Stämme ara-Acetoin und rha-Acetoin bei 0,3 mM und für den Stamm phb-Acetoin bei 1,3 mM lag (Abb. 16). Die beiden induzierten Stämme Ara-Acetoin und Rha-Acetoin zeigten ein ähnlich geringes Wachstum mit einer maximalen OD₆₀₀ von 0,7. Sowohl bei der Acetoin-Produktion als auch bei dem Fructose-Verbrauch unterscheiden sich diese beiden Stämme. Der Stamm Rha-Acetoin produzierte mit 8,5 mM die höchste Acetoin-Konzentration in diesem Versuch, daneben zeigte der Stamm Ara-Acetoin eine Produktion von 5,8 mM. Dieser Stamm metabolisierte im Gegensatz zu allen anderen Stämmen die Fructose nicht vollständig (4,4 mM Rest).

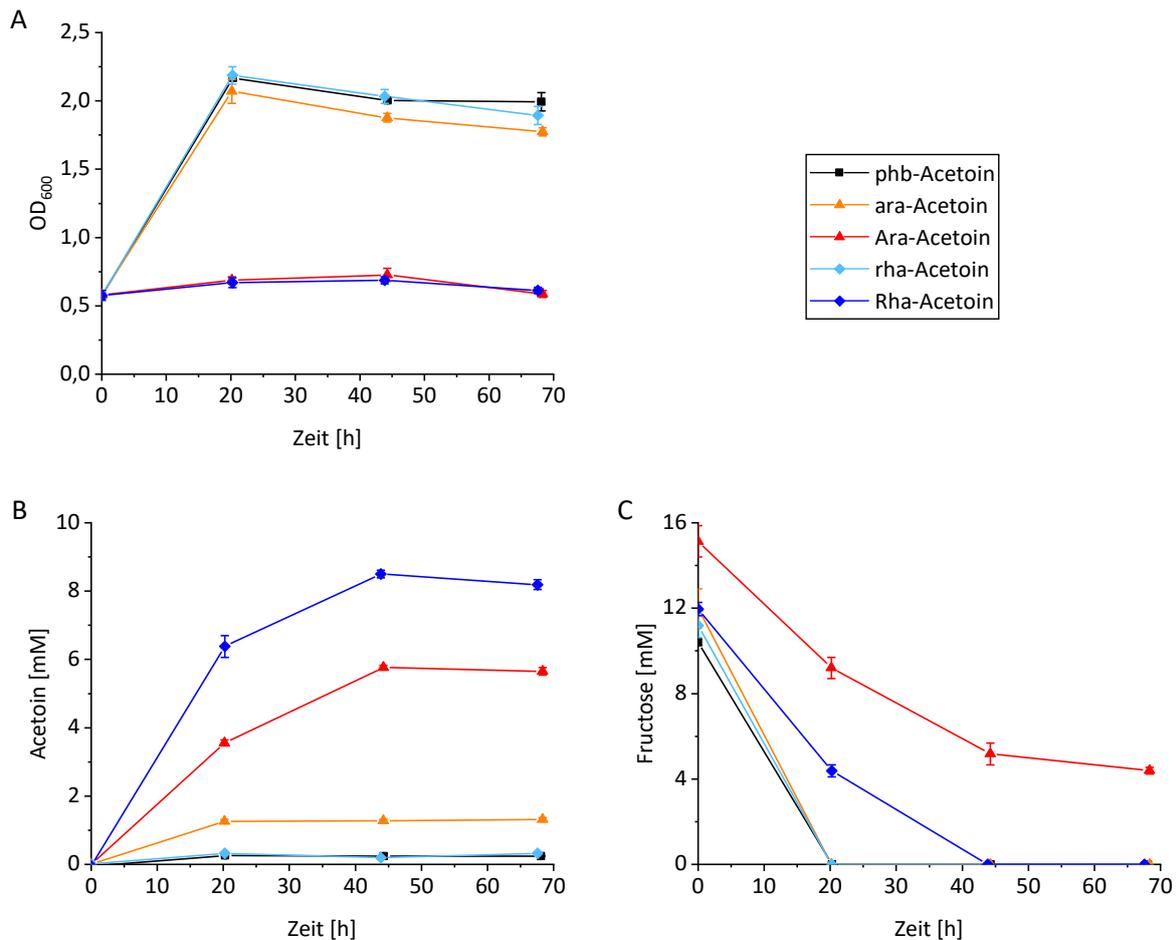


Abb. 16: Acetoin-Produktion ausgehend von drei verschiedenen Promotoren. Der Stamm *C. necator* H16_ΔacoABC wurde entweder mit Plasmid pKRphb-alsSD (phb-Acetoin, schwarzes Quadrat), pKRara-alsSD (ara-Acetoin, oranges Dreieck: nicht induziert, rotes Dreieck: induziert) oder pKRrha-alsSD (rha-Acetoin, hellblaue Raute: nicht induziert, blaue Raute: induziert) in Erlenmeyer-Kolben mit 100 ml Minimal-Medium 81 mit Fructose als Kohlenstoffquelle bei 30°C und 180 rpm kultiviert. Die Standardabweichung der Triplikate ist mithilfe der Fehlerbalken dargestellt. Die Abbildung zeigt das Wachstum (A), die Acetoin-Produktion (B) und den Fructose-Verbrauch (C) (verändert nach [74]).

3.2. Einfluss der PHB-Synthasen

3.2.1. Einfluss der PHB-Synthasen auf den Metabolismus

C. necator H16 ist in der Lage die Kohlenstoffquellen in seiner Umgebung in PHB zwischen zu lagern und diese bei Bedarf zu nutzen. Dieser Stamm kann bis zu 87% seiner Zelltrochsenmasse in Form von PHB speichern [61], daher ist es relevant, den Einfluss der PHB-Synthasen sowohl auf den Metabolismus als auch auf die Acetoin-Produktion zu untersuchen. Dafür wurden die Gene der beiden hypothetischen PHB-Synthasen PhaC1 und PhaC2 [31] mithilfe des Suizidvektor pMQ150 deletiert. Dabei entstanden sowohl die Einzel-Deletionsmutanten *C. necator* H16_ΔphaC1 und *C. necator* H16_ΔphaC2, sowie die Doppelmutante *C. necator* H16_ΔphaC1_ΔphaC2. Das Wachstum dieser drei

Mutanten wurde mit dem Wildtyp-Stamm verglichen. Dafür wurde Minimal-Medium mit Fructose auf eine Start-OD₆₀₀ von 0,03 angeimpft. Jeweils zwei Stämme zeigten ein ähnliches Wachstumsverhalten (Abb. 17). Der Wildtyp-Stamm und der Stamm mit der Deletion von *phaC2* zeigten ein etwas schnelleres Wachstum (*C. necator* H16 wt: $\mu=0,303 \text{ h}^{-1}$, *C. necator* H16_Δ*phaC2*: $\mu=0,296 \text{ h}^{-1}$) und eine höhere finale OD₆₀₀ von 2,1 nach 17 h. Die beiden Stämme mit der Deletion von *phaC1* wuchsen mit einer Rate von $\mu=0,282 \text{ h}^{-1}$ (*C. necator* H16_Δ*phaC1*) und $\mu=0,277 \text{ h}^{-1}$ (*C. necator* H16_Δ*phaC1*_Δ*phaC2*) und erreichten nach 19 h die maximale OD₆₀₀ von 2,0.

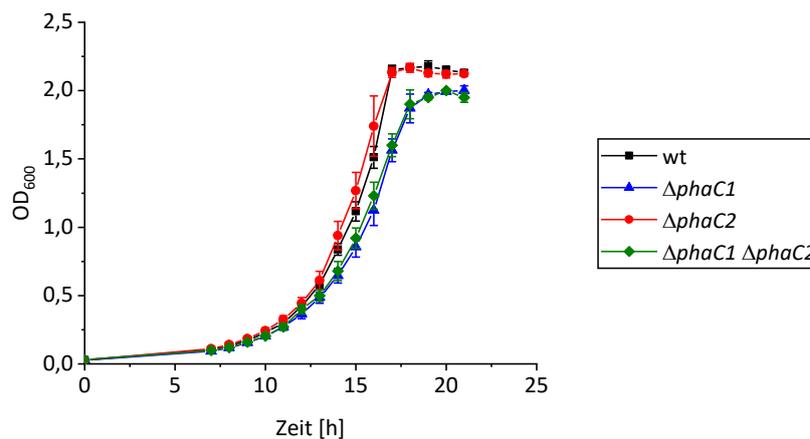


Abb. 17: Einfluss der PHB-Synthesen auf das Wachstum. Die Stämme *C. necator* H16 wt (schwarzes Quadrat), *C. necator* H16_Δ*phaC1* (blaues Dreieck), *C. necator* H16_Δ*phaC2* (roter Kreis) und *C. necator* H16_Δ*phaC1*_Δ*phaC2* (grüne Raute) wurden in Erlenmeyer-Kolben mit 100 ml Minimal-Medium 81 und 10 mM Fructose bei 30°C und 180 rpm kultiviert. Die Standardabweichung der Triplikate ist mithilfe der Fehlerbalken dargestellt.

Der Einfluss der PHB-Synthesen wurde neben dem Effekt auf das Wachstum ebenfalls auf die Fähigkeit zur Produktion von PHB untersucht. Dafür wurden die Zellen mit Nilrot (im Verhältnis 4:1 Zellsuspension:Nilrot-Lösung (2 μg/ml in DMSO)) für 30 min inkubiert und anschließend wurde das Vorhandensein lipophiler Moleküle fluorometrisch quantifiziert. Nilrot wurde mit einer Wellenlänge von 530 nm angeregt und die Emission bei 575 nm gemessen. Dabei wurde der Emissionswert des Wildtyp-Stammes auf 100% normiert (Abb. 18). Sowohl der Stamm mit der Deletion von *acoABC* mit 88,5% als auch der Stamm mit der zusätzlichen Deletion von *phaC2* mit 96,5% zeigten hier ähnliche Emissionen. Die beiden Stämme mit der Deletion von *phaC1* – *C. necator* H16_Δ*acoABC*_Δ*phaC1* und *C. necator* H16_Δ*acoABC*_Δ*phaC1*_Δ*phaC2* – zeigten deutliche geringe Emissionswerte mit 31% bzw. 33,5%.

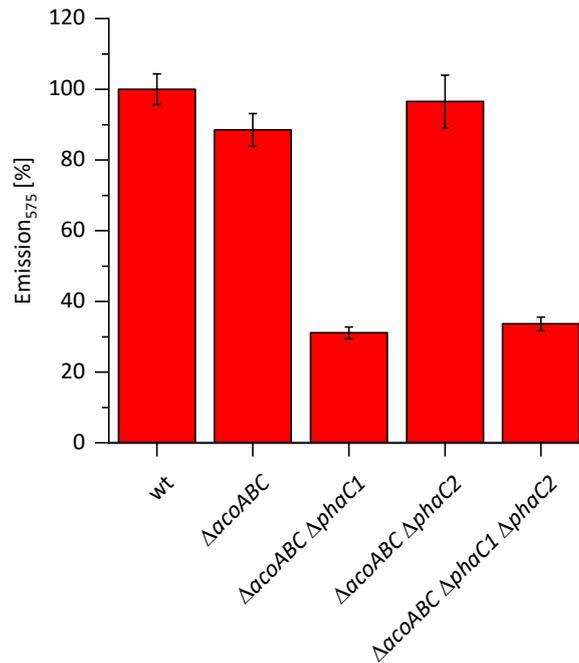


Abb. 18: Nilrot-Emission der PHB-Mutanten. Je Stamm (*C. necator* H16 wt, *C. necator* H16_ΔacoABC, *C. necator* H16_ΔacoABC_ΔphaC1, *C. necator* H16_ΔacoABC_ΔphaC2, *C. necator* H16_ΔacoABC_ΔphaC1_ΔphaC2) wurden 150 μl einer Zellsuspension mit einer OD₆₀₀ von 1,0 mit Nilrot gefärbt. Die Proben wurden anschließend mit einer Wellenlänge von 530 nm angeregt und die Emission bei 575 nm gemessen. Die Standardabweichung der Triplikate ist mithilfe der Fehlerbalken dargestellt. Die Emission wurde auf den Wildtyp-Stamm normiert (verändert nach [74]).

Dieselben Stämme wurden nach einer zusätzlichen DAPI-Gegenfärbung unter einem Fluoreszenzmikroskop mit einer 1000x Vergrößerung untersucht. Bei den Stämmen, die im vorherigen Versuch hohe Emissionen zeigten, konnten unter dem Fluoreszenz-Mikroskop lipophile Aggregate in den Zellen gefunden werden (Abb. 19). Sowohl der Stamm ΔphaC1 als auch die Doppelmutante ΔphaC1_ΔphaC2 zeigten korrespondierend zur fluorometrischen Messung keine intrazellulären Aggregate in der Nilrotfärbung.

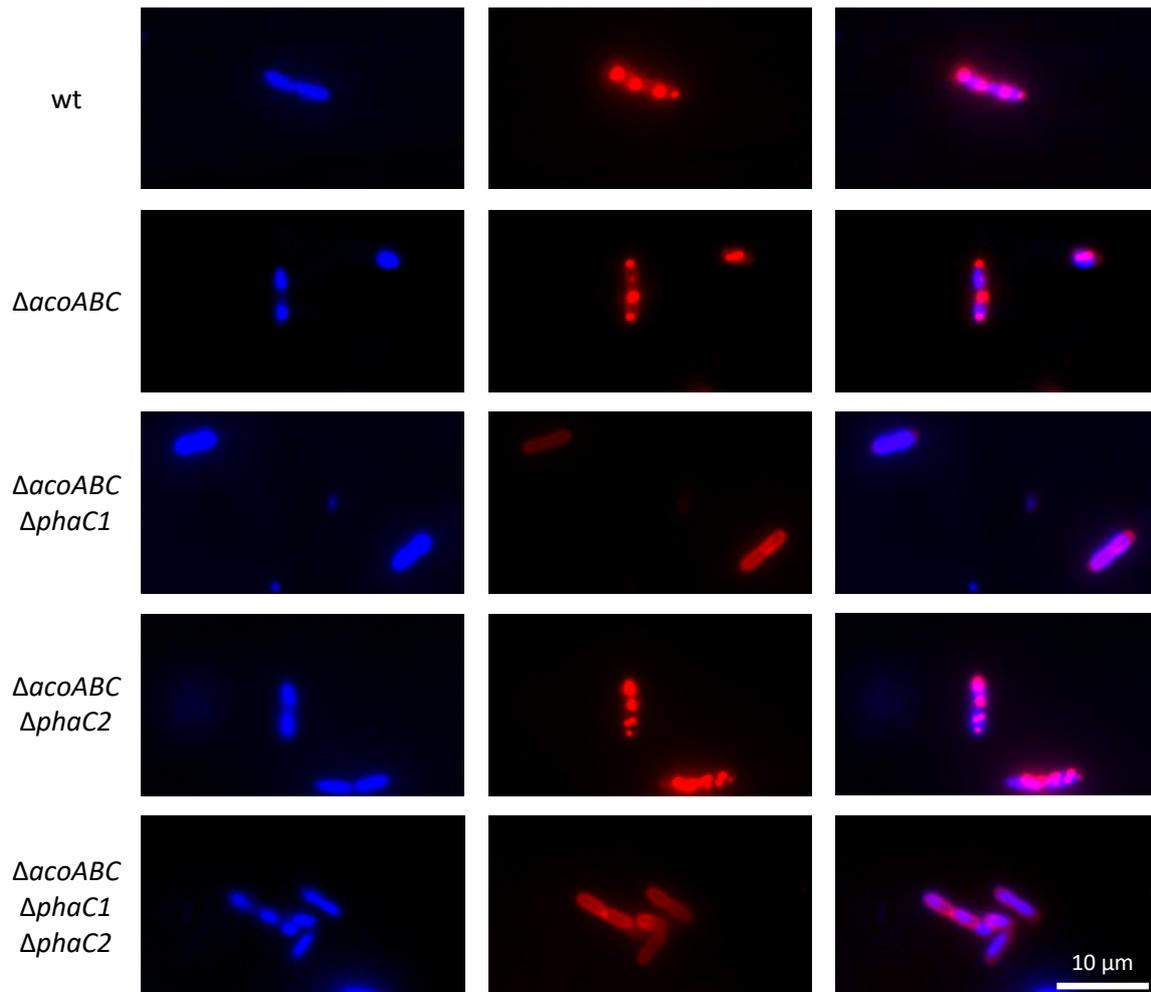


Abb. 19: Fluoreszenz-Aufnahmen von DAPI- und Nilrot-gefärbten Zellen. Die Stämme (*C. necator* H16 wt, *C. necator* H16_ΔacoABC, *C. necator* H16_ΔacoABC_ΔphaC1, *C. necator* H16_ΔacoABC_ΔphaC2, *C. necator* H16_ΔacoABC_ΔphaC1_ΔphaC2) wurden mit DAPI (blau) und Nilrot (rot) gefärbt. Die Zellen wurden mit einer 1000x Vergrößerung fotografiert. Der Größenbalken ist für alle Abbildungen identisch und entspricht 10 μm (verändert nach [74]).

3.2.2. Acetoin-Produktion in den PHB-Mutanten unter heterotrophen Bedingungen

In den folgenden Versuchen werden die Einzel-Deletionsmutanten mit „ΔC1“ für ΔphaC1 und mit „ΔC2“ für ΔphaC2 bzw. die Doppelmutante mit „ΔC1-ΔC2“ abgekürzt, die vorhereingeführten Abkürzungen für die Acetoin-produzierenden Stämme bleibt bestehen.

Um die Frage zu beantworten, ob es möglich ist, den Kohlenstofffluss von PHB zu Acetoin zu verschieben, wurde die Acetoin-Produktion der verschiedenen PHB-Mutanten untersucht. Hierfür wurden die drei PHB-Mutanten ΔC1, ΔC2 und ΔC1-ΔC2 mit dem Plasmid pKRara-alsSD ausgestattet und unter den identischen Bedingungen wie der Stamm ara-Acetoin kultiviert. Die beiden Stämme ara-Acetoin und ΔC2-ara-Acetoin zeigten das höchste Wachstum mit einer maximalen OD₆₀₀ von 2,1 (Abb. 20). Diese beiden Stämme produzierten die geringste Acetoin-Menge von maximal 1,3 mM. Die beiden verbleibenden nicht-induzierten Stämme ΔC1-ara-Acetoin und ΔC1-ΔC2-ara-Acetoin wuchsen bis zu

einer OD_{600} von 1,7. Die Acetoin-Produktion der Mutante $\Delta C1$ -ara-Acetoin lag bei 2,6 mM und die der Mutante $\Delta C1$ - $\Delta C2$ -ara-Acetoin bei 2,1 mM. Die vier Stämme mit dem induzierten Promotor unterschieden sich kaum beim Wachstum: Die OD_{600} stieg von 0,6 maximal auf 0,7 an. Dieselben PHB-Mutanten produzierten zwischen 4,2 und 4,7 mM Acetoin, wohingegen die Acetoin-Produktion von dem Vergleichsstamm Ara-Acetoin bis auf 5,8 mM anstieg. Diese Stämme konsumierten im gesamten Testzeitraum von 96 h nur 58% bis 72% der zur Verfügung stehenden Fructose.

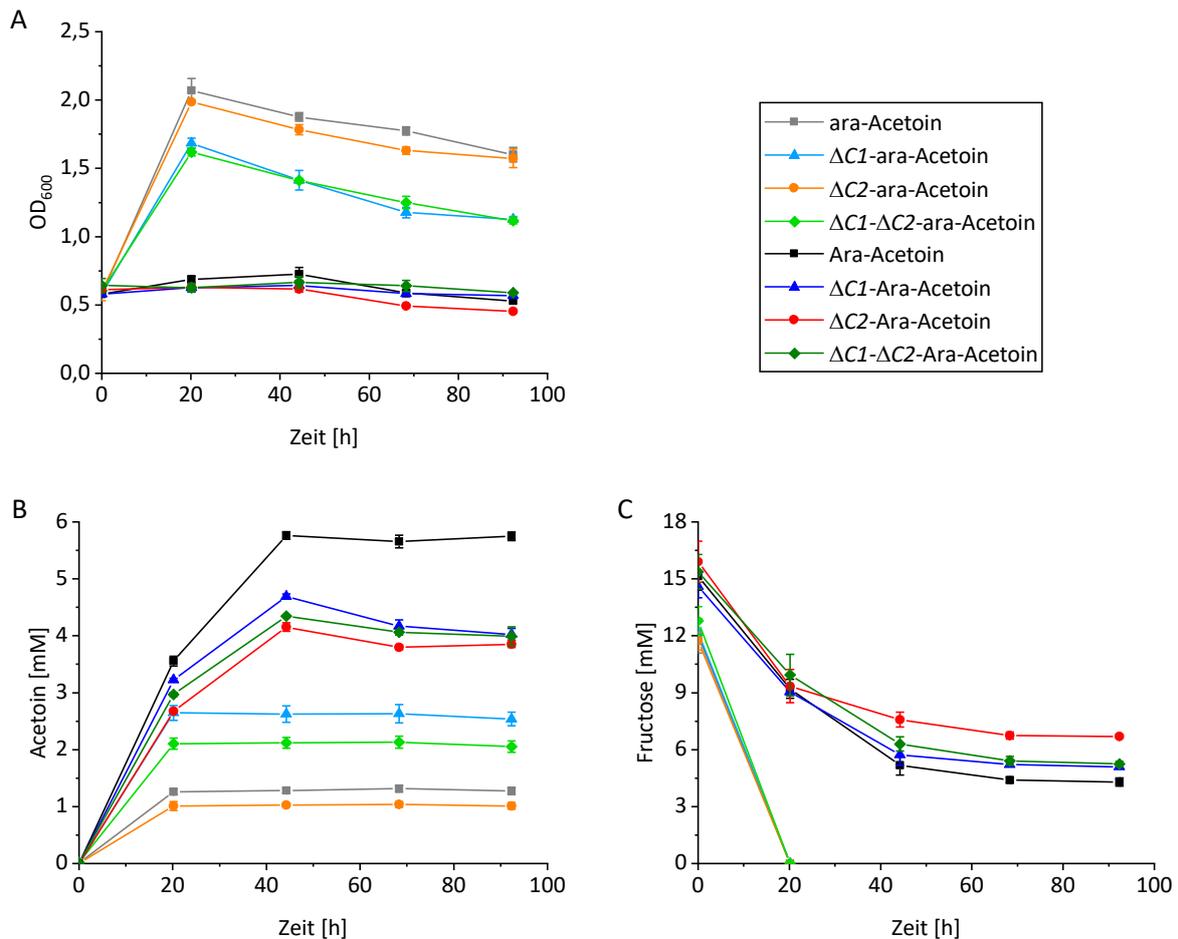


Abb. 20: Acetoin-Produktion ausgehend vom Arabinose-induzierbaren Promotor in den PHB-Mutanten. Die vier verschiedenen Stämme *C. necator* H16_Δ*acoABC* (ara-Acetoin, Quadrat) als Vergleichsstamm (Daten wurden bereits in Abb. 16 gezeigt), *C. necator* H16_Δ*acoABC*_Δ*phaC1* (Δ*C1*-ara-Acetoin, Dreieck), *C. necator* H16_Δ*acoABC*_Δ*phaC2* (Δ*C2*-ara-Acetoin, Kreis) und *C. necator* H16_Δ*acoABC*_Δ*phaC1*_Δ*phaC2* (Δ*C1*-Δ*C2*-ara-Acetoin, Raute) mit dem Plasmid pKRara-alsSD wurden unter nicht-induzierten (helle Farben) und induzierten (dunkle Farben) Bedingungen auf das Wachstum (A), die Acetoin-Produktion (B) und den Fructose-Verbrauch (C) untersucht. Dafür wurden die Stämme in Erlenmeyer-Kolben mit 100 ml Minimal-Medium 81 und Fructose bei 30°C und 180 rpm kultiviert. Die Standardabweichung der Triplikate ist mithilfe der Fehlerbalken dargestellt.

Die zweite Versuchsreihe wurde mit dem Plasmid pKRrha-*alsSD* durchgeführt. Dabei wurden dieselben PHB-Mutanten analog zum vorhergehenden Experiment gegen den Vergleichsstamm unter denselben Bedingungen getestet. Hierbei zeigten die nicht-induzierten Stämme (rha-Acetoin, $\Delta C1$ -rha-Acetoin, $\Delta C2$ -rha-Acetoin und $\Delta C1$ - $\Delta C2$ -rha-Acetoin) kaum einen Unterschied. Die maximale OD_{600} erreichte Werte zwischen 1,9 und 2,1 und die Acetoin-Produktion lag zwischen 0,2 und 0,4 mM (Abb. 21). Bis auf den Stamm $\Delta C2$ -rha-Acetoin verbrauchten alle nicht-induzierten Stämme innerhalb von 20 h die Fructose vollständig. $\Delta C2$ -rha-Acetoin verbrauchte die Fructose ebenfalls vollständig, allerdings erst nach 44 h. Die vier Stämme mit den Rhamnose-induzierten Promotor zeigten ein diverseres Verhalten, wobei die beiden Stämme Rha-Acetoin und $\Delta C1$ - $\Delta C2$ -Rha-Acetoin mit einer maximalen OD_{600} von 0,7 und 0,8 ähnlich waren. Auch in der Acetoin-Produktion zeigten sie nur geringe Unterschiede. Die Acetoin-Produktion lag mit 8,5 mM für den Vergleichsstamm Rha-Acetoin nur geringfügig höher als für den Stamm $\Delta C1$ - $\Delta C2$ -Rha-Acetoin (7,9 mM). Beide Stämme konsumierten die Fructose innerhalb von 44 h. Der induzierte Stamm $\Delta C1$ -Rha-Acetoin zeigte ein Wachstum bis zu einer OD_{600} von 1,4 und eine Acetoin-Produktion von 6,2 mM. Die Zelldichte des verbleibenden Stammes $\Delta C2$ -Rha-Acetoin sank innerhalb von 44 h von einer OD_{600} 0,6 auf 0,5 und stieg in den nächsten 24 h auf 2,1 an. Dieses Verhalten ist auch im Fructose-Verbrauch abgebildet, da die Fructose-Konzentration in den ersten 44 h nur langsam sank und in den darauffolgenden 24 h vollständig konsumiert wurde. Der Stamm produzierte eine maximale Menge von 1,2 mM Acetoin.

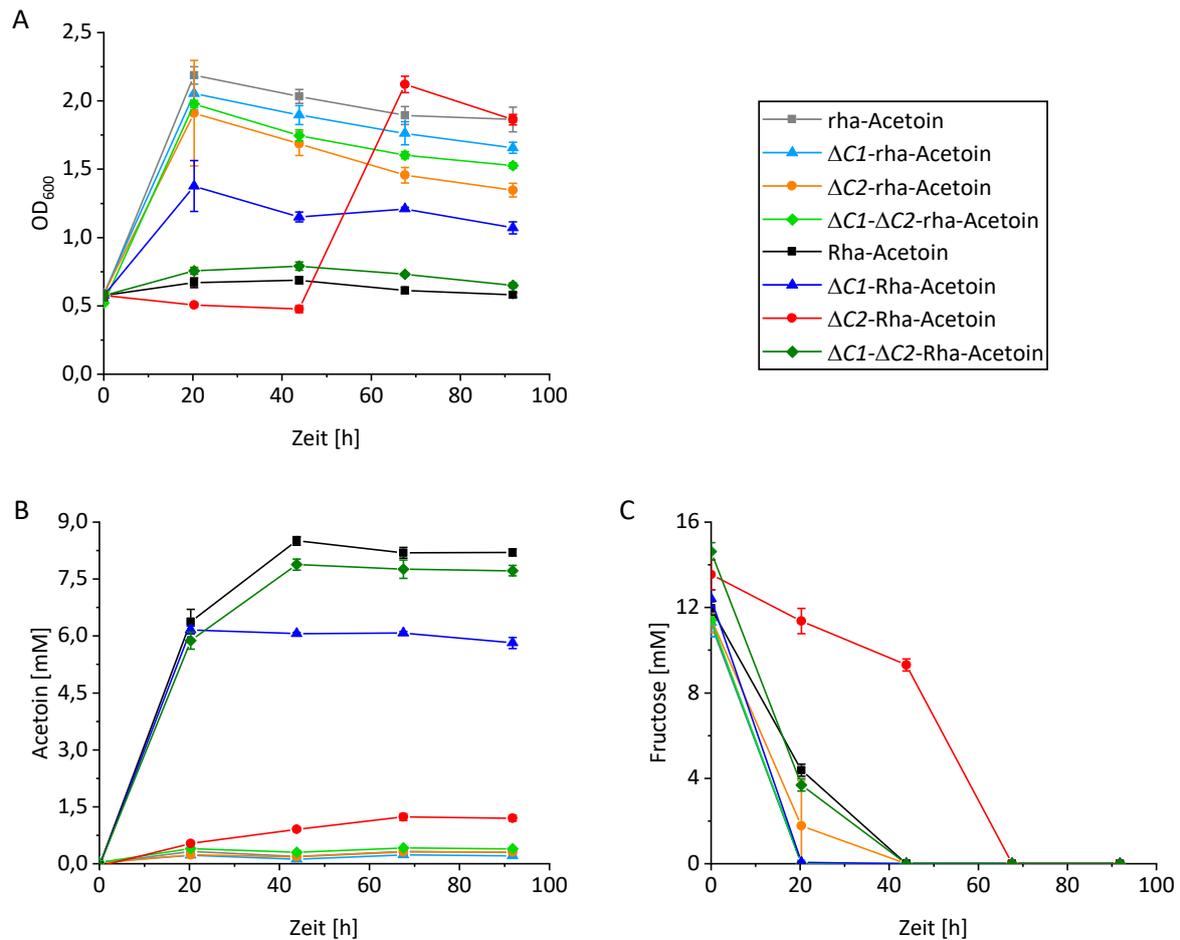


Abb. 21: Acetoin-Produktion ausgehend vom Rhamnose-induzierbaren Promotor in den PHB-Mutanten. Für diesen Versuch wurde das Plasmid pKRrha-*alsSD* verwendet. Für weitere Erklärungen siehe Beschreibung von Abb. 20.

In einem dritten Versuch wurde der Einfluss der PHB-Mutanten auf die Acetoin-Produktion ausgehend von dem Plasmid pKRphb-*alsSD* untersucht. Dabei zeigte der Vergleichsstamm phb-Acetoin das stärkste Wachstum (OD_{600} 2,1) und die geringste Acetoin-Konzentration (0,3 mM) (Abb. 22). Die nächst höhere Acetoin-Konzentration (1,2 mM) wurde von dem Stamm $\Delta C1$ -phb-Acetoin erreicht. Dieser Stamm wuchs bis zu einer OD_{600} von 2,0. Der Stamm $\Delta C2$ -phb-Acetoin zeigte ein Wachstum bis zu einer OD_{600} von 1,6 und der Stamm $\Delta C1-\Delta C2$ -phb-Acetoin von 1,2. Diese beiden Stämme produzierten in diesem Versuch die höchste Acetoin-Konzentration mit 7,0 mM.

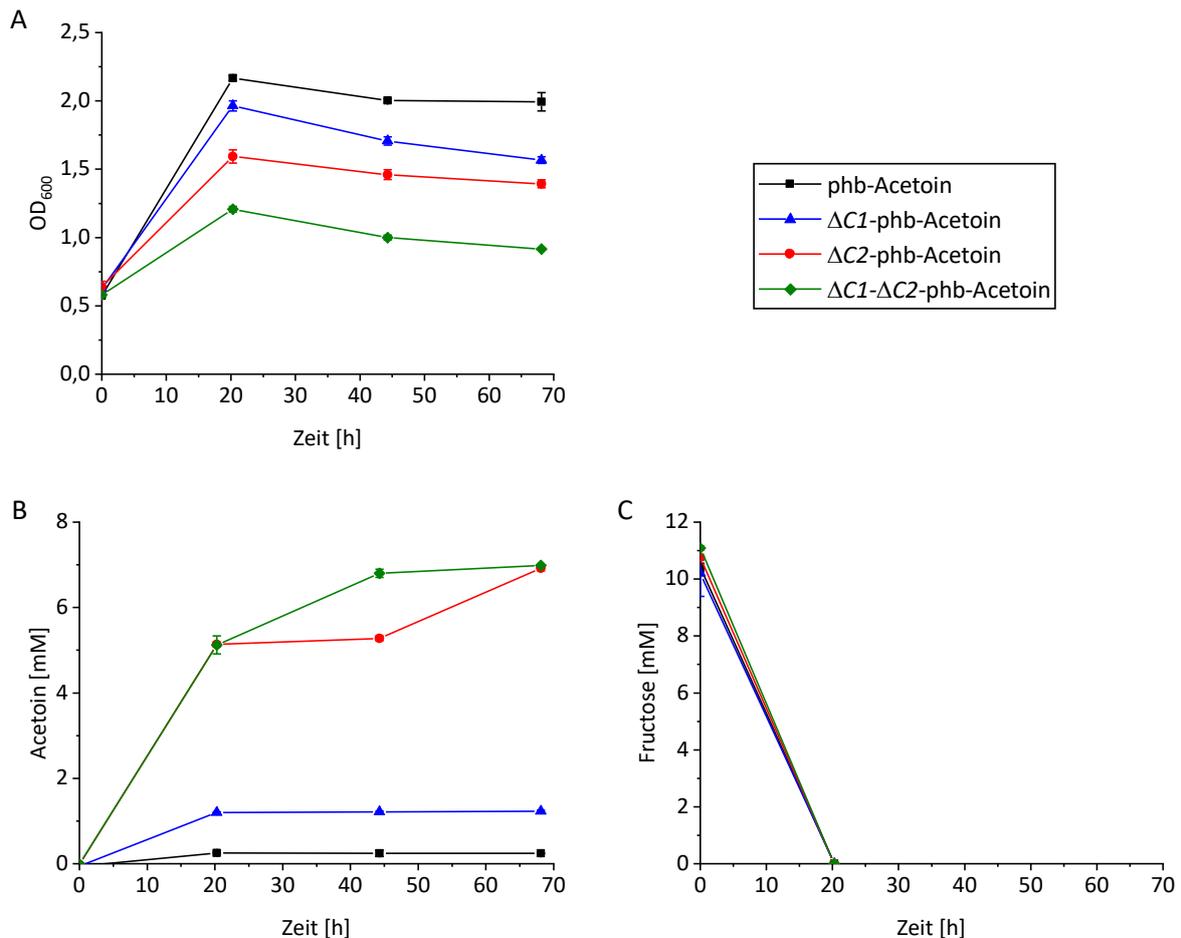


Abb. 22: Acetoin-Produktion ausgehend vom konstitutiven *phb*-Promotor in den PHB-Mutanten. Für diesen Versuch wurde das Plasmid *pKRphb-alsSD* ohne weitere Zugabe eines Induktors verwendet. Für weitere Erklärungen siehe Beschreibung von Abb. 20 (verändert nach [74]).

Um den Einfluss auf die oben gezeigten Parameter Wachstum, Fructose-Verbrauch und Acetoin-Produktion durch den Einsatz von Induktoren untersuchen zu können, wurden sowohl der Vergleichsstamm, als auch die PHB-Mutanten ohne Plasmid auf das Wachstumsverhalten getestet. Dafür wurden die vier Stämme in Reagenzgläsern mit 5 ml Minimal-Medium 81, 10 mM Fructose und mit bzw. ohne Induktor kultiviert. Dabei zeigte sich, dass die Induktion mit 1,5 mM Arabinose oder 1 mM Rhamnose keinen Einfluss auf das Wachstum der Zellen hatte, da alle Stämme bei diesen Bedingungen dieselbe OD₆₀₀ nach 20 h zeigten (Abb. 23). Generell ist zu erkennen, dass die beiden Stämme *C. necator* H16_Δ*acoABC* und *C. necator* H16_Δ*acoABC*_Δ*phaC2* eine höhere Zelldichte (OD₆₀₀ 2,6) als die beiden Stämme mit der Deletion von *phaC1* (OD₆₀₀ 2,3) aufweisen.

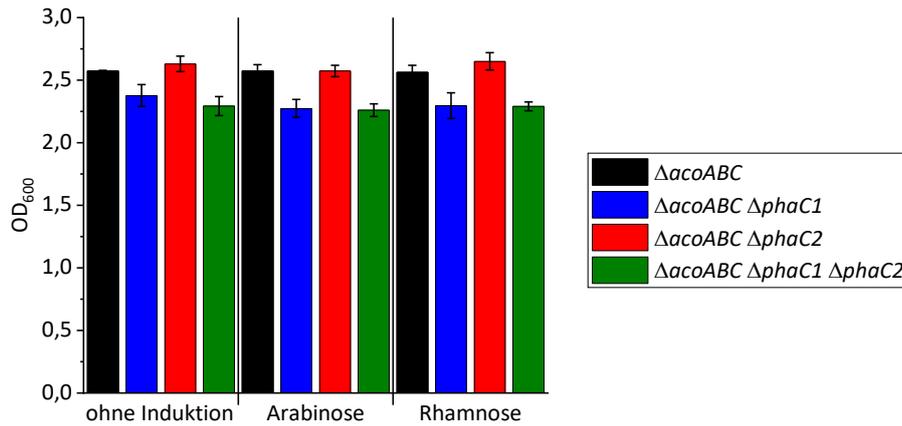


Abb. 23: Wachstum nach 20 h der PHB-Mutanten mit und ohne Induktor. Die vier verschiedenen Stämme *C. necator* H16_ΔacoABC (schwarz) als Vergleichsstamm, *C. necator* H16_ΔacoABC_ΔphaC1 (blau), *C. necator* H16_ΔacoABC_ΔphaC2 (rot) und *C. necator* H16_ΔacoABC_ΔphaC1_ΔphaC2 (grün) wurden in Reagenzglasern mit 5 ml Minimal-Medium 81 und 10 mM Fructose bei 30°C und 180 rpm kultiviert. Zusätzlich wurden den Stämmen kein Induktor, 1,5 mM Arabinose oder 1 mM Rhamnose hinzugefügt. Die Standardabweichung der Triplikate ist mithilfe der Fehlerbalken dargestellt. Die Daten werden repräsentativ für das gesamte Experiment hier nach 20 h dargestellt, eine vollständige Wachstumskurve über 97 h für alle Stämme zeigt Anhang-Abb. 1.

3.2.2.1. Analyse der Acetoin-Produktion auf mRNA und Protein Level

Für die quantitative Analyse der mRNA Level von *alsS* und *alsD* wurde RNA aus den Acetoin-produzierenden Kulturen mit dem Plasmid pKRrha-*alsSD* und pKRphb-*alsSD* isoliert. Die RNA wurde nach einem DNA-Verdau in cDNA umgeschrieben und anschließend als Template für die qRT-PCR eingesetzt. Die resultierenden Cq-Werte von *alsS* und *alsD* wurden auf die Cq-Werte des house-keeping Gens *gyrB* normalisiert. Nach einer Inkubation von 20 h zeigte der Vergleichsstamm Rha-Acetoin das höchste Level der mRNA von *alsS* (154%) und *alsD* (157%) (Abb. 24). Die beiden PHB-Mutanten ΔC1-Rha-Acetoin und ΔC1-ΔC2-Rha-Acetoin exprimierten die Gene *alsSD* mit etwa 20 Prozentpunkten weniger (*alsS*: 131 beide Stämme, *alsSD*: 133% bzw. 130%). Die niedrigste Expression wurde für den Stamm ΔC2-Rha-Acetoin berechnet (*alsS*: 126%, *alsD*: 119%).

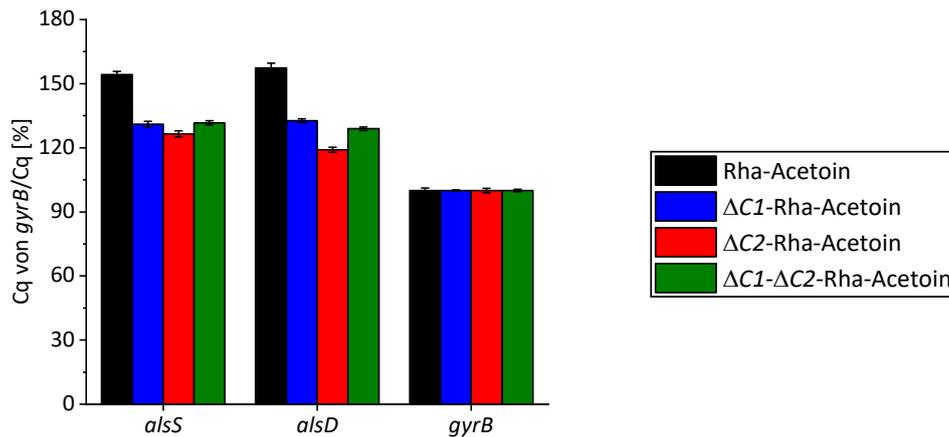


Abb. 24: Analyse der mRNA Level in den Stämmen mit dem Plasmid pKRrha-*alsSD*. Die vier verschiedenen Stämme *C. necator* H16_Δ*acoABC* (Rha-Acetoin, schwarz) als Vergleichsstamm, *C. necator* H16_Δ*acoABC_ΔphaC1* (ΔC1-Rha-Acetoin, blau), *C. necator* H16_Δ*acoABC_ΔphaC2* (ΔC2-Rha-Acetoin, rot) und *C. necator* H16_Δ*acoABC_ΔphaC1_ΔphaC2* (ΔC1-ΔC2-Rha-Acetoin, grün) wurden wie in Abb. 21 kultiviert. Die Proben wurden zu dem Zeitpunkt nach 20 h entnommen. OD₆₀₀ 1,0 wurde von den Proben zur RNA-Isolierung eingesetzt, nach anschließendem DNA-Verdau wurde die RNA in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA diente als Template für die qRT-PCR. Die Standardabweichung der Triplikate ist mithilfe der Fehlerbalken dargestellt. Die Werte wurde auf die Cq-Werte von dem house-keeping Gen *gyrB* normiert $[(1/Cq)/(1/Cq \text{ von } gyrB)]$ (verändert nach [74]).

Die PHB-Mutanten mit dem Plasmid pKRphb-*alsSD* zeigten ein anderes Verhalten bzgl. der Acetoin-Produktion (Abb. 22), dies spiegelte sich auch in der unterschiedlichen Expression der *alsSD* Gene wieder. Die geringsten mRNA-Level zeigte der Vergleichsstamm phb-Acetoin (*alsS*: 114%, *alsD*: 105%) (Abb. 25). Die beiden Stämme ΔC1-phb-Acetoin und ΔC2-phb-Acetoin exprimierten das *alsS* Gen gleich stark (124%), allerdings zeigte der Stamm ΔC1-phb-Acetoin eine niedrigere Expression für das *alsD* Gen (120%), als ΔC2-phb-Acetoin (127%). Die höchsten mRNA Level wurden für den Stamm ΔC1-ΔC2-phb-Acetoin gemessen (*alsS*: 134%, *alsD*: 136%).

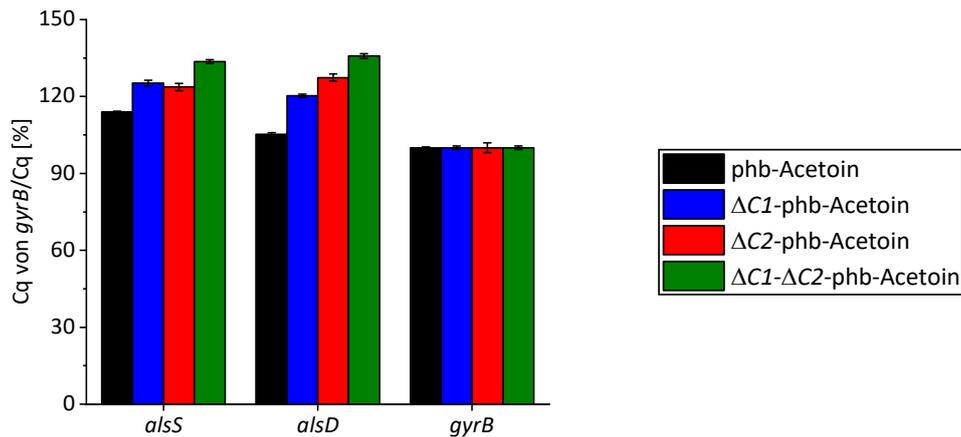


Abb. 25: Analyse der mRNA Level in den Stämmen mit dem Plasmid pKRphb-alsSD. Die vier verschiedenen Stämme *C. necator* H16_ΔacoABC (phb-Acetoin, schwarz) als Vergleichsstamm, *C. necator* H16_ΔacoABC_ΔphaC1 (ΔC1-phb-Acetoin, blau), *C. necator* H16_ΔacoABC_ΔphaC2 (ΔC2-phb-Acetoin, rot) und *C. necator* H16_ΔacoABC_ΔphaC1_ΔphaC2 (ΔC1-ΔC2-phb-Acetoin, grün) wurden wie in Abb. 22 kultiviert. Für weitere Erklärungen siehe Beschreibung von Abb. 24 (verändert nach [74]).

Die steigende Acetoin-Produktion konnte ebenfalls anhand eines Proteom-Vergleichs von dem Vergleichsstamm phb-Acetoin gegen den Stamm ΔC1-ΔC2-phb-Acetoin festgestellt werden. Die Mutante ΔC1-ΔC2-phb-Acetoin zeigte eine Steigerung der beiden Proteine AlsS und AlsD um den $\log_2(\text{FoldChange})$ von etwa 5,5 (Anhang-Tab. 1).

Neben diesen beiden Proteinen mit signifikant unterschiedlichen Mengen wurden 72 weitere unterschiedliche Proteine gefunden (Anhang-Tab. 1), davon wurden insgesamt 22 Proteine häufiger in dem Vergleichsstamm phb-Acetoin als in der Deletionsmutante ΔC1-ΔC2-phb-Acetoin detektiert. Anhand der Funktion der Proteine konnte drei dieser Proteine der Elektronentransportkette, zwei dem allgemeinen Kohlenstoff-Metabolismus und ein Protein einer regulatorische Funktion zugeordnet werden (Tab. 35). Die meisten häufiger vorkommenden Proteine in dem Vergleichsstamm (sieben Proteine) gehören zu dem PHB-Metabolismus.

In dem Stamm ΔC1-ΔC2-phb-Acetoin wurden 52 Proteine häufiger als in dem Vergleichsstamm phb-Acetoin detektiert. Dazu gehört ein Protein, welches im weiteren Sinne ebenfalls dem PHB-Metabolismus zugeordnet wurde. Des Weiteren konnten zehn Proteine im Kohlenstoff-Metabolismus und sieben Proteine im Stoffaustausch gruppiert werden. Insgesamt wurden 19 Enzyme häufiger gefunden, die für den Abbau von Aminosäuren (sieben Proteine), Aromaten (acht Proteine) und Fettsäuren (vier Proteine) verantwortlich sind. Zusätzlich wurden drei Proteine mit einer regulatorischen Funktion und fünf Proteine mit der Funktion eines Rezeptors häufiger in diesem Stamm gefunden.

Tab. 35: Zuordnung der unterschiedlichen Proteine in Kategorien. Diese Zuordnung basiert auf der Anhang-Tab. 1, daher kann ein Protein mehreren Kategorien zugeordnet worden sein. Die Anzahl von Proteinen in Klammern (1) gehört im weiteren Sinne zu dieser Kategorie.

Zuordnung	phb-Acetoin	$\Delta C1-\Delta C2$ -phb-Acetoin
Abbau von Aminosäuren	(1)	7
Abbau von Aromaten	0	8
Acetoin-Produktion	0	2
β -Oxidation	0	4
Elektronentransportkette	3	0
Kohlenstoff-Metabolismus	2	10
PHB-Metabolismus	7	(1)
Regulator	1	3
Rezeptor	0	5
Stickstoff-Metabolismus	1	2
Stoffaustausch	2	7
sonstige	1	6
nicht charakterisiert	4	3

3.2.3. Acetoin-Produktion in den PHB-Mutanten unter autotrophen Bedingungen

Bevor mit den Versuchen zur Acetoin-Produktion unter autotrophen Bedingungen begonnen werden konnte, wurde die optimale O_2 -Konzentration für *C. necator* H16 bestimmt, da die RubisCO neben der Carboxylase-Aktivität ebenfalls eine Oxygenase-Aktivität besitzt, die die Effektivität der Carboxylase erheblich beeinträchtigt. Für diese Bestimmung wurde *C. necator* H16 in 1 l Fermentern mit Minimal-Medium ohne organische Kohlenstoffquelle kultiviert. Das Medium wurde kontinuierlich mit unterschiedlichen Gemischen von H_2 , CO_2 und O_2 begast und währenddessen die OD_{600} zur Bestimmung der Wachstumsrate gemessen. Dabei zeigte sich, dass O_2 -Konzentrationen zwischen 3,8% und 20% kaum einen Einfluss auf das Wachstum haben (Abb. 26). Allerdings zeigten die O_2 -Konzentrationen von 25% und 30% einen negativen Einfluss auf das Wachstum. Für die anschließenden Versuche wurde eine O_2 -Konzentration von 15% gewählt, da der Median bei dieser Konzentration den höchsten Wert aufweist.

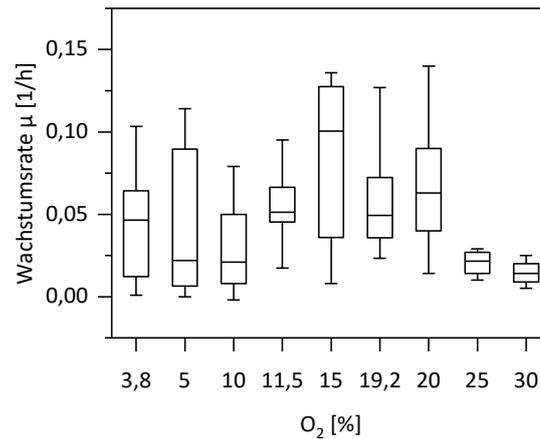


Abb. 26: Boxplot zur Bestimmung der optimalen O₂-Konzentration. *C. necator* H16 wt wurde in Fermentern mit 1 l Minimal-Medium 81 unter autotrophen Bedingungen bei 30°C und 400 rpm inkubiert. Dabei wurden unterschiedliche Gasgemische zugeführt. Nach einer Adaptionszeit von 15 h wurde die OD₆₀₀ stündlich für 9 h gemessen und anschließend ein neues Gasgemisch zugeführt. Dargestellt sind das erste bis vierte Quartil für jede O₂-Konzentration, in der Mitte des Rechteckes ist der Median durch eine horizontale Linie dargestellt (verändert nach [74]).

Mit dieser O₂-Konzentration wurden die verschiedenen Stämme auf autotrophe Acetoin-Produktion hin untersucht. Dafür wurden die Stämme mit einer Start-OD₆₀₀ von 4,0 in 50 ml Minimal-Medium in 1 l Schottflaschen mit einem autotrophen Gasgemisch kultiviert. Die beiden induzierbaren Promotorsysteme wurden sowohl mit als auch ohne Induktor getestet. Bei jeder Messung wurde ein möglicher Unterdruck in den Flaschen mit Umgebungsluft auf Normaldruck ausgeglichen. Die Triplikate wurden bei einer CO₂-Konzentration von unter 0,05% beendet.

In dem ersten Versuch wurde das Plasmid pKRara-*alsSD* in den PHB-Mutanten getestet, dabei zeigten die nicht-induzierten und die induzierten Stämme deutliche Unterschiede (Abb. 27). Die nicht-induzierten Stämme zeigten eine lag-Phase von etwa 24 h, danach stieg die OD₆₀₀ für die beiden Stämme $\Delta C1$ -ara-Acetoin und $\Delta C1$ - $\Delta C2$ -ara-Acetoin auf maximal 4,4. Der Vergleichsstamm ara-Acetoin und der Stamm $\Delta C2$ -ara-Acetoin erreichten eine maximale OD₆₀₀ von 6,0. Die induzierten Stämme zeigten erst nach 89 h eine Zunahme der Zelldichte. Dabei erreichte der Stamm $\Delta C1$ -Ara-Acetoin die geringste OD₆₀₀ von 4,5, gefolgt von der dreifachen Deletionsmutante $\Delta C1$ - $\Delta C2$ -Ara-Acetoin (OD₆₀₀ 5,6) und dem Vergleichsstamm Ara-Acetoin (OD₆₀₀ 6,0). Die höchste Zellzunahme wurde für den Stamm $\Delta C2$ -Ara-Acetoin mit einer maximalen OD₆₀₀ von 7,0 gemessen. Bei der Acetoin-Produktion zeigten die nicht-induzierten Stämme höhere Konzentrationen als die induzierten Stämme. Der Stamm $\Delta C1$ -ara-Acetoin erreichte eine Konzentration von 6,5 mM Acetoin, wohingegen für die induzierten Stämme maximal 2,7 mM Acetoin nachgewiesen werden konnte ($\Delta C1$ - $\Delta C2$ -Ara-Acetoin).

Die CO₂-Konzentration stieg in den ersten 24 h für alle Stämme von 5,5% auf 6,2% an, mit Ausnahme des Vergleichsstammes ara-Acetoin. Alle nicht-induzierten Stämme konsumierten das CO₂ innerhalb von 64 h. Die CO₂-Konzentration der induzierten Stämme stieg nicht nur in den ersten 24 h, sondern bis zu dem Zeitpunkt nach 89 h. Ebenso wie bei den vorhergehenden Experimenten der nicht-induzierten Stämme zeigt auch hier der Vergleichsstamm Ara-Acetoin die höchste Umsatzrate (120 h). Die verbleibenden Stämme $\Delta C1$ -Ara-Acetoin (141 h), $\Delta C2$ -Ara-Acetoin (180 h) und $\Delta C1$ - $\Delta C2$ -Ara-Acetoin (158 h) zeigten eine geringere Verbrauchsrate. $\Delta C2$ -Ara-Acetoin zeigte zudem eine verbleibende Restkonzentration von 0,2% CO₂. Die O₂-Konzentration sank in allen Stämmen langsamer als die CO₂-Konzentration, da bei jeder Messung der entstandene Unterdruck mit Umgebungsluft auf Normaldruck ausgeglichen wurde. Daher wurde nicht nur O₂ sondern auch N₂ zugeführt. Der H₂-Verbrauch und die N₂-Zunahme verhielten sich in allen getesteten Stämmen analog zum CO₂-Verbrauch.

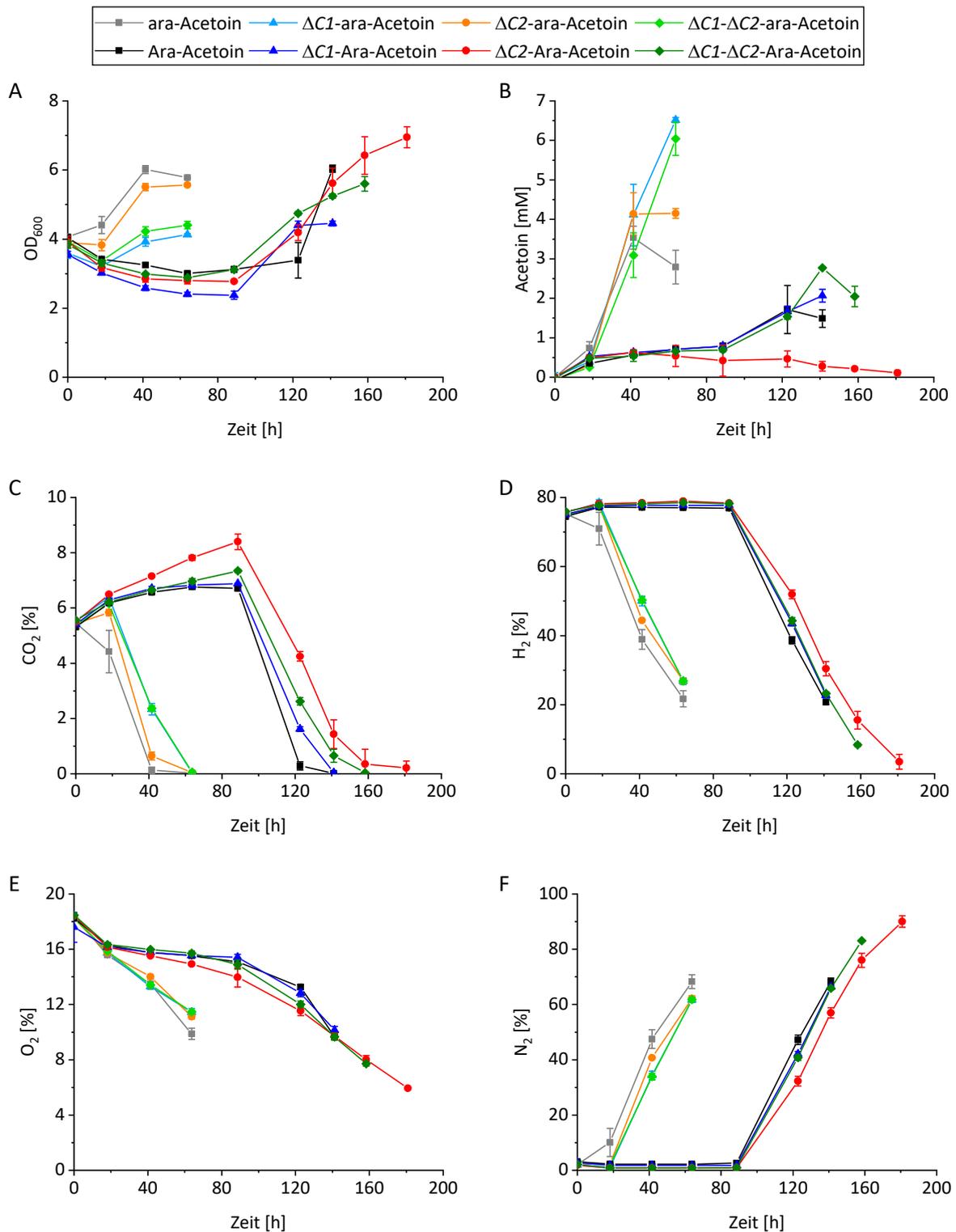


Abb. 27: Acetoin-Produktion ausgehend vom Arabinose-induzierbaren Promotor in den PHB-Mutanten unter autotrophen Bedingungen. Die vier verschiedenen Stämme *C. necator* H16_Δ*acoABC* (ara-Acetoin, Quadrat) als Vergleichsstamm, *C. necator* H16_Δ*acoABC*_Δ*phaC1* (ΔC1-ara-Acetoin, Dreieck), *C. necator* H16_Δ*acoABC*_Δ*phaC2* (ΔC2-ara-Acetoin, Kreis) und *C. necator* H16_Δ*acoABC*_Δ*phaC1*_Δ*phaC2* (ΔC1-ΔC2-ara-Acetoin, Raute) mit dem Plasmid pKRara-*alsSD* wurden unter nicht-induzierten (helle Farben) und induzierten (dunkle Farben) Bedingungen auf das Wachstum (A), die Acetoin-Produktion (B) und das Verhalten der Gase CO₂ (C), H₂ (D), O₂ (E) und N₂ (F) untersucht. Dafür wurden die Stämme in 1 l Schottflaschen mit

50 ml Minimal-Medium 81 und einem autotrophen Gasgemisch bei 30°C und 180 rpm kultiviert. Der Unterdruck in den Flaschen wurde bei jeder Messung mit Luft auf Normaldruck ausgeglichen. Die Standardabweichung der Triplikate ist mithilfe der Fehlerbalken dargestellt. CH₄ wurde nicht detektiert.

Für das zweite induzierbare Plasmid pKRrha-*alsSD* wurden ebenfalls die PHB-Mutanten auf die Acetoin-Produktion unter autotrophen Bedingungen getestet. Dabei zeigten die beiden nicht induzierten Stämme rha-Acetoin und $\Delta C1$ -rha-Acetoin die höchste OD₆₀₀ mit einem Wert von 7,5 und 7,0 (Abb. 28). Für den nicht-induzierten Stamm $\Delta C2$ -rha-Acetoin wurde eine OD₆₀₀ von 6,1 und für den Stamm $\Delta C1$ - $\Delta C2$ -rha-Acetoin von 6,2 gemessen. Für den induzierten Stamm $\Delta C1$ -Rha-Acetoin stieg die OD₆₀₀ von 3,6 auf 4,5 innerhalb von 44 h und sank anschließend auf 4,1 bis zum Zeitpunkt nach 89 h. Die verbleibenden drei induzierten Stämme (Rha-Acetoin, $\Delta C2$ -Rha-Acetoin und $\Delta C1$ - $\Delta C2$ -Rha-Acetoin) zeigten eine Zunahme in der Zellzahl erst nach 89 h, dabei erreichten diese Stämme Zelldichten zwischen 5,9 und 6,5. Die höchste Acetoin-Produktion der nicht-induzierten Stämme zeigte der Stamm rha-Acetoin mit 0,6 mM, wohingegen für die induzierten Stämme ein Konzentration bis zu 12,5 mM Acetoin gemessen wurde ($\Delta C1$ -Rha-Acetoin).

Die CO₂-Konzentration aller nicht-induzierten Stämme und des induzierten Stammes $\Delta C1$ -Rha-Acetoin war innerhalb von 89 h verbraucht. Die verbleibenden drei induzierten Stämme (Rha-Acetoin, $\Delta C2$ -Rha-Acetoin und $\Delta C1$ - $\Delta C2$ -Rha-Acetoin) benötigen zwischen 161 und 205 h um das CO₂ zu konsumieren. Die beiden Stämme $\Delta C1$ - $\Delta C2$ -rha-Acetoin und $\Delta C1$ - $\Delta C2$ -Rha-Acetoin erreichten beide nur eine minimale CO₂-Konzentration von 0,2%, zu den entsprechenden Zeitpunkten lag die H₂-Konzentration unter 1%, wodurch der Elektronendonator nicht ausreichend zur Verfügung stand. Die verbleibenden drei Gase verhielten sich analog zu dem CO₂-Verbrauch.

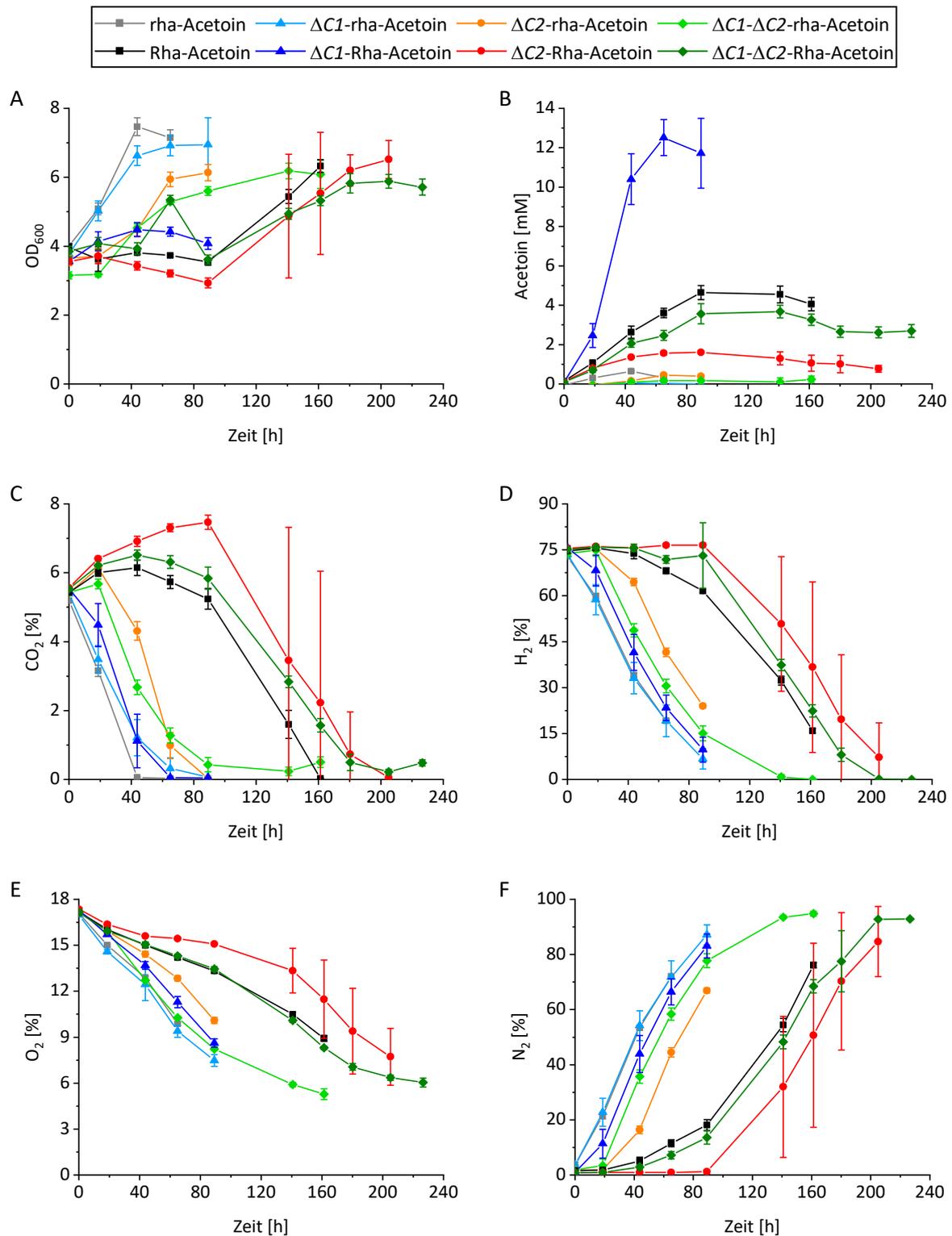


Abb. 28: AcetoIn-Produktion ausgehend vom Rhamnose-induzierbaren Promotor in den PHB-Mutanten unter autotrophen Bedingungen. Für diesen Versuch wurde das Plasmid pK_Rrha-*alsSD* verwendet. Für weitere Erklärungen siehe Beschreibung von Abb. 27.

Der Einfluss der PHB-Mutanten auf die Produktion von Acetoin ausgehend von dem konstitutiven *phb*-Promotor wurde ebenfalls analysiert. Dafür wurden die PHB-Mutanten mit dem Plasmid *pKRphb-alsSD* wie oben beschrieben unter autotrophen Bedingungen kultiviert. Dabei zeigte der Vergleichsstamm *phb*-Acetoin eine maximale OD_{600} von 8,6, gefolgt von den Stämmen $\Delta C1$ -*phb*-Acetoin (OD_{600} 7,8) und $\Delta C2$ -*phb*-Acetoin (OD_{600} 5,6) (Abb. 29). Die Mutante $\Delta C1$ - $\Delta C2$ -*phb*-Acetoin hingegen zeigte nur eine Abnahme der OD_{600} von 5,0 auf 4,6. Letzterer ($\Delta C1$ - $\Delta C2$ -*phb*-Acetoin) konnte die höchste Acetoin-Konzentration mit 13,7 mM aufweisen, gefolgt von dem Stamm $\Delta C2$ -*phb*-Acetoin mit 11 mM Acetoin. Die beiden verbleibenden Stämme (*phb*-Acetoin und $\Delta C1$ -*phb*-Acetoin) produzierten maximal 1,4 mM Acetoin. Die Veränderung der Gaskonzentrationen war für alle Stämme sehr ähnlich, nur der Stamm $\Delta C1$ -*phb*-Acetoin zeigte einen reduzierten Umsatz von CO_2 .

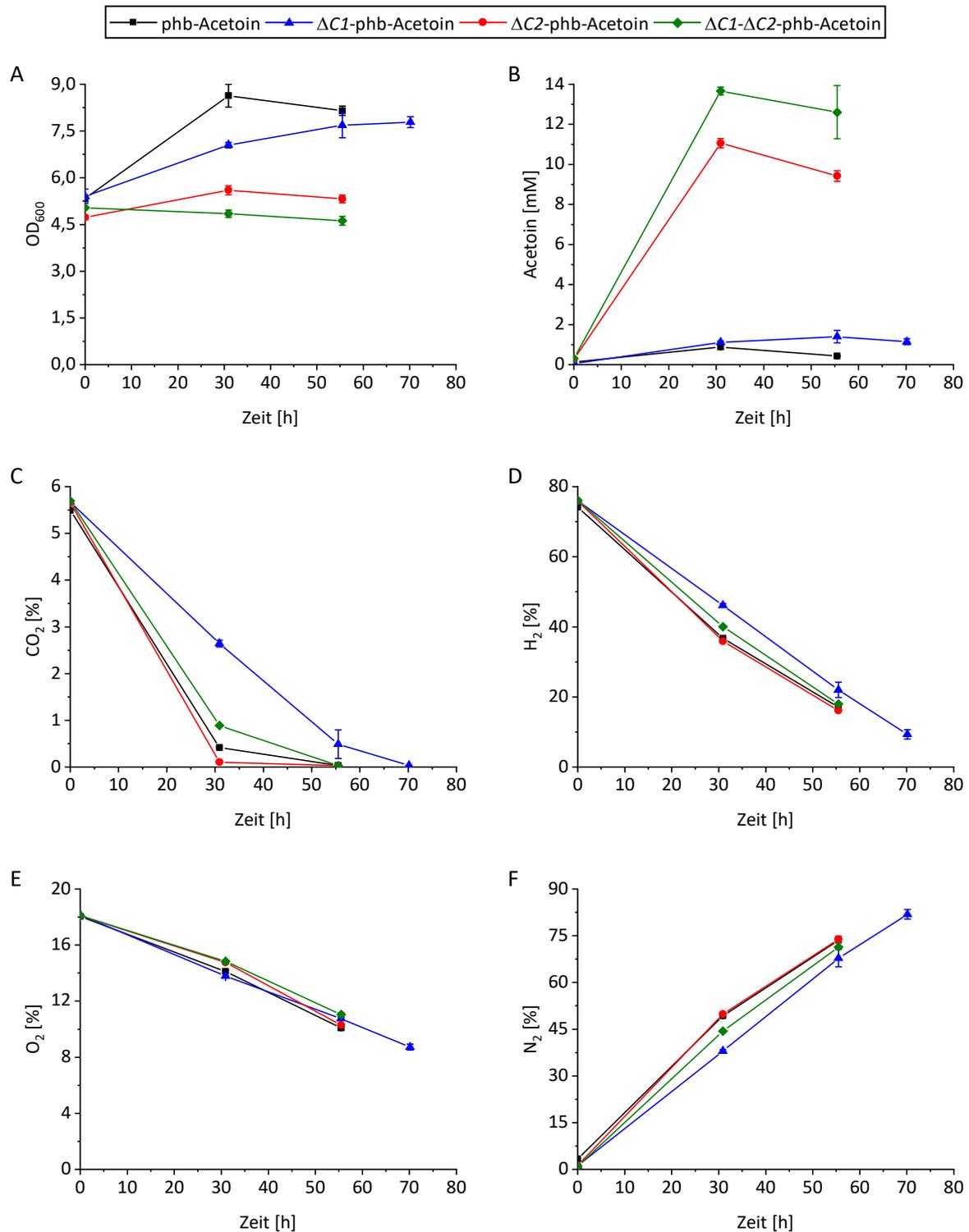


Abb. 29: Acetoin-Produktion ausgehend vom konstitutiven *phb*-Promotor in den PHB-Mutanten unter autotrophen Bedingungen. Für diesen Versuch wurde das Plasmid *pKRphb-alsSD* ohne weitere Zugabe eines Induktors verwendet. Für weitere Erklärungen siehe Beschreibung von Abb. 27 (verändert nach [74]).

In den vorherigen Versuchen wurde Acetoin ausgehend von einem Batch-System produziert, für eine kontinuierliche Produktion von Acetoin wurde der Stamm mit der höchsten Acetoin-Produktion in einem Fermenter mit 1 l Minimal-Medium und einer kontinuierlichen Begasung kultiviert. Dafür wurde der Stamm $\Delta C1-\Delta C2$ -phb-Acetoin gewählt. Diese Fermentation wurde mit einer OD_{600} von 2,0 gestartet (Abb. 30). Die Zelldichte stieg in den ersten 5 d auf eine OD_{600} von 4,8 und blieb über die restlichen 9 d konstant. Die Acetoin-Konzentration stieg in den ersten 5 d auf 23 mM an und hielt dieses Plateau für weitere 3 d. Anschließend stieg die Acetoin-Konzentration bis Tag 14 auf 44 mM.

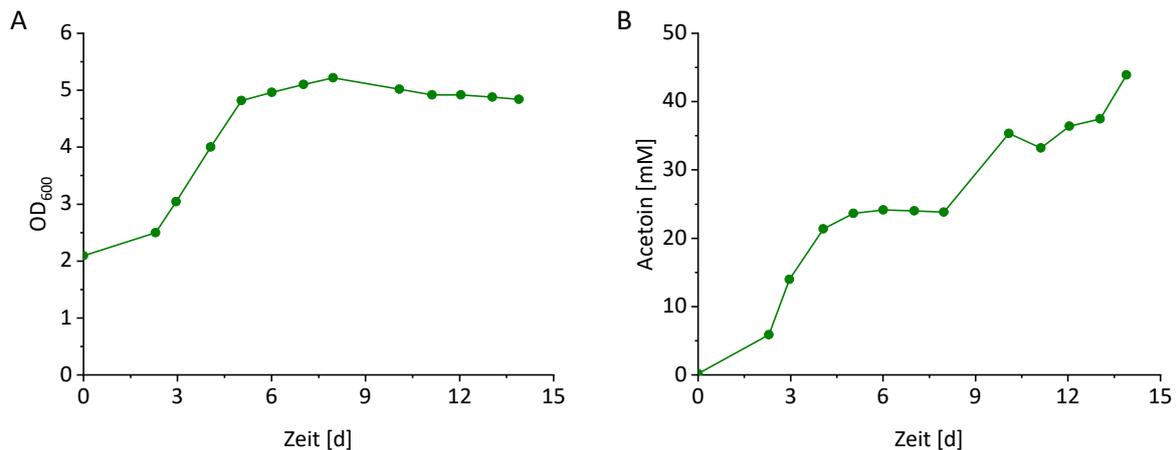


Abb. 30: Acetoin-Produktion im Fermenter unter autotrophen Bedingungen. Der Stamm $\Delta C1-\Delta C2$ -phb-Acetoin wurde als Unikat in einem Fermenter mit 1 l Minimal-Medium 81 unter autotrophen Bedingungen bei 30°C und 400 rpm inkubiert. Dafür wurde das Gasgemisch 80% H_2 : 5% CO_2 : 15% O_2 mit einer Begasungsrate von 4 l/h gewählt. Jeden zweiten Tag wurde 1 ml Tetrazyklin zum Erhalt des Selektionsdruckes hinzugefügt. Die Abbildung zeigt das Wachstum (A) und die Acetoin-Produktion (B) (verändert nach [74]).

3.3. 2,3-Butandiol-Produktion mit *C. necator* H16

Die Reduktion von Acetoin in 2,3-Butandiol wird durch das Enzym BudC katalysiert. Um die Expression in *C. necator* zu etablieren, wurde *budC* aus *K. pneumoniae* als Codon-optimiertes Gen hinter *alsSD* in die pKR-Plasmide kloniert. Für die 2,3-Butandiol-Produktion wurden die Stämme mit der höchsten Produktion gewählt, dabei wurde darauf geachtet, dass jeder Promotor (P_{ara} , P_{rha} und P_{phb}) einmal vertreten ist. Diese Stämme wurden mit dem entsprechenden Plasmid mit den Genen *alsSD* und *budC* ausgestattet. Daraus resultierten die Stämme $\Delta C1-\Delta C2$ -phb-Butandiol, ara-Butandiol und rha-Butandiol für die Versuche unter heterotrophen Bedingungen.

Diese Stämme wurden ebenfalls in 100 ml Minimal-Medium mit Fructose kultiviert. Die beiden nicht-induzierten Stämme ara-Butandiol und rha-Butandiol zeigten das höchste Wachstum mit einer maximalen OD_{600} von 2,1, gefolgt von dem Stamm $\Delta C1-\Delta C2$ -phb-Butandiol (OD_{600} 1,8) (Abb. 31). Die maximale OD_{600} für den Arabinose-induzierten Stamm Ara-Butandiol lag bei 1,3 und für den

Rhamnose-induzierten Stamm Rha-Butandiol bei 1,0. Mithilfe der drei Enzyme AlsS, AlsD und BudC werden sowohl Acetoin als auch 2,3-Butandiol produziert. Die Synthese dieser beiden Produkte erreichte für den Stamm $\Delta C1-\Delta C2$ -phb-Butandiol eine Acetoin-Konzentration von 1,4 mM und 0,2 mM 2,3-Butandiol. Für den Stamm ara-Butandiol wurde maximal 0,6 mM Acetoin und kein 2,3-Butandiol detektiert, wohingegen für den Stamm rha-Butandiol sowohl kein Acetoin als auch kein 2,3-Butandiol gemessen werden konnte. Die höchste Acetoin-Konzentration zeigte der Stamm Ara-Butandiol nach 69 h mit 4,3 mM Acetoin. Nach 45 h wurde für diesen Stamm 1 mM 2,3-Butandiol gemessen, diese Konzentration sank bis zu dem Zeitpunkt nach 69 h auf 0 mM. Bei der Kultivierung des Stammes Rha-Butandiol stieg die Acetoin-Konzentration in 45 h auf 3,8 mM, anschließend sank diese Konzentration auf 0,7 mM. Zum Zeitpunkt nach 45 h stieg die 2,3-Butandiol-Konzentration von 1 mM auf 4,2 mM und erreichte das Maximum nach 93 h mit 4,4 mM.

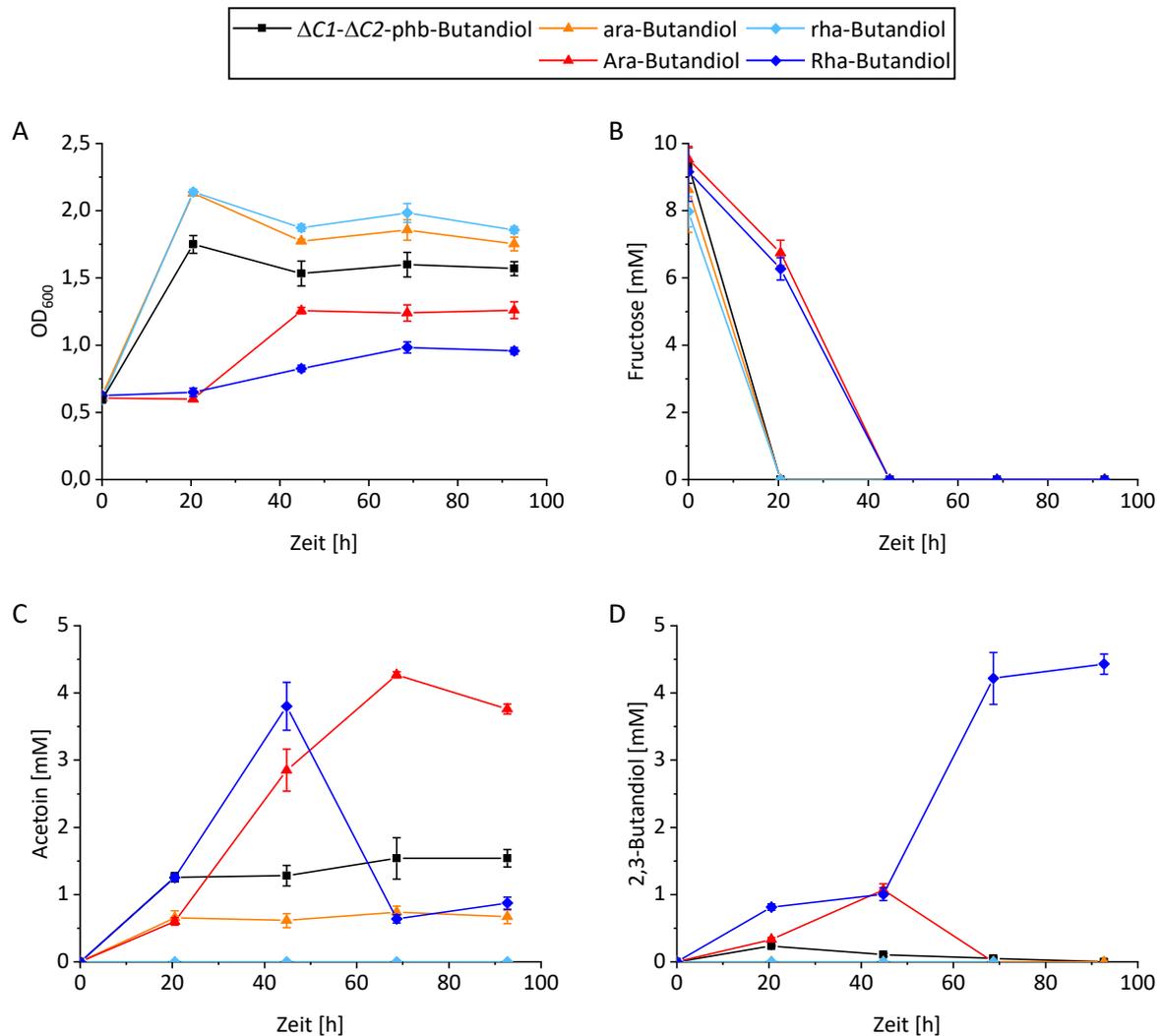


Abb. 31: 2,3-Butandiol-Produktion unter heterotropen Bedingungen. Die Stämme mit der höchsten Acetoin-Produktion wurden mit dem zusätzlichen Gen *budC* ausgestattet. $\Delta C1-\Delta C2$ -phb-Butandiol (schwarzes Quadrat), ara-Butandiol (nicht-induziert: oranges Dreieck, induziert: rotes Dreieck) und rha-Butandiol (nicht-induziert: hellblaue Raute, induziert: blaue Raute) wurden in Erlenmeyer-Kolben mit 100 ml Minimal-Medium 81 und Fructose bei 30°C und 180 rpm kultiviert. Die Abbildung zeigt das Wachstum (A), Fructose-Verbrauch (B), Acetoin-Produktion (C) und die 2,3-Butandiol-Produktion (D). Die Standardabweichung der Triplikate ist mithilfe der Fehlerbalken dargestellt.

Für die 2,3-Butandiol-Produktion unter autotropen Bedingungen wurden die Stämme $\Delta C1-\Delta C2$ -phb-Butandiol, ara-Butandiol und $\Delta C1$ -rha-Butandiol ausgewählt. Diese Stämme wurden ebenfalls in 50 ml Minimal-Medium in einer 1 l Schottflaschen mit einer H₂: O₂: CO₂-Atmosphäre kultiviert.

Der Stamm $\Delta C1-\Delta C2$ -phb-Butandiol erreichte nach 21 h seine maximale OD₆₀₀ von 5,2 (Abb. 32). Die anderen vier Stämme erreichten OD₆₀₀-Werte zwischen 6,4 und 6,9, wobei die beiden induzierten Stämme Ara-Butandiol und $\Delta C1$ -Rha-Butandiol diese Zelldichten erst nach 159 h bzw. 140 h erreichten. Bei der Synthese der beiden End-Produkte zeigte der Stamm $\Delta C1-\Delta C2$ -phb-Butandiol eine

Konzentration von 0,8 mM Acetoin nach 21 h und 3,4 mM 2,3-Butandiol nach 45h. Für den Stamm ara-Butandiol waren nach 21 h 1,7 mM Acetoin messbar, dies sank in den folgenden 24 h auf 0,9 mM, parallel dazu stieg die 2,3-Butandiol-Konzentration von 0,2 auf 1,6 mM. Dieser Stamm unter induzierten Bedingungen zeigte allerdings eine geringere Konzentration von 1,5 mM Acetoin und 0,1 mM 2,3-Butandiol. Für den Stamm $\Delta C1$ -rha-Butandiol wurden Konzentrationen für die beiden End-Produkte um 0,3 mM gemessen. Dieser Stamm mit Rhamnose als Induktor ($\Delta C1$ -Rha-Butandiol) produzierte innerhalb von 94 h 0,8 mM Acetoin, welche anschließend wieder auf 0,5 mM sanken. Die 2,3-Butandiol-Konzentration stieg bis zum Zeitpunkt nach 116 h auf einen Wert von 3,3 mM an.

Die CO_2 -Konzentration der Stämme ohne Induktor ($\Delta C1$ - $\Delta C2$ -phb-Butandiol, ara-Butandiol und $\Delta C1$ -rha-Butandiol) sank von Anfang an, nach 45 h erreichten die Stämme $\Delta C1$ - $\Delta C2$ -phb-Butandiol und ara-Butandiol die Grenze von 0,05%. Die Kultivierung des Stammes mit dem Rhamnose-induzierbaren Plasmid wurde nach 116 h beendet, da zu diesem Zeitpunkt die H_2 -Konzentration bei 0,05% lag und damit nicht mehr ausreichend Elektronen-Donor zur Verfügung stand. Die CO_2 -Konzentration der beiden induzierten Stämme (Ara-Butandiol und $\Delta C1$ -Rha-Butandiol) stieg zunächst an, bevor sie abnahm. Für den Arabinose-induzierten Stamm Ara-Butandiol stieg diese Konzentration 5,7% auf 7,8% an und wurde in den folgenden 91 h verbraucht. Bei dem Rhamnose-induzierten Stamm $\Delta C1$ -Rha-Butandiol stieg die Konzentration innerhalb den ersten 20 h auf 6,4% und wurde bis zum Zeitpunkt nach 140 h konsumiert. Die Veränderung der Gaskonzentrationen von H_2 , O_2 und N_2 fand analog zu CO_2 statt.

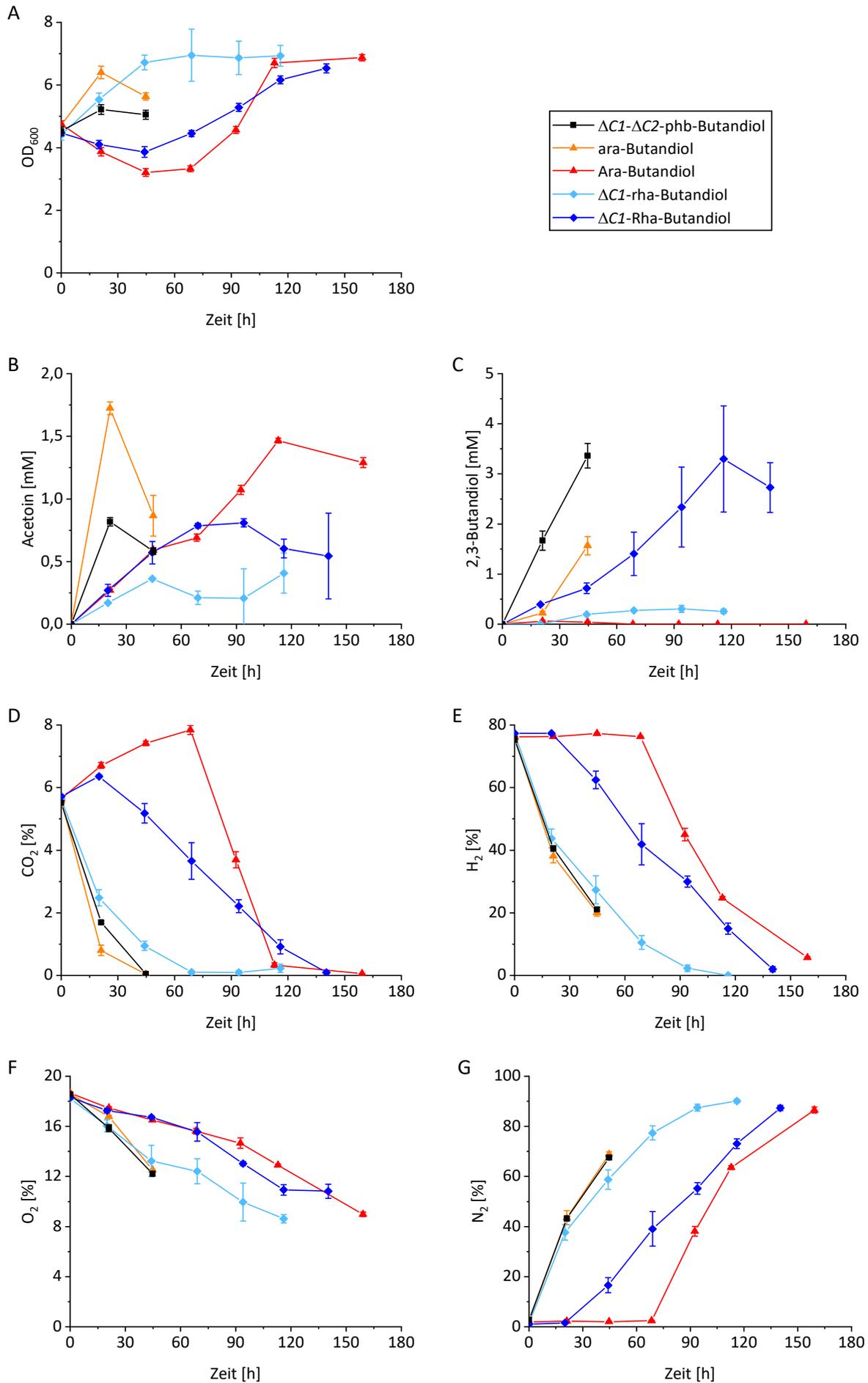


Abb. 32: 2,3-Butandiol-Produktion unter autotrophen Bedingungen. Die Stämme $\Delta C1$ - $\Delta C2$ -phb-Butandiol (schwarzes Quadrat), ara-Butandiol (nicht-induziert: oranges Dreieck, induziert: rotes Dreieck) und $\Delta C1$ -rha-Butandiol (nicht-induziert: hellblaue Raute, induziert: blaue Raute) wurden in 1 l Schottflaschen mit 50 ml Minimal-Medium 81 und einem autotrophen Gasgemisch bei 30°C und 180 rpm kultiviert. Die Abbildung zeigt das Wachstum (A), Acetoin-Produktion (B), 2,3-Butandiol-Produktion (C) und das Verhalten der Gase CO₂ (D), H₂ (E), O₂ (F) und N₂ (G). Die Triplikate (Standardabweichung dargestellt durch Fehlerbalken) wurden beendet, wenn die CO₂-Konzentration unter 0,05% lag. CH₄ wurde nicht detektiert.

3.4. H₂-Produktion mithilfe einer Elektrolyse-Zelle

Für den chemolithoautotrophen Metabolismus und der daraus resultierenden Produktion von Plattformchemikalien werden drei Gase benötigt: H₂ als Elektronendonator, O₂ als Elektronenakzeptor und CO₂ als Kohlenstoffquelle. Sowohl O₂ als auch CO₂ sind in unserer Umgebungsluft vertreten, wohingegen H₂ nicht in ausreichender Konzentration zur Verfügung steht. Daher wurde in dem letzten Abschnitt dieser Arbeit die Produktion von H₂ durch die Spaltung von Wasser fokussiert. Dafür wurde eine Elektrolyse-Zelle aus überwiegend handelsüblichen Materialien hergestellt.

In einem ersten Versuch H₂ zu produzieren, wurde die Version I der Elektrolyse-Zelle verwendet (Abb. 12). Diese Zelle bestand aus drei Halbzellen, zwei Anoden-Halbzellen mit je zwei Elektroden-Platten und dazwischen eine Kathoden-Halbzelle mit vier Elektroden-Platten. Zur Bestimmung des besten Potentials für die H₂-Produktion wurde das Anfangspotential von -1 V vs. Ag/AgCl alle 12 h um -0,5 V gesenkt (Abb. 33). Das Ziel-Potential wurde dabei nie erreicht, das niedrigste Potential wurde mit -0,94 V vs. Ag/AgCl nach 44 h gemessen, zu diesem Zeitpunkt sollte das Potential -2,5 V vs. Ag/AgCl betragen. Der Stromverbrauch, welcher notwendig ist, um Elektronen zur H₂-Produktion bereit zu stellen, zeigte sein Maximum nach 5,4 h mit einem Wert von -0,43 A. Der durchschnittliche Stromverbrauch lag bei -0,12 A. Zu dem Zeitpunkt mit dem höchsten Stromverbrauch war auch die H₂-Konzentration in der gasförmigen Phase der Elektrolyse-Zelle mit 8,1% am größten. Danach sanken der Stromverbrauch und die H₂-Konzentration. Nach 50 h nahmen die H₂-Konzentration und der Stromverbrauch wieder zu.

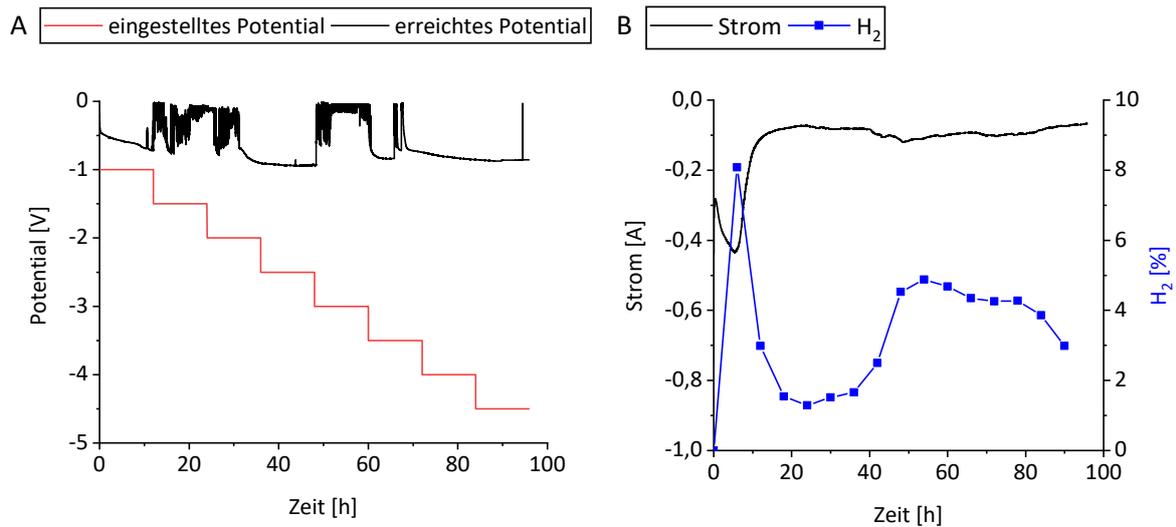


Abb. 33: Messungen der Elektrolyse-Zelle Version I mit allen Elektroden. Diese Elektrolyse-Zelle bestand aus drei Halbzellen: zwei Anoden-Halbzellen mit je zwei Elektroden und einer Kathoden-Halbzelle mit vier Elektroden. Das Anfangspotential lag bei -1 V vs. Ag/AgCl und wurde alle 12 h um -0,5 V gesenkt, bis das End-Potential von -4,5 V vs. Ag/AgCl eingestellt war (rote Linie in A). Dabei wurden das erreichte Potential (schwarze Linie in A), der Stromverbrauch (schwarze Linie in B) und die H₂-Konzentration (blaues Quadrat in B) gemessen.

Die Diskrepanz zwischen eingestelltem und erreichtem Potential konnte durch das Entfernen der Elektroden-Platten in den Halbzellen gelöst werden, sodass in jeder Halbzelle nur noch eine Elektroden-Platte vorhanden war (Abb. 12). Dafür wurde das Potential von 0 V vs. Ag/AgCl bis auf -2 V vs. Ag/AgCl mit einer Rate von $-5 \cdot 10^{-5}$ V/s gesenkt. Bei diesem Versuch entsprach das erreichte Potential auch dem eingestellten Potential (Abb. 34). In den ersten 4 h konnte kein Stromverbrauch gemessen werden, erst ab einem Potential von -0,65 V vs. Ag/AgCl stieg der Stromverbrauch langsam an. Nach 6,4 h stieg der Stromverbrauch deutlich, zu diesem Zeitpunkt wurde ein Potential von -1 V vs. Ag/AgCl angelegt. Die H₂-Produktion stieg ebenfalls nach 6 h an und erreichte das Maximum mit 2,8% nach 11,5 h. Anschließend sank der H₂-Gehalt wieder, allerdings war zu diesem Zeitpunkt kein Potential mehr angelegt. Zu Beginn und am Ende dieses Versuches wurden zusätzlich die pH-Werte bestimmt. Der pH-Wert in den beiden Anoden-Halbzellen betrug sowohl am Anfang als auch am Ende etwa 7,0, der pH-Wert der Kathoden-Halbzelle allerdings stieg von 7,2 am Anfang auf 10,6 am Ende.

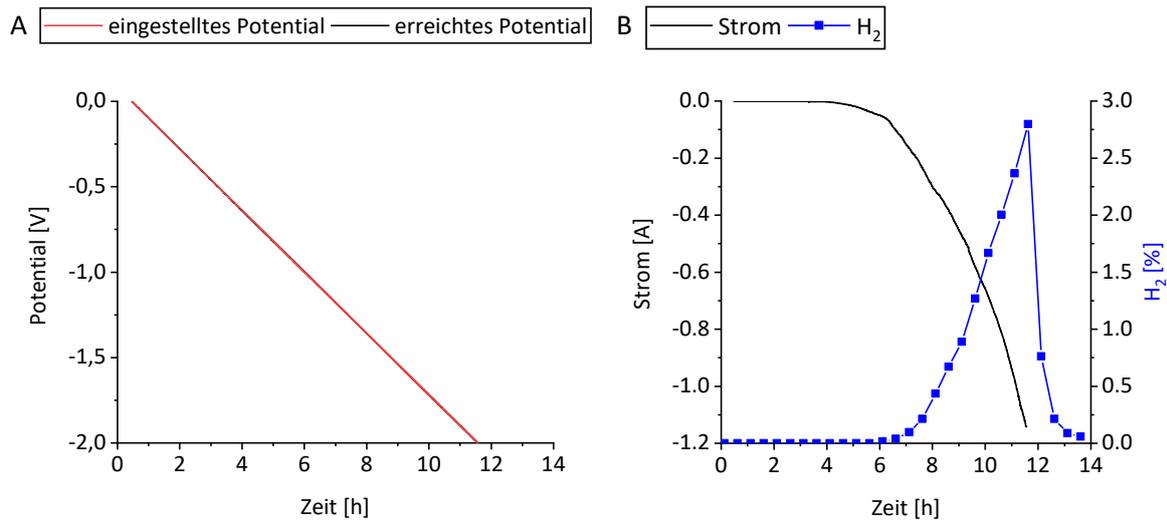


Abb. 34: Messungen der Elektrolyse-Zelle Version I mit reduzierter Elektrodenoberfläche. Diese Elektrolyse-Zelle bestand aus drei Halbzellen: zwei Anoden-Halbzellen mit je einer Elektrode und mittig angeordnet eine Kathoden-Halbzelle ebenfalls mit einer Elektrode. Das Anfangspotential lag bei 0 V vs. Ag/AgCl und wurde mit einer Rate von -5×10^{-5} V/s auf -2 V vs. Ag/AgCl gesenkt. In dieser Abbildung ist das eingestellte und erreichte Potential (deckungsgleich, A) und der Stromverbrauch und die H₂-Konzentration (B) dargestellt.

Um diesen pH-Unterschied auszugleichen, wurden ursprünglich Protonen-permeable Ton-Separatoren eingebaut, die in der Lage waren, unterschiedliche pH-Werte auszugleichen (Anhang-Abb. 2). In dem Kontrollversuch mit erfolgreichem pH-Ausgleich lag die pH-Differenz anfangs bei 6,5 und nach 20 h bei 1,3. Sowohl in dem vorherigen Versuch (Abb. 34) als auch in einem anschließenden Versuch mit unterschiedlichen pH-Werten (Abb. 35) fand kein pH-Ausgleich statt. Die Elektrolyse-Zelle Version I wurde mit Wasser unterschiedlicher pH-Werte befüllt, dabei zeigten die beiden Anoden-Halbzellen einen pH-Wert von 6 bzw. 7 und die mittlere Halbzelle 10,5. Diese Halbzellen wurden mithilfe von Ton-Platten als Membran voneinander getrennt. Dabei schwankten die pH-Werte der Anoden-Halbzellen zwischen 5,3 und 6,2 bzw. zwischen 6,2 und 7,2, wohingegen in der Kathoden-Halbzelle eine langsame Abnahme des pH-Wertes von 10,6 auf 9,3 gemessen wurde. Allerdings war nach 50 h kein Ausgleich der pH-Werte wie in dem Kontrollversuch (Anhang-Abb. 2) zu erkennen.

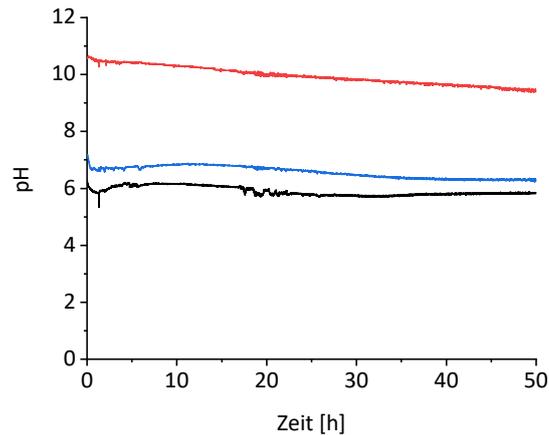


Abb. 35: Verhalten der pH-Werte in der Elektrolyse-Zelle Version I. Die beiden Anoden-Halbzellen wurden mit Wasser pH 6 und 7 (schwarze und blaue Linie) und die mittlere Kathoden-Halbzelle (rote Linie) mit Wasser pH 10,5 befüllt. Diese Halbzellen waren durch eine Ton-Platte als Membran getrennt.

Aufgrund der reduzierten Oberfläche der Elektroden und der pH-Wert-Problematik wurde die Elektrolyse-Zelle weiterentwickelt. Diese Version II wurde ohne Ton-Platten als Separatoren aufgebaut und die Anordnung der Elektroden verändert, so dass Anoden und Kathoden alternierend installiert wurden (Abb. 12). Mit diesem Aufbau konnte gezeigt werden, dass das erreichte Potential mit dem eingestellten Potential identisch sind (Abb. 36). Dabei sank das Potential mit einer Rate von $-5E-05$ V/s von 0 V vs. Ag/AgCl auf -2 V vs. Ag/AgCl. Der Stromverbrauch stieg innerhalb der ersten 6 h nur langsam, ab einem Potential von -1 V vs. Ag/AgCl deutlich an.

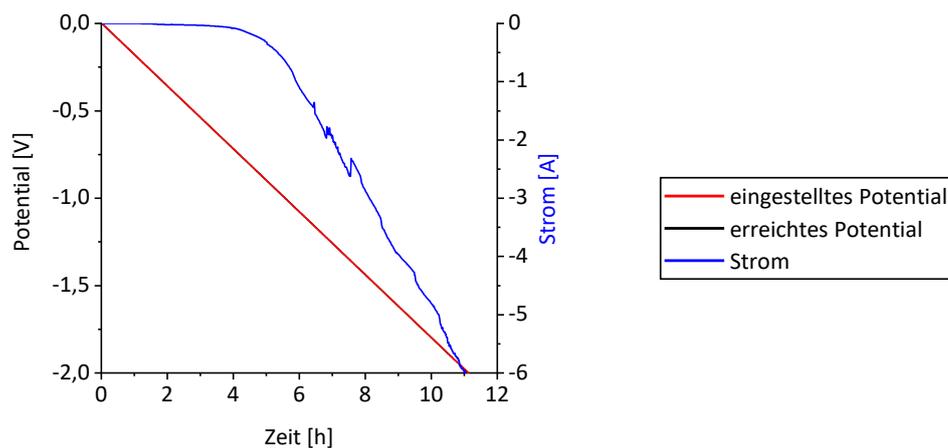


Abb. 36: Messung der Elektrolyse-Zelle Version II. Die Version II ist nicht unterteilt in mehrere Kompartimente, sondern Anoden und Kathoden befinden sich in demselben Kompartiment und sind alternierend angeordnet. Das Anfangspotential lag bei 0 V vs. Ag/AgCl und wurde mit einer Rate von $-5E-05$ V/s auf -2 V vs. Ag/AgCl gesenkt. In dieser Abbildung ist das eingestellte und erreichte Potential (rote und schwarze Linie, deckungsgleich) und der Strom (blaue Linie) dargestellt.

Aufgrund dessen wurde für einen Langzeitversuch ein konstantes Potential von -1 V vs. Ag/AgCl gewählt. Dieses Potential wurde aufgrund von einer Software-Problematik nicht in den Zeiträumen von 5,6 bis 6,0 d sowie von 13,7 bis 14,0 d angelegt (Anhang-Abb. 3), in diesen beiden Zeiträumen gab es korrelierend dazu ebenfalls keine Strommessung (Abb. 37). Für den Zeitraum vor der ersten Unterbrechung konnten zusätzlich die Stromdaten nicht gesichert werden. Weiterhin gab es nach 1,8 d einen Potential-Peak von $0,93\text{ V vs. Ag/AgCl}$, dieser resultierte in einem erhöhten Stromverbrauch bis zu -10 A . Generell ist ein Zusammenhang zwischen Stromverbrauch und H_2 -Konzentration zu sehen, wie bei dem erhöhten Stromverbrauch nach 1,8 d als auch nach 11 d steigt die H_2 -Konzentration an. Die höchste Konzentration an H_2 wurde nach 13,3 d mit $18,9\%$ gemessen. Während der gesamten Laufzeit wurde frisches Medium (pH-Wert $7,0$) mit einer Flussrate von 200 ml/h durch die Elektrolyse-Zelle gepumpt. Der pH-Wert vom Abfluss wurde punktuell gemessen und schwankte zwischen $10,06$ und $10,87$.

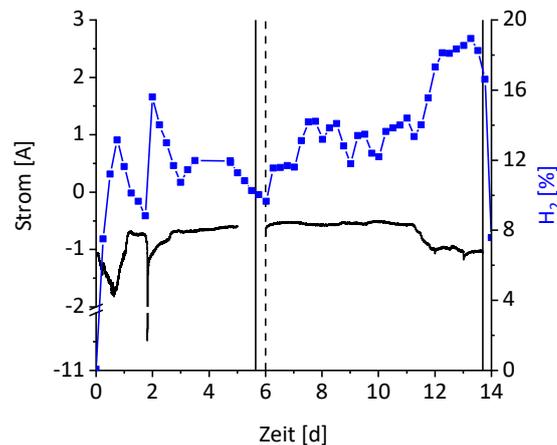


Abb. 37: Messung des Stroms und der H_2 -Produktion in der Elektrolyse-Zelle Version II. Das angelegte Potential wurde konstant bei -1 V vs. Ag/AgCl gehalten. In dieser Abbildung sind der Strom (schwarze Linie) und die H_2 -Konzentration (blaue Linie mit Quadraten) dargestellt. Die Referenzlinien bei 5,6 d und bei 13,7 d zeigten die Unterbrechungen des angelegten Potentials. Die gestrichelte Referenzlinie bei 6,0 d zeigt die Wiederaufnahme des angelegten Potentials.

4. Diskussion

Die Endlichkeit fossiler Rohstoffe bedroht unsere bisherige Lebensweise. Sowohl die Nutzung erneuerbarer Energiequellen als auch die weiterführende Forschung auf diesem Gebiet kann unsere Lebensweise erhalten. Allerdings brauchen wir nicht nur alternative Energiequellen wie Sonnen-, Wind- und Wasserenergie, sondern auch Kohlenstoffquellen, aus denen wir unsere alltäglichen Produkte herstellen können. Als Quelle für Kohlenstoff bieten sich Biomasse und CO₂ an, da Pflanzen und manche Mikroorganismen in der Lage sind, CO₂ zum Aufbau von Kohlenstoffverbindungen zu fixieren. Um die Transition von einer Petrochemie-basierten Produktion von Kohlenstoffverbindungen hin zu einer bio-basierten Produktion zu erleichtern, wurde das Plattformchemikalien-Konzept entwickelt. Plattformchemikalien soll sich leicht bio-basiert herstellen lassen und gleichzeitig die Möglichkeit bieten, sich chemisch in eine Vielzahl weiterer Substanzen umsetzen zu lassen. Unter anderem wurden Acetoin und 2,3-Butandiol als Plattformchemikalien vorgeschlagen [3, 4]. Beide Chemikalien können sowohl ohne weitere chemische Modifikationen direkt eingesetzt werden als auch als Vorstufe für weitere Chemikalien dienen. Aufgrund des breiten Anwendungsspektrums prognostizierte NXTGEN Reports sowohl für Acetoin als auch 2,3-Butandiol einen steigenden Absatzmarkt für die nächsten Jahre [8, 26].

Die Produktion dieser beiden Plattformchemikalien wurde in dieser Arbeit mithilfe des Bakteriums *C. necator* H16 untersucht, da es sowohl in der Lage ist, diverse organische Kohlenstoffquellen als auch die anorganische Kohlenstoffquelle CO₂ zu verwenden. Darüber hinaus wird dieser Mikroorganismus bereits seit knapp 40 Jahren für die Produktion von PHB in der Industrie eingesetzt [60].

4.1. Einflüsse auf die Acetoin-Produktion

Initiale Experimente zeigten die Verwendung von Acetoin als Kohlenstoffquelle durch *C. necator*. Um hohe Ausbeuten des Produzentenstamms zu gewährleisten, wurde in einem ersten Schritt das Operon deletiert, das für die Strukturgene des Acetoinkatabolismus' (*acoABC*) codiert. Der resultierende Deletionsstamm war nicht mehr in der Lage, Acetoin zu metabolisieren (Abb. 13) und bildete in der Folge die Grundlage für alle anderen generierten Stämme in dieser Arbeit, die zur Produktion von Acetoin und 2,3-Butandiol eingesetzt wurden.

Zunächst wurde an der Steigerung der Ausbeute gearbeitet, in dem drei verschiedene Promotorsysteme für die Expression der Gene *alsSD* verwendet und die hypothetischen PHB-Synthasen deletiert wurden [31]. Letzteres war notwendig, da *C. necator* H16 ein hervorragender Produzent für PHB ist und aufgrund dessen vermutet wurde, dass nicht alleine der Prozess des

Wachstums und die Produktion von Plattformchemikalien, sondern auch die Produktion von PHB um die Kohlenstoffquelle konkurrieren. Dafür wurden unterschiedliche Mutanten hergestellt, in denen entweder eine PHB-Synthase (*phaC1* oder *phaC2*) oder beide deletiert wurden. In den Untersuchungen dieser Stämme mittels Nilrot-Färbung konnte gezeigt werden, dass der Stamm mit der Deletion von *phaC1* als auch der Stamm mit der doppelten Deletion von *phaC1* und *phaC2* kein PHB produzierte (Abb. 18, Abb. 19). Dagegen produzierten sowohl die Stämme ohne deletierte PHB-Synthasen als auch der Stamm mit der Deletion von *phaC2* weiterhin PHB. Dies führte zu dem Rückschluss, dass unter diesen Bedingungen nur PhaC1 die PHB-Produktion katalysiert. Diese Erkenntnisse decken sich mit der Aussage von Peplinski et al. [63], die ebenfalls in *C. necator* zeigen konnten, dass PhaC1 das Schlüsselenzym der PHB-Synthese darstellt. Die Autoren konnten allerdings ebenfalls zeigen, dass durch die Expression von *phaC2* in der Knockout-Mutante *C. necator* PHB⁴, die kein PHB mehr produzieren kann, eine PHB-Produktion wieder detektierbar ist [63]. Dies lässt darauf schließen, dass PhaC2 mit PhaC1-Teilen in der Lage ist eine PHB-Synthase-Aktivität zu erhalten [63].

4.1.1. Konstitutive Acetoin-Produktion auf Fructose-Basis

Die Produktion von Acetoin wurde mit dem Vergleichsstamm (phb-Acetoin) als auch mit den drei PHB-Mutanten ($\Delta C1$ -phb-Acetoin, $\Delta C2$ -phb-Acetoin und $\Delta C1$ - $\Delta C2$ -phb-Acetoin) zunächst unter heterotrophen Bedingungen untersucht (Abb. 20 bis Abb. 22). Für diese Stämme wurden die Acetoin-Ausbeute aus der vorliegenden Kohlenstoffquelle Fructose berechnet (Formel 2, Tab. 36). Die aufgestellte Hypothese, dass die Deletion der PHB-Synthase zu einer Steigerung der Acetoin-Produktion führt, konnte nur für den konstitutiven Promotor bestätigt werden, wobei die Deletion von *phaC2* einen deutlichen größeren Einfluss auf die Acetoin-Produktion hatte als die Deletion der eigentlichen PHB-Synthase *phaC1*. Dies konnte zusätzlich durch die Steigerung der mRNA mit der qRT-PCR nachgewiesen werden (Abb. 25 und Abb. 25).

Ebenfalls konnte mithilfe der Proteom-Analyse gezeigt werden, dass signifikant mehr AlsS- und AlsD-Proteine in der dreifachen Deletionsmutante $\Delta C1$ - $\Delta C2$ -phb-Acetoin im Vergleich zu dem Vergleichsstamm phb-Acetoin vorhanden waren (Anhang-Tab. 1), dies deckt sich mit der steigenden Acetoin-Konzentration. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sieben Proteine des PHB-Metabolismus häufiger im Vergleichsstamm phb-Acetoin detektiert wurden (Tab. 35). Dies stimmt mit der Hypothese überein, dass der PHB-Metabolismus durch die beiden Deletionen von *phaC1* und *phaC2* in der Deletionsmutante $\Delta C1$ - $\Delta C2$ -phb-Acetoin deutlich reduziert wurde, da in diesem Stamm ebenfalls kein PHB mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden konnte (Abb. 19). Allerdings wurde ein Enzym mit einer wahrscheinlichen Funktion als β -Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase in der Mutante $\Delta C1$ - $\Delta C2$ -phb-Acetoin häufiger gefunden. Dieses Enzym wurde der β -Oxidation und dem Abbau von Aminosäuren zugeordnet. Im weiteren Sinne gehört dieses Enzym auch zum PHB-

Metabolismus, da es die Vorstufe von PHB (3-Hydroxybutyryl-CoA) über 3-Acetoacetyl-CoA dem Stoffwechsel wieder zur Verfügung stellt. Dies ist notwendig, da die PHB-Synthasen deletiert sind und somit 3-Hydroxybutyryl-CoA nicht über den Speicherstoff PHB und die anschließende PHB Depolymerase zurück in den Stoffwechsel gelangen kann.

In dem Vergleichsstamm *phb*-Acetoin wurde ein Regulator, welcher zur LysR-Familie gehört als unterschiedliches Protein gefunden, dahingegen wurden drei Regulatoren in dem Deletionsstamm $\Delta C1$ - $\Delta C2$ -*phb*-Acetoin mit höheren Proteinmengen detektiert. Diese drei Regulatoren wurde der MarR, YjgH und TetR/AcrR Familie zugeordnet. Nur für den Regulator AbmE aus der YjgH Familie wurde ein Operon identifiziert, welches reguliert werden könnte. Dabei handelt es sich um das Operon *abmABCDGX*, welches für den Abbau von 2-Aminobenzoat verantwortlich ist [91–93]. Bis auf das Enzym AbmA (2-Aminobenzoyl-CoA Monooxygenase/Reduktase), welches den zweiten Schritt in diesem Abbauweg katalysiert, wurden alle Proteine in der Mutante $\Delta C1$ - $\Delta C2$ -*phb*-Acetoin häufiger gefunden. Insgesamt wurden 27 Proteine mit Funktionen im Kohlenstoff-Metabolismus gefunden, die häufiger in dieser Mutante $\Delta C1$ - $\Delta C2$ -*phb*-Acetoin detektiert wurden. Das lässt darauf schließen, dass der zentrale Kohlenstoff-Metabolismus hochreguliert ist, insbesondere der Abbau von Aromaten, Aminosäuren und Fettsäuren zeigte einen höheren Bedarf an Enzymen. Bei einem höheren metabolischen Umsatz ist die Notwendigkeit von mehr Transportern und Poren für den Stoffaustausch durchaus sinnvoll, dies zeigte sich in sieben Proteinen. Wobei ebenfalls zwei Proteine für den Stoffaustausch in dem Vergleichsstamm *phb*-Acetoin gefunden wurden, die häufiger detektiert wurden.

Tab. 36: Acetoin-Ausbeuten unter heterotrophen und autotrophen Bedingungen. Die heterotrophen Ausbeuten wurde nach Formel 2 und die autotrophen Ausbeuten nach Formel 3 berechnet. Dabei ist zu beachten, dass die Ausbeute für den gesamten Versuchszeitraum berechnet wurde. Beide Ausbeuten „Acetoin/Fructose“ und „Acetoin/CO₂“ sind in mol/mol angegeben. Bei einer vollständigen Umsetzung von Fructose in Acetoin werden 100% erreicht, bei der Umsetzung von CO₂ in Acetoin 25%. Für die Ausbeuten ohne Asterisk weicht die Standardabweichung um weniger als 10% von dem Mittelwert ab. Für Ausbeuten mit einem Asterisk (*) liegt die Standardabweichung zwischen 10 und 25%, mit zwei Asteriske (**) zwischen 26 und 49% und mit drei Asteriske (***) zwischen 50 und 66% (verändert nach [74]).

Genom	Plasmid	Induktion	Acetoin/Fructose (max. 100%)	Acetoin/CO ₂ (max. 25%)
	ara-Acetoin		10,60%	7,73%
$\Delta C1$	ara-Acetoin		20,80%	13,81%
$\Delta C2$	ara-Acetoin		8,58%	9,06%
$\Delta C1-\Delta C2$	ara-Acetoin		15,99%	13,35%
	Ara-Acetoin	1,5 mM Arabinose	53,72%	4,21%**
$\Delta C1$	Ara-Acetoin	1,5 mM Arabinose	42,42%	4,55%
$\Delta C2$	Ara-Acetoin	1,5 mM Arabinose	42,38%	0,24%***
$\Delta C1-\Delta C2$	Ara-Acetoin	1,5 mM Arabinose	39,60%	4,34%
	rha-Acetoin		2,60%	1,61%
$\Delta C1$	rha-Acetoin		1,47%	0,21%*
$\Delta C2$	rha-Acetoin		2,58%	1,07%
$\Delta C1-\Delta C2$	rha-Acetoin		3,14%	0,73%***
	Rha-Acetoin	1 mM Rhamnose	69,02%	13,49%
$\Delta C1$	Rha-Acetoin	1 mM Rhamnose	47,46%	24,62%*
$\Delta C2$	Rha-Acetoin	1 mM Rhamnose	9,35%	1,39%*
$\Delta C1-\Delta C2$	Rha-Acetoin	1 mM Rhamnose	53,20%	6,01%
	phb-Acetoin		2,89%	0,64%*
$\Delta C1$	phb-Acetoin		12,60%	2,26%
$\Delta C2$	phb-Acetoin		64,61%	18,99%
$\Delta C1-\Delta C2$	phb-Acetoin		63,01%	25,29%

4.1.2. Induzierbare Acetoin-Produktion auf Fructose-Basis

Neben dem konstitutiven Promotor wurden ebenfalls zwei induzierbare Promotorsysteme auf deren Einfluss auf die Acetoin-Produktion hin getestet. Die Ausbeuten der Stämme in Abhängigkeit der Arabinose-Induktion sanken mit steigender Anzahl der Deletionen der PHB-Synthasen von 54% (Ara-Acetoin) auf 40% ($\Delta C1-\Delta C2$ -Ara-Acetoin) (Tab. 36). Für die Stämme mit Rhamnose als Induktor zeigte sich ein anderes Bild: Bei diesen Versuchen wurde ebenfalls für den Vergleichsstamm Rha-Acetoin die

höchste Ausbeute berechnet, gefolgt von den Stämmen $\Delta C1$ - $\Delta C2$ -Rha-Acetoin und $\Delta C1$ -Rha-Acetoin. Die Ausbeute des $\Delta C2$ -Rha-Acetoin hingegen war im Vergleich zu den anderen drei Stämmen mit Rhamnose-induzierten Plasmid deutlich reduziert. Diese Reduktion fand um den Faktor 4 bis 7,4 statt. Ebenfalls konnte diese Abnahme der Acetoin-Produktion anhand von qRT-PCR-Ergebnissen mit den sinkenden mRNA Leveln in Zusammenhang gebracht werden (Abb. 25 und Abb. 25).

Im Vergleich der beiden Promotorsysteme ist deutlich zu erkennen, dass die nicht-induzierten Systeme weniger Acetoin produzierten und somit die Ausbeute geringer war als bei den induzierten Systemen. Im direkten Vergleich der Systeme lässt sich aussagen, dass der Rhamnose-induzierbare Promotor sowohl eine geringere Basal-Expression aufweist als auch eine höhere Ausbeute erreicht wurde als beim Arabinose-induzierbare Promotor. Des Weiteren konnte die Verwendung der Induktoren als Energie- und Kohlenstoffquelle ausgeschlossen werden (Abb. 23, Anhang-Abb. 1). Das lässt darauf schließen, dass diese beiden induzierbaren Promotorsysteme in *C. necator* H16 funktional sind, wobei der Rhamnose-induzierbare Promotor Vorteile in Bezug auf die Acetoin-Produktion aufweist. Diese beiden Promotorsysteme wurden ebenfalls schon in anderen Studien sowohl zur Expression von *phaM* und GFP als auch zur Produktion von Kohlenwasserstoffe, Methylketone und Terpene verwendet [77, 94–97].

Die höchsten Ausbeuten unter heterotrophen Bedingungen wurden für den induzierten Stamm Rha-Acetoin (69%) und für die beiden Stämme mit dem konstitutiven Promotor $\Delta C2$ -phb-Acetoin (65%) und $\Delta C1$ - $\Delta C2$ -phb-Acetoin (63%) berechnet (Tab. 36).

4.1.3. H₂- und CO₂-basierte Acetoin-Produktion

Die Bestimmung der optimalen O₂-Konzentration war notwendig für eine erfolgreiche Acetoin-Produktion unter autotrophen Bedingungen, da die RubisCO sowohl eine Carboxylase-als auch eine Oxygenase-Aktivität aufweist. Dafür wurden O₂-Konzentrationen zwischen 3 und 30% getestet. Bei der statistischen Auswertung dieser Daten wurde festgestellt, dass die O₂-Konzentration zwischen 3 und 20% kaum einen Einfluss auf das Wachstum hatte (Abb. 26), dies ist nicht weiter überraschend, da das Bakterium an wechselnde O₂-Konzentrationen in seinem natürlichen Habitat adaptiert ist. Die stark reduzierte Wachstumsrate bei O₂-Konzentrationen von 25% und 30% ist dadurch zu erklären, dass in unserer Luft etwa 21% O₂ enthalten sind, und somit keine Anpassung an höhere O₂-Konzentrationen notwendig ist.

Im Gegensatz zu den heterotrophen Ausbeuten, bei denen das theoretische Maximum bei 100% lag, konnten bei den autotrophen Ausbeuten maximal 25% erreicht werden, da diese Ausbeute auf der Basis von Acetoin/CO₂ berechnet wurde und insgesamt vier CO₂ in einem Acetoin verbleiben. Mithilfe dieser Berechnung wurden die höchsten Ausbeuten unter autotrophen Bedingungen für den

Rhamnose-induzierten Stamm $\Delta C1$ -Rha-Acetoin (25%) und den Stamm mit dem konstitutiven Promotor $\Delta C1$ - $\Delta C2$ -phb-Acetoin (25%) bestimmt (Tab. 36). Bei diesen beiden Stämmen wurde die maximale Ausbeute erreicht. Aufgrund dessen, dass die Acetoin-Produktion und das Wachstum um die Kohlenstoffquellen konkurrieren, dürften diese beiden Stämme kein Wachstum gezeigt haben. Die zusätzliche Konkurrenz von der PHB-Produktion um die Kohlenstoffquelle wurde durch die Deletion von der PHB-Synthase *phaC1* unterbunden. Die Zunahme der OD₆₀₀ von 3,6 auf 4,1 für den ersten Stamm kann dadurch erklärt werden, dass die Zellen nicht nur das zur Verfügung gestellte CO₂, sondern auch Stoffwechselprodukte, die während der Kultivierung in komplexen Medien als Vorkultur produziert wurden, verwendeten. Für den zweiten Stamm sank die OD₆₀₀ von 5,0 auf 4,6. Daraus lässt sich schließen, dass Zellbestandteile für den Erhalt der restlichen Population verwendet wurden. Dieses kannibalistische Verhalten wurde bereits für den verwandten Stamm *C. necator* N-1 beschrieben [35, 98].

Die Hypothese, durch Deletion der PHB-Synthasen eine höhere Acetoin-Produktion zu erreichen, konnte ebenfalls unter autotrophen Bedingungen für den konstitutiven Promotor bestätigt werden (0,6% zu 25%), wobei die Deletion von *phaC2* hier ebenfalls einen größeren Einfluss auf die Produktion hatte als die Deletion der eigentlichen Synthase *phaC1*. Bei dem Arabinose-induzierbaren Promotor konnte ebenfalls eine Steigerung der Acetoin-Produktion festgestellt werden (8% zu 13%). In diesem Fall wurde die Steigerung überwiegend durch die Deletion von *phaC1* erreicht. Bei dem Rhamnose-induzierten Promotor wurde zwar eine Steigerung durch die Deletion von *phaC1* festgestellt (13% zu 25%), allerdings führte die (zusätzliche) Deletion von *phaC2* zur Reduktion der Acetoin-Produktion (13% zu 1% bzw. 6%)

Die verlängerte Lag-Phase der induzierten gegenüber den nicht-induzierten Stämmen (Abb. 27, Abb. 28) ist dadurch zu erklären, dass alle Zellen von einer heterotrophen Vorkultur in die autotrophe Hauptkultur überführt wurden und dabei eine Adaption an die neuen Wachstumsbedingungen stattfindet. Gleichzeitig wurde in der Hälfte aller Kulturen die Expression der Gene *alsSD* durch die Zugabe eines Induktors induziert, so dass die induzierten Zellen sich sowohl an die autotrophen Bedingungen durch die Expression von Hydrogenasen und CBB-Zyklus anpassen als auch zusätzlich die Expression der Acetoin-Gene gewährleisten mussten. Nach dieser lag-Phase verhielten sich die meisten induzierten Stämme vergleichbar zu den nicht-induzierten Stämmen. Allerdings produzierten die Arabinose-induzierten Stämme weniger Acetoin als die nicht-induzierten Referenzstämmen. Wohingegen bei den Stämmen mit dem Rhamnose-induzierbaren Promotor die Acetoin-Ausbeute durch die Induktion, wie erwartet, anstieg. Ohne eine vorherige Adaption an autotrophe Bedingungen scheinen der konstitutive und der Rhamnose-induzierbare Promotor eine geeignete Wahl für die Acetoin-Produktion zu sein.

4.1.4. Einfluss der PHB-Synthasen auf die Acetoin-Produktion

Wie schon oben erwähnt, zeigte der konstitutive Promotor eine Steigerung der Acetoin-Ausbeuten mit den Deletionen von *phaC1* und/oder *phaC2*, sowohl unter heterotrophen als auch unter autotrophen Bedingungen, wobei die hauptsächliche Steigerung durch die Deletion von *phaC2* hervorgerufen wurde (Tab. 36). Daraus könnte geschlossen werden, dass die mRNA oder das Protein von dem Gen *phaC2* einen negativen regulatorischen Effekt auf den *phb*-Promotor hatte.

Bei den beiden induzierbaren Promotorsystemen wurde die Acetoin-Ausbeute nur in einem von acht Versuchen gesteigert, wenn *phaC2* zusätzlich deletiert wurde. In diesem Fall stieg die Ausbeute von 8% für den Stamm ara-Acetoin auf 9% für den Stamm $\Delta C2$ -ara-Acetoin, beide Stämme wurden unter autotrophen Bedingungen kultiviert. Bei der zusätzlichen Deletion von *phaC1* wurde eine Steigerung der Acetoin-Ausbeute im Vergleich zu dem Vergleichsstamm in 50% der Fälle berechnet. Daher kann davon ausgegangen werden, dass der vermeintlich negative regulatorische Effekt von *phaC2* zusätzlich durch weitere Faktoren beeinflusst wurde. Da in diesem Fall die Deletion von *phaC2* einen negativen Einfluss auf die Acetoin-Produktion hatte, welcher aber durch die Deletion von *phaC1* kompensiert werden könnte. Die Funktion von PhaC2 ist bisher nicht geklärt, es ist aber bekannt, dass dieses Protein mit der PHB-Granula verbunden ist [99, 100] und dass es in einer Deletionsmutante von *phaC1* kein PHB produziert (Abb. 18, Abb. 19), aber in einer Knockout-Mutante von *phaC1* in der Lage ist PHB zu produzieren [63]. Daher wird davon ausgegangen, dass PhaC1 und PhaC2 miteinander interagieren.

4.1.5. Acetoin-Produktion im Vergleich

In dieser Arbeit wurde Acetoin nicht nur im Batch-System unter hetero- als auch autotrophen Bedingungen, sondern auch in einem kontinuierlichen System produziert. In diesem System wurde kontinuierlich autotrophes Gas zugeführt und verbrauchtes Gas abgeleitet. Für diese Produktion wurde der beste Acetoin-Produzent unter autotrophen Bedingungen ausgewählt, dabei handelte es sich um den Stamm $\Delta C1$ - $\Delta C2$ -*phb*-Acetoin (Tab. 36). Dieser Stamm produzierte 44 mM bzw. 3,9 g/l Acetoin innerhalb von 14 d (Abb. 30), dies entspricht einer Produktivität von 11,6 mg/(l*h). Im Vergleich dazu erreichte derselbe Stamm ($\Delta C1$ - $\Delta C2$ -*phb*-Acetoin) unter autotrophen Bedingungen im Batch-System eine Acetoin-Konzentration von 13,7 mM bzw. 1,2 g/l Acetoin mit einer Produktivität von 38,9 mg/(l*h) (Abb. 29). In diesem Versuch wurde eine Ausbeute von 32% für den Zeitraum von 31 h berechnet. Zusätzlich wurde im heterotrophen Batch-System von dem induzierten Stamm Rha-Acetoin eine maximale Acetoin-Konzentration von 8,5 mM bzw. 0,75 g/l produziert (Abb. 21), dies entspricht einer Ausbeute von 72% in den ersten 44 h und einer Produktivität von 17,1 mg/(l*h).

Für den Vergleich der Produktion von Acetoin wurden Bakterienstämme ausgewählt, die kein 2,3-Butandiol produzieren. Eine Auswahl dieser Stämme ist in Tab. 37 dargestellt. Dabei ist zu beachten,

dass bei einer Kultivierung in Medien mit komplexen Bestandteilen nur das Substrat und nicht z. B. Hefe- oder Fleischextrakt für die Bilanzierung miteinberechnet wurden. Bei einem Vergleich von *C. necator* zu anderen Stämmen, die ebenfalls unter heterotrophen Bedingungen kultiviert wurden, zeigt sich, dass sowohl die Acetoin-Konzentration als auch die Produktivität zu den niedrigeren Werten gehört. Dahingegen zählt die Ausbeute mit über 70% in die obere Hälfte.

Die Acetoin-Produktion aus anorganischen Kohlenstoffquellen ist bisher kaum untersucht. Oliver et al. [101] konnten mit dem genetisch veränderten Cyanobakterium *Synechococcus elongatus* eine Acetoin-Produktion von 0,2 g/l in 72 h zeigen. In dieser Arbeit wurde eine Acetoin-Produktion von 1,2 g/l in 31 h gemessen, dies ist eine Steigerung der Produktivität um das 27-fache. Im Vergleich zu einer kontinuierlichen Kultivierung wurde 3,9 g/l Acetoin allerdings in 14 d detektiert, daher sank die Produktivität im Vergleich zu demselben Stamm um den Faktor 3. Allerdings war die Produktivität im Vergleich zu dem Cyanobakterium um den Faktor 8 höher.

Tab. 37: Vergleich von Acetoin-produzierenden Bakterien. Für *C. necator* wurden die besten Stämme ausgewählt, im heterotrophen Batch-System Rha-Acetoin und in beiden autotrophen Kultivierungen $\Delta C1\text{-}\Delta C2\text{-phb}$ -Acetoin. Für diese Stämme wurden die Ausbeute und die Produktivität zu dem Zeitpunkt mit der höchsten Acetoin-Konzentration berechnet. Die Ausbeuten sind in „mol Acetoin/mol Substrat“ angegeben, die theoretische maximale Ausbeute ist als hochgestellte Zahl angegeben. ⁽¹⁾ steht für spontane Mutationen, ⁽²⁾ für genetisch modifizierte Stämme und ^(komplex) für komplexe Medienbestandteile wie Hefeextrakt und Fleischextrakt. n. d. steht für nicht definiert.

Bakterium	Substrat	Kultivierung	Acetoin	Ausbeute	Produktivität	Quelle
<i>B. subtilis</i>	Glucose	Batch	8,98 g/l	61,20% ^{100%}	63,2 mg/(l*h)	[102]
<i>B. subtilis</i> ²	Glucose	Batch ^{komplex}	38,1 g/l	51,93% ^{100%}	396,9 mg/(l*h)	[103]
<i>C. necator</i> ²	Fructose	Batch	0,75 g/l	71,53% ^{100%}	17,1 mg/(l*h)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> ²	Glucose	Batch	0,81 g/l	90% ^{100%}	n. d.	[104]
<i>E. coli</i> ²	Glucose	Batch ^{komplex}	9,4 g/l	96% ^{100%}	470 mg/(l*h)	[17]
<i>E. coli</i> ²	Glucose	Fed-Batch ^{komplex}	60,3 g/l	68,5% ^{100%}	1206 mg/(l*h)	[6]
<i>Shewanella oneidensis</i> ²	Lactat	Batch	1,80 g/l	43,12% ^{50%}	25,0 mg/(l*h)	[105]
<i>Streptococcus mutans</i>	Glucose	Batch	1,41 g/l	23,83% ^{100%}	9,9 mg/(l*h)	[106]
<i>Streptococcus mutans</i> ¹	Glucose	Batch	3,26 g/l	66,67% ^{100%}	23,0 mg/(l*h)	[106]
<i>C. necator</i> ²	CO ₂	Batch	1,2 g/l	32,33% ^{25%}	38,9 mg/(l*h)	diese Arbeit
<i>C. necator</i> ²	CO ₂	Kontinuierlich	3,9 g/l	n. d.	11,6 mg/(l*h)	diese Arbeit
<i>Synechococcus elongatus</i> ²	CO ₂ (NaHCO ₃)	Batch	0,20 g/l	4,61% ^{25%}	1,43 mg/(l*h)	[101]

4.2. Produktion von 2,3-Butandiol

Für die Produktion von 2,3-Butandiol wurde von jedem Promotor jeweils der Stamm mit der höchsten Acetoin-Produktion ausgewählt und unter den entsprechenden Bedingungen kultiviert. Dabei zeigten sich für das Arabinose-induzierbare Plasmid der Stamm *C. necator* H16_Δ_{aco}ABC (ara-Butandiol) und für das Plasmid mit dem konstitutiven Promotor der Stamm *C. necator* H16_Δ_{aco}ABC_Δ_{pha}C1_Δ_{pha}C2 (ΔC1-ΔC2-phb-Butandiol) als geeignete Kandidaten für die 2,3-Butandiol-Produktion unter heterotrophen und autotrophen Bedingungen. Für das Rhamnose-induzierte Plasmid wurde für die heterotrophe Produktion der Stamm *C. necator* H16_Δ_{aco}ABC (rha-Acetoin) und für die autotrophe der Stamm mit der zusätzlichen Deletion von *pha*C1 (ΔC1-rha-Butandiol) ausgewählt. In der Tab. 38 sind diese Stämme mit den Ausbeuten für Acetoin bzw. 2,3-Butandiol dargestellt, die anhand der Experimente (Abb. 31, Abb. 32) und der Formel 3 über die

gesamte Laufzeit berechnet wurden. Bei der Hälfte der Experimente konnte zum Ende des Experimentes kein 2,3-Butandiol detektiert werden und somit betrug auch die Ausbeute 0%. Das bedeutet allerdings nicht, dass 2,3-Butandiol zu keinem Zeitpunkt detektiert wurde, sondern dass das entstandene 2,3-Butandiol wieder in Acetoin umgewandelt wurde. Acetoin und 2,3-Butandiol stehen im Gleichgewicht, abhängig von dem NADH + H⁺ und NAD⁺ Level in der Zelle (Abb. 3).

Die beiden Stämme ara-Butandiol und rha-Butandiol produzierten unter heterotrophen Bedingungen in dem gesamten Zeitraum kein 2,3-Butandiol, wobei auch für den Rhamnose-induzierbaren Stamm rha-Butandiol kein Acetoin detektiert wurde. Tendenziell wurde erwartet, dass die Stämme eine ähnliche Kohlenstoffbilanz erzielen wie in der alleinigen Produktion von Acetoin. Abgesehen von dem Stamm $\Delta C1$ -rha-Butandiol unter autotrophen Bedingungen wurde für jedes Experiment eine geringe Kohlenstoffausbeute im Vergleich zu den Acetoin-Ausbeuten berechnet (Tab. 36). Dies könnte damit zusammenhängen, dass für die 2,3-Butandiol-Produktion ein weiteres Gen exprimiert wurde und somit der Zellstress nochmal erhöht wurde. Wie auch bei der Acetoin-Produktion zeigten die nicht-induzierten Stämme rha-Butandiol und $\Delta C1$ -rha-Butandiol eine deutlich geringere Produktion der Plattformchemikalien wie dieselben Stämme mit Induktor. Auch bei dem Arabinose-induzierbarem Plasmid zeigte sich dasselbe Verhalten zwischen nicht-induzierten und induzierten Promotor allerdings nur unter heterotrophen Bedingungen, unter autotrophen Bedingungen wurden für den nicht-induzierten Stamm ara-Butandiol höhere Ausbeuten berechnet.

Tab. 38: Ausbeuten von der kombinierten Produktion von Acetoin (Ac) und 2,3-Butandiol (2,3-BD). Dafür wurden die Stämme ara-Butandiol und $\Delta C1$ - $\Delta C2$ -phb-Butandiol sowohl unter heterotrophen als auch unter autotrophen Bedingungen kultiviert, für das Plasmid pKRrha-*alsSD-budC* wurde für die heterotrophe Kultivierung der Stamm rha-Butandiol und für autotrophe Kultivierung der Stamm $\Delta C1$ -rha-Butandiol gewählt. Die Ausbeuten wurden nach der Formel 2 und Formel 3 berechnet und sind in mol Produkt/mol Substrat angegeben. Dabei ist zu beachten, dass die Ausbeute für den gesamten Versuchszeitraum berechnet wurde. Bei einer vollständigen Umsetzung von Fructose in die Produkte werden 100% und bei CO₂ 25% erreicht. Für die Ausbeuten ohne Asterisk weicht die Standardabweichung um weniger als 10% von dem Mittelwert ab. Für Ausbeuten mit einem Asterisk (*) liegt die Standardabweichung zwischen 11 und 16%, mit zwei Asteriske (**) bei 34% und mit drei Asteriske (***) bei 50%.

Plasmid	Induktion	Ac/Fructose	2,3-BD/Fructose	Ac/CO ₂	2,3-BD/CO ₂
ara-Butandiol		7,86%*	0%	1,82%*	3,29%
Ara-Butandiol	1,5 mM Arabinose	39,50%	0%	2,69%	0%
rha-Butandiol		0%	0%	0,88%**	0,55%*
Rha-Butandiol	1 mM Rhamnose	10,09%	48,40%	1,12%***	5,67%*
phb-Butandiol		16,50%	0%	1,24%	7,17%

Allerdings ist der Wildtyp-Stamm von *C. necator* H16 nicht nur in der Lage Acetoin zu verstoffwechseln, sondern kann ebenfalls auch 2,3-Butandiol in sehr geringen Mengen (0,75 mM in 67 h) verwerten (Anhang-Abb. 4). Für die Nutzung von 2,3-Butandiol ist das Enzym Adh zuständig, welches durch eine spontane Mutation im Promotor zu „gutem Wachstum“⁴ mit 2,3-Butandiol als einzige Energie- und Kohlenstoffquelle führt [44, 107].

Der jeweils beste *C. necator* Stamm unter heterotrophen (Rha-Butandiol) und autotrophen Bedingungen ($\Delta C1$ - $\Delta C2$ -phb-Butandiol) wurde für den Vergleich mit anderen 2,3-Butandiol-produzierenden Stämmen herangezogen. Dafür wurden einige 2,3-Butandiol-produzierenden Bakterien in der Tab. 39 aufgelistet. Dabei zeigt sich, dass die heterotrophe Produktion von 2,3-Butandiol unter diesen Bedingungen anderen Kultivierungsstrategien und Bakterien deutlich unterliegt. Allerdings ist *C. necator* nicht für sein heterotrophes Wachstum bekannt, sondern viel mehr für das autotrophe Wachstum. Dies ist ebenfalls an den Produktivitäten zu erkennen, da *C. necator* unter heterotrophen Bedingungen eine Produktivität von 4,3 mg/(l*h) aufweist, aber unter autotrophen Bedingungen sogar 6,8 mg/(l*h) erreicht. Unter CO₂-fixierenden Bedingungen ist der in dieser Arbeit entwickelte *C. necator* Stamm in der Lage mit dem acetogenen Bakterium *Clostridium autoethanogenum* und dem Cyanobakterium *Synechococcus elongatus* hinsichtlich der Ausbeute und Produktivität von 2,3-Butandiol zu konkurrieren.

⁴ Übersetztes Zitat aus [44]: „good growth“, Abkürzungen Tabelle 2

Tab. 39: Vergleich von 2,3-Butandiol-produzierenden Bakterien. Für *C. necator* wurden die besten Stämme für die Produktion von 2,3-Butandiol (2,3-BD) ausgewählt, unter heterotrophen Bedingungen Rha-Butandiol und unter autotrophen Bedingungen $\Delta C1$ - $\Delta C2$ -phb-Butandiol. Die Ausbeuten sind in „mol 2,3-Butandiol/mol Substrat“ angegeben, die theoretische maximale Ausbeute ist als hochgestellte Zahl angegeben. (1) steht für spontane Mutationen, (2) für genetisch modifizierte Stämme und (^{komplex}) für komplexe Medienbestandteile wie Hefeextrakt und Fleischextrakt. n. d. steht für nicht definiert.

Bakterium	Substrat	Kultivierung	2,3-BD	Ausbeute	Produktivität	Quelle
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Glycerin	Batch	19,4 g/l	35,87% ^{50%}	404 mg/(l*h)	[108]
<i>C. necator</i> ²	Fructose	Batch	0,40 g/l	48,40% ^{100%}	4,3 mg/(l*h)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> ²	Glucose	Batch ^{komplex}	10 g/l	67,54% ^{100%}	208 mg/(l*h)	[15]
<i>E. coli</i> ²	Glucose + Xylose	Batch	54 g/l	96,21% ^{98%}	450 mg/(l*h)	[109]
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Glucose	Batch	14,7 g/l	60,22% ^{100%}	170 mg/(l*h)	[110]
<i>Klebsiella oxytoca</i> ^{1,2}	Glucose	Batch	23,5 g/l	93,58% ^{100%}	200 mg/(l*h)	[110]
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Fructose	Batch	44,84 g/l	64,24% ^{100%}	1,25 g/(l*h)	[111]
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ²	Fructose	Batch	49,47 g/l	86,48% ^{100%}	1,37 g/(l*h)	[111]
<i>Serratia marcescens</i> ²	Glucose	Fed-Batch	152 g/l	92,6% ^{100%}	2,7 g/(l*h)	[12]
<i>Clostridium autoethanogenum</i>	CO + CO ₂	Batch ^{komplex}	0,18 g/l	n. d.	2,5 mg/(l*h)	[112]
<i>C. necator</i> ²	CO ₂	Batch	0,30 g/l	7,17% ^{25%}	6,8 mg/(l*h)	diese Arbeit
<i>Synechococcus elongatus</i> ²	CO ₂ (NaHCO ₃)	Kontinuierlich	2,38 g/l	2,52% ^{25%}	4,7 µg/(l*h)	[101]
<i>Synechococcus elongatus</i> ²	CO ₂ (NaHCO ₃)	Batch	0,50 g/l	10,89% ^{25%}	6,9 mg/(l*h)	[113]

4.3. Produktion von Chemikalien mithilfe von *C. necator*

Um die Produktion von anderen Chemikalien mit der von Acetoin und 2,3-Butandiol auf Basis desselben Bakteriums vergleichen zu können, wurden in der Tab. 40 die Konzentration, die Ausbeute und die Produktivität von dieser Arbeit und zehn weiteren Veröffentlichungen zusammengefasst. Sowohl unter heterotrophen als auch autotrophen Bedingungen ist es auffällig, dass die höchsten Ausbeuten im Vergleich zu der theoretisch maximalen Ausbeute bei der Produktion von Acetoin und 2,3-Butandiol erreicht wurden. Aufgrund dieser hohen Ausbeuten sollte es ebenfalls möglich sein, höhere Konzentrationen zu erhalten, z. B. durch den Einsatz höherer Substrat-Konzentration. Diese gliedern sind besonders bei der heterotrophen Kultivierung im mittleren Feld ein, wie auch die 2,3-Butandiol-Konzentration unter autotrophen Bedingungen. Wohingegen sich die Acetoin-Konzentrationen unter autotrophen Bedingungen ebenfalls an der Spitze ansiedelt. Bei der Produktivität kann man ein ähnliches Verhalten erkennen, im Vergleich zu anderen Veröffentlichungen ist die heterotrophe Produktivität eher Mittelmaß, wohingegen die autotrophe Produktivität von Acetoin und 2,3-Butandiol die vorderen Plätze einnehmen. Dies zeigt, dass die hier angewandte Strategie zur Produktion von Acetoin und 2,3-Butandiol im Vergleich zu anderen Veröffentlichungen Vorteile unter autotrophen Bedingungen aufweist.

Tab. 40: Produktion von Chemikalien mit *C. necator*. Diese Chemikalien wurden mithilfe von genetisch veränderten *C. necator* Stämmen produziert. Ausgenommen aus dieser Tabellen sind alle Produktionen von Polyhydroxyalkanoaten, zu denen auch PHB zählt. Die Ausbeuten sind in „mol Produkt/mol Substrat“ angegeben, die theoretische maximale Ausbeute ist als hochgestellte Zahl angegeben. Für die Acetoin bzw. 2,3-Butandiol-Produktion unter heterotrophen Bedingungen wurde der Stamm Rha-Acetoin bzw. Rha-Butandiol und unter autotrophen Bedingungen der Stamm $\Delta C1-\Delta C2$ -phb-Acetoin bzw. $\Delta C1-\Delta C2$ -phb-Butandiol gewählt. n. d. steht für nicht definiert.

Produkt	Konzentration	Substrat	Ausbeute	Produktivität	Quelle
Acetoin	0,75 g/l	Fructose	71,53% ^{100%}	17,1 mg/(l*h)	diese Arbeit
Alkane + Alkene	0,43 g/l	Fructose	n. d.	4,3 mg/(l*h)	[114]
2,3-Butandiol	0,40 g/l	Fructose	48,40% ^{100%}	4,3 mg/(l*h)	diese Arbeit
Ethanol	2,40 g/l	Glucose	52% ^{200%}	20,0 mg/(l*h)	[115]
Isobutanol	200 mg/l	Fructose	4,86% ^{100%}	2,7 mg/(l*h)	[116]
Isobutanol + 3-Methyl-1-Butanol	307 mg/l	Fructose	n. d.	6,4 mg/(l*h)	[117]
Isopropanol	3,4 g/l	Fructose	59,95% ^{200%}	32,4 mg/(l*h)	[118]
Isopropanol	8,5 g/l	Fructose	12,61% ^{200%}	88,5 mg/(l*h)	[119]
Methylketone	65 mg/l	Fructose	n. d.	0,9 mg/l*h)	[96]
Acetoin	1,2 g/l	CO ₂	32,33% ^{25%}	38,9 mg/(l*h)	diese Arbeit
Acetoin	3,9 g/l	CO ₂	n. d.	11,6 mg/(l*h)	diese Arbeit
Alkane + Alkene	4,4 mg/l	CO ₂	n. d.	0,44 mg/l*h)	[114]
2,3-Butandiol	0,30 g/l	CO ₂	7,17% ^{25%}	6,8 mg/(l*h)	diese Arbeit
Isobutanol	30 mg/l	Formiat	n. d.	0,63 mg/(l*h)	[116]
Isobutanol + 3-Methyl-1-Butanol	1,4 g/l	Formiat	n. d.	11,7 mg/(l*h)	[120]
α -Humulen	6,3 mg/l	CO ₂	0,06% ^{6,6%}	0,13 mg/(l*h)	[97]
2-Hydroxyisobuttersäure	3,2 g/l	CO ₂	3% ^{25%}	6,4 mg/(l*h)	[121]
Methylketone	180 mg/l	CO ₂	n. d.	1,9 mg/(l*h)	[96]

4.4. Produktion von H₂ mit einer Elektrolyse-Zelle

Wie in der Einleitung dargestellt, gibt es viele verschiedene Methoden zur H₂-Herstellung. Um die Freisetzung von CO und CO₂ bei der Produktion dieser energiereichen Verbindung zu vermeiden, wurde in dieser Arbeit H₂ mithilfe einer Elektrolyse-Zelle produziert. Diese Elektrolyse-Zelle wurde aus handelsüblichen Materialien aufgebaut. Nur für die Metallplatten der Kathoden wurde nicht-handelsübliches Material verwendet, da Selembo et al. [79] für den Edelstahl in der Ausführung 1.4944 die höchsten H₂-Produktion zeigen konnten. Bei dem Aufbau der Version I wurde auf eine große Elektrodenoberfläche und die Separierung von Anoden- und Kathodenhalbzelle fokussiert, um unterschiedliche Medien einsetzen zu können (Abb. 10, Abb. 12 A). Bei dem ersten Betrieb dieser Elektrolyse-Zelle wurde ein Sweep durchgeführt, bei dem die Spannung alle 12 h um 0,5 V gesenkt werden sollte. Bei der Messung der Spannung stellte sich heraus, dass das gewünschte Potential nicht erreicht wurde (Abb. 33). Dies könnte daran liegen, dass eine solche Anordnung von Elektroden generell nicht den erwünschten Zweck erreicht. Üblicherweise werden Konstruktionen mit drei Elektroden verwendet, dabei handelt es sich um eine Gegenelektrode, Arbeitselektrode und Referenzelektrode. Mithilfe eines angeschlossenen Potentiostat wurde zwischen der Referenzelektrode und der Arbeitselektrode das gewünschte Potential angelegt und die Referenzelektrode misst dabei die Differenz zwischen der Arbeits- und Gegenelektrode. Aufgrund der durch das Potential unterstützten Reaktionen an der Arbeits- und Gegenelektrode fließen Elektronen von einer Elektrode zur anderen, dieser Strom wurde ebenfalls durch den Potentiostat gemessen. In der hier verwendeten Konstruktion ist die Referenzelektrode zwischen zwei Kathoden (Arbeitselektroden) installiert und somit könnte sowohl die Messung der Referenzelektrode als auch die Einstellung des Potentials zwischen Arbeitselektrode und Referenzelektrode beeinträchtigt werden. Damit nicht in der Lage zu sein, das gewünschte Potential in dieser Version der Elektrolyse-Zelle messen bzw. anlegen zu können. Zusätzlich ist es möglich, dass durch die Installation des Ton-Separators und der vermeintlich überflüssigen Elektroden, die kein oder ein schwach elektrisches Feld aufbauen, eine Diffusionsbarriere entsteht, wodurch die Diffusion der Protonen verlangsamt oder sogar verhindert werden könnte.

Dieses Problem konnte durch Entfernen von drei Kathoden und zwei Anoden (je eine auf einer Seite) gelöst werden (Abb. 12 B). Im anschließenden Versuch konnte gezeigt werden, dass durch ein sinkendes Potential ein steigender Stromverbrauch resultiert (Abb. 34). Proportional zu dem steigenden Stromverbrauch nahm ebenfalls die H₂-Konzentration zu. In diesem Versuch wurde zusätzlich der pH-Wert am Anfang und am Ende des Versuches überprüft, allerdings stellte sich kein Ausgleich der pH-Werte zwischen den beiden Anoden-Halbzellen und der Kathoden-Halbzelle ein. Da ein pH-Ausgleich mit einem Ton-Separator zuvor gezeigt werden konnte (Anhang-Abb. 2), wurde

davon ausgegangen, dass die Poren des Separators durch Partikel, die möglicherweise bei der Reduktion und Oxidation an den Elektroden gelöst wurden, verschlossen wurden. Dies würde zu einer Limitierung von Protonen in der Kathoden-Halbzelle führen und somit ebenfalls die H₂-Produktion reduzieren.

Um diese Problematik zu vermeiden und zusätzlich die Elektroden-Oberfläche zu vergrößern, wurde eine zweite Version der Elektrolyse-Zelle aufgebaut, dabei wurde auf die Separation von Anoden- und Kathoden-Halbzellen verzichtet und die Elektroden alternierend installiert (Abb. 11, Abb. 12 C). Für das erste Experiment wurde die Sweep-Methode gewählt, um so über einen größeren Potentialbereich das Verhalten von eingestelltem und erreichtem Potential und gleichzeitig den Stromverbrauch verfolgen zu können. Dabei zeigte sich, dass das gewünschte Potential über den gesamten Messzeitraum dem erreichten Potential entsprach (Abb. 36). Dieses Experiment wurde ebenfalls dafür verwendet, um ein Potential für einen Langzeitversuch zur H₂-Produktion zu bestimmen. Für diesen anschließenden Versuch wurde ein Potential von -1 V vs. Ag/AgCl festgelegt, da bei diesem Potential der Stromverbrauch bereits linear stieg. Dieses Potential wurde über 14 d an die Elektrolyse-Zelle Version II angelegt, dabei wurde das gewünschte Potential fast über den gesamten Zeitraum erfolgreich gemessen (Anhang-Abb. 3). Die Schwankungen der H₂-Konzentration in dieser Elektrolyse-Zelle sind zum einen durch den schwankenden Stromverbrauch zu erklären (Abb. 37) und zum anderen durch den Verlust von H₂, da davon ausgegangen wurde, dass das System nicht vollständig Gas-dicht und insbesondere nicht dicht für H₂ ist. Im Durchschnitt wurden ein Strom von -0,75 A und eine H₂-Konzentration von 12,8% gemessen. Die durchschnittliche Netto-Produktivität von H₂ (inkl. Verluste) lag bei 3,55 cm³ H₂/h, wohingegen 11,29 cm³ H₂/h für den Durchschnitt der Bruttoproduktivität (exkl. Verluste) berechnet wurde.

Das Phänomen der Wasserspaltung an Elektroden wurde bereits 1800 publiziert [122]. Seit dem wurden sowohl Messverfahren zur Quantifizierung von Gasen etabliert als auch die gesamte Elektrolyse-Zelle weiterentwickelt. Dabei spielen nicht nur die Bedingungen wie Druck, Temperatur und angelegte Spannung, sondern auch die verwendeten Materialien der Elektroden, Medien und Separatoren eine wichtige Rolle. Diese optimierten Elektrolyse-Zellen werden zur industriellen H₂-Produktion eingesetzt und produzieren bis zu 760 m³ H₂/h [123]. Sowohl die Nettoproduktivität als auch die Bruttoproduktivität, der in dieser Arbeit entwickelten Elektrolyse-Zelle, lag deutlich unter der industriellen H₂-Produktion, wobei dieser Vergleich mit Vorsicht zu betrachten ist, da die Produktivität nicht auf die Kathodenoberfläche normiert ist (Tab. 41). Sowohl die Steigerung der Temperatur als auch der Spannung würde zur Verbesserung der H₂-Produktion beitragen. Mit den hier gewählten Bedingungen konnte gezeigt werden, dass es möglich ist mit überwiegend handelsüblichen Materialien eine Elektrolyse-Zelle zuzubauen, die in der Lage ist H₂ zu produzieren. Bei dieser Methode zu H₂-

Produktion kann vollständig auf die CO- und CO₂-Freisetzung verzichtet werden, wenn die zusätzlich benötigte Spannung aus erneuerbaren Energiequellen stammt.

Tab. 41: Vergleich der Elektrolyse-Zelle Version II zu alkalische Elektrolyse-Zelle (AEZ) und Protonenaustauschmembran-Elektrolyse-Zelle (PAMEZ). Die Werte der Elektrolyse-Zelle Version II (Version II-EZ) stammen aus dieser Arbeit (Abb. 37). Sowohl bei der Netto- als auch bei der Brutto-Berechnung wurde der Potential-Peak nicht berücksichtigt.

	Version II-EZ^{Netto}	Version II-EZ^{Brutto}	AEZ [123]	PAMEZ
H ₂ -Produktion [m ³ /h]	3,55E-06	11,29E-06	760	450 [124]
Temperatur [°C]	20	20	60-80	50-80 [123]
Spannung [V vs. SHE]	1,23	1,23	1,8-2,4	1,8-2,2 [123]
Stromdichte [A/cm ²]	1,09E-04	1,13E-04	0,2-0,4	0,6-2,0 [123]

5. Ausblick

5.1. Produktion von Chemikalien in *C. necator*

Um die Produktion von Acetoin und 2,3-Butandiol weiter zu steigern, gibt es mehrere Strategien. Zum einen können die heterotrophen Kulturen weiterhin in Batch-Systemen angezogen werden, allerdings mit einer höheren Ausgangskonzentration an Fructose oder diese Kulturen werden in einem Fed-Batch oder kontinuierlichem System kultiviert, bei denen zusätzliche Fructose hinzugegeben wird, um so die Endkonzentration des Produktes zu erhöhen. Um die Produktivität zu steigern, ist der Einsatz von höheren Zelldichten empfehlenswert, da so die Dichte an Enzym pro Volumeneinheit und die Umsatzrate gesteigert werden kann.

Um die Ausbeute von 2,3-Butandiol steigern zu können, ist es notwendig, das Gleichgewicht von NAD^+ und $\text{NADH} + \text{H}^+$ auf die Seite des reduzierten Redoxäquivalents zu verschieben, da die enzymatische Reaktion von Acetoin zu 2,3-Butandiol von diesem reduzierten Redoxäquivalent abhängt und andernfalls das produzierte 2,3-Butandiol zur Herstellung von $\text{NADH} + \text{H}^+$ zurück zu Acetoin umgewandelt wird. Dazu könnte der NAD^+ und $\text{NADH} + \text{H}^+$ -Metabolismus optimiert werden. Da unter autotrophen Bedingungen eine lösliche, cytoplasmatische Hydrogenase zum Aufbau dieses Redoxäquivalents genutzt wird, wäre es möglich dieses Enzym und das Enzym BudC in räumliche Nähe zu bringen. Dies könnte durch die Herstellung eines Fusionsproteins oder durch die kovalente Bindung von zwei Enzymen stattfinden. Diese Strategie der Produktion von 2,3-Butandiol könnte ebenfalls unter heterotrophen Bedingungen getestet werden, wenn der native Promotor von der Hydrogenase durch einen regulierbaren Promotor ausgetauscht wird. In diesem Fall würde die Kultivierung unter organo- und lithoheterotrophen Bedingungen stattfinden. Um die Produktion von 2,3-Butandiol weiterhin zu stabilisieren und eine Verwertung zu unterbinden, wäre die Deletion des Genes *adh* notwendig.

Besonders bei der Kultivierung unter chemolithoautotrophen Bedingungen wäre eine vorherige Adaption an diese Bedingungen empfehlenswert, da so die Anpassungsphase reduziert werden könnte und die Zellen keinen Wachstumsvorteil ohne Plasmid hätten. Um die Plasmidstabilität zu erhöhen, wäre es zusätzlich möglich die Resistenz des Licht-empfindlichen Antibiotikums Tetrazyklin gegen ein Toxin/Anti-Toxin-System oder gegen eine Komplementierung einer Auxotrophie auszutauschen. Auch wäre eine genomische Integration der Gene denkbar, allerdings würde dies vermutlich mit einer Reduktion der Proteinmenge einhergehen.

Interessant wäre es, das Spektrum an Kohlenstoffquellen zu erweitern, insbesondere um die autotrophe Kohlenstoffquelle CO . Dieses Gas gehört neben H_2 zum Hauptbestandteil von Synthesegas,

welches bei der Verbrennung von Kohle entsteht. Um dieses Abfallgas für die Produktion von Chemikalien einsetzen können, wäre es notwendig *C. necator* die Fähigkeit zur Verwendung von CO beizubringen, wie es zum Beispiel schon acetogene Bakterien können. Der Vorteil in der Verwendung von *C. necator* liegt darin, dass dieses Bakterium genetisch besser zugänglich ist und bei der Oxidation von H₂ mehr Energie gewonnen wird.

Für diese Arbeit wurden die beiden PHB-Synthasen PhaC1 und PhaC2 deletiert. Deren Einfluss auf den allgemeinen Metabolismus und auf die Acetoin-Produktion sollte weiteruntersucht werden, da vor allem die Deletion von *phaC2* einen positiven Effekt auf den konstitutiven *phb*-Promotor vor den Genen *alsSD* hatte.

Alle Kultivierungen in dieser Arbeit wurden in Flüssigkulturen durchgeführt, eine andere Möglichkeit der Kultivierung ist der Biofilm. Der Vorteil von Biofilmkulturen wäre die getrennte Zugabe von H₂ und O₂, in dem das eine Gas durch die Flüssigkeit und das zweite Gas über die Gasphase an die Bakterien gelangt. So würden die Bakterien eine Grenzschicht zwischen H₂ und O₂ aufbauen und eine Mischung dieser beiden Gase zu einem explosiven Gasmisch vermeiden.

5.2. Weiterentwicklung der Elektrolyse-Zelle

In dieser Arbeit wurde die entwickelte Elektrolyse-Zelle zum Zwecke der Spaltung von Wasser und zur Produktion von H₂ eingesetzt. Des Weiteren ist es denkbar, diese Elektrolyse-Zelle als eine mikrobielle Elektrolyse-Zelle zu betreiben. Durch die Kultivierung von exoelektrogene Bakterien auf der Anode mithilfe eines Graphitvlieses kann die notwendige Spannung reduziert werden, da so die Elektronen und die Protonen zur H₂-Produktion nicht mehr aus der Wasserspaltung, sondern durch den Metabolismus von den Bakterien entstehen. In Abhängigkeit von der verwendeten Kohlenstoffquelle würde die mikrobielle Elektrolyse-Zelle H₂ aus regenerativen Energie- und Kohlenstoffquellen herstellen, dabei könnten allerdings auch Abfallströme, wie Abwasser, verwendet werden, um so die Aufbereitungskosten von den Abfallströmen zu reduzieren. In der mikrobiellen Elektrolyse-Zelle würde dann energiereiches H₂ und CO₂ freigesetzt werden.

In Kombination dieser beiden Gase und O₂ sind die vorher entwickelten Bakterienstämme in der Lage, Plattformchemikalien zu produzieren. Somit könnten aus kostenproduzierenden Abfallströmen wertvolle Plattformchemikalien wie Acetoin und 2,3-Butandiol hergestellt werden.

6. Literaturverzeichnis

1. **BP.** *BP statistical review of world energy.* 2018.
2. **Kamm B.** Produktion von Plattformchemikalien und Synthesegas aus Biomasse. *Angew Chemie* 2007;119:5146–5149.
3. **Palsson BO, Fathi-Afshar S, Rudd DF, Lightfoot EN.** Biomass as a source of chemical feedstocks: An economic evaluation. *Science* 1981;213:513–517.
4. **Werpy T, Petersen G (editors).** *Top value added chemicals from biomass.* 2004.
5. **Xiao Z, Lu JR.** Strategies for enhancing fermentative production of acetoin: A review. *Biotechnol Adv* 2014;32:492–503.
6. **Xu Q, Xie L, Li Y, Lin H, Sun S, et al.** Metabolic engineering of *Escherichia coli* for efficient production of (3R)-acetoin. *J Chem Technol Biotechnol* 2015;90:93–100.
7. **Burdock Group.** *Safety assessment of acetoin as a food ingredient.* 2002.
8. **NXTGEN Reports.** *Global acetoin market 2018-2023.* 2018.
9. **Harden A, Walpole GS.** Chemical action of *Bacillus lactis aerogenes* (*Escherich*) on glucose and mannitol: Production of 2,3-butylene glycol and acetylmethylcarbinol. *Proc R Soc London* 1906;77:399–405.
10. **Voloch M, Ladisch MR, Rodwell VW, Tsao GT.** Reduction of acetoin to 2,3-butanediol in *Klebsiella pneumoniae*: A new model. *Biotechnol Bioeng* 1983;25:173–183.
11. **Neish AC, Robertson FM, Blackwood AC, Ledingham GA.** Production and properties of 2,3-butanediol: XVIII. Dissimilation of glucose by *Serratia marcescens*. *Can J Res* 1947;25:65–69.
12. **Zhang L, Sun J, Hao Y, Zhu J, Chu J, et al.** Microbial production of 2,3-butanediol by a surfactant (serrawettin)-deficient mutant of *Serratia marcescens* H30. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2010;37:857–862.
13. **Ma C, Wang A, Qin J, Li L, Ai X, et al.** Enhanced 2,3-butanediol production by *Klebsiella pneumoniae* SDM. *Appl Microbiol Biotechnol* 2009;82:49–57.
14. **Voloch M, Jansen NB, Ladisch MR, Tsao GT, Narayan R, et al.** 2,3-butanediol. *Ind Chem Biochem Fuels* 1985;3:933–947.
15. **Yan Y, Lee CC, Liao JC.** Enantioselective synthesis of pure (R,R)-2,3-butanediol in *Escherichia coli* with stereospecific secondary alcohol dehydrogenases. *Org Biomol Chem* 2009;7:3914–3917.
16. **Ui S, Takusagawa Y, Sato T, Ohtsuki T, Mimura A, et al.** Production of L-2,3-butanediol by a new pathway constructed in *Escherichia coli*. *Lett Appl Microbiol* 2004;39:533–537.
17. **Ui S, Okajima Y, Mimura A, Kanai H, Kudo T.** Molecular generation of an *Escherichia coli* strain producing only the meso-isomer of 2,3-butanediol. *J Ferment Bioeng* 1997;84:185–189.
18. **Celińska E, Grajek W.** Biotechnological production of 2,3-butanediol—Current state and prospects. *Biotechnol Adv* 2009;27:715–725.
19. **Ji XJ, Huang H, Ouyang PK.** Microbial 2,3-butanediol production: A state-of-the-art review. *Biotechnol Adv* 2011;29:351–364.

20. **Maddox IS.** Microbial production of 2,3-butanediol. In: Rehm H, Reed G (editors). *Biotechnology*. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH; 1996. pp. 269–291.
21. **Soltys KA, Batta AK, Koneru B.** Successful nonfreezing, subzero preservation of rat liver with 2,3-butanediol and type I antifreeze protein. *J Surg Res* 2001;96:30–34.
22. **Tran AV, Chambers RP.** The dehydration of fermentative 2,3-butanediol into methyl ethyl ketone preparation of solid acid catalysts properties of catalyst. *Biotechnology* 1987;29:343–351.
23. **Syu MJ.** Biological production of 2,3-butanediol. *Appl Microbiol Biotechnol* 2001;55:10–18.
24. **Bartowsky EJ, Henschke PA.** The ‘buttery’ attribute of wine - Diacetyl - Desirability, spoilage and beyond. *Int J Food Microbiol* 2004;96:235–252.
25. **van Haveren J, Scott EL, Sanders J.** Bulk chemicals from biomass. *Biofuels, Bioprod Biorefining* 2008;2:41–57.
26. **NXTGEN Reports.** *Global 2,3 butanediol market growth 2018-2023*. 2018.
27. **Wilde E.** Untersuchungen über Wachstum und Speicherstoffsynthese von *Hydrogenomonas*. *Arch Mikrobiol* 1962;43:109–137.
28. **Davis DH, Doudoroff M, Stanier RY, Mandel M.** Proposal to reject the genus *Hydrogenomonas*: Taxonomic implications. *Int J Syst Bacteriol* 1969;19:375–390.
29. **Schwartz E, Henne A, Cramm R, Eitinger T, Friedrich B, et al.** Complete nucleotide sequence of pHG1: A *Ralstonia eutropha* H16 megaplasmid encoding key enzymes of H₂-based lithoautotrophy and anaerobiosis. *J Mol Biol* 2003;332:369–383.
30. **DiCenzo GC, Finan TM.** The divided bacterial genome: Structure, function, and evolution. *Microbiol Mol Biol Rev* 2017;81:1–37.
31. **Pohlmann A, Fricke WF, Reinecke F, Kusian B, Liesegang H, et al.** Genome sequence of the bioplastic-producing ‘Knallgas’ bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Nat Biotechnol* 2006;24:1257–1262.
32. **Yabuuchi E, Kosako Y, Yano I, Hotta H, Nishiuchi Y.** Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. no. *Microbiol Immunol* 1995;39:897–904.
33. **Vaneechoutte M, Kämpfer P, De Baere T, Falsen E, Verschraegen G.** *Wautersia* gen. nov., a novel genus accomodating the phylogenetic lineage including *Ralstonia eutropha* and related species, and proposal of *Ralstonia* [*Pseudomonas*] *syzygii* (Roberts et al. 1990) comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004;54:317–327.
34. **Makkar NS, Casipa LE.** *Cupriavidus necator* gen. nov., sp. nov.: a nonobligate bacterial predator of bacteria in soil. *Int J Syst Bacteriol* 1987;37:323–326.
35. **Vandamme P, Coenye T.** Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: A tale of lost and found. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004;54:2285–2289.
36. **Lapage SP, Sneath PHA, Lessel EF, Skerman VBD, Seeliger HPR, et al.** *International code of nomenclature of bacteria: Bacteriological code, 1990 revision*. Washington, DC: ASM Press; 1992.

37. **Johnson BF, Stanier RY.** Dissimilation of aromatic compounds by *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol* 1971;107:468–475.
38. **Budde CF, Riedel SL, Willis LB, Rha C, Sinskey AJ.** Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from plant oil by engineered *Ralstonia eutropha* strains. *Appl Environ Microbiol* 2011;77:2847–2854.
39. **Riedel SL, Bader J, Brigham CJ, Budde CF, Yusof ZAM, et al.** Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by *Ralstonia eutropha* in high cell density palm oil fermentations. *Biotechnol Bioeng* 2012;109:74–83.
40. **Dennis D, McCoy M, Stangl A, Valentin HE, Wu Z.** Formation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by PHA synthase from *Ralstonia eutropha*. *J Biotechnol* 1998;64:177–186.
41. **Gottschalk G, Eberhardt U, Schlegel HG.** Verwertung von Fructose durch *Hydrogenomonas* H16. *Arch Mikrobiol* 1964;48:95–108.
42. **Aragno M, Walther-Mauruschat A, Mayer F, Schlegel HG.** Micromorphology of gram-negative hydrogen bacteria: I. Cell morphology and flagellation. *Arch Mikrobiol* 1977;114:93–100.
43. **Sichwart S, Hetzler S, Bröker D, Steinbüchel A.** Extension of the substrate utilization range of *Ralstonia eutropha* strain H16 by metabolic engineering to include mannose and glucose. *Appl Environ Microbiol* 2011;77:1325–1334.
44. **Steinbüchel A, Fründ C, Jendrossek D, Schlegel H-G.** Isolation of mutants of *Alcaligenes eutrophus* unable to derepress the fermentative alcohol dehydrogenase. *Arch Mikrobiol* 1987;148:178–186.
45. **Pfützner J, Schlegel HG.** Denitrifikation bei *Hydrogenomonas eutropha* Stamm H16. *Arch Mikrobiol* 1973;90:199–211.
46. **Lenz O, Bernhard M, Buhrke T, Schwartz E, Friedrich B.** The hydrogen-sensing apparatus in *Ralstonia eutropha*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2002;4:255–62.
47. **Burgdorf T, Lenz O, Buhrke T, van der Linden E, Jones AK, et al.** [NiFe]-hydrogenases of *Ralstonia eutropha* H16: Modular enzymes for oxygen-tolerant biological hydrogen oxidation. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2006;10:181–196.
48. **Schäfer C, Friedrich B, Lenz O.** Novel, oxygen-insensitive group 5 [NiFe]-hydrogenase in *Ralstonia eutropha*. *Appl Environ Microbiol* 2013;79:5137–5145.
49. **Bowien B, Kusian B.** Genetics and control of CO₂ assimilation in the chemoautotroph *Ralstonia eutropha*. *Arch Mikrobiol* 2002;178:85–93.
50. **Gai CS, Lu J, Brigham CJ, Bernardi AC, Sinskey AJ.** Insights into bacterial CO₂ metabolism revealed by the characterization of four carbonic anhydrases in *Ralstonia eutropha* H16. *AMB Express* 2014;4:1–12.
51. **Kusian B, Sültemeyer D, Bowien B.** Carbonic anhydrase is essential for growth of *Ralstonia eutropha* at ambient CO₂ concentrations. *J Bacteriol* 2002;184:5018–5026.
52. **Grzeszik C, Jeffke T, Schäferjohann J, Kusian B, Bowien B.** Phosphoenolpyruvate is a signal metabolite in transcriptional control of the cbb CO₂ fixation operons in *Ralstonia eutropha*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2000;2:311–320.

53. **Lemoigne M.** Produits de deshydratation et de polymerisation de l'acide beta-oxybutyric. *Bull Soc Chim Biol* 1926;8:770–782.
54. **Verlinden RAJ, Hill DJ, Kenward MA, Williams CD, Radecka I.** Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *J Appl Microbiol* 2007;102:1437–1449.
55. **Reusch RN.** Poly-beta-hydroxybutyrate/calcium polyphosphate complexes in eukaryotic membranes. *Proc Soc Exp Biol Med* 1989;191:377–381.
56. **Seebach D, Brunner A, Bürger HM, Schneider J, Reusch RN.** Isolation and ¹H-NMR spectroscopic identification of poly (3-hydroxybutanoate) from prokaryotic and eukaryotic organisms: Determination of the absolute configuration (R) of the monomeric unit 3-hydroxybutanoic acid from *Escherichia coli* and spinach. 1994;328:317–328.
57. **Reusch RN, Sparrow AW, Gardiner J.** Transport of poly-β-hydroxybutyrate in human plasma. *Biochim Biophys Acta* 1992;1123:33–40.
58. **Reinecke F, Steinbüchel A.** *Ralstonia eutropha* strain H16 as model organism for PHA metabolism and for biotechnological production of technically interesting biopolymers. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2008;16:91–108.
59. **Baptist JN, Werber FX.** Poly-β-hydroxybutyric acid - A naturally occurring thermoplastic material. *Soc Plast Eng Trans* 1964;4:245–250.
60. **Chen GQ.** Industrial production of PHA. In: Chen GQ (editor). *Plastics from bacteria: Natural functions and applications*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 2010. pp. 121–132.
61. **Loo CY, Lee WH, Tsuge T, Doi Y, Sudesh K.** Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from palm oil products in a *Wautersia eutropha* mutant. *Biotechnol Lett* 2005;27:1405–1410.
62. **Fukui T, Ohsawa K, Mifune J, Orita I, Nakamura S.** Evaluation of promoters for gene expression in polyhydroxyalkanoate-producing *Cupriavidus necator* H16. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011;89:1527–1536.
63. **Peplinski K, Ehrenreich A, Döring C, Bömeke M, Reinecke F, et al.** Genome-wide transcriptome analyses of the 'Knallgas' bacterium *Ralstonia eutropha* H16 with regard to polyhydroxyalkanoate metabolism. *Microbiology* 2010;156:2136–2152.
64. **Schlegel HG, Gottschalk G, Von Bartha R.** Formation and utilization of poly-β-hydroxybutyric acid by Knallgas bacteria (*Hydrogenomonas*). *Nature* 1961;191:463–465.
65. **Khanna S, Srivastava AK.** Statistical media optimization studies for growth and PHB production by *Ralstonia eutropha*. *Process Biochem* 2005;40:2173–2182.
66. **York GM, Lupberger J, Tian J, Lawrence AG, Stubbe J, et al.** *Ralstonia eutropha* H16 encodes two and possibly three intracellular poly[D(-)-3-hydroxybutyrate] depolymerase genes. *J Bacteriol* 2003;185:3788–3794.
67. **Eggers J, Steinbüchel A.** Poly(3-hydroxybutyrate) degradation in *Ralstonia eutropha* H16 is mediated stereoselectively to (S)-3-hydroxybutyryl coenzyme A (CoA) via crotonyl-CoA. *J Bacteriol* 2013;195:3213–3223.
68. **Constant P, Poissant L, Villemur R.** Tropospheric H₂ budget and the response of its soil uptake under the changing environment. *Sci Total Environ* 2009;407:1809–1823.

69. **Lipman TE.** Hydrogen production science and technology. In: Lipman TE, Weber AZ (editors). *Fuel Cells and Hydrogen Production*. New York: Springer; 2018. pp. 783–798.
70. **Brinner A.** *Elektrolyse-Basics II: Verfahren zur Wasserstoffherstellung*. 2013.
71. **Schnurnberger W, Janßen H, Wittstadt U.** *Methoden der Wasserstoffherzeugung*. 2004.
72. **Krassen H, Schwarze A, Friedrich B, Ataka K, Lenz O, et al.** Photosynthetic hydrogen production by a hybrid complex of photosystem I and [NiFe]-hydrogenase. *ACS Nano* 2009;3:4055–4061.
73. **Zhang Y, Angelidaki I.** Microbial electrolysis cells turning to be versatile technology: Recent advances and future challenges. *Water Res* 2014;56:11–25.
74. **Windhorst C, Gescher J.** Efficient biochemical production of acetoin from carbon dioxide using *Cupriavidus necator* H16. *Biotechnol Biofuels* 2019;12:1-11.
75. **Lutz R, Bujard H.** Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I₁-I₂ regulatory elements. *Nucleic Acids Res* 1997;25:1203–1210.
76. **Shanks RMQ, Kadouri DE, MacEachran DP, O’Toole GA.** New yeast recombineering tools for bacteria. *Plasmid* 2009;62:88–97.
77. **Sydow A, Pannek A, Krieg T, Huth I, Guillouet SE, et al.** Expanding the genetic tool box for *Cupriavidus necator* by a stabilized L-rhamnose inducible plasmid system. *J Biotechnol* 2017;263:1–10.
78. **Nakamura Y, Gojobori T, Ikemura T.** Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: Status for the year 2000. *Nucleic Acids Res* 2000;28:292.
79. **Selembo PA, Merrill MD, Logan BE.** The use of stainless steel and nickel alloys as low-cost cathodes in microbial electrolysis cells. *J Power Sources* 2009;190:271–278.
80. **Winfield J, Gajda I, Greenman J, Ieropoulos I.** A review into the use of ceramics in microbial fuel cells. *Bioresour Technol* 2016;215:296–303.
81. **Pasternak G, Greenman J, Ieropoulos I.** Comprehensive study on ceramic membranes for low-cost microbial fuel cells. *ChemSusChem* 2016;9:88–96.
82. **Gibson DG, Young L, Chuang RY, Venter JC, Hutchison CA, et al.** Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods* 2009;6:343–345.
83. **Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
84. **Coligan JE, Dunn BM, Ploegh HL, Speicher DW, Wingfield PT.** *Current Protocols in Protein Science*. New York: John Wiley and Sons; 1995.
85. **Zehr BD, Savin TJ, Hall RE.** A one-step, low background coomassie staining procedure for polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1989;182:157–159.
86. **Wieczorek S, Combes F, Lazar C, Gianetto QG, Gatto L, et al.** DAPAR & ProStaR: Software to perform statistical analyses in quantitative discovery proteomics. *Bioinformatics* 2017;33:135–136.
87. **Voges O, Proskauer B.** Beitrag zur Ernährungsphysiologie und zur Differentialdiagnose der Bakterien der hämorrhagischen Septicämie. *Zeitschrift für Hyg und Infekt* 1898;28:20–32.

88. **Barritt MM.** The intensification of the Voges-Proskauer reaction by the addition of α -naphthol. *J Pathol Bacteriol* 1936;42:441–454.
89. **Friedrich CG, Friedrich B, Bowien B.** Formation of enzymes of autotrophic metabolism during heterotrophic growth of *Alcaligenes eutrophus*. *Microbiology* 1981;122:69–78.
90. **Fründ C, Priefert H, Steinbuchel A, Schlegel HG.** Biochemical and genetic analyses of acetoin catabolism in *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol* 1989;171:6539–6548.
91. **Pérez-Pantoja D, De La Iglesia R, Pieper DH, González B.** Metabolic reconstruction of aromatic compounds degradation from the genome of the amazing pollutant-degrading bacterium *Cupriavidus necator* JMP134. *FEMS Microbiol Rev* 2008;32:736–794.
92. **Schühle K, Jahn M, Ghisla S, Fuchs G.** Two similar gene clusters coding for enzymes of a new type of aerobic 2-aminobenzoate (anthranilate) metabolism in the bacterium *Azoarcus evansii*. *J Bacteriol* 2001;183:5268–5278.
93. **Gescher J, Zaar A, Mohamed M, Schägger H, Fuchs G.** Genes coding for a new pathway of aerobic benzoate metabolism in *Azoarcus evansii*. *J Bacteriol* 2002;184:6301–6315.
94. **Bi C, Su P, Müller J, Yeh YC, Chhabra SR, et al.** Development of a broad-host synthetic biology toolbox for *Ralstonia eutropha* and its application to engineering hydrocarbon biofuel production. *Microb Cell Fact* 2013;12:1–10.
95. **Pfeiffer D, Wahl A, Jendrossek D.** Identification of a multifunctional protein, PhaM, that determines number, surface to volume ratio, subcellular localization and distribution to daughter cells of poly(3-hydroxybutyrate), PHB, granules in *Ralstonia eutropha* H16. *Mol Microbiol* 2011;82:936–951.
96. **Müller J, MacEachran D, Burd H, Sathitsuksanoh N, Bi C, et al.** Engineering of *Ralstonia eutropha* H16 for autotrophic and heterotrophic production of methyl ketones. *Appl Environ Microbiol* 2013;79:4433–4439.
97. **Krieg T, Sydow A, Faust S, Huth I, Holtmann D.** CO₂ to terpenes: Autotrophic and electroautotrophic α -humulene production with *Cupriavidus necator*. *Angew Chem Int Ed Engl* 2018;57:1879–1882.
98. **Poehlein A, Kusian B, Friedrich B, Daniel R, Bowien B.** Complete genome sequence of the type strain *Cupriavidus necator* N-1. *J Bacteriol* 2011;193:5017.
99. **Sznajder A, Pfeiffer D, Jendrossek D.** Comparative proteome analysis reveals four novel polyhydroxybutyrate (PHB) granule-associated proteins in *Ralstonia eutropha* H16. *Appl Environ Microbiol* 2015;81:1847–1858.
100. **Pfeiffer D, Jendrossek D.** Localization of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) granule-associated proteins during PHB granule formation and identification of two new phasins, PhaP6 and PhaP7, in *Ralstonia eutropha* H16. *J Bacteriol* 2012;194:5909–5921.
101. **Oliver JWK, Machado IMP, Yoneda H, Atsumi S.** Cyanobacterial conversion of carbon dioxide to 2,3-butanediol. *Proc Natl Acad Sci* 2013;110:1249–1254.
102. **Wang M, Fu J, Zhang X, Chen T.** Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for enhanced production of acetoin. *Biotechnol Lett* 2012;34:1877–1885.

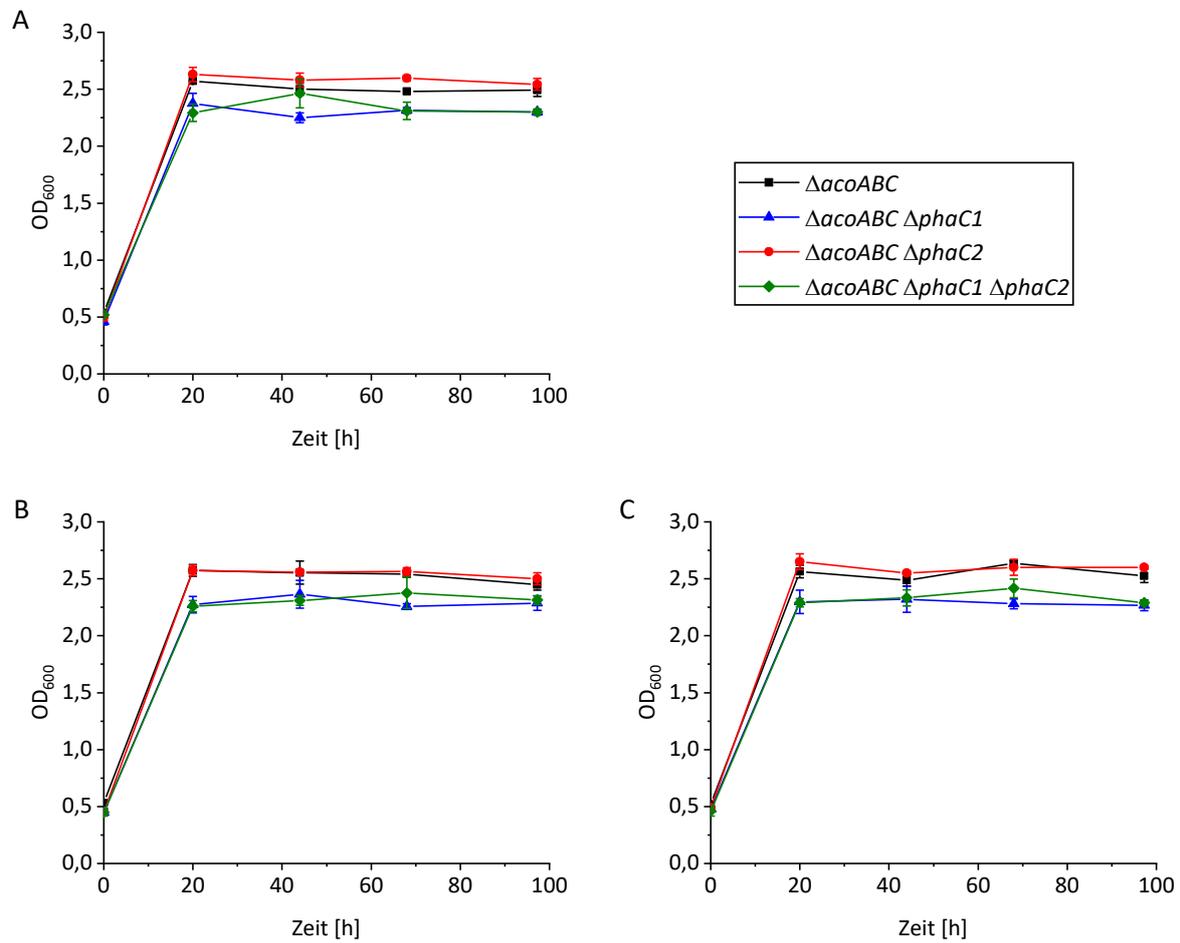
103. **Zhang X, Zhang R, Bao T, Rao Z, Yang T, et al.** The rebalanced pathway significantly enhances acetoin production by disruption of acetoin reductase gene and moderate-expression of a new water-forming NADH oxidase in *Bacillus subtilis*. *Metab Eng* 2014;23:34–41.
104. **Förster AH, Beblawy S, Golitsch F, Gescher J.** Electrode-assisted acetoin production in a metabolically engineered *Escherichia coli* strain. *Biotechnol Biofuels* 2017;10:1–11.
105. **Bursac T, Gralnick JA, Gescher J.** Acetoin production via unbalanced fermentation in *Shewanella oneidensis*. *Biotechnol Bioeng* 2017;114:1283–1289.
106. **Hillman JD, Andrews SW, Dzuback AL.** Acetoin production by wild-type strains and a lactate dehydrogenase-deficient mutant of *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* 1987;55:1399–1402.
107. **Jendrossek D, Kruger N, Steinbuchel A.** Characterization of alcohol dehydrogenase genes of derepressible wild-type *Alcaligenes eutrophus* H16 and constitutive mutants. *J Bacteriol* 1990;172:4844–4851.
108. **Yang TW, Rao ZM, Zhang X, Xu MJ, Xu ZH, et al.** Fermentation of biodiesel-derived glycerol by *Bacillus amyloliquefaciens*: Effects of co-substrates on 2,3-butanediol production. *Appl Microbiol Biotechnol* 2013;97:7651–7658.
109. **Nakashima N, Akita H, Hoshino T.** Establishment of a novel gene expression method, BICES (biomass-inducible chromosome-based expression system), and its application to the production of 2,3-butanediol and acetoin. *Metab Eng* 2014;25:204–214.
110. **Jantama K, Polyiam P, Khunnonkwao P, Chan S, Sangproo M, et al.** Efficient reduction of the formation of by-products and improvement of production yield of 2,3-butanediol by a combined deletion of alcohol dehydrogenase, acetate kinase-phosphotransacetylase, and lactate dehydrogenase genes in metabolically engineered *Klebsiella oxytoca* in mineral salts medium. *Metab Eng* 2015;30:16–26.
111. **Guo X, Cao C, Wang Y, Li C, Wu M, et al.** Effect of the inactivation of lactate dehydrogenase, ethanol dehydrogenase, and phosphotransacetylase on 2,3-butanediol production in *Klebsiella pneumoniae* strain. *Biotechnol Biofuels* 2014;7:1–11.
112. **Köpke M, Mihalcea C, Liew FM, Tizard JH, Ali MS, et al.** 2,3-Butanediol production by acetogenic bacteria, an alternative route to chemical synthesis, using industrial waste gas. *Appl Environ Microbiol* 2011;77:5467–5475.
113. **Oliver JWK, Machado IMP, Yoneda H, Atsumi S.** Combinatorial optimization of cyanobacterial 2,3-butanediol production. *Metab Eng* 2014;22:76–82.
114. **Crépin L, Lombard E, Guillouet SE.** Metabolic engineering of *Cupriavidus necator* for heterotrophic and autotrophic alka(e)ne production. *Metab Eng* 2016;37:92–101.
115. **Jeon BY, Yi JY, Jung IL, Park DH.** Activation of ethanol production by combination of recombinant *Ralstonia eutropha* and electrochemical reducing power. *Adv Microbiol* 2013;03:42–45.
116. **Black WB, Zhang L, Kamoku C, Liao JC, Li H.** Rearrangement of coenzyme A-acylated carbon chain enables synthesis of isobutanol via a novel pathway in *Ralstonia eutropha*. *ACS Synth Biol* 2018;7:794–800.
117. **Lu J, Brigham CJ, Gai CS, Sinskey AJ.** Studies on the production of branched-chain alcohols in engineered *Ralstonia eutropha*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012;96:283–297.

-
118. **Grousseau E, Lu J, Gorret N, Guillouet SE, Sinskey AJ.** Isopropanol production with engineered *Cupriavidus necator* as bioproduction platform. *Appl Microbiol Biotechnol* 2014;98:4277–4290.
 119. **Marc J, Grousseau E, Lombard E, Sinskey AJ, Gorret N, et al.** Over expression of GroESL in *Cupriavidus necator* for heterotrophic and autotrophic isopropanol production. *Metab Eng* 2017;42:74–84.
 120. **Li H, Opgenorth PH, Wernick DG, Rogers S, Wu TY, et al.** Integrated electromicrobial conversion of CO₂ to higher alcohols. *Science* 2012;335:1596.
 121. **Przybylski D, Rohwerder T, Dilßner C, Maskow T, Harms H, et al.** Exploiting mixtures of H₂, CO₂, and O₂ for improved production of methacrylate precursor 2-hydroxyisobutyric acid by engineered *Cupriavidus necator* strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015;99:2131–2145.
 122. **Nicholson W, Carlisle A, Cruickshank W.** IV. Experiments in galvanic electricity. *Philos Mag* 1800;7:337–347.
 123. **Smolinka T, Günther M, Garche J.** *Stand und Entwicklungspotenzial der Wasserstoffelektrolyse zur Herstellung von Wasserstoff aus regenerativen Energien.* 2011.
 124. **Götz M, Lefebvre J, Mörs F, McDaniel Koch A, Graf F, et al.** Renewable power-to-gas: A technological and economic review. *Renew Energy* 2016;85:1371–1390.

Anhang

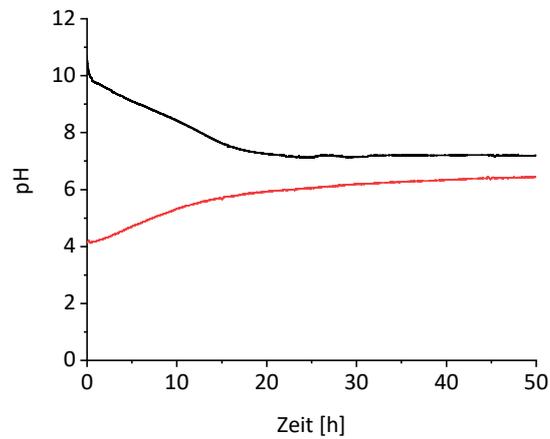
Abbildungen im Anhang

Vollständige Daten zur Abb. 23



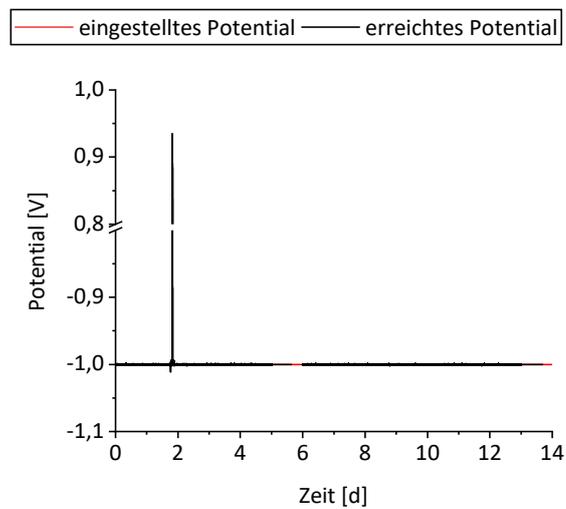
Anhang-Abb. 1: Vollständige Messdaten zur Abb. 23. Diese Abbildung zeigt den Einfluss ohne Induktor (A), mit 1,5 mM Arabinose (B) und 1 mM Rhamnose (C) auf die PHB-Mutanten. Für weiter Erklärungen siehe Beschreibung Abb. 23.

pH-Ausgleich über Ton-Membran



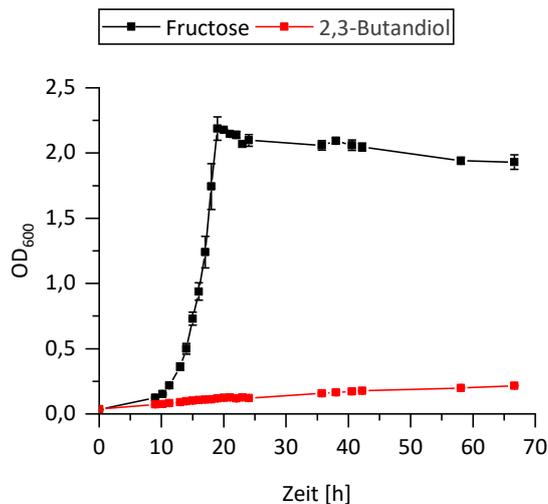
Anhang-Abb. 2: Ausgleich des pH über eine Ton-Membran. Die pH-Werte wurden mithilfe von pH-Metern von den Sartorius Biostat A Fermenter (Göttingen) gemessen. Dafür wurde eine Seite mit Wasser pH 4 (1 M HCl, rote Linie) und die andere Seite der Membran mit Wasser pH 10 (1 M NaOH, schwarze Linie) befüllt.

Gemessenes Potential für die Elektrolyse-Zelle Version II im Langzeitversuch (Abb. 37)



Anhang-Abb. 3: Potential-Messung für den Langzeitversuch. Das eingestellte Potential (-1 V) ist als rote Linie und das erreichte Potential als schwarze Linie dargestellt. In den beiden Zeiträumen zwischen 5,65 und 6,0 d sowie zwischen 13,7 und 14,0 d wurde kein Potential angelegt, da es Probleme mit der Software gab.

2,3-Butandiol-Verwertung durch *C. necator* H16 wt



Anhang-Abb. 4: Wachstum von *C. necator* H16 wt mit 2,3-Butandiol. Als rote Linie ist das Wachstum von *C. necator* H16 wt mit 2,3-Butandiol und als schwarze Linie mit Fructose als Referenzkohlenstoffquelle dargestellt. Dieser Stamm wurde in Erlenmeyer-Kolben mit 100 ml Minimal-Medium 81 und 10 mM Kohlenstoffquelle bei 180 rpm und 30°C kultiviert. Über den gesamten Zeitraum wurde 0,75 mM 2,3-Butandiol bzw. 10 mM Fructose verbraucht.

Sequenzen im Anhang

Codon-optimierte DNA-Sequenz von *alsS*

LOCUS *alsS* 1716 bp DNA linear UNA

DEFINITION Codon-optimiert nach *Bacillus subtilis* PY79

FEATURES Location/Qualifiers

gene 1..1716

/label="alsS"

ORIGIN

```

1 ATGCTGACCA AGGCCACCAA GGAACAGAAG TCGCTGGTGA AGAACCGTGG TGCCGAACTG
61 GTGGTGGACT GCCTGGTGGA ACAGGGCGTG ACCCACGTGT TCGGCATCCC GGGTGCCAAG
121 ATCGACGCCG TGTTTCGACGC CCTGCAGGAC AAGGGTCCGG AAATCATCGT GGCACGCCAC
181 GAACAGAACG CAGCCTTCAT GGCCAGGCC GTGGGTGC CC TGACCGGCAA GCCTGGCGTG
241 GTGCTGGTGA CCTCGGGTCC GGGAGCCTCG AACCTGGCCA CCGGCCTGCT GACCGCCAAC

```

301 ACCGAAGGCG ACCCGGTGGT GGCCCTGGCA GGCAACGTGA TCCGTGCCGA CCGCCTGAAG
361 CGCACCCACC AGTCGCTGGA CAACGCAGCC CTGTTCCAGC CGATCACCAA GTACTCGGTG
421 GAAGTGCAGG ACGTGAAGAA CATCCCGGAA GCCGTGACCA ACGCCTTCCG CATCGCCTCG
481 GCAGGCCAGG CAGGTGCAGC CTTCGTGTGCG TTCCCGCAGG ACGTGGTGAA CGAAGTGACC
541 AACACCAAGA ACGTGCCTGC CGTGGCAGCA CCGAAGCTGG GTCCTGCAGC CGACGACGCC
601 ATCTCGGCAG CCATCGCCAA GATCCAGACC GCCAAGCTGC CGGTGGTGCT GGTGGGCATG
661 AAGGGTGGCC GTCCGGAAGC CATCAAGGCC GTGCGCAAGC TGCTGAAGAA GGTGCAGCTG
721 CCGTTCGTGG AAACCTACCA GGCAGCCGGC ACCCTGTGCG GCGACCTGGA AGACCAGTAC
781 TTCGGTCGCA TCGGCCTGTT CCGCAACCAG CCTGGCGACC TGCTGCTGGA ACAGGCCGAC
841 GTGGTGCTGA CCATCGGCTA CGACCCGATC GAATACGACC CGAAGTTCTG GAACATCAAC
901 GGCGACCGCA CCATCATCCA CCTGGACGAA ATCATCGCAG ACATCGACCA CGCCTACCAG
961 CCGGACCTGG AACTGATCGG TGACATCCCG TCGACCATCA ACCACATCGA ACACGACGCC
1021 GTGAAGGTGG AATTCGCAGA ACGCGAACAG AAGATCCTGT CGGACCTGAA GCAGTACATG
1081 CACGAAGGCG AACAGGTGCC AGCCGACTGG AAGTCGGACC GTGCCACCC ACTGGAAATC
1141 GTGAAGGAAC TGCGCAACGC CGTGGACGAC CACGTGACCG TGACCTGCGA CATCGGCTCG
1201 CACGCCATCT GGATGTGCGG CTACTIONCGC TCGTACGAAC CGCTGACCCT GATGATCTCG
1261 AACGGCATGC AGACCCTGGG TGTGGCACTG CCGTGGGCCA TCGGTGCCTC GCTGGTGAAG
1321 CCAGGCAGAA AGGTGGTGTC GGTGTGCGGT GACGGTGGCT TCCTGTTCTC GGCCATGGAA
1381 CTGGAAACTG CCGTGCCTCT GAAGGCACCG ATCGTGCACA TCGTGTGGAA CGACTCGACC
1441 TACGACATGG TGGCCTTCCA GCAGCTGAAG AAGTACAACC GCACCTCGGC AGTGGACTTC
1501 GGCAACATCG ACATCGTGAA GTACGCCGAA TCGTTCGGTG CCACTGGCCT GCGTGTGGAA
1561 TCGCCAGACC AGCTGGCAGA CGTGCTGCGT CAGGGCATGA ACGCAGAAGG TCCGGTGATC
1621 ATCGACGTGC CCGTGGACTA CTCGGACAAC ATCAACCTGG CCTCGGACAA GCTGCCGAAG
1681 GAATTCGGCG AACTGATGAA GACCAAGGCA CTGTAA

//

Codon-optimierte DNA-Sequenz von *alsD*

LOCUS *alsD* 768 bp DNA linear UNA

DEFINITION Codon-optimiert nach *Bacillus subtilis* PY79

FEATURES Location/Qualifiers

 gene 1..768

 /label="*alsD*"

ORIGIN

```

1 ATGAAGCGCG AATCGAACAT CCAGGTGCTG TCGCGTGGCC AGAAGGACCA GCCAGTGTCG
61 CAGATCTACC AGGTGTCGAC CATGACCTCG CTGCTGGACG GCGTGTACGA CGGTGACTTC
121 GAACTGTCCG AAATCCCGAA GTACGGCGAC TTCGGCATCG GCACCTTCAA CAAGCTGGAC
181 GGCGAAGTGA TCGGCTTCGA CGGTGAATTC TACCGTCTGC GCTCGGACGG CACCGCCACT
241 CCGGTGCAGA ACGGTGACCG CTCGCCGTTT TGCTCGTTCA CCTTCTTCAC CCCAGACATG
301 ACCCACAAGA TCGACGCCAA GATGACCCGT GAAGACTTCG AAAAGGAAAT CAACTCGATG
361 CTGCCGTCGC GCAACCTGTT CTACGCCATC CGCATCGACG GTCTGTTCAA GAAGGTGCAG
421 ACCCGCACCG TGGAAGTACA GGAAAAGCCG TACGTGCCGA TGGTGGAAAG CGTGAAGACC
481 CAGCCGATCT TCAACTTCGA CAACGTGCGT GGCACCATCG TGGGCTTCCT GACCCAGCC
541 TACGCCAACG GCATCGCAGT GTCGGGCTAC CACCTGCACT TCATCGACGA AGGTCGCAAC
601 TCGGGTGGCC ACGTGTTTGA CTACGTGCTG GAAGACTGCA CCGTGACCAT CTCGCAGAAG
661 ATGAACATGA ACCTGCGCCT GCCGAACACC GCAGACTTCT TCAACGCCAA CCTGGACAAC
721 CCGGACTTCG CCAAGGACAT CGAAACCACC GAAGGCTCGC CTGAATAA

```

//

Codon-optimierte DNA-Sequenz von *budC*

LOCUS *budC* 771 bp DNA linear UNA

DEFINITION Codon-optimiert nach *Klebsiella pneumoniae* IAM1063

FEATURES Location/Qualifiers

 gene 1..771
 /label="*budC*"

ORIGIN

```

1 ATGAAGAAGG TGGCCCTGGT GACCGGTGCA GGCCAGGGCA TCGGCAAGGC CATCGCCCTG
61 CGCCTGGTGA AGGACGGCTT CGCCGTGGCC ATCGCCGACT ACAACGACGC CACCGCCAAG
121 GCCGTGGCCT CGGAAATCAA CCAGGCAGGA GGCCACGCCG TGGCCGTGAA GGTGGACGTG
181 TCGGACCGCG ACCAGGTGTT CGCAGCCGTG GAACAGGCAC GCAAGACCCT GGGTGGCTTC
241 GACGTGATCG TGAACAACGC AGGCGTGGCA CCGTCGACCC CGATCGAATC GATCACCCCG
301 GAAATCGTGG ACAAGGTGTA CAACATCAAC GTGAAGGGCG TGATCTGGGG CATCCAGGCA
361 GCCGTGGAAG CCTTCAAGAA GGAAGGCCAC GGTGGCAAGA TCATCAACGC CTGCTCGCAG
421 GCAGGCCACG TGGGCAACCC GGAACTGGCC GTGTACTCGT CGTCGAAGTT CGCCGTGCGT
481 GGCCTGACCC AGACCGCAGC ACGCGACCTG GCACCGCTGG GCATCACCGT GAACGGCTAC
541 TGCCCTGGCA TCGTGAAGAC CCCGATGTGG GCAGAAATCG ACCGCCAGGT GTCGGAAGCC
601 GCAGGCAAGC CGCTGGGCTA CGGCACTGCC GAATTCGCCA AGCGCATCAC CCTGGGTCGC
661 CTGTCGGAAC CGGAAGACGT GGCAGCCTGC GTGTCGTACC TGGCCTCGCC GGACTCGGAC
721 TACATGACCG GCCAGTCGCT GCTGATCGAC GGTGGCATGG TGTTCAACTA A

```

//

Tabelle im Anhang

Proteom-Vergleich bzgl. der unterschiedlichen Proteine

Anhang-Tab. 1: Vergleich der Proteome von phb-Acetoin und $\Delta C1-\Delta C2$ -phb-Acetoin. Dargestellt sind die Proteine mit signifikant unterschiedlichen Mengen. Diese Proteine werden mit der H16_Nummer, einem Protein Namen (wenn verfügbar), dem $\log_2(\text{FC})$ (FC=fold change), sowie einer Funktion und der Zuordnung dieses Proteins in den Stoffwechsel aufgeführt. Negative $\log_2(\text{FC})$ -Werte verweisen auf eine höhere Proteinmenge in dem Stamm $\Delta C1-\Delta C2$ -phb-Acetoin, wohingegen ein positiver $\log_2(\text{FC})$ -Wert für höhere Proteinmengen in dem Stamm phb-Acetoin sprechen. Bei Protein-Funktionen mit Asterisk (*) handelt es sich um wahrscheinliche Funktionen.

H16_Nummer	Name	$\log_2(\text{FC})$	Funktion	Zuordnung
	AlsD	-5,67	α -Acetolactat Decarboxylase	Acetoin-Produktion
	AlsS	-5,42	Acetolactat Synthase	Acetoin-Produktion
H16_A2460	AbmB	-5,23	β -Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase *	Abbau der PHB-Vorstufe, β - Oxidation, Abbau von Aminosäuren
H16_B1960	AcoD	-5,13	Acetaldehyd Dehydrogenase	Abbau von Aromaten, Kohlenstoff-Metabolismus
H16_B1051	PqqC1	-5,02	Pyrrolochinolinchinon Synthase	Cofaktor-Synthese
H16_B1644	CadA	-4,83	Schwermetall Efflux <i>P</i> -Typ ATPase *	Stoffaustausch
H16_A2456	AbmX	-4,78	Thioesterase *	Abbau von Aromaten
H16_B1760		-4,70	MFS Transporter, AAHS Familie	Stoffaustausch
H16_B0198	Pcal	-4,62	3-Oxoacidipat-CoA Transferase	Abbau von Aromaten
H16_B1057		-4,59	ABC-Typ Transporter	Stoffaustausch
H16_B2113	CitE4	-4,45	Citrat Lyase	Kohlenstoff-Metabolismus
H16_A0688		-4,41	Amidino-transferase	Stickstoff-Metabolismus
H16_B1190		-4,09	3-Hydroxyisobutyrat Dehydrogenase	Abbau von Aminosäuren
H16_B0961	Pyk3	-4,04	Pyruvat Kinase	Kohlenstoff-Metabolismus
H16_B0202		-3,91	cytoplasmatischer Rezeptor für gelöste Substanzen *	Rezeptor

H16_B1586		-3,80	Transporter für kurzkettige Fettsäuren	Stoffaustausch
H16_A1331		-3,62	Succinyl-CoA:3-Ketosäure-CoA Transferase	Kohlenstoff-Metabolismus
H16_A1310	Rbn	-3,59	Membranprotein (Exoribonuclease)	RNA-Metabolismus
H16_A1332		-3,51	Succinyl-CoA:3-Ketosäure-CoA Transferase	Kohlenstoff-Metabolismus
H16_A2457	AbmG	-3,49	2-Aminobenzoat-CoA Ligase	Abbau von Aromaten
H16_B2568	MscS5	-3,42	mechanosensitiver Kanal mit geringer Leitfähigkeit	Stoffaustausch
H16_A3728		-3,28	transkriptioneller Regulator, TetR/AcrR-Familie	Regulator
H16_A2459	AbmC	-3,27	Enoyl-CoA Hydratase/Isomerase *	β -Oxidation
H16_B2417		-3,14	nicht charakterisiert	
H16_A2458	AbmD	-3,09	Acyl-CoA Dehydrogenase *	β -Oxidation
H16_B0201		-3,05	Dehydrogenase für kurze Ketten	Kohlenstoff-Metabolismus
H16_B2116		-2,98	cytoplasmatischer Rezeptor für gelöste Substanzen *	Rezeptor
H16_A3344	UbiX1	-2,97	Flavin:Prenyl Transferase	Abbau von Aromaten
H16_A0695	HutU2	-2,92	Urocanat Hydratase	Abbau von Aminosäuren
H16_A3020		-2,88	ABC-Typ Transporter, NitT Familie	Stoffaustausch
H16_B0983		-2,87	cytoplasmatischer Rezeptor für gelöste Substanzen *	Rezeptor
H16_B0200	PcaF	-2,82	β -Ketoacyl-CoA Thiolase	Abbau von Aromaten

H16_A3346		-2,78	Saccharopin Dehydrogenase	Abbau/Aufbau von Aminosäuren
H16_B0509		-2,74	Rezeptor der äußeren Membran, TonB abhängig	Rezeptor
H16_A2455	AbmE	-2,70	initialer Inhibitor der Translation, YjgH Familie *	Regulator
H16_B1083	Hpd	-2,62	4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase	Abbau von Aminosäuren
H16_B1712		-2,61	Oxalyl-CoA Decarboxylase	Kohlenstoff-Metabolismus
H16_A2235		-2,55	nicht charakterisiert	
H16_A1646		-2,35	cytoplasmatischer Rezeptor für gelöste Substanzen *	Rezeptor
H16_B1046		-2,32	Zn-abhängige Hydrolase oder Glyoxylase	Kohlenstoff-Metabolismus
H16_B1191	MmsA3	-2,21	Methylmalonat-Semialdehyd Dehydrogenase	Abbau von Aminosäuren, Propanoat-Metabolismus
H16_A0125		-2,20	Allophanat Hydrolase	Stickstoff-Metabolismus
H16_B2559		-1,90	transkriptioneller Regulator, MarR Familie	Regulator
H16_B1358	PaaK2	-1,89	Phenylacetaldehyd Dehydrogenase	Abbau von Aromaten
H16_B0984	Ggt2c	-1,88	γ -Glutamyl Transferase	Abwehr gegen reaktive Sauerstoffspezies, Abbau von Glutathion
H16_B1757		-1,88	Acetyl/Propionyl-CoA Carboxylase	Abbau von Aminosäuren, Propanoat Metabolismus, β -Oxidation, Fettsäure-Synthese
H16_A3522	PaaC1	-1,82	1,2-Phenylacetyl-CoA Epoxidase	Abbau von Aromaten
H16_A0531	RhIE1	-1,81	ATP-abhängige RNA Helikase	RNA-Metabolismus

PHG420	CbbTP	-1,81	Transketolase	Kohlenstoff-Metabolismus
H16_A0758		-1,68	nicht charakterisiert	
H16_B1388	CbbTC	-1,67	Transketolase	Kohlenstoff-Metabolismus
PHG351	PilN	-1,57	Bestandteil des Typ II Sekretionssystemes *	Stoffaustausch
H16_A2378		2,00	äußeres Membran-Protein (Porin)	Stoffaustausch
H16_B0872		2,04	transkriptioneller Regulator, LysR Familie	Regulator
H16_B2059	CoxP	2,12	ähnlich zu <i>bb3</i> -Typ Cytochrom Oxidase Untereinheit III	Elektronentransportkette
H16_A0033		2,33	Dehydrogenase für kurze Ketten	Kohlenstoff-Metabolismus
H16_B1549		2,33	nicht charakterisiert	
H16_B0618	GlnA2	2,41	Glutamin Synthetase	Stickstoff-Metabolismus
H16_A1681	LdhA2	2,68	D-Lactat Dehydrogenase	Kohlenstoff-Metabolismus
H16_B1633		2,69	nicht charakterisiert	
H16_A1381	PhaP1	2,97	Phasin	PHB-Metabolismus
H16_B1013	CphB	3,06	Cyanophycinase oder verwandte Exopeptidase	Abbau von Proteinen
H16_B2061	CoxN	3,14	Cytochrome c Oxidase Untereinheit I	Elektronentransportkette
H16_A0884		3,17	nicht charakterisiert	
H16_B1632		3,60	nicht charakterisiert	
H16_A1150	PhaZ1	4,28	Intrazelluläre Poly(3- hydroxybutyrat) Depolymerase	PHB-Metabolismus
H16_B2021	PhaP4	4,57	Phasin	PHB-Metabolismus
PHG065		4,75	[NiFe] Hydrogenase	Hydrogenase
H16_B2277	NirS	5,30	Cytochrome cd1 Nitrit Reductase	Elektronentransportkette
PHG202	PhaP2	5,53	Phasin	PHB-Metabolismus

H16_A3405	TatA	5,86	Sec-unabhängiges Translokase Protein	Stoffaustausch
H16_A1437	PhaC	6,08	Poly(3-hydroxyalkanoat) Polymerase	PHB-Metabolismus
H16_A2172	PhaP3	6,20	Phasin	PHB-Metabolismus
H16_A2171	PhaB3	7,72	Acetoacetyl-CoA Reduktase	PHB-Metabolismus

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Publikation

Engel, Yvonne; Windhorst, Carina; Lu, Xiaojun; Goodrich-Blair, Heidi; Bode, Helge B. - The Global regulators Lrp, LeuO, and HexA control secondary metabolism in entomopathogenic bacteria. *Front Microbiol.* **2017** Feb 17; 8: 209.

Manuskript

Windhorst, Carina; Gescher, Johannes - Efficient biochemical production of acetoin from carbon dioxide using *Cupriavidus necator* H16. *Biotechnol Biofuels*, eingereicht.

Konferenzbeitrag

Vortrag beim Doktorandentag in der Wasserforschung am KIT (November 2016) - Conversion of chemical energy from waste water into current or liquid fuels by bio electrochemical systems (Windhorst, Carina; Arinda, Tutut; Gescher, Johannes)

Poster-Präsentation auf dem Brennstoffzellen-Meeting am KIT (Februar 2017) - Conversion of chemical energy from waste water in liquid fuels by bio electrochemical systems (Windhorst, Carina; Gescher, Johannes)

Vortrag auf der Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) in Mainz (März 2019) - Heterotrophic and autotrophic production of acetoin in *Cupriavidus necator* (Windhorst, Carina; Gescher, Johannes)