

Anodische Elektrofermentation von Acetoin in *Escherichia coli*

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)
genehmigte
DISSERTATION
von

Sebastian Beblawy

31. Januar 2020

KIT-Dekan:	Professor Dr. Reinhard Fischer
Erstgutachter:	Professor Dr. Johannes Gescher
Zweitgutachter:	Professor Dr. Reinhard Fischer
Tag der mündlichen Prüfung:	04.02.2019



Dieses Werk ist lizenziert unter einer Creative Commons Namensnennung - Keine kommerzielle Nutzung - Keine Bearbeitungen - 4.0 International Lizenz.
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Hiermit versichere ich, dass ich die folgende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Alle wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Texten entnommenen Stellen sind von mir durch Angabe der Quelle gekennzeichnet. Weiterhin habe ich beim Anfertigen dieser Arbeit die Regeln zur Sicherung der guten wissenschaftlichen Praxis am KIT beachtet und alle Primärdaten im Sinne von Absatz A. 6. dieser Richtlinie am Institut archiviert. Des Weiteren versichere ich, dass die elektronische mit der schriftlichen Form dieser Arbeit übereinstimmt.

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Juli 2015 bis Dezember 2018 am Institut für Angewandte Biowissenschaften der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften des Karlsruher Instituts für Technologie unter der Anleitung von Professor Johannes Gescher durchgeführt.

Karlsruhe, 31. Januar 2020

.....
(Sebastian Beblawy)

Zusammenfassung

Anodische Elektrofermentation ist eine neue Strategie anaerober Biotechnologie. Sie ermöglicht Umsetzungen, bei denen die mittlere Oxidationsstufe des Endproduktes höher ist als die des Substrats. Konventionell werden solche Reaktionen ausschließlich unter oxischen Prozessbedingungen katalysiert. Dies geht mit einer starken Biomassebildung und einem hohem Energieaufwand einher. Bei der Elektrofermentation fällt stattdessen als Nebenprodukt lediglich elektrische Energie an, welche universell verwendet werden kann. Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines Systemes zur Elektrofermentation von Acetoin in einem metabolisch veränderten *Escherichia coli* Stamm. Bei Acetoin handelt es sich um einen vielversprechenden Kandidaten für Basischemikalien einer anvisierten Bioökonomie.

Im ersten Teil der Arbeit konnte ein funktionales System zur Elektrofermentation von Acetoin in *Escherichia coli* etabliert werden. Darauf aufbauend wurde im zweiten Teil der Arbeit das Reaktorsystem dahingehend weiterentwickelt, den Anforderungen dieses speziellen Fermentationsprozesses Rechnung zu tragen und inhibierende Faktoren zu identifizieren und zu eliminieren. Im dritten Teil der Arbeit wurden Untersuchungen zur Physiologie des Produktionsstammes vorgenommen und die gewonnenen Erkenntnisse über die Acetyl-Phosphat abhängige Stoffwechselregulation zur Beschleunigung der metabolischen Rate angewandt. Im letzten Charakterisierungsschritt konnte die Leistungsgrenze des Reaktorsystems ermittelt und eine Modellbetrachtung des Fermentationsprozesses angestellt werden.

Es konnte hierdurch ein Fermentationsprozess etabliert werden, welcher Acetoin mit einer Ausbeute von rund 80 % des theoretischen Maximums produziert. Ferner wurde eine Steigerung der Umsatzrate um das 15-Fache erreicht. Mit einer Produktivität von $76 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}$ werden erstmals Werte erreicht, die eine zukünftige Konkurrenz zu oxischen Fermentationen plausibel erscheinen lassen.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	i
Abbildungsverzeichnis	iv
Tabellenverzeichnis	vii
Abkürzungsverzeichnis	xi
1. Einleitung	1
1.1. Produktion von Basischemikalien	1
1.2. Entwicklung von Produktionsstämmen	3
1.3. <i>Escherichia coli</i> als Fermentationsorganismus	5
1.4. Mikrobielle Elektrochemie	13
1.5. Zielsetzung	21
2. Material und Methoden	23
2.1. Zellkultivierung	23
2.2. Molekularbiologische Methoden	28
2.3. Chemische Analytik	37
2.4. Fermentationsplattformen	40
2.5. Elektrochemische Methoden	42
2.6. Elektrofermentation	44
2.7. Berechnung von Evaluationsparametern	45
3. Ergebnisse	49
3.1. Elektrofermentation im 250 ml-Reaktor	49
3.2. Elektrofermentation im Mini-Reaktor	51
3.3. Elektrofermentation mit Durchflusselektrode im Pumpreaktor	53
3.4. Untersuchung der Fermentationsbedingungen	54
3.5. Untersuchung der Physiologie des Produktionsstammes	68
3.6. Maximale Stromdichte in der Elektrofermentation	98
3.7. Übersicht über alle Elektrofermentationsexperimente	99
4. Diskussion	109
4.1. Etablierung einer Elektrofermentation für Acetoin in <i>E. coli</i>	109
4.2. Untersuchung der Fermentationsbedingungen	115
4.3. Physiologische Untersuchung des Fermentationsstammes	121
4.4. Maximale Stromdichte im Mini-Reaktor	135
4.5. Überblick über alle Elektrofermentations-Experimente	137

4.6. Zusammenfassung und Ausblick	139
Literatur	141
A. Anhang	159
A.1. Tabellen	159
A.2. Abbildungen	180

Abbildungsverzeichnis

1.1.	Zentralstoffwechsel von <i>Escherichia coli</i>	7
1.2.	Signaltransduktion durch ein Zwei-Komponenten-System.	9
1.3.	Heterologer Stoffwechsel zur Umsetzung von Pyruvat zu Acetoin.	12
1.4.	Wachstumsraten der <i>knock-out</i> Stämme.	13
1.5.	Extrazellulärer Elektronentransport in <i>Shewanella oneidensis</i>	15
1.6.	Schematischer Verlauf einer Elektrofermentation.	19
1.7.	Methylenblau abhängiger Elektronentransport in <i>Escherichia coli</i>	20
1.8.	Oxidation und Reduktion von Methylenblau.	21
2.1.	CAD-Modell des 250 ml-Reaktors.	40
2.2.	CAD-Modell des Mini-Reaktors.	41
2.3.	CAD-Modell der Elektrodenanordnung im Pump-Reaktor.	42
2.4.	Schematische Darstellung eines elektrochemischen Messaufbaus.	43
3.1.	Elektrofermentation von JG991 im 250 ml Reaktor.	50
3.2.	Elektrofermentation von JG991 im Mini-Reaktor.	51
3.3.	Proben der Elektrofermentationen im Mini-Reaktor und 250 ml-Reaktor.	52
3.4.	<i>open-circuit</i> -Fermentation von JG991 im Mini-Reaktor.	52
3.5.	Elektrofermentation mit JG991 im Pumpreaktor.	53
3.6.	Cyclovoltammetrie von $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ Methylenblau mit drei verschiedenen Elektrodenmaterialien.	54
3.7.	Anaerobes Wachstum von JG991 mit $40 \text{ mmol l}^{-1} \text{ NO}_3^-$ als Elektronenakzeptor in PBS-Medium mit variabler Glucosekonzentration zwischen 0 und 200 mmol l^{-1}	55
3.8.	Anaerobes Wachstum von JG991 in PBS-Medium mit $40 \text{ mmol l}^{-1} \text{ NO}_3^-$ als Elektronenakzeptor und variabler Supplementation.	57
3.9.	Cyclovoltammogramme von $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ Methylenblau in verschiedenen Puffern.	59
3.10.	Cyclovoltammogramme von $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ Methylenblau in verschiedenen Puffern mit unterschiedlicher Supplementation.	60
3.11.	Vergleich der Stromdichte zwischen PO_4^{3-} - und MOPS-gepuffertem Medium (mit und ohne Kontrolle des pH-Wertes) während der Elektrofermentation von JG991 im Mini-Reaktor.	62
3.12.	Aerobes Wachstum von JG991 mit ansteigender Konzentration von Methylenblau.	64
3.13.	Anaerobes Wachstum von JG991 in PBS-Minimalmedium mit 40 mmol l^{-1} DMSO als Elektronenakzeptor und ansteigender Methylenblaukonzentration.	64

3.14. Reduktionskinetik von Methylenblau mit JG991 in Zellsuspension (OD ₆₀₀ = 6).	65
3.15. Elektrofermentation mit JG991 im Minireaktor mit MOPS-Medium bei 50 und 273 μmol l ⁻¹ Methylenblau.	66
3.16. Zeitlicher Verlauf der Produktion von Acetoin in JG991 mit angepasster Methylenblau Konzentration	67
3.17. Elektrofermentation von JG991 (OD ₆₀₀ = 30) im Mini-Reaktor.	67
3.18. Anaerobes Wachstum von JG878 Transfer 0, 5, 10, 15 und 20 aus dem Mutagenese Experiment mit NO ₃ ⁻ als Elektronenakzeptor.	69
3.19. Elektrofermentation von JG1220 im Minireaktor.	70
3.20. Experimental Matrix zur Erfassung der Einflüsse auf den Stoffwechsel des Produktionsstammes	71
3.21. Wachstumsrate von JG1054, JG997 und JG991 im PBS-Minimalmedium mit 20 mmol l ⁻¹ Glucose und 40 mmol l ⁻¹ NO ₃ ⁻	72
3.22. Umsatzraten von JG1054, JG997 und JG991 im PBS-Minimalmedium mit 20 mmol l ⁻¹ Glucose und 40 mmol l ⁻¹ NO ₃ ⁻	73
3.23. Hauptkomponentenanalyse für die RNA-Sequenzierungen unter alle experimentellen Bedingungen in zwei Replikaten.	74
3.24. Korrelationsdiagramm zur metabolischen Belastung Anhand von <i>gyrB</i>	75
3.25. Korrelation zwischen der Wachstumsrate und der Expressionsstärke von Haushaltsgenen.	76
3.26. Korrelation der Wachstumsraten μ von JG1054 und JG997 mit dem Expressionssignal von <i>hcp</i> , <i>narG</i> und <i>napA</i> und Überexpression von <i>hcp</i>	77
3.27. Vergleich der differentiellen Expression von Genen im Zentralstoffwechsel zwischen NO ₃ ⁻ - und O ₂ -Atmung für JG1054 und JG991 unter Induktion.	79
3.28. Wachstumsversuche mit <i>E. coli</i> K-12 (JG109), K-12 Δ <i>ack</i> (JG1225) und K-12 Δ <i>pta</i> (JG1226) mit 40 mmol l ⁻¹ Glucose in PBS-Minimalmedium.	81
3.29. Anaerobes Wachstum von JG991 und JG1353 in MOPS-gepuffertem Medium mit 20 mmol l ⁻¹ Glucose und 40 mmol l ⁻¹ NO ₃ ⁻ oder DMSO.	82
3.30. Venn-Diagramm für die differentielle Genexpression zwischen JG1054, JG997 und JG1354.	82
3.31. <i>Volcano-Plot</i> differentiell exprimierter Gene zwischen JG997 und JG1354.	83
3.32. Elektrofermentation mit JG1353 im Minireaktor in MOPS-gepuffertem Medium mit 50 mmol l ⁻¹ Glucose bei OD ₆₀₀ = 6.	89
3.33. Anaerobes Wachstum von JG1054, JG1295 und JG991 auf MOPS-Medium mit DMSO als Elektronenakzeptor.	90
3.35. Aerobes Wachstum von JG1295 und JG991 auf MOPS-Medium.	91
3.34. Strukturmodelle der in JG1295 mutierten Proteine.	92
3.36. Elektrofermentation mit JG1295 im Mini-Reaktor in MOPS-Medium mit 10 mmol l ⁻¹ Glucose und 273 μmol l ⁻¹ Methylenblau bei OD ₆₀₀ = 6.	94
3.37. Chronoamperometrie zur Elektrofermentation von JG1295 im Mini-Reaktor in MOPS-gepuffertem Medium bei OD ₆₀₀ = 30 mit 10 und 50 mmol l ⁻¹ Glucose.	95
3.38. Chemische Analyse der Fermentationsexperimente von JG1295 in MOPS Medium mit 273 μmol l ⁻¹ Methylenblau mit 10 und 50 mmol l ⁻¹ Glucose.	96

3.39. Elektrofermentation von JG1350 im Mini-Reaktor in MOPS-gepuffertem Medium bei OD 6 mit 10 mmol l^{-1} Glucose.	97
3.40. Elektrofermentation mit JG1295 im Mini-Reaktor in MOPS-gepuffertem Medium bei $\text{OD}_{600} = 30$	98
3.41. Elektrofermentation von JG1295 im Pumpreaktor unter Sättigungsbedingungen.	99
3.42. Übersicht der mittleren Stromdichte über alle Experimente.	101
3.43. Übersicht der Effizienzparameter über alle Experimente.	103
3.44. Übersicht zur Produktivität von Acetoin über alle Experimente.	105
3.45. Korrelation der Evaluationsparameter BET-Stromdichte, Produktivität und Ausbeute mit Zelldichte und Methylenblaukonzentration in JG991 und JG1295.	107
4.1. REM-Aufnahme der äußeren Lage der Pumpelektrode im Querschnitt. . .	114
4.2. Struktur von Prolin und Leucin im Vergleich	132
A.1. Vergleich der BLAST-Ergebnisse von <i>narG</i> aus JG878 und JG1220	181
A.2. Korrelation den Wachstumsraten μ von JG1054 und JG997 mit dem Expressionssignal von <i>fdnG</i>	182
A.3. Korrelation den Wachstumsraten μ von JG1054 und JG997 mit dem Expressionssignal von <i>cspA</i>	183
A.4. Abhängigkeit der Stromstärke I im Pump-Reaktor von der Flussrate Q . .	183

Tabellenverzeichnis

1.1.	Redoxpotentiale E^0 der Elektronenakzeptoren in dieser Arbeit.	8
1.2.	Übersicht über Acetoinausbeuten.	11
2.1.	Liste in dieser Arbeit verwendeter Stämme.	23
2.2.	Zusammensetzung verwendeter Komplex-Medien.	25
2.3.	Zusammensetzung verwendeter Puffer-Lösungen.	25
2.4.	Zusammensetzung verwendeter Minimal-Medien.	26
2.5.	Zusammensetzung der verwendeten Spurenelement-Lösung.	26
2.6.	Liste verwendeter Supplement-Lösungen.	27
2.7.	Liste verwendeter Plasmide.	28
2.8.	Liste verwendeter Primer.	29
2.9.	Zusammensetzung der PCR-Ansätze.	31
2.10.	Übersicht über verwendete PCR-Protokolle.	31
2.11.	Zusammensetzung des TAE-Puffer.	32
2.12.	Zusammensetzung des Ladepuffers	32
2.13.	Ansatz für den Restriktionsverdau	35
2.14.	Zusammensetzung eines Ansatzes für eine isothermale Ligation nach Gibson.	36
2.15.	Zusammensetzung M63-Medium.	37
2.16.	BET-Oberfläche (A_{BET}), spezifische Oberfläche (V_s) und Oberfläche-Volumen-Verhältnis ($\frac{A}{V}$) für alle Reaktor-Systeme.	46
3.1.	Acetoin-Ausbeuten (Y_{Ace}) der anaeroben Wachstumsexperimente mit JG991 in PBS-Medium bei unterschiedlicher Supplementation.	58
3.2.	Vergleich der Fermentationsansätze mit angepasstem Medium und kontrolliertem pH-Wert.	61
3.3.	Variantenanalyse von JG878 Transfer 20.	70
3.4.	Auswahl von Genen mit phosphorylierungsabhängigen Transkriptionsfaktoren.	80
3.5.	Liste differentiell regulierter Gene zwischen JG997 und JG1354, gefiltert nach Genen, welche unverändert zwischen JG1054 und JG1354 exprimiert werden.	84
3.6.	Liste differentiell regulierter Gene zwischen JG997 und JG1354, gefiltert nach Genen, welche unverändert zwischen JG1054 und JG997 exprimiert werden.	87
3.7.	Variantenanalyse von JG1295.	90
3.8.	Expression der <i>ace</i> -Gene von a JG1054, JG997 und JG991 zwischen oxidischen und anoxischen Bedingungen und b von JG1054, JG997 und JG1354 zwischen den Stämmen mit NO_3^- unter Induktion.	93

A.1. Parameter für die Analyse der Genomresequenzierung.	159
A.2. Parameter für die Analyse der RNA-Sequenzierung.	161
A.3. Liste abweichend differentiell regulierter Gene zwischen aerobem und anaerobem Stoffwechsel von JG991 und JG1054	163
A.4. Liste differentiell regulierter Gene zwischen JG997 und JG1354 mit NO_3^- als Elektronenakzeptor und $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ IPTG.	169

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
BLAST	Basic-Local-Alignment-Search-Tool
CAD	<i>computer aided design</i>
CE	Coulomb-Effizienz
dH ₂ O	vollentsalztes Wasser
ddH ₂ O	Reinstwasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSMZ	Leibniz-Institut - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
× <i>g</i>	Vielfache der Erdbeschleunigung
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
MB	Methylenblau
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NCBI	<i>National Center for Biotechnological Information</i>
NGAM	<i>non-growth associated maintenance</i>
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
PBS	Phosphat-gepufferte-Saline
vs. REF	bezogen auf die Referenzelektrode
RT	Raumtemperatur
SHE	Standard-Wasserstoff-Elektrode
SOB	<i>super optimal broth</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TPM	<i>transcripts per kilobase million</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1. Produktion von Basischemikalien

1.1.1. Rohstoffe und Produkte der chemischen Industrie

Die Erzeugnisse der chemischen Industrie sind die Grundlage einer Vielzahl von Produkten. Darunter sind sowohl Konsumgüter des täglichen Bedarfs, wie auch essentielle Versorgungsgüter, zum Beispiel Medikamente oder Treibstoffe. Gerade im Hinblick auf letztere Gruppe erscheint es umso kritischer, dass die Rohstoffbasis der chemischen Industrie, aktuell und perspektivisch bis 2030, zu deutlich über 80 % aus fossilen Kohlenstoffverbindungen besteht (Prognos AG 2017). Im Jahr 2015 belief sich der Rohstoffeinsatz auf rund 19,8 Millionen Tonnen, davon waren 75 % Rohbenzin oder andere Erdölprodukte, 11 % Erdgas und 1 % Kohle. Lediglich 13 % stammen aus erneuerbaren Ressourcen (Verband der Chemischen Industrie 2017).

Zusammen mit der Energiewirtschaft, die ihre Rohstoffe ebenfalls zu 87 % aus fossilen Kohlenstoffverbindungen bezieht (Bundesministerium für Wirtschaft und Energie 2018), konkurrieren damit zwei Schlüssel-Industriezweige um eine absehbar endliche Ressource. Schätzungen gehen von einem Ende der Öl- und Kohle-Ressourcen in circa 35 beziehungsweise 100 Jahren aus (Shafiee u. a. 2009).

Ein Drittel der Produktion der chemischen Industrie entfallen auf Basischemikalien, die ihrerseits selbst wieder Ausgangsstoffe sind, zum Beispiel für die Produktion von Spezialchemikalien oder für andere Industriezweige (Prognos AG 2017). Darunter finden sich Organische Grundstoffe, wie zum Beispiel Ethen, Propen oder 1-Butanol mit einer Gesamtproduktion von 22,9 Mt in Deutschland für das Jahr 2017 (Statistisches Bundesamt 2018).

1.1.2. Produktion von Basischemikalien aus Biomasse

Ein wesentlicher Teil der Abhängigkeit der chemischen Industrie von fossilen Ressourcen ließe sich vermeiden, wenn organische Basischemikalien aus erneuerbaren Substraten gewonnen werden könnten. Durch die Umstellung der Produktion von Basischemikalien aus erneuerbaren Rohstoffen kann bestehende Infrastruktur für die Produktion von Spezialchemikalien, weitgehend erhalten bleiben. Als erneuerbare Rohstoffe, zu Beginn der Wertschöpfungskette, stehen in diesem Fall Agrarprodukte, wie Mais, Raps und Tiernebenprodukte (1. Generation) oder Lignocellulose, Lignin und Algen (2. Generation) zur Verfügung. Die Unterscheidung erfolgt hierbei nach sozioökonomischen Kriterien. Während Rohstoffe der 1. Generation in Konkurrenz zur Produktion von Nahrungsmitteln stehen, werden Rohstoffe der 2. Generation aus Abfallströmen oder sozialverträglichen

Quellen bezogen (Cherubini 2010; Mussgnug u. a. 2010). Die Prozessierung wird, in Übernahme der petrochemischen Terminologie, als Bioraffinerie bezeichnet. Der erste Schritt besteht in der Regel darin, die Zugänglichkeit des Rohstoffs zu erhöhen. Dies geschieht mechanisch durch Zermahlen, durch enzymatische/saure Hydrolyse oder durch Pyrolyse. Anschließend erfolgt die Konversion der erzeugten Grundstoffe, wie Stärke, Zucker oder Triglyceride in höherwertige Produkte (Cherubini 2010; Lopes 2015). Die Umsetzung kann sowohl thermochemisch/katalytisch, wie auch biotechnologisch erfolgen (Clark, J. H. u. a. 2015, Kapitel 3). Die thermochemische Umsetzung zielt häufig auf die Produktion von unspezifisch zusammengesetzten Biokraftstoffen, welche durch Dehydrierung der Biomasse erzeugt werden. (Chen, W.-H. u. a. 2015; Pfitzer u. a. 2016). Die biotechnologische Umsetzung durch Mikroorganismen hingegen forciert in der Regel die Produktion einzelner definierter Substanzen.

1.1.3. Mikrobielle Fermentationsprozesse für Basischemikalien

Entscheidend für die Anwendbarkeit eines Fermentationsprozesses sind, noch vor technischen und ökonomischen Rahmenbedingungen, Umsatz und Ausbeute des biochemischen Prozesses. Die anschließende Aufreinigung wird wesentlich dadurch bestimmt, in welcher Konzentration das Produkt neben anderen Produkten gebildet wird. In einigen Fällen können diese Kriterien bereits in nativen Organismen erfüllt werden (Lee, J. W., Kim, H. U. u. a. 2011).

Die Produktion von Ethanol aus Zucker ist bereits seit geraumer Zeit industriell etabliert (Jang u. a. 2012). Jedoch ist auch die Produktion von Ethanol aus Lignocellulose-Hydrolysat, beispielsweise in nativen Stämmen von *Bacteroides polypragmatus*, *Candida shehatae*, *Saccharomyces cerevisiae* oder *Zymomonas mobilis* mit Ausbeuten von über 75 % beschrieben (Patel u. a. 1986; Parekh, S. R., Yu u. a. 1986; Parekh, S. R., Parekh, R. S. u. a. 1989). Herausfordernd für die Nutzung der Fermentation ist vor allem die Integration von Prozessablauf und verschiedenen Fermentationsstämmen. So laufen Saccharifikation und Fermentation meist getrennt ab, was in Folge der Hydrolyse zur Anwesenheit von Inhibitoren wie Furfural im Hydrolysat führt. Findet die Saccharifikation und Fermentation unter milderen Bedingungen in einem Schritt statt, erschwert das Hydrolyse durch unterschiedliche Temperatur-Optima für die Teilprozesse (Sarkar u. a. 2012; Achinas u. a. 2016). Die Verwendung offener Kulturen kann sich positiv auf die Rate und Stabilität des Prozesses auswirken, führt aber zu einer geringeren Ausbeute (Lin u. a. 2011).

Im Falle von Laktat hat die Synthese durch Mikroorganismen den Vorteil, dass hier ein in hohem Maß enantiomerenreines Produkt gebildet wird (Jang u. a. 2012). Teilweise ist dieser Prozess bereits kommerzialisiert. Zum Einsatz kommen dabei Hefen oder Milchsäurebakterien (Becker, J. u. a. 2015). Die Bildung von Laktat erfolgt in Milchsäurebakterien homofermentativ. So können beispielsweise Stämme von *Lactobacillus brevis*, nativ als Produktionsorganismen für Laktat aus Lignocellulose-Hydrolysat verwendet werden (Guo u. a. 2010). Herausfordernd hierbei ist vor allem die komplexe Zusammensetzung der aufgeschlossenen Cellulose, welche als Substrat nicht vollständig mit dem Produktionsorganismus kompatibel ist, da die verschiedenen Zucker unterschiedlich gut bis gar nicht fermentiert werden können (Abdel-Rahman u. a. 2011).

Für die meisten Substanzen ist die Produktion von Basischemikalien in native Organismen jedoch meist ineffizient oder gar unmöglich. Mikrobielle Fermentationen werden daher aktuell vor allem in rekombinanten Stämmen entwickelt (Curran u. a. 2012; Menon u. a. 2012). Im Folgenden sollen daher die Grundlagen der metabolische Kontrolle von Fermentationsstämmen näher betrachtet werden.

1.2. Entwicklung von Produktionsstämmen

1.2.1. Grundlegende Prinzipien

Bei der Entwicklung von Stoffwechselwegen zur Produktion von Basischemikalien kommt dem *metabolic engineering* und der synthetischen Biologie größte Aufmerksamkeit zu. *Metabolic engineering* bezeichnet die Steuerung von Stoffwechselprozessen durch gezielte Modifikation auf genetischer Ebene hin zu gewünschten Zelleistungen. Dies kann sich sowohl auf Umsatz und Ausbeute eines nativen Metabolits beziehen, als auf die Bildung eines nicht-nativen Produkts oder die Erschließung eines nicht-nativen Substrats. Besonderes Augenmerk fällt dabei auf die Einflussnahme des metabolischen Kontextes auf den Stofffluss. So wird versucht, durch Beeinflussung diskreter Teilsysteme, eine systemische Betrachtung des Stoffwechsels abzuleiten (Stephanopoulos 1999). Im Hinblick auf die Produktion von Basischemikalien ergibt sich hieraus eine Schnittmenge mit den Zielen der synthetischen Biologie, natürlich nicht existente Zelleigenschaften zu realisieren. Die Generierung solcher, artifizieller Stoffwechselwege ist zentral für die Annäherung an bestehende chemische Prozesse (Keasling 2008). Die Kombination beider Ansätze bildet das Paradigma für die Erzeugung von Produktionsorganismen.

Die Steuerung des Stoffflusses hat dabei das Ziel Ausbeute, Umsatzrate und Titer des Produkts zu maximieren. Die Anpassung erfolgt dann zumeist nach Gesichtspunkten wie: Substratnutzung, Transporter für Stoffimport oder -export, Eliminierung von Nebenprodukten, Umleitung von Stoffflüssen, Kofaktor-Optimierung, Optimierung der Promotorstärke oder Modifikation von Enzymen (Lee, J. W., Na u. a. 2012). Dabei muss beachtet werden, dass nur eine begrenzte Menge zellulärer Ressourcen für die Umsetzung des Zielstoffwechsels zur Verfügung stehen.

1.2.2. Physiologische Konsequenzen und metabolische Belastung

Die Einführung komplexer Stoffwechselwege in einen Chassis-Stamm, führt häufig zu unerwarteten Folgen. Der geänderte Stofffluss und/oder die Vereinnahmung von Ressourcen durch die Expression heterologer Gene kann zu einer erheblichen Störung des Metabolismus führen (Heyland u. a. 2011). Das Verhältnis der Ressourcen die zur Bewältigung der synthetischen Stoffwechselleistung benötigt werden, gegenüber denen, die der Produktionswirt zur Verfügung stellen kann, wird als *metabolic burden* bezeichnet (Wu u. a. 2016). Zur Betrachtung der metabolischen Belastung werden physiologische Marker, wie zum Beispiel das Verhältnis von ATP- zu NADH-Bildung (P/O) herangezogen. Veränderte Stoffwechsel haben häufig Einfluss auf die Stabilität des Protonengradienten, sodass das P/O-Verhältnis von regulär 2,5 auf unter 2 fallen kann (Sauer und Bailey 1999).

Darüber hinaus lässt sich die Belastung auch über die Expressionstärke von Haushaltsgenen verfolgen. So kann beispielsweise die Expression der RNA-Polymerase limitierend für den Stoffwechsel sein und damit als Indikator für metabolische Belastung dienen (Gyorgy u. a. 2015; Scott u. a. 2010). Bei der Evaluation eines synthetischen Stoffwechsels müssen daher die Gegebenheiten im Wirtsorganismus wie auch die Expressionslast gleichermaßen Berücksichtigt werden (Borkowski u. a. 2016). Zur Vorabeeschätzung der Expressionslast können beispielsweise Kapazitätsmonitore auf Basis von GFP (Ceroni u. a. 2015) oder zellfreie Expressionssysteme (Siegal-Gaskins u. a. 2014) verwendet werden. Die Untersuchung des Wirtsmetabolismus geschieht meist unter Anwendung von genomweiten Modellen (Kremling u. a. 2015; Zhang, X., Tervo u. a. 2016). Hiermit wird versucht, einen für die Umsetzung optimalen Ausgleich zwischen Katabolen und Anabolen Reaktionen zu finden.

1.2.3. Verhältnis von Anabolismus zu Katabolismus

Eine große Bedeutung beim Design von Produktionsorganismen kommt der Begrenzung des Biomasseaufbaus zu. Während sich im Katabolismus die Bildung einzelner Endprodukte durch genetische Deletion gezielt unterbinden lassen (Lee, J. W., Na u. a. 2012), sind anabole Reaktionen diverser und daher schwieriger zu vermeiden. Die hier gebunden Ressourcen (Energie, Kohlenstoff, Cofaktoren) stehen automatisch nicht mehr für die Produktbildung zur Verfügung (Shin u. a. 2013). Wird der Anabolismus zu sehr begrenzt, kann der Organismus sich selbst nicht mehr erhalten. Das Ideal eines Produktionsstamms ist also ein, sich gerade selbst erhaltender, Ganzzellkatalysator (Lee, J. W., Na u. a. 2012). Häufig wird versucht sich diesem Ideal anzunähern in dem die Energieausbeute des Stoffwechsels künstlich limitiert wird (Causey u. a. 2004) oder zentrale Zugänge zu anabolen Reaktionen blockiert werden (Park, J. H. u. a. 2007; Lee, K. H. u. a. 2007). Ein Ausweg kann auch in der Umsetzung einer anoxischen Fermentation bestehen. Durch die geringere Energieausbeute des anaeroben Stoffwechsels laufen anabole Reaktionen in weit geringerem Umfang ab als unter O₂-atmenden Bedingungen. Folglich muss für die Konservierung der selben Menge ATP mehr Substrat umgesetzt werden. Die katabole Rate ist daher unter anoxischen Bedingungen groß im Vergleich zur anabolen Rate (Weusthuis u. a. 2011). Am Ende einer jeden metabolischen Umwandlung müssen sämtliche mit dem Substrat aufgenommenen Elektronen wieder von intermediär reduzierten Kofaktoren entfernt werden, um diese für eine erneute Umsetzung zur regenerieren. Die schränkt die Anwendung von anoxischen Fermentationen stark ein. Die Umsetzung ohne einen anoxischen Elektronenakzeptor ist nur bei einer ausgeglichenen Redoxbilanz zwischen Substrat und Produkten möglich. Die Produktion von nur einem Endprodukt, eine homofermentative Gärung, ist beispielsweise bei den in Abschnitt 1.1.3 genannten Beispielen gegeben. Wird bei einem Stoffwechsel ein Elektronenüberschuss produziert, kann der Stoffwechsel nur dann ablaufen wenn ein externer Elektronenakzeptor verfügbar ist oder ein Substrat in passender Oxidationsstufe gewählt wird. In allen anderen Fällen muss ein Produktgemisch in Kauf genommen werden (Weusthuis u. a. 2011). Die hohe metabolische Belastung durch heterologe Expression bedingt allerdings häufig die Anwesenheit von O₂ als Elektronenakzeptor, da sonst nicht ausreichend Energie für die angestrebte Zellfunktion zur Verfügung steht. Möglich ist hier die Modifikation globaler Stoffwechselregulatoren. So konnten durch Deletion von *arcA* und Modifikation von *crp* Teile des anaeroben Stoffwechsels unter oxischen Bedingungen

aktiviert werden (Dellomonaco u. a. 2011). Die Modifikation systemischer Regulatoren, ist bisher jedoch nur in gut verstandenen Modellorganismen umgesetzt (Lee, J. W., Na u. a. 2012). Der in diesem Kontext am besten verstandene Modellorganismus ist *Escherichia coli*, dessen Zentralstoffwechsel und die Regulation von selbigem im Folgenden erläutert werden soll.

1.3. *Escherichia coli* als Fermentationsorganismus

Unter den biotechnologisch erschlossenen Mikroorganismen stellt *E. coli* einen der am häufigsten und mit hoher Diversität angewandten Chassis-Stämme dar. Dafür prädestinieren ihn seine physiologischen Eigenschaften, wie eine kurze Generationszeit, hohe Umsatzrate und breiter Substratspektrum. Darüber hinaus ermöglicht die herausragende Stellung als am besten erforschter Modellorganismus in Genetik, Zellbiologie und Molekularbiologie eine hohe genetische Zugänglichkeit (Schaechter 2001; Zhang, X., Tervo u. a. 2016). Bereits 1997 konnte das Genom vollständig sequenziert und viele Funktionen zu Genen zugeordnet werden (Blattner u. a. 1997). In der Folge konnten zahlreiche funktionale Modelle des Stoffwechsels abgeleitet werden, was die Nutzbarkeit für biotechnologische Prozesse wesentlich erhöht (Edwards, J. S. u. a. 2000; Covert u. a. 2002; Orth u. a. 2011; Weaver u. a. 2014; Kremling u. a. 2015).

1.3.1. Zellbiologie und Stoffwechselregulation

Zentralstoffwechsel

Der chemoheterotrophe Stoffwechsel des fakultativ anaeroben Bakteriums *Escherichia coli* kann ein relativ breites Spektrum von niedermolekularen Kohlenstoffverbindungen umsetzen. Dazu gehören unter oxidischen Bedingungen neben einfachen Zuckern oder Alditolen wie Glucose, Maltose oder Mannit, auch organische Säuren und Aminosäuren wie Succinat, Laktat, Serin oder Acetat (Keseler u. a. 2013). Unter Fermentationsbedingungen verengt sich das Substratspektrum im Wesentlichen auf Zucker (Clark, D. P. 1989). Mit einem anoxischen Elektronenakzeptor wie NO_3^- , DMSO oder TMAO ist die Nutzbarkeit abhängig von der jeweiligen Kombination zwischen Akzeptor und Substrat (Unden und Bongaerts 1997).

Unabhängig vom Elektronenakzeptor werden Substrate über Transportsysteme in die Zelle transportiert. Im Falle von Glucose geschieht dies hauptsächlich über das Phosphotransferase-System (PTS) und teilweise durch einen Galactose/ H^+ -Antiporter (Escalante u. a. 2012; Steinsiek u. a. 2012). Die auf den Import folgenden Reaktionen der Glykolyse setzen eine Aktivierung der Glucose voraus. Im Falle des PTS-Systems erfolgt dies beim Import mit Phosphoenolpyruvat als Cosubstrat (Escalante u. a. 2012). In den weiteren Schritten der Glykolyse wird Glucose-6-Phosphat zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Dihydroxyaceton-Phosphat gespalten und dann jeweils zu Pyruvat oxidiert. In diesen Reaktionsschritten werden pro Mol Glucose 2 mol ATP, 2 mol NADH und 2 mol Pyruvat gewonnen (Fuchs 2017, Kapitel 13). Unter oxidischen Bedingungen verläuft der Katabolismus nun weiter bis zu CO_2 über den Citratzyklus und damit bis zur vollständigen Oxidation

des Substrats. Die Energiebilanz beträgt dabei pro Mol Glucose 3 mol ATP, 3 mol NADH und 1 mol Ubichinol (Fuchs 2017, Kapitel 13).

In völliger Abwesenheit eines Elektronenakzeptors (Fermentation), wird intermediär gebildetes Pyruvat in der gemischten Säuregärung zu Succinat, Laktat, Ethanol, Acetat und Formiat umgesetzt. Dies dient vor allem der Reoxidation von Cofaktoren und in geringerem Umfang der Energiekonservierung bei der Bildung von Acetat (Clark, D. P. 1989). Die Bildung von Succinat erfolgt aus PEP über den reduktiven Zweig des Citratzyklus. Malatdehydrogenase (Mdh) und Fumaratdehydrogenase (Frd) oxidieren dabei je ein Molekül NADH zu NAD^+ . Pyruvat wird durch die Laktatdehydrogenase (Ldh) unter Reoxidation von NADH zu Laktat reduziert (Clark, D. P. 1989). Über die Pyruvat-Formiat-Lyase (Pfl) oder die Pyruvat-Flavodoxin-Oxidoreduktase (YdbK) kann Pyruvat zu Acetyl-CoA oxidiert werden (Nakayama u. a. 2013). Im Falle der Umsetzung durch die Pfl wird dabei noch Formiat gebildet, welches durch die Formiat-Lyase zu CO_2 und H_2 disproportioniert. Über die Alkohol-Dehydrogenase (Adh) kann aus Acetyl-CoA Ethanol gebildet werden, wobei zwei Moleküle NAD^+ zurückgewonnen wird. Durch Reaktion mit der Phospho-Transacetylase (Pta) und der Acetat-Kinase (Ack) wird über intermediäres Acetyl-Phosphat Acetat gebildet. Im Kinase Schritt wird dabei ATP konserviert. Die Energiebilanz des Gärungsstoffwechsels liegt bei der Umsetzung von 1 mol Glucose und einer normalen Produktverteilung bei 2,4 mol ATP (Fuchs 2017, Kapitel 8). Die Gene des Citratzyklus sind nur schwach exprimiert und dienen lediglich der anabolen Bereitstellung von Aminosäuren und anderen Intermediaten (Trotter u. a. 2011).

In Anwesenheit von anoxischen Elektronenakzeptoren, läuft ein Mischstoffwechsel mit höherer Energieausbeute ab, da die Reoxidation von Cofaktoren unabhängig erfolgen kann (Unden und Bongaerts 1997; Ingledew u. a. 1984). Abbildung 1.1 zeigt die geschilderten Prozesse.

Die reduzierten Cofaktoren (hauptsächlich NADH) werden, falls externe Elektronenakzeptoren zur Verfügung stehen, durch membrangebundene Dehydrogenasen (insgesamt 15) reoxidiert. Elektronenakzeptoren sind in der Membran befindliche Chinone. Je nach Elektronenakzeptor ist der Chinonpool unterschiedlich, aus Ubichinon (UQ), Dimethylmenachinon (DMK) und Menachinon (MK) zusammengesetzt. Mit O_2 als Akzeptor besteht er aus UQ und DMK. MK ist kaum nachweisbar. Im Falle von NO_3^- steigt der Chinongehalt insgesamt an. Es wird hauptsächlich DMK gebildet, MK stellt rund 1/3 des Chinonpools und UQ ist nicht nachweisbar. Mit DMSO verschiebt sich die Zusammensetzung weiter zu MK (2/3), UQ und DMK stellen zusammen 1/3 des Chinonpools. Der Chinongehalt der Membran bleibt insgesamt hoch im Vergleich zum aeroben Stoffwechsel (Unden und Bongaerts 1997; Nitzschke u. a. 2018).

Je nach Elektronenakzeptor können so eine bestimmte Anzahl Protonen pro Elektron über die Membran transloziert werden. Für den Fall von NADH welches über die Dehydrogenase Nuo oxidiert wird ergeben sich 4 H^+/e^- mit O_2 als Akzeptor, 3 mit NO_3^- und 2 mit DMSO (Unden und Bongaerts 1997).

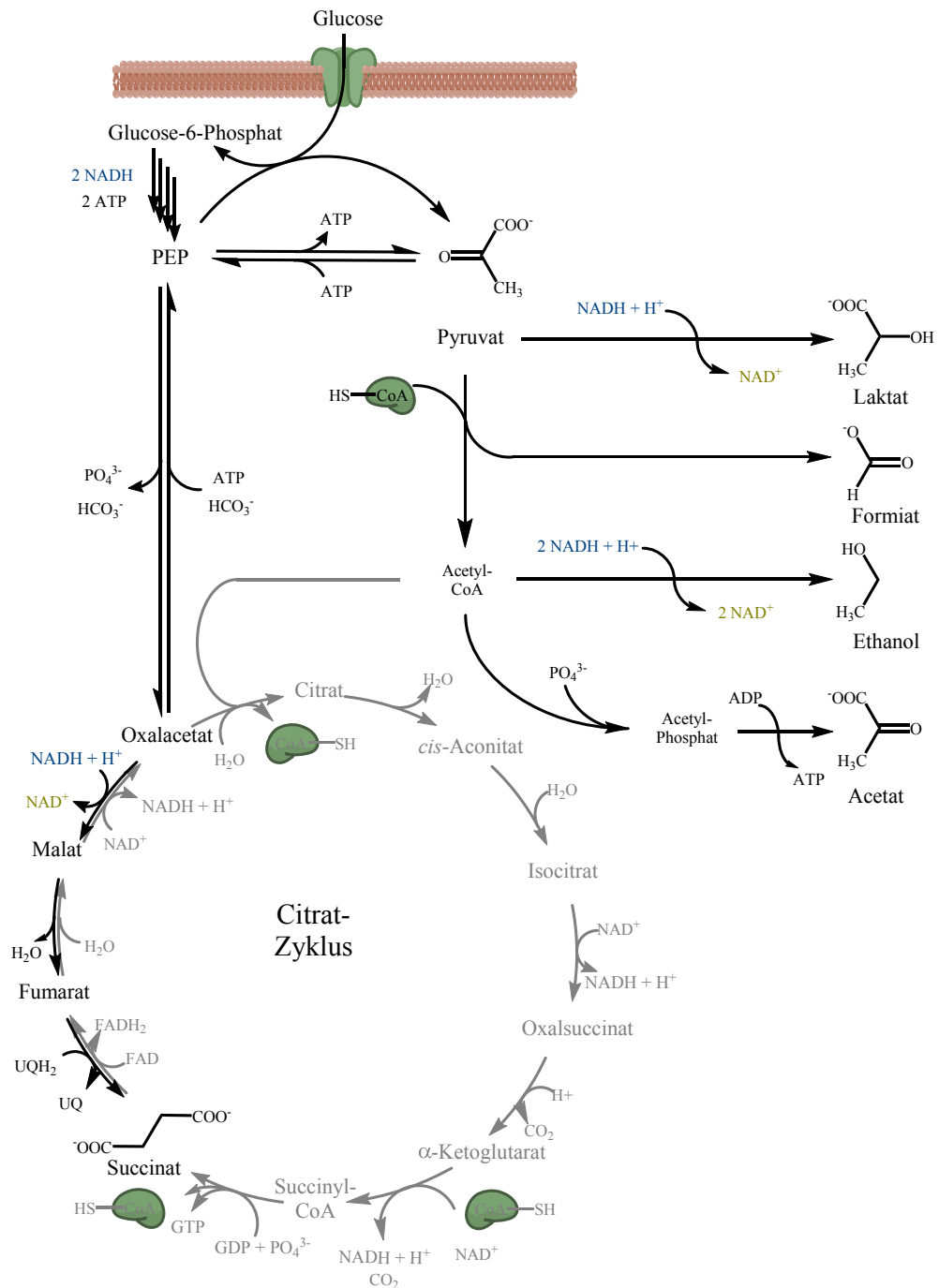


Abbildung 1.1.: Zentralstoffwechsel von *Escherichia coli*. Erläuterung im Text. grau - überwiegend im aeroben Stoffwechsel.

Tabelle 1.1.: Redoxpotentiale $E^{0'}$ der Elektronenakzeptoren in dieser Arbeit.

Redoxpaar	$E^{0'}$ [mV]	Referenz
$\frac{1}{2}\text{O}_2 + 2e^- \leftrightarrow \text{H}_2\text{O}$	+820	Thauer u. a. (1977)
$\text{NO}_3^- + 2e^- \leftrightarrow \text{NO}_2^-$	+433	Thauer u. a. (1977)
$\text{DMSO} + 2e^- \leftrightarrow \text{DMS}$	+160	Wood (1981)
$\text{MB}_{\text{ox}} + 2e^- \leftrightarrow \text{MB}_{\text{red}}^1$	+11	Lundblad (2010)

¹ Methylenblau

Zur Übertragung der Elektronen aus dem Chinonpool auf die genannten Elektronenakzeptoren, stehen *E. coli* je nach Akzeptor unterschiedliche terminale Reduktasen zur Verfügung. Im Fall von O_2 handelt es sich dabei hauptsächlich um Cyo und Cyd. NO_3^- wird durch NarA, NarZ und NapAP reduziert. Dabei entstehendes NO_2^- wird durch Nrf reduziert. Die Reduktion von DMSO erfolgt über die Reduktase Dms (Ingledeu u. a. 1984) Die Spezifität für das jeweilige Chinon wird durch das Redoxpotential relativ zum Elektronenakzeptor und durch transkriptionelle Regulation bestimmt (Nitzschke u. a. 2018).

Stoffwechselregulation

Im Stoffwechsel von *E. coli* existiert sowohl ein System zur hierarchischen Diskriminierung zwischen unterschiedlichen Substraten, wie auch zwischen unterschiedlichen Elektronenakzeptoren.

Cyclisches Adeninmonophosphat (cAMP) dient als molekularer Indikator für die Energieausbeute eines Substrats. Die transkriptionelle Kontrolle erfolgt dann durch die Aktivierung des cAMP Rezeptor Proteins (CRP). cAMP bindet CRP und führt zu einer Konformationsänderung, was die Bindung an DNA erlaubt. Vor allem Glucose hat einen starken Effekt auf die cAMP-Konzentration in der Zelle. Durch den Import von Glucose über das PTS-System wird dessen Adenylatcyclase-Untereinheit dephosphoryliert und dadurch inaktiv (Kolb u. a. 1993; Hermsen u. a. 2015). CRP wirkt dabei sowohl als Aktivator wie auch als Repressor für eine Reihe von Genen. In Anwesenheit von Glucose wird so zum Beispiel das *aceEF*-Operon der Pyruvat-Dehydrogenase hochreguliert, während die Gene für die Verstoffwechslung nieder hierarchischer Substrate, wie Galactose, Glycerin oder Laktat reprimiert werden (Gosset u. a. 2004).

Die Wahrnehmung verschiedener Elektronenakzeptoren erfolgt über das Fumarat und Nitrat Reduktions Regulations Protein (FNR). Das Redoxpotential (E') im Cytoplasma wird bestimmt durch den jeweiligen Elektronenakzeptor (vgl. Tabelle 1.1) und spiegelt sich im Verhältnis von NAD^+/NADH wieder (Graef u. a. 1999). Hierdurch wird das Verhältnis von inaktivem [2Fe-2S]-Monomer zu aktivem [4Fe-4S]-Homodimer von FNR reguliert (Green u. a. 2004). Mit abnehmendem Wert von E' des Elektronenakzeptors verschiebt sich das

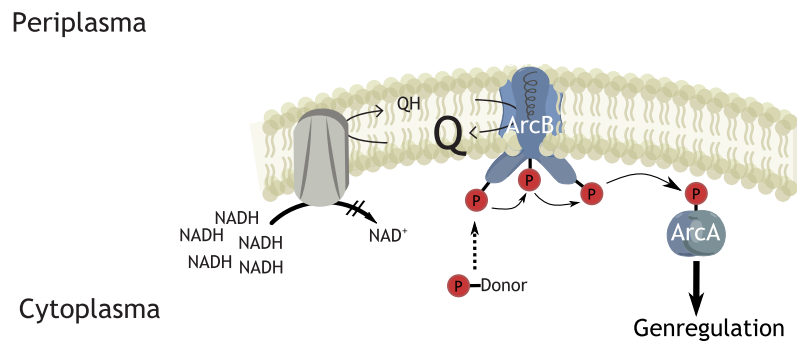


Abbildung 1.2.: Schematische Darstellung der Signaltransduktion durch ein Zwei-Komponenten-System am Beispiel von ArcAB. Erläuterung im Text.

Gleichgewicht hin zum Dimer. Der Mechanismus erlaubt eine abgestufte physiologische Antwort auf sich ändernde Umweltbedingungen / Elektronenakzeptoren (Salmon u. a. 2003). Dabei unterliegen Gene für die terminalen Reduktasen und NADH-Dehydrogenasen hauptsächlich der direkten Regulation von FNR (Salmon u. a. 2003). Beim Übergang von oxischen zu anoxischen Bedingungen erfolgt allerdings eine globale Regulation des Stoffwechsels. Dabei fungiert das ArcAB-System (*aerobic respiration control*) als zentraler Schalter zwischen den Expressionsprogrammen (Gunsalus u. a. 1994; Trotter u. a. 2011). Bei ArcAB handelt es sich um ein Zwei-Komponenten-System mit der Sensorikinease ArcB und dem Regulator-Protein ArcA (Abbildung 1.2). Die Aktivierung des Arc-Systems basiert auf der Phosphorylierung von membrangebundenem ArcB. Bei abnehmendem Redoxpotential im Chinonpool, erfolgt die Auflösung von Disulfidbrücken in ArcB. Dies ermöglicht die Autophosphorylierung und anschließend die Signaltransduktion an cytoplasmatisches ArcA, welches dann als Transkriptionsfaktor fungiert (Malpica u. a. 2004). Katabole Gene der Säuregärung sind positiv reguliert durch ArcA-P, wohingegen Gene des Citratzyklus und oder der Fettsäuresynthese negativ reguliert werden (Iuchi u. a. 1988; Georgellis u. a. 1997; Perrenoud u. a. 2005).

1.3.2. Anwendung von *E. coli* für die Produktion von Basischemikalien

E. coli ist einer der meist verwendeten Wirtsorganismen in der Biotechnologie. Insbesondere für die Produktion einfacher rekombinanter Proteinen wird *E. coli* verwendet (Adrio u. a. 2010). Die Entwicklung vieler Methoden an diesem Modellorganismus erlauben auch unter den Gesichtspunkten von synthetischer Biologie und *metabolic engineering* eine umfassende Betrachtung des Zellstoffwechsels (Chen, T. u. a. 2013; Zhang, X., Tervo u. a. 2016). Für die Verwendung von *E. coli* bestehen viele Ansätze, insbesondere zur Produktion von einfachen Alkoholen und organischen Säuren (Förster und Gescher 2014). Die Anwendungen von *E. coli* als Produktionsorganismus für die Produktion von Basischemikalien soll hier am Beispiel von Pyruvat erläutert werden.

Da Pyruvat zwar ein nativer Metabolit von *E. coli* ist, jedoch keines der Gärprodukte, besteht ein Ziel der Stoffwechselmodifikation in der die Eliminierung typischer Stoffwechselendprodukte, um eine Akkumulation von Pyruvat zu ermöglichen. Hierdurch

steigert sich die Produktausbeute erheblich. Causey u. a. (2004) konnten durch die Deletion von *focA*, *pflB*, *frdBC*, *ldhA*, *adhA* die Ausbeute von 5,9 auf 10,5 % steigern. Die weitere Deletion von *ackA* ergab einen Wert von 57,5 %.

Maßnahmen zur Erhöhung der Stoffwechselrate zielen zumeist auf die Beschleunigung der Glykolyse ab (Song u. a. 2016). Gleichzeitig wird das Zellwachstum durch eine Limitierung von ATP begrenzt. Durch Deletion der Protonen translozierenden Untereinheit der ATP-Synthase und der Pyruvate-Oxidase (*pox*) wurde erreicht, dass O₂ zwar als terminaler Elektronenakzeptor fungieren kann, jedoch durch oxidative Phosphorylierung keine Energie konserviert werden kann (Akita u. a. 2016; Zhu, Y. u. a. 2008; Causey u. a. 2004).

1.3.3. Fermentation von Acetoin

In einer Studie aus dem Jahr 2004 des US Energieministeriums wurde nach potentiellen Grund- beziehungsweise Aufbauchemikalien aus zuckerbasierten Fermentationen für den Wandel hin zu einer Bioökonomie gesucht (Werpy u. a. 2004). Unter den 30 vielversprechendsten Kandidaten wird unter anderem Acetoin (3-Hydroxy-2-Butanon, C₄H₈O₂) geführt. Insbesondere als Vorstufe für 2,3-Butandiol und 1,4-Butadien wird Acetoin große Bedeutung für die Produktion von Synthetikgummi zugemessen. Aktuell findet Acetoin, aufgrund seines intensiven Geruchs nach Butter, als Aromastoff und als Synthesegrundstoff für Pyrazine Anwendung in der Lebensmittelindustrie (Xiao u. a. 2014). Natürlich kommt Acetoin als Intermediat der 2,3-Butandiol-Gärung von Enterobakterien und im Stoffwechsel von Milchsäurebakterien vor (Celińska u. a. 2009).

Die Fermentation erfolgt sowohl in nativen wie auch in heterologen Wirtsorganismen. Da Acetoin jedoch nur als Intermediat auftritt, werden fast ausschließlich rekombinante Ansätze verwendet. In den Fermentationsansätzen sind in der Regel Glucose oder andere Zucker das Substrat für die Fermentation (Yang, S. u. a. 2016; Zhang, B. u. a. 2016). Mit Acetoin als natürlichem Intermediat bzw. Produkt werden viele Fermentationen konsequenterweise in homologen Stämmen umgesetzt. Typische Organismen sind *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* oder *Serratia marcescens*. Die Modifikationen zielen dabei auf die Repression der Butandiolbildung (Gao, S. u. a. 2014; Zhang, X., Zhang, R. u. a. 2014; Wang, D. u. a. 2015), sowie auf eine Beschleunigung der Glykolyse (Zhang, X., Zhang, R. u. a. 2014; Sun u. a. 2012).

In heterologen Ansätzen wird vor allem *E. coli* als Produktionsorganismus verwendet. Tabelle 1.2 gibt eine Übersicht über erreichte Ausbeuten mit den jeweiligen Fermentationsansätzen. Bereits die heterologe Expression von Genen zur Bildung von Acetoin kann zu relevanter Produktbildung führen (Ui u. a. 1998). Um die Repression der Glykolyse durch Katabolite zu unterbinden, wählten Xu u. a. (2015) einen Ansatz in dem durch Überexpression der NADH-Oxidase *nox* aus *L. brevis* eine beschleunigte Fermentation mit hoher Stereoselektivität erreicht werden konnte. (Xu u. a. 2015). Die Produktion von hoch enantiomeren reinem Acetoin wird zumeist durch Umsetzung der achiralen Vorstufe Diacetyl erreicht (Gao, J. u. a. 2013; Li u. a. 2018). Nakashima u. a. (2014) konnten unter Verwendung eines Xylose induzierbaren Promotors in einem pET-Vektor, ein effizientes System zu Fermentation von hydrolysierten Lignocellulose etablieren. In all diesen Ansätzen ist die Reoxidation der Cofaktoren an die Anwesenheit von Sauerstoff gebunden.

Tabelle 1.2.: Übersicht über die Acetoinausbeute in oxischen Ansätzen mit *E. coli* und anoxischen Ansätzen in allen Organismen.

Substrat	Ausbeute [%]	Bedingungen	Genetischer Hintergrund	Quelle
Oxisch (nur <i>E. coli</i>)				
Glucose	96	LB	pUC- <i>alsSD</i>	Ui u. a. (1998)
Diacetyl	88	LB, Glucose	pET- <i>dar</i>	Gao, J. u. a. (2013)
Glucose, Xylose	94	MM, ¹ Hefeextrakt, Pepton	pXYL- <i>alsSD</i>	Nakashima u. a. (2014)
Glucose	80	MM, ¹ Hefeextrakt	pUC- <i>budRAB-nox</i>	Xu u. a. (2015)
Palmen-Faser, hydrolysiert	87	LB	pXYL- <i>alsSD</i>	Mohd Yusoff u. a. (2017)
Diacetyl	86	LB, Formiat	pETDuet- <i>dar-fdh</i>	Li u. a. (2018)
Anoxisch				
Glucose	44	LB	<i>E. coli</i> $\Delta aceEF$, $\Delta ldhA$, $\Delta ilvC$ pET- <i>ilvBN-aldB</i>	Nielsen u. a. (2010)
Laktat	86	MM, Fumarat	<i>S. oneidensis</i> $\Delta \lambda$, $\Delta pta-ackA$	Bursac u. a. (2017)
Glucose	90	MM, ¹ NO ₃ ⁻	<i>E. coli</i> $\Delta frdA-D$, $\Delta adhE$, $\Delta ldhA$ $\Delta pta-ackA$	Förster, Beblawy u. a. (2017)

¹ Minimalmedium

In einer biphasischen Fermentation, mit einer 3-5 h oxischen Wachstumsphase und einer anoxischen Induktionsphase konnten Nielsen u. a. (2010) Acetoinbildung in einem *E. coli*-Stamm mit fokussiertem Zentralstoffwechsel bei einer Ausbeute von 50 % zeigen. Ein Ansatz zu strikt anoxischen Fermentation konnte in *Shewanella oneidensis* realisiert werden. Hierbei wurde Acetoin mit einer Ausbeute von 86 % gebildet. Da *S. oneidensis* nicht zur Gärung befähigt ist, wurde Fumarat als Elektronenakzeptor verwendet. Die Ausbeute konnte wesentlich durch den *knock-out* der Acetatkinase und Phosphotransacetylase gesteigert werden. Förster, Beblawy u. a. (2017) konnten die Bildung von Acetoin mit einer Ausbeute von 90 % mit NO₃⁻ als Elektronenakzeptor erreichen. Der hierzu notwendige Stoffwechsel ist im folgenden Abschnitt genauer erläutert.

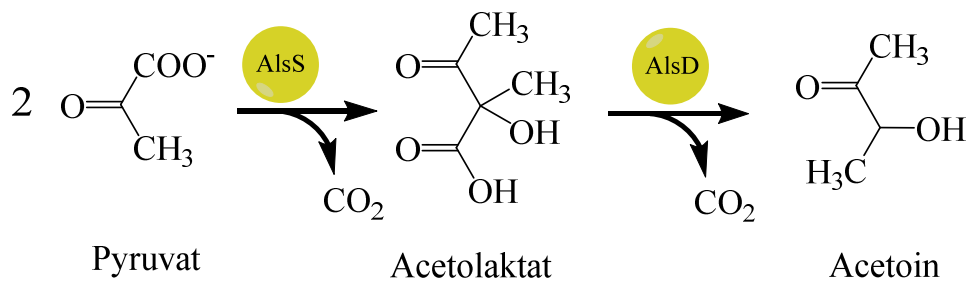
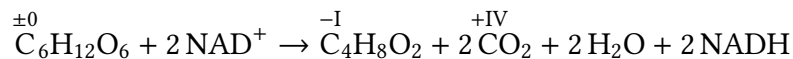


Abbildung 1.3.: Heterologer Stoffwechsel zur Umsetzung von Pyruvat zu Acetoin in *E. coli*.
 AlsS - Acetolaktat-Synthase, AlsD - Acetolaktat-Decarboxylase.

1.3.4. Vorarbeiten im Zentralstoffwechsel

Die Bildung von Acetoin aus Zuckern geht immer mit einem Netto-Überschuss an respiratorischen Elektronen einher, da die mittlere Oxidationsstufe der Fermentationsprodukte höher ist als die des Substrats. Ausgehend von Glucose werden bei stöchiometrischer Umsetzung $4 e^-$ auf NAD^+ übertragen.



Konsequenterweise ist die Bildung von Acetoin als einziges Endprodukt ohne einen Elektronenakzeptor nicht möglich. Die Fermentation mit Sauerstoff ist jedoch aus den bereits in Abschnitt 1.2.3 ausgeführten Gründen unvorteilhaft. Um eine effiziente Fermentation von Acetoin unter anoxischen Bedingungen zu ermöglichen, wurde in Vorarbeiten ein synthetischer Stoffwechsel für die Bildung von Acetoin entwickelt. Die Modifikationen im Zentralstoffwechsel von *E. coli* unterdrücken die Bildung von Nebenprodukten des anaeroben Stoffwechsels. Gleichzeitig wird so die Regeneration von Cofaktoren abhängig von der Anwesenheit eines Elektronenakzeptors (Förster, Beblawy u. a. 2017).

Dies wurde durch die Deletion der Loki für die Fumarat-Dehydrogenase (*frd*), Laktat-Dehydrogenase (*ldh*), Alkohol-Dehydrogenase (*adh*), Phosphotransacetylase (*pta*) und Acetatkinase (*ack*) erreicht. Der hieraus entstandene Stamm war vollständig gärdefizient und akkumulierte unter NO_3^- -atmenden Bedingungen Pyruvat als Endprodukt mit einer Ausbeute von 65 % des theoretischen Maximums. Durch die zusätzliche heterologe Expression der Acetolactat-Synthase *alsS* und der Acetolactat-Decarboxylase *alsD* unter einem *tac*-Promotor konnte ein Umsetzung von Glucose zu Acetoin mit einer Ausbeute von 90 % erreicht werden. Der Reaktionen ausgehend von Pyruvat sind in Abbildung 1.3 gezeigt.

Im anaeroben Stoffwechsel wurden im Zuge der Mutagenese erhebliche Einbußen in der Stoffwechselrate beobachtet (Abbildung 1.4). Mit NO_3^- und DMSO als Elektronenakzeptor verringert sich die Wachstumsrate des Stamms um 89 % beziehungsweise 95 % im Vergleich zum Ausgangsstamm. In der anoxischen Fermentation mit NO_3^- konnten zwar anabole Konkurrenzreaktionen vermieden werden, allerdings ist NO_3^- , wie jeder andere abbaubare Elektronenakzeptor, aus biotechnologischer Perspektive unvorteilhaft. Zum einen stellt die Bereitstellung stöchiometrischer Mengen einen erheblichen Kostenpunkt dar und zum anderen kann sich wie im Fall von NO_3^- die Standzeit des Fermenters durch Akku-

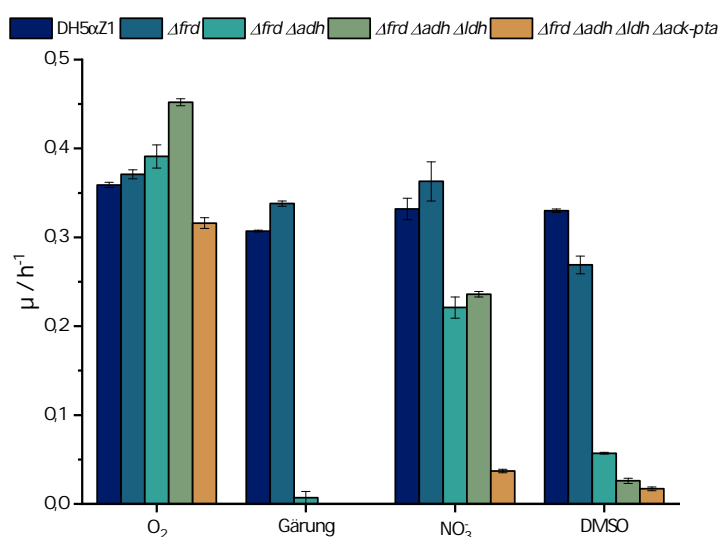


Abbildung 1.4.: Wachstumsraten der *knock-out* Stämme mit den Elektronenakzeptoren O₂, NO₃⁻ und DMSO, sowie ohne Elektronenakzeptor. nach Förster, Beblawy u. a. (2017)

mulation von toxischen Produkten wie NO₂⁻ verringern (Klebanoff 1993). Zur Auflösung dieser Problematik wird daher ein unerschöpflicher, nicht abbaubarer Elektronenakzeptor benötigt. Dieser findet sich in Form einer Anode eines bioelektrochemischen Systems und kann in einer sogenannten Elektrofermentation zum Ausgleich der Elektronenbilanz eines Stoffwechsels dienen. Die Grundlagen der mikrobiellen Elektrochemie und deren Anwendungen werden im folgenden Abschnitt genauer betrachtet.

1.4. Mikrobielle Elektrochemie

1.4.1. Grundlagen und Relevanz

Die Beobachtung einer, von Bakterien- oder Hefezellsuspensionen ausgehenden, elektrischen Spannung in einem galvanischen Element wurde bereits 1911 vermerkt (Potter 1911). Allerdings wurde diesem Phänomen, zu dieser Zeit, weit weniger große Bedeutung zugemessen als heute. Erst mit der formalchemischen Beschreibung von zellulären Prozessen als Redoxreaktionen (Thauer u. a. 1977) und der Isolation von Organismen mit extrazellulärer Atmungskette (Myers u. a. 1988; Lovley u. a. 1988) konnte eine Einordnung der ökologischen und sozioökonomischen Relevanz erfolgen. Zellstoffwechsel beruht auf der Oxidation energiereicher (ausgenommen Phototrophie) Verbindungen und der Konservierung dabei freiwerdender Energie. Elektronen werden dabei von einem niedrigen elektrochemischen Potential (Elektronendonator) auf ein hohes Potential überführt. Die Substanz mit dem höchsten elektrochemischen Potential im zellulären Stoffwechsel wird als terminaler Elektronenakzeptor bezeichnet (Thauer u. a. 1977). Die in Abschnitt 1.3.1 genannten Beispiele für Elektronenakzeptoren werden alle intrazellulär reduziert

und anschließend wieder aus der Zelle heraus transportiert. Organismen, welche in der Lage sind Elektronenakzeptoren außerhalb der Zelle zu reduzieren, bezeichnet man als exoelektrogen (Logan 2009). Evolutionär wurde hierdurch eine ökologische Nische erschlossen, welche die Nutzung von global abundanten, jedoch unlöslichen Mineralien als Elektronenakzeptor erlaubt. Mit dem Redoxpaar $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ steht damit das vierthäufigste Element¹ in der Erdkruste zur respiratorischen Nutzung zur Verfügung. In Nischen ohne oder mit wechselnder Verfügbarkeit von O_2 ermöglicht dies Zellstoffwechsel mit einem breiteren Spektrum von Substraten im Vergleich zum Gärstoffwechsel (Fredrickson u. a. 2008).

Modellorganismus *Shewanella oneidensis*

Der in diesem Kontext am besten erforschte Modellorganismus ist *S. oneidensis*. Das gram⁻ γ -Proteobakterium wurde 1988 aus dem Oneida-See in New York, USA in einer Anreicherung mit Manganoxid als Elektronenakzeptor isoliert (Myers u. a. 1988). Herausragend für das Genus *Shewanella* und für *S. oneidensis* im Speziellen ist dabei die Fähigkeit zur Nutzung einer Vielzahl von anoxischen Elektronenakzeptoren (Venkateswaran u. a. 1999). Im Falle von *S. oneidensis* gehören dazu eine Vielzahl unlöslicher Verbindungen wie Eisen-, oder Manganmineralien (Richter u. a. 2012; Beblawy u. a. 2018). Die Erschließung dieser Substrate erfolgt durch den Unterhalt eines Netzwerks aus bis zu 42 *c*-Typ Cytochromen, welche respiratorische Elektronen aus dem Chinonpool in der Cytoplasmamembran durch das Periplasma über die äußere Membran transportieren (Heidelberg u. a. 2002; Meyer u. a. 2004). Dabei haben nicht nur die löslichen Cytochrome im Periplasma, sondern auch die membrangebundenen terminalen Reduktasen zum Teil redundante Eigenschaften (Sturm u. a. 2015). Ebenfalls bemerkenswert ist, dass der letzte Reduktionsschritt relativ unspezifisch gegenüber dem jeweiligen Akzeptor erfolgt. So dient beispielsweise das Decahäm-Cytochrom MtrC nicht nur zur Reduktion von Eisen- oder Manganoxiden, sondern auch $\text{Cr}^{\text{VI}+}$ - oder $\text{U}^{\text{VI}+}$ -Komplexen (Beblawy u. a. 2018). In den beiden letztere Fällen ist eine extrazelluläre Reduktion vor allem deshalb nützlich, da die entstehenden Oxidationsstufen unter physiologischen Bedingungen unlöslich sind und intrazellulär präzipitieren würden (Belchik u. a. 2011). Neben anorganischen Verbindungen gehören aber auch Flavine, oder Huminstoffe wie Anthraquinondisulfonat zu den Interaktionspartnern von MtrC (Beblawy u. a. 2018).

Abbildung 1.5 zeigt das respiratorische Proteinset für die Reduktion extrazellulärer Elektronenakzeptoren (Beblawy u. a. 2018). Analog zu *E. coli* werden cytoplasmatisch anfallende Elektronen über membrangebundene Dehydrogenasen in den Chinonpool eingespeist (Pinchuk u. a. 2009; Duhl u. a. 2018). Unter anoxischen Bedingungen wird dieser durch Menachinon-7 dominiert, welches als Interaktionspartner, wie auch als Cofaktor für CymA (**C**ytoplasmamembran **P**rotein **A**) dient (McMillan u. a. 2012). Das in der Cytoplasmamembran lokalisierte Tetrahäm-Cytochrom dient dabei als zentraler Verteiler von Elektronen an periplasmatische Cytochrome. Bei extrazellulären Elektronenakzeptoren werden Elektronen von CymA hauptsächlich von FccA (Flavocytochrom **c**) und STC (*small tetraheme cytochrome*) auf den, in der äußeren Membran lokalisierten, MtrABC-

¹Wiberg u. a. 2007.

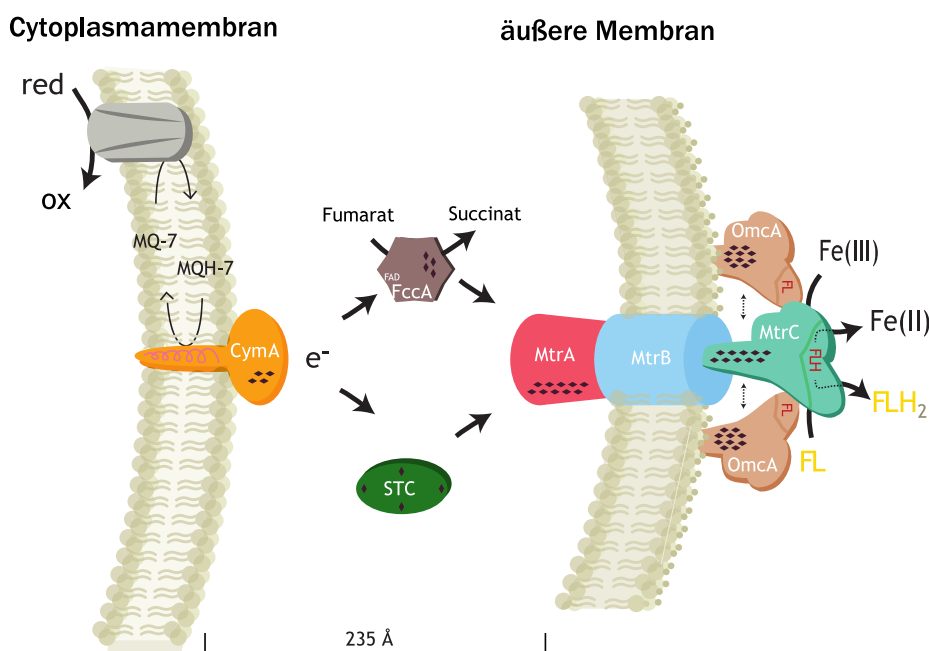


Abbildung 1.5.: Extrazellulärer Elektronentransport in *Shewanella oneidensis*. Erläuterung im Text.

Komplex (Metall reduzierendes Protein) übertragen (Sturm u. a. 2015; Schuetz u. a. 2009; Ding u. a. 2014; Schicklberger u. a. 2013). Periplasmaseitiges MtrA und externes MtrC interagieren dabei über das β -Fassprotein MtrB. MtrB selbst ist nicht leitfähig, sondern ermöglicht als Strukturprotein den e⁻-Austausch zwischen MtrA und MtrC (Edwards, M. J. u. a. 2018). Auf der äußeren Membran bilden MtrC und akzessorisches OmcA einen Proteinkomplex im Verhältnis 1:2 (Shi u. a. 2006; Babanova u. a. 2017; Neto u. a. 2017), welcher mit Flavinsemichinon als Cofaktor die terminale Reduktase für viele lösliche und unlösliche extrazelluläre Substrate darstellt.

Dieses promiskuitive Verhalten der membrangebundenen Reduktasen gegenüber verschiedenen Elektronenakzeptoren, erstreckt sich auch über natürliche Oberflächen hinaus. So ist *S. oneidensis* in der Lage auch verschiedene Elektrodenoberflächen, wie Graphit, Glaskohlenstoff, Platin oder Edelstahl zu reduzieren (Beblawy u. a. 2018). Entscheidend hierfür, scheint weniger die chemischen Zusammensetzung des Materials, als mehr das Redoxpotential der Oberfläche zu sein (TerAvest und Angenent 2014).

Die Interaktion zwischen Elektrodengrenzflächen und Mikroorganismen beziehungsweise redoxaktiver Proteine und anderer Biomoleküle bildet die Grundlage für alle bioelektrochemischen Anwendungen. Im folgenden soll eine Übersicht über diese gegeben werden.

1.4.2. Bioelektrochemische Systeme und deren Anwendung

Unter bioelektrochemischen Systemen werden alle Aufbauten verstanden, deren Zweck es ist elektrochemische Prozesse zwischen Elektronenleitern und Biomolekülen zu er-

möglichen (Schröder u. a. 2015). Dies schließt isolierte Proteine oder DNA genauso ein wie ganze mikrobielle Zellen. In erste Kategorie fallen viele pharmazeutische Sensoren, wie beispielsweise Blutzuckermessgeräte, welche ein elektrisches Signal proportional zur Aktivität von immobilisierter Glucose-Oxidase geben (Clarke u. a. 2012). Mikrobielle elektrochemische Systeme (MES) können einerseits zur Untersuchung biologischer oder biochemischer Prozesse eingesetzt werden (Golitsch u. a. 2013; West u. a. 2017) oder andererseits um Stoffumsatz zu katalysieren beziehungsweise zu erleichtern (Wang, H. u. a. 2013).

Mikroben-Elektroden-Interaktion

Im Zentrum aller MES steht ungeachtet der anvisierten Verwendung die Interaktion zwischen Mikroben und Elektroden. Hier lassen sich prinzipiell drei Mechanismen unterscheiden.

Direkter Elektronentransfer Mikroorganismus und Elektrode stehen in direktem Kontakt zueinander. Über redoxaktive Proteine die Teil der Atmungskette sind, werden Elektronen übertragen. Die Zellen können dabei in Form eines Biofilms auf der Elektrode immobilisiert sein oder sich als planktonische Zellen, im Sinne eines Kondensators, durch ihren Stoffwechsel aufladen und bei Elektrodenkontakt elektrisch entladen (Yang, Y. u. a. 2012).

Zellanhangsorgane Bestimmte Organismen sind in der Lage leitfähige Proteine / Pili auszubilden, über welche ein indirekter Kontakt zur Elektrode hergestellt werden kann (Reguera u. a. 2005). Darüber hinaus wurden Ausstülpungen der äußeren Membran beobachtet, welche zwar respiratorische Proteine tragen, jedoch auch in nicht-exoelektrogenen Organismen vorkommen und daher nicht als Spezialisierung auf extrazelluläre Atmung betrachtet werden (Gorby u. a. 2006).

Mediator vermittelt Der Austausch redoxaktiver Moleküle zwischen Elektrode und Mikroorganismus ermöglicht einen indirekten Transfer von Elektronen. Dabei dient die Elektrode zur katalytischen Rückgewinnung des Mediators. Mediatoren können endogen durch den Mikroorganismus produziert werden, wie zum Beispiel Flavine im Fall von *Shewanilla* oder *Lysteria* (Canstein u. a. 2008; Light u. a. 2018). Exogene Mediatoren finden sich entweder in der Umwelt, wie zum Beispiel Huminstoffe oder werden in Form synthetischer Moleküle zugegeben (Roller u. a. 1984). Da einige Mediatoren die Zellmembran passieren können, können so auch nicht exoelektrogene Organismen in bioelektrochemischen Systemen eingesetzt werden.

Reaktorsysteme für mikrobielle elektrochemische Systeme (MES)

Alle Reaktorsysteme für MES bestehen mindestens aus einer Arbeitselektrode und einer Gegenelektrode in einem Elektrolyt, welcher gleichzeitig Kulturmedium für die Mikroorganismen ist (2-Elektrodensystem). Eine dritte Elektrode als fixer Bezugspunkt für das System, die Referenzelektrode, kommt immer dann zum Einsatz, wenn die elektrochemischen Bedingungen extern, mit Hilfe eines Potentiostaten (vgl. Abschnitt 2.4) kontrolliert werden sollen (3-Elektrodensystem). Ein Separator zwischen Arbeitselektrode und Gegenelektrode kommt immer dann zum Einsatz, wenn Kreuzreaktionen zwischen Anode und Kathode zu

erwarten sind. In den meisten Fällen handelt es sich dabei um Ionentauschermembranen, poröses Glas oder Keramik (Wang, H. u. a. 2013).

Die technische Umsetzung von MES hängt stark von deren anvisierter Verwendung ab. Die Ausführungen reichen von simplen H-Zellen aus Glas für die Untersuchung von Oberflächenprozessen (Liu u. a. 2008) bis hin zu Pilotanlagen in der Abwasserreinigung (Logan 2010). Da die Produkte von MES, wie zum Beispiel elektrischer Strom, Wasserstoff, Methan oder Basischemikalien in der Regel einen geringen Marktwert pro Kilogramm haben, ist daher die Ausbeute und Rate der Produktbildung entscheidend für deren Verwendung. Krieg u. a. (2014) haben aus dieser Prämisse Anforderungen für Reaktorsysteme unabhängig von deren Anwendung formuliert:

- angemessenes Verhältnis von Elektrodenoberfläche zu Volumen
- biokompatible Oberflächen
- skalierbarer Aufbau
- haltbare Bauteile mit geringen Kosten
- Verzicht auf Verbrauchsmaterialien

Im folgenden soll eine kurze Übersicht über verschiedene Anwendungen gegeben werden.

Mikrobielle Brennstoffzellen sind Systeme welche zur Bereitstellung elektrischer Energie konzipiert sind. Der Energieträger des Elektrolyt besteht in der Regel aus einem Abfallstoff, wie kommunalen und industrielle Abwässer. Folglich ist die im Prozess erfolgende Decarbonisierung nutzbar in der Abwasserbehandlung. Der mikrobielle Katalysator besteht aus einer offenen Kultur und wird in der Regel mit dem Elektrolyt zugeführt. Bei der stofflichen Umsetzung durch die Mikroorganismen werden Elektronen und Energie auf die Anode übertragen. Die Elektrodeninteraktion erfolgt planktonisch oder sessil und ohne Zugabe eines exogenen Mediators. Unter allen Anwendungen für MES sind mikrobielle Brennstoffzellen am weitesten entwickelt mit mehreren Aufbauten im Kubikmeter-Maßstab in Pilotphasen (Rabaey u. a. 2010; Santoro u. a. 2017). Ein anderes Konzept verfolgen Brennstoffzellen welche direkt in Sediment oder Erde eingebracht werden und dort zur Bioremediation oder zur Energiegewinnung dienen (Tender u. a. 2008; Gong u. a. 2011; Kronenberg u. a. 2017)

Mikrobielle Entsalzungszellen bestehen aus drei Kammern, die durch Ionenaustausch-Membranen von einander getrennt sind. Die mittlere Kammer ist, analog zu einer klassischen Salzbrücke, mit salzreichem Elektrolyt gefüllt. Auf Anodenseite wird bioelektrochemisch ein Überschuss positiver Ladung, auf der Kathodenseite ein Überschuss negativer Ladung erzeugt. Durch die Auswahl geeigneter Separatormembranen migrieren Anionen zur Anode und Kationen zur Kathode. In Folge reichern sich diese Ionen in der mittleren Kammer ab (Cao u. a. 2009; Iskander u. a. 2018; Sophia u. a. 2016).

Mikrobielle Elektrolysezellen ermöglichen die abiotische Synthese eines Energieträgers wie H_2 oder CH_4 im Kathodenkompartiment. Dabei laufen bioelektrochemische Prozesse analog zur mikrobiellen Brennstoffzelle auf der Anodenseite ab, wodurch die Elektronen und ein Teil der Energie für die Kathodenreaktion bereitgestellt werden kann. Gegenüber der direkten Freisetzung von elektrischer Energie kann

so ein speicherfähiger Energieträger mit hoher Energiedichte aus Abfallstoffen gewonnen werden (Lu u. a. 2016).

Mikrobielle Elektrosynthese oder Elektrofermentation bezeichnet Prozesse in der die stoffliche Umsetzung in einem MES nicht nur der Bereitstellung von Energie und der Abreicherung von Abfallstoffen dient, sondern dem Aufbau von Wertstoffen, wie Basischemikalien oder Biokunststoffen. Zur Synthese kann eine bioelektrochemische Umsetzung sowohl reduktiv an der Kathode, als auch oxidativ an der Anode erfolgen. Die Elektrode dient in beiden Fällen dazu, die Redoxbilanz des Stoffwechsels auszugleichen (Kracke u. a. 2018). Es konnte gezeigt werden, dass die bekannten Redoxproteine auch zur Aufnahme von Elektronen in der Lage sind (Ross u. a. 2011). Dies eröffnet ein wesentlich breiteres Produktspektrum, als dies in konventionellen Fermentationen ohne zusätzlichen Elektronendonator oder -akzeptor möglich wäre. Durch kathodische Elektrofermentation kann so CO_2 als Substrat in der Bioelektrochemie erschlossen werden (Kracke u. a. 2018; Schievano u. a. 2016). Das in dieser Arbeit angewandte Konzept einer anodischen Elektrofermentationen wird im folgenden im Detail erläutert.

1.4.3. Anodischen Elektrofermentation

Die anodische Elektrofermentation stellt die Synthese aus den in vorangegangenen Abschnitten, eingeführten Konzepten zu Biotechnologie, Metabolismus und mikrobieller Elektrochemie dar. Sie soll an dieser Stelle in Gegenüberstellung zur konventionellen Fermentation betrachtet werden. Bei einer konventionellen anoxygenen Fermentation gewinnt ein Organismus Energie durch die Oxidation des Substrats zu einem oxidierten Intermediat (Substratstufenphosphorylierung). In diesem Prozess werden Redoxäquivalente wie NAD^+ reduziert. Um den Metabolismus dauerhaft aufrecht erhalten zu können, ist es notwendig diese Redoxäquivalente zu regenerieren. Dies geschieht in Abwesenheit eines externen Elektronenakzeptors durch Bildung der Fermentationsendprodukte. Hierbei wird das Intermediat durch die Redoxäquivalente reduziert und meist auch derivatisiert (vgl. Abschnitt 1.3.1). Alle mit dem Substrat aufgenommenen Elektronen werden dabei wieder auf die Endprodukte übertragen. Es ist daher inhärent, dass bei einer konventionellen Gärung die mittlere Oxidationsstufe des Substrats der mittleren Oxidationsstufe der Summe der Produkte entspricht. Aus biotechnologischer Sicht schränkt dies die Anwendbarkeit von anoxygenen Fermentationen stark ein, da nur sehr wenige Produkte homofermentativ gebildet werden können und für alle anderen Fälle Produktgemische in Kauf genommen werden müssen. Der Einsatz von Elektronenakzeptoren erhöht die Kosten für die Produktion und erhöht im Falle von O_2 das Verhältnis von Anabolismus zu Katabolismus (vgl. Abschnitt 1.2.3). In einer anodischen Elektrofermentation übernimmt die Anode die Funktion eines nicht-abbaubaren Elektronenakzeptors. Durch Modifikationen im Stoffwechsel wird die Fokussierung auf ein gewünschtes (natives oder heterologes) Zielprodukt erreicht. Üblicherweise geschieht dies durch die genetische Deletion konkurrierender Stoffwechselwege (vgl. Abschnitt 1.3.2). Als Konsequenz können Redoxäquivalente nicht mehr ohne Elektronenakzeptor regeneriert werden. Der Stoffwechsel kann hierdurch nur noch in Interaktion mit der Elektrode ablaufen. Biotechnologisch werden mehrere Vorteile erreicht: In dieser Konfiguration ist es möglich in einem strikt anoxygenen Prozess ein

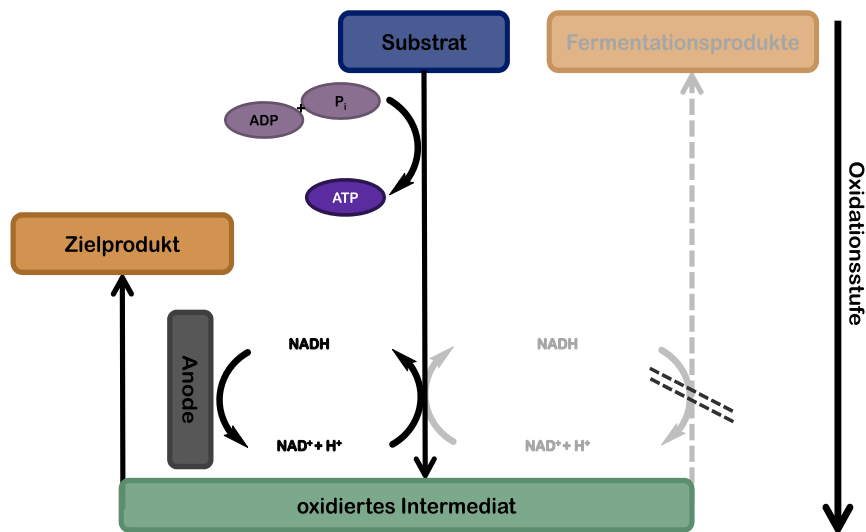


Abbildung 1.6.: Schematischer Verlauf einer Elektrofermentation. Erläuterung im Text.

einzelnes Endprodukt zu erzeugen, dessen Oxidationsstufe höher sein kann als die des Substrats ohne auf die Zugabe eines löslichen Elektronenakzeptors angewiesen zu sein. Darüber hinaus fällt als Nebenprodukt in diesem Prozess universell einsetzbare elektrische Energie an. Zuletzt erlaubt der synthetische Metabolismus eine Kombination von Substrat und Produkt nach Wahl (vgl. Abschnitt 1.1). Abbildung 1.6 fasst die Vorgänge schematisch zusammen.

Dieses Konzept wurde erstmals von Flynn u. a. (2010) realisiert. In diesem Ansatz konnte *S. oneidensis* durch Expression eines Glycerinmoduls aus *E. coli* und eines Alkoholmoduls aus *Zymomonas mobilis* dahingehend modifiziert werden, Glycerin zu Ethanol mit einer Ausbeute von 84 % umzusetzen. Um die Bildung von Acetat zu verhindern, wurde zudem *pta* deletiert. Bei dieser Umsetzung entsteht ein Nettoüberschuss von zwei Elektronen je Molekül Glycerin, welcher durch die membrangebundene Glycerin-Dehydrogenase auf den Chinonpool übertragen wird. Mit Hilfe der, auf Seite 14, beschriebenen Elektronentransportkette kann die Redoxbilanz des Stoffwechsels so über eine Elektrode ausgeglichen werden. Bursac u. a. (2017) konnten Acetoin erstmals in einer Elektrofermentation mit *S. oneidensis* erzeugen. Hierzu wurde der in Tabelle 1.2 angegebene Stamm bei einem Elektrodenpotential von $\pm 0V$ vs. Standard-Wasserstoff-Elektrode kultiviert. Es konnte eine Ausbeute von 78 % erreicht werden.

1.4.4. Elektrofermentation in *E. coli*

Escherichia coli ist nativ nicht exoelektrogen und zudem bei Anwesenheit von Glucose zur Gärung befähigt. Um dennoch die Interaktion mit einer Elektrode zu ermöglichen, wurden Systeme entwickelt, welche auf der Expression von Teilen der Elektronentransportkette

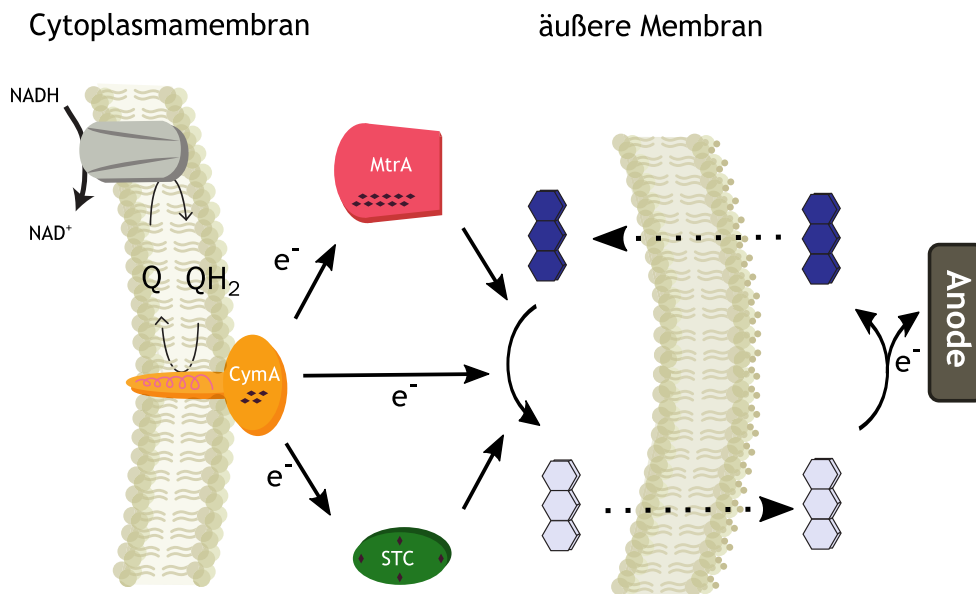


Abbildung 1.7.: Methylenblau abhängiger Elektronentransport im *Escherichia coli*-Stamm von Sturm-Richter u. a. (2015). Schematische Übersicht mit Erläuterungen im Text.

von *S. oneidensis* basieren. Als minimales Proteinset wurde hierzu *cymA-mtrCAB* gewählt (Jensen, Albers u. a. 2010; Goldbeck u. a. 2013). Die Expression von *cymA-mtrCAB* in *E. coli* BL21 führte in einem Ansatz mit Laktat als Kohlenstoffquelle und Elektronendonator zu einer Stromdichte von rund $0,2 \text{ mA m}^{-2}$ über 6 Tage und einem signifikanten Anstieg gegenüber dem Kontrollstamm ohne Cytochrome aus *S. oneidensis*. Ferner konnte eine Verschiebung des Produktspektrums hin zu oxidierten Produkten beobachtet werden (TerAvest, Zajdel u. a. 2014). Die Rate des Elektronentransports konnte zudem durch die Zugabe von Riboflavin moduliert werden (Jensen, TerAvest u. a. 2016). Durch die zusätzliche Expression von Fim-Pili sollte eine verstärkte Anheftung von *E. coli* an der Elektrodenoberfläche erreicht und damit der Elektronentransport zwischen Elektrode und Zelloberfläche erleichtert werden. Im betreffenden Experiment wurde jedoch eine rund 60 % geringere Stromdichte im Vergleich zum Vorgängerstamm erreicht (Lienemann u. a. 2018).

Sturm-Richter u. a. (2015) konnten ein System für den extrazellulären Elektronentransport in *E. coli* etablieren, welches ebenfalls auf dem Einsatz von *c*-Typ Cytochromen aus *S. oneidensis* basiert. Aufbauend auf Arbeiten von Gescher u. a. (2008), in welchen *E. coli* eigenes NapC durch orthologes CymA aus *S. oneidensis* ersetzt wurde, konnten mit Hilfe der periplasmatischen Cytochrome STC und MtrA Elektronen bis ins periplasmatische Lumen gebracht werden. Der Transport über die äußere Membran erfolgte durch Zugabe von Methylenblau, welches als exogener Mediator fungiert und passiv in die Zelle aufgenommen wird. Dort wird Methylenblau reduziert (Abbildung 1.8) und verlässt passiv oder aktiv die Zelle (Burse u. a. 2004; Kuroda u. a. 2009; Nishino u. a. 2009). Im Kulturüberstand kann Methylenblau an der Elektrodenoberfläche oxidiert werden (Sugnaux u. a. 2013).

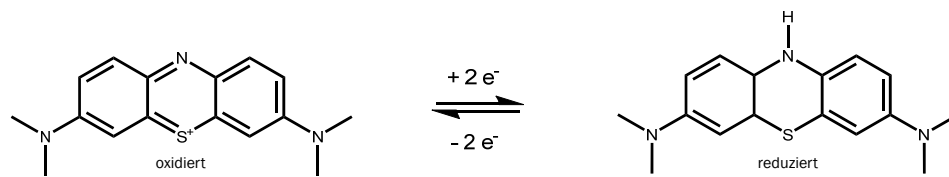


Abbildung 1.8.: Oxidation und Reduktion von Methylenblau.

Pro Redoxzyklus werden dabei zwei Elektronen transportiert. Abbildung 1.7 zeigt den Elektronentransport in der Übersicht. Die Anwendung dieses Systems erlaubte die beschleunigte Fermentation von Glycerin bei einem, zu oxidierten Produkten verschobenen, Fermentationsgemisch (Sturm-Richter u. a. 2015).

1.5. Zielsetzung

Knapper werdende fossile Ressourcen erfordern in zunehmendem Maße, die Umstellung chemischer Industriezweige hin zur Verwendung von nachhaltigen Ausgangsstoffen. Der biotechnologischen Produktion von Basischemikalien kommt hierbei eine wichtige Rolle zu. Ausgehend von einem gäreffizienten *E. coli*-Produktionsstamm für die Umsetzung von Glucose zu Acetoin, sollte unter Anwendung einer Methylenblau gestützten Elektronentransportkette die anoxische Produktion von Acetoin in einer Elektrofermentation etabliert werden. Die Umsetzung sollte in drei Schritten erfolgen. Zunächst sollte in einem Konzeptexperiment die prinzipielle Umsetzbarkeit der Elektrofermentation von Acetoin in *E. coli* gezeigt werden. Darauf aufbauend wurde eine, dem Prozess angepasste, Fermentationsplattform entwickelt, welche die Charakterisierung der Elektrofermentation erlaubt. Im zweiten Schritt wurde der Einfluss zentraler abiotischer Parameter auf den Fermentationsstamm und den Prozess untersucht. Ziel war es ein Optimum für die Fermentationsbedingungen zu finden, so dass als limitierender Faktor der Metabolismus des Produktionsstamms bleibt. Dies geschah unter Berücksichtigung von elektrochemischen und physiologischen Gesichtspunkten. Die Untersuchung der Physiologie des Produktionsstamms stellt den dritten Schritt in der Etablierung der Elektrofermentation von Acetoin dar. Die Modifikationen im Gärstoffwechsel und die Expression einer großen Zahl heterologer Proteine, führten zu starken Einschränkungen im anoxischen Stoffwechsel. Unter Anwendung einer Kombination von *ad-hoc* und rationalen Untersuchungen, sollte mit physiologischen, molekularbiologischen und genetischen Methoden der Stoffwechsel und seine Regulation erfasst und modellhaft beschrieben werden. Die sollte die Identifikation und Aufhebung von metabolischen Limitierungen erlauben.

2. Material und Methoden

2.1. Zellkultivierung

2.1.1. Verwendete Stämme

In Tabelle 2.1 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Stämme aufgelistet.

Tabelle 2.1.: Liste in dieser Arbeit verwendeter Stämme.

Stamm- Nummer	Stamm	relevanter Genotyp	Referenz
JG22	<i>E. coli</i> DH5 α Z1	<i>aci^q</i> , <i>PN25-tetR</i> , <i>Sp^R</i> , <i>deoR</i> , <i>supE44</i> , Δ (<i>lacZYA</i> <i>argFV169</i>), <i>Phi80</i> <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i>	Lutz u. a. (1997)
JG109	<i>E. coli</i> K-12	<i>F-λ-ilvG rfb-50 rph-1</i>	DSMZ (#498)
JG878	JG22	Δ (<i>napC-F</i>), Δ <i>frdA-D::</i> (P _{Tet} <i>cymA</i> , <i>mtrA</i> , <i>mtrB</i>), <i>idh::</i> P _{Ara} <i>stc</i> , Δ <i>galK</i> , Δ <i>adhE</i> , Δ <i>ldhA::cscRAKB</i> , Δ <i>pta-ackA::galK</i>	Förster, Beblawy u. a. (2017)
JG991	JG878	pMAL <i>alsSD</i> , pEC86	Diese Arbeit
JG997	JG878	pMAL <i>alsSD</i>	Diese Arbeit
JG1054	JG22	pMAL <i>alsSD</i>	Diese Arbeit
JG1220	JG991	<i>narG⁺</i>	Diese Arbeit
JG1225	<i>E. coli</i> BSL-1	Δ <i>ackA::kanR</i>	Baba u. a. (2006)(#9843)

Tabelle 2.1.: Liste in dieser Arbeit verwendeter Stämme.

Stamm- Nummer	Stamm	relevanter Genotyp	Referenz
JG1226	<i>E. coli</i> BSL-1	Δ <i>pta::kanR</i>	Baba u. a. (2006) (#9844)
JG1295	JG991	<i>aceF*</i> , <i>pfl</i> ⁻	Diese Arbeit
JG1316	JG878	pTrc <i>hcp</i>	Diese Arbeit
JG1324	JG878	pTrc B	Diese Arbeit
JG1325	JG22	Δ (<i>napC-F</i>), Δ <i>frdA-D::</i> (P _{Tet} <i>cymA</i> , <i>mtrA</i> , <i>mtrB</i>), <i>idh::</i> P _{Ara} <i>stc</i> , Δ <i>galK</i> , Δ <i>adhE</i> , Δ <i>ldhA::cscRAKB</i> , Δ <i>ackA</i>	Diese Arbeit
JG1350	JG1325	<i>aceF*</i> , <i>pfl</i> ⁻ pMAL <i>alsSD</i> pEC86	Diese Arbeit
JG1353	JG1325	pMAL <i>alsSD</i> pEC86	Diese Arbeit
JG1354	JG1325	pMAL <i>alsSD</i>	Diese Arbeit

2.1.2. Verwendete Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden sofern nicht anders angegeben von AppliChem (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Merk (Darmstadt), Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) oder VWR (Radnor, PA, USA) beschafft.

2.1.3. Allgemeine Handhabung und verwendete Medien

Die Überwachung des Wachstums der Bakterien erfolgte photometrisch durch Bestimmung der optischen Dichte der Zellsuspension. Für Ansätze ohne Methylenblau erfolgte die Messung bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600$ nm. Mit Methylenblau wurde bei $\lambda = 750$ nm

Tabelle 2.2.: Zusammensetzung verwendeter Komplex-Medien. Einwaage pro Liter.

Substanz	LB	LB-Agar	SOB
Trypton	10 g	10 g	20 g
Hefeextrakt	5 g	5 g	5 g
NaCl	5 g	5 g	0,58 g
KCl	-	-	0,19 g
Agar	-	2 %	-

Tabelle 2.3.: Zusammensetzung verwendeter Puffer-Lösungen. Einwaage pro Liter.

Substanz	Konzentration	10x-PBS-Puffer	10x-MOPS-Puffer
NaCl	137 mmol l ⁻¹	80 g	80 g
KCl	2,7 mmol l ⁻¹	2 g	2 g
Na ₂ HPO ₄	10 mmol l ⁻¹	14,4 g	-
KH ₂ PO ₄	1,76 mmol l ⁻¹	2,4 g	-
MOPS	15 mmol l ⁻¹	-	31,4 g

oder bei $\lambda = 850 \text{ nm}$ gemessen. Zu diesem Zweck wurden vier Spektro- oder Photometer verwendet: SPECTRONIC Genesys 20 Photospektrometer (Thermo Fisher Scientific), infinite 200Pro (Tecan, Männedorf, Schweiz), Varian Cary 50 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) und Ultrospec 10 Cell Density Meter (BioChrom, Holliston, MA, USA). Zur Herstellung von komplexen Medien (Tabelle 2.2) wie LB oder SOB wurde VE-Wasser (dH₂O) verwendet. Für Minimalmedien (Tabelle 2.4), wie PBS-Medium wurde Reinstwasser (ddH₂O) verwendet. Die Aufbereitung erfolgte in einer TKA MicroPure Anlage Typ ASTM I (Thermo Fisher Scientific). Sämtliche Kulturmedien und -gefäße wurden vor der Verwendung durch Autoklavieren bei 121 °C für 21 min sterilisiert (Autoklav VE-150, Systec, Münster). Thermolabile Substanzen (Tabelle 2.6) wurden durch Filtration über Celluloseacetat- oder PTFE-Membranen mit einer Porengröße von 0,2 μm sterilisiert und nach Bedarf dem sterilisierten Medium zugesetzt.

Die Kultivierung von Zellen erfolgte ausgehend von Gefrierkulturen (Abschnitt 2.1.4), welche zur Verwendung auf LB-Agar-Platten (Tabelle 2.2) ausgestrichen und bei 37 °C inkubiert wurden. Kulturen in flüssig Medien wurden dann mit Einzelkolonien von diesen Platten inokuliert und bei 37 °C inkubiert.

Zur Erhaltung von Plasmiden oder zur Selektion auf chromosomale Marker wurden die Kulturmedien mit Antibiotika versetzt. Die Konzentrationen in Stock-Lösung und Kulturmedien sind in Tabelle (2.6) angegeben.

2. Material und Methoden

Tabelle 2.4.: Zusammensetzung verwendeter Minimal-Medien. Einwaage pro Liter.

Substanz	Konzentration	PBS-Medium	MOPS-Medium
10x PBS-Puffer ¹		100 ml	-
10x MOPS-Puffer ¹		-	100 ml
(NH ₄) ₂ SO ₄	9 mmol l ⁻¹	1,18 g	1,18 g
MgSO ₄ -Lösung (1 mol l ⁻¹)	1 mmol l ⁻¹	1 ml	1 ml
CaCl ₂ -Lösung (0,1 mol l ⁻¹)	1 mmol l ⁻¹	1 ml	1 ml
Spurenelement-Lösung ²		10 ml	10 ml
Casein Hydrolysat		1 g	-
Hefeextrakt		-	1 g

¹ Tabelle 2.3

² Tabelle 2.5

Tabelle 2.5.: Zusammensetzung der verwendeten Spurenelement-Lösung. Einwaage pro Liter.

Substanz	Konzentration	Einwaage
Na ₂ -EDTA * 2 H ₂ O	6,72 mmol l ⁻¹	2501,45 mg
MnSO ₄ * H ₂ O	0,13 mmol l ⁻¹	21,97 mg
NaCl	1,0 mmol l ⁻¹	58,44 mg
FeCl ₂ * 4 H ₂ O	0,54 mmol l ⁻¹	107,36 mg
CoCl ₂ * 6 H ₂ O	0,5 mmol l ⁻¹	118,965 mg
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	0,1 mmol l ⁻¹	28,75 mg
CuSO ₄ * 5 H ₂ O	0,02 mmol l ⁻¹	4,99 mg
H ₃ BO ₄	5,66 mmol l ⁻¹	349,96 mg
Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O	0,39 mmol l ⁻¹	94,36 mg
NiCl ₂ * 6 H ₂ O	0,5 mmol l ⁻¹	118,85 mg
Na ₂ SeO ₄ * 10 H ₂ O	0,15 mmol l ⁻¹	55,36 mg

2.1.4. Cryokonservierung

Die dauerhafte Aufbewahrung von Bakterienstämmen erfolgte durch Cryokonservierung. Hierzu wurde 1 ml einer dicht gewachsenen Flüssigkultur in einem Cryoröhrchen mit 0,5 ml 80 %-Glycerin-Lösung versetzt und unmittelbar in flüssigem N₂ tiefgefroren. Die anschließende Lagerung erfolgte an zwei unabhängigen Orten, bei -80 °C und in flüssigem N₂.

2.1.5. Oxische Kultivierung

Die oxische Kultivierung in präparativen Ansätzen erfolgte in LB-Medium bis zu einem Volumen von 200 ml ausgehend von Einzelkolonien. Zur Expansion der Zellmenge in größeren Volumina, wurden diese aus einer frischen LB-Kultur mit 2 % inokuliert. Oxische Kulturen wurden stets schüttelnd bei 180 rpm und 37 °C inkubiert. Ansätze mit Volumina

Tabelle 2.6.: Liste verwendeter Supplement-Lösungen.

Substanz	C _{Stock}	C _{Medium}
Glucose	2 mol l ⁻¹	10-50 mmol l ⁻¹
Thiamin-Lösung	14,8 mmol l ⁻¹	14,8 µmol l ⁻¹
AHT-Lösung	4,3 mmol l ⁻¹	0,43 µmol l ⁻¹
Methylenblau	31,25 mmol l ⁻¹	50 - 1092 µmol l ⁻¹
IPTG	1 mol l ⁻¹	50 µmol l ⁻¹
Arabinose	2 mol l ⁻¹	1 mmol l ⁻¹
Ampicillin	100 g l ⁻¹	100 mg l ⁻¹
Chloramphenicol	30 g l ⁻¹	30 mg l ⁻¹
Kanamycin	50 g l ⁻¹	10 ¹ / 25 ² mg l ⁻¹

¹ Selektion auf *neo* in *idh*-Lokus für JG878 und Folgende.

² Selektion auf *neo* in *ackA* oder *pta*-Lokus für JG1225 und JG1226

größer als 500 ml wurden in gerührten Fermentern bei dauerhafter Durchströmung mit gefilterter Luft inkubiert. Für Wachstumsversuche oder Zellsuspensionsassays wurden die *E. coli* Kulturen zunächst in LB vorgezogen und vor der Inokulation mit PBS- oder MOPS-Medium ohne Supplementation (Waschpuffer) gewaschen. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation bei $5500 \times g$ für 5 min. Kulturen für Wachstumsversuche wurden zu einer Anfangsdichte von $OD_{600} = 0,05$ in zuvor supplementiertem PBS- oder MOPS-Medium inokuliert.

2.1.6. Anoxische Kultivierung

Anoxische Kulturen wurden stets aus oxischen Flüssigkulturen analog zu Abschnitt 2.1.5 inokuliert. Für Wachstumsexperimente wurde das PBS- oder MOPS-Medium vor der Sterilisation entweder mit 40 mmol l^{-1} KNO_3 oder 40 mmol l^{-1} DMSO versetzt. Zellsuspensionen für die Elektrofermentationen wurden in Medien ohne Elektronenakzeptor angesetzt. Anoxische Kulturen wurden in, mit Septum verschlossenen Flaschen oder Hungate-Röhrchen stehend bei 37°C oder 30°C inkubiert.

2.1.6.1. Selektionsexperimente mit KNO_3 oder DMSO als Elektronenakzeptor

Die **Selektion mit NO_3^-** auf einen beschleunigten anaeroben Metabolismus erfolgte in Hungate-Röhrchen mit 10 ml PBS-Medium. Diese wurden mit jeweils 100 µl Glucose-Lösung (2 mol l^{-1}) und $14,8 \text{ µmol l}^{-1}$ Thiamin-Lösung komplementiert und mit JG878 zu einer initialen $OD_{600} = 0,05$ inokuliert. Die Kulturen wurden anschließend bei 37°C inkubiert und bei deutlich erkennbarer Trübung $OD_{600} \approx 0,3$ in neue Röhrchen überführt. Zu diesem Zweck wurde in allen Ansätzen zu Beginn und zum Ende eines jeden Transfers die Zelldichte bestimmt und nach Gleichung 2.1 die Anzahl der Generationen berechnet. Aus dem Kulturröhrchen mit dem höchsten Wert wurden 3 ml entnommen und je 1 ml zur Inokulation eines neuen Röhrchens verwendet. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für

jeweils 24 bis 48 h.

$$N = N_0 + 2^n \Leftrightarrow n = \frac{\log_2 N - \log_2 N_0}{\log_2 2} \quad (2.1)$$

Die **Selektion mit DMSO** erfolgte analog zur Selektion auf NO₃, allerdings wurde das Kulturmedium mit 40 mmol l⁻¹ DMSO als Elektronenakzeptor und 100 μmol l⁻¹ Methylblau versetzt. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C in einem Anaerobenzelt (Coy Laboratory Products, Michigan, USA).

2.2. Molekularbiologische Methoden

Tabelle 2.7 listet alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide. In Tabelle 2.8 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Primer angegeben. Alle Methoden basieren sofern nicht anders angegeben auf Sambrook u. a. (2012).

Tabelle 2.7.: Liste verwendeter Plasmide.

Plasmid	relevanter Genotyp	Referenz
pMAL <i>alsSD</i>	<i>bla</i> , P _{Tac} <i>alsSD</i>	Förster, Beblawy u. a. (2017)
pEC86	<i>cat</i> , P _{Tet} <i>ccmABCDEFGH</i>	Arslan u. a. (1998)
pTrc B	<i>bla</i> P _{Trc}	Thermo Fisher Scientific
pTrc <i>hcp</i>	<i>bla</i> P _{Trc} <i>hcp</i>	diese Arbeit
pASK43 ⁺ <i>_pta_galK_ack</i>	<i>bla</i> CP6 <i>galK</i> (homologe Bereiche zu <i>ack-pta</i> -Lokus)	Förster, Beblawy u. a. (2017)
pASK43 ⁺ <i>_pta_pta_ack</i>	<i>bla</i> <i>pta</i> (homologe Bereiche zu <i>ack-pta</i> -Lokus)	diese Arbeit
pACBSR	<i>cat</i> , P _{Ara} <i>I-sceI</i> <i>exo beta</i> <i>gam</i>	Herring u. a. (2003)

2.2.0.1. Transformation mittels Elektroporation

Durch Anlegen einer elektrischen Spannung lassen sich in suspendierten Zellen vorübergehende Poren in der Zellmembran erzeugen. Dies wird genutzt um Plasmid-DNA in die Zelle einzuschleusen. Zur Vorbereitung der Elektroporation ist es zwingend notwendig die

Tabelle 2.8.: Liste verwendeter Primer.

#	Sequenz	Verwendung
2091	GGAAGTACCTATAATTGATACG	inverse PCR
2092	TCTCGTCATCATCCGCAGC	pASK <i>pta_galk_ack</i>
2557	TTATTTCCGGTTCAGATATCCGC AGCGCAAAGCTGCGGATGATGA CGAGATTACTGCTGCTGTGCAGAC	<i>pta</i> für Gibson Ligation
2761	CTATGGCTCCCTGACGTTTTTTTT AGCCACGTATCAATTATAGGTAC TTCCCATGGTTTCACACCGCCAGC	
581	ATACCCACTATCAGGTATCC	Testprimer für
582	CCAACGTATCGGGCATTGC	Gibson-Ligation
1377	GGTAAACTTAAGGCGAACAG	
1378	GGTAAACTTAAGGCGAACAG	
2788	TTTCACACCGCCAGCTC	Sequenzierung des
2790	CTTTGACCTGATCGCGAC	<i>pta</i> -Lokus
2791	GATTGAAATCGTTGATCCAG	
2784	AATTAAAGAGGTATATATTAATG TATCGATTAAATAAGGAGGAATA AACCATGTTTTGTGTGCAATGTGAAC	<i>hcp</i> für Gibson-Ligation
2785	GGCTGAAAATCTTCTCATCCG CCAAAACAGCCAAGCTGGAGACC GTTTTTACGCGCTCAACAGTTG	
1537	TGAGCGGATAACAATTCAC	
2786	GCAGAATTTACCCCTAACAAAG	Sequenzierung von
2787	CAACAGATGGCAGGCTTC	pTrc <i>hcp</i>
1902	GCGTTTCACTTCTGAGTTC	

Konzentration von Ionen in der Suspension möglichst weit zu reduzieren. Zu diesem Zweck wurde eine oxische Übernachtskultur in SOB-Medium (Tabelle 2.2) überführt und bis zu einer Zelldichte von $OD_{600} \approx 0,4 - 0,6$ inkubiert. Um den Metabolismus zu Verlangsamen und Stress während der Prozedur zu vermeiden wurde die Kultur vor der Verwendung 30 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden in zwei Ansätzen je 1,5 ml der Kultur bei $16.372 \times g$ abzentrifugiert und auf Eis gestellt. Zur Erhöhung des elektrischen Widerstandes wurden die Zellen zweimal mit 4 °C kaltem sterilen 10 % Glycerin in ddH₂O gewaschen und anschließend in jeweils 80 µl 10 % Glycerin aufgenommen.

Je 100 µl der gewaschenen Suspensionen wurden zusammen mit 100-200 ng des präparierten Plasmids in eine eisgekühlt Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 1 mm, Bio-Rad, München) gefüllt. Die Elektroporation erfolgte mit einem Mikropulser (Bio-Rad). Die Regeneration der Zellen erfolgte sofort nach dem elektrischen Puls in 1 ml

SOC-Medium¹ Die transformierten Zellen wurden für ca. 1,5 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert und anschließend auf LB-Kulturplatten mit den jeweils zur Plasmiderhaltung benötigten Antibiotika ausplattiert. Auf diese Art erhaltene Kolonien wurden vor ihrer Weiterverwendung nochmals vereinzelt.

2.2.1. Präparation von Nukleinsäuren

2.2.1.1. Präparation von Plasmiden

Die Präparation von Plasmiden erfolgte aus je 2 ml einer aeroben, mit den jeweils notwendigen Antibiotika versetzten, Kultur in LB-Medium. Die Isolierung der Plasmide erfolgte mit Hilfe des Wizard Plus Miniprep DNA Purification System (Promega, Madison, USA). Abweichend vom Protokoll wurde im letzten Elutionsschritt für 5 min inkubiert. Die Trennung basiert auf einer Copräzipitation von Proteinen und chromosomaler DNA bei einem plötzlichen Wechsel des pH-Wertes von stark alkalisch zu neutral. Die Lagerung präparierter Plasmide erfolgte bei -20 °C.

2.2.1.2. Präparation chromosomaler DNA

Die Präparation chromosomaler DNA erfolgte aus je 2 ml einer aeroben *E. coli* LB-Kultur. Zur Isolierung wurde das Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, USA) verwendet. Abweichend von dem Protokoll wurde die isolierte DNA im letzten Schritt in 75 µl Tris/HCl-Puffer (15 mmol l⁻¹) rehydriert. Die Trennung basiert auf einem chemisch/enzymatischen Aufschluss der Zellen sowie auf der Unlöslichkeit von DNA in Alkoholen, wie Ethanol und Isopropanol. Kleinere Moleküle lassen sich dadurch selektiv lösen.

2.2.1.3. Präparation von gesamt RNA

Zur Isolierung von RNA wurden für jede Reaktion 10⁹ *E. coli* Zellen eingesetzt. Diese wurden unter den jeweils zu analysierenden Bedingungen kultiviert. Anschließend wurde je 1 ml Zellsuspension aus drei Replikaten in 6 ml RNA Protect (Qiagen, Venlo, Niederlande) zusammengeführt. Nach der Lyse bei Raumtemperatur für 10 min wurden die Proben bei 5000 × g für 10 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Proben bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Die Isolierung der RNA erfolgte mit Hilfe des RNeasy Protect Bacteria Mini Kit von Qiagen (Venlo, Niederlande) und einem anschließenden Verdau von DNA für 20 min bei 37 °C mit Hilfe des Kits Ambion DNA-free (life Technologies, Darmstadt, Deutschland). Für jede experimentelle Bedingung wurden zwei unabhängige Isolierung durchgeführt.

2.2.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA Fragmenten erfolgte durch die Polymerasekettenreaktion. Die Reaktionen wurden mit C1000, S1000, MJMini Thermocyclern (BioRad) durchgeführt.

¹SOB mit 20 mmol l⁻¹ Glucose und 20 mmol l⁻¹ MgCl₂ supplementiert.

Tabelle 2.9.: Zusammensetzung der PCR-Ansätze für jeweils 15 µl.

	Mango Mix	PCRBIO HiFi
Mastermix	7,5 µl	-
Puffer	-	3 µl
Primer _{fwd}	0,75 µl	0,6 µl
Primer _{rev}	0,75 µl	0,6 µl
Polymerase	-	0,15 µl
Template	50 ng	50 ng
DMSO	-	1,5 µl ¹
dH ₂ O	auffüllen auf 15 µl	

¹ bei chromosomaler DNA als Template

Tabelle 2.10.: Übersicht über verwendete PCR-Protokolle.

Schritt	Temperatur	Zeit		Zyklen
		PCRBIO HiFi	Mango Mix	
Initiale Denaturierung	95 °C	300 s	300 s	1
Denaturierung	95 °C	15 s	30 s	
Hybridisierung	55-65 °C	15 s	30 s	28-32
Elongation	72 °C	30 s/kb	30 s/kb	
Endpolymersiation	72 °C	30 s0	300 s	1

Zur präparativen Amplifikation von DNA wurde die PCRBIO HiFi Polymerase (PCR Biosystems, London, GB) nach Herstellerangabe in Ansätzen von 15-50 µl verwendet. Im Falle von chromosomaler DNA als Template wurde den Ansätzen 10 % DMSO zugesetzt. Zur Kontrolle von Klonierungsschritten wurden analytische PCR durchgeführt. Hierzu wurde Mango Mix (Bioline, Luckenwalde) in Ansätzen von 15 µl verwendet. Die Zusammensetzung der PCR-Ansätze sind in Tabelle 2.9, PCR-Protokolle in Tabelle 2.10 und verwendete Primer in Tabelle 2.8 angegeben. Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte, nach Erfolgskontrolle durch Gelelektrophorese (Abschnitt 2.2.3), mit Hilfe des Wizard SV Gel and PCR Clean-up Kit (Promega).

2.2.3. Auftrennung von Nukleinsäuren

Die Trennung von Nukleinsäuren nach deren Größe erfolgte durch Elektrophorese in Agarose-Gelen. Hierzu wurde TAE-Puffer (Tabelle 2.11) mit 1 % Agarose aufgeköcht und anschließend mit 2 ppm Midori Green versetzt. Bei Interkalation in DNA-Doppelstränge weist Midori Green eine starke Fluoreszenz bei Anregung mit UV oder Blau/Grün-Licht auf. Nach dem Erstarren des Gels in einer Gelkammer wurden zur eigentlichen Trennung Nukleinsäure-Proben mit Ladepuffer (Tabelle 2.12) versetzt und in einem elektrischen Feld mit TAE-Puffer als Elektrolyt zwischen 120 V (Powerpack Universal, Bio-Rad) getrennt. Als Größenmarker für Plasmide und PCR-Amplifikate wurde der 1 kb DNA Ladder (Thermo

Tabelle 2.11.: Zusammensetzung des TAE-Puffer. Einwaage pro Liter.

Substanz	Einwaage
Tris-HCl pH 8	6,3 g
Eisessig	1,2 g
Na ₂ EDTA	0,93 g

Tabelle 2.12.: Zusammensetzung des Ladepuffers (6x). Einwaage pro Liter

Substanz	Einwaage
Tris-HCl (pH 7,6)	2,52 g
Bromphenolblau	0,3 g
Xylencyanol FF	0,3 g
Na ₂ EDTA	22,3 g
versetzen mit Glycerin	600 ml
ddH ₂ O	ad 1 l

Fisher Scientific) verwendet. Für chromosomale DNA diente λ HindIII - DNA als Referenz. Die Aufreinigung einzelner DNA-Fragmente erfolgte aus Gel-Ausschnitten mit Hilfe des Wizard SV Gel and PCR Clean-up Kit (Promega).

2.2.4. Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung von Nukleinsäuren erfolgte zum einen spektroskopisch mittels eines NanoDrop 2000 Spektro-Photometers (Thermo Scientific) in einem Volumen von 1 μ l. Diese Methode wurde standardmäßig für alle isolierten Nukleinsäuren durchgeführt. Chromosomale DNA wurde zusätzlich mit Hilfe des QBit dsDNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) quantifiziert. Die Messung erfolgte in 96-Well Platten mit Hilfe des infinitePro 200 Spektrometer (Tecan).

2.2.5. Sequenzierung von Nukleinsäuren

2.2.5.1. Sanger-Sequenzierung - Kettenabbruchmethode

Zur Überprüfung der Sequenz von PCR-Amplifikaten und Plasmiden wurden diese nach Aufreinigung mit der Sanger-Methode sequenziert (Sanger u. a. 1977). Dies erfolgte mit dem Mix2Seq Kit durch die Firma Eurofins Genomics (Ebersberg). Um eine vollständige Abdeckung der Sequenz zu gewährleisten wurden Sequenzier-Primer im Abstand von \approx 800 bp verwendet.

2.2.5.2. SMRT-Sequenzierung - Einzelmolekülsequenzierung

Um eine zuverlässige Referenz für die Analyse der Transkriptom Daten und der Genom-Resequenzierungen aus den Zufallsmutagenese-Experimenten zu erhalten, wurde zunächst das Genom von JG878 *de-novo* sequenziert. Hierzu wurde eine SMRT-Sequenzierung (*Single Molecule Real Time*) auf einem PacBio RSII Gerät durchgeführt. Die Sequenzierung, sowie die anschließende Assemblierung nach HGAP (Chin u. a. 2013) erfolgte bei der Firma GATC (Konstanz, heute Eurofins Genomics). Für die Sequenzierung wurden $\approx 25 \mu\text{g}$ hochmolekularer-Doppelstrang DNA von JG878 verwendet.

2.2.5.3. Illumina-Sequenzierung - Brückensynthesemethode

Ausgehend von der, in Abschnitt 2.2.5.2, beschriebenen Sequenzierung von JG878 sollten mit Hilfe von Illumina-Sequenzierungen drei weitere Analysen durchgeführt werden. Zunächst wurde das Genom von JG878 ein weiteres Mal sequenziert um die Zuverlässigkeit der Referenzsequenz für alle weiteren Analysen zu erhöhen. Des Weiteren wurden die Genome der Zufallsmutanten sequenziert. In beiden Fällen erfolgte die Sequenzierung auf einem Illumina MiSeq (v2 Chemie) mit 2x150bp Reads. Die Sequenzierung wurde durch die Firma Eurofins Genomics durchgeführt.

In der dritten Analyse sollte die isolierte RNA sequenziert werden. Dies wurde ebenfalls durch die Firma Eurofins Genomics durchgeführt. Im Zuge der Analyse wurde zunächst rRNA mit Hilfe des Illumina Ribo-Zero Kit entfernt und die verbliebene RNA in eine cDNA Bibliothek überführt. Die Sequenzierung erfolgte in diesem Fall auf einem Illumina HiSeq 2500 (v4 Chemie) mit 2x100bp Reads.

Die Erstellung der Sequenzbibliotheken für die Sequenzierung erfolgte mit Hilfe des Transposase basierten Nextera Library Präparation Kit (Illumina, San Diego, USA).

Für die Genom-Resequenzierungen wurden jeweils mindestens 5 μg DNA eingesetzt. RNA-Sequenzierungen gingen von jeweils mindestens 8 μg aus.

2.2.6. Analyse von Sequenzierdaten

2.2.6.1. Genom-Sequenzierungen

Die **Assemblierung der SMRT-Sequenzierung** nach dem HGAP-Ablauf, erfolgte durch GATC. Hieraus wurde ein geschlossenes Chromosom für JG878 erhalten. Das Genom wurde mit Hilfe der PROKKA-Pipeline (Seemann 2014) und der SwissProt Datenbank in CLC annotiert

Die **Analyse der Resequenzierungen** erfolgte mit Hilfe von CLC Genomics Workaholic 11 (Qiagen). Hierbei wurden die folgenden Schritte durchgeführt:

- Zusammenfügen von *forward* und *reverse* Datensätzen
- Qualitäts-Trimming $p = 0,05$
- Mapping der Reads von JG878 auf das *de-novo*-Referenzgenom
- Extraktion der Konsensussequenz nach Mehrheitsvotum
- Mapping der Reads für JG878 Transfer 5, 11, 15 und 20 und JG1295 auf die Konsensussequenz.

- Variantenanalyse

Die Parameter für das *Read-mapping*, sowie für die Variantenanalyse sind in Tabelle A.1 angegeben.

2.2.6.2. RNA-Sequenzierungen

Die Analyse der RNA-Sequenzierung wurde ebenfalls mit CLC Genomics Workbench durchgeführt. Der Arbeitsablauf umfasste die folgenden Schritte:

- Zusammenfügen von *forward* und *reverse* Datensätzen
- Qualitäts-Trimming $p = 0,05$
- Erstellen eines Pangenoms über die Stämme JG1054, JG997 und JG991
- Mapping der Reads für jede Probe separat auf die Konsensussequenz
- Hauptkomponentenanalyse für alle Proben
- Bestimmung der differentiellen Expression zwischen allen unmittelbar abhängigen experimentellen Bedingungen (3.20)

Die Parameter für das *Read-mapping*, sowie für statistische Auswertung sind in im Anhang (Tabelle A.2) angegeben. Die für das Mapping erhaltenen Expressionswerte sind als *transcripts per kilo base million* berechnet. Dies beinhaltet eine Normierung auf die jeweilige Genlänge, sowie die Anzahl der Reads einer Probe. In den Expressionsvergleichen wurden nur Werte berücksichtigt mit einer statistisch signifikanten Änderung des Expressionswertes (fc) von $|4|$ (entspricht $\log_2(fc) \geq |2|$)

Die aus der Analyse erhaltenen Expressionswerte wurden dann zur Untersuchung der metabolischen Belastung des Stoffwechsels und zur Clusteranalyse des Datensatzes an die Arbeitsgruppe für Systembiotechnologie (Prof. Andreas Kremling, TU München) weiter gegeben.

Aus den Vergleichen zwischen aerobem und anaerobem Metabolismus unter Induktion von JG1054 und JG991 wurde mit Hilfe von iPath3 (Darzi u. a. 2018) eine Übersicht über abweichend regulierte Gene des Zentralstoffwechsels erstellt. Zu diesem Zweck wurden die beiden Vergleiche \overline{AG} und \overline{FL} in Abhängigkeit voneinander gefiltert. Im ersten Durchlauf wurde \overline{AG} nach $\log_2(fc) \geq |2|$ und FDRp – Value $\leq 0,05$ gefiltert und \overline{FL} nach $\log_2(fc) \leq |2|$ und FDRp – Value $\leq 0,05$. Im zweiten Durchlauf wurde \overline{FL} nach $\log_2(fc) \geq |2|$ und FDRp – Value $\leq 0,05$ gefiltert und \overline{AG} nach $\log_2(fc) \leq |2|$ und FDRp – Value $\leq 0,05$. Beide Datensätze wurden anhand der Uniprot Nummern den Reaktionen zugeordnet.

Tabelle 2.13.: Ansatz für den Restriktionsverdau¹

Komponente	Menge
Puffer (10x)	2 µl
Restriktionsenzym	je 1 µl
DNA	2-3 µg
ddH ₂ O	ad 20 µl

37 °C für 30 min

¹ Alle Enzyme und Puffer von New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)

2.2.7. Klonierungsstrategien

2.2.7.1. Klonierung des pTrc *hcp* Plasmids

Zur Klonierung des Expressionsplasmids pTrc *hcp* wurde zunächst der Vektor pTrc His B (Thermo Fisher Scientific) mit BamHI und PmeI linearisiert (Tabelle 2.13). Die erhaltenen Fragmente wurden elektrophoretisch aufgetrennt und das 4,3 kb große Fragment aufgereinigt.

Die präparative Amplifikation von *hcp* erfolgte in einer PCR mit Primer 2784 und 2785 von chromosomaler DNA aus JG22 als Template. Die Annealingtemperatur betrug 59 °C. Um die vollständig Amplifikation des 1,8 kb großen Fragments zu gewährleisten, wurde eine Elongationszeit von 1 min gewählt.

Nach der Aufreinigung von *hcp* wurde dieses mit dem Plasmid Fragment in einer isothermalen Ligation nach Gibson (Tabelle 2.14) verknüpft (Gibson u. a. 2009). Der Ligationsansatz wurde nach einer Reaktionszeit von 90 min bei 50 °C für 20 min dialysiert (MF-Millipore Membran 0,025 µm hydrophil, Merck). Nach der Transformation in JG22 wurden Klone per PCR mit Primer 1537 und 1902 auf erfolgreiche Ligation getestet und gegebenenfalls mit Primer 1537, 2786, 2787 und 1902 sequenziert. Anschließend wurde das Plasmid zur Verwendung in JG878 transformiert (JG1316).

Tabelle 2.14.: Zusammensetzung eines Ansatzes für eine isothermale Ligation nach Gibson.

Komponente	Menge
5x Reaktionspuffer	
Tris/HCl (1 mol l ⁻¹ , pH 7.5)	125 µl
MgCl ₂ (1 mol l ⁻¹)	12,5 µl
dNTP-Lösung (0,01 mol l ⁻¹)	25 µl
DTT (1 mol l ⁻¹)	12,5 µl
NAD (0,1 mol l ⁻¹)	12,5 µl
PEG-8000	62,5 mg
H ₂ O	62,5 µl
Reaktionsmix	
5x Reaktionspuffer	3 µl
HIFI Polymerase 2 u/µl	0,2 µl
taq DNA-Ligase 40 u/µl	1,5 µl
T5 Exonuclease 0,1 u/µl	0,6 µl
dH ₂ O	9,8 µl

2.2.7.2. Genomische Integration von *pta*

Für die Reintegration von *pta* in seinen natürlichen Locus wurde zunächst das Plasmid pASK43⁺ *up pta_pta_down ack* erstellt. Hierzu wurde pASK43⁺ *up pta_galK_down ack* mit Primer 2091 und 2092 amplifiziert. Die Annealing-Temperatur betrug 57 °C. Es wurde für 2,5 min elongiert. Die erhaltenen Fragmente wurden elektrophoretisch aufgetrennt und das 4,2 kb große Fragment aufgereinigt. Die präparative Amplifikation von *pta* erfolgte mit Primer 2557 und 2761 von chromosomaler DNA aus JG22 als Template. Die Annealing-Temperatur betrug 56 °C. Für die Amplifikation des 2,3 kb großen Fragmentes wurde eine Elongations-Zeit von 1,5 min gewählt. Nach Aufreinigung wurden *pta* und das pASK Fragment isothermal ligiert. Nach Dialyse und Transformation in JG22 wurden Klone mit den Primern 582 und 2791 auf erfolgreiche Ligation analysiert. Positive Transformanten wurden mit den Primern 581, 582, 2789, 2790 und 2791 sequenziert.

Zur stabilen Integration von *pta* in seinen natürlichen Locus in JG878 wurde *gene gorging* angewandt (Herring u. a. 2003). Hierzu wurde pASK43⁺ *up pta_pta_down ack* zusammen mit pACBSR in JG878 transformiert. Positive Transformanten wurden in 1 ml LB-Medium mit 0,2 % Arabinose für 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend mit 1 µl Chloramphenicol-Lösung versetzt. Nach 8 h wurde die Zellsuspension abzentrifugiert, zwei Mal mit M63-Medium (Tabelle 2.15) gewaschen und anschließend auf M63-Agar² ausplattiert. 2-Desoxygalactose im Medium erlaubt die Selektion auf $\Delta galK$ Klone.

²M63 mit 2 % Agar

Tabelle 2.15.: Zusammensetzung von M63-Medium. Einwaage pro Liter

Substanz	Einwaage
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2 g
KH_2PO_4	13,6 g
FeSO_4	0,5 mg
dH_2O	ad. 977 ml
Supplementation	
MgSO_4 -Lösung (1 mol l^{-1})	1 ml
CaCl_2 -Lösung ($0,1 \text{ mol l}^{-1}$)	1 ml
Thiamin-Lösung ($14,8 \text{ mmol l}^{-1}$)	1 ml
DOG-Lösung (20 %) ¹	10 ml
Glycerin-Lösung (50 %)	10 ml
pH Wert	7

¹ DOG: 2-Desoxy-Galactose

Nach 2-3 Tagen Inkubation bei 37 °C wurden erhaltenen Klone per analytischer PCR mit den Primern 1377 und 1378 auf erfolgreiche Integration getestet (Annealing 59 °C, Elongation 2,5 min). Positive Klone wurden dann präparativ unter den selben Bedingungen amplifiziert, aufgereinigt und mit den Primern 1377, 1378, 2788, 2790, 2791 sequenziert.

Vor der Integration in JG1295 wurde dieser zunächst unter Vollinduktion (0,2 % Arabinose, 20 mmol l^{-1} IPTG) bei 42 °C ohne Antibiose inkubiert. Anschließend wurde auf LB ausplattiert und Klone auf ihre Resistenz gegen Ampicillin und Chloramphenicol untersucht. Ziel war es durch Verlust von pEC86 und pMAL *alsSD* wieder eine Sensitivität gegen Chloramphenicol und Ampicillin herzustellen. Sensitive Klone wurden dann dem oben beschriebenen Prozess unterzogen. Nach erfolgreicher Integration wurden die beiden Stämme mit pEC86 und pMAL *alsSD* transformiert und so für die Verwendung in der Elektrofermentation vorbereitet.

2.3. Chemische Analytik

2.3.1. Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Die Quantifizierung von Stoffwechselendprodukten erfolgte standardmäßig durch Messung mittels HPLC. Hierbei werden Stoffgemische chromatographisch, durch Interaktion zwischen mobiler und stationärer Phase getrennt. Im Anschluss an die Trennung erfolgt die Messung und teilweise Identifikation durch einen geeigneten Detektor. Generell erfolgt die Quantifizierung durch externe Standards. Hierbei wird das Signal einer Substanz bei bekannter Konzentration zur Kalibrierung verwendet. Die Trennung der Proben erfolgt mit einem UltiMate3000 Gerät (Thermo Fisher Scientific). Die Kon-

figuration bestand aus einer Niederdruckgradienten Pumpe mit integriertem Degaser, analytischem Autosampler, Säulenthermostat, analytischem Dioden Array Detektor, und einem RefractoMax 521 Brechungsindex Detektor (RI). Die Betriebsparameter waren:

Eluent	5 mmol l ⁻¹ H ₂ SO ₄
Flussrate	0,6 ml/min
Säulentemperatur	60 °C
Probenvolumen	50 µl
DAD	λ = 200 – 400 nm
RI-Detektor	Polarisation 500 mV
Laufzeit	30 min

Zur Probenvorbereitung wurden diese für 1 min bei 16873 × g zentrifugiert und der Überstand anschließend durch einen 0,2 µm PTFE Spritzenvorsatzfilter filtriert. Zur Analyse wurde ein Volumen von 150 µl mit 15 µl 0,5 mol l⁻¹ H₂SO₄ versetzt.

Standardmäßig wurde Glucose und Mannit anhand des Brechungsindex quantifiziert. Acetoin wurde sowohl mit dem RI-Detektor als auch bei λ = 275 nm quantifiziert. Zur Überwachung der Fermentation wurde die eventuelle Bildung von organischen Säuren bei λ = 210 nm beobachtet.

2.3.2. Enzymatische Quantifizierung von Glucose

Als unabhängige Messmethode zur Quantifizierung von Glucose diente die enzymatische Bestimmung mit Hilfe der Hexokinase (HK) und Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase (G6P-DH, beide Sigma Aldrich). Hierbei wird Glucose zu Gluconsäure-6-Phosphat unter Reduktion von NAD⁺ oxidiert. Entstandenes NADH kann selektiv bei λ = 340 nm detektiert werden. Der Messansatz bestand aus 180 µl Reaktionsmix und 20 µl Probe in einer 96-Well Platte. Der Reaktionsmix setzt sich wie folgt zusammen:

Triethanolamin	0,75 mol l ⁻¹
MgSO₄	10 mmol l ⁻¹
NADP⁺	1,1 mmol l ⁻¹
ATP	8 mmol l ⁻¹
Hexokinase	2,1 u/ml
G6P-DH	2,1 u/ml

Der Messbereich dieser Analyse beträgt 0-1 mmol l⁻¹. Proben mit erwartungsgemäß höherer Konzentration wurden vorab entsprechend verdünnt. Als externer Standard diente Glucose-Lösung mit Konzentrationen zwischen 0 und 1 mmol l⁻¹. Die Messung erfolgte nach 30 min Inkubation bei 37 °C im infinitePro 200 Spektrometer bei λ = 340 nm

2.3.3. Photometrische Quantifizierung von Acetoin

Als zweite Quantifizierungsmethode für Acetoin wurde die Reaktion nach Voges-Proskauer photometrisch quantifiziert (Sigma Aldrich). Hierzu wurden 20 µl Probe mit 140 µl Reaktionsmix in einer 96-Well Platte versetzt und bei λ = 490 nm im infinitePro 200 Spektrometer quantifiziert. Der Reaktionsmix bestand aus:

dH₂O	10 ml
L-Arginin	1,4 ml (10 mg ml ⁻¹)
1-Naphtol	50 mg in 1 ml Ethanol
NaOH	1 ml 40 %

Die Messung erfolgte nach einer Entwicklungszeit von 45 min bei Raumtemperatur. Zur Kalibrierung wurden als externer Standard eine Acetoin Lösung mit Konzentrationen von 0-5 mmol l⁻¹ verwendet. Proben mit erwartbar höherer Konzentration wurden vorab entsprechend verdünnt.

2.3.4. Spektrometrische Messung der Methylenblau Reduktion

Die Bestimmung der Reduktionsrate von Methylenblau durch JG991 erfolgte in einer anoxischen Zellsuspension (OD₆₀₀ = 6) ohne Elektronenakzeptor. Die Zellen wurden dazu vorab, wie in Absatz 2.1.6 beschrieben gewaschen und auf OD₆₀₀ = 12 ankonzentriert. Die Suspension wurde anschließend für 30 min in einem Anaerobenzelt inkubiert, um eventuellen Restsauerstoff zu entfernen. Die Eigentliche Messung erfolgte in einer 96-Well Platte. Hierzu wurden 50 µl Methylenblau-Lösung mit Konzentrationen von 0, 2, 5, 10, 20, 40, 100, 150, 200, 400, 700 und 1000 µmol l⁻¹ vorgelegt. Mit einer Mehrkanalpipette wurden dann 50 µl Zellsuspension zu allen Ansätzen zugegeben. Die Messung der Absorption erfolgte bei λ = 620 nm über einen Zeitraum von 180 s mit Hilfe eines infinite 200Pro Spektrometer (Tecan).

Zur Auswertung wurden die Datensätzen nach *t* differenziert und die höchste Änderungsrate für jeden Ansatz gegen die Konzentration aufgetragen. Anschließend wurde eine Anpassung an die Michaelis-Menten Gleichung (Gleichung 2.2) vorgenommen.

$$r = \frac{R_{max} \cdot c}{K_M + c} \quad (2.2)$$

<i>r</i>	Reaktionsgeschwindigkeit
R _{max}	Maximale Rate
<i>c</i>	Konzentration von Methylenblau
K _M	Michaelis-Menten-Konstante

2.4. Fermentationsplattformen

In diesem Abschnitt sollen die verwendeten bioelektrochemischen Fermenter vorgestellt werden.

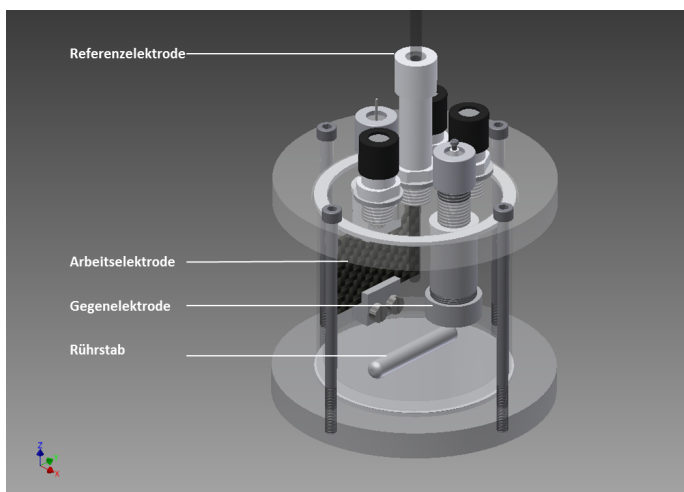


Abbildung 2.1.: CAD-Modell des 250 ml-Reaktors.

2.4.1. 250 ml-Reaktor

Das zu Beginn verwendete 250 ml-Reaktorsystem wurde in Vorarbeiten entwickelt (Golitsch 2016). Dabei handelt es sich um einen bioelektrochemischen Fermenter mit einem Elektrolytvolumen von 250 ml (Abbildung 2.1). Das System besteht aus einem Batterieglas, eingespannt zwischen einem Deckel und einem Bodenteil aus Polycarbonat. Die gesamte Elektrodentechnik, sowie alle Zugänge für Begasung und Beprobung sind im Deckel aufgehängt. Alle in den Elektrolyt eintauchenden Bauteile bestehen aus PTFE, Polyamid oder Edelstahl. Die Arbeitselektrode aus 40 cm² Sigracell GFD 2,5 Graphit-Vlies (SGL Carbon, Wiesbaden) ist vertikal an einem gebohrten PTFE-Stab befestigt, die Stromableitung erfolgt über eine Edelstahlkanüle im inneren des Stabes. Die Gegenelektrode aus 1,25 cm² Platinnetz (99,9 %, 10,24 Maschen mm⁻²) ist in einem PTFE-Rohr eingehaust und zur Arbeitselektrodenkammer durch eine Ionenaustauschmembran abgegrenzt. Die Referenzelektrode wird durch ein gebohrtes Septum im Deckel in den Elektrolyt geführt. Der Reaktor wird über einem Magnetrührer gerührt.

2.4.2. Mini-Reaktor

Das in dieser Arbeit entwickelte Mini-Reaktor-System basiert grundlegend auf dem 250 ml-Reaktor. Um den, aus dem Konzeptexperiment abgeleiteten Anforderungen der Elektrofermentation gerecht zu werden, wurde der Aufbau überarbeitet (Abbildung 2.2). Wesentliche Änderung war die Verringerung des Elektrolytvolumens auf 23,11 ml bei gleichbleibender Elektrodenfläche von 40 cm². Dies wurde erreicht, indem als Reaktorgefäß

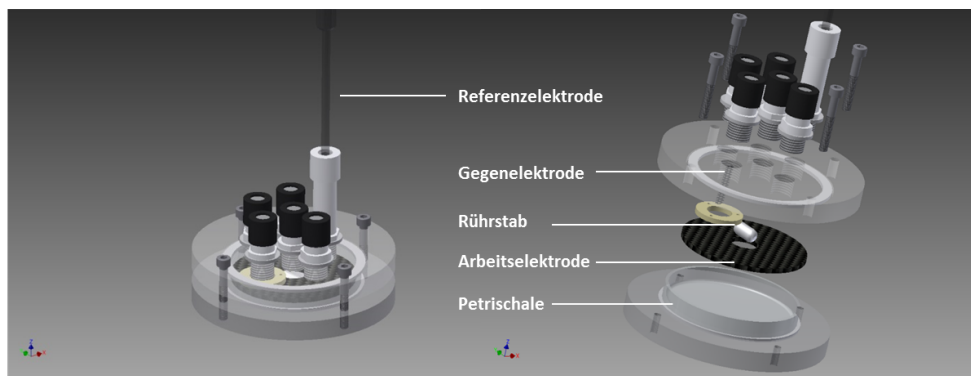


Abbildung 2.2.: CAD-Modell des Mini-Reaktors.

eine Glas-Petrischale (Duran Steriplan, 80×15 mm) eingesetzt wurde. Die Arbeitselektrode wurde ringförmig zugeschnitten mit einem Außendurchmesser von 7,4 cm und einer kreisförmigen Aussparung von 1,7 cm in der Mitte. Die Anordnung erfolgte horizontal auf dem Boden des Reaktors. Daraus ergibt sich eine, dem Elektrolyt zugewandte, Fläche von 40 cm². Die Stromableitung erfolgte mit einer Edelstahlkanüle durch ein Butyl-Kautschuk-Septum im Deckel. Die Gegenelektrode wurde bei gleichbleibender Fläche in einem PTFE-Gewindeeinsatz im Deckel verbaut. Die Abgrenzung zur Arbeitselektrodenkammer hingeschah auf der Unterseite des Polycarbonat-Deckels durch eine Ionenaustausch-Membran. Diese wurde durch einen Silikonring ($\varnothing_{\text{innen}} = 15 \text{ mm}$, $\varnothing_{\text{außen}} = 20 \text{ mm}$) und einen Polyamid-Ring ($\varnothing_{\text{innen}} = 15 \text{ mm}$, $\varnothing_{\text{außen}} = 20 \text{ mm}$) mit drei Schrauben (M2×20 mm, V2A) am Deckel verspannt. Hierzu wurden entsprechende Bohrungen am Deckel vorgenommen. Die Referenzelektrode bleibt unverändert im Deckel aufgehängt. Die Aussparung in der Mitte der Elektrode erlaubt die Verwendung eines Magnetrührers.

2.4.3. Pump-Reaktor

Der zur Evaluation von Diffusionslimitierungen verwendete Pumpreaktor wurde in Zusammenarbeit mit dem Arbeitsgruppe von Prof. Kerzenmacher (Fachbereich Umweltverfahrenstechnik, Universität Bremen) entwickelt (Abbildung 2.3). Auch dieses System basiert im Grundaufbau auf dem 250 ml-Reaktor. Die Arbeitselektrode wurde in diesem Reaktor in eine Polycarbonat-Kassette (5×5×4 cm) eingehaust. Die inneren Abmessungen erlauben den Einbau von 10 Lagen GFD 2,5 mit einer Grundfläche von 4,4×4,4 cm. Zum Reaktorvolumen wird diese durch ein Polypropylen-Gitter gehalten. Die Stromableitung erfolgt mit einem Titan-Draht (99 %, 0,1 mm, Chempur Karlsruhe) welcher im Inneren mehrfach vertikal durch die Elektrode geführt wurde. Außerhalb der Kassette wurde dieser mit einer Edelstahl-Gewindestange (M5×150 mm) aus dem Reaktor geführt. Die Elektrodenkassette wurde mit der Öffnung nach unten zentral im Abstand von 3 mm über dem Boden des Reaktors platziert. Am oberen Ende der Kassette wurde diese über eine Gewindetülle (PP, M6×15 mm, $\varnothing_{\text{außen}} = 20 \text{ mm}$) mit einem Pumpschlauch verbunden. Dieser Aufbau ermöglicht es, über eine externe Peristaltikpumpe Elektrolyt durch die Elektrode hindurch zu bewegen. Die Schlauchführung durch den Deckel über den Pum-

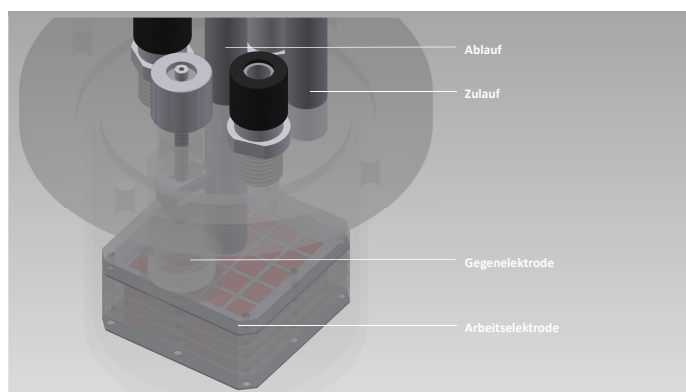


Abbildung 2.3.: CAD-Modell der Elektrodenanordnung im Pump-Reaktor.

penmotor zurück ins Reaktorvolumen erlaubt eine kontinuierliche Umwälzung und den dauerhaften Betrieb des Reaktors. Die Gegenelektrode wurde in ähnlicher Konfiguration wie im Ausgangsmodell weiter verwendet. Das PTFE Gehäuse wurde um 3 mm verkürzt, sodass die Gegenelektrodenkammer oberhalb der Arbeitslektrode angebracht werden kann. Das Füllvolumen des Pump-Reaktors beträgt 200 ml.

2.5. Elektrochemische Methoden

Alle Potentiale in dieser Arbeit sind auf eine gesättigte Ag/AgCl-Elektrode ($E_{\text{REF}} = 199 \text{ mV}$ vs. Standard-Wasserstoff-Elektrode) bezogen, sofern nicht anders angegeben. Bei den verwendeten Messaufbauten, respektive Fermenter, handelt sich um Drei-Elektroden-Systeme (Abbildung 2.4). Sie bestehen aus Arbeitslektrode (WE), Referenzelektrode (RE) und Gegenelektrode (CE). Das Potential der Arbeitslektrode wird relativ zum Potential der Referenzelektrode über einen Potentiostaten kontrolliert. An der Gegenelektrode wird zu diesem Zweck entsprechend ein Elektronenüberschuss oder -mangel erzeugt.

2.5.1. Cyclovoltammetrie

Zur kinetischen Untersuchung von Redoxprozessen in abiotischen Experimenten wurden cyclische Voltammetrien durchgeführt. Diese erlauben die Messung von Reduktions- und Oxidationsprozessen, durch ein zeitlich alternierendes Potential an der Arbeitslektrode (Sägezahnspannung). Abhängig von der Vorschubgeschwindigkeit des Potentials wird eine Stromantwort zum Potential aufgezeichnet. In den Potentialbereichen redoxaktiver Spezies in der Lösung steigt diese an. Dies erlaubt Aussagen über die Kinetik der Redoxreaktion.

Zur Evaluierung der Elektrodenmaterialien wurde $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ Methyleneblau in PBS-Medium bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 20 mV s^{-1} in einem Potentialbereich von -800 bis 600 mV untersucht. Als Messaufbau diente der 250 ml-Reaktor. Als Arbeitslektrode wurde 40 cm^2 Graphit-Vlies (Sigracell GFD 2,5), 40 cm^2 *electro spun carbon* (ESC, TU Bremen, Fachgebiet Umweltverfahrenstechnik, Prof. Kerzenmacher) oder 2 cm^2 Platin-

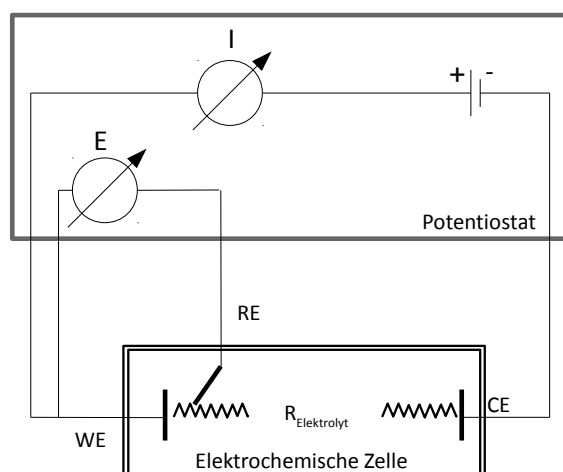


Abbildung 2.4.: Schematische Darstellung eines elektrochemischen Messaufbaus. Dieser besteht aus Potentiostat und elektrochemischer Zelle. Zwischen Arbeitselektrode (WE) und Referenzelektrode (RE) wird die Spannung gemessen. Durch Variation des Potentials der Gegenelektrode (CE) wird die Spannung zwischen WE und RE auf den Sollwert gebracht. Während der Messung werden Stromstärke und Potential der Arbeitselektrode aufgezeichnet.

netz verwendet. Es wurden jeweils 5 Zyklen gemessen und ein repräsentativer Zyklus ausgewählt.

Die Untersuchung der Medienzusammensetzung erfolgte ebenfalls mit $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ Metylenblau, allerdings in variablem Elektrolyt. Untersucht wurden Formulierungen mit PO_4^{3-} , MOPS oder HEPES als Puffer. In allen drei Puffern wurde jeweils der Einfluss von Casein Hydrolysat, Hefeextrakt und Glucose untersucht. Als Messaufbau diente ein Volumen von 15 ml mit einer Arbeitselektrode aus 10 cm^2 GFD 2,5. Es wurden ebenfalls jeweils 5 Zyklen gemessen und ein repräsentativer Zyklus ausgewählt.

In allen Cyclovoltammetrie-Experimenten, wurden die Elektrolyte vor der Messung mit N_2 durchspült. Während der Messung wurde der Elektrolyt nicht umgewälzt und unter N_2 -Atmosphäre gehalten. Die Messung wurde an einem WaveNow Potentiostat (Pine Instruments, Grove City, PA, USA) durchgeführt.

2.5.2. Chronoamperometrie

Während aller Elektrofermentationsexperimente wurde mit Hilfe des Potentiostaten das Potential an der Arbeitselektrode konstant bei 0 mV gehalten und die Stromstärke im zeitlichen Verlauf aufgezeichnet (Chronoamperometrie). Die Messungen wurden an Dropsense μSTAT 8000 (Metrohm, Herisau, Schweiz), WaveNow (Pine Instruments), MultiEmStat (PalmSens, Houten, Niederlande) oder Interface 1000E/1010E (Gamry, Philadelphia, PA, USA) durchgeführt. Als Messintervalle wurden Zeiten zwischen 30 s und 5 min angesetzt.

2.6. Elektrofermentation

Im folgenden sollen die Arbeitsabläufe zur Vorbereitung und Durchführung der Elektrofermentationsexperimente erläutert werden.

Plattform-übergreifend wurde GFD 2,5 als Elektrodenmaterial verwendet. Um die hydrophobe Oberfläche des Graphits mit Wasser zu benetzen und Luft aus der Elektrode zu verdrängen, wurde dieses zunächst für 10 min in 2-Propanol getaucht und anschließend unter fließendem Wasser ausgewaschen. Zur Kontrolle wurde das Vließ anschließend in Wasser getaucht. Vollständig benetztes Vließ weist eine höhere Dichte als Wasser auf und sinkt dementsprechend. In allen Experimenten wurde zwischen Arbeitselektrodenkammer und Gegenelektrodenkammer eine Ionenaustausch Membran verbaut. Experimente ohne pH-Kontrolle wurden mit einer Protonenaustauschmembran betrieben (Fumapem F950, Fumatech BWT, Bietigheim-Bissingen). In Experimenten mit pH-Kontrolle wurde eine Anionenaustauschmembran verwendet (Fumasep FAS-50, Fumatech BWT). In beiden Fällen wurde die Membran vor dem Einbau für 30 min in 1×-Puffer quellen gelassen. Das Potential der verwendeten Referenzelektroden (SE11, Sensortechnik Meinsberg, Meinsberg) wurde vor Verwendung gegen eine *Master*-Elektrode überprüft. Der Toleranzbereich betrug dabei ± 2 mV. Die Sterilisation der Referenzelektroden erfolgte für 30 min unter UV-Licht ($\lambda_M = 302$ nm, 8 W). Zur Vorbereitung der Elektrofermentation wurden die Fermenter mit 1×-Puffer in allen Kammern autoklaviert und anschließend unter einer Sterilbank wieder entnommen.

2.6.1. Elektrofermentation im 250 ml-Reaktor

Ausgehend von einer oxischen Kultur im Volumen von 500 ml wurden die Zellen, wie in Abschnitt 2.1.6 beschreiben, gewaschen und in vollständig supplementiertem PBS-Medium zu einer Zelldichte von $OD_{600} = 0,5$ suspendiert. Anschließend wurde das Medium auf drei Replikate aufgeteilt und die Referenzelektroden eingesetzt. Die Fermentation erfolgte dann bei 37 °C und N₂-Spülung der überstehenden Gasphase. Die Beprobung geschah mit 1 ml Spritzen mit 12 cm Kanülen durch Butyl-Kautschuk Septen im Deckel.

2.6.2. Elektrofermentation im Mini-Reaktor

Abweichend vom Ablauf im 250 ml-Reaktor, wurden die Mini-Reaktoren nach dem Autoklavieren zunächst mit vollständig supplementiertem, sterilem MOPS-Medium über Nacht bei einem Potential von 0 mV inkubiert. Aufgrund der fehlenden Gasphase im Reaktor und der vertikalen Anordnung der Elektroden, geschah dies, wie auch die eigentliche Fermentation in einem Anaerobenzelt (Coy Laboratory Products) unter N₂/H₂-Atmosphäre (98/2). Die oxisch vorgezogenen Zellen wurden wie zuvor beschrieben gewaschen und in supplementiertem PBS- oder MOPS-Medium zu einer Zelldichte von $OD_{600} = 6$ suspendiert. Die Befüllung der Reaktoren erfolgte mit 20 ml Spritzen im Anaerobenzelt. In Experimenten mit kontrolliertem pH-Wertes wurden Messelektroden (HI9126 Hanna Instruments, Vöhringen und pH1100, VWR) in je einen Reaktor des Triplikats integriert und für 8 h stündlich der pH-Wert eingestellt. Alle 2 h / bei jeder Beprobung, wurde in allen Replikaten der pH-Wert überprüft.

2.6.3. Elektrofermentation im Pump-Reaktor

Die Fermentation im Pumpreaktor folgte dem selben Ablauf wie im Mini-Reaktor. Während der Präinkubation und der eigentlichen Fermentation wurde der Elektrolyt mit einer Peristaltikpumpe (Master Flex L/S, ColeParmer, Vernon Hills, Illinois, USA) mit L/S 36 Norprene Schlauch (Coleparmer) umgewälzt. Die Förderrate betrug dabei 455 ml/min.

2.7. Berechnung von Evaluationsparametern

2.7.1. Mittlere Stromdichte

Um einen aussagekräftigen Parameter für den Vergleich zwischen den Experimenten zu erhalten, wurde die mittlere Stromdichte (\bar{j}) für den jeweils angegebenen Zeitraum des Experimentes nach Gleichung 2.3 berechnet.

$$\bar{j} = \frac{\int_{t_0}^t I}{t \cdot A} \quad (2.3)$$

\bar{j} Stromdichte
 I Stromstärke
 t Zeit
 A Elektrodenfläche

Da die Elektrodengeometrie im Pumpreaktor einen Vergleich der Flächennutzung auf Basis der geometrischen Oberfläche der Elektrode nicht zulässt, wurde für diese Fälle die Stromdichte bezogen auf die innere Oberfläche der Elektrode berechnet (j_{BET}). Das verwendete Sigracell GFD 2,5 Graphit-Vlies hat nach Herstellerangaben die folgenden physikalischen Eigenschaften:

Dicke (h) 2,5 mm
Dichte (ρ) 0,09 g cm⁻²
BET Oberfläche (a_{BET}) 0,4 g m⁻²

Nach Gleichung 2.4 lässt sich für die drei Reaktortypen dann die in Tabelle 2.16 angegebenen BET Oberflächen und spezifische Volumina berechnen. Diese ist dem Oberflächen-Volumen-Verhältnis ($\frac{A}{V}$) gegenübergestellt, welches sich auf die geometrische Oberfläche der Elektrode bezieht.

$$A_{BET} = A_{geo} \cdot h \cdot \rho \cdot a_{BET} \quad (2.4)$$

A_{BET} BET-Elektrodenfläche

2.7.2. Zyklenzahl des Mediators

Zur Berechnung der Anzahl von Oxidations- und Reduktionszyklen, die jedes Mediatormolekül in einem bestimmten Zeitintervall durchläuft, wurde die in diesem Intervall auf die Elektrode übertragen Ladung durch die elektrische Kapazität aller Mediatormoleküle berechnet (Gleichung 2.5).

Tabelle 2.16.: BET-Oberfläche (A_{BET}), spezifische Oberfläche (V_s) und Oberfläche-Volumen-Verhältnis ($\frac{A}{V}$) für alle Reaktor-Systeme.

Reaktor	A_{BET}	V_s	$\frac{A}{V}$
250 ml-Reaktor	0,189 m ²	0,756 m ² l ⁻¹	0,0163 m ² l ⁻¹
Mini-Reaktor	0,367 m ²	15,86 m ² l ⁻¹	0,176 m ² l ⁻¹
Pump-Reaktor	1,742 m ²	8,71 m ² l ⁻¹	0,009 68 m ² l ⁻¹

$$CE = \frac{\int_{t_0}^t I}{c_{MB} \cdot V_R \cdot z_e} \quad (2.5)$$

- I Stromstärke
- c_{MB} Konzentration von Metylenblau
- V_R Volumen im jeweiligen Reaktor
- z_e Überschuss metabolischer Elektronen pro molarem Umsatz

2.7.3. Produktivität

Um die Syntheseleistung der Fermentationen in eine skalierbare Form zu bringen wird diese üblicherweise als Produktivität (Q in [g l⁻¹ h]) angegeben. Die Bildung von Acetoin wird daher auf den selben Zeitraum bezogen wie der jeweilige Wert für die Stromdichte (Gleichung 2.6)

$$Q = \frac{\Delta c_{Ace} \cdot M_{Ace}}{\Delta t} \quad (2.6)$$

- c_{Ace} Konzentration von Acetoin
- $M_{Acetoin}$ molare Masse von Acetoin (88,11 g mol⁻¹)

Zur Evaluation der Flächennutzung für die Acetoinproduktion wurde zudem die spezifische Produktivität (Q_s in $[\text{g m}^{-2} \text{h}]$) nach Gleichung 2.7 berechnet.

$$Q_s = \frac{\Delta c_{Ace} \cdot M_{Ace}}{\Delta t \cdot S_v} \quad (2.7)$$

2.7.4. Ausbeute

Für die Umsetzung von Glucose zu Acetoin ergibt sich für den, in Abschnitt 1.3.4 eingeführten, Stoffwechselweg eine maximale Ausbeute (Y_{Ace}) von 1 mol Acetoin pro Mol Glucose das verbraucht wird. Die Ausbeute wird daher in Prozent des theoretischen Maximums oder in $\frac{\text{mol Acetoin}}{\text{mol Glucose}}$ angegeben. Entsprechend berechnet sich Y_{Ace} nach Gleichung 2.8

$$Y_{Ace} = \frac{\Delta c_{Ace}}{\Delta c_{Gluc}} \quad (2.8)$$

2.7.5. Coulomb Effizienz

Die Coulomb Effizienz (CE) der Elektrofermentation gibt das Verhältnis von gemessener Ladung zu metabolisch freigesetzter Überschussladung an. Die Berechnung erfolgt nach Gleichung 2.9.

$$CE = \frac{\int_{t_0}^t I}{\Delta c \cdot V_R \cdot z_e \cdot \epsilon \cdot N_A} \quad (2.9)$$

- I Stromstärke
- c Konzentration von Glucose oder Acetoin
- V_R Volumen im jeweiligen Reaktor
- z_e Überschuss metabolischer Elektronen pro molarem Umsatz
- ϵ Elementarladung [$\epsilon = 1,602 \cdot 10^{-19} \text{ C}$] (Lide 2010)
- N_A Avogadro-Konstante [$N_A = 6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$] (Lide 2010)

Im konkreten Fall werden ideal bei der Umsetzung von einem Molekül Glucose zu Acetoin vier Elektronen frei ($z_e = 4$).

3. Ergebnisse

Übersicht

In diesem Kapitel sollen die Ergebnisse zur Etablierung, Charakterisierung und Weiterentwicklung des mediatorbasierten Elektrofermentationsystems für die Synthese von Acetoin aus Glucose durch einen *Escherichia coli* Produktionsstamm veranschaulicht werden. Im ersten Teil wird ein entsprechender experimenteller Aufbau eingeführt, welcher die konzeptionelle Grundlage bildet. Im zweiten Teil wird dieser Aufbau, basierend auf den Erkenntnissen aus dem Konzeptexperiment, in Prozessablauf und Reaktoraufbau weiterentwickelt um den Besonderheiten der mediatorbasierten Fermentation Rechnung zu tragen. Im dritten Teil wird der Einfluss einzelner Parameter auf den Fermentationsprozess evaluiert und diese mit dem Ziel eines beschleunigten Umsatzes angepasst. Im vierten Teil wird die Physiologie des Produktionsstammes betrachtet. Schwerpunkt ist hier der anaerobe Stoffwechsel und seine Regulation. Im letzten Teil der Arbeit wird schließlich die Auslastungsgrenze des entwickelten Reaktorsystems evaluiert.

Um die einzelnen Elektrofermentationsexperimente eindeutig zu unterscheiden, sind diese in der Abbildungslegende jeweils mit einer Chiffre versehen. Diese Chiffren sind auf Seite 99 erläutert.

3.1. Elektrofermentation im 250 ml-Reaktor

Mit dem aus der Transformation von pMAL *alsSD* und pEC86 in JG878 erhaltenen Fermentationsstamm (JG991) wurde in einem ersten Konzeptexperiment die Fermentation von Acetoin aus Glucose in der angestrebten *E. coli* Plattform getestet. Als bioelektrochemischer Fermenter diente hierzu ein bereits vorab etablierter 250 ml Reaktor (Abschnitt 2.4.1). Als Redoxmediator zwischen Elektrodenoberfläche und Zelllumen wurde $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ Metylenblau eingesetzt. Abbildung 3.1a zeigt den Verlauf der Stromdichte über die Dauer von 72 h. In den ersten 10 h steigt die Stromdichte stark an bis zu einem Maximum bei $114,5 \pm 16,1 \text{ mA m}^{-2}$. Im weiteren Verlauf nimmt die Stromstärke ab bis zu einem Wert von $32,60 \pm 1,41 \text{ mA m}^{-2}$. Es wird eine durchschnittliche Stromdichte von $95,92 \pm 11,28 \text{ mA m}^{-2}$ in den ersten 24 h erreicht. Zum Vergleich ist der Hintergrundstrom in einem sterilen Reaktor gezeigt. Die Stromdichte in diesem Experiment liegt im Mittel bei $-0,023 \pm 0,171 \text{ mA m}^{-2}$.

Die chemische Analyse ist in Abbildung 3.1b gezeigt. Während der Fermentation wurden $3,80 \pm 0,69 \text{ mmol l}^{-1}$ Glucose verbraucht und $2,59 \pm 0,63 \text{ mmol l}^{-1}$ Acetoin gebildet. Dies entspricht einer Ausbeute von $67,19 \pm 0,11 \%$. Es konnten keine weiteren Fermentationsprodukte identifiziert werden. Die Produktivität in diesem Experiment liegt in den ersten 24 h bei $5,43 \pm 1,71 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Die Coulomb-Effizienz (CE) dieser Elektrofermentation beträgt

3. Ergebnisse

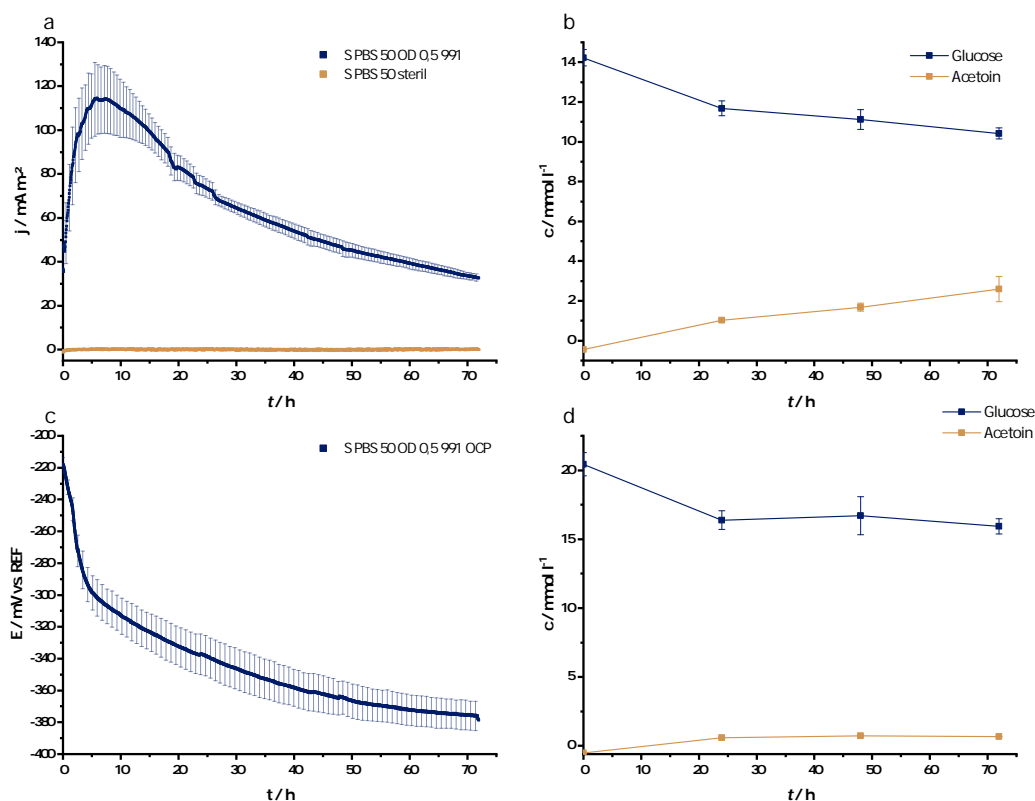


Abbildung 3.1.: Elektrofermentation von JG991 im 250 ml Reaktor. **a** Stromdichte j und **b** chemische Analyse im zeitlichen Verlauf über 90 h. **a** zeigt zum Vergleich den Verlauf der Stromdichte in einem sterilen Reaktor (*gelb*). **c + d**: *open-circuit*-Fermentation mit JG991 im 250 ml Reaktor. **c** Leerlaufpotential E und **d** chemische Analyse im zeitlichen Verlauf über 90 h.

$14,93 \pm 5,76$ %. Der Redoxzustand des Mediators, kann anhand der Farbe des Elektrolyts erkannt werden (oxidiert = blau, reduziert = farblos). Über das gesamte Experiment hinweg, war Methylblau reduziert.

In einem weiteren Kontrollexperiment wurde der Einfluss der Elektrode auf den Fermentationsprozess untersucht. Hierzu wurde in einer Chronopotentiometrie über den selben Zeitraum die Leerlaufspannung gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.1c gezeigt. Das gemessene Potential (Abbildung 3.1c) fällt über die Zeit von einem anfänglichen Wert von $-218,5 \pm 4,8$ mV auf $-378,8 \pm 9,0$ mV ab. Die chemische Analyse zeigt eine Abnahme von Glucose um $4,52 \pm 0,91$ mmol l⁻¹. Zeitgleich wurde eine Zunahme von Acetoin um $0,68 \pm 0,02$ mmol l⁻¹ gemessen (Abbildung 3.1d).

Der geringe Umsatz, in Verbindung mit einem durchgängig reduzierten Mediator, in diesem Experiment deutet auf eine unzureichende Reaktorleistung hin. Zudem konnte aus der geringen CE auf eine ungünstige Prozessführung geschlossen werden. Es wurde daher anschließend ein bioelektrochemischer Reaktor entwickelt, der den Anforderungen einer Mediator-basierten Elektrofermentation besser entsprechen soll.

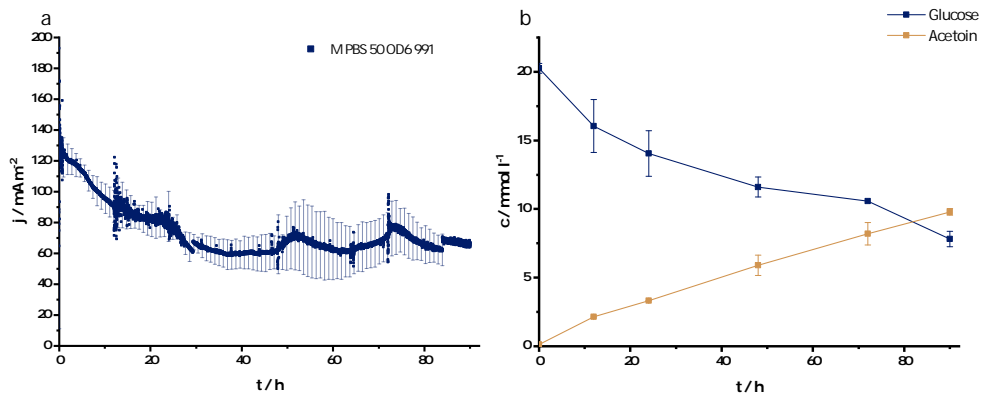


Abbildung 3.2.: Elektrofermentation von JG991 im Mini-Reaktor. **a** Stromdichte j und **b** chemische Analyse im zeitlichen Verlauf über 90 h.

3.2. Elektrofermentation im Mini-Reaktor

Die Anpassungen am Fermentationsprozess (Abschnitt 2.4.2) zielten zum einen darauf ab, das Verhältnis von Elektrodenoberfläche zu Elektrolytvolumen ($\frac{A}{V}$) des Reaktorsystems zu erhöhen um ausreichend oxidierten Mediator für den Produktionsorganismus zur Verfügung zu stellen. Zum anderen sollten die erkannten Probleme im Fermentationsablauf (Abschnitt 4.1.1) behoben werden. Bei der Elektrofermentation der zweiten Generation im Mini-Reaktor, wurde annähernd die selbe Menge Zellen wie in der ersten Generation eingesetzt. Da sich das Volumen von 250 ml auf 23,1 ml verringert hat, lag die Start Zelldichte damit bei $OD_{600} = 6$. Die dem Elektrolyt zugewandte Elektrodenfläche blieb im Vergleich zum Standard 250 ml Reaktor gleich. Damit ergibt sich ein 10,8x höheres $\frac{A}{V}$ im Mini-Reaktor. Die Ergebnisse der Elektrofermentation sind in Abbildung 3.2 gezeigt. Die Chronoamperometrie zeigt einen Abfall der Stromdichte in den ersten 30 Stunden von maximal $171,3 \pm 37,9 \text{ mA m}^{-2}$ auf einen Wert um circa 70 mA m^{-2} . In den ersten 24 h wird eine mittlere Stromdichte von $96,9 \pm 7,4 \text{ mA m}^{-2}$ erreicht. Die chemische Analyse zeigt eine Glucoseabnahme von $12,4 \pm 0,9 \text{ mA m}^{-2}$ in 90 h und eine Acetoinzunahme um $9,87 \pm 0,21 \text{ mmol l}^{-1}$. Damit ergibt sich eine Ausbeute von $79,0 \pm 7,5 \%$ des theoretischen Maximums und eine Produktivität von $11,70 \pm 0,25 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Die CE liegt bei $84,4 \pm 4,1 \%$. Der Redoxzustand des Mediators war im gesamten Verlauf des Experiments oxidiert. Zudem konnte im Vergleich zum Fermentationsprozess im 250 ml-Reaktor die Verfügbarkeit von Metylenblau im Überstand erhöht werden. Abbildung 3.3 zeigt vollständig oxidierte Proben zu den Zeitpunkten 0, 24, 48, 72 h der Fermentation im Mini-Reaktor im Vergleich zur Fermentation im 250 ml-Reaktor. Es ist zu erkennen, dass die Proben des Mini-Reaktors über den gesamten Zeitraum Metylenblau im Überstand enthalten.

3. Ergebnisse



Abbildung 3.3.: Proben der Elektrofermentationen im Mini-Reaktor und 250 ml-Reaktor zu den Zeitpunkten 0 (Mini-Reaktor repräsentativ für beide), 24, 48 und 72 h.

Auch in diesem Ansatz wurde ein Kontroll-Experiment mit offenem Stromkreis durchgeführt (Abbildung 3.4). Das gemessene Potential fällt in zwei Stufen von -187 ± 2 mV auf -288 ± 8 mV und dann auf -381 ± 26 mV ab. Die chemische Auswertung dieses Experiments zeigt keine messbare Abnahme von Glucose und eine Zunahme der Acetoinkonzentration von $1,27 \pm 0,03$ mmol l⁻¹ in 90 h.

Mit diesen Experimenten konnte erfolgreich ein System zur Elektrofermentation von Acetoin in *E. coli* etabliert werden, in welchem der Stoffwechsel nahezu ausschließlich in Interaktion mit der Elektrode erfolgt. Zur Evaluation des Mini-Reaktorsystems, insbesondere im Hinblick auf die Nutzung der zur Verfügung stehenden Elektrodenfläche, wurde auf ein weiteres Reaktorsystem zurückgegriffen, in welche der Elektrolyt im inneren der Elektrode bewegt wird.

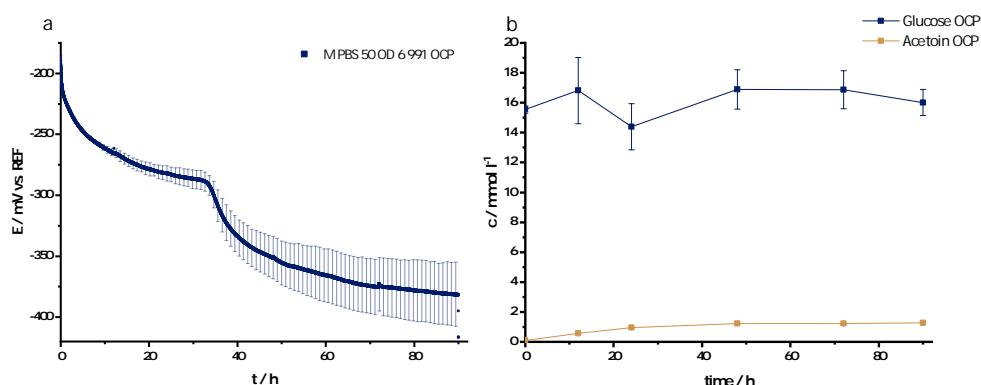


Abbildung 3.4.: *open-circuit*-Fermentation von JG991 im Mini-Reaktor. **a** Leerlaufpotential E und **b** chemische Analyse im zeitlichen Verlauf über 90 h.

3.3. Elektrofermentation mit Durchflusselektrode im Pumpreaktor

Das in der Elektrofermentation eingesetzte Elektrodenmaterial ist ein feinfaseriges dreidimensionales Graphit-Vlies. Die Struktur bringt eine hohe spezifische Oberfläche mit sich ($S_V = 36 \text{ m}^2 \text{ l}^{-1}$). Der mit der Arbeitsgruppe von Prof. Kerzenmacher entwickelte (Abt. Umweltverfahrenstechnik - Universität Bremen) und in Abschnitt 2.4.3 beschriebene Reaktortyp soll es ermöglichen die innere Oberfläche möglichst effizient zu nutzen und die Identifizierung vorhandener Limitierungen etwa durch Diffusion des Mediator zwischen Zelloberfläche und Elektrode ermöglichen. Hierzu wurde der Elektrolyt mit Hilfe einer Peristaltikpumpe durch einen Stapel von Elektroden Scheiben gesaugt und wieder zurück in das Reaktorgefäß geführt. Die Förderleistung der Pumpe beträgt $455 \pm 14 \text{ ml min}^{-1}$. Um Vergleichbarkeit zwischen den Reaktormodellen zu gewährleisten, wurde die Stromstärke auf die BET-Oberfläche (nach S. Brunauer, P. Emmett und E. Teller; vgl. Abschnitt 2.7.1) der verbauten Elektrode normiert (j_{BET}). Für das verwendete Material GFD 2,5 beträgt diese laut Hersteller $0,4 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$.

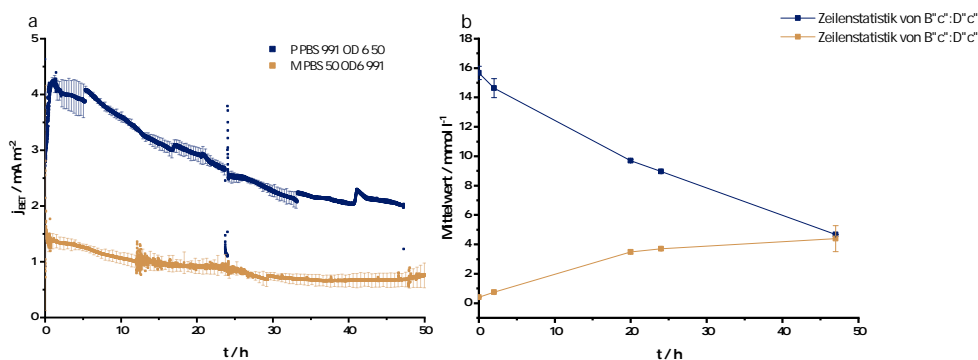


Abbildung 3.5.: Elektrofermentation mit JG991 im Pumpreaktor. **a** BET- Stromdichte (j_{BET}) und **b** chemische Analyse im zeitlichen Verlauf über 48 h. Zum Vergleich ist die Fermentation im Minireaktor unter identischen Bedingungen gezeigt (gelb).

Die Fermentation wurde unter den selben Bedingungen durchgeführt, wie das Experiment in Abschnitt 3.2. Die Ergebnisse der Elektrofermentation sind in Abbildung 3.5 gezeigt. Die chronoamperometrische Messung (Abbildung 3.5a) zeigt einen raschen Anstieg der Stromdichte innerhalb der ersten 2 h bis zu einem Maximum von $4,28 \pm 0,05 \text{ mA m}^{-2}$ und fällt anschließend im weiteren zeitlichen Verlauf ab. Nach 48 h liegt die Stromdichte bei $2,06 \pm 0,17 \text{ mA m}^{-2}$. Die durchschnittliche Stromdichte in den ersten 24 h liegt bei $3,43 \pm 0,02 \text{ mA m}^{-2}$. Zum Vergleich ist die BET-Stromdichte des analogen Experimentes aus Abschnitt 3.2 gezeigt. Abbildung 3.5b zeigt die chemische Analyse des Experimentes. Im Zeitraum von 24 h wurden $6,45 \pm 0,11 \text{ mmol l}^{-1}$ Glucose verbraucht und $3,29 \pm 0,06 \text{ mmol l}^{-1}$ Acetoin gebildet. Die Produktivität lag in den ersten 24 h bei

$12,08 \pm 0,24 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Die Ausbeute von Acetoin beträgt damit $50,95 \pm 0,11 \%$. Die CE liegt bei $103,7 \pm 1,7 \%$.

Aufgrund der höheren BET-Stromdichte im Pumpreaktor, kann im Mini-Reaktor auf eine Limitierung durch die gewählten Fermentationsbedingungen limitierten Prozess geschlossen werden. Um diese Limitierungen abzubauen zu können, soll im nächsten Schritt daher der Einfluss einzelner zentraler Parameter der Fermentation identifiziert werden.

3.4. Untersuchung der Fermentationsbedingungen

Ziel dieser Untersuchungen war die Charakterisierung der Bedingungen der Elektrofermentation. Anschließend sollte hieraus ein Optimum für die Produktion von Acetoin abgeleitet werden. Zu diesem Zweck wurden einzelne Parameter und deren Einfluss auf die Physiologie des Produktionsstammes beziehungsweise auf den Fermentationsprozess untersucht.

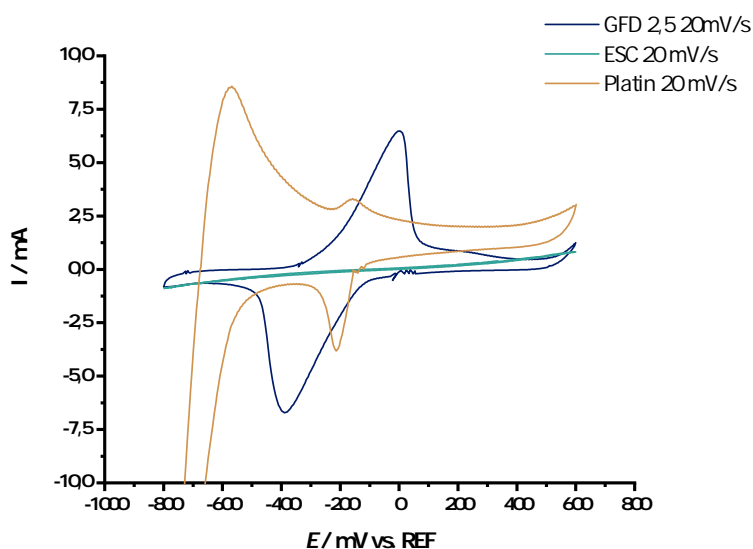


Abbildung 3.6.: Cyclovoltammetrie von $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ Methyleneblau mit drei verschiedenen Elektrodenmaterialien. blau: Graphit-Vlies türkis: *electro spun carbon* (ESC) gelb: Platin

3.4.1. Einfluss des Elektrodenmaterials

Der erste Arbeitsschritt zielte darauf ab, die Eignung des verwendeten Elektrodenmaterials für die Katalyse der Oxidation von Methyleneblau zu evaluieren. Zu diesem Zweck wurden drei Elektrodenmaterialien in abiotischen Cyclovoltammetrie Experimenten untersucht. Getestet wurden das bereits in den vorangegangenen Experimenten verwendete Graphit-Vlies (GFD 2,5), ein Platinnetz, sowie ein elektrogenesponnenes Carbonmaterial (ESC). Aufgrund der Materialeigenschaften von ESC diente als Versuchsaufbau der 250-ml-Reaktor. Von beiden Kohlenstoffmaterialien, wurden je 40 cm^2 verbaut. Im Falle von

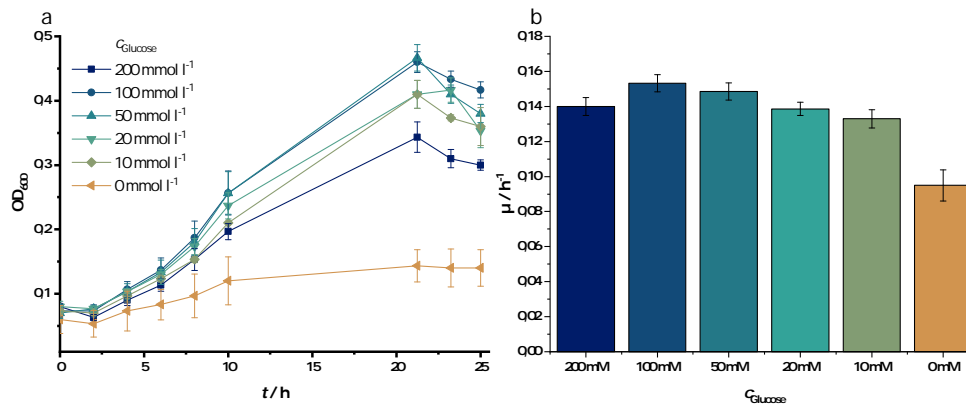


Abbildung 3.7.: Anaerobes Wachstum von JG991 mit $40 \text{ mmol l}^{-1} \text{ NO}_3^-$ als Elektronenakzeptor in PBS-Medium mit variabler Glucosekonzentration zwischen 0 und 200 mmol l^{-1} . **a** Wachstumskurven über 25 h und **b** Wachstumsraten zu **a**.

Platin wurden 2 cm^2 verbaut. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.6 gezeigt. Im Falle des GFD-Materials, zeigt sich bei einer Scanrate von 20 mV s^{-1} ein Oxidationspeak von $6,48 \text{ mA}$ bei einem Potential von $0,78 \text{ mV}$. Der reduktive Peak bei $-389,52 \text{ mV}$ hat eine Höhe von $-6,72 \text{ mA}$. Für Platin sind zwei oxidative Peaks zu erkennen, einer bei $-566,61 \text{ mV}$ mit einer Höhe von $8,57 \text{ mA}$ und ein weiterer bei $-158,18 \text{ mV}$ mit einer Höhe von $3,31 \text{ mA}$. Im reduktiven Scan zeigt das Voltammogramm mit Platin einen Peak bei $-213,62 \text{ mV}$ mit einer Höhe von $-3,82 \text{ mA}$, sowie im Bereich von unter -450 mV eine stark ansteigende Stromantwort bis zum Ende des Scanbereichs. Bei dem verwendeten ESC konnte kein Oxidations- oder Reduktionspeak festgestellt werden.

Die Untersuchung zeigte, dass unter den getesteten Materialien, das bereits verwendete GFD 2,5 den höchsten Umsatz für Methylenblau zeigt. Die Experimente wurden daher im Folgenden auch weiterhin mit diesem Material durchgeführt.

3.4.2. Anpassung des Fermentationsmediums

Im nächsten Schritt sollte die Zusammensetzung des Mediums, beziehungsweise des Elektrolyts untersucht werden. Hierzu wurden zunächst der Einfluss der Mediensupplementierung sowie der Glucosekonzentration auf das anaerobe Wachstum untersucht und anschließend daraus abgeleitete Formulierungen mit PO_4^{3-} , HEPES- und MOPS-Puffer auf ihre elektrochemischen Eigenschaften hin untersucht.

3.4.2.1. Einfluss der Glucosekonzentration auf den anaeroben Metabolismus

Zur Bestimmung der Glucoseabhängigkeit der anaeroben Stoffwechselrate von JG991 und zur Ermittlung einer optimalen Glucosekonzentration für die Elektrofermentation wurden anoxische Wachstumsversuche in PBS-Minimalmedium mit $40 \text{ mmol l}^{-1} \text{ NO}_3^-$ als Elektronenakzeptor durchgeführt. Die Wachstumskurven (Abbildung 3.7a) zeigen

eine geringe Abhängigkeit im Wachstum zwischen 10 und 200 mmol l⁻¹. Die maximale OD₆₀₀ erreicht bei 50 und 100 mmol l⁻¹ mit jeweils 0,466 ± 0,034 einen geringfügig höheren Wert als in den anderen drei Ansätzen. Der Ansatz mit 200 mmol l⁻¹ erreicht die geringste Zelldichte mit 0,343 ± 0,024. Deutlich verschieden verhält sich der Ansatz ohne Glucose mit Wachstum zu einem Höchstwert von 0,140 ± 0,029. Die Berechnung der Wachstumsrate (Abbildung 3.7b) spiegelt dieses Ergebnis wieder. Zwischen 200 und 10 mmol l⁻¹ bestehen keine signifikanten Unterschiede in der Rate. Es lässt sich jedoch eine schwache Tendenz zu niedrigeren Wachstumsraten bei höchster und niedrigster Glucosekonzentrationen erkennen. Die Wachstumsrate ohne Glucose hingegen liegt mit 0,095 ± 0,009 h⁻¹ deutlich unter den anderen Ansätzen. Diese erreichen Werte zwischen 0,133 ± 0,005 und 0,153 ± 0,005 h⁻¹.

3.4.2.2. Einfluss der Aminosäurequelle auf den anaeroben Metabolismus

Die heterologe Expression der *c*-Typ Cytochrome sowie der Acetoin-Gene stellt mutmaßlich eine hohe anabole Belastung dar. Gleichzeitig fällt, durch den stark eingeschränkten Katabolismus aufgrund der Deletion von Genen der gemischten Säuregärung, die Energieausbeute des Stoffwechsel deutlich geringer aus. Es wurde daher untersucht, ob die Supplementation des Mediums mit einer komplexeren Quelle für Aminosäuren vorteilhaft für den anaeroben Metabolismus ist. Zudem sollte untersucht werden, ob durch Zugabe von Acetat der stark verlangsamte Metabolismus des Produktionsstammes wieder beschleunigt werden kann.

In anoxischen Wachstumsversuchen in PBS-Medium mit 40 mmol l⁻¹ NO₃⁻ und 10 mmol l⁻¹ Glucose wurde daher der Einfluss der Supplementation von Casein Hydrolysat (PBS C), Hefeextrakt (PBS H) und Hefeextrakt mit 5 mmol l⁻¹ Natriumacetat (PBS HA) auf den anaeroben Stoffwechsel von JG991 untersucht. Als Kontrollexperiment wurde ein Ansatz ohne Supplementation (PBS -) kultiviert.

Abbildung 3.8a zeigt das Wachstum der vier Ansätze. Im Experiment ohne Supplementation ist kein Wachstum zu erkennen. Gegenüber der Supplementation mit Casein Hydrolysat, wachsen die Ansätze mit Hefeextrakt 1,54x schneller. PBS C erreicht eine Wachstumsrate von 0,133 ± 0,011 h⁻¹. PBS H und PBS HA erreichen jeweils eine Wachstumsrate von 0,205 ± 0,015 h⁻¹ (Abbildung 3.8b). Die zusätzliche Supplementation von Natriumacetat hat weder auf Wachstumsrate noch maximale optische Dichte einen Einfluss.

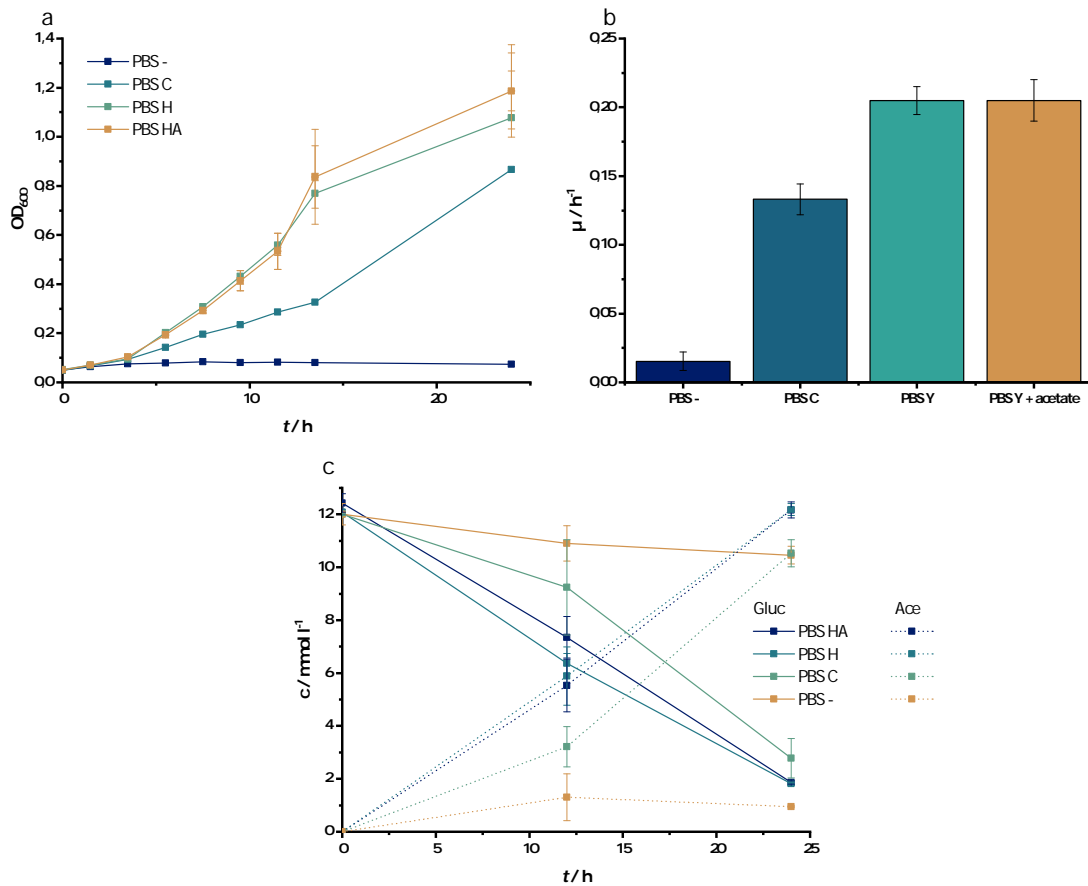


Abbildung 3.8.: Anaerobes Wachstum von JG991 in PBS-Medium mit $40 \text{ mmol l}^{-1} \text{ NO}_3^-$ als Elektronenakzeptor und variabler Supplementation. **a** Wachstumskurve über 24 h und **b** Wachstumsraten zu **a**. **c** Chemische Analyse der anoxischen Wachstumsversuche. – - ohne Supplementation; C - Casein Hydrolysat; H - Hefeextrakt; HA - Hefeextrakt + 5 mmol l^{-1} Natriumacetat.

Tabelle 3.1.: Acetoin-Ausbeuten (Y_{Ace}) der anaeroben Wachstumsexperimente mit JG991 in PBS-Medium bei unterschiedlicher Supplementation.

Ansatz	Y_{Ace}
PBS –	$61,72 \pm 5,56 \%$
PBS C	$102,6 \pm 8,8 \%$
PBS H	$115,3 \pm 9,4 \%$
PBS HA	$115,1 \pm 10,2 \%$

Die chemische Auswertung dieses Experimentes (Abbildung 3.8c) zeigt eine sehr gute Korrelation zwischen Wachstumsrate und Stoffumsatz. Während im Ansatz PBS – in 24 h nur $1,54 \pm 0,10 \text{ mmol l}^{-1}$ Glucose zu $0,95 \pm 0,02 \text{ mmol l}^{-1}$ Acetoin umgesetzt werden, verbraucht der Ansatz PBS C $9,23 \pm 2,40 \text{ mmol l}^{-1}$ Glucose und bildet daraus $10,53 \pm 0,51 \text{ mmol l}^{-1}$ Acetoin. In PBS H und PBS HA werden $10,26 \pm 0,38 \text{ mmol l}^{-1}$ und $10,56 \pm 0,67 \text{ mmol l}^{-1}$ Glucose zu $12,18 \pm 0,23 \text{ mmol l}^{-1}$ und $12,16 \pm 0,31 \text{ mmol l}^{-1}$ Acetoin umgesetzt. Die Acetoin-Ausbeuten sind in Tabelle 3.1 angegeben.

3.4.2.3. Einfluss der Medienformulierung auf die Kinetik von Methylenblau an Graphit

Die Untersuchung der Puffersubstanzen für das Fermentationsmedium erfolgte nach elektrochemischen Gesichtspunkten. Hierbei war vor allem der Einfluss des Puffers auf die Elektrodenkinetik von Methylenblau von Interesse. Zu diesem Zweck wurden Cyclovoltammogramme von Methylenblau in Medienformulierungen mit PO_4^{3-} , HEPES und MOPS als Puffersubstanzen untersucht. In einem zweiten Schritt wurden anschließend auch der Einfluss von Casein Hydrolysat, Hefeextrakt und Glucose auf die Kinetik der Oxidation und Reduktion von Methylenblau untersucht.

Abbildung 3.9a zeigt die Cylovoltammogramme von $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ Methylenblau in den drei getesteten Puffern im Potentialbereich von -700 mV bis 600 mV bei einer Scanrate von $7,5 \text{ mV s}^{-1}$. In allen drei Voltammogrammen ist sowohl am negativen Rand wie auch am positiven Rand ein Anstieg der Stromantwort zu erkennen. Auffällig ist das Auftreten zweier weiterer Peaks im Falle des PO_4^{3-} -Puffers. Ein Oxidationspeak wurde bei 500 mV gemessen und ein Reduktionspeak bei -350 mV . Dieser überlagert teilweise den Reduktionspeak von Methylenblau. In **b** ist der Potentialbereich des Oxidationspeak von Methylenblau vergrößert. Die drei Puffersystem zeigen leicht unterschiedliche Maxima. Für PO_4^{3-} liegt der Peak bei -179 mV mit einer Stromstärke von $0,651 \text{ mA}$. Bei HEPES ist das Maximum zu -159 mV verschoben bei einer Stromstärke von $0,608 \text{ mA}$. Mit MOPS als Puffer liegt der Peak bei -139 mV mit einer maximalen Stromdichte von $0,703 \text{ mA}$.

In Abbildung 3.10 sind nun die aus den Experimenten in Abschnitt 3.4.2.2 und 3.4.2.1 abgeleiteten Medienformulierungen mit den drei Puffersubstanzen gezeigt (**a** PO_4^{3-} , **b** MOPS,

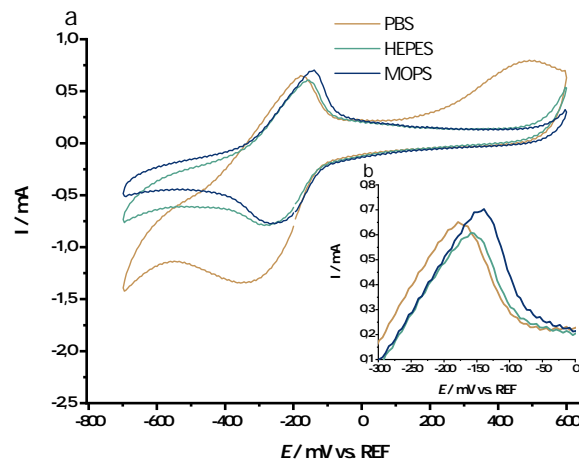


Abbildung 3.9.: Cyclovoltammogramme von $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ Methylenblau an GFD $2,5$ (8 cm^2) in PO_4^{3-} , HEPES- und MOPS-gepuffertem Medium. **a** ganzer Potentialbereich, **b** Vergrößerung auf den oxidativen Peak.

c HEPES). Es ist zu erkennen, dass im Falle von PO_4^{3-} und MOPS die Oxidation von Methylenblau weder durch die Zugabe von Glucose noch durch die Anwesenheit von Hefeextrakt wesentlich beeinflusst wird. Im Falle von HEPES verschiebt sich der Oxidations- und auch der Reduktionspeak in Anwesenheit von Glucose um 60 mV zu positiveren Potentialen. Abbildung 3.10d zeigt die oxidativen Peaks im Vergleich zwischen den Puffersubstanzen jeweils mit Hefeextrakt und Glucose. Es ist zu erkennen, dass der MOPS-Puffer wie zuvor auch, die höchste Stromdichte ($0,713 \text{ mA}$) für die Oxidation von Methylenblau (-150 mV) liefert. Gegenüber dem bisher verwendeten PO_4^{3-} -Puffer ($0,627 \text{ mA}$) entspricht das einer Steigerung von $13,7 \%$. Der Ansatz mit HEPES erreicht eine Peakhöhe von $0,531 \text{ mA}$ bei einem Potential von -99 mV .

Aus den hier durchgeführten Untersuchungen, wurde eine angepasste Medienformulierung für die Elektrofermentation abgeleitet, welche sowohl den physiologischen Anforderungen des Produktionsstammes, wie auch den elektrochemischen Gegebenheiten im Reaktor Rechnung trägt. Im folgenden wird daher das Puffersystem auf 15 mmol l^{-1} MOPS umgestellt und das Medium mit 50 mmol l^{-1} Glucose und 1 g l^{-1} Hefeextrakt supplementiert (vgl. Tabelle 3.2).

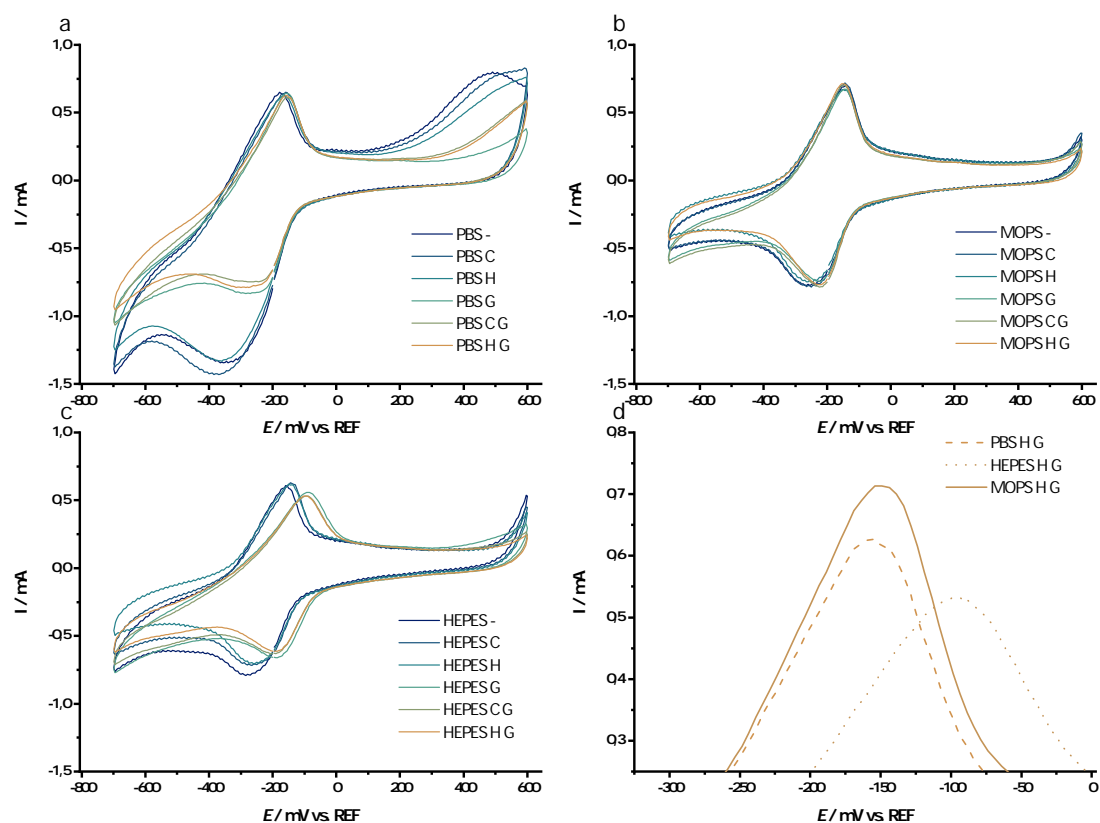


Abbildung 3.10.: Cyclovoltammogramme von $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ Methylenblau an GFD 2,5 (8 cm^2) in **a** PO_4^{3-} -, **b** HEPES- und **c** MOPS-gepuffertem Medium. **c** Vergleich der oxidativen Peaks zwischen den drei Puffersystemen mit Zusatz von Hefeextrakt und Glucose. – - ohne Supplementation; C - Casein Hydrolysat; H - Hefeextrakt; G - Glucose

Tabelle 3.2.: Vergleich der Fermentationsansätze mit angepasstem Medium und kontrolliertem pH-Wert.

Komponente	M PBS 50 OD6 991	M M 50 OD6 991	M M 50 OD6 991 pH
Puffer	PO ₄ ³⁻ (11,76 mmol l ⁻¹)	MOPS (15 mmol l ⁻¹)	MOPS (15 mmol l ⁻¹)
c _{Glucose}	20 mmol l ⁻¹	50 mmol l ⁻¹	50 mmol l ⁻¹
Aminosäurequelle (1 g l ⁻¹)	Casein Hydrolysat	Hefeextrakt	Hefeextrakt
pH-Kontrolle	-	-	+

3.4.3. Elektrofermentation mit angepasstem Medium und Kontrolle des pH-Wertes

In diesen Experimenten sollte der Einfluss der in Abschnitt 3.4.2 abgeleiteten Formulierung des Mediums auf die Elektrofermentation untersucht werden. In einem zweiten Schritt wird der pH-Wert in den ersten 8 h Stunden der Fermentation kontrolliert und auf einem Wert zwischen 6,8 und 7,4 gehalten. Die Unterschiede in den drei Ansätzen sind in Tabelle 3.2 gezeigt.

Die Stromdichte der Elektrofermentation ist in Abbildung 3.11a gezeigt. Zum Vergleich ist zudem die Messung aus Abschnitt 3.2 gezeigt. Es ist zu sehen, dass das angepasste Medium zu einer höheren Stromdichte führt. Nach 1,65 h wird das Maximum von $200,1 \pm 16,1 \text{ mA m}^{-2}$ erreicht. Im weiteren Verlauf des Experimentes sinkt die Stromdichte bis zu einem Wert von $112,0 \pm 23,8 \text{ mA m}^{-2}$ nach 24 h ab. Im Experiment mit zusätzlicher pH-Kontrolle durchläuft die Stromdichte ebenfalls ein Maximum, nach 1,43 h liegt die Stromdichte bei $327,3 \pm 88,7 \text{ mA m}^{-2}$. Nach 24 h wird ein Wert von $127,2 \pm 40,6 \text{ mA m}^{-2}$ erreicht. Die mittlere Stromdichte innerhalb der ersten 8 Stunden liegt bei $170,8 \pm 8,2 \text{ mA m}^{-2}$ für die Fermentation im angepassten Medium bei $244,2 \pm 48,2 \text{ mA m}^{-2}$ (Abbildung 3.11b). Gegenüber dem Vergleichsexperiment entspricht das einer Beschleunigung um Faktor 1,47 beziehungsweise 2,11. Der Verlauf des pH-Wertes in der Fermentation ohne eine Kontrolle nimmt in den ersten 6 h stark ab und erreicht nach 24 h einen Wert von 4,8. Im folgenden werden daher alle Experimente bei kontrolliertem pH-Wert und mit angepasstem Medium durchgeführt, sofern nicht abweichend spezifiziert.

3. Ergebnisse

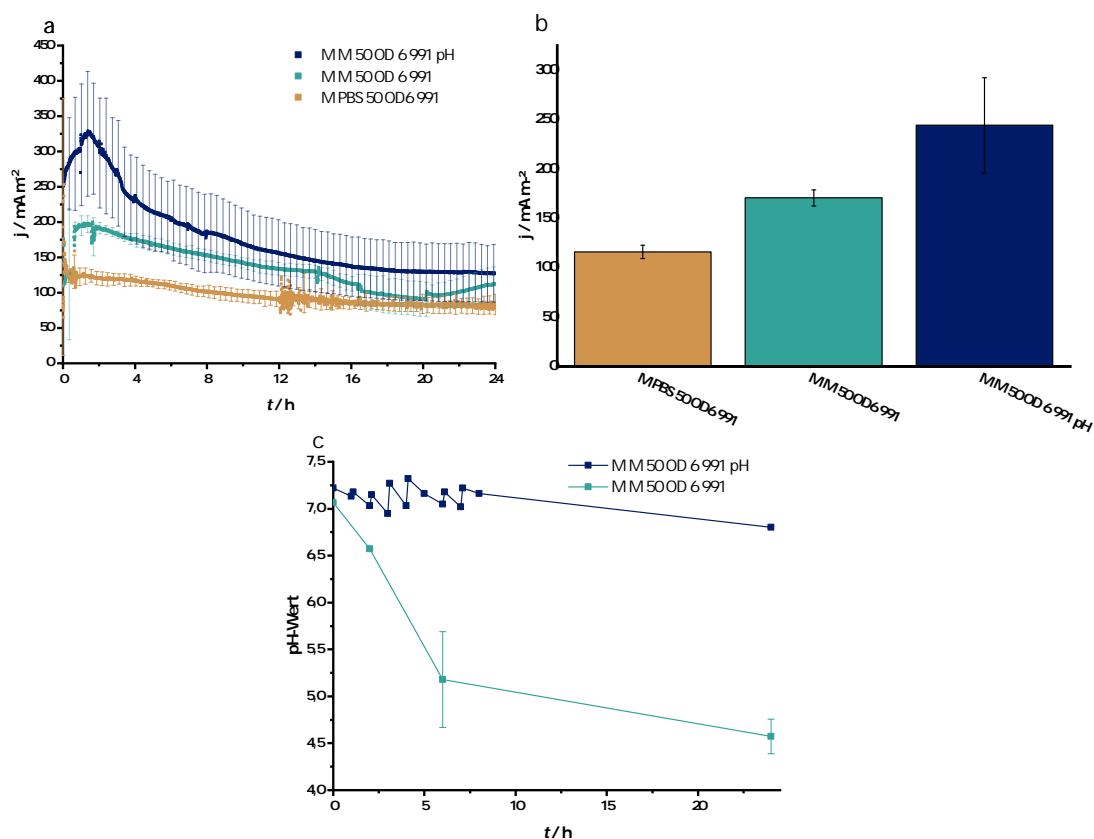


Abbildung 3.11.: Vergleich der Stromdichte zwischen PO_4^{3-} - und MOPS-gepuffertem Medium (mit und ohne Kontrolle des pH-Wertes) während der Elektrofermentation von JG991 im Mini-Reaktor. **a** Stromdichte im zeitlichen Verlauf über 90 h und **b** mittlere Stromdichte der ersten 8 h. **c** Verlauf des pH-Werts während der Elektrofermentation mit und ohne Kontrolle des pH-Wertes

3.4.4. Einfluss der Mediatorkonzentration

Im Minireaktor sorgt ein Magnetrührer in der Mitte von Reaktor und Elektrode für Konvektion des Elektrolyts. Allerdings befinden sich rund 40 % des Elektrolytvolumens innerhalb der Graphitelektrode. Es ist daher anzunehmen, dass innerhalb der Elektrode selbst der Transport des Mediators zwischen Zelloberfläche und Elektrodenoberfläche maßgeblich auf Diffusion beruht.

$$J = -D \frac{\partial c}{\partial x} \quad (3.1)$$

J Teilchenstromdichte
D Diffusionskoeffizient
c Konzentration
x Diffusionsstrecke

Da nach dem ersten Fick'schen Gesetz (Glg. 3.1) der Teilchenstrom proportional vom Konzentrationsgradienten abhängt, sollte in diesem Fall und im Fall unzureichender Konvektion die Fermentationsgeschwindigkeit von der Mediatorkonzentration abhängen. Ziel dieser Untersuchung war es daher zunächst, den physiologischen Einfluss von Methylblau auf den Stoffwechsel des Produktionsstammes zu ermitteln und anschließend unter Berücksichtigung der Reduktionskapazität des Fermentationsstammes eine geeignete Mediatorkonzentration für die Elektrofermentation abzuleiten.

3.4.4.1. Physiologischer Einfluss von Methylblau

Methylblau kann aufgrund seiner Membrangängigkeit von vielen Mikroorganismen reduziert werden (Roller u. a. 1984). In der Regel geht dies jedoch mit Einbußen in der metabolischen Aktivität einher (Wainwright u. a. 2002). Um den Einfluss von Methylblau auf den Stoffwechsel des Produktionsstammes unabhängig von einer respiratorischen Abhängigkeit zu untersuchen, wurden Wachstumsversuche unter oxidischen Bedingungen mit ansteigenden Konzentrationen zwischen 0 und 200 $\mu\text{mol l}^{-1}$ Methylblau durchgeführt.

Das Ergebnis der Wachstumsversuche ist in Abbildung 3.12a gezeigt. Es ist zu erkennen, dass mit ansteigender Methylblaukonzentration das Wachstum deutlich verlangsamt wird. Die Auftragung der Wachstumsraten (Abbildung 3.12b) gegen die Konzentration spiegelt dies wieder. Die Wachstumsrate nimmt oberhalb von 7,5 $\mu\text{mol l}^{-1}$ stetig ab. Für 200 $\mu\text{mol l}^{-1}$ ist diese um rund 80 % verringert.

3. Ergebnisse

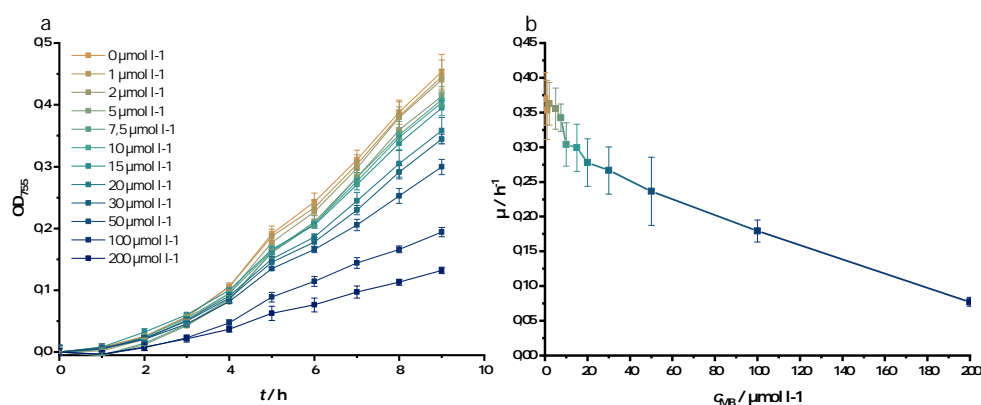


Abbildung 3.12.: Aerobes Wachstum von JG991 mit ansteigender Konzentration von Methylenblau. **a** zeitlicher Verlauf der OD_{755} über 9 h. Die Messwerte sind jeweils um den Startwert subtrahiert. **b** Wachstumsraten μ zu **a**.

Um den Effekt von Methylenblau auf den anaeroben Metabolismus zu untersuchen wurden Wachstumsversuche in anoxischen Kulturröhrchen mit 40 mmol l^{-1} DMSO als Elektronenakzeptor durchgeführt. Die Ansätze wurden mit Methylenblau zu Konzentrationen zwischen 0 und 100 $\mu\text{mol l}^{-1}$ versetzt. Da Methylenblau bei höheren Konzentrationen in einem breiten Wellenlängenbereich nicht zu vernachlässigende Absorption aufweist, wurde die OD Messung bei 850 nm durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.13a gezeigt. Die Kulturen erreichen nach 170 h Wachstum Dichten zwischen $0,150 \pm 0,026$ und $0,136 \pm 0,015$. Die Berechnung der Wachstumsraten (Abbildung 3.13b) zeigen, dass das Wachstum allgemein um eine Größenordnung langsamer ist als unter oxidischen Bedingungen. Zudem ist im betrachteten Konzentrationsbereich kein signifikanter Unterschied zwischen den Ansätzen zu erkennen.

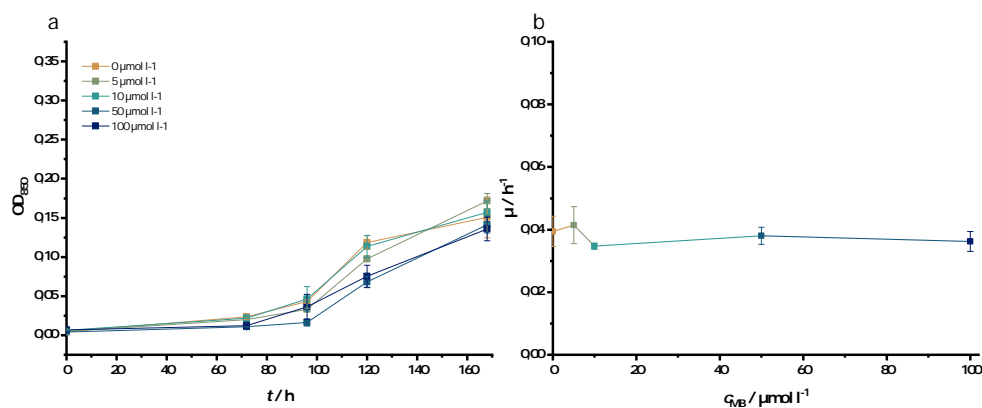


Abbildung 3.13.: Anaerobes Wachstum von JG991 in PBS-Minimalmedium mit 40 mmol l^{-1} DMSO als Elektronenakzeptor und ansteigender Methylenblaukonzentration. **a** Zeitlicher Verlauf der OD_{850} über 170 h. **b** Wachstumsraten μ zu **a** in Abhängigkeit von der Methylenblau-Konzentration.

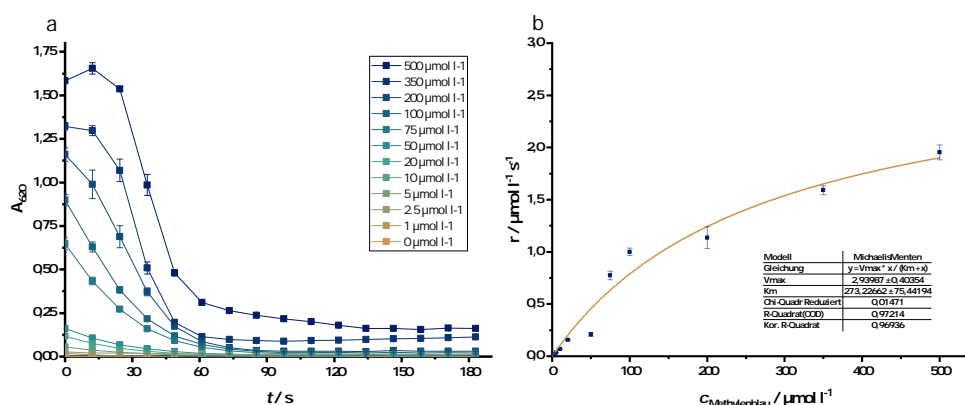


Abbildung 3.14.: Reduktionskinetik von Metylenblau mit JG991 in Zellsuspension ($OD_{600} = 6$). **a** Zeitlicher Verlauf der Absorption in Suspensionen mit 0 bis $500 \mu\text{mol l}^{-1}$ Metylenblau. **b** Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit r für die Reduktion von Metylenblau von dessen Konzentration. Anpassung nach Michaelis-Menten-Kinetik.

Unter den angestrebten Bedingungen während der Elektrofermentation sind die Zelldichten rund 20-40x höher als in den Wachstumsversuchen. Im nächsten Schritt soll daher noch das Reduktionsverhalten in Zellsuspension mit $OD_{600} = 6$ ohne zusätzlichen Elektronenakzeptor getestet werden.

3.4.4.2. Reduktionskinetik von JG991 für Metylenblau

Zur Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeit der Reduktionsrate von Metylenblau wurden Assays in einer Zellsuspension mit $OD_{600} = 6$ durchgeführt. Die zuvor, ohne Elektronenakzeptor, gewaschenen Zellen wurden in anoxische Atmosphäre in einer 96-Well Platte vorgelegt und dann mit Metylenblau-Lösung zu Konzentrationen zwischen 1 und $500 \mu\text{mol l}^{-1}$ versetzt (Abschnitt 2.3.4). Die Zeitprofile der Reduktion (Abbildung 3.14a) wurden nach t abgeleitet und jeweils die höchste Reduktionsrate gegen die Konzentration aufgetragen (Abbildung 3.14b). Der anschließende Fit an die Michaelis-Menten-Gleichung ergab einen K_M -Wert von $273,2 \pm 75,4 \mu\text{mol l}^{-1}$ Metylenblau und eine maximale Reduktionsrate von $2,94 \pm 0,40 \mu\text{mol s}^{-1}$.

Aus dieser Analyse lässt sich eine, für den K_M -Wert von $273 \mu\text{mol l}^{-1}$ eine 3,22x höhere Reduktionsrate erwarten. Im folgenden sollte dies unter Elektrofermentationsbedingungen untersucht werden.

3.4.4.3. Fermentation mit angepasster Metylenblaukonzentration

Die Untersuchung zum Einfluss der Mediatorkonzentration unter Elektrofermentationsbedingungen wurden in Übernahme der in Abschnitt 3.4.2 abgeleiteten Bedingungen durchgeführt. Die Fermentation erfolgte mit $273 \mu\text{mol l}^{-1}$ Metylenblau. Als Vergleich ist das entsprechende Experiment mit $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ Metylenblau gezeigt (vgl. Abschnitt 3.4.3).

3. Ergebnisse

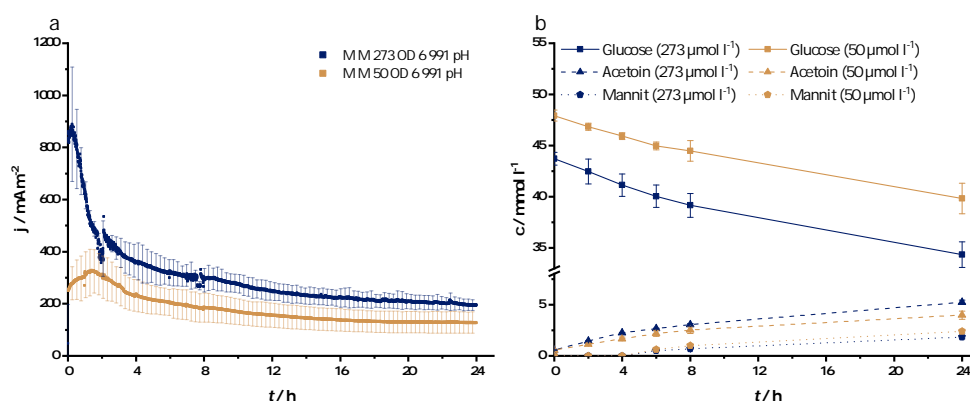


Abbildung 3.15.: Elektrofermentation mit JG991 im Minireaktor mit MOPS-Medium bei 50 und $273 \mu\text{mol l}^{-1}$ Methylenblau. **a** Zeitlicher Verlauf der Stromdichte über 24 h und **b** chemische Analyse des Experimentes.

Der zeitliche Verlauf der Stromdichte (Abbildung 3.15a) im Ansatz mit $273 \mu\text{mol l}^{-1}$ unterscheidet sich zu Beginn stark vom Ansatz mit $50 \mu\text{mol l}^{-1}$. Nach circa 20 min wird ein Maximum von $888,9 \pm 219,8 \text{ mA m}^{-2}$ erreicht. Im Falle von $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ wird ein Maximum nach $1,5$ h bei $327,6 \pm 87,1 \text{ mA m}^{-2}$ erreicht. In beiden Ansätzen nimmt die Stromstärke über den weiteren Verlauf ab und erreicht nach 24 h Werte von $195,2 \pm 21,7 \text{ mA m}^{-2}$ ($273 \mu\text{mol l}^{-1}$) und $127,1 \pm 40,6 \text{ mA m}^{-2}$ ($50 \mu\text{mol l}^{-1}$). Die mittlere Stromdichte über die ersten 8 h beträgt $420,1 \pm 43,7 \text{ mA m}^{-2}$ für die hohe Methylenblaukonzentration und $244,20 \pm 48,21 \text{ mA m}^{-2}$ für die niedrige Konzentration.

Die chemische Analyse zeigt für beide Ansätze ähnliche Verläufe. Im Falle von $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ wird in 8 h $3,45 \pm 0,41 \text{ mmol l}^{-1}$ Glucose zu $2,48 \pm 0,28 \text{ mmol l}^{-1}$ Acetoin umgesetzt. In der Fermentation mit $273 \mu\text{mol l}^{-1}$ wird im selben Zeitraum $4,55 \pm 0,58 \text{ mmol l}^{-1}$ Glucose verbraucht und $2,99 \pm 0,09 \text{ mmol l}^{-1}$ Acetoin gebildet. Zudem konnte beobachtet werden, dass Glucose teilweise zu Mannit reduziert wurde. Im $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ Ansatz wurde in 8 h $1,01 \pm 0,07 \text{ mmol l}^{-1}$ Mannit produziert. Der $273 \mu\text{mol l}^{-1}$ Ansatz weist $0,696 \pm 0,007 \text{ mmol l}^{-1}$ auf. Die Ausbeute von Acetoin beträgt für $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ $0,73 \pm 0,02 \text{ mol mol}^{-1}$ und für $273 \mu\text{mol l}^{-1}$ $0,67 \pm 0,07 \text{ mol mol}^{-1}$. Die Berechnung der Produktivität der beiden Fermentationen ist in Abbildung 3.16 dargestellt. Innerhalb von 8 h werden im $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ Ansatz $24,12 \pm 0,94 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ Acetoin erzeugt. Der $273 \mu\text{mol l}^{-1}$ Ansatz produziert $32,97 \pm 2,06 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Das entspricht einer Zunahme um $35,0 \pm 2,2 \%$.

Die ermittelten Unterschiede zwischen beiden Methylenblaukonzentrationen fielen geringer aus, als durch das kinetische Modell vorhergesagt. Eine Mögliche Erklärung könnte in einer mangelnden Reduktionsleistung des Produktionsstammes über größere Zeiträume als im Kinetik-Experiment liegen. Die Evaluation dessen erfolgte bei erhöhter Zelldichte.

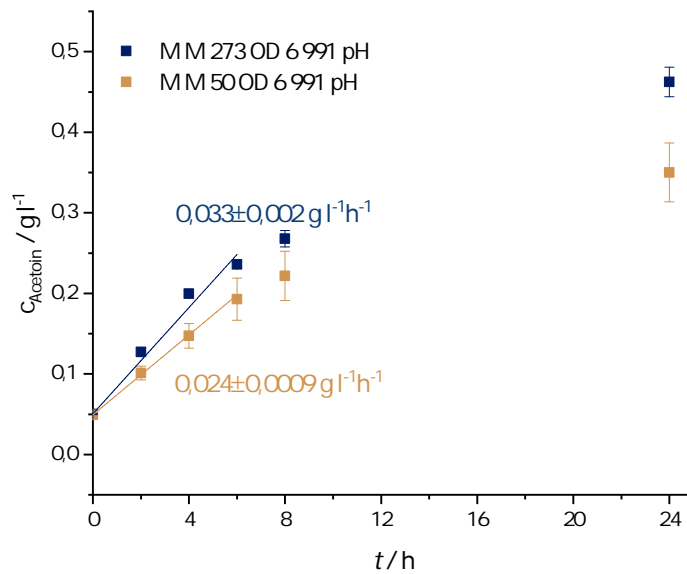


Abbildung 3.16.: Zeitlicher Verlauf der Produktion von Acetoin aus Abbildung 3.15b. Der Datensatz wurde zwischen 0 und 6 h linear angepasst. Die Steigung entspricht der Produktivität in $\text{g l}^{-1} \text{h}^{-1}$.

3.4.4.4. Fermentation mit erhöhter Zelldichte

Um zu ermitteln, in welchem Umfang die Reduktionsleistung des Produktionsstammes den Umsatz limitiert, wurde das Experiment mit einer Zelldichte von $\text{OD}_{600} = 30$ wiederholt.

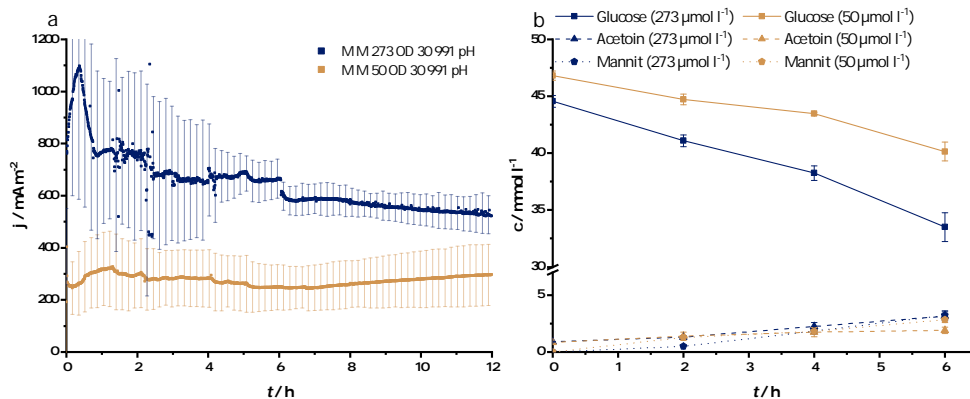


Abbildung 3.17.: Elektrofermentation von JG991 ($\text{OD}_{600} = 30$) im Mini-Reaktor in MOPS-gepuffertem Medium mit $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ und $273 \mu\text{mol l}^{-1}$ Methylenblau. **a** zeitlicher Verlauf der Stromdichte über 12 h und **b** chemische Analyse.

Die Stromdichte (Abbildung 3.17a) in diesem Experiment verhält sich in beiden Ansätzen deutlich verschieden, zu dem bisher beobachteten Verlauf. Zwar durchläuft die Stromdichte für $273 \mu\text{mol l}^{-1}$ auch hier nach circa 20 min ein Maximum ($1097 \pm 511 \text{ mA m}^{-2}$),

allerdings fällt sie danach weniger stark ab und erreicht nach 12 h einen Wert von $522,0 \pm 68,6 \text{ mA m}^{-2}$. Das Experiment mit $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ erreicht ein, zum $\text{OD}_{600} = 6$, vergleichbares Maximum von $326,9 \pm 147,9 \text{ mA m}^{-2}$ nach circa 1,3 h. Im weiteren Verlauf verringert sich die Stromdichte nur unwesentlich und erreicht nach 12 h einen Wert von $296,6 \pm 116,8 \text{ mA m}^{-2}$. Die mittlere Stromdichte über 6 h erreicht damit einen Wert von $279,1 \pm 88,9 \text{ mA m}^{-2}$ und $690,7 \pm 162,0 \text{ mA m}^{-2}$.

Die chemische Analyse (Abbildung 3.17b) zeigt einen für den $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ einen Glucoseumsatz von $6,67 \pm 0,98 \text{ mmol l}^{-1}$ und eine Acetoinbildung von $1,90 \pm 0,24 \text{ mmol l}^{-1}$ in 6 h. Der Ansatz mit $273 \mu\text{mol l}^{-1}$ Metylenblau verbraucht in der selben Zeit $11,05 \pm 1,09 \text{ mmol l}^{-1}$ Glucose und produziert $3,15 \pm 0,32 \text{ mmol l}^{-1}$ Acetoin. In beiden Fermentationen fällt Mannit an, $3,23 \pm 0,32 \text{ mmol l}^{-1}$ mit $273 \mu\text{mol l}^{-1}$ Metylenblau und $2,84 \pm 0,20 \text{ mmol l}^{-1}$ mit $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ Metylenblau.

Die Produktivität für Acetoin liegt damit bei $27,92 \pm 3,45 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($50 \mu\text{mol l}^{-1}$) und $46,20 \pm 0,47 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($273 \mu\text{mol l}^{-1}$).

Die Ergebnisse mit $\text{OD}_{600} = 30$ legen nahe, dass bei hoher Mediatorkonzentration, die Reduktionskapazität des Produktionsstammes hauptsächlich limitierend für den Gesamtprozess ist. In den folgenden Abschnitten wurde daher die Physiologie des Produktionsstammes genauer untersucht.

3.5. Untersuchung der Physiologie des Produktionsstammes

Ausgangspunkt für die Untersuchungen zur Physiologie des Produktionsstammes sind die in Abbildung 1.4 auf Seite 13 gezeigten Wachstumsversuche. In der Genese des 4x *knock-out*-Stammes nimmt die Wachstumsrate, sowohl mit NO_3^- als auch mit DMSO als Elektronenakzeptor, erwartungsgemäß sukzessive ab. Unerwartet war jedoch die extreme Auswirkung durch die Deletion der Gene für die Phosphotransacetylase (*pta*) und die Acetatkinase (*ack*) auf den NO_3^- -atmenden Stoffwechsel. Die Wachstumsrate verringert sich auf rund 10 % des Wildtyp Niveaus.

Das Ziel der folgenden Untersuchungen bestand zum einen darin, zu klären in welcher Form der Stoffwechsel durch die Modifikationen der gemischten Säuregärung und der heterologen Genexpression beschränkt wird. Zum anderen sollten diese Beschränkungen anschließend möglichst aufgehoben werden, mit dem Ziel die Elektrofermentation zu beschleunigen.

3.5.1. Zufallsmutagenese mit NO_3^- als Elektronenakzeptor

Um weitere Hinweise auf eventuell vorhandene Limitierungen im anaeroben Metabolismus des Produktionsstammes zu erhalten wurde ein Mutagenese Experiment mit NO_3^- haltigem Selektionsmedium durchgeführt. Hierbei wurden Zellen des *knock-out* Stammes in anoxischen Kulturröhrchen sequentiell propagiert. Während des Experimentes wurde auf anaerobes Wachstum selektiert, indem jeweils der Ansatz mit der höchsten Teilungsrate transferiert und die anderen verworfen wurden.

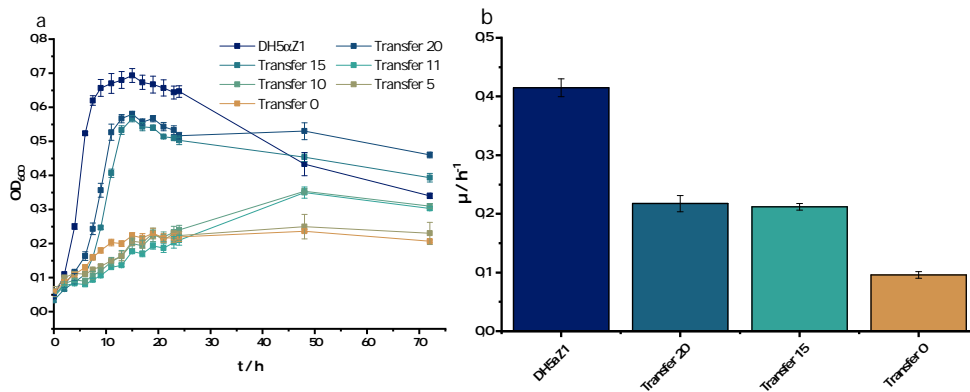


Abbildung 3.18.: Anaerobes Wachstum von JG878 Transfer 0, 5, 10, 15 und 20 aus dem Mutagenese Experiment mit NO_3^- als Elektronenakzeptor. Als Vergleich ist das Wachstum von *E. coli* DH5 α Z1 gezeigt. **a** Wachstumskurve über 72 h mit 20 mmol l^{-1} Glucose und 40 mmol l^{-1} KNO_3 . **b** Wachstumsraten zu **a** für Transfer 0, 15, 20 und DH5 α Z1.

3.5.1.1. Selektion auf NO_3^- -Atmung

Ziel des Experiments war es, mit Hilfe eines unter anoxischen Bedingungen, schnell wachsenden Phänotypes, einschränkende Zweige des anaeroben Stoffwechsels zu identifizieren und deren Einfluss auf die Elektrofermentation zu untersuchen. Die Selektion auf NO_3^- -Medium führte nach 15 Transfers zu einem Stamm mit deutlich beschleunigtem Wachstum (Abbildung 3.18). Von Transfer 0 steigert sich die Wachstumsrate von $0,096 \pm 0,006 \text{ h}^{-1}$ auf $0,212 \pm 0,005 \text{ h}^{-1}$ bei Transfer 15 und $0,217 \pm 0,013 \text{ h}^{-1}$ bei Transfer 20. Dies entspricht einer Steigerung um Faktor 2,2. *E. coli* DH5 α Z1 erreicht eine Rate von $0,414 \pm 0,015 \text{ h}^{-1}$. Neben dem schnelleren Wachstum lässt sich auch erkennen, dass die Kulturen zu wesentlich höheren Zelldichten anwachsen. So liegt die maximale Zelldichte für Transfer 0 bei $0,230 \pm 0,004$ und für Transfer 15 und 20 bei $0,567 \pm 0,009$ und $0,580 \pm 0,008$. Der Vergleichsstamm kommt auf einen Wert von $0,693 \pm 0,020$.

Um eine Aussage über die genetischen Veränderungen während dieses Mutageneseexperimentes treffen zu können wurde das Genom von Klonen aus Transfer 15 und 20 resequenziert und mit dem des Ausgangsstammes verglichen. Die Analyse ergab eine relevante Punktmutation in der NO_3^- -Reduktase *narG* (Tabelle 3.3). Diese führt zur Umwandlung eines Stop-Codons an Position 922 in ein Glutamat-Codon. Der Vergleich mit der BLAST-Datenbank zeigt, dass hierdurch *narG* vollständig abgelesen werden kann (Datenbank-Treffer sind in Anhang in Abbildung A.1 gezeigt).

3.5.1.2. Elektrofermentation mit JG1220

Nach Transformation mit pMAL *alsSD* und pEC86 in Zellen von JG878 Transfer 20 wurde das Verhalten des neu gewonnenen Stamm (JG1220) im Mini-Reaktor untersucht. Die Bedingungen entsprechen dem Experiment aus Abschnitt 3.2. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.19 zusammengefasst.

3. Ergebnisse

Tabelle 3.3.: Variantenanalyse von JG878 Transfer 20. Berücksichtigt wurden nur Mutationen mit einer Frequenz größer als 90 %, die nicht in Transfer 11 aufgetreten sind.

Base	Gen	Mutation	Effekt	Häufigkeit
70030	<i>narG</i>	T → C (SNV)	Stop → Gln (AS922)	$\frac{117}{126}$ (92,9 %)

Während der Elektrofermentation mit JG1220 wurde ein ähnlicher Verlauf der Stromdichte wie mit Stamm JG991 gemessen (Abbildung 3.19). Die maximale Stromdichte wurde mit $181,3 \pm 39,9 \text{ mA m}^{-2}$ zu Beginn des Experiments gemessen. Im weiteren Verlauf nimmt die Stromdichte ab bis zu einem Wert von $46,15 \pm 45,53 \text{ mA m}^{-2}$. Die mittlere Stromdichte in den ersten 24 h liegt bei $96,53 \pm 0,59 \text{ mA m}^{-2}$. Die chemische Analyse dieses Experimentes ergab eine Abnahme der Glucosekonzentration um $4,91 \pm 1,20 \text{ mmol l}^{-1}$ und eine Zunahme der Acetoinkonzentration um $3,17 \pm 0,63 \text{ mmol l}^{-1}$. Dies ergibt eine Ausbeute von Acetoin von $60,82 \pm 4,31 \%$. Die Produktivität in den ersten 24 h betrug $8,34 \pm 0,20 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Bezogen auf den Substratumsatz beträgt die CE dieses Experimentes $102,1 \pm 8,3 \%$.

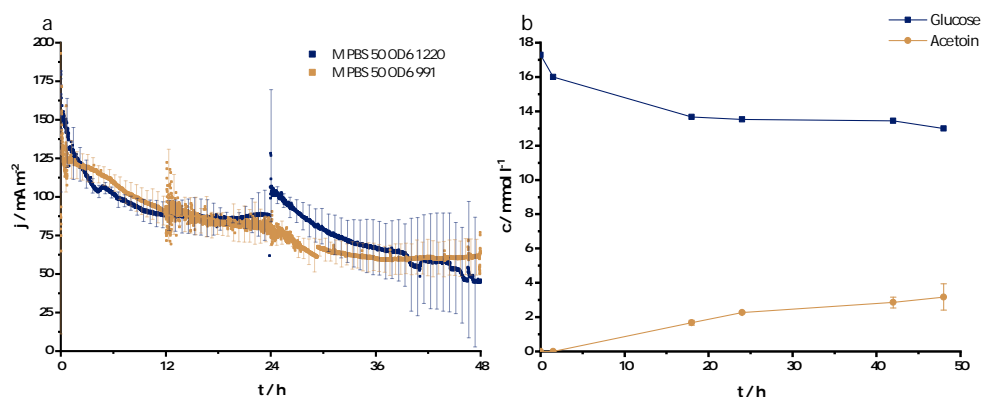


Abbildung 3.19.: Elektrofermentation von JG1220 im Minireaktor. **a** Stromdichte von JG1220 (blau) und JG991 (gelb) und **b** chemische Analyse der Fermentation mit JG1220 im zeitlichen Verlauf über 24 h.

3.5.2. Metabolisches Modell von JG991

Ziel der folgenden Arbeiten, war die systematische Erfassung der Einflüsse von genetischer Manipulation und Kultivierungsbedingungen des Produktionsstammes und seiner Vorstufen auf dessen Metabolismus.

Zu diesem Zweck wurde eine Experimentalmatrix (Abbildung 3.20) erstellt, welche den Vergleich einzelner Parameter zwischen drei Stämmen (JG1054, JG997, JG991) erlaubt. Diese Stämme wurden jeweils mit NO_3^- und O_2 als Elektronenakzeptoren kultiviert. Zudem wurde jeder Ansatz sowohl bei Induktion und Nicht-Induktion der jeweils heterolog

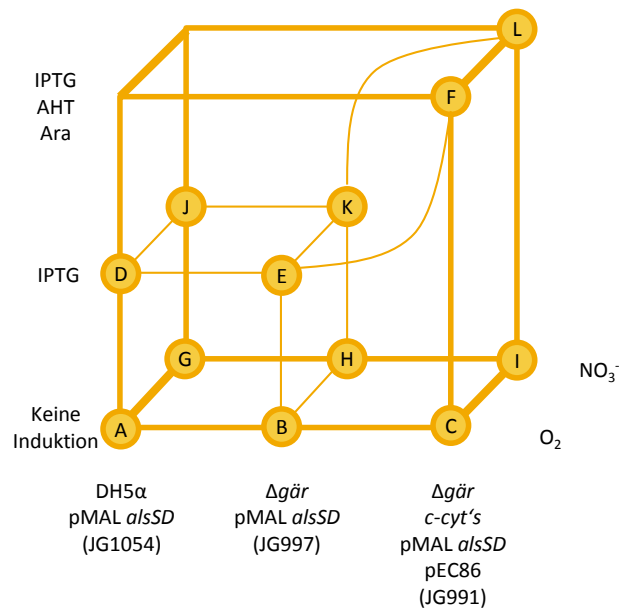


Abbildung 3.20.: Experimental Matrix zur Erfassung der Einflüsse auf den Stoffwechsel des Produktionsstammes durch genetische Manipulation, Elektronenakzeptor und heterologe Genexpression.

exprimierten Gene untersucht. Somit ergeben sich insgesamt zwölf experimentelle Bedingungen, unter denen jeweils das Zellwachstum erfasst, Produktbildung und Substratumsatz quantifiziert und mRNA isoliert und sequenziert wurde.

Im folgenden dient diese Matrix auch als Legende für die Korrelationsdiagramme zum metabolischen Modell. Die Kürzel zu *Bedingung* beziehen sich immer auf Abbildung 3.20.

3.5.2.1. Erfassung physiologischer Parameter

Die Erfassung physiologischer Parameter soll Aussagen über dominierende Einflüsse auf den Metabolismus unter den jeweiligen Bedingungen zulassen. Zu diesem Zweck wurden Wachstumsversuche in PBS-Minimalmedium mit 20 mmol l⁻¹ Glucose und 40 mmol l⁻¹ NO₃⁻ oder O₂ als Elektronenakzeptor durchgeführt. Abbildung 3.21 zeigt die Wachstumsrate zu diesen Experimenten.

Ohne Induktion unter oxischen Bedingungen erreichen alle Stämme vergleichbare Wachstumsraten von rund 0,39 h⁻¹. Die Induktion wirkt sich, abhängig von den heterolog exprimierten Genen, unterschiedlich stark negativ auf die Wachstumsrate aus. Für JG1054 und JG997 verringert sich die Rate auf 50 % des vorherigen Wertes, im Falle von JG991 auf 25 %. Unter anoxischen Bedingungen verringert sich die Wachstumsrate für JG1054 von 0,329 ± 0,023 h⁻¹ auf 30 % auf 0,203 ± 0,007 h⁻¹. JG997 und JG991 weisen bereits vor der Induktion um 75 % beziehungsweise 90 % verringerte Wachstumsraten im Vergleich zu JG1054 auf. Im Falle von JG997 verringert sich der Wert durch die Induktion nochmals um

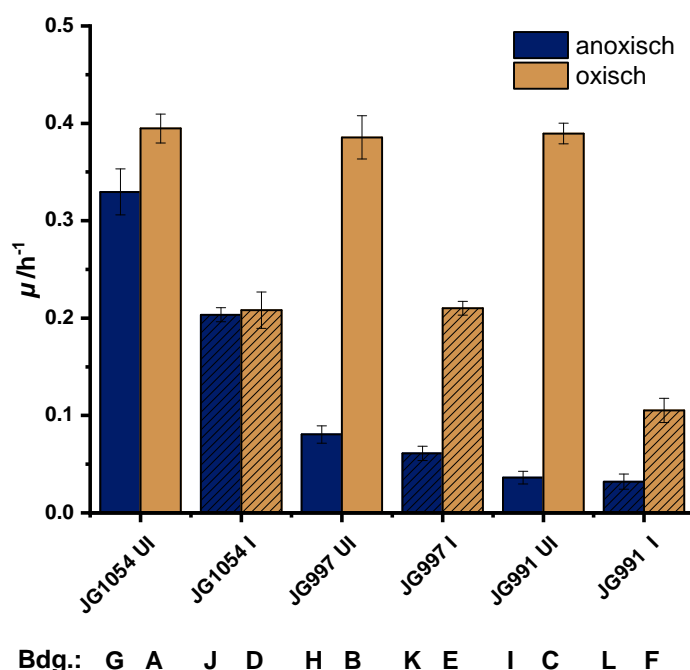


Abbildung 3.21.: Wachstumsrate von JG1054, JG997 und JG991 im PBS-Minimalmedium mit 20 mmol l^{-1} Glucose und 40 mmol l^{-1} NO_3^- (anoxisch) oder O_2 (oxisch) als Elektronenakzeptor. UI - uninduziert, I / Schraffur - induziert.

20 % auf $0,061 \pm 0,007 \text{ h}^{-1}$. Die Wachstumsrate von JG991 verringert sich unter Induktionsbedingungen nur noch unwesentlich von $0,036 \pm 0,006 \text{ h}^{-1}$ auf $0,032 \pm 0,008 \text{ h}^{-1}$.

Aus den Wachstumsexperimenten wurden zudem Glucoseaufnahme- und Acetoinbildungsraten pro Gramm Zelltrockengewicht bestimmt (m_{CDW}). Die Auswertung ist in Abbildung 3.22 gezeigt.

Im Falle der Glucoseaufnahmeraten (Abbildung 3.22a) fällt auf, dass diese unter oxidischen Bedingungen höher liegen als unter anoxischen, auch wird durch Induktion die Glucoseaufnahme verringert. Unter oxidischen Bedingungen ohne Induktion erreicht JG1054 mit $2,41 \pm 0,53 \text{ mmol g}^{-1} \text{ l}^{-1}$ die höchste Rate. Für JG997 und JG991 wird unabhängig vom Stamm ohne Induktion ein Wert von rund $1,3 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}$ gemessen. Unter Induktionsbedingungen sind die Raten unabhängig vom Stamm bei rund $1,5 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}$. Unter anoxischen Bedingungen lassen sich zwei verschiedene Niveaus erkennen. Die Raten von JG1054 sind unabhängig von der Induktion bei rund $1 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}$. Ebenso liegen die Raten für JG997 und JG991 auf einem Niveau von circa $0,7 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}$ für uninduzierte wie auch induzierte Ansätze.

Acetoinbildung (Abbildung 3.22b) ist nur unter Induktion in relevantem Umfang zu beobachten. Unter oxidischen Bedingungen liegen die Raten für alle Stämme vergleichbar auf einem Niveau um $1 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Unter anoxischen Bedingungen nimmt die Acetoinbildungsrate mit fortschreitender Modifikation des Stoffwechsels ab. Für JG1054 und JG997 liegen die Raten mit rund $1,5 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ über den oxidischen Vergleichswerten. Für JG991 wird unter anoxischen Bedingungen ein Wert von $0,47 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erreicht. Die

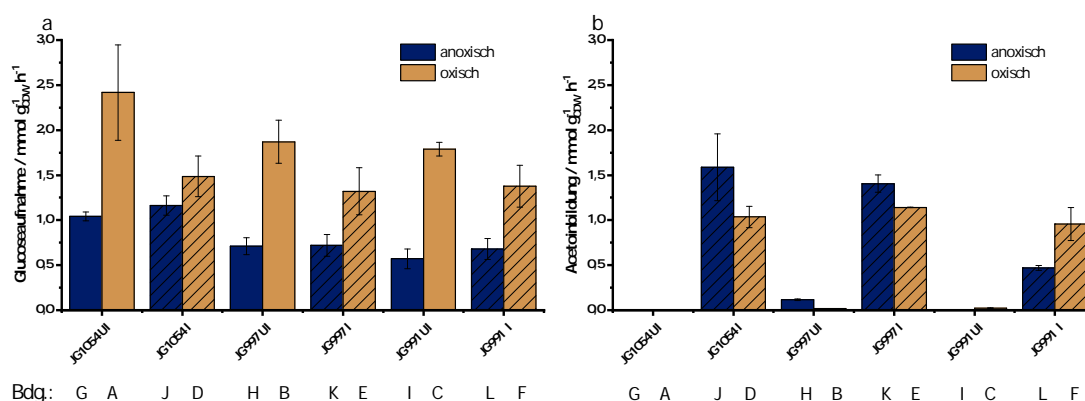


Abbildung 3.22.: Umsatzraten von JG1054, JG997 und JG991 im PBS-Minimalmedium mit 20 mmol l^{-1} Glucose und $40 \text{ mmol l}^{-1} \text{ NO}_3^-$ (anoxisch) oder O_2 (oxisch) als Elektronenakzeptor. **a** Glucoseaufnahme, **b** Acetoinbildung, UI - uninduziert, I / Schraffur - induziert.

Verminderung der Wachstums- und Produktaufnahmeraten mit fortschreitender Stammentwicklung deuten eine zunehmende metabolische Belastung der Zellen an. Dies soll im folgenden auf durch die Betrachtung der Transkription von Markergenen nachvollzogen werden.

3.5.2.2. RNA-Sequenzierung

Aus den erhaltenen Sequenzierdaten wurden Expressionsprofile für alle 12 Bedingungen erstellt. Sämtliche TPM-Werte, sowie das Referenzgenom sind in digitaler Form an diese Arbeit angehängt. Die Hauptkomponenten Analyse (Abbildung 3.23) dieser Profile zeigt Varianz auf der Ordinate von 27,7% und auf der Abszisse von 16,2%. Es lässt sich eine Gruppierung nach oxischen und anoxischen Ansätzen erkennen.

3.5.2.3. *metabolic burden* im Produktionsstamm

Die erste Fragestellung die mit Hilfe des kombinierten Datensatzes, aus physiologischen Daten und Expressionswerten beantwortet werden sollte, betrachtet die metabolische Belastung des Produktionsorganismus. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe für Systembiotechnologie an der TU München wurden Markergene, die keiner metabolischen Regulation unterliegen mit der Wachstumsrate korreliert. Ein hierfür in Frage kommender Kapazitätsmarker ist das Gen für die DNA-Gyrase *gyrB* (Abbildung 3.24).

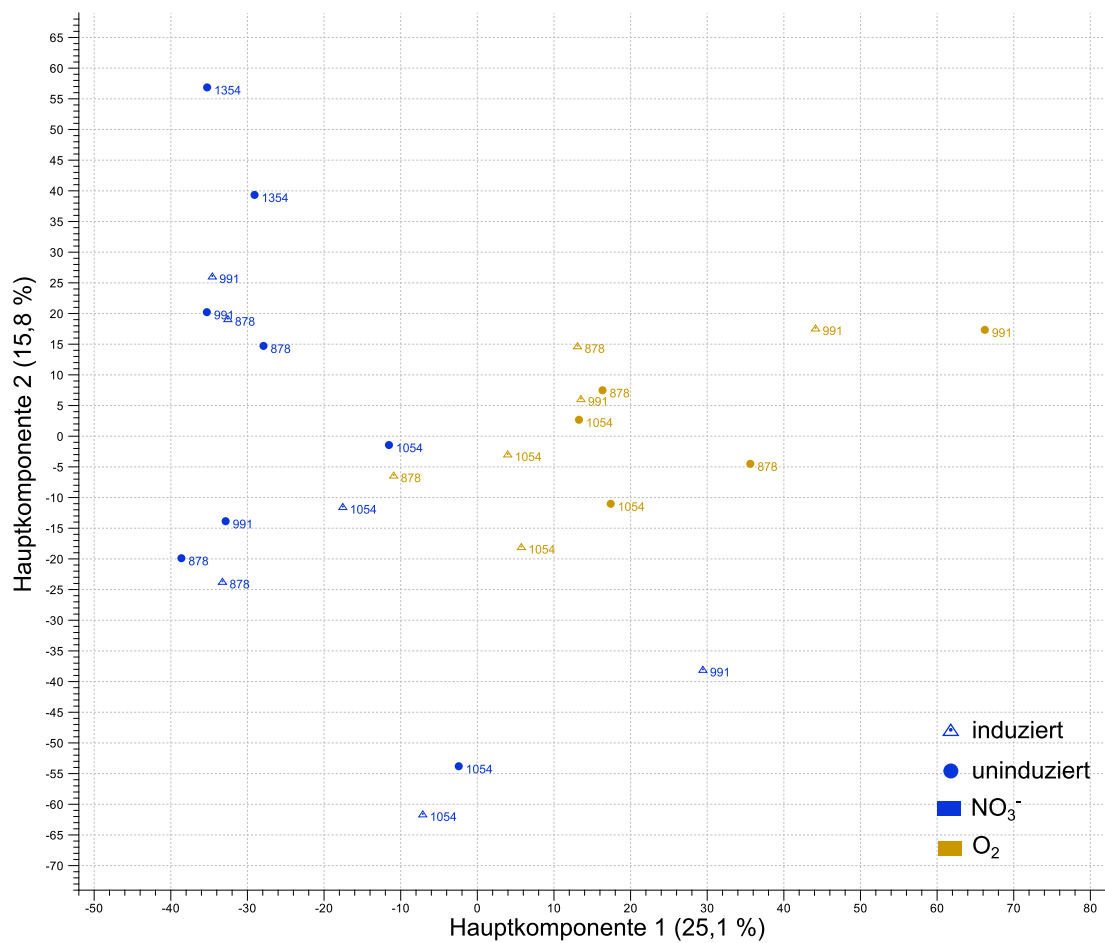


Abbildung 3.23.: Hauptkomponentenanalyse für die RNA-Sequenzierungen unter alle experimentellen Bedingungen in zwei Replikaten. *blau* - NO_3^- , *gelb* - O_2 als Elektronenakzeptor. \triangle - induziert, \bullet - uninduziert. Als Beschriftung ist jeweils die Stammnummer angegeben.

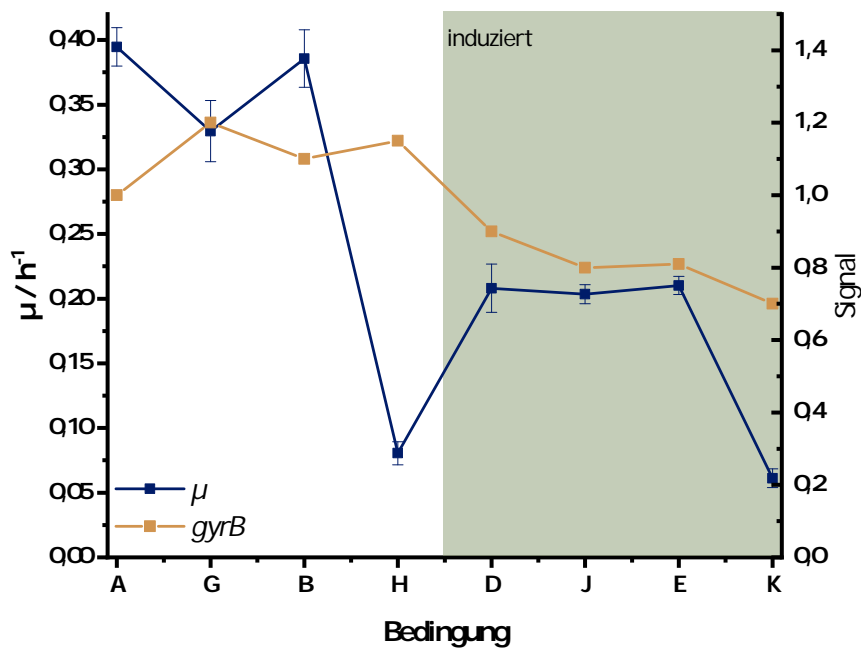


Abbildung 3.24.: Korrelationsdiagramm zur metabolischen Belastung Anhand von *gyrB*.
 a Korrelation von Wachstumsrate (*blau*) und auf Bedingung A normalisierter Expressionswert für *gyrB* (*gelb*). Abbildung verändert nach A. Kremling

In der Korrelation ist zu erkennen, dass die Expressionstärke von *gyrB* und die Wachstumsrate bei Induktion absinkt. Ausgenommen hiervon, ist Stamm JG997 unter anoxischen Bedingungen (H und K). In allen Fällen, außer Bedingung H korreliert *gyrB* gut mit der Wachstumsrate. Die absolute Änderung der Expressionstärke im Vergleich zu Bedingung A ist insgesamt jedoch gering, so schwanken die Werte zwischen einer maximal $1,2\times$ (G) und minimal $0,7\times$ (K) geänderten Expressionstärke, wohingegen die Wachstumsrate um auf rund 10 % des Ausgangswertes reduziert wird.

Die Korrelation zwischen RNA-Polymerase, ATP-Synthase und ribosomaler RNA sowie ribosomaler Proteine ist in Abbildung 3.25 gezeigt. Hier lässt sich erkennen, dass für die ribosomalen Marker die Proben unter Induktion ebenfalls ein leicht reduziertes Expressionslevel aufweisen. Insgesamt sind die Änderungen auch in diesem Fall zwischen $1,4\times$ (H, 16S rRNA) und $0,45\times$ (K, große ribosomale Untereinheit) Expressionstärke, klein im Vergleich zur Änderung der Wachstumsrate. Die Expressionstärke der RNA-Polymerase variiert ebenfalls nur zwischen $1,1\times$ (B) und $0,4\times$ (K). Die ATP-Synthase zeigt ein vergleichbares Muster wie die zuvor diskutierten Marker, wird jedoch unter Bedingung K deutlich geringer exprimiert und erreicht nur noch $0,2\times$ der Expressionstärke von Bedingung A. Verglichen mit den anderen Markern zeigt diese die beste Korrelation mit Bedingung H und K.

Neben Haushaltsgenen, deren Expression unabhängig von äußeren Bedingungen ist, lassen sich Korrelationen auch für stark abhängige Gene erstellen. Die Ergebnisse der Cluster-Analyse sind im nächsten Abschnitt erläutert.

3. Ergebnisse

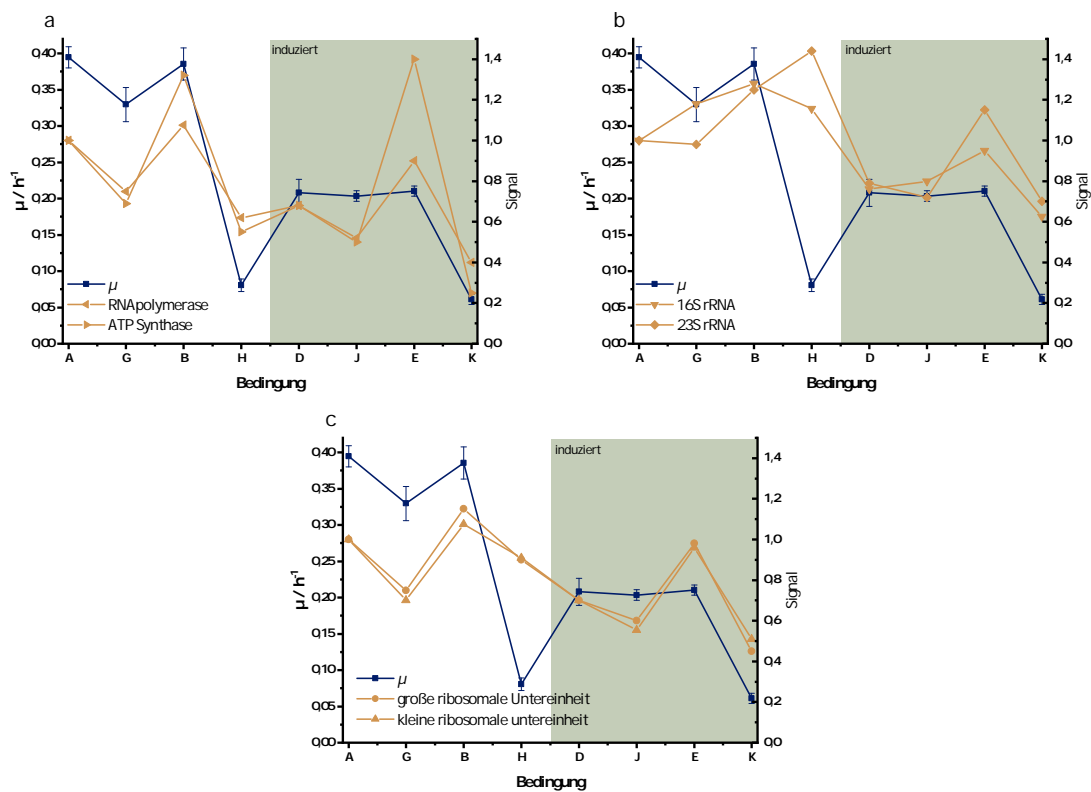


Abbildung 3.25.: Korrelation zwischen der Wachstumsrate und der Expressionsstärke von **a** RNA-Polymerase und ATP-Synthase, **b** 16S und 23S rRNA und **c** große und kleine ribosomale Untereinheit. Die Signalstärken (*gelb*) sind jeweils auf Bedingung A normiert. Abbildung verändert nach A. Kremling.

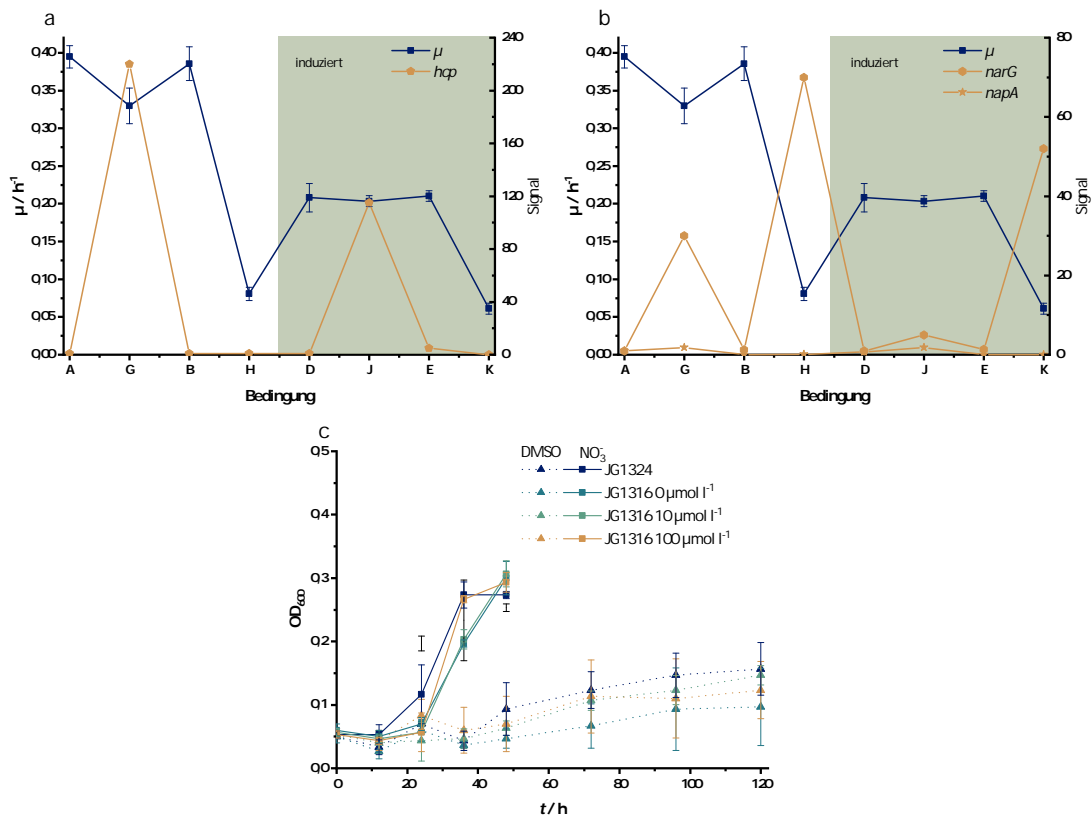


Abbildung 3.26.: Korrelation der Wachstumsraten μ von JG1054 und JG997 (blau) mit dem Expressionssignal (gelb) von **a** *hcp* und **b** *narG* und *napA*. Die Expressionswerte sind auf Bedingung A normiert. Abbildung verändert nach A. Kremling. **c** Anaerobes Wachstum von JG1316 in PBS-Medium mit 20 $mmol\ l^{-1}$ Glucose und 40 $mmol\ l^{-1}$ DMSO oder NO_3^- als Elektronenakzeptor. Der Trc-Promotor wurde mit 0, 10 oder 100 $\mu mol\ l^{-1}$ IPTG induziert. Zum Vergleich ist ein Wachstumsversuch mit leerem Vektor gezeigt (JG1324).

3.5.2.4. Hydroxylamin Reduktase Hcp

Die an der TU München durchgeführte Clusteranalyse der Expressionsprofile ergab als auffälligstes Gen die Hydroxylamin Reduktase *hcp* (Abbildung 3.26a). Während in JG1054 beim Übergang von O_2 - zu NO_3^- -Atmung der Expressionswert um 220x ansteigt (120x bei Induktion) bleibt dies im Falle von JG997 aus. Zudem ergibt sich hierbei eine starke positive Korrelation zwischen Wachstumsrate und Expressionssignal. Eine negative Korrelation lässt sich dagegen für *narG* beobachten (Abbildung 3.26b), welche in JG997 unter NO_3^- -Bedingungen stark hoch reguliert ist (70x). Die Expression von *napA*, welches Teil der periplasmatischen Nitratreductase NapB ist, reagiert hingegen nur schwach auf die Induktion durch NO_3^- . In JG997 ist *napA* deletiert und wird nicht exprimiert. Weitere negative Korrelationen für die Formiat-Dehydrogenase N (*FdnG*) und das Kälteschockprotein *CspA* sind im Anhang gezeigt (Abbildung A.2 und A.3).

Da *hcp* das Gen mit der stärksten Korrelation in der Clusteranalyse war, sollte dessen Einfluss auf den Stoffwechsel separat untersucht werden. Um den Einfluss von *hcp* unabhängig von der *E. coli* eigenen Stoffwechselregulation ermitteln zu können, wurde *hcp* auf ein Expressionsplasmid unter Kontrolle des IPTG-induzierbaren Trc-Promotors kloniert (pTRC *hcp*) und in JG878 transformiert (JG1316). In Abbildung 3.26c ist das anaerobe Wachstum von JG1316 gezeigt. Da *hcp* ein mit dem NO_3^- -Stoffwechsel assoziiertes Gen ist, wurde dessen Einfluss zudem unter DMSO-atmenden Bedingungen evaluiert um allgemeine Effekte auf den anaeroben Stoffwechsel erkennen zu können. Als Referenz wurde jeweils ein Stamm mit leerem pTrc-Plasmid (JG1324) kultiviert.

Die Wachstumsversuche zeigen sowohl mit NO_3^- als auch mit DMSO als Elektronenakzeptor keine signifikanten Unterschiede im Wachstum zwischen leerem Plasmid und den Ansätzen mit *hcp* in allen drei Induktionsstärken.

3.5.3. Missregulation

Eine weitere Hypothese zur stark eingeschränkten Stoffwechselrate war, dass regulatorische Elemente durch die Eingriffe in den Stoffwechsel sich abweichend zum Wildtyp Metabolismus verhalten. Hierzu wurden differentielle Expressionsprofile zwischen NO_3^- - und O_2 -Atmung für JG1054 und JG991 erstellt. Diese wurden dann nach Genen mit differentieller Expression im Wildtyp, aber nicht in der *knock-out* Mutante gefiltert. Zudem wurde nach Genen gefiltert, die im Wildtyp unreguliert bleiben, in der Mutante jedoch Unterschiede im Expressionswert zwischen den beiden Bedingungen zeigen.

3.5.3.1. Missregulation im Zentralstoffwechsel

Die Veranschaulichung dieses Datensatzes erfolgte mit Hilfe von IPath3 (Darzi u. a. 2018) durch Zuordnung der Uniprot-Nummer.

Die Abbildung 3.27 zeigt in rot Gene des Zentralstoffwechsel die in JG1054 zwischen aeroben und anaerobem Stoffwechsel unter Induktionsbedingungen reguliert sind, nicht aber in JG991. Gene die in JG991 unter diesen Bedingungen reguliert sind, nicht aber in JG1054 sind in grün dargestellt. Hierbei fallen in der Übersicht vor allem Gene des Amino- und Fettsäurestoffwechsels auf deren Expressionswerte sich unterscheiden, wie zum Beispiel im Arginin-Stoffwechsel *argG* im Alanin-Stoffwechsel *puuE* oder im Glutamat-Stoffwechsel *gadC* und *gadB*. Darüber hinaus finden sich auch viele Gene mit Assoziation zum Energiestoffwechsel wie die NADH-Dehydrogenase *nuoE* und oder die Succinatdehydrogenase *sdhC*. Ebenfalls unterscheiden sich die Stämme beim Übergang von aerobem zu anaerobem Stoffwechsel in der Expression zentraler kataboler Gene wie der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase *glpABC* oder der Pyruvat-Dehydrogenase *aceEF*. (vgl. Tabelle A.3).

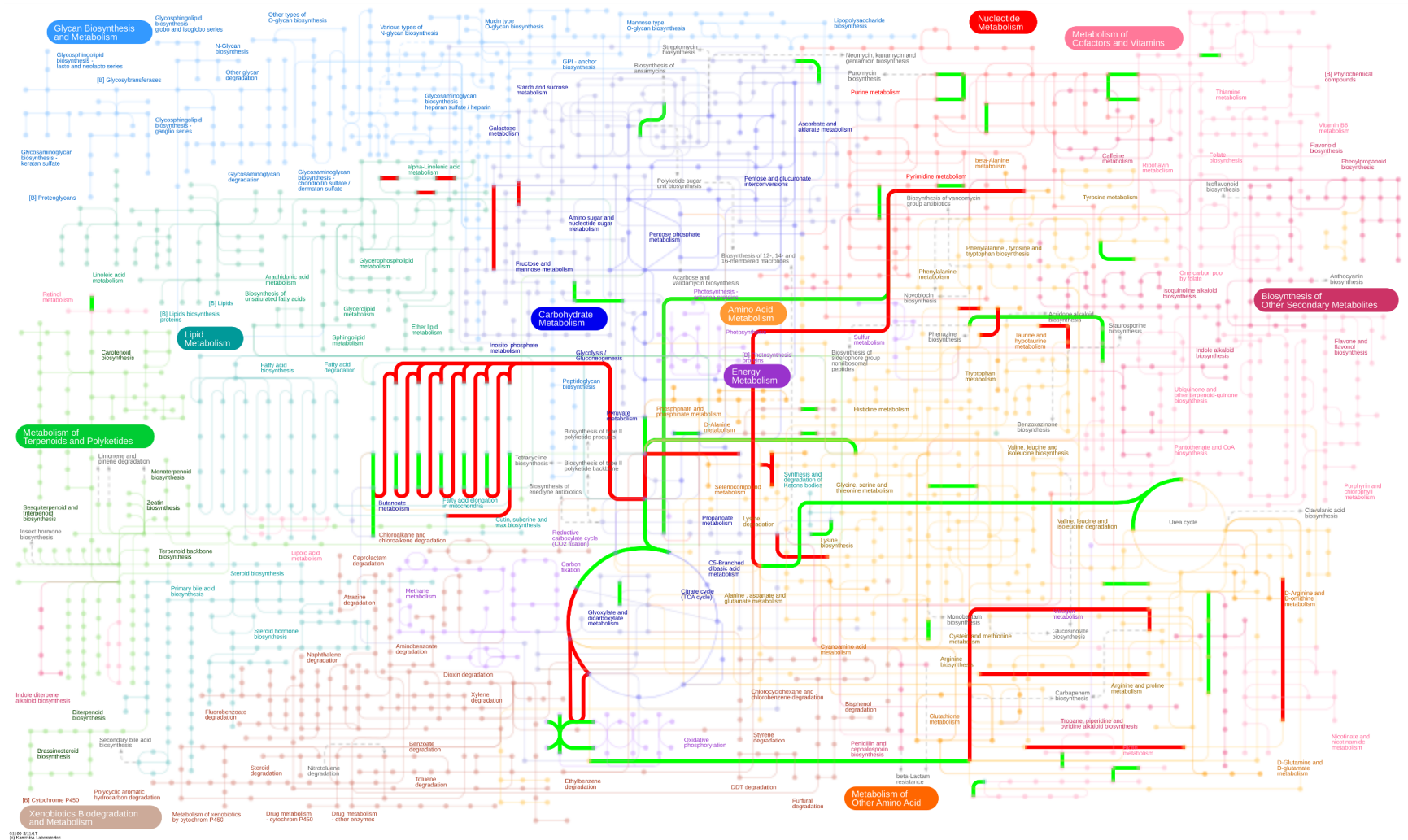


Abbildung 3.27.: Vergleich der differentiellen Expression von Genen im Zentralstoffwechsel zwischen NO_3^- - und O_2 -Atmung für JG1054 und JG991 unter Induktion. *rot* - reguliert in JG1054, unreguliert in JG991. *grün* - reguliert in JG991, unreguliert in JG1054.

3.5.3.2. Phosphorylierung in der Stoffwechselregulation

Eine weitere Auffälligkeit in den Transkriptionsdaten bestand in einer Häufung differentiell regulierter Gene mit phosphorylierungsabhängigen Regulatoren (Tabelle 3.4). Da in der Stammentwicklung *pta* als einziges der veränderten Gene direkt mit Phosphorylierung verknüpft werden kann, sollte dessen Einfluss nachfolgend genauer untersucht werden.

Tabelle 3.4.: Auswahl von Genen mit phosphorylierungsabhängigen Transkriptionsfaktoren, die zwischen JG1054 und JG991 abweichend reguliert werden beim Übergang zwischen aerobem und anaerobem Stoffwechsel.

Name	Log ₂ fc (NO ₃ ⁻ v. O ₂)	FDR p-value	Regulator
Reguliert in JG991 nicht in JG1054			
<i>cusS</i>	3,90	0,0E+00	PhoB ¹
<i>cusA</i>	4,02	0,0E+00	PhoB ¹
<i>cusB</i>	5,53	0,0E+00	PhoB ¹
<i>pykA</i>	2,07	5,2E-08	Cra ²
<i>glpA</i>	2,10	3,9E-07	ArcA ³
<i>glpB</i>	2,59	7,1E-14	ArcA ³
<i>glpC</i>	2,61	0,0E+00	ArcA ³
Reguliert in JG1054 nicht in JG991			
<i>fruB</i>	-4,48	0,0E+00	Cra ³
<i>fruA</i>	-2,02	0,0E+00	Cra ³
<i>sdhD</i>	-2,27	5,6E-06	ArcA ³
<i>sdhB</i>	-2,00	1,2E-08	ArcA ³
<i>sdhC</i>	-2,09	3,2E-05	ArcA ³
<i>aceE</i>	2,74	2,8E-10	Cra ² , Arc ³
<i>fumC</i>	-2,01	5,8E-06	ArcA ³

¹ Munson u. a. (2000)

² Ow, Lee, R. M.-Y. u. a. (2007), Bettenbrock, Sauter u. a. (2007), Perrenoud u. a. (2005)

³ Toya u. a. (2012), Trotter u. a. (2011), Gunsalus u. a. (1994)

Als erstes sollte der Effekt von *pta* und *ack* auf aerobes und anaerobes Wachstum isoliert von andern Modifikationen betrachtet werden.

Zu diesem Zweck wurden die Stämme JG1125 (*E. coli* K-12 Δ *ack*) und JG1126 (*E. coli* K-12 Δ *pta*) in Wachstumsversuchen mit JG109 (*E. coli* K-12) verglichen. Als Medium diente PBS-Medium mit 20 mmol l⁻¹ Glucose und O₂ oder 40 mmol l⁻¹ NO₃⁻ als Elektronenakzeptor.

Unter anoxischen Bedingungen (Abbildung 3.28a) ist zu sehen, dass der Δ *ack*-Stamm langsamer und zu niedrigerer Zelldichte wächst im Vergleich zum Wildtyp. Nach 6,2 h wird die maximale Zelldichte von 0,368 ± 0,013 erreicht. K-12 wächst im selben Zeitraum auf 0,438 ± 0,009. K-12 Δ *pta* wächst in 6,2 h auf 0,206 ± 0,002 und erreicht die maximale Zelldichte von 0,295 ± 0,024 nach 21 h. Unter oxischen Bedingungen (Abbildung 3.28b) verhalten sich K-12 Δ *pta* und K-12 Δ *ack* ähnlich, wobei K-12 Δ *pta* mit

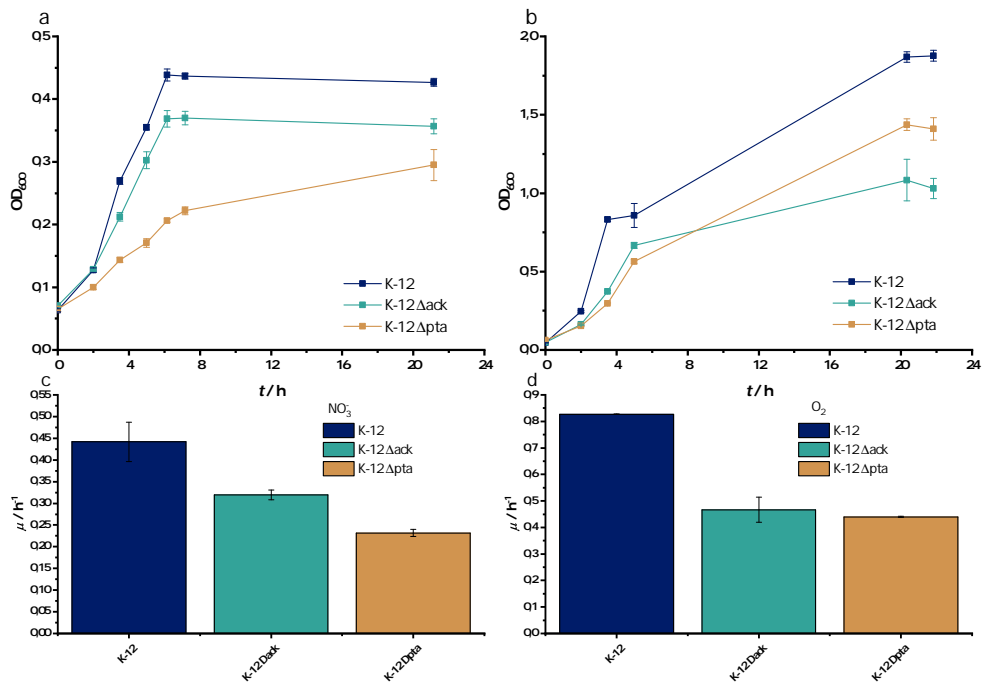


Abbildung 3.28.: Wachstumsversuche von *E. coli* K-12 (JG109), K-12 Δack (JG1225) und K-12 Δpta (JG1226) mit 40 mmol l⁻¹ Glucose in PBS-Minimalmedium. **a** NO₃⁻ und **b** O₂ als Elektronenakzeptor. **c** Wachstumsraten zu **a**, **d** Wachstumsraten zu **b**.

1,43 ± 0,04 gegenüber 1,08 ± 0,13 (K-12 Δack) eine höhere Zelldichte erreicht. Der Wildtyp K-12 Stamm wächst schneller als die beiden Mutanten und erreicht die maximale OD₆₀₀ von 1,87 ± 0,03 ebenfalls nach 20 h.

Die Berechnung der Wachstumsraten (Abbildung 3.28 b, c) spiegelt die drei unterschiedlichen Phänotypen unter anoxischen Bedingungen wieder. Das Wachstum in K-12 Δack ist um rund 28 % reduziert und in Δpta um rund 48 %. Unter oxischen Bedingungen besteht kein Unterschied zwischen K-12 Δack und K-12 Δpta , allerdings wächst der Wildtyp fast doppelt so schnell wie die beiden Mutanten.

Aufgrund des diskreten Phänotypes für die Deletion von *pta* wurde nachfolgend dieses Gen wieder in den Produktionsstamm eingebracht und dessen Auswirkung auf den anaeroben Stoffwechsel untersucht.

3.5.3.3. *pta* knock-in

Die Reintegration von *pta* in das Genom des Produktionsstammes erfolgte im nativen Locus mit nativem Promotor (Abschnitt 2.2.7.2). Mit dem so erhaltenen Stamm JG1325 wurden anaerobe Wachstumsversuche mit NO₃⁻ und DMSO als Elektronenakzeptor, als Vergleichsstamm diente JG878.

Das Ergebnis ist in Abbildung 3.29 gezeigt. Stamm JG1325 zeigt eine kürzere Lag-Phase und schnelleres Wachstum mit NO₃⁻. Mit DMSO als Elektronenakzeptor besteht kein

3. Ergebnisse

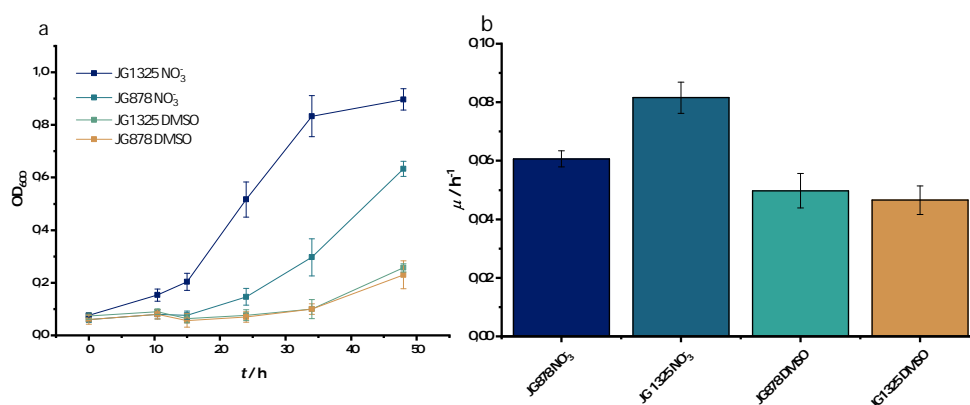


Abbildung 3.29.: Anaerobes Wachstum von JG991 und JG1353 in MOPS-gepuffertem Medium mit 20 mmol l^{-1} Glucose und $40 \text{ mmol l}^{-1} NO_3^-$ oder DMSO. **a** Zeitlicher Verlauf der OD_{600} und **b** Wachstumsraten zu **a**.

Unterschied im Wachstum der beiden Stämme. Die Wachstumsraten zeigen eine Zunahme der metabolischen Aktivität um $35,2 \pm 3,9 \%$ für JG1325 mit $0,082 \pm 0,005 \text{ h}^{-1}$ im Vergleich zu $0,061 \pm 0,003 \text{ h}^{-1}$.

3.5.3.4. Regulatorischer Einfluss von *pta*

Da der Stamm mit NO_3^- als Elektronenakzeptor ein beschleunigtes Wachstum zeigt, wurde dieser Stamm mit pMAL *alsSD* transformiert (JG1354). Analog zu den in Abschnitt 3.5.2 gezeigten Experimenten wurde dann unter NO_3^- -atmenden Bedingungen bei Induktion der Acetoin-Gene RNA isoliert und analysiert.

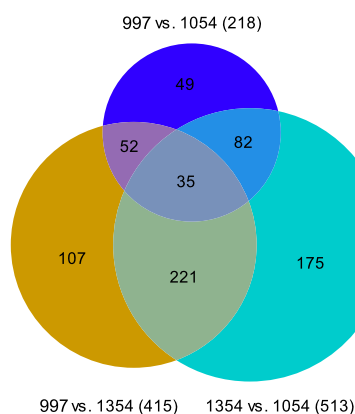


Abbildung 3.30.: Venn-Diagramm für die differentielle Genexpression zwischen JG1054, JG997 und JG1354 unter NO_3^- -atmenden Bedingungen mit $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ IPTG.

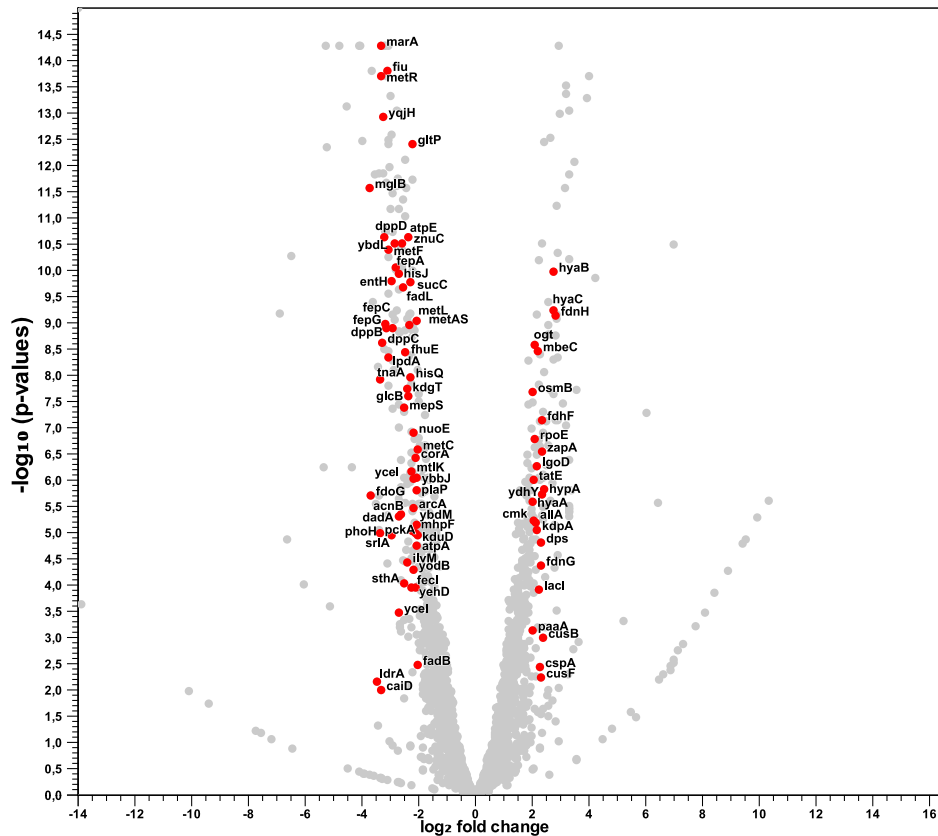


Abbildung 3.31.: *Volcano-Plot* differentiell exprimierter Gene zwischen JG997 und JG1354. *rot* - Gene, welche zwischen JG1054 und JG1354 unverändert exprimiert werden.

Anschließend wurden differentiell exprimierte Gene zwischen den Stämmen JG1054, JG997 und JG1354 identifiziert und mit einander verglichen (Abbildung 3.30). Dabei fällt auf, dass zwischen JG997 und JG1054 218 Gene differentiell exprimiert sind, wohingegen zwischen JG1354 und JG1054 513 Gene differentiell reguliert werden. Im Vergleich von JG997 mit JG1354 werden 415 Gene differentiell exprimiert. Der Hypothese folgend, dass es sich bei dem Wachstumsphänotyp um ein regulatorisches Problem handelt, wurden der Datensatz weiter gefiltert: Aus den zwischen JG997 und JG1354 differentiell exprimierten Genen, werden nur die betrachtet, welche keinen Unterschied zwischen JG1354 und JG1054 aufweisen (Tabelle 3.5). In einer zweiten Liste wurden die Gene extrahiert die zwischen JG1054 und JG997 unverändert exprimiert werden. Gene die im jeweils anderen Vergleich ebenfalls mit $\log_2 fc \leq |2|$ auftreten, sind in beiden Listen erfasst.

Der *Volcano-Plot* (Abbildung 3.31) zeigt diese Gene für die erste Liste in der Übersicht. Werte mit einem p -Value = 0 können nicht dargestellt werden und sind daher tabellarisch (Tabelle 3.5) gezeigt. Die erste Liste, enthält Gene, welche in JG1354 wieder auf dem Niveau des Ausgangstammes exprimiert werden. Unter den in JG1354 höher exprimierten Genen finden sich vor allem solche des Energiestoffwechsels wie *cyoBCD*, *fdoGH*, *nuoE* oder *atpAE*

3. Ergebnisse

und Gene der Glycolyse wie *lpdA* oder *pckA*, sowie des Anabolismus, wie *acnB*, *sucC*, *glcB* oder *metASCFRKLN*. Im Vergleich zu JG997 schwächer exprimiert sind hingegen Gene die im weiteren Sinne mit Stress assoziiert werden können, wie *cspA*, *omsB*, *rpoE* oder *cusFB*. Außerdem sind die Hydrogenase-Gene *hyaABC* und die *fdnGH* schwächer exprimiert.

Die zweite Liste (Tabelle 3.5) enthält Gene die vor der Integration von *pta* nicht reguliert wurden. In JG1354 stärker exprimierte Gene sind Teile des Aminosäurestoffwechsels wie *proVWX*, *ygaP*, *gltK*, *argT*, *hisJP*, *glnPH* und *gltK* oder das NADH-Dehydrogenase-Gen *ndh* oder die DMSO-Reduktase-Gene *dmsAB*. Erwähnenswert ist, das Stoffwechselregulatoren wie *arcA*, *csrA* und *marA* stärker exprimiert sind, als in JG997 und auch als in JG1054. Schwächer exprimierte Gene sind im wesentlichen identisch zur vorherigen Liste. Ausnahmen sind jedoch beispielsweise die c-di-GMP-Phosphodiesterase *pdeI* und die di-Guanylat-Zyklase *dgcZ*.

Tabelle 3.5.: Liste differentiell regulierter Gene zwischen JG997 und JG1354, gefiltert nach Genen, welche unverändert zwischen JG1054 und JG1354 exprimiert werden.

Name	997 vs. 1354		1354 vs. 1054		997 vs. 1054	
	Log fc	FDR p-value	Log fc	FDR p-value	Log fc	FDR p-value
<i>fdoH</i>	-4,83	0,0E+00	1,95	2,7E-06	-2,95	0,0E+00
<i>fdoG_1</i>	-4,52	0,0E+00	1,96	3,4E-07	-2,38	9,0E-10
<i>cyoC</i>	-4,47	0,0E+00	1,79	1,2E-06	-2,76	0,0E+00
<i>entC</i>	-4,40	0,0E+00	1,86	1,4E-04	-2,94	5,3E-07
<i>cyoB</i>	-4,11	0,0E+00	1,85	3,4E-06	-2,19	1,5E-13
<i>cyoD</i>	-4,08	0,0E+00	1,63	4,3E-07	-2,55	0,0E+00
<i>nrdI</i>	-3,99	0,0E+00	1,23	4,5E-02	-3,28	2,6E-06
<i>znuA</i>	-3,80	0,0E+00	1,28	7,8E-03	-2,67	4,8E-12
<i>mglB</i>	-3,72	2,7E-12	1,49	3,8E-03	-2,54	6,8E-11
<i>fdoG_2</i>	-3,69	2,0E-06	0,88	3,4E-02	-1,96	1,1E-03
<i>feoA</i>	-3,61	0,0E+00	1,62	1,0E-03	-2,20	6,9E-06
<i>metK</i>	-3,60	0,0E+00	1,70	7,4E-04	-2,20	8,0E-08
<i>ldrA_3</i>	-3,47	7,1E-03	1,32	5,9E-03	-2,08	1,1E-01
<i>tnaA</i>	-3,34	1,2E-08	1,17	3,9E-02	-2,37	1,3E-10
<i>phoH</i>	-3,33	1,1E-05	1,74	4,4E-03	-1,17	5,9E-04
<i>marA</i>	-3,32	5,4E-15	0,95	1,5E-02	-2,57	2,6E-13
<i>metR</i>	-3,30	2,0E-14	1,70	2,9E-09	-1,76	2,8E-09
<i>caiD</i>	-3,29	1,0E-02	1,41	2,6E-03	-1,89	1,6E-01
<i>entS</i>	-3,28	0,0E+00	1,04	7,6E-03	-2,37	1,0E-07
<i>dppC</i>	-3,26	2,4E-09	0,97	3,6E-02	-2,48	1,6E-13
<i>yqjH</i>	-3,21	1,2E-13	1,05	7,1E-04	-2,21	3,1E-08
<i>dppD</i>	-3,20	2,4E-11	1,10	1,9E-02	-2,26	1,0E-08
<i>fepC</i>	-3,17	1,1E-09	1,54	1,7E-04	-1,77	1,1E-03
<i>fepG</i>	-3,10	1,3E-09	1,17	5,1E-04	-1,97	8,1E-07
<i>nrdE</i>	-3,09	0,0E+00	1,71	6,2E-03	-1,91	6,6E-03

Tabelle 3.5.: Liste differentiell regulierter Gene zwischen JG997 und JG1354, gefiltert nach Genen, welche unverändert zwischen JG1054 und JG1354 exprimiert werden.

Name	997 vs. 1354		1354 vs. 1054		997 vs. 1054	
	Log fc	FDR p-value	Log fc	FDR p-value	Log fc	FDR p-value
<i>fiu</i>	-3,09	1,6E-14	1,84	1,2E-05	-1,43	4,4E-04
<i>metF</i>	-3,06	4,1E-11	1,98	6,9E-09	-1,14	6,0E-05
<i>lpdA</i>	-3,05	4,7E-09	0,98	2,2E-02	-1,92	7,4E-05
<i>metN</i>	-3,03	0,0E+00	1,81	3,1E-05	-1,43	5,6E-05
<i>srlA</i>	-2,94	1,2E-05	1,87	1,6E-04	-1,07	9,9E-02
<i>entH</i>	-2,93	1,7E-10	1,69	7,3E-03	-1,87	3,0E-03
<i>dppB</i>	-2,92	1,3E-09	0,97	3,0E-02	-2,13	1,6E-08
<i>ybdL</i>	-2,81	3,1E-11	1,85	3,9E-09	-1,12	2,3E-05
<i>fepA</i>	-2,79	8,9E-11	1,33	1,6E-02	-1,80	7,9E-04
<i>dadA</i>	-2,69	5,0E-06	-0,91	3,6E-03	-3,23	0,0E+00
<i>yceI_2</i>	-2,67	3,5E-04	0,77	4,4E-02	-1,95	7,0E-03
<i>hisJ</i>	-2,66	1,2E-10	1,09	4,9E-03	-1,57	3,5E-04
<i>acnB</i>	-2,62	4,5E-06	1,32	4,7E-03	-1,12	6,3E-03
<i>znuC</i>	-2,56	3,1E-11	1,68	4,0E-05	-0,93	2,0E-04
<i>fadL</i>	-2,53	2,2E-10	1,89	3,4E-12	-0,64	9,5E-02
<i>sthA</i>	-2,50	9,3E-05	1,15	8,5E-03	-0,93	6,8E-02
<i>mepS_2</i>	-2,49	4,2E-08	1,36	2,6E-03	-1,27	4,7E-04
<i>fhuE</i>	-2,44	3,7E-09	1,32	1,2E-03	-1,25	3,5E-03
<i>ilvM</i>	-2,39	3,8E-05	1,52	8,9E-05	-1,02	1,5E-01
<i>kdgT</i>	-2,38	1,8E-08	0,94	2,9E-02	-1,68	2,4E-05
<i>atpE</i>	-2,35	2,4E-11	1,82	9,3E-11	-0,57	5,9E-02
<i>glcB</i>	-2,34	2,6E-08	1,96	1,6E-07	-0,41	1,6E-01
<i>metAS</i>	-2,33	1,1E-09	1,14	9,7E-05	-1,24	7,6E-04
<i>sucC</i>	-2,27	1,7E-10	1,33	2,3E-04	-1,00	9,3E-04
<i>hisQ</i>	-2,26	1,1E-08	0,84	9,4E-03	-1,41	7,9E-05
<i>mtlK</i>	-2,23	6,9E-07	1,99	5,3E-06	-0,40	2,9E-01
<i>fecI</i>	-2,23	1,1E-04	-1,07	3,5E-03	-2,95	1,5E-07
<i>mhpF</i>	-2,20	9,6E-06	1,71	5,5E-08	-0,52	1,8E-01
<i>gltP</i>	-2,20	4,0E-13	1,75	8,3E-11	-0,50	7,5E-02
<i>nuoE</i>	-2,18	1,3E-07	1,70	1,4E-06	-0,52	5,8E-02
<i>arcA</i>	-2,16	3,4E-06	1,12	2,9E-03	-1,12	2,0E-03
<i>yodB</i>	-2,15	5,3E-05	0,98	4,8E-03	-1,15	7,9E-03
<i>yceI_1</i>	-2,15	9,8E-07	1,08	1,4E-03	-1,15	4,1E-03
<i>pckA</i>	-2,11	1,0E-05	1,72	4,9E-05	-0,46	2,5E-01
<i>yehD</i>	-2,10	1,1E-04	-0,89	8,8E-03	-3,03	2,1E-10
<i>corA</i>	-2,09	3,9E-07	1,16	2,2E-03	-0,94	2,2E-05
<i>atpA</i>	-2,06	1,8E-05	1,46	4,4E-04	-0,64	1,3E-01
<i>ybdM</i>	-2,05	7,2E-06	0,73	8,5E-03	-1,36	6,8E-04

3. Ergebnisse

Tabelle 3.5.: Liste differentiell regulierter Gene zwischen JG997 und JG1354, gefiltert nach Genen, welche unverändert zwischen JG1054 und JG1354 exprimiert werden.

Name	997 vs. 1354		1354 vs. 1054		997 vs. 1054	
	Log fc	FDR p-value	Log fc	FDR p-value	Log fc	FDR p-value
<i>ybbJ</i>	-2,04	9,0E-07	1,91	3,0E-13	-0,11	8,2E-01
<i>metL</i>	-2,04	9,5E-10	1,72	4,3E-08	-0,35	3,2E-01
<i>plaP</i>	-2,04	1,6E-06	1,47	2,8E-06	-0,52	3,2E-01
<i>fadB</i>	-2,03	3,4E-03	1,32	1,3E-02	-0,48	9,3E-02
<i>kduD_2</i>	-2,02	1,1E-05	1,72	3,0E-05	-0,34	4,8E-01
<i>metC</i>	-2,00	2,6E-07	0,82	1,8E-03	-1,20	4,0E-04
<i>osmB</i>	2,03	2,1E-08	-1,27	4,8E-03	0,48	2,2E-01
<i>paaA</i>	2,03	7,4E-04	-1,84	1,2E-05	0,18	7,2E-01
<i>hyaA</i>	2,05	2,6E-06	-1,60	2,1E-05	0,36	4,0E-01
<i>tatE</i>	2,06	1,0E-06	-1,82	1,4E-10	0,23	5,9E-01
<i>cmk</i>	2,07	5,9E-06	-1,29	2,0E-03	0,71	6,9E-02
<i>ogt</i>	2,11	2,7E-09	-1,62	1,3E-06	0,45	3,2E-01
<i>rpoE</i>	2,12	1,7E-07	-1,92	3,6E-06	0,14	7,9E-01
<i>allA</i>	2,13	6,6E-06	-1,72	1,1E-05	0,45	2,6E-01
<i>lgoD</i>	2,16	5,5E-07	-1,94	4,5E-09	0,17	6,9E-01
<i>kdpA</i>	2,19	9,2E-06	-1,11	9,0E-03	1,07	5,4E-04
<i>mbeC</i>	2,21	3,6E-09	-1,73	6,2E-06	0,48	2,8E-01
<i>lacI_4</i>	2,26	1,2E-04	-1,86	1,6E-07	0,35	5,0E-01
<i>cspA</i>	2,29	3,7E-03	-1,24	4,9E-02	0,97	1,9E-02
<i>cusF</i>	2,33	6,0E-03	-1,46	1,6E-03	2,34	1,2E-02
<i>dps</i>	2,33	1,6E-05	-2,00	1,2E-06	0,31	5,7E-01
<i>fdnG_1</i>	2,34	4,4E-05	-0,98	1,2E-02	1,57	9,3E-04
<i>zapA</i>	2,35	2,9E-07	-1,92	2,8E-07	0,35	4,5E-01
<i>ydhY</i>	2,37	1,9E-06	-1,48	1,7E-03	0,87	2,0E-02
<i>fdhF_2</i>	2,38	7,3E-08	-1,52	9,7E-06	1,07	1,9E-04
<i>cusB</i>	2,41	1,0E-03	-1,72	8,8E-06	1,76	3,3E-02
<i>hypA</i>	2,45	1,5E-06	-0,88	4,2E-02	1,81	1,0E-09
<i>hyaC</i>	2,77	5,9E-10	-1,84	6,3E-08	0,86	6,0E-03
<i>hyaB</i>	2,78	1,1E-10	-1,69	8,9E-07	1,01	7,9E-04
<i>fdnH_1</i>	2,84	7,5E-10	-0,91	3,1E-02	1,82	9,7E-05
<i>fdnI</i>	3,70	0,0E+00	-1,98	1,2E-06	1,68	9,3E-05

Tabelle 3.6.: Liste differentiell regulierter Gene zwischen JG997 und JG1354, gefiltert nach Genen, welche unverändert zwischen JG1054 und JG997 exprimiert werden.

Name	997 vs. 1354		1354 vs. 1054		997 vs. 1054	
	Log fc	FDR p-value	Log fc	FDR p-value	Log fc	FDR p-value
<i>fimF_2</i>	-6,10	0,00E+00	4,33	0,00E+00	-1,83	6,86E-04
<i>proX</i>	-5,05	0,00E+00	3,87	8,29E-15	-1,43	8,87E-08
<i>mdtI</i>	-4,98	0,00E+00	3,63	0,00E+00	-1,37	3,18E-02
<i>proV</i>	-4,78	5,38E-15	3,65	1,87E-14	-0,80	1,96E-02
<i>proW</i>	-4,74	0,00E+00	3,84	3,04E-15	-0,92	3,41E-04
<i>cirA</i>	-4,60	0,00E+00	3,35	5,69E-15	-1,41	2,74E-06
<i>feoB</i>	-4,33	0,00E+00	2,67	2,39E-08	-1,87	7,73E-04
<i>feoC</i>	-4,26	0,00E+00	3,17	9,10E-11	-1,40	6,53E-03
<i>ydhC</i>	-4,17	0,00E+00	3,43	0,00E+00	-0,85	1,04E-03
<i>lacI_3</i>	-4,08	5,38E-15	5,16	0,00E+00	1,04	5,73E-03
<i>fecD</i>	-4,08	0,00E+00	3,48	0,00E+00	-0,87	2,88E-02
<i>cueO</i>	-4,07	0,00E+00	4,80	0,00E+00	0,71	1,74E-02
<i>lacI_2</i>	-4,06	5,38E-15	5,13	0,00E+00	1,04	5,62E-03
<i>entB</i>	-4,04	0,00E+00	2,91	2,10E-06	-1,84	3,15E-02
<i>copA</i>	-3,96	3,55E-13	4,99	0,00E+00	1,02	5,73E-03
<i>fimH_2</i>	-3,81	0,00E+00	3,03	0,00E+00	-0,83	3,32E-03
<i>mdtJ</i>	-3,64	1,58E-14	5,08	0,00E+00	1,12	3,46E-03
<i>entE</i>	-3,46	0,00E+00	2,61	5,07E-06	-1,39	3,35E-02
<i>rbbA</i>	-3,44	0,00E+00	2,70	0,00E+00	-0,75	1,12E-02
<i>dmsA</i>	-3,16	5,38E-15	3,91	0,00E+00	0,68	3,04E-02
<i>dmsB_2</i>	-3,12	2,04E-14	3,95	0,00E+00	0,97	4,38E-03
<i>chaA</i>	-3,05	2,83E-10	3,89	0,00E+00	0,80	4,51E-03
<i>entF</i>	-3,04	0,00E+00	2,04	3,58E-04	-1,44	4,80E-02
<i>ygaP</i>	-3,04	5,38E-15	4,05	0,00E+00	1,01	4,33E-04
<i>gltK</i>	-2,91	7,17E-10	2,01	4,83E-09	-0,98	3,55E-03
<i>lacC</i>	-2,89	2,15E-09	4,33	0,00E+00	1,56	3,02E-03
<i>carA</i>	-2,51	5,10E-08	3,41	0,00E+00	0,86	2,04E-02
<i>glnP</i>	-2,30	7,17E-10	3,44	0,00E+00	1,17	1,49E-05
<i>glnH</i>	-2,29	7,30E-07	3,28	0,00E+00	0,94	1,04E-03
<i>lolD_1</i>	-2,24	1,35E-09	3,36	0,00E+00	1,15	5,66E-06
<i>fruA_1</i>	-2,21	3,04E-06	3,96	0,00E+00	1,85	9,74E-07
<i>dsrB</i>	2,24	9,22E-07	-3,09	0,00E+00	-0,82	6,80E-03
<i>csrA</i>	2,30	1,00E-06	-3,39	3,04E-15	-1,15	7,03E-03
<i>hchA</i>	2,44	3,61E-13	-3,26	0,00E+00	-0,89	4,08E-03
<i>ygiW_2</i>	2,45	0,00E+00	-3,44	1,45E-13	-1,17	1,71E-03
<i>gstB_1</i>	2,53	7,78E-08	-3,73	0,00E+00	-1,17	1,86E-03
<i>sra</i>	2,77	2,29E-08	-3,61	4,23E-10	-1,16	3,70E-03
<i>hilA</i>	2,85	7,26E-08	-2,23	2,53E-06	0,72	2,82E-02

3. Ergebnisse

Tabelle 3.6.: Liste differentiell regulierter Gene zwischen JG997 und JG1354, gefiltert nach Genen, welche unverändert zwischen JG1054 und JG997 exprimiert werden.

Name	997 vs. 1354		1354 vs. 1054		997 vs. 1054	
	Log fc	FDR p-value	Log fc	FDR p-value	Log fc	FDR p-value
<i>yeeD</i>	2,90	8,73E-10	-4,12	0,00E+00	-1,25	4,05E-02
<i>yhcO</i>	2,92	4,84E-11	-4,30	0,00E+00	-1,41	3,77E-07
<i>yiaW_2</i>	2,93	7,23E-08	-3,85	0,00E+00	-1,32	1,59E-05
<i>appY</i>	3,31	1,51E-12	-4,45	0,00E+00	-1,33	1,33E-05
<i>hokA_1</i>	3,32	4,19E-07	-2,44	3,64E-06	0,83	1,50E-02
<i>dgcZ_2</i>	3,48	0,00E+00	-2,05	4,96E-06	1,15	3,59E-03
<i>pdeI</i>	4,33	0,00E+00	-3,37	0,00E+00	1,15	1,65E-03
<i>rmf</i>	5,34	0,00E+00	-3,87	0,00E+00	1,42	2,68E-04
<i>tetA_1</i>	6,88	3,56E-03	-5,61	3,97E-02	1,79	2,37E-03

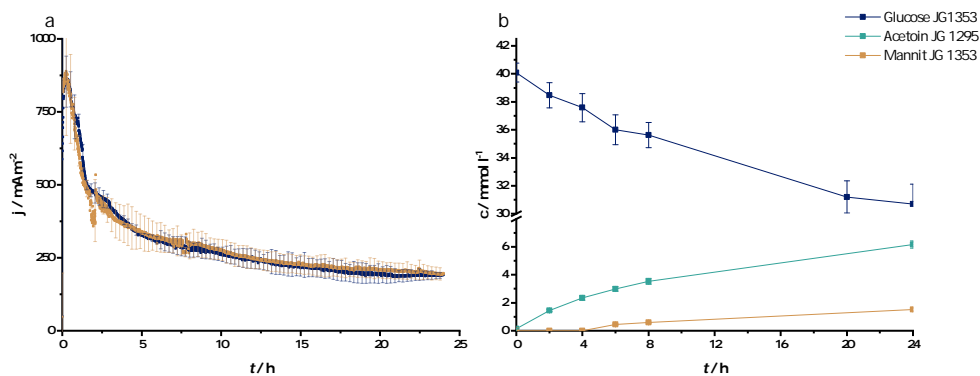


Abbildung 3.32.: Elektrofermentation mit JG1353 im Minireaktor in MOPS-gepuffertem Medium mit 50 mmol l^{-1} Glucose bei $\text{OD}_{600} = 6$. **a** Zeitlicher Verlauf der Stromdichte über 24 h (gelb - Vergleichsexperiment mit JG991) und **b** chemische Analyse zu **a**.

3.5.3.5. Elektrofermentation mit *pta-knock-in*-Stamm

Nach Transformation von pMAL *alsSD* und pEC86 (JG1353) sollte im Folgenden evaluiert werden, ob sich die unter NO_3^- -atmenden Bedingungen auch auf den Umsatz während der Elektrofermentation übertragen lassen. Als Vergleichsexperiment ist die Fermentation aus Abschnitt 3.4.4.3 gezeigt.

Im Verlauf der Stromdichte (Abbildung 3.32a) ist kein Unterschied zum Vergleichsexperiment zu erkennen. Nach 20 min wird das Maximum der Stromdichte bei $859,00 \pm 72,48 \text{ mA m}^{-2}$ erreicht. Im Weiteren Verlauf nimmt die Stromdichte stetig ab bis zu einem Wert von $192,6 \pm 13,1 \text{ mA m}^{-2}$ nach 24 h. Die mittlere Stromdichte nach 8 h beträgt $448,3 \pm 11,8 \text{ mA m}^{-2}$.

In der chemischen Analyse (Abbildung 3.32b) ist zu erkennen, dass in 8 h $4,46 \pm 0,18 \text{ mmol l}^{-1}$ Glucose verbraucht werden. Zeitgleich werden $3,54 \pm 0,17 \text{ mmol l}^{-1}$ Acetoin gebildet. Zudem kann die Bildung von $0,58 \pm 0,04 \text{ mmol l}^{-1}$ Mannit beobachtet werden.

Da sich in der Elektrofermentation mit JG1353, wie auch schon zuvor mit JG1220, der Phänotyp aus den Wachstumsexperimenten mit NO_3^- nicht übertragen lies, sollte im folgenden ein weiteres Subkultivierungsexperiment mit verändertem Selektionsdruck durchgeführt werden.

3.5.4. Zufallsmutagenese mit DMSO als Elektronenakzeptor

Durch Wechsel des Elektronenakzeptors zu DMSO wurde versucht die Bedingungen während der Selektion denen der Elektrofermentation ähnlicher zu gestalten. DMSO ($E^{0'} = 0,160 \text{ V}$) verfügt über ein ähnlicheres Redoxpotential zu Metylenblau ($E^{0'} = 0,011 \text{ V}$) als NO_3^- ($E^{0'} = 0,433 \text{ V}$) (Wood 1981; Lundblad 2010; Thauer u. a. 1977).

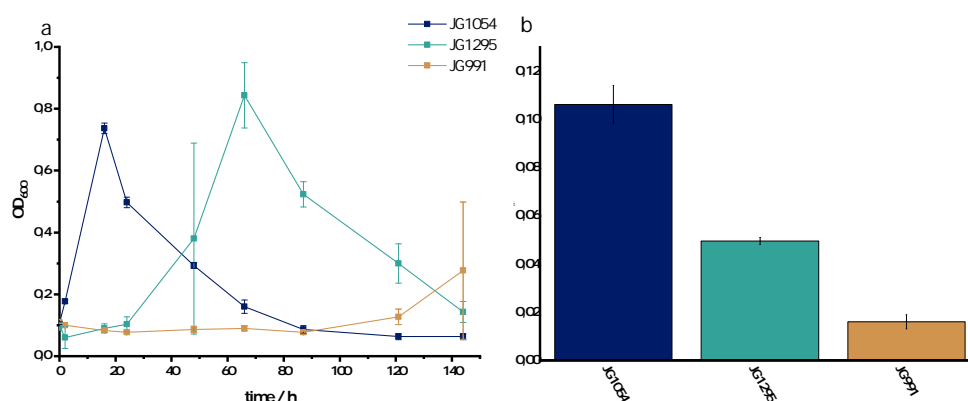


Abbildung 3.33.: Anaerobes Wachstum von JG1054, JG1295 und JG991 auf MOPS-Medium mit DMSO als Elektronenakzeptor. JG1295 wurde durch sequentielle Kultivierung über 16 Überföhrungen erzeugt. **a** Wachstumskurve über 144 h mit 20 mmol l^{-1} Glucose und 40 mmol l^{-1} DMSO. **b** Wachstumsraten zu **a** für JG1054, JG1295 und JG991.

3.5.4.1. Selektion auf DMSO-Atmung

Die Selektion auf einen beschleunigten anaeroben Metabolismus wurde nach selber Methodik wie zuvor, allerdings mit DMSO als Elektronenakzeptor durchgeföhrt. Zusätzlich sollte durch Methylenblau im Medium Selektionsdruck auf vorhandene Kompensationsmechanismen ausgeübt werden. Ausgangsstamm in diesem Experiment war JG991, welcher unter konstanter Antibiose gehalten wurde.

Tabelle 3.7.: Variantenanalyse von JG1295. Berücksichtigt wurden nur Mutationen mit einer Frequenz größer als 90 % und einer Abdeckung von mindestens $20\times$.

Base	Gen	Mutation	Effekt	Häufigkeit
4320496	<i>pflB</i>	A → G (SNV)	Gln → Stop (AS431)	$\frac{112}{112}$ (100%)
3009449	<i>rpoC</i>	C → T (SNV)	Pro → Leu (AS359)	$\frac{155}{156}$ (99,4%)
3593620	<i>aceF</i>	G → A (SNV)	Asp → Gly (AS430)	$\frac{136}{138}$ (98,6%)

Abbildung 3.33 zeigt den Vergleich im anaeroben Wachstum zwischen Transfer 0 und Transfer 16 (JG1295) und einem *E. coli* DH5 α Z1 Stamm mit pMAL *alsSD* (JG1054). Während JG1054 ohne erkennbare Verzögerung in exponentielles Wachstum übergeht, setzt dieses bei JG1295 nach etwa 24 h ein. JG991 zeigt erst nach etwa 90 h Wachstum (Abbildung 3.33a). Darüber hinaus lässt sich eine rund 3x höhere Wachstumsrate (Abbildung 3.33b) beobachten. Ausgehend von einer Rate von $0,0160 \pm 0,0029 \text{ h}^{-1}$ zu Beginn des Experimentes steigerte sich der Wert nach 16 Überföhrungen auf $0,0496 \pm 0,0014 \text{ h}^{-1}$ bei JG1295. Der

zum Vergleich gezeigte DH5 α Z1 Stamm wächst mit einer Rate von $0,1061 \pm 0,0079 \text{ h}^{-1}$ nochmals doppelt so schnell.

Die Sequenzierung des Genoms von JG1295 ergab zwei Mutationen in relevanten Genen (Tabelle 3.7). In einer ersten Punktmutation im Gen der Pyruvat-Formiat-Lyase (*pflB*) wurde Glutamat (AS431) durch ein Stop-Codon ersetzt. In einer zweiten Punktmutation im Gen der Dihydrolipoamid Acetyltransferase Unterseinheit (*aceF*) der Pyruvat-Dehydrogenase wurde Aspartat (AS430) gegen Glycin ersetzt. Des Weiteren wurden noch ein Mutation in der DNA-bindenden β -Untereinheit der RNA-Polymerase gefunden. Abbildung 3.34 zeigt die Strukturen der mutierten Proteine.

Um den Einfluss der Mutationen, insbesondere der Mutation in *aceF*, genauer zu untersuchen, wurden Wachstumsversuche unter oxischen Bedingungen in MOPS-Medium mit 20 mmol l^{-1} Glucose durchgeführt. Abbildung 3.35a zeigt, dass sich beide Stämme zu Beginn des Experimentes gleich Verhalten. Nach Ende der exponentiellen Phase wächst JG1295 jedoch noch weiter und erreicht mit $\text{OD}_{600} = 1,71 \pm 0,07$ eine rund 9% höhere Zelldichte als JG991 mit $1,57 \pm 0,02$. Die Wachstumsraten (Abbildung 3.35b) zeigen keinen Unterschied in den ersten 4 h.

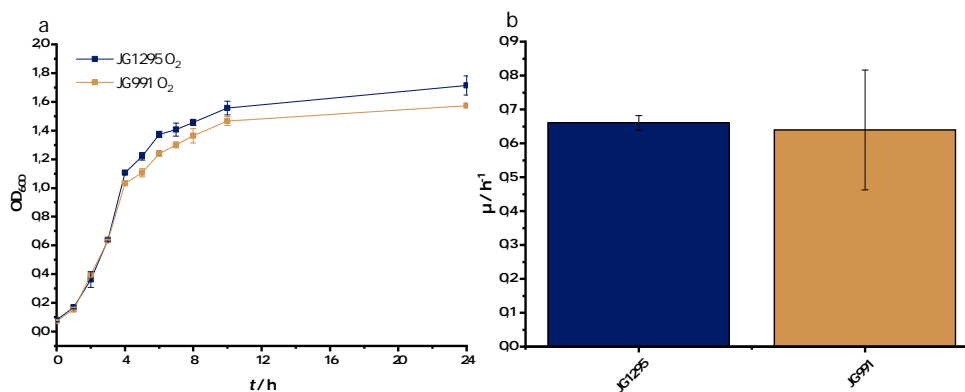


Abbildung 3.35.: Aerobes Wachstum von JG1295 und JG991 auf MOPS-Medium. **a** Wachstumskurve über 24 h mit 20 mmol l^{-1} Glucose. **b** Wachstumsraten zu **a**.

Um einen Überblick über die Regulation von *aceF* zwischen aerobem und anaerobem Stoffwechsel, sowie zwischen den Mutanten zu bekommen, sind in Tabelle 3.8 das *aceEF-lpdA*-Operon gezeigt und das *aceBAK*-Operon, für Gene des Glyoxylat-Zyklus codiert, gezeigt. Dabei ist bemerkenswert, dass in JG1054 *aceEF* unter anoxisch-induzierten Bedingungen hochreguliert sind. Die Gene des *aceBAK*-Operons sind herunter reguliert. Im Fall von JG997 und JG991 ist für alle betrachteten Gene $\log_2 fc \leq 2$ (Ausnahme: *aceF* in JG997 wird anoxisch schwächer exprimiert als unter oxischen Bedingungen. Bei Vergleich zwischen den Stämmen kann man sehen, dass durch die Integration von *pta* in JG1354 das *aceEF-lpdA* Operon wieder auf Niveau von JG1054 exprimiert wird. In JG997 ist wesentlich schwächer exprimiert als in JG1054. *aceBAK* wird in JG1354 tendenziell etwas höher exprimiert als in JG1054. Im Vergleich zwischen JG1054 und JG997 besteht keine Unterschied in der Expression von *aceBAK*.

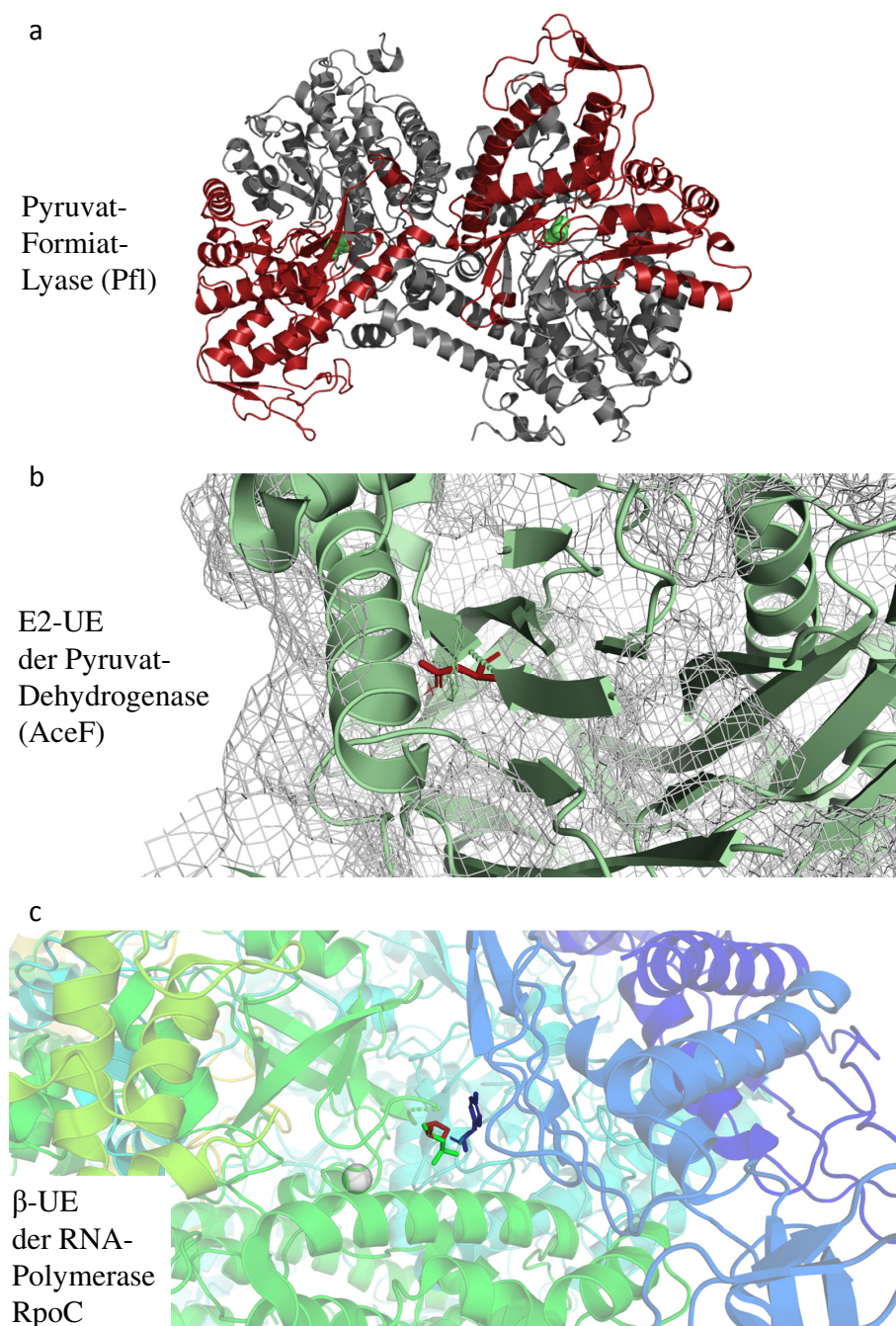


Abbildung 3.34.: Strukturmodelle der in JG1295 mutierten Proteine. **a** Pyruvat-Formiat-Lyase: Durch die Einführung eines Stopcodons wird der rot eingefärbte Teil nicht mehr exprimiert. **b** E2-Untereinheit (E2-UE) der Pyruvat Dehydrogenase: Rot eingefärbt ist Aspartat, welches durch Glycin ersetzt wurde. Hierdurch wird ein β -Faltblatt im mutierten Enzym (grün) unterbrochen. Die Raumfüllung der Aminosäuren ist für das native Enzym in Grau gezeigt, für das Mutierte Enzym in Grün. Der Wegfall von Aspartat erlaubt eine größere Ausdehnung der außenliegenden Kette. **c** β -UE der RNA-Polymerase: Relevante Aminosäuren sind als Stäbchen gezeigt. Prolin (rot) wird durch Leucin (grün) ersetzt. In blau ist Tyrosin als nächstliegende AS gezeigt. Im Hintergrund sind die betreffenden Seitenketten in grün und blau gezeigt.

Tabelle 3.8.: Expression der *ace*-Gene von **a** JG1054, JG997 und JG991 zwischen oxischen und anoxischen Bedingungen und **b** von JG1054, JG997 und JG1354 zwischen den Stämmen mit NO_3^- unter Induktion. Wahrscheinlichkeitswerte größer 0,05 sind in Rot gekennzeichnet.

Name	Log ₂ fc	FDR-p-value	Log ₂ fc	FDR-p-value	Log ₂ fc	FDR-p-value
a						
	JG991		NO ₃ ⁻ v. O ₂ JG997		JG1054	
<i>aceE</i>	-0,98	4,17E-03	-1,92	0,00E+00	2,74	2,82E-10
<i>aceF</i>	-0,58	8,66E-02	-2,08	0,00E+00	2,48	2,67E-09
<i>lpdA</i>	-1,28	2,65E-03	-0,53	3,50E-09	-0,30	5,98E-01
<i>aceB</i>	0,09	8,27E-01	1,22	0,00E+00	-1,96	1,59E-02
<i>aceA</i>	-0,54	7,60E-02	0,55	2,63E-08	-3,55	1,39E-09
<i>aceK</i>	-0,45	1,14E-01	-0,04	8,20E-01	-2,96	9,33E-12
b						
	JG1354 v. JG1054		NO ₃ ⁻ , induziert JG997 v. JG1054		JG997 v. JG1354	
<i>aceE</i>	0,69	2,21E-01	-3,63	0,00E+00	-4,10	0,00E+00
<i>aceF</i>	0,86	1,09E-01	-3,46	0,00E+00	-4,18	0,00E+00
<i>lpdA</i>	0,98	2,19E-02	-1,92	7,45E-05	-3,05	4,71E-09
<i>aceB</i>	0,95	2,00E-01	-0,38	4,04E-01	-0,96	2,00E-01
<i>aceA</i>	2,73	6,17E-06	0,47	1,30E-01	-2,34	9,70E-04
<i>aceK</i>	1,21	1,65E-03	0,36	3,67E-01	-0,96	9,72E-02

3.5.4.2. Elektrofermentation mit JG1295

Auch in diesem Fall sollte untersucht werden, ob sich die Ergebnisse auf die Elektrofermentation übertragen lassen.

Die Fermentation erfolgte in MOPS-gepuffertem Medium mit $273 \mu\text{mol l}^{-1}$ Methylblau und $\text{OD}_{600} = 6$. Als Vergleichsexperiment wurde das Experiment aus Abschnitt 3.4.4.3 wiederholt. In diesem Ansatz wurde die Glucosekonzentration jedoch auf 10 mmol l^{-1} verringert, da dies eine vollständige Quantifizierung innerhalb des experimentellen Zeitraum erlaubt.

Die chronoamperometrische Messung von JG1295 in Abbildung 3.36a zeigt ein Maximum der Stromdichte bei $1141,8 \pm 127,2 \text{ mA m}^{-2}$ nach circa 20 min. Die Fermentation mit JG991 erreicht ein Maximum von $845,7 \pm 411,0 \text{ mA m}^{-2}$ nach 15 min. Im weiteren Verlauf fällt die Stromdichte von JG1295 ab, allerdings wesentlich langsamer als im Vergleichsexperiment. Nach circa 9,8 h fällt die Stromdichte von rund 320 mA m^{-2} auf 240 mA m^{-2} ab und verbleibt dann unter der des Vergleichsexperiment. Die Fermentation mit JG991 erreicht nach 24 h eine Stromdichte von $177,2 \pm 19,4 \text{ mA m}^{-2}$. Die mittlere Stromdichte der ersten 8 h liegt für JG1295 bei $633,4 \pm 48,3 \text{ mA m}^{-2}$ und für JG991 bei $412,3 \pm 98,4 \text{ mA m}^{-2}$.

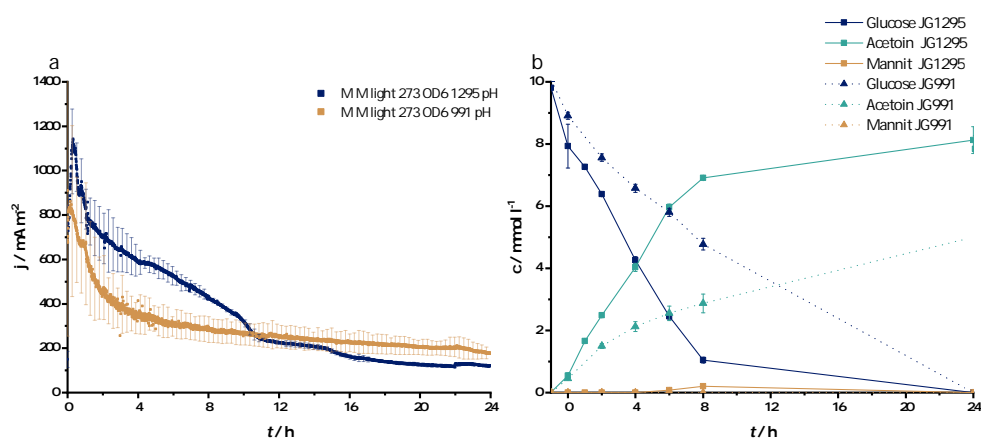


Abbildung 3.36.: Elektrofermentation mit JG1295 im Mini-Reaktor in MOPS-Medium mit 10 mmol l^{-1} Glucose und $273 \mu\text{mol l}^{-1}$ Methylblau bei $\text{OD}_{600} = 6$. **a** zeitlicher Verlauf der Stromdichte über 24 h. *gelb* - Fermentation mit JG991 unter identischen Bedingungen. **b** Chemische Analyse zu **a**.

Die chemische Auswertung (Abbildung 3.36b) der Fermentation mit JG1295 zeigt eine nahezu lineare Abnahme der Glucosekonzentration um $8,76 \pm 0,08 \text{ mmol l}^{-1}$ in den ersten 8 h und eine Zunahme der Acetoinkonzentration um $6,90 \pm 0,05 \text{ mmol l}^{-1}$. Das entspricht einer Produktivität von $76,04 \pm 0,60 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bei einer Ausbeute $78,8 \pm 0,8 \%$. Mannit wird zwischenzeitlich mit $0,20 \pm 0,01 \text{ mmol l}^{-1}$ detektiert. Im Vergleichsexperiment mit JG991 ist eine deutlich langsamere Glucoseabnahme $4,14 \pm 0,15 \text{ mmol l}^{-1}$ in 8 h und eine Acetoinbildung von $2,87 \pm 0,24 \text{ mmol l}^{-1}$ zu beobachten. Die Produktivität in dieser Fermentation beträgt damit $31,63 \pm 2,72 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bei einer Ausbeute von $69,32 \pm 3,57 \%$.

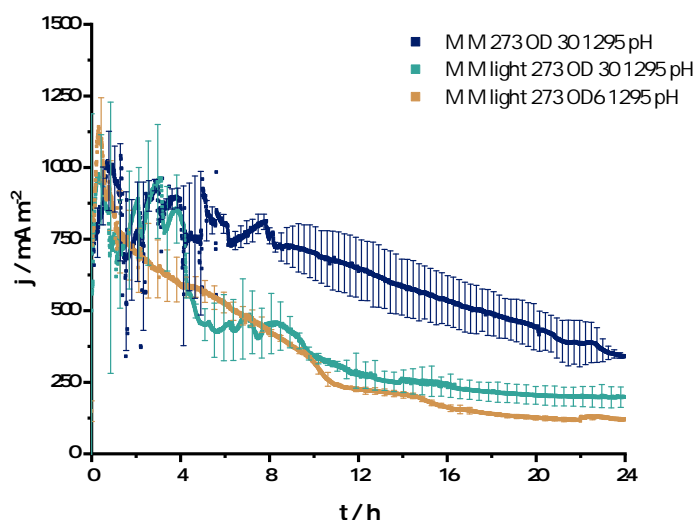


Abbildung 3.37.: Chronoamperometrie zur Elektrofermentation von JG1295 im Mini-Reaktor in MOPS-gepuffertem Medium bei $OD_{600} = 30$ mit 10 (*blau*) und 50 (*türkis*) mmol l^{-1} Glucose. *gelb* - Vergleichsexperiment aus Abbildung 3.36.

Die CE für die Fermentation mit JG1295 liegt bei $97,83 \pm 0,91 \%$. Die Fermentation mit JG991 erreicht einen Wert von $83,89 \pm 2,40 \%$.

Um zu untersuchen, in wie fern die Fermentation durch die Reduktionsleistung des Produktionsstammes limitiert ist, wurden zwei weitere Elektrofermentationen bei $OD_{600} = 30$ durchgeführt. Ein Experiment wurde ebenfalls mit 10 mmol l^{-1} Glucose angesetzt. Im zweiten Experiment wurde die Glucosekonzentration wie bisher bei 50 mmol l^{-1} beibehalten um eine Substratlimitierung zu vermeiden. Die Chronoamperometrie (Abbildung 3.37) der Experimente zeigt einen über circa 1,5 h übereinstimmenden Verlauf. Im Ansatz mit 10 mmol l^{-1} Glucose nimmt die Stromdichte nach 4 h stark ab von circa 830 mA m^{-2} auf circa 420 mA m^{-2} . Nach 24 h wird ein Wert von $199,0 \pm 37,8 \text{ mA m}^{-2}$ erreicht. Im Ansatz mit 50 mmol l^{-1} Glucose verläuft die Stromdichte bis 4 h vergleichbar zum 10 mmol l^{-1} Experiment. Die Stromdichte nimmt im weiteren Verlauf ebenfalls ab, jedoch wesentlich langsamer als im Vergleichsexperiment. Nach 24 h wird ein Wert von $340,7 \pm 8,9 \text{ mA m}^{-2}$ erreicht.

Die chemische Analyse (Abbildung 3.38) zeigt, dass im Ansatz mit 10 mmol l^{-1} Glucose das Substrat nach 4 h verbraucht ist. Im Ansatz mit hoher Glucosekonzentration werden in 5 h $13,56 \pm 1,50 \text{ mmol l}^{-1}$ Glucose verbraucht. Die Produktbildungsraten sind für diesen Anfangszeitraum ebenfalls vergleichbar mit $6,37 \pm 0,94 \text{ mmol l}^{-1}$ Acetoin in 5 h ($112,2 \pm 16,6 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) für 50 mmol l^{-1} Glucose und $4,75 \pm 0,91 \text{ mmol l}^{-1}$ in 4 h ($104,6 \pm 20,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) für 10 mmol l^{-1} Glucose.

Auffällig ist in allen drei Experimenten, dass die Mannitkonzentration zunimmt, solange Glucose verfügbar ist. Ist diese in den Experimenten mit 10 mmol l^{-1} Glucose verbraucht, nimmt auch die Mannitkonzentration wieder ab.

3. Ergebnisse

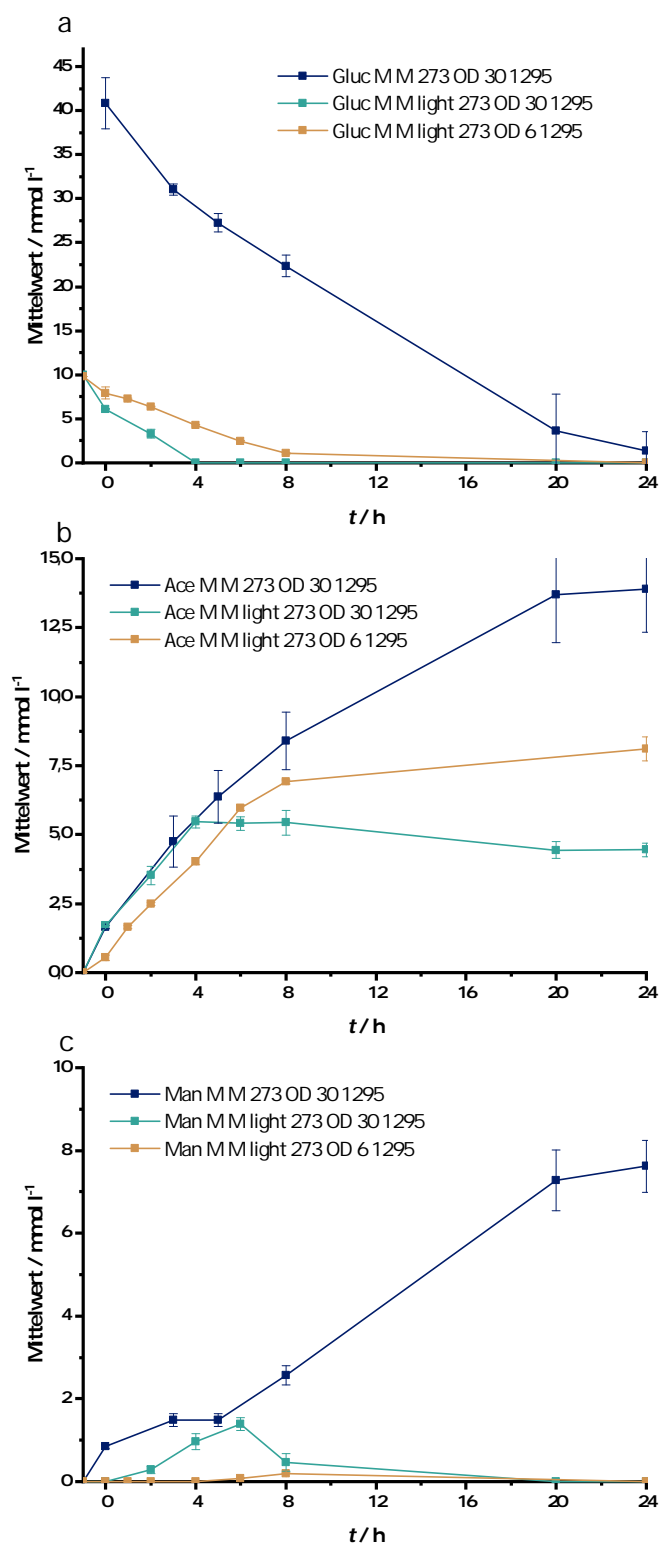


Abbildung 3.38.: Chemische Analyse der Fermentationsexperimente von JG1295 in MOPS Medium mit $273 \mu\text{mol l}^{-1}$ Methylenblau mit 10 (*türkis*) und 50 (*blau*) mmol l^{-1} Glucose. Verlauf der **a** Glucose-, **b** Acetoin- und **c** Mannitkonzentration über 24 h. *gelb* - Vergleichsexperiment aus Abbildung 3.36.

3.5.4.3. Elektrofermentation mit JG1350

Die in Abschnitt 3.5.3 gewonnenen Erkenntnisse über die Regulation des Stoffwechsels sollte dazu genutzt werden, Einsicht über die physiologische Rolle der Mutation in *aceF* zu erhalten. Zu diesem Zweck wurde *pta*, wie in Abschnitt 2.2.7.2 beschrieben, in das Genom von JG1295 integriert (JG1350). Das Ergebnis der Elektrofermentation mit 273 und 546 $\mu\text{mol l}^{-1}$ ist in Abbildung 3.39 gezeigt. Zum Vergleich sind analoge Experimente aus Abbildung 3.32 und 3.36 gezeigt.

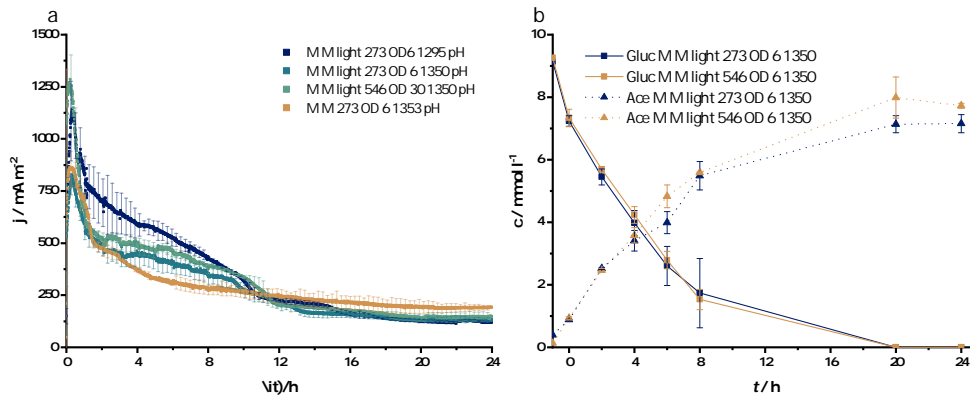


Abbildung 3.39.: Elektrofermentation von JG1350 im Mini-Reaktor in MOPS-gepuffertem Medium bei OD 6 mit 10 mmol l^{-1} Glucose und 273 und $546 \mu\text{mol l}^{-1}$ Methylenblau. **a** Zeitlicher Verlauf der Stromdichte über 24 h. Zum Vergleich sind analoge Experimente aus Abbildung 3.32 und 3.36 gezeigt. **b** chemische Analyse zu **a**.

Die Stromdichte (Abbildung 3.39a) der Fermentation mit $273 \mu\text{mol l}^{-1}$ verläuft während der ersten zwei Stunden zunächst vergleichbar zur Fermentation mit JG991. Nach 20 min erreicht die Stromdichte ein Maximum von $817,5 \pm 93,8 \text{ mA m}^{-2}$. Nach 2,2 h verlangsamt sich der Abfall gegenüber dem Vergleichsexperiment mit JG1353 bis circa 9,5 h. Danach verhalten sich alle drei Ansätze mit 10 mmol l^{-1} Glucose vergleichbar. Im Ansatz mit $546 \mu\text{mol l}^{-1}$ wird ein wesentlich höheres Maximum mit $1284,9 \pm 138,5 \text{ mA m}^{-2}$ nach 15 min erreicht. Der weitere Verlauf ist vergleichbar zum Ansatz mit $273 \mu\text{mol l}^{-1}$. Lediglich die mittlere Stromdichte über 8 h liegt etwas höher mit $545,7 \pm 10,7 \text{ mA m}^{-2}$ gegenüber $467,5 \pm 38,4 \text{ mA m}^{-2}$ im Ansatz mit $273 \mu\text{mol l}^{-1}$.

Die chemische Analyse (Abbildung 3.39b) der Experimente zeigt ein nahezu identischen Verlauf. In 8 h werden $7,40 \pm 0,90 \text{ mmol l}^{-1}$ ($273 \mu\text{mol l}^{-1}$) und $7,73 \pm 0,26 \text{ mmol l}^{-1}$ ($546 \mu\text{mol l}^{-1}$) Glucose umgesetzt. Zeitgleich entstehen $5,09 \pm 0,37 \text{ mmol l}^{-1}$ und $5,46 \pm 0,02 \text{ mmol l}^{-1}$ Acetoin. Die Bildung von Mannit wurde nicht beobachtet. Die Produktivitäten der beiden Fermentationen betragen damit $56,04 \pm 4,08 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bei einer Ausbeute von $69,4 \pm 7,1 \%$ für $273 \mu\text{mol l}^{-1}$ Methylenblau und $60,10 \pm 0,17 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bei einer Ausbeute von $70,69 \pm 229,00 \%$ für $546 \mu\text{mol l}^{-1}$.

Der Vergleich zwischen den Fermentationstämmen zeigt, dass im Stoffwechsel von JG1295 durch die Modifikation anaboler Reaktionen eine längere Fermentation bei höherer

Rate möglich ist. Im folgenden soll der Stamm dazu genutzt werden die maximale Leistung des Fermentations-Systems zu ermitteln.

3.6. Maximale Stromdichte in der Elektrofermentation

3.6.1. Sättigung der Elektrode

In einem weiteren Untersuchungsschritt sollte evaluiert werden ob das Fermentationssystem unter den zuletzt gezeigten Bedingungen voll ausgelastet ist. Zu diesem Zweck wurde die Mediatorkonzentration in zwei Ansätzen jeweils verdoppelt.

Abbildung 3.40 zeigt den zeitlichen Verlauf (a) und die mittlere Stromdichte (b) über 8 h für die Elektrofermentation von JG1295 bei $OD_{600} = 30$ und 273, 546 beziehungsweise 1092 $\mu\text{mol l}^{-1}$ Metylenblau. Alle drei Experimente zeigen ähnliche zeitliche Verläufe, was sich in den mittleren Stromdichten widerspiegelt. Der Ansatz mit 546 $\mu\text{mol l}^{-1}$ Metylenblau zeigt zu Beginn eine im Vergleich etwas niedrigere Stromdichte. Entsprechend ist der Wert geringer als für die anderen beiden Ansätze.

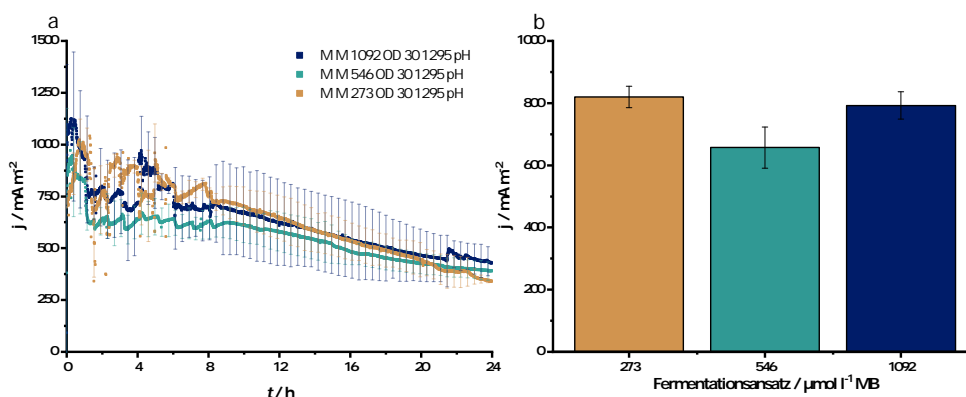


Abbildung 3.40.: Elektrofermentation mit JG1295 im Mini-Reaktor in MOPS-gepuffertem Medium bei $OD_{600} = 30$ mit 50 mmol l^{-1} Glucose und 273, 546 und $1092 \mu\text{mol l}^{-1}$ Metylenblau. **a** Chronoamperometrie und **b** mittlere Stromdichte über 8 h.

3.6.2. Pumpreaktor unter Sättigungsbedingungen

Die höchste Stromdichte für das Mini-Reaktor-System konnte in Abbildung 3.37 gezeigt werden. Diese Bedingungen sollten nun auf den Pumpreaktor übertragen werden, um zu ermitteln, ob Diffusionslimitierung im Prozess besteht. Hierzu wurde das Experiment analog zu 3.37 durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.41 zusammengefasst. Im zeitlichen Verlauf von 24 h steigt die Stromdichte in den ersten 9 h langsam an und fällt dann im weiteren Verlauf ab (Abbildung 3.41a). Die maximale Stromdichte wird nach 8 h erreicht mit einem Wert von $4,90 \pm 0,45 \text{ mA m}^{-2}$. Die mittlere Stromdichte beträgt $4,10 \pm 0,30 \text{ mA m}^{-2}$. Die chemische Analyse (Abbildung 3.41b) zeigt

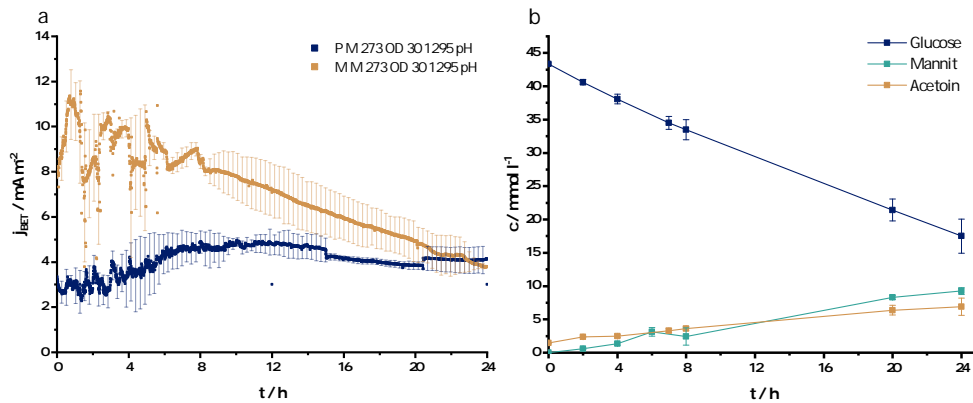


Abbildung 3.41.: Elektrofermentation von JG1295 im Pumpreaktor unter Sättigungsbedingungen. **a** Stromdichte von Pumpreaktor (blau) und Mini-Reaktor (gelb) und **b** chemische Analyse der Pump-Reaktor Fermentation im zeitlichen Verlauf über 24 h.

einen Glucoseumsatz von $24,52 \pm 3,65 \text{ mmol l}^{-1}$ bei einer gleichzeitigen Acetoinbildung von $6,20 \pm 0,37 \text{ mmol l}^{-1}$. Die Ausbeute an Acetoin beträgt damit $23,03 \pm 1,53 \%$ bei einer Produktivität von $22,75 \pm 1,35 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Die CE beträgt $31,32 \pm 3,36 \%$.

3.7. Übersicht über alle Elektrofermentationsexperimente

In den folgenden Abbildungen sind Evaluationsparameter aller Elektrofermentationsexperimente gegenüber gestellt. Ziel ist es, ratenbestimmende Parameter zu ermitteln. Als Legende sind eindeutige Chiffren verwendet, diese enthalten Informationen über alle variablen des Experiments und sind wie folgt zu lesen:

M	PBS	50	OD6	991	pH
Reaktor-System	Medium	$\mu\text{mol l}^{-1}$ Methylenblau	OD ₆₀₀ bei Inokulation	Stamm-Nummer	pH-Kontrolle

Für das Reaktor-System wird unterschieden zwischen:

- S** 250-ml-Reaktor
- M** Mini-Reaktor
- P** Pumpreaktor

Für das Medium wird unterschieden zwischen:

- PBS** PO_4^{3-} -Puffer, Casein Hydrolysat, 20 mmol l^{-1} Glucose
- M** MOPS-Puffer, Hefeextrakt, 50 mmol l^{-1} Glucose
- M light** MOPS-Puffer, Hefeextrakt, 10 mmol l^{-1} Glucose

Stromdichte

Abbildung 3.42a zeigt die mittlere Stromdichte bezogen auf die **geometrische Elektrodenoberfläche** (j). In den ersten drei Experimenten mit PBS Medium wurde unabhängig von Reaktormodell und Zelldichte, eine vergleichbare Stromdichte erreicht. Mit Einführung des optimierten Mediums und der Kontrolle des pH-Wertes erreicht die Stromdichte Werte um 250 mA m^{-2} , unabhängig von Stamm und Zelldichte. Mit **Erhöhung der Mediatorkonzentration** auf $273 \mu\text{mol l}^{-1}$, besteht eine höhere Varianz zwischen den einzelnen Ansätzen mit $\text{OD}_{600} = 6$. Die Ansätze mit geringer Glucosekonzentration erreichen je nach Stamm unterschiedliche Stromdichten mit dem höchsten Wert für JG1295 bei $633,4 \pm 48,3 \text{ mA m}^{-2}$. Wird unter vergleichbaren Bedingungen die **Zelldichte auf $\text{OD}_{600} = 30$** erhöht erreichen die Ansätze mit hoher Glucosekonzentration nochmals höhere Stromdichten als ihre Vergleichsexperimente. Für den Fall von 10 mmol l^{-1} Glucose ist die Stromdichte gleich im Vergleich zum $\text{OD}_{600} = 6$ Experiment.

In Abbildung 3.42b ist die Stromstärke auf die **innere Oberfläche der Elektrode** (BET-Oberfläche) normiert (j_{BET}). Dies erlaubt einen Vergleich der Flächennutzung zwischen den drei Reaktorsystemen. Im Vergleich zwischen 250-ml-Reaktor bei $\text{OD}_{600} = 0,5$ und dem Minireaktor bei $\text{OD}_{600} = 6$, was vergleichbaren Zellzahl entspricht, verschlechtert sich die Flächennutzung von $2,07 \pm 0,24 \text{ mA m}^{-2}$ auf $1,08 \pm 0,08 \text{ mA m}^{-2}$. Das Pumpreaktorsystem erreicht einen Wert von $3,43 \pm 0,02 \text{ mA m}^{-2}$, bei gleicher Zelldichte wie im Mini-Reaktor. Gegenüber dem 250-ml-Reaktor entspricht das einer 10x höheren Zellzahl im System. Die **höchste Flächennutzung** wird im Mini-Reaktor im Ansatz M M 273 OD 30 1295 pH erreicht. Mit $9,11 \pm 0,38 \text{ mA m}^{-2}$ entspricht das einer 9x höhere Flächennutzung als die erste Fermentation im Mini-Reaktor (M PBS 50 OD 6 991) und 4,4x höher als die Fermentation im 250-ml-Reaktor (S PBS 50 OD 0,5 991). Unter Vergleichbaren Bedingungen erreicht der Pump-Reaktor eine Flächennutzung von $4,29 \pm 0,11 \text{ mA m}^{-2}$.

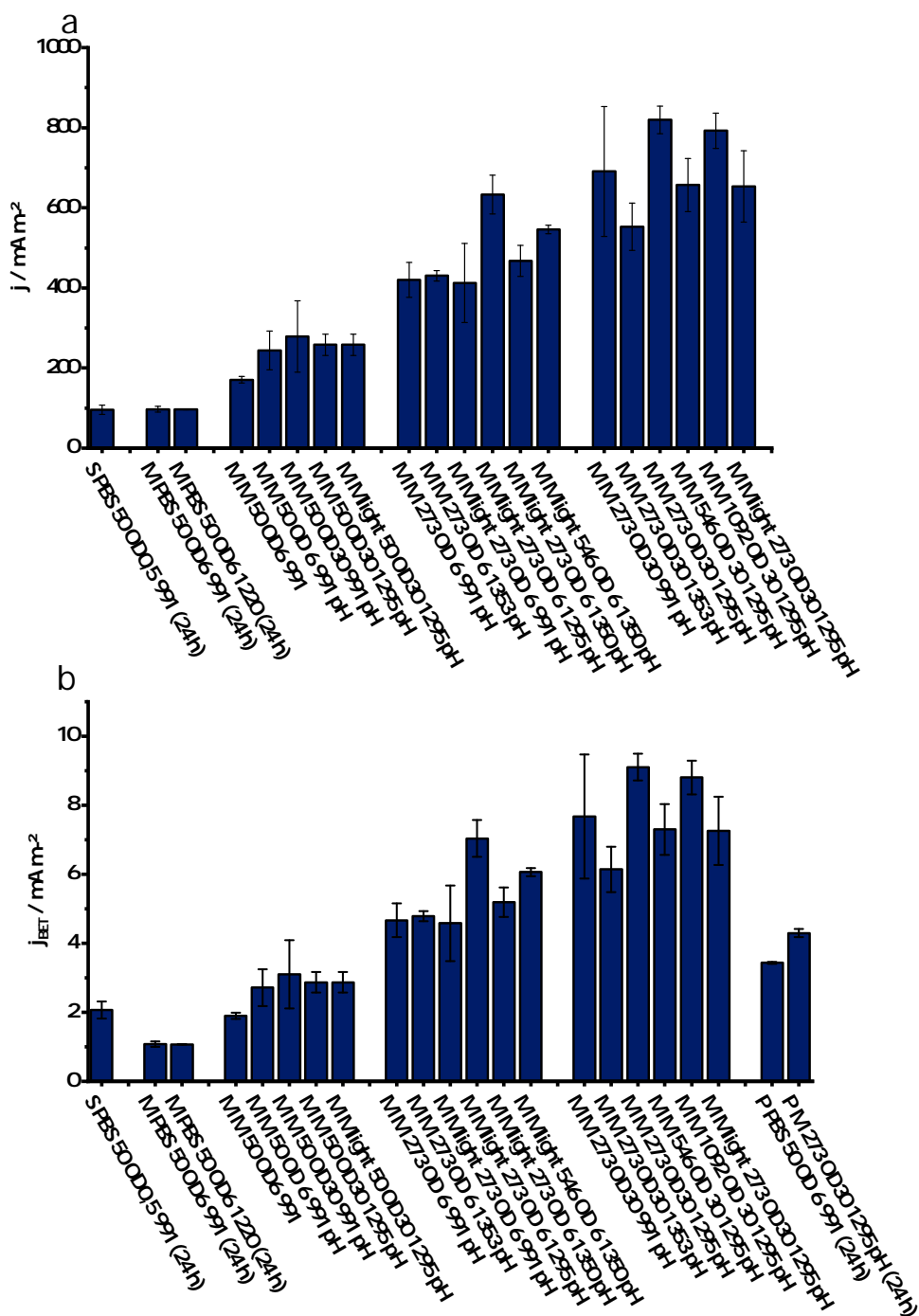


Abbildung 3.42.: Übersicht der mittleren Stromdichte über alle Experimente. **a** Stromdichte bezogen auf die geometrische Elektrodenoberfläche (j). **b** Stromdichte bezogen auf die BET-Oberfläche der Elektrode (j_{BET}). Die Werte wurden jeweils für die ersten 8 h berechnet, sofern nicht anderes angegeben.

Ausbeute und Coulomb-Effizienz

In Abbildung 3.43 sind Effizienzparameter für die Elektrofermentationsexperimente gezeigt.

Die molare Produktausbeute für Acetoin Y_{Ace} (Abbildung 3.43a) variiert in den Experimenten zwischen $0,230 \pm 0,015 \text{ mol mol}^{-1}$ (P M 273 OD30 1295 pH) und $0,790 \pm 0,075 \text{ mol mol}^{-1}$ (M PBS 50 OD6 991, M M 273 OD6 1350 pH und M Mlight 273 OD6 1295 pH). Experimente mit einer Ausbeute von unter $0,6 \text{ mol mol}^{-1}$ wurden alle bei $\text{OD}_{600} = 30$ durchgeführt, mit Ausnahme von P PBS 50 OD6 991. Zu den Experimenten mit einer Ausbeute größer als $0,6 \text{ mol mol}^{-1}$ gehört nur ein Experiment bei OD 30 (M Mlight 273 OD30 1295). Betrachtet man die Experimente mit den höchsten Ausbeuten (M PBS 50 OD6 991, M M 273 OD 6 1353 pH, M Mlight 273 OD6 1295 pH), so ist zu erkennen, dass dies unabhängig vom verwendeten Produktionsstamm erreicht wird. Die Werte der CE (Abbildung 3.43b) korrelieren mit wenigen Ausnahmen (S PBS 50 OD0,5 991, M Mlight 273 OD30 1295 pH) gut mit den Ausbeuten aus Abbildung 3.43a. Die Werte variieren zwischen $14,99 \pm 5,76 \%$ (S PBS 50 OD0,5 991) und $140,6 \pm 18,8 \%$ (M Mlight 273 OD30 1295 pH). Neben der zuvor genannten Fermentation M Mlight 273 OD30 273 pH wird nur noch im Ansatz M M 273 OD 6 1353 pH mit $127,1 \pm 7,9 \%$ ein Werte von deutlich über 100 % gemessen. Für Fermentationen bei $\text{OD}_{600} = 30$ liegen die CE wesentlich unter den Experimenten bei $\text{OD}_{600} = 6$, mit Ausnahme von M M 273 OD 30 1295 pH.

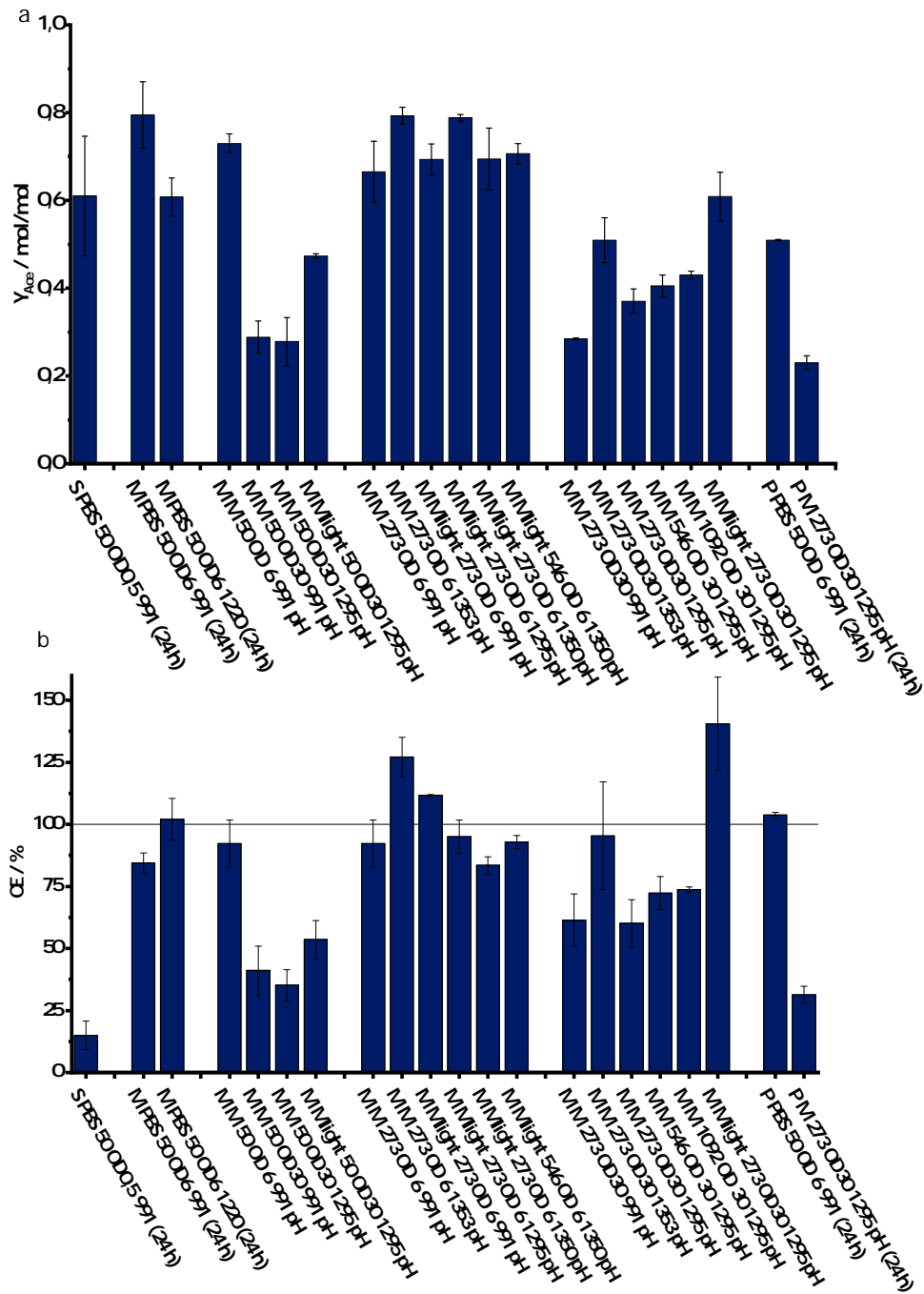


Abbildung 3.43.: Übersicht der Effizienzparameter über alle Experimente. **a** Ausbeute von Acetoin pro Mol verbrauchter Glucose Y_{Ace} . **b** Coulomb-Effizienz (CE) bezogen auf verbrauchte Glucose. Die Werte wurden jeweils für die ersten 8 h berechnet, sofern nicht anderes angegeben.

Produktivität

Die volumenbezogene Produktivität (Abbildung 3.44a) zeigt für alle Experimente ohne **pH-Kontrolle**, unabhängig vom jeweiligen Reaktorsystem, wesentlich geringere Raten für die Bildung von Acetoin im Vergleich zu Ansätzen mit pH-Kontrolle. In den Ansätzen mit kontrolliertem pH-Wert erreichen die Ansätze mit $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ Produktivitäten um $30 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ unabhängig von Stamm und Zelldichte. Abweichend zum Verlauf der Stromdichte ist beim Übergang zu **höherer Mediatorkonzentration** kein Anstieg der Produktivität für die Stämme JG991 und JG1353 zu beobachten. JG1295 erreicht unter diesen Bedingungen mit $76,04 \pm 0,59 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ den höchsten Wert unter allen Experimenten. Auch für JG1353, welcher aus JG1295 durch Integration von *pta* hervorgeht, ist ein Anstieg der Produktivität zu beobachten, wenn auch geringer als bei JG1295. Für die beiden mit JG1353 getesteten Konzentrationen von Methylenblau wird ein Wert von $\approx 60 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ gemessen. Für **Fermentationen mit $\text{OD}_{600} = 30$** ergeben sich für die Ansätze mit JG1295 die höchsten Produktivitäten. Mit $273 \mu\text{mol l}^{-1}$ Methylenblau erreicht JG1295 allerdings nur $74,30 \pm 8,83 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ eine vergleichbar hohe Produktivität wie im $\text{OD}_{600} = 6$ Experiment. Im Pump-Reaktor wird unter vergleichbaren Bedingungen eine 70 % geringere Produktivität erreicht. Wird die Mediatorkonzentration weiter erhöht, geht die Produktivität für $1092 \mu\text{mol l}^{-1}$ um 11 % und für $546 \mu\text{mol l}^{-1}$ um 30 % zurück.

In Abbildung 3.44b sind die Werte für die Acetoinbildung auf die pro Volumen verfügbare innere Elektrodenoberfläche (spezifische Oberfläche S_V) des Reaktors bezogen. Die daraus ermittelte spezifische Produktivität (Q_s) erlaubt den Vergleich zwischen den Reaktorsystemen unabhängig von der Elektrodengeometrie. Auffällig ist die extrem hohe spezifische Produktivität im 250-ml-Reaktor mit einem Wert von $7,18 \pm 0,23 \text{ mg m}^{-2} \text{ h}^{-1}$. Dem gegenüber erreicht das vergleichbare Experiment im Mini-Reaktor einen rund 90 % geringeren Wert von $0,74 \pm 0,02 \text{ mg m}^{-2} \text{ h}^{-1}$. Das Pump-Reaktorsystem erreicht unter vergleichbaren Bedingungen einen Wert von $1,39 \pm 0,03 \text{ mg m}^{-2} \text{ h}^{-1}$. Die **höchste spezifische Produktivität** wird in Ansatz M M 273 OD6 1295 pH mit $4,68 \pm 0,56 \text{ mg m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ erreicht. Unter identischen Bedingungen im Pump-Reaktor Produktivität von $2,60 \pm 0,16 \text{ mg m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ erzielt.

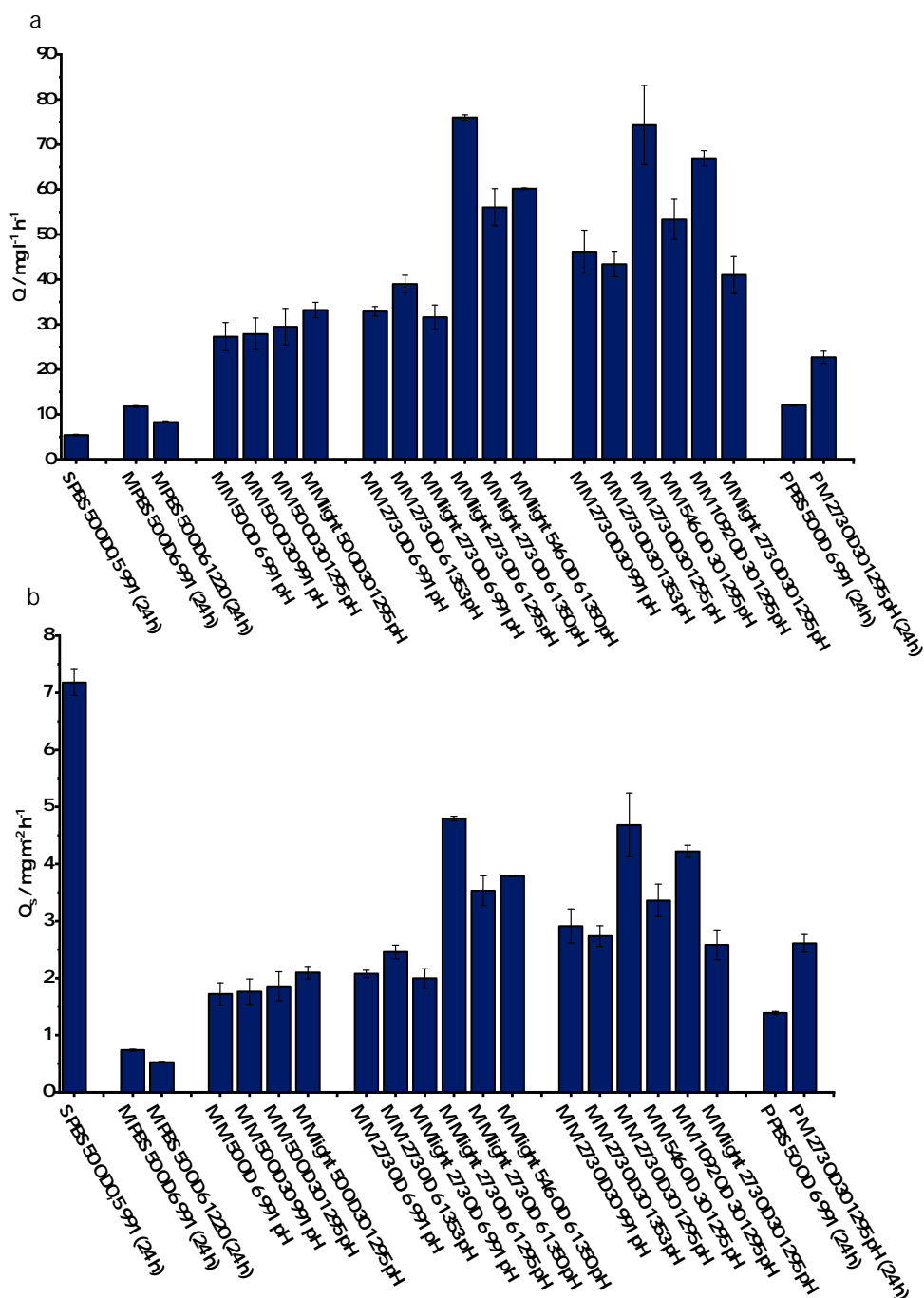


Abbildung 3.44.: Übersicht zur Produktivität von Acetoin über alle Experimente. **a** Produktivität bezogen auf das Reaktorvolumen (Q). **b** Produktivität bezogen auf die spezifische Oberfläche des Reaktor-Modells (Q_s). Die Werte wurden jeweils für die ersten 8 h berechnet, sofern nicht anderes angegeben.

Abhängigkeiten der Evaluationsparameter

In Abbildung 3.45 sind die BET-Stromdichte j_{BET} (**a**), Produktivität $Q_{Acetoin}$ (**b**) und Ausbeute $Y_{Acetoin}$ (**b**) für JG991 und JG1295 in Abhängigkeit von Methylenblaukonzentration und Zelldichte gezeigt. Dabei fällt zunächst, der bereits oben geschilderte Zusammenhang auf, nach dem in beiden Stämmen Stromdichte und Produktivität mit höherer Zelldichte und höherer Methylenblaukonzentration zunehmen. Die Ausbeute ist jedoch bei niedrigen Zelldichten höher und von der Methylenblaukonzentration kaum beeinflusst. Für die Stromdichte und Produktivität kann zudem ein wesentlich steilerer Anstieg zu höheren Methylenblaukonzentrationen in JG1295 gegenüber JG991 beobachtet werden. In JG1295 werden hohe Produktivitäten sowohl bei hoher als auch bei niedriger Zelldichte erreicht. In allen Darstellungen korreliert eine niedrige Mediatorkonzentration und eine hohe Zelldichte jeweils mit einem niedrigen Wert für den betrachteten Evaluationsparameter.

3.7. Übersicht über alle Elektrofermentationsexperimente

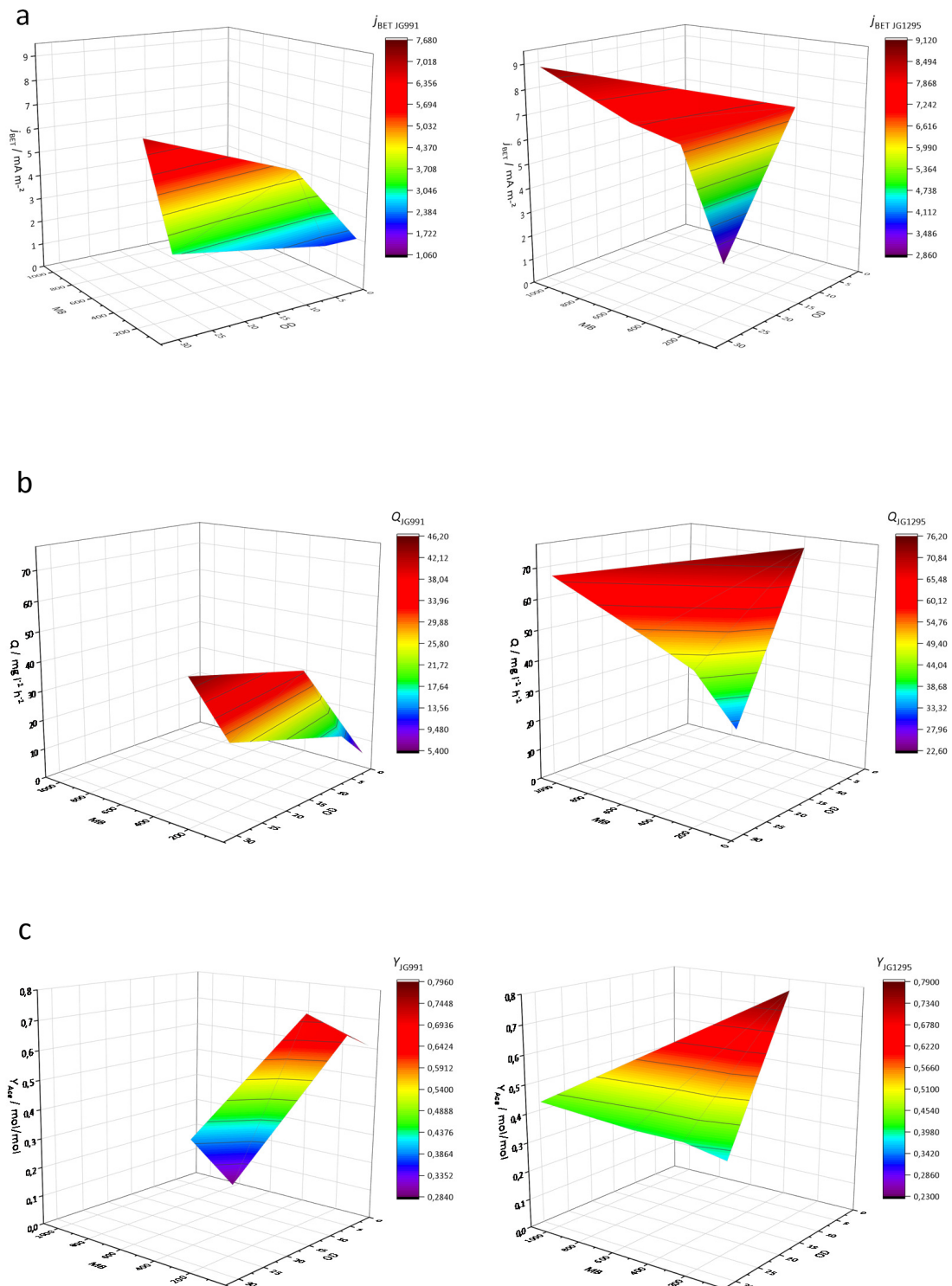


Abbildung 3.45.: Korrelation der Evaluationsparameter **a** BET-Stromdichte, **b** Produktivität und **c** Ausbeute mit Zelldichte und Methyleneblaukonzentration in JG991 und JG1295.

4. Diskussion

Vor dem Hintergrund einer hochgradig von fossilen Ausgangsstoffen abhängigen industriellen Chemie, sollte in dieser Arbeit ein bioelektrochemischer Ansatz für die anoxische Produktion für die Basischemikalie Acetoin in *Escherichia coli* etabliert werden. Da die biologische Synthese von Acetoin aus Glucose mit einer Nettofreisetzung von vier Elektronen einhergeht, sind konventionelle Fermentationen auf die Zugabe von Sauerstoff angewiesen. In einer anodischen Elektrofermentation lassen sich Stoffwechselwege, deren Redoxbilanz nicht ausgeglichen ist realisieren ohne, dass ein, sich verbrauchender Elektronenakzeptor zugesetzt werden muss. Es wurden daher konkret drei Ziele verfolgt: Basierend auf einem vorab entwickelten *E. coli*-Produktionsstamm sollte zunächst die Elektrofermentation mit *E. coli* in einem geeigneten Fermenter realisiert werden (Sturm-Richter u. a. 2015; Förster 2014). In diesem System sollten grundlegende Parameter und ihr Einfluss auf den Prozess ermittelt und eine optimale Konfiguration abgeleitet werden. Zuletzt sollte der Metabolismus des Produktionsstamms in einer Verbindung von rationalen und *ad hoc* Experimenten untersucht und modellhaft beschrieben werden. Die Erkenntnisse hieraus sollten dann dazu dienen, Umsatz und Ausbeute der Fermentation zu maximieren.

4.1. Etablierung einer Elektrofermentation für Acetoin in *E. coli*

4.1.1. Konzeptexperiment und Reaktorentwicklung

250 ml-Reaktor

Die Umsetzung eines Konzeptexperiments für die Elektrofermentation von Acetoin in *E. coli* basierte auf der Zusammenführung bereits in Vorarbeiten entwickelter Konzepte. Der verwendete Reaktortyp konnte bereits von (Golitsch 2016) zur Untersuchung einer synthetischen Elektronentransportkette in *Rhodobacter sphaeroides* etabliert werden. Auf physiologischer Seite war es notwendig einen *E. coli* Stamm zu verwenden, dessen Metabolismus strikt auf die Anwesenheit eines externen Elektronenakzeptors angewiesen ist, um einen gärenden Stoffwechsel zu vermeiden. Der von Förster (2014) entwickelte Stamm erlaubt es, unter Anwendung einer Methylenblau-unterstützten Elektronentransportkette (Sturm-Richter u. a. 2015), diesen Metabolismus mit einer Elektrode als terminalen Elektronenakzeptor zu verknüpfen. Ein Effekt dieser Modifikationen war eine hohe Effizienz für die Bildung von Acetoin bei einem verlangsamten Zellwachstum unter anoxischen Bedingungen. Das Medium für die Elektrofermentation bestand aus einem PO_4^{3-} -gepufferten Minimalmedium mit einer Molarität der Leitsalze NaCl und KCl von insgesamt 140 mmol l^{-1} . Da in der Elektrofermentation Kulturmedium zeitgleich auch

Elektrolyt für die elektrochemische Zelle ist, wurde ein Medium mit hoher Leitfähigkeit gewählt (Golitsch u. a. 2013; Kipf u. a. 2013).

Die gemessenen Stromdichte in diesem ersten Konzeptexperiment durchläuft nach 10 h ein Maximum. Dies kann durch die Überlagerung von zwei Einflüssen interpretiert werden. Ein Anstieg der Stromdichte kann mit einer Kolonisation des Elektrodenvolumens und -oberfläche durch *E. coli*-Zellen, sowie die Anpassung deren Expressionsmusters, aber auch durch die Durchdringung und Absättigung der Elektrode mit Methylenblau und Glucose interpretiert werden. Die Abnahme der Stromdichte im weiteren Verlauf deutet auf den Verlust einer, für den Stoffwechsel notwendigen Komponente und einen daraufhin limitierten Umsatz hin. Als verantwortliche Punkte kommen hierfür insbesondere die Selbsterhaltung des Zellstoffwechsels und die Verfügbarkeit von oxidiertem Methylenblau in Frage. Ersteres wird entscheidend durch die stark verringerte Stoffwechselrate unter anoxischen Bedingungen bestimmt (NO_3^- und DMSO-Wachstumabbildung 1.4). Da das Redoxpotential von Methylenblau $E^{0'} = 11 \text{ mV}$ nochmals wesentlich unter dem von DMSO liegt ist davon auszugehen, dass die Energieausbeute noch stärker eingeschränkt ist (vgl. Tabelle 1.1). Der Einfluss des Mediators muss durch die Beobachtung von dauerhaft reduziertem Methylenblau im Fermenter als limitierend eingeschätzt werden. Da der Redoxzustand des Mediators vom Verhältnis der Ratenkonstanten von Oxidation an der Elektrode und Reduktion durch *E. coli* bestimmt wird, muss daher angenommen werden, dass die Regeneration des Mediators zu langsam verläuft.

Bei der Betrachtung des Stoffumsatzes ist zu erkennen, dass rund 67 % der verbrauchten Glucose zu Acetoin umgesetzt wurde. Allerdings können nur rund 15 % der hierbei freigesetzten Elektronen auch auf der Elektrode detektiert werden. Die Coulomb-Effizienz (CE) wird maßgeblich durch die Verfügbarkeit eines alternativen Elektronenakzeptors neben der Anode bestimmt. In vielen Fällen handelt es sich dabei um O_2 , welcher in den Reaktor eindringt und als Elektronenakzeptor präferiert wird (Unden, Becker, S. u. a. 1994). Unter der Annahme, dass O_2 für die geringe CE verantwortlich ist, bedeutet dies, dass die Fermentation nur in sehr geringem Umfang von der Elektrodenreaktion abhängig ist. In der analog durchgeführten *open-circuit*-Fermentation kann diese Beobachtung bestätigt werden. Beide Experimente erreichen vergleichbare Glucoseumsätze, mit $3,80 \pm 0,69 \text{ mmol l}^{-1}$ in der Elektrofermentation und $4,52 \pm 0,91 \text{ mmol l}^{-1}$ in der *open-circuit*-Fermentation. Für den Umsatz von Glucose ist die Verfügbarkeit der Anode als Elektronenakzeptor in diesem Experiment nicht erforderlich. Bemerkenswert ist jedoch, dass im Kontrollexperiment lediglich $0,68 \pm 0,02 \text{ mmol l}^{-1}$ Acetoin gebildet werden. Im Gegensatz dazu erreicht die Elektrofermentation $2,59 \pm 0,63 \text{ mmol l}^{-1}$ Acetoin.

Ebenfalls fällt auf, dass besonders im *open-circuit*-Experiment sämtlicher Stoffumsatz im ersten Zeitintervall stattfindet. Dieser Verlauf stützt den bereits oben geäußerten Verdacht, dass hierbei abiotische Effekte, wie O_2 aus der Vorkultur oder die Adsorption von Methylenblau und Glucose an der Elektrodenoberfläche zum Tragen kommen. Insbesondere für die Adsorption von Methylenblau gibt es zahlreiche Untersuchungen in der Literatur (Ho 2006). Auch, dass nahezu kein Acetoin gebildet wurde legt den Schluss nahe, dass zumindest ein Teil des Umsatzes nicht auf biologische Aktivität zurück zu führen ist.

Zusammenfassend kann vermerkt werden, dass die Elektrofermentation von Acetoin in *E. coli* umgesetzt werden konnte und eine Ausbeute für das Produkt erreicht werden konnte, wie sie bereits in mikrooischen Fermentationen mit *Bacillus subtilis* beschrieben

ist. (Chen, T. u. a. 2013; Zhang, B. u. a. 2016). Der geringe biotische Stoffumsatz, sowie der starke Einfluss abiotischer Effekte auf die Fermentation legen offen, dass die Fermentationsplattform, sowie das experimentelle Prozedere ungeeignet sind um den Prozess oder die Physiologie des Produktionsstammes genauer zu untersuchen. Bevor biotische Einflüsse auf die Fermentation untersucht werden können, sollten daher zunächst Anpassungen am Reaktorkonzept und der Prozessführung vorgenommen werden um folgende Probleme zu adressieren:

Redoxzustand des Mediators Eine Grundvoraussetzung für maximalen Stoffumsatz durch den biologischen Teil dieses Systems stellt die Verfügbarkeit eines Elektronenakzeptors in Form von oxidiertem Methylenblau dar. Um die Verfügbarkeit zu erhöhen muss folglich die Reoxidation an der Elektrodenoberfläche beschleunigt werden. Dies sollte durch ein deutlich vergrößertes Verhältnis von Elektrodenoberfläche zu Elektrolytvolumen erreicht werden. Dazu wurde das Elektrolytvolumen von 250 ml auf 23,11 ml verringert. Durch die Reorganisation der Elektrodenanordnung bleibt die geometrische Elektrodenfläche nahezu unverändert.

Absättigung der Elektrode Deutet man den Anstieg der Stromdichte zu Beginn des Experiments als eine Absättigung von Elektrodenoberfläche mit Methylenblau, Glucose und anderen Bestandteilen des Mediums, führt dies auch zwangsläufig zu einer Anreicherung der Substanzen im restlichen Elektrolyt. Da Methylenblau als Mediator eine Schlüsselrolle in diesem Prozess einnimmt und zudem noch in sehr geringer Konzentration im Medium vorliegt, sind die Auswirkungen durch eine Adsorption an der Elektrodenoberfläche besonders gravierend. Um dies zu vermeiden sollte die Elektrode daher in einem 16 stündigen Präinkubationsschritt bei polarisierter Elektrode mit sterilem Medium abgesättigt werden.

O₂-Kontamination Der äußerst geringe Wert für die CE zeigt die Anwesenheit eines zusätzlichen Elektronenakzeptors im System an. Um auszuschließen, dass es sich hierbei um O₂ handelt, wurde das Reaktorsystem nicht mehr nur mit N₂ im Überstand begast, sondern der gesamte Versuchsaufbau in einem Anaerobenzelt mit einer N₂/H₂-Atmosphäre betrieben. Die katalytische Umsetzung von eindringendem O₂ mit Hilfe des H₂, schließt O₂ als relevanten Einflussfaktor aus. Ferner bedingt die vertikale Ausrichtung von Arbeitselektrode, Inonenaustauschmembran und Gegenelektrode eine blasenfreien Befüllung ohne Gasphase im Reaktor. Die Konstituierung anoxischer Bedingungen muss daher extern erfolgen.

Stoffumsatz Um den biotischen Stoffumsatz neben abiotischen Prozessen klarer identifizieren zu können, sollte eine Beschleunigung der Rate durch eine erhöhte Zelldichte erreicht werden. Hierdurch steht mehr Katalysator für den Stoffumsatz zur Verfügung. Dabei wurde die Anpassung so gewählt, dass nahezu dieselbe Zellzahl im verringerten Volumen von 23,11 ml suspendiert wird, wie zuvor in 250 ml. Die Zelldichte wurde von OD₆₀₀ = 0,5 auf OD₆₀₀ = 6 erhöht.

Mini-Reaktor

Bei der Fermentation im Mini-Reaktor fällt zunächst der qualitative Unterschied im Verlauf der Stromdichte auf. Es findet kein Anstieg der Stromdichte zu Beginn des Experiments statt.

Nach einem Abfall der Stromdichte über die ersten 30 h, stabilisiert sich die Stromdichte um einen Wert von 70 mA m^{-2} . Für die Interpretation der Abnahme der Stromdichte im 250 ml-Reaktor kam entweder eine Verringerung der zellulären Aktivität auf Grund mangelnden Anabolismus oder auf Grund von abgereicherten Medienbestandteilen in Frage. Da in diesem Experiment die Energieausbeute des zellulären Stoffwechsels nicht verändert wurde, es aber dennoch zu einer Stabilisierung der Stromdichte kommt, kann dies als Erklärung ausgeschlossen werden. Die Vergrößerung von $\frac{A}{V}$ um $10,8\times$ hat wie erwartet zur Folge, dass der Mediator in oxidiertem Form zur Verfügung steht. Die höhere Verfügbarkeit von Methylenblau insgesamt zeigt sich im Vergleich der Proben zwischen Mini-Reaktor und 250 ml-Reaktor. Dies stützt die Annahme aus dem vorherigen Experiment, dass sich Medienkomponenten im Überstand abreichern. Die Präinkubationsphase erlaubt in diesem Experiment eine Absättigung der Oberfläche und einen stabilen Strom nach einer kapazitiven Entladung in den ersten 30 h. Zudem ist chemische Modifikation von Graphit-Elektroden mit Methylenblau nach analogem Vorgehen eine etablierte Methode um Überpotentiale für die Umsetzung von Biomolekülen wie Hämproteine oder NADH zu verringern (Brett u. a. 1999; Wring u. a. 1992; Ye u. a. 1988).

Die nächste Anpassung im Fermentationsablauf zielte darauf ab, O_2 -Kontaminationen im System zu vermeiden. Dies spiegelt sich in einem starken Anstieg der CE von rund 15 % auf 84 % wieder. Glucose, welche nicht zu Acetoin umgesetzt wird, kann entweder zur Bildung von Biomasse oder dem Zellunterhalt (NGAM) verwendet werden. Beide Prozesse sind ohne eine weitere Freisetzung von Elektronen möglich. Berücksichtigt man zur Berechnung nur Glucose, welche zu Acetoin umgesetzt wurde, ergibt sich ein Wert von 94,3 % im Mini-Reaktor und ein Wert von 23,8 % im 250 ml-Reaktor. Für die weitere Untersuchung des Systems ist dies ein wichtiges Etappenziel, da nun gewährleistet ist, dass der wesentliche Teil des Substratumsatzes auf Elektrodenatmung basiert. Dies spiegelt sich auch in der analog durchgeführten *open-circuit*-Fermentation wieder, in welcher kein signifikanter Substratumsatz zu messen war.

Beim Vergleich der mittleren Stromdichte in den ersten 24 h zwischen diesem Experiment und der Fermentation im 250 ml-Reaktor ist kein Unterschied festzustellen. Da in beiden Experimenten die selbe Anzahl Zellen eingesetzt wurde, scheint sich hier eine Begrenzung der Stromdichte durch den Zellstoffwechsel auszudrücken. Die Produktivität im Minireaktor liegt mit rund $11,76 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}$ etwas mehr als doppelt so hoch gegen über $5,43 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}$ im vorangegangenen Experiment. Dies entspricht augenscheinlich nicht der zu erwartenden Verzehnfachung der Produktivität durch die Vergrößerung von $\frac{A}{V}$ bei gleicher Zellzahl. Berücksichtigt man jedoch die CE in beiden Fällen und damit den Teil der Produktivität welcher in einer Elektrodenreaktion erfolgt ist, ergibt sich ein Verhältnis von $11,09 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}$ im Mini-Reaktor zu $1,28 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}$ im 250 ml-Reaktor, was Faktor 8,7 entspricht. Zudem konnte die Produktausbeute auf 79 % gesteigert werden, was durch eine Verringerung anaboler Konkurrenzreaktionen aufgrund von weniger O_2 im System zu erklären ist. Da im *open-circuit*-Kontrollexperiment keine Substratabnahme sowie nur eine geringfügige Acetoinproduktion von $1,27 \text{ mmol l}^{-1}$ gemessen wurde, kann die Elektrofermentation im Minireaktor als hochgradig elektrodenabhängige Reaktion betrachtet werden.

Berechnet man die transferierte Ladung pro Methylenblau-Molekül im Reaktor, lässt sich eine Aussage darüber treffen wie oft jedes Methylenblau-Molekül oxidiert und reduziert wurde. Die Zyklenzahl für Methylenblau beträgt in den ersten 24 h $86\times$ und nach 90 h

367×. Dies verdeutlicht, dass Methylenblau tatsächlich zwischen Elektrode und Zelle als Mediator diffundiert.

Mit diesen Experimenten konnte damit erstmals die Elektroden-gestützte Fermentation von Acetoin in *E. coli* gezeigt werden. Die Evaluation von Ausbeute, CE und Mediator-Zyklen zeigen, dass es sich um einen hocheffizienten Prozess handelt, in dem zellulärer Stoffwechsel und Elektrodenreaktion eng mit einander verbunden sind. Der hierfür entwickelte Mini-Reaktor berücksichtigt die Anforderungen der Mediator-basierten Fermentation wie den hohe Flächenbedarf zur Reoxidation des Mediators.

Um zu evaluieren, ob die zur Verfügung gestellte Elektrodenfläche im Reaktor optimal genutzt wird, oder ob Diffusion zwischen Mediator und Zelloberfläche limitierend für die Gesamtreaktion ist, wurde eine Variante des 250 ml-Reaktors mit Durchflusselektrode entwickelt.

Pumpreaktor

Die Zielsetzung, welche dem Pump-Reaktorkonzept zu Grunde liegt, war zu ermitteln, ob der Fermentationsprozess unter den zuvor *ad hoc* abgeleiteten Bedingungen, durch Diffusion limitiert ist. Hierzu wurde, in Zusammenarbeit mit der AG Kerzenmacher (Universität Bremen, Fachbereich für Umweltverfahrenstechnik), in den Aufbau des 250 ml-Reaktors eine Elektrodenkassette verbaut, welche es erlaubt, mit Hilfe einer Peristaltikpumpe, den Elektrolyt beziehungsweise die Zellsuspension durch die dreidimensionale Struktur des Graphit-Vlies zu bewegen. Aus abiotischen Kinetikexperimenten und Modellrechnungen zum Verhalten der Durchflusselektrode ist bekannt (Abbildung A.4), dass oberhalb einer Flussrate von 300 ml/min die Kinetik der Elektrodenreaktion gesättigt ist. Bei der Pumprate von 455 ml/min ist also sichergestellt, dass die Stromdichte nicht durch die Diffusion von Methylenblau zur Elektrodenoberfläche limitiert wird. Die anderen Bedingungen der Elektrofermentation, wie Zelldichte oder experimenteller Ablauf waren identisch zur Fermentation im Mini-Reaktor. Um den Effekt auf die Stromdichte richtig beurteilen zu können wurde in diesem Experiment als Normierungsgröße die innere Oberfläche (BET-Oberfläche) der Elektrode verwendet. Hierbei handelt es sich um eine thermodynamische Materialkonstante, welche die Besetzung der Oberfläche durch Physisorption beschreibt (Brunauer u. a. 1938). Dies erlaubt im vorliegenden Fall die Nutzung der zur Verfügung stehenden inneren Oberfläche zu beurteilen.

Bei der Betrachtung des Verlaufs der Stromdichte in diesem Experiment, fällt zunächst auf, dass wesentlich mehr Strom pro Elektrodenfläche fließt als im Mini-Reaktor. Für den Minireaktor bedeutet das eine nicht optimale Ausnutzung der Elektrodenfläche. So erreicht der Pumpreaktor eine 3, 4× höhere BET-Stromdichte. Betrachtet man die Unterschiede qualitativ, so fällt ein zunächst steiler Anstieg in der Stromdichte auf. Es liegt daher die Vermutung auf der Hand, dass auch in diesem Fall ein Ausgleich zwischen dem Inneren der Elektrode und dem Elektrolytvolumen statt findet. Da auch in diesem Fall die Elektrode mit sterilem Medium vorinkubiert wurde und jetzt mit hoher Rate umgewälzt wird, ist nicht anzunehmen, dass der Effekt durch Methylenblau auftritt. Vielmehr ist anzunehmen, dass *E. coli* Zellen wesentlich länger benötigen um in das Vlies einzudringen, da die Elektrode im Pump-Reaktor aus zehn Lagen Elektroden-Vlies besteht. Zwar kann Methylenblau auch im Elektrolytvolumen reduziert werden, allerdings ist ein verkürzter Reaktionszyklus

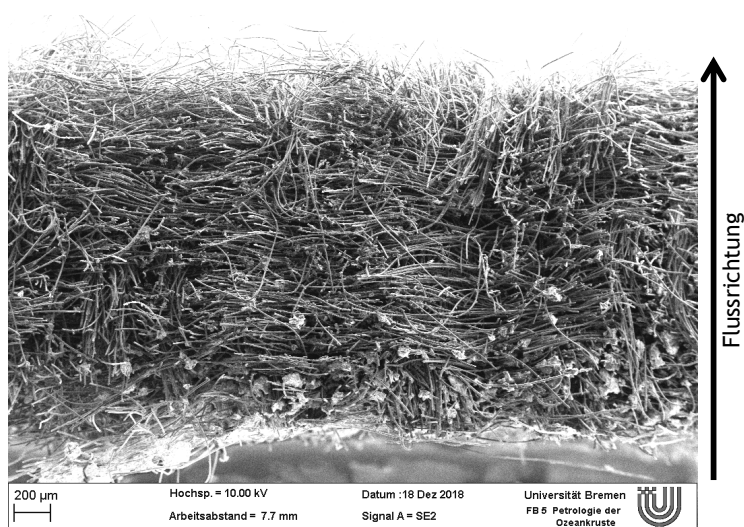


Abbildung 4.1.: REM-Aufnahme der äußeren Lage der Pumpelektrode im Querschnitt. Auf der, dem Elektrolyt zugewandten, Seite (unterer Rand) der Elektrode sind viele große Zellaggregate an den Fasern der Elektrode adhiert. Zum oberen Rand hin, in Flussrichtung des Elektrolyts, nimmt der Besatz ab. Abbildung freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von J. Erben (AG Kerzenmacher, UVT, Universität Bremen)

vorstellbar, in dem Methylenblau direkt an der Oberfläche von adsorbierten Zellen durch die Elektrode reoxidiert wird. Die Abnahme der Stomdichte in weiteren Verlauf, kann dieser Annahme folgend durch eine, in mehreren Schichten besetzte Elektrode, als Passivierung verstanden werden. In REM¹-Bildern der oberen Lage der Elektrode, lässt sich gut erkennen, wie die Besatzdichte von Vorderseite zu Rückseite abnimmt. Die inhomogene Ablagerung, kann zudem zu einer Unterversorgung von dicht besetzten Bereichen führen (Abbildung 4.1).

Betrachtet man die Stoffumsätze in dieser Fermentation, so fällt auf, dass Glucose mit relativ konstanter Rate über die Zeit umgesetzt wird. Die Acetoinbildung verlangsamt sich jedoch deutlich. Das spiegelt sich auch in der Ausbeute von rund 51 % wieder. Ursächlich hierfür können ebenfalls Biofilmeffekte sein (Flemming u. a. 2016). Insbesondere die, auf dem pMAL-Plasmid kodierte, β -Lactamase wird von den Zellen sekretiert und inaktiviert Ampicillin extrazellulär. Obere Schichten im Biofilm sorgen so für die Inaktivierung und schaffen eine Nische, in der Zellen ohne Acetoin-Plasmid einen Vorteil gegenüber Acetoin produzierenden Zellen haben. Betrachtet man die CE, so entspricht der gemessene Strom der umgesetzten Glucose (CE = 103,7 %). Gleichzeitig wird hieraus aber nur zu 51 % Acetoin gebildet. Dies zeigt, dass zwar Stoffwechsel über die Elektrode stattfindet, jedoch nicht in gleichem Umfang Produkt gebildet wird. Die Produktivität der Fermentation liegt bei rund $12 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}$, was der Fermentation im Mini-Reaktor entspricht. Da der Pump-Reaktor jedoch über eine geringere spezifische Oberfläche verfügt, ist die spezifische

¹Raster-Elektronen-Mikroskopie

Produktivität trotz der schlechteren Ausbeute mit $1,39 \text{ mg m}^{-2} \text{ h}$ rund doppelt so hoch wie im Minireaktor ($0,7 \text{ mg m}^{-2} \text{ h}$).

Die Elektrofermentation mit dem Pumpreaktor hat gezeigt, dass die Fermentation im Mini-Reaktor noch zu einem erheblichen Maß durch die Prozessbedingungen limitiert wird. Eine Fermentation im Pump-Reaktor ist aufgrund der geringeren spezifischen Oberfläche und der Filtration von Zellmasse nur zur Evaluation in kurzen Zeiträumen sinnvoll. Es wurde daher versucht im Weiteren den Einfluss zentraler Parameter auf Fermentation im Mini-Reaktor zu identifizieren und ein Optimum für die Fermentation zu finden.

Einordnung der Ergebnisse

In einer anoxischen Fermentation mit NO_3^- als Elektronenakzeptor konnten Förster, Beblawy u. a. (2017) eine Acetoinausbeute von 90 % erreichen, mit DMSO lag die Ausbeute bei 58 %. Die Verwendung eines *E. coli* DH5 α Z1 Stammes als Expressionswirt ergab unter den selben Bedingungen eine Ausbeute von 25 %. Dabei wurde der selbe genetische Hintergrund verwendet wie in der zuvor beschriebenen Experimenten. In der Elektrofermentation, in welcher Methylenblau in Verbindung mit einer Elektrode als Elektronenakzeptor zur Verfügung steht konnte mit 79 % eine vergleichbar hohe Ausbeute erreicht werden. Darüber hinaus sind nur zwei weitere Ansätze zur anoxischen Fermentation von Acetoin beschrieben. Ebenfalls mit *E. coli* als Produktionsorganismus erzielten Keasling (2008) mit einem teilweise noch intakten Gärstoffwechsel eine Ausbeute von 44 %. Ferner konnten Bursac u. a. (2017) ebenfalls eine Elektrofermentation für Acetoin etablieren. Substrat war hierbei Laktat, welches mit Hilfe von *Shewanella oneidensis*, in dessen Genom der λ -Prophage und *ackA-pta* deletiert wurde, zu Acetoin umgesetzt wurde. In diesem System konnte ebenfalls eine hohe Ausbeute von 78 % erreicht werden.

In oxischen Fermentationen mit *Bacillus subtilis* wurden Ausbeuten zwischen 69 % und 83 % erreicht (Zhang, B. u. a. 2016; Zhang, X., Zhang, R. u. a. 2014; Chen, T. u. a. 2013). In heterologen Ansätzen mit *E. coli* werden Ausbeuten bis 96 % angegeben (Ui u. a. (1998)) Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Ansätze neben Glucose noch bis zu 20 g L^{-1} komplexer Bestandteile enthalten haben, deren Einfluss nicht diskutiert ist (vgl. Tabelle 1.2). Die Ausbeute der Elektrofermentation von 79 % liegt in Bereich dessen, was leistungsfähige Systeme zur Fermentation erreichen. Oxische Fermentationen weisen jedoch häufig wesentliche höhere Produktivitäten im Bereich von $50 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}$ bis $1,88 \text{ g l}^{-1} \text{ h}$ auf (Yang, T. u. a. 2017). Es war daher das Ziel der anschließenden Untersuchungen, einzelne Prozessparameter zu untersuchen und ratenlimitierende Einflüsse zu identifizieren.

4.2. Untersuchung der Fermentationsbedingungen

Im ersten Teil der Arbeit, konnte ein hocheffizientes System zur anoxischen Umsetzung von Glucose zu Acetoin etabliert werden. Da jedoch im Besonderen die Umsatzrate beziehungsweise die Produktivität mit $11 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}$ noch sehr gering war, sollten Ursachen hierfür zunächst in den Fermentationsbedingungen identifiziert und behoben werden.

Elektrodenmaterial

Bereits im vorangegangenen Abschnitt konnte gezeigt werden, welche Bedeutung der Regeneration von Methylenblau für den Fermentationsprozess hat. Es sollte daher untersucht werden, ob das verwendete Elektrodenmaterial eine hierfür geeignete katalytische Oberfläche bietet. Als Referenzmaterial wurde Platin verwendet, welches aufgrund seines hohen Preises nicht für eine Anwendung in Frage kommt, jedoch gute katalytische Eigenschaften aufweist (Svetličič u. a. 1985). Damit verglichen wurden zwei Kohlenstoffbasierte Materialien: das bereits zuvor verwendete GFD 2,5 Graphit-Vlies und elektrogesponnenes Polyacrylnitril, welches anschließend carbonisiert wurde. Graphitisierung und Carbonisierung führen zu wesentlich unterschiedlichen Oberflächen und damit auch zu unterschiedlichen Reaktivitäten (Lafdi u. a. 1993; Oberlin 1984). Die Ergebnisse der Cyclovoltammetrien, zeigen eindeutig, dass die carbonisierte Oberfläche nicht zur Umsetzung von Methylenblau geeignet ist. Das Graphit-Vlies hingegen, liefert eine eindeutige Stromantwort, welche die von Platin im Reaktor übertrifft. In den folgenden Experimenten, wird daher weiterhin Graphit-Vlies für die Elektrofermentation verwendet.

Medienzusammensetzung

Im nächsten Schritt wurde nun der Einfluss einzelner Komponenten des Mediums untersucht. Die Wachstumsexperimente mit Glucosekonzentrationen zwischen 0 und 200 mmol l^{-1} zeigen nur einen geringfügigen Einfluss auf die Wachstumsrate. Im Ansatz mit 0 mmol l^{-1} stehen ausschließlich 0,1 % Casein-Hydrolysat für das Wachstum zur Verfügung, es findet daher kein effektiver Aufbau von Biomasse statt. Lediglich in den ersten 10 h findet eine Verdoppelung statt. In allen anderen Ansätzen, ist kein signifikanter Unterschied in der Wachstumsrate zu erkennen. Die Substrataufnahme von *E. coli* ist im Falle von Glucose sehr effizient und erreicht schon bei Konzentrationen oberhalb $20 \mu\text{mol l}^{-1}$ eine Sättigung (Shehata u. a. 1971). Zu hohen Konzentrationen hin ist ein Rückgang der Wachstumsrate aufgrund von osmotischen Effekten zu erwarten. Im untersuchten Konzentrationsbereich, ist das jedoch nicht zu beobachten, lediglich bei 200 mmol l^{-1} verringert sich die Wachstumsrate geringfügig gegenüber 100 mmol l^{-1} , jedoch nicht in signifikantem Ausmaß. Für die folgenden Experimente wurde daher eine Glucosekonzentration von 50 mmol l^{-1} gewählt, da dies auch bei beschleunigter Fermentation eine Substratlimitierung ausschließt und deutlich unterhalb zu erwartender Limitierungen durch osmotischen Stress liegt. Die Untersuchung der Supplementation mit Aminosäuren oder komplexeren Medienbestandteilen zielt darauf ab, Anabolismus und Katabolismus weiter zu entkoppeln und damit Ressourcen für die Bildung von Acetoin freizugeben. Die Untersuchung zeigt, dass ohne Zugabe von Aminosäuren kein anaerobes Wachstum im Produktionsstamm möglich ist. Hierin zeigt sich nicht nur eine Verlangsamung des anaeroben Stoffwechsels, sondern Auswirkungen auf den Aminosäurestoffwechsel die indirekt aus den Modifikationen des Gärstoffwechsels hervor gehen müssen. Die Untersuchung der Zellphysiologie auf Transkriptomebene in Abschnitt 4.3.1 zeigt die Unterschiede im Zentralstoffwechsel zwischen Produktionsstamm und *E. coli* DH5 α Z1 und wird an entsprechender Stelle diskutiert. Im Gegensatz zum Ansatz mit Casein Hydrolysat, ist in den beiden Ansätzen mit Hefeextrakt eine nahezu

verdoppelte Wachstumsrate zu verzeichnen. Dieser Effekt kann zum einen darauf beruhen, dass nicht alle proteinogene Aminosäuren in Casein Hydrolysat enthalten sind. Der saure Hydrolyseprozess führt beispielsweise im Falle von Cystein zu einem fast vollständigen Verlust (Wang, J. u. a. 2013). Darüber hinaus enthält Hefeextrakt eine Vielzahl von Zellbestandteilen wie zum Beispiel Fettsäuren, die nicht in Casein Hydrolysat enthalten sind. Dem letzten Ansatz in diesem Experiment wurden zusätzlich 5 mmol l^{-1} Acetat zugesetzt. Ziel war es zu ermitteln ob durch die Deletion des *ack-pta* Lokus Einfluss auf den Stoffwechsel genommen wird, der über den Verlust der Substratstufenphosphorylierung in diesem Reaktionsschritt hinaus geht. Vorstellbar wäre eine durch die Zugabe von Acetat verstärkte Bildung von Acetyl-CoA aus Acetat über die Acetyl-CoA-Synthase (Sauer und Eikmanns 2005). Es konnte gezeigt werden, dass eine zusätzliche Supplementierung mit Acetat keinen weiteren Einfluss auf die Wachstumsrate hat. Die chemische Analyse zeigt, dass in den Ansätzen mit Casein Hydrolysat und Hefeextrakt Acetoin-Ausbeuten von über 100 % erreicht werden. Hierin zeigt sich, dass auch aus diesen Medienbestandteilen in geringem Umfang Acetoin gebildet werden kann. Es besteht dabei jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen Hefeextrakt und Casein Hydrolysat. Die ermittelten Wachstumsraten korrelieren gut mit den Stoffumsätzen. So führt eine hohe Wachstumsrate auch zu einem schnellen Substratumsatz. Um die Produktivität in der Elektrofermentation zu verbessern ist es daher sinnvoll, Bedingungen zu schaffen, die eine hohe Wachstumsrate erlauben. Die Fermentationsmedien werden daher mit Hefeextrakt supplementiert.

Im nächsten Untersuchungsschritt wurde ein Puffersystem abgeleitet, welches die Umsetzung von Methylenblau an der Elektrode optimal unterstützt. Gleichzeitig muss die Puffersubstanz biokompatibel sein. HEPES und MOPS sind kompatibel mit *E. coli* und decken den relevanten pH-Bereich ab. Ihre elektrochemische Eignung wurde mittels Cyclovoltammetrie von Methylenblau untersucht. Als Vergleich diente der in den Konzeptexperimenten verwendete PO_4^{3-} -Puffer. Im Falle von PO_4^{3-} ist eine starke Asymmetrie zwischen Oxidation und Reduktion zu erkennen. Eine mögliche Erklärung kann in der Ausbildung von Polymethylenblau auf der Graphitoberfläche gefunden werden. Bei positiven Potentialen, kann Methylenblau elektrochemisch polymerisieren, was sich in einer Verschiebung der Peaks äußert (Brett u. a. 1999; Karyakin u. a. 1993). In Ansätzen mit HEPES und MOPS erscheint das Peak-Paar symmetrisch, was für eine reversible Reaktion spricht. Für die Elektrofermentation ist hierbei jedoch nur die Stromstärke des oxidativen Peaks relevant, da die Reduktion durch *E. coli* katalysiert wird. Dabei zeigt sich, dass die Unterschiede zwischen den Puffersubstanzen nur gering sind. MOPS weist jedoch eine 8 % höhere Stromdichte auf gegenüber PO_4^{3-} auf.

Um sicherzustellen, dass die veränderte Zusammensetzung des Mediums nicht zu einer unerwünschten Passivierung der Elektrodenoberfläche beispielsweise durch die Adsorption von Lipiden oder Fettsäuren aus dem Hefeextrakt führt, wurden nochmals Cyclovoltammogramme mit den drei Puffern in jeweils vollständiger Supplementierung durchgeführt. Es zeigen sich nochmals die oben bereits festgehaltenen Unterschiede zwischen den Puffersystemen unabhängig von deren Supplementierung. Im Falle von MOPS ist auch zwischen den einzelnen Ansätzen kein Unterschied zu erkennen, was zeigt, dass die Oxidation von Methylenblau unabhängig von anderen Medienbestandteilen erfolgt und keine Passivierung eintritt. Bei Betrachtung der oxidativen Peaks in vollständig supplementierten Ansätzen fällt auf, dass MOPS erreicht wieder die höchste Stromdichte

(13,7 % höher als PO_4^{3-}). Es konnte gezeigt werden, dass MOPS als Puffersubstanz geeignete elektrochemische Eigenschaften hat und eine reversible Katalyse von Methylenblau erlaubt. Zudem treten keine Passivierungseffekte in den getesteten Zusammensetzungen auf, sodass die neue Medienzusammensetzung in der Elektrofermentation angewandt wurde.

Die Fermentation mit MOPS-gepuffertem Medium liefert eine rund 50 % höhere Stromdichte als das Vergleichsexperiment mit der vorherigen Medienzusammensetzung. Der Verlauf ist dabei qualitativ jedoch gleich zu den vorherigen Experimenten. Um die so geschaffenen Fermentationsbedingungen auch bei starker zellulärer Aktivität über den Zeitraum des Experiments konstant zu halten, wurde in einem weiteren Schritt der pH-Wert über den Zeitraum des Experimentes kontrolliert und stündlich nachgestellt. Es zeigt sich dabei, dass es im Reaktor zu einer schnellen Ansäuerung kommt, sofern nicht nachjustiert wird. Die starke Ansäuerung im Anodenkompartiment liegt an der großen Asymmetrie in der Größe von Arbeitselektrode und Gegenelektrode und der vergleichsweise kleinen Fläche über die durch die Ionenaustauschmembran Ladungen zwischen Kathode und Anode verschoben werden können (Sleutels, Ter Heijne u. a. 2012; Sleutels, Hamelers u. a. 2010). Durch einen kontrollierten pH-Wert während der Elektrofermentation konnte eine weitere Steigerung um rund 50 % erreicht werden. Gegenüber den Ausgangsbedingungen entspricht das einer Verdoppelung. Auffällig ist in der Fermentation zudem der veränderte Verlauf der Stromdichte, welche im Gegensatz zu den vorherigen Experimenten nach rund 1,5 h durch ein Maximum läuft und Hinweis auf einen zuvor durch die Ansäuerung überlagerten Mechanismus darstellt.

Mediatorkonzentration

Aufgrund der zentralen Bedeutung für die Elektrofermentation, wurde der Einfluss von Methylenblau getrennt von anderen Medienbestandteilen untersucht. Ausgangspunkt hierfür, war die Annahme, dass der Teil des Elektrolyts im Inneren der Elektrode von der Konvektion durch den Rührer unbeeinflusst bleibt und damit der Stofftransport nur auf Diffusion beruht. Dabei handelt es sich um 40 % des Gesamtvolumens. Im Experiment mit dem Pump-Reaktor, konnte bereits gezeigt werden, dass durch Verringerung der Diffusionszeit (Verkürzung der Strecke oder Erhöhung der Geschwindigkeit) in der Elektrode eine deutliche Steigerung der Stromdichte zu erreichen ist. Aber auch unter der Annahme, dass das Elektroden-Vlies keinen Strömungswiderstand darstellt, bestehen zwischen allen aktiven Oberflächen (Elektroden, Membran und Zelloberfläche) und dem Elektrolytvolumen Bereiche, die ausschließlich diffusiv überwunden werden können. Die sogenannte Nernst-Diffusionsschicht bleibt auch bei maximaler Konvektion, wie sie mit *rotating-disc*-Elektroden erreicht wird, erhalten (Larchet u. a. 2008; Amatore u. a. 2001).

Da die Teilchenstromdichte proportional zur Konzentration der betrachteten Substanz ist, würde eine Erhöhung der Methylenblaukonzentration zu einer verkürzten Diffusionszeit führen. Allerdings ist Methylenblau nicht uneingeschränkt verträglich für *E. coli*. Zunächst wurde daher der Einfluss von Methylenblau auf die Physiologie des Produktionsstamms in aeroben und anaeroben Wachstumsversuchen untersucht.

Während unter oxidischen Bedingungen eine sehr starke Abhängigkeit der Wachstumsrate von der Methylenblaukonzentration bestand, konnten unter anoxischen Bedingungen im betrachteten Konzentrationsbereich keine negativen Effekte festgestellt werden. Zur

Interpretation sollte jedoch unbedingt der experimentelle Zeitraum der beiden Wachstumsversuche betrachtet werden. Unter anoxischen Bedingungen mit DMSO dauert die Lag-Phase zwischen 72 und 100 h in allen Ansätzen, wohingegen unter oxischen Bedingungen hohe MB-Konzentrationen (100 und 200 $\mu\text{mol l}^{-1}$) eine Lagphase von ca. 1 h haben. Ansätze mit niedriger Konzentration zeigen keine Lag-Phase. Die Einschränkungen im Stoffwechsel des Produktionsstammes scheinen unter anoxischen Bedingungen dominant über die Störung des Metabolismus durch Methylenblau. Die Toxizität von Methylenblau beruht auf einer Entkoppelung der Atmungskette, in dem respiratorische Elektronen aus dem Stoffwechsel entfernt werden, ohne dass diese zum Aufbau eines Protonengradienten beitragen können (Judah u. a. 1951). Im anaeroben Stoffwechsel mit DMSO wird gegenüber NO_3^- , Energie stärker durch Substratstufenphosphorylierung und in geringerem Umfang durch oxidative Phosphorylierung gewonnen (Tran u. a. 1998). Es ist daher verständlich, dass der Einfluss von Methylenblau in diesem Fall geringer ausfällt. Dabei ist die geringste Wachstumsrate im oxischen Experiment noch rund doppelt so hoch wie die Raten unter anoxischen Bedingungen. Da die Zelldichten unter den Bedingungen der Elektrofermentation wesentlich höher sind, als in den Wachstumsversuchen und sich damit auch die Dosis pro Zelle verringert, wurde zusätzlich noch die Reduktionskinetik von Methylenblau durch *E. coli* in Zellsuspension bestimmt. Die Auftragung von Reaktionsgeschwindigkeit gegen die Konzentration von Methylenblau zeigt eine gute Korrelation zur Michaelis-Menten Gleichung. Im Bereich bis 100 $\mu\text{mol l}^{-1}$ kann näherungsweise ein linearer Zusammenhang angenommen werden wie dies auch durch Roller u. a. (1984) gezeigt wurde. Die Reduktionsrate liegt rund 90 % unter dem Wert von Roller. Dies korreliert mit einer rund 90 % geringeren anaeroben Stoffwechselrate des Produktionsstammes gegenüber eines Wildtyp *E. coli*-Stammes. Als K_M -Wert konnte eine Konzentration von 273 $\mu\text{mol l}^{-1}$ Methylenblau ermittelt werden. Unter der Annahme, dass Diffusion die einzige Limitierung im System ist, könnte demnach bei 273 $\mu\text{mol l}^{-1}$ Methylenblau eine 3,22× höhere Reduktionsrate erreicht werden.

Die Fermentation mit 273 $\mu\text{mol l}^{-1}$ Methylenblau resultierte in einer 1,72× gesteigerten mittleren Stromdichte in den ersten 8 h gegenüber der Fermentation mit 50 $\mu\text{mol l}^{-1}$ und einer 1,66× Steigerung nach Abschluss des Experiments. Bei Betrachtung der Produktivität der Fermentation ist zu erkennen, dass die Steigerung in der Stromdichte nur teilweise auf die Acetoinbildung umgelegt werden kann. In der Fermentation mit 273 $\mu\text{mol l}^{-1}$ Methylenblau wird eine rund 1,4× höhere Produktivität erreicht. Hierin zeigt sich der Einfluss der Mediator Verfügbarkeit auf die Fermentationsgeschwindigkeit. Da jedoch weniger als die zuvor ermittelte theoretische Steigerung gemessen werden konnte, ist der Effekt nicht einzig auf Diffusion zurückzuführen. Einblick in möglicherweise zugrunde liegende Prozesse ergibt der zeitliche Verlauf der Stromdichte. In beiden Fällen werden Maxima durchschritten. Dabei ist auffällig, dass mit 273 $\mu\text{mol l}^{-1}$ Methylenblau, das Maximum bereits nach 20 min erreicht wird. Im Gegensatz dazu wird in der Fermentation mit 50 $\mu\text{mol l}^{-1}$ die maximale Stromdichte erst nach 1,5 h gemessen. Mit 273 $\mu\text{mol l}^{-1}$ Methylenblau wird eine rund 2,7× höhere Stromdichte erreicht. Dies ist nahe an dem vorab ermittelten Wert von 3,22×. Die Ausbildung eines Peaks in der Stromdichte lässt sich als eine Überlagerung von zwei Effekten interpretieren: Einer Konditionierungsphase des Reaktors in der reduziertes Methylenblau in die Elektrode diffundiert und zu einem linearen Anstieg der Stromdichte führt. Bei einer höheren Methylenblaukonzentration verläuft

dieser Prozess daher schneller ab. Zweitens kann die Abnahme der Stromdichte dann als kapazitive Entladung der Zellen gesehen werden, welche exponentiell im zeitlichen Verlauf abklingt und sich einem Gleichgewicht zwischen Reduktion und Reoxidation annähert. Bei einer höheren Methylenblau-Konzentration erfolgt die Entladung daher schneller und im Gleichgewicht wird ein höherer Umsatz erreicht.

In einer Fermentation mit höherer Zelldichte ist dann eine langsamere Entladung und ein höherer Gleichgewichtsstrom zu erwarten, sofern der Zellstoffwechsel limitierend für die Fermentationsgeschwindigkeit ist. Hierzu wurde das Experiment mit einer 5× höheren Zelldichte wiederholt. In der Fermentation bei $OD_{600} = 30$ werden die Maxima der Stromdichte sowohl bei 50 wie bei $273 \mu\text{mol l}^{-1}$ Methylenblau nach den jeweils gleichen Zeiten erreicht wie bei $OD_{600} = 6$. Hieraus ist zu erkennen, dass der Anstieg zu Beginn nicht auf eine zunehmende biologische Aktivität sondern auf eine abiotische Konditionierung zurück zu führen ist. Das Maximum für die Stromdichte liegt bei $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ Methylenblau bei 326 mA m^{-2} auf selber Höhe wie bei $OD_{600} = 6$. Der weitere Verlauf unterscheidet sich dann jedoch von der Fermentation bei $OD_{600} = 6$, in sofern als dass keine wesentliche Abnahme der Stromdichte zu erkennen ist. In der Fermentation mit $273 \mu\text{mol l}^{-1}$ wird im Vergleich zur Fermentation mit $OD_{600} = 6$ ein rund 20 % höheres Maximum von 1097 mA m^{-2} erreicht. Im weiteren zeitlichen Verlauf nimmt die Stromstärke ab und erreicht nach 12 h mit 522 mA m^{-2} eine 2× höhere Stromdichte im Vergleich zur Fermentation bei $OD_{600} = 6$. Hieraus können zwei Schlüsse gezogen werden: Die Fermentation mit $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ Methylenblau wird durch die Verfügbarkeit des Mediators begrenzt. Dadurch werden unabhängig von der jeweiligen Zelldichte vergleichbare Stromdichten erreicht. Bei Fermentationen mit $273 \mu\text{mol l}^{-1}$ Methylenblau wird bei erhöhter Zelldichte ein Steigerung der Stromdichte erzielt. Folglich ist bei $273 \mu\text{mol l}^{-1}$ die Umsatzrate des Zellstoffwechsels limitierend. Die maximale Stromdichte unterscheidet sich in weit geringerem Umfang zwischen beiden Zelldichten bei $273 \mu\text{mol l}^{-1}$ Methylenblau als die durchschnittliche Stromdichte. Das legt nahe, dass die initiale Abnahme tatsächlich als eine kapazitive Entladung des Redoxpools der Zellen zu verstehen ist. Gegen eine Fermentation bei $OD_{600} = 30$ zur Erhöhung der Produktivität, sprechen jedoch mehrere Gründe: Die chronoamperometrische Messung wird sehr instabil, was besonders am Beginn des Experiments zu einem starken Rauschen führt. Die Ausbeuten der Fermentation sind mit jeweils rund 30 % sehr niedrig im Vergleich zu den Experimenten bei $OD_{600} = 6$ mit Werten um 70 %. Mitunter kann das auf die Bildung von Mannit zurück geführt werden, welches in beiden Ansätzen anfällt. Dabei werden im Ansatz mit $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ Methylenblau in 6 h $3,22 \pm 0,31 \text{ mmol l}^{-1}$ Mannit gebildet, gegenüber $2,84 \pm 0,19 \text{ mmol l}^{-1}$ im Ansatz mit $273 \mu\text{mol l}^{-1}$ Methylenblau. Auch bei der Fermentation mit $OD_{600} = 6$ kann Mannit detektiert werden, jedoch in wesentlich geringerem Umfang. Allerdings kann auch hier festgestellt werden, dass mehr Mannit gebildet wird, wenn weniger Methylenblau zur Verfügung steht ($50 \mu\text{mol l}^{-1}$: $1,01 \pm 0,06 \text{ mmol l}^{-1}$; $273 \mu\text{mol l}^{-1}$: $0,67 \pm 0,01 \text{ mmol l}^{-1}$). Bei Mannit handelt es sich um reduzierte Glucose. Da mehr Mannit gebildet wird, je weniger Elektronenakzeptor und je mehr Zellen zur Verfügung stehen, kann die Bildung als Indikator für einen starken Elektronenrückstau im Metabolismus verstanden werden. Des weiteren spricht gegen eine Fermentation bei $OD_{600} = 30$ die Berücksichtigung der CE beider Fermentationen. So werden bei $OD_{600} = 30$ nur geringe Werte von $41,1 \pm 9,5 \%$ ($50 \mu\text{mol l}^{-1}$ Methylenblau) und $61,3 \pm 10,6 \%$ ($273 \mu\text{mol l}^{-1}$ Methylenblau) erreicht. Die

geht mit einer geringen Ausbeute für Acetoin einher und zeigt, dass Stoffwechselprozesse ablaufen, die nicht der Bildung von Acetoin dienen. In den Experimenten bei $OD_{600} = 6$ erreicht die CE Werte von $92,2 \pm 9,5 \%$ für $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ Methylenblau und $122,0 \pm 9,7 \%$ für $273 \mu\text{mol l}^{-1}$ Methylenblau. Die verringerte CE_{Glucose} bei $OD_{600} = 30$ zeigt die Anwesenheit eines zusätzlichen Elektronenakzeptors an. Da der einzige Unterschied zwischen beiden Ansätzen die Zellzahl ist, muss die Biomasse selbst als Elektronenakzeptor dienen. Es ist daher vorstellbar, dass bei der hohen Zelldichte Nebenreaktionen zu relevanten Umsätzen führen, die bei niedriger Zelldichte vernachlässigbar sind. Die oben bereits diskutierte Reduktion von Glucose zu Mannit, kann als Beispiel hierfür angesehen werden.

Durch Untersuchung des Einflusses der Mediatorkonzentration konnte gezeigt werden, dass Diffusion einen beträchtlichen Einfluss auf die Fermentationsgeschwindigkeit hat. Mit $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ Methylenblau ist dies ratenlimitierend für das System. Bei der Fermentation mit $273 \mu\text{mol l}^{-1}$ Methylenblau, was dem K_M -Wert für die Umsetzung entspricht, kann eine Steigerung der Produktivität um $1,4\times$ erreicht werden. Durch Fermentation bei $5\times$ erhöhter Zelldichte konnte gezeigt werden, dass mit $273 \mu\text{mol l}^{-1}$ Methylenblau die biotische Umsetzung ratenlimitierend ist und Diffusionseffekte vernachlässigbar werden. Der Ansatz bei $OD_{600} = 30$ ist jedoch nur zu diagnostischen Zwecken geeignet. Im nächsten Arbeitspaket wurde daher die Physiologie des Fermentationsstammes genauer untersucht um bestehende Einschränkungen zu identifizieren.

4.3. Physiologische Untersuchung des Fermentationsstammes

Ziel dieser Untersuchungen war es, möglichst umfassende Einsicht in den anaeroben Stoffwechsel des Produktionsstammes zu erhalten und hierdurch genetische Ziele identifizieren zu können, deren Manipulation eine erhöhte Stoffwechselrate ermöglicht. Hierzu sollte zunächst die Physiologie mit NO_3^- als Elektronenakzeptor untersucht werden und die Belastung durch Deletionen und heterologe Expression modellhaft beschrieben werden.

4.3.1. Anaerober Stoffwechsel mit NO_3^- als Elektronenakzeptor.

Die Untersuchungen zur Physiologie des Produktionsstammes hat ihren Ausgangspunkt in der Interpretation der Wachstumsversuche des *knock-out*-Stammes mit Sauerstoff, NO_3^- und DMSO als Elektronenakzeptor (Abbildung 1.4). Im Vergleich zwischen den beiden anoxischen Elektronenakzeptoren fällt der unterschiedliche Verlauf der Wachstumsraten mit zunehmendem Grad der Mutagenisierung auf. Mit NO_3^- als Elektronenakzeptor ist zu erkennen, dass die Deletion von Genen, deren Produkte die Regeneration von NAD^+ ermöglichen, zu einer um rund 30 % reduzierten Wachstumsrate führt. Mit dem *knock-out* des *ack-pta* Lokus reduziert sich die Wachstumsrate um 89 % gegenüber dem Ausgangsstamm. Im Gegensatz dazu hat unter DMSO atmenden Bedingungen die Deletion von *frd*, *adh* und *ldh* bereits eine Reduktion der Wachstumsrate um 92 % zur Folge. Die Deletion von *ack-pta* resultiert in einem Rückgang der Wachstumsrate von 95 % gegenüber dem Ausgangsstamm. Mit NO_3^- als Elektronenakzeptor kann, auf Grund seines höheren Redoxpotentials, in größerem Umfang Energie durch oxidative Phosphorylierung konserviert werden, als dies

mit DMSO der Fall ist (Tran u. a. 1998). Es war daher unerwartet, dass der NO_3^- -Stoffwechsel, durch den Wegfall der Substratstufenphosphorylierung bei der Umsetzung von Acetyl-CoA zu Acetat derart drastisch eingeschränkt wird. Daher bestand die Vermutung, dass die Deletion des *ack-pta*-Lokus weiterreichende Auswirkungen auf den Stoffwechsel hat. In Ermangelung eines konkreten Ansatzpunktes für genetische Untersuchungen wurde daher zunächst ein Zufallsmutagenese Experiment zu Selektion auf einen anaerob schneller wachsenden Phänotyp durchgeführt.

Zufallsmutagenese mit NO_3^-

Im Rahmen dieses Experiments konnte ein Stamm isoliert werden dessen Wachstumsrate rund doppelt so hoch war, wie die des Ausgangsstammes. Verglichen mit einem DH5 α Z1-Stamm entspricht dies jedoch nur rund 50 % der Rate. Die Sequenzierung ergab eine Mutation in *narG*, in deren Folge statt eines Stopcodons Glutamat codiert wurde. Hierdurch kann die Translation von *narG* wieder vollständig ablaufen. Der Vergleich mit BLAST zeigt, dass es sich bei *narG* von Transfer 0 um den Genotyp von DH5 α -Stämmen handelt. Da dies der Ausgangsstamm für den Produktionsstamm war, entspricht das dem erwarteten Ergebnis. Für *narG* von Transfer 20 findet sich der Genotyp von *E. coli* K12, der wiederum Ausgangsstamm für die Erzeugung des DH5 α Z1-Stammes war (Lutz u. a. 1997). *narG* ist Teil des Operons *narGHJL*, welches für die, an der Cytoplasmamembran lokalisierte, NO_3^- -Reduktase NarA codiert. Dabei ist *narG* die katalytische Domäne für die Umsetzung von NO_3^- zu NO_2^- und dem Cytoplasma zugewandt (Bertero u. a. 2003). In Folge der Reduktion von NO_3^- werden zwei Protonen über den Chinonpool ins Periplasma transportiert, was im Zuge der oxidativen Phosphorylierung zur Bildung von ATP genutzt werden kann (Bertero u. a. 2003). Darüber hinaus kommt NarA eine entscheidende Rolle bei der S-Nitrosylierung von Proteinen zu. Dabei handelt es sich um einen Regulationsmechanismus, welcher Einfluss auf die Aktivität von Proteinen in nahezu allen Bereichen des Stoffwechsels hat und unter Kontrolle von OxyR steht (Seth, Hausladen u. a. 2012). In einer Seitenreaktion wird durch NarG NO gebildet, welches als Substrat für die Nitrosylierung und damit für die Regulation von Proteinaktivität dient. Transposonmutanten in verschiedenen *nar*-Genen zeigten nahezu keine Nitrosylierungs-Aktivität mehr (Ralt u. a. 1988) Speziell für einen $\Delta narG$ Stamm konnte ein Rückgang der Nitrosylierung um 80 % festgestellt werden (Seth, Hausladen u. a. 2012). Die Beschleunigung der Stoffwechselrate kann also sowohl auf eine verstärkte Ausbildung eines Protonengradienten, in Folge der Reaktivierung der NO_3^- -Reduktase NarA zurückgeführt werden, oder durch eine Reaktivierung der S-Nitrosylierung erfolgen. Die Inaktivierung von *narG* geschah im Zuge der Erzeugung des DH5 α -Stammes. Da hierzu keinerlei Vermerk in der Literatur gefunden wurde, muss davon ausgegangen werden, dass dies unbeabsichtigt geschah. Die Zunahme der Stoffwechselrate in diesem Experiment beruht, auf der Veränderung einer terminalen Reduktase. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass der Stoffwechsel nicht direkt durch die Substrataufnahme oder die Glycolyse limitiert ist. Die Mutation in *narG* eröffnet zwei Erklärungen: Zum einen kann der Abfluss von Elektronen und damit die Reoxidation von Cofaktoren ratenbestimmend sein, oder es kommt in Folge einer Missregulation der Proteinaktivität zu einem verlangsamten Stoffwechsel. Dabei handelt es sich nicht um, sich gegenseitig ausschließende, Fälle. Insbesondere da die Wachstumseinschränkung bei der Erzeugung

des Produktionsstamms erst mit dem Verlust der Substratstufen-Phosphorylierung bei der Bildung von Acetat besonders stark auftrat, scheint eine energetische Unterversorgung plausibel. Dabei ist es schwierig zu unterscheiden, ob eine energetische Unterversorgung in Folge eines Elektronenrückstaus auftritt, oder ob ein Elektronenrückstau in Folge unzureichender anaboler Aktivität durch fehlende Energie auftritt.

Es wurde dann weiter untersucht, ob diese Mutation auch unter den Bedingungen der Elektrofermentation zu einem beschleunigten Stoffwechsel führt. Im Experiment konnte kein Unterschied in der Stromdichte zwischen den beiden Stämmen JG991 und JG1220² festgestellt werden. Die Produktivität und Ausbeute der Fermentation mit JG1220 liegen geringfügig unter der Fermentation mit JG991. Mit Methylenblau als Elektronenakzeptor ergibt sich folglich kein Vorteil für den Abtransport von Elektronen durch die Aktivierung von NarA. Mit seinem Redoxpotential von $E^{0'} = +11 \text{ mV}$ scheint Methylenblau nicht als Substrat für NarA in Frage zu kommen. Die typische Reaktion von NarA ist die Oxidation von Chinonen bei gleichzeitiger Reduktion von NO_3^- (Wissenbach u. a. 1990). Dabei liegt das Potential des Akzeptors bei $E^{0'} = +430 \text{ mV}$ (Thauer u. a. 1977). Die Chinone weisen Potentiale zwischen -80 mV und $+111 \text{ mV}$ auf (Unden und Bongaerts 1997). Methylenblau hat in diesem System eher das Potential eines möglichen Donors. Jedoch ist, zumindest thermodynamisch, die Reduktion von Methylenblau durch Menachinol ($E^{0'} = -80 \text{ mV}$) möglich. Dass diese Reaktion dennoch nicht verstärkt in JG1220 auftritt, kann an einer unzureichenden Katalyse durch NarA liegen. So ist nicht auszuschließen, dass Methylenblau aufgrund seiner Größe oder Ladung nicht mit dem aktiven Zentrum von NarG interagieren kann. Im Hinblick auf die oben angesprochene Protein-Nitrosylierung, kann das Experiment mit Methylenblau keine Klärung ermöglichen, da ohne NO_3^- kein Substrat für die Bildung von NO durch NarG vorhanden ist.

Das Selektionsexperiment mit NO_3^- als Elektronenakzeptor lieferte einen Hinweis auf eine bestehende Limitierung im Stoffwechsel durch entweder unzureichenden Elektronenabfluss oder eine fehlende Regulation auf Proteinebene. Daraus resultiert dann eine Verlangsamung des Stoffwechsels durch energetische Unterversorgung oder mangelnde Proteinaktivität. Dabei muss festgehalten werden, dass der Defekt in *narG* nicht ursächlich für das eingeschränkte Wachstum mit NO_3^- sein kann, da diese Mutation bereits im DH5 α Z1-Stamm vorhanden war. Folglich scheint in Folge der Deletionen im Gärstoffwechsel ein regulatorisches Element verloren gegangen, welches in DH5 α eine Kompensation erlaubt. Um den Stoffwechsel und eventuelle fehlerhafte regulatorische Einflüsse im Ganzen zu untersuchen, wurden im Folgenden systematische Vergleiche zwischen dem Ausgangsstamm und dem Produktionsstamm angestellt.

Systematische Untersuchung des Stoffwechsels

Die dieser Untersuchung zugrundeliegende Maxime bestand darin, durch eine rationale Auswahl der experimentellen Bedingungen einen systematischen Vergleich des Stoffwechsels zwischen Produktions- und Ausgangsstamm mit NO_3^- und O_2 als Elektronenakzeptor zu ermöglichen. Mit dem Ziel die Belastung durch die Deletionen im Gärstoffwechsel und die heterologe Expression, sowie deren Auswirkungen auf die Genexpression getrennt von

²JG991 *narG*⁺

einander zu untersuchen, wurden Wachstumsversuche durchgeführt und korrespondierende Transkriptome erstellt. Für jeden der drei Stämme JG1054³, JG997⁴ und JG991⁵ wurde die Physiologie mit beiden Elektronenakzeptoren jeweils mit uninduzierter und mit induzierter heterologer Expression untersucht. In JG1054 lässt sich die Auswirkung der Expression von *alsSD* auf den regulären Stoffwechsel von *E. coli* untersuchen, gleichzeitig, dient dieser Stamm als normativer Bezugspunkt für Aussagen über physiologische und regulatorische Prozesse in den anderen Stämmen. In JG997 sind zusätzlich zur Expression von *alsSD* die Deletionen im Gärstoffwechsel eingeführt. Als der eigentliche Produktionsstamm trägt JG991 sowohl die Deletionen im Gärstoffwechsel und pMAL *alsSD*, wie auch die *c*-Typ-Cytochrome der synthetischen Elektronentransportkette.

Die Analyse der Wachstumsraten ergibt für alle drei Stämme unter oxischen Bedingungen ohne Induktion nahezu identische Werte. Es entspricht den Erwartungen, dass unter diesen Bedingungen die Modifikationen im Gärstoffwechsel nicht dominant für die Wachstumsrate sind. Die Belastung durch die Expression heterologer Gene ist in allen Ansätzen vergleichbar, da ausschließlich für den Unterhalt der Plasmide und die Expression der Selektionsmarker Ressourcen aufgewendet werden müssen (Ow, Nissom u. a. 2006). Unter oxischen Bedingungen mit Induktion weisen JG1054 und JG997 die selbe Wachstumsrate auf, wohingegen die JG991 rund 50 % langsamer wächst. Die, zur Expression von *alsSD*, zusätzliche Belastung durch die Cytochrome CymA, MtrA und STC in JG991 findet hierin ihren Ausdruck. Es kann also festgehalten werden, dass unter oxischen Bedingungen die Belastung durch die Expression heterologer Gene über die Deletion im Gärstoffwechsel dominiert und daher ratenlimitierend ist. Unter anoxisch-uninduzierten Bedingungen tritt eine starke Abnahme der Wachstumsrate um 75 % zwischen JG1054 und JG997 auf. Zwischen JG1054 und JG991 ist die Rate um 89 % verringert. Hier spiegelt sich der bereits zuvor geschilderte Einfluss der Deletionen im Gärstoffwechsel wieder. Zusätzlich trägt JG991 das pEC86-Plasmid, welches zur Überexpression des *E. coli*-eigenen Häm-Maturationssystems benötigt wird (Arslan u. a. 1998). Analog zum Unterhalt von pMAL werden hier Ressourcen für die Replikation und die Synthese der Chloramphenicol-Kassette benötigt. Dies spiegelt sich auch ohne Induktion in einer verringerten Stoffwechselrate im Vergleich zu JG997 wieder. Unter oxischen Bedingungen ist dieser Effekt jedoch nicht zu beobachten. Die Induktion der heterologen Gene verringert in JG1054 unter anoxischen Bedingungen die Wachstumsrate auf das Niveau des oxisch-induzierten Ansatzes. Hierin zeigt sich, dass im nativen Stoffwechsel auch unter anoxischen Bedingungen die Expression von *alsSD* ratenlimitierend ist. Dies deckt sich mit anderen Untersuchungen zur Belastung des Stoffwechsel durch die Überexpression heterologer Proteine in *E. coli*, allerdings wurden hier jeweils keine Aussagen über den anoxischen Stoffwechsel getroffen (Bentley u. a. 1990; Corchero u. a. 1998; Sørensen u. a. 2005). In JG997 führt die Induktion zu einer weiteren geringfügigen Reduktion der Wachstumsrate. Für Stamm JG991 bleibt die Wachstumsrate durch die Induktion der heterologen Gene nahezu unverändert. Dies zeigt, dass unter anoxischen Bedingungen, die Deletion des Gärstoffwechsels dominierend für den anabolen

³DH5 α Z1 pMAL *alsSD*

⁴DH5 α Z1 Δ *gär* pMAL *alsSD*

⁵DH5 α Z1 Δ *gär::c-cyts* pMAL *alsSD*

Stoffwechsel ist. Die zusätzliche Belastung durch heterologe Gene spielt dabei zwar eine wahrnehmbare, jedoch untergeordnete Rolle.

Zusätzlich zu den Wachstumsraten wurde die Glucoseaufnahmerate und die Acetoinbildungsrate pro Gramm Zellrockengewicht bestimmt. Der Vergleich zu den Wachstumsraten erlaubt Aussagen über das Verhältnis von Anabolismus zu Katabolismus. Unter oxisch-uninduzierten Bedingungen besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Stämmen, was dem Verlauf der Substrataufnahme entspricht. Abweichend zur Wachstumsrate, sind auch unter oxisch-induzierten Bedingungen die Aufnahmeraten in allen Stämmen nahezu identisch, wenn auch geringer als unter uninduzierten Bedingungen. Auch zeigen alle drei Stämme unter oxischen Bedingungen ähnliche Acetoinbildungsraten um $1 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ohne signifikante Unterschiede. Hier zeigt sich, dass in JG991 ein erheblicher Teil der Ressourcen für die Bildung der Cytochrome aufgewandt werden muss, da der Aufbau von Biomasse nur noch rund halb so schnell läuft wie in den beiden anderen Stämmen die keine Cytochrome bilden. Unter anoxischen Bedingungen zeigt sich eine Abnahme in der Glucoseaufnahmerate zwischen JG1054 und den beiden Stämmen mit deletiertem Gärstoffwechsel von rund 40 %. Dabei besteht sowohl in den Absolutwerten wie auch im Verhältnis kein Unterschied zwischen uninduzierten und induzierten Ansätzen. In der Diskrepanz zu den oben geschilderten Unterschieden in den Wachstumsraten der einzelnen Ansätze, zeigt sich nochmals die Vereinnahmung von Ressourcen für die Expression heterologer Gene. Die Verminderung der Produktaufnahmerate, die mit der Einführung der Deletionen im Gärstoffwechsel einhergeht, bedeutet folglich auch weniger Ressourcen (Kohlenstoff, Energie), die für die Bewältigung des nativen und heterologen Stoffwechsel zur Verfügung stehen. Insbesondere hierin zeigt sich die Anfälligkeit der gärdeffizienten Stämme für eine Überlastung des Stoffwechsels. Als Auslöser für die Verminderung der Aufnahmerate kann, unter Berücksichtigung des im vorherigen Abschnitt identifizierten Elektronenstaus, ein auf Katabolit-Repression basierender Mechanismus angenommen werden (Kremling u. a. 2015; Bettenbrock, Fischer u. a. 2006).

Betrachtet man die Produktbildungsraten unter anoxischen Bedingungen, zeigt sich, dass diese im Fall von JG1054 und JG997, die Werte unter oxischen Bedingungen um rund 50 % beziehungsweise 20 % übersteigen. Hierin zeigt sich eine Unterdrückung anaboler Reaktionen. Kohlenstoff wird verstärkt in Form des Endprodukts Acetoin akkumuliert. Im Falle von JG991 wird unter anoxischen Bedingungen eine rund 50 % geringere Acetoinbildungsrate erreicht. Es liegt daher nahe, dass die Vereinnahmung von Ressourcen für den Aufbau der *c*-Typ-Cytochrome den metabolischen Fluss abweichend zu den beiden anderen Stämmen steuert.

Die systematische Analyse der Physiologie umreißt das Ausmaß der physiologischen Einschränkung und legt den Einfluss der Modifikationsschritte offen. Die Erfassung von Produktbildung und Substratumsatz zeigt, die Verlagerung des Stoffflusses in Folge der heterologer Expression. Um ermitteln zu können, wie weitreichend die metabolische Belastung ist, wurde die Expression von Markergenen untersucht und diese mit der Wachstumsrate korreliert.

Transkriptom-Analyse und *metabolic burden*

Mit den erhobenen Expressions-Daten wurde zunächst eine Hauptkomponenten-Analyse durchgeführt. Hier zeigt sich vor allem eine Gruppierung nach anaerobem und aerobem Stoffwechsel. Die Analyse zeigt keine Trends für eine Gruppierung nach Stämmen oder nach Induktionsbedingungen. Beim Übergang von aerobem zu anaerobem Stoffwechsel findet eine globale Reprogrammierung des Stoffwechsels statt (Trotter u. a. 2011; Toya u. a. 2012). Es entspricht daher der Erwartung, dass die Unterschiede zwischen oxischen und anoxischen Bedingungen zur stärksten Gruppierung führen, da bei der Erzeugung der Mutanten beziehungsweise durch die Induktion heterologer Gene jeweils nur wenige Gene grundlegend verändert werden. Allerdings ist auch festzustellen, dass die Gruppierung nach aerobem und anaerobem Stoffwechsel zum Teil überlappt. Dies kann ein Indiz für eine regulatorische Fehlfunktion sein und soll unten nochmals aufgegriffen werden.

Die Untersuchung des *metabolic burden* erfolgte anhand von Monitorgenen. Dabei handelt es sich um klassische Haushaltsgene, die nur geringer metabolischer Regulation unterworfen sind, da sie für grundlegende Zellfunktionen benötigt werden (Thellin u. a. 1999). Die Expressionsstärke dieser Gene korreliert daher direkt mit der Energieversorgung der Zelle (Hoffmann u. a. 2002). Die Korrelation mit der Wachstumsrate erfolgte anhand der Gene für die DNA-Gyrase, RNA-Polymerase, ATP-Synthase, sowie ribosomaler RNA und Proteinen. In fast allen Fällen korreliert die Signalstärke mit der Wachstumsrate, wobei absolute Änderungen der Expressionsstärke nur relative gering ausfallen. In allen Fällen ist die Expression der Markergene unter Induktionsbedingungen etwas niedriger als im jeweiligen uninduzierten Ansatz. Ausnahme hiervon ist die ATP-Synthase in JG997 unter induzierten Bedingungen. Ebenfalls auffällig ist die erhöhte Expression der Markergene in Stamm 997 unter oxischen und anoxischen Bedingungen. Gleichzeitig bleibt die Wachstumsrate entweder konstant (oxische Bedingungen) oder nimmt ab (anoxische Bedingungen) verglichen mit Stamm JG1054. Dies kann als Ausdruck eines erhöhten nicht-Wachstums-assoziierten-Metabolismus (NGAM) aufgefasst werden (Wu u. a. 2016). Hierunter werden zelluläre Prozesse subsumiert, die zum Unterhalt des Stoffwechsels notwendig sind, jedoch nicht dem Aufbau von Biomasse dienen. Auffällig ist die stark verringerte Expressionsstärke der ATP-Synthase unter anoxisch-induzierten Bedingungen in JG997. Hier verringert sich die Expressionstärke auf $\frac{1}{5}$ des Referenzwertes. Alle anderen Marker variieren um maximal $\pm 2\times$ des Wertes der Referenz. Die geringe Variation der Markergene über alle Bedingungen zeigt, dass kein generelles *burden*-Problem besteht, da grundlegende zelluläre Funktionen wie die DNA-Replikation, RNA-Synthese und Proteinsynthese nach wie vor ablaufen können. Der Verlauf der ATP-Synthase relativ zur Wachstumsrate, zeigt jedoch, dass es mit Einführung der Gärdeletion insbesondere unter induzierten Bedingungen zu einem erhöhten Energiebedarf für NGAM kommt. Die geringe Expression der ATP-Synthase unter anaeroben Bedingungen in Stamm JG997 geht dann mit einer Unterversorgung des Stoffwechsels an Energie einher. In Folge dessen laufen zelluläre Prozesse langsamer ab.

Neben der Untersuchung von metabolisch nur schwach regulierten Genen wurde an der TU München eine Cluster-Analyse durchgeführt, welche Gene identifiziert, die besonders stark positiv oder negativ mit der Wachstumsrate korrelieren. Das am stärksten positiv mit der Wachstumsrate korrelierende Gen *hcp* codiert für die Hydroxylamin-Reduktase (Hcp).

Dabei ist besonders auffällig, dass eine Induktion von *hcp* wie sie durch NO_3^- zu erwarten wäre, in JG997 ausbleibt. Bei Hcp handelt es sich um ein [Fe-S]-Protein, welches zusammen mit einer NADH-Dehydrogenase exprimiert wird. Die physiologische Funktion von Hcp war lange unbekannt (Berg u. a. 2000). Kürzlich konnten Seth, Hess u. a. (2018) eine zentrale Rolle für Hcp in der S-Nitrosylierung von Proteinen nachweisen. Dabei wird Hcp, durch von NarA erzeugtem NO, reduktiv autonitrosyliert und überträgt diese funktionelle Gruppe dann auf eine Vielzahl von Zielproteinen. Hierzu gehören unter anderem NarG, FdnG, die E1 Untereinheit der Pyruvat-Dehydrogenase AceE, und die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase GapA. *hcp* steht unter Kontrolle von OxyR, welches selbstverstärkend durch Nitrosylierung aktiviert wird. Damit geht eine Schutzfunktion vor endogenem Nitrosyl-Stress unter NO_3^- -atmenden Bedingungen durch Hcp einher. Die ausbleibende Expression von *hcp* kann durch die Abwesenheit von NO in Folge von defektem *narG* verstanden werden (Seth, Hausladen u. a. 2012).

Um auszuschließen, dass der Mangel an *hcp* nicht doch kausal für die Limitierung des NO_3^- -Stoffwechsels ist, wurden in anoxischen Wachstumsversuchen *hcp* unter der Kontrolle eines *trc*-Promotors überexprimiert. Dabei wurde der Einfluss sowohl auf Wachstum mit DMSO, wie auch auf NO_3^- untersucht. In beiden Fällen konnte durch Induktion von *hcp* keine Beschleunigung der Wachstumsrate gemessen werden. Da mit DMSO als Akzeptor keine Bildung von NO zu erwarten ist, ist es konsistent, dass die Expression von *hcp* keinen positiven Effekt auf die Stoffwechselrate hat. Mit NO_3^- zeigt das Ergebnis eine Limitierung des Stoffwechsels, die hierarchisch oberhalb von *hcp* angesiedelt ist. Die ausbleibende Expression von *hcp* und damit ein Schutz vor Nitrosylstress, beziehungsweise die Regulation durch S-Nitrosylierung kann nicht ursächlich für die Einschränkung des Wachstums unter NO_3^- -atmenden Bedingungen sein. Eine fehlende Induktion in Folge des Defektes in *narG*, scheint plausibel. Allerdings stellt sich auch an dieser Stelle die Frage, weshalb der Phänotyp nicht schon in JG1054 auftritt.

Die Korrelation der Gene für die Nitrat-Reduktasen NarG und NapA zeigt zunächst deutliche Unterschiede im Verlauf der Expressionsstärke zwischen den beiden Genen. *napA* wird in weit geringerem Umfang zwischen aerobem und anaerobem Stoffwechsel reguliert als *narG*. In JG997 ist *napA* deletiert und wird daher nicht mehr exprimiert. NarG hingegen wird im uninduzierten anoxischen Ansatz in JG997 rund doppelt so stark exprimiert wie in JG1054. In induzierten Ansätzen liegt die Signalstärke insgesamt etwas niedriger, jedoch vergrößert sich der Unterschied zwischen JG1054 und JG997 um 5×. In dem vorangegangenen Selektionsexperiment konnte gezeigt werden, dass *narG* aufgrund eines Stopcodons in der Mitte des Gens im Produktionsstamm defekt ist. Durch die Erkenntnisse aus der Cluster-Analyse und den Wachstumsversuchen mit überexprimiertem Hcp ist es wahrscheinlich, dass die S-Nitrosylierung von *narG* durch *hcp* ausbleibt. Die starke Expression von *narG* in JG997 muss dann auf das Fehlen einer Feedbackschleife zwischen Hcp und NarG zurück geführt werden.

In der Cluster-Analyse konnten viele Indizien gefunden werden, die auf ein regulatorisches Defizit und einen Energiemangel im Produktionsstamm hindeuten. Es ist allerdings nach wie vor unklar, weshalb dies erst im Stoffwechsel mit deletiertem Gärstoffwechselweg auftritt, da *narG* bereits im Ausgangsstamm defekt war. Dies weist auf den Einfluss einer zusätzlichen regulatorischen Ebene hin, die über den bisher betrachteten Akteuren liegt.

Regulation

In einer weiteren Analyse wurde gezielt nach regulatorischen Unterschieden zwischen aerobem und anaerobem Stoffwechsel von JG1054 und JG991 gesucht. Dazu wurden die differentiell exprimierten Gene auf zwei Arten gefiltert. Zum einen nach Genen die in JG1054 differentiell exprimiert sind zwischen O_2 und NO_3^- , jedoch keine relevanten Unterschiede in JG991 aufweisen. Zum anderen wurden Gene mit differentieller Expression in JG991, nicht aber in JG1054 identifiziert. Ziel dieser Auswahl war die Identifikation von Genen, welche in den betrachteten Stämmen beim Übergang von aerobem und anaerobem Stoffwechsel unterschiedlich reguliert werden. Unter der Prämisse, dass in JG1054 eine normale Anpassung stattfindet, ergibt die erste Filterung Gene, die in JG991 nicht an anaerobe Bedingungen angepasst werden. Die zweite Filterung enthält Gene, die JG991 in Folge einer fehlenden Regulation abweichend exprimiert werden.

Auffälligkeiten bestanden in einer stark abweichenden Regulation des Aminosäure-Stoffwechsels. Häufig, wie im Fall des Gens der Argininosuccinat-Synthetase *argG*, ist dabei zu beobachten, dass diese in JG991 beim Übergang von aerobem zu anaerobem Stoffwechsel wesentlich stärker herunter reguliert werden als in JG1054. Auch sind Gene des Fettsäurestoffwechsel stärker herabreguliert als in JG1054. Diese Beobachtung deckt sich mit den Experimenten zur Mediensupplementation in Abschnitt 3.4.2.2, in denen durch Zugabe von Hefeextrakt statt Casein-Hydrolysat ein 50 % schnelleres Wachstum beobachtet werden konnte. Die Zusammensetzung von Casein-Hydrolysat weist insbesondere von Cystein und Alanin nur geringe Anteile auf (Wang, J. u. a. 2013). Zusätzlich dazu sind Fettsäuren und Lipiden oder kurze Peptide enthalten, welche an den, in dieser Untersuchung, identifizierten Punkten den Stoffwechsel entlasten.

Eine weitere Beobachtung ist, dass Gene des zentralen Katabolismus, wie die anaerobe G3P-Dehydrogenase (*glpABC*) und Gene des Energiestoffwechsels, wie die NADH-Dehydrogenase *nuoE* unter anaeroben Bedingungen im Produktionsstamm stärker hochreguliert werden als im Referenzstamm. Auch dies spiegelt nochmals den hohen Energiebedarf wieder, der Anhand der Wachstumsparameter bereits abgeleitet werden konnte.

Unter den abweichend regulierten Genen stehen auffällig viele unter der Kontrolle von Transkriptionsfaktoren, deren Aktivität durch Phosphorylierung bestimmt wird (Tabelle 3.4). Dazu gehören mit *pykA*, *fruAB* oder *aceE* Gene die unter der Kontrolle von Cra (*catabolite repressor activator*) stehen (Ow, Lee, R. M.-Y. u. a. 2007; Bettenbrock, Sauter u. a. 2007; Perrenoud u. a. 2005). Cra selbst wird durch das zwei Komponentensystem PhoRB reguliert, welches allgemein mit PO_4^{3-} Stress assoziiert wird (Marzan u. a. 2011). Zum Regulon von *PhoB* gehören auch das Kationenexport System *cusABCS* welches zu den am stärksten abweichend regulierten Genen gehört (Munson u. a. 2000). Auch Gene unter Kontrolle des in der Einleitung erläuterten Zwei-Komponenten-System ArcAB wie *glpABC*, *gltA*, *sdhBCD* oder *fumC* unterscheiden sich stark in ihrer Expression beim Übergang von aerobem zu anaerobem Stoffwechsel zwischen JG991 und JG1054 (Trotter u. a. 2011; Gunsalus u. a. 1994). Dabei zeigt keiner der Regulatoren zeigt eine starke Veränderung in seiner Expressionstärke. Da ArcA die Umstellung des Stoffwechsels zwischen aerob und anaerob reguliert, stellt gerade hier eine vom Normalfall abweichende Regulation, eine schwerwiegende Einschränkung des Stoffwechsels für das betrachtete System dar (Gunsalus u. a. 1994). Zum Regulon, von von PhoB gehören Gene die häufig

mit Phosphatstress assoziiert sind. Da die Regulatoren in ihrer Expression nicht beeinflusst werden, Gene unter ihrer Kontrolle jedoch schon, lag die Vermutung nahe, dass ein regulatorisches Problem auf Ebene der Proteinaktivität besteht. Phosphorylierung von Proteinen zur Regulation ihrer Aktivität ist ubiquitär verbreitet (Wanner 1992; Deutscher u. a. 2006; Kobir u. a. 2011). In der Erzeugung des Produktionsstamms wurde jedoch nur durch den *knock-out* der Phosphotransacetylase *pta* im letzten Schritt mit Acetylphosphat ein potentieller Phosphorylierungsmetabolit aus dem Stoffwechsel entfernt. Von Acetyl-Phosphat ist bekannt, dass es unter gewissen Umständen zur Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren benötigt wird (Wolfe 2010; McCleary, Stock und Ninfa 1993; McCleary und Stock 1994; Wanner 1996; Gueriri u. a. 2008). Beispielsweise ist im Fall von PhoB ist Acetylphosphat eine von drei Möglichkeiten PhoB zu aktivieren (Sawers u. a. 2004).

Um den Einfluss von *pta* und *ack* unabhängig von einander untersuchen zu können, wurden Wachstumsversuche mit Deletionsstämmen in jeweils einem Gen durchgeführt. Diese erlauben zwei Erkenntnisse: Obwohl es sich bei *ack* und *pta* um Gene des anaeroben Stoffwechsel handelt, kann auch unter oxischen Bedingungen eine rund 50 % reduzierte Wachstumsrate durch die Deletion von jeweils einem Gen beobachtet werden. Die Interpretation wird allerdings durch sich überlagernde Effekte erschwert (Sawers u. a. 2004). In beiden Stämmen führt die Deletion zum Verlust der energiekonservierenden Umsetzung von Acetyl-Phosphat zu Acetat. Im Fall der Deletion von *pta* steht dem Stoffwechsel zusätzlich auch kein Acetyl-Phosphat zur Verfügung, welches, wie oben bereits angemerkt, zur Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren verwendet werden kann. Die zweite Erkenntnis ist, dass unter anoxischen Bedingungen, die Deletion von *pta* zu einer stärkeren Einschränkung (50 % gegenüber K-12) im Stoffwechsel führt, wie die Deletion von *ack* (25 % gegenüber K-12). Da im Unterschied zur *pta*-Mutante in der *ack*-Mutante noch Acetyl-Phosphat zur Verfügung steht, scheint dies insbesondere im anaeroben Stoffwechsel eine Rolle zu spielen. Um den Effekt von *pta*, respektive Acetyl-Phosphat, auf den Stoffwechsel des Produktionsstamms zu untersuchen, wurde dies an seinem nativen Locus wieder in das Chromosom von *E. coli* integriert. Die anoxischen Wachstumsversuche zeigen ein um rund 35 % gesteigertes Wachstum auf NO_3^- durch die Integration von *pta* in den Stoffwechsel. Mit DMSO als Elektronenakzeptor besteht kein Unterschied im Wachstum der beiden Stämme. Berücksichtigt man den Verlauf der Wachstumsrate in der Genese des Produktionsstamms, wäre nur eine geringe Zunahme der Wachstumsrate möglich. Es entspricht daher der Erwartung, dass mit DMSO keine wesentliche Zunahme der Wachstumsrate zu beobachten ist. Unter Berücksichtigung des bisher abgeleiteten Modells des Stoffwechsels im Produktionsstamm, kann dieses Experiment als weiteres Indiz für eine hierarchiehöhere regulatorische Limitierung gewertet werden.

Um dies auch auf Transkript-Ebene zu untersuchen, wurden auch von JG1354, was JG997::*pta* entspricht, eine Transkriptomanalyse erstellt. Im Vergleich mit den Stämmen JG997 und JG1054 fällt auf, dass mit 513 eine wesentlich größere Zahl an Genen zwischen JG1354 und JG1054 differentiell reguliert sind, als dies zwischen JG997 und JG1054 der Fall ist (218 Gene). Dies zeigt zum einen, dass die Integration von *pta* Einfluss auf die Expression einer großen Zahl Gene hat. Zum anderen, scheint die Integration von *pta* eine stärkere Anpassung des Stoffwechsels im Produktionsstamm an die metabolischen Einschränkungen zu erlauben.

Um regulatorische Unterschiede zwischen JG1354 und JG997 festzustellen wurde die differentielle Expression zwischen beiden Stämmen unter anoxisch-induzierten Bedingungen ermittelt. Anschließend wurden die 415 Treffer nach Genen gefiltert, die zwischen 1354 und 1054 unverändert sind. Zudem wurde eine weitere Liste erstellt mit Genen, die zwischen JG1054 und JG997 unverändert bleiben. Die erste Liste kann als Rekonstitution eines normal ablaufenden Stoffwechsels interpretiert werden. Dies trifft insbesondere auf den Energiestoffwechsel und die Glycolyse zu. Auch zeigt die Liste, dass der bereits zuvor diskutierte Aminosäurestoffwechsel wieder ähnlicher zu JG1054 wird. Ferner wird durch die Expression von *pta* metabolischer Stress reduziert. Die verminderte Expression von Hydrogenasen bei gleichzeitig verstärkter Expression von Genen der Atmungskette kann als Rückgang eines Elektronenrückstaus interpretiert werden.

Die zweite Liste ist als *pta*-medierte Anpassung des Stoffwechsels an die metabolische Belastung durch die Deletionen im Gärstoffwechsel anzusehen. Gene des Aminosäurestoffwechsels werden in JG1354 teilweise stärker exprimiert als in JG1054. Auch werden Teile des Elektronentransports über das Niveau von JG1054 hinaus exprimiert. Besonders bemerkenswert ist, dass Gene von Stoffwechselregulatoren wie *arcA*, *csrA* oder *appY* abweichend exprimiert sind. Mit der Integration von *pta* steht dem Stoffwechsel auch wieder Acetyl-Phosphat zur Phosphorylierung von Proteinen zur Verfügung (Gueriri u. a. 2008; Wolfe 2010). Dessen Verwendung, insbesondere zur Autophosphorylierung, konnte bereits *in-vitro* und *in-vivo* für Zwei-Komponenten-Systeme gezeigt werden (McCleary und Stock 1994; Kim, S.-K. u. a. 1996; Klein u. a. 2007; Wolfe u. a. 2003). Eine Abhängigkeit der Expression dieser Transkriptionsfaktoren von Acetyl-Phosphat, beziehungsweise *pta* ist bisher jedoch nicht dokumentiert.

Für die im Produktionsstamm bestehende Limitierung des NO_3^- -Stoffwechsels ist der Transkriptionsregulatoren *arcA* und *Cra* von besonderer Bedeutung. Auf den ersten Blick scheint es verwunderlich, dass Gene die normalerweise durch *ArcA* negativ reguliert sind, in JG1354 hochreguliert werden, gegenüber JG997 (z.B. *cyoBCD*, *acnB*, *sucC*). Allerdings muss beachtet werden, dass hier gerade das Niveau von JG1054 erreicht wird. Acetyl-Phosphat kann aufgrund seines hohen Energiegehalts zur Autophosphorylierung von Regulatorproteinen verwendet werden (Lima u. a. 2016; Wolfe 2010; Klein u. a. 2007). Da dies insbesondere auch in Abwesenheit der Sensor kinase passiert, wurde schon früh die Hypothese geäußert, dass Acetyl-Phosphat zur Aufrechterhaltung der Basalphosphorylierung dient (Wanner 1992; McCleary, Stock und Ninfa 1993). In diesem Kontext kann die Regulation von Genen auf das Niveau von JG1054 verstanden werden, bei gleichzeitig verstärkter Expression von *arcA*.

Einfluss von *pta* auf die Elektrofermentation

Die Untersuchungen zur Physiologie und Regulation des Produktionsstamms haben einen Energiemangel durch fehlende Phosphorylierung offenbart. In Folge dessen konnten Gene verschiedener Regelkreise nicht in normalem oder gesteigertem Umfang produziert werden. Die Integration von *pta* erlaubte eine teilweise Kompensation dieser Limitierung. Es wurde daher untersucht, ob sich dies auch auf die Bedingungen der Elektrofermentation übertragen ließ. Im Experiment mit JG1325 konnte jedoch kein Unterschied in der metabolischen Rate von *E. coli* festgestellt werden. Lediglich die Ausbeute und Produktivität liegen leicht

höher als im Vergleichsexperiment. Analog zum Wachstum auf DMSO muss, festgestellt werden, dass der positive Einfluss von *pta* auf den NO_3^- -Stoffwechsel beschränkt ist.

Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass der starke Einfluss auf die Stoffwechselrate durch die Deletion von *ack-pta* in der Genese des Produktionsstammes seine Ursache im Wegfall eines unter NO_3^- -atmenden Bedingungen grundlegenden Regulationsmechanismus beruht. Die Reintegration von *pta* ermöglicht die verstärkte Expression von globalen Stoffwechselregulatoren auf ein normales Niveau. Darüber hinaus, ermöglicht der reaktivierte Regelkreis eine Anpassung des Stoffwechsels an die besondere Belastung durch die heterologe Expression von *alsSD* bei gleichzeitig eingeschränktem anaerobem Stoffwechsel. Dabei werden anabole Gene über das Niveau des Ausgangstammes hoch reguliert.

Für die Weiterentwicklung der Elektrofermentation muss zur Untersuchung der Physiologie ein Elektronenakzeptor gewählt werden, der ähnlicher zu Methylenblau ist. Zu diesem Zweck wurde ein weiteres Selektionsexperiment mit DMSO als Elektronenakzeptor durchgeführt.

4.3.2. Anaerober Stoffwechsel mit DMSO als Elektronenakzeptor

Um bestehende Limitierungen für die Stoffwechselrate unter Bedingungen, wie sie in der Elektrofermentation auftreten, identifizieren zu können, wurde zunächst versucht, sich diesen Bedingungen in einer wachsenden Kultur anzunähern. Mit einem Redoxpotential von $E^{0'} = 160 \text{ mV}$ ist DMSO ähnlicher zum Potential von Methylenblau ($E^{0'} = 11 \text{ mV}$) und wurde daher als Elektronenakzeptor verwendet.

Zufallsmutagenese mit DMSO

In diesem Selektionsexperiment wurde zudem Methylenblau mit einer Konzentration von $100 \mu\text{mol l}^{-1}$ zugefügt, um eventuelle zelluläre Entgiftungsmechanismen anzustoßen. Im Laufe des Experiments konnte eine um $3\times$ beschleunigte Wachstumsrate festgestellt werden (Transfer 16). Im Vergleich dazu wächst der DH5 α Z1 Ursprungstamm rund doppelt so schnell. Die Genomsequenzierung und anschließende Variantenanalyse ergab eine Mutation im Gen der Pyruvat-Formiat-Lyase *pflB*, die zu deren Inaktivierung führt. Das neu eingefügte Stopcodon unterbricht die Translation nach etwas der Hälfte des Gens (Abbildung 3.34a). Für die Funktion der Pyruvat-Formiat-Lyase Pfl fehlen daher relevante Bereiche. Ferner konnte eine Mutation in der E2-Untereinheit der Pyruvat-Dehydrogenase *aceF* und der Nukleosid-Triphosphat-bindenden β -Untereinheit der RNA-Polymerase *rpoC* festgestellt werden. Die Mutation in *rpoC* führt zum Austausch von Prolin und gegen Leucin. Die beiden Aminosäuren unterscheiden sich zwar nicht in ihrer Polarität (Abbildung 4.2), jedoch ist Prolin häufig mit dem Aufbau der Sekundärstruktur der Aminosäure-Kette assoziiert (MacArthur u. a. 1991). Aufgrund des fehlenden Amid-Wasserstoffs kann Prolin keine Wasserstoffbrückenbindungen eingehen. Da die Mutation ist am Rand der Seitenkette in einer Schleife lokalisiert ist, hat dies möglicherweise Einfluss auf die Interaktion mit der angrenzenden Seitenkette über das nächstgelegene Tyrosin.

Auffällig ist die Mutation in *aceF*. Zum einen handelt es sich hierbei um eine weitere Mutation in einem Pyruvat-umsetzenden Enzym. Zum anderen wird im Zuge der Mutation,

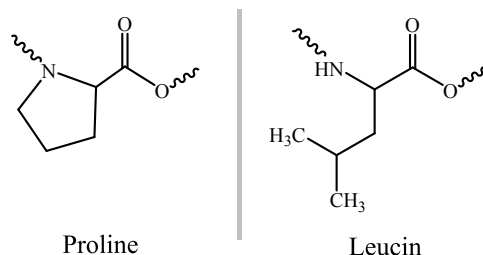


Abbildung 4.2.: Struktur von Prolin und Leucin im Vergleich

Aspartat gegen Glycin ausgetauscht und damit die Größe und Polarität an dieser Position wesentlich verändert (Abbildung 3.34b). Da jedoch unklar war, ob sich die Mutation beschleunigend oder verlangsamernd auf den Stoffwechsel auswirkt, wurde dies in einem aeroben Wachstumsversuch untersucht. Dies geschah aus zwei Gründen: Da es sich bei der Pyruvat-Formiat-Lyase um ein Enzym des anaeroben Stoffwechsels handelt, kann der Einfluss dieser Mutation unter oxischen Bedingungen vernachlässigt werden (Trotter u. a. 2011; Toya u. a. 2012). Desweiteren handelt es sich beim Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex (Pdh) um ein Enzym, das unter oxischen Bedingungen Pyruvat zu Acetyl-CoA, CO₂ und NADH umsetzt. Eine Inaktivierung von *aceF* führt in *E. coli* zu erheblichen Einschränkungen im aeroben Wachstum. In Abwesenheit von Acetat, sogar zum vollständigen Verlust (Kim, Y. u. a. 2007). Da unter oxischen Bedingungen keine Verminderung des Wachstums gegenüber JG991 festzustellen ist, kann davon ausgegangen werden, dass *aceF* intakt ist. Ferner kann ebenso geschlossen werden, dass die Mutation in *rpoC* nicht bestimmend für den Phänotyp ist, da in diesem Fall auch eine erhöhte Wachstumsrate unter oxischen Bedingungen zu erwarten gewesen wäre. Bei genauer Betrachtung ist zu erkennen, dass JG1295 zu höherer Zelldichte wächst und später in die stationäre Phase übergeht. Auch dies spricht gegen einen entscheidenden Einfluss der RNA-Polymerase auf den Phänotyp. Zwar wird der Übergang in die stationäre Phase durch die Bindung des σ^S -Faktors an die RNA-Polymerase mediiert (Huisman u. a. 1996; Rahman u. a. 2006), jedoch wurde im Zuge der Mutagenese nur die Nukleotid-Triphosphat-bindende β -Untereinheit der RNA-Polymerase verändert. *rpoS* weist die wildtypische Sequenz auf.

Die physiologischen Auswirkungen der Mutationen in JG1295 lassen sich wie folgt zusammen fassen: Durch die Inaktivierung der Pfl muss Pyruvat auch unter anoxischen Bedingungen über *aceF* umgesetzt werden. Unter oxischen Bedingungen bringt die mutierte Form von AceF einen Vorteil beim Übergang in die stationäre Phase. Generell wird dies mit Zellstress in Verbindung gebracht, Katabolite reichern sich an. Der Kohlenstofffluss wird bei verringerter Substratverfügbarkeit im Citratcyclus über Glyoxylat umgeleitet um damit mit Acetyl-CoA mehr Kohlenstoff assimilieren zu können (Huisman u. a. 1996). Die Gewinnung von Energie und damit die Verfügbarkeit von NADH wird wichtiger als in der exponentiellen Phase (Zambrano u. a. 1993). Acetyl-CoA und NADH sind beides Produkte

der Pyruvat-Dehydrogenase. Eine Form des Enzyms, welche in der stationären Phase einen höheren Umsatz gewährleistet, würde demnach einen Vorteil darstellen. Es ist vorstellbar, dass durch die Mutation in *aceF*, die Sensitivität gegen allosterische Inhibitoren Acetyl-CoA und NADH abnimmt (Hansen u. a. 1966; Bisswanger u. a. 1971). Eine, gegen NADH insensitive, Pdh ermöglicht daher auch unter anoxischen Bedingungen einen schnelleren Umsatz von Pyruvat. Es ist vorstellbar, dass hierdurch auch eine verringerte Katabolitrepression der Glycolyse auftritt und als Konsequenz daraus auch schneller Energie konserviert werden kann (Saier u. a. 1996). Da schon im Selektionsexperiment mit NO_3^- einen Elektronenrückstau im Stoffwechsel identifiziert werden konnte, ist davon auszugehen, dass das Verhältnis NADH/NAD^+ im Produktionsstamm deutlich erhöht ist. Die besser Verfügbarkeit von Energie im Stoffwechsel könnte auch unter diesem Aspekt vorteilhaft sein, da hierdurch reduktive anabole Reaktionen verstärkt ablaufen können. Dies würde in Folge nicht nur den Elektronenrückstau verringern, sondern auch das beschleunigte Zellwachstum erklären. Die angestellten Überlegungen zur Physiologie von JG1295 sind nicht auf einen bestimmten anoxischen Elektronenakzeptor beschränkt. Es war daher anzunehmen, dass der Phänotyp auch mit Methylenblau reproduzierbar ist. Daher wurde der Stamm JG1295 im nächsten Schritt in einer Elektrofermentation untersucht.

Elektrofermentation mit JG1295

Im Elektrofermentationsexperiment mit JG1295 konnte eine, im Vergleich zu Stamm JG991 rund 1,6× höhere, mittlere Stromdichte gemessen werden. Nach 9 h nimmt die Stromstärke abrupt stark ab, was gut mit einer Substratlimitierung korreliert. Im Experiment mit JG991 ist das Substrat nach rund 21 h verbraucht, auch hier ist eine Abnahme der Stromdichte zu beobachten, allerdings weniger stark ausgeprägt. Die chemische Analyse zeigt, dass der Substratumsatz analog zur Stromdichte ansteigt. JG1295 weist eine rund 2× höheren Glucoseumsatz auf. Aufgrund der etwas höheren Ausbeute in der Fermentation mit JG1295 wird hier mit $76 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}$ eine rund 2,5× höhere Produktivität erreicht als mit JG991.

Die unter DMSO-atmenden Bedingungen beobachtete Beschleunigung des Stoffwechsels kann auch mit Methylenblau als Elektronenakzeptor reproduziert werden. Jedoch wird nur eine Erhöhung der metabolischen Rate um 2× beobachtet, anstatt 3× wie dies mit DMSO der Fall war. Dies kann, wie oben bereits diskutiert, in einem kinetischen Effekt durch schlechtere Interaktion zwischen Methylenblau und den terminalen Reduktasen begründet sein. Gegenüber JG991 fällt die Stromdichte im Experiment wesentlich langsamer ab. Die beschleunigte Wachstumsrate von JG1295 ist Ausdruck einer höheren Energieausbeute des Stoffwechsels. Die verlangsamte Abnahme der Stromdichte kann daher als ein verbesserter Unterhalt der Proteinmaschinerie verstanden werden. Um zu untersuchen in wie fern der Verlauf der Stromdichte in der Elektrofermentation durch die Glucosekonzentration und der Reduktionsleistung des Produktionsstammes abhängt, wurden analog zu Abschnitt 4.2, Experimente bei $\text{OD}_{600} = 30$ durchgeführt. Dabei wurde einmal, wie im vorangegangenen Experiment, 10 mmol l^{-1} Glucose eingesetzt und einmal 50 mmol l^{-1} Glucose. Im Ansatz mit niedriger Konzentration, ist zu beobachten, dass die Stromdichte bereits nach 4 h stark abnimmt, in der chemischen Analyse korreliert dies wieder mit dem vollständigen Umsatz des Substrates. Im Experiment mit 50 mmol l^{-1} Glucose verläuft die Stromdichte in den

ersten 4 h analog zum Experiment mit 10 mmol l^{-1} Glucose. Da in dieser Fermentation keine Substrallimitierung eintritt verläuft die Stromdichte über 8 h auf einem Wert um 800 mA m^{-2} und nimmt dann anschließend linear ab. Im Experiment bei $\text{OD}_{600} = 6$ nimmt die Stromdichte bereits nach 2 h linear ab.

Die Abnahme Stromdichte im zeitlichen Verlauf ist daher auch im Fall von JG1295 auf einen Rückgang der Reduktionsleistung zurückzuführen. Verglichen mit JG991 verläuft diese jedoch wesentlich langsamer, was für eine höhere anabole Rate spricht. Die Elektrofermentation mit JG1295 kann daher als Indiz für die oben formulierte Hypothese zum Ablauf des Stoffwechsels gewertet werden. Den Mutationen im Pyruvatstoffwechsel folgt eine erhöhte anabole Rate. In den vorab angestellten Überlegungen bezüglich einer verringerten Sensitivität der Pdh gegenüber ihren Kataboliten, würde dies einen verstärkten Umsatz im Citratzyklus und in der Synthese von Fettsäuren erlauben, da verstärkt Acetyl-CoA als Substrat für diese Stoffwechselwege gebildet wird. Gleichzeitig reichern diese Reaktionen Acetyl-CoA und Pyruvat als Repressoren der Glycolyse ab. In Folge kann der Stoffwechsel schneller Energie konservieren. Acetoinausbeute und CE liegen in diesem Experiment nach wie vor bei Werten wie sie auch mit JG991 erreicht wurden. Hierin zeigt sich, dass die Anpassung des Anabolismus insgesamt nur einen geringen Teil des Kohlenstoffs aus Glucose in Anspruch nimmt.

Für die physiologischen Anforderung an den Produktionsstamm bedeutet dies mehr Ressourcen, insbesondere Energie, in den Anabolismus zu leiten, um eine Selbsterhaltung des Katalysators zu ermöglichen. Mit JG1295 konnte dadurch bereits eine rund $3\times$ höhere Stoffwechselrate mit DMSO und eine $2\times$ höhere Rate mit Methylenblau erreicht werden. Im Folgenden soll daher untersucht werden, ob die anabole Rekonstitution durch *pta*, wie sie zuvor beobachtet wurde, in JG1295 einen Effekt auf die Elektrofermentation hat.

Elektrofermentation mit JG1350

Da in JG1350 mehr Energie für anabole Reaktionen zur Verfügung steht, sollte untersucht werden, ob die Expression von *pta* wie in JG1354 zu einer Wiederherstellung normaler physiologischer Bedingungen führt. Hierzu wurde *pta* und die Umsatzrate in einer Elektrofermentation mit 273 und $546 \mu\text{mol l}^{-1}$ Methylenblau untersucht. Zwischen den beiden Ansätzen konnte erwartungsgemäß kein Unterschied, sowohl in der Stromdichte als auch in der chemischen Analyse festgestellt werden. Im Vergleich zu den anderen Stämmen zeigt sich, dass die Stromdichte von JG1350 (*::pta aceF**) zwischen der von JG1295 (*aceF**) und JG1353 (*::pta*) liegt. Die Produktivität liegt mit 56 und $60 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}$ rund 25 % unter dem Wert für die Fermentation mit JG1295. Dabei folgt JG1350 zunächst dem Verlauf von JG991 und nähert sich dann bis zum vollständigen Verbrauch der Glucose an JG1295 an. Hierin zeigt sich, dass *pta* einen Teil des Phänotyps durch *aceF** wieder kompensiert. In JG1054 wird beim Übergang von O_2 zu NO_3^- , entgegen anderer Publikationen (Toya u. a. 2012), *aceEF* höher exprimiert (Tabelle 3.8a). Bei Induktion erhöht sich die Expression unter anoxischen Bedingungen noch weiter zu $\log_2 \text{fc} = 2,78/2,48$. In den Stämmen mit Gärdeletion bleibt diese Anpassung aus. Aus den Transkriptom-Daten ist weiter zu erkennen, dass *aceF*, unter NO_3^- -atmenden Bedingungen, höher als in JG997 und damit wieder auf Wildtyp-Niveau exprimiert ist (Tabelle 3.8b). Unter der Annahme, dass die Expressionsmuster mit DMSO nicht fundamental verschieden sind lässt sich die der in der Elektrofermentation

beobachtete Phänotyp von JG1350 wie folgt interpretieren: Da eine höhere Expression von *aceF** in Anwesenheit von *pta* zu einer geringeren Stoffwechselrate führt, ist davon auszugehen, dass der regulatorische Einfluss von *pta* über Acetyl-Phosphat zumindest teilweise dominiert. Kolobova u. a. (2001) konnten zeigen, dass der Pdh-Komplex durch Phosphorylierung inaktiviert wird. In einem Stamm, welcher energetische unterversorgt ist, steht weniger ATP zur Verfügung, was als normales Cosubstrat für die Phosphorylierung verwendet wird. Durch die Expression von *pta* steht in JG1350 nun wieder Acetyl-Phosphat zur Verfügung, welches diese Rolle teilweise übernehmen kann (Wolfe 2010). Die kann als weiteres Indiz für die Hypothese einer Basalregulation durch Acetyl-Phosphat angesehen werden. Es ist allerdings nicht zwingend, dass eine Regulation auf der Ebene von *aceF* erfolgt. Aus den Untersuchungen zum NO_3^- -Stoffwechsel, ist bekannt, dass die Integration von *pta* zur Wiederherstellung von Transkriptionsfaktoren, wie ArcA führt. Die Wiederherstellung eines solchen Redoxsensor-Systems führt dann zu einem Absinken der Transkripte im Citratzyklus und somit ebenfalls zu einer Verlangsamung im Stoffwechsel.

Zusammenfassend lässt sich durch einen indirekten Nachweis zeigen, dass *pta* und damit Acetyl-Phosphat als basaler Regulator im anaeroben Stoffwechsel auftritt. Die Expression von *pta* ermöglicht die Rekonstitution des Normalzustandes einer Vielzahl von Genen des anaeroben Energie- und Kohlenstoffmetabolismus. Ferner konnte beobachtet werden, dass dies zudem die Anpassung an hohe metabolische Belastungen erlaubt. Der Stoffwechsel im Produktionsstamm ist in großem Umfang durch einen Anabolismus limitiert, der unter Bedingungen der Elektrofermentation keine Selbsterhaltung ermöglicht. Mit den Mutationen im Pyruvatstoffwechsel konnte hier eine Verbesserung erreicht werden, die in der Elektrofermentation zu einer verlängerten Produktionsphase führt. Die teilweise Kompensation dieses Phänotyps durch die Integration von *pta* zeigt, dass die Deregulierung des Stoffwechsel nicht nur auf Transkriptionsebene, sondern auch auf Proteinebene besteht. Der neu erhaltene Produktionsstamm JG1295 sollte dann in einem abschließenden Charakterisierungsschritt zur Ermittlung der maximalen Stromdichte im Mini-Reaktor verwendet werden.

4.4. Maximale Stromdichte im Mini-Reaktor

Auch wenn die Ansätze bei erhöhter Zelldichte aus den bereits oben diskutierten Gründen nicht zur effizienten Produktion von Acetoin genutzt werden können, erlauben die Fermentationsansätze mit $\text{OD}_{600} = 30$, jedoch die Untersuchung der Grenzen des Reaktorsystems. Zu diesem Zweck wurden Fermentationen mit $546 \mu\text{mol l}^{-1}$ und $1092 \mu\text{mol l}^{-1}$ Methylenblau durchgeführt. Ziel war es, zu ermitteln, ob die Reoxidationsleistung für Methylenblau des Reaktorsystems ausgereizt ist. Dazu kann die maximale Stromdichte im Experiment herangezogen werden. In der Fermentation mit $\text{OD}_{600} = 6$ und $273 \mu\text{mol l}^{-1}$ Methylenblau wurde ein Wert um 1100 mA m^{-2} erreicht. Da auch mit $\text{OD}_{600} = 30$ ein vergleichbarer Wert von rund 1040 mA m^{-2} erreicht wird, besteht in diesem Fall keine Limitierung durch die biologische Reduktion. Durch Variation der Mediatorkonzentration sollte ermittelt werden, ob die maximale Stromdichte durch die Verfügbarkeit des Mediators begrenzt ist, oder durch die Reoxidationsleistung der Elektrode. In beiden Fermentationen konnte kein

signifikanter Anstieg der maximalen Stromdichte beobachtet werden. Der Ansatz mit $546 \mu\text{mol l}^{-1}$ Methylenblau erreicht ein Maximum von 950 mA m^{-2} . Für $1092 \mu\text{mol l}^{-1}$ Methylenblau werden 1120 mA m^{-2} erreicht. Auch im zeitlichen Verlauf ist kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Methylenblaukonzentrationen festzustellen. Folglich ist die Reoxidation des Mediators limitierend für die maximale Stromdichte. Dies erlaubt die Berechnung einer maximalen Produktivität für das Mini-Reaktorsystem. Für einen theoretischen Prozess mit einem konstanten Strom von 1100 mA m^{-2} ergäbe dies eine maximale Produktivität von $160 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}$ Acetoin. Idealisiert man noch weiter und nimmt einen theoretischen Reaktor an, dessen Volumen nur aus Elektrode besteht, wäre eine maximale Produktivität von $360 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}$ Acetoin möglich.

Darüber hinaus wurden in dieser Elektrofermentation die selben Instabilitäten im Verlauf der Stromdichte gemessen wie im vorangegangenen Experiment mit JG991 bei $\text{OD}_{600} = 30$. Auch sind die Ausbeuten und CE in beiden Fällen durch die Bildung von Mannit eingeschränkt. Im Ansatz mit 10 mmol l^{-1} Glucose, kann beobachtet werden, dass Mannit nach dem Abbau von Glucose als Substrat für den Stoffwechsel dient. Allerdings wird in diesem Fall Mannit nicht in Acetoin umgesetzt. Es scheint daher nicht zu Pyruvat umgesetzt zu werden und steht daher nicht zur Bildung von Acetoin zur Verfügung.

In einem abschließenden Evaluationsexperiment sollte noch untersucht werden, ob die zur Verfügung stehende Elektrode optimal genutzt ist. Für eine abschließende Evaluation wurden die Bedingungen mit der höchsten Stromdichte im Mini-Reaktor auf den Pump-Reaktor übertragen. Die Fermentation erfolgte bei $\text{OD}_{600} = 30$ mit $273 \mu\text{mol l}^{-1}$ Methylenblau. Als Fermentationsstamm wurde JG1295 verwendet. Im Vergleich zur Fermentation im Mini-Reaktor konnte dabei allerdings nur eine rund 50 % geringere BET-Stromdichte gemessen werden. Gegenüber der Fermentation aus Abschnitt 3.3 stieg die Stromdichte um 25 % an. Die vergrößerte Elektrode im Pumpreaktor bringt nur bedingt einen Vorteil bei erhöhter Zelldichte, da Verblockungen im Elektroden-Vlies schneller zu einer Limitierung führen. Der Anstieg der Stromdichte vom ursprünglichen Pump-Reaktor Experiment zu diesem ist nicht proportional zur Entwicklung im Mini-Reaktor. Die Ergebnisse unter optimierten Bedingungen für den Minireaktor sind daher nicht auf den Pumpreaktor zu übertragen. Für den Mini-Reaktor lässt sich hierüber aussagen, dass die, orthogonal zur Konvektion im Reaktor angeordnete Elektrode effektiv gegen Passivierung durch Zellen schützt. Das Elektrodenmaterial bleibt über die Zeit des Experiments zugänglich. im Pumpreaktor verläuft die Konvektion durch die Elektrode und verursacht Verblockung.

In Abschnitt 3.4.4 konnte gezeigt werden, dass Diffusion bei erhöhter Methylenblaukonzentration nur noch eine untergeordnete Rolle spielt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Reoxidation des Mediators unter den hier angewandten Bedingungen limitierend für die maximale Stromdichte ist. Die rund doppelt so hohe Flächennutzung verglichen zum Pump-Reaktor zeigt, dass die, für die Fermentation im Mini-Reaktor ermittelten, Bedingung ein Optimum für die Nutzung der Elektrode darstellen.

4.5. Überblick über alle Elektrofermentations-Experimente

Der Vergleich der verschiedenen Evaluationsparameter zwischen allen Elektrofermentationen ermöglicht es, ratenlimitierende Variablen zu identifizieren. Es soll so versucht werden zu einem modellhaften Verständnis der Prozesse zu kommen.

In den Fermentationen mit PBS Medium im 250 ml-Reaktor und Mini-Reaktor wurde unabhängig von Stamm und Reaktor dieselbe Stromdichte erreicht. Die BET-Stromdichte ist im Standardreaktor höher als im Minireaktor. Dies lässt sich dadurch erklären, dass in diesen Experimenten die selbe Anzahl Zellen und eine vergleichbar große geometrische Elektrodenoberfläche eingesetzt wurde. Durch die veränderte Geometrie steht im Mini-Reaktor mehr innere Oberfläche zur Verfügung. Hieraus lässt sich ableiten, dass die Fermentationen M PBS 50 OD6 991 und M PBS 50 OD6 1220 nicht durch die Verfügbarkeit von Elektrodenmaterial limitiert sind, sondern durch die Reduktionsleistung des Produktionsstamms. Die Produktivität vergrößert sich im Mini Reaktor gegenüber dem 250 ml-Reaktor, da im Mini-Reaktor das der Elektrode überstehende Elektrolytvolumen verringert wurde. Die spezifische Produktivität des 250 ml Reaktors ist von allen Experimenten die höchste. Zwar verfügt dieser Reaktor über die kleinste spezifische Oberfläche, was eine hohe spezifische Produktivität begünstigen würde, entscheidend ist jedoch die Kontamination mit O₂ in diesem Aufbau, welche eine Produktion von Acetoin unabhängig von der Anode ermöglicht. Dies drückt sich in der niedrigsten CE unter allen Experimenten aus. In den folgenden Anpassungen durch Medium und pH-Wert erhöht sich die Stromdichte um rund 2, 5×. Da weder eine Modulation der Reduktionsleistung des Katalysators in Form einer erhöhten Zelldichte oder eines schneller metabolisierenden Stamms zu einer erhöhten Stromdichte führt, kann die Konzentration des Mediators als ratenlimitierende Variable identifiziert werden.

Eine Erhöhung der Mediatorkonzentration führt folglich zu einer allgemein höheren Stromdichte und zu einer Diversifizierung der Stromdichte zwischen den Ansätzen, je nach Reduktionsleistung der Zellen (abhängig von Zelldichte und Stamm). Unter den Ansätzen mit erhöhter Methylenblaukonzentration bei OD₆₀₀ = 6 reihen sich die maximalen Stromdichten nach Produktionsstämmen. JG1295⁶ erreicht den höchsten Wert, gefolgt von Stamm JG1350⁷. Alle Stämme ohne Mutation im Pyruvat-Stoffwechsel erreichen eine ähnliche Stromdichte bei 273 μmol l⁻¹ Methylenblau. Der Vergleich zeigt nochmals die teilweise Kompensation des Phänotyps von *aceF*^{*} und *pfl*⁻ durch *pta*. Vergleicht man nun dazu die Ansätze bei OD₆₀₀ = 30 ist zunächst zu erkennen, dass JG1295 mit 10 mmol l⁻¹ Glucose bei beiden Zelldichten die selbe Stromdichte erreicht. Hierin spiegelt sich eine Limitierung durch das Substrat wieder. Bei 50 mmol l⁻¹ Glucose besteht diese Limitierung nicht und die mittlere Stormdichte erreicht das Maximum unter allen Ansätzen. Zwischen den Ansätzen bei OD₆₀₀ = 30, spiegeln sich die zuvor beobachteten Unterschiede zwischen den Stämmen wieder. Die Stromdichten skalieren jedoch nicht proportional zur Zelldichte, was nahe legt, dass eine Limitierung durch die zur Verfügung stehende Oberfläche besteht. Aus den Experiment im Pump-Reaktor ist bekannt, dass eine Passivierung der Elektrode durch Zellmasse zu einem Rückgang der Stromdichte führt. Es scheint daher

⁶JG991 *pfl*⁻, *aceF*^{*}

⁷JG991::*pta*, *pfl*⁻, *aceF*^{*}

plausibel, dass Zellen zu einem Teil an der Elektrode adherieren und so die Oxidation von Metylenblau verhindert wird. Da dies in der Pump-Elektrode in wesentlich größerem Umfang passiert, als an der Elektrode im Mini-Reaktor, werden hier auch deutlich geringere BET-Stromdichten erreicht.

Die Betrachtung der Ausbeuten zeigt zunächst, dass in Experimenten bei $OD_{600} = 30$ mit unlimitierter Glucose die geringsten Werte erreicht werden. Dies geht mit der erheblichen Bildung von Mannit einher. Da hierbei Glucose reduziert wird, liegen in diesen Experimenten auch die CE weit unter denen der anderen Experimente (Ausnahme: S PBS 50 OD0,05 991, siehe oben). Zudem wird in diesen Experimenten nicht in äquivalentem Umfang zum Glucoseumsatz Acetoin gebildet. Die höchsten Ausbeuten in den Experimenten werden bei $OD_{600} = 6$ und erhöhter Metylenblaukonzentration erreicht. Das Maximum von rund 79 % wird dabei mit $273 \mu\text{mol l}^{-1}$ Metylenblau durch Stamm JG1353 und JG1295 erreicht. Die Ausnahme zu dieser Regel bildet die Fermentation M PBS 50 OD6 991, welche ebenfalls einen Wert von 79 % erreicht. In den Experimenten bei $OD_{600} = 6$ liegt die CE jeweils nahe bei 100 %. In Experimenten mit einer CE von über 100 %, sollte berücksichtigt werden, dass der Stoffwechsel bis zu rund 15 % über Hefeextrakt ablaufen kann (vgl. Tabelle 3.1). Dies tritt besonders bei Experimenten auf, in welchen schnell eine Glucoselimitierung erreicht wird (M Mlight 273 OD30 1295 pH).

Die Produktivität der Elektrofermentationen bildet im wesentlichen die den Verlauf der Stromdichte ab. Unterschiede gibt es jedoch in den Experimenten bei $OD_{600} = 6$ mit erhöhter Metylenblaukonzentration. Stämme ohne Mutation im Pyruvat-Stoffwechsel weisen eine deutlich geringere Produktivität auf als JG1295 und JG1353. Die Stromdichten und Ausbeuten unter diesen Bedingungen weisen in allen vier untersuchten Stämmen geringere Unterschiede auf als die Produktivitäten. Da die heterologe Bildung von Acetoin bei Pyruvat vom nativen Stoffwechsel abzweigt, müssen die Mutationen in *aceF* und *pflB* folglich auf den Stofffluss oberhalb der eigentlichen Reaktion der betroffenen Enzyme rückwirken. Diese Hypothese wird dadurch gestärkt, dass durch Integration von *pta* der Phänotyp teilweise kompensiert wird. In Abschnitt 3.5.3 konnte gezeigt werden, dass durch die Integration von *pta* Gene der Glykolyse auf normales Niveau reguliert werden. Es ist daher plausibel, dass eine rekonstituierte Phosphorylierung im Stoffwechsel, den Effekt wieder kompensiert. Die maximale Produktivität unter allen Fermentationen mit $76 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}$ Acetoin in Stamm JG1295 entspricht knapp $15\times$ der Produktivität des initialen Experiments.

Die Korrelation von Stromdichte, Produktivität und Ausbeute gegen die Konzentration von Metylenblau und die Zelldichte verdeutlicht die quantitativen Unterschiede zwischen JG991 und JG1295. Zu den insgesamt niedrigeren Werten für Stromdichte und Produktivität in JG991 kommt ein wesentlich flacherer Anstieg gegenüber JG1295 der beiden Parameter, wenn die Verfügbarkeit des Elektronenakzeptor oder die Zelldichte erhöht wird. In beiden Stämmen werden für alle drei Parameter die niedrigsten Werte erreicht, für hohe Zelldichten und niedrige Mediator Konzentration. Entscheiden für einen effizienten Stoffwechsel, ist also ein unlimitierter Elektronenabfluss. Bei zu hoher Reduktionsleistung oder zu wenig Akzeptor verläuft die Umsetzung ineffizient. In der metabolische Fluss wird umgelenkt und es kommt zur Bildung von Nebenprodukten wie Mannit.

4.6. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals die Elektrofermentation von Acetoin in einem nicht-exoelektrogenen Stamm gezeigt werden. Hierzu wurde ein bioelektrochemisches Reaktorsystem entwickelt, welches nicht nur die Demonstration dieser Fermentation erlaubt, sondern auch die systematische Untersuchung prozessbestimmender Parameter. Das aus Vorarbeiten abgeleitete Protokoll erlaubte eine Acetoinproduktion mit einer Ausbeute von 79 %, was nahe am Wert der vorab ermittelten Fermentation mit NO_3^- als Elektronenakzeptor liegt. Da zudem elektrochemische Evaluationsgrößen wie CE, und Zyklenzahl des Mediators eine echte Elektrofermentation anzeigen, konnte die weitere Entwicklung und Anpassung der Fermentationsbedingungen vor allem nach ratenlimitierenden Gesichtspunkten erfolgen. Im Zuge dessen konnte die Abhängigkeit des Systems von der Mediatorkonzentration beschrieben werden und die Zusammensetzung des Fermentationsmedium optimiert werden.

Die anschließende systematische Untersuchung des Produktionsstamms durch die Erfassung und den Abgleich einer Kombination von physiologischen und molekularbiologischen Parametern ermöglichte die Identifikation einer grundlegenden Störung in der Regulation des anaeroben Stoffwechsels mit NO_3^- . Die chromosomale Integration der Phosphotransacetylase an ihrem nativen Locus, ermöglichte die Wiederherstellung wildtypischer Genexpression für zentrale Stoffwechselwege, wie Glycolyse, Citratzyklus und im Energiehaushalt. Es konnte zu dem gezeigt werden, dass die Expression von zentralen Stoffwechselregulatoren wie *arcA* durch die Anwesenheit von *pta* reguliert wird. In einem weitergehenden Untersuchungsschritt konnte zudem gezeigt werden, dass mit DMSO als Elektronenakzeptor die Modifikation der Pyruvat-Dehydrogenase zu einer höheren anabolen und katabolen Rate im Zellstoffwechsel führt. Der Phänotyp ist zudem auf Methylenblau als Elektronenakzeptor übertragbar und erlaubt damit eine beschleunigte Elektrofermentation mit einem nachhaltigeren Zellstoffwechsel, bei gleichbleibend hoher Ausbeute. Eine mechanistische Erschließung kann durch biochemische Untersuchungen erfolgen. Hierbei sollten Phosphorylierungsmuster bestimmt werden und Metabolite wie NADH, Acetyl-CoA, Acetyl-Phosphat und ATP quantifiziert werden.

Die Produktion von Acetoin erfolgt üblicherweise in oxischen Fermentationen, welche mit hohen Produktivitäten um $1 \text{ g l}^{-1} \text{ h}$ einhergehen. Allerdings fließt im aeroben Stoffwechsel auch mit ein höher Anteil der Ressourcen in anabole Reaktionen und steht damit nicht mehr für die Produktbildung zur Verfügung. Ziel der meisten Ansätze zur Entwicklung von Produktionsstämmen ist daher die Begrenzung anaboler Reaktionen. Dies geschieht häufig durch die Fokussierung des Stoffwechsels, um im Zuge genetischer Deletionen mehr Kohlenstoff in Pyruvat zu leiten (Gao, S. u. a. 2014; Lv u. a. 2016). Kritisch für die Bildung von Acetoin ist auch unter oxischen Bedingungen die Redoxbilanz. So werden Ansätze entwickelt, in welchen NADH-Dehydrogenasen überexprimiert werden um den Stoffwechsel ausgleichen zu können (Xu u. a. 2015; Sun u. a. 2012; Li u. a. 2018). Im Fall des hier untersuchten Produktionsstammes konnte gezeigt werden, dass eine grundlegende Limitierung des Stoffwechsels darin besteht, dass der Anteil anaboler Reaktionen unzureichend sind, damit der Produktionsorganismus sich selbst erhalten kann. Durch einen veränderten Pyruvatstoffwechsel wurde, abweichend zu den oben beschriebenen Ansätzen, eine Erhöhung des NGAM erreicht, welche es erlaubt, die

Fermentation länger und bei einer höheren Rate aufrecht zu erhalten. Hierdurch und durch die systematische Untersuchung der Fermentationsbedingungen konnte eine Produktivität für Acetoin von $76 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}$ erreicht werden. Dieser Wert liegt immer noch bei rund $\frac{1}{10}$ der Produktivitäten oxischer Fermentationen aus Glucose (Yang, T. u. a. 2017). Die großen Vorteile in der Prozessführung anoxischer Fermentationen (kein stöchiometrischer Elektronenakzeptor, weniger Biomasse Aufbau, keine Schaumbildung) finden sich ebenso in einer Elektrofermentation wieder. Zudem ermöglicht der bioelektrochemische Ansatz in Verbindung mit synthetischer Biologie die Umsetzung möglicher Anwendungen die zuvor nur unter oxischen Bedingungen möglich waren. So sind Fermentationen wie die von Acetoin unter anoxischen Bedingungen möglich, auch wenn deren Redoxbilanz nicht ausgeglichen ist. Zuletzt fällt bei der Elektrofermentation als Nebenprodukt immer elektrische Energie an, die universell einsetzbar ist. Es scheint daher erstrebenswert, die verbleibende Lücke in der Produktivität zwischen oxischen Fermentationen und der Elektrofermentation zu schließen um diese neue Strategie Konkurrenz fähig zu machen. Im konkreten Fall sind hierzu drei entscheidende Ansatzpunkte zu nennen.

- Das entwickelte Reaktorsystem limitiert die maximale Produktivität auf rund $160 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}$, berücksichtigt man nur das Volumen der Elektrode, kann knapp das doppelte erreicht werden. Für eine weitere Beschleunigung sollte die Kinetik für Methylenblau an der Elektrode erhöht werden. Hierzu sind Oberflächenmodifizierungen denkbar, welche eine polarere Oberfläche ermöglichen (Zhu, X. u. a. 2011). Zudem kann durch mikro- oder nanostrukturierte Oberflächen die innere Oberfläche des Materials erheblich vergrößert werden (Park, I. H. u. a. 2013; Du u. a. 2006). Bei gleichbleibender Aktivität muss eine spezifische Oberfläche von mindestens $120 \text{ m}^2 \text{ l}^{-1}$ gewährleistet sein.
- Bei der Weiterentwicklung des Produktionsstamms muss auf Basis der identifizierten und teilweise behobenen Limitierungen ein noch besserer Ausgleich gefunden werden zwischen anaboler Selbsterhaltung und kataboler Produktion. Ansatzpunkte für die weitere Modifikation in diesem Sinne können in der Modifikation von Regulatoren wie Cra liegen um eine globale Repression des Anabolismus zu vermeiden. Um einen zu starke Umsteuerung in des Flusses zu vermeiden, liefert der von Gyorgy u. a. (2015) beschriebene Ansatz eine theoretische Grundlage.
- Es konnte gezeigt werden, dass die Energieversorgung des Stoffwechsels zentral durch den Abfluss von Elektronen limitiert ist. Eine sinnvolle Auflösung kann in der Intensivierung der Interaktion von *E. coli* und Elektrodenoberfläche gefunden werden. Um eine Passivierung wie im Falle der Pumpelektrode zu vermeiden, sollte ein Ziel der weiteren Entwicklung sein, die Zelloberfläche von *E. coli* leitfähig zu machen. Dabei sind bereits existierende Systeme ungeeignet, da deren Umsatzraten weit hinter denen liegen, die in dieser Fermentation erreicht wurden (Jensen, TerAvest u. a. 2016).

Literatur

- Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y. und Sonomoto, K. (2011). Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits. *Journal of Biotechnology*. **156**:286–301.
- Achinas, S. und Euverink, G. J. W. (2016). Consolidated briefing of biochemical ethanol production from lignocellulosic biomass. *Electronic Journal of Biotechnology*. **23**:44–53.
- Adrio, J.-L. und Demain, A. L. (2010). Recombinant organisms for production of industrial products. *Bioengineered Bugs*. **1**:116–131.
- Akita, H., Nakashima, N. und Hoshino, T. (2016). Pyruvate production using engineered *Escherichia coli*. *AMB Express*. **6**:94.
- Amatore, C., Szunerits, S., Thouin, L. und Warkocz, J. (2001). The real meaning of Nernst's steady diffusion layer concept under non-forced hydrodynamic conditions. A simple model based on Levich's seminal view of convection. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. **500**:62–70.
- Arslan, E., Schulz, H., Zufferey, R., Künzler, P. und Thöny-Meyer, L. (1998). Overproduction of the *Bradyrhizobium japonicum* c-Type Cytochrome Subunits of the cbb3 Oxidase in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **251**:744–747.
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L. und Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular Systems Biology*. **2**:2006.0008.
- Babanova, S., Matanovic, I., Cornejo, J., Bretschger, O., Nealson, K. und Atanassov, P. (2017). Outer membrane cytochromes/flavin interactions in *Shewanella* spp.—A molecular perspective. *Biointerphases*. **12**:021004.
- Beblawy, S., Bursac, T., Paquete, C., Louro, R., Clarke, T. A. und Gescher, J. (2018). Extracellular reduction of solid electron acceptors by *Shewanella oneidensis*. *Molecular Microbiology*. **109**:571–583.
- Becker, J., Lange, A., Fabarius, J. und Wittmann, C. (2015). Top value platform chemicals: bio-based production of organic acids. *Current Opinion in Biotechnology*. **36**:168–175.
- Belchik, S. M., Kennedy, D. W., Dohnalkova, A. C., Wang, Y., Sevinc, P. C., Wu, H., Lin, Y., Lu, H. P., Fredrickson, J. K. und Shi, L. (2011). Extracellular Reduction of Hexavalent Chromium by Cytochromes MtrC and OmcA of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Applied and Environmental Microbiology*. **77**:4035–4041.
- Bentley, W. E., Mirjalili, N., Andersen, D. C., Davis, R. H. und Kompala, D. S. (1990). Plasmid-encoded protein: The principal factor in the “metabolic burden” associated with recombinant bacteria. *Biotechnology and Bioengineering*. **35**:668–681.
- Berg, W. A. M. v. d., Hagen, W. R. und Dongen, W. M. A. M. v. (2000). The hybrid-cluster protein (‘prismane protein’) from *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*. **267**:666–676.

- Bertero, M. G., Rothery, R. A., Palak, M., Hou, C., Lim, D., Blasco, F., Weiner, J. H. und Strynadka, N. C. J. (2003). Insights into the respiratory electron transfer pathway from the structure of nitrate reductase A. *Nature Structural & Molecular Biology*. **10**:681–687.
- Bettenbrock, K., Fischer, S., Kremling, A., Jahreis, K., Sauter, T. und Gilles, E.-D. (2006). A Quantitative Approach to Catabolite Repression in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*. **281**:2578–2584.
- Bettenbrock, K., Sauter, T., Jahreis, K., Kremling, A., Lengeler, J. W. und Gilles, E.-D. (2007). Correlation between Growth Rates, EIICrr Phosphorylation, and Intracellular Cyclic AMP Levels in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*. **189**:6891–6900.
- Bisswanger, H. und Henning, U. (1971). Regulatory Properties of the Pyruvate-Dehydrogenase Complex from *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*. **24**:376–384.
- Blattner, F. R., Plunkett, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B. und Shao, Y. (1997). The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*. **277**:1453–1462.
- Borkowski, O., Ceroni, F., Stan, G.-B. und Ellis, T. (2016). Overloaded and stressed: whole-cell considerations for bacterial synthetic biology. *Current Opinion in Microbiology*. **33**:123–130.
- Brett, C. M. A., Inzelt, G. und Kertesz, V. (1999). Poly(methylene blue) modified electrode sensor for haemoglobin. *Analytica Chimica Acta*. **385**:119–123.
- Brunauer, S., Emmett, P. H. und Teller, E. (1938). Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *Journal of the American Chemical Society*. **60**:309–319.
- Bundesministerium für Wirtschaft und Energie (2018). *Primärenergieverbrauch in Deutschland*. URL: <https://www.bmwi.de/Redaktion/DE/Infografiken/Energie/Energiedaten/Energiegewinnung-und-Energieverbrauch/energiedaten-energiegewinnung-verbrauch-06.html> (besucht am 18. 11. 2018).
- Bursac, T., Gralnick, J. A. und Gescher, J. (2017). Acetoin production via unbalanced fermentation in *Shewanella oneidensis*. *Biotechnology and Bioengineering*. **114**:1283–1289.
- Burse, A., Weingart, H. und Ullrich, M. S. (2004). NorM, an *Erwinia amylovora* Multidrug Efflux Pump Involved in In Vitro Competition with Other Epiphytic Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:693–703.
- Canstein, H. v., Ogawa, J., Shimizu, S. und Lloyd, J. R. (2008). Secretion of Flavins by *Shewanella* Species and Their Role in Extracellular Electron Transfer. *Applied and Environmental Microbiology*. **74**:615–623.
- Cao, X., Huang, X., Liang, P., Xiao, K., Zhou, Y., Zhang, X. und Logan, B. E. (2009). A New Method for Water Desalination Using Microbial Desalination Cells. *Environmental Science & Technology*. **43**:7148–7152.
- Causey, T. B., Shanmugam, K. T., Yomano, L. P. und Ingram, L. O. (2004). Engineering *Escherichia coli* for efficient conversion of glucose to pyruvate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **101**:2235–2240.
- Celińska, E. und Grajek, W. (2009). Biotechnological production of 2,3-butanediol—Current state and prospects. *Biotechnology Advances*. **27**:715–725.
- Ceroni, F., Algar, R., Stan, G.-B. und Ellis, T. (2015). Quantifying cellular capacity identifies gene expression designs with reduced burden. *Nature Methods*. **12**:415–418.

-
- Chen, T., Liu, W.-X., Fu, J., Zhang, B. und Tang, Y.-J. (2013). Engineering *Bacillus subtilis* for acetoin production from glucose and xylose mixtures. *Journal of Biotechnology*. **168**:499–505.
- Chen, W.-H., Lin, B.-J., Huang, M.-Y. und Chang, J.-S. (2015). Thermochemical conversion of microalgal biomass into biofuels: A review. *Bioresource Technology*. **184**:314–327.
- Cherubini, F. (2010). The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management*. **51**:1412–1421.
- Chin, C.-S., Alexander, D. H., Marks, P., Klammer, A. A., Drake, J., Heiner, C., Clum, A., Copeland, A., Huddleston, J., Eichler, E. E., Turner, S. W. und Korlach, J. (2013). Nonhybrid, finished microbial genome assemblies from long-read SMRT sequencing data. *Nature Methods*. **10**:563–569.
- Clark, D. P. (1989). The fermentation pathways of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*. **63**:223–234.
- Clark, J. H. und Deswarte, F. (2015). *Introduction to chemicals from biomass*. John Wiley & Sons.
- Clarke, S. F. und Foster, J. R. (2012). A history of blood glucose meters and their role in self-monitoring of diabetes mellitus. *British Journal of Biomedical Science*. **69**:83–93.
- Corchero, J. L. und Villaverde, A. (1998). Plasmid maintenance in *Escherichia coli* recombinant cultures is dramatically, steadily, and specifically influenced by features of the encoded proteins. *Biotechnology and Bioengineering*. **58**:625–632.
- Covert, M. W. und Palsson, B. Ø. (2002). Transcriptional Regulation in Constraints-based Metabolic Models of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*. **277**:28058–28064.
- Curran, K. A. und Alper, H. S. (2012). Expanding the chemical palate of cells by combining systems biology and metabolic engineering. *Metabolic Engineering*. **14**:289–297.
- Darzi, Y., Letunic, I., Bork, P. und Yamada, T. (2018). iPath3.0: interactive pathways explorer v3. *Nucleic Acids Research*. **46**:W510–W513.
- Dellomonaco, C., Clomburg, J. M., Miller, E. N. und Gonzalez, R. (2011). Engineered reversal of the β -oxidation cycle for the synthesis of fuels and chemicals. *Nature*. **476**:355–359.
- Deutscher, J., Francke, C. und Postma, P. W. (2006). How Phosphotransferase System-Related Protein Phosphorylation Regulates Carbohydrate Metabolism in Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**:939–1031.
- Ding, D.-W., Xu, J., Li, L., Xie, J.-M. und Sun, X. (2014). Identifying the potential extracellular electron transfer pathways from a c-type cytochrome network. *Molecular BioSystems*. **10**:3138–3146.
- Du, C. und Pan, N. (2006). High power density supercapacitor electrodes of carbon nanotube films by electrophoretic deposition. *Nanotechnology*. **17**:5314.
- Duhl, K. L., Tefft, N. M. und TerAvest, M. A. (2018). *Shewanella oneidensis* MR-1 utilizes both sodium- and proton-pumping NADH dehydrogenases during aerobic growth. *Applied and Environmental Microbiology*. AEM.00415–18.
- Edwards, J. S. und Palsson, B. Ø. (2000). The *Escherichia coli* MG1655 in silico metabolic genotype: Its definition, characteristics, and capabilities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **97**:5528–5533.
- Edwards, M. J., White, G. F., Lockwood, C. W., Lawes, M. C., Martel, A., Harris, G., Scott, D. J., Richardson, D. J., Butt, J. N. und Clarke, T. A. (2018). Structural modeling of an outer

- membrane electron conduit from a metal-reducing bacterium suggests electron transfer via periplasmic redox partners. *The Journal of biological chemistry*. **293**:8103–8112.
- Escalante, A., Salinas Cervantes, A., Gosset, G. und Bolívar, F. (2012). Current knowledge of the *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate–carbohydrate phosphotransferase system: peculiarities of regulation and impact on growth and product formation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **94**:1483–1494.
- Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A. und Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*. **14**:563–575.
- Flynn, J. M., Ross, D. E., Hunt, K. A., Bond, D. R. und Gralnick, J. A. (2010). Enabling Unbalanced Fermentations by Using Engineered Electrode-Interfaced Bacteria. *mBio*. **1**:e00190–10.
- Förster, A. H. (2014). „Produktion von Basischemikalien in den Modellorganismen *Escherichia coli* und *Synechocystis sp.* PCC 6803“. Diss.
- Förster, A. H., Beblawy, S., Golitsch, F. und Gescher, J. (2017). Electrode-assisted acetoin production in a metabolically engineered *Escherichia coli* strain. *Biotechnology for Biofuels*. **10**:65.
- Förster, A. H. und Gescher, J. (2014). Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for Production of Mixed-Acid Fermentation End Products. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. **2**:
- Fredrickson, J. K., Romine, M. F., Beliaev, A. S., Auchtung, J. M., Driscoll, M. E., Gardner, T. S., Nealson, K. H., Osterman, A. L., Pinchuk, G., Reed, J. L., Rodionov, D. A., Rodrigues, J. L. M., Saffarini, D. A., Serres, M. H., Spormann, A. M., Zhulin, I. B. und Tiedje, J. M. (2008). Towards environmental systems biology of *Shewanella*. *Nature Reviews Microbiology*. **6**:nrmicro1947.
- Fuchs, G. (2017). *Allgemeine Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag. 751 S.
- Gao, J., Xu, Y. Y., Li, F. W. und Ding, G. (2013). Production of S-acetoin from diacetyl by *Escherichia coli* transformant cells that express the diacetyl reductase gene of *Paenibacillus polymyxa* ZJ-9. *Letters in Applied Microbiology*. **57**:274–281.
- Gao, S., Guo, W., Shi, L., Yu, Y., Zhang, C. und Yang, H. (2014). Characterization of acetoin production in a *budC* gene disrupted mutant of *Serratia marcescens* G12. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. **41**:1267–1274.
- Georgellis, D., Lynch, A. S. und Lin, E. C. (1997). In vitro phosphorylation study of the arc two-component signal transduction system of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. **179**:5429–5435.
- Gescher, J., Cordova, C. D. und Spormann, A. M. (2008). Dissimilatory iron reduction in *Escherichia coli*: identification of CymA of *Shewanella oneidensis* and NapC of *E. coli* as ferric reductases. *Molecular Microbiology*. **68**:706–719.
- Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J. C., Hutchison, C. A. und Smith, H. O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*. **6**:343–345.
- Goldbeck, C. P., Jensen, H. M., TerAvest, M. A., Beedle, N., Appling, Y., Hepler, M., Cambray, G., Mutalik, V., Angenent, L. T. und Ajo-Franklin, C. M. (2013). Tuning Promoter Strengths for Improved Synthesis and Function of Electron Conduits in *Escherichia coli*. *ACS Synthetic Biology*. **2**:150–159.

-
- Golitsch, F. (2016). „Entwicklung bioelektrochemischer Systeme für die Untersuchung von elektrodenabhängigen Konversionsprozessen“. Diss.
- Golitsch, F., Bücking, C. und Gescher, J. (2013). Proof of principle for an engineered microbial biosensor based on *Shewanella oneidensis* outer membrane protein complexes. *Biosensors and Bioelectronics*. **47**:285–291.
- Gong, Y., Radachowsky, S. E., Wolf, M., Nielsen, M. E., Girguis, P. R. und Reimers, C. E. (2011). Benthic Microbial Fuel Cell as Direct Power Source for an Acoustic Modem and Seawater Oxygen/Temperature Sensor System. *Environmental Science & Technology*. **45**:5047–5053.
- Gorby, Y. A., Yanina, S., McLean, J. S., Rosso, K. M., Moyles, D., Dohnalkova, A., Beveridge, T. J., Chang, I. S., Kim, B. H., Kim, K. S., Culley, D. E., Reed, S. B., Romine, M. F., Saffarini, D. A., Hill, E. A., Shi, L., Elias, D. A., Kennedy, D. W., Pinchuk, G., Watanabe, K., Ishii, S., Logan, B., Nealson, K. H. und Fredrickson, J. K. (2006). Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **103**:11358–11363.
- Gosset, G., Zhang, Z., Nayyar, S., Cuevas, W. und Saier, M. H. (2004). Transcriptome Analysis of Crp-Dependent Catabolite Control of Gene Expression in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. **186**:3516–3524.
- Graef, M. R. d., Alexeeva, S., Snoep, J. L. und Mattos, M. J. T. d. (1999). The Steady-State Internal Redox State (NADH/NAD) Reflects the External Redox State and Is Correlated with Catabolic Adaptation in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. **181**:2351–2357.
- Green, J. und Paget, M. S. (2004). Bacterial redox sensors. *Nature Reviews Microbiology*. **2**:954–966.
- Gueriri, I., Bay, S., Dubrac, S., Cyncynatus, C. und Msadek, T. (2008). The Pta–AckA pathway controlling acetyl phosphate levels and the phosphorylation state of the DegU orphan response regulator both play a role in regulating *Listeria monocytogenes* motility and chemotaxis. *Molecular Microbiology*. **70**:1342–1357.
- Gunsalus, R. P. und Park, S. J. (1994). Aerobic-anaerobic gene regulation in *Escherichia coli*: control by the ArcAB and Fnr regulons. *Research in Microbiology*. **145**:437–450.
- Guo, W., Jia, W., Li, Y. und Chen, S. (2010). Performances of *Lactobacillus brevis* for Producing Lactic Acid from Hydrolysate of Lignocellulosics. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **161**:124–136.
- Gyorgy, A., Jiménez, J. I., Yazbek, J., Huang, H.-H., Chung, H., Weiss, R. und Del Vecchio, D. (2015). Isocost Lines Describe the Cellular Economy of Genetic Circuits. *Biophysical Journal*. **109**:639–646.
- Hansen, R. G. und Henning, U. (1966). Regulation of pyruvate dehydrogenase activity in *Escherichia coli* K12. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology and Biological Oxidation*. **122**:355–358.
- Heidelberg, J. F., Paulsen, I. T., Nelson, K. E., Gaidos, E. J., Nelson, W. C., Read, T. D., Eisen, J. A., Seshadri, R., Ward, N., Methe, B., Clayton, R. A., Meyer, T., Tsapin, A., Scott, J., Beanan, M., Brinkac, L., Daugherty, S., DeBoy, R. T., Dodson, R. J., Durkin, A. S., Haft, D. H., Kolonay, J. F., Madupu, R., Peterson, J. D., Umayam, L. A., White, O., Wolf, A. M., Vamathevan, J., Weidman, J., Impraim, M., Lee, K., Berry, K., Lee, C., Mueller, J., Khouri, H., Gill, J., Utterback, T. R., McDonald, L. A., Feldblyum, T. V., Smith, H. O., Venter, J. C.,

- Nealson, K. H. und Fraser, C. M. (2002). Genome sequence of the dissimilatory metal ion-reducing bacterium *Shewanella oneidensis*. *Nature Biotechnology*. **20**:1118–1123.
- Hermesen, R., Okano, H., You, C., Werner, N. und Hwa, T. (2015). A growth-rate composition formula for the growth of *E. coli* on co-utilized carbon substrates. *Molecular Systems Biology*. **11**:801.
- Herring, C. D., Glasner, J. D. und Blattner, F. R. (2003). Gene replacement without selection: regulated suppression of amber mutations in *Escherichia coli*. *Gene*. **311**:153–163.
- Heyland, J., Blank, L. M. und Schmid, A. (2011). Quantification of metabolic limitations during recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*. **155**:178–184.
- Ho, Y.-S. (2006). Review of second-order models for adsorption systems. *Journal of Hazardous Materials*. **136**:681–689.
- Hoffmann, F., Weber, J. und Rinas, U. (2002). Metabolic adaptation of *Escherichia coli* during temperature-induced recombinant protein production: 1. Readjustment of metabolic enzyme synthesis. *Biotechnology and Bioengineering*. **80**:313–319.
- Huisman, G. W., Siegele, D. A., Zambrano, M. M. und Kolter, R. (1996). Morphological and physiological changes during stationary phase. *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. **2**:1672–1682.
- Ingledeew, W. J. und Poole, R. K. (1984). The respiratory chains of *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews*. **48**:222–271.
- Iskander, S. M., Novak, J. T. und He, Z. (2018). Enhancing forward osmosis water recovery from landfill leachate by desalinating brine and recovering ammonia in a microbial desalination cell. *Bioresource Technology*. **255**:76–82.
- Iuchi, S. und Lin, E. C. (1988). *arcA* (dye), a global regulatory gene in *Escherichia coli* mediating repression of enzymes in aerobic pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **85**:1888–1892.
- Jang, Y.-S., Kim, B., Shin, J. H., Choi, Y. J., Choi, S., Song, C. W., Lee, J., Park, H. G. und Lee, S. Y. (2012). Bio-based production of C2–C6 platform chemicals. *Biotechnology and Bioengineering*. **109**:2437–2459.
- Jensen, H. M., Albers, A. E., Malley, K. R., Londer, Y. Y., Cohen, B. E., Helms, B. A., Weigele, P., Groves, J. T. und Ajo-Franklin, C. M. (2010). Engineering of a synthetic electron conduit in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **107**:19213–19218.
- Jensen, H. M., TerAvest, M. A., Kokish, M. G. und Ajo-Franklin, C. M. (2016). CymA and Exogenous Flavins Improve Extracellular Electron Transfer and Couple It to Cell Growth in Mtr-Expressing *Escherichia coli*. *ACS Synthetic Biology*. **5**:679–688.
- Judah, J. D. und Williams-Ashman, H. G. (1951). The inhibition of oxidative phosphorylation. *Biochemical Journal*. **48**:33–42.
- Karyakin, A. A., Strakhova, A. K., Karyakina, E. E., Varfolomeyev, S. D. und Yatslmirsky, A. K. (1993). The electrochemical polymerization of Methylene Blue and bioelectrochemical activity of the resulting film. *Synthetic Metals*. **60**:289–292.
- Keasling, J. D. (2008). Synthetic Biology for Synthetic Chemistry. *ACS Chemical Biology*. **3**:64–76.
- Keseler, I. M., Mackie, A., Peralta-Gil, M., Santos-Zavaleta, A., Gama-Castro, S., Bonavides-Martínez, C., Fulcher, C., Huerta, A. M., Kothari, A., Krummenacker, M., Latendresse, M., Muñoz-Rascado, L., Ong, Q., Paley, S., Schröder, I., Shearer, A. G., Subhraveti, P.,

-
- Travers, M., Weerasinghe, D., Weiss, V., Collado-Vides, J., Gunsalus, R. P., Paulsen, I. und Karp, P. D. (2013). EcoCyc: fusing model organism databases with systems biology. *Nucleic Acids Research*. **41**:D605–D612.
- Kim, S.-K., Wilmes-Riesenberg, M. R. und Wanner, B. L. (1996). Involvement of the sensor kinase EnvZ in the in vivo activation of the response-regulator PhoB by acetyl phosphate. *Molecular Microbiology*. **22**:135–147.
- Kim, Y., Ingram, L. O. und Shanmugam, K. T. (2007). Construction of an *Escherichia coli* K-12 Mutant for Homoethanogenic Fermentation of Glucose or Xylose without Foreign Genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:1766–1771.
- Kipf, E., Koch, J., Geiger, B., Erben, J., Richter, K., Gescher, J., Zengerle, R. und Kerzenmacher, S. (2013). Systematic screening of carbon-based anode materials for microbial fuel cells with *Shewanella oneidensis* MR-1. *Bioresource Technology*. **146**:386–392.
- Klebanoff, S. J. (1993). Reactive nitrogen intermediates and antimicrobial activity: Role of nitrite. *Free Radical Biology and Medicine*. **14**:351–360.
- Klein, A. H., Shulla, A., Reimann, S. A., Keating, D. H. und Wolfe, A. J. (2007). The Intracellular Concentration of Acetyl Phosphate in *Escherichia coli* Is Sufficient for Direct Phosphorylation of Two-Component Response Regulators. *Journal of Bacteriology*. **189**:5574–5581.
- Kobir, A., Shi, L., Boskovic, A., Grangeasse, C., Franjevic, D. und Mijakovic, I. (2011). Protein phosphorylation in bacterial signal transduction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. **1810**:989–994.
- Kolb, A., Busby, S., Buc, H., Garges, S. und Adhya, S. (1993). Transcriptional Regulation by cAMP and Its Receptor Protein. *Annual Review of Biochemistry*. **62**:749–797.
- Kolobova, E., Tuganova, A., Boulatnikov, I. und Popov, K. M. (2001). Regulation of pyruvate dehydrogenase activity through phosphorylation at multiple sites. *Biochemical Journal*. **358**:69–77.
- Kracke, F., Lai, B., Yu, S. und Krömer, J. O. (2018). Balancing cellular redox metabolism in microbial electrosynthesis and electro fermentation – A chance for metabolic engineering. *Metabolic Engineering*. **45**:109–120.
- Kremling, A., Geiselmann, J., Ropers, D. und Jong, H. de. (2015). Understanding carbon catabolite repression in *Escherichia coli* using quantitative models. *Trends in Microbiology*. **23**:99–109.
- Krieg, T., Sydow, A., Schröder, U., Schrader, J. und Holtmann, D. (2014). Reactor concepts for bioelectrochemical syntheses and energy conversion. *Trends in Biotechnology*. **32**:645–655.
- Kronenberg, M., Trably, E., Bernet, N. und Patureau, D. (2017). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: Using microbial bioelectrochemical systems to overcome an impasse. *Environmental Pollution*. **231**:509–523.
- Kuroda, T. und Tsuchiya, T. (2009). Multidrug efflux transporters in the MATE family. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. **1794**:763–768.
- Lafdi, K., Bonnamy, S. und Oberlin, A. (1993). Textures and structures in heterogeneous pitch-based carbon fibres (as-spun, oxidized, carbonized, and graphitized). *Carbon*. **31**:29–34.
- Larchet, C., Nouri, S., Auclair, B., Dammak, L. und Nikonenko, V. (2008). Application of chronopotentiometry to determine the thickness of diffusion layer adjacent to an

- ion-exchange membrane under natural convection. *Advances in Colloid and Interface Science*. **139**:45–61.
- Lee, J. W., Kim, H. U., Choi, S., Yi, J. und Lee, S. Y. (2011). Microbial production of building block chemicals and polymers. *Current Opinion in Biotechnology*. **22**:758–767.
- Lee, J. W., Na, D., Park, J. M., Lee, J., Choi, S. und Lee, S. Y. (2012). Systems metabolic engineering of microorganisms for natural and non-natural chemicals. *Nature Chemical Biology*. **8**:536–546.
- Lee, K. H., Park, J. H., Kim, T. Y., Kim, H. U. und Lee, S. Y. (2007). Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for L-threonine production. *Molecular Systems Biology*. **3**:149.
- Li, J.-X., Huang, Y.-Y., Chen, X.-R., Du, Q.-S., Meng, J.-Z., Xie, N.-Z. und Huang, R.-B. (2018). Enhanced production of optical (S)-acetoin by a recombinant *Escherichia coli* whole-cell biocatalyst with NADH regeneration. *RSC Advances*. **8**:30512–30519.
- Lide, D. R. (2010). *CRC Handbook of chemistry and physics on CD-ROM / David R. Lide ed.-in-chief*.
- Lienemann, M., TerAvest, M. A., Pitkänen, J.-P., Stuns, I., Penttilä, M., Ajo-Franklin, C. M. und Jäntti, J. (2018). Towards patterned bioelectronics: facilitated immobilization of exoelectrogenic *Escherichia coli* with heterologous pili. *Microbial Biotechnology*. **11**:1184–1194.
- Light, S. H., Su, L., Rivera-Lugo, R., Cornejo, J. A., Louie, A., Iavarone, A. T., Ajo-Franklin, C. M. und Portnoy, D. A. (2018). A flavin-based extracellular electron transfer mechanism in diverse Gram-positive bacteria. *Nature*. **562**:140.
- Lima, B. P., Lennon, C. W., Ross, W., Gourse, R. L. und Wolfe, A. J. (2016). In vitro evidence that RNA Polymerase acetylation and acetyl phosphate-dependent CpxR phosphorylation affect *cpxP* transcription regulation. *FEMS Microbiology Letters*. **363**:
- Lin, C.-W., Wu, C.-H., Tran, D.-T., Shih, M.-C., Li, W.-H. und Wu, C.-F. (2011). Mixed culture fermentation from lignocellulosic materials using thermophilic lignocellulose-degrading anaerobes. *Process Biochemistry*. **46**:489–493.
- Liu, Y., Harnisch, F., Fricke, K., Sietmann, R. und Schröder, U. (2008). Improvement of the anodic bioelectrocatalytic activity of mixed culture biofilms by a simple consecutive electrochemical selection procedure. *Biosensors and Bioelectronics*. **24**:1006–1011.
- Logan, B. E. (2009). Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells. *Nature Reviews Microbiology*. **7**:375–381.
- Logan, B. E. (2010). Scaling up microbial fuel cells and other bioelectrochemical systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **85**:1665–1671.
- Lopes, M. S. G. (2015). Engineering biological systems toward a sustainable bioeconomy. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. **42**:813–838.
- Lovley, D. R. und Phillips, E. J. P. (1988). Novel Mode of Microbial Energy Metabolism: Organic Carbon Oxidation Coupled to Dissimilatory Reduction of Iron or Manganese. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:1472–1480.
- Lu, L. und Ren, Z. J. (2016). Microbial electrolysis cells for waste biorefinery: A state of the art review. *Bioresource Technology*. **215**:254–264.
- Lundblad, R. L. (2010). *Handbook of biochemistry and molecular biology*.

-
- Lutz, R. und Bujard, H. (1997). 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 Research*. **25**:1203–1210.
- Lv, X., Dai, L., Bai, F., Wang, Z., Zhang, L. und Shen, Y. (2016). Metabolic engineering of *Serratia marcescens* MG1 for enhanced production of (3R)-acetoin. *Bioresources and Bioprocessing*. **3**:52.
- MacArthur, M. W. und Thornton, J. M. (1991). Influence of proline residues on protein conformation. *Journal of Molecular Biology*. **218**:397–412.
- Malpica, R., Franco, B., Rodriguez, C., Kwon, O. und Georgellis, D. (2004). Identification of a quinone-sensitive redox switch in the ArcB sensor kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **101**:13318–13323.
- Martinez, A. und Kolter, R. (1997). Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA-binding protein Dps. *Journal of Bacteriology*. **179**:5188–5194.
- Marzan, L. W. und Shimizu, K. (2011). Metabolic regulation of *Escherichia coli* and its *phoB* and *phoR* genes knockout mutants under phosphate and nitrogen limitations as well as at acidic condition. *Microbial Cell Factories*. **10**:39.
- McCleary, W. R. und Stock, J. B. (1994). Acetyl phosphate and the activation of two-component response regulators. *Journal of Biological Chemistry*. **269**:31567–31572.
- McCleary, W. R., Stock, J. B. und Ninfa, A. J. (1993). Is acetyl phosphate a global signal in *Escherichia coli*? *Journal of Bacteriology*. **175**:2793–2798.
- McMillan, D. G. G., Marritt, S. J., Butt, J. N. und Jeuken, L. J. C. (2012). Menaquinone-7 Is Specific Cofactor in Tetraheme Quinol Dehydrogenase CymA. *The Journal of Biological Chemistry*. **287**:14215–14225.
- Menon, V. und Rao, M. (2012). Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Progress in Energy and Combustion Science*. **38**:522–550.
- Meyer, T. E., Tsapin, A. I., Vandenbergh, I., De Smet, L., Frishman, D., Nealson, K. H., Cusanovich, M. A. und Van Beeumen, J. J. (2004). Identification of 42 Possible Cytochrome C Genes in the *Shewanella oneidensis* Genome and Characterization of Six Soluble Cytochromes. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*. **8**:57–77.
- Mohd Yusoff, M. Z., Akita, H., Hassan, M. A., Fujimoto, S., Yoshida, M., Nakashima, N. und Hoshino, T. (2017). Production of acetoin from hydrothermally pretreated oil mesocarp fiber using metabolically engineered *Escherichia coli* in a bioreactor system. *Bioresource Technology*. **245**:1040–1048.
- Munson, G. P., Lam, D. L., Outten, F. W. und O’Halloran, T. V. (2000). Identification of a Copper-Responsive Two-Component System on the Chromosome of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*. **182**:5864–5871.
- Mussgnug, J. H., Klassen, V., Schlüter, A. und Kruse, O. (2010). Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *Journal of Biotechnology*. **150**:51–56.
- Myers, C. R. und Nealson, K. H. (1988). Bacterial Manganese Reduction and Growth with Manganese Oxide as the Sole Electron Acceptor. *Science*. **240**:1319–1321.
- Nakashima, N., Akita, H. und Hoshino, T. (2014). 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. *Metabolic Engineering*. **25**:204–214.

- Nakayama, T., Yonekura, S.-I., Yonei, S. und Zhang-Akiyama, Q.-M. (2013). *Escherichia coli* pyruvate:flavodoxin oxidoreductase, YdbK - regulation of expression and biological roles in protection against oxidative stress. *Genes & Genetic Systems*. **88**:175–188.
- Neto, S. E., Melo-Diogo, D., Correia, I. J., Paquete, C. M. und Louro, R. O. (2017). Characterization of OmcA Mutants from *Shewanella oneidensis* MR-1 to Investigate the Molecular Mechanisms Underpinning Electron Transfer Across the Microbe-Electrode Interface. *Fuel Cells*. **17**:601–611.
- Nielsen, D. R., Yoon, S.-H., Yuan, C. J. und Prather, K. L. J. (2010). Metabolic engineering of acetoin and meso-2, 3-butanediol biosynthesis in *E. coli*. *Biotechnology Journal*. **5**:274–284.
- Nishino, K., Nikaido, E. und Yamaguchi, A. (2009). Regulation and physiological function of multidrug efflux pumps in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. **1794**:834–843.
- Nitzschke, A. und Bettenbrock, K. (2018). All three quinone species play distinct roles in ensuring optimal growth under aerobic and fermentative conditions in *E. coli* K12. *PLOS ONE*. **13**:e0194699.
- Oberlin, A. (1984). Carbonization and graphitization. *Carbon*. **22**:521–541.
- Orth, J. D., Conrad, T. M., Na, J., Lerman, J. A., Nam, H., Feist, A. M. und Palsson, B. Ø. (2011). A comprehensive genome-scale reconstruction of *Escherichia coli* metabolism—2011. *Molecular Systems Biology*. **7**:535.
- Ow, D. S.-W., Lee, R. M.-Y., Nissom, P. M., Philp, R., Oh, S. K.-W. und Yap, M. G.-S. (2007). Inactivating FruR global regulator in plasmid-bearing *Escherichia coli* alters metabolic gene expression and improves growth rate. *Journal of Biotechnology*. **131**:261–269.
- Ow, D. S.-W., Nissom, P. M., Philp, R., Oh, S. K.-W. und Yap, M. G.-S. (2006). Global transcriptional analysis of metabolic burden due to plasmid maintenance in *Escherichia coli* DH5 α during batch fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*. **39**:391–398.
- Parekh, S. R., Parekh, R. S. und Wayman, M. (1989). Ethanolic fermentation of wood-derived cellulose hydrolysates by *Zymomonas mobilis* in a continuous dynamic immobilised biocatalyst bioreactor. *Process Biochem*. **24**:88.
- Parekh, S. R., Yu, S. und Wayman, M. (1986). Adaptation of *Candida shehatae* and *Pichia stipitis* to wood hydrolysates for increased ethanol production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **25**:300–304.
- Park, I. H., Heo, Y. H., Kim, P. und Nahm, K. S. (2013). Direct electron transfer in *E. coli* catalyzed MFC with a magnetite/MWCNT modified anode. *RSC Advances*. **3**:16665–16671.
- Park, J. H., Lee, K. H., Kim, T. Y. und Lee, S. Y. (2007). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of l-valine based on transcriptome analysis and in silico gene knockout simulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **104**:7797–7802.
- Patel, G. B., MacKenzie, C. R. und Agnew, B. J. (1986). Fermentation of xylose and hemicellulose hydrolysates by an ethanol-adapted culture of *Bacteroides polypragmatus*. *Archives of Microbiology*. **146**:68–73.
- Perrenoud, A. und Sauer, U. (2005). Impact of Global Transcriptional Regulation by ArcA, ArcB, Cra, Crp, Cya, Fnr, and Mlc on Glucose Catabolism in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. **187**:3171–3179.

-
- Pfizer, C., Dahmen, N., Tröger, N., Weirich, F., Sauer, J., Günther, A. und Müller-Hagedorn, M. (2016). Fast Pyrolysis of Wheat Straw in the Bioliq Pilot Plant. *Energy & Fuels*. **30**:8047–8054.
- Pinchuk, G. E., Rodionov, D. A., Yang, C., Li, X., Osterman, A. L., Dervyn, E., Geydebekht, O. V., Reed, S. B., Romine, M. F., Collart, F. R., Scott, J. H., Fredrickson, J. K. und Beliaev, A. S. (2009). Genomic reconstruction of *Shewanella oneidensis* MR-1 metabolism reveals a previously uncharacterized machinery for lactate utilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **106**:2874–2879.
- Potter, M. C. (1911). Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds. *Proc. R. Soc. Lond. B*. **84**:260–276.
- Prognos AG (2017). *Die deutsche chemische Industrie 2030 - Update 2015/2016*. Verband der chemischen Industrie eV (VCI), Frankfurt.
- Rabaey, K., Bützer, S., Brown, S., Keller, J. und Rozendal, R. A. (2010). High Current Generation Coupled to Caustic Production Using a Lamellar Bioelectrochemical System. *Environmental Science & Technology*. **44**:4315–4321.
- Rahman, M., Hasan, M. R., Oba, T. und Shimizu, K. (2006). Effect of rpoS gene knockout on the metabolism of *Escherichia coli* during exponential growth phase and early stationary phase based on gene expressions, enzyme activities and intracellular metabolite concentrations. *Biotechnology and Bioengineering*. **94**:585–595.
- Ralt, D., Wishnok, J. S., Fitts, R. und Tannenbaum, S. R. (1988). Bacterial catalysis of nitrosation: involvement of the nar operon of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. **170**:359–364.
- Reguera, G., McCarthy, K. D., Mehta, T., Nicoll, J. S., Tuominen, M. T. und Lovley, D. R. (2005). Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature*. **435**:1098–1101.
- Richter, K., Schicklberger, M. und Gescher, J. (2012). Dissimilatory Reduction of Extracellular Electron Acceptors in Anaerobic Respiration. *Applied and Environmental Microbiology*. **78**:913–921.
- Roller, S. D., Bennetto, H. P., Delaney, G. M., Mason, J. R., Stirling, J. L. und Thurston, C. F. (1984). Electron-transfer coupling in microbial fuel cells: 1. comparison of redox-mediator reduction rates and respiratory rates of bacteria. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. **34**:3–12.
- Ross, D. E., Flynn, J. M., Baron, D. B., Gralnick, J. A., Bond, D. R. und Xu, S. Y. (2011). Towards Electrosynthesis in *Shewanella*: Energetics of Reversing the Mtr Pathway for Reductive Metabolism. *PLoS ONE*. **6**:e16649.
- Saier, M. H. und Ramseier, T. M. (1996). The catabolite repressor/activator (Cra) protein of enteric bacteria. *Journal of Bacteriology*. **178**:3411–3417.
- Salmon, K., Hung, S.-P., Mekjian, K., Baldi, P., Hatfield, G. W. und Gunsalus, R. P. (2003). Global Gene Expression Profiling in *Escherichia coli* K12 THE EFFECTS OF OXYGEN AVAILABILITY AND FNR. *Journal of Biological Chemistry*. **278**:29837–29855.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (2012). *Molecular cloning: A laboratory manual*. 4. ed. Bd. 1. 3 Bde. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **74**:5463–5467.

- Santoro, C., Arbizzani, C., Erable, B. und Ieropoulos, I. (2017). Microbial fuel cells: From fundamentals to applications. A review. *Journal of Power Sources*. **356**:225–244.
- Sarkar, N., Ghosh, S. K., Bannerjee, S. und Aikat, K. (2012). Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy*. **37**:19–27.
- Sauer, U. und Bailey, J. E. (1999). Estimation of P-to-O ratio in *Bacillus subtilis* and its influence on maximum riboflavin yield. *Biotechnology and Bioengineering*. **64**:750–754.
- Sauer, U. und Eikmanns, B. J. (2005). The PEP—pyruvate—oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria: We dedicate this paper to Rudolf K. Thauer, Director of the Max-Planck-Institute for Terrestrial Microbiology in Marburg, Germany, on the occasion of his 65th birthday. *FEMS Microbiology Reviews*. **29**:765–794.
- Sawers, R. G. und Clark, D. P. (2004). Fermentative Pyruvate and Acetyl-Coenzyme A Metabolism. *EcoSal Plus*. **1**:
- Schaechter, M. (2001). *Escherichia coli* and *Salmonella* 2000: the View From Here. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **65**:119–130.
- Schicklberger, M., Sturm, G. und Gescher, J. (2013). Genomic Plasticity Enables a Secondary Electron Transport Pathway in *Shewanella oneidensis*. *Applied and Environmental Microbiology*. **79**:1150–1159.
- Schievano, A., Pepé Sciarria, T., Vanbroekhoven, K., De Wever, H., Puig, S., Andersen, S. J., Rabaey, K. und Pant, D. (2016). Electro-Fermentation – Merging Electrochemistry with Fermentation in Industrial Applications. *Trends in Biotechnology*. **34**:866–878.
- Schröder, U., Harnisch, F. und Angenent, L. T. (2015). Microbial electrochemistry and technology: terminology and classification. *Energy & Environmental Science*. **8**:513–519.
- Schuetz, B., Schicklberger, M., Kuermann, J., Spormann, A. M. und Gescher, J. (2009). Periplasmic Electron Transfer via the *c*-Type Cytochromes MtrA and FccA of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Applied and Environmental Microbiology*. **75**:7789–7796.
- Scott, M., Gunderson, C. W., Mateescu, E. M., Zhang, Z. und Hwa, T. (2010). Interdependence of Cell Growth and Gene Expression: Origins and Consequences. *Science*. **330**:1099–1102.
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics (Oxford, England)*. **30**:2068–2069.
- Seth, D., Hausladen, A., Wang, Y.-J. und Stamler, J. S. (2012). Endogenous Protein S-Nitrosylation in *E. coli*: Regulation by OxyR. *Science*. **336**:470–473.
- Seth, D., Hess, D. T., Hausladen, A., Wang, L., Wang, Y.-J. und Stamler, J. S. (2018). A Multiplex Enzymatic Machinery for Cellular Protein S-nitrosylation. *Molecular Cell*. **69**:451–464.e6.
- Shafiee, S. und Topal, E. (2009). When will fossil fuel reserves be diminished? *Energy Policy*. **37**:181–189.
- Shehata, T. E. und Marr, A. G. (1971). Effect of Nutrient Concentration on the Growth of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. **107**:210–216.
- Shi, L., Chen, B., Wang, Z., Elias, D. A., Mayer, M. U., Gorby, Y. A., Ni, S., Lower, B. H., Kennedy, D. W., Wunschel, D. S., Mottaz, H. M., Marshall, M. J., Hill, E. A., Beliaev, A. S., Zachara, J. M., Fredrickson, J. K. und Squier, T. C. (2006). Isolation of a High-Affinity Functional Protein Complex between OmcA and MtrC: Two Outer Membrane Decaheme *c*-Type Cytochromes of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Journal of Bacteriology*. **188**:4705–4714.

-
- Shin, J. H., Kim, H. U., Kim, D. I. und Lee, S. Y. (2013). Production of bulk chemicals via novel metabolic pathways in microorganisms. *Biotechnology Advances*. **31**:925–935.
- Siegal-Gaskins, D., Tuza, Z. A., Kim, J., Noireaux, V. und Murray, R. (2014). Gene Circuit Performance Characterization and Resource Usage in a Cell-Free “Breadboard”. *ACS Synthetic Biology*. **3**:416–425.
- Sleutels, T. H. J. A., Hamelers, H. V. M. und Buisman, C. J. N. (2010). Reduction of pH Buffer Requirement in Bioelectrochemical Systems. *Environmental Science & Technology*. **44**:8259–8263.
- Sleutels, T. H. J. A., Ter Heijne, A., Buisman, C. J. N. und Hamelers, H. V. M. (2012). Bioelectrochemical Systems: An Outlook for Practical Applications. *ChemSusChem*. **5**:1012–1019.
- Song, Y., Li, J., Shin, H.-d., Liu, L., Du, G. und Chen, J. (2016). Biotechnological production of α -keto acids: Current status and perspectives. *Bioresource Technology*. **219**:716–724.
- Sophia, A. C., Bhalambaal, V. M., Lima, E. C. und Thirunavoukkarasu, M. (2016). Microbial desalination cell technology: Contribution to sustainable waste water treatment process, current status and future applications. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. **4**:3468–3478.
- Sørensen, H. P. und Mortensen, K. K. (2005). Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*. **4**:1.
- Statistisches Bundesamt (2018). *Fachserie 4, Produzierendes Gewerbe. Reihe 3. 1 - 2017, Produktion im produzierenden Gewerbe*. 2040310177004. Wiesbaden, Deutschland: Statistisches Bundesamt, S. 305.
- Steinsiek, S. und Bettenbrock, K. (2012). Glucose Transport in *Escherichia coli* Mutant Strains with Defects in Sugar Transport Systems. *Journal of Bacteriology*. **194**:5897–5908.
- Stephanopoulos, G. (1999). Metabolic Fluxes and Metabolic Engineering. *Metabolic Engineering*. **1**:1–11.
- Sturm-Richter, K., Golitsch, F., Sturm, G., Kipf, E., Dittrich, A., Beblawy, S., Kerzenmacher, S. und Gescher, J. (2015). Unbalanced fermentation of glycerol in *Escherichia coli* via heterologous production of an electron transport chain and electrode interaction in microbial electrochemical cells. *Bioresource Technology*. **186**:89–96.
- Sturm, G., Richter, K., Doetsch, A., Heide, H., Louro, R. O. und Gescher, J. (2015). A dynamic periplasmic electron transfer network enables respiratory flexibility beyond a thermodynamic regulatory regime. *The ISME Journal*. **9**:1802.
- Sugnaux, M., Mermoud, S., Costa, A. F. da, Happe, M. und Fischer, F. (2013). Probing electron transfer with *Escherichia coli*: A method to examine exoelectronics in microbial fuel cell type systems. *Bioresource Technology*. **148**:567–573.
- Sun, J.-A., Zhang, L.-Y., Rao, B., Shen, Y.-L. und Wei, D.-Z. (2012). Enhanced acetoin production by *Serratia marcescens* H32 with expression of a water-forming NADH oxidase. *Bioresource Technology*. **119**:94–98.
- Svetličič, V., Žutić, V., Clavilier, J. und Chevalet, J. (1985). Supramolecular phenomena in organic redox films at electrodes: Part I. The methylene blue/leucomethylene blue redox couple at the platinum electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*. **195**:307–319.

- Tender, L. M., Gray, S. A., Groveman, E., Lowy, D. A., Kauffman, P., Melhado, J., Tyce, R. C., Flynn, D., Petrecca, R. und Dobarro, J. (2008). The first demonstration of a microbial fuel cell as a viable power supply: Powering a meteorological buoy. *Journal of Power Sources*. **179**:571–575.
- TerAvest, M. A. und Angenent, L. T. (2014). Oxidizing Electrode Potentials Decrease Current Production and Coulombic Efficiency through Cytochrome *c* Inactivation in *Shewanella oneidensis* MR-1. *ChemElectroChem*. **1**:2000–2006.
- TerAvest, M. A., Zajdel, T. J. und Ajo-Franklin, C. M. (2014). The Mtr Pathway of *Shewanella oneidensis* MR-1 Couples Substrate Utilization to Current Production in *Escherichia coli*. *ChemElectroChem*. **1**:1874–1879.
- Thauer, R. K., Jungermann, K. und Decker, K. (1977). Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol Rev*. **41**:100–180.
- Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A. und Heinen, E. (1999). Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of Biotechnology*. **75**:291–295.
- Toya, Y., Nakahigashi, K., Tomita, M. und Shimizu, K. (2012). Metabolic regulation analysis of wild-type and *arcA* mutant *Escherichia coli* under nitrate conditions using different levels of omics data. *Molecular BioSystems*. **8**:2593–2604.
- Tran, Q. H. und Uden, G. (1998). Changes in the proton potential and the cellular energetics of *Escherichia coli* during growth by aerobic and anaerobic respiration or by fermentation. *European Journal of Biochemistry*. **251**:538–543.
- Trotter, E. W., Rolfe, M. D., Hounslow, A. M., Craven, C. J., Williamson, M. P., Sanguinetti, G., Poole, R. K. und Green, J. (2011). Reprogramming of *Escherichia coli* K-12 Metabolism during the Initial Phase of Transition from an Anaerobic to a Micro-Aerobic Environment. *PLoS ONE*. **6**:e25501.
- Ui, S., Mimura, A., Okuma, M. und Kudo, T. (1998). The production of D-acetoin by a transgenic *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*. **26**:275–278.
- Uden, G., Becker, S., Bongaerts, J., Schirawski, J. und Six, S. (1994). Oxygen regulated gene expression in facultatively anaerobic bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. **66**:3–22.
- Uden, G. und Bongaerts, J. (1997). Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. **1320**:217–234.
- Venkateswaran, K., Moser, D. P., Dollhopf, M. E., Lies, D. P., Saffarini, D. A., MacGregor, B. J., Ringelberg, D. B., White, D. C., Nishijima, M., Sano, H., Burghardt, J., Stackebrandt, E. und Nealson, K. H. (1999). Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **49**:705–724.
- Verband der Chemischen Industrie (2017). *Rohstoffbasis der chemischen Industrie*. Verband der Chemischen Industrie e.V. (VCI).
- Wainwright, M. und Crossley, K. B. (2002). Methylene Blue - a Therapeutic Dye for All Seasons? *Journal of Chemotherapy*. **14**:431–443.
- Wang, D., Zhou, J., Chen, C., Wei, D., Shi, J., Jiang, B., Liu, P. und Hao, J. (2015). R-acetoin accumulation and dissimilation in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. **42**:1105–1115.

-
- Wang, H. und Ren, Z. J. (2013). A comprehensive review of microbial electrochemical systems as a platform technology. *Biotechnology Advances*. **31**:1796–1807.
- Wang, J., Su, Y., Jia, F. und Jin, H. (2013). Characterization of casein hydrolysates derived from enzymatic hydrolysis. *Chemistry Central Journal*. **7**:62.
- Wanner, B. L. (1992). Is cross regulation by phosphorylation of two-component response regulator proteins important in bacteria? *Journal of Bacteriology*. **174**:2053–2058.
- Wanner, B. L. (1996). Signal transduction in the control of phosphate-regulated genes of *Escherichia coli*. *Kidney International*. **49**:964–967.
- Weaver, D. S., Keseler, I. M., Mackie, A., Paulsen, I. T. und Karp, P. D. (2014). A genome-scale metabolic flux model of *Escherichia coli* K-12 derived from the EcoCyc database. *BMC Systems Biology*. **8**:79.
- Werpy, T. A., Holladay, J. E. und White, J. F. (2004). *Top Value Added Chemicals from Biomass: I. Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas*. PNNL-14808. Pacific Northwest National Laboratory (PNNL), Richland, WA (US).
- West, E. A., Jain, A. und Gralnick, J. A. (2017). Engineering a Native Inducible Expression System in *Shewanella oneidensis* to Control Extracellular Electron Transfer. *ACS Synthetic Biology*. **6**:1627–1634.
- Weusthuis, R. A., Lamot, I., Oost, J. van der und Sanders, J. P. M. (2011). Microbial production of bulk chemicals: development of anaerobic processes. *Trends in Biotechnology*. **29**:153–158.
- Wiberg, N., Wiberg, E. und Holleman, A. F. (2007). *Lehrbuch der anorganischen Chemie*, 102. ed. de Gruyter, Berlin.
- Wissenbach, U., Kröger, A. und Unden, G. (1990). The specific functions of menaquinone and demethylmenaquinone in anaerobic respiration with fumarate, dimethylsulfoxide, trimethylamine N-oxide and nitrate by *Escherichia coli*. *Archives of Microbiology*. **154**:60–66.
- Wolfe, A. J. (2010). Physiologically relevant small phosphodonors link metabolism to signal transduction. *Current Opinion in Microbiology*. **13**:204–209.
- Wolfe, A. J., Chang, D.-E., Walker, J. D., Seitz-Partridge, J. E., Vidaurri, M. D., Lange, C. F., Prüß, B. M., Henk, M. C., Larkin, J. C. und Conway, T. (2003). Evidence that acetyl phosphate functions as a global signal during biofilm development. *Molecular Microbiology*. **48**:977–988.
- Wood, P. M. (1981). The redox potential for dimethyl sulphoxide reduction to dimethyl sulphide. *FEBS Letters*. **124**:11–14.
- Wring, S. A. und Hart, J. P. (1992). Chemically modified, carbon-based electrodes and their application as electrochemical sensors for the analysis of biologically important compounds. A review. *Analyst*. **117**:1215–1229.
- Wu, G., Yan, Q., Jones, J. A., Tang, Y. J., Fong, S. S. und Koffas, M. A. G. (2016). Metabolic Burden: Cornerstones in Synthetic Biology and Metabolic Engineering Applications. *Trends in Biotechnology*. **34**:652–664.
- Xiao, Z. und Lu, J. R. (2014). Strategies for enhancing fermentative production of acetoin: A review. *Biotechnology Advances*. **32**:492–503.
- Xu, Q., Xie, L., Li, Y., Lin, H., Sun, S., Guan, X., Hu, K., Shen, Y. und Zhang, L. (2015). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for efficient production of (3R)-acetoin. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. **90**:93–100.

- Yang, S., Mohagheghi, A., Franden, M. A., Chou, Y.-C., Chen, X., Dowe, N., Himmel, M. E. und Zhang, M. (2016). Metabolic engineering of *Zymomonas mobilis* for 2,3-butanediol production from lignocellulosic biomass sugars. *Biotechnology for Biofuels*. **9**:189.
- Yang, T., Rao, Z., Zhang, X., Xu, M., Xu, Z. und Yang, S.-T. (2017). Metabolic engineering strategies for acetoin and 2,3-butanediol production: advances and prospects. *Critical Reviews in Biotechnology*. 1–16.
- Yang, Y., Xu, M., Guo, J. und Sun, G. (2012). Bacterial extracellular electron transfer in bioelectrochemical systems. *Process Biochemistry*. **47**:1707–1714.
- Ye, J. und Baldwin, R. P. (1988). Catalytic reduction of myoglobin and hemoglobin at chemically modified electrodes containing methylene blue. *Analytical Chemistry*. **60**:2263–2268.
- Zambrano, M. M. und Kolter, R. (1993). *Escherichia coli* mutants lacking NADH dehydrogenase I have a competitive disadvantage in stationary phase. *Journal of Bacteriology*. **175**:5642–5647.
- Zhang, B., Li, X.-L., Fu, J., Li, N., Wang, Z., Tang, Y.-J. und Chen, T. (2016). Production of Acetoin through Simultaneous Utilization of Glucose, Xylose, and Arabinose by Engineered *Bacillus subtilis*. *PLOS ONE*. **11**:e0159298.
- Zhang, X., Tervo, C. J. und Reed, J. L. (2016). Metabolic assessment of *E. coli* as a Biofactory for commercial products. *Metabolic Engineering*. **35**:64–74.
- Zhang, X., Zhang, R., Bao, T., Rao, Z., Yang, T., Xu, M., Xu, Z., Li, H. und Yang, S. (2014). 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*. *Metabolic Engineering*. **23**:34–41.
- Zhu, X., Zhu, Y., Murali, S., Stoller, M. D. und Ruoff, R. S. (2011). Nanostructured Reduced Graphene Oxide/Fe₂O₃ Composite As a High-Performance Anode Material for Lithium Ion Batteries. *ACS Nano*. **5**:3333–3338.
- Zhu, Y., Eiteman, M. A., Altman, R. und Altman, E. (2008). High Glycolytic Flux Improves Pyruvate Production by a Metabolically Engineered *Escherichia coli* Strain. *Applied and Environmental Microbiology*. **74**:6649–6655.

Danksagungen

Lieber Johannes, erst durch deine motivierende und offene Art habe ich einen Zugang zu Biologie gefunden hinter dem ich heute mit fester Überzeugung stehe. Vielen Dank, für alles was ich von dir lernen durfte, für dein großes Vertrauen, deine Ideen und dein Engagement. Danke auch dafür, dass es dir nie egal war, was außerhalb des Labors passiert. Ich hoffe, dass wir auch in Zukunft eine Möglichkeit finden zusammen zu arbeiten.

Liebste Annika, deine kompromisslose Unterstützung und dein hundertfacher Einsatz mir den Rücken frei zuhalten haben vieles erst möglich gemacht. Vielen Dank dafür, dass du mich immer wieder angeschoben hast und jedes mal Verständnis für mich hattest, wenn es mal wieder länger ging als gedacht. Ich freue mich über jedes Maß, dass es dich gibt und ich mein Leben mit dir teilen kann.

Liebe Kadda, lieber Fredi, dank eurer Fürsprache und eurer Unterstützung konnte ich in der Wissenschaft und in dieser Arbeitsgruppe Fuß fassen. Dafür und für die entstandene Freundschaft möchte ich euch danken.

Ein großes Dankeschön gehört der ganzen AG Gescher, für die gegenseitige Hilfe und ein Umfeld in dem viele Kollegen zu Freunden wurden. Liebe Thea, nie hätte ich mir eine freundlichere, zuverlässigere und organisiertere Projektpartnerin vorstellen können. Ich freue mich, dass hieraus eine so schöne Freundschaft entstanden ist. Ein Glück dich als Dolmetscherin im Schwabenland zu haben. Liebe Laura, als letzte Instanz beim roten Roulette und als Spanngurt bei den größten Durchhängen bist du unersetzlich geworden. Danke für deine Akribie und deinen Einsatz bei der Korrektur und bei der Abgabe. Am meisten Danke ich dir jedoch für deine Freundschaft, die außer an Sonntagabenden keine Einschränkungen hat. Bis zur Revolution wünsche ich dir, mit den Worten meines absoluten Lieblingsfilms, dass du einfach kein Pech hast. Vielen Dank Nicola, für deine große Hilfe bei allerlei Kleinkram und der Verteidigung meines Schreibtisches. Die Stifte darfst du behalten. Lieber Tobi, danke für deine Freude an gemeinsamen Experimenten mit wirklich teurem Zucker. Danke Jonas, dass du immer so klaglos meine Beschwerden über allerlei Computerprobleme entgegen genommen hast, für deine Hilfe mit Pymol und Latex und für die Versorgung unseres Büro mit Schokolade. Danke Lucas, für Kaffee und Geschichten und den besten Honig. Danke Vicky, für Auslandspolitik und Sport und Oberarme wie Fässer. Dein Fahrrad und ich würden uns freuen, wenn wir mal wieder treffen. Danke Susi für die freiwillige Bereitstellung von färbbaren Caniden.

Auch gilt all meinen Bachelor- und Masterstudenten ein Dank für ihren Beitrag zu dieser Arbeit. Ein besonderes Dankeschön gilt Maxi. Als mein bester *commis* danke ich dir für dein großes Interesse, deine Bereitschaft immer dann einzuspringen wenn du gebraucht wirst und für den Musik-Tip der Woche. Ich wünsche dir auf deinem Weg zum *chef de cuisine* nur das Beste und wenig Hirsche.

Lieber Dieter, lieber Thorsten, danke für eure Geduld und eure Mühe mit einem ungelerten Mechaniker. Dank euch und euren Männern werden die unvollständigsten Pläne Realität.

Ein ganz besonderes Dankeschön gilt all meinen Kooperationspartnern. Im Fachbereich für Umweltverfahrenstechnik an der Universität Bremen: Lieber Sven, Lieber Johannes, vielen Dank für gute Ideen, deren Umsetzung und neue Blickwinkel. Im Fachbereich für Systembiotechnologie an der TU München: Danke an Andreas Kremling, Katharina Pflüger-Grau und Miguel Valderrama Gómez. Im Engler-Bunte-Institut am KIT: Danke Max und Rafael für Notfall-Massenspektroskopie.

In einem abgeschlossenen System nimmt die Entropie durch eine weiter gefasste Definition ordentlicher Zustände ab. Lieber Philipp, danke, dass es dich interessiert. Danke auch für den besten Literatur-Podcast mit dem kleinsten Hörerkreis und deine Freundschaft.

Danke an meine Familie und die erweiterte Familie für viel Verständnis und moralische Unterstützung. Danke für viele kleine und große Gesten und euer Interesse.

A. Anhang

A.1. Tabellen

Tabelle A.1.: Parameter für die Analyse der Genomresequenzierung.

Parameter	Value
Trim Reads	
Quality trim	true
Quality limit	0,05
Ambiguous trim	true
Ambiguous limit	2
Automatic read-through adapter trimming	true
Use colorspace	false
Remove 5' terminal nucleotides	false
Number of 5' terminal nucleotides	1
Remove 3' terminal nucleotides	false
Number of 3' terminal nucleotides	1
Discard short reads	false
Minimum number of nucleotides in reads	15
Discard long reads	false
Maximum number of nucleotides in reads	1000
Map Reads to Reference	
Masking mode	No masking
Match score	1
Mismatch cost	2
Cost of insertions and deletions	Linear gap cost
Insertion cost	3
Deletion cost	3
Insertion open cost	6
Insertion extend cost	1
Deletion open cost	6
Deletion extend cost	1

Tabelle A.1.: Parameter für die Analyse der Genomresequenzierung.

Parameter	Value
Length fraction	0,8
Similarity fraction	0,8
Global alignment	false
Color space alignment	true
Color error cost	3
Auto-detect paired distances	true
Non-specific match handling	Map randomly
Extract Consensus Sequence	
Threshold	0
Action	Fill from Reference
Post-remove action	Split into separate sequences
Conflict resolution strategy	Vote
Noise threshold	0,1
Minimum nucleotide count	1
Use quality score	false
Add consensus annotations (conflicts, indels, low coverage etc.)	false
Keep annotations already on consensus	true
Transfer annotations from reference	false
Fixed Ploidy Variant Detection	
Ploidy	2
Required variant probability (%)	90
Ignore positions with coverage above	100000
Minimum coverage	10
Minimum count	2
Minimum frequency (%)	20
Ignore broken pairs	false
Ignore non-specific matches	Reads
Minimum read length	20
Base quality filter	false
Neighborhood radius	5
Minimum central quality	20
Minimum neighborhood quality	15

Tabelle A.1.: Parameter für die Analyse der Genomresequenzierung.

Parameter	Value
Read direction filter	false
Direction frequency (%)	5
Relative read direction filter	true
Significance (%)	1
Read position filter	false
Significance (%)	1
Remove pyro-error variants	false
In homopolymer regions with minimum length	3
With frequency below	0,8

Tabelle A.2.: Parameter für die Analyse der RNA-Sequenzierung.

Parameter	Value
Trim Reads	
Quality trim	true
Quality limit	0,05
Ambiguous trim	true
Ambiguous limit	2
Automatic read-through adapter trimming	true
Use colorspace	false
Remove 5' terminal nucleotides	false
Number of 5' terminal nucleotides	1
Remove 3' terminal nucleotides	false
Number of 3' terminal nucleotides	1
Discard short reads	false
Minimum number of nucleotides in reads	15
Discard long reads	false
Maximum number of nucleotides in reads	1000
RNA-Seq Analysis	
Reference type	Genome annotated with genes only
Enable handling of spike-in controls	Do not use spike-in controls

Tabelle A.2.: Parameter für die Analyse der RNA-Sequenzierung.

Parameter	Value
Mismatch cost	2
Insertion cost	3
Deletion cost	3
Length fraction	0,8
Similarity fraction	0,8
Global alignment	false
Color space alignment	true
Color error cost	3
Auto-detect paired distances	true
Strand specific	Both
Maximum number of hits for a read	10
Count paired reads as two	false
Expression value	TPM
Calculate expression for genes without transcripts	false
Minimum read count fusion gene table	5

GO annotation

Workflow Input	gene_association_ecoli
----------------	------------------------

Differential Expression for RNA-Seq

Test differential expression due to	Experimental Condition
While controlling for	batch, seq
Comparisons	All group pairs

Create Heat Map for RNA-Seq

Measure	Euclidean distance
Linkage criteria	Complete linkage
Filter settings	Fixed number of features
Fixed number of features	25
Minimum counts in at least one sample	10
Statistical comparison	
Minimum absolute fold change	1,5
Correction	FDR p-value

Tabelle A.2.: Parameter für die Analyse der RNA-Sequenzierung.

Parameter	Value
Threshold	0,05

Tabelle A.3.: Liste abweichend differentiell regulierter Gene zwischen aerobem und anaerobem Stoffwechsel von JG991 und JG1054

Reg. in JG991, nicht in JG1054 (NO ₃ ⁻ v. O ₂)			Reg. in JG1054, nicht in JG991 (NO ₃ ⁻ v. O ₂)		
Name	Log ₂ fc	FDR p-value	Name	Log ₂ fc	FDR p-value
<i>yjjQ</i>	-9,03	1,3E-03	<i>fruB</i>	-4,48	0,0E+00
<i>psuK</i>	-7,32	1,0E-02	<i>aldA</i>	-3,53	1,1E-13
<i>ycjM</i>	-5,88	0,0E+00	<i>astD</i>	-3,44	0,0E+00
<i>puuC</i>	-5,78	0,0E+00	<i>livJ</i>	-3,31	0,0E+00
<i>puuB</i>	-5,58	0,0E+00	<i>ELGAJEGK_03234</i>	-3,17	4,7E-04
<i>entC</i>	-5,38	0,0E+00	<i>astB</i>	-3,03	0,0E+00
<i>pgaC</i>	-5,32	0,0E+00	<i>nrfB</i>	-2,93	4,1E-02
<i>fimH</i>	-5,30	0,0E+00	<i>mtlK</i>	-2,78	0,0E+00
<i>chuR</i>	-5,22	3,4E-15	<i>tetA</i>	-2,76	8,1E-08
<i>xylG</i>	-5,06	0,0E+00	<i>fecA</i>	-2,68	0,0E+00
<i>yihN</i>	-4,78	0,0E+00	<i>trpGD</i>	-2,65	1,1E-06
<i>proP</i>	-4,70	0,0E+00	<i>intQ</i>	-2,62	0,0E+00
<i>srlR</i>	-4,69	3,9E-12	<i>ELGAJEGK_03098</i>	-2,58	5,1E-04
<i>galD</i>	-4,62	2,2E-14	<i>ELGAJEGK_01267</i>	-2,52	2,8E-09
<i>fepE</i>	-4,43	2,7E-13	<i>yjch</i>	-2,49	4,7E-09
<i>ybhI</i>	-4,36	0,0E+00	<i>ELGAJEGK_03069</i>	-2,48	4,1E-03
<i>ydiF</i>	-4,32	5,8E-12	<i>torC</i>	-2,40	3,6E-02
<i>bioF</i>	-4,30	0,0E+00	<i>asr</i>	-2,37	7,5E-12
<i>pgaD</i>	-4,23	0,0E+00	<i>ELGAJEGK_01268</i>	-2,35	5,8E-06
<i>uidC</i>	-4,21	0,0E+00	<i>fecC</i>	-2,34	0,0E+00
<i>bioC</i>	-4,19	0,0E+00	<i>trpC</i>	-2,31	3,9E-05
<i>bcsQ</i>	-4,14	0,0E+00	<i>fiu</i>	-2,30	3,1E-08
<i>ygiS</i>	-4,10	0,0E+00	<i>actP</i>	-2,29	3,0E-14
<i>pspC</i>	-4,10	0,0E+00	<i>fadI</i>	-2,28	1,3E-06
<i>pspD</i>	-4,08	0,0E+00	<i>gatB</i>	-2,27	1,1E-04
<i>higA</i>	-4,07	0,0E+00	<i>lacC</i>	-2,27	0,0E+00
<i>fes</i>	-4,06	0,0E+00	<i>sdhD</i>	-2,27	5,6E-06
<i>ydiM</i>	-4,01	1,1E-10	<i>fadD</i>	-2,26	1,0E-11
<i>puuE</i>	-4,00	0,0E+00	<i>lldD</i>	-2,21	0,0E+00
<i>bdm</i>	-4,00	1,8E-06	<i>sufC</i>	-2,17	1,2E-06

Tabelle A.3.: Liste abweichend differentiell regulierter Gene zwischen aerobem und anaerobem Stoffwechsel von JG991 und JG1054

Reg. in JG991, nicht in JG1054 (NO ₃ ⁻ v. O ₂)			Reg. in JG1054, nicht in JG991 (NO ₃ ⁻ v. O ₂)		
Name	Log ₂ fc	FDR p-value	Name	Log ₂ fc	FDR p-value
<i>puuA</i>	-3,96	0,0E+00	<i>sufE</i>	-2,16	1,2E-07
<i>fimD</i>	-3,95	0,0E+00	<i>yeiL</i>	-2,16	2,9E-06
<i>mglC</i>	-3,95	0,0E+00	<i>gatA</i>	-2,16	2,8E-06
<i>betC</i>	-3,95	0,0E+00	<i>hcaR_3</i>	-2,13	0,0E+00
<i>bioB</i>	-3,86	0,0E+00	<i>ELGAJEGK_03233</i>	-2,11	0,0E+00
<i>yfcV</i>	-3,86	3,4E-15	<i>sdhC</i>	-2,09	3,2E-05
<i>fimF</i>	-3,83	8,5E-13	<i>sufS</i>	-2,08	2,7E-07
<i>uhpT</i>	-3,82	0,0E+00	<i>fhuD</i>	-2,07	5,2E-07
<i>pgaB</i>	-3,79	0,0E+00	<i>fruA</i>	-2,02	0,0E+00
<i>ELGAJEGK_00044</i>	-6,02	3,8E-02	<i>kdpA</i>	-2,01	2,0E-06
<i>ELGAJEGK_00259</i>	-2,37	1,2E-04	<i>fumC</i>	-2,01	5,8E-06
<i>ELGAJEGK_00263</i>	-2,22	3,1E-05	<i>kdgT</i>	-2,01	5,8E-10
<i>ELGAJEGK_00266</i>	-2,56	8,1E-15	<i>sdhB</i>	-2,00	1,2E-08
<i>ELGAJEGK_00320</i>	-3,10	0,0E+00	<i>hyaB</i>	2,02	4,4E-07
<i>ELGAJEGK_00322</i>	-3,60	0,0E+00	<i>pliG</i>	2,06	4,8E-03
<i>ELGAJEGK_00411</i>	-2,71	8,0E-12	<i>hyaA</i>	2,06	7,1E-07
<i>ELGAJEGK_00447</i>	-2,32	9,2E-11	<i>ELGAJEGK_04239</i>	2,07	4,5E-05
<i>ELGAJEGK_00639</i>	-3,60	4,6E-10	<i>ELGAJEGK_00714</i>	2,07	1,5E-06
<i>ELGAJEGK_00825</i>	2,01	7,9E-06	<i>ELGAJEGK_03021</i>	2,08	5,2E-14
<i>ELGAJEGK_00975</i>	-4,09	7,6E-08	<i>evgS</i>	2,08	1,2E-07
<i>ELGAJEGK_01034</i>	-2,74	1,2E-12	<i>sbmC</i>	2,11	0,0E+00
<i>ELGAJEGK_01039</i>	-3,27	6,1E-07	<i>ELGAJEGK_04224</i>	2,16	1,3E-12
<i>ELGAJEGK_01190</i>	-2,19	1,5E-05	<i>fdnH</i>	2,16	1,9E-09
<i>ELGAJEGK_01259</i>	2,53	1,9E-11	<i>hybB</i>	2,18	6,0E-11
<i>ELGAJEGK_01261</i>	-2,34	7,4E-09	<i>dctR</i>	2,19	1,7E-08
<i>ELGAJEGK_01290</i>	-4,23	2,8E-13	<i>hyaE</i>	2,30	1,5E-04
<i>ELGAJEGK_01504</i>	5,91	0,0E+00	<i>mdtE</i>	2,41	1,8E-07
<i>ELGAJEGK_01763</i>	2,59	5,9E-08	<i>putA</i>	2,53	0,0E+00
<i>ELGAJEGK_01764</i>	3,49	2,5E-09	<i>gadW</i>	2,72	3,1E-09
<i>ELGAJEGK_01778</i>	-2,17	3,2E-14	<i>glgS</i>	2,72	3,9E-08
<i>ELGAJEGK_01791</i>	-2,77	3,5E-10	<i>aceE</i>	2,74	2,8E-10
<i>ELGAJEGK_01892</i>	-2,24	0,0E+00	<i>gadX</i>	2,81	4,1E-08
<i>ELGAJEGK_01955</i>	-10,24	2,4E-04	<i>alaE</i>	2,99	0,0E+00
<i>ELGAJEGK_02384</i>	-3,64	0,0E+00	<i>cbpM</i>	3,11	1,2E-14
<i>ELGAJEGK_02387</i>	-2,63	0,0E+00	<i>slp</i>	3,12	1,8E-07
<i>ELGAJEGK_02462</i>	-3,29	0,0E+00	<i>cbpA</i>	3,13	0,0E+00
<i>ELGAJEGK_02463</i>	-4,01	0,0E+00	<i>hmp</i>	3,26	5,2E-13

Tabelle A.3.: Liste abweichend differentiell regulierter Gene zwischen aerobem und anaerobem Stoffwechsel von JG991 und JG1054

Reg. in JG991, nicht in JG1054 (NO ₃ ⁻ v. O ₂)			Reg. in JG1054, nicht in JG991 (NO ₃ ⁻ v. O ₂)		
Name	Log ₂ fc	FDR p-value	Name	Log ₂ fc	FDR p-value
<i>ELGAJEGK_02466</i>	-2,26	4,7E-09	<i>gadX</i>	3,28	0,0E+00
<i>ELGAJEGK_02879</i>	5,98	0,0E+00	<i>ytjE</i>	4,59	6,9E-13
<i>ELGAJEGK_02918</i>	6,03	0,0E+00	<i>hcr</i>	5,15	0,0E+00
<i>ELGAJEGK_03056</i>	2,09	0,0E+00	<i>gadC</i>	5,30	0,0E+00
<i>ELGAJEGK_03102</i>	-2,80	4,3E-10	<i>gadB</i>	5,63	0,0E+00
<i>ELGAJEGK_03105</i>	2,15	1,4E-09	<i>hcp</i>	6,21	0,0E+00
<i>ELGAJEGK_03228</i>	-3,72	0,0E+00	<i>yeaR</i>	6,45	0,0E+00
<i>ELGAJEGK_03293</i>	-4,82	0,0E+00	<i>yoaG</i>	6,75	0,0E+00
<i>ELGAJEGK_03544</i>	-2,84	3,4E-04			
<i>ELGAJEGK_03605</i>	-2,23	4,4E-09			
<i>ELGAJEGK_03781</i>	-3,16	0,0E+00			
<i>ELGAJEGK_03787</i>	-2,25	4,6E-10			
<i>ELGAJEGK_03810</i>	-2,18	7,9E-07			
<i>ELGAJEGK_03916</i>	-2,53	5,0E-14			
<i>ELGAJEGK_03928</i>	-5,41	1,2E-04			
<i>ELGAJEGK_04069</i>	2,25	1,2E-05			
<i>ELGAJEGK_04267</i>	-4,04	0,0E+00			
<i>pspB</i>	-3,75	0,0E+00			
<i>tdcB</i>	-3,74	2,3E-07			
<i>higB</i>	-3,74	0,0E+00			
<i>bioD1</i>	-3,73	0,0E+00			
<i>proW</i>	-3,71	0,0E+00			
<i>gntK</i>	-3,66	1,2E-11			
<i>trkG</i>	-3,62	0,0E+00			
<i>proV</i>	-3,61	0,0E+00			
<i>frmA</i>	-3,58	0,0E+00			
<i>spaR</i>	-3,57	0,0E+00			
<i>yadK</i>	-3,53	2,5E-14			
<i>torY</i>	-3,53	0,0E+00			
<i>tfaE</i>	-3,47	6,8E-08			
<i>ybgD</i>	-3,40	0,0E+00			
<i>tdcD</i>	-3,40	5,9E-07			
<i>ydiE</i>	-3,39	0,0E+00			
<i>mgo</i>	-3,37	0,0E+00			
<i>entS</i>	-3,35	0,0E+00			
<i>cnu</i>	-3,35	0,0E+00			
<i>rhtA</i>	-3,34	0,0E+00			

Tabelle A.3.: Liste abweichend differentiell regulierter Gene zwischen aerobem und anaerobem Stoffwechsel von JG991 und JG1054

Reg. in JG991, nicht in JG1054 (NO ₃ ⁻ v. O ₂)			Reg. in JG1054, nicht in JG991 (NO ₃ ⁻ v. O ₂)		
Name	Log ₂ fc	FDR p-value	Name	Log ₂ fc	FDR p-value
<i>sfmC</i>	-3,33	1,8E-13			
<i>bglH</i>	-3,30	1,6E-14			
<i>thiQ</i>	-3,29	4,9E-15			
<i>puuP</i>	-3,28	0,0E+00			
<i>cysW</i>	-3,26	0,0E+00			
<i>yncE</i>	-3,24	0,0E+00			
<i>sfmD</i>	-3,24	0,0E+00			
<i>argD</i>	-3,24	0,0E+00			
<i>torZ</i>	-3,23	0,0E+00			
<i>marA</i>	-3,23	0,0E+00			
<i>potA</i>	-3,22	1,3E-12			
<i>pspE</i>	-3,22	0,0E+00			
<i>cdaR</i>	-3,16	0,0E+00			
<i>papC_3</i>	-3,12	0,0E+00			
<i>sicA</i>	-3,12	4,5E-02			
<i>mglA</i>	-3,12	0,0E+00			
<i>nanC</i>	-3,11	9,6E-11			
<i>yihP</i>	-3,10	0,0E+00			
<i>epsC</i>	-3,07	9,7E-14			
<i>oxc</i>	-3,06	7,0E-14			
<i>puuR</i>	-3,03	0,0E+00			
<i>fadE</i>	-3,02	0,0E+00			
<i>fepB</i>	-3,02	0,0E+00			
<i>caiA</i>	-3,02	1,1E-08			
<i>ycaM</i>	-3,01	0,0E+00			
<i>fepC</i>	-3,01	0,0E+00			
<i>pphB</i>	-3,00	5,6E-10			
<i>argG</i>	-2,95	0,0E+00			
<i>mdtJ</i>	-2,89	9,3E-10			
<i>kdgR_3</i>	-2,87	4,3E-07			
<i>rihB</i>	-2,86	5,1E-10			
<i>limB</i>	-2,84	1,7E-15			
<i>ais</i>	-2,79	6,2E-10			
<i>ydjE</i>	-2,79	9,6E-15			
<i>cdhR</i>	-2,76	1,2E-08			
<i>bglJ</i>	-2,76	0,0E+00			
<i>oppB</i>	-2,75	0,0E+00			

Tabelle A.3.: Liste abweichend differentiell regulierter Gene zwischen aerobem und anaerobem Stoffwechsel von JG991 und JG1054

Reg. in JG991, nicht in JG1054 (NO ₃ ⁻ v. O ₂)			Reg. in JG1054, nicht in JG991 (NO ₃ ⁻ v. O ₂)		
Name	Log ₂ fc	FDR p-value	Name	Log ₂ fc	FDR p-value
<i>fepG</i>	-2,72	0,0E+00			
<i>yehL</i>	-2,70	6,6E-11			
<i>aer</i>	-2,70	0,0E+00			
<i>yhjJ</i>	-2,69	0,0E+00			
<i>ompL</i>	-2,68	2,3E-06			
<i>mntH</i>	-2,68	0,0E+00			
<i>tyrP</i>	-2,66	0,0E+00			
<i>yigG</i>	-2,63	1,5E-04			
<i>spuE</i>	-2,63	0,0E+00			
<i>uxaB</i>	-2,63	0,0E+00			
<i>aqpZ</i>	-2,63	1,2E-11			
<i>ybiU</i>	-2,63	0,0E+00			
<i>fadH</i>	-2,61	0,0E+00			
<i>frc</i>	-2,59	3,5E-10			
<i>glcC</i>	-2,59	3,7E-10			
<i>allD</i>	-2,58	1,2E-08			
<i>pspG</i>	-2,56	0,0E+00			
<i>bcsA</i>	-2,54	0,0E+00			
<i>icsA</i>	-2,53	0,0E+00			
<i>emrY</i>	-2,51	2,2E-10			
<i>oppA</i>	-2,51	1,8E-13			
<i>xylF</i>	-2,51	4,9E-09			
<i>lacA</i>	-2,50	8,0E-07			
<i>sdiA</i>	-2,50	0,0E+00			
<i>yejG</i>	-2,48	9,5E-05			
<i>proX</i>	-2,47	0,0E+00			
<i>ydfO</i>	-2,46	7,1E-09			
<i>epsJ</i>	-2,43	6,5E-15			
<i>yadC</i>	-2,43	7,2E-12			
<i>tmk</i>	-2,40	9,1E-05			
<i>catM</i>	-2,40	2,6E-05			
<i>nrdE</i>	-2,39	1,4E-08			
<i>mglB</i>	-2,38	2,4E-12			
<i>yejE</i>	-2,35	1,7E-15			
<i>fecI</i>	-2,35	7,9E-14			
<i>noc</i>	-2,34	8,5E-06			
<i>rsxA</i>	-2,33	0,0E+00			

Tabelle A.3.: Liste abweichend differentiell regulierter Gene zwischen aerobem und anaerobem Stoffwechsel von JG991 und JG1054

Reg. in JG991, nicht in JG1054 (NO ₃ ⁻ v. O ₂)			Reg. in JG1054, nicht in JG991 (NO ₃ ⁻ v. O ₂)		
Name	Log ₂ fc	FDR p-value	Name	Log ₂ fc	FDR p-value
<i>yccM</i>	-2,33	4,9E-15			
<i>pspA</i>	-2,28	7,9E-12			
<i>yiaA</i>	-2,27	1,5E-06			
<i>aaeA</i>	-2,26	1,5E-12			
<i>chbC</i>	-2,24	1,5E-10			
<i>glcA</i>	-2,23	5,1E-10			
<i>efeU</i>	-2,23	3,7E-08			
<i>hin</i>	-2,21	5,0E-05			
<i>yhhQ</i>	-2,21	0,0E+00			
<i>gabP</i>	-2,21	2,0E-10			
<i>flhD</i>	-2,21	3,0E-05			
<i>gltA</i>	-2,18	1,2E-10			
<i>ydjG</i>	-2,13	1,3E-07			
<i>hisQ</i>	-2,10	4,8E-11			
<i>purR</i>	-2,10	1,1E-12			
<i>kgtP</i>	-2,08	8,0E-05			
<i>recN</i>	-2,08	1,2E-10			
<i>gfcB</i>	-2,07	1,7E-10			
<i>mhpA</i>	-2,07	3,6E-07			
<i>sufB</i>	-2,06	1,5E-11			
<i>adhP</i>	-2,03	1,5E-08			
<i>bcsB</i>	-2,03	4,7E-11			
<i>tauA</i>	-2,03	1,5E-05			
<i>agaC</i>	-2,03	6,7E-04			
<i>hybO</i>	2,00	1,3E-11			
<i>ahpC</i>	2,00	3,3E-14			
<i>glmU</i>	2,02	6,4E-08			
<i>pykA</i>	2,07	5,2E-08			
<i>glpA</i>	2,10	3,9E-07			
<i>secG</i>	2,14	4,4E-08			
<i>elaB</i>	2,15	2,1E-07			
<i>ygiW</i>	2,16	1,0E-08			
<i>lpp</i>	2,19	1,5E-07			
<i>hemN</i>	2,22	8,1E-15			
<i>menD</i>	2,22	0,0E+00			
<i>tabA</i>	2,25	1,2E-07			
<i>menF</i>	2,29	0,0E+00			

Tabelle A.3.: Liste abweichend differentiell regulierter Gene zwischen aerobem und anaerobem Stoffwechsel von JG991 und JG1054

Reg. in JG991, nicht in JG1054 (NO ₃ ⁻ v. O ₂)			Reg. in JG1054, nicht in JG991 (NO ₃ ⁻ v. O ₂)		
Name	Log ₂ fc	FDR p-value	Name	Log ₂ fc	FDR p-value
<i>ibpB</i>	2,29	0,0E+00			
<i>hslV</i>	2,31	0,0E+00			
<i>menH</i>	2,31	1,5E-12			
<i>ynfD</i>	2,32	6,0E-12			
<i>moeB</i>	2,39	0,0E+00			
<i>fdhF</i>	2,47	3,7E-10			
<i>ahpF</i>	2,49	1,5E-10			
<i>bhsA</i>	2,51	4,1E-10			
<i>tatA</i>	2,52	1,2E-12			
<i>glpB</i>	2,59	7,1E-14			
<i>glpC</i>	2,61	0,0E+00			
<i>moeA</i>	2,77	0,0E+00			
<i>torD</i>	2,79	0,0E+00			
<i>copA</i>	3,08	0,0E+00			
<i>nuoE</i>	3,12	0,0E+00			
<i>mcbA</i>	3,62	0,0E+00			
<i>zraP</i>	3,72	4,9E-15			
<i>spy</i>	3,74	0,0E+00			
<i>torC</i>	3,82	0,0E+00			
<i>cusS</i>	3,90	0,0E+00			
<i>cusA</i>	4,02	0,0E+00			
<i>dps</i>	4,78	0,0E+00			
<i>cusB</i>	5,53	0,0E+00			
<i>cusC</i>	5,63	0,0E+00			

Tabelle A.4.: Liste differentiell regulierter Gene zwischen JG997 und JG1354 mit NO₃⁻ als Elektronenakzeptor und 50 µmol l⁻¹ IPTG.

JG997 v. JG1354		
Name	Log fc	FDR p-value
<i>pta</i>	-13,86	2,4E-04
<i>narL_3</i>	-10,09	1,1E-02
<i>lpfA</i>	-9,39	0,0E+00
<i>ELGAJEGK_03025</i>	-9,38	1,9E-02
<i>fimA</i>	-8,51	0,0E+00

Tabelle A.4.: Liste differentiell regulierter Gene zwischen JG997 und JG1354 mit NO_3^- als Elektronenakzeptor und $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ IPTG.

JG997 v. JG1354		
Name	Log fc	FDR p-value
<i>fimC</i>	-8,48	0,0E+00
<i>lacI_1</i>	-7,73	0,0E+00
<i>fimD_2</i>	-7,14	0,0E+00
<i>zinT</i>	-7,05	0,0E+00
<i>ELGAJEGK_00913</i>	-6,87	6,8E-10
<i>yneM</i>	-6,62	1,4E-05
<i>ELGAJEGK_01955</i>	-6,48	5,5E-11
<i>fimF_2</i>	-6,10	0,0E+00
<i>cscB_2</i>	-6,01	1,0E-04
<i>ELGAJEGK_02344</i>	-5,46	0,0E+00
<i>fecA_2</i>	-5,46	0,0E+00
<i>sodA</i>	-5,34	0,0E+00
<i>ELGAJEGK_03604</i>	-5,33	5,8E-07
<i>ELGAJEGK_03131</i>	-5,32	0,0E+00
<i>ELGAJEGK_01889</i>	-5,25	5,4E-15
<i>cyoA</i>	-5,22	4,5E-13
<i>ELGAJEGK_00318</i>	-5,11	2,7E-04
<i>proX</i>	-5,05	0,0E+00
<i>uhpT</i>	-5,04	0,0E+00
<i>mdtI</i>	-4,98	0,0E+00
<i>yncE</i>	-4,93	0,0E+00
<i>fdoH</i>	-4,83	0,0E+00
<i>proV</i>	-4,78	5,4E-15
<i>proW</i>	-4,74	0,0E+00
<i>ELGAJEGK_01890</i>	-4,72	0,0E+00
<i>fimG_2</i>	-4,64	0,0E+00
<i>cirA</i>	-4,60	0,0E+00
<i>fecB</i>	-4,56	0,0E+00
<i>btsT</i>	-4,52	7,7E-14
<i>fdoG_1</i>	-4,52	0,0E+00
<i>cyoE</i>	-4,51	0,0E+00
<i>cyoC</i>	-4,47	0,0E+00
<i>entC</i>	-4,40	0,0E+00
<i>ELGAJEGK_02824</i>	-4,34	5,7E-07
<i>feoB</i>	-4,33	0,0E+00
<i>leuB</i>	-4,27	0,0E+00
<i>feoC</i>	-4,26	0,0E+00
<i>aceF</i>	-4,18	0,0E+00
<i>ydhC</i>	-4,17	0,0E+00

Tabelle A.4.: Liste differentiell regulierter Gene zwischen JG997 und JG1354 mit NO_3^- als Elektronenakzeptor und $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ IPTG.

JG997 v. JG1354		
Name	Log fc	FDR p-value
<i>puuB</i>	-4,17	0,0E+00
<i>leuC</i>	-4,15	0,0E+00
<i>cyoB</i>	-4,11	0,0E+00
<i>fecC</i>	-4,11	0,0E+00
<i>aceE</i>	-4,10	0,0E+00
<i>lacI_3</i>	-4,08	5,4E-15
<i>cyoD</i>	-4,08	0,0E+00
<i>fecD</i>	-4,08	0,0E+00
<i>frmA</i>	-4,08	0,0E+00
<i>cueO</i>	-4,07	0,0E+00
<i>lacI_2</i>	-4,06	5,4E-15
<i>entB</i>	-4,04	0,0E+00
<i>nrdI</i>	-3,99	0,0E+00
<i>copA</i>	-3,96	3,6E-13
<i>fimH_2</i>	-3,81	0,0E+00
<i>znuA</i>	-3,80	0,0E+00
<i>mglB</i>	-3,72	2,7E-12
<i>fdoG_2</i>	-3,69	2,0E-06
<i>hcp</i>	-3,65	0,0E+00
<i>mdtJ</i>	-3,64	1,6E-14
<i>feoA</i>	-3,61	0,0E+00
<i>metK</i>	-3,60	0,0E+00
<i>ELGAJEGK_04084</i>	-3,59	4,1E-10
<i>exbB</i>	-3,52	1,5E-12
<i>ELGAJEGK_00696</i>	-3,48	2,9E-06
<i>ldrA_3</i>	-3,47	7,1E-03
<i>entE</i>	-3,46	0,0E+00
<i>rbbA</i>	-3,44	0,0E+00
<i>yehC</i>	-3,43	4,8E-02
<i>fepD</i>	-3,41	7,2E-09
<i>sdhD</i>	-3,39	9,0E-06
<i>puuC</i>	-3,38	1,4E-12
<i>bfd</i>	-3,37	2,0E-06
<i>tnaA</i>	-3,34	1,2E-08
<i>phoH</i>	-3,33	1,1E-05
<i>marA</i>	-3,32	5,4E-15
<i>metR</i>	-3,30	2,0E-14
<i>caiD</i>	-3,29	1,0E-02
<i>entS</i>	-3,28	0,0E+00

Tabelle A.4.: Liste differentiell regulierter Gene zwischen JG997 und JG1354 mit NO_3^- als Elektronenakzeptor und $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ IPTG.

JG997 v. JG1354		
Name	Log fc	FDR p-value
<i>dppC</i>	-3,26	2,4E-09
<i>hcr</i>	-3,24	1,5E-12
<i>yqiH</i>	-3,21	1,2E-13
<i>fhuF</i>	-3,21	3,2E-09
<i>fes</i>	-3,20	5,4E-15
<i>dppD</i>	-3,20	2,4E-11
<i>ELGAJEGK_00447</i>	-3,20	1,7E-11
<i>frmB</i>	-3,19	5,4E-15
<i>fepC</i>	-3,17	1,1E-09
<i>dmsA</i>	-3,16	5,4E-15
<i>nrdF</i>	-3,16	1,9E-11
<i>frmR</i>	-3,14	5,4E-15
<i>dmsB_2</i>	-3,12	2,0E-14
<i>leuD</i>	-3,12	2,2E-12
<i>fepG</i>	-3,10	1,3E-09
<i>nrdE</i>	-3,09	0,0E+00
<i>ELGAJEGK_03933</i>	-3,09	4,8E-06
<i>fiu</i>	-3,09	1,6E-14
<i>yqiJ</i>	-3,08	3,9E-05
<i>yciV</i>	-3,06	3,4E-13
<i>metF</i>	-3,06	4,1E-11
<i>ELGAJEGK_01887</i>	-3,06	3,6E-09
<i>chaA</i>	-3,05	2,8E-10
<i>cbtA</i>	-3,05	5,6E-11
<i>lpdA</i>	-3,05	4,7E-09
<i>entF</i>	-3,04	0,0E+00
<i>carB</i>	-3,04	3,9E-13
<i>ygaP</i>	-3,04	5,4E-15
<i>metN</i>	-3,03	0,0E+00
<i>ELGAJEGK_01589</i>	-3,03	1,6E-08
<i>maa</i>	-3,03	0,0E+00
<i>ELGAJEGK_02387</i>	-3,01	0,0E+00
<i>entA</i>	-3,01	1,1E-12
<i>fruB</i>	-2,98	7,0E-12
<i>puuE</i>	-2,96	4,9E-14
<i>fecE</i>	-2,95	2,6E-13
<i>srlA</i>	-2,94	1,2E-05
<i>entH</i>	-2,93	1,7E-10
<i>pyrB</i>	-2,92	5,4E-09

Tabelle A.4.: Liste differentiell regulierter Gene zwischen JG997 und JG1354 mit NO_3^- als Elektronenakzeptor und $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ IPTG.

JG997 v. JG1354		
Name	Log fc	FDR p-value
<i>dppB</i>	-2,92	1,3E-09
<i>fepB</i>	-2,91	1,9E-11
<i>gltK</i>	-2,91	7,2E-10
<i>exbD</i>	-2,90	3,4E-12
<i>ompW</i>	-2,89	4,4E-08
<i>lacC</i>	-2,89	2,1E-09
<i>uraA</i>	-2,87	0,0E+00
<i>cbeA</i>	-2,87	7,9E-09
<i>citF</i>	-2,83	8,9E-10
<i>ybdL</i>	-2,81	3,1E-11
<i>fepA</i>	-2,79	8,9E-11
<i>melA</i>	-2,77	1,0E-10
<i>hisC</i>	-2,76	9,0E-14
<i>pyrI</i>	-2,75	5,9E-10
<i>cydX</i>	-2,75	2,5E-12
<i>hisD</i>	-2,73	1,8E-12
<i>znuB</i>	-2,72	9,9E-14
<i>hisH</i>	-2,71	0,0E+00
<i>dadA</i>	-2,69	5,0E-06
<i>putA</i>	-2,69	3,7E-08
<i>leuA</i>	-2,68	2,4E-10
<i>ELGAJEGK_00625</i>	-2,68	1,0E-07
<i>narK</i>	-2,67	1,5E-09
<i>uspG</i>	-2,67	7,0E-12
<i>yceI_2</i>	-2,67	3,5E-04
<i>sdhA</i>	-2,67	2,3E-06
<i>hisJ</i>	-2,66	1,2E-10
<i>argT</i>	-2,63	5,8E-04
<i>metB</i>	-2,63	0,0E+00
<i>ELGAJEGK_03928</i>	-2,63	6,6E-04
<i>mepM</i>	-2,62	1,6E-09
<i>kgtP</i>	-2,62	7,9E-04
<i>acnB</i>	-2,62	4,5E-06
<i>ELGAJEGK_04445</i>	-2,61	8,2E-05
<i>glnQ_2</i>	-2,61	3,9E-11
<i>nrdH</i>	-2,61	1,5E-06
<i>neo</i>	-2,61	1,4E-06
<i>fecR</i>	-2,59	4,2E-07
<i>nuoB</i>	-2,57	4,1E-11

Tabelle A.4.: Liste differentiell regulierter Gene zwischen JG997 und JG1354 mit NO_3^- als Elektronenakzeptor und $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ IPTG.

JG997 v. JG1354		
Name	Log fc	FDR p-value
<i>fhuA</i>	-2,57	8,6E-11
<i>tonB</i>	-2,56	2,4E-12
<i>znuC</i>	-2,56	3,1E-11
<i>caiB</i>	-2,55	4,5E-12
<i>ydiE</i>	-2,55	3,4E-05
<i>fadL</i>	-2,53	2,2E-10
<i>citD</i>	-2,51	4,7E-04
<i>carA</i>	-2,51	5,1E-08
<i>sthA</i>	-2,50	9,3E-05
<i>bvgA_2</i>	-2,49	1,5E-02
<i>mepS_2</i>	-2,49	4,2E-08
<i>yebE</i>	-2,48	9,0E-07
<i>qmcA</i>	-2,47	1,4E-09
<i>citX</i>	-2,46	3,6E-05
<i>hisA</i>	-2,46	7,9E-13
<i>hisF</i>	-2,45	9,4E-12
<i>ELGAJEGK_03932</i>	-2,45	2,8E-06
<i>fhuE</i>	-2,44	3,7E-09
<i>aglJ</i>	-2,41	2,2E-05
<i>ELGAJEGK_02493</i>	-2,41	2,8E-12
<i>nfsA</i>	-2,40	8,5E-10
<i>ELGAJEGK_03576</i>	-2,40	8,4E-03
<i>ilvM</i>	-2,39	3,8E-05
<i>kdgT</i>	-2,38	1,8E-08
<i>citE</i>	-2,37	1,2E-06
<i>atpE</i>	-2,35	2,4E-11
<i>aceA</i>	-2,34	9,7E-04
<i>yceJ</i>	-2,34	1,5E-05
<i>glcB</i>	-2,34	2,6E-08
<i>metAS</i>	-2,33	1,1E-09
<i>ELGAJEGK_03130</i>	-2,32	8,9E-07
<i>gcd</i>	-2,30	4,6E-04
<i>glnP</i>	-2,30	7,2E-10
<i>nemA</i>	-2,29	6,8E-10
<i>glnH</i>	-2,29	7,3E-07
<i>ELGAJEGK_00919</i>	-2,28	1,1E-06
<i>sucC</i>	-2,27	1,7E-10
<i>hisQ</i>	-2,26	1,1E-08
<i>dhaL</i>	-2,25	1,5E-08

Tabelle A.4.: Liste differentiell regulierter Gene zwischen JG997 und JG1354 mit NO_3^- als Elektronenakzeptor und $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ IPTG.

JG997 v. JG1354		
Name	Log fc	FDR p-value
<i>thiB</i>	-2,24	8,7E-07
<i>gpmA</i>	-2,24	3,2E-05
<i>lolD_1</i>	-2,24	1,3E-09
<i>oppF_2</i>	-2,24	1,2E-07
<i>cysB</i>	-2,24	6,7E-04
<i>glnG</i>	-2,23	4,2E-09
<i>mtlK</i>	-2,23	6,9E-07
<i>fecI</i>	-2,23	1,1E-04
<i>hha</i>	-2,22	3,1E-07
<i>hisG</i>	-2,22	4,8E-07
<i>marR</i>	-2,22	1,1E-10
<i>msrB</i>	-2,21	4,8E-03
<i>nuoC</i>	-2,21	6,9E-07
<i>fruA_1</i>	-2,21	3,0E-06
<i>ELGAJEGK_00918</i>	-2,21	2,9E-06
<i>truB</i>	-2,20	1,9E-12
<i>mdh_2</i>	-2,20	3,9E-06
<i>mhpF</i>	-2,20	9,6E-06
<i>ybdZ</i>	-2,20	2,3E-05
<i>glpP</i>	-2,20	4,0E-13
<i>hisB</i>	-2,19	1,8E-09
<i>ELGAJEGK_04265</i>	-2,18	3,5E-05
<i>nuoE</i>	-2,18	1,3E-07
<i>arcA</i>	-2,16	3,4E-06
<i>yodB</i>	-2,15	5,3E-05
<i>yceI_1</i>	-2,15	9,8E-07
<i>ndh_1</i>	-2,15	1,1E-09
<i>ELGAJEGK_03275</i>	-2,13	1,7E-07
<i>glnM_2</i>	-2,12	1,4E-09
<i>mtrB</i>	-2,12	6,7E-06
<i>pckA</i>	-2,11	1,0E-05
<i>bcsQ</i>	-2,10	2,0E-05
<i>yqiK</i>	-2,10	8,9E-07
<i>yehD</i>	-2,10	1,1E-04
<i>mntH</i>	-2,09	1,2E-04
<i>corA</i>	-2,09	3,9E-07
<i>atpA</i>	-2,06	1,8E-05
<i>ybdM</i>	-2,05	7,2E-06
<i>mtrA</i>	-2,05	3,2E-05

Tabelle A.4.: Liste differentiell regulierter Gene zwischen JG997 und JG1354 mit NO_3^- als Elektronenakzeptor und $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ IPTG.

JG997 v. JG1354		
Name	Log fc	FDR p-value
<i>ELGAJEGK_01502</i>	-2,05	9,1E-04
<i>ybbJ</i>	-2,04	9,0E-07
<i>metL</i>	-2,04	9,5E-10
<i>plaP</i>	-2,04	1,6E-06
<i>fadB</i>	-2,03	3,4E-03
<i>hisP</i>	-2,02	1,8E-05
<i>ilvD</i>	-2,02	8,0E-09
<i>kduD_2</i>	-2,02	1,1E-05
<i>metC</i>	-2,00	2,6E-07
<i>ygdR_2</i>	2,00	4,3E-06
<i>ybjM</i>	2,03	3,3E-08
<i>osmB</i>	2,03	2,1E-08
<i>paaA</i>	2,03	7,4E-04
<i>ELGAJEGK_00825</i>	2,05	1,4E-05
<i>hyaA</i>	2,05	2,6E-06
<i>tatE</i>	2,06	1,0E-06
<i>cmk</i>	2,07	5,9E-06
<i>otsB</i>	2,07	5,3E-06
<i>fdnG_2</i>	2,08	9,4E-05
<i>ELGAJEGK_01763</i>	2,08	1,5E-04
<i>mocA</i>	2,08	8,2E-06
<i>ELGAJEGK_03248</i>	2,11	2,9E-05
<i>ogt</i>	2,11	2,7E-09
<i>rpoE</i>	2,12	1,7E-07
<i>hcpA</i>	2,12	2,4E-02
<i>ELGAJEGK_02685</i>	2,12	9,9E-07
<i>ELGAJEGK_04224</i>	2,12	2,5E-07
<i>allA</i>	2,13	6,6E-06
<i>ynaE</i>	2,14	5,7E-03
<i>ELGAJEGK_02466</i>	2,14	5,3E-05
<i>ELGAJEGK_00263</i>	2,14	1,6E-03
<i>ELGAJEGK_02934</i>	2,15	1,4E-05
<i>lgoD</i>	2,16	5,5E-07
<i>ELGAJEGK_04211</i>	2,16	3,3E-07
<i>ELGAJEGK_00870</i>	2,18	7,1E-10
<i>kdpA</i>	2,19	9,2E-06
<i>mbeC</i>	2,21	3,6E-09
<i>slp_2</i>	2,22	6,7E-04
<i>inlJ</i>	2,23	2,7E-02

Tabelle A.4.: Liste differentiell regulierter Gene zwischen JG997 und JG1354 mit NO_3^- als Elektronenakzeptor und $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ IPTG.

JG997 v. JG1354		
Name	Log fc	FDR p-value
<i>ELGAJEGK_03116</i>	2,23	2,5E-07
<i>dsrB</i>	2,24	9,2E-07
<i>ELGAJEGK_01958</i>	2,24	1,6E-08
<i>ELGAJEGK_03861</i>	2,24	6,6E-11
<i>lacI_4</i>	2,26	1,2E-04
<i>gadC</i>	2,27	1,7E-07
<i>ELGAJEGK_00649</i>	2,28	2,3E-07
<i>ymgD</i>	2,28	4,0E-09
<i>pagP</i>	2,29	7,8E-08
<i>cspA</i>	2,29	3,7E-03
<i>csrA</i>	2,30	1,0E-06
<i>ccmD_2</i>	2,32	3,0E-02
<i>cusF</i>	2,33	6,0E-03
<i>dps</i>	2,33	1,6E-05
<i>fdnG_1</i>	2,34	4,4E-05
<i>zapA</i>	2,35	2,9E-07
<i>ydhY</i>	2,37	1,9E-06
<i>cspD</i>	2,38	3,1E-11
<i>fdhF_2</i>	2,38	7,3E-08
<i>cysI</i>	2,38	4,7E-06
<i>ELGAJEGK_00873</i>	2,39	3,4E-06
<i>cedA</i>	2,39	1,3E-07
<i>ELGAJEGK_04240</i>	2,39	8,0E-07
<i>ELGAJEGK_01564</i>	2,40	2,3E-02
<i>ELGAJEGK_02796</i>	2,40	5,9E-06
<i>ELGAJEGK_00013</i>	2,41	9,0E-07
<i>cusB</i>	2,41	1,0E-03
<i>yraH</i>	2,42	5,1E-08
<i>ispE</i>	2,43	8,8E-09
<i>hchA</i>	2,44	3,6E-13
<i>ygiW_2</i>	2,45	0,0E+00
<i>hypA</i>	2,45	1,5E-06
<i>ELGAJEGK_03529</i>	2,47	6,6E-04
<i>yjiG</i>	2,48	7,2E-05
<i>ELGAJEGK_02271</i>	2,50	5,4E-07
<i>gstB_1</i>	2,53	7,8E-08
<i>ELGAJEGK_02496</i>	2,55	1,3E-02
<i>ompN_1</i>	2,57	1,1E-09
<i>ELGAJEGK_00490</i>	2,57	2,1E-02

Tabelle A.4.: Liste differentiell regulierter Gene zwischen JG997 und JG1354 mit NO_3^- als Elektronenakzeptor und $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ IPTG.

JG997 v. JG1354		
Name	Log fc	FDR p-value
<i>narU</i>	2,57	4,2E-10
<i>ELGAJEGK_03562</i>	2,58	3,3E-02
<i>bvgA_1</i>	2,59	1,0E-02
<i>ELGAJEGK_01911</i>	2,59	1,7E-09
<i>ELGAJEGK_00090</i>	2,60	2,2E-07
<i>cysJ</i>	2,65	2,6E-06
<i>ELGAJEGK_01331</i>	2,67	3,1E-13
<i>ELGAJEGK_03448</i>	2,68	2,0E-08
<i>ELGAJEGK_02401</i>	2,68	0,0E+00
<i>ELGAJEGK_00259</i>	2,72	1,6E-02
<i>ELGAJEGK_00255</i>	2,73	1,1E-06
<i>sra</i>	2,77	2,3E-08
<i>hyaC</i>	2,77	5,9E-10
<i>hyaB</i>	2,78	1,1E-10
<i>clcD_1</i>	2,78	5,2E-09
<i>ELGAJEGK_01909</i>	2,79	4,8E-05
<i>ELGAJEGK_02415</i>	2,80	7,2E-06
<i>fdnH_1</i>	2,84	7,5E-10
<i>hila</i>	2,85	7,3E-08
<i>ELGAJEGK_01000</i>	2,85	1,8E-09
<i>icd_2</i>	2,86	4,1E-02
<i>ELGAJEGK_03616</i>	2,87	5,9E-12
<i>gadA</i>	2,89	7,2E-10
<i>ydfZ</i>	2,89	3,1E-04
<i>yeeD</i>	2,90	8,7E-10
<i>ELGAJEGK_00993</i>	2,91	4,6E-09
<i>ydfO_3</i>	2,92	2,8E-05
<i>yhcO</i>	2,92	4,8E-11
<i>yiaW_2</i>	2,93	7,2E-08
<i>ELGAJEGK_01771</i>	2,95	9,2E-03
<i>ELGAJEGK_01031</i>	2,96	5,4E-15
<i>gap_2</i>	2,99	1,1E-13
<i>yihD</i>	3,01	0,0E+00
<i>ELGAJEGK_02956</i>	3,09	0,0E+00
<i>ELGAJEGK_02345</i>	3,10	3,5E-08
<i>ELGAJEGK_00167</i>	3,17	2,7E-12
<i>ELGAJEGK_01214</i>	3,19	3,0E-14
<i>ELGAJEGK_00603</i>	3,21	4,5E-14
<i>dctR</i>	3,23	9,4E-08

Tabelle A.4.: Liste differentiell regulierter Gene zwischen JG997 und JG1354 mit NO_3^- als Elektronenakzeptor und $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ IPTG.

JG997 v. JG1354		
Name	Log fc	FDR p-value
<i>ELGAJEGK_02459</i>	3,28	0,0E+00
<i>csgB</i>	3,30	5,1E-03
<i>ELGAJEGK_02758</i>	3,31	4,1E-06
<i>appY</i>	3,31	1,5E-12
<i>ELGAJEGK_01506</i>	3,32	3,6E-06
<i>ELGAJEGK_02184</i>	3,32	4,0E-06
<i>hokA_1</i>	3,32	4,2E-07
<i>ELGAJEGK_00757</i>	3,32	9,0E-14
<i>ELGAJEGK_00198</i>	3,32	6,2E-11
<i>ELGAJEGK_02668</i>	3,33	3,1E-06
<i>ELGAJEGK_02877</i>	3,33	5,1E-06
<i>ELGAJEGK_02916</i>	3,33	3,5E-06
<i>elaB</i>	3,38	0,0E+00
<i>ELGAJEGK_01912</i>	3,39	1,6E-06
<i>ELGAJEGK_03020</i>	3,45	0,0E+00
<i>ELGAJEGK_00385</i>	3,46	1,7E-03
<i>dgcZ_2</i>	3,48	0,0E+00
<i>sapB_2</i>	3,52	8,7E-13
<i>ELGAJEGK_01561</i>	3,57	2,0E-08
<i>gadB</i>	3,62	0,0E+00
<i>ELGAJEGK_00853</i>	3,65	1,3E-03
<i>fdnI</i>	3,70	0,0E+00
<i>ELGAJEGK_00134</i>	3,73	0,0E+00
<i>ELGAJEGK_01533</i>	3,84	0,0E+00
<i>torI</i>	3,89	0,0E+00
<i>gadE</i>	3,94	5,4E-14
<i>mcbA</i>	3,98	0,0E+00
<i>ELGAJEGK_02175</i>	4,04	2,0E-14
<i>grxA</i>	4,14	0,0E+00
<i>hdeA</i>	4,23	1,4E-10
<i>pdeI</i>	4,33	0,0E+00
<i>yebV</i>	4,75	0,0E+00
<i>sgrT</i>	4,90	0,0E+00
<i>tetA_2</i>	5,23	4,9E-04
<i>rmf</i>	5,34	0,0E+00
<i>hdeD</i>	5,36	0,0E+00
<i>ELGAJEGK_00472</i>	5,49	2,7E-02
<i>ELGAJEGK_02125</i>	5,68	3,4E-02
<i>cat</i>	6,04	5,2E-08

Tabelle A.4.: Liste differentiell regulierter Gene zwischen JG997 und JG1354 mit NO_3^- als Elektronenakzeptor und $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ IPTG.

JG997 v. JG1354		
Name	Log fc	FDR p-value
<i>hdeB</i>	6,16	0,0E+00
<i>ELGAJEGK_01893</i>	6,43	2,8E-06
<i>ELGAJEGK_03808</i>	6,47	6,5E-03
<i>ELGAJEGK_01113</i>	6,64	5,2E-03
<i>tetA_1</i>	6,88	3,6E-03
<i>ELGAJEGK_01312</i>	6,88	4,4E-03
<i>ELGAJEGK_01011</i>	7,00	3,3E-11
<i>ELGAJEGK_03592</i>	7,01	3,1E-03
<i>ELGAJEGK_04261</i>	7,01	2,7E-03
<i>ELGAJEGK_00242</i>	7,16	1,8E-03
<i>ELGAJEGK_03810</i>	7,35	1,3E-03
<i>ELGAJEGK_02406</i>	7,79	6,3E-04
<i>galK_2</i>	8,11	3,5E-04
<i>ELGAJEGK_02407</i>	8,45	1,4E-04
<i>ELGAJEGK_00746</i>	8,91	5,5E-05
<i>ELGAJEGK_03886</i>	9,43	1,7E-05
<i>ELGAJEGK_03778</i>	9,55	1,4E-05
<i>ELGAJEGK_00947</i>	9,96	5,3E-06
<i>ELGAJEGK_00246</i>	10,36	2,5E-06
<i>galK_1</i>	16,22	0,0E+00

A.1.1. Expressionswerte

Das Referenzgenom für das Mapping von RNA-Sequenzierungen, sowie eine vollständige Liste aller, im Rahmen dieser Arbeit, erhobenen Expressionswerte findet sich im digitalen Anhang dieser Arbeit.

/Epxpressionswerte/Referenzgenom.gbk – Referenzgenom

/Epxpressionswerte/TPM_Mapping.xlsx – Expressionswerte

Die Zuordnung zu den jeweiligen experimentellen Bedingungen erfolgt mit Hilfe der Metadaten-Tabelle.

/Expressionswerte/Metadaten_zu_RNA_Seq.xlsx – Metadaten

A.2. Abbildungen

JG878

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Escherichia coli strain DH5alpha chromosome, complete genome	6914	7785	100%	0.0	100%	CP025520.1
Escherichia coli strain K-12 NEB 5-alpha, complete genome	6914	7785	100%	0.0	100%	CP017100.1
Escherichia coli strain ER1821R, complete genome	6914	7785	100%	0.0	100%	CP016018.1
Escherichia coli strain QSW20, complete genome	6914	7785	100%	0.0	100%	CP013253.1
Escherichia coli strain DH1Ec169, complete genome	6914	7785	100%	0.0	100%	CP012127.1
Escherichia coli strain DH1Ec104, complete genome	6914	7785	100%	0.0	100%	CP012126.1
Escherichia coli strain DH1Ec095, complete genome	6914	7785	100%	0.0	100%	CP012125.1
Escherichia coli DH1 (ME8569) DNA, complete genome	6914	7785	100%	0.0	100%	AP012030.1
Escherichia coli DH1, complete genome	6914	7785	100%	0.0	100%	CP001637.1
Escherichia coli strain ER1709 chromosome, complete genome	6909	7780	100%	0.0	99%	CP030240.1
Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655 chromosome, complete genome	6909	7780	100%	0.0	99%	CP032667.1

Sequences producing significant alignments:

JG1220

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Escherichia coli strain ER1709 chromosome, complete genome	6914	7785	100%	0.0	100%	CP030240.1
Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655 chromosome, complete genome	6914	7785	100%	0.0	100%	CP032667.1
Escherichia coli strain C600 chromosome, complete genome	6914	7785	100%	0.0	100%	CP031214.1
Escherichia coli strain FORC 064 chromosome, complete genome	6914	7785	100%	0.0	100%	CP022664.1
Escherichia coli strain RTdelA_B_UU3 chromosome	6914	7785	100%	0.0	100%	CP023749.1
Escherichia coli strain VH1 chromosome, complete genome	6914	7785	100%	0.0	100%	CP028704.1
Escherichia coli strain ME8067 chromosome, complete genome	6914	7785	100%	0.0	100%	CP028703.1
Escherichia coli strain J53 chromosome, complete genome	6914	7785	100%	0.0	100%	CP028702.1
Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655 strain K-12 chromosome	6914	7785	100%	0.0	100%	CP027060.1
Escherichia coli strain DTU-1 chromosome, complete genome	6914	7785	100%	0.0	100%	CP026612.1

Abbildung A.1.: Vergleich der BLAST-Ergebnisse von *narG* aus JG878 und JG1220

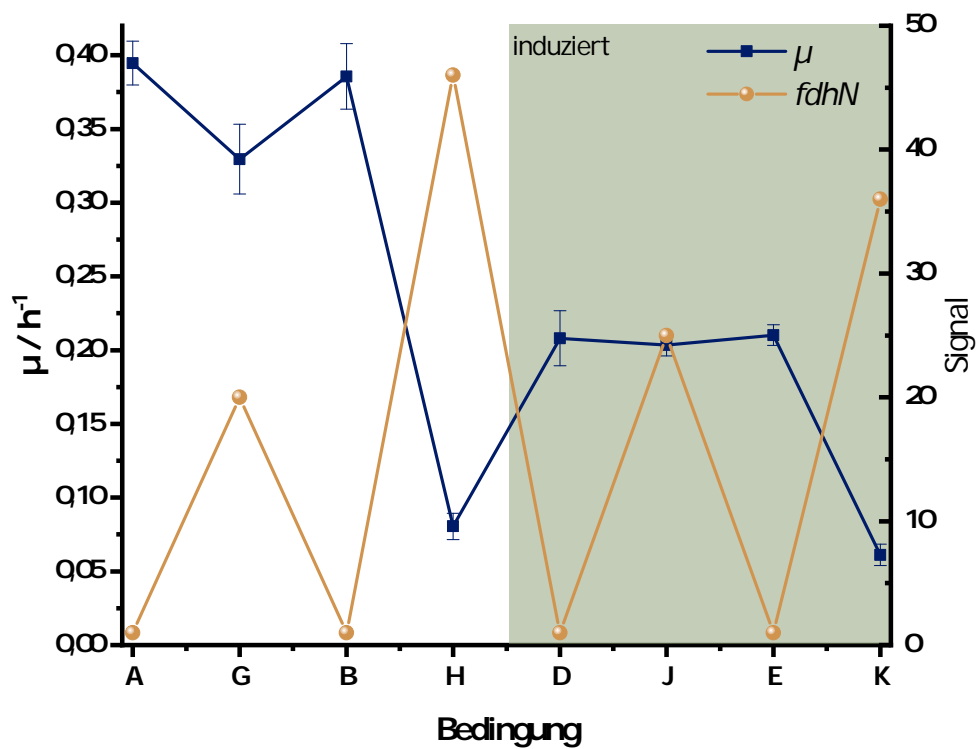


Abbildung A.2.: Korrelation den Wachstumsraten μ von JG1054 und JG997 (blau) mit dem Expressionssignal (gelb) von *fdhG*. Die Expressionswerte sind auf Bedingung A normiert. Abbildung verändert nach A. Kremling.

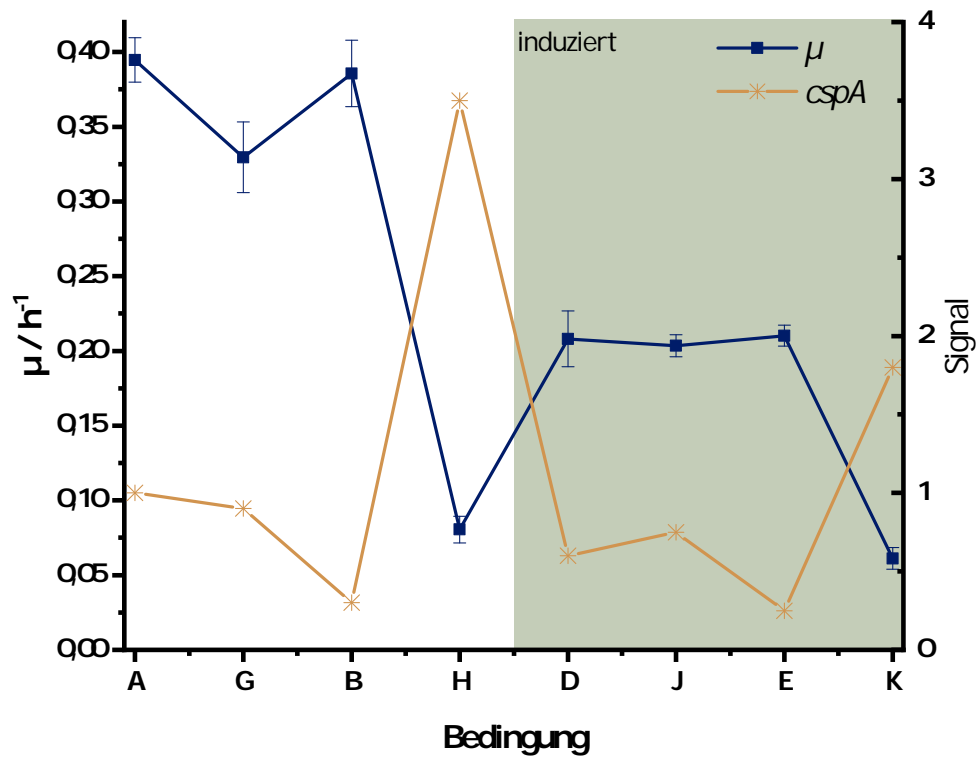


Abbildung A.3.: Korrelation den Wachstumsraten μ von JG1054 und JG997 (blau) mit dem Expressionssignal (gelb) von *cspA*. Die Expressionswerte sind auf Bedingung A normiert. Abbildung verändert nach A. Kremling.

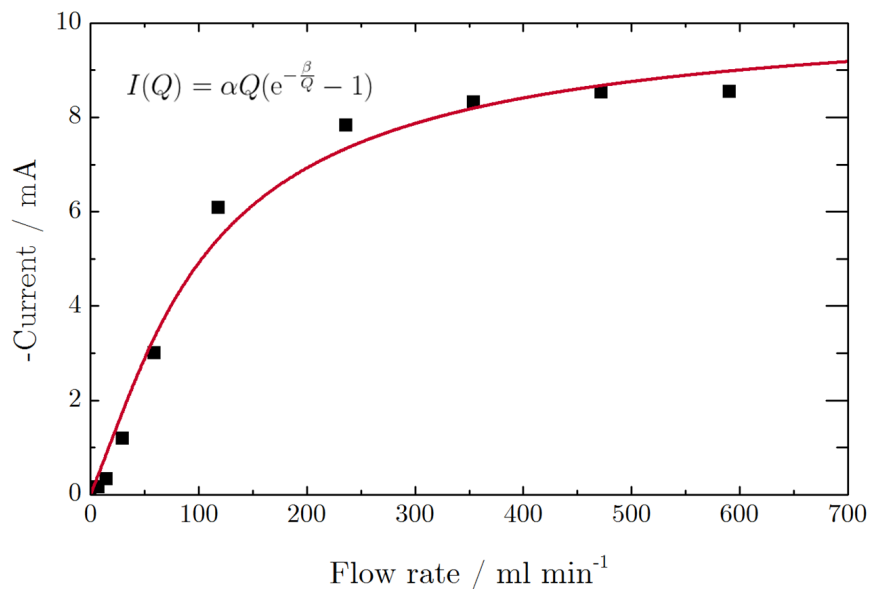


Abbildung A.4.: Abhängigkeit der Stromstärke I im Pump-Reaktor von der Flussrate Q . Abbildung von J. Erben.