

Untersuchungen zur Nutzung von *R. sphaeroides* als Produktionsstamm in der mikrobiellen Elektrosynthese

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

Ferdinand Schmid

Dekan: Prof. Dr. Jörg Kämper

1. Referent: Prof. Dr. Johannes Gescher

2. Referent: Prof. Dr. Jörg Kämper

Tag der mündlichen Prüfung: 19.10.2021



Dieses Werk ist lizenziert unter einer Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz (CC BY 4.0):

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die folgende Arbeit selbstständig 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 Experimente zur vorliegenden Arbeit wurden von Juni 2017 bis Juni 2021 am Institut für Angewandte Biowissenschaften der Fakultät für Chemie- und Biowissenschaften am Karlsruher Institut für Technologie unter der Leitung von Professor Johannes Gescher durchgeführt.

Karlsruhe, den 05.09.2021

Ferdinand Schmid

Veröffentlichungen und Konferenzbeiträge

Veröffentlichungen:

Schmid, F., Novion Ducassou, J., Couté, Y., Gescher, J. Developing *Rhodobacter sphaeroides* for cathodic biopolymer production. *Bioresource Technology* **336**, 125340 (2021).

Konferenzbeiträge:

Schmid F., Gescher J. 2020. "Electrode assisted production of platform chemicals with *R. sphaeroides*".

Posterpräsentation, Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), 08.03. – 11.03.2020, Leipzig, Deutschland

Schmid F., Gescher J. 2020. "Electrode assisted production of platform chemicals with *R. sphaeroides*".

Posterpräsentation, biofilms 9 Konferenz, 29.09. – 1.10.2020, Karlsruhe, Deutschland

Zusammenfassung

Angesichts der steigenden CO₂-Konzentration in der Atmosphäre und der damit verbundenen Bedrohung für die Menschheit ist es das Ziel bioökonomischer Forschung, Wege zur Reduktion des CO₂-Ausstoßes zu finden. Die Fixierung von CO₂ ist dabei ein vielversprechender Ansatz zur Etablierung einer kreislaufbasierten Rohstoffwirtschaft. Eine Möglichkeit zur nachhaltigen Gestaltung dieses Prozesses bieten Bioreaktoren mit CO₂-fixierenden Mikroorganismen als Biokatalysatoren. In dieser Arbeit sollte deshalb *Rhodobacter sphaeroides* als Biokatalysator genutzt werden. Eine optimale Nutzung dieses Organismus im Hinblick auf die angestrebten Ziele bietet seine photolithoautotrophe Lebensweise, in der H₂, CO₂ und Licht als Substrat dienen. Da 95 % der globalen Wasserstoffproduktion auf fossilen Rohstoffen basieren, sollte in dieser Arbeit ein nachhaltiger Weg zur Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten gefunden werden. Eine vielversprechende Option hierfür bietet die mikrobielle Elektrosynthese, in der die Kathode eines bioelektrochemischen Systems (BES) durch Nutzung von regenerativ erzeugtem Strom die Elektronenquelle darstellt. Deshalb wurde zunächst eine Interaktion von Mikroorganismus und Kathode und somit eine stabile Kultivierung von *R. sphaeroides* in einem BES etabliert. Im nächsten Schritt sollte diese Mikroben-Elektroden-Interaktion optimiert werden. Hierfür wurde der Einsatz einer verlängerten Elektronentransportkette im Hinblick auf die Etablierung eines extrazellulären Elektronentransports untersucht. Bei den Untersuchungen wurden Optimierungen der Mikroben-Elektronen-Interaktion, die auf ein integriertes pIND4-Expressionsplasmid sowie den angelegten Antibiotikaselektionsdruck zurückzuführen waren, erkannt und charakterisiert. Nach erfolgter Optimierung wurden zwei Beispielprozesse für die BES-gestützte Produktion von Wertstoffen etabliert. Im ersten Prozess wurde die intrazelluläre Anreicherung von PHB als Beispiel für die Produktion zelleigener Wertstoffe untersucht. Im zweiten Prozess wurde durch die heterologe Expression eines Acetoin-Syntheseweges die Möglichkeit zur Produktion zellfremder Stoffe demonstriert. Somit konnte die grundlegende Eignung von *R. sphaeroides* als photoautotropher Produktionsstamm in der mikrobiellen Elektrosynthese belegt werden.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	III
1 Einleitung	1
1.1 Bioökonomie	1
1.2 <i>Carbon Capture and Utilization</i> - CCU	2
1.3 Biotechnologie als Grundlage von CCU-Technologien	4
1.3.1 Photosynthese: Die Lichtreaktion	5
1.3.2 Calvin Zyklus: Die Dunkelreaktion	8
1.3.3 Implikationen photosynthetischer CCU-Technologien	10
1.3.4 Ansätze zur Optimierung photoautotropher Produktionspro- zesse	13
1.4 Mikrobielle Elektrochemie	14
1.4.1 Elektronentransport in exoelektrogenen Mikroorganismen . .	15
1.4.2 Mikroben-Elektroden-Interaktion	17
1.4.3 Aufbau und Anwendung bioelektrochemischer Systeme . . .	17
1.4.4 Herausforderungen der mikrobiellen Elektrosynthese	20
1.5 Zielsetzung	22
2 Material und Methoden	23
2.1 Chemikalien und Enzyme	23
2.2 Bakterienstämme und Plasmide	23
2.3 Oligonukleotide	25
2.4 Mikrobiologische Methoden	25
2.4.1 Kultivierung	25
2.4.2 Stammkonservierung	28
2.5 Molekularbiologische Methoden	28
2.5.1 DNA-Methoden	28
2.5.2 Protein-Methoden	32
2.6 Bildgebende Methoden	38
2.6.1 Optische Kohärenztomographie	38

2.6.2	Fluoreszenzmikroskopie	38
2.7	Analytische Methoden	39
2.7.1	Micro-GC	39
2.7.2	High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC)	40
2.7.3	Relative PHB-Quantifizierung	40
2.7.4	Quantifizierung von Acetoin	41
2.8	Aufbau bioelektrochemischer Systeme	41
2.8.1	Standard BES	41
2.8.2	Optimiertes BES	42
2.8.3	BES Fließzelle	42
2.9	Elektrochemische Methoden	43
2.9.1	Lineare Voltammetrie	43
2.9.2	Chronoamperometrie	43
2.9.3	Chronopotentiometrie	43
3	Ergebnisse	45
3.1	Etablierung einer stabilen BES-basierten Kultivierung von <i>R. sphaeroides</i>	46
3.1.1	Validierung der photolithoautotrophen Kultivierungsbedingungen	49
3.2	Untersuchung einer verlängerten Elektronentransportkette in <i>R. sphaeroides</i>	50
3.2.1	Klonierung und Integration der verlängerten Elektronentransportkette	50
3.2.2	Überprüfung der Funktionalität der integrierten Elektronentransportkette	52
3.3	Charakterisierung des biofilmbildenden <i>R. sphaeroides</i> pIND4-Phänotyps	53
3.3.1	Mikroskopische Analyse des <i>R. sphaeroides</i> -Biofilms	53
3.3.2	Quantifizierung der Biofilmbildung mittels Fließzell-BES	54
3.3.3	Proteomanalyse von <i>R. sphaeroides</i> pIND4	57
3.4	BES-gestützte Produktion von Wertstoffen mit <i>R. sphaeroides</i> pIND4	58
3.4.1	<i>Proof of principle</i> für die Produktion von PHB	58
3.4.2	<i>Proof of principle</i> für die Produktion von Acetoin	59
4	Diskussion	65
4.1	Etablierung stabiler Kultivierungsbedingungen in einem BES	65
4.2	Untersuchung einer verlängerten Elektronentransportkette in <i>R. sphaeroides</i>	69

4.3	Charakterisierung des biofilmbildenden <i>R. sphaeroides</i> pIND4-Phänotyps	72
4.4	BES-gestützte Produktion von Wertstoffen	75
5	Ausblick	80
	Literatur	82
	Anhang	94
	Danksagung	100

Abbildungsverzeichnis

1	Schematische Darstellung des Elektronenflusses in der Photosynthese.	6
2	Vereinfachte schematische Darstellung des Calvin Zyklus.	10
3	Extrazellulärer Elektronentransport am Beispiel von <i>S. oneidensis</i> . .	16
4	Schematische Darstellung der Funktionsweise von bioelektrochemischen Systemen.	18
5	Chronoamperometrische Analyse eines abiotischen bioelektrochemischen Systems (BES)	46
6	Chronoamperometrische Analyse von <i>R. sphaeroides</i> WS8N in einem BES.	47
7	Kultivierung von <i>R. sphaeroides</i> WS8N in einem BES mittels Chronopotentiometrie	48
8	Validierung der photolithoautotrophen Kulturbedingungen in einem BES	49
9	Analyse von von <i>R. sphaeroides</i> pIND4_cymA_pioABC mittels SDS-Gelelektrophorese.	51
10	Vergleich von <i>R. sphaeroides</i> pIND4_cymA_pioABC, <i>R. sphaeroides</i> pIND4 und <i>R. sphaeroides</i> WS8N in einem BES	53
11	Mikroskopische Analyse eines auf einer Kathode gewachsenen <i>R. sphaeroides</i> pIND4-Biofilms.	54
12	Kultivierung von <i>R. sphaeroides</i> pIND4 in einem Fließzellen-Setup. . .	56
13	Fluoreszenzmikroskopische Analyse von in einem Fließzellen-Setup kultivierten <i>R. sphaeroides</i> pIND4-Zellen	59
14	Heterotrophe Acetoinproduktion mit <i>R. sphaeroides</i> pIND4_alsSD . .	61
15	Vergleich von <i>R. sphaeroides</i> Wildtyp und pIND4_alsSD unter autotrophen Bedingungen	62
16	Kultivierung von <i>R. sphaeroides</i> pIND4_alsSD in einem optimierten BES	64

Tabellenverzeichnis

2.1	In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme.	23
2.2	In dieser Arbeit verwendeten Plasmide.	24
2.3	In dieser Arbeit zur Klonierung verwendete Primer.	25
2.4	Zusammensetzung von LB-, SOB- und SOC-Medium.	26
2.5	Zusammensetzung der Medien für die heterotrophe (A) und autotrophe (B) Kultivierung von <i>R. sphaeroides</i>	27
2.6	Zusammensetzung der zum Komplementieren verwendeten Spurenelementlösung (A) und Vitaminlösungen (B).	27
2.7	Zusammensetzung des Waschpuffers.	28
2.8	Zusammensetzung des Reaktionsansatzes mit dem MangoMix. . . .	29
2.9	Zusammensetzung des Reaktionsansatzes mit der HiFi Polymerase.	29
2.12	Zusammensetzung des 6x DNA-Ladepuffers.	29
2.10	Zyklisches Protokoll für die Amplifikation von DNA mittels PCR. . . .	30
2.11	Zusammensetzung des TAE-Puffers.	30
2.13	Pipettierschema eines Restriktionsverdau.	31
2.14	Zusammensetzung des Gibson Mastermixes.	31
2.15	Zusammensetzung der Bradford-Reagenz.	33
2.16	Zusammensetzung des Sammelgels, für 7 Gele, 4 % Acrylamid (w/v).	34
2.17	Zusammensetzung des Trenngels, für 7 Gele, 15 % Acrylamid (w/v).	34
2.18	Zusammensetzung des SDS-Laufpuffers.	34
2.19	Zusammensetzung des 5x Laemmli-Puffers.	35
2.20	Zusammensetzung der Lösungen für den Hemestain.	35
2.21	Zusammensetzung des Blottingpuffers.	36
2.22	Protokoll der Immunodetektion.	36
2.23	Zusammensetzung von TBS, TBST- und TBSTT-Puffer.	37
2.24	Zusammensetzung der Reaktionslösung zur Quantifizierung von Acetoin.	41
3.1	Zusammenfassung der Proteomanalyse	57
4.1	Vergleich von <i>R. sphaeroides</i> pIND4_alsSD mit verschiedenen für die Acetoinproduktion optimierten Bakterien	78

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
Ag/AgCl	Silber/Silberchlorid-Referenzelektrode
BES	Bioelektrochemisches System
CCU	<i>Carbon Capture and Utilization</i>
ddH ₂ O	Reinstwasser
EET	Extrazellulärer Elektronentransport
MES	Mikrobielle Elektrosynthese
MFC	Mikrobielle Brennstoffzelle
OCT	Optische Kohärenztomographie
OD	Optische Dichte $\lambda = 650 \text{ nm}$
PHB	Polyhydroxybutyrat
PMF	Protonenmotorische Kraft
PS	Photosystem
SHE	Standard-Wasserstoff Elektrode

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Bioökonomie

Eine der größten Bedrohungen der Menschheit ist der steigende CO₂-Gehalt in der Atmosphäre. Der Anstieg der anthropogenen CO₂-Konzentration führt zu Treibhaus-effekten, die das Gleichgewicht des Klimas bereits jetzt empfindlich stören [103]. In den letzten Jahren stieg das gesellschaftliche Bewusstsein zu diesem Problem deutlich, was sich nicht zuletzt in von der Politik beschlossenen Strategien und Initiativen zur Reduktion des CO₂-Ausstoßes widerspiegelt. So steht beispielsweise das deutsche Wissenschaftsjahr 2020/21 im Zeichen der Bioökonomie. Der komplexe Gedanke, der sich hinter diesem Begriff verbirgt, ist die Verbindung von Ökonomie und Ökologie für nachhaltiges Wirtschaften. Die Grundlage dieser Idee bildet eine kreislaufbasierte Wirtschaft, die – mit Rücksicht auf die Biosphäre – nachhaltig gewonnene Rohstoffe für Produktionsprozesse verwendet und anfallende Abfallstoffe recycelt. So soll durch biobasierte Innovationen ein zukunftsfähiges Wirtschaftssystem mit Potenzial für nachhaltige, ressourcenschonende Lösungen etabliert werden. Die Notwendigkeit zum nachhaltigen Handeln wurde auch in der “Agenda 2030” der Vereinten Nationen festgehalten. Die in dieser Nachhaltigkeitsagenda formulierten Ziele fordern neben Wohlstand, Gesundheit, bezahlbarer und sauberer Energie auch Konsum und Produktion auf nachhaltiger Basis [140]. Die deutsche Regierung greift diese Ziele in ihrer nationalen Bioökonomiestrategie auf, die zwei Leitlinien folgt [24]. Die erste Leitlinie dieser Strategie befasst sich mit der Bioökonomie-Forschung. Der zentrale Forschungsbereich ist die Biotechnologie, die biologisches Wissen mit fortschrittlichen Technologien als Fundament eines nachhaltigen Wirtschaftssystems vereint. Dabei sollen biobasierte Produktionssysteme zur Bereitstellung von Produkten erforscht werden. Grundlage ist hierbei ein tiefgehendes Verständnis biologischer Systeme, das in Zusammenarbeit mit interdisziplinären Forschungsbereichen Lösungsansätze bietet. Die zweite Leitlinie

richtet sich an eine nachhaltige Ausrichtung der Rohstoffbasis der Wirtschaft. Der Fokus wird dabei auf die Erzeugung von Rohstoffen biogenen Ursprungs gelegt, die effizient und kreislaforientiert genutzt werden, ohne dabei der Umwelt zur Last zu fallen.

Diesen Leitlinien folgend wurden sechs konkrete Ziele zur Umsetzung der Bioökonomiestrategie formuliert:

1. Bioökonomische Lösungen für die Nachhaltigkeitsagenda entwickeln
2. Potenziale der Bioökonomie innerhalb ökologischer Grenzen erkennen und erschließen
3. Biologisches Wissen erweitern und anwenden
4. Ressourcenbasis der Wirtschaft nachhaltig ausrichten
5. Deutschland zum führenden Innovationsstandort der Bioökonomie ausbauen
6. Gesellschaft einbinden, nationale und internationale Kooperationen intensivieren

Zentraler Bestandteil sind also Innovationen, die Möglichkeiten zur Reduktion von CO₂-Emissionen und der damit verbundenen Verringerung des Treibhauseffektes schaffen. Ein nachhaltiger Ansatz zur Erreichung dieses Ziels ist die Erforschung und Etablierung von Produktionsprozessen, die CO₂ fixieren und als Rohstoff nutzen.

1.2 *Carbon Capture and Utilization - CCU*

Kohlenstoff spielt eine essentielle Rolle in der Energiegewinnung und in der Herstellung von Handwerksmaterialien mit vielfältigen Eigenschaften. Kohlenstoffpolymere werden beispielsweise für die Herstellung von Kunststoffen verwendet, deren Anwendungsbereiche sehr divers sind. Die Nachfrage nach Kunststoffen in Deutschland belief sich im Jahr 2018 auf 12.6 Millionen Tonnen, von denen 35 % als Verpackungsmaterialien, 22 % im Bauwesen, 12 % im Fahrzeugbau und 7 % in der Elektronikbranche verwendet wurden [95]. Vom anfallenden Kunststoffmüll wurden 39 % recycelt und 61 % energetisch verwertet, was mit einer Freisetzung des gebundenen Kohlenstoffs in Form von CO₂ einhergeht [139]. Im Angesicht des steigenden CO₂-Gehalts in der Atmosphäre gewinnen Prozesse, die CO₂ effektiv als Rohstoff nutzen, zusehends an Bedeutung. Produktionsprozesse, die CO₂ als Kohlenstoffquelle für Synthesen nutzen, werden als CCU-Technologien (*Carbon Capture and Utilization*) bezeichnet [60, 130]. Sie werden dabei als Prozesse definiert, in denen CO₂-Moleküle

als Bausteine eines neuen Moleküls dienen und somit fossile Kohlenstoffquellen ersetzen. Diese Transformation kann chemisch, photochemisch, elektrochemisch und biologisch durchgeführt werden, wobei chemische CCU-Technologien bisher am intensivsten erforscht wurden [83]. Im CO_2 -Molekül liegt das Kohlenstoffatom in seiner am höchsten oxidierten Form vor, weshalb dessen Nutzung in Synthesen zunächst einen hohen Energieeintrag erfordert. Dies führt in der Regel zu einer Netto-Freisetzung von CO_2 , da die Bereitstellung der Aktivierungsenergie zum Großteil aus fossilen Quellen erfolgt. Für die Aktivierung wird zumeist Wasserstoff verwendet, um zum Beispiel Methan, Methanol oder Ethanol zu erzeugen [83]. Bis heute basieren ca. 95 % der globalen Wasserstoffproduktion auf fossilen Ressourcen, was die Nachhaltigkeit dieser Prozesse negativ beeinflusst [54]. Ein Beispiel für eine wasserstoffbasierte CCU-Technologie ist der Sabatier-Prozess, in dem Wasserstoff und Kohlendioxid zu Methan und Wasser umgesetzt werden. Um den Energiebedarf sowohl für die benötigte Wasserstoffproduktion als auch für die Aufrechterhaltung der Reaktionsbedingungen der Methanisierung durch erneuerbare Energien wie zum Beispiel Windkraft zu decken, sind enorme Kapazitäten notwendig: Der in der deutschen Nordsee gebaute Windpark Alpha Ventus soll bis 2030 auf eine Kapazität von 20-25 GW erweitert werden (zum Vergleich: Die gesamte Windkraftkapazität Deutschlands 2020 betrug 62 GW). Diese gesamte Leistung würde benötigt, um die Polymernachfrage Deutschlands (Stand 2011!) mit dem Sabatier-Prozess zu bedienen [13]. Als Beispiel für CCU-Technologien, die keinen Wasserstoff zur Aktivierung verwenden, ist die Synthese von zyklischen Carbonaten zu nennen. Dieser Prozess wurde bereits in den 1950er Jahren industriell etabliert und katalysiert die Reaktion von CO_2 und Epoxiden zu Ethylen- und Propylencarbonat, welches Ausgangsstoffe für die Produktion von Polymeren wie Polyurethan und Polycarbonaten sind [83]. Auch die Harnstoffsynthese ist ein Prozess, in dem CO_2 ohne Beteiligung von Wasserstoff fixiert wird. Die Produktion der Edukte ist in beiden Fällen mit einem hohen Energieaufwand und dem damit einhergehenden CO_2 -Ausstoß verbunden, was eine Zuordnung zu nachhaltigen CCU-Technologien fraglich erscheinen lässt.

Den herkömmlichen chemischen CCU-Technologien ist also gemein, dass Ausgangsstoffe benötigt werden, deren Synthese weitestgehend auf fossilen Rohstoffen basiert. Zusätzlich werden in den meisten Verfahren zur chemischen CO_2 -Fixierung kostspielige Katalysatoren mit Metallkomplexen als aktiven Zentren benötigt. Auf diese Weise katalysierte Reaktionen resultieren oft in unbeabsichtigten Nebenreaktionen, die den Katalysatoren schaden und nur durch eine aufwändige Aufreinigung der Edukte unterbunden werden können. Trotz der Verwendung von Katalysatoren ist in chemischen CCU-Prozessen die Aufrechterhaltung teils extrem hoher Temperaturen und Drucke erforderlich, damit die Reaktionen exotherm ablaufen können [13]. Diese

Faktoren führen zu zusätzlichem Energieaufwand, wodurch es unmöglich ist, eine neutrale Kohlenstoffbilanz zu erhalten. Aus diesem Grund rückt zunehmend die Erforschung alternativer CCU-Technologien, abseits chemischer Methoden, in den Fokus.

1.3 Biotechnologie als Grundlage von CCU-Technologien

Ein vielversprechendes Feld für die Erforschung nachhaltiger CCU-Technologien bietet die Biotechnologie, die den Einsatz biologischer Systeme mit technischer Prozessführung verbindet. Die Grundlage bilden dabei chemische Reaktionen, die von Enzymen katalysiert werden, die entweder frei oder in den Zellen lebender (Mikro-)Organismen vorliegen können. Sie haben den Vorteil, dass sie unter physiologischen Bedingungen arbeiten und eine höhere Toleranz gegenüber verunreinigten Edukten besitzen. Werden Mikroorganismen verwendet, besteht zudem der Vorteil der Selbstregeneration des Katalysators. Während die Synthese komplexer Verbindungen in der chemischen Industrie viele verschiedene Schritte erfordert, können diese mit Mikroorganismen oft in einem Batch durchgeführt werden [97]. Zudem sind enzymatische Reaktionen hoch spezifisch, was vor allem in der Produktion von Feinchemikalien von großem Wert ist [74]. Das Produktspektrum ist der hohen biologischen Vielfalt entsprechend sehr breit gefächert und Gegenstand fortlaufender biotechnologischer Forschung. Im Feld der CCU-Fragestellung finden sich biologische Lösungen, die Vorbilder in Sachen Nachhaltigkeit sind. Das wohl prominenteste Beispiel ist dabei die an die CO₂-Fixierung gekoppelte Photosynthese, in der Licht als Energiequelle verwendet wird. Die Menge an Sonnenenergie, die in einer Stunde auf der Erde ankommt, ist größer als der jährliche Energiebedarf der Menschheit, was sie zur am meisten verfügbaren Energieform auf dem Planeten macht [6, 55]. In der Vergangenheit wurden beachtliche technologische Fortschritte in der Nutzung dieser Energiequelle erzielt. So stellten Photovoltaiksysteme in Deutschland Ende des Jahres 2019, nach Windkraftanlagen, mit 47,5 GW den zweitgrößten Anteil an erneuerbaren Energien zur Verfügung [1]. Zur Photosynthese befähigte Organismen können als natürliches Äquivalent zu Photovoltaikzellen gesehen werden. Schätzungsweise 1 % der gesamten auf der Erde eintreffenden Sonnenenergie wird von phototrophen Organismen verwendet, um jährlich ca. 104,9 Gigatonnen CO₂ zu fixieren [31, 120]. Eine gezielte Nutzung solcher photoautotrophen Organismen zur Produktion von chemischen Wertstoffen würde in solarbetriebenen Zellfabriken resultieren, die CO₂-neutral agieren und zu einer kreislaufbasierten Wirtschaft beitragen könnten. Aus

diesem Grund gewann der Forschungsbereich, CO₂ in Photobioreaktoren zu chemischen Wertstoffen zu konvertieren, in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung. Die dafür essentiellen physiologischen Prozesse werden im Folgenden beschrieben.

1.3.1 Photosynthese: Die Lichtreaktion

Phototrophie definiert eine Form des Metabolismus, in der Organismen Licht zur Erzeugung chemischer Energie nutzen. Der zugrundeliegende Prozess wird als Photosynthese bezeichnet und umfasst die Umwandlung der Strahlungsenergie des Lichts mit Hilfe spezieller Pigmente in ein elektrochemisches Potential. Diese Umwandlung wird auch als Lichtreaktion bezeichnet. Die erzeugte chemische Energie wird anschließend in einer lichtunabhängigen Reaktion (Dunkelreaktion s.u.) genutzt, um energiereiche organische Substanzen durch Fixierung von CO₂ zu synthetisieren.

Es gibt verschiedene Varianten der Photosynthese, denen allen dasselbe Prinzip zu Grunde liegt: In membrangebundenen Photosystemen "sammeln" sogenannte Lichtsammelkomplexe Lichtenergie. Sie bestehen aus zahlreichen in Antennen angeordneten Komplexen, die Pigmente wie Chlorophylle, Carotenoide und Phycobiline enthalten und eine definierte Menge an Anregungsenergie, auch Exziton genannt, zu einem zentralen chlorophyllhaltigen Reaktionszentrum transportieren. Der Transport erfolgt dabei in Form kurzlebig angeregter Molekülzustände von aneinandergereihten Pigmenten. Das im Reaktionszentrum enthaltenen Chromophor wird von der transportierten Lichtenergie in einen angeregten Zustand versetzt, wodurch es zu einem starken Reduktionsmittel wird und ein Elektron auf einen primären Akzeptor transferiert; es kommt zur Ladungstrennung. Von dort aus durchläuft das Elektron eine protonentransduzierende Elektronentransportkette, die funktionale Ähnlichkeiten zur Atmungskette aufweist. Die dabei generierte protonenmotorische Kraft kann von der ATP-Synthase zur Produktion von ATP genutzt werden. Dieser Prozess wird auch Photophosphorylierung genannt. Die Photosyntheseapparate sind meist in speziellen Membransystemen lokalisiert, die der Oberflächenvergrößerung dienen. Sie werden intracytoplasmatische Membranen oder auch Thylakoide genannt und können in Form von Röhren, Vesikeln oder Lamellen angeordnet sein. Je nach Aufbau und Funktion der darin enthaltenen Photosystemen wird in oxygene und anoxygene Photosynthese unterschieden (Abbildung 1) [35].

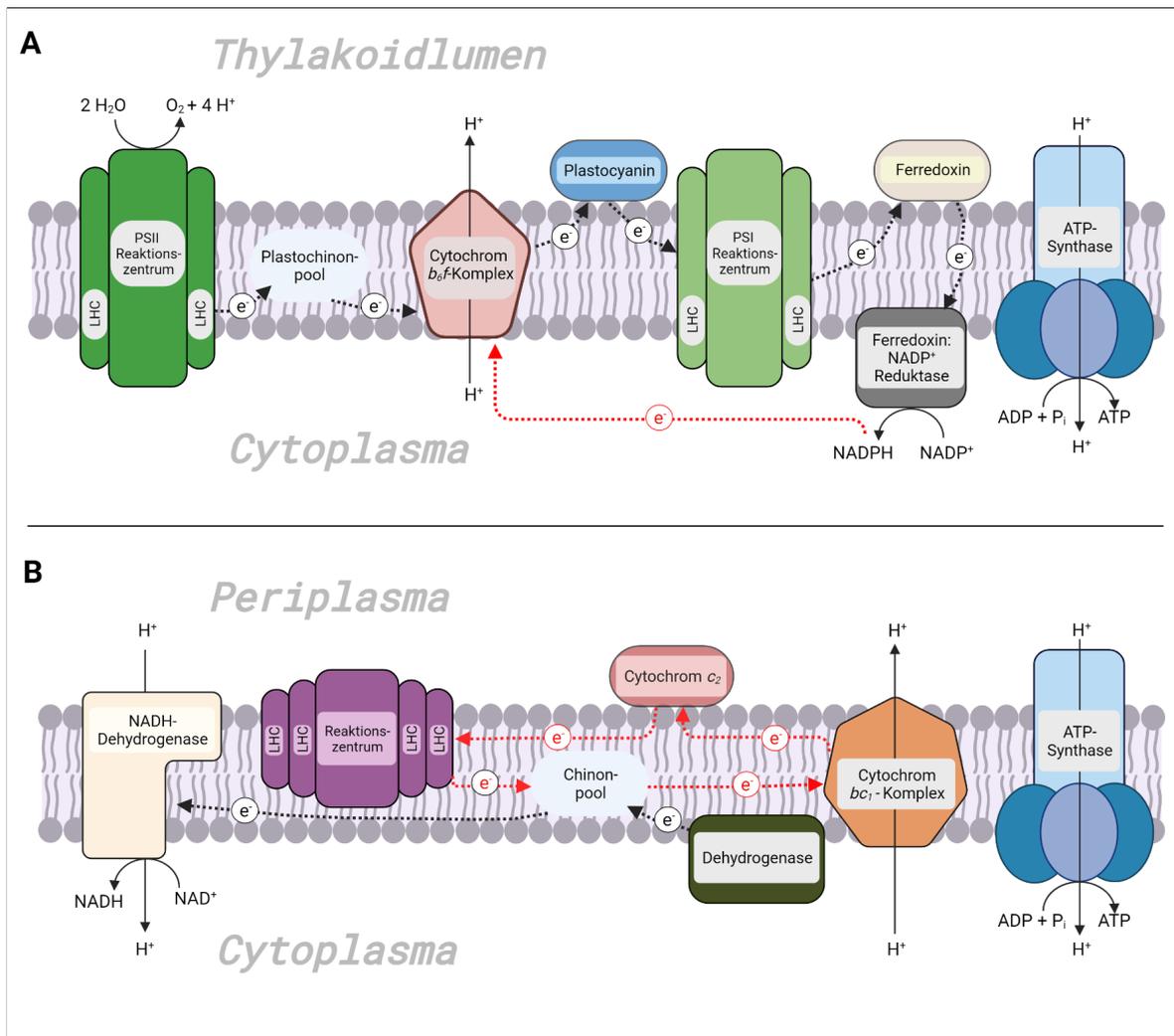


ABBILDUNG 1: Schematische Darstellung des Elektronenflusses in der Photosynthese. Verändert nach Stephens *et al.* [125]. A: Oxygene Photosynthese mit Photosystem I und II. B: Anoxygene Photosynthese am Beispiel eines Typ II-Photosystems. Wege des zyklischen Elektronenflusses sind in rot dargestellt. Eine detaillierte Beschreibung erfolgt im Text. LHC = Lichtsammelkomplex.

Oxygene Photosynthese

Die oxygene Photosynthese wird ausschließlich von Pflanzen, Algen und Cyanobakterien betrieben. Die Chloroplasten, in denen die Photosynthese der Pflanzen und Algen abläuft, haben ihren Ursprung in den Cyanobakterien, weshalb diese im Folgenden näher beschrieben werden. In der oxygenen Photosynthese dient die Spaltung von Wasser als Elektronendonator, wobei der Sauerstoff freigesetzt wird, der für die Namensgebung verantwortlich ist. Cyanobakterien besitzen zwei Arten von Photosystemen, wovon Photosystem II (PS II) ein starkes Oxidationsmittel für die Wasserspaltung und PS I ein starkes Reduktionsmittel für die Reduktion von NADP⁺ bereitstellt. PS II nutzt dabei ein spezielles Chlorophyllpaar (Chl *a*) mit

einem Absorptionsmaximum bei 680 nm (P_{680}) als Reaktionszentrum. Wird dieses *spezielle Paar* durch Lichtenergie angeregt, ist es ein starkes Reduktionsmittel (P_{680}^* , $E^{0'} = -0,7$ V) und gibt ein Elektron an Phäophytin, den primären Elektronenakzeptor, ab. Das Chlorophyll wird dabei zu P_{680}^+ mit einem Redoxpotential von $E^{0'} = +1,15$ V oxidiert, das in der Lage ist, seinen Elektronenbestand mit der Wasserspaltung aufzufüllen. Das transferierte Elektron wird vom Phäophytin über Plastochinon in eine transmembrane Elektronentransportkette überführt, in der es im Cytochrom *b₆f*-Komplex eine Protonentranslokation durch die Membran bewirkt. Nachdem es den Cytochrom *b₆f*-Komplex durchlaufen hat, wird das Elektron über Plastocyanin zum PSI (P_{700}) transportiert, wo es durch eine zweite Lichtreaktion erneut angeregt und über mehrere Chinon- und Eisen-Schwefel Zentren in der Membran auf Ferredoxin übertragen wird. Die Ferredoxin:NADP⁺-Reduktase reduziert letztendlich NADP⁺. Zwei Durchläufe dieses Weges ergeben ein reduziertes NADPH. Wird zusätzliche Energie in Form von ATP benötigt, kann ein Prozess genutzt werden, der zyklische Phosphorylierung genannt wird: Elektronen werden von NADPH zurück zum protonentransduzierenden *b₆f*-Komplex transportiert und fließen danach auf einem niedrigeren Energieniveau zurück zum PS I, wo sie erneut angeregt werden. Diese zyklische Phosphorylierung entspricht einem Steuerprozess, der auf den Bedarf an NADPH bzw. ATP reagiert, um so das intrazelluläre Gleichgewicht dieser Komponenten zu erhalten [56, 68].

Anoxygene Photosynthese

Alle sonstigen phototrophen Bakterien betreiben anoxygene Photosynthese. Im Gegensatz zur oxygenen Photosynthese wird nur ein Photosystem (Typ II oder Typ I) mit Bakteriochlorophyll als *speziellem Paar* genutzt. Nach der lichtgetriebenen Ladungstrennung werden die Elektronen vom reduzierten primären Akzeptor in einem zyklischen Elektronentransport zurück zum oxidierten Zentrum des Photosystems geleitet. Dabei wird mit Hilfe des Cytochrom *bc₁*-Komplex, analog zum *b₆f*-Komplex der Cyanobakterien, ein Protonengradient gebildet, der der ATP-Synthese dient. Der Durchlauf eines Elektrons ist mit der Ausschleusung von zwei Protonen gekoppelt. Cytochrom *c* übernimmt die Aufgabe vom Plastocyanin der Cyanobakterien. Typ II und Typ I Photosysteme unterscheiden sich sowohl durch ihre Absorptionsmaxima (Typ II: 870 nm, Typ I: 840 nm) als auch durch die Redoxpotentiale ihrer Reaktionszentren und dementsprechend ihrer primären Elektronenakzeptoren nach der Ladungstrennung. Typ II Photosysteme, mit einem geringfügig positiveren Redoxpotential, nutzen hierfür ein Chinon mit Kontakt zum in der Membran lokalisierten Chinonpool. Diese Art von Photosystemen ist in Purpurbakterien und grünen Nicht-Schwefelbakterien vertreten. Typ I Photosysteme, mit geringfügig negativerem

Redoxpotential, nutzen dagegen ein FeS Protein mit Kontakt zu Ferredoxin als primären Elektronenakzeptor. Photosysteme dieses Typs kommen vor allem in grünen Schwefelbakterien und Heliobakterien vor. Sollen Reduktionsäquivalente in Form von NAD(P)H generiert werden, müssen externe Elektronendonoren verwendet werden, um die entstehende Elektronenlücke zu schließen. Dabei kann kein Wasser, sondern es können lediglich reduzierte organische oder anorganische Verbindungen verwendet werden. Diese werden durch gewöhnliche im Stoffwechsel vorhandene Dehydrogenasen oxidiert und die erhaltenen Elektronen auf der Stufe von Chinon oder Cytochrom *c* in die Elektronentransportkette eingeschleust [35]. In Typ I Photosystemen können Elektronen nach der lichtabhängigen Anregung dank des ausreichend negativen Redoxpotentials von Ferredoxin direkt auf NAD(P)⁺ übertragen werden. Typ II Systeme, die kein Ferredoxin nutzen, verwenden reduziertes Chinon zur NAD(P)⁺ Reduktion. Da Chinon ein positiveres Redoxpotential als NAD(P)⁺ hat, muss ein rückläufiger (auch: reverser) Elektronentransport erfolgen, der einer Umkehr der Reaktion der NADH:Ubichinon Reduktase (Komplex I der Atmungskette) entspricht. So kann NAD(P)⁺ mit Hilfe der protonenmotorischen Kraft entgegen des thermodynamischen Gradienten zu NAD(P)H reduziert werden [51, 123].

1.3.2 Calvin Zyklus: Die Dunkelreaktion

Reduktionsäquivalente und ATP aus der Lichtreaktion werden in der Dunkelreaktion verwendet, um durch die Fixierung von CO₂ energiereiche Biomoleküle zu synthetisieren (= Photoautotrophie). Der im globalen Maßstab quantitativ bedeutendste CO₂-Fixierungsprozess ist der Calvin Zyklus (Abbildung 2). Er wurde von 1946 bis Mitte der 1950er Jahre von Andrew A. Benson, James Alan Bassham und Melvin Calvin aufgeklärt und läuft im Cytoplasma von Bakterien bzw. im Stroma eukaryotischer Chloroplasten ab. Insgesamt sind 11 Enzyme beteiligt, die eine Reihe von 13 Reaktionen katalysieren. Die initiale kohlenstofffixierende Reaktion wird dabei von der Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RuBisCO) katalysiert, die ein CO₂ an die reaktive Endiolatform des Akzeptormoleküls Ribulose-1,5-Bisphosphat (RuBP) bindet. Das gebildete C₆-Intermediat ist instabil und hydrolysiert zu zwei Molekülen 3-Phosphoglycerat (3-PG), von denen eines das gebundene CO₂ enthält. Im weiteren Verlauf werden durch Folgereaktionen zwei Moleküle Glycerinaldehyd-3-Phosphat (G3P) gebildet, wobei 2 ATP und 2 NADPH verbraucht werden. G3P steht im chemischen Gleichgewicht zu Dihydroxyacetonphosphat (DHAP), wobei beide Moleküle als Triosephosphate bezeichnet werden. Nach dreimaliger Ausführung der beschriebenen Reaktionen kann ein überschüssiges Triosephosphat den Zyklus

verlassen. Die übrigen fünf Triosephosphate bilden die Ausgangsstoffe für die regenerative Phase des Calvin Zyklus, in der in einer Serie von Reaktionen, die unter anderem von der ATP-verbrauchenden Ribulose-5-Phosphat-Kinase katalysiert werden, das CO_2 -Akzeptormolekül RuBP wiederhergestellt wird. Das Triosephosphat, das den Zyklus verlässt, steht für Biosynthesen zur Verfügung. Es stellt dabei den Ausgangsstoff für Prozesse wie der Stärkeproduktion, der Gluconeogenese sowie der Synthese von Saccharose dar. Durch Reaktionen der Gluconeogenese kann Pyruvat als Intermediat gebildet werden, welches ein Schlüsselmolekül darstellt, aus dem oder aus dessen Folgeintermediaten eine Vielzahl komplexer Synthesen möglich ist. Desweiteren stellt der Calvin Zyklus auch Ausgangsstoffe für eine Reihe anderer anaboler Prozesse zur Verfügung. Genannt sei hierbei die Synthese von Aminosäuren und sekundären Stoffwechselprodukten im Shikimatweg, die Isoprenoidsynthese und die Zellwandsynthese [101]. Er nimmt damit eine zentrale Rolle im Kohlenstoffmetabolismus autotropher Organismen ein. Schlüsselenzyme sind dabei die kohlenstofffixierende RuBisCO sowie die Ribulose-5-Phosphat-Kinase im regenerativen Teil des Zyklus. Erstere hat eine sogenannte Oxygenase-Nebenaktivität, in der sie die Reaktion von Sauerstoff mit dem primären Akzeptormolekül Ribulose-1,5-Bisphosphat katalysiert. Durch diese Reaktion wird ein Peroxid gebildet, das zu 3-Phosphoglycerat und Phosphoglycolat zerfällt. Letzteres hat negative Auswirkungen auf den Stoffwechsel und muss im energieverbrauchenden Prozess der Photorespiration abgebaut werden. Die Oxygenasereaktion der RuBisCO tritt, abhängig von Temperatur und CO_2 -Sättigung, mit einer Rate von 20 bis 40 % auf, wobei die Verwertung des dabei gebildeten Phosphoglycolat ca. 30 % der durch die Photosynthese bereitgestellten Energie benötigt [114]. Erklärungen zur Fehleranfälligkeit des Enzyms greifen dessen historischen Kontext auf: Die RuBisCO trat zu Zeiten in Erscheinung, in denen kein Sauerstoff in der Atmosphäre vorhanden war, sodass der Prozess keine Sauerstoffresistenz aufweisen musste. Die Fähigkeit zur Selektion zwischen O_2 und CO_2 wurde somit erst mit steigender atmosphärischer Sauerstoffkonzentration erforderlich [29]. Selektivität bedeutet für Enzyme eine verringerte Wechselzahl, welche im Fall der RuBisCO lediglich zwischen 1 und 10 s^{-1} liegt. Aus diesem Grund tritt sie in ähnlichen Konzentrationen wie das Substrat CO_2 auf, was bis zu 20 % des Proteingehalts autotropher Zellen ausmachen kann [35].

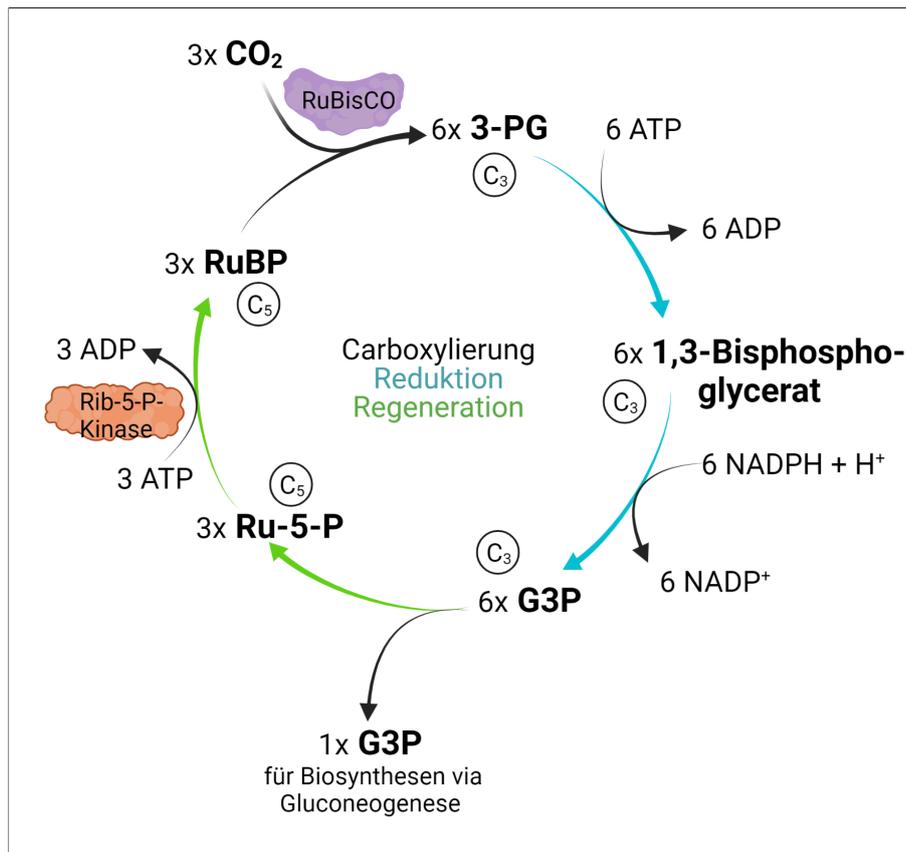


ABBILDUNG 2: Vereinfachte schematische Darstellung des Calvin Zyklus. Die drei Phasen, Carboxylierung, Reduktion und Regeneration des Akzeptors sind farblich markiert. Eine detaillierte Beschreibung erfolgt im Text. 3-PG = 3-Phosphoglycerat, G3P = Glycerinaldehyd-3-Phosphat, Ru-5-P = Ribulose-5-Phosphat, RuBP = Ribulose-1,5-Bisphosphat, Rib-5-P-Kinase = Ribulose-5-Phosphat-Kinase.

1.3.3 Implikationen photosynthetischer CCU-Technologien

Bei der industriellen Nutzung photoautotropher Organismen als Grundlage von CCU-Technologien ergeben sich spezielle Sachverhalte, die durch deren physiologische Merkmale bedingt sind. Diese sind sowohl mit Vor- als auch mit Nachteilen verbunden, die im Folgenden erörtert werden.

Der schnelle Forschungsfortschritt im Bereich des *metabolic engineering* ermöglicht die Optimierung von Produktionsstämmen im Hinblick auf die drei wichtigsten Ziele der Biotechnologie. Diese Ziele sind die Maximierung der Produktkonzentration, der Ausbeute und der Produktivität, deren Erreichung oft mit einer Ummodellierung des natürlichen Kohlenstoffflusses verbunden ist [155]. Mit der Transformation von Zellen zu industriellen Zellfabriken ergeben sich oft physiologische Engpässe, die ohne tiefgreifendes biologisches Wissen nicht behoben werden können. So müssen Zellfabriken abseits der industriell relevanten Stoffwechselwege für die Erhaltung ihres eigenen Stoffwechsels sorgen. Hierzu zählt neben der kohlenstoffbasierten

anabolen Synthese zelleigener Substanzen auch die Aufrechterhaltung der intrazellulären Balance zwischen Energie- und Reduktionsäquivalenten. Heterotrophe Produktionsstämme sind beispielsweise oft dadurch limitiert, ausreichend ATP und NADH für stark beanspruchte Stoffwechselwege bereitzustellen [48]. Eine Möglichkeit, diese Limitierung zu umgehen, ist die Zugabe von Hilfssubstraten, die eine erhöhte ATP bzw. NADH-Versorgung sicherstellen. So wird beispielsweise mit der Zugabe von Citrat ein Substrat für Dehydrogenasen des TCA-Zyklus bereitgestellt, wodurch mehr Elektronen in die Atmungskette eingeschleust werden können. Der daraus resultierende Beitrag zur Generierung der protonenmotorischen Kraft bewirkt eine erhöhte ATP-Synthese, die durch eine Überexpression der Dehydrogenasen noch weiter gesteigert werden kann. In *Lactobacillus panis* führte diese Strategie zu schnellerem Zellwachstum mit gesteigerter glucosebasierter Laktatproduktion [61]. Die Zugabe von Hilfssubstraten erhöht jedoch die Gesamtkosten von industriellen Bioproduktionen und ist aus wirtschaftlicher Sicht deshalb nur selten eine Option. Unter Bedingungen, in denen Licht im Überfluss bereitgestellt wird, haben photosynthetische Organismen das gegenteilige Problem zu bewältigen. Ist wenig Kohlenstoff vorhanden, kann die Effizienz der Lichtsammelkomplexe dazu führen, dass der Chinonpool überreduziert wird. Um die intrazelluläre Redox-Balance aufrechtzuerhalten (= Photostasis), sind Wege erforderlich, die überschüssigen Elektronen zu verwerten. Dies kann beispielsweise durch Reduktion von Elektronenakzeptoren wie Nitrat in einer anaeroben Atmung erfolgen [30]. Unter CO₂-reichen Bedingungen wird die Calvin-Zyklus vermittelte CO₂-Fixierung als Elektronenakzeptor verwendet, was in der Bildung von Biomolekülen und somit in Wachstum resultiert [52, 138]. Folglich würde dieser Ausgleichsprozess in einem Stamm, der für die Produktion von Kohlenwasserstoff-basierten Wertstoffen optimiert ist, in einer erhöhten Produktausbeute resultieren. Diese Eigenschaft bildet eine solide Grundlage für die energieaufwändige Produktion komplexer Substanzen und ist Gegenstand laufender Forschung [68].

Ein weiterer prozesstechnischer Vorteil ist die Natur des Substratspektrums photolithoautotropher Produktionsstämme. So kann CO₂ als Kohlenstoffquelle, Licht als Energiequelle und Wasserstoff als Quelle für Reduktionsäquivalente genutzt werden. Während CO₂ als Kohlenstoffquelle wie bereits beschrieben positive Auswirkungen auf die Nachhaltigkeit hat, akkumulieren mit den übrigen Substraten keine oxidierten Reste im Reaktor, wodurch eine kontinuierliche Prozessführung erleichtert wird. Diese Form der Prozessführung ist in der Industrie besonders gefragt, da sie sich durch verringerten zeitlichen Aufwand für die Vorbereitung und Säuberung des Reaktors sowie für die Anzucht der Zellkultur auszeichnet [106]. Desweiteren sind personelle Anforderungen durch eine vereinfachte Möglichkeit zur Prozessautomatisierung

geringer, was kontinuierliche Systeme insgesamt kosteneffizienter als Batch oder Fed-Batch-Systeme gestaltet [59].

Die Vorteile phototropher Organismen sind eng an Herausforderungen in der Prozessführung geknüpft, die eine industrielle Anwendung oftmals erschweren. Um Produktionskosten zu senken und die CO₂-Bilanz positiv zu gestalten, sollten keine künstlichen Lichtquellen zur Beleuchtung der Reaktoren eingesetzt werden. Dies führt den Prozess in eine Abhängigkeit von schwer zu beeinflussenden Faktoren wie den verfügbaren Tagessonnenstunden [32]. Zudem ist das Design von Photobioreaktoren besonders anspruchsvoll, da zur Aufrechterhaltung der Produktivität eine durchgängige Beleuchtung gewährleistet sein muss. Zerstreuung und Schattierungseffekte in dichten Zellkulturen schwächen das Licht jedoch mit zunehmender Reaktortiefe ab. Eine Möglichkeit zur Aufrechterhaltung einer gleichmäßigen Beleuchtung stellt die Lichtleitertechnologie dar, in der Licht durch Reflexion innerhalb eines Leiters transportiert wird. Auf der Oberfläche des Lichtleiters wird das transportierte Licht schrittweise freigesetzt, wodurch eine effektive Beleuchtung auch innerhalb des Reaktors ermöglicht wird. Ein zusätzlicher Effekt ist hierbei, dass die Oberfläche des Lichtleiters als Oberfläche zur Anlagerung von Biofilm genutzt werden kann, was aus prozesstechnischer Sicht vorteilhaft sein kann [57]. So wird die Aufreinigung der Zellmasse erleichtert, da ein deutlich geringeres Reaktor- und Medienvolumen für die Kultivierung notwendig ist. Die daraus resultierende höhere Zelldichte erfordert eine geringere Entwässerung, was eine energieeffizientere Ernte der Biomasse ermöglicht [72]. Während Biofilm eine verbesserte Prozessstabilität bewirkt, kann darüber hinaus die volumetrische Produktivität im Vergleich zu planktonischen Zellkulturen erhöht sein, wie es am Beispiel von wasserstoffproduzierenden Purpurbakterien gezeigt wurde [19, 43]. Immobilisierter Biofilm führt darüber hinaus zu einer erhöhten Zellretention, da die Biomasse nicht aus dem Reaktor getragen wird. Somit sind anspruchsvolle Aufbauten zur Biomasserückhaltung überflüssig, was wiederum eine kontinuierliche Prozessführung begünstigt [59]. Auch die Wiederverwertung der Bakterienkultur ist durch immobilisierte Zellen erleichtert, da das biofilmtragende Modul in neue Reaktoren übertragen werden kann. Da hierbei nur wenig Biomasse verloren geht, fällt eine erneute, der Inokulation folgende Wachstumsphase deutlich kürzer aus.

Angesichts dieser Hintergründe besteht das Ziel aktueller biotechnologischer Forschung darin, wettbewerbsfähige photoautotrophe Zellfabriken zu erstellen, um somit deren bioökonomischen Stärken ausspielen zu können. Hierbei werden Ansätze der synthetischen Biologie verfolgt, die sich einerseits mit der Erschließung und Optimierung potentieller und vorhandener Produktionsstämme beschäftigen

und andererseits völlig neue Innovationen zur Etablierung und Steigerung der Leistungsfähigkeit photosynthetischer Produktionsprozesse bereitstellen.

1.3.4 Ansätze zur Optimierung photoautotropher Produktionsprozesse

Ein oft beschriebener Ansatzpunkt zur Optimierung photoautotropher Produktionsprozesse ist die CO₂-fixierende RuBisCO, deren Effizienz sowohl durch eine geringe Wechselzahl als auch die Oxygenase-Nebenreaktion beeinträchtigt wird. In Studien mit Vorgängern der heutigen RuBisCO wurde beispielsweise versucht, eine Verbesserung der Sauerstofftoleranz durch künstliche Evolution unter hohen Sauerstoffkonzentrationen zu erreichen [118]. Auch umfassendere Optimierungskonzepte wurden verfolgt. So sollten die Erzeugnisse der Oxygenase-Nebenreaktion mit Hilfe einer synthetisch optimierten Photorespiration zu Pyruvat umgesetzt und für den Organismus nutzbar gemacht werden. Die Funktionalität des dafür integrierten Stoffwechselweges wurde durch eine RuBisCO-unabhängige Fixierung von CO₂ unterstützt [117]. Die Etablierung von CO₂-Fixierungswegen, die gänzlich unabhängig von der RuBisCO arbeiten, ist ein weiterer wichtiger Ansatzpunkt laufender Forschung. Der synthetische CETCH-Zyklus wurde beispielsweise aus 17 verschiedenen Enzymen designt, die aus neun verschiedenen Organismen stammen, wodurch eine ähnliche CO₂-Fixierungsrate zu der des Calvin Zyklus *in vitro* erreicht werden konnte. Die Substitution des Calvin Zyklus in Organismen gestaltet sich jedoch als schwierig, da er, wie zuvor beschrieben, tief im Metabolismus verankert ist und somit viele verschiedene Funktionen erfüllt werden müssen [114].

Auch auf Seiten der Lichtreaktion gibt es Ansätze zur Optimierung, die eine industrielle Nutzung der Photosynthese begünstigen sollen. Die Vielfalt dieser Ansätze ist groß, weshalb im Folgenden nur einige Beispiele genannt werden sollen. Die Lichtsammelkomplexe photosynthetischer Organismen arbeiten so effektiv, dass die Reaktionszentren die transportierte Energie bei hoher Lichteinstrahlung nicht schnell genug verwerten können und sie deshalb über Ausgleichsmechanismen in Form von Wärme wieder freisetzen [90, 112]. So wird geschätzt, dass zeitweise bis zu 75 % der gesammelten Photonen nicht verwertet werden [80]. Ein Ziel ist es deshalb, die Mechanismen zur Nutzung dieser Energie zu verbessern, was sowohl durch eine optimierte dreidimensionale Anordnung der Antennenkomplexe als auch eine Optimierung der Konzentration an Chromophoren erreicht werden könnte [112]. Durch eine effektivere Nutzung der Photonen stünden mehr Elektronen zur Verfügung, die in die Produktion chemischer Wertstoffe geleitet und so einen Beitrag zur Steigerung der Produktivität leisten könnten. Ein weiterer Ansatz hierbei ist die

Reduzierung der Größe der Lichtsammelkomplexe. Kleinere Lichtsammelkomplexe tragen dazu bei, dass Photosysteme nur so viel Lichtenergie sammeln, wie ihre Reaktionszentren verwerten können. Die Produktivität einzelner Photosysteme wird dadurch nicht verbessert, wohl aber die Produktivität der gesamten Zellkultur, da das Licht tiefer in Reaktoren eindringen kann und somit für mehr Zellen zur Verfügung steht [87]. Eine Innovation in der Nutzung der Photosynthese präsentierte die Arbeitsgruppe Erb im Jahr 2020 [84]. Sie verfolgte den Ansatz einer künstlichen Photosynthese, die unter *in vitro* Bedingungen arbeitet. Durch Imitation pflanzlicher Chloroplasten mittels mikrofluidischer Systeme wurde ein Milieu erschaffen, das aufgereinigten photosynthetischen Membranen die Durchführung der Lichtreaktion ermöglichte. Das dadurch produzierte ATP und NADPH wurde durch Kopplung mit dem zuvor erwähnten CETCH-Zyklus zur Fixierung von CO₂ und der nachfolgenden Produktion organischer Säuren genutzt. Auch wenn Eigenschaften wie Selbstreparatur, Reproduktion, Informationsverarbeitung und Regulation noch nicht vorhanden sind, stellt diese Arbeit eine wichtige Grundlage zur Realisierung von synthetischen Organellen dar und demonstriert, wie die Anwendung synthetischer Biologie in Zukunft zu innovativen Lösungen bedeutender bioökonomischer Fragestellungen beitragen kann.

In dieser Arbeit wurde die mikrobielle Elektrosynthese im Hinblick auf ihre Eignung als CCU-Technologie untersucht. Die mikrobielle Elektrosynthese wird in bioelektrochemischen Systemen betrieben, in denen die Interaktion des Produktionsstammes mit einer Elektrode die Grundlage zur Überwindung prozesstechnischer und ökonomischer Limitierungen darstellen kann. Dafür sollten sowohl die beschriebenen Vorteile der Photosynthese als auch die CO₂-fixierenden Eigenschaften autotropher Mikroorganismen mit einer nachhaltigen Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten vereint werden. Die Grundlagen mikrobieller elektrochemischer Systeme werden im Folgenden beschrieben.

1.4 Mikrobielle Elektrochemie

Die Bioelektrochemie beschreibt den zellulären Metabolismus unter anderem als Abfolge von Redoxreaktionen. Der Zellstoffwechsel basiert demnach auf dem Zusammenspiel von Elektronendonoren und -akzeptoren, die organischer und anorganischer Natur sein können. Die Elektronenübertragung von Donoren mit niedrigerem zu Akzeptoren mit höherem elektrochemischen Potential führt dabei zur Freisetzung von Energie, die von der Zelle in anabolen Reaktionen genutzt wird. Die Übertragung

der Elektronen erfolgt dabei über Proteinkomplexe und Transportmoleküle. Die Substanz mit dem höchsten Redoxpotential wird auch als terminaler Elektronenakzeptor bezeichnet [136]. Mikroorganismen, die extrazelluläre Substanzen als terminalen Elektronenakzeptor nutzen, werden folglich als exoelektrogen bezeichnet [77]. Diese Eigenschaft kann in einem bioelektrochemischen System (BES) durch Interaktion mit einer Elektrode als terminalem Elektronendonator oder -akzeptor als Grundlage technischer Anwendungen genutzt werden.

1.4.1 Elektronentransport in exoelektrogenen Mikroorganismen

Ein Modellorganismus für die Nutzung extrazellulärer Elektronenakzeptoren ist das Gramnegative γ -Proteobakterium *Shewanella oneidensis*. Durch den sogenannten extrazellulären Elektronentransfer (EET) werden respiratorische Elektronen aus der Cytoplasmamembran durch das Periplasma und über die äußere Membran aus der Zelle transportiert (Abbildung 3). Für den Transport wird ein Netzwerk aus *c*-Typ Cytochromen verwendet, die Hämgruppen als prosthetische Gruppe enthalten. In den Hämgruppen enthaltene Eisenatome können durch Wechsel ihres Oxidationszustandes Elektronen aufnehmen bzw. abgeben, was den *c*-Typ Cytochromen ihre leitfähige Eigenschaft verleiht. Der EET-Prozess in *S. oneidensis* beginnt mit dem Tetrahäm *c*-Typ Cytochrom CymA, welches Elektronen aus dem Chinonpool in der Cytoplasmamembran entnimmt und sie auf das Tetrahäm *c*-Typ Cytochrom STC oder alternativ auf das Flavoprotein FccA im Periplasma überträgt. Das Periplasma ist mit 25 Ångström zu breit für einen direkten Elektronentransport zur äußeren Membran, weshalb STC und FccA als Shuttleproteine fungieren, die den Kontakt zur äußeren Membran herstellen [33, 76]. An der äußeren Membran werden die Elektronen auf den heterotrimeren MtrABC-Komplex übertragen. MtrA dient dabei als Annahmestelle, die durch das β -Fassprotein MtrB mit der terminalen Reduktase MtrC in Kontakt steht. MtrC befindet sich an der Oberfläche der äußeren Membran und kann extrazelluläre Elektronenakzeptoren wie Eisen- und Manganoxide oder Stoffe wie Graphitelektroden reduzieren. Versuche mit *S. oneidensis* zeigten, dass diese Transportwege auch in entgegengesetzter Richtung ablaufen können. So konnte eine Reduktion von Fumarat oder Nitrat mit einer Kathode als alleiniger Elektronenquelle nachgewiesen werden. Durch Deletion von Bestandteilen der verlängerten Elektronentransportkette waren die Zellen hierzu nicht mehr in der Lage, was die Hypothese einer bidirektional fungierenden Elektronentransportkette, die einen direkten Kontakt zur Elektrode ermöglicht, unterstützt [108].

Ein weiterer Organismus, in dem eine direkte Interaktion mit einem extrazellulären

Elektronendonator beschrieben wurde, ist das eisenoxidierende Nicht-Schwefel Purpurbakterium *Rhodospseudomonas palustris*. In der Natur wird durch die extrazelluläre Oxidation von Eisen verhindert, dass sich oxidierte Eisenrückstände im Zellinneren ablagern. Das *c*-Typ Cytochrom PioA und das β -Fassprotein PioB ist dabei homolog zu MtrC und MtrB in *S. oneidensis*. Das *high-potential iron-sulfur* Protein (HIPIP) PioC übernimmt dabei die Rolle des periplasmatischen Shuttles, von dem angenommen wird, dass es Elektronen von PioA unter anderem zum photosynthetischen Reaktionszentrum transportiert. Die Deletion dieser Proteine in *R. palustris* TIE-1 resultierten in einer zu 30 % verringerten Aufnahme kathodischer Elektronen im Vergleich zum Wildtyp [7]. Davon abgesehen sind die Mechanismen zu dieser Form der Elektronenaufnahme noch größtenteils unerforscht und die geringen Aufnahmeraten wirken in bisherigen bioelektrochemischen Anwendungen limitierend.

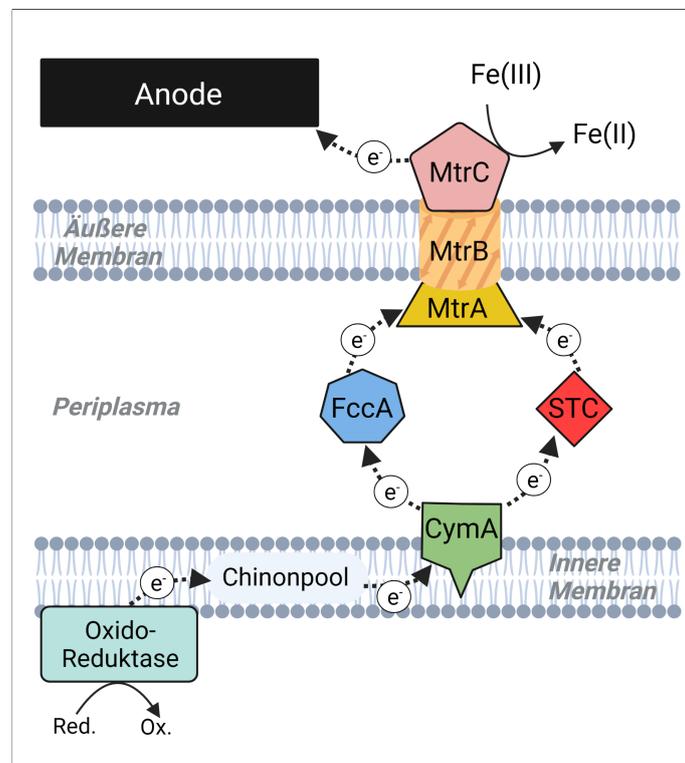


ABBILDUNG 3: Extrazellulärer Elektronentransport am Beispiel von *S. oneidensis*. Elektronen werden von CymA aus dem Chinonpool über die periplasmatischen Shuttleproteine STC und FccA zum MtrABC-Komplex übertragen. MtrC ist zur Reduktion extrazellulärer Elektronenakzeptoren befähigt.

1.4.2 Mikroben-Elektroden-Interaktion

Die Interaktion von Mikroorganismus und Elektrode ist ungeachtet der Anwendung ausschlaggebend für die Effizienz bioelektrochemischer Systeme und somit ein Schlüsselpunkt zur Optimierung deren Produktivität. Die Art des Elektronentransfers lässt sich in zwei grundlegende Mechanismen einteilen.

Direkter Elektronentransfer

Der direkte Elektronentransfer wird durch membranständige, redoxaktive Proteine vermittelt, die in direkten Kontakt zur Elektrode treten. Die Bildung von Biofilm ist dabei vorteilhaft, da sie zu einer direkten räumlichen Nähe zur Elektrode führt. Yang *et al.* [151] konnten zeigen, dass das Netzwerk aus Cytochromen Elektronen speichern und diese bei Kontakt zur Elektrode entladen kann, wodurch auch planktonische Kulturen für den direkten Elektronentransfer geeignet sind. Die Fähigkeit zum direkten Elektronentransfer kann durch die Ausbildung leitfähiger Zellfortsätze begünstigt werden. In *S. oneidensis* sind die dabei geformten Pili, auch Nanowires genannt, Ausstülpungen der äußeren Membran, die den Elektronentransport durch die enthaltenen *c*-Typ Cytochrome ermöglichen [94, 144]. In Biofilmen haben somit auch weiter entfernte Zellen Zugang zu einer Elektrode, was die Ausbildung mehrschichtiger elektroaktiver Biofilme ermöglicht [128].

Indirekter Elektronentransfer

Im indirekten Elektronentransfer vermitteln redoxaktive Shuttles durch Wechsel ihres Redoxzustandes den Kontakt zur Elektrode. An der Elektrode werden sie regeneriert, wodurch sie der Zelle erneut zur Verfügung stehen. Shuttle können endogen produzierte Moleküle wie Wasserstoff oder Flavine sein. Letztere werden beispielsweise von *S. oneidensis* produziert [142]. Auch artifizielle Redox-Mediatoren wie Thionin, Methylenblau und Benzylviologen wurden beschrieben [105]. Exogene Shuttles, die die Zellmembran passieren können, ermöglichen den Einsatz von nicht-exoelektrogenen Organismen in bioelektrochemischen Systemen, was jedoch mit Nachteilen wie erhöhten Kosten, begrenzter Halbwertszeit und einer problematischen Aufreinigung verbunden ist.

1.4.3 Aufbau und Anwendung bioelektrochemischer Systeme

Die Funktion eines BES ist es, elektrochemische Prozesse zwischen Elektroden und Biomolekülen zu ermöglichen [113]. Alle BES sind aus einer Arbeits- und einer Gegenelektrode aufgebaut, an denen je eine Teilreaktion einer Redoxreaktion abläuft.

Beide Elektroden befinden sich in einem Elektrolyt (2-Elektroden-Aufbau), der auch gleichzeitig das Kulturmedium für die Mikroorganismen darstellt, die mit der Arbeitselektrode interagieren. Als Arbeitselektroden werden Materialien verwendet, die neben einer hohen Leitfähigkeit und Biokompatibilität eine (bio)chemische Stabilität aufweisen. Dafür kommen Stoffe wie Graphit, Edelstahl, Platin oder Titan in Frage, wobei Graphit mit seiner porösen Oberflächenstruktur Mikroorganismen eine gute Zugänglichkeit bietet und die Anlagerung von Biofilm erleichtert. Falls Kreuzreaktionen zwischen Kathode und Anode zu erwarten sind, werden diese durch Separatoren, wie zum Beispiel Protonenaustauschmembranen, getrennt. Diese ermöglichen einen Ladungsaustausch durch die Migration von Protonen zwischen den Kompartimenten, halten andere Stoffe jedoch zurück. Sollen spezifische elektrochemische Bedingungen geschaffen werden, wird das System extern von einem Potentiostaten gesteuert. In diesem Fall wird eine Referenzelektrode als Bezugspunkt im System verwendet (3-Elektroden-Aufbau). Die beabsichtigte Anwendung legt fest, ob die Arbeitselektrode eine Kathode oder eine Anode ist. Mit einer Anode als Arbeitselektrode wird das BES als mikrobielle Brennstoffzelle oder mikrobielle Elektrolysezelle (MFC, Abbildung 4A) bezeichnet, mit einer Kathode als Arbeitselektrode dagegen als mikrobielle Elektrosynthesezelle (MES, Abbildung 4B). Neben diesen beiden grundlegenden Typen gibt es weitere Variationen, die jedoch auf dasselbe Prinzip zurückgreifen und deshalb an dieser Stelle nicht näher beschrieben werden sollen.

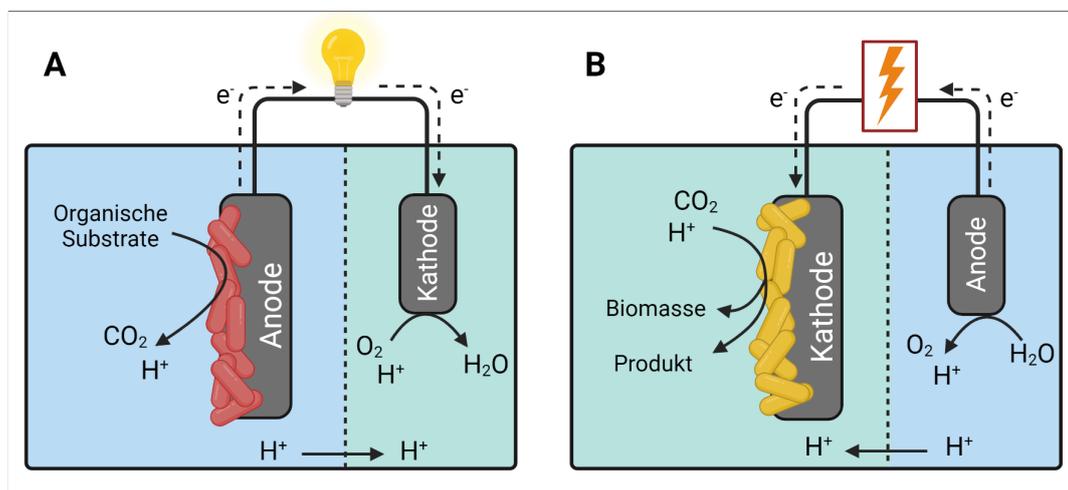


ABBILDUNG 4: Schematische Darstellung der Funktionsweise von bioelektrochemischen Systemen. A: Mikrobielle Brennstoffzelle (MFC) mit einer Anode als Arbeitselektrode. B: Mikrobielle Elektrosynthesezelle (MES) mit einer Kathode als Arbeitselektrode.

MFC - Mikrobielle Brennstoffzelle

In einer MFC fungiert die Anode als terminaler Elektronenakzeptor für den Metabolismus exoelektrogener Mikroorganismen. Das primäre Ziel ist der Abbau organischer Substanzen und die daraus resultierende Erzeugung von Strom. Im Anodenkompartiment findet die erste Redox-Teilreaktion statt, in der Mikroorganismen organische Substrate zu Substanzen wie Acetat und CO_2 oxidieren. Die dabei freigesetzten Elektronen werden nach deren Nutzung im Metabolismus auf die Anode übertragen. Diese Teilreaktion muss unter anoxischen Bedingungen ablaufen, da Sauerstoff als Elektronenakzeptor mit einem hohen Redoxpotential mit der Anode konkurrieren und so die Effizienz des Prozesses beeinträchtigen würde [102]. Von der Anode fließen die Elektronen zur Kathode, wo die zweite Redox-Teilreaktion abläuft und Sauerstoff und Protonen zu Wasser reduziert werden [27, 78]. MFCs sind die zur Zeit am besten erforschte BES-Technologie und finden bereits Anwendung im Kubikmeter-Maßstab [99, 110]. Das breite Substratspektrum ermöglicht den Einsatz in der Aufreinigung kommunaler oder industrieller Abwässer sowie der Bioremediation und Energiegewinnung in Sedimenten [40, 69, 134].

MES - Mikrobielle Elektrosynthese

Die mikrobielle Elektrosynthese (MES) nutzt eine Kathode als Elektronendonator für die mikrobielle Produktion von organischen Kohlenstoffverbindungen aus CO_2 . Sie kehrt damit das Prinzip der Reaktionen einer MFC um. Die Elektroden werden durch eine externe Spannungsquelle (Potentiostat) polarisiert, wodurch es an der Anode zur Spaltung von Wasser in Sauerstoff und Protonen kommt. Die dabei freigesetzten Elektronen fließen zur Kathode, wo sie auf Mikroorganismen übertragen werden. Durch den EET-vermittelten Import stehen die Elektronen für den Metabolismus bereit und können auf CO_2 als terminalen Elektronenakzeptor übertragen werden, durch dessen Fixierung anabole Synthesen ermöglicht werden [100]. Eine besondere Bedeutung hat dabei die Mikробen-Elektroden-Interaktion. Diese ist Gegenstand intensiver Forschung und steht im Hinblick auf eine mögliche Optimierung der Elektronentransferraten vor der Herausforderung, dass die Art des EETs oft nicht eindeutig bestimmt werden kann. Ein indirekter Elektronentransfer kann meist nicht ausgeschlossen werden, da die Möglichkeit zur kathodischen Wasserstoffproduktion besteht. Das Redoxpotential dieser Reaktion liegt unter Standardbedingungen bei $E^{0'} = -413 \text{ mV}$ gegenüber einer Standard-Wasserstoffelektrode (SHE). An einer Graphitelektrode wird dagegen meist ein Potential von -1000 mV vs SHE benötigt [5, 25]. Die Interaktion von Mikroorganismen mit der Kathode kann dieses Potential jedoch maßgeblich beeinflussen. Yates *et al.* [152] konnten eine Wasserstoffentwicklung an

einer Biokathode bereits ab einem Kathodenpotential von $E = -600$ mV nachweisen. Abhängig vom Wasserstoffpartialdruck und pH Wert kann diese Reaktion deutlich positivere Werte annehmen wie z.B. -89 mV bei pH 2 und einem Wasserstoffpartialdruck von 10^{-5} . Die genauen Mechanismen, die dieser Beobachtung zugrunde liegen sind unklar. Deutzmann und Spormann [25] konnten eine rein Enzym-basierte Produktion reduzierter Verbindungen durch extrazelluläre, an der Kathodenoberfläche assoziierter Hydrogenasen und Formiat-Dehydrogenasen nachweisen. Die Produktionsraten von Wasserstoff und Formiat waren ausreichend, um als Substrat für Zellwachstum zu dienen, wodurch ein direkter Elektronentransfer imitiert wurde. Diese Tatsachen erschweren eine Untersuchung der Elektronentransfermechanismen, da eine experimentelle Klarheit oft nicht gegeben ist.

In bisherigen MES-Anwendungen wurden vor allem kurzkettinge Kohlenwasserstoffe wie Acetat und Methan hergestellt. Acetat ist ein wichtiger Ausgangsstoff für diverse Synthesen, während die Methanproduktion durch Biogasanlagen die ökonomisch vorteilhaftere Variante darstellt [47].

1.4.4 Herausforderungen der mikrobiellen Elektrosynthese

Die mikrobielle Elektrosynthese birgt das Potential einer zukunftssträchtigen CCU-Technologie, da eine nachhaltige Produktion von Wertstoffen aus CO_2 ohne die beschriebenen Nachteile klassischer Verfahren ermöglicht wird. Dies eröffnet Perspektiven wie zum Beispiel die Nutzung als Speichertechnologie. Die Leistung regenerativer Energiequellen ist umweltbedingten Schwankungen unterworfen. An sehr sonnigen oder windigen Tagen wird elektrische Energie im Überschuss produziert, die nicht in das Stromnetz eingespeist werden kann. Anstatt die Anlagen abzuschalten, könnte diese Energie durch die Nutzung von MES-Technologien in Kohlenwasserstoffen konserviert werden. Trotz der Tatsache, dass sich bis zu 80 % der zugeführten Elektronen in den reduzierten chemischen Verbindungen wiederfinden [89], sind die Produktionsraten noch zu gering für entsprechende Anwendungen im industriellen Maßstab [26]. Eine Optimierung ist, wie bereits beschrieben (Absatz 1.4.2), nur durch tiefere Kenntnis von physiologischen Prozessen wie dem EET und der Mikrobelektroden-Interaktion der Biokatalysatoren möglich [107]. Entscheidend für die Weiterentwicklung der MES ist außerdem, Produktionsstämme zu finden, die den Herausforderungen einer energetisierten Kathode gewachsen sind. Neben der Resistenz gegen reaktive Sauerstoffspezies und Zellschäden aufgrund der reduktiven Umgebung muss eine gute genetische Zugänglichkeit sowie optimalerweise ein breites Produktspektrum gegeben sein [71]. Ein Transfer der Elektronen sollte zudem im Hinblick auf die Wirtschaftlichkeit ohne

artifizielle Mediatoren stattfinden. Desweiteren sollte die CO₂-Fixierung möglichst effizient an den Verbrauch kathodischer Elektronen gekoppelt sein. Bisher wurden nur wenige mögliche bakterielle Kandidaten beschrieben, die einige dieser Kriterien erfüllen. Dazu zählen vor allem methanogene und acetogene Organismen [89]. Diese sind jedoch in ihrem Produktspektrum limitiert, da zur CO₂-Fixierung der Wood-Ljungdahl-Weg verwendet wird, der durch eine sehr geringe Energieausbeute gekennzeichnet ist. Durch den geringen Energiegewinn muss der katabole Stoffumsatz sehr hoch sein, was zur Folge hat, dass nur ein kleiner Teil des reduzierten CO₂ für anabole Synthesen genutzt werden kann. Die energieaufwändige Produktion längerkettiger Kohlenwasserstoffe ist somit nicht möglich, weshalb Organismen mit alternativen CO₂-Fixierungswegen von größerem Interesse sind. Ein dafür in Frage kommender Organismus ist, wie bereits erwähnt, *Rhodospseudomonas palustris* TIE-1. Dieses phototrophe Nicht-Schwefel Purpurbakterium verwendet den Calvin Zyklus zur CO₂-Fixierung und besitzt exoelektrogene Eigenschaften. Studien belegten, dass die CO₂-Fixierung in einem bioelektrochemischen System an die Aufnahme kathodischer Elektronen gekoppelt ist. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind größtenteils unbekannt und die Elektronenaufnahmeraten sind zum jetzigen Zeitpunkt limitierend für etwaige Anwendungen [45]. Das natürliche Zusammenspiel von Photosynthese und Calvin Zyklus und die Fähigkeit zur Kopplung der CO₂-Fixierung an eine extrazelluläre Elektronenaufnahme bietet jedoch eine effiziente Basis für eine mögliche Anwendung in der mikrobiellen Elektrosynthese. Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit der Einsatz von Nicht-Schwefel Purpurbakterien als potentielle MES-Stämme weiter verfolgt werden. Ein möglicher Kandidat hierfür ist *Rhodobacter sphaeroides*, das ein Modellorganismus für die anoxygene Photosynthese (Typ II) ist. Kennzeichnend ist die Fähigkeit zum photoautotrophen, photoheterotrophen, chemoautotrophen und chemoheterotrophen Wachstum und das folglich extrem breite potentielle Produktspektrum. In früheren Studien konnten bereits komplexe Verbindungen wie Sesquiterpene, Isoprenoide, Carotenoide, Lycopene und Biopolymere wie PHB synthetisiert werden [65, 92, 98, 131, 154]. Desweiteren wurden effektive genetische Systeme wie Expressionsplasmide und CRISPR/Cas etabliert, die Möglichkeiten zur Erforschung optimierender Modifikationen bieten [53, 86]. Insgesamt verbindet dieses Bakterium also die Vorteile der Photosynthese-gestützten CO₂-Fixierung mit einer hohen metabolischen Versatilität, einer guten genetischen Zugänglichkeit sowie einer stabilen und schnellen Kultivierung. Ein extrazellulärer Elektronentransfer wurde bisher nicht beschrieben, wohl aber die Fähigkeit zur Maturation elektronentransportierender, cytoplasmatischer *c*-Typ Cytochrome [104]. In dieser Arbeit sollte deshalb mit der Einbringung einer verlängerten Elektronentransportkette versucht werden, kathodische Reduktionsäquivalente für

die CO₂-Fixierung in *R. sphaeroides* zugänglich zu machen.

1.5 Zielsetzung

Die geringen Umsatzraten bisheriger MES-Technologien sind ein limitierender Faktor für eine Anwendung im industriellen Maßstab. Eine Herausforderung dieses Forschungsbereichs besteht in der Etablierung geeigneter Biokatalysatoren, die die notwendigen Voraussetzungen für eine effiziente Nutzung in der MES erfüllen. Ein vielversprechender Ansatz ist die Nutzung von photoautotrophen Bakterien, weshalb es das Ziel dieser Arbeit war, *R. sphaeroides* auf seine Eignung als Biokatalysator in der MES zu untersuchen. Dabei stand vor allem die Etablierung einer BES-gestützten Kultivierung im Fokus, die auf einer stabilen Interaktion von Mikroorganismus und Kathode zur Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten basiert. Neben der Nutzung von Wasserstoff als Redoxmediator sollte durch heterologe Expression eine verlängerte Elektronentransportkette etabliert werden, die die Interaktion mit der Kathode optimieren sollte. Der Beweis, dass die CO₂-basierte Produktion von Wertstoffen unter den genannten Bedingungen möglich ist, sollte anhand zweier Beispielprozesse erbracht werden. Die Produktion von zelleigenen Stoffen sollte anhand der PHB-Akkumulation demonstriert werden. Als Beispielprozess für die Produktion zellfremder Stoffe sollte die Acetoinproduktion etabliert werden.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Sofern nicht anders vermerkt, wurden die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (München), Roth (Karlsruhe), Promega (Mannheim), Tyczka Industrie-Gase (Mannheim) und Roche Diagnostics (Mannheim) bezogen.

2.2 Bakterienstämme und Plasmide

In Tabelle 2.1 und 2.2 sind die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme bzw. Plasmide aufgelistet.

TABELLE 2.1: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme.

ID	Stamm	Relevanter Genotyp	Referenz
JG22	<i>E. coli</i> DH5 α	F-80lacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF), U169, recA1, endA1, hsdR17, (rK-, mK+) phoA, supE44, λ -thi-1, gyrA96, relA1	[81]
JG582	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> WS8N	Wildtyp	[122]
JG1766	<i>R. sphaeroides</i> pIND4	JG582 / Plasmid #1	diese Arbeit

JG1766	<i>R. sphaeroides</i> pIND4_pioABC	JG582 / Plasmid #2	diese Arbeit
JG1767	<i>R. sphaeroides</i> pIND4_cymA_pioABC	JG582 / Plasmid #3	diese Arbeit
JG1768	<i>R. sphaeroides</i> pIND4_alsSD	JG582 / Plasmid #4	diese Arbeit

TABELLE 2.2: In dieser Arbeit verwendeten Plasmide.

ID	Plasmid	Relevanter Genotyp	Referenz
#1	pIND4	KanR, oriT, colEI, <i>mobL</i> , <i>mobS</i> , <i>repA</i> , <i>lacI</i> , P _{A1/04/03}	[53]
#2	pIND4_pioABC	KanR, oriT, colEI, <i>mobL</i> , <i>mobS</i> , <i>repA</i> , <i>lacI</i> , P _{A1/04/03} , <i>pioA</i> , <i>pioB</i> , <i>pioC</i>	unver- öffentlichte Arbeit
#3	pIND4_cymA_pioABC	KanR, oriT, colEI, <i>mobL</i> , <i>mobS</i> , <i>repA</i> , <i>lacI</i> , P _{A1/04/03} , <i>cymA_{His}</i> , <i>pioA</i> , <i>pioB</i> , <i>pioC</i>	diese Arbeit
#4	pIND4_alsSD	KanR, oriT, colEI, <i>mobL</i> , <i>mobS</i> , <i>repA</i> , <i>lacI</i> , P _{A1/04/03} , <i>alsS</i> , <i>alsD</i>	diese Arbeit

2.3 Oligonukleotide

In Tabelle 2.3 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Primer aufgeführt.

TABELLE 2.3: In dieser Arbeit zur Klonierung verwendete Primer.

Nr.	Name	Sequenz 5'-3'
1	AlsSD FOR OH pIND4	CAATTGTGAGCGGATAACAATTTCA CACATCTCTACTGTTTCTCCATACCC
2	AlsSD REV OH pIND4	TATCAACAGGAGTCCAAGCTCAGCT AATTACCGCTCACAATTTGAATTTCCG
3	Test REV AlsSD pIND4	CACCAATAAAAAACGCCC
4	Test FOR alsSD pIND4	TTTCACATTCACCACCCT
5	cymA FOR OH pIND	ACAATTTCACACATCTAGAATTAAG AGGAGAAATTAACCATGGGCAACTG GCGCGCCCT
6	cymA REV OH pioA	CGCGCGCCGCGCCGCGCCCCGCGA GCCGCCCATCGTTAATTTCTCCTCATT CCGAGTCATCAGCCCTTCGGATAGGG GT
7	pIND4 test for	CATTTCCCCGAAAAGTGCC
8	pIND4 test rev	CGTTAATTTCTCCTCATTCC
9	alsSD Seq1	ATCAGGGTTATTGTCTCA
10	alsSD Seq2	CCACCGTTGATATATCCCA
11	alsSD Seq3	CCGCAGGACGTGGTGAA
12	alsSD Seq4	GGAAATCGTGAAGGAAGTGGC
13	cymA Seq5	AGTACGGCGACTTCGGCATCG
14	pioABC Seq6	CAATAAGTTCTATAAGTTCA
15	pioABC Seq7	TGGGCTGCTTTGACGGCCAG
16	pioABC Seq8	GAGCCGGACTACGTGGCGGAG
17	pioABC Seq9	GCCCGATCGACGACACGACCCA
18	pIND4 Seq10	AATTAACGATGAACGACA
19	pIND4 Seq11	GGATCAGATCACGCATCTTCC

2.4 Mikrobiologische Methoden

2.4.1 Kultivierung

Die Kultivierung von *R. sphaeroides* erfolgte, sofern nicht anders erwähnt, bei 30 °C und 180 rpm, von *E. coli* dagegen bei 37 °C. Falls erforderlich wurden die Medien

mit 25 µg/ml Kanamycin zur Aufrechterhaltung eines Selektionsdrucks und 50 µM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) zur Induktion versetzt. Zur Kultivierung auf Agarplatten wurde dem Medium 2 % Agar-Agar hinzugefügt. Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte stets in Lysogeny Broth-Medium. Zur Herstellung elektrisch kompetenter Zellen wurde SOB-Medium, zur Regeneration elektroporierter Zellen SOC-Medium verwendet (Tabelle 2.4). Die heterotrophe Kultivierung von *R. sphaeroides*

TABELLE 2.4: Zusammensetzung von LB-, SOB- und SOC-Medium.

Substanz	LB (g/l)	SOB (g/l)	SOC (g/l)
Trypton	10,0	10,0	10,0
Hefeextrakt	5,0	5,0	5,0
NaCl	5,0		
MgCl ₂			1,9
Glucose			3,6

erfolgte in Siström's Minimalmedium [119] mit 45 mM Laktat als Kohlenstoffquelle. Eine Kultivierung unter autotrophen Bedingungen erfolgte in gasdichten Glasflaschen mit modifiziertem FEM Medium (Tabelle 2.5) nach Croal *et al.* [22]. Die Stammlösung wurde für 30 min aufgekocht und nach dem Abkühlen mit einem N₂/CO₂-Gasgemisch (80 %/20 %) für 30 min begast. Nach anschließendem Autoklavieren wurde die Stammlösung mit Wolfe's Mineralsalzlösung als Spurenelementlösung (ATCC Medium: 2672) und Vitaminlösungen komplementiert (Tabelle 2.6). Infrarot-Strahler dienen der Beleuchtung der Systeme (IR LED spotlight λ = 850 nm, KKmoon, Hongkong). Vor der Inokulation wurde die Gasphase der Mediumsflasche durch ein steriles H₂/CO₂-Gasgemisch (80 %/20 %) ausgetauscht. Der bei der Kultivierung entstehende Unterdruck wurde durch Zugabe von sterilem Stickstoff bis zum Atmosphärendruck ausgeglichen. Die Kultivierung in bioelektrochemischen Systemen wurde im selben Medium durchgeführt, jedoch erfolgte die Begasung der Systeme mit einem N₂/CO₂-Gasgemisch (80 %/20 %). Vorkulturen für autotrophe Wachstumsexperimente wurden unter heterotrophen Bedingungen angezogen. In ihrer exponentiellen Wachstumsphase wurden die Kulturen unter mikro-oxischen Bedingungen ohne Schütteln oder Rühren für 6 h unter IR-Licht inkubiert und vor der Inokulation zweimalig mit Waschpuffer (Tabelle 2.7) gewaschen.

TABELLE 2.5: Zusammensetzung der Medien für die heterotrophe (A) und autotrophe (B) Kultivierung von *R. sphaeroides*.

A		B	
Substanz	Menge	Substanz	Menge
Sistrom-Stammlösung 1 l		FEM-Stammlösung 1 l	
K ₂ HPO ₄	3,48 g	NH ₄ Cl	0,3 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g	KH ₂ PO ₄	0,5 g
L-Glutaminsäure	0,1 g	MgCl ₂ × 6 H ₂ O	0,4 g
L-Asparaginsäure	0,04 g	CaCl ₂ × 2 H ₂ O	0,1 g
NaCl	0,5 g	NaHCO ₃	1,8 g
Nitrilotriessigsäure	0,2 g	Na ₂ CO ₃	0,5 g
Fe(II)SO ₄ × 7H ₂ O	2 mg	Komplementieren	
Laktat	45 mM	100x Spurenelementlsg.	1 ml/l
Komplementieren		100x Vitaminlsg.	1 ml/l
100x Spurenelementlsg.	10 ml/l	1000x Vitamin B12-Lsg.	1 ml/l
100x Vitaminlsg.	10 ml/l	pH 7	
1000x Vitamin B12-Lsg.	1 ml/l		
pH 7			

TABELLE 2.6: Zusammensetzung der zum Komplementieren verwendeten Spurenelementlösung (A) und Vitaminlösungen (B).

A		B	
Substanz	Menge	Substanz	Menge
100x Spurenelementlösung 1 l		100x Vitaminlösung 1 l	
Nitrilotriessigsäure	1,5 g	4-Aminobenzoessäure	4 mg
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	3 g	Biotin	1 mg
MnSO ₄ × H ₂ O	0,5 g	Nicotinsäure	10 mg
NaCl	1 g	Ca-DL-Panthotenat	5 mg
FeSO ₄ × H ₂ O	0,1 g	Pyridoxin-HCl	15 mg
CoCl ₂ × 6 H ₂ O	0,1 g	Thiamin-Cl	10 mg
CaCl ₂	0,1 g	1000x Vitamin B12-Lösung 1 l	
ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	0,1 g	Vitamin B12	100 mg
CuSO ₄ × 5 H ₂ O	0,01 g		
AlK(SO ₄) ₂ × 12 H ₂ O	0,01 g		
H ₃ BO ₃	0,01 g		
Na ₂ MoO ₄ × 2 H ₂ O	0,01 g		

TABELLE 2.7: Zusammensetzung des Waschpuffers.

Substanz	Menge für 1 l
K_2HPO_4	0,35 g
NH_4Cl	0,5 g
NaCl	0,5 g
$MgCl_2 \times 7 H_2O$	0,3 g
$CaCl_2 \times 2 H_2O$	0,034 g

2.4.2 Stammkonservierung

Die erstellten Stämme wurden als Cryokulturen bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Dafür wurde 850 μl einer dicht bewachsenen Kultur mit 150 μl sterilem 100 %igem Glycerin vermischt und in flüssigem N_2 schockgefroren. Zur erneuten Anzucht wurde ein Teil der Cryokulturen mit der Pipettenspitze entnommen und auf LB-Agarplatten kultiviert.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 DNA-Methoden

DNA-Amplifikation

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerase Chain Reaction (PCR) wurden die in Tabelle 2.3 dargestellten Primer verwendet. Zu analytischen Zwecken wurde der MangoMix von Biotin (Luckenwalde), wie in Tabelle 2.8 dargestellt, verwendet. Als Template wurde entweder aufgereinigte DNA oder eine ganze Kolonie eingesetzt. Zur Amplifikation von Templates, die größer als 4 kb waren oder zu präparativen Zwecken wurde eine HiFi Polymerase (PCR Biosystems/Nippon Genetics Europe, Düren) verwendet (Tabelle 2.9). Diese Polymerase besitzt eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität, wodurch weniger Mutationen erzeugt werden. Als PCR-Cycler wurde der Thermal Cycler S1000 (Bio-Rad, München) verwendet und nach dem in Tabelle 2.10 dargestellten Protokoll betrieben. Die Elongationszeit wurde der Größe des zu amplifizierenden Fragments, die Annealingtemperatur dem verwendeten Primerpaar angepasst.

TABELLE 2.8: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes mit dem MangoMix.

Substanz	20 μ l Ansatz
2x MangoMix	10 μ l
10 μ M Primer I	1 μ l
10 μ M Primer II	1 μ l
DNA	Kolonie oder 1 μ l
ddH ₂ O	8 bzw. 7 μ l

TABELLE 2.9: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes mit der HiFi Polymerase.

Substanz	50 μ l Ansatz
5x Reaktionspuffer	10 μ l
10 μ M Primer I	2 μ l
10 μ M Primer II	2 μ l
DNA (10 ng/ μ l)	1 μ l
HiFi Polymerase	0,5 μ l
ddH ₂ O	34,5 μ l

Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese. Zur Herstellung eines Agarosegels wurden 0,8 % Agarose (w/v) in TRIS-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer (Tabelle 2.11) durch Aufkochen gelöst und mit 0,5 μ g/ μ l Midori-Green (Nippon Genetics, Düren) versetzt. Die DNA-Proben wurden vor dem Beladen des Gels mit 6x DNA-Ladepuffer (Tabelle 2.12) versetzt. Zum Größenvergleich wurde außerdem ein DNA-Größenmarker (GeneRuler 1 kb, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte entlang eines elektrischen Feldes bei einer konstanten Spannung von 120 V. Zur anschließenden Analyse wurden die im Gel geformten DNA-Banden auf einem Blautisch (FastGene B/G LED Trans Luminator, Nippon Genetics, Düren) sichtbar gemacht und bei Bedarf aus dem Gel extrahiert.

TABELLE 2.12: Zusammensetzung des 6x DNA-Ladepuffers.

Substanz	Menge
Xylene cyanol	0,05 g
Orange G	0,05 g
Glycerin	12 ml
50x TAE	1,5 ml
dH ₂ O	add 15 ml

TABELLE 2.10: Zyklisches Protokoll für die Amplifikation von DNA mittels PCR.

Temperatur	Zeit	Schritt
95 °C	120 s	1 Initiale Denaturierung
95 °C	30 s	2 Denaturierung
45-72 °C	30 s	3 Primer Annealing
72 °C	30 s/kb Amplifikat	4 Elongation
Schritt 2 - 4: 30 x wiederholen		
72 °C	300s	5 Finale Elongation
4 °C	∞	6 Ende

TABELLE 2.11: Zusammensetzung des TAE-Puffers.

Substanz	Konzentration [mM]
Tris-HCl (pH 8)	40
Essigsäure	20
EDTA	1

DNA-Isolierung, -Aufreinigung und -Quantifizierung

Nach der Auftrennung der DNA-Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese, wurde zur Extraktion das Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System von Promega (Mannheim) nach Herstellerangaben verwendet. Die Extraktion von Plasmiden aus Zellkulturen erfolgte mit dem Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System (Promega, Mannheim) nach Herstellerangaben. Um genomische DNA aus Zellkulturen oder kathodischem Biofilm zu isolieren wurde das InnuPREP Stool DNA Kit von Analytik Jena (Jena, Deutschland) ebenfalls nach Herstellerangaben verwendet. Aufgereinigte DNA wurde mittels Nanodrop-Spektrophotometer (Nanodrop 2000, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) quantifiziert.

Sequenzierung

Die Sequenzierung isolierter Plasmide oder amplifizierter DNA-Fragmente wurde mit dem Mix2Seq Kit der Firma MWG Eurofins Genomics durchgeführt. Die Ergebnisse basierten auf einer Sanger-Sequenzierung und wurden *in silico* mithilfe der CLC Main Workbench (Version 10.0, Qiagen, Aarhus/Dänemark) analysiert.

Restriktion

Zur Restriktion von DNA wurden Restriktionsenzyme der Firma New England Biolabs (Frankfurt am Main) nach Herstellerangaben verwendet. Der Ansatz für eine Restriktionsreaktion ist in Tabelle 2.13 dargestellt.

TABELLE 2.13: Pipettierschema eines Restriktionsverdaus.

Substanz	Menge
DNA	1-5 µg
CutSmartPuffer (10x)	5 µl
Restriktionsenzym	je Enzym: 1 µl/µg Plasmid
ddH ₂ O	add 50 µl

Isothermale Ligation nach Gibson

Zur Klonierung von Plasmiden wurde die isothermale *in vitro* Ligation nach Gibson [38] durchgeführt. Diese Methode ermöglicht es, mehrere DNA-Fragmente mit homologen Bereichen (30 - 50 bp) durch das Zusammenspiel von drei verschiedenen Enzymen miteinander zu verbinden. Dabei erzeugt zunächst eine T5 Exonuklease mit 5'-3'-Aktivität ssDNA-Bereiche, welche an ihre komplementären Äquivalente binden können. Anschließend werden bestehende ssDNA-Bereiche durch eine Phusion Polymerase zu dsDNA aufgefüllt und das Rückgrat der DNA abschließend mit einer Taq DNA-Ligase verschlossen. In dieser Arbeit wurden äquimolare Mengen an DNA-Fragmenten (insgesamt 5 µl, max. 100 ng) in den Gibson-Mastermix (15 µl) eingesetzt und für 90 min bei 50 °C inkubiert. Die Zusammensetzung des Mastermixes ist in Tabelle 2.14 dargestellt.

TABELLE 2.14: Zusammensetzung des Gibson Mastermixes.

Substanz	Menge
Mastermix (für 400 µl)	
5x Reaktionspuffer	80 µl
Phusion Polymerase (2 U/µl)	5 µl
Taq DNA-Ligase (40 U/µl)	40 µl
T5 Exonuklease (0,1 U/µl)	16 µl
ddH ₂ O	259 µl
5x Reaktionspuffer (für 250 µl)	
1 M Tris/HCl pH 7,5	125 µl
1 M MgCl ₂ x 6 H ₂ O	12,5 µl
10 mM dNTPs	25 µl
1 M DTT	12,5 µl
0,1 M NAD	12,5 µl
PEG-8000	62,5 mg
ddH ₂ O	62,5 µl

Transformation

Die Transformation von Plasmiden in Bakterien erfolgte durch Elektroporation. Zur Vorbereitung wurde eine Empfängerkultur in ihrer exponentiellen Wachstumsphase auf Eis gekühlt und 1 bis 2 ml der Kultur dreimal mit eiskaltem ddH₂O gewaschen. Nach dem letzten Waschschriff wurden die Zellen in 50 µl ddH₂O aufgenommen und in einer gekühlten Elektroporationsküvette (Gene Pulser Küvette, Elektrodenabstand: 1 mm, Bio-Rad, München) mit 1 µl der Plasmidprobe versetzt. Bei Bedarf wurde die Plasmidprobe zuvor für 30 min auf einer Dialyse-Membran (MF-Milipore, Cellulosemischester, Porengröße 0,025 µm, Merck Milipore, Darmstadt) entsalzt. Durch Anlegen einer Hochspannung von 1,5 kV für 5 ms in einem Bio-Rad Mikropulser (München) wurde die Bakterienmembran depolarisiert, wodurch die Plasmid-DNA in die Zellen gelangen konnte. Nach dem Puls wurden die Zellen sofort für 1 h in vorgewärmtem SOC-Medium (Tabelle 2.4) regeneriert und anschließend auf LB-Selektionsplatten über Nacht inkubiert.

Codon Optimierung von *alsS* und *alsD*

Durch die Einbringung der Gene *alsS* und *alsD* aus *Bacillus subtilis* PY79 sollte die Produktion von Acetoin *R. sphaeroides* etabliert werden. Ein Vergleich der Codon-Nutzung mit Hilfe der Datenbank "Kazusa Codon Usage Database" (www.kazusa.or.jp/codon/) nach Nakamura *et al.* [88] und des "Graphical Codon Usage Analyser" (<http://gcu.schoedl.de/>) nach Fuhrmann *et al.* [36] zeigte eine unzureichende Abdeckung der entsprechenden Codons in *R. sphaeroides*. Um dennoch eine durchgängige Translation zu ermöglichen, wurden Codon optimierte Versionen der Gene erstellt. Zur Generierung von kompatiblen Gensequenzen wurden alle Basentriplets mit einer Abdeckung von unter 10 % gegen für *R. sphaeroides* geeignetere Triplets ausgetauscht. Das Konstrukt wurde von einem externen Dienstleister (GeneArt Strings DNA Fragments, Thermo-Fisher-Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) synthetisiert. Die optimierten Sequenzen sind im Anhang dargestellt.

2.5.2 Protein-Methoden

Zellaufschluss

Zur Analyse des Proteoms wurden die gewünschten *R. sphaeroides*-Stämme kultiviert und anschließend bei 4 °C und 9000 g für 10 min pelletiert. Die Zellen wurden in Tris/HCl-Puffer (pH 6,8) resuspendiert und mit Ultraschall (Digital Sonifier 250, Branson, Danbury/USA) aufgeschlossen. Hierfür wurde ein Puls mit einer Amplitude von 50 % für 0,5 s angelegt, auf den eine 4,5 s dauernde Pause folgte, die

ein Erwärmen der Probe vermeiden sollte. Dieser Zyklus wurde wiederholt, bis eine Pulszeit von insgesamt 2 min erreicht wurde. Während des Aufschlussverfahrens wurden die Zellen auf Eis gekühlt, um einen Abbau der Proteine zu verhindern. Das erhaltene Zellextrakt wurde für 5 min bei 4 °C und 9000 g zentrifugiert und somit Zelltrümmer und nicht aufgeschlossene Zellen entfernt.

Sollte die Expression membranständiger Proteine untersucht werden, wurde das Zellextrakt in einer Ultrazentrifuge bei 208.000 g für 60 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand, der die cytoplasmatische Fraktion enthielt, wurde verworfen. Das Pellet, das die Membranfraktion enthielt, wurde in Tris/HCl-Puffer (pH 6,8) resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

Präparation der periplasmatischen Fraktion

Zur Untersuchung der Expression periplasmatischer Proteine wurde eine *R. sphaeroides*-Kultur auf Eis gekühlt und anschließend pelletiert (5 min, 4 °C, 9000 g). Das Zellpellet wurde in Tris-HCl (pH 6,8) resuspendiert und mit Polymyxin-B-Sulfat (Endkonzentration: 1 mg/ml) versetzt. Dieses Antibiotikum komplexiert mit Lipopolysacchariden der äußeren Membran und führt zu deren Destabilisierung. Die Zellen wurden für 1 h bei 37 °C inkubiert. Durch anschließende Zentrifugation (1 h, 23.000 g) wurde die periplasmatische Fraktion als Überstand erhalten und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das Verfahren nach Bradford [9] angewendet. Als Standard diente Rinderserumalbumin (0 bis 100 µg/ml). Proben und Standards wurden im Verhältnis 1:10 mit der Bradfordreagenz (Tabelle 2.15) versetzt und nach einer Inkubationszeit von 5 min vermessen (Absorptionsmessung $\lambda = 595$ nm, iMark Microplate Reader, Bio-Rad, München). Anhand der Standardgerade konnte die Proteinkonzentration der Proben errechnet werden.

TABELLE 2.15: Zusammensetzung der Bradford-Reagenz.

Substanz	Menge
Coomassie Brilliant Blue G250	100 mg
konz. Phosphorsäure	100 ml
Ethanol	50 ml
ddH ₂ O	Add 1000 ml

Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteingemischen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte über eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli [70]. Die Auftrennung wurde in 4 %igen Sammel- und 15 %igen Trenngelen (Tabelle 2.16 und 2.17) durchgeführt. Zur Vorbereitung wurden 20 µg jeder Probe mit 5x Laemmli-Puffer (Tabelle 2.19) gemischt und für 5 min bei 95 °C inkubiert. Die Gele wurden in eine mit Laufpuffer (Tabelle 2.18) befüllte Kammer gespannt und mit den vorbereiteten Proben und einem Größenmarker (Blue Prestained Protein marker, Nippon Genetics Europe, Düren) beladen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 100 V im Sammelgel bzw. 150 V im Trenngel.

TABELLE 2.16: Zusammensetzung des Sammelgels, für 7 Gele, 4 % Acrylamid (w/v).

Substanz	Volumen
ddH ₂ O	17,7 ml
1 M Tris-HCl (pH 6,8)	3,1 ml
30 % (w/v) Acrylamid, 0,8 % (w/v) Bisacrylamid	3,4 ml
10 % (w/v) SDS in ddH ₂ O	244,4 µl
TEMED	98 µl
10 % (w/v) Ammoniumpersulfat in ddH ₂ O	195 µl

TABELLE 2.17: Zusammensetzung des Trenngels, für 7 Gele, 15 % Acrylamid (w/v).

Substanz	Volumen
ddH ₂ O	11,5 ml
2 M Tris-HCl (pH 8,8)	11,8 ml
30 % (w/v) Acrylamid, 0,8 % (w/v) Bisacrylamid	23,5 ml
10 % (w/v) SDS in ddH ₂ O	470 µl
TEMED	69 µl
10 % (w/v) Ammoniumpersulfat in ddH ₂ O	342 µl

TABELLE 2.18: Zusammensetzung des SDS-Laufpuffers.

Substanz	Menge
SDS	1 g/l
Glycin	14 g/l
Tris	3 g/l

TABELLE 2.19: Zusammensetzung des 5x Laemmli-Puffers.

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

Färbung von Hämgruppen

Ein Hemestain ermöglicht die spezifische Färbung von Hämgruppen in mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteingemischen. Die Färbung basiert auf der Peroxidase-Aktivität der Hämgruppen, durch die 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) unter Zugabe von H₂O₂ zu einem blauen Farbstoff oxidiert wird [137]. Nach einem 30-minütigen Fixierungsschritt durch Zugabe einer TCA-Lösung wurde das Gel 30 min in ddH₂O gewaschen, anschließend mit der Entwicklungslösung überschichtet und inkubiert, bis klare Signale sichtbar wurden. Die Dokumentierung erfolgte im Chemidoc XRS+ System (Bio-Rad, München). Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen ist in Tabelle 2.20 dargestellt. Zur Kontrolle, dass vergleichbar große Mengen an Proteinprobe geladen wurden, wurden die Gele nach dem Hemestain in ddH₂O entfärbt und mit dem Coomassie-Brilliant-Blau-Farbstoff detektiert [153]. Dazu wurde das Gel mit dem InstantBlue Farbstoff von Expedeon (Echingen) überschichtet und für 15 min bis zu 16 h inkubiert.

TABELLE 2.20: Zusammensetzung der Lösungen für den Hemestain.

Substanz	Zusammensetzung	Volumen
TCA	12,5 % (w/v) in ddH ₂ O	10 ml
Entwicklungslösung		
TMB	10 mg in 9 ml ddH ₂ O	9 ml
Citrat	0,5 M pH 6,4	1 ml
H ₂ O ₂	30 % (v/v)	20 μ l

Western Blotting und Immunodetektion

Die in Polyacrylamid-Gelen aufgetrennten Proteingemische wurden in Western Blots durch Anlegen eines elektrischen Feldes auf eine Trägermembran (Nitrocellulose, Roth, Karlsruhe) übertragen. Dazu wurden SDS-Gel und Nitrocellulosemembran inmitten zweier Stapel aus in Blotting-Puffer (Tabelle 2.21) getränkten Whatman-Papiere (jeweils 7 Stück) in die Kammer eines Trans-Blot-Turbo-Systems (Bio-Rad,

München) gelegt. Der Blot-Vorgang erfolgte in einem Programm für hohe Molekulargewichte (13 A, 25 V, 12 min). Anschließend wurden die zu detektierende Proteine

TABELLE 2.21: Zusammensetzung des Blottingpuffers.

Substanz	Menge
Tris	40 g
Glycin	20 g
Ethanol	150 ml
Methanol	50 ml
ddH ₂ O	add 1000 ml

in einer Immunodetektion nachgewiesen. Dafür wurde ein Antikörper eingesetzt, der an den angehängten Hexa-Histidin-Tag bindet. Durch die Verwendung eines sekundären Antikörpers, der eine alkalische Phosphatase als Reporterenzym trug, wurde bei Zugabe von 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat (BCIP) eine detektierbare Farbreaktion katalysiert. Als Entwicklungslösung wurde das AP Conjugate Substrate Kit (Bio-Rad, München) nach Herstellerangaben verwendet. Das Protokoll der Immunodetektion und die dafür verwendeten Lösungen sind in Tabelle 2.22 bzw. 2.23 dargestellt.

TABELLE 2.22: Protokoll der Immunodetektion.

Dauer	Substanz	Zusammensetzung
2 x 10 min	TBS	Siehe Tab. 2.23
1 h oder länger	Blockierlösung	3 % (w/v) Milchpulver in TBS
1 h oder länger	Primärer Antikörper	Primärer Antikörper 1:1000 + 3 % (w/v) Milchpulver in TBS
2 x 10 min	TBST	Siehe Tab. 2.23
1 x 10 min	TBST	Siehe Tab. 2.23
max 1 h	Sekundärer Antikörper	Sekundärer Antikörper 1:7500 + 3 % (w/v) Milchpulver in TBS
4 x 5 min	TBST	Siehe Tab. 2.23
5 x 2 min	ddH ₂ O	
Entwicklung	AP Conjugate Substrate Kit Entwicklungslösung	11,75 ml ddH ₂ O 500 µl AP-Detektionspuffer 125 µl Color Reagent A 125 µl Color Reagent B

TABELLE 2.23: Zusammensetzung von TBS, TBST- und TBSTT-Puffer.

Substanz	TBS	TBST	TBSTT
Tris	10 mM	20 mM	20 mM
NaCl	150 mM	500 mM	500 mM
Tween-20	-	0,05 %	0,05 %
Triton-X100	-	-	0,2 %

Proteomanalyse

Die Analyse des Proteoms wurde von den Kooperationspartnern Julia Novion Ducassou und Yohann Couté (Universität Grenoble Alpes, Frankreich) durchgeführt. Zur Vorbereitung der Analyse wurden die *R. sphaeroides*-Stämme in einer MES-Zelle unter den in Absatz 2.4.1 bzw. 2.8.1 beschriebenen Bedingungen kultiviert. Nach 64 h wurde die Kathode aus dem System entnommen und in Tris/HCl-Puffer (25 mM, pH 6,8) aufgenommen. Die Zellen wurden durch intensives Schütteln des Reaktionsgefäßes auf einem Vortexmischer aus dem Kathodenvlies gelöst. Die Suspension wurde gefiltert, um Rückstände der Kathode zu entfernen. Um eine ausreichend hohe Zelldichte zu erreichen, wurde die Suspension zentrifugiert (9000 g, 4 °C, 10 min) und in 400 µl Tris/HCl-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen wie in Absatz 2.5.2 beschrieben mittels Ultraschallbehandlung lysiert. Das extrahierte Proteingemisch wurde in einer SDS-Gelelektrophorese in einem 4-12 %igem NuPAGE Gel aufgetrennt. Nach einer Coomassie-Färbung wurden die Proteine wie in Casabona *et al.* [17] beschrieben im Gel tryptisch verdaut. Die erhaltenen Peptide wurden mittels nanoLC, gekoppelt an eine MS/MS (Ultimate 3000 RSLCnano and Q-Exactive HF, Thermo Fisher Scientific, Bremen), in einem 120 min Gradienten analysiert. Zu diesem Zweck wurden die Peptide in einer Vorsäule (300 µm x 5 mm PepMap C18, Thermo Scientific, Illkirch-Grafenstaden, Frankreich) gesammelt und auf einer 75 µm x 250 mm C18 Säule (Reprosil-Pur 120 C18-AQ, 1.9 µm, Dr. Maisch, Ammerbuch-Entringen) aufgetrennt. Die MS/MS-Daten wurden dabei mit Xcalibur (Thermo Fisher Scientific, Bremen) erfasst. Peptide und Proteine wurden mit Mascot (Version 2.7.0, Matrix Science, London, Vereinigtes Königreich) durch Abgleich gegen die Genebank und Microscope (PMID:28968784) Datenbanken (*R. sphaeroides* WS8N Taxonomie, Versionen: Juni 2020), eine eigens erstellte Datenbank der auf dem Plasmid codierten Proteinsequenzen, eine Kontaminanten-Datenbank, sowie den zugehörigen reversen Datenbanken identifiziert. Die Proline Software (Version 2.0, [8]) wurde zur Aufstellung, Gruppierung und zum Filtern der Ergebnisse verwendet (Konservierung der Proteine auf Platz 1, Peptidlänge ≥ 7 Aminosäuren, Peptididentifikation FDR < 1 % der berechneten Peptid-Wert durch die reverse Datenbank-Strategie, Minimum der Peptid-Werte 25, Minimum der spezifischen Peptide pro

identifizierte Protein-Gruppe 1). Die Statistische Analyse wurde mit der ProStaR Software (Version 1.18, [145]) durchgeführt. Proteine, die in der Kontaminanten-Datenbank identifiziert oder die von der MS/MS nicht als Replikate erfasst wurden, wurden entfernt. Die Häufigkeit der verbleibenden Proteine wurde nach einer \log_2 -Umrechnung durch die vsn Methode normalisiert. Statistische Berechnungen wurden mit *limma* durchgeführt, wobei differentiell exprimierte Proteine nach der p-Wert Berechnung mit der Benjamini-Hochberg Methodik (FDR < 1,5 %) bestimmt wurden.

2.6 Bildgebende Methoden

2.6.1 Optische Kohärenztomographie

Die Optische Kohärenztomographie (OCT- *optical coherence tomography*) ermöglicht die Anfertigung von dreidimensionalen Aufnahmen von Biofilmen auf den glatten Kathodenoberflächen der BES-Fließzellen [143]. Hierfür wird breitbandiges Licht mit zeitlich geringer Kohärenzlänge durch einen Strahlenteiler auf das Untersuchungsobjekt (Probenstrahl) und auf einen Spiegel in einem Referenzarm (Referenzstrahl) geleitet und reflektiert. Biofilm streut und reflektiert das Licht, was zu einer Überlagerung von Probenstrahl und Referenzstrahl im Detektorarm führt. Dieses Interferenzsignal kann vom Detektor aufgezeichnet und visualisiert werden. Durch Ausrichtung des Spiegels im Referenzarm kann die Probe in axialer Richtung gescannt werden. Durch laterale Aneinanderreihung wiederholter axialer Scans kann so eine dreidimensionale Aufnahme des Biofilms im gescannten Bereich angefertigt werden. Zur Aufnahme der OCT-Bilder wurde das Ganymede II - LSM04 (mit zugehöriger Software ThorImageOCT Version 5.4, Thorlabs, Dachau) mit einer Auflösung von 12 μm pro Pixel verwendet. Der OCT-Probenkopf wurde durch eine fest an der BES-Peripherie verschraubbare Halterung fixiert, wodurch die wiederholte Aufnahme exakt derselben Stelle auf der Kathode zu verschiedenen Zeitpunkten ermöglicht wurde. Die visualisierte Stelle (8 x 4 mm) befand sich 50 mm stromabwärts des Zuflusses der Fließzelle.

2.6.2 Fluoreszenzmikroskopie

DAPI-Färbung

Für die unspezifische Färbung der zellulären DNA in kathodischen Biofilmen wurde ein Stück der Kathode in einer Waschpufferlösung (Tabelle 2.7), die 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) enthielt, für 15 min inkubiert. Anschließend wurde die Probe mit Waschpuffer überschichtet und mit einem Leica DM 5500B

Mikroskop mit einer Dip-In-Lense 63x HCX APO L63/090W (Leica Camera AG, Wetzlar, Deutschland) analysiert. Die Bilder wurden mit einer Leica DFC 360 FX Kamera und der entsprechenden Leica LAS AF Lite Software aufgenommen.

Live-Dead-Färbung

Mit einer Live-Dead-Färbung kann die Viabilität von Bakterienzellen untersucht werden. Die Färbung beruht auf Unterschieden in der Membrangängigkeit zweier Fluoreszenzfarbstoffe. SYTO9 ist membrangängig und lässt nach unspezifischer Bindung an die DNA sowohl intakte als auch Zellen mit beschädigter Membran grün fluoreszieren. Propidiumiodid dagegen kann lediglich Membranen mit beeinträchtigter Integrität überwinden. Die Bindungsaffinität von Propidiumiodid zu DNA ist stärker als die von SYTO9, weshalb dieses durch Propidiumiodid verdrängt wird und beschädigte Zellen rot fluoreszieren [127]. Zur Durchführung dieser Färbung wurde ein Teil der Kathode 1 h lang in Waschpuffer gewaschen und 20 min lang in Live-Dead-Färbelösung (Propidiumiodid 20 mM und Syto9 (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) 1:1, 3 µl verdünnt in 1 ml Waschpuffer (Tabelle 2.7)) inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit Pufferlösung wurde Bilder mit dem gleichen Aufbau wie für die DAPI-Analyse beschrieben aufgenommen.

Nilrot-Färbung von PHB

Zur Visualisierung intrazellulärer PHB-Granula wurde der Fluoreszenzfarbstoff Nilrot verwendet. Dieser Phenoxazin-Farbstoff bindet an hydrophobe Strukturen und weist dabei ein Absorptionsmaximum von 535 nm und ein Emissionsmaximum von 605 nm auf. Die Zellen wurden für 5 min in Waschpuffer (Tabelle 2.7) mit einer Nilrot-Konzentration von 0,5 µg/ml inkubiert und umgehend unter dem Mikroskop mit zuvor beschriebenem Aufbau analysiert. Als Gegenfärbung wurde eine DAPI-Färbung wie bereits beschrieben (Absatz 2.6.2) durchgeführt.

2.7 Analytische Methoden

2.7.1 Micro-GC

Die Analyse der Zusammensetzung von Gasgemischen wurde mittels Gaschromatographie durchgeführt (Micro-GC, Agilent Technologies Deutschland, Waldbronn). Die Analyse erfolgte auf einer 10 m MS5A- (Analyse von H₂, O₂, N₂) und einer 10 m PPQ-Säule (CO₂, CH₄), die mit einer Temperatur von 70 °C bzw. 45 °C und einem Druck von 150 kPa betrieben wurde. Nach einer Stabilisierungszeit von 5 s wurden

20 s lang Proben gezogen. Die Temperatur der Messgasleitung und des Injektors lag bei 110 °C und die Injektionsdauer wurde auf 50 ms eingestellt. Die Konzentrationen der einzelnen Gase konnten anhand von Standards (H_2 : 0 %, 1 % und 80 %, O_2 : 0 % und 21 %, N_2 : 0 %, 78 %, 80 %, 97 % und 100 %) bestimmt werden. Der durch den mikrobiellen Verbrauch der Gase in den Flaschen entstehende Unterdruck wurde vor der Messung mit sterilem N_2 auf 1 bar Normaldruck ausgeglichen. Zur erneuten Substratbereitstellung wurde die Gasphase der Kulturflaschen nach der Messung mit einem H_2/CO_2 -Gasgemisch (80 %/20 %) gespült, ohne dabei einen Überdruck anzulegen. Anschließend wurde die Gaszusammensetzung erneut gemessen. Durch Bildung der Differenz diese Werte konnte der Verbrauch von H_2 und CO_2 zwischen den Probenahmepunkten quantifiziert werden.

2.7.2 High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC)

Zur Detektion und Identifizierung von Substraten und Produkten wurde die Methode der High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC) angewendet. In diesem chromatographischen Trennverfahren werden die zu untersuchenden Substanzen zusammen mit einem Laufmittel durch eine Trennsäule gepumpt, die eine stationäre Phase beinhaltet. Unterschiedlich starke Wechselwirkungen zwischen mobiler und stationärer Phase führen dabei zu unterschiedlichen Retentionszeiten, die am Ende der Trennsäule durch einen Detektor erfasst werden. In dieser Arbeit wurde ein Dioden Array Detektor sowie ein Detektor für den Brechungsindex (RefractoMax 520 ERC, Riemerling) verwendet. In der Dionex UltiMate 3000 HPLC (Thermo Scientific, Waltham/USA) diente eine bei 60 °C betriebene 300 × 7,8 mm Aminex HPX-87H Säule (Bio-Rad, München) als Trennsäule. Als Laufmittel wurde 5 mM Schwefelsäure mit einer Flussrate von 0,6 ml/min verwendet. Zur Probenvorbereitung wurden die Proben durch einen Membranfilter (0,2 µm PTFE Membran VWR, Darmstadt) filtriert und 150 µl davon mit 15 µl 0,5 M H_2SO_4 angesäuert. Die Auswertung erfolgte mit der Chromeleon 11 Software (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA) wobei die Verwendung von Standards eine qualitative und quantitative Analyse der Probe ermöglichte.

2.7.3 Relative PHB-Quantifizierung

Zur relativen Quantifizierung des intrazellulären PHB-Gehalts wurden photometrische Messungen von Nilrot-gefärbten Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden von der Kathode der MES-Fließzelle abgeschabt und in Waschpuffer (Tabelle 2.7) resuspendiert. 150 µl der Zellsuspension wurden mit 50 µl einer Nilrot-Lösung (2 µg/ml in DMSO) gemischt und 30 min lang im Dunkeln inkubiert. Die Quantifizierung

von PHB erfolgte mit dem Tecan Infinite 200 PRO Spektrometer (Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz) bei den Anregungs- und Emissionswellenlängen von 530 bzw. 575 nm. Da diese Methode nur eine relative Quantifizierung darstellt, wurden die Werte auf den Gehalt an genomischer DNA aus einem äquivalenten Probenvolumen normalisiert. Die Extraktion von gDNA erfolgte mit dem InnuPREP Stool DNA Kit (Analytik Jena GmbH, Jena, Deutschland) nach Herstellerangaben.

2.7.4 Quantifizierung von Acetoin

Die Konzentration von Acetoin wurde mittels nach Barritt optimierter [4] Voges und Proskauer-Farbreaktion [141] quantifiziert. 20 μl des Überstands pelletierter Proben wurden in einer 96 Well-Platte mit 140 μl Reaktionslösung (Tabelle 2.24) versetzt. Nach einer Inkubation von 20 min wurde die Absorption bei 490 nm (iMark Microplate Reader, Bio-Rad, München) gemessen. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe einer Standardgeraden (0-5 mM).

TABELLE 2.24: Zusammensetzung der Reaktionslösung zur Quantifizierung von Acetoin.

Substanz	Menge
ddH ₂ O	10 ml
10 mg/ml L-Arginin	1,4 ml
50 mg/ml α -Naphtol in Ethanol	1 ml
40 % KOH (in H ₂ O)	1 ml

2.8 Aufbau bioelektrochemischer Systeme

2.8.1 Standard BES

Die standardmäßig zur Untersuchung der mikrobiellen Elektrosynthese verwendeten BES basierten auf einem Drei-Elektroden-Setup (Siehe Kapitel 1.4.3) mit Arbeitselektrode (Kathode), Gegenelektrode (Anode) und Referenzelektrode (Ag/AgCl, Sensortechnik Meinsberg GmbH; Ziegra-Knobelsdorf). Als Arbeitselektrode wurde ein Graphitvlies (SIGRACELL Carbon, GFD 2,5 EA, SGL Group; Wiesbaden) mit einer Fläche von 36 cm² verwendet. Ein Platinnetz mit einer Fläche von 2 cm² diente als Gegenelektrode. Die Systeme fassten 280 ml Kulturmedium, das durch einen Magnetrührer (Topolino, IKA, Staufen im Breisgau) durchmischt wurde. Der detaillierte Aufbau der Systeme wurde von Golitsch [39] beschrieben. Zur Quantifizierung von kathodischem Biofilm wurde ein definiertes Stück der Kathode ($A = 2 \text{ cm}^2$) entnommen und die Gesamt-DNA extrahiert. Dazu wurde das Elektrodenstück

zerschnitten und in Waschpuffer (Tabelle 2.7), zweimalig abwechselnd intensiv geschüttelt (1 min in einem Vortexmischer) und bei 95 °C (5 min) gekocht. Anschließend wurden die Reste der Kathode durch Filtration entfernt. Die DNA der erhaltenen Suspension wurde mit dem InnuPREP Stool DNA Kit (Analytik Jena GmbH, Jena) extrahiert und quantifiziert (Nanodrop 2000 Spektrophotometer, Thermo scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Die erhaltenen Werte erlaubten keine absolute Quantifizierung der Biomasse, ermöglichten aber einen Vergleich zwischen den untersuchten *R. sphaeroides*-Stämmen. Eventuell auftretende Abweichungen bei der DNA-Aufreinigung wurden durch die Durchführung von Triplikaten kompensiert.

2.8.2 Optimiertes BES

Zur Erhöhung der volumetrischen Produktivität von biofilmbildenden *R. sphaeroides*-Stämmen wurde ein BES-Prototyp mit einem optimierten Verhältnis von Kathodenoberfläche zu Reaktorvolumen entworfen. Hierfür wurde das Reaktorvolumen auf 200 ml verkleinert, während die Kathodenfläche auf 140 cm² vergrößert wurde. Somit konnte ein um das fünffache erhöhte Kathodenflächen/Volumen-Verhältnis im Vergleich zu herkömmlichen Systemen erreicht werden. Die Kathoden waren dabei so angeordnet, dass die Beleuchtung der Elektroden sowie die Durchmischung des Mediums gewährleistet war.

2.8.3 BES Fließzelle

Zur Analyse des kathodischen Biofilmwachstums wurde eine BES Fließzelle, wie von Hackbarth *et al.* [46] beschrieben, verwendet. Die glatte Elektrodenoberfläche (Graphitblock 100 mm x 20 mm, MR40, Müller und Rössner, Troisdorf-Bergheim) sowie die Borosilikatscheibe, die das System verschloss, ermöglichte dabei eine nicht-invasive Visualisierung und Quantifizierung der Biofilmbildung mittels optischer Kohärenztomographie (Absatz 2.6.1). Als Anode fungierten sechs mit Iridium-Tantal beschichtete Titanplättchen (Platinode, MMO Anode 177, umicore, Schwäbisch Gmünd), die zusammen dieselbe zugängliche Oberfläche wie die Kathode besaßen. Eine Ag/AgCl-Referenzelektrode (SE23I, Sensortechnik Meinsberg, Waldheim) wurde am Auslass der Fließzelle eingeschraubt. Auf das System wurde ein Druck von 1,5 bar (N₂/CO₂-Gasgemisch 80 %/20 %) angelegt, was eine erhöhte Löslichkeit der gasförmigen Substrate im Medium bewirkte und somit die Bildung eventueller Substratgradienten im Biofilm verringerte. Das mit Substrat angereicherte Medium wurde mit einer Magnetzahnradpumpe (ISMATEC REGLO-Z Digital, Cole-Parmer, Wertheim) mit einer konstanten Rate von 100 ml/min durch die Fließzelle und die Fließzellenperipherie gepumpt. Um während des Experiments eine Umschaltung auf

stickstofflimitierte Bedingungen durchzuführen, wurde die Fließzelle mit Hilfe der Schnellkupplungsventile von der Peripherie abgekoppelt. Die Fließzelle wurde dann, ohne den aufgebauten Druck zu verlieren, mit einer anderen Peripherie verbunden, die eine stickstofffreie Version des FEM-Kulturmediums enthielt.

2.9 Elektrochemische Methoden

2.9.1 Lineare Voltammetrie

Zur Bestimmung des elektrochemischen Potentials, bei dem die Wasserstoffbildung an der Kathode eines elektrochemischen Systems einsetzte, wurde der Potentiostat (Interface 1010B, Gamry Instruments, Warminster, PA, USA) mit einer linearen Voltammetrie gesteuert. In dieser Einstellung wird das Elektrodenpotential schrittweise gesenkt und der resultierende Stromfluss aufgezeichnet. Das Startpotential von 0 mV gegen eine Ag/AgCl-Referenzelektrode (entspricht +199 mV gegen eine Standard Wasserstoff Elektrode) wurde und mit einer Rate von 0,06 mV/s verringert. Eine zunehmende Stromstärke konnte als einsetzende Wasserstoffproduktion interpretiert werden, da nur Protonen als Elektronenakzeptoren in ausreichender Konzentration im System vorhanden waren.

2.9.2 Chronoamperometrie

Eine Chronoamperometrie ist eine Methode zur Steuerung eines Potentiostaten, in der die Stromstärke bei konstantem Potential über die Zeit aufgezeichnet wird. Eine erhöhte Konzentration an Elektronendonoren oder -akzeptoren im System bewirkt dabei eine erhöhte Stromstärke. Ein Elektronenfluss in die Arbeitselektrode (Anode) wird als positiver, ein Elektrodenfluss aus der Arbeitselektrode (Kathode) dagegen als negativer Wert dargestellt.

2.9.3 Chronopotentiometrie

In Versuchen, in denen eine möglichst konstante Wasserstoffproduktion an der Kathode erzielt werden sollte, wurde der Potentiostat via Chronopotentiometrie gesteuert. In dieser Methode wird eine konstante Stromstärke an die Kathode angelegt und das Potential, das notwendig ist, um diese Stromstärke aufrechtzuerhalten, über die Zeit gemessen. Ein positiveres Elektrodenpotential deutet dabei auf eine erleichtert ablaufende Reduktion von Elektronenakzeptoren im System hin, da entweder Akzeptoren in größerer Konzentration oder Akzeptoren mit positiverem Redoxpotential vorliegen, die somit leichter zu reduzieren sind. Als Elektronenakzeptoren sind dabei

auch exoelektrogene Mikroorganismen zu sehen. Eine konstante Entfernung des Produktes kann denselben Effekt auf das Elektrodenpotential haben. Die Analyse des gemessenen Potentials bei gleichbleibender Stromdichte ermöglicht somit die Gewinnung von Einblicken in die Redox-Abläufe an der Kathode. Eine Stromdichte von $I = -22,2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ vs Ag/AgCl erwies sich als geeignet um eine konstante Wasserstoffproduktion zu gewährleisten, die lithotrophes Wachstum ermöglichte. Als Negativkontrollen wurden entweder abiotische MES-Zellen verwendet oder inokulierte MES-Zellen, die mit einem Open Circuit Potential (OCP) gesteuert wurden. Hierbei wird ein sehr hoher Widerstand im Potentiostaten erzeugt, weshalb keine Elektronen zwischen Anode und Kathode fließen können.

Kapitel 3

Ergebnisse

Ziel der Arbeit war es, die Grundlagen einer BES-basierten Plattform für photoautotrophe Produktionsprozesse zu schaffen. Hierfür sollte das Nicht-Schwefel Purpurbakterium *R. sphaeroides* WS8N aufgrund seines extrem vielseitigen Stoffwechsels, seiner sehr guten genetischen Zugänglichkeit und seiner phototrophen Lebensweise auf seine Eignung als Biokatalysator hin untersucht werden. Eine Möglichkeit, die Mikroben-Elektroden-Interaktion in einem BES effizient zu gestalten ist die heterologe Expression einer verlängerten Elektronentransportkette, die einen direkten EET ermöglicht. Diese sollte aus den bereits beschriebenen Proteinen CymA und PioABC bestehen, die den Transport über die Zellmembranen und das Periplasma katalysieren.

Die Funktionalität der mit Hilfe des Expressionsplasmids pIND4 integrierten verlängerten Elektronentransportkette wurde in bioelektrochemischen Systemen analysiert. Eine Möglichkeit hierzu bietet die Steuerung des Potentiostaten mit einer Chronoamperometrie (Absatz 2.9.2), in der das Arbeitselektrodenpotential festgelegt und der resultierende Strom aufgezeichnet wird. Ein funktionaler EET resultiert in einer messbaren Stromstärke. Je effektiver dabei der Elektronentransfer, desto höher ist die Stromstärke bei konstantem Potential [12, 23, 85, 129]. Um Kontrollexperimente mit nicht-exoelektrogenen *R. sphaeroides*-Stämmen zu ermöglichen und stabile Kultivierungsbedingungen zu etablieren, musste ein Potential gefunden werden, das die kathodische Produktion von Wasserstoff ermöglicht. Der gebildete Wasserstoff sollte dabei als Substrat für *R. sphaeroides* dienen. Eine funktionale verlängerte Elektronentransportkette würde bewirken, dass Zellen als Elektronenakzeptoren mit einem höherem Redoxpotential als dem der Wasserstoffbildung zur Verfügung stünden, was bei gleichem Elektrodenpotential folglich in einer höheren Stromstärke resultieren würde.

3.1 Etablierung einer stabilen BES-basierten Kultivierung von *R. sphaeroides*

Um ein für eine stabile Kultivierung geeignetes elektrochemisches Potential zu finden, wurde zunächst ein abiotischer Versuch gestartet, in dem das angelegte Potential schrittweise verringert (Schrittgröße: $E = -0,06 \text{ mV/s}$) und der resultierende Strom gemessen wurde (= Chronoamperometrie). Da keine sonstigen Elektronenakzeptoren im System in ausreichender Konzentration vorhanden waren, konnte eine Zunahme des Stroms (negativere Werte) als einsetzende Wasserstoffproduktion interpretiert werden. Das Ziel bestand dabei darin, ein Potential zu finden, das eine geringe Wasserstoffproduktion bewirkt, um ein Wachstum von nicht-exoelektrogenen *R. sphaeroides*-Stämmen zur Durchführung von Kontrolleexperimenten zu ermöglichen. Die Hypothese war, dass Stämme mit funktionierendem EET bei einer geringen Wasserstoffkonzentration durch direkte Oxidation der Kathode dennoch einen Selektionsvorteil haben. Ein zu hoher Strom und folglich eine starke Wasserstoffbildung könnte bewirken, dass das Wachstum ausschließlich über die Aktivität der Hydrogenasen abläuft. Somit bestünde die Möglichkeit, dass eventuelle Potentialunterschiede, die auf einen funktionierenden direkten EET hindeuteten, verschleiert würden.

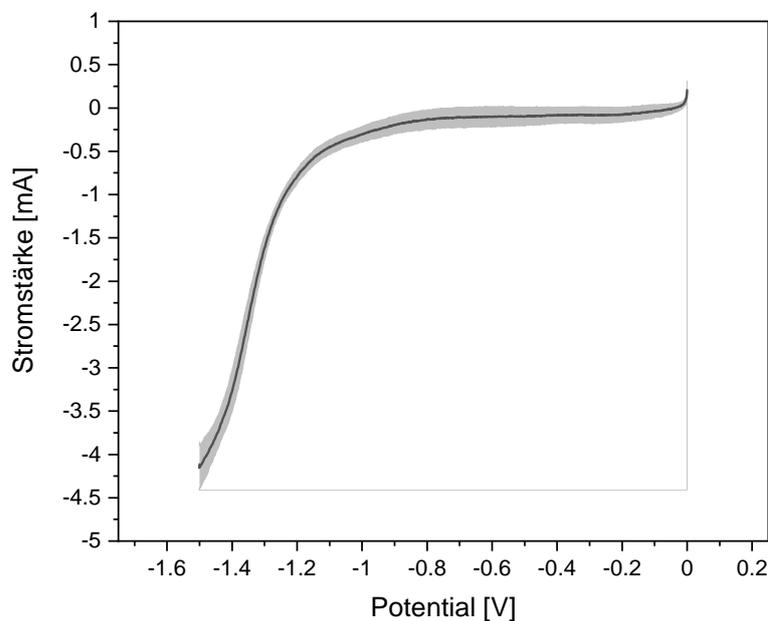


ABBILDUNG 5: Chronoamperometrische Analyse eines abiotischen bioelektrochemischen Systems (BES). Der Sweep des elektrochemischen Potentials wurde mit einer Scanrate von $E = -0,06 \text{ mV/s}$ durchgeführt. Eine zunehmende Stromstärke konnte mit einer einsetzenden Wasserstoffproduktion gleichgesetzt werden.

Wie in Abbildung 5 ersichtlich, war bei einem Kathodenpotential von $E = -0,8$ V eine einsetzende Zunahme des Stroms zu erkennen, die sich bis zu einem Potential von $E = -1$ V auf einen Wert von $-0,3$ mA verstärkte. Tiefere Potentiale resultierten in höheren Stromstärken von bis zu $-4,1$ mA bei $E = -1,5$ V. Um die zuvor genannten Voraussetzungen zu erfüllen erschienen Kathodenpotentiale zwischen $-0,9$ V und $-1,1$ V als angemessen. Diesen Ergebnissen folgend wurde das nächste Experiment mit dem Wildtypstamm *R. sphaeroides* WS8N als Inokulum durchgeführt. In diesem Experiment wurde der Potentiostat mit einer Chronoamperometrie betrieben, in der das Kathodenpotential schrittweise abgesenkt wurde, um das resultierende Wachstum von *R. sphaeroides* zu beobachten (Abbildung 6).

Das Startpotential wurde bei $E = -0,9$ V angesetzt, was in einer Stromstärke von ca. $-0,25$ mA resultierte. Die optische Dichte (OD, $\lambda = 650$ nm) nahm in diesem Zeitraum zunächst ab und stabilisierte sich anschließend. Bei Verringerung des Kathodenpotentials auf $E = -1$ V erreichte die Stromstärke etwa $I = -0,8$ mA und es konnte ein starker Anstieg der OD beobachtet werden. Dabei wurde ersichtlich, dass innerhalb des Triplikats große Abweichungen im Wachstum bestanden. Zudem nahm der Strom im Verlauf des Experiments weiter zu, was zu der Vermutung führte, dass die Menge an produziertem H_2 und somit der übertragenen Elektronen variierte und somit nicht von stabilen Kultivierungsbedingungen ausgegangen werden konnte.

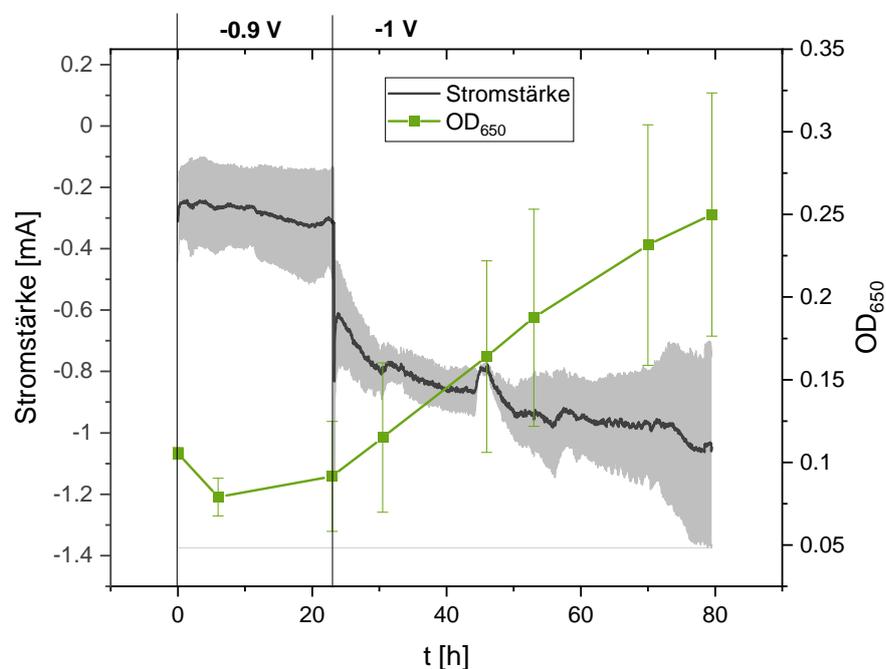


ABBILDUNG 6: Chronoamperometrische Analyse von *R. sphaeroides* WS8N in einem BES. Das Potential wurde schrittweise abgesenkt und der resultierende Strom gemessen. Gezeigt ist die OD (grün) und die Stromstärke (schwarz) bei einem angelegten Potential von $E = -0,9$ V und $E = -1$ V.

Da diese jedoch essentiell für weitere Untersuchungen waren, wurde die Betriebsart des Potentiostaten in folgenden Experimenten zu einer Chronopotentiometrie gewechselt. Eine Chronopotentiometrie kann als Umkehrung des Betriebsmodus der Chronoamperometrie gesehen werden: Anstatt das Potential festzulegen und den resultierenden Strom zu messen (= Chronoamperometrie), wird in einer Chronopotentiometrie der Strom festgelegt und das für die Aufrechterhaltung dieses Stroms notwendige Potential gemessen. Den Ergebnissen des vorherigen Versuchs folgend, wurde in diesem Versuch eine Chronopotentiometrie mit einer konstanten Stromdichte von $-22 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (entspricht einer Stromstärke von $-0,8 \text{ mA}$ im verwendeten BES) als Betriebsmodus verwendet. Durch Festlegung des Stroms und somit der Menge an übertragenen Elektronen wurde eine stabilere Wasserstoffproduktion vermutet. Nach einem anfänglichen Anstieg des gemessenen Potentials auf bis zu $-1,15 \text{ V}$, der mit einer erhöhten Abweichung im Triplikat verbunden war, stabilisierte sich der Wert bei etwa $-1,2 \text{ V}$ (Abbildung 7B). Wie in Abbildung 7A dargestellt, war die Standardabweichung der optischen Dichte im Vergleich zu den vorherigen Versuchen geringer. Erst mit Eintritt in die stationäre Phase bei einer OD von ca. 1,1 zeigten sich auftretende Abweichungen im Triplikat, was darauf hindeutete, dass mit diesem Ansatz eine stabilere Kultivierung erreicht werden konnte.

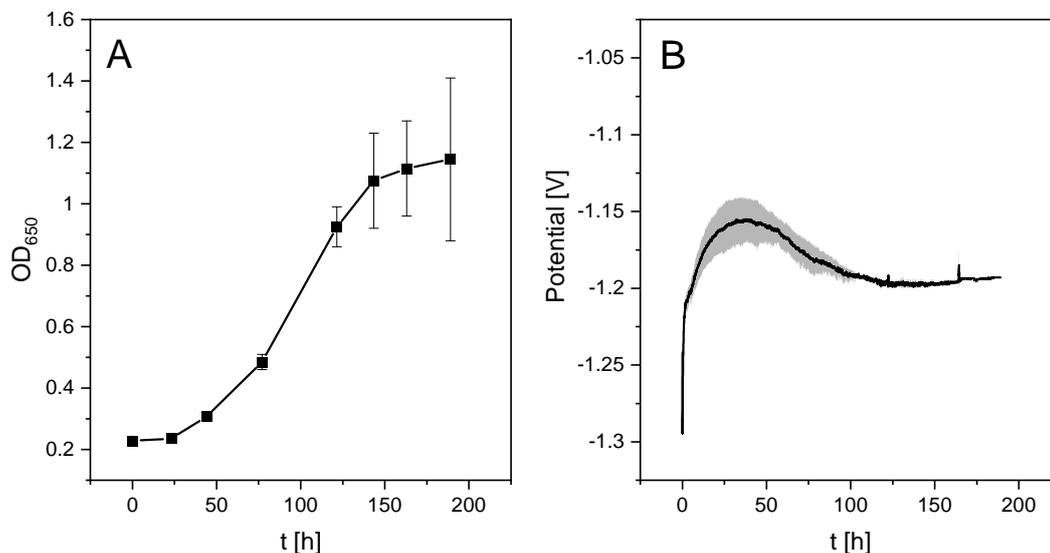


ABBILDUNG 7: Kultivierung von *R. sphaeroides* WS8N mittels Chronopotentiometrie mit einem festgelegten Strom von $I = -22,2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Sowohl die Messung der OD (A) als auch die Ergebnisse der Chronopotentiometrie (B) deuteten auf stabile Kultivierungsbedingungen hin.

3.1.1 Validierung der photolithoautotrophen Kultivierungsbedingungen

In den vorangegangenen Experimenten konnten Bedingungen ermittelt werden, die eine stabile BES-basierte Kultivierung von *R. sphaeroides* ermöglichten. Das nächste Ziel war es, die Hypothese, dass das beobachtete Wachstum durch photolithoautotrophe Bedingungen bedingt war, zu validieren. Daher wurde ein Versuch gestartet, in dem jeweils eine Bedingung des photolithoautotrophen Wachstums ausgesetzt wurde. So wurde ein BES-Triplikat ohne Licht und ein weiteres Triplikat ohne Wasserstoffproduktion betrieben. Wie in Abbildung 8A ersichtlich, konnte ohne Beleuchtung kein Wachstum stattfinden. Die Zuschaltung der Beleuchtung führte zu einem sofortigen Wachstum von *R. sphaeroides*. Andererseits zeigten beleuchtete Systeme, die ohne Strom (*Open Circuit Potential*) betrieben wurden, immer noch einen langsamen Anstieg der OD (Abbildung 8B). Nach 96 h stoppte das Zellwachstum in diesem Triplikat und setzte sich erst fort, sobald durch Anlegen eines konstanten Stroms wieder Reduktionsäquivalente bereitgestellt wurden. Ein Kontrollexperiment, bei dem alle Bedingungen von Anfang an bereitgestellt wurden (Abbildung 8C), zeigte zu Beginn stetiges Wachstum. Somit konnte die Hypothese, dass das beobachtete Wachstum auf Licht, kathodischen Reduktionsäquivalenten und CO_2 basierte, bestätigt werden.

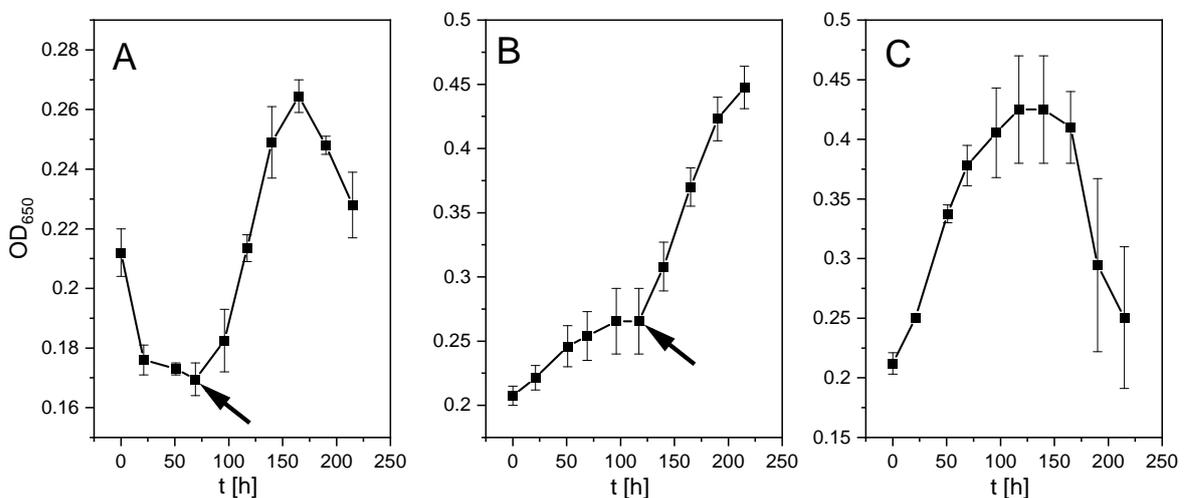


ABBILDUNG 8: Validierung der photolithoautotrophen Kulturbedingungen in einem BES durch Messung der optischen Dichte. A: BES-Lauf ohne Beleuchtung. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt, an dem Licht bereitgestellt wurde. B: BES betrieben ohne Wasserstoffproduktion (*Open Circuit Potential*). Der Pfeil markiert den Zeitpunkt, an dem der Potentiostat auf Chronopotentiometrie umgeschaltet und Wasserstoff erneut bereitgestellt wurde. C: BES, in dem Licht und Wasserstoff kontinuierlich bereitgestellt wurde.

3.2 Untersuchung einer verlängerten Elektronentransportkette in *R. sphaeroides*

3.2.1 Klonierung und Integration der verlängerten Elektronentransportkette

Die Gene für den direkten EET sollten über ein pIND4- Expressionsplasmid in *R. sphaeroides* WS8N eingebracht und exprimiert werden. Für die Klonierung von pIND4_ *cymA_pioABC* wurde ein bereits vorhandenes pIND4_ *pioABC* mit den Restriktionsenzymen XhoI und XbaI aufgeschnitten. Das mit einem His-Tag versehene Gen *cymA* wurde mit Primer #5 und #6 (Tabelle 2.3), die mit komplementären Überhängen zu pIND4 versehen waren, amplifiziert und in einer *in vitro* Ligation in das aufgeschnittene Plasmid zwischen Promotor und *pioABC* kloniert. Das Konstrukt wurde mit Primer #14 - #19 sequenziert und per Elektroporation (Absatz 2.5.1) in *R. sphaeroides* integriert. Der Nachweis der Funktionalität des Plasmids und somit der Expression der Gene erfolgte mit unter autotrophen Bedingungen kultivierten *R. sphaeroides* pIND4_ *cymA_pioABC*-Zellen, deren Membran- und Periplasmafraktion, wie in Absatz 2.5.2 dargestellt, präpariert wurde. Die Zellextrakte wurden in je einer SDS-Gelelektrophorese mit anschließender Immunodetektion (angefügter His-Tag von CymA) bzw. anschließendem Hemestain (Hämgruppen von PioA) analysiert. PioA kann als Holoenzym in der periplasmatischen Fraktion mit einer Größe von 34 kDa identifiziert werden. PioC ist ein *high potential iron-sulfur protein* (HIPIP) und enthält Eisen-Schwefel-Cluster als elektroaktive Gruppen, weshalb es im Hemestain nicht detektiert werden kann. Auch PioB besitzt als β -Fassprotein keine Hämgruppen, weshalb ein direkter Nachweis im Hemestain nicht möglich ist [44]. Im Hemestain der periplasmatischen Fraktion wurde eine Bande auf der Höhe von ca. 34 kDa sowie eine direkt darunterliegende Bande detektiert (Abbildung 9A). Der Nachweis von CymA ist bei einer Größe von 21 kDa in der Membranfraktion möglich. Im Westernblot der Membranfraktion konnte mittels Immunodetektion eine Bande auf der entsprechenden Höhe detektiert werden (Abbildung 9B). Sowohl im Wildtyp, als auch unter uninduzierten Bedingungen waren keine Banden sichtbar.

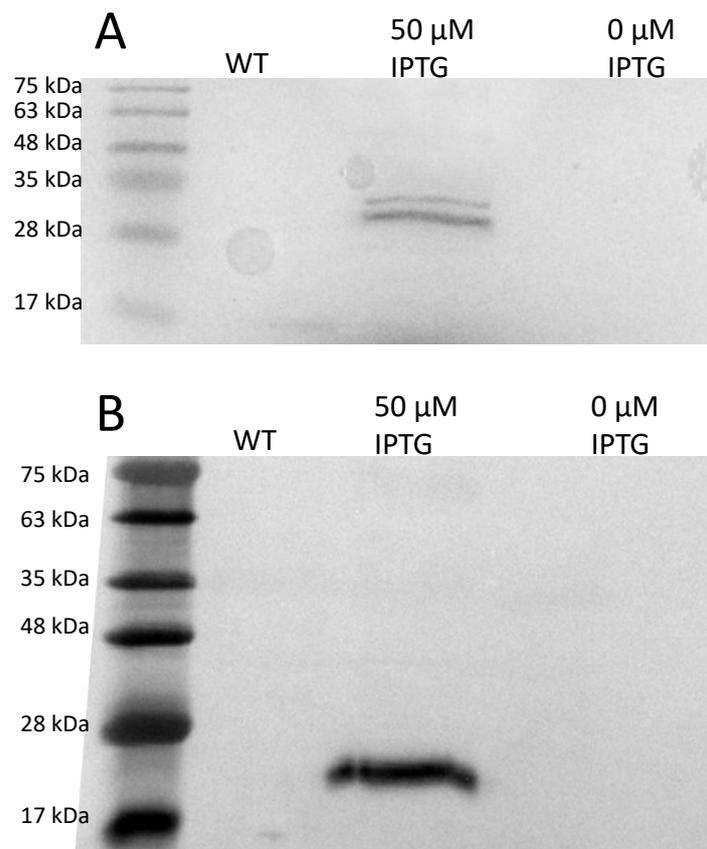


ABBILDUNG 9: Analyse von von *R. sphaeroides* pIND4_cymA_pioABC mittels SDS-Gelelektrophorese. Vergleich zwischen induzierten und uninduzierten Bedingungen. A: Hemestain der periplasmatischen Fraktion zum Nachweis von PioA (34 kDa). B: Western-Blot der Membranfraktion zum Nachweis von CymA (21 kDa). Als Kontrolle dienen die entsprechenden Fraktionen des Wildtyps (WT).

3.2.2 Überprüfung der Funktionalität der integrierten Elektronentransportkette

Zur Überprüfung der Funktionalität der Elektronentransportkette sollte *R. sphaeroides* pIND4_ *cymA_pioABC* in einem BES kultiviert werden. Äquivalent zu dem zuvor beschriebenen Effekt, dass ein effizienterer EET bei gleichbleibendem Elektrodenpotential in einem höheren Stromfluss resultiert, sollten in der Chronopotentiometrie Unterschiede im Elektrodenpotential, das für die Aufrechterhaltung des festgelegten Stroms nötig ist, Aufschlüsse über Mikroben-Elektroden-Interaktion geben.

R. sphaeroides pIND4_ *cymA_pioABC* wurde mit dem Wildtyp und *R. sphaeroides* pIND4 verglichen. Letzterer trug nur das pIND4-Expressionsplasmid, in das keine Gene integriert wurden, sodass es nur die Resistenz gegen den angelegten Kanamycin-Selektionsdruck und die Maschinerie zur stabilen Replikation enthielt. Er stellte damit einen Referenzstamm zu *R. sphaeroides* pIND4_ *cymA_pioABC* dar, da er sich nur in der Anwesenheit der integrierten *cymA* und *pioABC*-Gene unterschied. Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Abbildung 10 dargestellt. Der Wildtyp verhielt sich wie in vorherigen Experimenten und zeigte von Beginn an eine zunehmende planktonische optische Dichte und ein Kathodenpotential von ca. -1,2 V. *R. sphaeroides* pIND4_ *cymA_pioABC* dagegen zeigte keine Zunahme der planktonischen OD. Die chronopotentiometrischen Werte zeigten ein im Vergleich zum Wildtyp um ca. 200 mV positiveres Potential, das nötig war, um den festgelegten Strom aufrechtzuerhalten. Das Kontrollexperiment mit *R. sphaeroides* pIND4 ohne die Gene der verlängerten Elektronentransportkette zeigte dabei ein ähnliches Verhalten wie der pIND4_ *cymA_pioABC*-Stamm. Die Anwesenheit des pIND4-Expressionsplasmids und der damit verbundene Antibiotikumselektionsdruck allein schienen also bereits einen positiven Einfluss auf die Übertragung von kathodischen Elektronen zu haben. Auffällig war zudem, dass beide Stämme einen dicken Biofilm auf der Kathode bildeten, was bei den vorherigen Wildtyp-Experimenten nicht beobachtet werden konnte. Zur Quantifizierung des auf der Kathode gebildeten Biofilms wurde am Ende des Experiments, wie in Absatz 2.8.1 beschrieben, ein definiertes Stück der Elektrode extrahiert, um die Gesamtmenge der darauf vorhandenen genomischen DNA zu bestimmen. Die Analyse ergab eine im Vergleich zum Wildtyp um 2,5-fach bzw. 2,9-fach erhöhte Menge der gDNA und somit der Biomasse auf der Kathodenoberfläche für den pIND4- und den pIND4_ *cymA_pioABC*-Stamm.

Eine erhöhte Biofilmbildung auf der Elektrode resultierte also in verbesserten bioelektrochemischen Eigenschaften von *R. sphaeroides*. Die integrierte Elektronentransportkette schien dabei keinen Einfluss zu haben. Ob eine beeinträchtigte Funktionalität derselben Grund für diese Beobachtung war, konnte nicht abschließend geklärt

werden. Wenngleich unerwartet, entsprachen die Beobachtungen doch dem ursprünglichen Ziel, den Transfer kathodischer Reduktionsäquivalente zu *R. sphaeroides* und somit die elektrochemischen Eigenschaften zu optimieren. Als Shuttle diente dabei vermutlich Wasserstoff, der die eingangs erwähnten Nachteile exogener Redox-shuttles umgeht (Absatz 1.4.2), da er sich in seiner oxidierten Form nicht im Reaktor anreichert und durch die Nutzung regenerativer Energien zudem umweltfreundlich und zugleich kostengünstig durch Elektrolyse bereitgestellt werden kann. Deshalb wurde der Fokus der Arbeit im weiteren Verlauf auf den durch die pIND4-Integration optimierten Phänotyp gelegt.

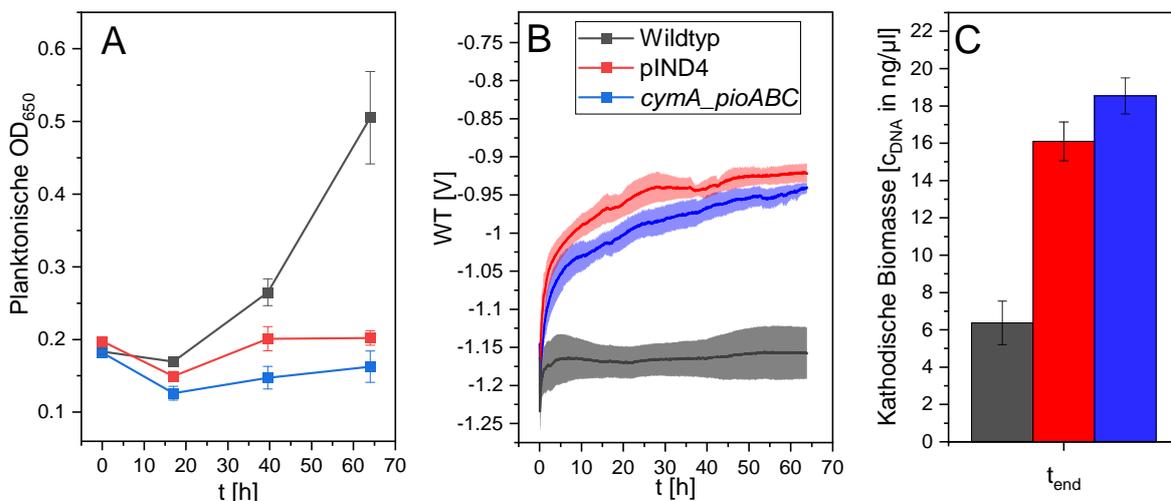


ABBILDUNG 10: Vergleich von *R. sphaeroides* pIND4_cymA_pioABC (blau), *R. sphaeroides* pIND4 (rot) und *R. sphaeroides* WS8N (grau) in einem BES. A: Vergleich des planktonischen Wachstums über die Messung der optischen Dichte. B: Ergebnisse der chronopotentiometrischen Messungen bei einem eingestellten Strom von $I = -22,2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. C: Vergleich der kathodischen Biomasse anhand der extrahierten gDNA eines definierten Stücks der Kathode.

3.3 Charakterisierung des biofilmbildenden *R. sphaeroides* pIND4-Phänotyps

3.3.1 Mikroskopische Analyse des *R. sphaeroides*-Biofilms

Für eine nähere Charakterisierung der biofilmbildenden Zellen wurden mikroskopische Analysen des konstruierten pIND4-Stammes durchgeführt (Abbildung 11). Eine DAPI-Analyse einer mit *R. sphaeroides* pIND4 bewachsenen Kathode bestätigte die bisherigen Ergebnisse, indem sie eine dicht besiedelte Kathodenoberfläche zeigte, auf der vereinzelt sogar mehrschichtige Zellagglomerate zu beobachten waren. Die Life Dead-Färbung zeigte, dass die Mehrheit der Zellen ein intaktes Membranpotential

hatte, während nur wenige beschädigte oder tote Zellen zu beobachten waren. Im Vergleich dazu zeigte die Analyse einer Kathode, die aus einem Wildtyp-inokulierten BES extrahiert wurde, nach Verwendung beider Färbungen nur wenige zufällig anhaftende Zellen (Daten nicht gezeigt).

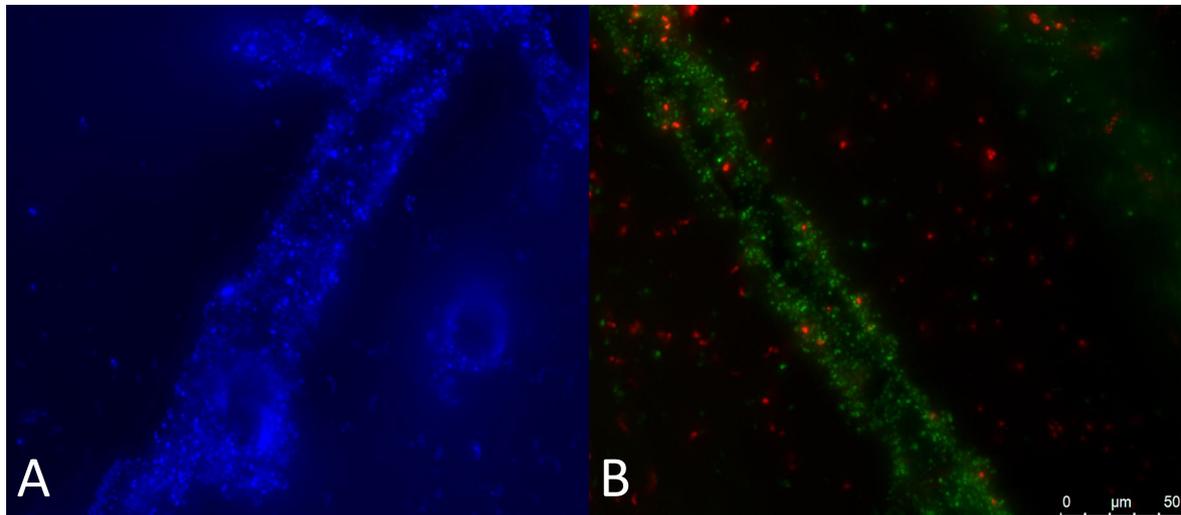
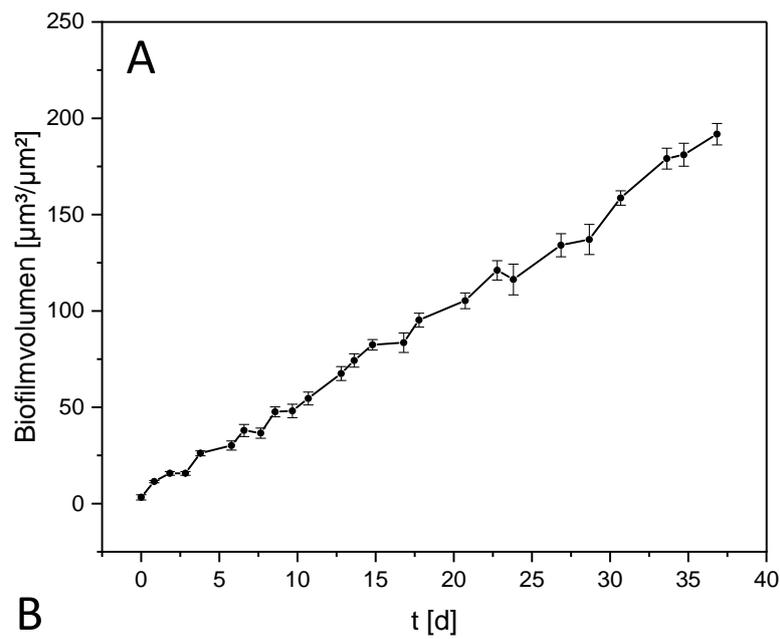


ABBILDUNG 11: Mikroskopische Analyse eines auf einer Kathode gewachsenen *R. sphaeroides* pIND4-Biofilms. A: 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI)-Färbung. Gefärbte Zellen erscheinen blau. B: Life Dead-Färbung. Lebensfähige Zellen erscheinen grün, Zellen mit beeinträchtigter Zellwandintegrität erscheinen rot.

3.3.2 Quantifizierung der Biofilmbildung mittels Fließzell-BES

Um die biofilmbildende Eigenschaft zu quantifizieren, wurde *R. sphaeroides* pIND4 in einem BES kultiviert, das für die Analyse der Biofilmbildung auf einer Kathode optimiert wurde. Dieses Fließzellen-Setup ermöglichte durch seine flache Kathodenoberfläche eine nicht-invasive Analyse der Biofilmkinetik mittels optischer Kohärenztomographie (OCT). Aufgrund des Wechsels des Kathodenmaterials war es notwendig, eine geeignete Stromdichte für ein stabiles Biofilmwachstum zu ermitteln. Daher wurde eine Chronopotentiometrie gestartet, in der der Strom schrittweise erhöht wurde (Daten nicht gezeigt). Wasserstoff musste in einer ausreichenden Menge erzeugt werden, um Wachstum zu ermöglichen. Dabei sollten keine Gasblasen gebildet werden, da diese die Biofilmbildung stören würden. Geeignete Bedingungen wurden durch Anlegen eines Stroms von $I = -10 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ erreicht. Abbildung 7 zeigt ein Experiment, in dem *R. sphaeroides* pIND4 mit diesen Einstellungen kultiviert wurde. Durch wiederholte OCT-Messungen der gleichen Stelle der Kathode konnte das Wachstum des Biofilms nachvollzogen werden. Wie in Abbildung 12 zu sehen ist, nahm das Biofilmvolumen annähernd linear ($R^2 = 0,9959$) mit einer Wachstumsrate

von $\mu = 0,21 \text{ h}^{-1}$ zu. Am Ende des Experiments wurde ein Biofilmvolumen von $224 \text{ } \mu\text{m}^3 / \mu\text{m}^2$ erreicht. Durch Prozessierung der aufgenommenen OCT-Daten zu topographischen Höhenprofilen war eine detaillierte Visualisierung des Biofilmwachstums möglich (Abbildung 12C). Die Biofilmhöhe wird durch einen Farbverlauf angezeigt, wobei eine zunehmend helle Farbe Biofilmstrukturen mit zunehmender Höhe bis zu 0,4 mm zeigt (gelblich-weiß). Die Kathodenoberfläche (schwarzer Bereich) wurde an Tag 1 von einzelnen Zellagglomeraten besiedelt und war bis Tag 9 vollständig bedeckt. Zusätzlich zu den visuellen Informationen erlaubten die topographischen Höhenprofile auch die Quantifizierung der mittleren Biofilmdicke und -dicke (Abbildung 12B). Nachdem der Biofilm zu Beginn an Tag 3 eine geringe mittlere Dicke von $26 \text{ } \mu\text{m}$ und eine Abweichung von dieser Dicke um $23 \text{ } \mu\text{m}$ aufwies, erreichte er an Tag 13 eine Dicke von $79 \text{ } \mu\text{m}$ ($\pm 34 \text{ } \mu\text{m}$). Die Abweichung veränderte sich danach nicht mehr, wodurch die relative Abweichung von der mittleren Dicke mit fortlaufender Zeit abnahm. An Tag 31 erreichte die mittlere Biofilmdicke einen Wert von $168 \text{ } \mu\text{m}$ ($\pm 34 \text{ } \mu\text{m}$).



Tag	Mittlere Dicke [μm]	Abweichung [μm]	Abweichung [%]
1	13	15	115
3	26	23	88
9	54	26	49
13	79	34	42
23	132	34	26
31	168	34	20

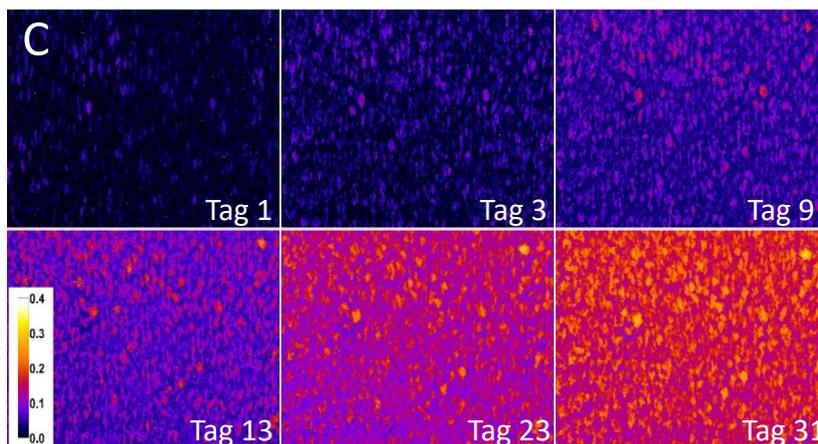


ABBILDUNG 12: Kultivierung von *R. sphaeroides* pIND4 in einem Fließzellen-Setup. A: Berechnetes Biofilmvolumen über die Zeit. Die Daten wurden durch wiederholte OCT-Messungen derselben Stelle auf der Kathode gesammelt. B: Mittlere *R. sphaeroides* pIND4-Biofilmdicke und die Abweichung von dieser Dicke. C: Topographische Höhenprofile des Biofilms zu bestimmten Zeitpunkten. Die Farbskala links unten zeigt die entsprechende Höhe in mm.

3.3.3 Proteomanalyse von *R. sphaeroides* pIND4

Zusammengefasst zeigen die bisherigen Ergebnisse, dass die Integration eines pIND4-Expressionsvektors und der entsprechende Kanamycin-Selektionsdruck die elektrochemischen Eigenschaften sowie die Biofilmbildung von *R. sphaeroides* auf der Kathode eines BES verbessert. Die physiologischen Grundlagen die zu diesen Veränderungen führten, blieben unklar. Um diese auf molekularer Ebene zu untersuchen, wurde eine Massenspektrometrie-basierte quantitative Proteomanalyse mit drei biologischen Replikaten von kathodischen Wildtyp-Zellen und *R. sphaeroides* pIND4-Zellen durchgeführt. Diese Strategie ermöglichte eine zuverlässige Identifizierung und Quantifizierung von 1561 Proteinen, von denen 316 eine unterschiedliche Häufigkeit zwischen den verglichenen Stämmen aufwiesen (Fold Change ≥ 2 und p-Wert $< 0,01$). Die differentiell exprimierte Proteine, die für die Erklärung der beobachteten Veränderungen auf molekularer Ebene relevant sein könnten, sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

TABELLE 3.1: Zusammenfassung der Proteomanalyse: Relevante Proteine, die in *R. sphaeroides* pIND4 im Vergleich zum Wildtyp als mindestens 2-fach hoch- oder herunterreguliert identifiziert wurden.

Protein	Potentielle Aufgabe	Log ₂ FC
ATP-Synthase	Energiestoffwechsel	4,08
Ni/Fe-Hydrogenase	Uptake Hydrogenase	2,89
UvrD-ähnliche DNA Helicase	DNA-Reparatur	2,57
2-Oxoglutarat-Dehydrogenase	Citrat-Zyklus	2,25
MerR	Transkriptioneller Regulator	2,18
MurE	Peptidoglycan-Biosynthese	2,10
Formiat-Dehydrogenase	Formiat-Stoffwechsel	2,03
PHA-Synthase	Produktion von Speicherstoffen	1,89
NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase	Komplex I Atmungskette	1,80
PpkA	Serin/Threonin-Proteinkinase	1,78
PufX	Photosynthese	-1,11
Cytochrom <i>b</i>	Photosynthese	-1,18
Lichtsammelkomplex (LHC)	Photosynthese	-1,19
OmpA/MotB	Flagellum-assoziiert	-1,39
LexA Repressor	Regulator DNA-Reparatur	-2,45

Zu den am meisten im pIND4-Stamm hochregulierten Proteinen zählten Proteine, die mit dem Stoffwechsel assoziiert waren, wie zum Beispiel die ATP-Synthase und eine Ni/Fe-Hydrogenase. Proteine des Kohlenstoffmetabolismus wie zum Beispiel des Citrat-Zyklus (2-Oxoglutarat Dehydrogenase) und der Speicherstoffproduktion (PHA-Synthase) wurden als vermehrt exprimiert identifiziert, was womöglich auf

den durch die Ni/Fe-Hydrogenase vermittelten, verbesserten Zugang zu Reduktionsäquivalenten zurückzuführen ist. Auffallend war außerdem die vermehrte Expression von DNA-Reparaturmechanismen und der Zellwandsynthese (MurE). Auf der anderen Seite wurden vor allem Proteine der Photosynthese (PufX, Cytochrom *b*, LHC), sowie Flagellum-assoziierte Proteine als herunterreguliert identifiziert.

3.4 BES-gestützte Produktion von Wertstoffen mit *R. sphaeroides* pIND4

Die Integration von pIND4 und der korrespondierende Selektionsdruck bewirkten eine starke Steigerung der Biofilmbildung und damit verbundene verbesserte elektrochemische Eigenschaften. Diese hatten wiederum die erhöhte Expression von Proteinen, die in den Metabolismus involviert sind, zur Folge. Insgesamt konnten die Eigenschaften von *R. sphaeroides* also durch sehr einfache Mittel in Richtung eines Produktionsstamms optimiert werden. Als *Proof of principle*, dass die photolithoautotrophe BES-gestützte Produktion von Wertstoffen mit dem so optimierten *R. sphaeroides* pIND4-Stamm möglich ist, sollten zwei Beispielprozesse etabliert werden. Im ersten dieser Prozesse wurde die intrazelluläre Anreicherung von Polyhydroxybutyrat (PHB) untersucht, während im zweiten Prozess die Synthese von Acetoin als Beispiel für die Produktion von zellfremden Stoffen dienen sollte.

3.4.1 *Proof of principle* für die Produktion von PHB

PHB wird als Speicherstoff unter stickstofflimitierten Bedingungen akkumuliert, wenn Kohlenstoff im Überschuss vorhanden ist. Um zu evaluieren, ob die BES-basierte photolithoautotrophe Kultivierung von *R. sphaeroides* zur Produktion von PHB genutzt werden kann, wurden im zuvor beschriebenen Fließzellen-Setup stickstofflimitierte Bedingungen geschaffen. Dazu wurde *R. sphaeroides* pIND4 in einem stickstoffreichen Medium kultiviert, bis sich ein Biofilmvolumen von $106 \mu\text{m}^3 / \mu\text{m}^2$ gebildet hatte. Anschließend wurde das Kulturmedium gegen eine stickstofffreie Variante ausgetauscht. Dazu wurde die Peripherie der Fließzelle an den Schnellkupplungsventilen von der Fließzelle abgekoppelt und durch eine Peripherie mit stickstofffreiem Medium ersetzt. Nach drei Tagen Inkubation wurde der Biofilm von der Kathode abgeschabt und in Waschpuffer resuspendiert. Der PHB-Gehalt der Suspension wurde anschließend durch eine Nilrot-Färbung analysiert. Die durch die Nilrot-Färbung erhobenen Daten wurden auf die Gesamt-DNA-Konzentration der Probe normalisiert. Die Ergebnisse zeigten, dass der Wechsel zu stickstofflimitierten Bedingungen einen Anstieg des intrazellulären PHB-Gehalts um das 5,4-fache im

Vergleich zu Bedingungen ohne Stickstofflimitierung verursachte. Der Nachweis, dass PHB tatsächlich vorhanden war, wurde durch eine Nilrot-Färbung der PHB-Granula und anschließender fluoreszenzmikroskopischer Analyse erbracht. Die Kultivierung unter stickstoffreichen Bedingungen zeigte Zellen mit wenig bis gar keiner PHB-Akkumulation, während die Kultivierung unter stickstofflimitierten Bedingungen zu mehr Zellen führte, die große PHB-Granula akkumuliert hatten (Abbildung 13). Somit konnte eine intrazelluläre PHB-Akkumulation, die durch stickstofflimitierte Bedingungen induziert wurde, nachgewiesen werden.

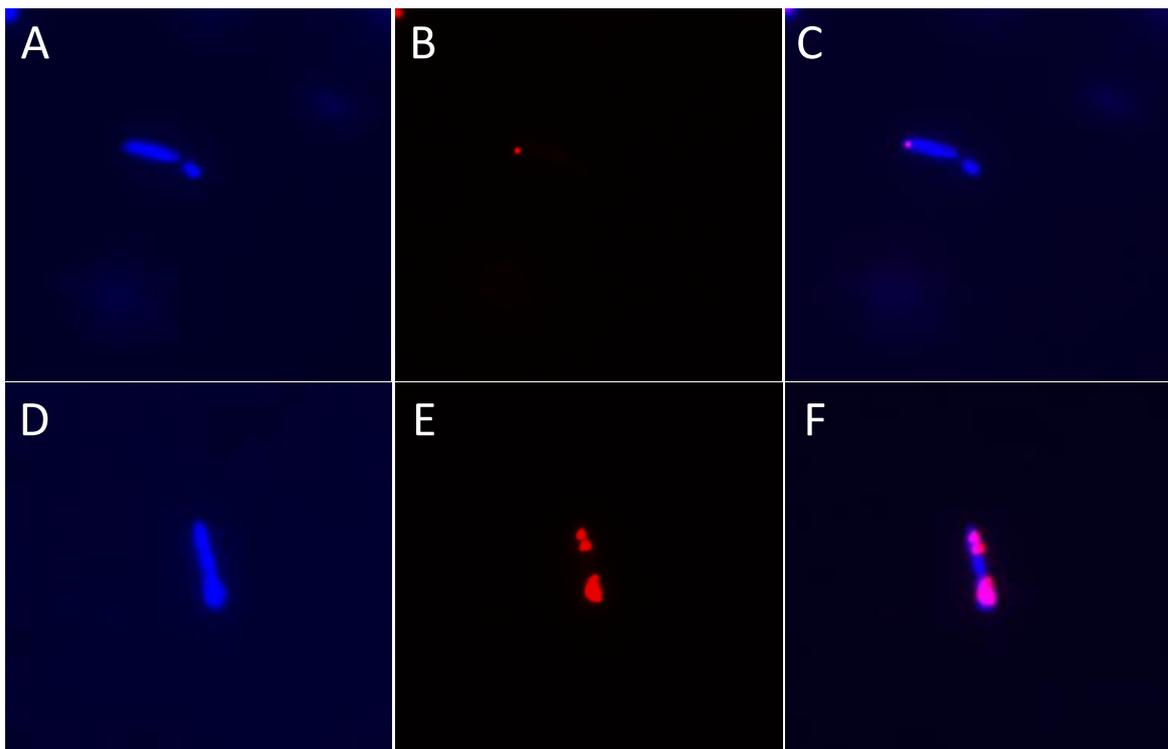


ABBILDUNG 13: Fluoreszenzmikroskopische Analyse von in einem Fließzellen-Setup kultivierten *R. sphaeroides* pIND4-Zellen. Vergleich von *R. sphaeroides* pIND4-Zellen, die unter stickstoffreichen Bedingungen (A-C) und unter stickstofflimitierten Bedingungen (D-F) kultiviert wurden. Die verwendeten Färbungen waren 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI), in der Zellen blau erscheinen (linke Spalte) und Nilrot, in der die PHB-Granula rot erscheinen (mittlere Spalte). Die rechte Spalte zeigt beide Färbungen überlagert.

3.4.2 Proof of principle für die Produktion von Acetoin

Als *Proof of principle*, dass die BES-gestützte Produktion mit dem optimierten *R. sphaeroides* pIND4-Stamm nicht nur von endogenen, sondern auch von zellfremden Stoffen durch die heterologe Expression der entsprechenden Enzyme möglich ist, sollte die Produktion von Acetoin etabliert werden. Der dafür gewählte Stoffwechselweg

besteht aus zwei Enzymen. Das Erste, eine Acetolactat-Synthase (AlsS), katalysiert die Umsetzung von zwei Molekülen Pyruvat zu einem Molekül Acetolactat, welches im zweiten Schritt durch eine Acetolactat-Decarboxylase (AlsD) zu Acetoin umgesetzt wird. In beiden Schritten wird CO_2 freigesetzt, was unter autotrophen Bedingungen für eine erneute Fixierung verwendet werden kann. Pyruvat sollte dabei durch die Fixierung von CO_2 bereitgestellt werden, wofür Elektronen von der Oxidation des an der Kathode produzierten Wasserstoffs genutzt werden sollten. Eine Analyse der Codon Usage ergab, dass die Sequenzen der Gene, die in *Bacillus subtilis* ihren Ursprung haben, nicht für eine stabile Expression in *R. sphaeroides* geeignet sind. Aus diesem Grund wurde eine Optimierung der Codon Usage nach Nakamura *et al.* [88], wie in Absatz 2.5.1 dargestellt, durchgeführt. Die optimierten synthetisierten Sequenzen wurden mit Primer #1 und #2 amplifiziert und per *in vitro* Ligation in ein per Restriktionsverdau mit XbaI und HindIII geöffnetes pIND4-Expressionsplasmid kloniert. Durch Verwendung des pIND4-Expressionsplasmids sollten die zuvor charakterisierten optimierten Stammeigenschaften von *R. sphaeroides* pIND4 für die Produktion von Acetoin genutzt werden. Das erstellte Konstrukt wurde mit Primer #9 - #12 sequenziert und per Elektroporation in *R. sphaeroides* WS8N integriert.

Acetoinproduktion unter heterotrophen Bedingungen

Nach erfolgreicher Klonierung von *R. sphaeroides* pIND4_alsSD sollte dessen grundlegende Funktionalität getestet werden. Dafür wurde der generierte Stamm wie in Absatz 2.4.1 beschrieben unter heterotrophen Bedingungen kultiviert und mit 50 μM IPTG induziert. Wie in Abbildung 14 ersichtlich, zeigte die OD eine über den Zeitraum des Experiments stabile Zunahme bis zu einem Wert von 1,2. In den ersten 21,5 h war eine starke Abnahme der Laktatkonzentration auf einen Wert von 7,4 mM zu beobachten, während im selben Zeitraum 4,3 mM Acetoin mit einer Produktivität von 17,8 mg/(l*h) gebildet wurden. Nach 40,5 h war sämtliches Laktat verbraucht und es wurde eine maximale Acetoinkonzentration von 4,7 mM bzw. 0,42 g/l Acetoin gemessen. Die Produktivität bis zum höchsten gemessenen Acetoinwert lag bei 10,3 mg/(l*h). Dabei lag die Kohlenstoffausbeute bezogen auf das verbrauchte Laktat bei 0,101 mol Acetoin/mol Laktat. Aufgrund der Stöchiometrie des Acetoinstoffwechselweges entspricht das theoretisch erreichbare Maximum einer Ausbeute von 0,5 mol Acetoin/mol Laktat, wodurch der in diesem Experiment erhaltene Wert einer Acetoinproduktion mit einer Effizienz von 20,2 % entsprach.

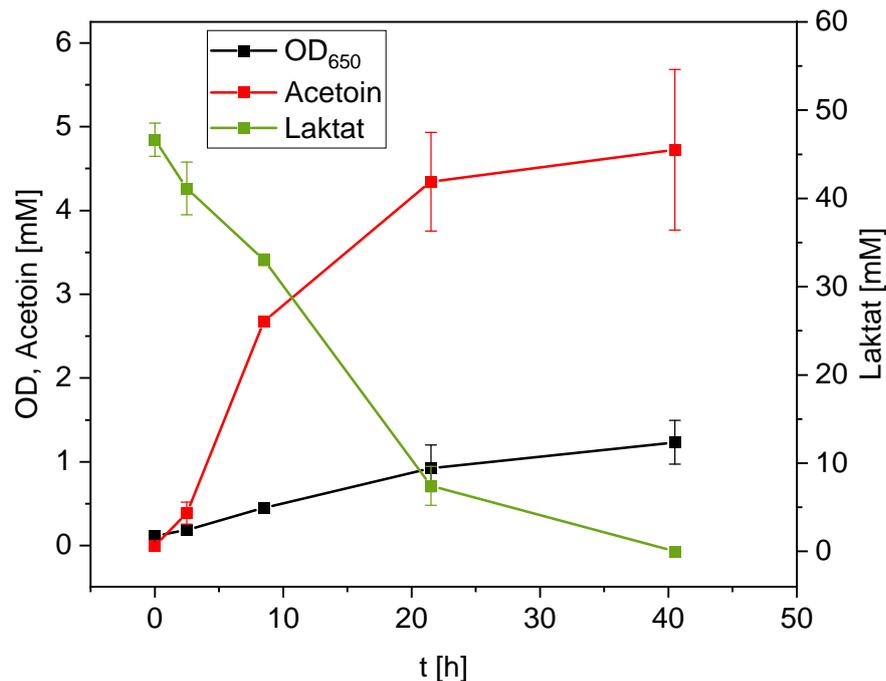


ABBILDUNG 14: Heterotrophe Acetoinproduktion mit *R. sphaeroides* pIND4_alsSD. Der vollständige Verbrauch von Laktat resultierte in der Zunahme der OD und der Produktion von Acetoin.

Acetoinproduktion unter photolithoautotrophen Bedingungen

Den Ergebnissen des heterotrophen Experiments folgend, wurde der Versuch unter photolithoautotrophen Bedingungen wiederholt. Unter diesen Bedingungen sollte die auf der Calvin-Zyklus-vermittelten CO₂-Fixierung basierende Acetoinproduktion bewertet werden. Zur Schaffung möglichst genau definierter Bedingungen wurde das Experiment im Flaschen-Scale durchgeführt. Dafür wurden 0,2 l FEM-Medium in gasdicht verschlossene 1 l-Kulturflaschen gefüllt und mit *R. sphaeroides* pIND4_alsSD beimpft. Die Gasphase wurde durch ein H₂/CO₂-Gasgemisch (80 %/20 %) ersetzt, ohne dabei Überdruck anzulegen. Bei jeder Probenahme wurden Micro-GC-Messungen wie in Absatz 2.7.1 beschrieben durchgeführt. Zur Substratbereitstellung wurde die Gasphase außerdem erneut durch ein H₂/CO₂-Gasgemisch (80 %/20 %) ersetzt. Eine darauf folgende Micro-GC-Messung ermöglichte durch Bildung der Differenz der Start- und Endkonzentrationen eine genaue Quantifizierung des Substratverbrauchs zwischen jedem Probenahmepunkt. Die Ergebnisse des Versuchs sind in Abbildung 15 dargestellt. Der Wildtyp zeigte eine starke Zunahme der OD auf einen Wert von 1,95 was mit einem Verbrauch von H₂ und CO₂ verbunden war. In den ersten 23 h stieg die OD am schnellsten an, was mit einem erhöhten Verbrauch von 14,5 mmol H₂ und 7,3 mmol CO₂ korrelierte. Der zwischen den folgenden Probenahmepunkten gemessene Substratverbrauch schwankte zwischen

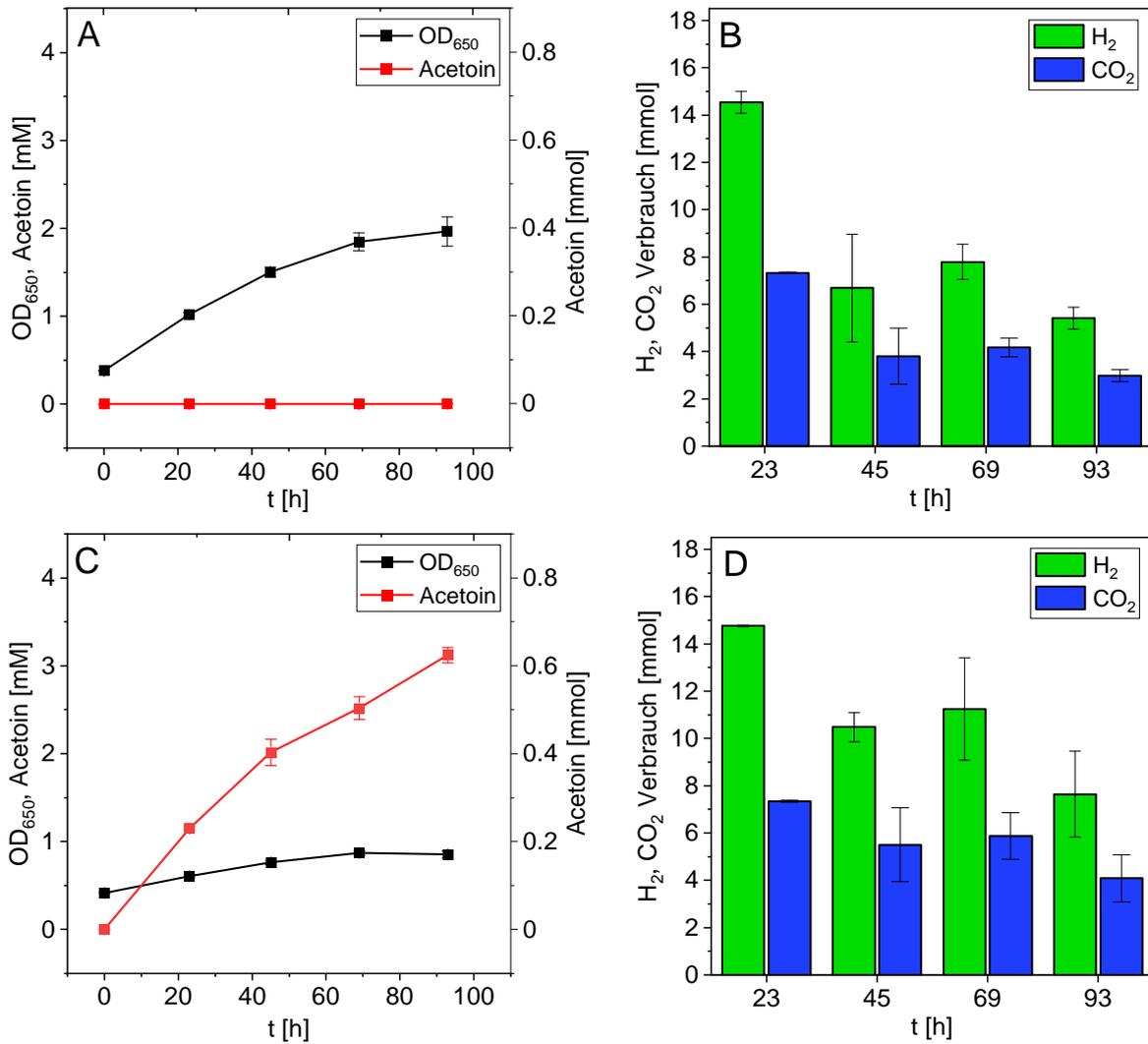


ABBILDUNG 15: Vergleich von *R. sphaeroides* Wildtyp (A und B) und pIND4_alsSD (C und D) unter photolithoautotrophen Bedingungen. Die H₂- und CO₂-Werte stellen den Substratverbrauch ab der vorherigen Probenahme dar.

5,4 - 7,8 mmol H₂ bzw. 3,0 - 4,2 mmol CO₂. *R. sphaeroides* pIND4_alsSD dagegen zeigte eine geringere Zunahme der OD auf 0,87 nach 69 h, welche anschließend stagnierte. Der Substratverbrauch war in den ersten 23 h mit 14,8 mmol H₂ und 7,3 mmol CO₂ am höchsten und schwankte anschließend zwischen 7,6 - 11,2 mmol H₂ bzw. 4,1 - 5,9 mmol CO₂. Im Gegensatz zum Wildtyp wurde im Verlauf des Experiments 3,1 mM bzw. 0,27 g/l Acetoin mit einer Produktivität von 2,96 mg/(l*h) produziert. Die gemessene Acetoinkonzentration entsprach einer auf den CO₂-Verbrauch bezogenen Ausbeute von 0,027 mol Acetoin/mol CO₂. Unter diesen Wachstumsbedingungen und aufgrund des abgeschlossenen Systems kann das im AlsSD-Stoffwechselweg abgespaltene CO₂ erneut als Substrat verwendet werden. Somit liegt das theoretisch

erreichbare Maximum bei 0,25 mol Acetoin/mol CO₂, wodurch die Kohlenstoffeffizienz 10,9 % betrug. Die Quantifizierung des H₂-Verbrauchs erlaubt außerdem die Bestimmung, wie viele der durch die Wasserstoffoxidation erhaltenen Elektronen sich im Endprodukt wiederfinden. Für die Reduktion von CO₂ zu Acetoin werden 20 mol Elektronen pro mol Acetoin benötigt, was in einem optimalen Wert (theoretisches Minimum) von 10 mol H₂/mol Acetoin resultiert. In diesem Experiment wurde ein Wert von 70,69 mol H₂/mol Acetoin erreicht, was bezogen auf den insgesamt verbrauchten Wasserstoff einer Effizienz von 14,1 % entsprach.

Acetoinproduktion unter BES-gestützten Bedingungen

Wie zuvor beschrieben, erhöhte die Integration von pIND4 und der entsprechende Antibiotikumselektionsdruck die Tendenz zur Biofilmbildung. Es konnte gezeigt werden, dass sich die unmittelbare Nähe zur Elektrode positiv auf den Metabolismus auswirkt. Die bisher verwendeten BES waren für die Kultivierung von planktonischen Zellkulturen optimiert und hatten bei einem Volumen von 280 ml eine Elektrodenoberfläche von 36 cm², was einem Oberflächen-zu-Volumen (A/V)-Verhältnis von 12,86 m²/m³ entspricht. Um den biofilmbildenden Eigenschaften von *R. sphaeroides* pIND4_alsSD gerecht zu werden und einen besseren Zugang zum Substrat zu gewährleisten, wurde die Elektrodenfläche auf 140 cm² vergrößert und das Reaktorvolumen auf 200 ml reduziert. Mit diesen Anpassungen konnte ein A/V-Verhältnis von 70 m²/m³ erreicht werden. Das System wurde so angeordnet, dass eine durchgängige Beleuchtung der Kathodenoberfläche weiterhin möglich war.

Die Ergebnisse der Kultivierung von *R. sphaeroides* pIND4_alsSD in diesem System sind in Abbildung 16 dargestellt. Das System wurde mit einer OD von 0,55 inokuliert, die sich nur marginal veränderte. Die vergrößerte Kathodenoberfläche wurde im Verlauf des Experiments, wie bereits zuvor beobachtet, durchgängig mit Biofilm besiedelt. Die Produktion von Acetoin setzte zu Beginn des Experiments ein und erreichte nach 71 h Laufzeit ein Maximum von 0,85 mM (0,075 g/l). Anschließend wurde eine Abnahme der Acetoinkonzentration auf einen Wert von 0,51 mM beobachtet.

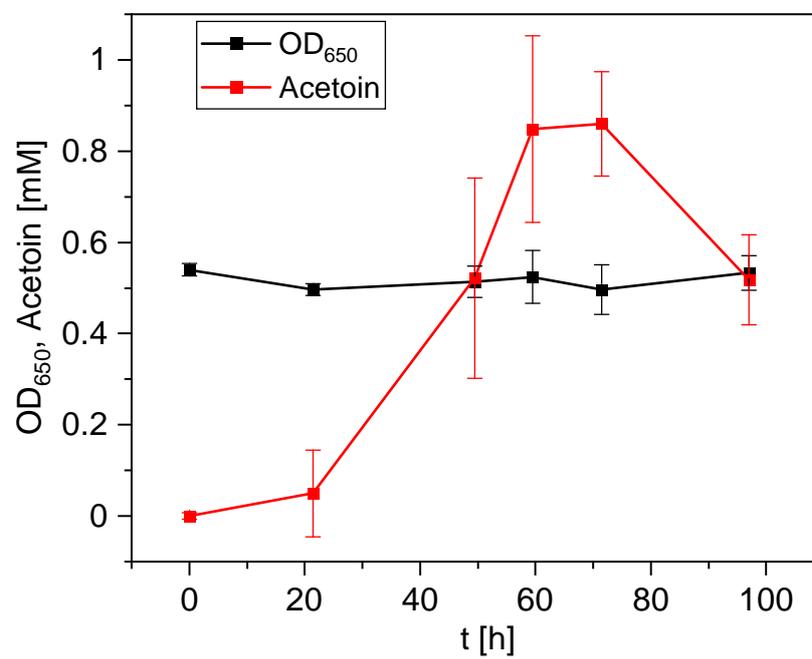


ABBILDUNG 16: Kultivierung von *R. sphaeroides* pIND4_alsSD in einem optimierten BES mit vergrößerter Elektrodenoberfläche und verkleinertem Reaktorvolumen. Im Verlauf wurden maximal 0,86 mM Acetoin produziert.

Kapitel 4

Diskussion

Der erste Teil der Arbeit bestand in der Etablierung stabiler BES-basierter Kultivierungsbedingungen um eine effiziente Interaktion von *R. sphaeroides* mit einer Kathode zu ermöglichen. Anschließend wurden Möglichkeiten zur Optimierung dieser Interaktion untersucht und charakterisiert. Im letzten Teil der Arbeit konnte die Produktion von Wertstoffen unter BES-gestützten photoautotrophen Bedingungen im zuvor optimierten Stamm demonstriert werden, um dessen grundlegende Eignung für die vorgesehenen Einsatzgebiete zu belegen.

4.1 Etablierung stabiler Kultivierungsbedingungen in einem BES

An den Elektroden eines BES läuft je eine Teilreaktion einer Redoxreaktion ab. Deren elektrochemische Eigenschaften werden dabei über einen Potentiostaten definiert. In einer Chronoamperometrie wird beispielsweise ein Kathodenpotential E definiert und die resultierende Stromstärke I gemessen. Die Konzentration an Elektronenakzeptoren bzw. -donoren sowie deren Redoxpotential beeinflusst dabei den Stromfluss. Diese Eigenschaft wird genutzt um elektrochemische Wechselwirkungen zwischen Mikroorganismen und Elektrode zu untersuchen. Mikroorganismen mit exoelektrogenen Eigenschaften besitzen die Fähigkeit, Elektronen entweder direkt oder indirekt auf eine Anode oder von einer Kathode zu transferieren und für ihren Metabolismus zu nutzen, was wiederum zu einem detektierbaren Stromfluss führt. Eine Schwierigkeit bei der Nutzung einer Chronoamperometrie besteht darin, dass ein Stromfluss und entsprechendes Wachstum nur bei funktionalem EET sichtbar ist. Um in dieser Arbeit dennoch Bedingungen zu definieren, die eine stabile Kultivierung von *R. sphaeroides* ermöglichen, sollte ein Elektrodenpotential angelegt werden, das die abiotische Bildung von Wasserstoff an der Kathode ermöglicht, welcher wiederum als Substrat für die Hydrogenasen

von *R. sphaeroides* dient. Die dem zu Grunde liegende Hypothese war, dass eine Differenzierung zwischen exoelektrogenen und nicht-exoelektrogenen Stämmen im weiteren Verlauf der Arbeit durch einen höheren Strom bei gleichbleibendem Potential dennoch möglich ist. Die H–H Bindungsstärke im Wasserstoffmolekül liegt bei 432 kJ/mol^{-1} , weshalb ein hoher Energieaufwand für dessen Bildung erforderlich ist [2]. Organismen mit funktionierendem direktem EET können die Kathode ohne Mediatoren oxidieren, wodurch weniger Elektronen für die Bildung des stark elektronegativen Wasserstoffs aufgewendet werden müssen. Folglich wird ein geringerer Energieaufwand benötigt was einen höheren Stromfluss bei konstantem Potential bewirkt. Das elektrochemische Potential, bei dem Wasserstoff an einer Elektrode gebildet wird, ist abhängig von den Versuchsbedingungen wie dem gewählten Elektrodenmaterial und der Zusammensetzung des Elektrolyten. Literaturwerte für die abiotische Wasserstoffbildung an Graphitelektroden liegen bei -1 V vs SHE [5, 25], was einem Potential von $-1,2 \text{ V}$ gegen eine Ag/AgCl-Referenzelektrode entspricht. Der in dieser Arbeit durchgeführte abiotische Sweep (Absatz 3.1), in dem das FEM-Kulturmedium als Elektrolyt diente, zeigte eine Zunahme des Stroms und somit eine einsetzende Wasserstoffproduktion ab $-0,8 \text{ V}$. Bei einem Potential von -1 V konnte ein Strom von $-0,3 \text{ mA}$ detektiert werden. In Folgeversuchen, in denen das BES mit dem nicht-exoelektrogenen *R. sphaeroides* Wildtyp inokuliert war, wurde bei demselben Potential ein stärkerer Strom von $-0,8 \text{ mA}$ gemessen. Die bei gleichem Potential erhöhte Stromstärke deckt sich mit Literaturstellen, die von einer Reduzierung des für die Wasserstoffproduktion nötigen Überpotentials in inokulierten Systemen berichten. Yates *et al.* konnten einen positiven Einfluss sowohl von lebendigen Zellkulturen von *Geobacter sulfurreducens* oder *Methanosarcina barkeri*, als auch von deren lysierten Zellextrakten auf die kathodische Produktion von Wasserstoff zeigen [152]. Die Ursache dieser Beobachtung wurde mit Scanning Electron Microscopy (SEM) untersucht. Auf Kathoden, die mit Zellextrakt inkubiert wurden, konnte die Anlagerung von biologischem Material detektiert werden, das seinen Ursprung in lysierten Zellen hatte. Dazu gehörten Peptide aus Ferredoxin-Oxidoreduktasen, Dehydrogenasen und sonstigen Metalloenzymen, die in zelluläre Elektronentransportprozesse involviert sind. Diese nutzen in der Zelle meist NAD^+ oder FAD^+ als Elektronenakzeptor, können jedoch, falls kein sonstiger Akzeptor vorhanden ist, auch die Reduktion von Protonen katalysieren [111]. Durch den hohen Sauerstoffanteil in Graphitelektroden enthält die oxidierte Elektrodenoberfläche vermutlich funktionelle Gruppen, die eine Anlagerung der erwähnten Peptide ermöglichen [121]. Die Analyse der elementaren Zusammensetzung des angelagerten biologischen Materials zeigte eine erhöhte Menge an Kobalt, Nickel, Eisen und Zink, was typische Reaktionszentren von Metalloenzymen sind. Kobalt und Nickel

wurden ebenfalls als Katalysatoren einer abiotischen, elektrochemischen Wasserstoffproduktion verwendet [126, 132]. Replikate der durch Zellysate katalysierten Wasserstoffproduktion zeigten höhere Abweichungen voneinander, als die mit lebenden Zellen inokulierten Systeme. Hohe Abweichungen konnten ebenfalls in den mit *R. sphaeroides* inokulierten Triplikaten beobachtet werden, was einen Hinweis darauf liefert, dass eine wie oben beschriebene Katalyse der Wasserstoffproduktion durch adsorbierte Enzyme, die aus lysierten *R. sphaeroides* Zellen stammen, stattgefunden haben könnte [152]. Eine enzymatische Produktion von kleinen Metaboliten wie H_2 und Formiat durch an der Kathode adsorbierte Enzyme konnte auch an anderer Stelle im Zusammenhang mit der Biokorrosion von Eisen beschrieben werden [25]. Bei in der MES genutzten Potentialen von $-0,6$ V bis $-0,9$ V ist die abiotische Bildung dieser Metabolite thermodynamisch begünstigt, jedoch kinetisch limitiert. Eine Verringerung des Überpotentials durch Adsorption von Redoxenzymen umgeht diese kinetische Limitierung, wodurch die resultierende Produktion von H_2 und Formiat als Substrat für mikrobiellen Metabolismus dienen kann. Hydrogenasen weisen eine hohe Stabilität auf, vor allem wenn sie an Elektroden immobilisiert sind [18, 62]. Eine zunehmende biotische Aktivierung der Kathode könnte somit die beobachtete fortlaufend steigende Stromstärke erklären.

Diese Beobachtungen führen zu dem Schluss, dass eine Chronoamperometrie im verwendeten Versuchsaufbau zu instabilen Wasserstoffbedingungen führt, die durch biotische Aktivierung der Kathode zu Stande kommen. Um dem entgegenzuwirken wurde der Potentiostat via Chronopotentiometrie gesteuert, in der anstatt des Potentials die Stromstärke festgelegt wird. Bei einer enzymatischen Aktivierung der Elektrode führt die festgelegte Stromstärke trotzdem zu einer definierten Menge an abgegebenen Reduktionsäquivalenten, was sich in einer Verringerung des zur Aufrechterhaltung der festgelegten Stromstärke benötigten Überpotentials widerspiegelt. Die geringeren Standardabweichungen im Triplikat deuten darauf hin, dass diese Hypothese zutrifft und die Bereitstellung der Reduktionsäquivalente stabiler ist. Folglich konnten durch Anwendung einer Chronopotentiometrie stabilere H_2 -basierte Kultivierungsbedingungen geschaffen werden.

Ob durch die getroffenen Vorkehrungen tatsächlich photolithoautotrophe Wachstumsbedingungen geschaffen wurden, wurde in einem Validierungsversuch überprüft (Absatz 3.1.1). In diesem Versuch wurde je eine Bedingung des photolithoautotrophen Wachstums ausgesetzt. Ohne die Bereitstellung von Licht konnte kein Wachstum beobachtet werden. Für das ausbleibende Wachstum gibt es zwei mögliche Ursachen, die miteinander verknüpft sind. Unter photolithoautotrophen Wachstumsbedingungen wird mit Hilfe des Photosyntheseapparates die für den Metabolismus

notwendige protonenmotorische Kraft (PMF) erzeugt. Durch sie kann in der Photo-phosphorylierung ATP und im reversen Elektronentransfer NADH generiert werden (vgl. Absatz 1.3.1). In *R. sphaeroides* gibt es zwei Isoenzyme der NADH:Ubichinon Oxidoreduktase (Komplex I der Atmungskette), Isoenzym A (I_A) und Isoenzym E (I_E). I_E ist Bestandteil der Atmungskette, und katalysiert die Oxidation von NADH, welches im (photo)heterotrophen Stoffwechsel produziert wurde. Mit Laktat als Kohlenstoffquelle sorgt beispielsweise die Laktatdehydrogenase für die Produktion von NADH. I_E oxidiert dieses NADH unter Translokation eines Protons, trägt somit zur Bildung der PMF bei und schleust die Elektronen in die Atmungskette ein, an deren Ende sie auf einen terminalen Elektronenakzeptor übertragen werden. Ist kein terminaler Elektronenakzeptor vorhanden, wird I_A anstatt I_E verwendet. Dieses Isoenzym katalysiert unter photoheterotrophen und photoautotrophen Bedingungen die Produktion von NADH und somit die gegensätzliche Reaktion von I_E . NAD^+ wird dabei mit Elektronen aus dem Chinonpool im reversen Elektronentransfer reduziert. Somit verhindert I_A unter Zuhilfenahme der PMF eine Überreduktion des Chinonpools [138]. Das ausbleibende Wachstum ist demnach ein Indikator, dass tatsächlich photolithoautotrophe Bedingungen herrschen, da für die Reaktion von I_A eine protonenmotorische Kraft nötig ist, die im durchgeführten Experiment aufgrund fehlender Beleuchtung nicht gebildet werden konnte. Isoenzym A ist konserviert in phototrophen Purpurbakterien, da diese Typ II Photosysteme mit Chinon als Produkt nutzen. Spezies mit Typ I Photosystemen besitzen kein I_A , da hier Ferredoxin als Produkt gebildet wird, welches eine direkte NAD^+ -Reduktion ermöglicht. Im genannten Experiment war Wasserstoff nach wie vor als Elektronendonator anwesend. Elektronen, die von der Hydrogenase durch Oxidation von Wasserstoff gewonnen werden, können ohne I_A (bzw. ohne PMF) jedoch nicht für die Reduktion von NADH verwendet werden, da sie von der Hydrogenase in den Chinonpool der Zelle übertragen werden und somit ebenfalls von der Funktion von I_A abhängig sind [51]. Die zuvor beschriebene kathodische Bildung von Formiat kann nicht ausgeschlossen werden. Formiat-Dehydrogenasen können durch die Oxidation von Formiat NADH für den Metabolismus bereitstellen. Da kein terminaler Elektronenakzeptor für die Atmungskette vorhanden ist, kann dieses NADH jedoch nicht von I_E in die Atmungskette eingeschleust werden, wodurch es nicht zur Ausbildung der PMF beitragen kann. Unabhängig davon, ob Formiat vorhanden ist oder nicht, ist das Wachstum also von der Photosynthese abhängig.

Im zweiten Teil des Validierungsversuchs, in dem die Kathode mit einem *Open Circuit Potential* betrieben wurde und somit keine Reduktionsäquivalente bereitgestellt wurden, konnte in den ersten 117 Stunden trotzdem Wachstum beobachtet werden.

Dieser Befund könnte durch den Metabolismus von intrazellulären Speicherstoffen wie PHB erklärt werden, die unter stickstofflimitierten Bedingungen verstärkt akkumuliert werden, wenn eine Kohlenstoffquelle im Überschuss vorhanden ist [79]. Ein gewisser Anteil an PHB wird bei guter Kohlenstoffversorgung auch unter Anwesenheit von Stickstoff gebildet. So konnten in Kulturmedien mit einem C/N-Verhältnis von 12 ein PHB-Gehalt von 30 % der Zelltrockenmasse nachgewiesen werden, wohingegen stickstofflimitierte Bedingungen, die einen PHB-Gehalt von 60 % bewirkten, ab einem C/N-Verhältnis von 31,5 definiert wurden [50]. Im für diesen Versuch verwendeten Medium der Vorkultur herrschte ein C/N-Verhältnis von 6. Die Produktion von PHB ist in Kapitel 4.4 detailliert beschrieben. Sind keine Reduktionsäquivalente verfügbar, kann die CO₂-Fixierung nicht stattfinden und die Zelle greift auf den im PHB gespeicherten Kohlenstoff zurück. Der Abbau von PHB wird durch eine PHB-Depolymerase katalysiert, die das PHB-Polymer in dessen Monomere β -Hydroxybutyrat spaltet. Durch die Oxidationsreaktion einer β -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase wird Acetoacetat gebildet und ein NAD⁺ zu NADH reduziert. Eine Acetoacetyl-CoA Synthase katalysiert die Umsetzung von Acetoacetat zu Acetoacetyl-CoA, das als Kohlenstoffquelle für anabole Zwecke verwendet werden kann [64]. Wenn Licht fortlaufend bereitgestellt wird und somit die ATP-Produktion durch die Photophosphorylierung stattfinden kann, sind mit der Bereitstellung von Kohlenstoff, NADH und ATP alle limitierenden Wachstumsvoraussetzungen erfüllt. Sobald die PHB-Speicher erschöpft sind stoppt das Wachstum, da kein Kohlenstoff und NADH mehr zur Verfügung stehen und schreitet erst fort, wenn externe Elektronen für die CO₂-Fixierung wieder bereitgestellt werden. Im Validierungsversuch wurde dieser Zusammenhang durch einen starken Anstieg des Wachstums beim Umschalten des Potentiostaten auf eine Chronopotentiometrie deutlich. Diese Beobachtungen unterstützen die Hypothese, dass in den BES photolithoautotrophe Wachstumsbedingungen herrschen.

4.2 Untersuchung einer verlängerten Elektronentransportkette in *R. sphaeroides*

Wie in Absatz 1.4.2 erläutert, ist die Mikroben-Elektroden-Interaktion in einer mikrobiellen Elektrosynthesezelle ausschlaggebend für die Produktivität des Systems. Deshalb sollte zunächst ein Weg gefunden werden, kathodische Reduktionsäquivalente effektiv in die Zelle zu transferieren. Die Nutzung von Redoxshuttles wie Thionin, Methyleneblau und Benzylviologen wurde bereits beschrieben und ermöglicht es auch nicht exoelektrogenen Stämmen Reduktionsäquivalente von einer Kathode zu

beziehen [105]. Prozesstechnische Nachteile der Nutzung von redoxaktiven Shuttles bestehen jedoch darin, dass sie kostspielig sind, eine begrenzte Halbwertszeit haben und anschließend wieder aufgereinigt werden müssen. Ein Weg diese Nachteile zu umgehen ist die Nutzung von verlängerten Elektronentransportketten, die einen direkten extrazellulären Elektronentransfer über die Zellmembran hinweg ermöglichen. Diese Möglichkeit ist von Natur aus auf wenige exoelektrogene Organismen beschränkt. Prominente Beispiele sind hierbei *R. palustris* und *S. oneidensis* (vgl. Absatz 1.4.1). Die heterologe Expression von verlängerten Elektronentransportketten wurde in der Vergangenheit bereits genutzt, um nicht-exoelektrogenen Organismen den direkten EET und somit die Nutzung von Anoden als Elektronenakzeptor zu ermöglichen [129, 135]. Studien konnten außerdem eine bidirektionale Funktionalität der Elektronentransportwege belegen, die in *S. oneidensis* für den Export von Elektronen zuständig sind [108]. Ein Ansatz, kathodische Elektronen für *R. sphaeroides* bereitzustellen, sollte deshalb die heterologe Expression von EET-assoziierten Genen sein. Dies sollte durch eine pIND4-unterstützte Integration von *pioABC* sowie *cymA* erfolgen. Wie in Absatz 1.4.1 dargestellt, ist PioABC maßgeblich am direkten EET des Nicht-Schwefel Purpurbakteriums *R. palustris* beteiligt. PioAB stellt dabei den Kontakt zwischen Extrazellulärraum und Periplasma her, wo das Shuttleprotein PioC den Elektronentransport durch das Periplasma ermöglicht. Als Kopplungsstelle zum Chinonpool sollte CymA aus *S. oneidensis* dienen.

Die Untersuchung des erstellten *R. sphaeroides* pIND4_ *cymA_pioABC*-Stammes erfolgte in einem BES, das mit den zuvor etablierten Bedingungen betrieben wurde (Absatz 3.2.2). Die dem Experiment zugrundeliegende Annahme war, dass ein funktionierender direkter EET in einer Chronopotentiometrie einen vergleichbaren Effekt wie in einer Chronoamperometrie hat. So bewirkte die Deletion des für den Elektronenimport zuständigen PioABC in einer Chronoamperometrie eine um 30 % geringere Stromdichte [7]. Exoelektrogene Mikroorganismen mit funktionalem EET sind also ebenfalls als Elektronenakzeptoren zu betrachten. Auf eine Chronopotentiometrie übertragen bedeutet dies, dass wenn Elektronenakzeptoren in größerer Konzentration zugänglich sind, oder Akzeptoren mit positiverem Redoxpotential vorliegen, die somit leichter zu reduzieren sind, ein geringeres Überpotential genügt, um den festgelegten Strom aufrechtzuerhalten. Studien belegen, dass der Elektronenimport über PioC in einem BES bereits bei einem Elektrodenpotential von -100 mV vs Ag/AgCl stattfindet, was bedeutend positiver ist, als das Potential der Wasserstoffbildung [45]. Ein funktionaler direkter EET sollte in einer Chronopotentiometrie mit den zuvor etablierten Bedingungen somit aufgrund einer direkten Oxidation der Elektrode ebenfalls detektierbare Auswirkungen auf das Elektrodenpotential haben. Im durchgeführten Versuch zeigte *R. sphaeroides* pIND4_ *cymA_pioABC* ein um 200 mV

geringeres Überpotential als der Wildtyp, was zunächst für einen funktionierenden EET sprach. Kontrollexperimente mit *R. sphaeroides* pIND4 hatten jedoch denselben Effekt, was diese Hypothese entkräftigte. Auffällig war, dass beide Stämme eine starke Tendenz zur Biofilmbildung auf der Kathode zeigten, was in Versuchen mit dem Wildtyp nicht beobachtet werden konnte. Die Biofilmbildung, die vermutlich das Resultat des angelegten Kanamycin-Selektionsdrucks war, könnte die Erklärung für die beobachteten Potentialunterschiede sein. Das pIND4-Expressionsplasmid trägt eine Kanamycin-Resistenz, die eine Aminoglycosid-Phosphotransferase codiert. Kanamycin diffundiert ins Zellinnere, lagert sich an die 30S-Ribosomenuntereinheit an und inhibiert dort die Proteinbiosynthese. Eine Aminoglycosid-Phosphotransferase phosphoryliert Kanamycin, wodurch die Bindung an die Ribosomenuntereinheit aufgrund sterischer Hinderung nicht mehr möglich ist [148]. Neben der Expression von Phosphotransferasen ist die Bildung von Biofilm eine verbreitete Stressreaktion auf Antibiotikaselektionsdruck [3, 21]. Ein positiver Nebeneffekt hierbei ist, dass sich durch die Biofilmbildung mehr Zellen in unmittelbarer Nähe zur Kathodenoberfläche befinden und somit einen besseren Zugang zum gebildeten Wasserstoff haben. Studien mit einem H₂-Mikrosensor konnten zeigen, dass die Konzentration kathodisch produzierten Wasserstoffs schon in geringer Entfernung zur Kathode stark abnimmt. In einem abiotischen Experiment mit Wasser als Elektrolyt konnte innerhalb von 900 µm eine Abnahme der Wasserstoffkonzentration um mehr als die Hälfte detektiert werden, was darauf hindeutet, dass der gebildete Wasserstoff aufgrund seiner geringen Löslichkeit schnell aus dem System entweicht. Ein hydrogenotropher Multispezies-Biofilm auf der Kathode verstärkte die Abnahme in den ersten 58 µm drastisch [16]. Eine biofilminduzierte verstärkte Wasserstoffoxidation an der Kathodenoberfläche könnte aufgrund des resultierenden geringeren Wasserstoffpartialdrucks wiederum eine erleichterte Wasserstoffbildung bedingen, was im detektierten niedrigeren Überpotential deutlich wird. Im Hinblick auf die Energieeffizienz des Prozesses erscheint ein biofilmbildender Produktionsstamm also vorteilhaft. Die integrierte Elektronentransportkette schien dabei keinen Einfluss zu haben. Dies führt zu der Frage, ob deren Funktionalität durch korrekte Expression bzw. korrekten Einbau der Proteine gegeben ist. CymA und PioA konnten einzeln in den entsprechenden Fraktionen nachgewiesen werden, was für eine grundlegende Funktionalität des Plasmids spricht. Der Ursprung der Doppelbande auf der Höhe des PioA-Holoenzym konnte nicht geklärt werden. Es konnte außerdem nicht eindeutig bestimmt werden, ob PioA und PioB korrekt maturiert wurden und ob ein korrekter Einbau in die Membran stattgefunden hatte. In zukünftigen Studien muss deshalb die Funktionalität der Elektronentransportkette näher untersucht werden, um zu überprüfen, ob das benötigte Überpotential durch eine direkte

Kathodenoxidation weiter verringert werden kann.

Zusammenfassend wurde durch die Biofilmbildung jedoch ein verbesserter Zugang zu den Reduktionsäquivalenten geschaffen, was eine Optimierung des Elektronentransfers zu *R. sphaeroides* pIND4 und somit eine Optimierung der Energieeffizienz des Prozesses bewirkte. Das ursprüngliche Ziel, kathodische Reduktionsäquivalente effektiv in die Zelle zu transferieren wurde somit erreicht, weshalb im weiteren Verlauf der Arbeit *R. sphaeroides* pIND4 als Biokatalysator verwendet wurde.

4.3 Charakterisierung des biofilmbildenden *R. sphaeroides* pIND4-Phänotyps

Die Integration von pIND4 und die Exposition gegenüber dem entsprechenden Kanamycin-Selektionsdruck erwies sich als sehr einfacher Weg zur Induktion der Biofilmbildung von *R. sphaeroides*. Um die biofilmbildende Eigenschaft näher zu charakterisieren, wurde auf bildgebende Methoden zurückgegriffen. Eine DAPI- und eine Live-Dead-Färbung einer mit *R. sphaeroides* pIND4-Biofilm bewachsenen Kathode bestätigte den zuvor gewonnenen Eindruck der starken Tendenz zur Biofilmbildung. Das dicht besiedelte Kathodenvlies zeigte teilweise vielschichtige Zellanlagerungen entlang der Fasern, die hauptsächlich aus intakten Zellen bestanden. Dies deutet darauf hin, dass es sich um eine aktive Besiedlung handelte anstatt um Sedimentation von Zellflocken, die durch den Medienstrom eingetragen wurden.

Eine genaue Quantifizierung der Biofilmbildung erfolgte in einem Fließzellen-Setup, auf das mit einem N_2/CO_2 Gasgemisch ein Druck von 1,5 bar angelegt wurde. Durch den gesteigerten Druck ist die Löslichkeit von CO_2 und H_2 erhöht, wodurch eventuelle Limitationen durch die Ausbildung von Konzentrationsgradienten innerhalb des Biofilms verringert werden. Im Experiment wurde ein stetiges, beinahe lineares Wachstum beobachtet. Am Ende des Experiments erreichte das Biofilmvolumen einen Wert von $224 \mu m^3 / \mu m^2$. Vergleichbare Werte mit anderen Bakterienstämmen, die im selben Fließzellen-Setup kultiviert wurden, liegen an derselben Stelle der Kathode bei ca. $150 \mu m^3 / \mu m^2$ für *Kyrpidia spormannii* bzw. $30 \mu m^3 / \mu m^2$ für *Sulfolobus acidocaldarius*. Diese Daten stammen aus internen, unveröffentlichten Daten. Bisher veröffentlichte Literatur zu diesem Setup stellt das Biofilmvolumen stets als Mittelwert aus drei Messstellen entlang der Kathode dar [46, 58]. Die Messstellen, die weiter stromabwärts liegen, sind aufgrund der Bauweise der Fließzelle einer geringeren Fließgeschwindigkeit ausgesetzt, weshalb die Sedimentation von abgelösten Biofilmflocken dort eine größere Rolle in der Zunahme des Biofilmvolumens spielt [46]. Eine Untersuchung dieser Stellen war mit *R. sphaeroides* pIND4 nicht möglich, da sich dort

so viele Zellagglomerate absetzten, dass der mögliche Bereich der OCT-Messung innerhalb kurzer Zeit überschritten und somit eine zuverlässige Quantifizierung nicht mehr möglich war. Hackbarth *et al.* zeigten, dass die durchschnittliche Zunahme des Biofilmvolumens von *K. spormannii* bis zur Erreichung eines Maximums annähernd linear ($R^2 = 0,99318$) ablief, bevor die Ablösung aufgrund von Scherkräften größer als die Zunahme war und die Biofilmvolumenzunahme in eine Plateauphase überging. Mit *R. sphaeroides* pIND4 konnte im Zeitraum des Experiments kein Abflachen der Zunahme beobachtet werden, bevor die Messung mittels OCT aufgrund zu hoher Biofilmstrukturen ungenau wurde. Dies deutet darauf hin, dass das maximale Biofilmvolumen noch nicht erreicht wurde. Diese Beobachtungen unterstreichen die sehr starke Tendenz von *R. sphaeroides* pIND4 zur Biofilmbildung. In den topographischen Höhenprofilen wurde deutlich, dass mit zunehmender Biofilmdicke die relative Abweichung von der mittleren Dicke von 115 % auf 20 % abnahm. Diese Werte deuten auf die Bildung eines Biofilms mit einer zunehmend dichteren Struktur hin, was höchstwahrscheinlich eine Anpassung an die hohe laterale Fließgeschwindigkeit des Mediums ist [143]. Die dichte Struktur gibt außerdem Hinweise darauf, dass Biofilmwachstum anstatt der Sedimentation einzelner Zellagglomerate beobachtet wurde.

Die verstärkte Biofilmbildung von *R. sphaeroides* pIND4 bewirkte verbesserte elektrochemische Eigenschaften, deren physiologische Grundlagen bislang nicht eindeutig identifiziert werden konnten. Um die Optimierungen auf molekularer Ebene zu ergründen, wurde eine quantitative Proteomanalyse durchgeführt (Absatz 3.3.3). Eines der am stärksten hochregulierten Proteine war eine Ni/Fe-Hydrogenase, die hauptsächlich die Oxidation von Wasserstoff katalysiert [115]. Dieser Befund unterstützt die zuvor aufgestellte Hypothese, dass eine gesteigerte Wasserstoffoxidation der Grund für das beobachtete höhere Kathodenpotential sein könnte. Im Einklang mit der Überproduktion der Hydrogenase und der somit verbesserten Versorgung mit Reduktionsäquivalenten steht die beobachtete Hochregulierung der ATP-Synthase und einer NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase. Auch einige Proteine, die am Kohlenstoffmetabolismus beteiligt sind, waren hochreguliert, z. B. die 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase, ein Schlüsselenzym im Citrat Zyklus, und die Polyhydroxyalkansäure-Synthase PhaC, die für die Produktion des Speicherstoffs PHB benötigt wird [20]. MurE, eine Ligase, die an der Zellwandsynthese beteiligt ist, wurde ebenfalls als vermehrt exprimiert identifiziert, was auf ein verstärktes Wachstum der Zellen hindeutet [11]. Eine hochregulierte Formiat-Dehydrogenase führte zu dem Schluss, dass kathodische Reduktionsäquivalente neben Wasserstoff zu einem gewissen Teil, wie von Deutzmann *et al.* postuliert (siehe Absatz 4.1), auch durch Formiat transferiert werden. Die zelluläre Oxidation von Formiat zu CO_2

stellt NADH zur Verfügung, das unter autotrophen Bedingungen aufgrund der Abwesenheit von geeigneten terminalen Elektronenakzeptoren jedoch nicht in die Atmungskette eingeschleust werden kann [49]. Die Generierung der PMF ist also trotzdem abhängig von der zyklischen Photosynthese, was im Validierungsversuch bestätigt wurde (Absatz 3.1.1). Die Oxidation von Formiat ergibt CO_2 , weshalb es ähnlich wie Wasserstoff in seiner oxidierten Form nicht im Reaktor akkumuliert und den Prozess somit nicht negativ beeinflusst. Insgesamt konnte also ein aktiverer Metabolismus beobachtet werden, was vermutlich auf den verbesserten Zugang zu den kathodischen Reduktionsäquivalenten zurückzuführen ist. Auch MerR, ein transkriptioneller Regulator, der an der Reaktion auf Antibiotika und oxidativen Stress beteiligt ist [14], und PpkA, ein regulatorisches Protein, das die Biofilmbildung als Reaktion auf osmotischen und oxidativen Stress induziert [93], wurden als hochreguliert detektiert. Mehrere Proteine, die an DNA-Reparaturmechanismen beteiligt sind (UvrD, RecN), wurden in *R. sphaeroides* pIND4 verstärkt exprimiert. Die Überproduktion von Proteinen, die an Reparaturmechanismen und Stresstoleranz beteiligt sind, könnte auf eine Anpassung an die anspruchsvollen Bedingungen hindeuten, die an der Oberfläche einer auf ein niedriges Potential eingestellten Kathode vorherrschen, wie z. B. die Anwesenheit von reaktiven Sauerstoffspezies.

Die Veränderung der Abundanz der photosynthetisch aktiven Proteine, (Lichtsammelkomplex LHC, Cytochrom *b* und PufX) [147], war bemerkenswert und deutete auf eine insgesamt geringere photosynthetische Aktivität hin. Diese Ergebnisse waren überraschend, da die Verfügbarkeit von Licht in Biofilmen generell mit zunehmender Biofilmdicke abnimmt [73]. In *Rhodobacter* führt ein geringeres Lichtangebot jedoch zu einer Erhöhung der Menge an photosynthetischen Komplexen [42], was im Widerspruch zu der beobachteten Herunterregulierung von Photosyntheseassoziierten Proteinen steht. Eine Erklärung für diese Beobachtung könnte erneut der verbesserte Zugang zu Reduktionsäquivalenten sein. Die Oxidation von Wasserstoff schleust Elektronen in den Quinonpool ein, was zu einer Überreduzierung desselben führen kann [45]. Die zyklische Photosynthese benötigt oxidiertes Chinon als Akzeptor der Reaktion des Bakteriochlorophylls. Ein stärker reduzierter Chinonpool bewirkt somit eine Hemmung der photosynthetischen Aktivität [28]. Die hochregulierte NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase trägt zur Aufrechterhaltung des Redox-Gleichgewichts bei, indem sie mit Elektronen aus dem überreduzierten Chinonpool im reversen Elektronentransfer NADH produziert, das im Calvin Zyklus der CO_2 -Fixierung dient [138]. Zusammen mit dem in der zyklischen Photosynthese erzeugten ATP könnte die erhöhte Bereitstellung von NADH für den Calvin Zyklus somit eine vermehrte CO_2 -Fixierung bewirken, wodurch mehr Biomoleküle produziert werden können, was wiederum die Produktivität des Stammes erhöhen würde. In

der Proteomanalyse konnte keine erhöhte Expression von Enzymen des Calvin-Zyklus identifiziert werden, die diese Hypothese bestätigen würden. Es konnte jedoch eine 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase als hochreguliert identifiziert werden ($\text{Log}_2 \text{FC} = 1,72$), die 3-Phosphoglycerat, das primäre Fixierungsprodukt des Calvin Zyklus, für die Synthese von L-Serin verwendet und somit einen Hinweis auf einen vermehrt ablaufenden Calvin Zyklus gibt. Deutlich im Einklang mit dem beobachteten Biofilm-Phänotyp steht die Abnahme der Produktion des Flagellum-assoziierten Proteins MotB, was auf eine reduzierte Motilität innerhalb des Biofilms hinweist [116]. In *E. coli* unterdrückt LexA die Expression von Genen, die mit dem SOS-System assoziiert sind. RecA induziert die proteolytische Inaktivierung von LexA, was zur Expression der SOS-Gene in Zellen mit beschädigter DNA führt [75]. Es wird angenommen, dass ein ähnlicher Prozess in *R. sphaeroides* stattfindet [133]. Daher unterstreicht die geringere Abundanz des LexA-Repressors die offensichtliche Notwendigkeit für die bereits erwähnten DNA-Reparaturmechanismen.

Zusammenfassend ergab die Proteomanalyse das Bild, dass die Biofilmbildung als Stressantwort auf den Kanamycinselektionsdruck einen verbesserten Zugang zum Substrat zur Folge hatte. Dies bewirkte eine Reihe von physiologischen Antwortreaktionen, die zu einer Optimierung des Stammes in Hinblick auf die Nutzung als Biokatalysator in einem BES führten.

4.4 BES-gestützte Produktion von Wertstoffen

Im folgenden Verlauf der Arbeit sollte der Beweis erbracht werden, dass *R. sphaeroides* sowohl zur Produktion von zelleigenen als auch von zellfremden Wertstoffen unter photoautotrophen BES-gestützten Bedingungen geeignet ist (Absatz 3.4). Die Produktion zelleigener Wertstoffe wurde durch die Akkumulation von PHB demonstriert.

PHB ist ein Biopolymer aus der Familie der Polyhydroxyalkanoate. Es kann als biologisch abbaubare Alternative zu petrochemisch hergestellten Kunststoffen verwendet werden. Die Anwendungen reichen von der Herstellung von Flaschen, Latex und Fasern bis hin zu hochspezifischen medizinischen Einsatzmöglichkeiten. Derzeit sind die wichtigsten Einschränkungen für die Massenproduktion von Biokunststoffen die hohen Produktions- und Aufreinigungskosten [79]. Da die Kultivierungsmedien den größten Teil der Produktionskosten jedes biotechnologischen Prozesses ausmachen, ist eine Optimierung unabdinglich [109]. Autotrophe Produktionsbedingungen sind hierfür ein vielversprechender Weg. Der geringe Preis der Substrate sowie die unter Umständen negative Kohlenstoffbilanz sind essentielle Faktoren einer bioökonomischen Produktion von PHB. Die zelluläre PHB-Synthese beginnt mit

der Kondensation von zwei Molekülen Acetyl-CoA zu Acetoacetyl-CoA, katalysiert durch die β -Ketothiolase PhaA. Die Acetoacetyl-CoA-Reduktase PhaB reduziert Acetoacetyl-CoA zu β -Hydroxybutyryl-CoA, welches dann durch die Wirkung der PHB-Synthase PhaC zu PHB polymerisiert wird [20]. PHB reichert sich in Form von Granula im Zytoplasma an. Die Größe und Menge dieser Granula wird durch die Abundanz von PhaC und PhaP, einem Phasin, das an die Granula binden kann, reguliert [79]. Abhängig von der Kohlenstoffquelle kann der intrazelluläre PHB-Gehalt bis zu 60 % betragen [50], was *R. sphaeroides* als einen potentiellen Kandidaten für die PHB-Produktion hervorhebt. Der zuvor charakterisierte *R. sphaeroides* pIND4-Stamm sollte nun auf seine Eignung zur Produktion von Wertstoffen wie PHB untersucht werden.

In dieser Arbeit wurde die Akkumulation von PHB unter stickstofflimitierten photoautotrophen Bedingungen durch die photometrische Messung von Nilrot-gefärbten Zellen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass diese Methode zur Bestimmung des Gehalts an Polyhydroxyalkansäure (PHA) in lebenden Zellen verwendet werden kann [41]. Eine Korrelation zwischen der Fluoreszenzintensität von Nilrot-gefärbten Zellen und chromatographisch bestimmten PHA-Konzentrationen konnte ebenfalls bestätigt werden [156]. Die Differenzierung verschiedener PHAs ist durch die Nilrotfärbung nicht möglich, da alle PHAs gleich gefärbt werden. Studien zeigten jedoch, dass PHB in *R. sphaeroides*, unabhängig von der Kohlenstoffquelle, 98 % des Gesamtgehalts aller PHAs ausmacht [10]. Der Nachweis, dass PHB tatsächlich vorhanden war, konnte durch die Detektion von PHB-Granulaten mittels Fluoreszenzmikroskopie erbracht werden. Die Kultivierung unter stickstoffreichen Bedingungen zeigte Zellen mit wenig bis keiner PHB-Akkumulation, während stickstofflimitierte Bedingungen zu mehr Zellen führten, die große PHB-Granula akkumulierten. Eine Normalisierung der Fluoreszenzwerte auf den DNA-Gehalt der Proben ergab eine um 5,4-fach erhöhte Akkumulation von PHB unter stickstofflimitierten Bedingungen. Diese Ergebnisse stellen eine relative Quantifizierung dar. Da nicht genügend Zellmaterial zur Verfügung stand, war eine absolute Quantifizierung, wie an anderer Stelle beschrieben [66], nicht möglich. Es müssen außerdem weitere Studien durchgeführt werden, um die Menge des Biofilms mit der volumetrischen Produktivität zu korrelieren. Da Biofilme verschiedener Spezies unter spezifischen Bedingungen unterschiedliche Zelldichten aufweisen [63], muss die Architektur der extrazellulären polymeren Substanz und die Konzentration der eingebetteten *R. sphaeroides*-Zellen in einem geeigneten Setup analysiert werden, um eine zuverlässige Charakterisierung in Bezug auf die Ausbeute pro Biofilmvolumen zu erreichen. Eine Frage könnte sein, wie die Biomasse von den Elektroden gerntet werden kann. Die Antwort wurde in einer Publikation von Gião *et al.* gegeben [37], in der eine

schnelle Abnahme des Kathodenpotentials genutzt wurde, um die Biomasse mit Hilfe einer gesteuerten Wasserstoffgasbildung zu entfernen. Die PHB-Aufreinigung aus der Biomasse könnte anschließend durch bereits etablierte industrielle Verfahren erreicht werden [67]. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine erhöhte PHB-Akkumulation erreicht wurde, was darauf hindeutet, dass *R. sphaeroides* pIND4 ein potentieller PHB-Produzent in einem BES unter photolithoautotrophen Bedingungen sein könnte. Dies ist das erste Mal, dass die Produktion von PHB mit *R. sphaeroides* unter diesen Bedingungen beschrieben wurde. Bereits etablierte biotechnologische PHB-Produktionsverfahren verwenden überwiegend organische Kohlenstoffquellen als Substrat. Organische Substrate müssen CO₂-neutral hergestellt werden, um die Nachhaltigkeit des Prozesses zu gewährleisten. Außerdem sollte ihre Produktion nicht mit landwirtschaftlichen Flächen konkurrieren. Die Verwendung von landwirtschaftlichen Abfällen ist ein Ansatz, um dies zu erreichen [82]. Während jedoch der Transport und die Aufbereitung dieser Kohlenstoffquellen deren Nachhaltigkeit beeinträchtigen, ist CO₂ als Kohlenstoffquelle in der Atmosphäre ubiquitär verfügbar, was die Gesamtproduktionskosten senkt und den Kohlenstoff-Fußabdruck des Prozesses weiter verbessert. Diese Arbeit präsentiert einen *Proof of principle*-Ansatz zur Verwendung von CO₂ als alleinige Kohlenstoffquelle für eine nachhaltige Biopolymerproduktion, die die bioökonomischen Einschränkungen organischer Substrate umgeht.

Als *Proof of principle*, dass die photoautotrophe Synthese von zellfremden Wertstoffen ebenfalls möglich ist, wurde die Produktion von Acetoin etabliert. Acetoin wird natürlicherweise von verschiedenen Bakterienarten wie zum Beispiel *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens* oder *Lactobacillus lactis* produziert. Es hat vielfältige Anwendungsmöglichkeiten in der Lebensmittelindustrie, in der Kosmetik, als Detergenz und als Pflanzenstärkungsmittel und gilt als vielversprechende Plattformchemikalie [149]. Die für die mikrobielle Produktion benötigten Enzyme wurden von dem Stamm *R. sphaeroides* pIND4_alsSD exprimiert. AlsS, eine Acetolactat-Synthase, katalysiert die Umsetzung von zwei Molekülen Pyruvat zu einem Molekül Acetolactat, welches im zweiten Schritt von AlsD, einer Acetolactat-Decarboxylase zu Acetoin umgesetzt wird. In beiden Schritten wird CO₂ freigesetzt, was unter autotrophen Bedingungen für eine erneute Fixierung verwendet werden kann. Pyruvat sollte dabei durch die Fixierung von CO₂ bereitgestellt werden. Die beobachtete Acetoinproduktion unter heterotrophen Bedingungen bestätigte die Funktionalität des erstellten Konstruktes sowie eine korrekte Expression und Funktionsweise des Acetoinstoffwechselweges in *R. sphaeroides* pIND4_alsSD. Die Durchführung von Wachstumsversuchen im Flaschen-Scale ermöglichte definierte photolithoautotrophe Bedingungen, unter denen der Verbrauch von H₂ und CO₂ genau quantifiziert werden konnte. Im Vergleich

zeigte der Wildtyp eine starke Zunahme der planktonischen OD, *R. sphaeroides* pIND4_alsSD hingegen nicht. Eine Bildung von Biofilm, die diesen Unterschied erklären könnte, war ohne eine Oberfläche nicht begünstigt. Planktonische Zellagglomerate wurden vor der Messung der OD resuspendiert, wodurch verlässliche Werte erhalten wurden. Eine Möglichkeit zur Erklärung dieser Beobachtung bietet daher die IPTG-induzierte Überexpression von *alsSD*. Die durch die CO₂-Fixierung bereitgestellten Triosen werden unter anderem zu Pyruvat umgewandelt, welches durch AlsS und AlsD zu Acetoin umgesetzt wird, anstatt für anabole Prozesse, die zum Zellwachstum beitragen, zur Verfügung zu stehen. Eine erhöhte Expression von *alsSD* führt somit zu weniger Substrat für den Anabolismus. Diese Hypothese wird durch die Tatsache gestützt, dass im Verlauf des Experiments trotz geringeren Wachstums 24,8 % mehr CO₂ und 28,2 % mehr H₂ verbraucht wurden als im Wildtyp. Eine genaue Quantifizierung des CO₂- und H₂-Verbrauchs zur Berechnung von Effizienzen war im BES-Maßstab nicht möglich, da es sich um ein offenes System handelte, das kontinuierlich mit CO₂ begast wurde. Zusammen mit den vorherigen Ergebnissen konnte jedoch der grundlegende Beweis erbracht werden, dass eine elektrodengestützte photoautotrophe Produktion von zellfremden Wertstoffen in *R. sphaeroides* möglich ist.

Vergleichswerte aus anderen Studien, die spezifische Optimierungen des Biokatalysators für die Produktion von Acetoin vorgenommen hatten, sind in Tabelle 4.1 dargestellt. Im Vergleich zum Cyanobakterium *Synechococcus elongatus*, das Acetoin ebenfalls unter photoautotrophen Bedingungen produzierte, konnte mit *R. sphaeroides* pIND4_alsSD eine doppelt so hohe Produktivität erreicht werden.

TABELLE 4.1: Vergleich von *R. sphaeroides* pIND4_alsSD mit verschiedenen für die Acetoinproduktion optimierten Bakterien

Bakterium	Substrat	Acetoin	Produktivität	Quelle
<i>Shewanella oneidensis</i>	Laktat	1,8 g/l	25,0 mg/(l*h)	[15]
<i>Cupriavidus necator</i>	Fructose	0,75 g/l	17,1 mg/(l*h)	[146]
<i>Cupriavidus necator</i>	CO ₂	1,2 g/l	38,9 mg/(l*h)	[146]
<i>Synechococcus elongatus</i>	CO ₂ , Licht	0,2 g/l	1,43 mg/(l*h)	[91]
<i>R. sphaeroides</i>	CO ₂ , Licht	0,27 g/l	2,96 mg/(l*h)	diese Arbeit

Die in den Flaschenversuchen berechneten Werte zeigen, dass *R. sphaeroides* auch ohne produktorientierte Modifikationen eine vergleichsweise hohe Effizienz in der Acetoinproduktion aufweist, was eine vielversprechende Basis darstellt und die Eignung als Produktionsstamm in photoautotrophen BES-basierten Produktionsprozessen belegt. Modifikationen, die auf eine spezifische Optimierung der Acetoinproduktion abzielen, könnten die Produktivität weiter steigern. Die im BES-Experiment beobachtete Abnahme der Acetoinkonzentration deutet beispielsweise darauf hin,

dass *R. sphaeroides* ab einer gewissen Acetoinkonzentration zu einem heterotrophen Acetoinmetabolismus wechselt. In einem gesonderten Wachstumsexperiment konnte ein eingeschränktes Wachstum mit Acetoin als Kohlenstoffquelle beobachtet werden (Daten nicht gezeigt), was diese Hypothese unterstützt. Ein Acetoinkatabolismus wurde bereits in mehreren Organismen beschrieben und wirkt einer Akkumulation von Acetoin entgegen [34, 96, 124, 150]. Eine Deletion würde folglich der Effizienz des Prozesses zutragen. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass *R. sphaeroides* das Potential eines versatilen Produktionsstammes hat, der eine große Bandbreite an Einsatzmöglichkeiten unter BES-basierten photoautotrophen Bedingungen bietet.

Kapitel 5

Ausblick

Eine Voraussetzung zur Etablierung einer effizienten MES ist die Wahl eines Organismus, der die eingangs erwähnten Voraussetzungen erfüllt. In dieser Arbeit wurde *R. sphaeroides* als photoautotropher Produktionsstamm in einem BES untersucht. Die stabile Kultivierung sowie die CO₂-basierte Produktion von Wertstoffen belegen dessen Eignung für diese Art der Anwendung. Die Integration von pIND4 sowie das Anlegen eines Kanamycin-Selektionsdrucks induzierte die Bildung von Biofilm, was optimierte elektrochemische Eigenschaften sowie eine erhöhte metabolische Aktivität zur Folge hatte. Obwohl somit ein verbesserter Zugang zu Reduktionsäquivalenten gewährleistet wurde, wurde die Biofilmbildung nicht von *R. sphaeroides* selbst induziert. Um den optimierten Phänotyp aufrechtzuerhalten, war somit die Zugabe von Kanamycin notwendig. Für eine rentable Anwendung müssen kostspielige Zusätze wie Kanamycin vermieden werden. Um dies zu erreichen sollte der molekulare Trigger, der die Biofilmbildung induziert, identifiziert werden. Mit entsprechender genetischer Modifikation könnte versucht werden, diesen Trigger dauerhaft auszulösen, wodurch die optimierten Eigenschaften ohne die Addition von Kanamycin zur Verfügung stünden.

In dieser Arbeit wurde keine pIND4-unabhängige Optimierung der Mikroben-Elektroden-Interaktion durch die Integration einer verlängerten Elektronentransportkette beobachtet. Dabei wurde nicht abschließend geklärt, ob eine korrekte Expression und Funktion der eingebrachten Gene gewährleistet war. In weiterführenden Studien muss deshalb durch Expressionsstudien belegt und überprüft werden, ob eine funktionale verlängerte Elektronentransportkette eine weitere Steigerung des Elektronenimports durch direkte Interaktion mit der Kathode bewirkt. Durch genomische Integration der Elektronentransportkette könnte die Energieeffizienz des Prozesses durch einen elektroaktiven Biofilm mit einer direkten Mikroben-Elektroden-Interaktion weiter verbessert werden. Die in dieser Arbeit erzielten Umsatzraten waren trotz der induzierten Biofilmbildung noch gering. Eine produktorientierte metabolische Optimierung durch genetische Manipulation könnte zu

höheren Umsatzraten beitragen. Dazu gehört auch die Optimierung des intrazellulären Kohlenstoffflusses, die eine Deletion von nicht essentiellen Stoffwechselwegen, die mit der Synthese des gewünschten Stoffes konkurrieren, umfasst. Im Beispiel der Acetoinproduktion sind dies Pyruvat-verbrauchende Wege wie die PHB-Produktion. Auch Wege, die einer Akkumulation des gewünschten Produktes entgegenwirken fallen in diese Kategorie, wie beispielsweise der Acetoinkatabolismus. Neben der Optimierung des Produktionsstammes sollte ein weiterer Fokus auf die Optimierung der Prozessparameter gelegt werden. Die in dieser Arbeit getestete optimierte MES-Zelle mit vergrößerter Kathodenoberfläche ist ein Ansatz, um der biofilmbildenden Eigenschaft von *R. sphaeroides* pIND4 gerecht zu werden. Zusätzlich muss sichergestellt werden, dass beim Upscaling des Prozesses keine biofilmbedingten Nachteile wie zum Beispiel Substrat- und Lichtlimitationen auftreten. Möglichkeiten hierzu sind bereits in der Literatur diskutiert [72].

Literatur

1. AG Energiebilanzen e.V. *Energieverbrauch in Deutschland: Daten für das 1.-4. Quartal 2019* Techn. Ber. (2020), 29.
2. Armstrong, F. A. u. a. Dynamic electrochemical investigations of hydrogen oxidation and production by enzymes and implications for future technology. *Chemical Society Reviews* **38**, 36–51 (2008).
3. Balcázar, J. L., Subirats, J. & Borrego, C. M. The role of biofilms as environmental reservoirs of antibiotic resistance. *Frontiers in Microbiology* **6** (2015).
4. Barritt, M. The Intensification of the Voges-Proskauer Reaction By the Addition of α -Naphthol. *The Journal of Pathology and Bacteriology* **42**, 441–454 (1936).
5. Batlle-Vilanova, P. u. a. Assessment of biotic and abiotic graphite cathodes for hydrogen production in microbial electrolysis cells. *International Journal of Hydrogen Energy* **39**, 1297–1305 (2014).
6. Blankenship, R. E., Sadekar, S. & Raymond, J. in *Evolution of Primary Producers in the Sea* (Hrsg. Falkowski, P. G. & Knoll, A. H.) 21–35 (Elsevier Inc., Amsterdam, 2007).
7. Bose, A., Gardel, E. J., Vidoudez, C., Parra, E. A. & Girguis, P. R. Electron uptake by iron-oxidizing phototrophic bacteria. *Nature communications* **5**, 3391 (2014).
8. Bouyssié, D. u. a. Proline: An efficient and user-friendly software suite for large-scale proteomics. *Bioinformatics* **36**, 3148–3155 (2020).
9. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248–254 (1976).
10. Brandl, H., Gross, R. A., Lenz, R. W., Lloyd, R. & Fuller, R. C. The accumulation of poly(3-hydroxyalkanoates) in *Rhodobacter sphaeroides*. *Archives of Microbiology* **155**, 337–340 (1991).
11. Bratkovič, T., Lunder, M., Urleb, U. & Štrukelj, B. Peptide inhibitors of MurD and MurE, essential enzymes of bacterial cell wall biosynthesis. *Journal of Basic Microbiology* **48**, 202–206 (2008).

12. Bretschger, O. *u. a.* Current production and metal oxide reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1 wild type and mutants. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 7003–7012 (2007).
13. Bringezu, S. Carbon Recycling for Renewable Materials and Energy Supply: Recent Trends, Long-Term Options, and Challenges for Research and Development. *Journal of Industrial Ecology* **18**, 327–340 (2014).
14. Brown, N. L., Stoyanov, J. V., Kidd, S. P. & Hobman, J. L. The MerR family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiology Reviews* **27**, 145–163 (2003).
15. Bursac, T., Gralnick, J. A. & Gescher, J. Acetoin production via unbalanced fermentation in *Shewanella oneidensis*. *Biotechnology and Bioengineering* **114**, 1283–1289 (2017).
16. Cai, W. *u. a.* Semiquantitative detection of hydrogen-associated or hydrogen-free electron transfer within methanogenic biofilm of microbial electrosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology* **86** (2020).
17. Casabona, M. G., Vandenbrouck, Y., Attree, I. & Couté, Y. Proteomic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 inner membrane. *Proteomics* **13**, 2419–2423 (2013).
18. Chatelus, C. *u. a.* Hydrogenase activity in aged, nonviable *Desulfovibrio vulgaris* cultures and its significance in anaerobic biocorrosion. *Applied and environmental microbiology* **53**, 1708–1710 (1987).
19. Chen, C. Y. & Chang, J. S. Enhancing phototropic hydrogen production by solid-carrier assisted fermentation and internal optical-fiber illumination. *Process Biochemistry* **41**, 2041–2049 (2006).
20. Chou, M. E., Chang, W. T., Chang, Y. C. & Yang, M. K. Expression of four *pha* genes involved in poly- β -hydroxybutyrate production and accumulation in *Rhodobacter sphaeroides* FJ1. *Molecular Genetics and Genomics* **282**, 97–106 (2009).
21. Costerton, J. W., Geesey, G. G. & Cheng, K.-J. How Bacteria Stick. *Scientific American* **238**, 86–95 (1978).
22. Croal, L. R., Johnson, C. M., Beard, B. L. & Newman, D. K. Iron isotope fractionation by Fe(II)-oxidizing photoautotrophic bacteria. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **68**, 1227–1242 (2004).
23. Delgado, V. P., Paquete, C. M., Sturm, G. & Gescher, J. Improvement of the electron transfer rate in *Shewanella oneidensis* MR-1 using a tailored periplasmic protein composition. *Bioelectrochemistry* **129**, 18–25 (2019).
24. Deutscher Bundestag. Unterrichtung durch die Bundesregierung: Nationale Bioökonomiestrategie. *Pressemitteilung*, URL: <https://www.bmbf.de/de/karliczek-biooekonomie-ist-wichtiger-treiber-fuer-wandel-zu-nachhaltigerem-11743.html> (2020).

25. Deutzmann, J. S., Sahin, M. & Spormann, A. M. Extracellular enzymes facilitate electron uptake in biocorrosion and bioelectrosynthesis. *mBio* **6**, 1–8 (2015).
26. Deutzmann, J. S. & Spormann, A. M. Enhanced microbial electrosynthesis by using defined co-cultures. *ISME Journal* **11**, 704–714 (2017).
27. Du, Z., Li, H. & Gu, T. A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy. *Biotechnology Advances* **25**, 464–482 (2007).
28. Dupuis, A. *u. a.* The Complex I from *Rhodobacter capsulatus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1364**, 147–165 (1998).
29. Erb, T. J. & Zarzycki, J. A short history of RubisCO: the rise and fall (?) of Nature's predominant CO₂ fixing enzyme. *Current Opinion in Biotechnology* **49**, 100–107 (2018).
30. Ferguson, S. J., Jackson, J. B. & McEwan, A. G. Anaerobic respiration in the Rhodospirillaceae: characterisation of pathways and evaluation of roles in redox balancing during photosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews* **3**, 117–143 (1987).
31. Field, C. B., Behrenfeld, M. J., Randerson, J. T. & Falkowski, P. Primary production of the biosphere: Integrating terrestrial and oceanic components. *Science* **281**, 237–240 (1998).
32. Fishedick, M., Görner, K. & Thomeczek, M. CO₂: *Abtrennung, Speicherung, Nutzung: Ganzheitliche Bewertung im Bereich von Energiewirtschaft und Industrie* 1. Aufl. (Hrsg. Thomeczek, M.) 855 (Springer Vieweg., Berlin, 2015).
33. Fonseca, B. M. *u. a.* Mind the gap: cytochrome interactions reveal electron pathways across the periplasm of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Biochemical Journal* **449**, 101–108 (2013).
34. Fründ, C., Priefert, H., Steinbüchel, A. & Schlegel, H. G. Biochemical and genetic analyses of acetoin catabolism in *Alcaligenes eutrophus*. *Journal of Bacteriology* **171**, 6539 (1989).
35. Fuchs, G. *Allgemeine Mikrobiologie* 9. Aufl. (Hrsg. Fuchs, G.) 749 (Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2014).
36. Fuhrmann, M. *u. a.* Monitoring dynamic expression of nuclear genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by using a synthetic luciferase reporter gene. *Plant Molecular Biology* **55**, 869–881 (2004).
37. Gião, M. S., Montenegro, M. I. & Vieira, M. J. The influence of hydrogen bubble formation on the removal of *Pseudomonas fluorescens* biofilms from platinum electrode surfaces. *Process Biochemistry* **40**, 1815–1821 (2005).
38. Gibson, D. G. *u. a.* Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods* **6**, 343–345 (2009).

39. Golitsch, F. *Entwicklung bioelektrochemischer Systeme für die Untersuchung von elektrodenabhängigen Konversionsprozessen* Diss. (Karlsruhe Institut of Technology, 2016), 263.
40. Gong, Y. *u. a.* Benthic microbial fuel cell as direct power source for an acoustic modem and seawater oxygen/temperature sensor system. *Environmental Science and Technology* **45**, 5047–5053 (2011).
41. Gorenflo, V., Steinbüchel, A., Marose, S., Rieseberg, M. & Scheper, T. Quantification of bacterial polyhydroxyalkanoic acids by Nile red staining. *Applied Microbiology and Biotechnology* **51**, 765–772 (1999).
42. Gregor, J. & Klug, G. Regulation of bacterial photosynthesis genes by oxygen and light. *FEMS Microbiology Letters* **179**, 1–9 (1999).
43. Gunes, B. A critical review on biofilm-based reactor systems for enhanced syngas fermentation processes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **143**, 110950 (2021).
44. Gupta, D. *u. a.* Photoferrotrophs Produce a PioAB Electron Conduit for Extracellular Electron Uptake (2019).
45. Guzman, M. S. *u. a.* Phototrophic extracellular electron uptake is linked to carbon dioxide fixation in the bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *Nature Communications* **10**, 1–13 (2019).
46. Hackbarth, M. *u. a.* Monitoring and quantification of bioelectrochemical *Kyrrpidia spormannii* biofilm development in a novel flow cell setup. *Chemical Engineering Journal* **390** (2020).
47. Hallenbeck, P. C., Grogger, M. & Veverka, D. Recent Advances in Microbial Electrocatalysis. *Electrocatalysis* **5**, 319–329 (Apr. 2014).
48. Hara, K. Y. & Kondo, A. ATP regulation in bioproduction. *Microbial Cell Factories* **14**, 1–9 (2015).
49. Hartmann, T. & Leimkühler, S. The oxygen-tolerant and NAD⁺-dependent formate dehydrogenase from *Rhodobacter capsulatus* is able to catalyze the reduction of CO₂ to formate. *The FEBS Journal* **280**, 6083–6096 (2013).
50. Hassan, M. A. *u. a.* The production of polyhydroxyalkanoate from anaerobically treated palm oil mill effluent by *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **83**, 485–488 (1997).
51. Herter, S. M., Kortlüke, C. M. & Drews, G. Complex I of *Rhodobacter capsulatus* and its role in reverted electron transport. *Archives of Microbiology* **169**, 98–105 (1998).
52. Huner, N. *u. a.* Chloroplast redox imbalance governs phenotypic plasticity: the “grand design of photosynthesis” revisited. *Frontiers in Plant Science* **3**, 255 (2012).

53. Ind, A. C. *u. a.* Inducible-expression plasmid for *Rhodobacter sphaeroides* and *Paracoccus denitrificans*. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 6613–6615 (2009).
54. IRENA-International Renewable Energy Agency. *Hydrogen: A renewable energy perspective* Techn. Ber. (2019), 52.
55. Jeuken, L. J. C. *Biophotoelectrochemistry: From Bioelectrochemistry to Biophotovoltaics* 1. Aufl., 180 (Springer, Basel, 2016).
56. Joliot, P. & Johnson, G. N. Regulation of cyclic and linear electron flow in higher Plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 13317–13322 (2011).
57. Jung, E. E. *u. a.* Slab waveguide photobioreactors for microalgae based biofuel production. *Lab on a Chip* **12**, 3740–3745 (2012).
58. Jung, T., Hackbarth, M., Horn, H. & Gescher, J. Improving the cathodic biofilm growth capabilities of *Kyrpidia spormannii* EA-1 by undirected mutagenesis. *Microorganisms* **9**, 1–15 (2021).
59. Al-Kaidy, H. *u. a.* Biotechnology and Bioprocess Engineering - From the First Ullmann's Article to Recent Trends. *ChemBioEng Reviews* **2**, 175–184 (2015).
60. Kaiser, S. & Bringezu, S. Use of carbon dioxide as raw material to close the carbon cycle for the German chemical and polymer industries. *Journal of Cleaner Production* **271**, 122775 (2020).
61. Kang, T. S., Korber, D. R. & Tanaka, T. Contributions of citrate in redox potential maintenance and ATP production: Metabolic pathways and their regulation in *Lactobacillus panis* PM1. *Applied Microbiology and Biotechnology* **97**, 8693–8703 (2013).
62. Karyakin, A. A. *u. a.* Hydrogen fuel electrode based on bioelectrocatalysis by the enzyme hydrogenase. *Electrochemistry Communications* **4**, 417–420 (2002).
63. Kassinger, S. J. & van Hoek, M. L. Biofilm architecture: An emerging synthetic biology target. *Synthetic and Systems Biotechnology* **5**, 1–10 (2020).
64. Khanna, S. & Srivastava, A. K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry* **40**, 607–619 (2005).
65. Kobayashi, J. & Kondo, A. Disruption of poly (3-hydroxyalkanoate) depolymerase gene and overexpression of three poly (3-hydroxybutyrate) biosynthetic genes improve poly (3-hydroxybutyrate) production from nitrogen rich medium by *Rhodobacter sphaeroides*. *Microbial Cell Factories* **18**, 1–13 (2019).
66. Koch, M., Orthwein, T., Alford, J. T. & Forchhammer, K. The Slr0058 Protein From *Synechocystis* sp. PCC 6803 Is a Novel Regulatory Protein Involved in PHB Granule Formation. *Frontiers in Microbiology* **11**, 1–13 (2020).

67. Koller, M., Niebelschütz, H. & Braunegg, G. Strategies for recovery and purification of poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] (PHA) biopolyesters from surrounding biomass. *Engineering in Life Sciences* **13**, 549–562 (2013).
68. Kramer, D. M. & Evans, J. R. The importance of energy balance in improving photosynthetic productivity. *Plant Physiology* **155**, 70–78 (2011).
69. Kronenberg, M., Trably, E., Bernet, N. & Patureau, D. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: Using microbial bioelectrochemical systems to overcome an impasse. *Environmental Pollution* **231**, 509–523 (2017).
70. Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
71. Li, H. *u. a.* Integrated electromicrobial conversion of CO₂ to higher alcohols. *Science* **335**, 1596 (2012).
72. Li, T., Strous, M. & Melkonian, M. Biofilm-based photobioreactors: Their design and improving productivity through efficient supply of dissolved inorganic carbon. *FEMS Microbiology Letters* **364**, 1–9 (2017).
73. Liehr, S. K., Suidan, M. T. & Eheart, J. W. A modeling study of carbon and light limitation in algal biofilms. *Biotechnology and Bioengineering* **35**, 233–243 (1990).
74. Lin, H., Liu, J. Y., Wang, H. B., Ahmed, A. A. Q. & Wu, Z. L. Biocatalysis as an alternative for the production of chiral epoxides: A comparative review. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **72**, 77–89 (2011).
75. Little, J. W. Mechanism of specific LexA cleavage: Autodigestion and the role of RecA coprotease. *Biochimie* **73**, 411–421 (1991).
76. Lloyd, J. R. *u. a.* Biochemical and genetic characterization of PpcA, a periplasmic c-type cytochrome in *Geobacter sulfurreducens*. *Biochemical Journal* **369**, 153 (2003).
77. Logan, B. E., Rossi, R., Ragab, A. & Saikaly, P. E. Electroactive microorganisms in bioelectrochemical systems. *Nature Reviews Microbiology* **17**, 307–319 (2019).
78. Logan, B. E. *u. a.* Microbial fuel cells: Methodology and technology. *Environmental Science and Technology* **40**, 5181–5192 (2006).
79. Luengo, J. M., García, B., Sandoval, A., Naharro, G. & Olivera, E. R. Bioplastics from microorganisms. *Current Opinion in Microbiology* **6**, 251–260 (2003).
80. Lüttge, U. in *Terrestrial Photosynthesis in a Changing Environment* (Hrsg. Flexas, J., Loreto, F. & Medrano, H.) 71–84 (Cambridge University Press, Cambridge, 2012).
81. Lutz, R. & Bujard, H. Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements. *Nucleic Acids Research* **25**, 1203–1210 (1997).

82. Medeiros Garcia Alcântara, J. *u. a.* Current trends in the production of biodegradable bioplastics: The case of polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology Advances* **42**, 107582 (2020).
83. Mikkelsen, M., Jørgensen, M. & Krebs, F. C. The teraton challenge. A review of fixation and transformation of carbon dioxide. *Energy and Environmental Science* **3**, 43–81 (2010).
84. Miller, T. E. *u. a.* Light-powered CO₂ fixation in a chloroplast mimic with natural and synthetic parts. *Science* **654**, 1–48 (2020).
85. Min, D. *u. a.* Enhancing Extracellular Electron Transfer of *Shewanella oneidensis* MR-1 through Coupling Improved Flavin Synthesis and Metal-Reducing Conduit for Pollutant Degradation. *Environmental Science and Technology* **51**, 5082–5089 (2017).
86. Mougiakos, I. *u. a.* Efficient Cas9-based genome editing of *Rhodobacter sphaeroides* for metabolic engineering. *Microbial Cell Factories* **18**, 204 (2019).
87. Mussnug, J. H. *u. a.* Engineering photosynthetic light capture: Impacts on improved solar energy to biomass conversion. *Plant Biotechnology Journal* **5**, 802–814 (2007).
88. Nakamura, Y., Gojobori, T. & Ikemura, T. Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: Status for the year 2000. *Nucleic Acids Research* **28**, 292 (2000).
89. Nevin, K. P. *u. a.* Electrosynthesis of organic compounds from carbon dioxide is catalyzed by a diversity of acetogenic microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* **77**, 2882–2886 (2011).
90. Oey, M., Sawyer, A. L., Ross, I. L. & Hankamer, B. Challenges and opportunities for hydrogen production from microalgae. *Plant Biotechnology Journal* **14**, 1487–1499 (2016).
91. Oliver, J. W. K., Machado, I. M. P., Yoneda, H. & Atsumi, S. Cyanobacterial conversion of carbon dioxide to 2,3-butanediol. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 1249–1254 (Jan. 2013).
92. Orsi, E. *u. a.* Characterization of heterotrophic growth and sesquiterpene production by *Rhodobacter sphaeroides* on a defined medium. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **46**, 1179–1190 (2019).
93. Pan, J. *u. a.* Serine/threonine protein kinase PpkA contributes to the adaptation and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Pathogenesis* **113**, 5–10 (2017).
94. Pirbadian, S. *u. a.* *Shewanella oneidensis* MR-1 nanowires are outer membrane and periplasmic extensions of the extracellular electron transport components. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 12883–8 (2014).

95. Plastics Europe Deutschland e.V. Geschäftsbericht 2019. *Pressemitteilung*, URL: <https://www.plasticseurope.org/de/resources/publications/2918-geschaeftsbericht-2019> (2019).
96. Pohlmann, A. *u. a.* Genome sequence of the bioplastic-producing “Knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Nature Biotechnology* **24**, 1257–1262 (2006).
97. Porter, J. L., Rusli, R. A. & Ollis, D. L. Directed Evolution of Enzymes for Industrial Biocatalysis. *ChemBioChem* **17**, 197–203 (Feb. 2016).
98. Qiang, S. *u. a.* Elevated β -Carotene Synthesis by the Engineered *Rhodobacter sphaeroides* with Enhanced CrtY Expression. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **67**, 9560–9568 (2019).
99. Rabaey, K., Bützer, S., Brown, S., Keller, J. & Rozendal, R. A. High current generation coupled to caustic production using a lamellar bioelectrochemical system. *Environmental Science and Technology* **44**, 4315–4321 (2010).
100. Rabaey, K. & Rozendal, R. A. Microbial electrosynthesis - Revisiting the electrical route for microbial production. *Nature Reviews Microbiology* **8**, 706–716 (2010).
101. Raines, C. A. The Calvin cycle revisited. *Photosynthesis Research* **75**, 1–10 (2003).
102. Ringeisen, B. R., Ray, R. & Little, B. A miniature microbial fuel cell operating with an aerobic anode chamber. *Journal of Power Sources* **165**, 591–597 (2007).
103. Ringsmuth, A. K., Landsberg, M. J. & Hankamer, B. Can photosynthesis enable a global transition from fossil fuels to solar fuels, to mitigate climate change and fuel-supply limitations? *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **62**, 134–163 (2016).
104. Rios-Velazquez, C., Coller, R. & Donohue, T. J. Features of *Rhodobacter sphaeroides* CcmFH. *Journal of Bacteriology* **185**, 422–431 (2003).
105. Roller, S. D. *u. a.* 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. Biotechnology* **34**, 3–12 (2008).
106. Rosche, B., Li, X. Z., Hauer, B., Schmid, A. & Buehler, K. Microbial biofilms: a concept for industrial catalysis? *Trends in Biotechnology* **27**, 636–643 (2009).
107. Rosenbaum, M. A. & Henrich, A. W. Engineering microbial electrocatalysis for chemical and fuel production. *Current Opinion in Biotechnology* **29**, 93–98 (2014).
108. Ross, D. E., Flynn, J. M., Baron, D. B., Gralnick, J. A. & Bond, D. R. Towards electrosynthesis in *Shewanella*: Energetics of reversing the Mtr pathway for reductive metabolism. *PLoS ONE* **6** (2011).
109. Sangkharak, K. & Prasertsan, P. Optimization of polyhydroxybutyrate production from a wild type and two mutant strains of *Rhodobacter sphaeroides* using statistical method. *Journal of Biotechnology* **132**, 331–340 (Nov. 2007).

110. Santoro, C., Arbizzani, C., Erable, B. & Ieropoulos, I. Microbial fuel cells: From fundamentals to applications. A review. *Journal of Power Sources* **356**, 225–244 (2017).
111. Sapra, R., Bagramyan, K. & Adams, M. A simple energy-conserving system: proton reduction coupled to proton translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 7545–7550 (2003).
112. Scholes, G. D., Fleming, G. R., Olaya-Castro, A. & Van Grondelle, R. Lessons from nature about solar light harvesting. *Nature Chemistry* **3**, 763–774 (2011).
113. Schröder, U., Harnisch, F. & Angenent, L. T. Microbial electrochemistry and technology: Terminology and classification. *Energy and Environmental Science* **8**, 513–519 (2015).
114. Schwander, T., Von Borzyskowski, L. S., Burgener, S., Cortina, N. S. & Erb, T. J. A synthetic pathway for the fixation of carbon dioxide in vitro. *Science* **354**, 900–904 (2016).
115. Shafaat, H. S., Rüdiger, O., Ogata, H. & Lubitz, W. [NiFe] hydrogenases: A common active site for hydrogen metabolism under diverse conditions. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **1827**, 986–1002 (2013).
116. Shah, D. S., Armitage, J. P. & Sockett, R. E. *Rhodobacter sphaeroides* WS8 expresses a polypeptide that is similar to MotB of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **177**, 2929–2932 (1995).
117. Shih, P. M., Zarzycki, J., Niyogi, K. K. & Kerfeld, C. A. Introduction of a synthetic CO₂-fixing photorespiratory bypass into a cyanobacterium. *Journal of Biological Chemistry* **289**, 9493–9500 (2014).
118. Shih, P. M. *u. a.* Biochemical characterization of predicted Precambrian RuBisCO. *Nature Communications* **7**, 10382 (2016).
119. Sistrom, W. R. A requirement for sodium in the growth of *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *Journal of general microbiology* **22**, 778–785 (1960).
120. Sitte, P., Ziegler, H., Ehrendorfer, F. & Bresinsky, A. *Lehrbuch der Botanik* 33. Aufl., 1033 (Fischer, Stuttgart, 1991).
121. Sloan, F. E. & Talbot, J. B. Corrosion of Graphite-Fiber-Reinforced Composites I — Galvanic Coupling Damage. *Corrosion* **48**, 830–838 (1992).
122. Sockett, E. R., Foster, J. C. A. & Armitage, J. P. in *Molecular Biology of Membrane-Bound Complexes in Phototrophic Bacteria* (Hrsg. G. D. & E. A., D.) 473–478 (Springer US, Boston, 1990).
123. Spero, M. A. *u. a.* Different functions of phylogenetically distinct bacterial complex I isozymes. *Journal of Bacteriology* **198**, 1268–1280 (2016).

124. Steinbüchel, A., Fründ, C., Jendrossek, D. & Schlegel, H. G. Isolation of mutants of *Alcaligenes eutrophus* unable to derepress the fermentative alcohol dehydrogenase. *Archives of Microbiology* **148**, 178–186 (1987).
125. Stephens, S., Mahadevan, R. & Allen, D. G. Engineering Photosynthetic Bioprocesses for Sustainable Chemical Production: A Review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **8**, 1–15 (2021).
126. Stewart, M. P. *u. a.* High Catalytic Rates for Hydrogen Production Using Nickel Electrocatalysts with Seven-Membered Cyclic Diphosphine Ligands Containing One Pendant Amine. *Journal of the American Chemical Society* **135**, 6033–6046 (2013).
127. Stiefel, P., Schmidt-Emrich, S., Maniura-Weber, K. & Ren, Q. Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide. *BMC Microbiology* **15**, 1–9 (2015).
128. Strycharz-Glaven, S. M., Snider, R. M., Guiseppi-Elie, A. & Tender, L. M. On the electrical conductivity of microbial nanowires and biofilms. *Energy and Environmental Science* **4**, 4366–4379 (2011).
129. Sturm-Richter, K. *u. a.* 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 (2015).
130. Styring, P., Quadrelli, E. A. & Armstrong, K. *Carbon Dioxide Utilisation -Closing the Carbon Cycle* 1. Aufl., 336 (Elsevier, Amsterdam, 2015).
131. Su, A. *u. a.* Metabolic Redesign of *Rhodobacter sphaeroides* for Lycopene Production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **66**, 5879–5885 (2018).
132. Sun, Y. *u. a.* Electrodeposited Cobalt-Sulfide Catalyst for Electrochemical and Photoelectrochemical Hydrogen Generation from Water. *Journal of the American Chemical Society* **135**, 17699–17702 (2013).
133. Tapias, A., Campoy, S. & Barbé, J. Analysis of the expression of the *Rhodobacter sphaeroides* *lexA* gene. *Molecular and General Genetics* **263**, 957–965 (2000).
134. Tender, L. M. *u. a.* The first demonstration of a microbial fuel cell as a viable power supply: Powering a meteorological buoy. *Journal of Power Sources* **179**, 571–575 (2008).
135. TerAvest, M. A., Zajdel, T. J. & Ajo-Franklin, C. M. The Mtr Pathway of *Shewanella oneidensis* MR-1 Couples Substrate Utilization to Current Production in *Escherichia coli*. *ChemElectroChem* **1**, 1874–1879 (2014).
136. Thauer, R. K., Jungermann, K. & Decker, K. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriological Reviews* **41**, 100–180 (1977).

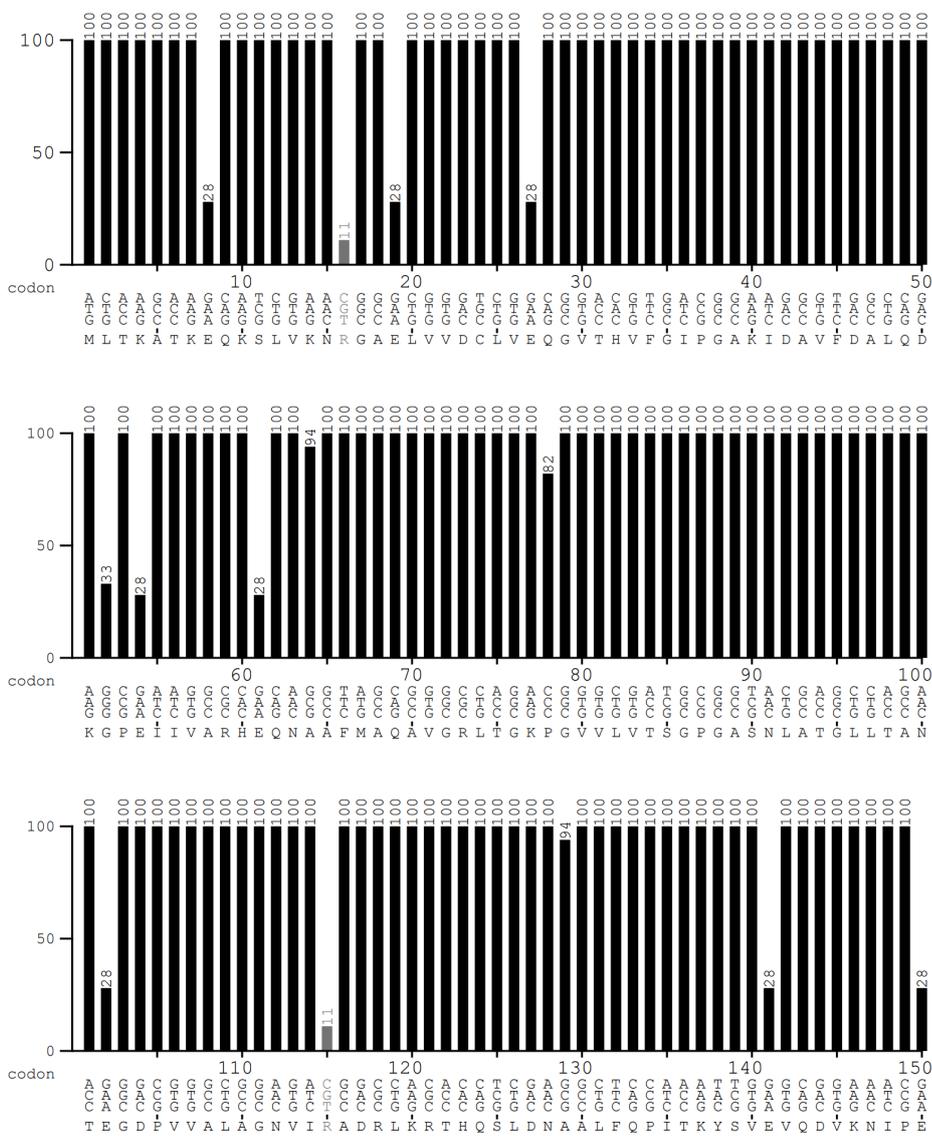
137. Thomas, P., Ryan, D. & Levin, W. An improved staining procedure for the detection of the peroxidase activity of cytochrome P-450 on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. *Analytical biochemistry* **75**, 168–176 (1976).
138. Tichi, M. A., Meijer, W. G. & Tabita, F. R. Complex I and its involvement in redox homeostasis and carbon and nitrogen metabolism in *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of Bacteriology* **183**, 7285–7294 (2020).
139. Verband der Chemischen Industrie e.V. Stoffstrombild Kunststoffe in Deutschland. *Pressemitteilung*, URL: <https://www.vci.de/themen/zirkulaere-wirtschaft/stoffstrombild-kunststoffe-in-deutschland-2019-kurzfassung-conversio-studie.jsp> (2020).
140. Vereinte Nationen. Agenda 2030 – Resolution der Generalversammlung verabschiedet am 25. September 2015. *Pressemitteilung*, URL: <https://unric.org/de/17ziele/> (2015).
141. Voges, O. & Proskauer, B. Beitrag zur Ernährungsphysiologie und zur Differentialdiagnose der Bakterien der hämorrhagischen Septicämie. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten* **28**, 20–32 (1898).
142. Von Canstein, H., Ogawa, J., Shimizu, S. & Lloyd, J. R. Secretion of flavins by *Shewanella* species and their role in extracellular electron transfer. *Applied and Environmental Microbiology* **74**, 615–623 (2008).
143. Wagner, M., Taherzadeh, D., Haisch, C. & Horn, H. Investigation of the mesoscale structure and volumetric features of biofilms using optical coherence tomography. *Biotechnology and Bioengineering* **107**, 844–853 (2010).
144. Wang, F. *u. a.* Structure of Microbial Nanowires Reveals Stacked Hemes that Transport Electrons over Micrometers. *Cell* **177**, 361–369 (2019).
145. Wieczorek, S. *u. a.* DAPAR & ProStaR: Software to perform statistical analyses in quantitative discovery proteomics. *Bioinformatics* **33**, 135–136 (2017).
146. Windhorst, C. & Gescher, J. Efficient biochemical production of acetoin from carbon dioxide using *Cupriavidus necator* H16. *Biotechnology for Biofuels* **12**, 1–11 (2019).
147. WP, B. *u. a.* Role of PufX protein in photosynthetic growth of *Rhodobacter sphaeroides*. 1. PufX is required for efficient light-driven electron transfer and photophosphorylation under anaerobic conditions. *Biochemistry* **34**, 15235–15247 (1995).
148. Wright Gerard, D. Aminoglycoside phosphotransferases: proteins, structure, and mechanism. *Frontiers in Bioscience* **4**, 9–21 (1999).
149. Xiao, Z. & Lu, J. R. Strategies for enhancing fermentative production of acetoin: A review. *Biotechnology Advances* **32**, 492–503 (2014).
150. Xiao, Z. & Xu, P. Acetoin Metabolism in Bacteria. *Critical Reviews in Microbiology* **33**, 127–140 (2008).

151. Yang, Y., Xu, M., Guo, J. & Sun, G. Bacterial extracellular electron transfer in bioelectrochemical systems. *Process Biochemistry* **47**, 1707–1714 (2012).
152. Yates, M. D., Siegert, M. & Logan, B. E. Hydrogen evolution catalyzed by viable and non-viable cells on biocathodes. *International Journal of Hydrogen Energy* **39**, 16841–16851 (2014).
153. Zehr, B. D., Savin, T. J. & Hall, R. E. A one-step, low background Coomassie staining procedure for polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* **182**, 157–159 (1989).
154. Zhang, J., Gao, D., Cai, J., Liu, H. & Qi, Z. Improving coenzyme Q10 yield of *Rhodobacter sphaeroides* via modifying redox respiration chain. *Biochemical Engineering Journal* **135**, 98–104 (2018).
155. Zhou, J., Liu, L., Shi, Z., Du, G. & Chen, J. ATP in current biotechnology: Regulation, applications and perspectives. *Biotechnology Advances* **27**, 94–101 (2009).
156. Zuriani, R., Vigneswari, S., Azizan, M. N., Majid, M. I. & Amirul, A. A. A high throughput Nile red fluorescence method for rapid quantification of intracellular bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **18**, 472–478 (2013).

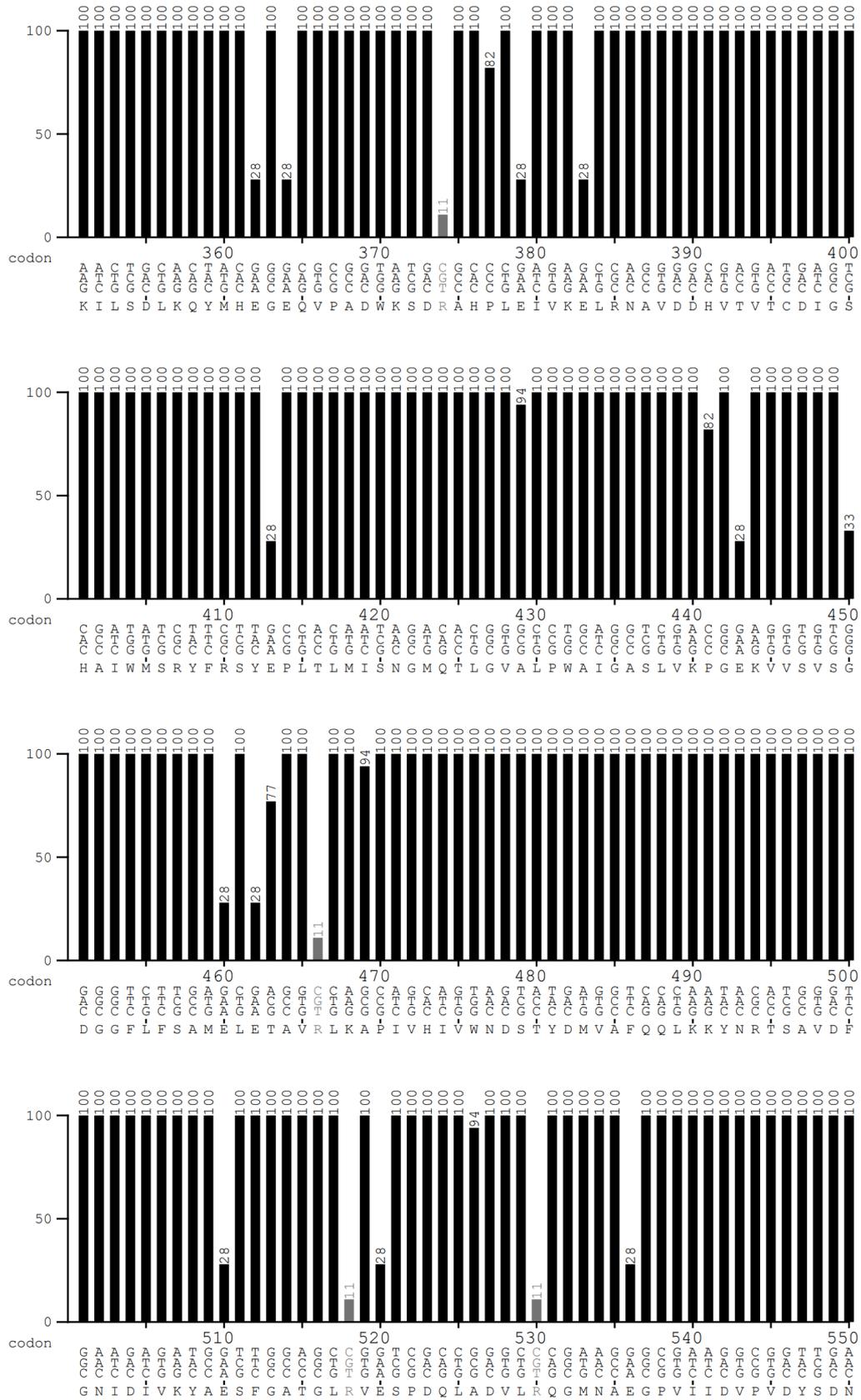
Anhang

Codon optimierte Sequenz von AlsS (visualisiert im Graphical Codon Usage Analyzer)

Codontable:
<https://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=1063&aa=11&style=N>
 Ordinate (y-axis): relative adaptiveness <20% <10%



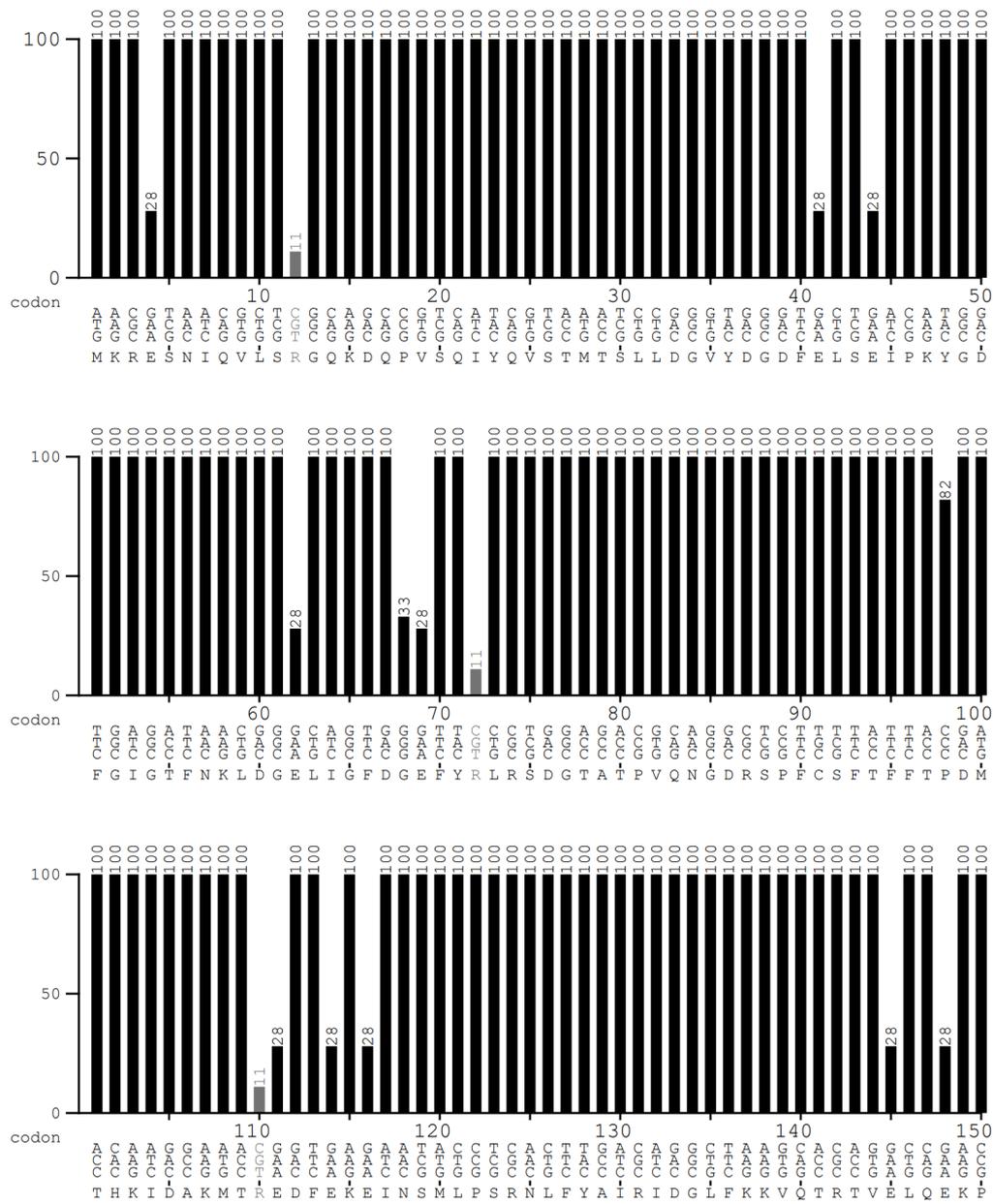


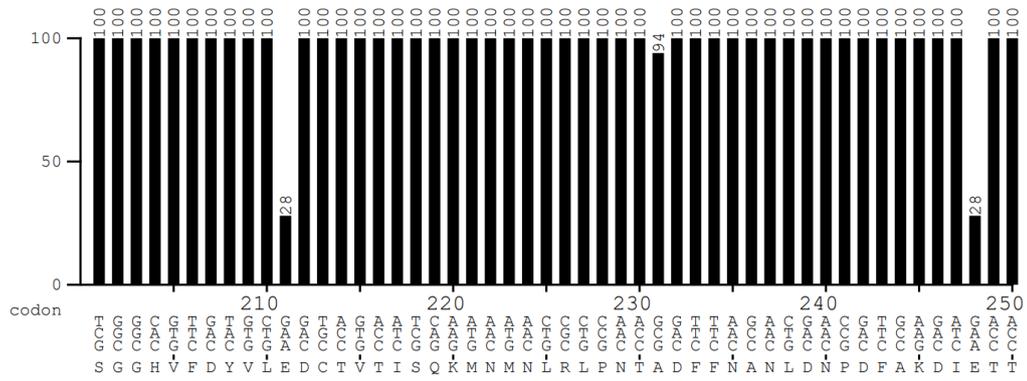
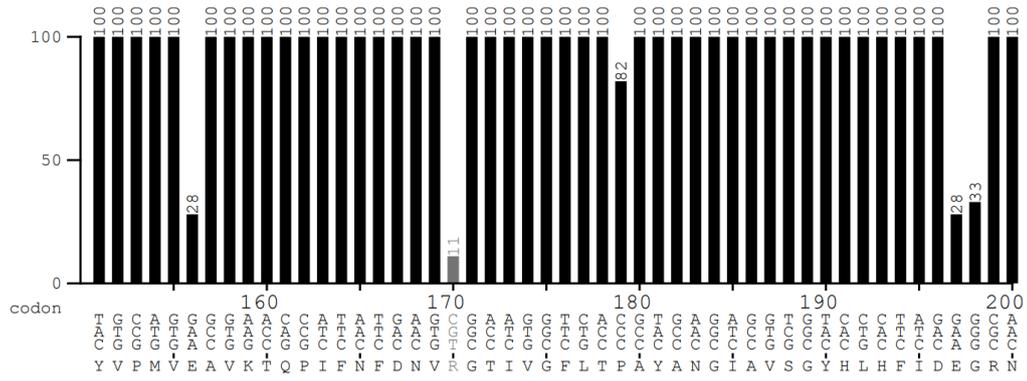


Codon optimierte Sequenz von AlsD (visualisiert im Graphical Codon Usage Analyzer)

Codontable:
<https://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=1063&aa=11&style=N>

Ordinate (y-axis): relative adaptiveness <20% <10%





Danksagung

Mein größter Dank geht an meinen Betreuer Johannes Gescher. Danke für alles was ich lernen durfte, alles was ich lernen musste und alles was du zu dem Erfolg, als den ich diese Arbeit sehe, beigetragen hast. Letzteres beginnt beim Vertrauen, mir die Chance zu geben, dieses Thema zu bearbeiten und führt sich fort zu deiner enthusiastischen, inspirierenden und motivierenden Art und Weise der Betreuung, die mir stets Vertrauen und Energie schenkte. Ich wählte dein Institut, da ich vermutete, dort am meisten lernen zu dürfen. Damit sollte ich in einem größeren Ausmaß recht behalten, als mir zu Beginn der Reise klar war.

Liebe AG, vielen Dank für die einmalige Atmosphäre, die aus einer Balance aus Wohlfühlen und harter Arbeit bestand. Viele der Momente innerhalb und außerhalb des Instituts werden mich nachhaltig begleiten. Die Unterstützung meiner Praktikanten und Bacheloranden ist an dieser Stelle natürlich ebenfalls zu betonen.

Lieber Daniel vom Walde, die Unterstützung, die du mir gegeben hast, motivierte durch deine liebenswert-kauzige Art und Weise um so mehr. Der stundenlange Austausch bis in die kleinsten Details hat einen riesigen Teil zu dem beigetragen, was diese Arbeit letztendlich wurde. Auch ein großes Dankeschön an Lucas. Das Wissen, das du geteilt hast, hat manche Versuche erst ermöglicht.

Desweiteren gilt meine Dankbarkeit meinen Freunden, die mich auf diesem Weg begleitet haben und mehr zu der Arbeit beigetragen haben, als sie vielleicht je vermuten werden.

Ohne meine Familie, die mich immer unterstützt und immer an mich geglaubt hat, wäre ich niemals so weit gekommen. Vielen Dank, dass ihr immer da seid und ich mich, egal was auch passiert, auf euch verlassen kann!

Liebe Lida, vielen Dank auch für deine Unterstützung und dafür, dass du mir immer den Rücken frei gehalten hast.