



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

TUM School of Life Sciences

**Verwertung von Weizenstroh und Mühlennebenprodukten zur Butanol-
produktion durch cellulolytische und solventogene Clostridien**

Johanna Claudia Panitz

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Life Sciences der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Dieter Langosch

Prüfende der Dissertation:

1. Prof. Dr. Wolfgang Liebl

2. apl. Prof. Dr. Matthias Ehrmann

Die Dissertation wurde am 25.11.2020 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die TUM School of Life Sciences am 22.03.2021 angenommen.

I Zusammenfassung

Lignocellulosehaltige Biomasse aus Resten der Nahrungsmittelproduktion oder aus land- und forstwirtschaftlichen Abfällen ist ein äußerst vielversprechendes, regeneratives Substrat für die fermentative Herstellung von Bioalkoholen. Allerdings muss die Lignocellulose dafür erst kostenintensiv vorbehandelt und verzuckert werden und viele traditionelle Produktionsstämme sind nicht in der Lage, die daraus resultierenden Hydrolysate effizient zu Alkoholen zu fermentieren. Ein aussichtsreicher Ansatz, um Biomasse direkt zu nutzen, ist *consolidated bioprocessing* (CBP). Dabei können Cellulose-abbauende Organismen verwendet werden, um die Enzymproduktion, die Hydrolyse der Biomasse und die Fermentation darin erhaltener Zucker zu Biokraftstoffen in einem Prozess zu kombinieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden die cellulolytischen Clostridien *Ruminiclostridium cellulolyticum* DSM 5812^T und einige *Clostridium thermocellum* Stämme auf ihre Fähigkeit hin untersucht, unvorbehandeltes Weizenstroh effektiv zu verwerten. Die thermophilen *C. thermocellum* Stämme weisen dabei einen hohen Substratabbau auf, nutzen aber in erster Linie die abgespaltenen Cellodextrine. Im Gegensatz dazu können die mesophilen *R. cellulolyticum* DSM 5812^T Kulturen alle im Substrat enthaltenen Zucker verwerten, zeigen aber einen niedrigeren Substratabbau und eine geringere Toleranz gegen hohe Substratkonzentrationen, was Grundvoraussetzungen für industrielle Anwendungen sind. Darüber hinaus wurde analysiert, inwieweit sich *C. thermocellum* ATCC 27405^T und *R. cellulolyticum* DSM 5812^T Stämme als Wirtsorganismen für die rekombinante Herstellung von Butanol eignen. Für beide Organismen wurde dafür eine Transformationsmethodik entwickelt, um verschiedene Varianten des CoA-abhängigen Butanol-Stoffwechselweges aus solventogenen Clostridien rekombinant zu exprimieren. Die Auswirkung der eingeführten genetischen Modifikationen auf den Metabolismus der cellulolytischen Clostridien wurde durch Analyse der Fermentationsprodukte mittels Gaschromatographie und teilweise mittels Enzym-Assays untersucht. Nach Optimierung der Kultivierungsbedingungen zur Butanolproduktion betrug der maximale n-Butanol-Titer in den genetisch veränderten *C. thermocellum* ATCC 27405^T Kulturen 13 mg/l nach 7 Tagen auf kristalliner Cellulose.

Neben Weizenstroh wurden auch zwei Nebenprodukte der Weizenmehlherstellung mit einem höheren Gehalt leicht zugänglicher Kohlenhydrate, unvorbehandelt als Substrate für solventogene Clostridien untersucht. Durch Screening der am besten geeigneten Stämme und Optimierung der Kultivierungsbedingungen konnte so bereits im Labormaßstab bis zu 14 g/l n-Butanol (20 g/l Gesamtlösungsmittel) in 96 h produziert werden.

II Abstract

A potentially attractive substrate for fermentative bio-alcohol production from renewable materials is lignocellulosic biomass, for example, from agricultural residues or forest slash. However, hydrolysis of lignocellulose is difficult and cost intensive, and many traditional production strains are not able to efficiently ferment the resulting hydrolysates into alcohols. One promising approach to convert biomass directly into biofuels is consolidated bioprocessing (CBP). CBP envisages the use of naturally cellulolytic microorganisms to perform enzyme production, biomass hydrolysis, and fermentation of the resulting sugars into biofuels within a single process.

In this work the ability of *Ruminiclostridium cellulolyticum* DSM 5812^T and some *Clostridium thermocellum* strains to solubilize autoclaved but otherwise un-pretreated wheat straw was examined. The thermophilic *C. thermocellum* strains exhibit a high substrate digestion rate, but mainly only utilize cellobextrins released from the substrate. On the other hand, the mesophilic *R. cellulolyticum* DSM 5812^T cultures are able to degrade and utilize all containing sugars but with a slower substrate degradation rate and a lower tolerance to high substrate concentrations, both prerequisites for industrial applications.

Furthermore, the suitability of *C. thermocellum* ATCC 27405^T and *R. cellulolyticum* DSM 5812^T strains to be used as host organisms for recombinant butanol production was analyzed. A transformation method for both organisms was developed and different shuttle plasmids for butanol production based on the CoA-dependent pathway known from solventogenic clostridia were used for recombinant expression. The effect of these genetic modifications was measured by analysis of fermentation products by gas chromatography, as well as partly by enzyme assays. After optimization of cultivation conditions for recombinant butanol production in *C. thermocellum* ATCC 27405^T, maximal n-butanol titers on crystalline cellulose were 13 mg/l after 7 days.

As an alternative to wheat straw, two byproducts of wheat flour manufacture, offering more easily accessible carbohydrates, were analyzed for butanol production by solventogenic clostridia without pretreatment of the substrates. Strain screening for enhanced butanol production and optimization of cultivation conditions resulted in up to 14 g/l n-butanol (20 g/l total solvents) in 96 h in 50 ml laboratory bottles.

III Inhaltsverzeichnis

I	Zusammenfassung	
II	Abstract	
III	Inhaltsverzeichnis	
IV	Veröffentlichungen, Tagungsbeiträge und betreute Arbeiten	
V	Abbildungsverzeichnis	
VI	Tabellenverzeichnis	
VII	Abkürzungsverzeichnis	
1.	<i>Einleitung</i>	1
1.1	Überblick über den ABE-Stoffwechsel und die Fermentationsprodukte solventogener Clostridien	2
1.2	Methoden zur genetischen Modifikation von Clostridien	4
1.3	Alternative Substrate für die Herstellung von Bioalkoholen	5
1.4	CBP Verfahren als vielversprechendes Forschungsziel	9
1.5	Zielsetzung	11
2.	<i>Material und Methoden</i>	12
2.1	Chemikalien, Gase und Geräte	12
2.2	Enzyme	13
2.3	Molekularbiologische Hilfsmittel (Kit's)	13
2.4	Bakterienstämme	14
2.5	Plasmide	15
2.6	Oligodesoxynukleotide	15
2.7	Zellanzucht	17
2.7.1	Herstellung von Nährmedien	17
2.7.2	Medienzusätze	19
2.7.2.1	Reduktionsmittel	19
2.7.2.2	Antibiotika	20
2.7.3	Anzuchtbedingungen und Stammhaltung	20
2.7.4	Bestimmung von Wachstums und Stoffwechselfparametern	21
2.7.4.1	Messung der Optischen Dichte	21
2.7.4.2	Messung des externen pH-Wertes	21

2.7.4.3	Gaschromatographische Analyse von Produkten	21
2.7.4.4	Dünnschichtchromatographie	22
2.8	Protein-chemische Methoden	22
2.8.1	Zellaufschluss aerob	22
2.8.2	Zellaufschluss anaerob	23
2.8.3	Bradford-Assay	23
2.8.4	Butanol-Dehydrogenase (BDH) Enzymassay	23
2.8.4.1	BDH-Assay in nicht-physiologischer Richtung	23
2.8.4.2	BDH-Assay in physiologischer Richtung	24
2.9	Abbauanalyse von festen Substraten	25
2.9.1	Fraktionierte Analyse des Substratabbaus (Van Soest Analyse)	25
2.9.2	Analyse reduzierender Enden in Kulturüberständen (DNSA-Test)	27
2.10	Transfer von DNA in <i>E. coli</i>	27
2.10.1	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	27
2.10.2	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	28
2.10.3	Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> Zellen:	28
2.10.4	Elektroporation von <i>E. coli</i> Zellen	29
2.11	Transfer von DNA in Clostridien	29
2.11.1	Elektroporation von <i>C. thermocellum</i> ATCC 27405 ^T	29
2.11.2	Elektroporation von <i>R. cellulolyticum</i> DSM 5812 ^T	30
2.12	Molekularbiologische Methoden	30
2.12.1	Vorbehandlung von Geräten und Lösungen	30
2.12.2	Isolation von Nukleinsäuren aus Bakterien	31
2.12.2.1	Isolierung genomischer DNA aus Clostridien	31
2.12.2.2	Isolation von gesamt DNA aus Clostridien mit der „InstaGene TM “-Matrix	31
2.12.2.3	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	31
2.12.2.4	Isolation von Plasmid-DNA aus Clostridien	32
2.12.3	Aufreinigung und Konzentration von Nukleinsäuren	32
2.12.3.1	(Phenol)-Chloroform-Extraktion	32
2.12.3.2	Isopropanolfällung	32
2.12.3.3	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen, Restriktions- und PCR-Reaktionen	32
2.12.3.4	Aufreinigung von Plasmid-DNA über Mikrodialyse	33

2.12.4	Analyse von Nukleinsäuren	33
2.12.4.1	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	33
2.12.4.2	Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	33
2.12.4.3	Sequenzierung	34
2.12.4.4	Analyse der DNA bzw. Protein Sequenzen	34
2.12.5	Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren	34
2.12.5.1	Restriktionsspaltung von Nukleinsäuren	34
2.12.5.2	Dephosphorylierung	34
2.12.5.3	Ligation von DNA-Fragmenten	35
2.12.6	PCR-Techniken	35
2.12.6.1	Standard-PCR	35
2.12.6.2	Two-Step-PCR	35
3	<i>Ergebnisse</i>	37
3.1	Cellulolytische Clostridien als Empfängerorganismen für die Gene aus dem Butanol-Stoffwechselweg	37
3.1.1	<i>Clostridium thermocellum</i>	37
3.1.1.1	Wachstumsstudien mit <i>C. thermocellum</i>	38
3.1.1.2	Cellulose-Abbau	39
3.1.1.3	Verwertung einzelner Zucker	39
3.1.1.4	Fermentationsprodukte	40
3.1.1.5	Butanol-Toleranz	41
3.1.1.6	Analyse des Genoms nach Genen für die Butanol-Produktion	42
3.1.2	<i>Ruminiclostridium cellulolyticum</i>	43
3.1.2.1	Wachstumsstudien mit <i>R. cellulolyticum</i>	43
3.1.2.2	Cellulose-Abbau	44
3.1.2.3	Verwertung einzelner Zucker	44
3.1.2.4	Fermentationsprodukte	45
3.1.2.5	Butanol-Toleranz	45
3.1.2.6	Analyse des Genoms nach Genen für die Butanol-Produktion	46
3.1.3	Neuisolation cellulolytischer Bakterien aus Naturproben	46
3.2	Analyse des Abbaus von unbehandeltem SC-Substrat und einzelner Substratbestandteile daraus	47
3.2.1	Analyse des Substrats	47

3.2.2	Einfluss verschiedener Faktoren auf den Abbau von SC-Substrat durch <i>C. thermocellum</i> ATCC 27405 ^T und <i>R. cellulolyticum</i> DSM 5812 ^T	48
3.2.2.1	Inokulum	48
3.2.2.2	Inkubationsdauer	49
3.2.2.3	Inkubationstemperatur	51
3.2.2.4	Substratkonzentration	51
3.2.2.5	pH-Bedingungen	52
3.2.2.6	Gasdruck und Durchmischung	53
3.2.2.7	Substratabbau unter Zugabe von Butanol	53
3.2.2.8	Analyse der Kulturüberstände nach Substratabbau	54
3.3	Umsetzung von Mühlennebenprodukten zu Butanol durch solventogene Clostridien	56
3.3.1	Umsetzung von Weizengrießkleie (WGK)	57
3.3.1.1	Screening geeigneter Clostridien-Stämme auf Weizengrießkleie	57
3.3.1.2	Optimierung der Fermentationsbedingungen für WGK ohne Vorbehandlung	58
3.3.2	Umsetzung von Weizennachmehl (WNM)	59
3.3.2.1	Screening der Stammsammlung auf Weizennachmehl	59
3.3.2.2	Optimierung der Fermentationsbedingungen für WNM ohne Vorbehandlung	60
3.4	Rekombinante Darstellung des Butanol-Stoffwechselwegs	62
3.4.1	Die Plasmide <i>pHYC-BCS</i> und <i>pHYC-BCS-thl</i> und darauf basierende Varianten	63
3.4.1.1	<i>pHYc-BCS</i> und <i>pHYc-BCS-thl</i>	64
3.4.1.2	<i>pHYc-BCS-thl-adhE1</i> und <i>pHYc-BCS-thl-adhE2</i>	64
3.4.2	Die Plasmide <i>pMW1</i> und <i>pMW2</i>	65
3.4.3	Sequenzanalyse des BCS-Operons von <i>C. tetanomorphum</i> GT6	67
3.4.4	Ersetzen von <i>bcd/etfA/etfB</i> durch <i>ter</i> aus <i>Treponema denticola</i>	69
3.5	Transformation cellulolytischer Clostridien mit den Genen für den Butanol-Stoffwechselweg	70
3.5.1	Selektionsmarker, Kulturbedingungen und mögliche Schaukelvektoren für die Transformation	71
3.5.2	Etablierung einer geeigneten Elektroporations-Methode für <i>C. thermocellum</i> ATCC 27405 ^T und <i>R. cellulolyticum</i> DSM 5812 ^T	72

3.5.3	Transformation von <i>R. cellulolyticum</i> DSM 5812 ^T und <i>C. thermocellum</i> ATCC 27405 ^T mit den Plasmiden <i>pHYc-BCS</i> und <i>pHYc-BCS-thl</i> und daraus entwickelten Konstrukten	73
3.5.3.1	<i>pHYc-BCS</i> und <i>pHYc-BCS-thl</i>	73
3.5.3.2	<i>pHYc-BCS-thl-adhE1</i> und <i>pHYc-BCS-thl-adhE2</i>	75
3.5.4	Transformation von <i>R. cellulolyticum</i> DSM 5812 ^T und <i>C. thermocellum</i> ATCC 27405 ^T mit den Plasmiden <i>pMW1</i> und <i>pMW2</i>	75
3.5.4.1	Transformationen mit <i>pMW1</i> und <i>pMW2</i>	75
3.5.4.2	Analyse der Fermentationsprodukte von <i>C. thermocellum</i> ATCC 27405 ^T - <i>pMW1</i> und - <i>pMW2</i> auf unterschiedlichen Medien	77
3.5.4.3	Analyse von <i>C. thermocellum</i> ATCC 27405 ^T - <i>pMW1</i> und - <i>pMW2</i> unter Zugabe verschiedener Substanzen	79
3.5.4.4	Aktivität der bifunktionalen Aldehyd-Alkohol-Dehydrogenase aus <i>C. thermocellum</i>	82
3.5.4.5	Analyse der Fermentationsprodukte von <i>C. thermocellum</i> ATCC 27405 ^T - <i>pMW1</i> und - <i>pMW2</i> auf unterschiedlichen Substraten	83
3.5.4.6	Analyse der Fermentationsprodukte von <i>C. thermocellum</i> ATCC 27405 ^T - <i>pMW1</i> und - <i>pMW2</i> bei niedrigeren Temperaturen	84
4	<i>Diskussion</i>	88
	Regenerative Substrate für eine industrielle Bioalkoholproduktion	88
	<i>C. thermocellum</i> ATCC 27405^T und <i>R. cellulolyticum</i> DSM 5812^T als am besten geeignete Kandidaten für die rekombinante Produktion von Biobutanol	92
	Heterologe Expression der Gene des CoA-abhängigen Butanol-Stoffwechselwegs in <i>C. thermocellum</i> ATCC 27405^T und <i>R. cellulolyticum</i> DSM 5812^T	98
	Ausblick	112
VIII	Literaturverzeichnis	114
IX	Anhang	134
X	Danksagung	159
XI	Eidesstattliche Erklärung	161

IV Veröffentlichungen, Tagungsbeiträge und betreute Arbeiten

Publikationen, die aus dieser Arbeit hervorgegangen sind:

Thieme, N.¹; Panitz, J. C.¹, C. D. Held, B. Lewandowski, W. H. Schwarz, W. Liebl & V. V. Zverlov (2020). Milling byproducts are an economically viable substrate for butanol production using clostridial ABE fermentation. *Appl Microbiol and Biotechnol*, 104, 8679-8689
¹geteilte Erstautorenschaft

Panitz, J. C., V. V. Zverlov, V. T. Pham, S. Stürzl, D. Schieder & W. H. Schwarz (2014) Isolation of a solventogenic Clostridium sp. strain: fermentation of glycerol to n-butanol, analysis of the bcs operon region and its potential regulatory elements. *Syst Appl Microbiol*, 37, 1-9

Tagungsbeiträge:

Panitz, J. C.; C. D. Held, W.H. Schwarz, W. Liebl & V. V. Zverlov (2020). Bio-butanol production from wheat flour milling byproducts. Poster auf der internationalen Tagung Clostridium XV, Freising, 2018

Panitz, J. C.; S. Stürzl, V. V. Zverlov & W.H. Schwarz (2010). Isolation of a solventogenic Clostridium sp. producing alcohols from glycerol. Poster auf der internationalen Tagung Clostridium XI, San Diego, 2010

Arbeiten, die während dieser Doktorarbeit betreut wurden und deren Ergebnisse - mit Erlaubnis der Autoren - in den oben genannten Publikationen oder, wo angegeben, in dieser Arbeit erwähnt sind:

Johannes Meier: Butanol Dehydrogenase Aktivität verschiedener Clostridien Stämme; Forschungspraktikum, 2011

Trang Pham: Charakterisierung des „GT6“- Isolats; Forschungspraktikum, 2010

Sabrina Stürzl: Screening und Charakterisierung solventogener Clostridien; Forschungspraktikum, 2010

Quirin Krabichler: Screening von Naturproben auf cellulolytisch aktive anaerobe mesophile Isolate; Bachelorarbeit, 2009

Die Arbeiten von Katharina Holzner, Olga Shostak und Thomas Schenk behandelten andere Themen und fanden keine Erwähnung.

V Abbildungsverzeichnis

#	Titel	Seite
Abb. 1	Stoffwechselwege in der ABE-Fermentation solventogener Clostridien	3
Abb. 2	Organisation des BCS- und des SOL-Operons in <i>C. acetobutylicum</i>	4
Abb. 3	Schematische Darstellung der Zusammensetzung und des Abbaus von Biomasse durch <i>C. thermocellum</i>	8
Abb. 4	Temperaturabhängigkeit des Wachstums von <i>C. thermocellum</i> Stämmen	38
Abb. 5	Verwertung einzelner Zucker durch <i>C. thermocellum</i> ATCC 27405 ^T und <i>R. cellulolyticum</i> DSM 5812 ^T	40
Abb. 6	Fermentationsprodukte von <i>C. thermocellum</i> ATCC 27405 ^T unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen	41
Abb. 7	Butanoltoleranz von <i>C. thermocellum</i> ATCC 27405 ^T	42
Abb. 8	Wachstum von <i>R. cellulolyticum</i> DSM 5812 ^T	44
Abb. 9	Fermentationsprodukte von <i>R. cellulolyticum</i> DSM 5812 ^T und von <i>C. thermocellum</i> ATCC 27405 ^T auf unterschiedlichen Substraten	45
Abb. 10	Butanoltoleranz von <i>R. cellulolyticum</i> DSM 5812 ^T	46
Abb. 11	Analyse der SC-Substratzusammensetzung nach Van-Soest	47
Abb. 12	Analyse des fraktionierten Abbaus von Cellulose und Hemicellulose durch <i>C. thermocellum</i> ATCC 27405 ^T und <i>R. cellulolyticum</i> DSM 5812 ^T nach Van-Soest über die Zeit	48
Abb. 13	Analyse des fraktionierten Abbaus von Cellulose und Hemicellulose nach Van-Soest durch <i>C. thermocellum</i> ATCC 27405 ^T und <i>R. cellulolyticum</i> DSM 5812 ^T mit verschiedenen Inokulationsmethoden über die Zeit	50
Abb. 14	Van-Soest-Analyse des Abbaus von Hemicellulose und Cellulose auf 1,33 % SC-Substrat bei verschiedenen Temperaturen	51
Abb. 15	Van-Soest-Analyse des Abbaus von Hemicellulose und Cellulose auf 1,33 % SC-Substrat durch <i>C. thermocellum</i> ATCC 27405 ^T bei unterschiedlichen pH-Werten	52
Abb. 16	Van-Soest-Analyse des Abbaus von Hemicellulose und Cellulose aus SC-Substrat bei steigenden Butanol-Konzentrationen von 0 - 0,6 % Butanol	54

Abb. 17	Dünnschicht-Analyse der Kulturüberstände von <i>R. cellulolyticum</i> DSM 5812 ^T und <i>C. thermocellum</i> ATCC 27405 ^T nach Substratabbau	55
Abb. 18	Fermentationsprodukte für <i>C. thermocellum</i> ATCC 27405 ^T nach 7 Tagen bei 60°C auf unterschiedlichen Konzentrationen SC-Substrat	56
Abb. 19	Übersicht über die hauptsächlichen Nebenprodukte der Weizenmehlherstellung und ihre Verfügbarkeit in Bayern	57
Abb. 20	Fermentationsprodukte der besseren Lösungsmittelproduzenten (> 0,18 % Butanol) beim Screening der Stammsammlung auf 13 % WGK	58
Abb. 21	Fermentationsprodukte für die Stämme 7 und 41 in Leitungswasser basiertem Medium sowie die Stämme 131 und 132 in Grundmedium	59
Abb. 22	Fermentationsprodukte der besseren Lösungsmittelproduzenten (> 0,6 % Butanol) nach dem Screening der Sammlung auf 7,2 % WNM	60
Abb. 23	Direkter Vergleich der Fermentationsprodukte für die Stämme 7 und 27	60
Abb. 24	Fermentationsprodukte für Stamm 2 in Grundmedium und Stamm 132 in Leitungswasser basiertem Medium auf 13,5 % WNM	61
Abb. 25	Fermentationsprodukte ausgewählter Stämme auf a) steigender Substratkonzentration oder b) auf 13,5 % WNM	62
Abb. 26	Das Shuttle-Plasmid <i>pHYC-BCS-thl</i>	64
Abb. 27	Fermentationsprodukte von <i>E. coli</i> Top10 transformiert mit <i>pIMP1</i> , <i>pHYC-BCS-thl</i> , <i>pHYC-BCS-thl-adhE1</i> , <i>pHYC-BCS-thl-adhE2</i> , <i>pMW1</i> und <i>pMW2</i>	65
Abb. 28	Die Plasmide <i>pMW1</i> und <i>pMW2</i>	66
Abb. 29	Fermentationsprodukte von <i>E. coli</i> Top10 mit <i>pIMP1</i> , <i>pMW1</i> und <i>pMW2</i>	66
Abb. 30	Phylogenetische Einordnung des Isolats <i>C. tetanomorphum</i> GT6	67
Abb. 31	Das BCS-Operon von <i>C. tetanomorphum</i> GT6	68
Abb. 32	Sequenz der Promotorregion und einer potentiellen Rex-Bindestelle oberhalb des BCS- Operons von <i>C. tetanomorphum</i> GT6, <i>C. acetobutylicum</i> , <i>C. beijerinckii</i> , <i>C. tetani</i> , und <i>C. saccharobutylicum</i>	69
Abb. 33	Wachstumskurve von <i>R. cellulolyticum</i> DSM 5812 ^T und <i>C. thermocellum</i> ATCC 27405 ^T	71

Abb. 34	Selektionsplatte mit <i>C. thermocellum</i> ATCC 27405 ^T - <i>pMW1</i> im Overlay	74
Abb. 35	Fermentationsprodukte von <i>R. cellulolyticum</i> DSM 5812- <i>pHYC-BCS-thl</i>	74
Abb. 36	Fermentationsprodukte von <i>C. thermocellum</i> ATCC 27405 ^T und von Transformanten mit den Plasmiden <i>pMW1</i> und <i>pMW2</i> auf 2 % Cellobiose oder 2 % Cellulose	75
Abb. 37	Fermentationsprodukte von <i>C. thermocellum</i> ATCC 27405 ^T und Transformanten mit den Plasmiden <i>pMW1</i> und <i>pMW2</i> nach 2, 4 und 7 Tagen	76
Abb. 38	Fermentationsprodukte von <i>C. thermocellum</i> ATCC 27405 ^T und den Transformanten <i>C. thermocellum</i> ATCC 27405 ^T - <i>pMW1</i> und - <i>pMW2</i> auf unterschiedlichen Medien mit 2 % Cellulose	77
Abb. 39	Fermentationsprodukte von a) <i>C. thermocellum</i> ATCC 27405 ^T und Transformanten mit den Plasmiden b) <i>pMW1</i> und c) <i>pMW2</i> auf unterschiedlichen Medien und Substraten	78
Abb. 40	Analyse der Fermentationsprodukte von <i>C. thermocellum</i> ATCC 27405 ^T , <i>C. thermocellum</i> ATCC 27405 ^T - <i>pMW1</i> und - <i>pMW2</i> nach wiederholter Zugabe von Butyraldehyd oder Isobutyraldehyd	80
Abb. 41	Fermentationsprodukte bei Zugabe von Methylviologen zu Kulturen unterschiedlicher optischer Dichte	81
Abb. 42	Vergleich der mit Butyraldehyd bzw. Isobutyraldehyd ermittelten spezifischen Dehydrogenase-Aktivitäten von <i>C. acetobutylicum</i> , <i>C. saccharoperbutylicum</i> , <i>C. thermocellum</i> und der Transformante <i>C. thermocellum</i> ATCC 27405 ^T - <i>pMW1</i>	82
Abb. 43	Fermentationsprodukte von <i>C. thermocellum</i> ATCC 27405 ^T , <i>C. thermocellum</i> ATCC 27405 ^T - <i>pMW1</i> und <i>C. thermocellum</i> ATCC 27405 ^T - <i>pMW2</i> auf zwei unterschiedlichen Medien	84
Abb. 44	GC-Analyse der Fermentationsprodukte von <i>C. thermocellum</i> ATCC 27405 ^T und den Transformanten mit den Plasmiden <i>pMW1</i> und <i>pMW2</i>	85
Abb. 45	Fermentationsprodukte von <i>C. thermocellum</i> ATCC 27405 ^T und Transformanten mit den Plasmiden <i>pMW1</i> und <i>pMW2</i> auf 2% Cellulose bei 60°C bzw. 42°C	87
Abb. 46	Schematische Darstellung der hauptsächlichen Fermentationsprodukte von <i>C. thermocellum</i> und der Integration des CoA-abhängigen Butanolstoffwechsels aus solventogenen Clostridien	102

VI Tabellenverzeichnis

#	Titel	Seite
Tab.1	Gase und Gasgemische	12
Abb.2	Geräte und deren Hersteller	12
Tab.3	Enzyme und ihr Verwendungszweck	13
Tab.4	Kits sowie deren Hersteller und Verwendungszweck	13
Tab.5	Clostridienstämme sowie deren Herkunft und optimale Wachstumstemperatur	14
Tab.6	<i>E. coli</i> - Stämme und deren Eigenschaften	14
Tab.7	Plasmide sowie deren Größe, Eigenschaften und Herkunft	15
Tab.8	Oligodesoxynukleotide und deren Eigenschaften	15f
Tab.9	Verwendete Antibiotika	20
Tab.10	Einfluss verschiedener Faktoren auf den prozentualen Abbau von SC-Substrat	53
Tab.11	Überblick über die zur Transformation verwendeten Shuttle-Plasmide und deren Aufbau	63
Tab.12	Übereinstimmung/Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz in % der Proteine Crt, Bcd, EtfB, EtfA und Hbd und eines potentiellen Regulators (Rex) aus <i>C. tetanomorphum</i> GT6 und verwandten Clostridien	68
Tab.13	Butanolproduktion auf Biomasse mit Hilfe cellulolytischer Clostridien	99

VII Abkürzungsverzeichnis

ad	bis
ADP	Adenosindiphosphat
ApR	Ampicillinresistenz
AS	Aminosäure
ATCC	„American Type Culture Collection“
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CmR	Chloramphenicolresistenz
CO ₂	Kohlendioxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotid-5'-triphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EmR	Erythromycinresistenz
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
FID	Flammenionisationsdetektor
g	Gramm
GC	Gaschromatograph
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranosid
k	kilo
l	Liter
LB	Luria Broth
m	milli (10 ⁻³)
M	Molar
μ	mikro (10 ⁻⁶)
max.	maximal
min	Minute
mol	Mol (6,023 x 10 ²³ Teilchen)
n	nano (10 ⁻⁹)
NAD	β-Nicotinamidadenindinukleotid
OD	optische Dichte
ori	origin of replication (Replikationsursprung)

p	Plasmid
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
®	registered (eingetragenes Markenzeichen)
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
S	Sekunde
SAM	S-Adenosylmethionin
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Tm	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Unit (Einheit)
UpM	Umdrehung pro Minute
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	volume per volume (Volumen pro Volumen)
w/v	weight per volume (Gewicht pro Volumen)
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Schwankende Rohölpreise und ein durch neue Umwelt- und Klimaschutzbestimmungen vergrößertes Bewusstsein für die Endlichkeit fossiler Rohstoffe, hat Wissenschaftler aus verschiedensten Forschungsbereichen dazu veranlasst, nach neuen, sauberen und nachhaltigen Ressourcen für den weltweit wachsenden Energiebedarf zu suchen. Neben Wasserkraft, Solar- und Windenergie wird schon seit Jahrzehnten auch an Kraftstoffen aus regenerativen Quellen gearbeitet, um Erdöl und -gas zumindest teilweise zu ersetzen. Bereits Anfang des 20. Jahrhunderts wurde mit der biotechnologischen Herstellung von Aceton und Butanol durch Vergärung von Kartoffeln, Zuckerrohr, Getreide, Mais oder Melasse im industriellen Maßstab begonnen [Jones & Woods, 1986, Moon *et al.*, 2016]. Die dazu verwendeten Clostridienstämme wurden damals generell als *Clostridium acetobutylicum* bezeichnet, werden heute jedoch aufgrund molekulargenetischer Erkenntnisse in die Spezies *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. saccharobutylicum* und *C. saccharoperbutylacetonicum* unterteilt [Keis *et al.*, 1995, Keis *et al.*, 2001]. Während dieser sogenannte Aceton-Butanol-Ethanol- (ABE-) Prozess zumeist nach dem 2. Weltkrieg nicht mehr mit der petrochemischen Synthese mithalten konnte, wurde er in der ehemaligen Sowjetunion, Südafrika oder China noch bis weit in die 1980er Jahre betrieben [Zverlov *et al.*, 2006, Chiao & Sun, 2007].

Insbesondere das Interesse an biotechnologisch hergestellten Alkoholen für Kraftstoffe hat sich in den letzten Jahrzehnten weiter erhöht, was zu einem Anstieg der Forschungstätigkeiten in diesem Bereich führte [Moon *et al.*, 2016]. Die Schwerpunkte lagen dabei auf der Reduktion der Prozesskosten durch Verwendung kostengünstigerer Ausgangsstoffe, einer Steigerung der Lösungsmittel-Toleranz, sowie auf verfahrenstechnischen Verbesserungen wie einer optimierten Abtrennung der Produkte aus der Fermentationsbrühe oder der Verwertung entstehender Beiprodukte [zusammengefasst in: Papoutsakis, 2008, Jang *et al.*, 2012c, Moon *et al.*, 2016, Patakova *et al.*, 2018, Kolesinska *et al.*, 2019]. Daneben gab es auch zahlreiche grundlegende Forschungen, die sich mit der Sequenzierung und Regulation der beteiligten Gene, sowie der Etablierung von mikro- und molekularbiologischen Methoden für Clostridien beschäftigten [zusammengefasst in: Ezeji *et al.*, 2007b, Heap *et al.*, 2007, Papoutsakis, 2008, Lutke-Eversloh & Bahl, 2011, Jang *et al.*, 2012b, Schiel-Bengelsdorf *et al.*, 2013, Poehlein *et al.*, 2017]. So haben wir heute einen recht guten Überblick über den Ablauf der Lösungsmittelproduktion in solventogenen Clostridien, auch wenn einzelne Zusammenhänge noch nicht gänzlich geklärt werden konnten [Lee *et al.*, 2008, Gheshlaghi *et al.*, 2009b, Tracy *et al.*, 2012].

1.1 Überblick über den ABE-Stoffwechsel und die Fermentationsprodukte solventogner Clostridien

Die zur großtechnischen ABE-Fermentation verwendeten solventogenen Clostridien besitzen einen biphasischen Gärungsstoffwechsel, der am besten für *C. acetobutylicum* beschrieben ist [Hartmanis & Gatenbeck, 1984, Dürre, 2005]. Bis zum Ende des exponentiellen Wachstums (acidogene Phase) werden zuckerhaltige Substrate zur ATP Gewinnung vor allem zu Acetat und Butyrat umgesetzt, wobei Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff abgegeben werden. In der zweiten (solventogenen) Phase des Stoffwechsels werden dann - unter Wiederaufnahme der Carbonsäuren - Aceton, Butanol und Ethanol gebildet [Dürre, 2005]. Während die Produktion von Lösungsmitteln den biotechnologisch interessantesten Aspekt darstellt, ist sie für die Mikroorganismen selbst lebensnotwendig, um eine zu hohe intrazelluläre Säurekonzentration und damit das Zusammenbrechen des Protonengradienten über der Membran zu verhindern und die Endosporenbildung abzuschließen, bevor die Lösungsmittelkonzentration auf einen toxischen Wert (meist um 2 %) ansteigt [Paredes *et al.*, 2005, Al-Hinai *et al.*, 2015]. Dieses Umschalten zwischen den Stoffwechselphasen ist das Ergebnis einer deutlichen Veränderung in der Expression der beteiligten Gene [Dürre *et al.*, 2002, Grimmeler *et al.*, 2011].

Der schematische Ablauf des Butanol-Stoffwechselwegs und die daran beteiligten Enzyme sind in Abb. 1 dargestellt. Als grundlegender Schritt für den acidogenen als auch den solventogenen Stoffwechselweg, katalysiert das Enzym Thiolase (Thl) die reversible Kondensation von Acetoacetyl-CoA aus zwei Acetyl-CoA [Petersen & Bennett, 1991]. Für die Bildung von Butyryl-CoA aus Acetoacetyl-CoA unter Verbrauch von NADH sind eine β -Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase (Hbd), eine Crotonase (Crt) und eine Butyryl-CoA-Dehydrogenase (Bcd) verantwortlich, deren Gene gemeinsam mit den beiden Untereinheiten eines Elektronentransfer-Flavoproteins (EtfB und EtfA) das BSC- (*Butyryl-CoA-Synthesis*-) Operon bilden [Hartmanis & Gatenbeck, 1984, Boynton *et al.*, 1996, Gheshlaghi *et al.*, 2009a, Sommer *et al.*, 2013]. Für die beiden letzten Schritte von Butyryl-CoA zu Butanol sind die Enzyme Butyraldehyde-Dehydrogenase (Ald) und Butanol-Dehydrogenase (BdhA/B) verantwortlich [Youngleson *et al.*, 1995, Fontaine *et al.*, 2002]. In *C. acetobutylicum* können diese Reaktionen auch durch bifunktionale Aldehyd / Alkohol-Dehydrogenasen (AdhE und AdhE2) katalysiert werden. [Toth *et al.*, 1999, Dürre *et al.*, 2002]. Ein Großteil der verantwortlichen Gene für die Butanolproduktion solventogener Clostridien sind im SOL- (*solventogenesis*-) Operon (*ald* (bzw. *adhE* in *C. acetobutylicum*), *ctfA*, *ctfB*, *adc*) und im BCS-Operon (*crt*, *bcd*, *etfB*, *etfA*, *hbd*) organisiert (Abb. 2) und werden entsprechend jeweils zeitgleich exprimiert [Bennett & Rudolph, 1995, Boynton *et al.*, 1996, Toth *et al.*, 1999, Dürre *et al.*, 2002].

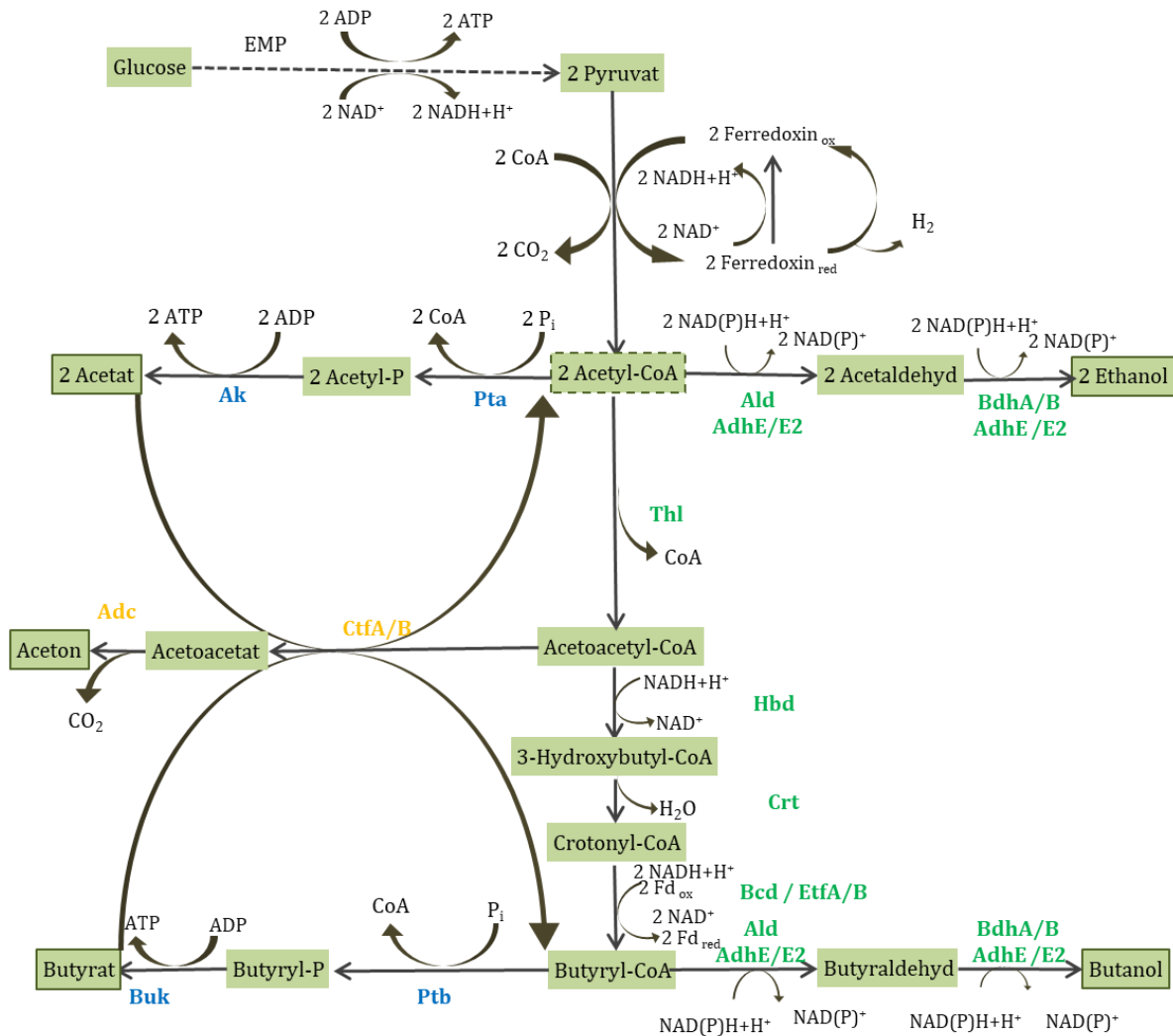


Abb. 1 : Stoffwechselwege in der ABE-Fermentation solventogener Clostridien;

Ethanol/Butanol-Stoffwechselweg (grün): Thiolase (Thl), β -Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase (Hbd), Crotonase (Crt) und Butyryl-CoA-Dehydrogenase (Bcd), die beiden Untereinheiten eines Elektronentransfer Flavoproteins (EtfA/B), Butyraldehyd-Dehydrogenase (Ald) und Butanol-Dehydrogenase (Bdh), bifunktionale Aldehyd/Alkohol-Dehydrogenasen (AdhE und AdhE2), Alkohol-Dehydrogenasen (BdhA und BdhB). Außerdem sind auch die Enzyme für die säurebildenden Stoffwechselschritte (blau) mit Phosphotransacetylase (Pta), Acetatkinase (Ak) Phosphotransbutylase (Ptb) und Butyratkinase (Buk) sowie für die Aceton-Bildung (gelb) mit Acetoacetyl-CoA-Acetat/Butyrat-CoA-Transferasen α und β (CtfA/B) und der Acetoacetyl-CoA-Decarboxylase (Adc) gezeigt.

Während es im SOL-Operon aber Variationen gibt, sind die Gene im BCS-Operon in allen bekannten, Butanol produzierenden Clostridien in derselben Reihenfolge angeordnet und in ihrer Länge und Aminosäurezusammensetzung hochkonserviert [Kosaka *et al.*, 2007, Berezina *et al.*, 2009, Poehlein *et al.*, 2017]. Die Regulation der Gene des SOL-Operons und der Alkohol-Dehydrogenasen sind relativ gut untersucht, wohingegen die Regulation des BCS-Operons noch nicht gänzlich geklärt werden konnte [Girbal & Soucaille, 1994, Thormann & Dürre, 2001, Dürre *et al.*, 2002, Ravcheev *et al.*, 2012].

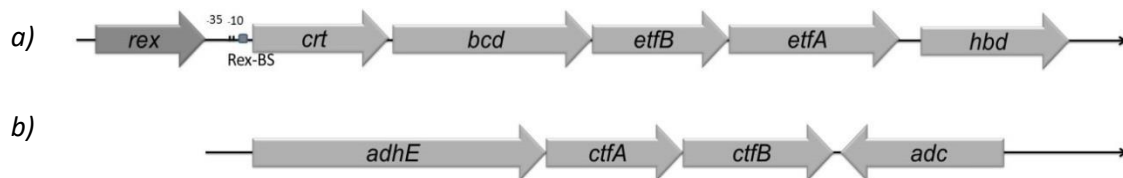


Abb. 2: Organisation des BCS- und des SOL-Operons in *C. acetobutylicum*; a) BCS-Operon: Crotonase (*crt*), Butyryl-CoA-Dehydrogenase (*bcd*), die Untereinheiten eines Elektronentransfer Flavoproteins (*etfB* und *etfA*) und β -Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase (*hbd*); davor das Gen für den putativen Repressor REX (*rex*) und dessen Bindestelle in der Promotorregion des BCS-Operons b) SOL-Operon: bifunktionale Aldehyd / Alkohol-Dehydrogenase (*adhE1*), Acetoacetyl-CoA:Acetat/Butyrat-CoA-Transferase α und β (*ctfA/B*) und Acetoacetat-Decarboxylase (*adc*).

1.2 Methoden zur genetischen Modifikation von Clostridien

Die industrielle ABE-Fermentation ergibt typischerweise bis zu 20 g/l Lösungsmittel in einem Produktverhältnis von 6:3:1 (Butanol : Aceton : Ethanol) [Jones & Woods, 1986, Schwarz *et al.*, 2007, Lee *et al.*, 2008]. Mit fortschreitenden technischen Möglichkeiten zur gezielten Manipulation clostridialer Gene, ließ sich die Menge, die Toleranz gegen Butanol und auch die Selektivität für Butanol nochmal deutlich erhöhen [Lee *et al.*, 2009, Sillers *et al.*, 2009, Lutke-Eversloh & Bahl, 2011, Cooksley *et al.*, 2012, Jang *et al.*, 2012b]. Zahlreiche Reviews dazu liefern einen Übersicht über die Fermentationsergebnisse auf verschiedenen Substraten und die dafür verwendeten Stämme [Jang *et al.*, 2012a, Schiel-Bengelsdorf *et al.*, 2013, Zheng *et al.*, 2015, Moon *et al.*, 2016]. Auch durch eine Vielzahl an verfahrenstechnischen Verbesserungen, Optimierung der Kultivierungsbedingungen und durch Abtrennung der Endprodukte können inzwischen höhere und damit auch heutzutage wirtschaftliche Lösungsmittelkonzentrationen erzielt werden [Ezeji *et al.*, 2004, 2013, Outram *et al.*, 2017, Nguyen *et al.*, 2018].

Sobald man Produktionsstämme modifizieren will, muss es dafür gut funktionierende Systeme geben, mit deren Hilfe die Organismen einfach genetisch manipuliert werden können. Bereits mit Wiederaufleben der Forschung im Bereich der ABE Fermentation um 1990 wurde erfolgreich begonnen, Elektroporationstechniken für Clostridien zu entwickeln [Minton & Outram, 1988, Lee *et al.*, 1992, Mermelstein & Papoutsakis, 1993, Nakotte *et al.*, 1998]. Aus dieser Zeit stammen auch einige Schaukelvektoren, die jeweils zwei Selektionsmarker und Replikationsursprünge tragen und so das Arbeiten sowohl in bekannten Organismen wie *E. coli* bzw. *B. subtilis* als auch in Clostridien erlaubten [Azeddoug *et al.*, 1992, Lee *et al.*, 1992, Nakotte *et al.*, 1998]. Die Erforschung von Restriktionssystemen, die Clostridien gegen das Eindringen von Fremd-DNA entwickelt haben, sowie von *in-vitro* und *in-vivo*-Methylierungsmethoden, um die Zerstörung der eingefügten DNA zu umgehen, ebneten den Weg zur weite-

ren genetischen Modifikation von Clostridien [Mermelstein & Papoutsakis, 1993, Papoutsakis, 2008, Lutke-Eversloh & Bahl, 2011, Lesiak *et al.*, 2014, Huang *et al.*, 2018]. Darüber hinaus wurden Systeme zur Geninaktivierung und zur Repression einzelner Gene über antisense-RNA entwickelt und zur Analyse der Solventogenese genutzt [Harris *et al.*, 2002, Girbal *et al.*, 2003, Tummala *et al.*, 2003a, Tummala *et al.*, 2003b]. In den letzten Jahren konnte außerdem das TargeTron-System an Clostridien angepasst (ClosTron), zu einer ganzen Reihe von intronbasierten, gezielten Geninaktivierungs-Systemen ausgebaut und an verschiedenen Clostridien erfolgreich angewandt werden [Heap *et al.*, 2007, Shao *et al.*, 2007, Heap *et al.*, 2010a, Heap *et al.*, 2010b, Cooksley *et al.*, 2012, Heap *et al.*, 2012, Jang *et al.*, 2012b, Kuehne & Minton, 2012]. Neben dem Modelorganismus *C. acetobutylicum* konnten auch für andere Clostridien zahlreiche genetische Modifikationsmethoden erarbeitet sowie geeignete Promotoren, Replikationsursprünge und Reportersysteme untersucht werden, die das Repertoire an *genetic engineering tools* für Clostridien noch erweiterten [zusammengefasst in: Pyne *et al.*, 2014, Minton *et al.*, 2016, Gyulev *et al.*, 2018, Joseph *et al.*, 2018].

Auch cellulolytische Clostridien, die weniger gut für genetische Modifikationen zugänglich sind, wie *Clostridium thermocellum* (auch: *Acetivibrio thermocellus* [Tindall, 2019]; *Hungateiclostridium thermocellum* [Zhang *et al.*, 2018]) oder *Ruminiclostridium cellulolyticum* (bisher: *Clostridium cellulolyticum*, [Zhang *et al.*, 2018]), können inzwischen erfolgreich transformiert werden [Tardif *et al.*, 2001, Guedon *et al.*, 2002a, Tyurin *et al.*, 2004, Guss *et al.*, 2012]. Darüber hinaus wurden in den letzten Jahren eine ganze Reihe der für Clostridien vorhandenen *genetic engineering tools* auch an cellulolytische oder thermophile Clostridien angepasst und erfolgreich getestet [Tripathi *et al.*, 2010, Mohr *et al.*, 2013, Cui *et al.*, 2014, Xu *et al.*, 2015, Tian *et al.*, 2016].

1.3 Alternative Substrate für die Herstellung von Bioalkoholen

Während bis vor kurzem - aus Gründen der politischen Unabhängigkeit - die fermentative Herstellung von Alkoholen aus stärke- oder zuckerhaltigen Pflanzenteilen (1. Generation der Biokraftstoffe) noch toleriert wurde, wird der Prozess inzwischen wegen der Verwendung von Lebensmitteln zur Gewinnung von Treibstoffen stark kritisiert [Gomez *et al.*, 2008]. Die damit verbundenen Probleme, wie Verknappung und Verteuerung von Grundnahrungsmitteln, könnten aber durch die Verwendung alternativer Substrate umgangen werden. In neuen Verfahren könnten regenerative Substrate Verwendung finden, die nicht in direkter oder indirekter Konkurrenz zur Nahrungsmittelherstellung stehen. Um Bioalkohole industriell aus einer solchen

gut verfügbaren, regenerativen Quelle herzustellen, werden aktuell vor allem zwei mögliche Substrate als besonders vielversprechend diskutiert. Zum einen Syn(these)gas, das sehr einfach und günstig durch die Vergasung von Erdöl, Kohle oder Biomasse herzustellen ist, aber auch als industrielles Abfallprodukt in der Stahlherstellung anfällt [Munasinghe & Khanal, 2010, Latif *et al.*, 2014, Salehi Jouzani & Taherzadeh, 2015]. Auf den darin enthaltenen Hauptbestandteilen H₂, CO und CO₂ können einige acidogene Organismen (z. B. *C. autoethanogenum* oder *C. ljungdahlii*) autotroph wachsen, das zentrale Stoffwechselintermediat Acetyl-CoA herstellen und daraus v.a. Acetat und Ethanol produzieren [Thauer, 2007, Kopke *et al.*, 2010, Tracy *et al.*, 2012, Latif *et al.*, 2014]. Entsprechende Anlagen sind bereits in Betrieb und werden von Biotechfirmen wie Coskata, IneosBio und LanzaTech betrieben [Bengelsdorf *et al.*, 2013].

Ein weiteres geeignetes Substrat für eine industrielle Produktion von Bioalkoholen in großem Maßstab ist Lignocellulose. Als Hauptbestandteil pflanzlicher Biomasse ist Cellulose für die sogenannte 2. Generation der Biokraftstoffe ein äußerst attraktives Ausgangsprodukt [Wang *et al.*, 2017, Birgen *et al.*, 2019, Kolesinska *et al.*, 2019]. Die fibrillären oder kristallinen Cellulosepolymere sind meist aus mehreren tausend β -1,4-glycosidisch verbundenen Glucose Molekülen zusammengesetzt und liegen in der Natur eingebettet in einer amorphen Hülle von Hemicellulose-Bestandteilen vor [Lynd *et al.*, 2005b, Bayer *et al.*, 2007]. Zur weiteren Stabilisierung und zum Schutz gegen Fressfeinde lagern Pflanzen in den meisten Geweben zusätzlich Lignin ein (s. Abb. 3). Mit der Verwendung dieser Lignocellulose ergeben sich jedoch für den technischen Prozess eine Vielzahl neuer Schwierigkeiten, die hauptsächlich durch den komplexen Aufbau des Substrates entstehen [Kumar *et al.*, 2008, Lynd *et al.*, 2008, Salehi Jouzani & Taherzadeh, 2015, Saggi & Dey, 2016]. Den ersten Schritt in der Produktion von Bioalkoholen aus Biomasse stellt die aufwendige Vorbehandlung des Ausgangsmaterials dar. In Abhängigkeit von dessen spezifischer Zusammensetzung werden dabei verschiedene z. T. harsche, chemische (z. B. Säure, Lauge oder Lösungsmittel), physikalische (Vermahlung, Mikrowellenbehandlung) und physikalisch-chemische Methoden (z. B. „*Steam-Explosion*“, „*AFEX*“) angewendet, um Hemicellulose- und Lignin-Bestandteile abzutrennen und die Cellulose besser zugänglich zu machen [Mosier *et al.*, 2005, Salehi Jouzani & Taherzadeh, 2015, Silva-Fernandes *et al.*, 2015, Barisik *et al.*, 2016, Kim, 2018].

Den zweiten und meist kostenintensivsten Schritt stellt die enzymatische Hydrolyse der Lignocellulose dar [Brethauer & Studer, 2015]. Um das hochkomplexe Geflecht aus Biomolekülen effektiv aufzubrechen, sind eine ganze Reihe von Cellulasen nötig, die unterschiedliche glycosidische Bindungen spalten (Endoglucanasen, Exoglucanasen und β -Glucosidasen) [Schwarz, 2001a, Lynd *et al.*, 2002a, Bayer *et al.*, 2004, Lynd *et al.*, 2005b]. Darüber hinaus

müssen Hemicellulasen sowie weitere Enzyme hinzugefügt werden, die Lignin und Pektin abbauen und die Zellwand anlösen [Brethauer & Studer, 2015]. Erst im Anschluss kann dann eine fermentative Umsetzung der nun einzeln vorliegenden, unterschiedlichen Hexosen und Pentosen beginnen, die allerdings meist nicht gleichzeitig genutzt werden können [Kim *et al.*, 2010]. Dafür werden industriell hauptsächlich Hefen verwendet, wobei es erst seit kurzem gentechnisch optimierte Stämme gibt, die auch Xylose umsetzen können [Brat *et al.*, 2009, Subtil & Boles, 2012]. Trotz aufwendiger Optimierungen bei der Gewinnung von Biotreibstoffen bleibt die Rentabilität v.a. wegen hoher Substrat- und Enzymkosten eines der Hauptprobleme eines solchen Prozesses; aber auch ein unvollständiger Abbau, der negative Einfluss der eingesetzten Reagenzien (z. B. der Schwefelsäure) und die Bildung von Fermentationshemmstoffen (z. B. Furfural, Säuren) erschweren die industrielle Produktion von Bioalkoholen aus Lignocellulose [zusammengefasst in: Parisutham *et al.*, 2014, Maiti *et al.*, 2016, Kim, 2018, Birgen *et al.*, 2019].

In der Natur erfolgt der allgegenwärtige Abbau von lignocellulosehaltiger Biomasse aerob und anaerob durch hocheffiziente cellulolytische Organismen, insbesondere Eubakterien und Pilze [Raven *et al.*, 2019]. Aber auch unter den Bakterien gibt es mit *C. thermocellum*, *Clostridium phytofermentans* und *R. cellulolyticum* einige ausgezeichnete Celluloseverwerter [Zverlov & Schwarz, 2008, Juturu & Wu, 2014]. Für den Abbau von lignocellulosehaltiger Biomasse werden eine ganze Reihe von Enzymen wie Cellulasen, Hemicellulasen, Pektinasen, Ligninasen und weitere Enzyme, die den Zugang erleichtern, benötigt [Bayer *et al.*, 2004]. Die cellulolytischen Enzyme werden aufgrund ihrer genetischen Ähnlichkeit und ihrer Funktion in drei Gruppen eingeteilt: Endoglucanasen, die die Cellulose an amorphen Regionen in kleinere Teilstücke spalten können, Exoglucanasen, die an den entstandenen Enden prozessiv Cellobiose abspalten und β -Glucosidasen, die Cellobiose in Glucose spalten können [Zhang & Zhang, 2013, Srivastava *et al.*, 2019]. Neben den echten Celluloseabbauern gibt es aber auch unter den saccharolytischen Clostridien etliche, die zwar keine Cellulose, wohl aber andere komplexe Zuckerpolymeren wie Stärke, Pektin, β -1,3-1,4-Glucan oder Xylan problemlos abbauen können [Koeck *et al.*, 2014].

Als Lösung für den vielschichtigen und komponentenreichen Aufbau pflanzlicher Biomasse besitzen echtcellulolytische Organismen sehr spezialisierte und effiziente Abbausysteme, die teilweise zu hochkomplexen, synergistisch zusammenarbeitenden Multienzymkomplexen - den Cellulosomen - zusammengefasst sind [Bayer *et al.*, 2004, Fontes & Gilbert, 2010]. Allen Cellulosomen gemeinsam ist ihr grundsätzliches Funktionsprinzip sowie ihr Aufbau aus einer ganzen Reihe miteinander kombinierter und sich gegenseitig optimal ergänzender Enzyme [Shoham *et al.*, 1999, Schwarz, 2001b]. Die Position der Cellulosomen auf der Zelloberfläche

der Bakterien, ihr modularer Aufbau und ihre direkte und spezifische Bindung an das Substrat, erlauben einen hocheffizienten Abbau und eine direkte Aufnahme der abgespaltenen Oligosaccharide [Schwarz, 2001b, Doi & Kosugi, 2004, Desvaux, 2005]. Durch die räumliche Nähe und die Vielzahl an Kombinationsmöglichkeiten von Enzymen in Abhängigkeit vom jeweiligen Substrat, kann sich das Cellulosom der jeweils abzubauenen Biomasse und den äußeren Gegebenheiten optimal anpassen und besonders effektiv arbeiten [Schwarz, 2001a, Doi & Kosugi, 2004, Raman *et al.*, 2011, Yoav *et al.*, 2017]. Dabei gibt es zum einen vergleichsweise einfache und kleinere Cellulosomen wie sie in *R. cellulolyticum* oder *C. cellulovorans* gefunden wurden, aber auch deutlich größere und komplexere [Blumer-Schuette *et al.*, 2014, Koeck *et al.*, 2014]. Das bekannteste und bereits seit den 80er Jahren erforschte System ist das Cellulosom von *C. thermocellum* - eine Art Schweizer Taschenmesser für den Cellulose-Abbau [Lamed *et al.*, 1983, Bayer & Lamed, 1986, Bayer *et al.*, 1998, Schwarz, 2001b].

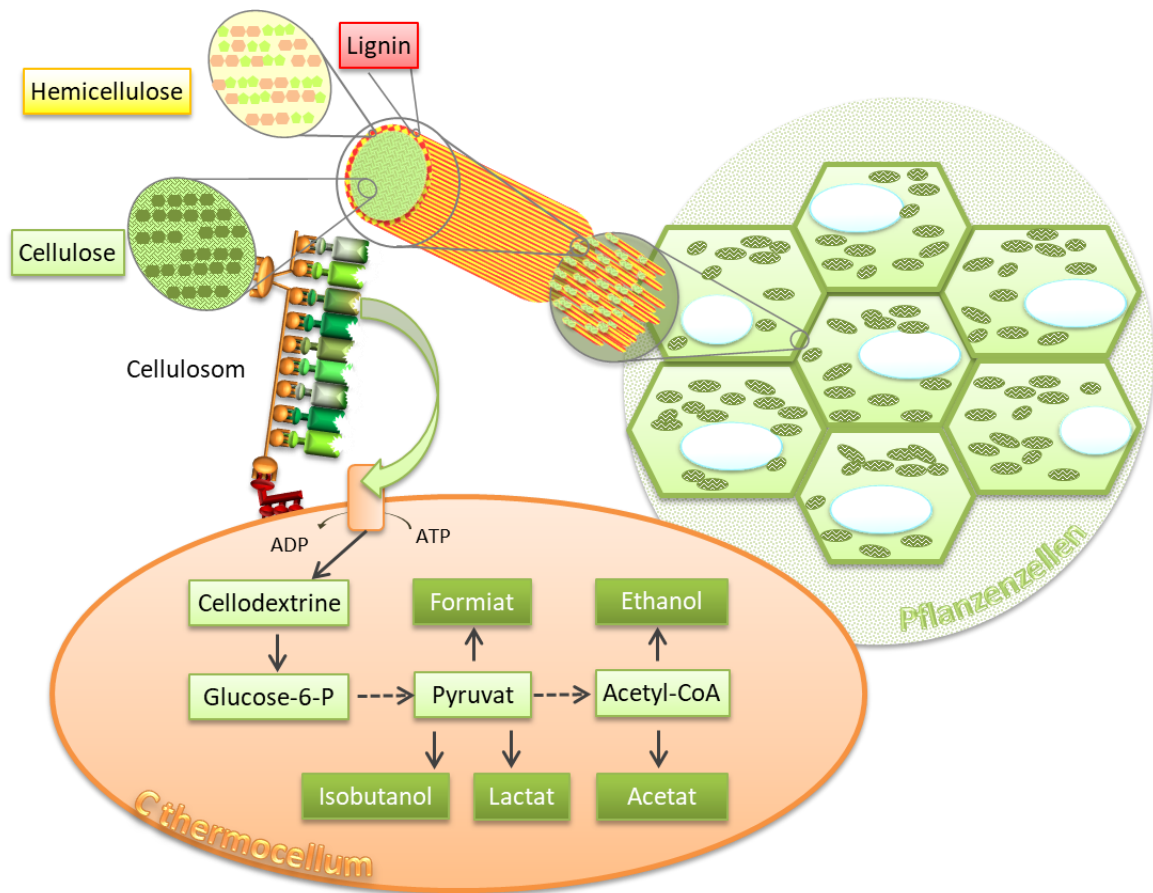


Abb. 3: Schematische Darstellung der Zusammensetzung und des Abbaus von Biomasse durch *C. thermocellum*; Zusammensetzung von Biomasse aus Cellulose, Hemicellulose (Hexosen und Pentosen) und Lignin, sowie Abbau der Cellulose mit Hilfe des zellgebundenen Cellulosoms in die hauptsächlichsten Fermentationsendprodukte.

Die Grundeinheit des Cellulosoms (vgl. Abb. 3) besteht aus einem zellgebundenen, nicht-katalytischen Scaffoldin Protein (CipA) an dem über hochspezifische Protein-Protein-Interaktionen mehrere Cohesine hängen, durch die die unterschiedlichen katalytischen Komponenten des Cellulosoms wie Cellulasen, Hemicellulasen, Pectinasen oder Glycosidasen zusammengehalten werden [Carvalho *et al.*, 2005, Zverlov *et al.*, 2005]. Das Scaffoldin besitzt außerdem noch ein weiteres Modul, das die Bakterienzellen über das Cellulosom direkt an der Oberfläche der Cellulosefasern befestigt [Gilbert, 2007]. Insbesondere diese räumliche Nähe aller Komponenten zueinander führt zu einem hocheffektiven Celluloseabbau, was durch Mutationsanalysen des verbindenden Scaffoldin-Bestandteils gezeigt werden konnten [Zverlov *et al.*, 2008]. Zusätzlich verfügt *C. thermocellum* über ein weiteres, lösliches Cellulasesystem, das das zellgebundene Cellulosom ergänzt [Berger *et al.*, 2007]. Das Cellulosom von *R. cellulolyticum* gilt als Model für die Cellulosomen mesophiler Clostridien und entspricht vom grundsätzlichen Aufbau - aus einem zentralen CipC Scaffoldin mit katalytischen Untereinheiten - dem von *C. thermocellum* [Desvaux, 2005]. Die meisten Gene für die Cellulosom-Komponenten liegen im Genom von *R. cellulolyticum* im sogenannten *cel*-Cluster gesammelt vor, während die Gene des *C. thermocellum* Cellulosoms über das Genom verstreut sind [Fendri *et al.*, 2009, Blouzard *et al.*, 2010, Raman *et al.*, 2011].

1.4 CBP Verfahren als vielversprechendes Forschungsziel

Zum Abbau von (vorbehandelter) Lignocellulose werden in technischen Prozessen gegenwärtig hauptsächlich Cellulasen aus Pilzen eingesetzt [Raven *et al.*, 2019]. Dieser Schritt der Verzuckerung ist sehr kostenintensiv und gilt gleichzeitig als schwierig zu optimieren, weil jedes Substrat eine eigene Enzymzusammenstellung benötigt. Deswegen zielt die aktuelle Forschung zur industriellen Cellulose-Verwertung in erster Linie darauf ab, Methoden für sogenanntes *consolidated bioprocessing* (CBP) zu entwickeln [Lynd *et al.*, 2005b]. Das bedeutet, eine direkte Umsetzung eines möglichst kostengünstigen, cellulosehaltigen Substrates durch einen definierten Organismus oder ein Konsortium von Organismen, die die Lignocellulose abbauen und daraus möglichst nur ein gewünschtes Endprodukt in großen Mengen produzieren können [Lynd *et al.*, 2005b, Olson *et al.*, 2012, Parisutham *et al.*, 2014]. Neben einem hocheffizienten Cellulase-System, das Biomasse zersetzen und die darin enthaltenen Hexosen und Pentosen verwerten kann, ist auch eine hohe Substrat- und Produkttoleranz, eine gute Handhabbarkeit und die Apathogenität des gewählten Stammes eine Grundvoraussetzung für eine großtechnische Nutzung. Bisher konnte allerdings kein Organismus gefunden werden, der eine Kombination all

dieser Eigenschaften schon von Natur aus vereint, sodass eine rekombinante Konstruktion über genetische Modifikationen nötig sein dürfte, um einen solchen Stamm zu entwickeln [Demain *et al.*, 2005, Lynd *et al.*, 2005b, Olson *et al.*, 2012].

Dafür gibt es prinzipiell zwei mögliche Wege: Zum einen gibt es die sogenannte „*recombinant strategy*“ bei der einem für das gewünschte Zielprodukt gut geeigneten Organismus die Fähigkeit verliehen wird, die notwendigen Cellulasen und Hemicellulasen zu sekretieren [Olson *et al.*, 2012]. Beispielsweise konnten in der Genomsequenz von *C. acetobutylicum* mehrere Gene für ein rudimentäres Cellulosom gefunden werden (Nölling *et al.*, 2001; Sabathé *et al.*, 2002). Obwohl diese Gene ausgereicht haben, um durch heterologe Überexpression in *E. coli* ein funktionales Minicellulosom zu bilden, kann *C. acetobutylicum* selbst keine kristalline Cellulose abbauen und konnte auch bisher rekombinant nicht dazu gebracht werden, es zu tun [Sabathe & Soucaille, 2003, Perret *et al.*, 2004, Mingardon *et al.*, 2005]. Ein limitierender Schritt für diese Vorgehensweise dürfte die große Zahl an Genen sein, die für die einzelnen Komponenten eines Cellulosoms nach dem Vorbild von *C. thermocellum* oder *R. cellulolyticum* nötig wären und die energetischen Kosten für deren Expression.

Zum anderen gibt es die sogenannte „*native strategy*“, bei der in einem cellulolytischen Organismus Metabolic Engineering zur Optimierung der Produktion des gewünschten Endprodukts betrieben wird [Lynd *et al.*, 2005b, Olson *et al.*, 2012]. *C. thermocellum* im thermophilen und *R. cellulolyticum* im mesophilen Temperaturbereich gelten als die am besten geeigneten Kandidaten für eine direkte Umsetzung von (Ligno)-Cellulose zu Alkoholen, weil sie vergleichsweise gut erforscht sind, zu hocheffektivem Celluloseabbau fähig sind und schon natürlicherweise Ethanol und Isobutanol produzieren können. Neben Ethanol wurde auch intensive Forschung zur biotechnologischen Herstellung von Butanol aus lignocellulosehaltiger Biomasse betrieben, das sich insbesondere als Ersatz für konventionelle Kraftstoffe hervorragend eignet [Bharathiraja *et al.*, 2017, Gottumukkala *et al.*, 2017, Wang *et al.*, 2017]. Da Butanol in seinen Eigenschaften aktuellen Kraftstoffen sehr ähnlich oder sogar überlegen ist, müssten dafür keine Veränderungen an den Motoren oder der bestehenden Infrastruktur vorgenommen werden. Darüber hinaus lässt sich Butanol in beliebiger Konzentration mit gegenwärtigen Kraftstoffen mischen oder auch unverdünnt verwenden und ist außerdem weniger hygroskopisch und korrosiv als Ethanol. [Schwarz & Gapes, 2006, Dürre, 2007, 2008, Swana *et al.*, 2011]

Da sowohl Celluloseabbau als auch fermentative Butanolherstellung von einigen Clostridien betrieben werden, ist es naheliegend, die phylogenetische Nähe zu nutzen, um diese beiden besonderen Eigenschaften von Clostridien zu kombinieren.

1.5 Zielsetzung

Das Ziel dieser Promotionsarbeit war es, eine möglichst vorbehandlungsarme Produktion von Butanol auf regenerativen Substraten wie dem hier verwendeten Weizenstroh und Nebenprodukten der Weizenmehlproduktion zu untersuchen.

Um Butanol direkt und ohne Vorbehandlung aus kristalliner Cellulose produzieren zu können, sollten die Gene aus dem CoA-abhängigen Butanol-Stoffwechselweg solventogener Clostridien rekombinant in einen geeigneten cellulolytischen Organismus exprimiert werden. Dafür sollten Organismen ausgewählt werden, die kristalline Cellulose effizient abbauen können, gut kultivierbar sind sowie einen bereits beschriebenen Energiestoffwechsel und ein gut charakterisiertes Cellulose-Abbausystem besitzen. Darüber hinaus sollten die cellulolytischen Organismen genetisch modifizierbar, apathogen und möglichst tolerant gegenüber Lösungsmitteln sein, um den Butanol-Stoffwechselweg integrieren zu können. Neben dem Abbau von kristalliner Cellulose sollte auch das vom Projektpartner Clariant (ehem. Süd-Chemie AG) zur Verfügung gestellte Weizenstroh - als ein gut verfügbares und günstiges lignocellulosehaltiges Substrat - von den ausgewählten Organismen direkt zur Produktion von Lösungsmitteln genutzt werden können. All diese Eigenschaften bieten die dafür ausgewählten cellulolytischen Clostridien *C. thermocellum* ATCC 27405^T (thermophil) und *R. cellulolyticum* DSM 5812^T (mesophil).

Ausgehend von bekannten Methoden zur genetischen Modifikation von Clostridien, sollte eine Transformationsmethodik für *C. thermocellum* ATCC 27405^T und *R. cellulolyticum* DSM 5812^T erarbeitet werden, um Gene des CoA-abhängigen Butanol-Stoffwechselwegs rekombinant zu exprimieren. Es wurde mit beiden Organismen weitergearbeitet, weil nicht bekannt war, ob die aus mesophilen Organismen stammenden Enzyme des Butanol-Stoffwechselwegs ausreichend temperaturstabil sind. Anschließend sollte untersucht werden, unter welchen Kultivierungsbedingungen die transformierten cellulolytischen Clostridien die höchsten Butanolkonzentrationen erzielen können. Neben den vom Projektpartner Prof. Dürre, Universität Ulm, stammenden Plasmiden mit den Genen des CoA-abhängigen Butanol-Stoffwechselwegs, sollten auch alternative Donorgene analysiert werden.

Darüber hinaus sollte die direkte Produktion von Butanol durch solventogene Clostridien aus der lehrstuhleigenen Stammsammlung auf zwei weiteren Nebenprodukten der Weizenmehlherstellung analysiert werden. Dabei sollte untersucht werden, unter welchen Bedingungen sich die vom Bayerischen Müllerbund zur Verfügung gestellten Substrate - Weizengrießkleie und Weizennachmehl - in möglichst hohe Lösungsmittelkonzentrationen umsetzen lassen.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Gase und Geräte

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, so nicht anders im Text angegeben, von den Firmen Sigma-Aldrich GmbH (Schnelldorf), Merk KGaA (Darmstadt), Serva Feinbiochemica GmbH & Co KG (Heidelberg), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe) oder AppliChem GmbH (Darmstadt) in p.a.-Qualität oder hochwertiger bezogen. Gase und Gasgemische wurden von Air Liquide (Gröbenzell) bezogen und sind Tab. 1 zu entnehmen.

Tab. 1: Gase und Gasgemische

Gas	Zusammensetzung	Verwendung
Formiergas	95 % Stickstoff 5 % Wasserstoff	Anaerobenkammer
Stickstoff		Anaerobes Arbeiten, Trägergas GC Gaschromatograph
Synthetische Luft	79 % Stickstoff 21 % Sauerstoff	FID Gaschromatograph
Wasserstoff		FID Gaschromatograph

Tab. 2: Geräte und deren Hersteller

Gerät	Hersteller
Alpha Imager Mini	Biozym, Hess. Oldendorf
Anaerobenkammer	Töpffer lab systems, Göppingen
Digital-pH-Meter	Knick
Elektroporationsgerät Gene-Pulser	Biorad,
Elektroporationsküvetten (2 mm)	Peqlab Biotechnologie GmbH; Erlangen
2010 Gaschromatograph	SHIMADZU
Gel-Dokumentationssystem	Cybertech
Mikroskop	Carl Zeiss AG; Oberkochen
Nano Drop Spectrophotometer ND-1000	peQlab
Photometer	“Ultrospec® 2100 pro“ oder 3000“
pH-Elektrode SenTix21	ATW
Phasenkontrastmikroskop	Zeiss, Göttingen
Präzisionswaage 125 ASCS	Precisa
UV-Visible spectrophotometer	LKB Biochrom
Zentrifuge Rotina 35R	Hettich
Zentrifuge Heraeus Biofuge pico	Heraeus Holding GmbH, Hanau

2.2 Enzyme

Tab. 3: Enzyme und ihr Verwendungszweck

Enzym	Lieferant	Verwendung	Stock
Lysozym	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf	Zelllyse	50 mg/ml
T4-Ligase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot	DNA-Ligation	
Restriktionsenzyme	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot; NEB, Frankfurt am Main	Restriktion von DNA	
Protease K	Applichem, Darmstadt	Verdau von Proteinen	10 mg/ml
RNase A	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot	Verdau von RNA	
Fast-AP			
Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot	Dephosphorylierung	
Phusion Polymerase	Finnzymes, Finnland		
Herculase II Fusion DNA Polymerase	Agilent Technologies	PCR	

2.3 Molekularbiologische Hilfsmittel (Kit's)

Tab. 4: Kits sowie deren Hersteller und Verwendungszweck

„Kit“	Hersteller	Verwendungszweck
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega GmbH, Mannheim	Reinigung von DNA
Qiagen	QIAGEN GmbH, Hilden	Reinigung von DNA
SV Wizard® Plus	Promega GmbH, Mannheim	Isolation von Plasmid-DNA
Qiagen-Midi-Prep Kit	QIAGEN GmbH, Hilden	Isolation von Plasmid-DNA
AxyPrep™ Plasmid Mini-prep Kit	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	

2.4 Bakterienstämme

Tab. 5: Clostridienstämme sowie deren Herkunft und optimale Wachstumstemperatur

Spezies	Stamm	Herkunft	Optimal Temp.
<i>Clostridium thermocellum</i> (auch: <i>Acetivibrio thermocellus</i> ¹ , <i>Hungateiclostridium thermocellum</i> ²)	ATCC 27405 ^T	DSMZ	60°C
	F7 (VKMB 2203)	VKMB	
	DSM 4150	DSMZ	
	DSM 2310	DSMZ	
	DSM 7150	DSMZ	
<i>Ruminiclostridium cellulolyticum</i> (bisher: <i>Clostridium cellulolyticum</i> ¹)	DSM 5812 ^T	DSMZ	34°C
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	DSM 824 ^T		37°C
<i>Clostridium tetanomorphum</i>	DSM 4474 ^T	DSMZ	34°C
	DSM 528	DSMZ	
	DSM 665	DSMZ	
	GT6	Eigenes Isolat	
<i>Clostridium pasteurianum</i>	DSM 525 ^T	DSMZ	37°C

¹[Tindall, 2019] ² [Zhang *et al.*, 2018]

Tab. 6: *E. coli* Stämme und deren Eigenschaften

Stamm	Herkunft	Genotyp
<i>BL21</i>		<i>F- ompT gal dcm lon hsdSB (rB-mB-)</i>
<i>DH5α</i>	Hanahan, 1983	<i>F - φ80dlaclqZ_M15 _(lacZYA-argF) U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rK-, mK+) phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1</i>
<i>Top10</i>	Invitrogen	<i>HSDR, mcrA, lacZM15, endA1, recA1</i>
<i>XL1-Blue</i>	Stratagene	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac,</i>

2.5 Plasmide

Tab. 7: Verwendete Plasmide, sowie deren Größe, Eigenschaften und Herkunft

Name:	Größe (kb):	Eigenschaften:	Herkunft:
<i>pIMP1</i>	4,7	Em ^R , Apr, pMB1 oriR, pIM13 oriR(+)	[Mermelstein <i>et al.</i> , 1992]
<i>pIMP-thl-ter</i>	9,7	<i>pIMP1</i> , <i>thl</i> (Cac), <i>crt</i> (Cac), <i>ter</i> (Tde), <i>hbd</i> (Cac)	diese Arbeit
<i>pIMP1-thl-ter_{mut}</i>	9,7	<i>pIMP1</i> , <i>thl</i> (Cac), <i>crt</i> (Cac), <i>ter_{mut}</i> (Tde), <i>hbd</i> (Cac)	diese Arbeit
<i>pHYC-BCS-thl</i>	11,8	Amp ^R Cm ^R <i>crt</i> , <i>bcd</i> , <i>etfB</i> , <i>etfA</i> , <i>hbd</i> , <i>thl</i>	[Berezina <i>et al.</i> , 2010]
<i>pHYC-BCS-thl</i>	11,8	Amp ^R Cm ^R <i>crt</i> , <i>bcd</i> , <i>etfB</i> , <i>etfA</i> , <i>hbd</i> , <i>thl</i>	[Berezina <i>et al.</i> , 2010]
<i>pHYC-BCS-thl-adhE1/2</i>	14,8	Amp ^R Cm ^R <i>crt</i> , <i>bcd</i> , <i>etfB</i> , <i>etfA</i> , <i>hbd</i> , <i>thl</i> , P _{<i>ptb</i>} <i>adhE</i> ,	diese Arbeit
<i>pSB3C5-UUMKS1</i>	12,6	pSB3C5, P _{<i>ptb</i>} , <i>crt</i> , <i>bcd</i> , <i>etfB</i> , <i>etfA</i> , <i>hbd</i> , P _{<i>ptb</i>} , <i>thlA</i> , <i>catP</i> , P _{<i>ptb</i>} , <i>ald</i> , <i>bdhB</i> , Cm ^R	ATG:biosynthetics GmbH, Freiburg
<i>pSB3C5-UUMKS2</i>	12,5	pSB3C5, P _{<i>ptb</i>} , <i>crt</i> , <i>bcd</i> , <i>etfB</i> , <i>etfA</i> , <i>hbd</i> , P _{<i>ptb</i>} , <i>thlA</i> , <i>catP</i> , P _{<i>ptb</i>} <i>adhE</i> , Cm ^R	ATG:biosynthetics GmbH, Freiburg
<i>pMW1</i>	14,6	pSB3C5-UUMKS1, <i>ori repL</i> , Em ^R	[Wensche, 2013]
<i>pMW2</i>	14,5	pSB3C5-UUMKS2 <i>ori repL</i> , Em ^R	[Wensche, 2013]

C. acetobutylicum (Cac); *T. denticola* (Tde)

2.6 Oligodesoxynukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligodesoxynukleotide wurden von der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg) synthetisiert und sind in Tab. 8 aufgelistet. Angegeben sind Name, Sequenz, errechneter Schmelzpunkt für die v.a. verwendete Phusion Polymerase (Finnzymes), sowie bei einigen Oligonukleotiden eingefügte Schnittstellen, die in der jeweiligen Sequenz durch Fettdruck hervorgehoben sind.

Tab. 8: Oligodesoxynukleotide und deren Eigenschaften

Name:	Sequenz 5`-3`	Tm (NN)
161V (16s)	AGAGTTTGATYMTGGCTC	52°C
630R (16s)	CAKAAAGGAGGTGATCC	52°C
Pptb- <i>adhE</i> - Sall -for	CTCGAG T CGACCATTCTCCCG	58°C
Pptb- <i>adhE</i> - Sall -rev	GTTACCG T CGACTCTACAATTTTATAAG	55°C
Pptb- <i>ald</i> - <i>bdhB</i> - Sall -for	GAG G T C GACGGTTAGAAGAATATTTAGC	58°C

Pptb-ald-bdhB- Sall -rev	CCCTAAAG TCGACA ATTTTATAAGAAAG	55°C
adhE- Sall -for	GTAAAG TCGACG TTTACATTTAGCAG	56°C
adhE- Sall -rev	TATT TCGACT TCATTTTAATCCCTC	54°C
adhE2- Sall -for	CATAG TCGACT TTTTGCTATAGG	54°C
adhE2- Sall -rev	CAGAG TCGACCA AGCAACCAC	56°C
pIMP1-4642-for	GACCTCCAATAACACCAC	50°C
pIMP1-211-rev	GCACAGATGCGTAAGGAG	51°C
rex-for	GATGTGGATAGGATTTTCATCCA	50°C
crt-prom-rev	CCTGCTCCAGTAAGTACAAC	50°C
crt-3-for	GAAGGTATGGCAGCATTTGTTG	53°C
bcd-3-for	GAGCATCATCAACAACAGAAC	50°C
etfA-rev (rc)	GTAGACATTTGTGGTCTATGTTC	50°C
hbd-rev (rc)	CAAAACCTGGAGCTTCTGC	52°C
etfB1-for	GGAAGACAGGCTATAGATGGAG	53°C
etfA2-for	GATTGTACATCACTTGACATAGAAG	52°C
hbd2-rev (rc)	CATCCATTATAGCAAGGCATAC	51°C
crt1	ATGGAAYTARAMAATGTNATYCTTG	45-47°C
crt2	TATGKCWTGTGAYATAAGAATACG	51°C
bcd1	TTAGCATCTCTCATCATTCTTTC	51°C
bcd2	ATACCAATTCTCCTCCATCAAG	52°C
2St-crt-rev (rc)	CCTGCTCCAGTAAGTACAACCTGC	56°C
2St-crt-seq-rev (rc)	GCTAAAGTATCAACTACTATATC	46°C
2St-hbd-for	GCAGAAGGAATAGCTTCAGCAG	57°C
2St-hbd-seq-for	GATAAGGCTATGATGCTTGG	50°C
BCS-U-for:	GCCATCCTGCTCTTACATACTTC	63°C
BCS-U-rev: (rc)	CTGAGCCGATTTCAAAGATATTATC	63°C
Dehyd-U-for:	GAATATTCAGCAATTTGCCCGTG	68°C
Dehyd-U-rev: (rc)	GAAGTATGTAAGAGCAGGATGGC	63°C
BCS-O-for:	CTTAGCCGAGATTAGTACGGTAATG	56°C
BCS-O-rev:	GCCATCCTGCTCTTACATACTTC	63°C
Dehyd-O-for:	GTATCCGCTCATGAGACAATAACC	55°C
Dehyd-O-rev (rc)	CATTACCGTACTAATCTCGGCTAAG	56°C
Rex- BamHI -for	CAAG GATCCT GAGTATACCAAC	53°C
Rex- BamHI -rev (rc)	TT GGATCC CATTACCGTACTAATC	53°C
hbd Ox for:	GAGACATCTATAGCAATAGG	46°C
thl Ox rev (rc):	GTTGGACAGTTGATGAATTAG	47°C
crt-hbd- Sall for	GTAG TCGAC CTGGTAAAAGTAAAG	64°C
crt-hbd Sall rev	GCAG TCGACT CAGTCAATCCATAAG	67°C
hbd-pAM- Sall -rev	GAAG TCGACT TGATTCATACAGATGATG	66°C
pAM-crt- Sall -for	CAAG TCGACT TCTTCTGTGCATCAAGG	69°C
Tercel- Sall -for	GAAG TCGACG GAGGATTTTATGATAG	67°C
Tercel- Sall -rev	GCT TCGACA ATATCTTAATAAAGACC	68°C

2.7 Zellanzucht

2.7.1 Herstellung von Nährmedien

Zur Herstellung von Flüssigmedien wurden die jeweiligen Chemikalien eingewogen und in destilliertem Wasser gelöst. Anschließend wurden der pH-Wert und das Endvolumen eingestellt. Anaerobe Medien wurden zusätzlich noch mit dem pH- und Redox-Indikator Resazurin (Sigma) versetzt, um den Sauerstoffgehalt im Medium zu überprüfen. Das Medium wurde anschließend in der Schleuse der Anaerobenkammer entgast, eingeschleust und luftdicht mit Butylgummistöpsel und Alukappen verschlossen. Alle Medien wurden bei 121 °C und 1,2 bar für mind. 20 min autoklaviert. Um chemische Reaktionen einzelner Komponenten untereinander zu verhindern bzw. hitzelabile Komponenten zu schützen, wurden bestimmte Medienbestandteile separat autoklaviert oder mit 0,2 oder 0,4 µm Filtern sterilfiltriert und dem Medium erst unmittelbar vor Gebrauch zugesetzt. Für die Herstellung von festen Medien wurde zusätzlich vor dem Autoklavieren 1,8 % (w/v) Agar zugegeben. Direkt nach dem Autoklavieren wurden diese dann in Petrischalen gegossen. Bei der Herstellung von festen, anaeroben Medien erfolgte dieser Schritt unter Sauerstoffabschluss in der Anaerobenkammer. Eventuell verwendete Antibiotika (s. 2.7.2.2) wurden den jeweiligen Nährlösungen steril nach dem Autoklavieren und abkühlen auf 50-60°C zugegeben. Nach dem Gießen wurden die Platten kurze Zeit trocknen gelassen und bei 4°C gelagert; anaeroben Agarplatten wurden kurzzeitig direkt in der Anaerobenkammer aufbewahrt. Versuche mit *E. coli* wurden entweder in den Komplexmedien LB, SOB oder SOC durchgeführt, während für Clostridien die Komplexmedien GS2, CGM und RCM sowie das Minimalmedium MJ-Medium verwendet wurde.

SOB- und SOC-Medium

SOB-Medium [Sambrook und Russell, 2001], pH 7,0

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

Die Magnesiumsalze wurden getrennt hergestellt (je 1 M) und sterilfiltriert.

Zur Herstellung von SOC-Medium wurden dem bereits fertigen SOB-Medium 20 mM sterilfiltrierte Glucose (1M) zugegeben.

Luria Bertani (LB)-Medium

Herstellung von LB-Medium [Sambrook und Russell, 2001], pH 7,0

Zusammensetzung	Menge	Konzentration
Trypton	10 g	1 % (w/v)
Hefeextrakt	5 g	0,5 % (w/v)
Natriumchlorid	10 g	172 mM
H ₂ O	<i>ad</i> 1000 ml	

GS2-Medium

GS2-Medium [Johnson *et al.*, 1981], pH 7,0

Zusammensetzung	Menge	Konzentration
Kaliumdihydrogenphosphat	1,5 g	11mM
<i>di</i> -Kaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	2,9 g	17 mM
Harnstoff	2,1 g	35 mM
Cystein	1,0 g	8 mM
MOPS	10 g	48 mM
Hefe-Extrakt	6,0 g	0,6 %
Na-Citrat	2,9 g	11 mM
Resazurin	2 mg	0,0002 %
Cellobiose	5 g	0,5 %
Salzlösung	10 ml (100x)	1 x
dH ₂ O	<i>ad</i> 1000ml	

Cellobiose und Salzlösung (s. u.) wurden separat hergestellt und sterilfiltriert. Die Zugabe zum übrigen Medium erfolgte kurz vor Gebrauch.

Salzlösung (100x) für GS2 und MJ-Medium:

Zusammensetzung	Menge	Konzentration
Magnesiumchlorid Hexahydrat	10 g	49 mM
Calciumchlorid Dihydrat	1,5 g	10 mM
Eisen(II)sulfat Heptahydrat	12,5 mg	450 µM
dH ₂ O	<i>ad</i> 100ml	

MJ-Medium (Minimalmedium) [Johnson *et al.*, 1981]

Die Herstellung erfolgte wie für GS2-Medium mit dem Unterschied, dass kein Hefeextrakt verwendet wurde. Um die Bakterien mit Vitaminen zu versorgen, wurde dem Medium neben der Salzlösung noch 0,1 ml/l Vitaminlösung zugegeben.

Zusammensetzung Vitaminlösung	Menge
Pyridoxin Hydrochlorid (Vitamin B ₆)	0,2 g
Biotin (Vitamin H)	0,02 g
<i>p</i> -Aminobenzoesäure (Vitamin B ₁₀)	0,04 g
Cyanocobalamin (Vitamin B ₁₂)	0,02 g
dH ₂ O	<i>ad</i> 10ml

Grundmedium (GM) (für solventogene Clostridien)

Herstellung von Grundmedium, pH 6,8

Zusammensetzung	Menge	Konzentration
Hefe-Extrakt	5,0 g	0,5 %
Eisen(II)sulfat Heptahydrat	25 mg	90 µM
Ammoniumacetat	5,0 g	65 mM
dH ₂ O	<i>ad</i> 1000ml	

Reinforced Clostridial Medium (RCM)

Herstellung von RCM, pH 6,8

Zusammensetzung	Menge	Konzentration
Pepton	10 g	1 %
Hefe-Extrakt	3 g	0,3 %
Fleisch-Extrakt	10 g	1 %
Stärke	1 g	0,1 %
D-(+)-Glucose	5 g	0,5 %
NaCl	5 g	86 mM
Natriumacetat Trihydrat	3 g	22 mM
Resazurin	1mg	0,0001 %
Cystein	0,5 g	4 mM
H ₂ O	<i>ad</i> 1000 ml	

50 %ige Glucose-Lösung wurde getrennt hergestellt und warm sterilfiltriert. Die Zugabe zum übrigen Medium erfolgte kurz vor Gebrauch.

2.7.2 Medienzusätze

2.7.2.1 Reduktionsmittel

In dieser Arbeit wurde als Reduktionsmittel Cystein-HCl (1-2 g/l, Sigma) verwendet, das den Medien vor dem Autoklavieren zugesetzt wurde.

2.7.2.2 Antibiotika

Sämtliche verwendeten Antibiotika (Tab. 9) wurden als konzentrierte Stammlösungen ange-
setzt und den Medien kurz vor Gebrauch zugegeben. Alle Lösungen wurden aliquotiert und bei
-20 °C aufbewahrt. Für Clostridien wurde Clarithromycin anstelle von Erythromycin eingesetzt,
weil es hitzeresistenter und säurestabiler ist, was insbesondere für *C. thermocellum* notwendig
ist. Statt Chloramphenicol wurde für Clostridien Thiamphenicol benutzt, weil manche Clostri-
dien dazu in der Lage sind, die Aryl-Nitrogruppe von Chloramphenicol zu reduzieren, was zu
einem Wirkungsverlust des Antibiotikums führt.

Tab. 9: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung [mg/ml]	Konz. [$\mu\text{g/ml}$]	Verwendung
Ampicillin	100 mg/ml in H ₂ O	100	<i>E. coli</i>
Chloramphenicol	15 mg/ml in 96 % (v/v) Ethanol	15	<i>E. coli</i>
Tetracyclin	10 mg/ml in 70 % (v/v) Ethanol	10	<i>E. coli</i>
Erythromycin	25 mg/ml in 50 % (v/v) Ethanol	5	Clostridien
Clarithromycin	4 mg/ml in H ₂ O* oder 96 % (v/v) Ethanol	4	Clostridien
Thiamphenicol	50 mg/ml in DMF	10	Clostridien

*Bei der Herstellung wurde Clarithromycin in mit HCl angesäuertem Wasser (pH 2) gelöst und an-
schließend mit NaOH auf etwa pH 6,5 neutralisiert;

2.7.3 Anzuchtbedingungen und Stammhaltung

Die Anzucht von *E. coli* und der unterschiedlichen Clostridienstämmen erfolgte, so nicht anders
angegeben, bei Standardbedingungen (s. Tab. 5). Aerobes Wachstum erfolgte bis zu einem
Volumen von 5 ml in Reagenzgläsern und bei größeren Volumina in Erlenmeyerkolben auf ei-
nem Inkubationsschüttler bei 120-200 rpm bzw. auf Agarplatten im Brutschrank. Zur Herstel-
lung von *E. coli*-Stammkulturen wurden 0,8 ml Zellsuspension einer üN in LB-Medium (wenn
nötig unter selektiven Bedingungen) gewachsenen Kultur mit Glycerin (20 %, v/v) versetzt und
in 2 ml-Schraubdeckelreaktionsgefäßen bei -70 °C gelagert.

Anaerobes Wachstum wurde bis zu einem Volumen von 10 ml in Rollrandfläschchen (Brenn-
stein Laborbedarf, Markt Schwaben) mit Butyl-Gummistopfen (Ochs GmbH, Bovenden) und
Alukappen (Brennstein Laborbedarf, Markt Schwaben) und bei größeren Volumina in Kulturfla-
schen (Müller+Krempel AG, Bülach) mit Naturgummistopfen (Maag Technic GmbH, Göppin-
gen) und Edelstahldeckeln mit Schraubverschluss im Brutschrank durchgeführt. Wachstum auf
Agarplatten fand unter Stickstoffatmosphäre im Anaerobentopf (Oxoid) unter Zugabe einer
Tüte AnaeroGen Compact (Oxoid) statt.

Für viele Clostridien kann die Stammhaltung gut durch Sporenpräparation erfolgen. Dafür wurden 50 ml einer gut gewachsenen und sporulierenden (unter Phasenkontrast im Mikroskop erkennbar) Kultur bei 4°C und 5000 rpm abzentrifugiert, das Pellet zweimal in sterilem MilliQ gewaschen und anschließend in 5 ml MilliQ gelöst. Die Lagerung erfolgte dann ohne Sauerstoffabschluss bei 4°C. Für die Anzucht von Kulturen aus einer Sporenpräparation wurden davon ca. 100 µl für 10 min bei 80 °C pasteurisiert und 10 ml Medium damit beimpft und anschließend kultiviert.

2.7.4 Bestimmung von Wachstums und Stoffwechselfparametern

2.7.4.1 Messung der Optischen Dichte

Der Verlauf des Bakterienwachstums wurde anhand der Zunahme der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm verfolgt. Die Messung erfolgte mit einem Spektralphotometer in einer 1 ml-Küvette (Schichtdicke 1 cm) mit entsprechendem Medium als Referenzwert. Ab einer OD₆₀₀ von 0,7 wurden die Kulturen vor der Messung mit Medium verdünnt.

2.7.4.2 Messung des externen pH-Wertes

Zur Bestimmung des externen pH-Wertes von *Clostridium*-Kulturen erfolgte die Messung bei RT in 2 ml abzentrifugiertem (5 min bei 13.000 rpm) Kulturüberstand.

2.7.4.3 Gaschromatographische Analyse von Produkten

Zur quantitativen Analyse des Produktspektrums der Bakterienkulturen wurden jeweils 2 ml Proben entnommen. Die Proben wurden abzentrifugiert (13.000 rpm, 20 min) und der Kulturüberstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, um eine Verschmutzung der Säule zu verhindern. Falls die Messung nicht sofort stattfand, wurden die Proben abzentrifugiert, kurzfristig bei -20 °C gelagert und nach dem Auftauen erneut zentrifugiert, um eine Verschmutzung der Säule zu vermeiden.

Folgende Bedingungen wurden zur Analyse in einem Shimadzu GC-2010 Gas-chromatograph gewählt:

Parameter	Bedingungen
Säule	Glas, gepackt, ID 2 mm
Säulenmaterial	StabilWax-DA Säule, Länge: 65 m, 0,32 mm Innendurchmesser, 0,5 µm df
Injektortemperatur	195 °C
Detektor	FID, 230 °C
Trägergas	N ₂ (15 ml/min)

FID-Gase	H ₂ (30 ml/min) Synthetische Luft (250 ml/min) „Make-Up“-Gas: N ₂ (15 ml/min)
Temperaturprofil	50–80 °C mit 6 °C/min und 80 °C – 250 °C mit 25 °C/min
Injektionsvolumen	10 µl

Um eine Quantifizierung der Proben zu ermöglichen, wurden Kalibrierläufe mit bekannten Konzentrationen (0 - 0,5 % (w/v) in 11 Schritten) an Aceton, Methanol, Ethanol, n-Butanol, Isobutanol, Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure (nach der Reihenfolge ihres Auftretens) durchgeführt. Um eine aussagekräftige Auswertung zu erhalten, sollten die Konzentration der einzelnen Substanzen in den Kulturüberständen für diese Kalibrierung 0,25 % nicht überschreiten. Die Kulturüberstände wurden deshalb je nach Bedarf mit angesäuertem Wasser (pH 2) verdünnt und mit final 0,005 % 1-Propanol oder 0,02 % Isobutanol als internem Standard versetzt. Die quantitative Auswertung beruhte auf vergleichender Flächenberechnung der Kalibrierung und des internen Standards. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Analyseprogramms "CG Solution" (Shimadzu).

2.7.4.4 Dünnschichtchromatographie

Der Nachweis der Zuckerzusammensetzung in Kulturüberständen erfolgte durch Dünnschichtchromatographie. Als mobile Phase diente dabei Acetonitril (80% in Wasser (v/v)), das die Proben über eine mit Kieselgel beschichtete Aluminiumträgerplatte auftrennt.

Es wurden jeweils 1,5 µl der einzelnen Kulturüberstände und der entsprechenden Kontrolllösungen auf Dünnschichtplatten aufgetragen und zweimal mit 80 %igem Acetonitril laufen gelassen, um eine deutliche Auftrennung der einzelnen Substanzen zu gewährleisten. Zum Anfärben wurde eine Färbestammlösung aus 1 g Diphenylamin, 1ml Anilin und 100 ml Aceton 1:10 mit orthoPhosphorsäure gemischt. Die Färbelösung wurde dünn und gleichmässig auf die Dünnschichtplatten aufgesprüht und bei 120°C für ca. 15 min inkubiert. Als Kontrollen dienten 0,1 %ige Lösungen von C₁-C₆ (Glucose, Cellobi-, tri-, tetra-, penta-, hexaose), X₁ – X₅ (Xylose, tri-, tetra-, pentaose), Arabinose und Mannose.

2.8 Protein-chemische Methoden

2.8.1 Zellaufschluss aerob

Eine 50 ml ÜN-Kultur Bakterien wurde abzentrifugiert, in 1 ml MilliQ resuspendiert (5 min, 4000rpm), in ein zu $\frac{3}{4}$ mit 1 mm Durchmesser Glaskügelchen gefülltes 2 ml Schraubdeckel-Cap (Eppendorf) gegeben und für maximal 3 min am Stück im Ultraschallbad behandelt, damit sich

die Suspension nicht erwärmt. Vor einer erneuten Behandlungsrunde wurde die Suspension 3 min auf Eis gekühlt. Alternativ erfolgte ein aerober Zellaufschluss auch im Ultra-Turrax in unterschiedlichen Puffern unter ständiger Kühlung auf Eis.

2.8.2 Zellaufschluss anaerob

Die Zellen wurden mit Glaskügelchen anaerob (im Zelt) im Ultraschall-Bad aufgeschlossen. Eine 50 ml ÜN-Kultur Bakterien wurde auf Eis gekühlt, abzentrifugiert (20 min, 4400 rpm, 4°C), das Pellet mit 50 ml gekühlter 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen, erneut abzentrifugiert und in 3 ml gekühlten Resuspendierungspuffer (s. 2.8.4.1) aufgenommen. Die so entstandene Lösung wurde wie unter 2.8.1 behandelt, um die Zellen aufzuschließen. Anschließend wurden die aufgeschlossenen Zellen bei 4.400 rpm und 4°C für 20 min abzentrifugiert und der Überstand mit den freigesetzten Proteinen in ein neues Gefäß überführt.

2.8.3 Bradford-Assay

Für den Bradford Assay wurden die aufgeschlossenen Zellsuspensionen bei 13.000 rpm für 10 min und 4°C erneut abzentrifugiert. 10 µl des Überstandes wurden mit 15 µl frischen Medium und 750 µl Bradford Lösung vermischt und anschließend im Photometer bei 595 nm gemessen. Mit Hilfe einer Eichgeraden kann die Proteinkonzentration der Lösung bestimmt werden. Als Referenzwert wurden 25 µl Medium mit 750 µl Bradford Lösung verwendet. Um die Proteinmenge bestimmen zu können, wurde eine Eichgerade erstellt. Hierzu wurden mit BSA die Proteinkonzentrationen 0, 1, 5, 10, 15, 20, 30, 40 und 50 µg in je 25 µl hergestellt, mit je 750µl Bradford-Lösung versetzt und bei 595 nm gemessen. Aus deren Geradengleichung lassen sich die Proteinmengen anderer Lösungen mit dem Bradford Assay bestimmen.

2.8.4 Butanol-Dehydrogenase (BDH) Enzymassay

Die Aktivität der Butanol Dehydrogenase bzw. der bifunktionalen Aldehyd-/Alkohol-Dehydrogenase wurde sowohl in physiologischer, also der Umwandlung vom Aldehyd zum Alkohol, als auch in nicht-physiologischer Richtung untersucht.

2.8.4.1 BDH-Assay in nicht-physiologischer Richtung

Nach Aufschluss der Zellen anaerob und auf Eis (s. 2.8.2) wurde die Proteinkonzentration im Bradford-Assay (s. 2.8.3) bestimmt und je 100 µg Gesamtprotein für die Enzymassays eingesetzt. Der gesamte BDH Reaktionsansatz außer dem Substrat (Butanol) wurde zusammengeführt und für 10 min bei 37°C equilibriert.

BDH-Assay (nichtphysiologische Richtung):

Zusammensetzung	Menge
MES (pH6,0; 1mM DTT; 1mM ZnSO ₄)	985 µl - x
NAD ⁺ (100 mM)	10 µl
Zellextrakt (100 µg Protein) equilibrieren	x µl
Butanol	14,8 µl
1000 µl	

Resuspendierungspuffer:

Zusammensetzung	Menge
MES (pH 6,0)	50 mM
ZnSO ₄	1 mM
DTT	1 mM
Roche Protease	1 x

Die Reaktion wurde durch Zugabe von Butanol gestartet und die BDH-Aktivität der jeweiligen Enzyme (Butanol wird zu Butyraldehyd oxidiert, dabei wird NAD⁺ zu NADH) durch Nachweis des zusätzlichen Absorptionsmaximums von NADH bei 340 nm für mind. 10 min alle 20 sec im Photometer analysiert.

Aus der Änderung der optischen Dichte kann auf die Menge des durchschnittlich pro Minute produzierten NADH (= Steigung der Ausgleichsgeraden) geschlossen werden und dadurch die Enzymaktivität verschiedener Stämme verglichen werden. Als 1 Unit U ist die Umsetzung von 1 µmol Substrat pro Minute definiert. Da bei der von BDH katalysierten Reaktion je umgesetzten Substratmolekül auch ein Molekül NADH gebildet wird, entspricht die NADH-Konzentrationsänderung direkt der Menge umgesetzten Substrats. Als Nullprobe diente ein Ansatz ohne Protein und Substrat und als Kontrolle ein Ansatz ohne Substrat.

2.8.4.2 BDH-Assay in physiologischer Richtung

Als Substrat wurde hier Butyraldehyd eingesetzt und als Co-Substrat NADH. BDH reduziert Butyraldehyd zu Butanol unter gleichzeitiger Oxidation von NADH zu NAD⁺. Durch Rückgang von NADH während der Reaktion sinkt auch die Absorption bei 340 nm.

Der Ansatz in physiologischer Richtung wurde unter denselben Bedingungen alternativ auch noch mit Isobutyraldehyd (1M) als Substrat durchgeführt, nachdem sich gezeigt hatte, dass *C. thermocellum* ATCC 27405^T und dessen Transformanten Isobutanol produzieren können.

BDH-Assay (physiologische Richtung):

Zusammensetzung	Menge
MES (pH6,0; 1mM DTT; 1mM ZnSO ₄)	985 µl - x µl
NADH (20 mM)	5 µl
Zellextrakt (100 µg Protein) equilibrieren	x µl
Butyraldehyd (1M)	10 µl
1000 µl	

2.9 Abbauanalyse von festen Substraten

2.9.1 Fraktionierte Analyse des Substratabbaus (Van Soest Analyse)

Prinzip: Die Van-Soest-Analyse ist eine Methode zur schrittweisen Fraktionierung und Bestimmung einzelner Bestandteile einer lignocellulosehaltigen Probe [Soest, 1963]. Für die hier verwendeten Substrate kamen dabei 3 Schritte zur Anwendung. Im ersten Schritt (NDF, neutral detergent fiber) werden durch eine neutrale Detergenzienlösung mit dem Hauptbestandteil SDS alle löslichen, nicht faserigen Bestandteile der Probe abgebaut und herausgewaschen. In dem darauffolgenden ADF-Schritt (*acid detergent fiber*) werden Hemicelluloseanteile durch Kochen in schwefelsaurer Detergenzienlösung herausgelöst. Die Cellulose wird durch Behandlung mit konzentrierter Schwefelsäure (ADL, *acid detergent lignin*) aufgelöst, so dass letztendlich nur noch Lignin und unlösliche Stoffe als feste Fraktion übrigbleiben. Vor jedem Schritt werden die übrigen Feststoffe getrocknet und abgewogen, wodurch sich die einzelnen Bestandteile sowie der jeweilige Abbau der einzelnen Fraktionen bestimmen lassen.

Durchführung: Nach Kultivierung der Bakterien in Medium mit definierter Menge (meist ca. 1 g) lignocellulosehaltigen Substrates, wurden das Medium und die nicht abgebauten Substratbestandteile in abgewogene Fiber-Caps (Fibertec FiberCap 2021/2023 System, FOSS GmbH, Rellingen) aufgefangen und bei 100°C üN getrocknet. Nach Abkühlen der Proben im Exsikkator (um eine Absorption von Luftfeuchtigkeit auszuschließen), wurden die Caps gewogen und das Trockengewicht bestimmt. Anschließend erfolgten die Schritte NDF, ADF und ADL und die jeweils dazugehörige Trockenzeit und Bestimmung des Trockengewichts an drei aufeinanderfolgenden Tagen.

NDF: Als erstes erfolgte eine 15-minütige Amylase-Behandlung in 500 ml Aqua dest. mit 4 ml Thermamylenzym (Novozymes) und anschließendes Waschen des Substrates in kochendem Wasser (1:1 Leitungswasser und Aqua dest.). Um lösliche Substratbestandteile herauszulösen wurde das Substrat daraufhin in 1 l NDS-Lösung 30 min leicht sprudelnd köcheln gelassen und anschließend dreimal mit kochendem Wasser gewaschen. Nach leichtem Abtrocknen der Proben wurden sie durch mehrmaliges Eintauchen in 360 ml Aceton entfettet, das Aceton unter dem Abzug abdampfen gelassen und die Proben üN bei 100°C getrocknet.

ADF: Nach Auskühlen und Abwiegen der Proben (NDF) wurden die Caps in einem 1 l ADL Lösung für 1 h köcheln gelassen und anschließend 4 – 6-mal mit kochendem Wasser gewaschen, bis der pH des Waschwassers im neutralen Bereich lag. Durch diesen Schritt wer-

den Hemicellulose-Bestandteile aus dem Substrat herausgelöst. Die Proben wurden bei 100°C üN getrocknet.

ADL: Nach Auskühlen und Abwiegen (ADF) wurden die Proben für 3 h unter mehrmaligem Schwenken in 72 %iger Schwefelsäure behandelt, um die Cellulose-Bestandteile aus dem Substrat zu lösen. Anschließend wurden die Caps 2-mal mit Aqua dest. und danach mit kochendem Wasser gewaschen, bis der pH des Waschwassers neutral war. Nach Trocknen üN bei 100°C und Auskühlen, wurden die Proben erneut gewogen (ADL).

NDS-Lösung:

Zusammensetzung	Menge
EDTA	18,6 g
Na ₂ B ₄ O ₇	6,8 g
SDS	30 g
Triethylenglycol	10 ml
Na ₂ HPO ₄	4,6 g
H ₂ O	add. 900 ml
Na ₂ SO ₃	10,5 g

Na₂SO₃ wurde erst nach dem vollständigen Lösen der restlichen Substanzen zugeben und dann auf 1000 ml aufgefüllt

ADL:

Zusammensetzung	Menge
CTAB	20 g
H ₂ SO ₄ (1 N)	add. 1000 ml

72 %ige Schwefelsäure:

Zusammensetzung	Menge
Aqua dest.	125 ml
konz. Schwefelsäure	375 ml

dabei ist darauf zu achten, dass die Schwefelsäure zum Wasser zugegeben wird

Auswertung:

Um den anteilmäßigen Abbau der einzelnen Substratbestandteile zu bestimmen wurde für 11 unbewachsene Kontrollen eine Van Soest Analyse durchgeführt. Außerdem wurde in jedem Experiment eine zusätzliche, nicht mit Bakterien angeimpfte Kontrolle mit analysiert, um eventuell unvollständigen Abbau zu erkennen. Die Berechnung der einzelnen Substratbestandteile erfolgte durch:

Anteile	Berechnung
Gesamtabbau [%]:	$\frac{(m_{\text{Cellulose}} + m_{\text{Hemicellulose}})_{\text{nach Abbau}}}{(m_{\text{Cellulose}} + m_{\text{Hemicellulose}})_{\text{vor Abbau}}}$
Cellulose [g]:	$m_{\text{Cellulose}} = m_{\text{ADF}} - m_{\text{ADL}} \text{ [g]}$
Hemicellulose [g]:	$m_{\text{Hemicellulose}} = m_{\text{NDF}} - m_{\text{ADF}}$
Abgebaute Cellulose [%]:	$\frac{m_{\text{Cellulose; nach Abbau}}}{m_{\text{Cellulose; vor Abbau}}}$
Abgebaute Hemicellulose [%]:	$\frac{m_{\text{Hemicellulose; nach Abbau}}}{m_{\text{Hemicellulose; vor Abbau}}}$

2.9.2 Analyse reduzierender Enden in Kulturüberständen (DNSA-Test)

Mit Hilfe des DNSA-Testes [Miller, 1959] kann die Konzentration reduzierender Enden bestimmt werden, die durch die Einwirkung von glykanolytischen Enzymen auf polymere Substrate entstehen. Die daraus resultierenden Zucker reduzieren unter Einwirkung von Phenol und Natriumsulfit die Nitrogruppen der 3,5-Dinitrosalicylsäure (DNSA), wobei es zu einem Farbumschlag von gelb nach braun kommt. Dabei ist in einem bestimmten Bereich die Intensität des Farbumschlags direkt proportional zur Reduktionskraft des Ansatzes, was eine Quantifizierung erlaubt. Für den Test wurden 500 µl Kulturüberstand oder verdünnter Proteinextrakt mit 750 µl DNSA-Reagenz gemischt, um die Enzymreaktion abzustoppen. Diese Mischung wurde 15 min im Wasserbad gekocht und anschließend die Absorption bei $\lambda=575$ nm im Photometer bestimmt. Dabei ist 1 Unit definiert als die Enzymmenge, die nötig ist, um 1 µmol Glucose pro Minute umzusetzen. Die Spezifische Aktivität wurde mit Hilfe einer Kalibrierungskurve mit Glucose (0 – 500 µg) ermittelt und lässt sich wie folgt berechnen:

$$\text{Spezifische Aktivität}[U / mg] = \frac{\text{Glu}[\mu\text{g}] \times 1000}{180 \times t[\text{min}] \times V[\mu\text{l}] \times c[\text{mg} / \text{ml}]}$$

DNSA-Reagenz:

Zusammensetzung	Menge
Dinitrosalicylsäure	10 g
Natriumsulfat	0,5 g
Phenol	2 g
Kaliumnatriumtartrat Tetrahydrat	200 g
NaOH	10 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

2.10 Transfer von DNA in *E. coli*

2.10.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurde die Methode nach Inoue verwendet [Inoue *et al.*, 1990]. Dafür wurden 250 ml SOB mit 2 ml einer exponentiell wachsenden *E. coli* Vorkultur angeimpft und bei 18°C unter leichtem Schütteln in Schikanekolben bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,3 – 0,4 inkubiert (ca. 24 – 36 h). Die Zellen wurden für 10 min auf Eis abgekühlt und dann bei 5.000 rpm und 4°C für 10 min abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 80 ml eiskaltem PIPES-Puffer gewaschen und 10 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifu-

gationsschritt (5000 rpm, 10 min, 4 °C) konnte das Zellsediment in 20 ml eiskaltem PIPES-Puffer suspendiert und mit 1,4 ml DMSO (Endkonzentration 7 % (v/v)) versetzt werden. DMSO, das in höheren lokalen Konzentrationen toxisch für die Zellen ist, wurde sehr langsam unter Rühren zugegeben. Die *E. coli* Zellen wurden in Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -70 °C gelagert.

PIPES-Puffer (pH 6,5):

Zusammensetzung	Menge	Konzentration
CaCl ₂	0,882 g	15 mM
PIPES	1,2 g	10 mM
KCl	7,4 g	250 mM
dH ₂ O	ad 400ml	
MnCl ₂	4,33 g	55 mM

Der pH wurde auf 6,5 eingestellt, erst dann das Manganchlorid hinzugegeben und anschließend mit einem 0,22 µm Filter sterilfiltriert.

2.10.2 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Die Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* wurde weitgehend nach dem Protokoll von Hanahan durchgeführt [Hanahan, 1983]. Dafür wurden 200 µl chemisch kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut und mit 1-2 µl Plasmid-Präparation bzw. 5-10 µl DNA aus entsalzten Ligationsansätzen versetzt und für 10-30 min auf Eis inkubiert. Die Transformationsansätze wurden dann für 60 sec einem Hitzeschock von 42 °C unterzogen, anschließend für 2 min auf Eis gekühlt und mit 800 µl auf 37 °C vorgewärmten LB oder SOC-Mediums gemischt. Anschließend erfolgte eine Regenerationsphase zur Expression der Antibiotikaresistenz für 45-60 min bei 37 °C und 150 rpm. Aliquots dieses Ansatzes wurden auf vorgewärmten LB-Agarplatten mit entsprechenden Selektivbedingungen ausgestrichen und üN bei 37 °C bebrütet.

2.10.3 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Zellen

Zur Herstellung elektrokompetenter Zellen wurden 250 ml SOB mit 2 ml einer exponentiell wachsenden *E. coli* Vorkultur angeimpft und bei 37°C unter leichtem Schütteln in Schikanekolben bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,5-0,6 inkubiert (ca. 3 h). Die Zellen wurden anschließend für 20 min auf Eis abkühlen gelassen und dann bei 5000 rpm und 4°C für 10 min geerntet. Das Zellsediment wurde zweimal mit eiskaltem MilliQ gewaschen und anschließend jeweils 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurden zwei weitere Waschschrte in eiskaltem 10 %igem Glycerin (v/v) durchgeführt und dabei die Zellsuspension auf 0,1 Vol konzentriert. Nach erneuter Zentri-

fugation (5000 rpm, 10 min, 4 °C) wurde das Zellsediment in 1 ml eiskalten 10 %igen Glycerin resuspendiert, in 50 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C gelagert.

2.10.4 Elektroporation von *E. coli* Zellen

Für die Elektroporation wurde ein Aliquot kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut, mit bis zu 500 ng entsalzter Plasmid-DNA versetzt, gemischt und in eine sterile und vorgekühlte Elektroporationsküvette (Paqlab, 0,2 cm) überführt. Die Transformation erfolgte mit dem Gene-Pulser (Biorad) bei 2,5 kV, 25 µF und 200 Ω und den daraus resultierenden Zeitkonstanten von 4 - 5 ms. Direkt im Anschluss an den Strompuls wurden die Zellen mit 800 µl vorgewärmten SOC Medium versetzt. Das weitere Vorgehen erfolgte analog zu 2.10.2.

2.11 Transfer von DNA in Clostridien

2.11.1 Elektroporation von *C. thermocellum* ATCC 27405^T

Zur Herstellung elektrokompetenter *C. thermocellum* ATCC 27405^T Zellen wurde eine Vorkultur aus einer pasteurisierten Sporensuspension in GS2 mit 0,5 % Cellobiose angeimpft und bei 60 °C ca. 10 h anaerob kultiviert. Daraus wurden 50 ml GS2 1:50 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,2-0,3 anaerob wachsen gelassen (ca. 4 h), wobei in den beiden letzten Stunden 20 mg/ml Isoniacid (Sigma) zugegeben wurde, um die Zellwände zu schwächen. Nach Abkühlen der Kulturen auf Eis wurden alle folgenden Schritte in der Anaerobenkammer durchgeführt. Die *C. thermocellum* ATCC 27405^T Kulturen wurde bei 4 °C und 3000 rpm für 20 min abzentrifugiert, im selben Volumen eiskaltem Transformationspuffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 1/5 Vol. Transformationspuffer gewaschen, sedimentiert und in 1 ml Transformationspuffer aufgenommen.

Für die Elektroporation wurden jeweils 200 µl Zellsuspension mit 0,5-2 µg entsalzter Plasmid-DNA in vorgekühlten Elektroporationsküvetten (0,2 cm) gemischt und 5-10 min auf Eis inkubiert. Zur Erzeugung des Strompulses wurde ein Biorad Gene Pulser verwendet, wobei sich für *C. thermocellum* eine Kapazität von 25 µF, ein Widerstand von 1000 Ω und eine Spannung von 1,8 kV als am besten geeignet erwiesen hatten. Das ergab Zeitkonstanten im Bereich von 3-5 ms. Direkt nach dem Puls wurde den Zellen 500 µl gekühltes Medium zugegeben, der gesamte Ansatz in 5 ml gekühltes GS2-Medium überführt und 3 Stunden bei 55°C zur Regeneration anaerob inkubiert. Nach Zugabe einer unterschwelligigen (0,5 µg/ml Clarithromycin) Antibiotikakonzentration zur Expression der Resistenz, wurden die Kulturen für 5-6 weitere Stunden bei

55 °C inkubiert. Anschließend wurden je 0,5 und 1 ml der Zellsuspension auf GS2 Platten mit 4 µg/ml Clarithromycin (Kontrollen: ohne Antibiotikum) und einem Cellulose-Overlay (0,5 % MN301 (Macherey-Nagel) und 0,05 % Cellobiose in GS2 mit 9 g/l Agar und 4 µg/ml Clarithromycin) eingegossen und 5-7 Tage bei 55 °C inkubiert. Vereinzelte cellulolytisch aktive Transformanten wurden gepickt, bei 55 °C in GS2 inkubiert und weiter analysiert.

Transformations-Puffer (pH 7,0):

Zusammensetzung	Menge	Konzentration
Saccharose	36,93 g	270 mM
di-Kaliumhydrogenphosphat	0,34 g	5 mM
dH ₂ O	ad 400ml	

Der pH wurde auf 7,0 eingestellt, der Puffer sterilfiltriert und anschließend unter Vakuum in die Anaerobenkammer geschleust und dort anaerob gelagert.

2.11.2 Elektroporation von *R. cellulolyticum* DSM 5812^T

Die Herstellung kompetenter Zellen von *R. cellulolyticum* DSM 5812^T und deren Elektroporation erfolgte analog zu oben mit dem Unterschied, dass die Isoniazid-Konzentration mit 10 µg/ml deutlich geringer war und dass sämtliche Kultivierungsschritte bei 34 °C durchgeführt wurden. Für die Transformation von *R. cellulolyticum* DSM 5812^T musste außerdem die Plasmid-DNA vor der Verwendung noch einer *in vitro* Methylierung über 12 h bei 37°C mit der spezifischen MspI Methylase (NEB) unterzogen werden. Anschließend wurde das Enzym für 15 min bei 65°C inaktiviert und die DNA vor Verwendung entsalzen (s. 2.12.3.4.).

Plasmid-DNA methylieren:

Zusammensetzung	Menge
Plasmid-DNA	52,8 µl
10x Puffer	6 µl
Methylase	1 µl
S-Adenosin	0,2 µl

2.12 Molekularbiologische Methoden

2.12.1 Vorbehandlung von Geräten und Lösungen

Alle thermostabilen Lösungen, Glaswaren und andere Materialien, die für das Arbeiten mit Nukleinsäuren notwendig sind, wurden zur Inaktivierung von Nukleasen durch Autoklavieren (20 min bei 121°C) sterilisiert oder ggf. abgeflammt. Hitzelabile Substanzen wurden sterilfiltriert (Zefa Laborservice).

2.12.2 Isolation von Nukleinsäuren aus Bakterien

2.12.2.1 Isolierung genomischer DNA aus Clostridien

Für die Isolierung von Gesamt-DNA aus Clostridien wurden Kulturen in 50 ml entsprechenden Medium bis zum Ende der exponentiellen Phase anaerob kultiviert und anschließend bei 5.000 rpm und 4°C für 15 min abzentrifugiert. Das so erhaltene Pellet wurde in einem Volumen 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen, erneut abzentrifugiert, in 2,5 ml Lyse-Puffer resuspendiert und für 30 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 1/10 Volumen 10 %iger SDS-Lösung und von 1 mg/ml Proteinase K-Lösung, wurde die Suspension für 1-2 h unter leichtem Schütteln bei bis zu 55 °C inkubiert. Nach Zugabe von 1/3 Volumen 5 M NaCl-Lösung erfolgte eine Chloroformextraktion (2.12.3.1), optional ein RNase Verdau (nach Angaben des entsprechenden Herstellers) und eine Isopropanol-Fällung (2.12.3.2). Das kurz getrocknete DNA-Pellet wurde in MilliQ oder TE bei 4 °C gelöst und anschließend bei -20 °C gelagert.

Lyse-Puffer:

Zusammensetzung	Konzentration
Tris (pH 7,5)	20 mM
EDTA	25 mM
NaCl	75 mM
Lysozym	1 mg/ml

Lysozym wurde dem Puffer erst direkt vor Verwendung zugesetzt

2.12.2.2 Isolation von gesamt DNA aus Clostridien mit Hilfe der „InstaGene™“-Matrix

Zum Nachweis von Transformanten wurde z. T. Gesamt-DNA mit Hilfe der Instagene Matrix (Biorad) isoliert und als Template für PCR-Analysen verwendet. Dafür wurden 2 ml einer frischen Kultur abzentrifugiert, im selben Volumen 0,9 %iger NaCl-Lösung gewaschen und in 100 µl Lyse-Puffer (s. o.) mit 100 µg/ml RNaseA resuspendiert. Die Suspension wurde 1 h bei 37 °C inkubiert, um die Zellwand aufzuweichen. Anschließend wurden 200 µl der gut gemischten „InstaGene™“-Matrix-Lösung zugegeben, die Mischung bei 56°C für 30 min inkubiert und nach kräftigem Vortexen bei 100 °C für 8 min inkubiert. Von der so vorbereiteten DNA-Lösung wurden 2 µl als Template für PCR-Reaktionen eingesetzt.

2.12.2.3 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* Kulturen wurde entweder das SV Wizard® Plus System (Promega), der QIAquick® Miniprep Kit (Qiagen) oder der AxyPrep™ Plasmid Miniprep Kit (Serva) jeweils nach Angaben des entsprechenden Herstellers verwendet. Die jeweiligen Empfehlungen zur Isolation großer Plasmide (doppelter Waschschrift, Erwärmen des Elutionspuffers) wurden dabei nur z. T. beachtet. Für die großen Plasmide, die zur Transformation in

Clostridien verwendet wurden, konnte mit dem SV Wizard® Plus System von Promega die am höchsten konzentrierten und saubersten Präparate erhalten werden. Das Erwärmen des Elutionspuffers bei der Isolierung von Plasmid-DNA für die Transformation von Clostridien verringerte die Transformationseffizienz und wurde deswegen in diesen Fällen nicht durchgeführt.

2.12.2.4 Isolation von Plasmid-DNA aus Clostridien

Zur Isolation von Plasmid-DNA aus Clostridien Kulturen wurde ebenfalls die drei oben genannten Kits (SV Wizard® Plus System, QIAquick® Miniprep Kit oder AxyPrep™ Plasmid Miniprep Kit) jeweils nach Angaben des entsprechenden Herstellers verwendet. In allen Fällen wurde dem Resuspendierungspuffer aber Lysozym in einer Konzentration von 4 mg/ml zugesetzt und die Zellen darin 30 min inkubiert. Die besten Ergebnisse konnten auch hier mit dem Kit von Promega erhalten werden, insbesondere, wenn die Zellernte und der Lysozymverdau anaerob im Zelt durchgeführt wurde.

2.12.3 Aufreinigung und Konzentration von Nukleinsäuren

2.12.3.1 (Phenol)-Chloroform-Extraktion

Um Proteine aus DNA-Lösungen abzutrennen, wurde eine Phenol-Chloroform- oder eine Chloroform-Extraktion durchgeführt. Davor wurde durch Zugabe von 1/3 Volumen 5 M NaCl-Lösung (oder: 1/10 Volumen 3M Na-Acetatlösung, pH 5,2) die Ionenkonzentration in der Lösung erhöht, was zu einer verbesserten Denaturierung der Proteine führt. Für die Extraktion wurde ein Vol. Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol (25:24:1) bzw. Chloroform zu der DNA-Lösung gegeben und für 10 min die Proteine ausgeschüttelt. Anschließend wurde die Lösung 10 min bei RT zentrifugiert, und die wässrige DNA-haltige Phase so lange derselben Prozedur unterzogen, bis die Interphase nicht mehr durchgehend war. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und mit einer Isopropanolfällung (s. u.) aufkonzentriert.

2.12.3.2 Isopropanolfällung

Zu der wässrigen DNA-Lösung wurde 1 Vol. Isopropanol gegeben und die gefällte DNA anschließend durch Zentrifugation bei 13.000 rpm für 30 min sedimentiert. Das DNA-Pellet wurde mit kaltem (-20°C) 70 %igen Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Sediment in Wasser oder TE-Puffer aufgenommen.

2.12.3.3 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen, Restriktions- und PCR-Reaktionen

PCR-Produkte oder enzymatisch behandelte DNA wurde über ein 0,8 bis 1,5 %iges Agarosegel aufgetrennt, das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt und das gewünschte Fragment aus dem Gel

ausgeschnitten. Für Klonierungen wurde darauf geachtet, dass die Probe jeweils auf 2 Spuren aufgetragen wurde, wovon die eine belichtet und die andere ausgeschnitten wurde. Zum Aufreinen von DNA-Fragmenten wurde entweder das Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) oder der QIAquick® Gel-Extraction Kit bzw. der QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) jeweils nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.12.3.4 Aufreinigung von Plasmid-DNA über Mikrodialyse

Ligationen und Plasmid-DNA für die Transformation in Clostridien wurden mittels Mikrodialyse entsalzt, um größere Volumina bei der Elektroporation (s. S. 29) einsetzen zu können. Dabei wurde je eine Petrischale mit MilliQ gefüllt und ein Dialysefilterplättchen (0,025µM Porengröße, Millipore) mit der glänzenden Seite nach oben (!) auf die Wasseroberfläche gelegt. Darauf wurde der DNA-Ansatz getropft und für ca. 30 min bei RT inkubiert.

2.12.4 Analyse von Nukleinsäuren

2.12.4.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Nukleinsäurekonzentration von wässrigen Lösungen wurde meist photometrisch durch Absorption bei 260 nm im Nano-Drop bestimmt. Dabei können durch den Quotienten der Absorption bei 260 nm und 280 nm auch Aussagen über die Reinheit der DNA (1,8-2) oder der RNA (2-2,2) getroffen werden.

2.12.4.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Je nach Fragmentgröße wurde für die elektrophoretische Auftrennung von isolierten oder amplifizierten DNA-Fragmenten eine Agarosekonzentration zwischen 0,8 % und 2 % in 1 x TAE gewählt. Als Marker diente je nach Fragmentgröße meist der „GeneRuler™ DNA LadderMix“, die GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder bzw. die GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (MBI Fermentas). Zur Auftrennung der Proben, die zuvor 1:6 mit Loading Dye Solution (10mM Tris-HCl, pH7,6; 0,03 % Bromphenolblau, 0,03 % Xylene Cyanol FF, 60 % Glycerin und 60mM EDTA; MBI Fermentas) versetzt worden sind, wurde eine konstante Spannung von ca. 120 V angelegt und das Agarosegel (Biozym) ca. 45 min in 1 x TAE laufen gelassen. Anschließend wurde das Gel 10 min im Ethidiumbromidbad (0,01 mg/ml) gefärbt, in Wasser entfärbt und in einer Gel-Dokumentationsanlage (Alpha Imager Mini) das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht.

50x-TAE-Puffer (pH 8,5):

Zusammensetzung	Menge	Konzentration
EDTA (0,5 M)	100 ml	50 mM
Tris	242 g	2 M
Eisessig	57 ml	1 M
dH ₂ O	<i>ad</i> 1000 ml	

2.12.4.3 Sequenzierung

Die Sequenzierung von PCR-Produkten wurde meist in linearer Form und - je nach Fragmentgröße - mit einem oder mehreren Sequenzierprimern versetzt bei der Firma MWG Eurofins, Ebersberg durchgeführt.

2.12.4.4 Analyse der DNA bzw. Protein Sequenzen

Mit Hilfe des CloneManagers (Sci-Ed, USA) und online verfügbarer Software wie ClustalW2 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/>), BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) oder KEGGb (<http://www.genome.jp/kegg/kegg2.html>), wurden die verschiedenen für den Butanol-Stoffwechselweg zur Verfügung stehenden Wege und deren Sequenzen verglichen.

2.12.5 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren**2.12.5.1 Restriktionsspaltung von Nukleinsäuren**

Die sequenzspezifische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen zu präparativen oder analytischen Zwecken erfolgte unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen und im entsprechenden Reaktionspuffer. Bei präparativen Ansätzen wurde nach dem Verdau eine Hitzeinaktivierung des Restriktionsenzym oder - bei hitzestabilen Enzymen- eine Aufreinigung des Ansatzes (s. 2.12.3.3) vorgenommen.

2.12.5.2 Dephosphorylierung

Um Vektor-DNA nach einem Restriktionsverdau an der Religation zu hindern, wurde die Phosphatgruppe am 5' Ende der gespaltenen DNA entfernt. Dafür wurde entweder die Fast-AP oder die CIAP (*calf intestine alkaline phosphatase*; beides MBI Fermentas) nach Angaben des Herstellers zur Dephosphorylierung verwendet. Im Anschluss erfolgte eine Hitzeinaktivierung und entweder eine direkte Aufreinigung des Vektors aus dem Ansatz (s. 2.12.3.3) oder eine vorhergehende Agarose-Gelelektrophorese (s. 2.12.4.2).

2.12.5.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation eines dephosphorylierten Vektors mit einem Insert erfolgte meist über Nacht bei 16°C mit der T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas) unter den angegebenen Bedingungen. Zur Berechnung der jeweils eingesetzten Mengen wurde nachfolgender Formel vorgegangen:

$$\frac{(\text{Menge Vektor in ng}) \times (\text{Größe Insert in kb}) \times (\text{molekulares Verhältnis Insert : Vektor})}{(\text{Größe Vektor in kb})}$$

Nach Hitzeinaktivierung des Ligationsansatzes für 10 min bei 65°C, wurde der entweder direkt in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert oder zuvor über Mikrodialyse entsalzen (2.12.3.4), wenn für eine Elektroporation mehr als 2 µl Ligationsansatz verwendet werden sollten.

2.12.6 PCR-Techniken

2.12.6.1 Standard-PCR

Für die Amplifikation wurde standardmäßig die Phusion DNA Polymerase wegen ihrer proof-reading Funktion verwendet. Die Oligonukleotidprimer sind in Tab. 8 aufgeführt und hatten im Durchschnitt eine Länge von 16-24 Nukleotiden. Für eine optimale Amplifikation wurde darauf geachtet, dass die Oligonukleotide eine annähernd gleiche Schmelztemperatur (berechnet nach der *Nearest Neighbor* Methode) aufweisen. Es wurden Thermocycler der Firmen MWG, Eppendorf und Jena Analytik verwendet. Unten ist der Standardreaktionsansatz in 25 µl und das entsprechende PCR Programm gezeigt.

Zusammensetzung	Menge	PCR-Protokoll		
MilliQ	15 µl	Initiale Denaturierung	98 °C	20 sec
dNTP's (je 10mM)	0,5 µl	Denaturierung	98 °C	10 sec
5xHF Puffer	5 µl	Primerannealing	X °C	20 sec 35 x
Template	2 µl	Elongation	72 °C	30 sec
Primer (10 pmol/µl)	je 1,25 µl	Finale Elongation	72 °C	10 min
Polymerase	0,25 µl			
	25 µl			

2.12.6.2 Two-Step-PCR [Pilhofer *et al.*, 2007]

Die Two-Step-PCR ermöglicht es mit Hilfe einer 2-stufigen PCR-Reaktion unbekannte flankierende Bereiche neben bekannten Sequenzen mit nur einem spezifischen Primer zu amplifizieren und anschließend zu sequenzieren. Durch die niedrige Annealing-Temperatur im zweiten Amplifikationsschritt kann der Primer sowohl spezifisch an der komplementären Sequenz als auch unspezifisch binden [Pilhofer *et al.*, 2007]. Dafür wurde ebenfalls hauptsächlich die Phu-

sion DNA Polymerase verwendet. Es wurden Thermocycler der Firmen MWG, Eppendorf und Jena Analytik verwendet. Unten ist der Standardreaktionsansatz in 50 μ l und das dementsprechende PCR Programm dargestellt.

Zusammensetzung	Menge
MilliQ	30 μ l
dNTP's (je 10mM)	1 μ l
5xHF Puffer	10 μ l
Template	4 μ l
Primer (10 pmol/ μ l)	5 μ l
Polymerase	0,5 μ l
	50 μ l

PCR-Protokoll			
Initiale Denaturierung	98 °C	20 sec	
Denaturierung	98 °C	10 sec	
Primerannealing	x °C	20 sec	30 x
Elongation	72 °C	2 min	
Denaturierung	98 °C	10 sec	
Primerannealing	38 °C	20 sec	1 x
Elongation	72 °C	1 min	
Denaturierung	98 °C	10 sec	
Primerannealing	x °C	20 sec	30 x
Elongation	72 °C	2 min	
Finale Elongation	72 °C	10 min	

3. Ergebnisse

3.1 Cellulolytische Clostridien als Empfängerorganismen für die Gene aus dem Butanol-Stoffwechselweg

Zu Projektbeginn wurde eine umfassende Literaturrecherche durchgeführt, um einen cellulolytischen Organismus zu finden, der einen effizienten (Ligno-) Celluloseabbau mit der Zugänglichkeit für genetische Modifikationen kombiniert. Ein hocheffizienter Cellulose- und Hemicelluloseabbau war insbesondere deswegen das wichtigste Kriterium für die Auswahl, weil das auf die meisten als cellulolytisch beschriebenen Mikroorganismen nicht zutrifft. Viele von ihnen besitzen zwar „Cellulasegene“, diese codieren aber meist nur für extrazelluläre Endoglucanasen, die lösliche Substrate wie Carboxymethylcellulose (CMC) oder β -Glukan zersetzen können, für die Komplexität von Lignocellulose aber bei weitem nicht ausreichen. Bereits gezeigte Zugänglichkeit für genetische Modifikationen und das Vorhandensein einer Genomsequenz grenzte die Liste auf nur wenige geeignete Bakterienstämme ein.

Als vielversprechendste Kandidaten aus dieser Recherche gingen einige *Clostridium thermocellum* Stämme (thermophil) hervor, die im Folgenden genauer auf ihre Eigenschaften und ihre Eignung als Empfänger für die Gene aus dem Butanol-Stoffwechselweg untersucht wurden. Nachdem nicht sicher war, ob der Butanolstoffwechselweg aus mesophilen solventogenen Clostridien auch bei höheren Temperaturen funktionieren kann, wurde daneben mit *Ruminiclostridium cellulolyticum* (*Clostridium cellulolyticum*) DSM 5812^T auch ein mesophiler Organismus ausgewählt.

3.1.1 *Clostridium thermocellum*

Clostridium thermocellum (Viljoen *et al.*, 1926; auch: *Acetivibrio thermocellus* [Tindall, 2019], *Hungateiclostridium thermocellum* [Zhang *et al.*, 2018]) ist ein Gram-positives, anaerobes, thermophiles, stäbchenförmiges Bodenbakterium, dessen Einzigartigkeit darin besteht, dass es mit Hilfe seines hochspezialisierten Cellulosoms kristalline Cellulose besonders schnell und effektiv zersetzen und verwerten kann [Lamed *et al.*, 1983]. Nachdem eine aktuelle Neueinordnung und die entsprechende Nomenklatur noch nicht abschließend geklärt werden konnte [Zhang *et al.*, 2018, Tindall, 2019], wird hier weiterhin die Bezeichnung *C. thermocellum* verwendet. In der Natur kommt *C. thermocellum* ubiquitär vor und kann aus den meisten Boden-

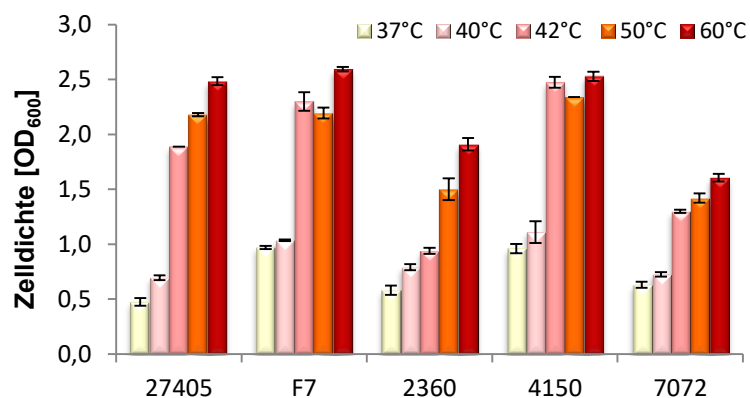
proben isoliert werden. Obwohl es bereits 1926 isoliert und charakterisiert wurde, konnten erst vor kurzem alle Stoffwechselendprodukte nachgewiesen werden [Holwerda *et al.*, 2014].

3.1.1.1 Wachstumsstudien mit *C. thermocellum*

Im Labor erfolgte die Kultivierung von *C. thermocellum* Stämmen standardmäßig bei einer Temperatur von 55 - 60°C auf 0,5 % Cellobiose oder Cellulose (meist Whatman Paper #1) in GS2-Medium (Normalbedingungen). Für weitere Versuche zur Lösungsmittelproduktion wurde neben GS2- auch GS2Y-Medium (mit doppelter Hefeextraktkonzentration) oder ein Minimalmedium (MJ) verwendet, bei dem der Hefeextrakt gegen eine Vitaminlösung ausgetauscht wurde. Auf 0,5 % Cellobiose wuchsen *C. thermocellum* Kulturen bei 60°C relativ schnell bis zu einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von ca. 1,4 an, bevor sie in die stationäre Phase übergingen. Mit steigenden Substratkonzentrationen stieg auch die erreichbare Zelldichte deutlich an (vgl. Abb. 5). Auf Cellulose konnte das Bakterienwachstum nicht photometrisch bestimmt werden, weil neben den Zellen auch freigesetzte Cellulosefasern zu einer Trübung des Mediums führten.

Nachdem die Gene für den CoA-abhängigen Butanol-Stoffwechselweg, die hier hauptsächlich verwendet werden sollten, ursprünglich aus mesophilen Organismen stammen, könnte eine rekombinante Butanolproduktion in *C. thermocellum* eventuell eine niedrigere Kultivierungstemperatur erforderlich machen. Aus diesem Grund wurde untersucht, inwieweit unterschiedliche Temperaturen das Wachstum von verschiedenen Stämmen beeinflussen (Abb. 4). Insbesondere *C. thermocellum* DSM 4150 und das russische Isolat F7 aber auch ATCC 27405^T zeigten bei verringerten Temperaturen von 50°C bzw. 42 °C nur eine geringfügige Wachstumsverminderung. Eine weitere Absenkung der Kultivierungstemperatur führte bei allen getesteten Stämmen zu einem deutlich schlechteren bzw. verlangsamten Wachstum.

Abb. 4: Temperaturabhängigkeit des Wachstums von *C. thermocellum* Stämmen: *C. thermocellum* ATCC 27405^T, F7, DSM 2360, DSM 4150 und DSM 7072 in GS2 mit 2 % Cellobiose bei 34, 37, 40, 42, 50 und 60°C, nach 48 h; n=2 ± SD.



Je nach Anforderung des entsprechenden Experiments, wurde als Inokulum eine exponentiell wachsende Vorkultur, eine Glycerinkultur oder eine hitzeaktivierte Sporensuspension verwendet. In der Praxis haben sich zum Animpfen und zur Stammhaltung von Clostridien im Kühl-

schrank gelagerte, sterile Sporensuspensionen bewahrt. Für die verschiedenen hier verwendeten *C. thermocellum*-Stämme konnte gezeigt werden, dass sie innerhalb kurzer Zeit zuverlässig Sporen ausbilden, die dann gesammelt, gewaschen und anschließend auch aerob gelagert werden konnten. Ein reproduzierbares Sporenpräparations-Protokoll (s. 2.7.3) wurde für *C. thermocellum* und *R. cellulolyticum* erarbeitet und auch an verschiedenen anderen Clostridien getestet. Die Sporen ließen sich aus diesen Präparaten sowohl in Flüssigkultur als auch durch direktes Eingießen in Agar verlässlich wieder aktivieren. Beim Animpfen aus Sporen mit anschließender Pasteurisierung bei 80°C dauert es länger, um eine wachsende Kultur zu erhalten, als beim Animpfen aus exponentiell wachsenden Kulturen; jedoch ist die Zeit bis zu einer bestimmten Zelldichte bei der Verwendung von Sporen besser vorhersagbar und die Versuche waren unter ähnlichen Voraussetzungen einfacher wiederhol- und vergleichbar.

3.1.1.2 Celluloseabbau

Der hocheffektive Celluloseabbau von *C. thermocellum* Stämmen ist einer der hauptsächlichen Gründe für dessen besondere Eignung in einer direkten Umsetzung von pflanzlichen Material zu Lösungsmitteln. Unter optimalen Bedingungen, d.h. bei 60°C in GS2, 1:100 angeimpft aus einer exponentiell wachsenden Vorkultur, erfolgte der Abbau von 1 % (w/v) kristalliner Cellulose (Whatman Papier #1) durch *C. thermocellum* ATCC 27405^T, DSM 4150 und auch F7 innerhalb von 48 Stunden. Auch höhere Konzentrationen kristalliner Cellulose konnten in entsprechend längerer Zeit und teilweise nach Zugabe von frischem Medium bzw. Auswechseln eines Teils des Mediums weitestgehend abgebaut werden.

Da die Kultivierung eines rekombinanten Stammes zur Butanolproduktion eventuell nicht unter gleichzeitig optimalen Bedingungen für den Celluloseabbau durch *C. thermocellum* ablaufen kann, wurde untersucht, inwieweit eine geringere Temperatur oder die Zugabe von Butanol einen hemmenden Einfluss auf den Abbau haben. Mit jedem geänderten Parameter, weg von den optimalen Kultivierungsbedingungen (55 - 60°C, ohne Butanol), erhöht sich zwar die dafür benötigte Zeit, die Umsetzung blieb aber - verglichen mit anderen bakteriellen Cellulose-Zersetzern - immer noch außergewöhnlich effizient. Die weiteren Ergebnisse zum Einfluss der Butanolkonzentration (s. 3.1.1.5) und zur Temperatursensitivität (s. 3.1.1.1) entsprechen in etwa denen auf Cellobiose und sind dort genauer ausgeführt.

3.1.1.3 Verwertung einzelner Zucker

In einer letztendlichen Anwendung soll statt gereinigter kristalliner Cellulose ein kostengünstiges und gut verfügbares Substrat verwendet werden. Bei dem durch den Projektpartner Süd-Chemie AG (jetzt: Clariant) zur Verfügung gestellten Substrat handelt es sich um zerkleinertes

(< 2 mm), nicht vorbehandeltes Weizenstroh (SC-Substrat, s. I.3.2.1), das vielerorts in großen Mengen günstig zu bekommen ist. Unterschiedliche Zucker, die beim Abbau von Weizenstroh entstehen [Jackowiak *et al.*, 2011], wurden deswegen einzeln als mögliche Substrate getestet (Abb. 5). Dafür wurden Cellobiose, Glucose, die Hexosen Galactose und Mannose, sowie die Pentosen Arabinose und Xylose als mögliche hauptsächliche Kohlenstoffquellen in GS2 Medium analysiert. *C. thermocellum* ATCC 27405^T konnte neben Cellobiose nur noch Glucose - nach einer kurzen Adaptionszeit und zeitverzögert - gut verwerten, während alle anderen analysierten Zucker scheinbar nicht verstoffwechselt werden konnten.

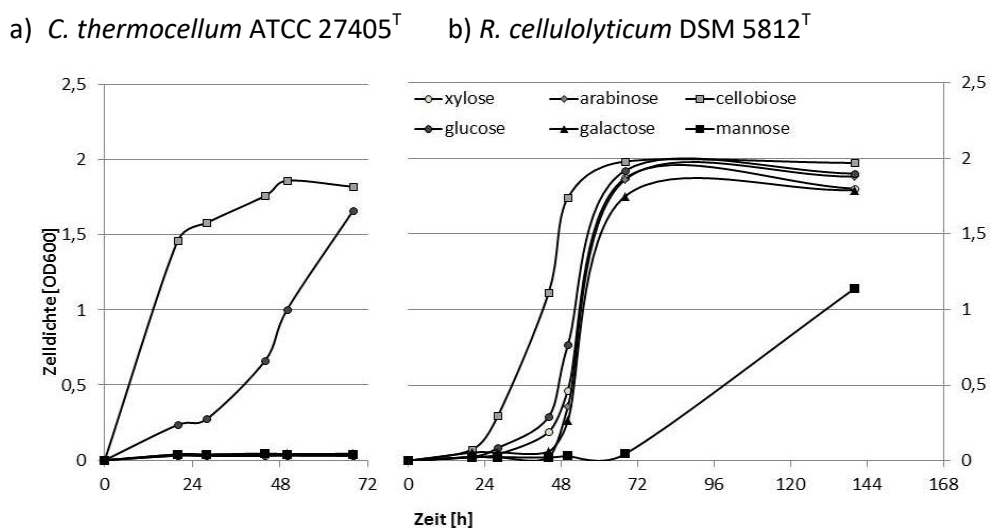


Abb. 5: Verwertung einzelner Zucker (je 1 %) durch a) *C. thermocellum* ATCC 27405^T und b) *R. cellulolyticum* DSM 5812^T; gezeigt ist je eine beispielhafte Kinetik angeimpft aus einer exponentiell wachsenden Vorkultur auf 0,5 % Cellobiose in je 1 % Xylose, Arabinose, Cellobiose, Glucose, Galactose oder Mannose auf eine Start-OD von 0,05.

3.1.1.4 Fermentationsprodukte

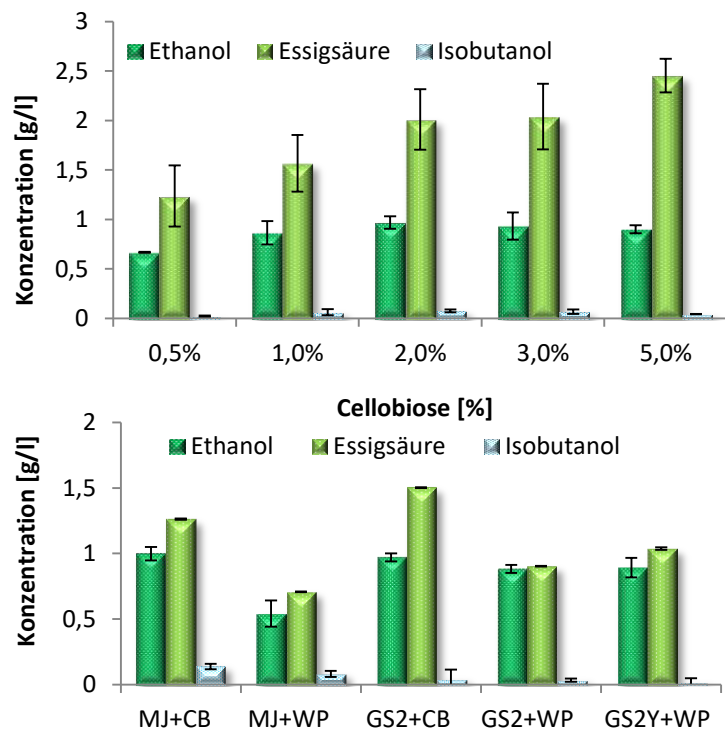
In Abhängigkeit vom verwendeten Substrat, der Kultivierungsdauer und der gewählten Temperatur ändert sich für *C. thermocellum* ATCC 27405^T die Menge und Zusammensetzung der gebildeten Fermentationsprodukte. Neben den bereits bekannten Produkten wie Ethanol, Essigsäure und Formiat (hier nicht weiter analysiert), konnten auch nicht unerhebliche Mengen Isobutanol in den Kulturüberständen detektiert werden. Dass auch Isobutanol, 2,3-Butandiol sowie einige Aminosäuren zu den normalen Endprodukten von *C. thermocellum* Stämmen gehören, konnte auch an anderer Stelle vor kurzem [Ellis *et al.*, 2012, Holwerda *et al.*, 2014] nachgewiesen werden. Steigende Konzentrationen gelöster Zucker führten nicht zu einer höheren Produktion von Fermentationsprodukten (s. Abb. 6), sondern eher zu einer Stagnation des Wachstums. Abbildung 6 b) zeigt die Unterschiede in den Fermentationsprodukten von *C. thermocellum* ATCC 27405^T auf verschiedenen Medien und Substraten. Entgegen erster An-

nahmen lässt sich erkennen, dass das gebildete Isobutanol nicht aus Aminosäuren des zugesetzten Hefeextrakts stammt, weil auf Minimalmedium (MJ, ohne Hefeextrakt) eher mehr Isobutanol gebildet wird, als auf Medien mit Hefeextrakt (GS2 mit 6 g/l und GS2Y mit 12 g/l).

Abb. 6: Fermentationsprodukte von *C. thermocellum* ATCC 27405^T unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen

a) auf steigenden Cellobiose-Konzentrationen von 0,5 – 5 % in GS2 bei 60°C. Die Probenahme erfolgte nach 7 Tagen; n=2 ± SD.

b) in unterschiedlichen Medien (Minimalmedium MJ ohne Hefeextrakt, GS2 mit 6g/l Hefeextrakt und GS2Y mit 12 g/l Hefeextrakt) mit 1 % Cellobiose (CB) oder 1 % Whatmanpaper (WP) bei 60°C. Die Probenahme erfolgte nach 72 h; n=2 ± SD.



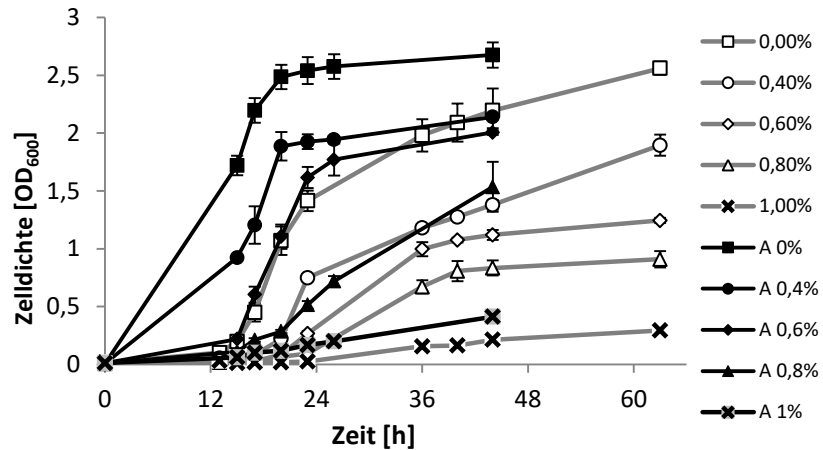
Im entsprechenden GC-Diagramm war außerdem ein minimaler Butanol-Peak erkennbar, der nicht nur in den transformierten Kulturen mit den Genen aus dem Butanol-Stoffwechselweg, sondern auch in den Kontrollen (*C. thermocellum* ATCC 27405^T und *C. thermocellum* ATCC 27405^T transformiert mit *pIMP1*) auftaucht. Die wahrscheinlichste Erklärung dafür ist, dass Buttersäure aus dem Hefeextrakt durch *C. thermocellum* ATCC 27405^T zu Butanol reduziert werden kann. Dafür spricht, dass der Buttersäure-Peak mit der Zeit aus dem Medium verschwindet, während der Butanol-Peak in Abhängigkeit von der Hefeextraktkonzentration im Medium größer wird (im Bereich der GC-Nachweisgrenze). Auch Versuche unter direkter Zugabe von Buttersäure zum Medium ergaben, dass diese von *C. thermocellum* ATCC 27405^T zu Butanol umgesetzt werden konnte (vgl. 3.5.4.3).

3.1.1.5 Butanol-Toleranz

Um Butanol rekombinant zu gewinnen, benötigen die Bakterien eine möglichst hohe Toleranz gegen das für sie toxische Fermentationsprodukt. Darum wurde untersucht, inwieweit extrazellulär zugesetztes Butanol die Bakterien hemmt, eventuell sogar von ihnen abgebaut wird, und ob eine Adaptation daran möglich ist. Anhand der Wachstumskinetiken auf Butanol ließ sich im Bereich von bis zu 1 % Butanol erkennbares Wachstum der *C. thermocellum* Kulturen

nachweisen. Für ATCC 27405^T scheint die erreichbare Zelldichte mit steigender Butanolkonzentration abzunehmen, wohingegen für F7 eine etwa gleich hohe Butanol-Toleranz im Bereich von 0 - 0,8 % Butanol gezeigt werden konnte (s. Anhang I). Konzentrationen deutlich über 1 % wurden von allen analysierten *C. thermocellum* Stämmen nicht mehr toleriert.

Abb. 7: Butanol-Toleranz von *C. thermocellum* 27405^T in GS2 mit 2 % Cellobiose bei 60°C und zugegebenen Butanolkonzentrationen von 0,0-1,0 % in nicht adaptierten und adaptierten (A) Kulturen; n=2 ± SD.



Der Versuch einer kurzfristigen Adaptation (zweimalige Überimpfung auf 0,5 % (w/v) Butanol) war zwar nicht ausreichend, um eine final deutlich höhere Toleranz zu vermitteln, jedoch sehr wohl, um ein besseres und schnelleres Anwachsen der Kulturen auf Butanolkonzentrationen bis 0,8 % zu ermöglichen (Abb. 7). In Langzeitversuchen, bei denen durch wiederholtes Überimpfen bei leicht steigenden Butanolkonzentrationen in 0,1 % Schritten die Toleranz gegen Butanol erhöht wurde, konnte für *C. thermocellum* ATCC 27405^T, F7 und DSM 4150 auf bis zu 1,4 % Butanol sehr schwaches Wachstum nachgewiesen werden.

3.1.1.6 Analyse des Genoms nach Genen für die Butanolproduktion

Bereits im Genom von *C. thermocellum* vorhandene Gene könnten die Expression von entsprechenden Fremdgene überflüssig machen, wenn sie die richtige Spezifität sowie entsprechende Substrat- und Produktselektivität besitzen und ausreichend exprimiert werden. Deswegen wurde in der Genom-Sequenz von *C. thermocellum* ATCC 27405^T (ca. 3,8 Mb DNA mit über 3000 proteinkodierenden Genen) nach Genen mit Ähnlichkeiten zu den Genen des BCS-Operons und zu Alkohol-Dehydrogenasen bzw. den hier ebenfalls verwendeten Aldehyd-/Alkohol-Dehydrogenasen gesucht.

Sequenzanalysen mit Hilfe von ClustalW nach bereits vorhandenen Genen für die Darstellung des Butanol-Stoffwechselweges ergaben, dass die Aminosäuresequenz der bifunktionalen Aldehyd-/Alkohol-Dehydrogenase (Cthe_0423, 873 AS) aus *C. thermocellum* ATCC 27405^T zu 68 % mit der aus *C. saccharobutylicum* DSM 13864 (CLSA_c03350, 871 AS), zu 63/60 % mit denen aus *C. acetobutylicum* ATCC 824 (AdhE CA_P0035, 858 AS / AdhE2 CA_P0162, 862 AS) und zu 67 % mit der aus *C. beijerinckii* NCIMB 8052 (Cbei_0305, 864 AS) übereinstimmt (s. Anhang II).

Alle diese bifunktionalen Enzyme enthalten N-terminal einen Bereich, der zur Familie der Aldehyd-Dehydrogenasen zählt, während das C-terminale Ende den Ferredoxin-enthaltenden Alkohol-Dehydrogenasen zugeordnet werden kann. Daneben gibt es mit Cthe_0394 (389 AS), Cthe_2579 (368 AS) und Cthe_0101 (389 AS) noch drei weitere Alkohol-Dehydrogenasen in *C. thermocellum* ATCC 27405^T. Nachdem die Alkohol-Dehydrogenasen in Clostridien für die Produktion von mehreren unterschiedlichen Alkoholen zuständig sind, ist davon auszugehen, dass es sich dabei um eher unspezifische Enzyme handelt und dass sie auch in der Lage sein dürften, die Reduktion zu Butanol zu katalysieren. Die Analyse zur Funktionalität der endogenen Aldehyd-/Alkohol-Dehydrogenase durch Zugabe von geringen Buttersäure- bzw. Butyraldehyd-Mengen zum Fermentationsansatz und anschließender GC-Analyse der daraus gebildeten Produkte ergab, dass der zweite Teil des Butanol-Stoffwechselwegs von Butyraldehyd zu Butanol in *C. thermocellum* ATCC 27405^T auch ohne Fremdgene funktionieren konnte. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind unter 3.5.4.3 genauer dargestellt. Ausgehend von den Gen-Sequenzen des BCS-Operons solventer Clostridien, konnten keine anderen Gene mit einer voraussichtlichen Funktion im Butanol-Stoffwechsel identifiziert werden.

3.1.2 *Ruminiclostridium cellulolyticum*

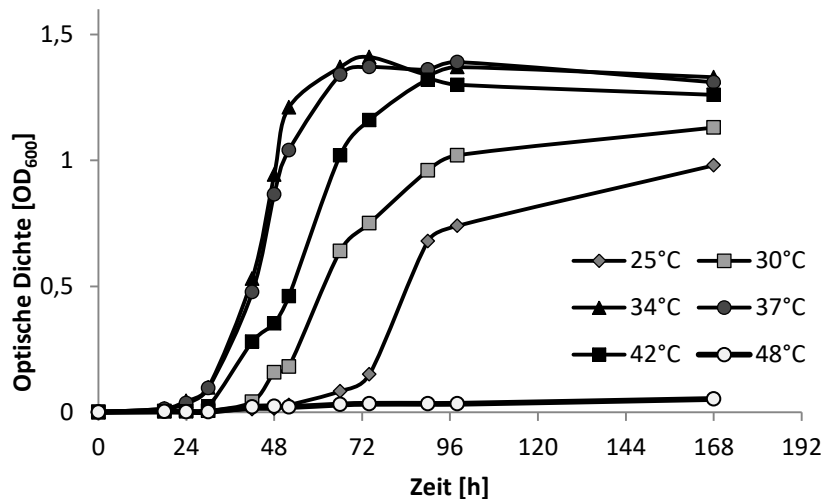
Ruminiclostridium cellulolyticum (Petitdemange *et al.*, 1984) ist ein Gram-positives, anaerobes Bodenbakterium und gilt nach jetzigem Wissensstand als das effektivste mesophile, cellulolytische Bakterium. Es wurde kürzlich neuklassifiziert und wird statt bisher *Clostridium cellulolyticum* jetzt als *R. cellulolyticum* bezeichnet [Zhang *et al.*, 2018]. Im Vergleich zu *C. thermocellum* verfügt *R. cellulolyticum* DSM 5812^T über ein kleineres aber sehr vielseitiges Cellulosom. Damit kann es u.a. auch verschiedene C₅-Zucker (vgl. Abb. 5) verwerten und so den Hemicellulose-Bestandteil der Lignocellulose deutlich besser und vollständiger verwerten als *C. thermocellum*.

3.1.2.1 Wachstumsstudien mit *R. cellulolyticum* DSM 5812^T

Für *R. cellulolyticum* DSM 5812^T hat sich unter Laborbedingungen eine Temperatur von 34°C im Standardmedium GS2 mit Cellobiose oder Cellulose als optimal erwiesen. Im Vergleich zu allen getesteten *C. thermocellum* Stämmen zeigte *R. cellulolyticum* 5812^T ein langsames und von der erreichbaren Zelldichte geringeres Wachstum. Auch für *R. cellulolyticum* DSM 5812^T konnte Wachstum über einen sehr breiten Temperaturbereich nachgewiesen werden (Abb. 8). Trotz eines Optimums von 34°C kann *R. cellulolyticum* DSM 5812^T bei niedrigeren Temperatu-

ren bis herunter zu Raumtemperatur noch wachsen, jedoch zeitlich verzögert und nur bis zu einer geringeren Zelldichte. Bei Temperaturen bis zu 42°C ist die maximale Zelldichte noch vergleichbar mit der bei 34 °C und das Wachstum nur leicht verzögert. Da aber alle bekannten solventogenen Clostridien wie auch *R. cellulolyticum* DSM 5812^T mesophil sind, dürfte bei einer rekombinanten Butanolproduktion die Kultivierungstemperatur keine Probleme bereiten.

Abb. 8: Wachstum von *R. cellulolyticum* DSM 5812^T: Messung der Optischen Dichte (OD₆₀₀) je einer beispielhaften Kultur auf GS2-Medium mit 1 % Cellobiose bei 25, 30, 34, 37, 42 und 48°C.



Während für die verschiedenen hier untersuchten *C. thermocellum*-Stämme die Verwendung einer Sporensuspension als Inokulum sehr gut funktioniert hat, konnte diese Methode für *R. cellulolyticum* DSM 5812^T nur bedingt eingesetzt werden. Dessen deutlich schlechtere Sporenbildung machte die Gewinnung von Sporen mühsamer und das Animpfen daraus weniger gut vergleichbar. Deshalb wurde für die folgenden Versuche meist erst eine Übernachtskultur aus Sporen angezogen, aus der dann angeimpft werden konnte.

3.1.2.2 Celluloseabbau

Unter optimalen Bedingungen, d.h. bei 34°C in GS2, 1:100 angeimpft aus einer exponentiell wachsenden Vorkultur, erfolgt ein vollständiger Abbau von 1 % (w/v) kristalliner Cellulose (Whatman Papier #1) durch *R. cellulolyticum* DSM 5812^T innerhalb von 5 bis 7 Tagen. Die weiteren Ergebnisse zum Einfluss der Butanolkonzentration (s. 3.1.2.5) und zur Temperatursensitivität (s. 3.1.2.1) entsprechen in etwa denen auf Cellobiose und sind dort genauer ausgeführt.

3.1.2.3 Verwertung einzelner Zucker

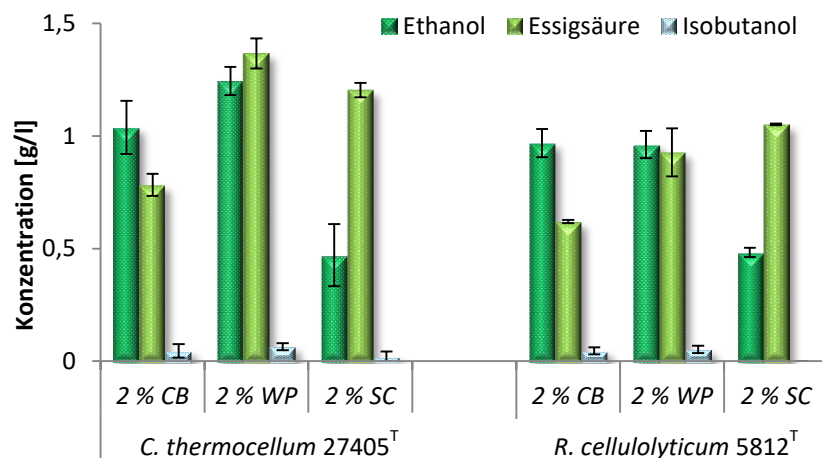
Wie für *C. thermocellum* ATCC 27405^T beschrieben und auch für *R. cellulolyticum* DSM 5812^T in Abb. 5 vergleichend dargestellt, wurden verschiedene Zucker, die in der hier verwendeten lignocellulosehaltigen Biomasse vorkommen, einzeln als mögliche Substrate getestet. Während *C. thermocellum* ATCC 27405^T aber neben Cellobiose nur noch Glucose verwerten konnte, zeigte *R. cellulolyticum* DSM 5812^T ein nur leicht zeitlich verzögertes, aber gleich dichtes

Wachstum neben Cellobiose auch auf Arabinose, Galactose, Glucose und Xylose, und konnte, obgleich deutlich verzögert, auch auf Mannose wachsen. Das belegt, dass *R. cellulolyticum* DSM 5812^T einige C₅-Zucker effizient abbauen kann und damit vor allem für den Abbau der zahlreichen Hemicellulose-Bestandteile aus lignocellulosehaltiger Biomasse geeignet ist.

3.1.2.4 Fermentationsprodukte

Die beiden cellulolytischen Clostridien *C. thermocellum* ATCC 27405^T und *R. cellulolyticum* DSM 5812^T sind sich von der Zusammensetzung und der Menge der gebildeten Fermentationsprodukte sehr ähnlich (s. Abb. 9 und vgl. 3.1.1.4). So produzieren beide hauptsächlich Ethanol und Essigsäure, aber auch Isobutanol und einige weitere Nebenprodukte. Weil *R. cellulolyticum* DSM 5812^T länger braucht, um das lignocellulosehaltige SC-Substrat abzubauen, wurde für die Vergleiche in Abb. 9 eine verlängerte Inkubationszeit gewählt, die für den Abbau von Cellobiose und Cellulose nicht nötig gewesen wäre. Nachdem das SC-Substrat von beiden Organismen zu ca. 50 % abgebaut werden konnte, ist die Menge an gebildeten Fermentationsprodukten in etwa mit denen auf Cellobiose und Cellulose vergleichbar.

Abb. 9: Fermentationsprodukte von *R. cellulolyticum* DSM 5812^T nach 10 Tagen bei 34°C und von *C. thermocellum* ATCC 27405^T nach 7 Tagen bei 60°C auf unterschiedlichen Substraten; jeweils auf 2 % Cellobiose (CB), 2 % Cellulose (WP) oder 2 % SC-Substrat (SC; w/v); n=2 ± SD.

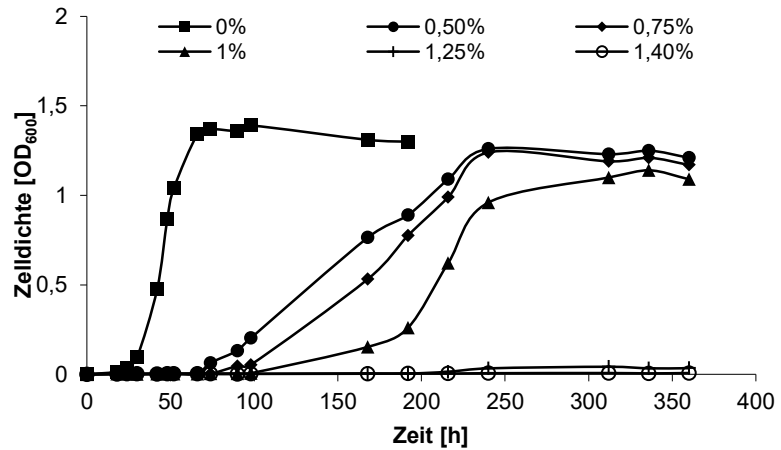


3.1.2.5 Butanoltoleranz

Auch für *R. cellulolyticum* DSM 5812^T ließ sich ein sinkendes und zeitlich verzögertes Wachstum unter Zugabe von steigenden Butanolkonzentrationen erkennen. Konzentrationen ab 1,2 % wurden nicht mehr toleriert (s. Abb. 10). Eine zweimalige Überimpfung war nicht ausreichend, um durch Adaptation eine höhere Toleranz gegen Butanol zu vermitteln. Auch in Langzeitversuchen (vielfaches Überimpfen bei leicht steigenden Butanolkonzentrationen) konnte keine deutlich höhere Toleranz der Bakterien gegen Butanol erreicht werden - außer einem geringfügig schnelleren Wachstum auf niedrigeren Butanolkonzentrationen bis 0,8 % Butanol. Nachdem diese Versuche außerdem noch auf Cellobiose - einem weniger komplexen und ein-

facher zu verstoffwechselnden Substrat als das für die Abbauersuche verwendete Stroh - durchgeführt wurden, kann davon ausgegangen werden, dass die Toleranzgrenze auf SC-Substrat unterhalb von 0,8 % Butanol anzusiedeln ist. Das bestätigen auch die unter 3.2.2.7 beschriebenen Ergebnisse zum SC-Substratabbau auf geringen Butanolkonzentrationen.

Abb. 10: Butanoltoleranz von *R. cellulolyticum* DSM 5812^T: Messung der Optischen Dichte (OD₆₀₀) je einer beispielhaften Kultur auf GS2-Medium bei 34°C gegen unbeimpftes Medium unter Zugabe von 0 - 1,4 % Butanol nach Animpfen auf eine Start OD₆₀₀ von 0,05.



3.1.3 Analyse des Genoms nach Genen für die Butanolproduktion

Sequenzanalysen mit ClustalW ergaben, dass die bifunktionale Aldehyd-/Alkohol-Dehydrogenase aus *R. cellulolyticum* DSM 5812^T (Ccel_3198, 867 AS) zu 68 % mit der aus *C. saccharobutylicum* DSM 13864 (CLSA_03350, 871 AS), zu 64/62 % mit denen aus *C. acetobutylicum* ATCC 824 (AdhE CA_P0035 858 AS/AdhE2 CA_P0162, 862 AS) und zu 69 % mit der aus *C. beijerinckii* NCIMB 8052 (Cbei_0305, 864 AS) übereinstimmt (s. Anhang III). Daneben gibt es mit Ccel_1083 (381 AS), Ccel_0894 (399 AS) und Ccel_3337 (354 AS) noch drei weitere Alkohol-Dehydrogenasen.

3.1.4 Neuisolierung cellulolytischer Bakterien aus Naturproben

Im Rahmen einer Bachelorarbeit wurde versucht, cellulolytische Mikroorganismen aus unterschiedlichen Naturproben zu isolieren, die bereits bei mesophilen Temperaturen einen sehr guten Substratabbau zeigen. Obwohl die Anreicherungen direkt auf dem hier verwendeten SC-Substrat durchgeführt wurden, konnte für keinen der isolierten Kandidaten eine höhere Substratumsetzung als durch *C. thermocellum* ATCC 27405^T oder *R. cellulolyticum* DSM 5812^T nachgewiesen werden, weswegen sie hier nicht weiter einbezogen wurden.

3.2 Analyse des Abbaus von unbehandeltem SC-Substrat und einzelner Substratbestandteile daraus

Das vom Projektpartner Südchemie AG (jetzt: Clariant) zur Verfügung gestellte Substrat (SC-Substrat) besteht aus Weizenstroh, das ohne weitere Vorbehandlung direkt für den Abbau durch cellulolytische Bakterien eingesetzt wurde.

3.2.1 Analyse des SC-Substrats

Die verwendete Fraktion #2 entspricht einer Korngröße von < 2 mm. Als Ausgangspunkt für die fraktionierte Abbauanalyse wurden 11 Leerproben des Substrats mittels Van-Soest-Analyse (s. 2.9.1) untersucht und die daraus resultierenden Mittelwerte als Referenzwerte für den prozentualen Abbau verwendet.

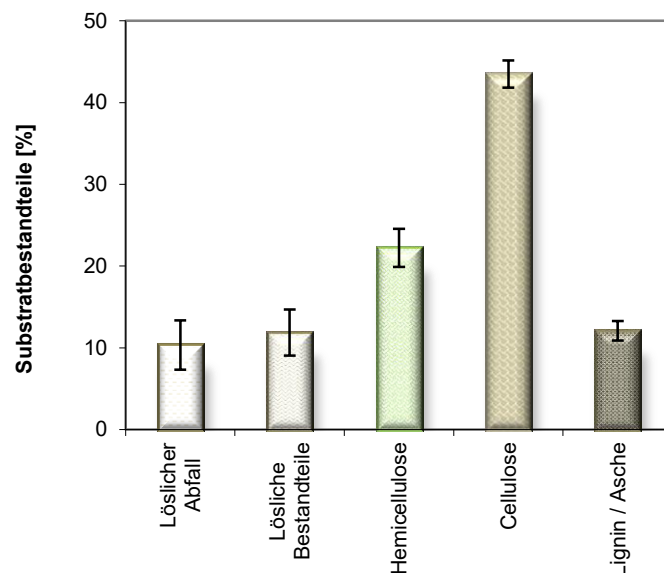


Abb. 11: Analyse der SC-Substratzusammensetzung nach Van-Soest; 11 Wiederholungen \pm SD.

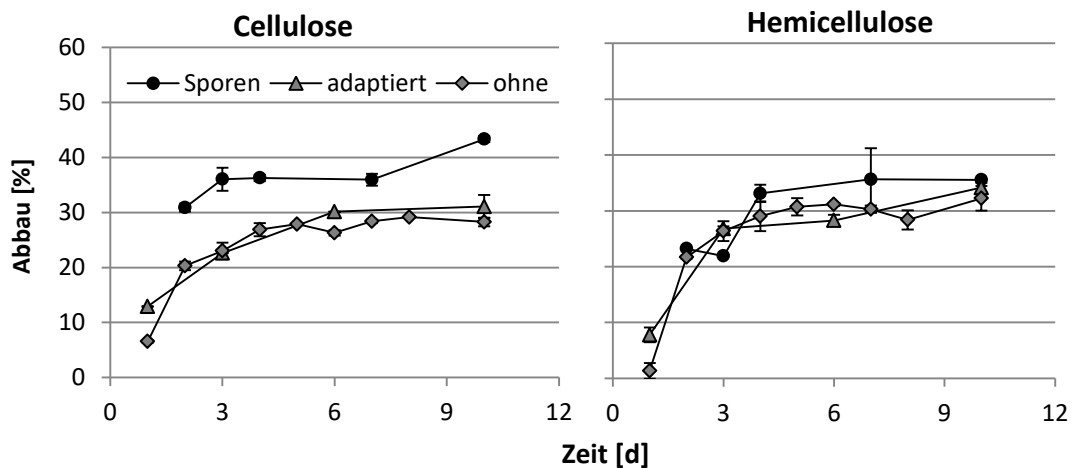
Dabei bezeichnet „Löslicher Abfall“ all jene Bestandteile, die sich bereits durch die Zugabe von Medium bzw. durch das Autoklavieren aus dem Substrat lösen (z. B. Zucker). Diese machen in etwa 10 % aus und können mit der Feststoffanalyse nicht quantifiziert werden. In einer ähnlichen Größenordnung liegen auch die „Löslichen Bestandteile“, zu denen Fette und Proteine zählen. Diese beiden Fraktionen schwanken relativ stark (s. Anhang IV) in Abhängigkeit von der Korngröße und der Homogenität des Substrates. Die Hemicellulose- (ca. 22 %) und Celluloseanteile (ca. 43 %) im Substrat unterliegen dagegen nur geringfügigen Schwankungen und entsprechen in etwa den Werten der von Süd-Chemie eingangs durchgeführten Substratanalyse.

3.2.2 Einfluss verschiedener Faktoren auf den Abbau von SC-Substrat durch *C. thermocellum* ATCC 27405^T und *R. cellulolyticum* DSM 5812^T

3.2.2.1 Inokulum

Die Ausbildung des Cellulosoms bzw. dessen Aufbau aus den einzelnen Cellulosomen-Bestandteilen sowie deren Anzahl wird von der Art und Zusammensetzung des verwendeten Substrates beeinflusst. Insofern sollte eine Adaptation an unterschiedliche Substrate möglich sein, die dann zu einem besseren Substratumsatz führt. Die Analyse unterschiedlicher Inokulationsmethoden in Abb. 12 a) ergab, dass es für *C. thermocellum* ATCC 27405^T nicht nötig ist, die Kulturen an das Substrat zu adaptieren, weil ein Animpfen direkt aus Sporen in etwa dasselbe Abbauergebnis lieferte.

a) *C. thermocellum* ATCC 27405^T



b) *R. cellulolyticum* DSM 5812^T

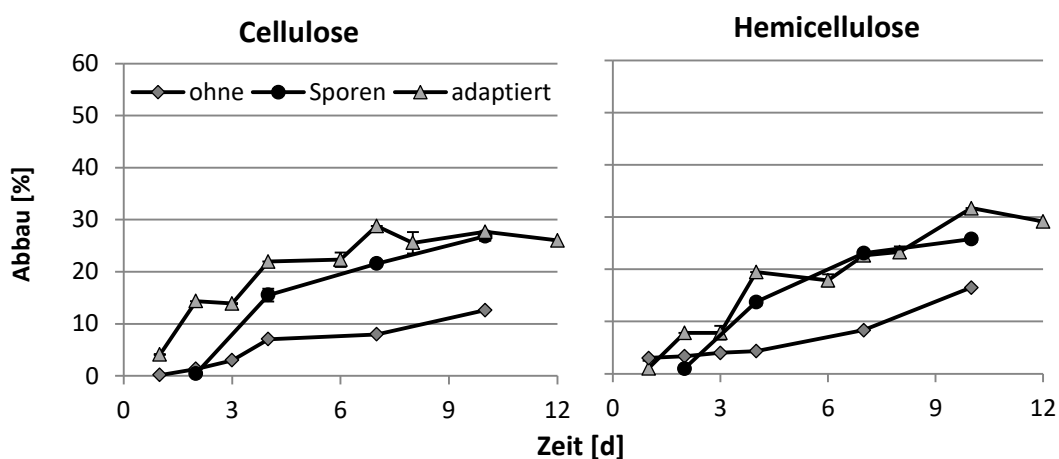


Abb. 12: Analyse des fraktionierten Abbaus von Cellulose und Hemicellulose durch *C. thermocellum* ATCC 27405^T und *R. cellulolyticum* DSM 5812^T nach Van-Soest über die Zeit (in Tagen); Abbau von 1,33 % SC-Substrat (w/v) in GS2 angeimpft aus einer Vorkultur auf 0,5 % Cellobiose (ohne), einer Vorkultur auf 1,33 % SC-Substrat (adaptiert) oder aus einer Sporensuspension (Sporen). a) *C. thermocellum* ATCC 27405^T und b) *R. cellulolyticum* DSM 5812^T; n=2 ± SD.

Für *R. cellulolyticum* DSM 5812^T (Abb. 12 b) ist deutlich erkennbar, dass bevorzugt Sporen oder eine adaptierte Kultur verwendet werden sollte, weil nach Animpfen aus einer Cellobiose-Vorkultur nur ein sehr viel schlechteres Abbauergebnis erzielt werden konnte. Im Gegensatz zu *C. thermocellum* ATCC 27405^T führte hier der Abbau direkt aus Sporen insbesondere während der ersten Tage zu einer geringeren Umsetzung des Substrats als bei den adaptierten Kulturen. Nachdem *R. cellulolyticum* DSM 5812^T deutlich schlechter und langsamer Sporen bildet als *C. thermocellum*, dürften diese Unterschiede v.a. auf die Qualität der Sporensuspension zurückzuführen sein. Insgesamt waren die Abbauraten beim Animpfen aus Sporen oder aus einer adaptierten Kultur besser, als wenn aus exponentiell wachsenden Cellobiose-Vorkulturen angeimpft wurde. Auch der besseren Vergleichbarkeit wegen wurden die folgenden Versuche in der Regel aus Sporensuspensionen angeimpft, die zuvor 1:10 in Medium verdünnt und anaerob hitzeaktiviert wurden. Aus diesen Ansätzen wurde für *C. thermocellum* mit 100 µl und für *R. cellulolyticum* DSM 5812^T mit 250 µl auf 75 ml angeimpft, entsprechend der besten Ergebnisse aus den Vorversuchen (s. Anhang V).

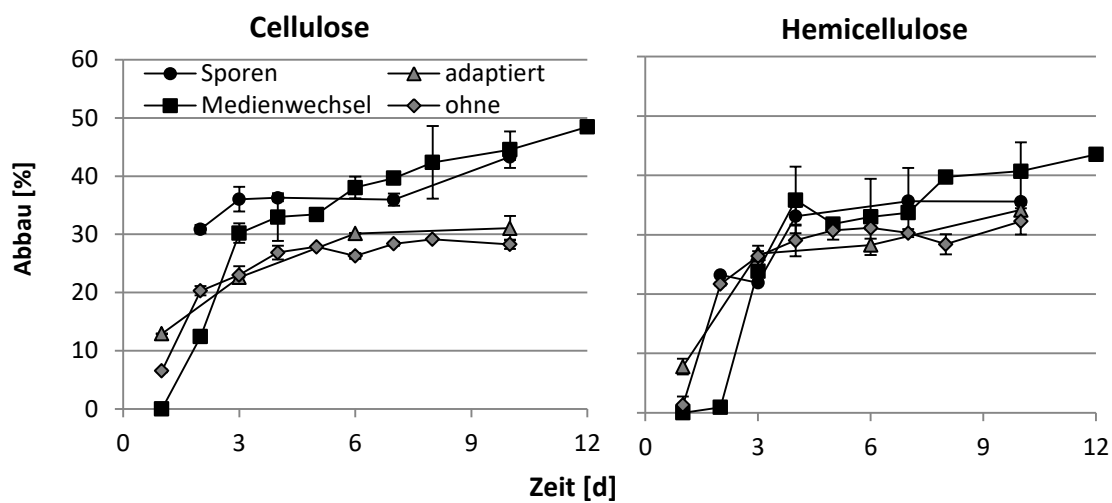
3.2.2.2 Inkubationsdauer

Nachdem ein komplexeres Substrat für die Mikroorganismen schwieriger und zeitaufwendiger abzubauen ist als gelöste Einfachzucker, wurde untersucht, welcher Zeitraum für eine gute Umsetzung des SC-Substrats durch *C. thermocellum* ATCC 27405^T und *R. cellulolyticum* DSM 5812^T nötig ist. Für *C. thermocellum* ATCC 27405^T (Abb. 13 a) stieg der Abbau von 1,3 % SC-Substrat bis zum vierten Tag deutlich auf etwas über 30 % der zuvor vorhandenen Hemicellulose und etwas unter 30 % der Cellulose an und stagnierte anschließend. Dieser Stillstand konnte für die Kulturen von *R. cellulolyticum* DSM 5812^T nur in sehr geringem Umfang festgestellt werden. Nachdem *R. cellulolyticum* DSM 5812^T insgesamt weniger Substrat abbaut und alle abgespaltenen Zucker auch verwerten kann, dürfte in diesem Fall eine Stagnation durch eine zu hohe Zuckerkonzentration oder Metabolite im Medium ausgeschlossen sein. Entsprechend ließ sich hier durch einen Teilaustausch des Mediums kein verbesserter Abbau erkennen. Ein deutlich steigender Gasdruck im Fläschchen und auch ein möglicher Abfall des pH's durch Anreicherung saurer Stoffwechselprodukte konnten durch entsprechende Versuche (Abbau unter Verwendung von Ventilen zum Entgasen, s. Anhang VI; bzw. Analyse des pH-Wertes während des Wachstums, s. 3.2.2.5) als mögliche Gründe für die Stagnation ausgeschlossen werden.

Um festzustellen, ob der verringerte Abbau für *C. thermocellum* ATCC 27405^T darauf zurückzuführen ist, dass sich Hemmstoffe im Medium anreichern, oder aber, dass ein weiterer Abbau des Substrats nicht möglich ist, wurde unter denselben Bedingungen wie zuvor ab dem

dritten Tag täglich 1/5 bzw. das komplette Medium durch Neues ersetzt (Abb. 13 a). Dabei zeigte sich, dass das Substrat gleichmäßig und ohne Stagnation weiter abgebaut wurde, was eher auf eine Anreicherung von Hemmstoffen bzw. Metaboliten oder auf das Fehlen von Substanzen im Medium hindeutet als darauf, dass das Substrat grundsätzlich nicht weiter abgebaut werden kann. Wie bereits angedeutet, könnte das mit einer Wachstumshemmung durch gelöste Zucker im Medium erklärt werden, die von *C. thermocellum* ATCC 27405^T im Kulturüberstand angereichert und nicht weiter abgebaut werden, während *R. cellulolyticum* DSM 5812^T alle abgespaltenen Zucker nutzt (Abb. 13 b).

a) *C. thermocellum* ATCC 27405^T



b) *R. cellulolyticum* DSM 5812^T

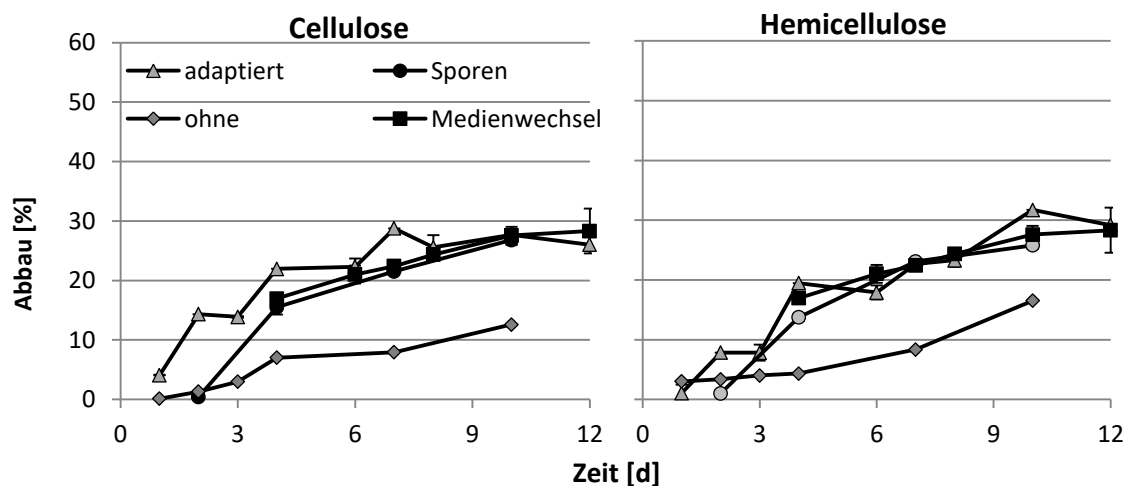


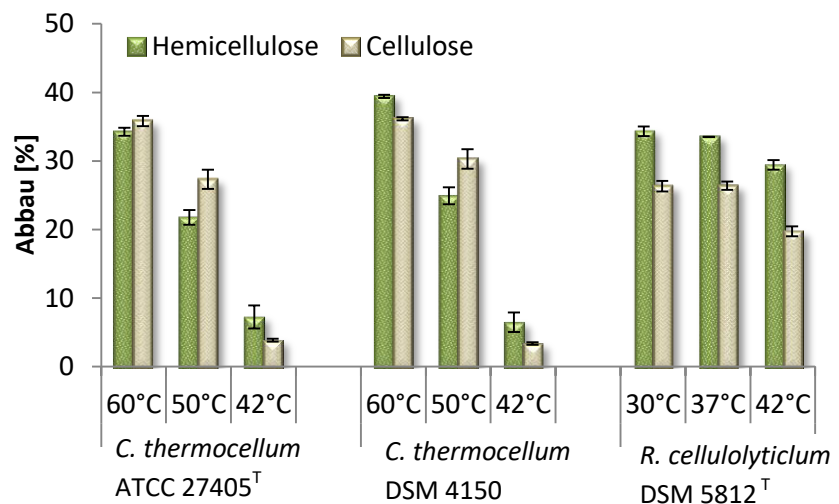
Abb. 13: Analyse des fraktionierten Abbaus von Cellulose und Hemicellulose nach Van-Soest durch *C. thermocellum* ATCC 27405^T und *R. cellulolyticum* DSM 5812^T mit verschiedenen Inokulationsmethoden über die Zeit (in Tagen); a) *C. thermocellum* ATCC 27405^T und b) *R. cellulolyticum* DSM 5812^T; auf 1,33 % SC-Substrat (w/v) in GS2 angeimpft aus entweder einer exponentiell wachsenden Vorkultur auf 0,5 % Cellulose (ohne), einer exponentiell wachsenden Vorkultur auf 1,33 % SC-Substrat (adaptiert), einer Sporensuspension (Sporen) oder einer Sporensuspension mit zusätzlichem Austausch von 1/5 des Mediums ab dem dritten Tag (Medienwechsel); n=2 ± SD.

3.2.2.3 Inkubationstemperatur

Trotz der Tatsache, dass *C. thermocellum* Stämme als Bodenbakterien beinahe ubiquitär und bei unterschiedlichen Temperaturbedingungen vorkommen, ist die Temperatur ein recht kritischer Punkt für einen effizienten Celluloseabbau durch *C. thermocellum* Kulturen.

Deutliche Abweichungen vom Temperaturoptimum können auf Cellobiose noch bis herunter zu 37°C gut toleriert werden, auf Whatman Papier (kristalline Cellulose) dagegen fällt die Abbaurrate mit verringerter Temperatur deutlich ab. Dasselbe lässt sich auch auf dem strukturell komplexeren, zerkleinerten Weizenstroh (SC-Substrat) erkennen. Eine Reduzierung der Temperatur wäre im Folgenden v.a. dann nötig, wenn die Funktion der Enzyme für die Lösungsmittelproduktion, die ursprünglich aus mesophilen Organismen stammen, bei der optimalen Wachstumstemperatur von *C. thermocellum* nicht ausreichend funktionieren. Schon bei einer Absenkung auf 50°C wurde das Substrat von *C. thermocellum* ATCC 27405^T und auch von Stamm DSM 4150 deutlich schlechter abgebaut (Abb. 14). Bei 42°C lag der Abbau – zumindest innerhalb von 7 Tagen – bereits unter 10 %. *R. cellulolyticum* DSM 5812^T Kulturen zeigten zwischen der unteren (30°C) und oberen Grenze (37°C) der Optimaltemperatur solventogener Clostridien keine signifikanten Unterschiede in der Abbauleistung. Bei einer weiteren Erhöhung der Kultivierungstemperatur auf 42°C fiel der Abbau jedoch etwas niedriger aus. Nachdem auch *R. cellulolyticum* DSM 5812^T mesophil ist, müsste die Temperatur hier, wenn überhaupt, nur in einem geringfügigen Rahmen angepasst werden.

Abb. 14.: Van-Soest-Analyse des Abbaus [%] von Hemicellulose und Cellulose auf 1,33 % SC-Substrat bei verschiedenen Temperaturen; bei 60, 50 und 42 °C für *C. thermocellum* ATCC 27405^T und DSM 4150 (nach 7 Tagen) sowie bei 30, 37 und 42°C für *R. cellulolyticum* DSM 5812^T (nach 14 Tagen); n=2 ± SD.



3.2.2.4 Substratkonzentration

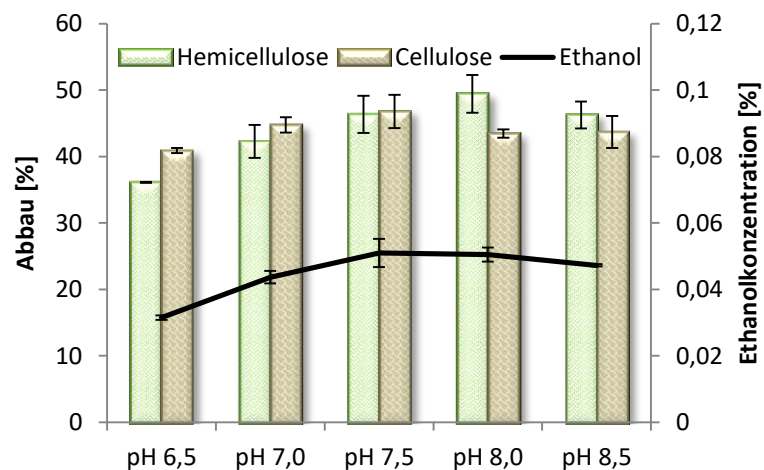
Während für die industrielle ABE-Fermentation meist mit Zuckerkonzentrationen im Bereich von ca. 6 % gearbeitet wird, führten hohe SC-Substratkonzentrationen zu einem prozentual geringeren Abbau und waren aus technischen Gründen mittels Van-Soest-Analyse nicht quantifizierbar. Da von cellulolytischen Bakterien außerdem bekannt ist, dass sie Schwierigkeiten mit

dem Abbau von hohen Substratkonzentrationen haben (v.a. *R. cellulolyticum* DSM 5812^T) und um ein Auswechseln des Medium zu umgehen, sollte analysiert werden, bis wohin das Substrat durch die Bakterien überhaupt abgebaut werden kann. Eine Erhöhung der Medienmenge von 75 ml auf 100 bzw. 150 ml (was einer Verringerung der Substratkonzentration von 1,33 % auf 1 bzw. 0,66 % (w/v) entspricht) führte sowohl für *R. cellulolyticum* DSM 5812^T als auch für *C. thermocellum* ATCC 27405^T zu einem höheren prozentualen Substratabbau. Dabei konnte auf 1 % Substrat bis zu 50 % der Hemicellulose und Cellulose innerhalb von 7 Tagen abgebaut werden, ohne das Medium zu wechseln (Anhang VII). Um den Abbau zwischen den Experimenten vergleichbar zu machen, wurde die Substratkonzentration 1,33 % (w/v) gewählt, bei der das voluminöse Substrat in kleinen Serum-Flaschen (1,0 g Substrat und 75 ml Medium in 100 ml Serumflaschen) gänzlich mit Medium bedeckt war, um einen gleichbleibend guten Abbau zu ermöglichen. Die Menge der auf SC-Substrat produzierten Fermentationsprodukte ist unter 3.2.2.8 analysiert.

3.2.2.5 pH-Bedingungen

Der Substratabbau in Abhängigkeit vom jeweiligen Ausgangs-pH-Wert wurde genauer untersucht, um den am besten geeigneten pH-Bereich für die hier ausgewählten, cellulolytischen Clostridien zu bestimmen. Die Analyse des verbliebenen Substratrests erfolgte mit der Van-Soest Methode und die Kulturüberstände wurden gaschromatographisch analysiert. Abb. 15 zeigt, dass der Abbau durch *C. thermocellum* ATCC 27405^T im Bereich von pH 7,5 bis 8,5 etwas höher war, als bei geringeren pH-Werten. Auch die Analyse der Kulturüberstände ergab für pH-Werte ab 7,5 eine höhere Konzentration an produziertem Ethanol als unterhalb dieses pH-Werts. Auch für *R. cellulolyticum* DSM 5812^T lieferte nur der Abbau bei einem pH-Wert von 6,5 eine geringere Abbauleistung, während alle anderen Werte in etwa gleich waren.

Abb. 15: Van-Soest-Analyse des Abbaus [in %] von Hemicellulose und Cellulose auf 1,33 % SC-Substrat durch *C. thermocellum* ATCC 27405^T bei unterschiedlichen pH-Werten; zudem ist die Menge des dabei gebildeten Ethanols bei einem anfangs eingestellten pH-Wert von 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 und 8,5 nach 7 Tagen bei Standardbedingungen angegeben; n=2 ± SD.



3.2.2.6 Gasdruck und Durchmischung

Eine erste Vermutung, dass der steigende Gasdruck in den Kulturfläschchen zu einer Beeinträchtigung des Abbaus führen könnte, konnte nicht bestätigt werden, weil es in Versuchen mit täglichem Entgasen zu keiner verbesserten Abbauleistung kam. Obwohl die Kulturfläschchen entsprechend diesem Ergebnis nicht mehr komplett drucklos gehalten wurden, wurden sie weiterhin regelmäßig entgast, um ein Explodieren zu verhindern. Auch eine Durchmischung der Kulturen bei unterschiedlich starker Rotation zeigte keine verbesserte Umsetzung.

Zusammenfassend (Tab. 10) lässt sich sagen, dass eine Verbesserung des prozentualen Abbaus von SC-Substrat durch Verlängerung der Inkubationszeit (s. 3.2.2.2), eine vorhergehende Adaptation der Kulturen an das verwendete Substrat (s. 3.2.2.1), eine Verringerung der Substratkonzentration (s. 3.2.2.4), eine Anpassung des pH-Wertes auf ca. pH 7,5 (s. 3.2.2.5) oder durch den Austausch eines Teils des Mediums (s. 3.2.2.2) erreicht werden konnte. Alle anderen getesteten Parameter führten zu keiner verbesserten Abbauleistung.

Tab. 10: Einfluss verschiedener Faktoren auf den prozentualen Abbau von SC-Substrat:

Verbesserung des Abbaus	negativer / kein Effekt
Geringere Substratkonzentration	Entgasen ¹
Längere Inkubationszeit	Reicheres Medium ²
Adaptation der Kulturen	Schütteln / Schwenken ³
~ pH 7,5	veränderte Salzkonzentration ²
Austausch des Mediums	Zugabe von Butanol
Zugabe neuen Mediums	

siehe: ¹: Anhang VI, ²: Anhang VIII, ³: Anhang IX

3.2.2.7 Substratabbau unter Zugabe von Butanol

Wie bereits gezeigt, nimmt das Wachstum von *C. thermocellum* ATCC 27405^T (s. 3.1.1.5) und *R. cellulolyticum* DSM 5812^T (s. 3.1.2.5) ab, je weiter die extrazelluläre Butanolkonzentration erhöht wird. Nachdem ein Trübungsnachweis wegen der vielen enthaltenen Schwebstoffe auf SC-Substrat nicht möglich ist, wurde in diesem Fall die Abbauleistung (Van Soest Analyse; Wiegen des Restsubstrates nach Abfiltrieren) nach 10 bzw. 14 Tage (*R. cellulolyticum* DSM 5812^T) als Maß für die Verträglichkeit von extrazellulärem Butanol zum Substratabbau verwendet (Abb. 16). Mit steigender Butanolkonzentration (0 % - 0,6 % (w/v)) konnte sowohl für verschiedene getestete *C. thermocellum* Stämme (ATCC 27405^T, DSM 4150 und F7) als auch für *R. cellulolyticum* DSM 5812^T ein deutlicher Rückgang im Substratabbau festgestellt werden. Oberhalb von 0,8 % zugesetztem Butanol war kein Abbau erkennbar (s. Anhang X).

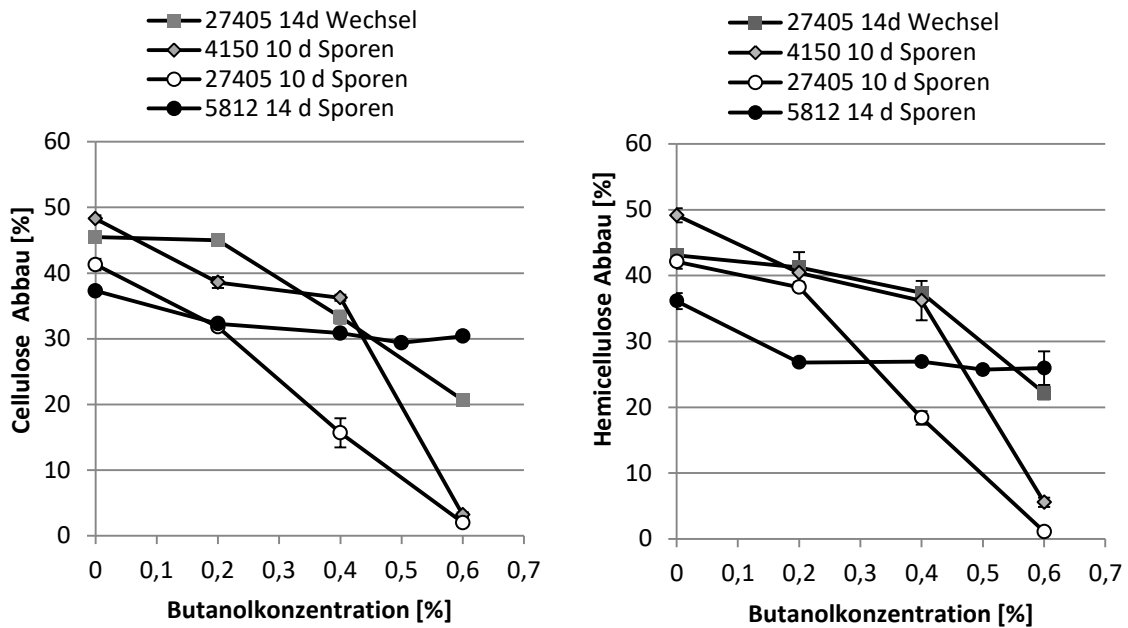


Abb. 16: Van-Soest-Analyse des Abbaus [in %] von Hemicellulose (rechts) und Cellulose (links) aus SC-Substrat bei steigenden Butanolkonzentrationen von 0 % - 0,6 % Butanol; durch *C. thermocellum* ATCC 27405^T (nach 10 bzw. 14 Tagen („Wechsel“, mit Auswechseln des Mediums nach 5 und 10 Tagen)) und *C. thermocellum* DSM 4150 (nach 10 Tagen) sowie *R. cellulolyticum* DSM 5812^T (nach 14 Tagen) bei 60 bzw. 34 °C angeimpft aus Sporen; n=2 ±SD.

Auf 0,2 und 0,4 % Butanol war noch ein deutlicher Abbau des Substrates festzustellen. Dabei zeigte sich der *C. thermocellum* Stamm DSM 4150 toleranter gegen den Butanol-Stress als ATCC 27405^T oder auch *R. cellulolyticum* DSM 5812^T. Mit steigenden Konzentrationen reagierten die *C. thermocellum* Kulturen deutlich stärker auf das zugesetzte Butanol, als *R. cellulolyticum* DSM 5812^T, was vermutlich auf die höhere Toxizität von Butanol bei den höheren Temperaturen zurückzuführen ist. Die verminderte Abbauleistung kann durch Verlängerung der Inkubationszeit und Ersetzen des Mediums z. T. kompensiert werden wie die Versuchsreihe (Wechsel) mit *C. thermocellum* ATCC 27405^T zeigte. Während ohne Butanol die vorhandene Cellulose von *C. thermocellum* besser abgebaut wurde, als die Hemicellulose-Bestandteile des Substrates, lassen die Ergebnisse der fraktionierten Analyse vermuten, dass bei steigender Butanolkonzentration Cellulose schlechter abgebaut werden kann. Auch für *R. cellulolyticum* DSM 5812^T, der ohne Butanol mehr Hemicellulose abgebaut hat, dreht sich das Verhältnis um.

3.2.2.8 Analyse der Kulturüberstände nach Substratabbau

Um zu analysieren, welche Fermentationsprodukte durch *C. thermocellum* ATCC 27405^T und *R. cellulolyticum* DSM 5812^T auf SC-Substrat gebildet werden, welche Zucker noch vorhanden sind und inwieweit eine Butanolzugabe einen hemmenden Effekt auf die Abbauleistung hat, wurden die Kulturüberstände mit Hilfe von Gas- und Dünnschichtchromatographie untersucht.

Analyse der Zuckerzusammensetzung im Kulturüberstand

In der Analyse der Kulturüberstände nach Abbau von SC-Substrat durch die hier verwendeten cellulolytischen Clostridien ließen sich deutliche Unterschiede erkennen. Während sich in *C. thermocellum* ATCC 27405^T Kulturüberständen hauptsächlich Xylose, Xylobiose und Arabinose akkumulierten, konnte *R. cellulolyticum* DSM 5812^T scheinbar alle durch den Abbau des Substrats freigesetzten Zucker verstoffwechseln.

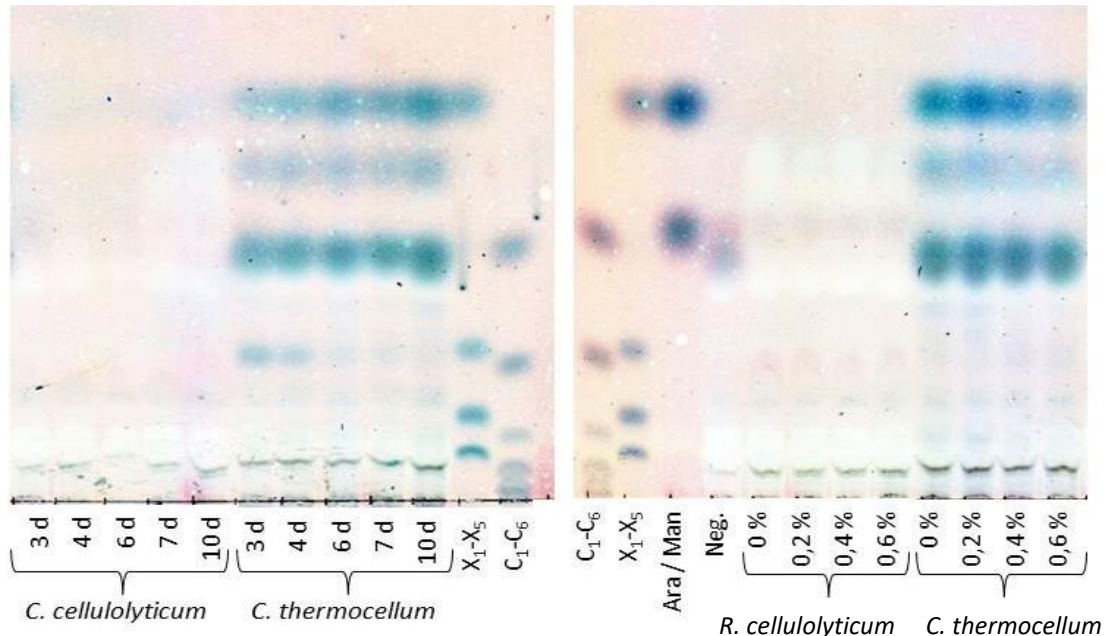


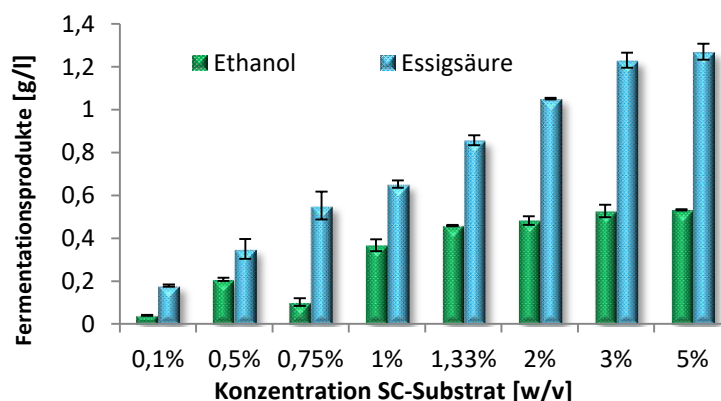
Abb. 17: Dünnschicht-Analyse der Kulturüberstände von *R. cellulolyticum* DSM 5812^T und *C. thermocellum* ATCC 27405^T nach Substratabbau. Als Kontrolle diente unbeimpftes Substrat in Medium (Neg.) sowie 1%ige Zuckermischungen C1-C6 (Glucose, Cellobiose, Cellotriase, Cellotetraose, Cellopentaose und Cellohexaose), X1, X3, X4, X5 (Xylose, Xylotriase, Xylotriase, Xylotriase und Xylopentaose) sowie Arabinose (Ara) und Mannose (Man). Links: Analyse der in Kulturüberstand vorhandenen Zucker nach 3, 4, 6, 7 und 10 Tagen Inkubation; rechts: Analyse der Zucker im Kulturüberstand unter Zugabe von Butanol (v/v) nach 7 Tagen jeweils bei 34 bzw. 60°C; n=2.

Obwohl die Verwertung einzelner Zucker (s. 3.1.1.3) gezeigt hat, dass *C. thermocellum* ATCC 27405^T Glucose als Kohlenstoffquelle nutzen kann, schien das auf dem lignocellulosehaltigen SC-Substrat nur zu einem sehr geringen Anteil zu geschehen, oder erst, wenn keine bevorzugte Quelle mehr verfügbar ist. Xylose und eine Reihe anderer Zucker wurden zwar aus dem komplexen Substrat abgespalten, konnten aber nicht umgesetzt werden. Im deutlichen Gegensatz dazu ließen sich im Kulturüberstand von *R. cellulolyticum* DSM 5812^T keine gelösten Zucker mehr nachweisen, was darauf hindeutet, dass *R. cellulolyticum* DSM 5812^T in der Lage ist verschiedene Zucker als Substrat zu verwenden. Zusammen mit den Ergebnissen der Abbaubersuche mit unterschiedlichen Zuckern ergab sich, dass *C. thermocellum* zwar insgesamt mehr Substrat abbauen kann, aber nur einen Teil davon - vorzugsweise die Cellulose und Cellobiose - auch wirklich nutzt, während *R. cellulolyticum* DSM 5812^T etwas weniger Substrat abbauen kann und auch langsamer, dafür aber alle entstandenen Zucker verwertet.

Analyse der Fermentationsprodukte auf SC-Substrat

Die gaschromatographische Analyse der Kulturüberstände ergab, dass sowohl für *C. thermocellum* ATCC 27405^T als auch für *R. cellulolyticum* DSM 5812^T bei deren jeweiliger Optimaltemperatur vergleichbare Mengen Ethanol und Essigsäure auf Whatman Papier, Cellobiose und SC-Substrat (je 2 %; vergl. Abb. 9) gebildet wurden, wenn berücksichtigt wird, dass nur etwa 40 % des SC-Substrats abgebaut und genutzt wird. Ein hauptsächlicher Unterschied lag darin, dass auf SC-Substrat weniger Isobutanol gebildet wurde als auf Cellulose oder Cellobiose und dass die Umsetzung des komplexeren Substrats deutlich länger dauerte. Die finale Menge an produzierten Alkoholen war für beide cellulolytischen Clostridien in etwa vergleichbar; allerdings benötigte *R. cellulolyticum* DSM 5812^T auf SC-Substrat deutlich länger, um diese Menge Alkohol zu produzieren (s. Abb. 9). SC-Substratkonzentrationen über 2 % ließen sich nicht mehr mittels Van-Soest-Analyse untersuchen, weil die dafür vorhandenen Reaktionsgefäße für das Volumen des Substrats zu klein waren. Im analysierbaren Bereich bis 2 % ließ sich jedoch erkennen, dass je höher die gewählte Substratkonzentration, desto geringer blieb der prozentuale Abbau (s. Anhang VII).

Abb. 18: Fermentationsprodukte für *C. thermocellum* ATCC 27405^T nach 7 Tagen bei 60°C auf unterschiedlichen Konzentrationen SC-Substrat von 0,1 - 5,0 % (w/v); n=2 ± SD.



3.3 Umsetzung von Mühlennebenprodukten zu Butanol durch solventogene Clostridien

Neben Stroh, das unvorbehandelt als Substrat für die cellulolytischen Clostridien *C. thermocellum* ATCC 27405^T und *R. cellulolyticum* DSM 5812^T verwendet wurde (s. o.), fallen bei der Verarbeitung von Weizen auch weitere so genannte Mühlennebenprodukte an. So entstehen bei der Vermahlung der Getreidekörner zu Mehl Nebenprodukte wie z.B. Kleie, Grießkleie sowie Nach- und Futtermehle (Abb. 19). Die darin enthaltenen Zucker liegen nicht frei vor, sondern sind größtenteils in Polymeren gebunden (z. B. Stärke, Pektin, β -1,3-1,4-Glukan, Xylan), die für eine fermentative Verwertung zu Mono- und Oligosacchariden abgebaut werden müssen.

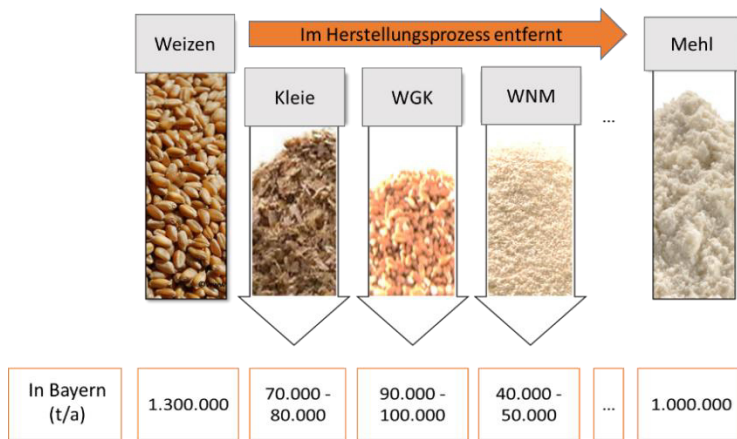


Abb. 19: Übersicht über die hauptsächlichsten Nebenprodukte der Weizenmehlherstellung und ihre Verfügbarkeit in Bayern. WGK, Weizengrießkleie; WNM, Weizennachmehl; Zusammensetzung: s. Anhang XI

Dieser hydrolytische Abbau von komplexen oder gemischten Kohlenstoffen kann von einigen solventogenen Clostridien durch eine Vielzahl ausgeschiedener Enzyme (Depolymerasen wie Amylase, Pektin-Lyase, Endo-Glukanase, α - oder β -Glukosidase etc.) selbst durchgeführt werden. Nur für die schwer aufschließbaren Substratanteile wie z. B. die Cellulose ist eine Vorbehandlung notwendig. Als Alternative zur Verwertung der Nebenprodukte aus der Weizenverarbeitung zu Futtermitteln, wurden hier Weizengrießkleie (WGK) und Weizennachmehl (WNM) als Substrate für solventogene Clostridien analysiert (s. Abb. 19 und Anhang XI). Die praktischen Arbeiten und der Abschlussbericht dazu wurden zusammen mit Claudia Held im Rahmen des Verbundprojekts „Gewinnung von Biobutanol als Energieträger und Plattformchemikalie aus Mühlennebenprodukten“ durchgeführt. Die Ergebnisse wurden 2018 auf der internationalen Fachtagung „Clostridium XV“, in Freising vorgestellt (Poster: Panitz *et al.*, 2018) und zusammen mit den Ergebnissen zur enzymatischen Vorbehandlung beider Substrate veröffentlicht [Thieme *et al.*, 2020] (s. IV Veröffentlichungen, Tagungsbeiträge und betreute Arbeiten).

3.3.1 Umsetzung von Weizengrießkleie (WGK)

3.3.1.1 Screening geeigneter Clostridien-Stämme auf Weizengrießkleie

Für alle in Frage kommenden Clostridien aus der lehrstuhleigenen Stammsammlung wurde unvorbehandelte WGK als Substrat (in Grundmedium oder Leitungswasser mit Eisen (II)-Sulfat) zur Butanolproduktion getestet. Etwa die Hälfte der Stämme setzte 13 % WGK (entspricht einer Konzentration von ca. 5 % verwertbarer Kohlehydrate; s. Anhang XII) hauptsächlich zu Buttersäure um und bildete nur geringe Mengen Butanol, Aceton oder Ethanol (s. Anhang XIII). Die Gruppe der jeweils besseren Lösungsmittelproduzenten ist dagegen in der Lage, das komplexe Substrat sowohl in Grundmedium (Abb. 20 a) als auch in Leitungswasser (Abb. 20 b) in mehr als 0,18 % Butanol umzusetzen. Zwölf der hier getesteten Stämme produzierten in Grundmedium auf 13 % WGK bis zu 0,58 % Butanol und – zusammen mit den Beiprodukten Aceton bzw. Ethanol – bis zu 0,9 % Gesamtlösungsmittel.

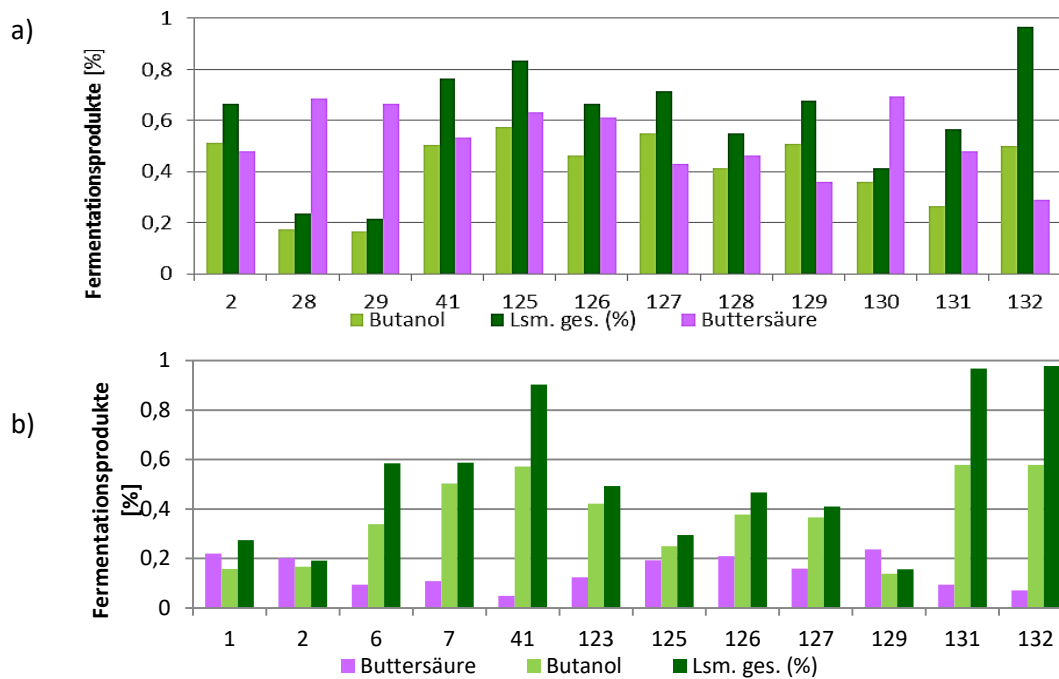


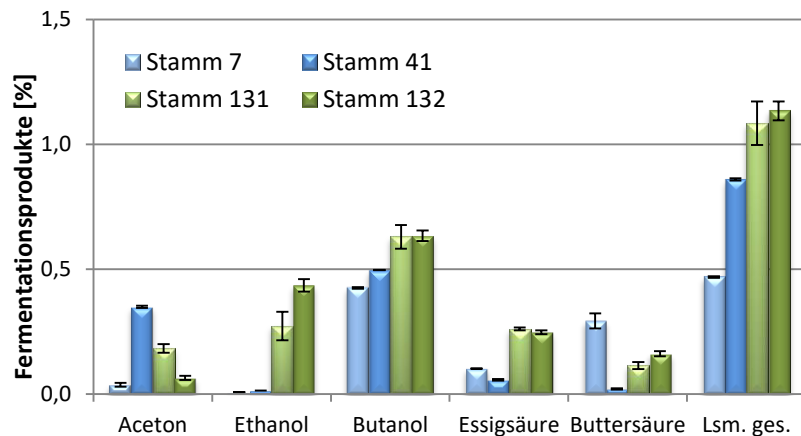
Abb. 20: Fermentationsprodukte [%] der besseren Lösungsmittelproduzenten (> 0,18 % Butanol) beim Screening der Stammsammlung auf 13 % WGK in (a) Grundmedium oder (b) Leitungswasser mit 25 mg/L Fe(II)SO₄ bei 34°C; beispielhaft sind hier die Endpunkte nach 7 Tagen gezeigt.

Für weitere Optimierungen wurden die Stämme 2, 41, 131 und 132 ausgewählt, weil sie neben hohen Butanol- bzw. Gesamtlösungsmittelkonzentrationen ein gut reproduzierbares Wachstumverhalten und eine gute Handhabung boten. Nachdem die meisten für Clostridien nötigen Medienbestandteile bereits in der WGK enthalten sind (vgl. Anhang XI), war eine weitere Reduktion des Mediums auf nur noch Leitungswasser mit Eisen (II)-Sulfat für einige getestete Stämme möglich (s. Abb. 20 b und Anhang XIV). Im direkten Vergleich lässt sich erkennen, dass sich die Menge produzierter Fermentationsprodukte in Abhängigkeit vom ausgewählten Stamm auf Grundmedium und Leitungswasser z. T. deutlich unterschied (Anhang XIV). Eine Kultivierung auf Leitungswasser basierendem Medium war für die Stämme 7, 41, 131 und 132 möglich, ohne die Lösungsmittelproduktion deutlich zu verringern. Keiner der getesteten Stämme bildete in Leitungswasser basierendem Medium mehr als 0,085 % Ethanol (Anhang XIV).

3.3.1.2 Optimierung der Fermentationsbedingungen für WGK ohne Vorbehandlung

Das verwendete Grundmedium wurde hier am Lehrstuhl für solventogene Clostridien ausgearbeitet und ist ein schon auf die minimal nötigen Komponenten zur optimierten Lösungsmittelproduktion reduziertes Medium (s. 2.7.1). Das mit Eisen(II)-Sulfat supplementierte Leitungswasser stellt eine weitere Reduktion des Mediums und damit der Produktionskosten und des nötigen Arbeitsaufwands für einen späteren Prozess dar. In Grundmedium wurden die Stämme 131 und 132 für weite Analysen ausgewählt, in Leitungswasser basierendem Medium die Stämme 7 und 41, von denen Stamm 7 die höhere Butanol-Spezifität besaß (Abb. 21).

Abb. 21: Fermentationsprodukte [%] für die Stämme 7 und 41 in Leitungswasser basiertem Medium (blau) sowie die Stämme 131 und 132 in Grundmedium (grün) nach 96 h bei 34°C auf 13 % WGK; n=2 ± SD.



Eine Verringerung der Substratkonzentration unter 13 % WGK (~ 5 % verwertbare Kohlehydrate) führte zu schlechterem Wachstum und geringerer Butanolbildung. 18 % WGK (~ 7 % verwertbare Kohlehydrate) stellte die höchste analysierbare Substratkonzentration dar (s. Anhang XV) und ergab bis zu 0,67 % Butanol (bzw. 1 % Gesamtlösungsmittel) nach 96 h. Höhere Substratkonzentrationen konnten nicht analysiert werden, weil die Medium-Substrat-Mischung bereits bei 18 % WGK fest war, was durch Verkleisterung des Substrats beim Autoklavieren in Flüssigkeit zustande kommt. Um WGK durch solventogene Clostridien in deutlich mehr als 10 g/l Gesamtalkohol umzusetzen, ist offensichtlich eine Vorbehandlung des Substrats notwendig. Anhand der Kinetik-Werte in Anhang XV lässt sich außerdem erkennen, dass ein Großteil der Fermentationsprodukte bereits nach 48 Stunden produziert worden waren, sodass sich die Fermentationsdauer noch deutlich verkürzen ließe.

3.3.2 Umsetzung von Weizennachmehl (WNM)

3.3.2.1 Screening der Stammsammlung auf Weizennachmehl

Als erster Überblick wurden alle solventogenen Clostridien aus der Stammsammlung auf 7,2 % WNM (entspricht ca. 5 % verwertbarer Kohlenhydrate, s. Anhang XII) in Grundmedium und in Leitungswasser mit 25 mg/l Eisen(II)-Sulfat auf Ihre Butanolproduktion hin gescreent. Auch dieses Substrat wurde von einem Teil der Stämme v.a. zu Buttersäure umgesetzt während Butanol (weniger als 0,5 % in 120 h), Aceton oder Ethanol nur als Beiprodukte gebildet wurden (Anhang XVI). Die übrigen Stämme (Abb. 22) sind dagegen in der Lage, das Substrat innerhalb von 96 Stunden zu Butanolkonzentrationen von 0,67 bis 0,9 % umzusetzen. Die Gesamtlösungsmittelkonzentration liegt bei diesen Stämmen zwischen 0,9 und 1,2 %, wobei neben Butanol hauptsächlich Aceton produziert wurde. In Grundmedium wurden die Stämme 2, 7, 129 und 132 zur weiteren Optimierung der Fermentationsbedingungen ausgewählt, in Leitungswasser basiertem Medium die Stämme 6, 7, 41 und 132.

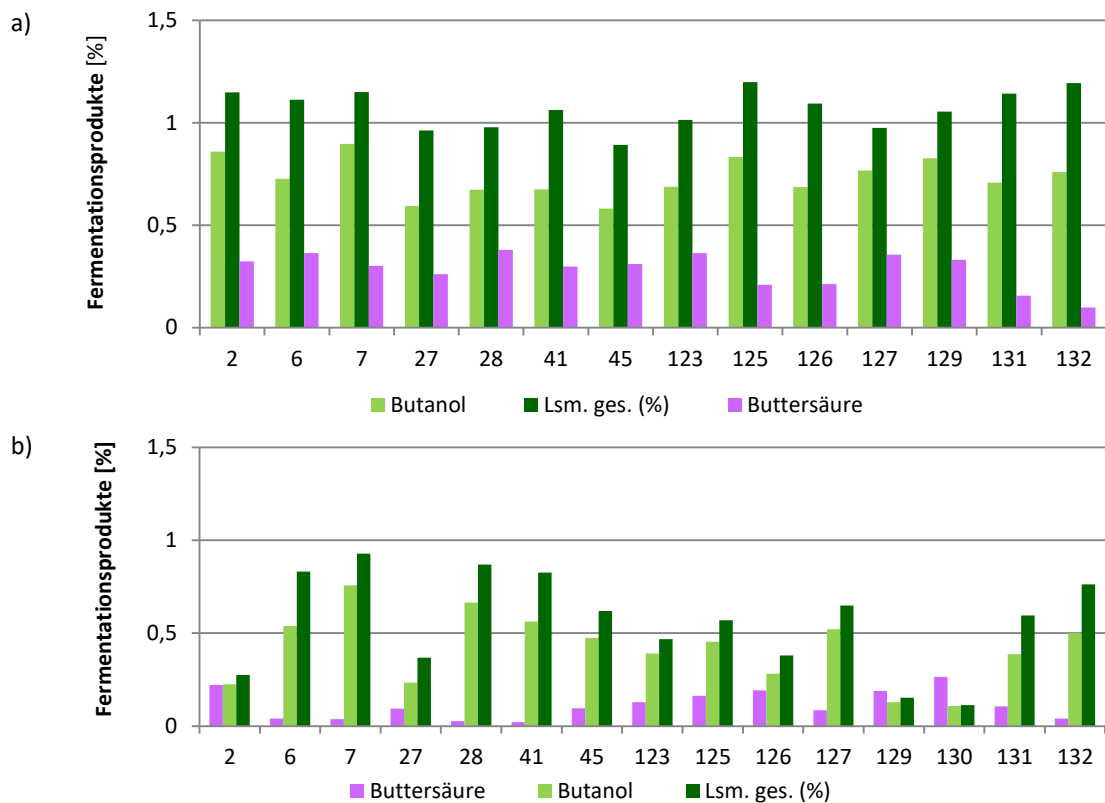


Abb. 22: Fermentationsprodukte [%] der besseren Lösungsmittelproduzenten (> 0,6 % Butanol) nach dem Screening der Sammlung auf 7,2 % WNM nach 96 h bei 34°C in a) Grundmedium oder b) Leitungswasser basiertem Medium; beispielhaft sind hier die 4 Tage Werte gezeigt.

3.3.2.2 Optimierung der Fermentationsbedingungen für WNM ohne Vorbehandlung

Im direkten Vergleich lässt sich erkennen, dass die Stämme 7, 28, 41 und 45 auch in Leitungswasser basiertem Medium noch vergleichbare Konzentrationen an Lösungsmitteln produzieren, wie in Grundmedium (Abb. 23, bspw. Stamm 7).

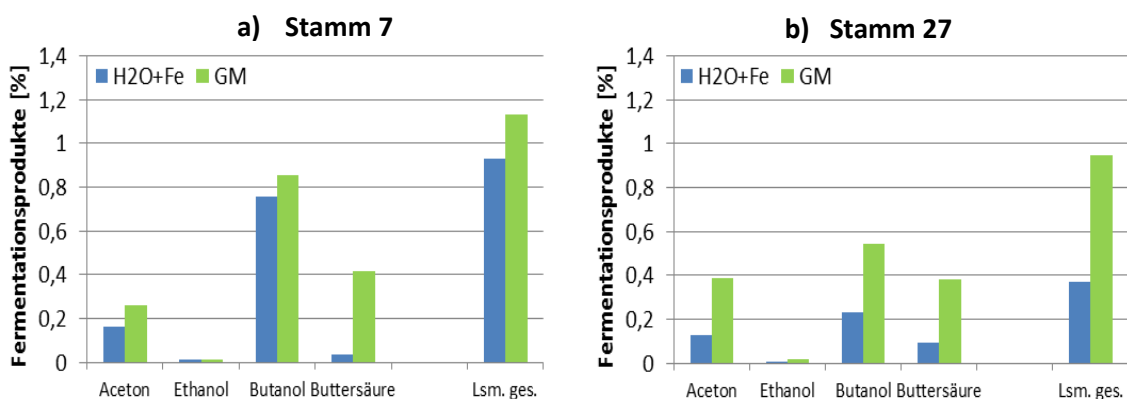


Abb. 23: Direkter Vergleich der Fermentationsprodukte [%] auf 7,2 % WNM für die Stämme 7 (a) und 27 (b) bei 34°C in Grundmedium (grün) oder Leitungswasser basiertem Medium (blau); beispielhaft sind hier die Endpunkte nach 7 Tagen gezeigt.

Alle anderen Stämme bildeten in Grundmedium deutlich mehr Alkohol (Abb. 23, bspw. Stamm 27). Die restlichen Abbildungen für diesen Versuch sind im Anhang XVII dargestellt. Eine Ver-

längerung der Inkubationszeit über 48 h brachte zumeist nur noch eine geringfügige Veränderungen der finalen Lösungsmittelkonzentrationen, was auch eine weitere Optimierung der Kultivierungszeit erlauben würde (Abb. 24 zeigt Stamm 2 in Grundmedium und Stamm 132 in Leitungswasser basiertem Medium; alle weiteren Ergebnisse sind in Anhang XVIII zu finden).

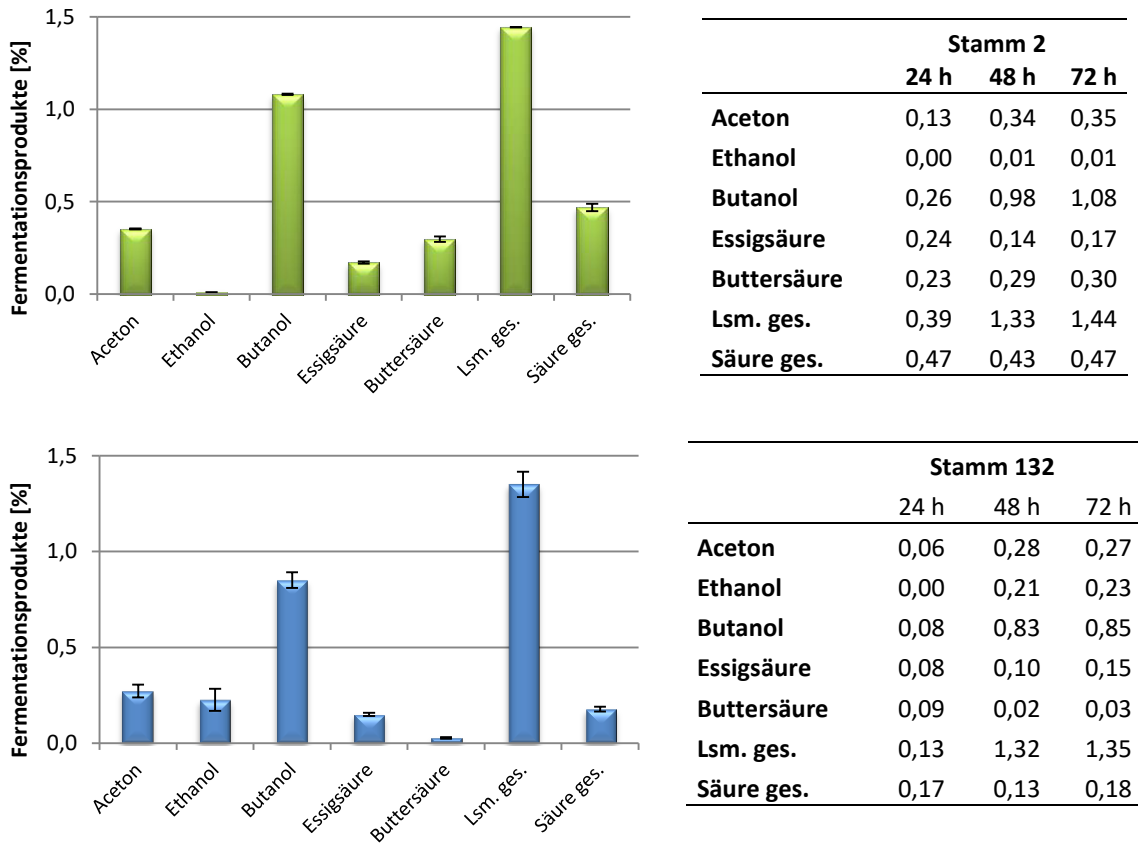


Abb. 24: Fermentationsprodukte [%] für Stamm 2 (oben in grün) in Grundmedium und Stamm 132 (unten in blau) in Leitungswasser basiertem Medium auf 13,5 % WNM nach 72 Stunden bei 34 °C; als Vergleich auch die Mittelwerte nach 24 und 48 h Inkubation; n=2 ± SD.

Um zu untersuchen, ob eine Substratsättigung und damit eine Limitierung der maximal möglichen Lösungsmittelproduktion eintritt, wurden ausgewählte Stämme in Grundmedium auf steigenden Substratkonzentrationen (1,6 - 15,8 %) kultiviert und die Fermentationsprodukte nach 72 h analysiert. Die Einzelwerte der Messungen und die Graphen für alle analysierten Stämme befinden sich in Anhang XIX. Dieser Versuch wurde mit den jeweils 4 besten Stämmen sowohl in Grundmedium als auch in Wasser auf 7,2 %, 9,9 %, 12,3 % und 14,7 % Weizennachmehl wiederholt (Abb. 25 a) zeigt Stamm 2). Die entsprechenden Diagramme für alle weiteren Stämme befinden sich in Anhang XX. Die Stämme 2 und 7 zeigten hier keine Substratsättigung bis 14,7 %, die Stämme 129 und 132 dagegen eine Sättigung ab ca. 12,3 % WNM und produzieren bei 14,7 % WNM gleichviel bzw. nur geringfügig mehr Butanol.

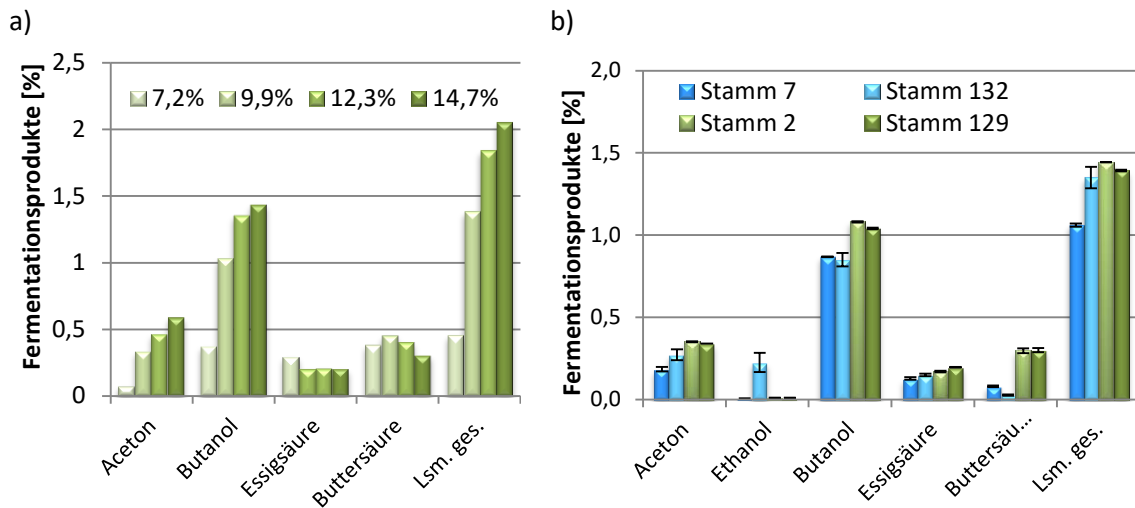


Abb. 25: Fermentationsprodukte [%] ausgewählter Stämme auf a) steigenden Substratkonzentrationen für Stamm 2 in Grundmedium auf 7,2 % bis 14,7 % WNM; beispielhafte Daten nach 72 h aus einer Kinetik bei 34°C oder b) auf 13,5 % WNM für die Stämme 7 und 132 in Leitungswasser basiertem Medium und für die Stämme 129 und 132 nach 72 h in Grundmedium; n=2 ± SD.

Keiner der getesteten 4 Stämme zeigte in Leitungswasser basiertem Medium eine Substratsättigung (allerdings bei niedrigerem Niveau der erzielten Fermentationsprodukte). In Grundmedium wurden nach 72 Stunden 0,76 - 1,15 % Butanol und 1,39 - 1,65 % Gesamtlösungsmittel gebildet (nach 96 h: 0,85 - 1,44 % Butanol und 1,39 - 2,05 % Gesamtlösungsmittel). In Leitungswasser basiertem Medium wurden nach 72 Stunden 0,85 - 0,93 % Butanol und 1,14 - 1,51 % Gesamtlösungsmittel produziert (nach 96 h: 0,9 - 1,13 % Butanol und 1,51 - 1,88 % Gesamtlösungsmittel).

3.4 Rekombinante Darstellung des Butanol-Stoffwechselwegs

Solventogene Clostridien nutzen den sogenannten CoA-abhängigen Stoffwechselweg zur Butanolbildung, in dem Butyryl-CoA aus Acetyl-CoA synthetisiert und anschließend zu 1-Butanol reduziert wird (s. Abb. 1). Dafür sind hauptsächlich die Gene des BCS-Operons verantwortlich, die sich innerhalb der lösungsmittelproduzierenden Clostridien in ihrer Länge und den abgeleiteten Aminosäuresequenzen sehr ähnlich sind. Auch im Vergleich mit den entsprechenden Genen aus weiter entfernten Clostridien lässt sich noch ein hoher Konservierungsgrad feststellen. Die verschiedenen für den Butanol-Stoffwechselweg zur Verfügung stehenden Wege und die Sequenzen der jeweiligen Gene bzw. Proteine wurden verglichen und die Unterschiede genauer analysiert. Besondere Aufmerksamkeit galt dabei den 5 Genen, die zusammen das polycistronische BCS-Operon bilden (s. Abb. 2) und deren Promotorregion; zusätzlich wurden

auch die Gene für die Thiolasen und die (Aldehyd-/)Alkohol-Dehydrogenasen verglichen. Um verschiedene Wege nutzen zu können und anhand der dadurch gebildeten Fermentationsprodukte Rückschlüsse ziehen zu können, wurden unterschiedlich aufgebauter Shuttle-Plasmide (Tab. 11) verwendet, um *C. thermocellum* ATCC 27405^T und *R. cellulolyticum* DSM 5812^T damit zu transformieren. Dabei wurden sowohl unterschiedliche Quellen für die Butyryl-CoA-Synthese (BCS-Operon o.ä.) und die Alkohol-Dehydrogenasen sowie Kombinationen davon analysiert, die im Folgenden näher erklärt sind.

Tab. 11: Überblick über die zur Transformation verwendeten Shuttle-Plasmide und deren Aufbau

Plasmid	Butyryl-CoA-Synthese	Thiolase	Aldehyd-DH	Alkohol-DH	siehe
<i>pHYc-BCS</i> ¹⁾	BCS Cac, <i>P_{endo}</i>	-	-	-	
<i>pHYc-BCS-thl</i> ¹⁾	BCS Cac, <i>P_{endo}</i>	<i>thlA</i> Cac	-	-	
<i>pHYc-BCS-thl-adhE1</i> ²⁾	BCS Cac, <i>P_{endo}</i>	<i>thlA</i> Cac	<i>adhE1</i> Cac		3.4.1
<i>pHYc-BCS-thl-adhE2</i> ²⁾	BCS Cac, <i>P_{endo}</i>	<i>thlA</i> Cac	<i>adhE2</i> Cac		
<i>pMW1</i> ³⁾	<i>crt, bcd, hbd</i> (Cac), <i>etfA/B</i> (Clj), <i>P_{ptb}</i>	<i>thlA</i> Cac	<i>ald</i> Cbei	<i>bdhB</i> Cac	3.4.2
<i>pMW2</i> ³⁾	<i>crt, bcd, hbd</i> (Cac), <i>etfA/B</i> (Clj), <i>P_{ptb}</i>	<i>thlA</i> Cac	<i>adhE</i> Cac		
<i>pIMP-thl-ter</i> ²⁾	<i>crt, hbd</i> (Cac), <i>ter</i> (Tde, angepasst an Cac), <i>P_{endo}</i>	<i>thlA</i> Cac	-	-	3.4.4
<i>pIMP-thl-ter_{mut}</i> ²⁾	<i>crt, hbd</i> (Cac), <i>ter</i> (Tde, angepasst an Cac); <i>P_{endo}</i> Rex-BS verändert	<i>thlA</i> Cac	-	-	

¹⁾[Berezina *et al.*, 2010]; ²⁾diese Arbeit; ³⁾[Wensche, 2013]; Cac: *C. acetobutylicum*; Clj: *C. ljungdahlii*; Cbei: *C. beijerinckii*; Tde: *T. denticola*

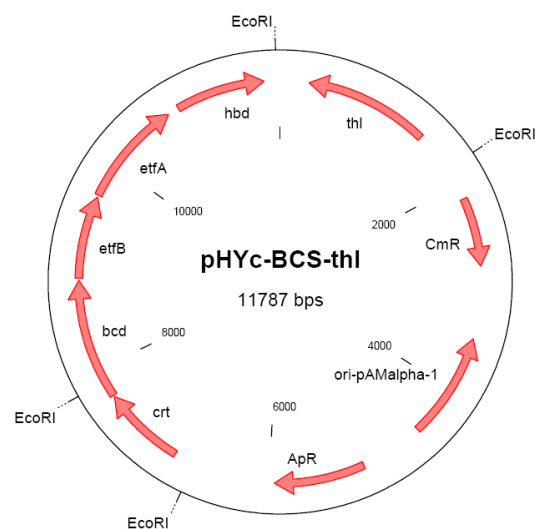
3.4.1 Die Plasmide *pHYC-BCS* und *pHYC-BCS-thl* und darauf basierende Varianten

Genklonierungen in Clostridien erfolgen gängiger Weise über die Konstruktion von Schaukelvektoren, die sowohl für *E. coli* als auch für Gram-positive Bakterien Replikons und Antibiotika-Resistenzen tragen. Diese Vorgehensweise erleichtert den Klonierungsprozess, da die Methoden zur genetischen Manipulation in *E. coli* gut etabliert sind und eine große Zahl an Techniken und Stämmen zur Verfügung steht. Viele der für Clostridien konstruierten Vektoren enthalten das Replikon des *Bacillus subtilis* Plasmids *pIM13* [Azeddoug *et al.*, 1992], aber auch Replikons von *Staphylococcus*-Plasmiden finden häufig Verwendung [Mermelstein *et al.*, 1992].

3.4.1.1 *pHYc-BCS* und *pHYc-BCS-thl*

Die beiden Schaukelvektoren *pHYc-BCS* und *pHYc-BCS-thl* [Berezina *et al.*, 2010], die das BCS-Operon aus *C. acetobutylicum* ATCC 824 und im zweiten Fall auch noch dessen Thiolase A Gen enthalten, waren bereits am Lehrstuhl vorhanden und konnten direkt nach Etablierung einer Transformationsmethode für *C. thermocellum* ATCC 27405^T eingesetzt werden. Die Plasmide *pMW1* und *pMW2* aus Ulm mussten dort zunächst synthetisiert und dann um einen Gram-positiven Replikationsursprung ergänzt werden. Um sowohl das mit dem Plasmid *pIMP1* ausgearbeitete Transformationsprotokoll als auch die anschließenden Nachweissysteme zu testen, wurde deswegen anfangs mit *pHYc-BCS* und *pHYc-BCS-thl* gearbeitet (s. Abb. 26).

Abb. 26: Das Shuttle-Plasmid *pHYc-BCS-thl* trägt sowohl das komplette BCS-Operon (mit den Genen *crt* (Crotonase), *bcd* (Butyryl-CoA-Dehydrogenase), den Genen für die Elektronentransfer-Flavoproteine *etfA* und *etfB* sowie *hbd* (3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase) als auch das Gen *thl* für eine Thiolase aus *C. acetobutylicum* ATCC 824. Außerdem besitzt es einen Replikationsursprung (*ori-p15A*) und eine Ampicillin-Resistenz für *E. coli* (*ApR*), einen Gram+ Replikationsursprung (*ori-pAM α 1*) und eine Thiamphenicol-Resistenz (*CmR*) für Clostridien. *pHYc-BCS* ist analog aber ohne das Gen für die Thiolase aufgebaut [Berezina *et al.*, 2010].

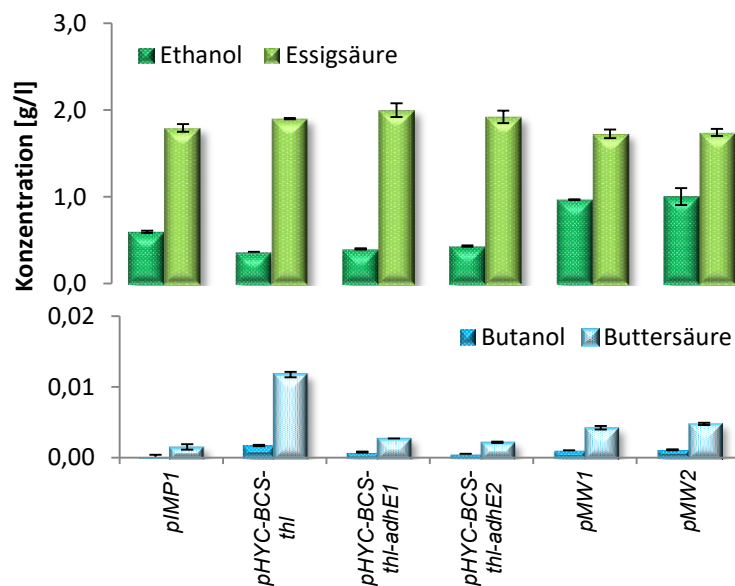


3.4.1.2 *pHYc-BCS-thl-adhE1* und *pHYc-BCS-thl-adhE2*

Um zu klären, ob zusätzliche Gene für eine erhöhte Butanol-Produktion nötig sind, wurden die bifunktionalen Aldehyd-/Alkohol-Dehydrogenasen AdhE1 und AdhE2 (jeweils unter deren endogenen Promotor) aus *C. acetobutylicum* ATCC 824 in das Plasmid *pHYc-BCS-thl* integriert (*pHYc-BCS-thl-adhE1* und *-adhE2*). Zur Konstruktion von *pHYc-BCS-thl-adhE1* wurde *pHYc-BCS-thl* mit XhoI verdaut und das 11.787 bp große Fragment dephosphoryliert und aufgereinigt. Das 3090 bp große Insert wurde mit den Primern *adhE-Sall-for* und *adhE-Sall-rev* (s. Tab. 8) von genomischer DNA aus *C. acetobutylicum* ATCC 824 amplifiziert und mit Sall verdaut. Die Konstruktion von *pHYc-BCS-thl-adhE2* verlief analog dazu mit dem Unterschied, dass für die PCR-Amplifikation die entsprechenden Primer *adhE2-Sall-for* und *adhE2-Sall-rev* (s. Tab. 8) verwendet wurden. Die finalen Konstrukte *pHYc-BCS-thl-adhE1* und *pHYc-BCS-thl-adhE2* hatten eine Größe von 14.869 bp bzw. 14.877 bp.

Fermentationstests mit anaerob gezogenen *E. coli* Zellen ergaben, dass Kulturen mit dem Plasmid *pHYC-BCS-thl* die höchsten Butanolkonzentrationen zeigten, während ein zusätzliches Gen für eine Aldehyd-/Alkohol-Dehydrogenase in diesen Plasmiden in erster Linie zu einem schlechteren Wachstum der Zellen und entsprechend zu geringeren Produktkonzentrationen führte. Die zum Vergleich mitanalysierten Plasmide *pMW1* und *pMW2* zeigten deutlich höhere Ethanolwerte, als *pIMP1* oder die auf *pHYC-BCS-thl* basierenden Plasmide, was eventuell auf die Aldehyd-/Alkohol-Dehydrogenase in Verbindung mit dem konstitutiv exprimierten P_{ptb} Promotor zurückzuführen ist (Abb. 27).

Abb. 27: Fermentationsprodukte von *E. coli* Top10 transformiert mit *pIMP1*, *pHYC-BCS-thl*, *pHYC-BCS-thl-adhE1*, *pHYC-BCS-thl-adhE2*, *pMW1* und *pMW2*, anaerob in GS2 mit 1 % Glucose nach 3 Tagen bei 37°C; n=2 ± SD; die Werte nach 1, 3 und 5 Tagen unterschieden sich nur geringfügig.



3.4.2 Die Plasmide *pMW1* und *pMW2*

Die für einen Großteil der Experimente in dieser Arbeit verwendeten Plasmide *pMW1* und *pMW2* stammen aus der Arbeitsgruppe des Kooperationspartners Peter Dürre von der Universität Ulm [Wensche, 2013]. Die Plasmide *pMW1* und *pMW2* (s. Tab. 7 und Tab. 11) tragen die Gene *thlA* (Thiolase A), *hbd* (3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase), *crt* (Crotonase) und *bcd* (Butyryl-CoA-Dehydrogenase) aus *C. acetobutylicum* DSM 824 und die Gene für die Untereinheiten eines Elektronentransfer-Flavoproteins *etfA* und *etfB* aus *C. ljungdahlii*. Daneben trägt das Plasmid *pMW1* (Abb. 28 a) das Gen *ald* für eine Butyraldehyd-Dehydrogenase aus *C. beijerinckii* und das Gen *bdhB* für eine Butanol-Dehydrogenase aus *C. acetobutylicum*, während in *pMW2* (Abb. 28 b) stattdessen das Gen *adhE* für eine bifunktionale Butyraldehyd-/Butanol-Dehydrogenase ebenfalls aus *C. acetobutylicum* eingefügt ist. Diese Plasmide wurden jeweils um einen Replikationsursprung für Gram-positive Organismen (*repL*) sowie um die Erythromycin-Resistenz (*ermC*) ergänzt, um so als *Shuttle*-Plasmide auch in Clostridien verwendet werden zu können [Wensche, 2013].

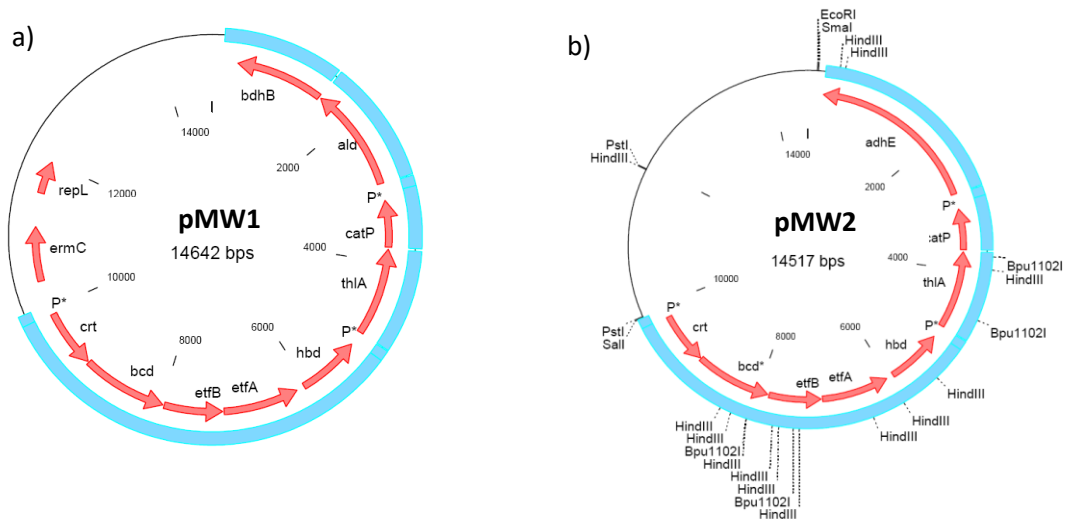


Abb. 28: Die Plasmide *pMW1* und *pMW2* [Wensche, 2013]. Die Gene *thIA* (Thiolase A), *hbd* (3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase), *crt* (Crotonase) und *bcd* (Butyryl-CoA-Dehydrogenase) stammen aus *C. acetobutylicum*, die Gene *etfA* und *etfB* aus *C. ljungdahlii*. Daneben trägt das Plasmid *pMW1* (a) das Gen *ald* (Butyraldehyd-Dehydrogenase) aus *C. beijerinckii* und das Gen *bdhB* (Butanol-Dehydrogenase) aus *C. acetobutylicum*, während in *pMW2* (b) stattdessen das Gen *adhE* (bifunktionale Butyraldehyd/Butanol-Dehydrogenase) aus *C. acetobutylicum* integriert ist. Außerdem sind in Abb. 28 b) die HindIII-, Sall-, SmaI-, PstI-, EcoRI- und Bpu1102I-Schnittstellen eingezeichnet.

In *pMW1* und *pMW2* sind die Gene des BCS-Operons sowie die Thiolase und auch die Aldehyd- bzw. Alkohol-Dehydrogenasen jeweils unter P_{ptb} , den konstitutiv exprimierten Promotor des Phosphotransbutyrylase-/Butyrat-Kinase Operons aus *C. acetobutylicum* gestellt, von dem zu erwarten war, dass er zu einer durchgehend hohen Expression führt. Anaerob in *E. coli* Kulturen transformiert konnte mit beiden Plasmiden *pMW1* und *pMW2* (Abb. 29), eine deutlich höhere Ethanol-, Buttersäure- und Butanolkonzentration nachgewiesen werden, als in der Kontrolle *pIMP1* (die dieselbe Antibiotikaresistenz und denselben Replikationsursprung trägt). Wobei die Konzentrationen für Buttersäure und Butanol aber sehr gering waren.

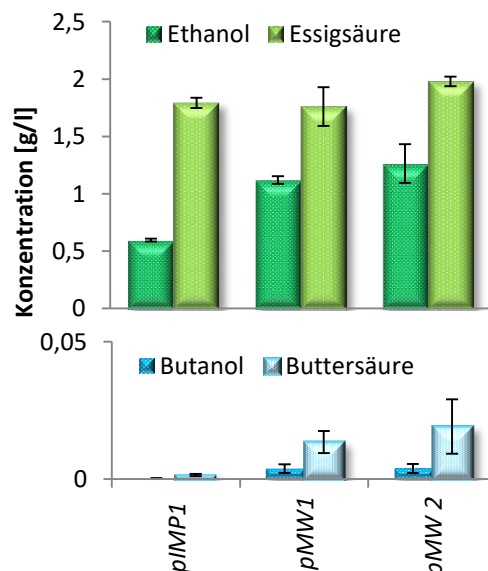


Abb. 29: Fermentationsprodukte von *E. coli* Top10 transformiert mit *pIMP1*, *pMW1*, *pMW2*, anaerob in GS2 mit 1 % Glucose nach 3 Tagen bei 37°C; n=2 ± SD.

3.4.3 Sequenzanalyse des BCS-Operons von *Clostridium tetanomorphum* GT6

Bisher veröffentlichte Versuche, Butanol rekombinant über den CoA-abhängigen Stoffwechselweg solventogener Clostridien zu produzieren, führten zu nur sehr geringen Butanolmengen [Atsumi *et al.*, 2008b, Inui *et al.*, 2008, Steen *et al.*, 2008, Nielsen *et al.*, 2009, Berezina *et al.*, 2010, Chen *et al.*, 2013]. Deswegen wurden in mesophilen Anreicherungskulturen von Naturproben auf dem vom Projektpartner Südchemie (jetzt Clariant) zur Verfügung gestellten

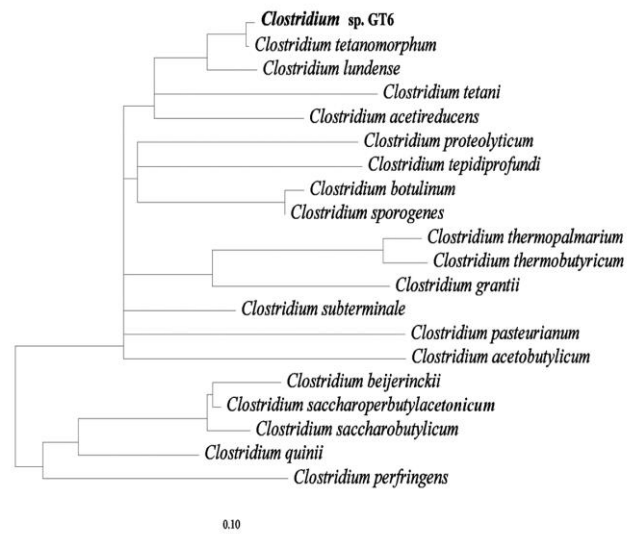


Abb. 30: Phylogenetische Einordnung des Isolats *C. tetanomorphum* GT6.

Substrat nach geeigneten Butanolproduzenten gesucht, die als mögliche Spender für die Gene aus dem Butanol-Stoffwechselweg fungieren könnten. Als besonders vielversprechender Kandidat ging das Isolat *C. tetanomorphum* GT6 aus diesen Analysen hervor (Abb. 30). Die Analyse der Fermentationsprodukte von *C. tetanomorphum* GT6 [Panitz *et al.*, 2014] ergab, dass GT6 eine Vielzahl von Substraten metabolisieren kann und dabei ausschließlich Butanol und Ethanol produziert, aber kein Aceton (vgl. Anhang XXI). Die Acetonproduktion ist in den bekannten solventogenen Clostridien direkt an die Rückumwandlung von Buttersäure zu Butyryl-CoA gebunden (vgl. Abb. 1). Diese Reduktion der Produktbreite würde entsprechend die spezifische Ausbeute von Butanol erhöhen. Es bestand die Hoffnung, dass diese Besonderheit durch Unterschiede in den Genen des Butanol-Stoffwechselwegs begründet sein könnte, was auch für eine rekombinante Produktion von Butanol in solventogenen Clostridien interessant wäre.

Die Ergebnisse zu *C. tetanomorphum* GT6 wurden mit Hilfe von Sabrina Stürzl und Trang Pham erarbeitet, auf der internationalen Fachtagung „Clostridium XI“, in San Diego, 2010 vorgestellt (s. IV Veröffentlichungen, Tagungsbeiträge und betreute Arbeiten) und zusammen mit den Sequenzanalysen (s. u.) veröffentlicht [Panitz *et al.*, 2014]. In Anhang XXI findet sich eine Zusammenfassung der Ergebnisse zu den Fermentationsanalysen mit *C. tetanomorphum* GT6 auf verschiedenen Substraten, während im Folgenden nur auf die Sequenzen des BCS-Operons eingegangen wurde. Das BCS-Operon von *C. tetanomorphum* GT6 und dessen flankierende Bereiche wurden mittels unspezifischer Primer (2-Step-gene Walking PCR, [Pillhofer *et al.*, 2007]) von genomischer DNA amplifiziert, sequenziert (ACC: HE660044) und analysiert.

Wie in anderen lösungsmittelproduzierenden Clostridien auch, besteht das BCS-Operon von GT6 aus den Genen *hbd* für eine 3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase (Hbd; EC 1.1.1.157), *crt* für eine 3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydratase oder Crotonase (Crt; EC 4.2.1.17) und *bcd* für eine Butyryl-CoA-Dehydrogenase (Bcd; EC 1.3.8.1) in Kombination mit den Genen *etfA/B* für die Untereinheiten eines Elektronentransfer-Flavoproteins (EtfA/B) (Abb. 31). Die Sequenzen, die für *C. tetanomorphum* GT6 als auch für die nahe verwandten *C. tetanomorphum* Stämme DSM 4474^T, DSM 528 und DSM 665 erhalten wurden, sind bei GenBank unter den Nummern HE662759, HE660044, HE662753, HE662754, HE662755, HE662756, HE662757 und HE662758 abrufbar.



Abb. 31: Das BCS-Operon von *C. tetanomorphum* GT6 besteht aus den Genen für Crotonase (*crt*), Butyryl-CoA Dehydrogenase (*bcd*), A und B Untereinheiten des Elektronentransfer-Flavoproteins (*etfA* / *etfB*) und der 3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase (*hbd*). Die Positionen der -35 und -10 Promotorbereiche und das Gen für den potenziellen Regulator (*rex*) und dessen Bindestelle (Rex-BS) sind angegeben.

Aus Tab. 12 und dem Vergleich in Anhang XXII ist ersichtlich, dass sich die Aminosäuresequenzen der einzelnen Gene des BCS-Operons von *C. tetanomorphum* GT6 nur geringfügig von den Sequenzen bereits bekannter solventogenen Clostridien unterscheiden und auch die Reihenfolge der Gene im Operon dieselbe ist [Boynton *et al.*, 1996, Berezina *et al.*, 2009, Panitz *et al.*, 2014]. Mit den entsprechenden Genen aus *C. acetobutylicum* ATCC 824, *C. beijerinckii* CIMB 8052, *C. pasteurianum* DSM 525, und *C. tetani* E88 zeigt GT6 eine 69-93 %ige Übereinstimmung bzw. eine 80-96 %ige Ähnlichkeit (BLASTX) in der Aminosäuresequenz der einzelnen Proteine des BCS-Operons. Durch Analyse der Sequenz des BCS-Operons von *C. tetanomorphum* GT6 wurde außerdem eine theoretische Regulations-Bindestelle vor dem BCS-

Tab. 12: Übereinstimmung/Ähnlichkeit (BLASTX) der Aminosäuresequenz in % der Proteine Crt, Bcd, EtfB, EtfA und Hbd und eines potentiellen Regulators (Rex) aus GT6 und verwandten Clostridien.

Gen	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	<i>C. tetani</i> E88	<i>C. beijerinckii</i> CIMB 8052	<i>C. pasteurianum</i> DSM 525
<i>rex</i>	71/85	82/91	70/84	73/83
<i>crt</i>	75/88	83/91	72/86	73/85
<i>bcd</i>	84/92	91/97	77/88	87/94
<i>etfB</i>	77/88	86/93	69/80	80/89
<i>etfA</i>	70/84	73/85	67/83	71/85
<i>hbd</i>	80/92	88/95	93/96	84/92

Operon gefunden, die anschließend auch in *C. acetobutylicum* ATCC 824 und einigen anderen solventogenen Clostridien nachgewiesen werden konnte [Panitz *et al.*, 2014]. Es wird vermutet, dass das BCS-Operon von einem „*redox-sensing transcriptional repressor*“ Protein (Rex) reguliert wird, dessen Bindestelle sich direkt vor dem Gen für Crotonase in der Promotorregion des BCS-Operons befindet. Dieser Regulator soll an einer invertierten palindromischen Sequenz (5' TTTGTTAN6TAACAAT 3') an die DNA binden. Eine Blast-Analyse in anderen Clostridien bestätigte die Position der putativen Bindestelle, da die Sequenz stark konserviert zu sein scheint (Abb. 32).

	-35	-10	+1		
<i>C. saccha</i>	<u>ATTGCAA</u> ATAATTAAGTAAGTAT <u>TATAAT</u> TTTAAT <u>T</u>			-31N-	<u>TTGTTATAATATTAACAAA</u>
<i>C. beijer</i>	<u>ATTGCAA</u> ATAATCTAGGAACGTAT <u>TATAAT</u> TTTAAT <u>T</u>			-33N-	<u>TTGTTATATATTAAACAAT</u>
<i>C. acetob</i>	<u>ATTGAAA</u> TATAAAATAAATCATTA <u>TATAAT</u> AATTATA			-30N-	<u>TTGTTATAATATTAACAAT</u>
<i>GT6</i>	<u>GTTGAAA</u> AATAAATCATTAAAGTAT <u>TATAAT</u> AAAAATA			-30N-	<u>TTGTTATATATTAAACAAA</u>
<i>C. tetani</i>	<u>ATTGAAA</u> AATAAACAGATAGAGTA <u>TATAAT</u> TGTATTT			-30N-	<u>TTGTTATAATATTAACAAA</u>
<i>B. subtil</i>					<u>ATTGTCATGAATTCACAAT</u>
<i>S. aureus</i>					<u>TTGTAANNNTTCACAA</u>

Abb. 32: Sequenz der Promotorregion und einer potentiellen Rex-Bindestelle stromaufwärts des BCS- Operons von *C. tetanomorphum* GT6, *C. acetobutylicum* ATCC 824, *C. beijerinckii* CIMB 8052, *C. tetani* E88, und *C. saccharobutylicum* DSM13864 . Die -35 und -10 Sequenz der Promotorregion (fett) und die `direct repeats` der Rex-Operator-Region (ROP) sind unterstrichen und zum Vergleich auch für *Bacillus subtilis* und *Staphylococcus aureus* dargestellt.

3.4.4 Ersetzen von *bcd/etfA/etfB* durch *ter* aus *Treponema denticola*

Ein möglicher Grund für die geringe Butanolproduktion der transformierten *C. thermocellum* ATCC 27405^T Kulturen könnte sein, dass der Komplex aus Bcd und dem Elektronenüberträger EtfA/B in *C. thermocellum* ATCC 27405^T und *R. cellulolyticum* DSM 5812^T nicht oder schlechter funktioniert. In *C. acetobutylicum* und auch in *C. ljungdahlii*, aus dem die Sequenzen der Gene für *etfA/B* auf den Plasmiden *pMW1* und *pMW2* stammen, ist die Funktion der Enzyme BCD und EtfA/B miteinander und an Hydrogenasen als weitere Reaktionspartner funktionell geknüpft [Li *et al.*, 2008]. Nachdem diese Reaktionspartner rekombinant evtl. nicht kompatibel mit den Proteinen aus *C. acetobutylicum* bzw. *C. ljungdahlii* sind, wäre es vermutlich einfacher, wenn statt des Komplexes aus BCD und EtfA/B nur ein Enzym diesen Schritt übernehmen könnte, das NADH direkt nutzt. Aus *Treponema denticola* ist eine Trans-2-Enoyl-CoA-Reductase (Ter; EC 1.3.1.44) bekannt, die diese eigenständig Aufgabe erfüllt und für die es in *R. cellulolyticum* DSM 5812^T mit Ccel_2273 sogar ein orthologes Enzym (mit 50 % Aminosäure- Sequenz-übereinstimmung und 69 % ähnlichen Aminosäuren; s. Anhang XXIII gäbe). Für den Fall, dass ein Plasmid mit der Kombination aus *crt*, *ter* und *hbd* in *C. thermocellum* ATCC 27405^T zu einer

deutlich höheren Butanolproduktion führt, könnte dasselbe auch in *R. cellulolyticum* DSM 5812^T (dann eventuell ohne *ter* aus *T. denticola*) analysiert werden. Wenn das Genprodukt des zu *ter* orthologen Gens *Ccel_2273*, dieselbe oder eine ähnliche Funktionalität und Spezifität hätte, müssten nur noch Gene für Crt und Hbd sowie evtl. zusätzlich eine Thiolase und eine Aldehyd-/Alkohol-Dehydrogenase eingefügt werden, um Butanol aus Lignocellulose zu produzieren. Die Analyse der dafür konstruierten Plasmide *pIMP1-thl-ter* und *pIMP1-thl-ter_{mut}* (vgl. Tab. 11) ergab in *E. coli* keine deutlichen Unterschiede in den produzierten Fermentationsprodukten zwischen *pIMP1* und den um *crt*, *ter*, *hbd* und *tlw*. um *thl* erweiterten Plasmiden. Nichts desto trotz konnten in den Kulturen mit den Plasmiden *pIMP1-thl-ter* und *pIMP1-thl-ter_{mut}* geringe Butanolkonzentrationen nach 144 h anaerober Inkubation nachgewiesen werden (s. Anhang XXIV). Die Transformation in *C. thermocellum* ATCC 27405^T ergab jedoch geringere Butanolkonzentrationen als die, die bereits für *pMW1* und *pMW2* nachgewiesen werden konnten. Weitere Versuche mit *C. thermocellum* ATCC 27405^T und *R. cellulolyticum* DSM 5812^T mit und ohne die Verwendung von *ter* statt *bcd* und *etfA/B* wurden aus Zeitgründen nicht unternommen, stellen jedoch eine Möglichkeit für eine Optimierung des verwendeten Stoffwechselwegs zur Butanolproduktion dar.

3.5 Transformation cellulolytischer Clostridien mit den Genen für den Butanol-Stoffwechselweg

Für die Genklonierung in Clostridien gibt es nur eine überschaubare Zahl an Schaukelvektoren, die sowohl in *E. coli* als auch in Clostridien verwendet und so für deren genetische Modifikation eingesetzt werden können. Weitere Schwierigkeiten bei der Transformation von Clostridien stellen deren starke DNase-Aktivität [Lin & Blaschek, 1984] sowie rigide artspezifische Restriktions-/Modifikationssysteme dar [Mermelstein *et al.*, 1992]. Anhand der Genomsequenzen verschiedener *C. thermocellum* Stämme wird vermutet, dass es noch eine Reihe weiterer Restriktions-/Modifikations-Systeme gibt [Guss *et al.*, 2012]. Bereits bekannt ist ein *Mbol* Restriktionssystem, das durch die Dam⁺ Methylierung in vielen *E. coli* Stämmen blockiert werden kann, wobei eine gleichzeitige Dcm⁺ Methylierung die Transformationsraten wieder verschlechtert [Klapatch *et al.*, 1996, Guss *et al.*, 2012]. Auch für *R. cellulolyticum* DSM 5812^T ist mit *MspI* bereits ein Restriktions-/Modifikations-System bekannt, so dass die Plasmid-DNA entsprechend *in-vitro* methyliert werden konnte [Jennert *et al.*, 2000].

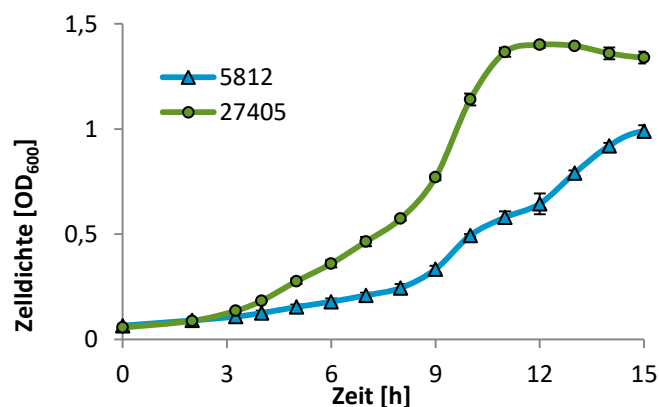
3.5.1 Selektionsmarker, Kulturbedingungen und mögliche Schaukelvektoren für die Transformation

Zu den Vorversuchen für die Transformation gehörte die Analyse geeigneter Antibiotika und eine genaue Bestimmung des Kulturwachstums, um die Zellen zur richtigen Zeit ernten, vorbehandeln und anschließend transformieren zu können. Die Tests möglicher Antibiotika für *C. thermocellum* ATCC 27405^T und *R. cellulolyticum* DSM 5812^T ergaben, dass Erythromycin und auch dessen Analogon Clarithromycin sehr gut geeignet sind. Das *Em*-Resistenzgen auf den verwendeten Plasmiden *pMW1* und *pMW2* vermittelt eine Resistenz gegen diese beiden Makrolid-Antibiotika, die die Proteinbiosynthese an den Ribosomen hemmen. Dabei ist zu beachten, dass die Expression der *Em*-Resistenz einen posttranskriptionalen Regulationsmechanismus beinhaltet, der zu einer verzögerten Expression führen kann, was durch eine längere Inkubationszeit in Gegenwart von unerschwelligen Antibiotikakonzentrationen ausgeglichen wurde. Hauptsächlich wurde das temperatur- als auch säurestabilere Clarithromycin verwendet.

Zwei weitere Plasmide, *pHYc-BCS* und *pHYc-BCS-thl*, die zur Transformation von *R. cellulolyticum* DSM 5812^T und *C. thermocellum* ATCC 27405^T verwendet wurden, besitzen ein Gen für eine Chloramphenicolresistenz. Chloramphenicol und dessen Analogon Thiamphenicol hemmen die Proteinsynthese der Zellen durch Hemmung der Peptidyltransferase in der Elongationsphase. Hier wurde v.a. Thiamphenicol verwendet, weil bekannt ist, dass in einigen Clostridien Chloramphenicol inaktiviert werden kann [O'Brien & Morris, 1971].

Um für die Transformation von Clostridien den jeweils exakten Zeitpunkt abschätzen zu können, wurden Wachstumskinetiken für *R. cellulolyticum* DSM 5812^T und *C. thermocellum* ATCC 27405^T durchgeführt. Bei immer gleicher Vorgehensweise konnte mit Hilfe dieser Daten relativ genau abgeschätzt werden, wann sich die Zellen in der am besten geeigneten Phase zur Zugabe von zellwandaufweichenden Reagenzien (hier: Isoniacid bei OD₆₀₀ ~ 0,15) und dann auch zur Transformation befinden (s. Abb. 33 und vgl. 3.1).

Abb. 33: Wachstumskurve von *R. cellulolyticum* DSM 5812^T und *C. thermocellum* ATCC 27405^T in GS2 mit 0,5 % Cellobiose bei 34°C bzw. 60°C, angeimpft auf eine Start-OD₆₀₀ von 0,05; unter Zugabe von 20 µg/ml Isoniazid bei einer OD₆₀₀ von 0,15; n=2 ± SD.



3.5.2 Etablierung einer geeigneten Elektroporations-Methode für *C. thermocellum* ATCC 27405^T und *R. cellulolyticum* DSM 5812^T

Ausgehend von bereits bekannten Transformationsmethoden für solventogene Clostridien [Reysset & Sebald, 1985, Oultram *et al.*, 1988, Lee *et al.*, 1992, Mermelstein & Papoutsakis, 1993, Birrer *et al.*, 1994], *C. perfringens* [Phillips-Jones, 1990], *C. thermocellum* Stämme [Tyurin *et al.*, 2004, Guss *et al.*, 2012] und *R. cellulolyticum* DSM 5812^T [Tardif *et al.*, 2001, Guedon *et al.*, 2002a], wurde eine geeignete Transformationsmethodik (vgl. 2.11) entwickelt, um die Gene des Butanol-Stoffwechselweges in einem cellulolytisch aktiven Clostridium zu exprimieren. Neben der Elektroporation wurden auch Protokolle zur Konjugation (beschrieben für *R. cellulolyticum* DSM 5812^T [Jennert *et al.*, 2000]) und zur genetischen Veränderung mittels Protoplasten mit anschließender Protoplasten-Regeneration untersucht. Es zeigte sich jedoch, dass die Elektroporation, angelehnt an die Methode von Tyurin [Tyurin *et al.*, 2004], auch ohne den dort verwendeten und speziell angefertigten Puls-Generator und die entsprechenden Küvetten für *C. thermocellum* ATCC 27405^T und *R. cellulolyticum* DSM 5812^T mit einem handelsüblichen Elektroporationsgerät (BioRad) funktioniert und weiterführende Versuche mit den anderen beiden Methoden nicht nötig waren.

Während die Transformationen von *C. thermocellum* ATCC 27405^T mit dem „leeren“ Shuttle-Vektor *pIMP1* zu einer vergleichsweise guten, wenn auch erwartungsgemäß niedrigen, Transformations-Effizienz von ca. 4000 cfu/μg DNA führte, konnten mit den später verwendeten sehr großen Plasmiden (die zusätzlich die Gene für den Butanol-Stoffwechselweg enthielten) nur eine Effizienz von bis zu 200 cfu/μg DNA erreicht werden. Die schlechte Transformierbarkeit der cellulolytischen Clostridien liegt zum einen an ihrer geringen Transformationseffizienz in Kombination mit der niedrigen Plattierungseffizienz von ca. 5-10 % und zum anderen an der enormen Größe der Plasmide. Während *pIMP1* etwa 4,8 kb groß ist, liegen die in diesem Projekt verwendeten Plasmide durch die Anzahl der eingefügten Gene im Größenordnungsbereich zwischen 14 und 19 kb. Bereits die Transformation in verschiedene *E. coli* Stämme (zur Gewinnung einer ausreichenden Menge Plasmid-DNA für die Transformation der Clostridien), ergab sehr viel niedrigere Transformationsraten als mit dem vergleichsweise immer mit transformierten *pIMP1*.

Auch die Isolierung der Plasmide mit den Genen für den Butanol-Stoffwechsel aus *E. coli* Zellen mit handelsüblichen Miniprep-Kits verschiedener Hersteller (Qiagen, Promega, Axygene) lieferte trotz aller zusätzlichen Maßnahmen, die die Aufreinigung großer Plasmide verbessern sollten, meist nur DNA-Konzentrationen im Bereich von ca. 200 ng/μl. Das oft beschriebene

Erhitzen des Wassers oder TE-Puffers zum Eluieren der Plasmid-DNA von den Säulchen verringerte die Transformationseffizienz nochmals und wurde im Weiteren nicht mehr durchgeführt. Ein weiteres Problem stellte der Nachweis und die Isolation der großen Plasmide aus den transformierten Kulturen von *C. thermocellum* ATCC 27405^T dar. Außer für die vergleichsweise kleinen Plasmide *pIMP1* sowie *pIMP1-crt-ter-hbd* und *pIMP1-crt-ter_{mut}-hbd* konnte die aus den transformierten Clostridien isolierte Plasmid-DNA nicht erfolgreich in *E. coli* retransformiert werden, um sie dort durch Restriktionsanalysen auf ihre Vollständigkeit hin zu untersuchen. Der PCR-Nachweis auf Plasmidisolierungen (beste Ergebnisse: Promega SV Miniprep Kit) oder Gesamt-DNA mit spezifischen Primern (s. Tab. 8) funktionierte für die meisten der Gene auf den Plasmiden dagegen gut. Für diese Art der Analyse konnten jedoch nur Plasmid-DNA aus mehrfach überimpften Einzelkolonien verwendet werden, um auszuschließen, dass durch die PCR DNA-Fragmente aus der Transformation nachgewiesen wurden.

3.5.3 Transformation von *R. cellulolyticum* DSM 5812^T und *C. thermocellum* ATCC 27405^T mit den Plasmiden *pHYc-BCS* und *pHYc-BCS-thl* und daraus entwickelten Konstrukten

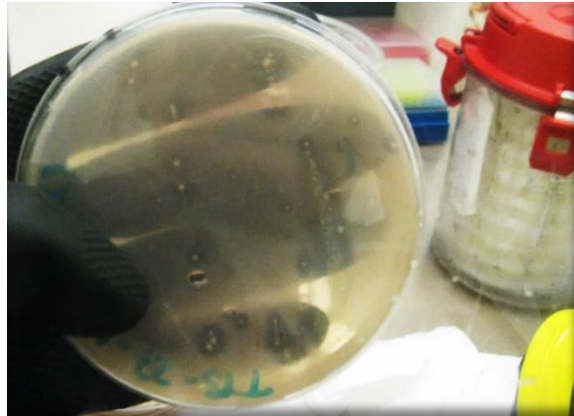
Um sowohl das mit dem Plasmid *pIMP1* ausgearbeitete Transformationsprotokoll als auch die anschließenden Nachweissysteme zu testen, wurde anfangs mit den Plasmiden *pHYc-BCS* und *pHYc-BCS-thl* [Berezina *et al.*, 2010] gearbeitet (s. 3.4.1).

3.5.3.1 *pHYc-BCS* und *pHYc-BCS-thl*

Die Plasmide *pHYc-BCS* und *pHYc-BCS-thl* wurden sowohl in *R. cellulolyticum* DSM 5812^T als auch in *C. thermocellum* ATCC 27405^T eingefügt. Im Gegensatz zu den ersten Transformationen mit dem Schaukelvektor *pIMP1*, der sich nach Optimierung der Bedingungen recht zuverlässig sowohl in *C. thermocellum* ATCC 27405^T als auch in *R. cellulolyticum* DSM 5812^T transformieren, vereinzeln und nachweisen ließ, stellten die Plasmide *pHYc-BCS* und *pHYc-BCS-thl* eine deutlich größere Herausforderung dar. Die geringe Transformations- und Plattierungseffizienz erschwerte die Isolation von Transformanten erheblich. Um trotzdem analysierbare Transformanten zu erhalten, wurde der gesamte Transformationsansatz nach der Elektroporation zunächst zur Regeneration und für die ersten Verdopplungsschritte 24 h (*C. thermocellum* ATCC 27405^T) bzw. 48 h (*R. cellulolyticum* DSM 5812^T) in 5 ml Flüssigmedium mit 0,5 % MN301 und 0,4 % Cellobiose sowie Thiamphenicol (10 µg/ml) überführt. Anschließend wurde davon einmal 0,5 ml und einmal 2,5 ml (Rest für Kontrollen ohne Antibiotikum bzw. ohne MN301) mit einem Cellulose-Overlay (flüssiger Agar ca. 40°C mit 0,5 % MN301 und 10 µg/ml Thiamphenicol) ge-

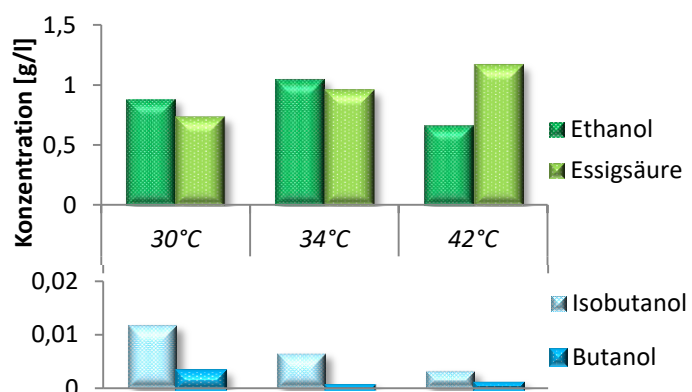
mischt und auf Selektionsplatten eingegossen. Transformanten konnten einfach an einem durchsichtigen Halo im milchigtrüben Agar um die elipsenförmig wachsende Bakterienkolonie (Abb. 34) identifiziert und vereinzelt werden, so dass sicher gegangen werden konnte, dass nur cellulolytisch aktive Transformanten selektiert wurden. *C. thermocellum* ATCC 27405^T Transformanten wurden bei 60°C inkubiert, *R. cellulolyticum* DSM 5812^T Transformanten bei Raumtemperatur, um die Expression der evtl. toxisch wirkenden Proteine durch möglichst suboptimale Temperaturen vorerst so niedrig wie möglich zu halten.

Abb. 34: Selektionsplatte mit *C. thermocellum* ATCC 27405^T-pMW1 Kolonien eingegossen in Cellulose-Overlay; fotografiert nach 7 Tagen bei 60°C; GS2-Agar mit 0,5 % Cellulose-Overlay mit 4 µg/ml Clarithromycin; transformierte, cellulolytisch aktive Kolonien sind durch durchsichtige Hallos erkennbar; im Hintergrund der Anaerobentopf zur Inkubation der Platten.



Gepickte Einzelkolonien wurden nochmals vereinzelt und anschließend bei unterschiedlichen Temperaturen in Flüssigkultur überführt und analysiert. Dadurch konnten für beide cellulolytische Clostridien Transformanten isoliert werden, die bis zu 0,003 g/l Butanol produzierten (Abb. 35). Es bestand jedoch die Hoffnung, dass durch eine zusätzliche Aldehyd- und Alkohol-Dehydrogenase höhere Werte zu erzielen wären. Die GC-MS-Analyse der Kulturüberstände (s. Anhang XXV) ergab, dass neben den bereits identifizierten Produkten noch Isobuttersäure 2,3-Butandiol und Buttersäureethylester sowie 2-Methylbutansäure bzw. 2-Methylhexansäure gebildet wurden.

Abb. 35: Fermentationsprodukte von *R. cellulolyticum* DSM 5812^T-pHYC-BCS-thl; anaerob in GS2 mit 2 % Cellobiose und 10 µg/ml Thiamphenicol bei 30, 34 und 42°C; beispielhaft sind die 7-Tage Werte gezeigt; hier und auch im Folgenden erfolgte die Darstellung von Butanol und z. T. auch von Isobutanol in separaten Diagrammen, entsprechend ihrer niedrigeren Konzentrationen verglichen mit Ethanol und Essigsäure.



3.5.3.2 *pHYC-BCS-thl-adhE1* und *pHYC-BCS-thl-adhE2*

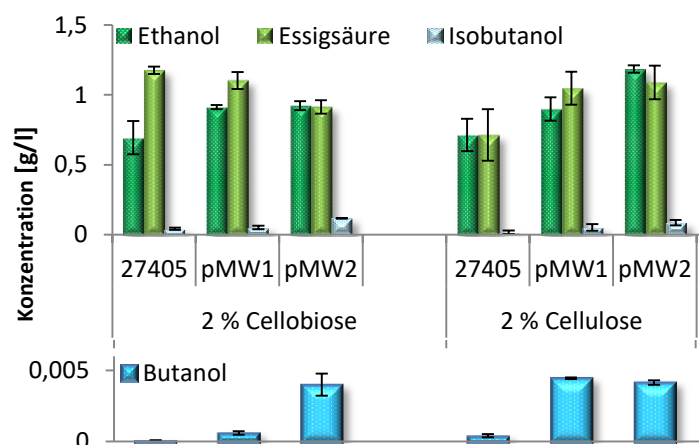
Sowohl *C. thermocellum* ATCC 27405^T als auch *R. cellulolyticum* DSM 5812^T wurden mit dem Plasmiden *pHYC-BCS-thl-adhE1* und *pHYC-BCS-thl-adhE2* (vgl. 3.4.1.2) transformiert, wobei nur für *C. thermocellum* ATCC 27405^T ein Anwachsen beider Transformationsansätze gezeigt werden konnte. In den *C. thermocellum* ATCC 27405^T Transformanten mit *pHYC-BCS-thl-adhE1* konnte eine geringe Menge Butanol nachgewiesen werden, die aber deutlich unter den Ergebnissen der Transformationen mit den Plasmiden *pMW1* (*ald + bdhB*) und *pMW2* (*adhE1*) lag. Nachdem sich darüber hinaus gezeigt hatte, dass die bereits endogen vorhandenen Alkohol-Dehydrogenasen ausreichen, um die letzten beiden Schritte im Butanol-Stoffwechsel zu katalysieren (vgl. 3.5.4.3), wurde mit diesen Plasmiden nicht weitergearbeitet.

3.5.4 Transformation von *R. cellulolyticum* DSM 5812^T und *C. thermocellum* ATCC 27405^T mit den Plasmiden *pMW1* und *pMW2*

3.5.4.1 Transformationen mit *pMW1* und *pMW2*

Durch die mit den Plasmiden *pHYC-BCS-thl* und *pHYC-BCS-thl-adhE1/2* gesammelten Erfahrungen, wurden alle Transformationsansätze mit *pMW1* und *pMW2* auf unterschiedliche Temperaturen aufgeteilt, um das Anwachsen der Transformanten zu erleichtern bzw. die Expression der Proteine vorerst zu behindern (und damit die Bildung z.T. toxischer Zwischen- oder Endprodukte). Trotzdem konnte nur bei 60°C für *C. thermocellum* ATCC 27405^T Transformanten isoliert werden und nicht bei den ebenfalls getesteten niedrigeren Temperaturen. Um ein Anwachsen der Kulturen zur Analyse der Fermentationsprodukte zu erleichtern, wurden sie gegebenenfalls 12-16 h bei 60°C inkubiert, und erst in Anschluss auch bei niedrigeren Temperaturen (meist 42°C) kultiviert. Bei 60°C konnten in den Transformanten ca. 0,004 g/l Butanol sowie erkennbar höhere Mengen Isobutanol und Ethanol auf 2 % Cellulose bzw. Cellobiose produziert werden als im WT (Abb. 36).

Abb. 36: Fermentationsprodukte von *C. thermocellum* ATCC 27405^T und von Transformanten mit den Plasmiden *pMW1* und *pMW2* auf 2% Cellobiose oder 2% Cellulose nach 4 Tagen; isolierte Einzelkulturen wurden 1:50 in GS2 mit 4 µg/ml Clarithromycin angeimpft und anschließend 4 Tage bei 60°C inkubiert sowie als Kontrolle untransformierte Kulturen (ohne Antibiotikum); n=2 ± SD.



Für *R. cellulolyticum* DSM 5812^T waren selbst nach einer vorhergehenden kurzen Inkubation in Flüssigmedium keine cellulolytisch aktiven Kolonien auf den Selektions-Platten erkennbar. Daraufhin wurde die Hälfte jedes Transformationsansatzes direkt in Soft-Agar mit 0,5 % Cellulose (MN301) eingegossen, während die andere Hälfte weiter in Flüssigkultur gehalten wurde. Nach 2-3 Tagen konnte für den (nun nicht vereinzelt) Transformationsansatz in Flüssigkultur bei 34°C zwar Butanolbildung nachgewiesen werden, aber ab einer optischen Dichte von OD₆₀₀ ~ 0,2 fingen die transformierten *R. cellulolyticum* DSM 5812^T-Zellen an zu lysieren, so dass auch nach mehrfachen Versuchen keine analysierbaren Einzelkulturen isoliert werden konnten. Deswegen wurden im Folgenden nur die *C. thermocellum* ATCC 27405^T Transformanten mit den Plasmiden *pMW1* und *pMW2* genauer analysiert. Wie in Abb. 36 erkennbar, ließ sich auch im *C. thermocellum* ATCC 27405^T Wildtyp eine sehr geringe Menge Butanol nachweisen, das vermutlich aus der Umsetzung von Buttersäure aus dem Medium stammt; allerdings sind für die Transformanten - insbesondere auf Cellulose - höhere Werte erkennbar.

Um zu überprüfen, wie sich die Menge der Fermentationsprodukte über die Zeit entwickelt, erfolgte eine GC-Analyse der Kulturüberstände nach 2, 4 und 7 Tagen (Abb. 37). Dabei ließ sich erkennen, dass nach 4 Tagen bereits ein Großteil der final detektierten Produkte produziert worden war, während der weitere Anstieg langsamer von Statten ging. Weil sich die Isobutanol- und Butanol-Werte z.T. deutlich unterschieden, wurden in Abb. 37 je zwei unterschiedliche Transformanten mit den Plasmiden *pMW1* und *pMW2* nebeneinander dargestellt.

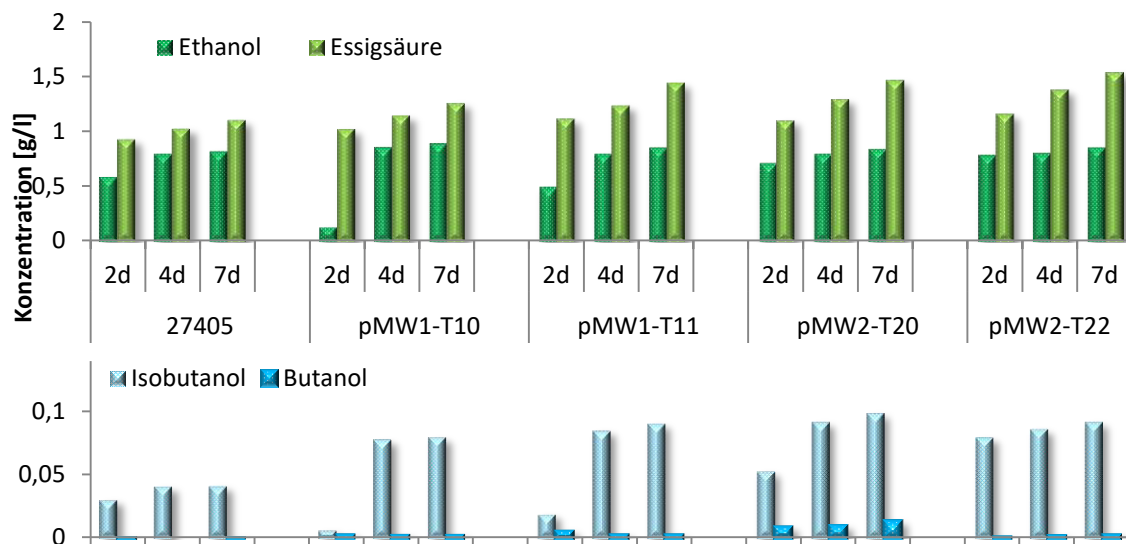


Abb. 37: Fermentationsprodukte von *C. thermocellum* ATCC 27405^T und Transformanten mit den Plasmiden *pMW1* (T10, T11) und *pMW2* (T20, T22) nach 2, 4 und 7 Tagen; 1:50 in GS2 mit 3 % Cellobiose und 4 µg/ml Clarithromycin angeimpft und bei 60°C 2, 4 bzw. 7 Tage inkubiert; gezeigt ist eine beispielhafte Kinetik von 2 isolierten Einzelkulturen je verwendeten Plasmid sowie als Kontrolle *C. thermocellum* ATCC 27405^T (ohne Antibiotikum).

Darüber hinaus wurde im Folgenden eine Reihe von modifizierten Fermentationsbedingungen untersucht, um zu analysieren, ob die Butanolkonzentrationen durch Veränderung der Kultivierungsbedingungen gesteigert werden können. Dabei wurden sowohl verschiedene Medien und Additive als auch unterschiedliche Substrate und Kultivierungstemperaturen analysiert.

3.5.4.2 Analyse der Fermentationsprodukte von *C. thermocellum* ATCC 27405^T - *pMW1* und *pMW2* auf unterschiedlichen Medien

Für *C. thermocellum* ATCC 27405^T und auch für darauf basierende Transformanten wurden verschiedene Medienkombinationen untersucht und die dabei entstandenen Produkte analysiert. Während Isobutanol von den *C. thermocellum* Kulturen selbst - vermutlich aus einer Vorstufe von Valin - gebildet wurde, kann die im Medium vorhandene Buttersäure (aus dem Hefeextrakt) von *C. thermocellum* ATCC 27405^T und beiden Transformanten zu Butanol umgesetzt werden. Entsprechend waren steigende Butanolwerte auf aufsteigenden Hefeextraktkonzentrationen im Medium auch für *C. thermocellum* ATCC 27405^T nachweisbar - allerdings im Bereich der GC-Nachweisgrenze.

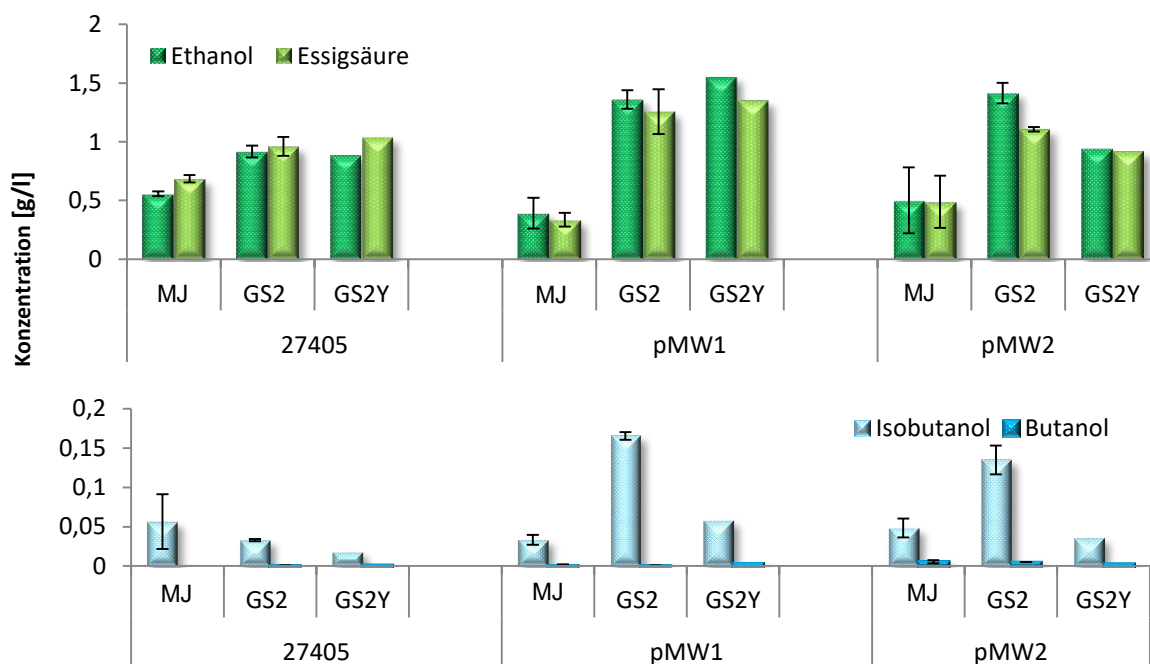


Abb. 38: Fermentationsprodukte von *C. thermocellum* ATCC 27405^T und den Transformanten *C. thermocellum* ATCC 27405^T-*pMW1* und -*pMW2* auf unterschiedlichen Medien mit 2 % Cellulose (Whatman-Paper) nach 4 Tagen bei 42°C (die ersten 16 h bei 60°C); MJ = Minimalmedium (ohne Hefeextrakt); GS2 = Medium mit 6 g/l Hefeextrakt (je n=2 ± SD) sowie GS2Y = wie GS2 Medium aber mit 12 g/l Hefeextrakt, beispielhaft sind hier die 4-Tage Werte gezeigt. Die Transformanten wurden jeweils in Medium mit 4 µg/ml Clarithromycin kultiviert.

Im Vergleich der einzelnen Medien untereinander, wachsen sowohl *C. thermocellum* ATCC 27405^T als auch die Transformanten auf Medium mit 6 g/l Hefeextrakt besser als ohne oder mit der doppelten Menge. Im Gegensatz zu *C. thermocellum* ATCC 27405^T bildeten die Trans-

formanten auch auf Minimalmedium (MJ, ohne Hefeextrakt) geringe Mengen an Butanol sowie Isobutanol. Insbesondere auf GS2 konnte in den Transformanten ca. 4-5-mal mehr Isobutanol nachgewiesen werden, als in *C. thermocellum* ATCC 27405^T. Mehr Hefeextrakt im Medium (GS2Y) führte sowohl im Wildtyp als auch in den Transformanten zu keiner deutlich höheren Butanolproduktion aber verringerte die Isobutanolkonzentration v.a. in den Transformanten deutlich. Es wurden außerdem Analysen der Fermentationsprodukte von *C. thermocellum* ATCC 27405^T Transformanten auf abgewandelten Medien durchgeführt, die sowohl auf die Bedürfnisse solventogener als auch cellulolytischer Clostridien hin ausgerichtet waren. Dabei wurde als Kohlenstoffquelle sowohl Cellobiose als auch Glucose verwendet (Abb. 39).

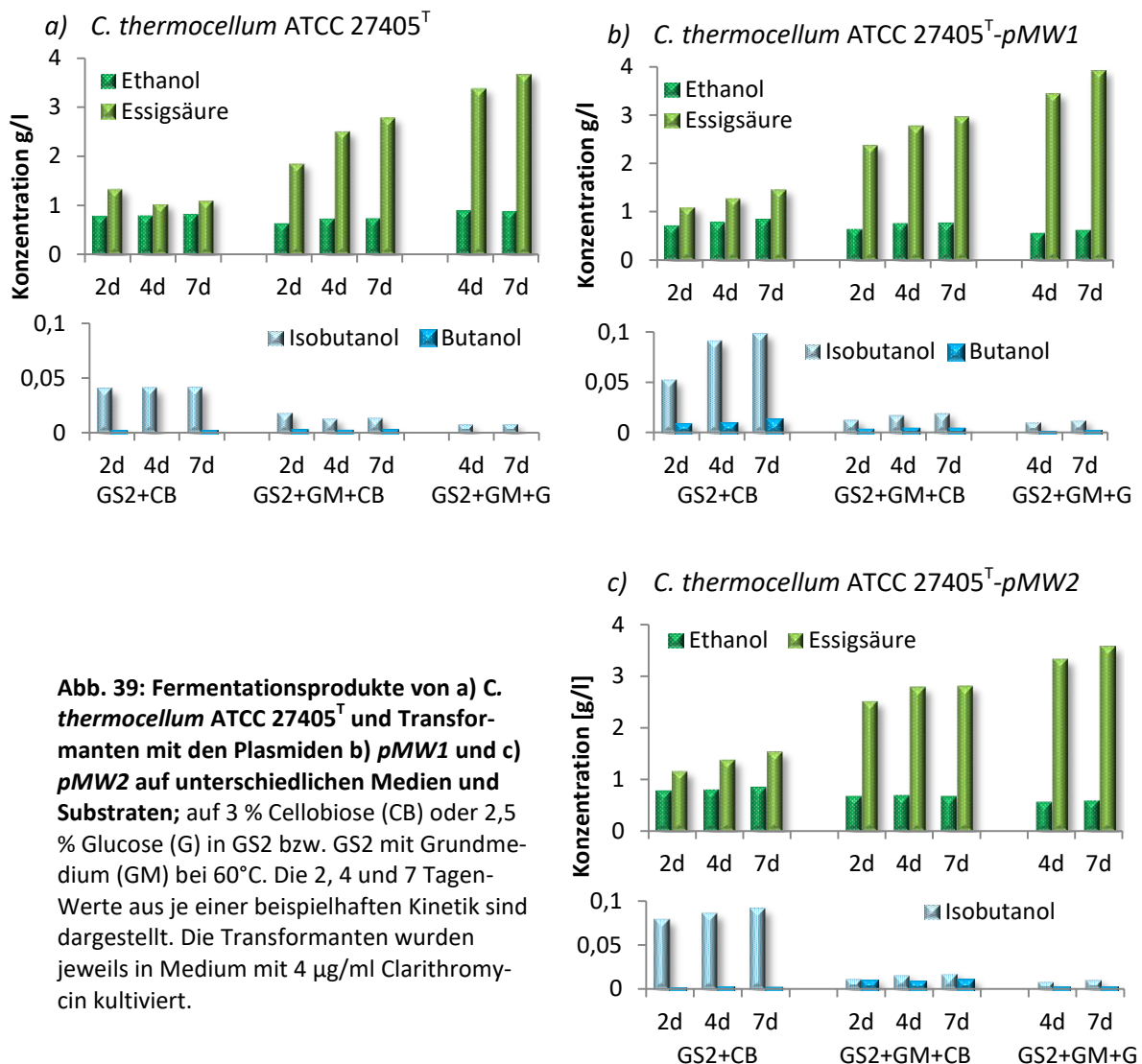


Abb. 39: Fermentationsprodukte von a) *C. thermocellum* ATCC 27405^T und Transformanten mit den Plasmiden b) *pMW1* und c) *pMW2* auf unterschiedlichen Medien und Substraten; auf 3 % Cellobiose (CB) oder 2,5 % Glucose (G) in GS2 bzw. GS2 mit Grundmedium (GM) bei 60°C. Die 2, 4 und 7 Tagen-Werte aus je einer beispielhaften Kinetik sind dargestellt. Die Transformanten wurden jeweils in Medium mit 4 µg/ml Clarithromycin kultiviert.

Diese Tests ergaben jedoch, dass eine Ergänzung des Mediums mit Elementen, die die Butanolproduktion in solventogenen Clostridien deutlich verbessern, wie beispielsweise Eisen(II)-Sulfat oder Ammoniumacetat (beide enthalten in GM), nicht gleichermaßen dafür geeignet schienen,

die rekombinante Butanolproduktion in cellulolytischen Clostridien zu erhöhen. In Abb. 39 lässt sich deutlich erkennen, dass eine Zugabe von Grundmedium in jedem Fall zu einer Reduktion der Isobutanolproduktion führte. Nur für Transformanten mit dem Plasmid *pMW2* konnte durch Zugabe von Grundmedium die Produktion von Butanol verbessert werden, bei gleichzeitig deutlich geringerer Isobutanolproduktion.

3.5.4.3 Analyse von *C. thermocellum* ATCC 27405^T-*pMW1* und -*pMW2* unter Zugabe verschiedener Substanzen

Zugabe von Buttersäure zum Medium

Immer wieder konnten auch in den Kontrollen (*C. thermocellum* ATCC 27405^T und *C. thermocellum* ATCC 27405^T-*pIMP1*) geringe Mengen Butanol detektiert werden, wenn auch deutlich unterhalb der Butanolkonzentration in den Transformanten. Um herauszufinden, ob das in den Kontrollen nachgewiesene Butanol aus der Umsetzung von im Medium enthaltener Buttersäure stammte, wurde Kulturen von *C. thermocellum* ATCC 27405^T und einiger ausgewählter Transformanten Buttersäure zugesetzt und die Kulturüberstände nach 7 Tagen auf 1 % WP und bei 42°C untersucht. Damit ließe sich gleichzeitig klären, ob der zweite Teil des Butanol-Stoffwechselwegs (Butyryl-CoA → Butyraldehyd → Butanol) in *C. thermocellum* bereits vorhanden ist und funktioniert. Die Buttersäure, die anfangs dem Medium in sehr geringen Konzentrationen von 0,001 und 0,01 % (Vol%) zugesetzt wurde, konnte von *C. thermocellum* ATCC 27405^T (WT) und der Kontrolle *C. thermocellum* ATCC 27405^T-*pIMP1* in bis zu 0,0016 g/l und von den Transformanten *C. thermocellum* ATCC 27405^T-*pMW1* und -*pMW2* in bis zu 0,0038 g/l Butanol umgesetzt werden (s. Anhang XXVI). Deutlich Unterschiede in der Menge des produzierten Butanols zwischen dem WT und den Transformanten konnten dabei jedoch nicht nachgewiesen werden, was angesichts der durch das BCS-Operon vermittelten geringen Produktion von Butanol in allen anderen Versuchen auch nicht zu erwarten gewesen war. Erst durch die Zugabe von höheren Buttersäurekonzentrationen (0,1-1 Vol%) zum Medium und durch gleichzeitiges Ausgleichen des pH-Wertes auf 7,0 konnte die Menge des durch *C. thermocellum* ATCC 27405^T produzierten Butanols deutlich auf bis zu 0,18 g/l Butanol (bei 0,1 % zugesetzter Buttersäure) gesteigert werden; höhere Buttersäurezugaben (0,5 %, 0,75 % oder 1 %) führten aber nicht zu mehr Butanol (s. Anhang XXVII).

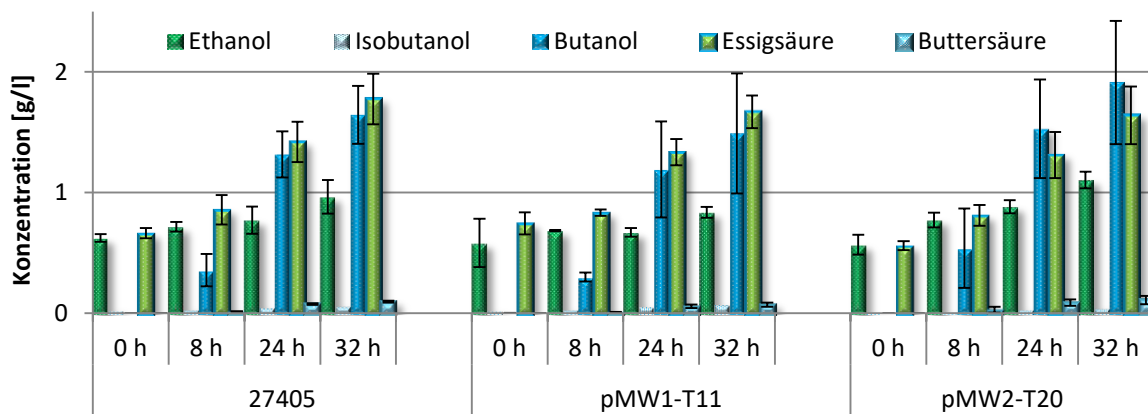
Zugabe von Butyraldehyd oder Isobutyraldehyd

Die Ergebnisse aus der Zugabe von Buttersäure zum Fermentationsansatz lassen vermuten, dass zumindest einige der Alkohol-Dehydrogenasen aus *C. thermocellum* ATCC 27405^T in der Lage sind, Butyryl-CoA bzw. Butyraldehyd zu Butanol umzusetzen und dass es somit eventuell

nicht nötig ist, eine Aldehyd- und eine Alkohol-Dehydrogenase oder eine bifunktionale Aldehyd-/Alkohol-Dehydrogenase in das Plasmid zur Butanolproduktion zu integrieren.

Durch wiederholte Zugabe von 0,1 Vol% Butyraldehyd bzw. Isobutyraldehyd (die durch die oben genannten Enzyme in Butanol bzw. Isobutanol umgesetzt werden sollten) im Abstand von 8 Stunden konnte sowohl in *C. thermocellum* ATCC 27405^T als auch in den beiden hier analysierten Transformanten mit den Plasmiden *pMW1* und *pMW2* vermehrt Isobutanol bzw. Butanol produziert werden (s. Abb. 40). Insbesondere die Zugabe von Butyraldehyd führte aber für alle untersuchten Proben zu einem schlechteren Wachstum der Kulturen.

a) Zugabe von Butyraldehyd



b) Zugabe von Isobutyraldehyd

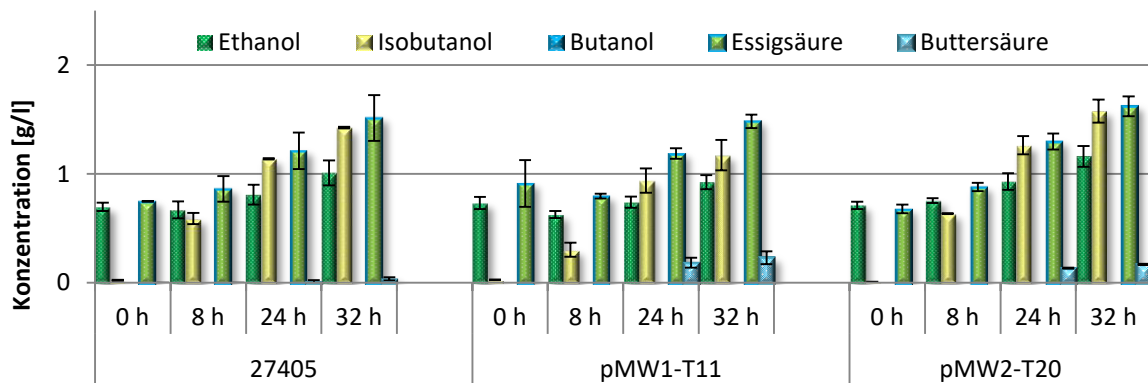


Abb. 40: Analyse der Fermentationsprodukte von *C. thermocellum* ATCC 27405^T, *C. thermocellum* ATCC 27405^T-*pMW1* und -*pMW2* vor (0h), bzw. nach wiederholter Zugabe von a) Butyraldehyd (je 0,1 Vol%) oder b) Isobutyraldehyd (je 0,1 Vol%); in GS2 mit 2 % Cellobiose bei 60°C nach 8, 24 und 32 h zu wachsenden Kulturen; 0h: Start-OD600 ~ 0,8; n=2 ± SD. Die Transformanten wurden jeweils in Medium mit 4 µg/ml Clarithromycin kultiviert.

Die (Aldehyd-/) Alkohol-Dehydrogenasen aus *C. thermocellum* ATCC 27405^T scheinen also - trotz großer Sequenzunterschiede zu den Dehydrogenasen aus solventogenen Clostridien - in der Lage zu sein, Butyraldehyd gut zu Butanol und auch Isobutyraldehyd zu Isobutanol umzusetzen. Außerdem lässt dieses Ergebnis vermuten, dass der eigentliche Grund für die geringen

Butanolkonzentrationen, die hier von den Transformanten produziert werden konnten, eher im ersten Teil des Stoffwechselwegs zu suchen ist. Dafür kämen die Gene für die Thiolase und das BCS-Operons selbst oder auch deren Regulation durch mangelnde Pyruvat- oder NADH-Verfügbarkeit in Frage.

Zugabe von Methylviologen

Methylviologen (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridiniumdichlorid; MV) ist ein künstlicher Elektronencarrier und kann Ferredoxin in zahlreichen Stoffwechselreaktionen und Elektronentransportketten ersetzen. Für viele solventogene Clostridien konnte bereits gezeigt werden, dass die Butanolproduktion durch Methylviologen gesteigert werden kann.

Die Zugabe von Methylviologen zu wachsenden Kulturen von *C. thermocellum* ATCC 27405^T und der Transformante *C. thermocellum* ATCC 27405^T-pMW2 (Abb. 41) zeigt einen erkennbaren Einfluss auf die Verteilung der verschiedenen Fermentationsprodukte. Während die Auswirkung auf Butanol aber gering war, lag das Ergebnis der MV-Zugabe für *C. thermocellum* ATCC 27405^T und noch mehr für *C. thermocellum* ATCC 27405^T-pMW2 in einer gesteigerten Ethanol- und einer verminderten Isobutanolproduktion. Durch Zugabe von Methylviologen kann also das Verhältnis der produzierten Alkohole zueinander verschoben und so die Produktion eines favorisierten Fermentationsprodukts eventuell gesteigert werden. Das macht allerdings erst dann Sinn, wenn die Butanolproduktion vorher schon deutlich verbessert werden konnte, weil der Einsatz von Methylviologen mit sehr hohen Kosten verbunden ist.

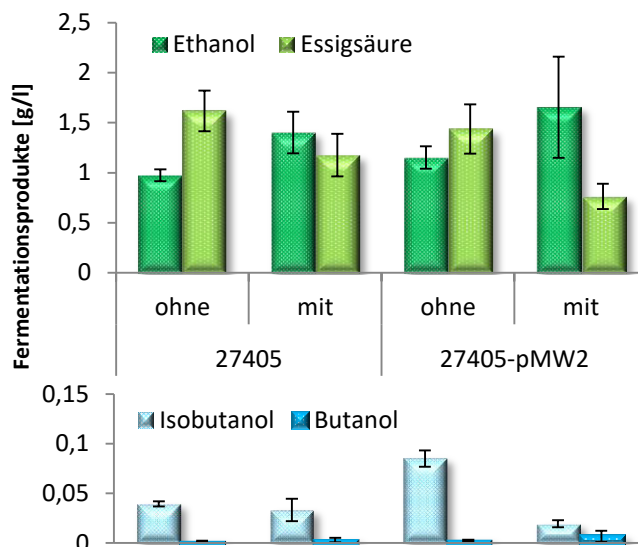
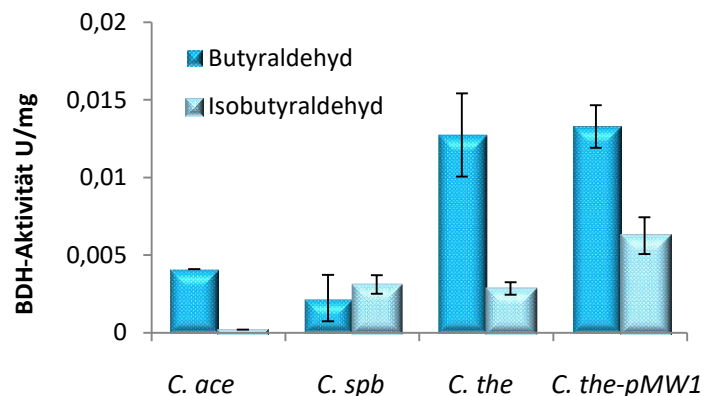


Abb. 41: Fermentationsprodukte bei Zugabe von Methylviologen (MV, 10 mM) zu wachsenden Kulturen von *C. thermocellum* ATCC 27405^T und *C. thermocellum* ATCC 27405^T-pMW2 auf 2 % Cellobiose nach 4 Tagen bei 60°C ohne und mit Zugabe von Methylviologen; n=3 ± SD. Die Transformante wurden in Medium mit 4 µg/ml Clarithromycin kultiviert.

3.5.4.4 Aktivität der bifunktionalen Aldehyd-/Alkohol-Dehydrogenase aus *C. thermocellum* ATCC 27405^T

Nachdem neben den Genen des BCS-Operons noch Gene für verschiedene teils bifunktionale Aldehyd- und Alkohol-Dehydrogenasen auf den Plasmiden vorhanden sind, wurde ein Nachweis für die Aktivität der Butyraldehyd-Dehydrogenase (BYDH) und der Butanol-Dehydrogenase (BDH) im Rahmen eines Praktikums etabliert. Zur Kontrolle wurde die Aktivität auch in Zellextrakten solventogener Clostridien analysiert. In nicht physiologischer Richtung (Zugabe von Butanol) konnte für *C. thermocellum* ATCC 27405^T keinerlei BDH Aktivität nachgewiesen werden. In physiologischer Richtung (Zugabe von Butyraldehyd) dagegen zeigten *C. thermocellum* ATCC 27405^T und die Transformante *C. thermocellum* ATCC 27405^T-pMW1 mit 0,0127 bzw. 0,0133 U/mg die mit Abstand größte Dehydrogenase-Aktivität aller gemessenen Organismen. Der Zellextrakt der Transformante *C. thermocellum* ATCC 27405^T-pMW1 zeigte eine deutlich höhere Aktivität bei Isobutyraldehyd als der des Wildtyps.

Abb. 42: Vergleich der mit Butyraldehyd bzw. Isobutyraldehyd ermittelten spezifischen Dehydrogenase-Aktivitäten von *C. acetobutylicum* (*C. ace*), *C. saccharoperbutylicum* (*C. spb*) und *C. thermocellum* ATCC 27405^T (*C. the*) und der Transformante *C. thermocellum* ATCC 27405^T-pMW1 (*C. the-pMW1*) in U/mg, gemessen in physiologischer Richtung; n=2 ± SD.



Diese Versuche, sowie die mit *C. thermocellum* ATCC 27405^T unter 3.5.4.3 gezeigten Ergebnisse bestätigen, dass die Alkohol-Dehydrogenase, die in *C. thermocellum* ATCC 27405^T die Reaktion von Acetaldehyd zu Ethanol katalysiert, nicht besonders spezifisch ist und auch Butyraldehyd umsetzen kann.

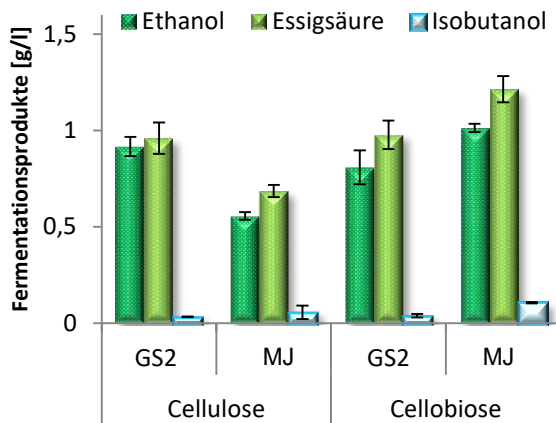
Auch das alternative Substrat Isobutyraldehyd konnte durch die bifunktionale Aldehyd-/Alkohol-Dehydrogenase aus *C. thermocellum* ATCC 27405^T zu Isobutanol umgesetzt werden. Um die Aktivität der rekombinant in *C. thermocellum* ATCC 27405^T bzw. *R. cellulolyticum* eingefügten Gene zu analysieren, und potentielle Engstellen zu ermitteln, wurden geeignete Nachweismethoden für die einzelnen Enzyme gesucht. Für alle Enzymreaktionen, die durch die 5 Gene des BCS-Operons codiert werden, gibt bereits Assays. Allerdings bereitet für die meisten davon bereits der Nachweis von aufgereinigten Proteinen aus natürlicherweise solventogenen

Clostridien Probleme, sodass davon ausgegangen werden kann, dass der Aktivitätsnachweis von rekombinanten Enzymen direkt aus Zellextrakt noch deutlich geringer ausfallen dürfte und eventuell kein adäquates Mittel darstellt. Nachdem die Enzyme aus dem Butanol-Stoffwechselweg prinzipiell in beide Richtungen funktionieren, ist es auch nicht immer möglich, die Aktivität in nur eine Richtung zu bestimmen. Deswegen muss auch bei den hier gemessenen Dehydrogenase Aktivitäten davon ausgegangen werden, dass die gemessene Enzymaktivität eventuell eine Schnittmenge aus den Aktivitäten in beide Richtungen darstellt, auch wenn durch die Wahl des pH-Werts bei 6,0 eher die Reaktion zum Butanol / Isobutanol hin bevorzugt sein dürfte. Die deutlichen Schwankungen in den einzelnen Messungen und die Probleme, die bereits bei der Messung der Kontrollen (aus solventogenen Clostridien) auftreten, machen diesen Assay nicht unbedingt zu einem verlässlichen Mittel, um die Enzymaktivität in *C. thermocellum* und den Transformanten nachzuweisen. Außerdem muss berücksichtigt werden, dass die Versuche zwar unter anaeroben Bedingungen im Zelt gemessen wurden, allerdings bei Raumtemperatur und nicht bei 60°C, was eventuell zu anderen Enzymaktivitäten in Zellextrakt führen würde.

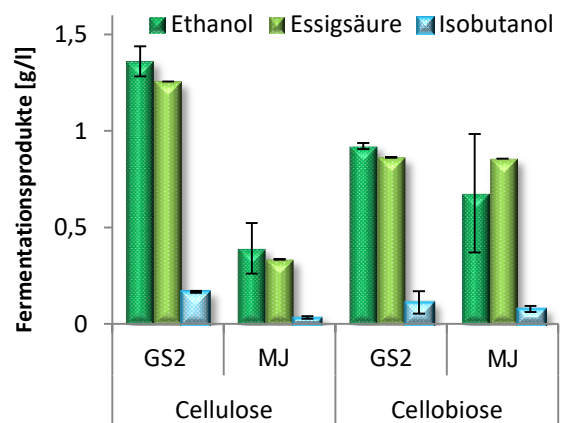
3.5.4.5 Analyse der Fermentationsprodukte von *C. thermocellum* ATCC 27405^T-*pMW1* und -*pMW2* auf unterschiedlichen Substraten

Im direkten Vergleich von *C. thermocellum* ATCC 27405^T mit den Transformanten *C. thermocellum* ATCC 27405^T-*pMW1* und -*pMW2* in unterschiedlichen Kombinationen von Medium und Substrat (Abb. 43) waren deutliche Unterschiede erkennbar. So führte insbesondere Cellulose als Substrat in GS2 für Kulturen beider Transformanten zu ca. 1/3 höheren Ethanol- und Isobutanolwerten als bei *C. thermocellum* ATCC 27405^T Kulturen. Bei der Verwendung von Minimalmedium (MJ) führte Cellobiose - wohl auch wegen des schnelleren Wachstums verglichen mit Cellulose - sowohl für *C. thermocellum* ATCC 27405^T als auch für beide Transformanten zu höheren Ethanol- und Isobutanolkonzentrationen. Aus Abb. 43 d) wird deutlich, dass die Butanolkonzentrationen für *C. thermocellum* ATCC 27405^T-*pMW2* auf Cellulose (in GS2 aber auch in Minimalmedium MJ) deutlich über denen auf Cellobiose lagen, während für *C. thermocellum* ATCC 27405^T-*pMW1* kein deutlicher Unterschied in der Butanolproduktion zwischen den verwendeten Kohlenstoffquellen erkennbar war. Anhand der hohen Fehlerbalken lässt sich aber auch erkennen, dass auf Minimalmedium das Wachstum der Transformanten und damit auch die Menge produzierter Fermentationsprodukte stark schwankten.

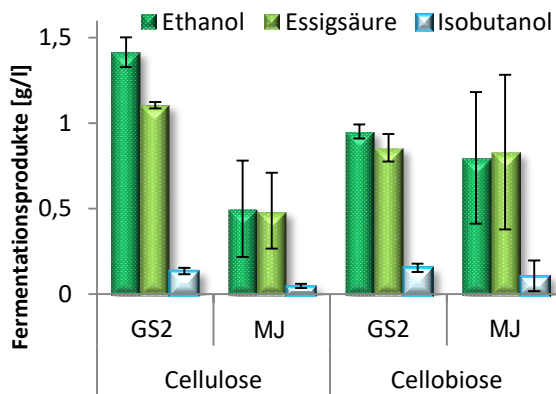
a) *C. thermocellum* ATCC 27405^T



b) *C. thermocellum* ATCC 27405^T-pMW1



c) *C. thermocellum* ATCC 27405^T-pMW2



d) Butanolproduktion

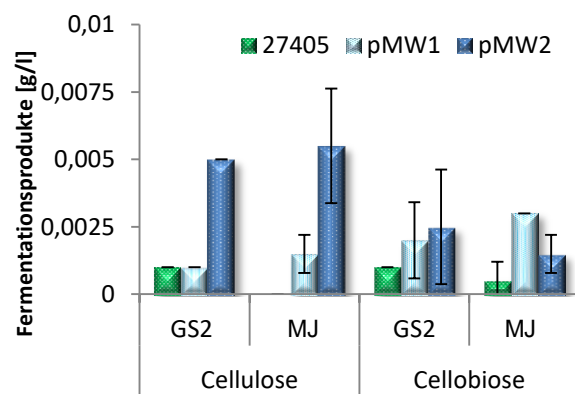


Abb. 43: Fermentationsprodukte von a) *C. thermocellum* ATCC 27405^T; b) *C. thermocellum* ATCC 27405^T-pMW1 und c) *C. thermocellum* ATCC 27405^T-pMW2 auf zwei unterschiedlichen Medien; (MJ = Minimalmedium; GS2 = GS2 Medium) mit 2 % Cellobiose oder 2 % Cellulose (Whatman-Paper#1) nach 4 Tagen bei 60°C; n=2 ± SD. Die Transformanten wurden jeweils in Medium mit 4 µg/ml Clarithromycin kultiviert.

3.5.4.6 Analyse der Fermentationsprodukte von *C. thermocellum* ATCC 27405^T-pMW1 und -pMW2 bei niedrigeren Temperaturen

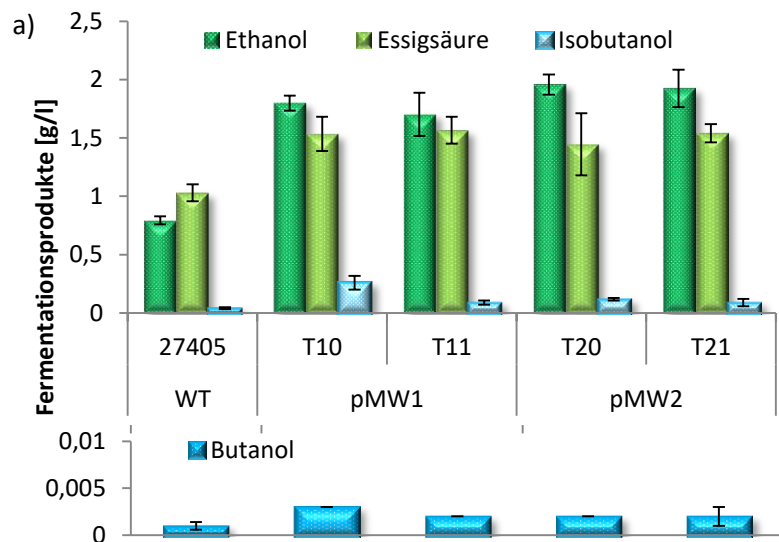
Nachdem die Gene für den CoA-abhängigen Butanol-Stoffwechselweg ursprünglich aus mesophilen Clostridien stammen, könnten niedrigere Temperaturen möglicherweise zu einer besseren Stabilität der Proteine und damit evtl. auch zu einer höheren Butanolproduktion führen. Deswegen wurden die *C. thermocellum* ATCC 27405^T Transformanten in mehreren Experimenten bei 42°C oder einer Kombination aus anfangs 60°C und anschließender Inkubation bei 42°C analysiert.

Analyse der Fermentationsprodukte auf 2 % Cellobiose bei 42°C

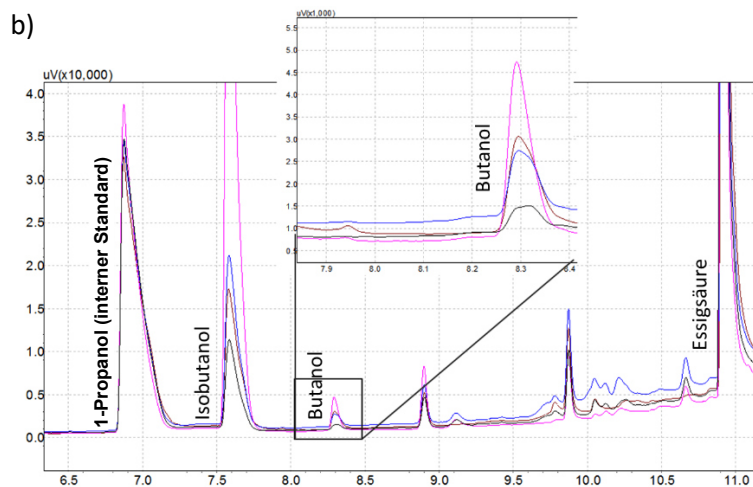
Bereits unter 3.1.1.1 konnte gezeigt werden, dass Kultivierungstemperaturen unter einem Wert von ca. 40°C einen deutlich negativen Einfluss auf das Wachstum von *C. thermocellum* Kulturen auf Cellobiose hatten. Auch für die Transformanten *C. thermocellum* ATCC 27405^T-*pMW1* und *-pMW2* war das Wachstum bei niedrigeren Temperaturen deutlich langsamer, als bei 60°C. Die Analyse der Fermentationsprodukte (Abb. 44) bei 42°C ergab in den Transformanten ca. 2-3-mal mehr Butanol, als im Wildtyp (das dort nur durch die Umsetzung von Buttersäure aus dem Medium gebildet wurde). Die Kombination von Cellobiose als Substrat und Kultivierungstemperaturen deutlich unter den Optimalbedingungen von *C. thermocellum* Stämmen, führten somit zu den niedrigsten hier beobachteten Butanolkonzentrationen in den Transformanten, wohingegen Ethanol unter diesen Bedingungen am höchsten war.

Abb. 44: GC-Analyse der Fermentationsprodukte von *C. thermocellum* ATCC 27405^T und von Transformanten mit den Plasmiden *pMW1* und *pMW2*;

a) *C. thermocellum* ATCC 27405^T und je 2 Transformanten mit den Plasmiden *pMW1* und *pMW2* nach 7 Tagen auf GS2 mit 2 % Cellobiose bei 42°C (anfangs ÜN bei 60°C); n=2 ± SD. Die Transformanten wurden jeweils in Medium mit 4 µg/ml Clarithromycin kultiviert.



b) GC-Spektrum je eines beispielhaften Laufes von *C. thermocellum* ATCC 27405^T (schwarz) sowie *C. thermocellum* ATCC 27405^T-*pMW1* bei 60°C (magenta) und bei 42°C (braun) und *C. thermocellum* ATCC 27405^T-*pMW2* bei 60°C (blau); Ausschnitt: Butanol-Peak in der Vergrößerung.



Die ca. doppelt so hohen Werte für Ethanol dürften wohl hauptsächlich auf eine gesteigerte Aktivität der rekombinanten (Aldehyd-/)Alkohol-Dehydrogenase(n) bei niedrigeren Tempera-

turen zurückzuführen sein. Die Gene und die rekombinant exprimierten Proteine des BCS-Operons (außer eben die Alkohol-Dehydrogenasen) aus *C. acetobutylicum* scheinen also auch bei 42°C keine deutlich höhere Aktivität zu haben, als bei 60°C. Das bedeutet, dass die höhere Temperatur nicht der Grund für die vergleichsweise geringen Butanolkonzentrationen in den Transformanten sein dürfte. Die Unterschiede und die Größenordnung der Produkte (Isobutanol zu Butanol) werden insbesondere durch das Übereinanderlegen der GC-Diagramme wie in Abb. 44 b) für einzelne Proben deutlich. Der Ethanol-Peak ist nicht erkennbar, weil er schon früher erscheint und insbesondere in diesen Proben in einer anderen Größenordnung liegt.

Analyse der Fermentationsprodukte auf 2 % Cellulose bei 60°C und 42°C

Um den anfänglichen Abbau der Cellulose zu beschleunigen, wurden die Kulturen zunächst über Nacht (16 h) bei 60°C gehalten, bis die Cellulose teilweise abgebaut war, und anschließend für 5 Tage bei 60°C bzw. für 7 Tage bei 42°C inkubiert.

In Abbildung 45 lässt sich deutlich erkennen, dass die Ethanolproduktion nach Inkubation bei 42°C höher war, als in den Kulturen bei 60°C, auch wenn für die Transformanten der Unterschied z. T. geringer ausfiel als für *C. thermocellum* ATCC 27405^T. Butanol dagegen schien - wider Erwarten - bei 60°C besser produziert zu werden. Ob das auf ein etwas schlechteres Wachstum (trotz Verlängerung der Inkubationszeit auf 7 Tage bei 42 °C, um das auszugleichen) bei niedrigeren Temperaturen zurückzuführen sein könnte, war auf Cellulose optisch nicht bestimmbar.

Im direkten Vergleich des auf 60 bzw. 42°C gebildeten Butanols (Abb. 45 b) lässt sich für alle Proben erkennen, dass auf Cellulose bei 60°C von den *C. thermocellum* ATCC 27405^T Transformanten mehr Butanol gebildet wurde als bei 42°C. Für Isobutanol ergibt sich das direkt umgekehrte Bild, weil mehr Isobutanol bei 42°C gebildet wurde, als bei 60°C. Vermutlich dürfte die NADH-Verfügbarkeit oder die Temperatursensitivität und dadurch geänderte Spezifität einer Alkohol-Dehydrogenase der Grund für die Verschiebung der Fermentationsprodukte mit sinkender Inkubationstemperatur sein. Die vergleichsweise hohen Fehlerbalken rühren daher, dass sich die Werte für diese beiden Transformanten relativ stark unterschieden haben. Diese Beobachtung konnte im Laufe der Experimente mit den Transformanten häufiger gemacht werden. Obwohl es sich bei den drei Proben 10, 11 und 12 von *C. thermocellum* ATCC 27405^T-*pMW1* um dasselbe Plasmid handelt, unterschieden sich die Werte für Butanol und Isobutanol auch in den doppelten Ansätzen derselben Transformante z. T. erheblich.

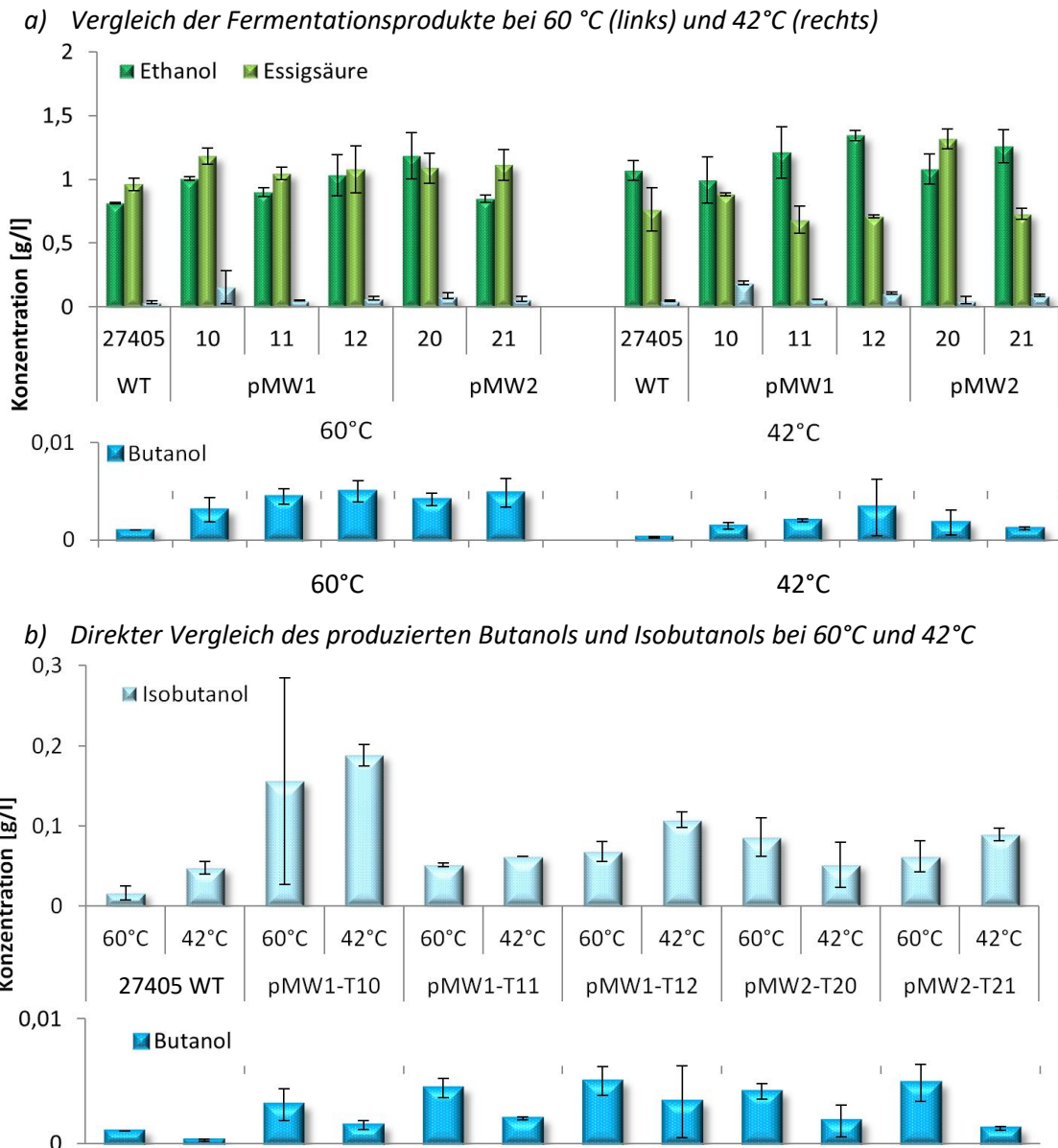


Abb. 45: Fermentationsprodukte von *C. thermocellum* ATCC 27405^T (27405 WT) und Transformanten mit den Plasmiden *pMW1* (T10, T11, T12) und *pMW2* (T20, T21) auf 2 % Cellulose bei 60°C (links) bzw. bei 42°C (rechts) in GS2; die Transformanten wurden jeweils in GS2 Medium mit 4 µg/ml Clarithromycin kultiviert. Nach 16 h Inkubation bei 60°C wurden die 42°C-Kulturen auf 42°C gestellt und nach insgesamt 5 (60°C) bzw. 7(42°C) Tagen die Kulturüberstände gaschromatographisch analysiert; n=2 ± SD; a) Ethanol, Isobutanol, Butanol und Essigsäure bei 60°C und 42°C; b) Vergleich Isobutanol (oben) und Butanol (unten) nach Inkubation bei 60°C oder 42°C.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene lignocellulosehaltige Substrate, die bei der Weiterverarbeitung von Weizen anfallen, auf ihre Eignung zur fermentativen Butanolproduktion analysiert. Mit Weizennachmehl und Weizengrießkleie wurden zwei direkte Nebenprodukte aus der Mehlherstellung als Substrate für die Butanolproduktion durch solventogene Clostridien untersucht. Vorrangig jedoch wurde das ebenfalls anfallende Weizenstroh analysiert, das durch cellulolytische Clostridien abgebaut und zu Alkoholen fermentiert werden sollte. Nachdem Cellulose abbauende Clostridien aber natürlicherweise kein Butanol produzieren können, wurde der CoA-abhängige Butanol-Stoffwechselweg aus Lösungsmittel produzierenden Clostridien heterolog in zwei cellulolytischen Clostridien exprimiert (vgl. Abb. 46, S.102). Mit *C. thermocellum* ATCC 27405^T und *R. cellulolyticum* DSM 5812^T wurden dafür zwei Organismen ausgewählt, die das unvorbehandelte Weizenstroh besonders gut verwerten konnten und so das Potenzial hatten, es direkt zur Produktion von Lösungsmitteln zu nutzen. Solch eine einstufige Verwendung eines cellulolytischen Organismus für den Abbau von (Ligno-) Cellulose und die gleichzeitige Produktion von Lösungsmitteln, hätte den Vorteil, dass die kostenintensive Vorbehandlung und Verzuckerung des Substrates möglichst komplett entfallen könnte. Das würde die Substrataufbereitung - die größte Hürde für eine wirtschaftliche Herstellung von Bioalkoholen aus regenerativen Rohstoffen - vereinfachen und kostengünstiger machen.

Regenerative Substrate für eine industrielle Bioalkoholproduktion

Aktuell wird Butanol hauptsächlich petrochemisch hergestellt oder biotechnologisch durch die Fermentation von Zuckern oder Stärke im sogenannten ABE-Prozess durch solventogene Clostridien [Lee *et al.*, 2008, Moon *et al.*, 2016]. Um den weltweit steigenden Bedarf an Energie zu decken und den Anteil an regenerativen Energieträgern zu erhöhen, wurde in den letzten Jahrzehnten insbesondere für die Kraftstoffgewinnung nach neuen Lösungen gesucht. Eines der Hauptprobleme der Biotreibstoffe der ersten Generation - für die Akzeptanz in der Bevölkerung und die Konkurrenzfähigkeit auf dem Markt - sind die verwendeten zucker- oder stärkehaltigen Substrate. Hohe Substratkosten, politische Vorgaben und auch der ethische Konflikt, der durch die Konkurrenz der Treibstoffgewinnung zur Nahrungsmittelproduktion entsteht, befeuerten daraufhin die Entwicklung von Biokraftstoffen der zweiten Generation [Demain, 2009, Salehi Jouzani & Taherzadeh, 2015]. Im Gegensatz zur ersten Generation werden dabei die essbaren Pflanzenteile nicht mehr genutzt. Trotzdem stellen die hohen Kosten für die Substrate und deren Aufbereitung weiterhin eines der Hauptprobleme für eine wirtschaftliche

Produktion von Biokraftstoffen dar. Deswegen wurde bereits erfolgreich versucht eine Vielzahl industrieller Reststoffe wie Syngas, Glycerin oder industrielle Beiprodukte, die noch Restzucker oder Stärke enthalten, dafür einzusetzen [zusammengefasst in: Birgen *et al.*, 2019]

So fallen beispielsweise bei der Vermahlung von Weizenkörnern zu Mehl eine Reihe von Nebenprodukten an, die üblicherweise hauptsächlich als Viehfutter Verwendung finden. Neben Weizenkleie ist das vor allem Weizengrießkleie (WGK) und Weizennachmehl (WNM). Die Analyse zur Umsetzung von Weizengrießkleie in 100 ml Fläschchen durch ausgewählte solventogene Clostridien ergab, dass bereits ohne jegliche Vorbehandlung bis zu 7 g/l Butanol bzw. 10 g/l Gesamtlösungsmittel gebildet werden konnten (vgl. 3.3.1.2). Dabei wurde allerdings nur der zuckerhaltige Anteil des Substrats genutzt, weil zumindest die bisher bekannten Butanol produzierenden Clostridien keine Cellulose oder gar Lignocellulose abbauen können. Um auch den relativ hohen Celluloseanteil der WGK nutzen zu können und so wirtschaftlich interessante Lösungsmittelkonzentrationen zu erzielen, wäre zumindest eine Vorbehandlung des Substrats durch enzymatische Behandlung oder Hydrolyse nötig. Dagegen konnten auf dem stärkereichereren Weizennachmehl bereits ohne Vorbehandlung mit bis zu 14 g/l Butanol bzw. 20 g/l Gesamtlösungsmittel mehr als doppelt so hohe Konzentrationen erzielt werden (s. IV Veröffentlichungen, Tagungsbeiträge und betreute Arbeiten, Poster: Panitz *et al.*, 2018). Das entspricht in etwa den Ergebnissen, die solventogene Clostridien unter ähnlichen Bedingungen auch auf Zucker oder Stärke produzieren [Moon *et al.*, 2016]. Durch eine zusätzliche und vergleichsweise günstige enzymatische Vorbehandlung von WNM konnte gezeigt werden, dass bereits mit den hier im Labormaßstab erzielten Ergebnissen eine wirtschaftliche Lösungsmittelproduktion aus diesem Nebenprodukt der Weizenmehlherstellung in Bayern erfolgen könnte [Thieme *et al.*, 2020]. Für die ebenfalls getesteten Hydrolysate aus beiden Substraten traf das jedoch nicht zu. Hauptsächlich wegen der zu geringen Zuckerkonzentration und der schlechten Umsetzung der Hydrolysate durch die hier untersuchten Clostridien, aber auch durch die hohen Kosten für die Hydrolyse selbst (Daten hier nicht gezeigt).

Auch das bei der Biodieselproduktion anfallende Glycerin ist ein Beispiel für einen solchen industriellen Reststoff, der als Substrat für die Produktion von Lösungsmitteln genutzt werden könnte [Yazdani & Gonzalez, 2007]. Das hier vorrangig wegen seiner reduzierten Produktbreite genauer analysierte Isolat *C. tetanomorphum* GT6 (vgl. 3.4.3) konnte neben einer Vielzahl anderer Substrate wie Xylose, Maltose, Glucose oder Fructose auch Glycerin umsetzen (s. IV Veröffentlichungen, Tagungsbeiträge und betreute Arbeiten, Poster: Panitz *et al.*, 2010) [Panitz *et al.*, 2014]. Darüber hinaus konnte auch auf CMC, Xylan und Stärke Wachstum nachgewiesen werden sowie auf Lipiden; was auch für den nah verwandten *C. tetanomorphum* Typstamm

DSM 4474^T gezeigt werden konnte [Petersen & Daniel, 2005]. Glycerin konnte von GT6 in bis zu 11 g/l Butanol und 14 g/l Gesamtlösungsmittel umgesetzt werden, wobei - im Gegensatz zu gängigen solventogenen Clostridien - nur Butanol und Ethanol produziert wurden, aber kein Aceton (Anhang XXI) [Panitz *et al.*, 2014]. Auch 1,3-Propandiol, das üblicherweise eines der Hauptprodukte bei der fermentativen Umsetzung von Glycerin ist, konnte nur in Spuren nachgewiesen werden. In *C. pasteurianum* DSM 525 beispielsweise, einem der am besten untersuchten Organismen für die Fermentation von rohem Glycerin, wird Butanol und 1,3-Propandiol in etwa gleichen Anteilen gebildet [Biebl, 2001, Gallardo *et al.*, 2014]. Durch die hohe Spezifität für Butanol ist *C. tetanomorphum* GT6 ein geeigneter Kandidat für die Butanolvergewinnung auf einem so günstigen industriellen Reststoff wie Glycerin, das z.B. in großen Mengen als Beiprodukt der Biodiesel-Produktion anfällt [Johnson *et al.*, 2016]. Diese hohe Butanolspezifität konnte jedoch nicht auf deutliche Unterschiede in den Aminosäuresequenzen der durch das BCS-Operon codierten Enzyme zurückgeführt werden (vgl. Abb. 32 und Anhang XXII), die eine hohe Übereinstimmung mit Enzymen aus bekannten solventogenen Clostridien zeigten und ähnlich reguliert zu sein schienen [Boynton *et al.*, 1996, Berezina *et al.*, 2009, Panitz *et al.*, 2014].

Der vielversprechendste Rohstoff für neuere Generationen von Biokraftstoffen ist jedoch nachwachsende, lignocellulosehaltige Biomasse, wobei unterschiedliche Quellen wie z. B. landwirtschaftliche oder organische Reststoffe, Holzabfälle oder auch speziell gezüchtete Energiepflanzen Verwendung finden könnten [Lynd *et al.*, 2005b, Himmel *et al.*, 2007, Qureshi & Ezeji, 2008, Gottumukkala *et al.*, 2017]. Das hier als Substrat für cellulolytische Clostridien eingesetzte Weizenstroh (SC-Substrat) ist ein Beispiel für solch ein reichlich verfügbares und günstiges, regeneratives, lignocellulosehaltiges Substrat ohne lange Transportwege.

Die bisher verwendeten zucker- oder stärkehaltigen Substrate konnten meist direkt für die Fermentation eingesetzt werden. Mit der Verwendung von Lignocellulose für die Produktion von Biokraftstoffen entstehen hingegen durch deren hoch komplexen Aufbau und die zusätzliche Lignifizierung, enorme Schwierigkeiten in der Substratvorbehandlung [Lynd *et al.*, 2002b, Lynd *et al.*, 2005a, Kim, 2018, Birgen *et al.*, 2019]. Die Lignocellulose muss erst in komplizierten und mehrstufigen Prozessen (vgl. Einleitung) vorbehandelt und enzymatisch zu oligo- oder monomeren Zuckern (v.a. Glucose, Xylose, Arabinose) abgebaut werden, bevor aus diesen Hydrolysaten Lösungsmittel produziert werden können [Mosier *et al.*, 2005, Kumar *et al.*, 2008, Jang *et al.*, 2012c]. Obwohl die Kosten für die enzymatische Hydrolyse durch den Einsatz von rekombinanten Techniken sowohl in der Enzymproduktion als auch in der Züchtung von lignin-reduzierter Biomasse bereits deutlich vermindert werden konnten, stellt der

schwierige Aufschluss des Substrats das größte Problem für eine großtechnische Nutzung der Lignocellulose dar [Fang & Xia, 2013, Akinosho *et al.*, 2014, Saggi & Dey, 2016]. Die anschließende Fermentation wird oft durch die Vielzahl an Zuckern, die bei der Verzuckerung von lignocellulosehaltiger Biomasse entstehen, erschwert. So können Pentosen in nicht modifizierten gängigen Produktionsstämmen meist nicht genutzt werden, was eines der größten Hindernisse für die Verwendung von Hefen zur Bioalkoholproduktion war [Subtil & Boles, 2011, 2012]. Diese Schwierigkeit konnte teilweise überwunden werden, indem ein Hefestamm entwickelt wurde, der neben Hexosen auch Pentosen (Xylose und Arabinose) verwerten kann, so dass nun auch der Hemicellulose-Anteil der Biomasse genutzt werden kann [Brat *et al.*, 2009].

Im Gegensatz zu konventionellen Industriestämmen wie *S. cerevisiae* oder *Zymomonas mobilis*, können viele Clostridien bereits von Natur aus unterschiedliche C₅ und C₆ Zucker verwerten, was besonders auf uneinheitlichen Substraten wie Biomasse ein großer Vorteil ist [Weber *et al.*, 2010]. So wurden lösungsmittelproduzierenden Clostridien bereits auf ihre Eignung zur Butanolproduktion auf vorbehandelten, lignocellulosehaltigen Substraten wie Weizen-, Gersten- oder Reisstroh, Resten aus der Maisproduktion, Pinienholz oder einjährigen Energiepflanzen (z. B. *Miscanthus*, *Panicum*) untersucht [Ezeji *et al.*, 2007a, Qureshi *et al.*, 2007, Qureshi *et al.*, 2008, Gottumukkala *et al.*, 2013, Birgen *et al.*, 2019]. Allerdings sind auch die durch die Vorbehandlung der Lignocellulose gewonnenen Hydrolysate keine optimalen Substrate für lösungsmittelproduzierende Clostridien oder industrielle Produktionsstämme, weil bei der Vorbehandlung und Verzuckerung auch Hemmstoffe wie z. B. Furfural und aromatische Komponenten entstehenden [Ezeji *et al.*, 2007a, Weber *et al.*, 2010, Zhang & Ezeji, 2014, Kim, 2018]. Auch in den hier durchgeführten Fermentationsanalysen mit Hydrolysaten aus WGK, konnten von den 27 verschiedenen solventogenen Clostridien nur 3 das Hydrolysat in mehr als 0,45 % Butanol umsetzen (Daten nicht gezeigt). Diesen vergleichsweise geringen Butanolwerten stehen aber deutlich höhere Kosten für die Herstellung der Hydrolysate gegenüber, als bspw. für den Einsatz einer enzymatischen Vorbehandlung auf denselben Ausgangssubstraten. Darüber hinaus liegt die Toleranz von Clostridien gegen Lösungsmittel allgemein und gegen das wegen seiner technischen Eigenschaften favorisierte Butanol insbesondere bei „nur“ ca. 2 %, was für eine industrielle Anwendung vergleichsweise gering ist [Zheng *et al.*, 2009, Nicolaou *et al.*, 2010]. Dagegen besitzen biotechnologisch etablierten Stämme eine Reihe von Vorteilen, die den technischen Prozess vereinfachen, wie bspw. eine bessere Lösungsmitteltoleranz, hohe Wachstumsraten, eine gute Prozessstabilität und ein bereits erforschtes genetisches System, das sich leicht manipulieren und an die jeweiligen Bedingungen anpassen lässt [Zheng *et al.*, 2009, Weber *et al.*, 2010, Olson *et al.*, 2012, Parisutham *et al.*, 2014]. Um den trotzdem notwendigen Schritt der Verzuckerung zu umgehen, müssten sowohl die Gene

für den Celluloseabbau als auch die Gene für die Butanolproduktion parallel in einen bekannten und gut manipulierbaren Produktionsstamm exprimiert werden, was angesichts der dafür nötigen Menge an Genen und der Anpassung der verschiedenen Stoffwechselwege denkbar schwierig sein dürfte. Das größte Problem bestände wohl darin, ein effizient funktionierendes Cellulose-Abbausystem zu schaffen, das normalerweise aus einer Vielzahl miteinander gezielt kooperierender Enzyme besteht [Bayer *et al.*, 2004, Demain *et al.*, 2005, Gilbert, 2007]. Eine so komplexe Bio-Maschinerie, deren Zusammensetzung und Regulation bisher noch nicht vollständig verstanden ist, lässt sich rekombinant vermutlich nur schwer nachbauen [Kumar *et al.*, 2008, Maki *et al.*, 2009].

Eine aussichtsreiche Lösung, um die kostenintensiven Schritte der Vorbehandlung und der Hydrolyse zu umgehen, böte die Verwendung von Organismen, die bereits die Fähigkeit besitzen lignocellulosehaltige Biomasse effektiv zu zersetzen und sie in einem sogenannten `consolidated bioprocessing` (CBP) Prozess direkt zu Lösungsmitteln umzusetzen [zusammengefasst in: Olson *et al.*, 2012, Parisutham *et al.*, 2014, Salehi Jouzani & Taherzadeh, 2015].

C. thermocellum ATCC 27405^T und *R. cellulolyticum* DSM 5812^T als am besten geeignete Kandidaten für die rekombinante Produktion von Biobutanol

Ein idealer CBP Organismus für großtechnische Anwendungen sollte das verwendete lignocellulosehaltige Substrat effektiv zersetzen, die so entstandenen Bestandteile möglichst vollständig in das gewünschte Produkt umsetzen können und sowohl gegen das meist toxische Endprodukt als auch gegen andere hemmende Faktoren eine hohe Toleranz besitzen [Lynd *et al.*, 2005b, Mazzoli *et al.*, 2012, Tracy *et al.*, 2012, Salehi Jouzani & Taherzadeh, 2015]. Ein solcher Organismus, der einen effektiven Celluloseabbau mit einer sehr hohen Lösungsmittelproduktion von Natur aus vereint, ist bisher nicht bekannt, weswegen eine Kombination dieser beiden Eigenschaften vermutlich gentechnologisch erfolgen müsste.

Unter den Celluloseabbauern gibt es einige, die schon von Natur aus in der Lage sind, Alkohole (insbesondere Ethanol aber auch Isobutanol) zu produzieren. Das tun sie jedoch nicht in so hohen Konzentrationen und Umsatzraten, dass es den Ansprüchen an aktuelle biotechnologische Prozesse genügen würde oder gar rentabel wäre [Weber *et al.*, 2010]. Deswegen wurden in jüngster Vergangenheit bereits einige genetische Modifikationen untersucht, um v.a. die Ethanol- [Deng *et al.*, 2013, van der Veen *et al.*, 2013a, Akinosho *et al.*, 2014, Tian *et al.*, 2016, Hon *et al.*, 2017], aber auch die Isobutanolproduktion [Higashide *et al.*, 2011, Lin *et al.*, 2015] mit Hilfe von cellulolytischen Clostridien zu erhöhen. Darüber hinaus wurde versucht,

die Produkttoleranz zu verbessern und konkurrierende Nebenprodukte auszuschalten [Tripathi *et al.*, 2010, Shao *et al.*, 2011, Li *et al.*, 2012, Mohr *et al.*, 2013, van der Veen *et al.*, 2013a, Cui *et al.*, 2014]. Die Produkteigenschaften von Ethanol sind für die Anwendung als Kraftstoff jedoch nicht optimal und werden von den C₄-Alkoholen Butanol oder auch Isobutanol in fast allen Punkten übertroffen [Schwarz & Gapes, 2006, Antoni *et al.*, 2007, Dürre, 2007]. Butanol gilt wegen der höheren Energiedichte, seiner unbegrenzten Mischbarkeit mit bestehenden Kraftstoffen, seiner geringeren Explosivität und der Tatsache, dass es mit der bereits bestehenden Infrastruktur (Pipelines und auch Motoren) verwendet werden kann, als der am meisten favorisierte Biotreibstoff [Schwarz & Gapes, 2006, Dürre, 2007, Schwarz *et al.*, 2007].

Für eine direkte Umsetzung von (Ligno-)Cellulose zu Butanol stellte sich entsprechend die Frage, welcher Cellulosezerersetzer das von Projektpartner Südchemie zur Verfügung gestellte Substrat - unvorbehandeltes Weizenstroh - am besten abbauen und gleichzeitig um die Gene aus dem Butanol-Stoffwechselweg ergänzt werden könne. Unter den als „cellulolytisch“ beschriebenen Organismen gibt es jedoch nur eine Handvoll, die tatsächlich in der Lage sind, kristalline Cellulose oder gar die zusätzlich mit Hemicellulose und Lignin komplexierte Lignocellulose zu zersetzen [Zverlov & Schwarz, 2008, Koeck *et al.*, 2014]. Zu den effektivsten bakteriellen Celluloseabbauern zählen v.a. diejenigen, die ein Cellulosom besitzen wie im mesophilen *R. cellulolyticum*, *Ruminococcus albus* und *Clostridium cellulovorans*, sowie *C. thermocellum* und *Clostridium clariflavum* im thermophilen Temperaturbereich [Schwarz, 2001b, Doi & Kosugi, 2004, Blumer-Schuetz *et al.*, 2014, Koeck *et al.*, 2014]. Für die heterologe Darstellung des Butanol-Stoffwechselwegs und zur direkten Produktion von Butanol aus Cellulose wurden hier *C. thermocellum* ATCC 27405^T und *R. cellulolyticum* DSM 5812^T analysiert. Beide gelten außerdem wegen ihres hocheffektiven Celluloseabbaus und der Tatsache, dass sie schon von Natur aus Alkohole produzieren können, in ihren jeweiligen Temperaturbereichen als Modelorganismen für eine CBP Anwendung [Bayer *et al.*, 2004, Demain *et al.*, 2005, Lynd *et al.*, 2005b]. Für diese zwei cellulolytischen Clostridien spricht außerdem ihre Apathogenität, ihre gute Handhabbarkeit im Labor, die vorhandene Genomsequenz und ihre Zugänglichkeit für genetische Manipulationen [Tardif *et al.*, 2001, Guedon *et al.*, 2002b, Tyurin *et al.*, 2004, Tripathi *et al.*, 2010, Cui *et al.*, 2014].

Auf dem hier verwendeten Weizenstroh (SC-Substrat, Siebgröße < 2 mm) konnten *C. thermocellum* ATCC 27405^T und *R. cellulolyticum* DSM 5812^T unter ihren jeweiligen Optimalbedingungen gut wachsen und bis zu 50 % der anfangs vorhandenen Cellulose und Hemicellulose abbauen (vgl. 3.2.2). Dafür war es nicht nötig, das Weizenstroh einer konventionellen Art der Vorbehandlung zu unterziehen (z. B. *steam explosion* oder Säurebehandlung), wie sie bei der Umsetzung von lignocellulosehaltiger Biomasse normalerweise durchgeführt wird und auch

noch unter die gängige Definition von CBP fallen würde. Zur Sterilisation war es jedoch notwendig, das Medium mit dem zerkleinerten SC-Substrat bei 121°C und 1,2 bar 20 min zu autoklavieren, was nachweislich zu einem verbesserten Abbau führt, jedoch weit von den energieintensiven Bedingungen industrieller Vorbehandlungen (160 – 260 °C, 0,7 – 4,8 MPa, evtl. zusätzliche Säurebehandlung) entfernt ist [Salehi Jouzani & Taherzadeh, 2015, Silva-Fernandes *et al.*, 2015, Barisik *et al.*, 2016].

Zusammengefasst ergab die Analyse von *C. thermocellum* ATCC 27405^T und *R. cellulolyticum* DSM 5812^T auf SC-Substrat, dass der höchste prozentuale Abbau durch eine vergleichsweise lange Inkubationszeit von 7 bzw. 10 Tagen, Kultivierung unter jeweils optimalen Temperaturbedingungen und durch Einstellung des pH-Wertes auf über pH 7,5 erreicht werden konnte (vgl. Tab. 10, S. 53). Für *R. cellulolyticum* DSM 5812^T war eine vorhergehende Adaptation der Kulturen an das verwendete Substrat für gute Abbauleistungen förderlich (vgl. 3.2.2.1). Zum einen, weil *R. cellulolyticum* generell nur schlecht Sporen ausbildet, weswegen der Abbau bei Beimpfung mit Sporen ein schlechteres Ergebnis lieferte und zum anderen, weil sich während der Adaptation der Aufbau des Cellulosoms an die Zusammensetzung des Substrates anpasst [Blouzard *et al.*, 2010]. Diese Adaptation an das verwendete Substrat trifft zwar grundsätzlich auch für *C. thermocellum* zu, war unter den hier analysierten Bedingungen aber nicht notwendig, da auch bei Beimpfung mit Sporen ein gleich gutes Abbauergebnis erzielt werden konnte [Raman *et al.*, 2009, Yoav *et al.*, 2017]. Eine kontinuierliche Durchmischung des Kultivierungsansatzes führte weder für *C. thermocellum* ATCC 27405^T noch für *R. cellulolyticum* DSM 5812^T zu einer Verbesserung im Substratabbau. An anderer Stelle konnte bereits gezeigt werden, dass zerkleinerte, feste Substrate von cellulolytischen Bakterien durch die Ausbildung von Biofilmen um das Substrat herum, deutlich besser abgebaut werden können, als wenn sie stetig vermischt werden [Morrell-Falvey *et al.*, 2015]. Ein weiterer Vorteil eines unvermischten, festen Substrats dürfte eine lokale Anreicherung von freigesetztem Wasserstoff sein, von dem angenommen wird, dass er die NAD⁺ Regeneration über einen alternativen NADH-verbrauchenden Stoffwechselweg - wie dem der Lösungsmittel (vgl. Abb. 46, S. 102) - verbessert [Bothun *et al.*, 2004, Islam *et al.*, 2009].

Die Trockenmasse von Weizenstroh besteht aus etwa 32 % Glucose, 19 % Xylose, 2,4 % Arabinose und unter 1 % aus Galactose. *R. cellulolyticum* DSM 5812^T kann all diese C₅ und C₆ Zucker verwerten, was dieses Bakterium für den Abbau von Hemicellulose besonders geeignet macht [Desvaux *et al.*, 2000, Desvaux, 2005, Fendri *et al.*, 2009]. *C. thermocellum* Stämme setzen dagegen bevorzugt Oligosaccharide um [Strobel *et al.*, 1995, Zhang & Lynd, 2005a]. Das ist hauptsächlich dadurch begründet, dass *C. thermocellum* insgesamt mehr Energie bei der Verwertung von Oligosacchariden erzeugen kann, als bei Einfachzuckern, bei denen der energeti-

sche Aufwand des Zuckertransports und der Cellulaseproduktion insgesamt zu einer negativen Netto-Energie-Bilanz führt [Lynd *et al.*, 2002a, Zhang & Lynd, 2005a]. Die Umsatzraten von Cellulasen sind deutlich kleiner als die vieler anderer Enzyme, was bedeutet, dass für eine effiziente Hydrolyse des Substrats sehr viele Cellulasen produziert werden müssen und dementsprechend viel Energie in ihre Produktion investiert werden muss [van Walsum & Lynd, 1998, Zhang & Lynd, 2004]. Sollte die vollständige Verwertung des Substrats ein unabdingbares Ziel sein, müsste im Falle von *C. thermocellum* mit Einschränkungen gerechnet werden (vgl. Abb. 17, S. 55). Vom mengenmäßigen Substratanteil her stellt dabei v.a. die fehlende Verwertung von Xylose (ca. 1/5 des Gesamtzuckers) durch *C. thermocellum* ein Problem dar, wohingegen die im SC-Substrat vorhandene Arabinose und Galactose quantitativ nur eine untergeordnete Rolle spielt. Während *R. cellulolyticum* DSM 5812^T alle im Substrat vorkommenden Zucker von Natur aus abbauen und umsetzen konnte, müssten in *C. thermocellum* Stämmen z. B. zusätzlich noch die Gene für den Xyloseabbau exprimiert werden. Dass eine gleichzeitige Fermentation von Xylose und Cellobiose bzw. Cellulose für *C. thermocellum* grundsätzlich möglich ist, konnte erst kürzlich mit den Genen *xylA* und *xylB* aus *Thermoanaerobacter ethanolicus* erfolgreich gezeigt werden [Xiong *et al.*, 2018].

Ein wichtiger Punkt bei der Kombination von Cellulosehydrolyse und Lösungsmittelproduktion in einem einstufigen System sind unterschiedliche Optimaltemperaturen. Die meisten bekannten Cellulasen und Hemicellulasen haben ein Aktivitätsmaximum zwischen 50°C und 70°C [Blumer-Schuetz *et al.*, 2008, Kumar *et al.*, 2008, Maki *et al.*, 2009]. Die hier verwendeten Gene für den Butanol-Stoffwechselweg dagegen stammen aus mesophilen Clostridien, sodass eventuell eine niedrige Kultivierungstemperatur für die *C. thermocellum* Stämme nötig sein könnte. Für das ebenfalls mesophile Bakterium *R. cellulolyticum* DSM 5812^T waren keine offensichtlichen Probleme in Bezug auf die Kultivierungstemperatur zu erwarten. Auch der Abbau des lignocellulosehaltigen SC-Substrats verlief für *R. cellulolyticum* DSM 5812^T über den Temperaturbereich von 30 - 37°C gleichbleibend gut (vgl. 3.2.2.3). Es könnte jedoch sein, dass durch die eingefügten Gene toxische End- oder Zwischenprodukte entstehen, die die Zellen schädigen. Im Falle der transformierten *R. cellulolyticum* DSM 5812^T-Zellen mit den Plasmiden *pMW1* und *pMW2* könnte das möglicherweise der Grund für die beobachtete Zelllyse nach kurzem Anwachsen der Kulturen nach der Transformation sein (vgl. 3.5.4.1).

Für *C. thermocellum* Stämme gingen Temperaturen unter 50°C zwar mit einer längeren Dauer für den Celluloseabbau einher, die Umsetzung blieb aber - verglichen mit allen anderen bakteriellen Cellulosezersetzern - außergewöhnlich effizient [Zverlov & Schwarz, 2008, Dumitrache *et al.*, 2013, Chen *et al.*, 2014]. Trotzdem erreichte der Abbau des komplexen SC-

Substrats nur bei Temperaturen zwischen 55 und 60 °C optimale Werte und fiel bereits bei 50 °C sichtbar geringer aus. Sollte die Kultivierungstemperatur für die Aktivität der Enzyme aus dem Butanol-Stoffwechselwegs dagegen nebensächlich sein - worauf die Ergebnisse unter 3.5.4.6 hindeuten - wäre für einen CBP Prozess ein thermophiler Organismus sehr interessant. Durch die höheren Prozesstemperaturen können bspw. Kontaminationen vermindert, die Produktabtrennung durch Destillation oder Gas-Stripping erleichtert und der Celluloseabbau verbessert werden [Demain *et al.*, 2005, Blumer-Schuette *et al.*, 2008, Abdel-Banat *et al.*, 2010].

Trotz der Tatsache, dass *C. thermocellum* gerne als CBP Model-Organismus gehandelt wird, ist bekannt, dass bereits Ethanolkonzentrationen von 5 g/l reichen, um maßgeblich das Wachstum zu hemmen [Brown *et al.*, 2011, Zhu *et al.*, 2013]. Gegen extrazellulär zugegebenes Butanol reagierte sowohl *C. thermocellum* ATCC 27405^T als auch *R. cellulolyticum* DSM 5812^T sensitiver als solventogene Clostridien oder gar Hefen und bereits ab 4 g/l Butanol war ein vermindertes Kulturwachstum erkennbar, was den Literaturwerten entspricht [Tian *et al.*, 2019b]. Auch der Abbau von SC-Substrat verlief unter Zugabe von Butanol deutlich langsamer (vgl. 3.2.2.7). Für beide Clostridien konnte hier durch kurzfristige Adaptation ein besseres Anwachsen der Kulturen auf Butanolkonzentrationen bis 8 g/l sowie - durch langsame und schrittweise Adaptation - bis auf 14 g/l erreicht werden, wenn auch bei deutlich vermindertem Wachstum. Das weniger toxische Ethanol kann dagegen von unadaptierten *C. thermocellum* Kulturen in Konzentrationen von ca. 20 g/l toleriert werden [Brown *et al.*, 2011, Hon *et al.*, 2017]. In mehreren Studien konnte die Toleranz von *C. thermocellum* gegen Ethanol jedoch durch adaptive Evolution oder direkte Mutagenese auf bis zu 50 g/l gesteigert werden [Timmons *et al.*, 2009, Brown *et al.*, 2011, Shao *et al.*, 2011]. Diese an Ethanol adaptierten Kulturen unterscheiden sich in der Zusammensetzung ihrer Membran sowohl auf Ebene der Proteine, als auch auf der der Fettsäuren [Timmons *et al.*, 2009]. Die dadurch vergrößerte Steifigkeit der vorher eher beweglicheren Membran erhöhte die Produkttoleranz, die als einer der Schlüssel zu einem besonders geeigneten CBP-fähigen Organismus gilt [Timmons *et al.*, 2009]. Eine verbesserte Toleranz erhöht jedoch nicht zwangsläufig die Lösungsmittelproduktion, die zusammen mit der Wachstumsrate in den meisten dort analysierten Mutanten geringer ausfiel als im Wildtyp [Timmons *et al.*, 2009, Brown *et al.*, 2011]. Es konnte aber noch ein weiterer Mechanismus gefunden werden, der die Toleranz gegen Ethanol deutlich erhöht. So schienen insbesondere die Mutationen in einer bifunktionalen Aldehyd-/Alkohol-Dehydrogenase einen großen Unterschied für die Toleranz zu machen, die deren Co-Faktorspezifität von NADH nach NADPH änderten [Brown *et al.*, 2011, Shao *et al.*, 2011]. Wie die Ethanoltoleranz konnte auch die Butanoltoleranz von *C. thermocellum* DSM 1313 durch adaptive Evolution auf bis zu 15 g/l

erhöht werden; interessanterweise wurde auch dort die erhöhte Toleranz durch eine *adhE*-Mutation vermittelt (D494G) was gleichermaßen zu einer Änderung des verwendeten Cofaktors von vorher NADH zu NADPH führte [Tian *et al.*, 2019a]. Es sollte also möglich sein, die Toleranz von *C. thermocellum* ATCC 27405^T durch adaptive Evolution noch zu verbessern. Nachdem die Transformation einer an Lösungsmittel adaptierten Kultur wegen der damit einhergehenden Veränderung der Membranzusammensetzung aber vermutlich nicht, oder nur sehr schwer möglich sein dürfte, sollte das erst nach der gezielten genetischen Modifikation erfolgen.

Die beiden hier ausgewählten Clostridien haben ein recht ähnliches Spektrum an Fermentationsprodukten und auch die produzierten Mengen unterscheiden sich auf niedrigen Substratkonzentrationen nur geringfügig (vgl. Abb. 9, S. 45). Durch gaschromatographische Analyse der Kulturüberstände wurde die Konzentration von Ethanol, Isobutanol, Butanol, Essigsäure und Buttersäure für *C. thermocellum* ATCC 27405^T und *R. cellulolyticum* DSM 5812^T Kulturen und deren Transformanten bestimmt. Alle anderen Fermentationsprodukte wurden nicht weiter analysiert, weil sie oft nur in geringen Mengen oder unter bestimmten Kultivierungsbedingungen nachweisbar sind. So konnte gezeigt werden, dass auch Formiat, Pyruvat und nicht unerhebliche Mengen Aminosäuren zu den normalen Fermentationsendprodukten von *C. thermocellum* ATCC 27405^T gehören, deren Konzentration sich v.a. mit steigender Substratkonzentration noch erhöht [Ellis *et al.*, 2012, Holwerda *et al.*, 2014].

Auf 2 % Cellulose bzw. Cellobiose als Kohlenstoffquelle lagen die Fermentationsprodukte im Bereich von ca. 1 g/l Ethanol und 0,05 g/l Isobutanol, und auf 2 % unvorbehandeltem SC-Substrat im Bereich von ca. 0,5 g/l Ethanol und 0,005 g/l Isobutanol. Angesichts der Tatsache, dass mindestens 15 % des SC-Substrats nicht abgebaut werden kann (Asche) und der Rest unter den hier verwendeten Bedingungen ca. zur Hälfte abgebaut wurde (vgl. 3.2.2), ist die Konzentration der Fermentationsprodukte auf SC-Substrat mit denen auf Cellobiose oder Cellulose durchaus vergleichbar. Erwartungsgemäß dauerte der Abbau von 1,33 % SC-Substrat mit etwa 7 Tagen für *C. thermocellum* ATCC 27405^T und 10 Tagen für *R. cellulolyticum* DSM 5812^T jedoch deutlich länger, als der von Cellobiose oder Cellulose. Oberhalb von 2 % Substrat (Cellobiose oder Cellulose) konnte unter den hier analysierten Bedingungen keine höhere Konzentration an Fermentationsprodukten festgestellt werden. Eine solche Substratsättigung wird häufig bei cellulolytischen Clostridien beobachtet und wird mit einer Wachstumshemmung durch Anreicherung gelöster Zucker oder Metabolite im Medium („*carbon-catabolite-repression*“), Säurebildung, einer mangelnden Oberflächenverfügbarkeit als Andockpunkte für den Celluloseabbau oder mit dem Fehlen von Vitaminen oder Spurenelementen in Verbindung gebracht [Zhang & Lynd, 2005b, Dumitrache *et al.*, 2013,

Verbeke *et al.*, 2017, Xiong *et al.*, 2018]. Auch bei Verwendung von SC-Substrat konnte für *C. thermocellum* ATCC 27405^T eine Verringerung der Abbaurate nach 3-4 Tagen festgestellt werden, was jedoch durch Auswechseln eines Teils des Mediums, unter Wiederaufnahme des abzentrifugierten Zell- und Substratpellets, umgangen werden konnte (vgl. Abb. 13, S. 50). Das lässt vermuten, dass eine Anreicherung von Zuckern oder Abbauprodukten im Medium oder ein Mangel an Vitalstoffen für die beobachtete Stagnation verantwortlich sein dürfte. Allerdings müssen hohe Substratkonzentrationen für *C. thermocellum* nicht zwangsläufig zur Stagnation führen, was Holwerda *et al.* mit *C. thermocellum* Kulturen zeigte, die bis zu 93g/l Avicel umgesetzt werden konnten [Holwerda *et al.*, 2014].

Auch von *R. cellulolyticum* ist bekannt, dass sich höhere Substratkonzentrationen negativ auf das Wachstum auswirken und zu einer Anreicherung von NADH und Pyruvat bis zu einem toxischen Level führen [Guedon *et al.*, 1999a, Guedon *et al.*, 1999b, Guedon *et al.*, 2000a]. Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass sich eine solche Inhibierung durch Anpassung des Mediums (Verwendung einer Spurenelement- und Vitaminlösung statt Hefeextrakt) oder durch eine zusätzliche heterologe Expression von Pyruvat-verbrauchenden Stoffwechselwegen (Pyruvat-Decarboxylase und ADH) deutlich verbessern ließ [Guedon *et al.*, 2000b, Guedon *et al.*, 2002a].

Das bedeutet, dass durch Optimierung der Kultivierungsbedingungen eine Anpassung von *C. thermocellum* und auch *R. cellulolyticum* an die hohen Substratkonzentrationen, die für eine industrielle Nutzung nötig wären, erfolgen könnte.

Heterologe Expression der Gene des CoA-abhängigen Butanol-Stoffwechselwegs in *C. thermocellum* ATCC 27405^T und *R. cellulolyticum* DSM 5812^T

Prinzipiell gibt es unterschiedliche Herangehensweisen, um Butanol fermentativ in einem CBP-Prozess aus Cellulose herzustellen. Neben der *recombinant strategy* mit der versucht wird, die wichtigsten Enzyme zum Abbau von Cellulose in Lösungsmittel-Produzenten zu exprimieren, gibt es die *„native strategy“*, bei der in einem von Natur aus cellulolytischen Organismus Bioalkohole produziert werden sollen [Lynd *et al.*, 2005b, Tracy, 2012]. Letztere Strategie wurde bereits für einige cellulolytische Clostridien untersucht (s. Tab. 13, S. 99) und auch hier mit Hilfe der Gene aus dem CoA-abhängigen Butanol-Stoffwechselweg solventogener Clostridien verfolgt.

Schon vor Jahren wurden die Gene für den CoA-abhängigen Butanol-Stoffwechselweg aus solventogenen Clostridien heterolog in eine ganze Reihe von klassischen Labor- oder Produktionsstämmen wie *E. coli* [Atsumi *et al.*, 2008a, Inui *et al.*, 2008, Shen *et al.*, 2011], *S. cerevisiae*

[Steen *et al.*, 2008], *Bacillus subtilis* [Nielsen *et al.*, 2009] oder auch *Lactobacillus brevis* [Berezina *et al.*, 2010] integriert. Trotz der Verwendung monosacharidhaltiger Substrate, war die Menge an rekombinant produziertem Butanol dabei meist sehr gering (z. B.: *E. coli*: 550 – 1200 mg/l; *S. cerevisiae*: 4 mg/l; *L. brevis*: 300 mg/l; *B. subtilis*: 24 mg/l) und damit deutlich von einer industriell interessanten Konzentration entfernt [Atsumi *et al.*, 2008a, Steen *et al.*, 2008, Nielsen *et al.*, 2009, Berezina *et al.*, 2010].

Tab. 13: Butanolproduktion auf Biomasse mit Hilfe cellulolytischer Clostridien

Substrat	Stamm	Strategie	Ergebnis	Quelle
Cellulose	<i>R. cellulolyticum</i>	Isobutanol rekombinant	660 mg/l	[Higashide <i>et al.</i> , 2011]
Cellulose	<i>C. thermocellum</i>	Isobutanol rekombinant	5,4 g/l	[Lin <i>et al.</i> , 2015]
Cellulose	<i>R. cellulolyticum</i>	Butanol rekombinant	120 mg/l	[Gaida <i>et al.</i> , 2016]
Cellulose	<i>C. thermocellum</i> DSM 1313	Butanol rekombinant	195 mg/l / 357 mg/l	[Tian <i>et al.</i> , 2019c]
Cellulose	<i>C. acetobutylicum</i> und <i>R. cellulolyticum</i>	Butanol in Co-Kultur	350 mg/l	[Salimi & Mahadevan, 2013]
Cellulose	<i>C. celevecrescens</i> N3-2 / Konsortium N3 und <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	Butanol in Co-Kultur	2,7 bzw. 3,7 g/l	[Wang <i>et al.</i> , 2015]
Reisstroh	<i>C. thermocellum</i> NBRC 103400 und <i>C. saccharoperbutylacetonicum</i> N1-4	Butanol in Co-Kultur mit Vorbehandlung	5,5 g/l	[Kiyoshi <i>et al.</i> , 2015]
Cellulose	<i>C. thermocellum</i> JN4 und <i>C. saccharoperbutylacetonicum</i> N1-4	Butanol in Co-Kultur	7,9 g/l	[Nakayama <i>et al.</i> , 2011, Nakayama <i>et al.</i> , 2013]
Mais-spindeln	<i>C. cellulovorans</i> 743B und <i>C. beijerinckii</i> NCIMB 8052	Butanol in Co-Kultur mit alk. Vorbehandlung	10,9 g/l	[Wen <i>et al.</i> , 2014]

Um den CoA-abhängigen Butanol-Stoffwechselweg heterolog in cellulolytische Clostridien zu exprimieren, die nicht in die Gruppe der klassischen Laborstämme fallen, ist ein etwas größerer Aufwand nötig. Denn obwohl in den letzten Jahren eine ganze Reihe von neuen Werkzeugen und Vorgehensweisen für die genetische Modifikation von Clostridien entwickelt und erfolgreich getestet wurden, sind wir noch ein ganzes Stück davon entfernt, ihren Stoffwechsel komplett zu verstehen und schnell und einfach in ihn einzugreifen [zusammengefasst in: Lutke-Eversloh & Bahl, 2011, Joseph *et al.*, 2018, Kolesinska *et al.*, 2019].

In der vorliegenden Arbeit konnten eine Reihe unterschiedlicher Transformanten erhalten werden, die Butanol direkt aus Cellulose produzieren können. Weil die Größe und Menge der integrierten Gene für den Butanol-Stoffwechselweg zu sehr großen Plasmiden führte, waren die Transformationsraten aber gering (vgl. 3.5).

Wenngleich zu erwarten gewesen wäre, dass *R. cellulolyticum* DSM 5812^T - als mesophiles Bakterium - besser geeignet ist, um darin die Enzyme für den Butanol-Stoffwechselweg, die ebenfalls aus mesophilen Organismen stammen, heterolog zu exprimieren, war es in diesem Fall deutlich schwieriger, analysierbare Kulturen zu erhalten. In *R. cellulolyticum* DSM 5812^T konnte hier nur mit einem der getesteten Plasmide - *pHYc-BCS-thl*, das die Gene des BCS-Operons und eine Thiolase aus *C. acetobutylicum* enthält - bis zu 3 mg/l Butanol nachgewiesen werden. Dasselbe Plasmid hatte in *L. brevis* zu einer Produktion von immerhin 300 mg/l Butanol geführt [Berezina *et al.*, 2010]. Gaida *et al.* konnte 2016 den CoA-abhängigen Butanol-Stoffwechselweg (mit den Genen *crt*, *hbd*, *bcd* und *adhE2* aus *C. acetobutylicum*) in *R. cellulolyticum* H10 transformieren und damit Butanol direkt aus Cellulose produzieren [Gaida *et al.*, 2016]. Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit verwendeten Genen wurde dabei auf die Gene *etfA/B* verzichtet, *adhE1* durch *adhE2* ersetzt und statt *thl* aus *C. acetobutylicum* *atoB* aus *E. coli* verwendet. Das durch *atoB* kodierte Enzym AtoB besitzt eine höhere spezifische Aktivität, wird nicht durch freies CoA inhibiert und hatte bereits bei der rekombinanten Butanolproduktion in *E. coli* gut funktioniert [Shen *et al.*, 2011, Gaida *et al.*, 2016]. Die Verwendung dieser Kombination von Genen führte dort zu keinem verringerten Wachstum der transformierten *R. cellulolyticum* H10 Zellen und resultierte in bis zu 120 mg/l Butanol [Gaida *et al.*, 2016].

Jeder hier unternommene Transformationsversuch mit den Plasmiden *pMW1* und *pMW2*, führte für *R. cellulolyticum* DSM 5812^T im besten Fall zur Zellyse nach kurzem Anwachsen der Transformationsansätze auf eine geringe optische Dichte (OD₆₀₀) von ca. 0,2. Auch durch Versuche mit unterschiedlichen Kultivierungstemperaturen, Substraten oder Substratkonzentrationen direkt nach der Transformation (in Flüssigmedium oder auf Kulturplatten) konnten keine analysierbaren Einzelkulturen von *R. cellulolyticum* DSM 5812^T mit den Plasmiden *pMW1* oder *pMW2* erhalten werden. Im Kulturüberstand der lysierten Zellen des Transformationsansatzes mit dem Plasmid *pMW1* konnte jedoch - trotz nur sehr geringer Zelldichte - mit 4 mg/l bereits etwas mehr Butanol nachgewiesen werden, als mit dem Plasmid *pHYc-BCS-thl* (vgl. 3.5.4.1). Da eine so geringe Butanolkonzentration jedoch nicht toxisch für die Zellen ist, dürfte wohl weniger das produzierte Butanol selbst, als vielmehr die Anreicherung eines der Zwischenprodukte den transformierten *R. cellulolyticum* DSM 5812^T Kulturen erheblich geschadet haben. Ein ähnliches Problem ergab sich auch bei der Transformation von *R. cellulolyticum* mit den Genen für die Isobutanolproduktion über den Weg der 2-Keton-Säure-Zwischenprodukte. Dort konnte

gezeigt werden, dass vermutlich das Genprodukt der eingefügten Acetolactat-Synthase (*alsS*) einen toxischen Effekt auf *R. cellulolyticum* hat [Higashide *et al.*, 2011]. Wahrscheinlich könnte - durch Variation oder Anpassung der verwendeten Gene (vgl. [Gaida *et al.*, 2016]) oder durch die Verwendung eines regulierbaren Promotors - die hier in *R. cellulolyticum* beobachtete Zelllyse verhindert werden, um so Einzelkulturen zu isolieren, die den CoA-abhängigen Butanol-Stoffwechselweg rekombinat exprimieren.

Im Gegensatz zu den Schwierigkeiten mit *R. cellulolyticum* DSM 5812^T konnten in *C. thermocellum* ATCC 27405^T einige der verwendeten Plasmide mit den Genen für den Butanol-Stoffwechselweg transformiert und damit Butanol direkt aus Cellulose hergestellt werden. Die hier angewandte Vorgehensweise zur Integration des CoA-abhängigen Butanolstoffwechsels in *C. thermocellum* ATCC 27405^T ist in Abb. 46 schematisch dargestellt. Die höchste nachgewiesene Butanolkonzentration in den *C. thermocellum* ATCC 27405^T Transformanten wurde mit den Plasmiden *pMW1* und *pMW2* erzielt, die vom Kooperationspartner an der Universität Ulm zur Verfügung gestellt worden waren [Wensche, 2013]. Sie lag sowohl für *C. thermocellum* ATCC 27405^T -*pMW1* als auch -*pMW2* maximal bei 13 mg/l nach 7 Tagen, durchschnittlich jedoch meist im Bereich von 5 mg/l. Daneben konnte in beiden Transformanten mehr Ethanol (insbesondere bei niedrigeren Temperaturen) und Isobutanol nachgewiesen werden. Anhand der Verteilung der unterschiedlichen Endprodukte über die Zeit lässt sich erkennen, dass Ethanol und Essigsäure hauptsächlich am Anfang und während der exponentiellen Wachstumsphase produziert wurden. Isobutanol und Butanol wurden dagegen auch nach Ende des Wachstums und bis zum Ende des hier analysierten Zeitraums von meist 4 - 7 Tagen gebildet, allerdings immer nur in sehr geringem Umfang, so dass die Werte nur langsam anstiegen. Eine ähnlich langsame Steigerung konnten auch Gaida *et al.* an den *C. cellulolyticum* Kulturen feststellen, in denen der CoA-abhängige Butanol-Stoffwechselweg rekombinant exprimiert war. Auch dort stieg die Butanolproduktion auf Cellulose nur sehr langsam (über 20 Tage) auf bis zu 120 mg/l an, während auf Cellobiose nicht mehr als 40 mg/l (nach 150 h) nachgewiesen werden konnten [Gaida *et al.*, 2016].

Um die Menge an produziertem Butanol durch Anpassung der Kultivierungsbedingungen zu verbessern, wurden unterschiedliche Medien, Substrate und Inkubationstemperaturen analysiert. Ein Großteil der hier verwendeten Medien basiert auf GS2, das sowohl für *C. thermocellum* Stämme als auch für *C. cellulolyticum* DSM 5812^T zu gutem Wachstum unter Standardbedingungen führt und ein gängiges Medium zur Kultivierung cellulolytischer Clostridien ist [Johnson *et al.*, 1981].

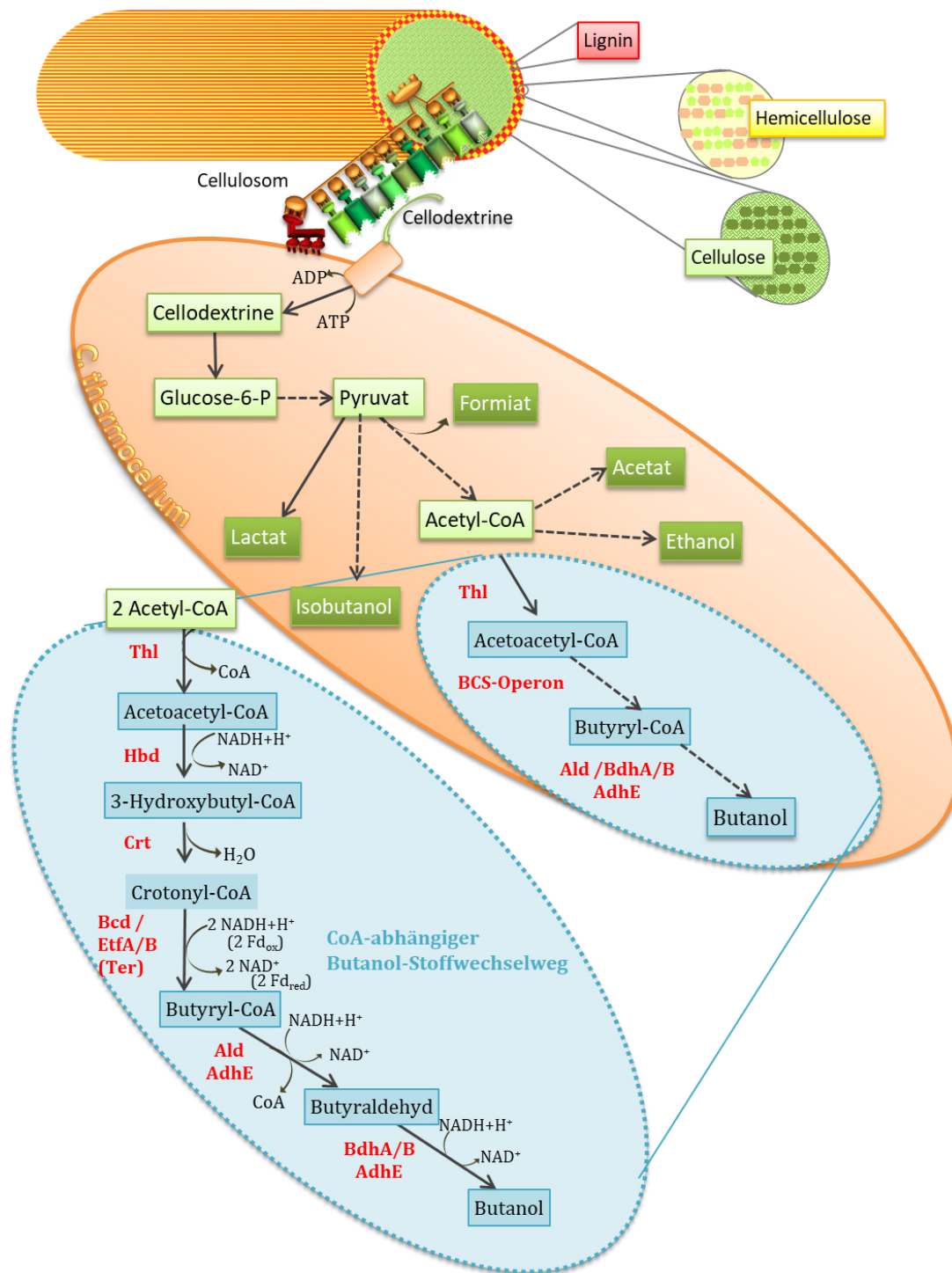


Abb. 46: Schematische Darstellung der hauptsächlichsten Fermentationsprodukte von *C. thermocellum* und der Integration des CoA-abhängigen Butanolstoffwechselwegs aus solventogenen Clostridien; *C. thermocellum* kann mit Hilfe des zellgebundenen Cellulosoms Biomasse abbauen, die entstandenen Cellodextrine aufnehmen und eine Vielzahl von Fermentationsendprodukten daraus produzieren. Im blauen Oval ist der CoA-abhängige Butanol-Stoffwechselweg gezeigt, der hier über die Plasmide *pMW1* und *pMW2* in *C. thermocellum* ATCC 27405^T eingefügt wurde. Thiolase (Thl), β -Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase (Hbd), Crotonase (Crt), Butyryl-CoA-Dehydrogenase (Bcd), die Untereinheiten des Elektronentransfer Flavoproteins (EtfA/B), Butyraldehyd-Dehydrogenase (Ald) und Butanol-Dehydrogenase (Bdh), bifunktionale Aldehyd/Alkohol-Dehydrogenasen (AdhE), Alkohol-Dehydrogenasen (BdhA und BdhB).

Der darin enthaltene Hefeextrakt (6 g/l) wurde in den ebenfalls getesteten Medien GS2Y verdoppelt und in MJ-Medium durch eine Vitaminlösung ersetzt (vgl. 2.7.1). Bei der Wachstumsanalyse auf diesen drei Medienvarianten zeigte sich, dass die final höchsten Butanolkonzentrationen auf GS2 erzielt werden konnten (vgl. Abb. 43, S. 84). Bei Verwendung von MJ (ohne Hefeextrakt), fielen die Konzentrationen von Ethanol, Essigsäure und Isobutanol sowie das Wachstum geringer aus, die Butanolkonzentration blieb aber in etwa gleich und war somit anteilmäßig höher. Die doppelte Menge Hefeextrakt im Medium führte dagegen zu niedrigeren Isobutanol und Butanolkonzentrationen in den Kulturüberständen. In aktuellen Studien zur rekombinanten Produktion von Alkoholen in *C. thermocellum* (vgl. Tab. 13, S. 99) werden vorwiegend synthetische Medien verwendet, die auf MTC-5 (*Medium for Thermophilic Clostridia*) basieren. Verglichen mit den hier verwendeten synthetischen Medium MJ nach Johnson *et al.* wurde in neueren Studien mit 10-20-fach höheren Vitaminkonzentrationen und einer zusätzlichen Spurenelementlösung gearbeitet [Holwerda *et al.*, 2012, Holwerda *et al.*, 2014, Lin *et al.*, 2015, Tian *et al.*, 2019c]. Ausgehend von MTC-5 Medium (10-fach höhere Konzentration an Vitaminen als MJ), entwickelte und verwendete Holwerda *et al.* LC Medium, das für die Versuche zur Umsetzung von sehr hohen Substratkonzentrationen auf einen möglichst geringen Kohlenstoffhintergrund ausgerichtet war [Holwerda *et al.*, 2012]. In den damit unternommenen Analysen konnte gezeigt werden, dass eine mehrmalige Zugabe von Vitaminen im Kultivierungsverlauf förderlich ist und zu einer deutlich besseren Substratumsetzung führte [Holwerda *et al.*, 2014]. Tian *et al.* nutzte zur rekombinanten Butanolproduktion eine Variation von MTC-5, verdoppelte die Vitaminlösung dabei aber nochmals [Tian *et al.*, 2019c]. Auch wenn es keine genaueren Analysen zum Vitaminbedarf gibt, scheinen sowohl die Menge als auch der Zeitpunkt der Vitaminzugabe einen deutlichen Effekt auf die Substratumsetzung und auch auf die Höhe der Fermentationsprodukte zu haben.

Eine Ergänzung von GS2 mit Zusätzen, die die Lösungsmittelproduktion in solventogenen Clostridien verbessern (wie Eisen(II)-Sulfat, Ammoniumacetat oder Glucose), führte zu keinen höheren Butanolkonzentrationen und resultierte hauptsächlich in einer verringerten Produktion von Isobutanol (vgl. Abb. 39, S. 78). Es gibt darüber hinaus noch eine Reihe von weiteren Medienzusätzen, die gängiger Weise verwendet werden, um die Lösungsmittelproduktion in solventogenen Clostridien zu steigern. Clostridien benötigen zur Produktion von Alkoholen ein hohes Redoxpotential. So lässt sich häufig über die Verfügbarkeit von zusätzlichen Reduktionsäquivalenten (z. B. durch Zugabe von Glycerin oder Methylviologen zum Medium) die Butanolproduktion verbessern und das Verhältnis der einzelnen Produkte verschieben [Mitchell, 1998, Tashiro *et al.*, 2007, Atsumi *et al.*, 2008a, Zhang *et al.*, 2014]. Durch Methylviologen konnte auch in *C. thermocellum* ATCC 27405^T und den Transformanten mit den Plasmiden *pMW1* und

pMW2 die Menge und Zusammensetzung der Fermentationsprodukte geringfügig beeinflusst werden (vgl. Abb. 41, S. 81). In *C. thermocellum* ATCC 27405^T-*pMW2* führte das neben einer geringfügigen Steigerung der Butanolproduktion v.a. zu einer höheren Ethanol- und einer geringeren Isobutanolproduktion. Die Zugabe von Zusätzen (insbesondere von solchen kostenintensiven wie Methylviologen) und die Analyse des dadurch geänderten Verhältnisses der Fermentationsprodukte, dürfte erst dann sinnvoll sein, wenn die grundsätzliche Butanolproduktion deutlich höher liegt. Die Zugabe von Ethanol zum Fermentationsansatz, einem der hauptsächlichen Endprodukte von *C. thermocellum* ATCC 27405^T, wäre auch eine Möglichkeit das Produktverhältnis zu verschieben und so die Bildung der anderen Fermentationsprodukte zu begünstigen. So konnte Tian *et al.* 2019 zeigen, dass sich durch Zugabe von Ethanol (in derselben Größenordnung, wie es *C. thermocellum* ATCC 27405^T selbst produziert) das Produktverhältnis verschieben und so die Butanolproduktion um bis zu 20 % steigern ließ [Tian *et al.*, 2019d].

Obwohl ein Einfluss der Medienzusammensetzung auf die Produktbildung für *C. thermocellum* und *R. cellulolyticum* bekannt ist, ist sie jedoch nicht gänzlich geklärt [Holwerda *et al.*, 2012]. Hier war sowohl die Butanol- als auch die Isobutanolbildung von *C. thermocellum* ATCC 27405^T und dessen Transformanten in geringem Umfang von der Medienzusammensetzung und -ergänzung abhängig. Ausgehend von den Medien in aktuellen Veröffentlichungen (s.o.), könnte eine genauere Bestimmung und Optimierung des Vitamin- und Spurenelementbedarfs in weiterführenden Fermentationsanalysen mit *C. thermocellum* Kulturen zu einer Verbesserung des Substratabbaus und zu gesteigerten Lösungsmittelkonzentrationen führen.

Die Zusammensetzung eines Mediums zur Optimierung der Lösungsmittelproduktion direkt auf einem cellulosehaltigen Substrat hängt vermutlich auch stark von der Substratwahl und dessen Beschaffenheit ab. Für *C. thermocellum* ATCC 27405^T und *R. cellulolyticum* DSM 5812^T ist bekannt, dass hohe Substratkonzentrationen häufig zu einer Wachstumsinhibierung führen, was auch für die hier analysierten Kulturen oberhalb von ca. 2 % Substrat erkennbar war (vgl. S. 97) [Zhang & Lynd, 2005b, Xiong *et al.*, 2018]. Deswegen wurde sowohl für die Analyse der Fermentationsprodukte in den Kulturüberständen von *C. thermocellum* ATCC 27405^T und *R. cellulolyticum* DSM 5812^T als auch für die der Transformanten meist mit 2 % Substrat gearbeitet. Generell produzierten die *C. thermocellum* Transformanten mit den Plasmiden *pMW1* und *pMW2* mehr Ethanol, Isobutanol und Butanol als der Wildtyp. Insbesondere die Verwendung von Cellulose in GS2 führte für Kulturen beider Transformanten zu ca. 1/3 höheren Ethanol- und Isobutanolwerten als bei *C. thermocellum* ATCC 27405^T. Im Vergleich dazu waren die Werte für diese beiden Alkohole auf Cellulose in Minimalmedium (MJ) eher gering, was auch an dem geringeren Wachstum der Transformanten in MJ liegen dürfte. Für *C. ther-*

thermocellum ATCC 27405^T-*pMW2* konnten auf Cellulose - in beiden Medien - höhere Butanolwerte erreicht werden, als auf Cellobiose, während für *C. thermocellum* ATCC 27405^T-*pMW1* kein deutlicher Unterschied in der Butanolproduktion in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle erkennbar war. Nachdem sich die beiden Transformanten nur in den Gen(en) für die Aldehyd- und Alkohol-Dehydrogenase(n) (*adhE* auf dem Plasmid *pMW2* bzw. *bdh+ald* auf *pMW1*) unterscheiden, scheint die Verwendung von *adhE* auf Cellulose zu einer bevorzugten Bildung von Butanol beizutragen. Allerdings lag die maximale Butanolkonzentration mit 13 mg/l immer in einem sehr niedrigen Bereich und weit unterhalb derjenigen für Ethanol und Isobutanol.

Insbesondere bei hohen Substratkonzentrationen nutzt *C. thermocellum* eine Vielzahl von unterschiedlichen - und hauptsächlich NADH-abhängigen - Stoffwechselwegen, um die NAD Regeneration und damit die Glykolyse an Laufen zu halten [Holwerda *et al.*, 2014]. Mit steigenden Substratkonzentrationen - wie sie für eine industrielle Anwendung nötig wären - müsste das Medium angepasst werden, um den Substratabbau zu verbessern und eine Stagnation zu vermeiden. Nach Optimierung der Bedingungen konnten beispielsweise bis zu 93 g/l Avicel von *C. thermocellum* DSM 1313 in bis zu 12 g/l Ethanol und 1,6 g/l Isobutanol umgesetzt werden [Holwerda *et al.*, 2014]. Dafür wurde ein Medium mit einem geringen Kohlenstoffhintergrund verwendet sowie eine Spurenelementlösung und eine 10-fach höhere Menge an Vitamine als in dem hier verwendeten MJ Medium, die dosiert im Laufe des Wachstums zugesetzt wurden [Holwerda *et al.*, 2012, Holwerda *et al.*, 2014].

Nachdem es sich bei *C. thermocellum* um einen thermophilen Organismus handelt, war davon auszugehen, dass neben der Medienzusammensetzung auch die Kultivierungstemperatur einen Einfluss auf das Wachstum der Transformanten und die Bildung von Fermentationsprodukten haben würde. Eine Kultivierung bei 42°C führte sowohl in *C. thermocellum* ATCC 27405^T und - noch verstärkt - in den Transformanten zur bevorzugten Bildung von Ethanol. Dagegen wurde wider Erwarten bei 60°C etwas mehr Butanol und Isobutanol produziert als bei niedrigeren Temperaturen. Die drei Stoffwechselwege für Ethanol, Butanol und Isobutanol teilen sich v.a. die Abhängigkeit von Pyruvat und NADH sowie die Aktivität der Aldehyd- und Alkohol-Dehydrogenase(n). Entsprechend könnte z.B. eine veränderte NADH-Verfügbarkeit oder die Temperatursensitivität und dadurch geänderte Spezifität einer Alkohol-Dehydrogenase der Grund für die Verschiebung der Fermentationsprodukte mit sinkender Inkubationstemperatur sein. Nachdem gezeigt werden konnte, dass auch die Aldehyd- und Alkohol-Dehydrogenase(n) aus *C. thermocellum* dazu in der Lage sind, Butylaldehyd bzw. Isobutylaldehyd in Butanol bzw. Isobutanol umzusetzen (vgl. 3.5.4.3 und s. S. 107), könnte auch deren Aktivität zu einer Verschiebung der Fermentationsprodukte beigetragen haben. Von den Enzymen, die durch die

Gene des BCS-Operons kodiert werden, wurde bisher nur für Hbd eine sehr hohe Temperaturstabilität sowie eine hohe Toleranz gegen Butanol nachgewiesen [Sommer *et al.*, 2013]. Für alle Schritte des Butanol-Stoffwechselweges gäbe es auch Isoenzyme aus thermophilen Bakterien [Keller *et al.*, 2015, Loder *et al.*, 2015, Tian *et al.*, 2019c]. Allerdings lagen die Ergebnisse von Tian *et al.* - in der Genkombination, die der hier verwendeten am nächsten kommt - bei Verwendung von Genen (*thl*, *crt*, *bcd*, *etfAB*, *bad*) aus verschiedenen thermophilen Organismen sowie *bdh* aus *C. acetobutylicum*, mit einer Butanolkonzentration von 15 mg/l (7 d; 20 g/l Cellobiose) nur geringfügig höher [Tian *et al.*, 2019c]. Aus den hier gewonnenen Ergebnissen und den Vergleichswerten mit Genen aus unterschiedlichen thermophilen Organismen von Tian *et al.*, kann davon ausgegangen werden, dass die Enzyme aus den Butanol-Stoffwechselweg - trotz ihres Ursprungs aus mesophilen Clostridien - eine recht hohe Temperaturstabilität besitzen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass es nicht nötig ist, die Kultivierungstemperatur zu senken, was insbesondere für einen effektiven Celluloseabbau eine gute Voraussetzung wäre [Demain *et al.*, 2005].

R. cellulolyticum und auch *C. thermocellum* produzieren neben Ethanol, Isobutanol und Essigsäure noch eine Vielzahl weiterer Produkte [Higashide *et al.*, 2011, Ellis *et al.*, 2012, Holwerda *et al.*, 2014]. Für *C. thermocellum* gehören dazu neben Ethanol, Milch- und Essigsäure auch Ameisensäure, 2,3-Butandiol (SS, RR und auch *meso*-2,3-Butandiol) und Isobutanol sowie Pyroglutamat, Xylitol, Pyruvat, 1,2,3-Butantriol, 2-Methyl-1-Butanol und 3-Methyl-1-Butanol [Holwerda *et al.*, 2014]. Außerdem konnte eine überraschend hohe Bildung von extrazellulären Aminosäuren nachgewiesen werden, die durch Knock-Out konkurrierender Stoffwechselwege (ΔIdh für Lactat und/oder Δpta für Acetat) oder steigende Substratkonzentrationen noch verstärkt werden konnte [van der Veen *et al.*, 2013b, Holwerda *et al.*, 2014].

Die Mehrzahl der Stoffwechselwege, die zu den diversen Fermentationsendprodukten von *C. thermocellum* führen, sind NADH-abhängig; genau wie der Butanol-Stoffwechselweg, der hier integriert wurde (vgl. Abb. 46, S. 102). Die dadurch entstehende mangelnde NADH- und Pyruvat-Verfügbarkeit dürfte vermutlich der größte Engpass für eine gesteigerte rekombinante Butanolproduktion sein. Um diese Engstelle im rekombinanten Stoffwechselweg zu verbessern, müsste voraussichtlich die Produktion einiger konkurrierender Nebenprodukte wie Ethanol, Essig-, Ameisen- oder Milchsäure vermindert bzw. entfernt und zusätzlich die Cofaktorabhängigkeit der einzelnen Stoffwechselschritte optimiert werden. Bei Versuchen zur Steigerung der Ethanolproduktion in cellulolytischen Clostridien ergab sich eine ähnliche Problematik. So konnte für *R. cellulolyticum* DSM 5812^T bereits nachgewiesen werden, dass durch Knock-out der L-Lactat-Dehydrogenasen (Ccel_0137 und Ccel_2485) und der L-Malat-Dehydrogenase

(Ccel_0135) entsprechende Nebenprodukte vermieden und dadurch die Ethanolproduktion deutlich verbessert werden konnte [Li *et al.*, 2012]. Auch für *C. thermocellum* war ein umfangreiches Eingreifen in dessen Stoffwechsel an mehreren Stellen notwendig, um eine deutliche Steigerung der Ethanolproduktion zu erzielen (zusammengefasst in: Olson *et al.*, 2015]. Ausgehend von einem genetisch modifizierten *C. thermocellum* Stamm ($\Delta hpt \Delta hydG \Delta ldh \Delta pfl \Delta ptack$ [Papanek *et al.*, 2015]), der aber nur schlechtes Wachstum zeigte, konnten so durch zwei anschließende Runden adaptiver Evolution verbessertes Wachstum und Ethanolkonzentrationen von bis zu 25 g/l erhalten werden [Tian *et al.*, 2016].

Wie Ethanol, das bereits seit Jahren als Treibstoffzusatz verwendet wird, wäre auch Isobutanol hervorragend für einen solchen Einsatz geeignet. Es besitzt ähnliche technische Eigenschaften wie Butanol und stellt eine gute Alternative für die Kraftstoffgewinnung aus Biomasse dar [Chen & Liao, 2016]. Ethanol und auch Isobutanol können von *R. cellulolyticum* und *C. thermocellum* schon von Natur aus produziert werden, wobei für *C. thermocellum* bis zu 1,6 g/l Isobutanol bei der Verwendung sehr hoher Substratkonzentrationen nachgewiesen werden konnten [Holwerda *et al.*, 2014]. Es wird davon ausgegangen, dass Isobutanol in beiden cellulolytischen Clostridien über den Valin-Stoffwechselweg und die Enzyme Ketoisovalerat-Oxidoreduktase und Acetolactat-Synthase in Kombination mit Alkohol-Dehydrogenasen synthetisiert wird [Higashide *et al.*, 2011]. Durch zusätzlich eingefügte Gene für eine α -Ketoisovalerate-Decarboxylase (*kivd*) und eine α -Acetolactat-Synthase (*ilvBN/ilvCD*) konnte die in *R. cellulolyticum* auch in *C. thermocellum* bereits vorhandene Isobutanolproduktion noch deutlich auf 660 mg/l bzw. 5,4 g/l gesteigert werden [Higashide *et al.*, 2011, Lin *et al.*, 2015]. Neben einer Isobutanolkonzentration von bis zu 22 g/l (50 g/l mit Produktentfernung) in *E. coli* [Atsumi *et al.*, 2008b, Atsumi *et al.*, 2010, Baez *et al.*, 2011], konnte auch in mehreren anderen Organismen bereits Isobutanol über unterschiedliche Stoffwechselwege hergestellt werden [Li *et al.*, 2011, Lee *et al.*, 2012, Brat & Boles, 2013, Lin *et al.*, 2014]. Nachdem der Isobutanol-Stoffwechselweg vom Aminosäure-Stoffwechsel abzweigt, lässt er sich vermutlich einfacher in recht unterschiedlichen Organismen rekombinant darstellen [Lan & Liao, 2013]. Das dürfte - zusammen mit den höheren Produktkonzentrationen - auch für die Verwendung von Biomasse als Ausgangssubstrat zur rekombinanten Produktion von Bioalkoholen ein Vorteil gegenüber Butanol sein.

Der letzte Schritt im Isobutanol- und auch im Butanol-Stoffwechselweg wird von Alkohol-Dehydrogenasen katalysiert. Neben einigen Alkohol-Dehydrogenasen (Cthe_0101, Cthe_0394, Cthe_2579) besitzt *C. thermocellum* selbst auch eine bifunktionale Aldehyd-Alkohol-Dehydrogenase (Cthe_0423) [Raman *et al.*, 2011, Lo *et al.*, 2015, Rydzak *et al.*, 2015]. In den

hier unternommenen Versuchen zur Substratspezifität dieser *C. thermocellum* ATCC 27405^T Dehydrogenasen konnte gezeigt werden, dass sie unspezifisch genug sind, um dem Medium zugesetzte Buttersäure oder auch Butyraldehyd zu Butanol umzusetzen und ebenso Isobutyraldehyd zu Isobutanol [s. 3.5.4.3]. Dabei konnte von *C. thermocellum* ATCC 27405^T aus der zugesetzten Buttersäure bis zu 0,18 g/l Butanol gebildet werden. Eine schrittweise Zugabe von Butyraldehyd bzw. Isobutyraldehyd lieferte in *C. thermocellum* ATCC 27405^T und in beiden Transformanten mit den Plasmiden *pMW1* und *pMW2* sogar bis zu 1,8 g/l Butanol bzw. 1,5 g/l Isobutanol innerhalb weniger Stunden (vgl. Abb. 40, S. 80). Das lässt vermuten, dass die Aldehyd-/ und Alkohol-Dehydrogenase(n) aus *C. thermocellum* ATCC 27405^T ausreichen dürften, um die letzten Schritte des Butanol- und auch des Isobutanol-Stoffwechselwegs selbstständig zu katalysieren und nicht zusätzlich integriert werden müssten. Allerdings könnte eine zusätzliche Optimierung der vorhandenen bifunktionalen Aldehyd-/ Alkohol-Dehydrogenase eine deutliche Verbesserungen der Spezifität für Butanol und / oder der Toleranz gegen Butanol ermöglichen. So ließ sich für *C. acetobutylicum* durch geringe Modifikationen der Aldehyd-Alkohol-Dehydrogenase die Spezifität für Butanol gegenüber Ethanol auf bis zu 17:1 steigern [Dai *et al.*, 2016, Cho *et al.*, 2019]. Für *C. thermocellum* konnte gezeigt werden, dass bereits der Austausch einer einzigen Aminosäure, die die Co-Faktorspezifität der bifunktionalen Aldehyd-Alkohol-Dehydrogenase aus *C. thermocellum* DSM 1313 von NADH nach NADPH änderte, dafür verantwortlich war, die Toleranz gegen verschiedene Alkohole deutlich zu erhöhen [Tian *et al.*, 2019a]. Sowohl eine hohe Toleranz als auch eine hohe Spezifität gelten als Schlüssel für einen besonders geeigneten CBP Organismus, sodass eine Optimierung der verwendeten (Aldehyd-/) Alkohol-Dehydrogenase(n) wahrscheinlich auch zu einer höheren Butanolproduktion beitragen dürfte - insbesondere, wenn dabei deren Cofaktorspezifität geändert werden kann.

Bei der Analyse von GT6 als potenzieller Gen-donor für eine verbesserte rekombinante Butanolproduktion wurde eine Repressorbindestelle in der Promotorregion des BCS-Operons gefunden (vgl. 3.4.3), die auch in verschiedenen solventogenen Clostridien nachgewiesen werden konnte [Panitz *et al.*, 2014, Zhang *et al.*, 2014]. Der Repressor Rex reguliert wahrscheinlich in solventogenen Clostridien und in einer Vielzahl anderer Bakterien in Abhängigkeit von der NADH-Verfügbarkeit die Transkription einer ganzen Reihe NADH-abhängiger Gene wie auch die des BCS-Operons oder der Thiolase [McLaughlin *et al.*, 2010, Ravcheev *et al.*, 2012, Zhang *et al.*, 2014]. Als ergänzende Maßnahme und um die NADH-Verfügbarkeit spezifisch für die eingefügten Gene zu verbessern, könnte die Repressor-Rex-Bindestellen mutiert werden, die sowohl in der Promotorregion vor dem BCS-Operon als auch vor den (Aldehyd-/)Alkohol-Dehydrogenase(n) in den Plasmiden *pMW1* und *pMW2* vorhanden sind. Durch die fehlende

Repressor-Rex-Bindestelle vor den eingefügten Genen des Butanol-Stoffwechselwegs, könnte eventuell eine Repression dieser Gene durch mangelnde NADH-Verfügbarkeit umgangen werden. Optimal könnte das gleichzeitig dazu führen, dass die Gene, die für Enzyme aus konkurrierenden NADH-abhängigen Stoffwechselwegen codieren, umso deutlicher reprimiert bleiben. Mit dem dafür testweise konstruierten Plasmid *pIMP1-thl-ter_{mut}* (mit *ter* für eine *trans*-Enoyl-CoA-Reductase statt *bcd/etfA/B* (s.u.) und mit einer mutierten Rex-Bindestelle vor der Crotonase; vgl. Tab. 11, S. 63) konnten in ersten Tests in *C. thermocellum* ATCC 27405^T aber keine höheren Butanolkonzentrationen erhalten werden als mit den Plasmiden *pMW1* und *pMW2*.

Für einen genetisch modifizierten *C. acetobutylicum* Stamm (Δ CAC1502 Δ upp) wurde vor kurzem versucht, neben den Genen *ptb*, *buk*, *ctfAB* und *ldhA* (vgl. Abb. 1) auch das Gen *rexA* für den Repressor Rex zu deletieren [Nguyen *et al.*, 2018]. Das führte zwar zu einer höheren Aktivität von Hbd (Acetoacetyl-CoA \rightarrow 3-Hydroxybutyryl-CoA), aber nicht der Thiolase (Acetyl-CoA \rightarrow Acetoacetyl-CoA), da diese zusätzlich noch über die CoenzymA-Verfügbarkeit reguliert ist. Auch das Ersetzen von *thlA* durch *AtoB* (aus *E. coli*) verbesserte das Butanol zu Ethanol Verhältnis nur geringfügig. Erst der Austausch des Gens *hbd* für eine NADH-abhängige β -Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase durch das Gen für das entsprechende aber NADPH-abhängige Enzym aus *C. kluyveri*, führte zu einer deutlich höheren Butanolproduktion. Erst durch diese Vielzahl von Eingriffen in den endogenen Butanol-Stoffwechselweg gekoppelt mit einer Optimierung des technischen Prozesses, konnte die Butanolkonzentration soweit zu erhöht werden, dass eine biotechnologische Produktion auch aktuell rentabel sein kann. [Nguyen *et al.*, 2018]

Wie auch hier konnte in den meisten anderen Fällen, in denen der Butanol-Stoffwechselweg aus solventogenen Clostridien übernommen und rekombinant in industriellen Produktionsstämmen exprimiert wurde, nur wenig Butanol produziert werden [Atsumi *et al.*, 2008a, Steen *et al.*, 2008, Nielsen *et al.*, 2009, Berezina *et al.*, 2010]. Der CoA-abhängige Butanol-Stoffwechselweg nutzt im Bcd/EtfA/B Komplex, der Crotonyl-CoA zu Butyryl-CoA katalysiert, neben dem Cofaktor NADH auch noch Ferredoxin [Bennett & Rudolph, 1995, Li *et al.*, 2008, Buckel & Thauer, 2013]. Dieser gekoppelte Reaktionsschritt sorgt v.a. rekombinant für Probleme [Atsumi *et al.*, 2008a, Inui *et al.*, 2008, Nielsen *et al.*, 2009, Berezina *et al.*, 2010]. Mit der *trans*-Enoyl-CoA-Reductase Ter (ursprünglich aus *Treponema denticola* [Tucci & Martin, 2007]) gibt es ein weiteres Enzym für den Schritt von Crotonyl-CoA zu Butyryl-CoA, das in den meisten neueren Versuchen, den Butanol-Stoffwechselweg rekombinant darzustellen, auch (z.T. modifiziert) verwendet wurde [Shen *et al.*, 2011, Kataoka *et al.*, 2015, Loder *et al.*, 2015, Tian *et al.*, 2019c]. Die Vorteile von Ter im Vergleich zum Bcd/EtfA/B Komplex sind, dass das Enzym nicht

sauerstoffanfällig ist, die Reaktion nicht reversibel ist und auch, dass es NADH direkt nutzt [Tucci & Martin, 2007, Shen *et al.*, 2011, Bond-Watts *et al.*, 2012]. Um zu überprüfen, ob dieses Enzym in *C. thermocellum* ATCC 27405^T zu einer deutlichen Steigerung der Butanolbildung führt, wurden einige Transformationen mit dem Plasmid *pIMP1-thl-ter* unternommen, das neben *thl*, *crt* und *hbd* ein Gen für eine *trans*-Enoyl-CoA-Reductase besitzt, deren Codonverwendung an Clostridien angepasst wurde (jedoch keine Alkohol-Dehydrogenase). Mit diesem Konstrukt konnte zwar sowohl in *E. coli* (anaerob) als auch in *C. thermocellum* ATCC 27405^T Butanol produziert werden, allerdings lag die Menge unter der, die mit den Plasmiden *pMW1* und *pMW2* erzielt werden konnte (vgl. 3.4.4). Auch andere Studien ergaben, dass die Verwendung von *ter* zwar die Produktion von Butanol rekombinant etwas verbessern kann, als alleinige Maßnahme jedoch nicht ausreicht, um eine deutliche Butanolsteigerung zu erzielen [Shen *et al.*, 2011, Tian *et al.*, 2019c].

So konnte Tian *et al.* durch die Integration von *ter* aus *Spirochaeta thermophila* und unter Verwendung von Enzymen aus verschiedenen thermophilen Organismen für die übrigen Schritte des Butanol-Stoffwechselwegs (*thl*, *hbd* und *crt* aus *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* sowie *bad* und *bdh* aus *Thermoanaerobacter sp.* X514) in *C. thermocellum* DSM 1313 42 mg/l Butanol nachweisen; trotz vorhergehender Deletion der Gene für die Lactat- (*ldh*) und Isobutanolbildung (Clo1313_1353-1356). Erst zusammen mit der gleichzeitigen Überexpression einer Thl-Variante (mit höherer V_{\max} und geringerer Sensitivität gegen den Inhibitor Coenzym A) und von Varianten der Enzyme Ter (E75A) und Hbd (D31A, I32R, P36I) mit jeweils geänderter Cofaktor-Spezifität (von NADH zu NADPH, was gleichzeitig V_{\max} deutlich erhöhte), führte zu bis zu 195 mg/l Butanol. Eine Optimierung der Kultivierungsbedingungen durch Batch-Fermentierung und die gleichzeitige Zugabe von Ethanol (4000 mg/l) konnte die Butanolkonzentration final auf 357 mg/l erhöhen. [Tian *et al.*, 2019c]

Auch in Studien mit *S. cerevisiae* konnte erst eine massive Optimierung des Butanol-Stoffwechselwegs durch Verwendung einer Kombination von Genen aus verschiedenen Organismen und das gleichzeitige Ausschalten von konkurrierenden Stoffwechselwegen sowie die Verbesserung der Acetyl-CoA-Verfügbarkeit zu einer deutlich gesteigerten Butanolproduktion von bis zu 120 mg/l führen [Lian *et al.*, 2014, Schadeweg & Boles, 2016].

Shen *et al.* argumentierten für *E. coli*, dass vermutlich das Fehlen einer chemischen Triebkraft im heterolog exprimierten Butanol-Stoffwechselweg dazu führte, dass dort keine größeren Mengen Butanol produziert werden konnten. Im Gegensatz zu Butanol existiert in anderen, sehr erfolgreich in *E. coli* exprimierten Stoffwechselwegen wie denen für Ethanol, Isobutanol oder Isopropanol, immer eine Stelle, an der ein irreversibler Schritt (wie z. B. die Freisetzung von CO₂) den Flux in Richtung der Endprodukte forciert und dadurch eine hohe Produkti-

on ermöglicht. Erst durch Änderung der Cofaktor-Abhängigkeit des Butanol-Stoffwechselwegs zu nur noch NADH (*ter* statt *bcd/etfAB*), Inaktivierung alternativer NADH verbrauchender Stoffwechselwege (Δ *ldh*, Δ *adhE*, Δ *frdBC*), Verbesserung der Acetyl-CoA-Verfügbarkeit (Δ *pta*) und weiterer Anpassungen, die den Flux in Richtung Butanol verschieben und die NADH Balance ausgleichen, konnten so letztendlich in *E. coli* bis zu 15 g/l Butanol (bzw. 30 g/l bei Endproduktentfernung) produziert werden. [Shen *et al.*, 2011]

Diese Versuche Butanol rekombinant zu produzieren zeigen, dass neben der Expression der Gene aus dem Butanol-Stoffwechselweg noch eine sehr umfangreiche Anpassung und Optimierung im Stoffwechsel der jeweiligen Wirtsorganismen nötig ist, um damit höhere Butanolkonzentrationen zu erreichen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass verschiedene Nebenprodukte bzw. Reststoffe, die bei der Weiterverarbeitung von Weizen in großen Mengen anfallen, von Clostridien sehr gut als Substrate genutzt werden können, um - ohne oder mit nur geringer Vorbehandlung - daraus Bioalkohole zu produzieren.

Auf den stärke- und zuckerhaltigen Nebenprodukten Weizengrießkleie und Weizennachmehl konnte eine effiziente Butanolproduktion bereits durch Screening der am besten für das jeweilige Substrat geeigneten solventogenen Clostridien und Optimierung der Fermentationsbedingungen erfolgen. Durch eine zusätzliche und vergleichsweise kostengünstige enzymatische Vorbehandlung wäre das für Weizennachmehl bereits mit den hier im Labormaßstab erhaltenen Butanolkonzentrationen wirtschaftlich sinnvoll.

Auch für das ebenfalls anfallende Weizenstroh konnten mit *C. thermocellum* ATCC 27405^T und *R. cellulolyticum* DSM 5812^T zwei Mikroorganismen gefunden werden, die das Substrat ohne weitere Vorbehandlung abbauen und zur Produktion von Bioalkoholen nutzen können. Nach Ausarbeitung einer Transformationsmethode konnten verschiedene Plasmide mit Genen für den CoA-abhängige Butanol-Stoffwechselweg in cellulolytische Clostridien transformiert und dadurch bis zu 13 mg/l Butanol direkt auf Cellulose produziert werden. Obwohl die dafür verwendeten Gene aus mesophilen Organismen stammen, konnte in *C. thermocellum* ATCC 27405^T auch bei Temperaturen bis 60°C Butanol gebildet werden, was auf eine ausreichende Temperaturstabilität der verwendeten Enzyme hindeutet. Allerdings bedarf eine effiziente Umsetzung von Cellulose zu Bioalkoholen durch cellulolytische Organismen noch einer umfangreichen genetischer Optimierungen, um die produzierte Butanolmenge grundsätzlich deutlich zu erhöhen. So ist zusätzlich wahrscheinlich eine detaillierte Analyse aller Zwischenschritte, zugehöriger Reaktionspartner und Reduktionsäquivalente sowie eine anschließende

massive Optimierung des Stoffwechsel erforderlich, um die Vielzahl an konkurrierenden Stoffwechselwegen, die dieselben Substrate oder Cofaktoren verwenden, anzupassen.

Ausblick

Als größte verfügbare Kohlenstoffquelle auf der Erde stellt lignocellulosehaltige Biomasse ein ideales regeneratives Substrat für die fermentative Produktion von Biotreibstoffen oder Plattformchemikalien dar. Trotz aller Optimierungen erschweren aber v.a. hohe Kosten für die Vorbehandlung und für die Enzyme zur Hydrolyse der Biomasse die Produktion von Bioalkoholen aus Lignocellulose durch konventionelle Laborstämme [Olson *et al.*, 2012, Parisutham *et al.*, 2014]. Hier könnte die Verwendung von cellulolytischen Organismen zum Aufschließen der Biomasse einen Vorteil und eine große Kostenreduktion darstellen. Für biotechnologische Anwendungen werden aus prozesstechnischen Gründen gerne Reinkulturen einer Spezies verwendet, was jedoch kein natürliches Lebensprinzip ist. In der Natur besetzen Mikroorganismen unterschiedliche Nischen und leben meist in Systemen zusammen in denen sie sich oft synergistisch ergänzen; beispielsweise durch einen Austausch von Vitaminen und Nährstoffen. Bei cellulolytischen Organismen wird davon ausgegangen, dass die Synergieeffekte von Co-Kulturen auch zu einer Verbesserung des Cellulose-Abbaus führen [Mori, 1995, Salimi & Mahadevan, 2013]. Wenn zwei so unterschiedliche Fähigkeiten wie die Zersetzung von Lignocellulose und die Produktion von hohen Alkoholkonzentrationen kombiniert werden sollen, sind auch Co-Kulturen von cellulolytischen Organismen mit solventogenen gut vorstellbar. In Co-Kulturen von *C. thermocellum* mit *C. saccharoperbutylacetonicum* konnte z. B. auf Cellulose bzw. auf vorbehandeltem Reisstroh bis zu 7,9 g/l Butanol produziert werden [Nakayama *et al.*, 2011, Nakayama *et al.*, 2013, Kiyoshi *et al.*, 2015]. Auch Kombinationen von genetisch modifizierten Organismen, die jeweils für ein spezifisches Substrat oder Produkt optimiert wurden, könnten eine geeignete Alternative darstellen. Beispielsweise konnte eine genetisch optimierten *C. thermocellum* Mutante (Δhpt , Δldh , Δpta) in Co-Kultur mit *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* die produzierte Ethanolkonzentration auf Cellulose im Vergleich zur einzeln kultivierten Mutanten fast verdoppeln [Argyros *et al.*, 2011]. Für die Kombination mit *C. thermocellum* würden sich insbesondere solche solventogenen Organismen anbieten, die die von *C. thermocellum* nicht genutzten Hexosen und Pentosen aus Biomasse bevorzugt verwerten und so zusätzlich dessen Wachstumsinhibierung durch *carbon catabolite repression* verhindern. So konnte in einem aktuellen Versuch eine stabile Co-Kultur von *C. thermocellum* mit *Thermoclostridium stercorarium* (bisher: *Clostridium stercorarium*) und *Thermoanaerobacter thermohyd-*

rosulfuricus, die bevorzugt die Hemicellulose Bestandteile nutzen, etabliert werden, was zu einer deutlich verbesserten Substratumsetzung des verwendeten Weizenstrohs führte [Froese *et al.*, 2019]. Wie hier gezeigt werden konnte, sind die Aldehyd-/Alkohol-Dehydrogenase(n) aus *C. thermocellum* in der Lage, dem Medium zugegebenes Butyryl-Aldehyd und auch Buttersäure effizient zu Butanol umzusetzen. Weitergedacht könnte in einer Co-Kultur *C. thermocellum* den Abbau der Lignocellulose übernehmen und bevorzugt Cellodextrine verwerten, während beispielsweise das ebenfalls thermophile Bakterium *C. thermobutyricum* die verbleibenden Zucker nutzen, um Buttersäure zu produzieren, die dann wiederum von *C. thermocellum* zu Butanol umgesetzt werden könnte. Bereits ein erster Test dazu konnte zeigen, dass ein solches System grundsätzlich funktioniert und dass bereits auf niedrigen Substratkonzentrationen und innerhalb von nur 1-3 Tagen bis zu 40 mg/l Butanol produziert werden konnte (Anhang XXVIII).

Nachdem cellulosehaltige Biomasse für eine biotechnologische Anwendung theoretisch aus sehr vielen verschiedenen Quellen stammen kann und entsprechend unterschiedlich zusammengesetzt ist, dürfte es vorteilhaft sein, wenn für jedes Substrat der am besten geeignete cellulolytische und / oder saccharolytische Stamm gescreent und anschließend optimiert werden könnte. Mit der augenblicklich rasant vorschreitenden Etablierung von Methoden zum *genetic engineering* von Organismen, die nicht zu den klassischen Laborstämmen zählen, kommen wir der Verwendung von Celluloseabbauern auf regenerativen Substraten so ein großes Stück näher. So könnten genetisch modifizierte cellulolytische Organismen in Einzel- oder Co-Kultur als eine Art Plattform zur Produktion von Biotreibstoffen oder Grundchemikalien aus cellulosehaltiger Biomasse oder Reststoffen eingesetzt werden.

VIII Literaturverzeichnis

- Abdel-Banat, B. M., H. Hoshida, A. Ano, S. Nonklang & R. Akada (2010) High-temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast? *Appl Microbiol Biotechnol*, 85, 861-7
- Akinosho, H., K. Yee, D. Close & A. Ragauskas (2014) The emergence of *Clostridium thermocellum* as a high utility candidate for consolidated bioprocessing applications. *Front Chem*, 2, 66
- Al-Hinai, M. A., S. W. Jones & E. T. Papoutsakis (2015) The *Clostridium* sporulation programs: diversity and preservation of endospore differentiation. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 79, 19-37
- Antoni, D., V. V. Zverlov & W. H. Schwarz (2007) Biofuels from microbes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 77, 23-35
- Argyros, D. A., S. A. Tripathi, T. F. Barrett, S. R. Rogers, L. F. Feinberg, D. G. Olson, J. M. Foden, B. B. Miller, L. R. Lynd, D. A. Hogsett & N. C. Caiazza (2011) High ethanol titers from cellulose by using metabolically engineered thermophilic, anaerobic microbes. *Appl Environ Microbiol*, 77, 8288-94
- Atsumi, S., A. F. Cann, M. R. Connor, C. R. Shen, K. M. Smith, M. P. Brynildsen, K. J. Chou, T. Hanai & J. C. Liao (2008a) Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol production. *Metab Eng*, 10, 305-11
- Atsumi, S., T. Hanai & J. C. Liao (2008b) Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels. *Nature*, 451, 86-9
- Atsumi, S., T. Y. Wu, I. M. Machado, W. C. Huang, P. Y. Chen, M. Pellegrini & J. C. Liao (2010) Evolution, genomic analysis, and reconstruction of isobutanol tolerance in *Escherichia coli*. *Mol Syst Biol*, 6, 449
- Azeddoug, H., J. Hubert & G. Reysset (1992) Stable inheritance of shuttle vectors based on plasmid pIM13 in a mutant strain of *Clostridium acetobutylicum*. *J Gen Microbiol*, 138, 1371-8
- Baez, A., K.-M. Cho & J. C. Liao (2011) High-flux isobutanol production using engineered *Escherichia coli*: a bioreactor study with in situ product removal. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90, 1681-1690
- Barisik, G., A. Isci, N. Kutlu, S. Bagder Elmaci & B. Akay (2016) Optimization of organic acid pretreatment of wheat straw. *Biotechnol Prog*, 10.1002/btpr.2347
- Bayer, E. A., J. P. Belaich, Y. Shoham & R. Lamed (2004) The cellulosomes: multienzyme machines for degradation of plant cell wall polysaccharides. *Annu Rev Microbiol*, 58, 521-54
- Bayer, E. A., H. Chanzy, R. Lamed & Y. Shoham (1998) Cellulose, cellulases and cellulosomes. *Curr Opin Struct Biol*, 8, 548-57

- Bayer, E. A. & R. Lamed (1986) Ultrastructure of the cell surface cellulosome of *Clostridium thermocellum* and its interaction with cellulose. *J Bacteriol*, 167, 828-36
- Bayer, E. A., R. Lamed & M. E. Himmel (2007) The potential of cellulases and cellulosomes for cellulosic waste management. *Curr Opin Biotechnol*, 18, 237-45
- Bengelsdorf, F. R., M. Straub & P. Durre (2013) Bacterial synthesis gas (syngas) fermentation. *Environ Technol*, 34, 1639-51
- Bennett, G. N. & F. B. Rudolph (1995) Papers presented at the Meeting on Solventogenic Clostridia The central metabolic pathway from acetyl-CoA to butyryl-CoA in *Clostridium acetobutylicum*. *FEMS Microbiology Reviews*, 17, 241-249
- Berezina, O. V., A. Brandt, S. Yarotsky, W. H. Schwarz & V. V. Zverlov (2009) Isolation of a new butanol-producing *Clostridium* strain: high level of hemicellulosic activity and structure of solventogenesis genes of a new *Clostridium saccharobutylicum* isolate. *Syst Appl Microbiol*, 32, 449-59
- Berezina, O. V., N. V. Zakharova, A. Brandt, S. V. Yarotsky, W. H. Schwarz & V. V. Zverlov (2010) Reconstructing the clostridial n-butanol metabolic pathway in *Lactobacillus brevis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 87, 635-46
- Berger, E., D. Zhang, V. V. Zverlov & W. H. Schwarz (2007) Two noncellulosomal cellulases of *Clostridium thermocellum*, Cel9I and Cel48Y, hydrolyse crystalline cellulose synergistically. *FEMS Microbiol Lett*, 268, 194-201
- Bharathiraja, B., J. Jayamuthunagai, T. Sudharsanaa, A. Bharghavi, R. Praveenkumar & M. Chakravarthy (2017) Biobutanol—an impending biofuel for future: a review on upstream and downstream processing techniques. *Renew Sustain Energy Rev*, 68
- Biebl, H. (2001) Fermentation of glycerol by *Clostridium pasteurianum*--batch and continuous culture studies. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 27, 18-26
- Birgen, C., P. Dürre, H. A. Preisig & A. Wentzel (2019) Butanol production from lignocellulosic biomass: revisiting fermentation performance indicators with exploratory data analysis. *Biotechnology for biofuels*, 12, 167-167
- Birrer, G. A., W. R. Chesbro & R. M. Zsigray (1994) Electro-transformation of *Clostridium beijerinckii* NRRL B-592 with shuttle plasmid pHR106 and recombinant derivatives. *Appl Microbiol Biotechnol*, 41, 32-8
- Blouzard, J. C., P. M. Coutinho, H. P. Fierobe, B. Henrissat, S. Lignon, C. Tardif, S. Pages & P. de Philip (2010) Modulation of cellulosome composition in *Clostridium cellulolyticum*: adaptation to the polysaccharide environment revealed by proteomic and carbohydrate-active enzyme analyses. *Proteomics*, 10, 541-54
- Blumer-Schuette, S. E., S. D. Brown, K. B. Sander, E. A. Bayer, I. Kataeva, J. V. Zurawski, J. M. Conway, M. W. Adams & R. M. Kelly (2014) Thermophilic lignocellulose deconstruction. *FEMS Microbiol Rev*, 38, 393-448
- Blumer-Schuette, S. E., I. Kataeva, J. Westpheling, M. W. Adams & R. M. Kelly (2008) Extremely thermophilic microorganisms for biomass conversion: status and prospects. *Curr Opin Biotechnol*, 19, 210-7

- Bond-Watts, B. B., A. M. Weeks & M. C. Chang (2012) Biochemical and structural characterization of the trans-enoyl-CoA reductase from *Treponema denticola*. *Biochemistry*, 51, 6827-37
- Bothun, G. D., B. L. Knutson, J. A. Berberich, H. J. Strobel & S. E. Nokes (2004) Metabolic selectivity and growth of *Clostridium thermocellum* in continuous culture under elevated hydrostatic pressure. *Appl Microbiol Biotechnol*, 65, 149-57
- Boynton, Z. L., G. N. Bennett & F. B. Rudolph (1996) Cloning, sequencing, and expression of clustered genes encoding beta-hydroxybutyryl-coenzyme A (CoA) dehydrogenase, crotonase, and butyryl-CoA dehydrogenase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Journal of Bacteriology*, 178, 3015-3024
- Brat, D. & E. Boles (2013) Isobutanol production from D-xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*, 13, 241-4
- Brat, D., E. Boles & B. Wiedemann (2009) Functional expression of a bacterial xylose isomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, 75, 2304-11
- Brethauer, S. & M. H. Studer (2015) Biochemical Conversion Processes of Lignocellulosic Biomass to Fuels and Chemicals - A Review. *Chimia (Aarau)*, 69, 572-81
- Brown, S. D., A. M. Guss, T. V. Karpinets, J. M. Parks, N. Smolin, S. Yang, M. L. Land, D. M. Klingeman, A. Bhandiwad, M. Rodriguez, Jr., B. Raman, X. Shao, J. R. Mielenz, J. C. Smith, M. Keller & L. R. Lynd (2011) Mutant alcohol dehydrogenase leads to improved ethanol tolerance in *Clostridium thermocellum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 13752-7
- Buckel, W. & R. K. Thauer (2013) Energy conservation via electron bifurcating ferredoxin reduction and proton/Na(+) translocating ferredoxin oxidation. *Biochim Biophys Acta*, 1827, 94-113
- Carvalho, A. L., V. M. Pires, T. M. Gloster, J. P. Turkenburg, J. A. Prates, L. M. Ferreira, M. J. Romao, G. J. Davies, C. M. Fontes & H. J. Gilbert (2005) Insights into the structural determinants of cohesin-dockerin specificity revealed by the crystal structure of the type II cohesin from *Clostridium thermocellum* SdbA. *J Mol Biol*, 349, 909-15
- Chen, C. T. & J. C. Liao (2016) Frontiers in microbial 1-butanol and isobutanol production. *FEMS Microbiol Lett*, 363, fnw020
- Chen, L., L. Wang & H. Zhang (2014) [Mics of the *Clostridium thermocellum* in lignocellulose degradation--a review]. *Wei Sheng Wu Xue Bao*, 54, 121-8
- Chen, S. K., W. C. Chin, K. Tsuge, C. C. Huang & S. Y. Li (2013) Fermentation approach for enhancing 1-butanol production using engineered butanogenic *Escherichia coli*. *Bioresour Technol*, 145, 204-9
- Chiao, J. S. & Z. H. Sun (2007) History of the acetone-butanol-ethanol fermentation industry in China: development of continuous production technology. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 13, 12-4

- Cho, C., S. Hong, H. G. Moon, Y.-S. Jang, D. Kim & S. Y. Lee (2019) Engineering Clostridial Aldehyde/Alcohol Dehydrogenase for Selective Butanol Production. *mBio*, 10, e02683-18
- Cooksley, C. M., Y. Zhang, H. Wang, S. Redl, K. Winzer & N. P. Minton (2012) Targeted mutagenesis of the *Clostridium acetobutylicum* acetone-butanol-ethanol fermentation pathway. *Metab Eng*, 14, 630-41
- Cui, G. Z., J. Zhang, W. Hong, C. Xu, Y. Feng, Q. Cui & Y. J. Liu (2014) Improvement of Clostron for successive gene disruption in *Clostridium cellulolyticum* using a pyrF-based screening system. *Appl Microbiol Biotechnol*, 98, 313-23
- Dai, Z., H. Dong, Y. Zhang & Y. Li (2016) Elucidating the contributions of multiple aldehyde/alcohol dehydrogenases to butanol and ethanol production in *Clostridium acetobutylicum*. *Sci Rep*, 6, 28189
- Demain, A. L. (2009) Biosolutions to the energy problem. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 36, 319-32
- Demain, A. L., M. Newcomb & J. H. Wu (2005) Cellulase, clostridia, and ethanol. *Microbiol Mol Biol Rev*, 69, 124-54
- Deng, Y., D. G. Olson, J. Zhou, C. D. Herring, A. Joe Shaw & L. R. Lynd (2013) Redirecting carbon flux through exogenous pyruvate kinase to achieve high ethanol yields in *Clostridium thermocellum*. *Metab Eng*, 15, 151-8
- Desvaux, M. (2005) *Clostridium cellulolyticum*: model organism of mesophilic cellulolytic clostridia. *FEMS Microbiol Rev*, 29, 741-64
- Desvaux, M., E. Guedon & H. Petitdemange (2000) Cellulose catabolism by *Clostridium cellulolyticum* growing in batch culture on defined medium. *Appl Environ Microbiol*, 66, 2461-70
- Doi, R. H. & A. Kosugi (2004) Cellulosomes: plant-cell-wall-degrading enzyme complexes. *Nat Rev Microbiol*, 2, 541-51
- Dumitrache, A., G. M. Wolfaardt, D. G. Allen, S. N. Liss & L. R. Lynd (2013) Tracking the cellulolytic activity of *Clostridium thermocellum* biofilms. *Biotechnol Biofuels*, 6, 175
- Dürre, P. (2007) Biobutanol: an attractive biofuel. *Biotechnol J*, 2, 1525-34
- Dürre, P. (2008) Fermentative butanol production: bulk chemical and biofuel. *Ann N Y Acad Sci*, 1125, 353-62
- Dürre, P. 2005. *Handbook on clostridia*. Boca Raton: Taylor & Francis.
- Dürre, P., M. Bohringer, S. Nakotte, S. Schaffer, K. Thormann & B. Zickner (2002) Transcriptional regulation of solventogenesis in *Clostridium acetobutylicum*. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 4, 295-300
- Ellis, L. D., E. K. Holwerda, D. Hogsett, S. Rogers, X. Shao, T. Tschaplinski, P. Thorne & L. R. Lynd (2012) Closing the carbon balance for fermentation by *Clostridium thermocellum* (ATCC 27405). *Bioresour Technol*, 103, 293-9

- Ezeji, T., N. Qureshi & H. P. Blaschek (2007a) Butanol production from agricultural residues: Impact of degradation products on *Clostridium beijerinckii* growth and butanol fermentation. *Biotechnol Bioeng*, 97, 1460-9
- Ezeji, T. C., N. Qureshi & H. P. Blaschek (2004) Butanol fermentation research: upstream and downstream manipulations. *Chem Rec*, 4, 305-14
- Ezeji, T. C., N. Qureshi & H. P. Blaschek (2007b) Bioproduction of butanol from biomass: from genes to bioreactors. *Curr Opin Biotechnol*, 18, 220-7
- Ezeji, T. C., N. Qureshi & H. P. Blaschek (2013) Microbial production of a biofuel (acetone-butanol-ethanol) in a continuous bioreactor: impact of bleed and simultaneous product removal. *Bioprocess Biosyst Eng*, 36, 109-16
- Fang, H. & L. Xia (2013) High activity cellulase production by recombinant *Trichoderma reesei* ZU-02 with the enhanced cellobiohydrolase production. *Bioresour Technol*, 144, 693-7
- Fendri, I., C. Tardif, H. P. Fierobe, S. Lignon, O. Valette, S. Pages & S. Perret (2009) The cellulosomes from *Clostridium cellulolyticum*: identification of new components and synergies between complexes. *FEBS J*, 276, 3076-86
- Fontaine, L., I. Meynial-Salles, L. Girbal, X. Yang, C. Croux & P. Soucaille (2002) Molecular Characterization and Transcriptional Analysis of *adhE2*, the Gene Encoding the NADH-Dependent Aldehyde/Alcohol Dehydrogenase Responsible for Butanol Production in Alcohologenic Cultures of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Journal of Bacteriology*, 184, 821-830
- Fontes, C. M. & H. J. Gilbert (2010) Cellulosomes: highly efficient nanomachines designed to deconstruct plant cell wall complex carbohydrates. *Annu Rev Biochem*, 79, 655-81
- Froese, A., J. Schellenberg & R. Sparling (2019) Enhanced depolymerization and utilization of raw lignocellulosic material by co-cultures of *Ruminiclostridium thermocellum* with hemicellulose-utilizing partners. *Can J Microbiol*, 65, 296-307
- Gaida, S. M., A. Liedtke, A. H. Jentges, B. Engels & S. Jennewein (2016) Metabolic engineering of *Clostridium cellulolyticum* for the production of n-butanol from crystalline cellulose. *Microb Cell Fact*, 15, 6
- Gallardo, R., M. Alves & L. R. Rodrigues (2014) Modulation of crude glycerol fermentation by *Clostridium pasteurianum* DSM 525 towards the production of butanol. *Biomass and Bioenergy*, 71, 134-143
- Gheshlaghi, R., J. Scharer, M. Moo-Young & C. Chou (2009a) Metabolic pathways of clostridia for producing butanol. *Biotechnol Adv*, 27
- Gheshlaghi, R., J. M. Scharer, M. Moo-Young & C. P. Chou (2009b) Metabolic pathways of clostridia for producing butanol. *Biotechnol Adv*, 27, 764-81
- Gilbert, H. J. (2007) Cellulosomes: microbial nanomachines that display plasticity in quaternary structure. *Mol Microbiol*, 63, 1568-76
- Girbal, L., I. Mortier-Barriere, F. Raynaud, C. Rouanet, C. Croux & P. Soucaille (2003) Development of a Sensitive Gene Expression Reporter System and an Inducible

Promoter-Repressor System for *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 4985-4988

Girbal, L. & P. Soucaille (1994) Regulation of *Clostridium acetobutylicum* metabolism as revealed by mixed-substrate steady-state continuous cultures: role of NADH/NAD ratio and ATP pool. *J Bacteriol*, 176, 6433-8

Gomez, L. D., C. G. Steele-King & S. J. McQueen-Mason (2008) Sustainable liquid biofuels from biomass: the writing's on the walls. *New Phytol*, 178, 473-85

Gottumukkala, L. D., K. Haigh & J. Görgens (2017) Trends and advances in conversion of lignocellulosic biomass to biobutanol: microbes, bioprocesses and industrial viability. *Renew Sustain Energy Rev*, 76

Gottumukkala, L. D., B. Parameswaran, S. K. Valappil, K. Mathiyazhakan, A. Pandey & R. K. Sukumaran (2013) Biobutanol production from rice straw by a non acetone producing *Clostridium sporogenes* BE01. *Bioresour Technol*, 145, 182-7

Grimmler, C., H. Janssen, D. Krausse, R. J. Fischer, H. Bahl, P. Durre, W. Liebl & A. Ehrenreich (2011) Genome-wide gene expression analysis of the switch between acidogenesis and solventogenesis in continuous cultures of *Clostridium acetobutylicum*. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 20, 1-15

Guedon, E., M. Desvaux, S. Payot & H. Petitdemange (1999a) Growth inhibition of *Clostridium cellulolyticum* by an inefficiently regulated carbon flow. *Microbiology*, 145 (Pt 8), 1831-8

Guedon, E., M. Desvaux & H. Petitdemange (2000a) Kinetic analysis of *Clostridium cellulolyticum* carbohydrate metabolism: importance of glucose 1-phosphate and glucose 6-phosphate branch points for distribution of carbon fluxes inside and outside cells as revealed by steady-state continuous culture. *J Bacteriol*, 182, 2010-7

Guedon, E., M. Desvaux & H. Petitdemange (2002a) Improvement of Cellulolytic Properties of *Clostridium cellulolyticum* by Metabolic Engineering. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 53-58

Guedon, E., M. Desvaux & H. Petitdemange (2002b) Improvement of cellulolytic properties of *Clostridium cellulolyticum* by metabolic engineering. *Appl Environ Microbiol*, 68, 53-8

Guedon, E., S. Payot, M. Desvaux & H. Petitdemange (1999b) Carbon and electron flow in *Clostridium cellulolyticum* grown in chemostat culture on synthetic medium. *J Bacteriol*, 181, 3262-9

Guedon, E., S. Payot, M. Desvaux & H. Petitdemange (2000b) Relationships between cellobiose catabolism, enzyme levels, and metabolic intermediates in *Clostridium cellulolyticum* grown in a synthetic medium. *Biotechnol Bioeng*, 67, 327-35

Guss, A. M., D. G. Olson, N. C. Caiazza & L. R. Lynd (2012) Dcm methylation is detrimental to plasmid transformation in *Clostridium thermocellum*. *Biotechnol Biofuels*, 5, 30

Gyulev, I. S., B. J. Willson, R. C. Hennessy, P. Krabben, E. R. Jenkinson & G. H. Thomas (2018) Part by Part: Synthetic Biology Parts Used in Solventogenic Clostridia. *ACS Synth Biol*, 7, 311-327

- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, 166, 557-80
- Harris, L. M., N. E. Welker & E. T. Papoutsakis (2002) Northern, Morphological, and Fermentation Analysis of *spo0A* Inactivation and Overexpression in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Journal of Bacteriology*, 184, 3586-3597
- Hartmanis, M. G. & S. Gatenbeck (1984) Intermediary Metabolism in *Clostridium acetobutylicum*: Levels of Enzymes Involved in the Formation of Acetate and Butyrate. *Appl Environ Microbiol*, 47, 1277-83
- Heap, J. T., S. T. Cartman, S. A. Kuehne, C. Cooksley & N. P. Minton (2010a) ClosTron-targeted mutagenesis. *Methods Mol Biol*, 646, 165-82
- Heap, J. T., M. Ehsaan, C. M. Cooksley, Y. K. Ng, S. T. Cartman, K. Winzer & N. P. Minton (2012) Integration of DNA into bacterial chromosomes from plasmids without a counter-selection marker. *Nucleic Acids Res*, 40, e59
- Heap, J. T., S. A. Kuehne, M. Ehsaan, S. T. Cartman, C. M. Cooksley, J. C. Scott & N. P. Minton (2010b) The ClosTron: Mutagenesis in *Clostridium* refined and streamlined. *J Microbiol Methods*, 80, 49-55
- Heap, J. T., O. J. Pennington, S. T. Cartman, G. P. Carter & N. P. Minton (2007) The ClosTron: a universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*. *J Microbiol Methods*, 70, 452-64
- Higashide, W., Y. Li, Y. Yang & J. C. Liao (2011) Metabolic engineering of *Clostridium cellulolyticum* for production of isobutanol from cellulose. *Appl Environ Microbiol*, 77, 2727-33
- Himmel, M. E., S. Y. Ding, D. K. Johnson, W. S. Adney, M. R. Nimlos, J. W. Brady & T. D. Foust (2007) Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*, 315, 804-7
- Holwerda, E. K., K. D. Hirst & L. R. Lynd (2012) A defined growth medium with very low background carbon for culturing *Clostridium thermocellum*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 39, 943-7
- Holwerda, E. K., P. G. Thorne, D. G. Olson, D. Amador-Noguez, N. L. Engle, T. J. Tschaplinski, J. P. van Dijken & L. R. Lynd (2014) The exometabolome of *Clostridium thermocellum* reveals overflow metabolism at high cellulose loading. *Biotechnol Biofuels*, 7, 155
- Hon, S., D. G. Olson, E. K. Holwerda, A. A. Lanahan, S. J. L. Murphy, M. I. Maloney, T. Zheng, B. Papanek, A. M. Guss & L. R. Lynd (2017) The ethanol pathway from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* improves ethanol production in *Clostridium thermocellum*. *Metab Eng*, 42, 175-184
- Huang, C.-N., W. Liebl & A. Ehrenreich (2018) Restriction-deficient mutants and marker-less genomic modification for metabolic engineering of the solvent producer *Clostridium saccharobutylicum*. *Biotechnology for biofuels*, 11, 264-264
- Inoue, H., H. Nojima & H. Okayama (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96, 23-8

- Inui, M., M. Suda, S. Kimura, K. Yasuda, H. Suzuki, H. Toda, S. Yamamoto, S. Okino, N. Suzuki & H. Yukawa (2008) Expression of *Clostridium acetobutylicum* butanol synthetic genes in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 77, 1305-16
- Islam, R., N. Cicek, R. Sparling & D. Levin (2009) Influence of initial cellulose concentration on the carbon flow distribution during batch fermentation by *Clostridium thermocellum* ATCC 27405. *Appl Microbiol Biotechnol*, 82, 141-8
- Jackowiak, D., D. Bassard, A. Pauss & T. Ribeiro (2011) Optimisation of a microwave pretreatment of wheat straw for methane production. *Bioresour Technol*, 102, 6750-6
- Jang, Y. S., J. Lee, A. Malaviya, J. H. Cho & S. Y. Lee (2012a) Butanol production from renewable biomass: rediscovery of metabolic pathways and metabolic engineering. *Biotechnol J*, 7
- Jang, Y. S., J. Y. Lee, J. Lee, J. H. Park, J. A. Im, M. H. Eom, J. Lee, S. H. Lee, H. Song, J. H. Cho, Y. Seung do & S. Y. Lee (2012b) Enhanced butanol production obtained by reinforcing the direct butanol-forming route in *Clostridium acetobutylicum*. *MBio*, 3
- Jang, Y. S., A. Malaviya, C. Cho, J. Lee & S. Y. Lee (2012c) Butanol production from renewable biomass by clostridia. *Bioresour Technol*, 123, 653-63
- Jennert, K. C., C. Tardif, D. I. Young & M. Young (2000) Gene transfer to *Clostridium cellulolyticum* ATCC 35319. *Microbiology*, 146 Pt 12, 3071-80
- Johnson, E., T. Sarchami, S. Kiesslich, G. Munch & L. Rehm (2016) Consolidating biofuel platforms through the fermentative bioconversion of crude glycerol to butanol. *World J Microbiol Biotechnol*, 32, 103
- Johnson, E. A., A. Madia & A. L. Demain (1981) Chemically Defined Minimal Medium for Growth of the Anaerobic Cellulolytic Thermophile *Clostridium thermocellum*. *Appl Environ Microbiol*, 41, 1060-2
- Jones, D. T. & D. R. Woods (1986) Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiol Rev*, 50, 484-524
- Joseph, R. C., N. M. Kim & N. R. Sandoval (2018) Recent Developments of the Synthetic Biology Toolkit for *Clostridium*. *Front Microbiol*, 9, 154
- Juturu, V. & J. C. Wu (2014) Microbial exo-xylanases: a mini review. *Appl Biochem Biotechnol*, 174, 81-92
- Kataoka, N., A. S. Vangnai, T. Pongtharangkul, T. Tajima, T. Yakushi, K. Matsushita & J. Kato (2015) Construction of CoA-dependent 1-butanol synthetic pathway functions under aerobic conditions in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*, 204, 25-32
- Keis, S., C. F. Bennett, V. K. Ward & D. T. Jones (1995) Taxonomy and phylogeny of industrial solvent-producing clostridia. *Int J Syst Bacteriol*, 45, 693-705
- Keis, S., R. Shaheen & D. T. Jones (2001) Emended descriptions of *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*, and descriptions of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* sp. nov. and *Clostridium saccharobutylicum* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 51, 2095-103

- Keller, M. W., G. L. Lipscomb, A. J. Loder, G. J. Schut, R. M. Kelly & M. W. Adams (2015) A hybrid synthetic pathway for butanol production by a hyperthermophilic microbe. *Metab Eng*, 27, 101-6
- Kim, D. (2018) Physico-Chemical Conversion of Lignocellulose: Inhibitor Effects and Detoxification Strategies: A Mini Review. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23, 309
- Kim, J.-H., D. E. Block & D. A. Mills (2010) Simultaneous consumption of pentose and hexose sugars: an optimal microbial phenotype for efficient fermentation of lignocellulosic biomass. *Applied microbiology and biotechnology*, 88, 1077-1085
- Kiyoshi, K., M. Furukawa, T. Seyama, T. Kadokura, A. Nakazato & S. Nakayama (2015) Butanol production from alkali-pretreated rice straw by co-culture of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*. *Bioresour Technol*, 186, 325-328
- Klapatch, T. R., A. L. Demain & L. R. Lynd (1996) Restriction endonuclease activity in *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermosaccharolyticum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 45, 127-31
- Koeck, D. E., A. Pechtl, V. V. Zverlov & W. H. Schwarz (2014) Genomics of cellulolytic bacteria. *Curr Opin Biotechnol*, 29, 171-83
- Kolesinska, B., J. Fraczyk, M. Binczarski, M. Modelska, J. Berlowska, P. Dziugan, H. Antolak, Z. J. Kaminski, I. A. Witonska & D. Kregiel (2019) Butanol Synthesis Routes for Biofuel Production: Trends and Perspectives. *Materials (Basel)*, 12
- Kopke, M., C. Held, S. Hujer, H. Liesegang, A. Wiezer, A. Wollherr, A. Ehrenreich, W. Liebl, G. Gottschalk & P. Durre (2010) *Clostridium ljungdahlii* represents a microbial production platform based on syngas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 13087-92
- Kosaka, T., S. Nakayama, K. Nakaya, S. Yoshino & K. Furukawa (2007) Characterization of the sol operon in butanol-hyperproducing *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* strain N1-4 and its degeneration mechanism. *Biosci Biotechnol Biochem*, 71, 58-68
- Kuehne, S. A. & N. P. Minton (2012) Clostron-mediated engineering of *Clostridium*. *Bioengineered*, 3, 247-54
- Kumar, R., S. Singh & O. V. Singh (2008) Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 35, 377-391
- Lamed, R., E. Setter & E. A. Bayer (1983) Characterization of a cellulose-binding, cellulase-containing complex in *Clostridium thermocellum*. *J Bacteriol*, 156, 828-36
- Lan, E. I. & J. C. Liao (2013) Microbial synthesis of n-butanol, isobutanol, and other higher alcohols from diverse resources. *Bioresour Technol*, 135, 339-349
- Latif, H., A. A. Zeidan, A. T. Nielsen & K. Zengler (2014) Trash to treasure: production of biofuels and commodity chemicals via syngas fermenting microorganisms. *Curr Opin Biotechnol*, 27, 79-87
- Lee, J. Y., Y. S. Jang, J. Lee, E. T. Papoutsakis & S. Y. Lee (2009) Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* M5 for highly selective butanol production. *Biotechnol J*, 4, 1432-40

- Lee, S. Y., L. D. Mermelstein, G. N. Bennett & E. T. Papoutsakis (1992) Vector construction, transformation, and gene amplification in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Ann N Y Acad Sci*, 665, 39-51
- Lee, S. Y., J. H. Park, S. H. Jang, L. K. Nielsen, J. Kim & K. S. Jung (2008) Fermentative butanol production by Clostridia. *Biotechnol Bioeng*, 101, 209-28
- Lee, W. H., S. O. Seo, Y. H. Bae, H. Nan, Y. S. Jin & J. H. Seo (2012) Isobutanol production in engineered *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of 2-ketoisovalerate decarboxylase and valine biosynthetic enzymes. *Bioprocess Biosyst Eng*, 35, 1467-75
- Lesiak, J. M., W. Liebl & A. Ehrenreich (2014) Development of an in vivo methylation system for the solventogen *Clostridium saccharobutylicum* NCP 262 and analysis of two endonuclease mutants. *J Biotechnol*, 188, 97-9
- Li, F., J. Hinderberger, H. Seedorf, J. Zhang, W. Buckel & R. K. Thauer (2008) Coupled ferredoxin and crotonyl coenzyme A (CoA) reduction with NADH catalyzed by the butyryl-CoA dehydrogenase/Etf complex from *Clostridium kluyveri*. *J Bacteriol*, 190, 843-50
- Li, S., J. Wen & X. Jia (2011) Engineering *Bacillus subtilis* for isobutanol production by heterologous Ehrlich pathway construction and the biosynthetic 2-ketoisovalerate precursor pathway overexpression. *Appl Microbiol Biotechnol*, 91, 577-89
- Li, Y., T. J. Tschaplinski, N. L. Engle, C. Y. Hamilton, M. Rodriguez, Jr., J. C. Liao, C. W. Schadt, A. M. Guss, Y. Yang & D. E. Graham (2012) Combined inactivation of the *Clostridium cellulolyticum* lactate and malate dehydrogenase genes substantially increases ethanol yield from cellulose and switchgrass fermentations. *Biotechnol Biofuels*, 5, 2
- Lian, J., T. Si, N. U. Nair & H. Zhao (2014) Design and construction of acetyl-CoA overproducing *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Metabolic Engineering*, 24, 139-149
- Lin, P. P., L. Mi, A. H. Morioka, K. M. Yoshino, S. Konishi, S. C. Xu, B. A. Papanek, L. A. Riley, A. M. Guss & J. C. Liao (2015) Consolidated bioprocessing of cellulose to isobutanol using *Clostridium thermocellum*. *Metab Eng*, 31, 44-52
- Lin, P. P., K. S. Rabe, J. L. Takasumi, M. Kadisch, F. H. Arnold & J. C. Liao (2014) Isobutanol production at elevated temperatures in thermophilic *Geobacillus thermoglucosidasius*. *Metab Eng*, 24, 1-8
- Lin, Y. L. & H. P. Blaschek (1984) Transformation of Heat-Treated *Clostridium acetobutylicum* Protoplasts with pUB110 Plasmid DNA. *Appl Environ Microbiol*, 48, 737-42
- Lo, J., T. Zheng, S. Hon, D. G. Olson & L. R. Lynd (2015) The bifunctional alcohol and aldehyde dehydrogenase gene, *adhE*, is necessary for ethanol production in *Clostridium thermocellum* and *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*. *J Bacteriol*, 197, 1386-93
- Loder, A. J., B. M. Zeldes, G. D. Garrison, 2nd, G. L. Lipscomb, M. W. Adams & R. M. Kelly (2015) Alcohol Selectivity in a Synthetic Thermophilic n-Butanol Pathway Is Driven by Biocatalytic and Thermostability Characteristics of Constituent Enzymes. *Appl Environ Microbiol*, 81, 7187-200

- Lutke-Eversloh, T. & H. Bahl (2011) Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum*: recent advances to improve butanol production. *Curr Opin Biotechnol*, 22, 634-47
- Lynd, L., W. Zyl, J. McBride & M. Laser (2005a) Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Curr Opin Biotechnol*, 16
- Lynd, L. R., M. S. Laser, D. Bransby, B. E. Dale, B. Davison, R. Hamilton, M. Himmel, M. Keller, J. D. McMillan, J. Sheehan & C. E. Wyman (2008) How biotech can transform biofuels. *Nat Biotechnol*, 26, 169-72
- Lynd, L. R., W. H. van Zyl, J. E. McBride & M. Laser (2005b) Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Curr Opin Biotechnol*, 16, 577-83
- Lynd, L. R., P. J. Weimer, W. H. van Zyl & I. S. Pretorius (2002a) Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66, 506-577
- Lynd, L. R., P. J. Weimer, Z. y. l. W. H. Van & S. Isak (2002b) Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev*, 66
- Maiti, S., G. Gallastegui, S. J. Sarma, S. K. Brar, Y. Bihan & P. Drogui (2016) A re-look at the biochemical strategies to enhance butanol production. *Biomass Bioenergy*, 94
- Maki, M., K. T. Leung & W. Qin (2009) The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. *Int J Biol Sci*, 5, 500-16
- Mazzoli, R., C. Lamberti & E. Pessione (2012) Engineering new metabolic capabilities in bacteria: lessons from recombinant cellulolytic strategies. *Trends Biotechnol*, 30, 111-9
- McLaughlin, K. J., C. M. Strain-Damerell, K. Xie, D. Brekasis, A. S. Soares, M. S. Paget & C. L. Kielkopf (2010) Structural basis for NADH/NAD⁺ redox sensing by a Rex family repressor. *Mol Cell*, 38, 563-75
- Mermelstein, L. D. & E. T. Papoutsakis (1993) In vivo methylation in *Escherichia coli* by the *Bacillus subtilis* phage phi 3T I methyltransferase to protect plasmids from restriction upon transformation of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl Environ Microbiol*, 59, 1077-81
- Mermelstein, L. D., N. E. Welker, G. N. Bennett & E. T. Papoutsakis (1992) Expression of cloned homologous fermentative genes in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Biotechnology (N Y)*, 10, 190-5
- Miller, G. L. (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.*, 31, 426-428
- Mingardon, F., S. Perret, A. Belaich, C. Tardif, J. P. Belaich & H. P. Fierobe (2005) Heterologous production, assembly, and secretion of a minicellulosome by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl Environ Microbiol*, 71, 1215-22
- Minton, N. P., M. Ehsaan, C. M. Humphreys, G. T. Little, J. Baker, A. M. Henstra, F. Liew, M. L. Kelly, L. Sheng, K. Schwarz & Y. Zhang (2016) A roadmap for gene system development in *Clostridium*. *Anaerobe*, 41, 104-112

- Minton, N. P. & J. D. Oultram (1988) Host: vector systems for gene cloning in *Clostridium*. *Microbiol Sci*, 5, 310-5
- Mitchell, W. J. (1998) Physiology of carbohydrate to solvent conversion by clostridia. *Adv Microb Physiol*, 39, 31-130
- Mohr, G., W. Hong, J. Zhang, G. Z. Cui, Y. Yang, Q. Cui, Y. J. Liu & A. M. Lambowitz (2013) A targetron system for gene targeting in thermophiles and its application in *Clostridium thermocellum*. *PLoS One*, 8, e69032
- Moon, H. G., Y. S. Jang, C. Cho, J. Lee, R. Binkley & S. Y. Lee (2016) One hundred years of clostridial butanol fermentation. *FEMS Microbiol Lett*, 363
- Mori, Y. (1995) Nutritional interdependence between *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* and *Clostridium thermocellum*. *Archives of Microbiology*, 164, 152-154
- Morrell-Falvey, J. L., J. G. Elkins & Z. W. Wang (2015) Determination of the cellulase activity distribution in *Clostridium thermocellum* and *Caldicellulosiruptor obsidiansis* cultures using a fluorescent substrate. *J Environ Sci (China)*, 34, 212-8
- Mosier, N., C. Wyman, B. Dale, R. Elander, Y. Y. Lee, M. Holtzapple & M. Ladisch (2005) Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol*, 96, 673-86
- Munasinghe, P. C. & S. K. Khanal (2010) Biomass-derived syngas fermentation into biofuels: Opportunities and challenges. *Bioresour Technol*, 101, 5013-22
- Nakayama, S., Y. Bando, A. Ohnishi, T. Kadokura & A. Nakazato (2013) Decreased hydrogen production leads to selective butanol production in co-cultures of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* strain N1-4. *J Biosci Bioeng*, 115, 173-5
- Nakayama, S., K. Kiyoshi, T. Kadokura & A. Nakazato (2011) Butanol production from crystalline cellulose by cocultured *Clostridium thermocellum* and *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4. *Appl Environ Microbiol*, 77, 6470-5
- Nakotte, S., S. Schaffer, M. Bohringer & P. Durre (1998) Electroporation of, plasmid isolation from and plasmid conservation in *Clostridium acetobutylicum* DSM 792. *Appl Microbiol Biotechnol*, 50, 564-7
- Nguyen, N.-P.-T., C. Raynaud, I. Meynial-Salles & P. Soucaille (2018) Reviving the Weizmann process for commercial n-butanol production. *Nature Communications*, 9, 3682
- Nicolaou, S. A., S. M. Gaida & E. T. Papoutsakis (2010) A comparative view of metabolite and substrate stress and tolerance in microbial bioprocessing: From biofuels and chemicals, to biocatalysis and bioremediation. *Metabolic Engineering*, 12, 307-331
- Nielsen, D. R., E. Leonard, S. H. Yoon, H. C. Tseng, C. Yuan & K. L. Prather (2009) Engineering alternative butanol production platforms in heterologous bacteria. *Metab Eng*, 11, 262-73

- O'Brien, R. W. & J. G. Morris (1971) The Ferredoxin-dependent reduction of chloramphenicol by *Clostridium acetobutylicum*. *J Gen Microbiol*, 67, 265-71
- Olson, D. G., J. E. McBride, A. J. Shaw & L. R. Lynd (2012) Recent progress in consolidated bioprocessing. *Curr Opin Biotechnol*, 23, 396-405
- Olson, D. G., R. Sparling & L. R. Lynd (2015) Ethanol production by engineered thermophiles. *Curr Opin Biotechnol*, 33, 130-41
- Oultram, J. D., H. Peck, J. K. Brehm, D. E. Thompson, T. J. Swinfield & N. P. Minton (1988) Introduction of genes for leucine biosynthesis from *Clostridium pasteurianum* into *C. acetobutylicum* by cointegrate conjugal transfer. *Mol Gen Genet*, 214, 177-9
- Outram, V., C.-A. Lalander, J. G. M. Lee, E. T. Davies & A. P. Harvey (2017) Applied in situ product recovery in ABE fermentation. *Biotechnology progress*, 33, 563-579
- Panitz, J. C., V. V. Zverlov, V. T. Pham, S. Sturzl, D. Schieder & W. H. Schwarz (2014) Isolation of a solventogenic *Clostridium* sp. strain: fermentation of glycerol to n-butanol, analysis of the bcs operon region and its potential regulatory elements. *Syst Appl Microbiol*, 37, 1-9
- Papanek, B., R. Biswas, T. Rydzak & A. M. Guss (2015) Elimination of metabolic pathways to all traditional fermentation products increases ethanol yields in *Clostridium thermocellum*. *Metab Eng*, 32, 49-54
- Papoutsakis, E. T. (2008) Engineering solventogenic clostridia. *Curr Opin Biotechnol*, 19, 420-9
- Paredes, C. J., K. V. Alsaker & E. T. Papoutsakis (2005) A comparative genomic view of clostridial sporulation and physiology. *Nat Rev Microbiol*, 3, 969-78
- Parisutham, V., T. H. Kim & S. K. Lee (2014) Feasibilities of consolidated bioprocessing microbes: from pretreatment to biofuel production. *Bioresour Technol*, 161, 431-40
- Patakova, P., J. Kolek, K. Sedlar, P. Koscova, B. Branska, K. Kupkova, L. Paulova & I. Provaznik (2018) Comparative analysis of high butanol tolerance and production in clostridia. *Biotechnol Adv*, 36, 721-738
- Perret, S., L. Casalot, H. P. Fierobe, C. Tardif, F. Sabathe, J. P. Belaich & A. Belaich (2004) Production of heterologous and chimeric scaffoldins by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J Bacteriol*, 186, 253-7
- Petersen, D. J. & G. N. Bennett (1991) Cloning of the *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 acetyl coenzyme A acetyltransferase (thiolase; EC 2.3.1.9) gene. *Applied and environmental microbiology*, 57, 2735-2741
- Petersen, M. & R. Daniel (2005) Purification and characterization of an extracellular lipase from *Clostridium tetanomorphum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 431-435
- Phillips-Jones, M. K. (1990) Plasmid transformation of *Clostridium perfringens* by electroporation methods. *FEMS Microbiol Lett*, 54, 221-6

- Pilhofer, M., A. P. Bauer, M. Schrollhammer, L. Richter, W. Ludwig, K. H. Schleifer & G. Petroni (2007) Characterization of bacterial operons consisting of two tubulins and a kinesin-like gene by the novel Two-Step Gene Walking method. *Nucleic Acids Res*, 35, e135
- Poehlein, A., J. D. M. Solano, S. K. Flitsch, P. Krabben, K. Winzer, S. J. Reid, D. T. Jones, E. Green, N. P. Minton, R. Daniel & P. Dürre (2017) Microbial solvent formation revisited by comparative genome analysis. *Biotechnology for biofuels*, 10, 58-58
- Pyne, M. E., M. Bruder, M. Moo-Young, D. A. Chung & C. P. Chou (2014) Technical guide for genetic advancement of underdeveloped and intractable *Clostridium*. *Biotechnol Adv*, 32, 623-41
- Qureshi, N. & T. C. Ezeji (2008) Butanol, 'a superior biofuel' production from agricultural residues (renewable biomass): recent progress in technology. *Biofuels Bioprod Biorefin*, 2
- Qureshi, N., T. C. Ezeji, J. Ebener, B. S. Dien, M. A. Cotta & H. P. Blaschek (2008) Butanol production by *Clostridium beijerinckii*. Part I: use of acid and enzyme hydrolyzed corn fiber. *Bioresour Technol*, 99, 5915-22
- Qureshi, N., B. C. Saha & M. A. Cotta (2007) Butanol production from wheat straw hydrolysate using *Clostridium beijerinckii*. *Bioprocess Biosyst Eng*, 30, 419-27
- Raman, B., C. K. McKeown, M. Rodriguez, Jr., S. D. Brown & J. R. Mielenz (2011) Transcriptomic analysis of *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 cellulose fermentation. *BMC Microbiol*, 11, 134
- Raman, B., C. Pan, G. B. Hurst, M. Rodriguez, Jr., C. K. McKeown, P. K. Lankford, N. F. Samatova & J. R. Mielenz (2009) Impact of pretreated Switchgrass and biomass carbohydrates on *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 cellulosome composition: a quantitative proteomic analysis. *PLoS One*, 4, e5271
- Ravcheev, D. A., X. Li, H. Latif, K. Zengler, S. A. Leyn, Y. D. Korostelev, A. E. Kazakov, P. S. Novichkov, A. L. Osterman & D. A. Rodionov (2012) Transcriptional regulation of central carbon and energy metabolism in bacteria by redox-responsive repressor Rex. *J Bacteriol*, 194, 1145-57
- Raven, S., C. Srivastava, H. Kaushik, V. Hesuh & A. Tiwari. 2019. Fungal Cellulases: New Avenues in Biofuel Production. In *Approaches to Enhance Industrial Production of Fungal Cellulases*, eds. M. Srivastava, N. Srivastava, P. W. Ramteke & P. K. Mishra, 1-18. Cham: Springer International Publishing.
- Reysset, G. & M. Sebald (1985) Conjugal transfer of plasmid-mediated antibiotic resistance from streptococci to *Clostridium acetobutylicum*. *Ann Inst Pasteur Microbiol (1985)*, 136B, 275-82
- Rydzak, T., L. R. Lynd & A. M. Guss (2015) Elimination of formate production in *Clostridium thermocellum*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 42, 1263-72
- Sabathe, F. & P. Soucaille (2003) Characterization of the CipA scaffolding protein and in vivo production of a minicellulosome in *Clostridium acetobutylicum*. *J Bacteriol*, 185, 1092-6

- Saggi, S. K. & P. Dey (2016) An overview of simultaneous saccharification and fermentation of starchy and lignocellulosic biomass for bio-ethanol production. *Biofuels*, 10, 287-299
- Salehi Jouzani, G. & M. J. Taherzadeh (2015) Advances in consolidated bioprocessing systems for bioethanol and butanol production from biomass: a comprehensive review. *Biofuel Research Journal*, 152-195
- Salimi, F. & R. Mahadevan (2013) Characterizing metabolic interactions in a clostridial co-culture for consolidated bioprocessing. *BMC Biotechnol*, 13, 95
- Schadeweg, V. & E. Boles (2016) n-Butanol production in *Saccharomyces cerevisiae* is limited by the availability of coenzyme A and cytosolic acetyl-CoA. *Biotechnol Biofuels*, 9, 44
- Schiel-Bengelsdorf, B., J. Montoya, S. Linder & P. Durre (2013) Butanol fermentation. *Environ Technol*, 34, 1691-710
- Schwarz, W. H. (2001a) The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56, 634-649
- Schwarz, W. H. (2001b) The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*, 56, 634-49
- Schwarz, W. H. & J. R. Gapes (2006) Butanol - rediscovering a renewable fuel. *BioWorld Europe*, 01-2006, 16-19
- Schwarz, W. H., M. Slattery & J. R. Gapes (2007) The ABC of ABE. *BioWorld Europe*, 02-2007, 8-10
- Shao, L., S. Hu, Y. Yang, Y. Gu, J. Chen, Y. Yang, W. Jiang & S. Yang (2007) Targeted gene disruption by use of a group II intron (targetron) vector in *Clostridium acetobutylicum*. *Cell Res*, 17, 963-5
- Shao, X., B. Raman, M. Zhu, J. R. Mielenz, S. D. Brown, A. M. Guss & L. R. Lynd (2011) Mutant selection and phenotypic and genetic characterization of ethanol-tolerant strains of *Clostridium thermocellum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 92, 641-52
- Shen, C. R., E. I. Lan, Y. Dekishima, A. Baez, K. M. Cho & J. C. Liao (2011) Driving forces enable high-titer anaerobic 1-butanol synthesis in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 77, 2905-15
- Shoham, Y., R. Lamed & E. A. Bayer (1999) The cellulosome concept as an efficient microbial strategy for the degradation of insoluble polysaccharides. *Trends Microbiol*, 7, 275-81
- Sillers, R., M. A. Al-Hinai & E. T. Papoutsakis (2009) Aldehyde-alcohol dehydrogenase and/or thiolase overexpression coupled with CoA transferase downregulation lead to higher alcohol titers and selectivity in *Clostridium acetobutylicum* fermentations. *Biotechnol Bioeng*, 102, 38-49
- Silva-Fernandes, T., L. C. Duarte, F. Carvalheiro, S. Marques, M. C. Loureiro-Dias, C. Fonseca & F. Girio (2015) Biorefining strategy for maximal monosaccharide recovery from

three different feedstocks: eucalyptus residues, wheat straw and olive tree pruning. *Bioresour Technol*, 183, 203-12

Soest, v. (1963) Use of Detergents in the Analysis of Fibrous Feeds. II. A Rapid Method for the Determination of Fiber and Lignin. *JOURNAL OF THE A.O.A.C.*, 46

Sommer, B., D. Garbe, P. Schrepfer & T. Brück (2013) Characterization of a highly thermostable β -hydroxybutyryl CoA dehydrogenase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 98, 138-144

Srivastava, N., R. Rathour, S. Jha, K. Pandey, M. Srivastava, V. K. Thakur, R. S. Sengar, V. K. Gupta, P. B. Mazumder, A. F. Khan & P. K. Mishra (2019) Microbial Beta Glucosidase Enzymes: Recent Advances in Biomass Conversion for Biofuels Application. *Biomolecules*, 9

Steen, E. J., R. Chan, N. Prasad, S. Myers, C. J. Petzold, A. Redding, M. Ouellet & J. D. Keasling (2008) Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of n-butanol. *Microb Cell Fact*, 7, 36

Strobel, H. J., F. C. Caldwell & K. A. Dawson (1995) Carbohydrate Transport by the Anaerobic Thermophile *Clostridium thermocellum* LQRI. *Appl Environ Microbiol*, 61, 4012-5

Subtil, T. & E. Boles (2011) Improving L-arabinose utilization of pentose fermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells by heterologous expression of L-arabinose transporting sugar transporters. *Biotechnol Biofuels*, 4, 38

Subtil, T. & E. Boles (2012) Competition between pentoses and glucose during uptake and catabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels*, 5, 14

Swana, J., Y. Yang, M. Behnam & R. Thompson (2011) An analysis of net energy production and feedstock availability for biobutanol and bioethanol. *Bioresour Technol*, 102, 2112-7

Tardif, C., H. Maamar, M. Balfin & J. P. Belaich (2001) Electrotransformation studies in *Clostridium cellulolyticum*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 27, 271-4

Tashiro, Y., H. Shinto, M. Hayashi, S. Baba, G. Kobayashi & K. Sonomoto (2007) Novel high-efficient butanol production from butyrate by non-growing *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (ATCC 13564) with methyl viologen. *J Biosci Bioeng*, 104, 238-40

Thauer, R. K. (2007) Microbiology. A fifth pathway of carbon fixation. *Science*, 318, 1732-3

Thieme, N., J. C. Panitz, C. Held, B. Lewandowski, W. H. Schwarz, W. Liebl & V. Zverlov (2020) Milling byproducts are an economically viable substrate for butanol production using clostridial ABE fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 104, 8679-8689

Thormann, K. & P. Dürre (2001) Orf5/SolR: a transcriptional repressor of the sol operon of *Clostridium acetobutylicum*? *J Ind Microbiol Biotechnol*, 27, 307-13

Tian, L., N. D. Cervenka, A. M. Low, D. G. Olson & L. R. Lynd (2019a) A mutation in the AdhE alcohol dehydrogenase of *Clostridium thermocellum* increases tolerance to several

- primary alcohols, including isobutanol, n-butanol and ethanol. *Scientific Reports*, 9, 1736
- Tian, L., N. D. Cervenka, A. M. Low, D. G. Olson & L. R. Lynd (2019b) A mutation in the AdhE alcohol dehydrogenase of *Clostridium thermocellum* increases tolerance to several primary alcohols, including isobutanol, n-butanol and ethanol. *Scientific reports*, 9, 1736-1736
- Tian, L., P. M. Conway, N. D. Cervenka, J. Cui, M. Maloney, D. G. Olson & L. R. Lynd (2019c) Metabolic engineering of *Clostridium thermocellum* for n-butanol production from cellulose. *Biotechnology for biofuels*, 12, 186-186
- Tian, L., P. M. Conway, N. D. Cervenka, J. Cui, M. Maloney, D. G. Olson & L. R. Lynd (2019d) Metabolic engineering of *Clostridium thermocellum* for n-butanol production from cellulose. *Biotechnol Biofuels*, 12, 186
- Tian, L., B. Papanek, D. G. Olson, T. Rydzak, E. K. Holwerda, T. Zheng, J. Zhou, M. Maloney, N. Jiang, R. J. Giannone, R. L. Hettich, A. M. Guss & L. R. Lynd (2016) Simultaneous achievement of high ethanol yield and titer in *Clostridium thermocellum*. *Biotechnology for Biofuels*, 9, 116
- Timmons, M. D., B. L. Knutson, S. E. Nokes, H. J. Strobel & B. C. Lynn (2009) Analysis of composition and structure of *Clostridium thermocellum* membranes from wild-type and ethanol-adapted strains. *Appl Microbiol Biotechnol*, 82, 929-39
- Tindall, B. J. (2019) The names *Hungateiclostridium* Zhang et al. 2018, *Hungateiclostridium thermocellum* (Viljoen et al. 1926) Zhang et al. 2018, *Hungateiclostridium cellulolyticum* (Patel et al. 1980) Zhang et al. 2018, *Hungateiclostridium aldrichii* (Yang et al. 1990) Zhang et al. 2018, *Hungateiclostridium alkallicellulosi* (Zhilina et al. 2006) Zhang et al. 2018, *Hungateiclostridium clariflavum* (Shiratori et al. 2009) Zhang et al. 2018, *Hungateiclostridium straminisolvens* (Kato et al. 2004) Zhang et al. 2018 and *Hungateiclostridium saccincola* (Koeck et al. 2016) Zhang et al. 2018 contravene Rule 51b of the International Code of Nomenclature of Prokaryotes and require replacement names in the genus *Acetivibrio* Patel et al. 1980. *Int J Syst Evol Microbiol*, 69, 3927-3932
- Toth, J., A. A. Ismaiel & J. S. Chen (1999) The ald gene, encoding a coenzyme A-acylating aldehyde dehydrogenase, distinguishes *Clostridium beijerinckii* and two other solvent-producing clostridia from *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Environ Microbiol*, 65, 4973-80
- Tracy, B. P. (2012) Improving butanol fermentation to enter the advanced biofuel market. *MBio*, 3
- Tracy, B. P., S. W. Jones, A. G. Fast, D. C. Indurthi & E. T. Papoutsakis (2012) Clostridia: the importance of their exceptional substrate and metabolite diversity for biofuel and biorefinery applications. *Curr Opin Biotechnol*, 23, 364-81
- Tripathi, S. A., D. G. Olson, D. A. Argyros, B. B. Miller, T. F. Barrett, D. M. Murphy, J. D. McCool, A. K. Warner, V. B. Rajgarhia, L. R. Lynd, D. A. Hogsett & N. C. Caiazza (2010) Development of pyrF-based genetic system for targeted gene deletion in *Clostridium thermocellum* and creation of a pta mutant. *Appl Environ Microbiol*, 76, 6591-9

- Tucci, S. & W. Martin (2007) A novel prokaryotic trans-2-enoyl-CoA reductase from the spirochete *Treponema denticola*. *FEBS Lett*, 581, 1561-6
- Tummala, S. B., S. G. Junne & E. T. Papoutsakis (2003a) Antisense RNA downregulation of coenzyme A transferase combined with alcohol-aldehyde dehydrogenase overexpression leads to predominantly alcohologenic *Clostridium acetobutylicum* fermentations. *J Bacteriol*, 185, 3644-53
- Tummala, S. B., N. E. Welker & E. T. Papoutsakis (2003b) Design of antisense RNA constructs for downregulation of the acetone formation pathway of *Clostridium acetobutylicum*. *J Bacteriol*, 185, 1923-34
- Tyurin, M. V., S. G. Desai & L. R. Lynd (2004) Electrotransformation of *Clostridium thermocellum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 883-890
- van der Veen, D., J. Lo, S. D. Brown, C. M. Johnson, T. J. Tschaplinski, M. Martin, N. L. Engle, R. A. van den Berg, A. D. Argyros, N. C. Caiazza, A. M. Guss & L. R. Lynd (2013a) Characterization of *Clostridium thermocellum* strains with disrupted fermentation end-product pathways. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 40, 725-734
- van der Veen, D., J. Lo, S. D. Brown, C. M. Johnson, T. J. Tschaplinski, M. Martin, N. L. Engle, R. A. van den Berg, A. D. Argyros, N. C. Caiazza, A. M. Guss & L. R. Lynd (2013b) Characterization of *Clostridium thermocellum* strains with disrupted fermentation end-product pathways. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 40, 725-34
- van Walsum, G. P. & L. R. Lynd (1998) Allocation of ATP to synthesis of cells and hydrolytic enzymes in cellulolytic fermentative microorganisms: bioenergetics, kinetics, and bioprocessing. *Biotechnol Bioeng*, 58, 316-20
- Verbeke, T. J., G. M. Garcia & J. G. Elkins (2017) The effect of switchgrass loadings on feedstock solubilization and biofuel production by *Clostridium thermocellum*. *Biotechnology for Biofuels*, 10, 233
- Wang, Y., S.-H. Ho, H.-W. Yen, D. Nagarajan, N.-Q. Ren & S. Li (2017) Current advances on fermentative biobutanol production using third generation feedstock. *Biotechnol Adv*, 35
- Wang, Z., G. Cao, J. Zheng, D. Fu, J. Song, J. Zhang, L. Zhao & Q. Yang (2015) Developing a mesophilic co-culture for direct conversion of cellulose to butanol in consolidated bioprocess. *Biotechnology for biofuels*, 8, 84-84
- Weber, C., A. Farwick, F. Benisch, D. Brat, H. Dietz, T. Subtil & E. Boles (2010) Trends and challenges in the microbial production of lignocellulosic bioalcohol fuels. *Appl Microbiol Biotechnol*, 87, 1303-15
- Wen, Z., M. Wu, Y. Lin, L. Yang, J. Lin & P. Cen (2014) Artificial symbiosis for acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation from alkali extracted deshelled corn cobs by co-culture of *Clostridium beijerinckii* and *Clostridium cellulovorans*. *Microb Cell Fact*, 13, 92
- Wenske, M. (2013) Produktion von 1-Butanol mit rekombinanten Stämmen auf LCB-Hydrolysat, CO und CO₂+H₂. Open Access Repositorium der Universität Ulm.

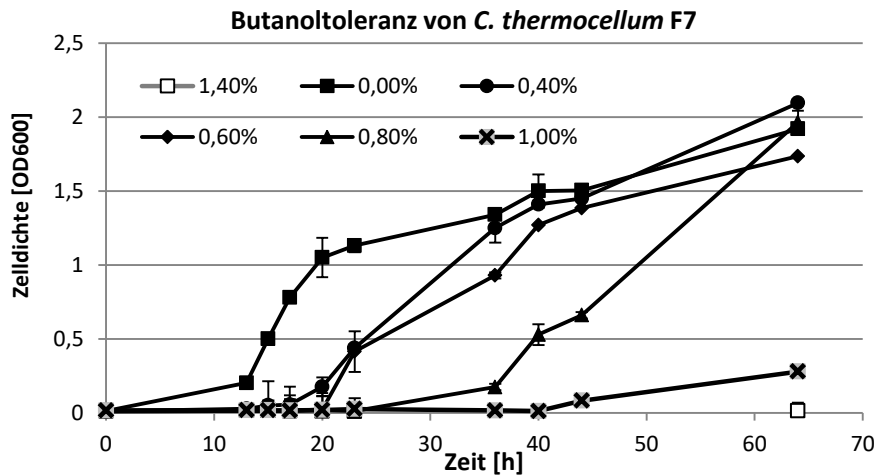
Dissertation. <http://dx.doi.org/10.18725/OPARU-2604>. *Open Access Repositorium der Universität Ulm. Dissertation.*, <http://dx.doi.org/10.18725/OPARU-2604>

- Xiong, W., L. H. Reyes, W. E. Michener, P. C. Maness & K. J. Chou (2018) Engineering cellulolytic bacterium *Clostridium thermocellum* to co-ferment cellulose- and hemicellulose-derived sugars simultaneously. *Biotechnol Bioeng*, 115, 1755-1763
- Xu, T., Y. Li, Z. Shi, C. Hemme, Y. Li, Y. Zhu, J. Van Nostrand, Z. He & J. Zhou (2015) Efficient Genome Editing in *Clostridium cellulolyticum* via CRISPR-Cas9 Nickase. *Applied and environmental microbiology*, 81
- Yazdani, S. S. & R. Gonzalez (2007) Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Curr Opin Biotechnol*, 18, 213-9
- Yoav, S., Y. Barak, M. Shamshoum, I. Borovok, R. Lamed, B. Dassa, Y. Hadar, E. Morag & E. A. Bayer (2017) How does cellulosome composition influence deconstruction of lignocellulosic substrates in *Clostridium* (*Ruminiclostridium*) *thermocellum* DSM 1313? *Biotechnol Biofuels*, 10, 222
- Youngleson, J. S., F. P. Lin, S. J. Reid & D. R. Woods (1995) Structure and transcription of genes within the beta-hbd-adh1 region of *Clostridium acetobutylicum* P262. *FEMS Microbiol Lett*, 125, 185-91
- Zhang, L., X. Nie, D. A. Ravcheev, D. A. Rodionov, J. Sheng, Y. Gu, S. Yang, W. Jiang & C. Yang (2014) Redox-responsive repressor Rex modulates alcohol production and oxidative stress tolerance in *Clostridium acetobutylicum*. *J Bacteriol*, 196, 3949-63
- Zhang, X., B. Tu, L. R. Dai, P. A. Lawson, Z. Z. Zheng, L. Y. Liu, Y. Deng, H. Zhang & L. Cheng (2018) *Petroclostridium xylanilyticum* gen. nov., sp. nov., a xylan-degrading bacterium isolated from an oilfield, and reclassification of clostridial cluster III members into four novel genera in a new Hungateiclostridiaceae fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 68, 3197-3211
- Zhang, X. & Y. P. Zhang. 2013. Cellulases: Characteristics, Sources, Production, and Applications. In *Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers*, ed. H. A. E. E. a. N. T. S. Yang, 131-146.
- Zhang, Y. & T. C. Ezeji (2014) Elucidating and alleviating impacts of lignocellulose-derived microbial inhibitors on *Clostridium beijerinckii* during fermentation of *Miscanthus giganteus* to butanol. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 41, 1505-16
- Zhang, Y. H. & L. R. Lynd (2004) Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnol Bioeng*, 88, 797-824
- Zhang, Y. H. & L. R. Lynd (2005a) Cellulose utilization by *Clostridium thermocellum*: bioenergetics and hydrolysis product assimilation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 7321-5
- Zhang, Y. H. & L. R. Lynd (2005b) Regulation of cellulase synthesis in batch and continuous cultures of *Clostridium thermocellum*. *J Bacteriol*, 187, 99-106

- Zheng, J., Y. Tashiro, Q. Wang & K. Sonomoto (2015) Recent advances to improve fermentative butanol production: Genetic engineering and fermentation technology. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119, 1-9
- Zheng, Y. N., L. Z. Li, M. Xian, Y. J. Ma, J. M. Yang, X. Xu & D. Z. He (2009) Problems with the microbial production of butanol. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 36, 1127-38
- Zhu, X., J. Cui, Y. Feng, Y. Fa, J. Zhang & Q. Cui (2013) Metabolic adaption of ethanol-tolerant *Clostridium thermocellum*. *PLoS One*, 8, e70631
- Zverlov, V. V., O. Berezina, G. A. Velikodvorskaya & W. H. Schwarz (2006) Bacterial acetone and butanol production by industrial fermentation in the Soviet Union: use of hydrolyzed agricultural waste for biorefinery. *Appl Microbiol Biotechnol*, 71, 587-97
- Zverlov, V. V., J. Kellermann & W. H. Schwarz (2005) Functional subgenomics of *Clostridium thermocellum* cellulosomal genes: identification of the major catalytic components in the extracellular complex and detection of three new enzymes. *Proteomics*, 5, 3646-53
- Zverlov, V. V., M. Klupp, J. Krauss & W. H. Schwarz (2008) Mutations in the scaffoldin gene, *cipA*, of *Clostridium thermocellum* with impaired cellulosome formation and cellulose hydrolysis: insertions of a new transposable element, IS1447, and implications for cellulase synergism on crystalline cellulose. *J Bacteriol*, 190, 4321-7
- Zverlov, V. V. & W. H. Schwarz (2008) Bacterial cellulose hydrolysis in anaerobic environmental subsystems--*Clostridium thermocellum* and *Clostridium stercorarium*, thermophilic plant-fiber degraders. *Ann N Y Acad Sci*, 1125, 298-307
-

IX Anhang

Anhang I: Butanol-Toleranz von *C. thermocellum* F7; in GS2 mit 2 % Cellobiose bei 60°C und zugegebenen Butanolkonzentrationen von 0,0 bis 1,4 %; n=2 ± SD.



Anhang II: Sequenz-Vergleich der *C. thermocellum* ATCC 27405^T Alkohol-Dehydrogenase (Cthe_0423) mit denen aus *C. saccharobutylicum* DSM 13864 (CLSA_c03350), *C. acetobutylicum* ATCC 824 (AdhE CA_P0035/AdhE2 CA_P0162) und *C. beijerinckii* NCIMB 8052 (Cbei_0305)

Proteinsequenz Alignment (CLUSTALW)

```
Sequence 1: cth_Cthe_0423      873 aa
Sequence 2: csb_CLSA_c03350   871 aa
Sequence 3: cbe_Cbei_0305     864 aa
Sequence 4: cac_CA_P0035      858 aa
Sequence 5: cac_CA_P0162      862 aa
```

```
Sequences (1:2) Aligned. Score: 67.7382
Sequences (1:3) Aligned. Score: 66.8981
Sequences (1:4) Aligned. Score: 63.7529
Sequences (1:5) Aligned. Score: 60.5568
```

DNA-Sequenz Alignment:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
CP000568.1	<i>Clostridium thermocellum</i> ATCC 27405, complete genome	<u>4729</u>	4729	100%	0.0	100%
CP000721.1	<i>Clostridium beijerinckii</i> NCIMB 8052, complete genome	<u>762</u>	799	96%	0.0	70%
AF321779.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i> plasmid pSOL1 aldehyde/alcohol dehydrogenase (adhE2) gene, complete cds	<u>596</u>	596	82%	6e-169	66%
AE001438.3	<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824 megaplasmid pSOL1, complete sequence	<u>596</u>	1100	82%	6e-169	67%
X72831.1	<i>C. acetobutylicum</i> adhE, ctfA and ctfB genes	<u>333</u>	503	69%	1e-89	67%

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<u>L14817.1</u>	Clostridium acetobutylicum transcriptional repressor (solR) and aldehyde-alcohol dehydrogenase (aad) genes, complete cds	<u>333</u>	503	69%	1e-89	67%
<u>M26941.1</u>	Clostridium saccharobutylicum NADPH-dependent butanol dehydrogenase (adh) gene, complete cds	<u>44.6</u>	44.6	2%	0.008	72%

Anhang III: Sequenz-Vergleich der *R. cellulolyticum* DSM 5812^T Alkohol-Dehydrogenase (Ccel_3198) mit denen aus *C. saccharobutylicum* DSM 13864 (CLSA_c03350), *C. acetobutylicum* ATCC 824 (AdhE CA_P0035/AdhE2 CA_P0162) und *C. beijerinckii* NCIMB 8052 (Cbei_0305).

Proteinsequenz Alignment (CLUSTALW)

```
Sequence 1: cce_Ccel_3198      867 aa
Sequence 2: cbe_Cbei_0305     864 aa
Sequence 3: csb_CLSA_c03350   871 aa
Sequence 4: cac_CA_P0035      858 aa
Sequence 5: cac_CA_P0162      862 aa
```

```
Sequences (1:2) Aligned. Score: 68.8657
Sequences (1:3) Aligned. Score: 68.0507
Sequences (1:4) Aligned. Score: 63.6364
Sequences (1:5) Aligned. Score: 62.181
```

Anhang IV: Feststoffanalyse (nach Van Soest) der einzelnen SC-Substrat Fraktionen

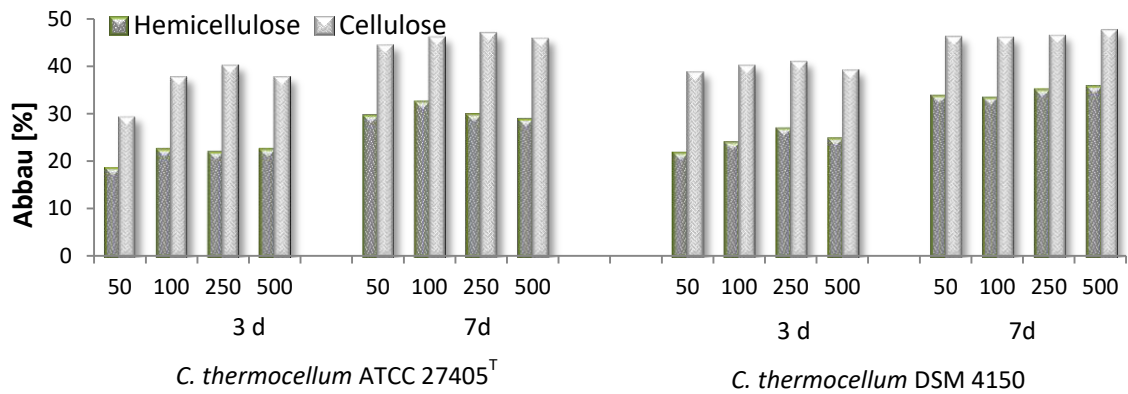
#	Löslicher Abfall	lösliche Best.	Hemicellulose	Cellulose	Lignin + Asche
1	11,37	10,25	21,83	42,00	14,55
2	12,23	9,39	22,83	43,68	11,88
3	13,45	8,85	22,56	43,34	11,80
4	13,22	9,51	26,58	39,56	11,12
5	13,14	9,74	20,42	44,44	12,25
6	9,86	13,76	18,88	44,97	12,53
7	4,98	17,28	20,51	44,79	12,44
8	11,98	10,22	21,12	44,36	12,32
9	6,90	14,72	20,59	45,00	12,79
10	10,19	12,30	23,77	42,11	11,62
11	6,25	14,50	25,56	44,03	9,66

	Löslicher Abfall	Lösliche Bestandteile	Hemicellulose	Cellulose	Lignin / Asche
MW	10,33	11,87	22,24	43,48	12,09
SD	3,01	2,81	2,33	1,66	1,19

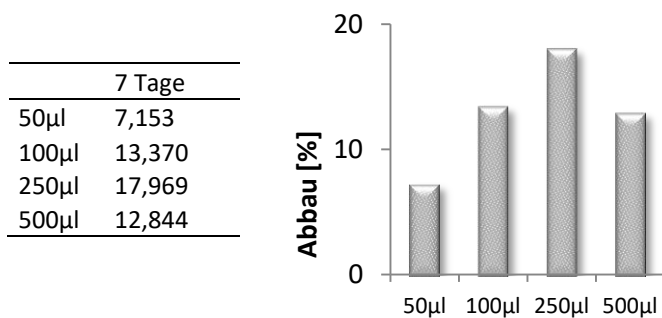
Anhang V: Analyse der optimalen Inokulationsmenge aus Sporensuspensionen (nach Van Soest);

a) Abbau von SC-Substrat durch aus Sporen angeimpfter Kulturen von *C. thermocellum* ATCC 27405^T und DSM 4150 in unterschiedlichen Anfangskonzentrationen [Angabe Abbau in % vom Ausgangsgewicht].

	Hemi				Hemi		
	µl	cellulose	Cellulose		µl	cellulose	Cellulose
27405-Sp-3T	50	18,51	29,20	4150-Sp-3T	50	21,71	38,58
27405-Sp-3T	100	22,40	37,53	4150-Sp-3T	100	23,89	40,02
27405-Sp-3T	250	21,84	39,96	4150-Sp-3T	250	26,80	40,79
27405-Sp-3T	500	22,40	37,53	4150-Sp-3T	500	24,72	38,95
27405-Sp-7T	50	29,50	44,24	4150-Sp-7T	50	33,66	46,01
27405-Sp-7T	100	32,43	45,94	4150-Sp-7T	100	33,21	45,87
27405-Sp-7T	250	29,71	46,78	4150-Sp-7T	250	34,90	46,29
27405-Sp-7T	500	28,69	45,68	4150-Sp-7T	500	35,63	47,41



b) Abbau SC-Substrat (gesamt) durch direkt aus Sporen (mit Pasteurisation) angeimpfte Kulturen von *R. cellulolyticum* DSM 5812^T in unterschiedlichen Anfangskonzentrationen [Angabe Abbau in %] nach 7 Tagen bei 34°C.

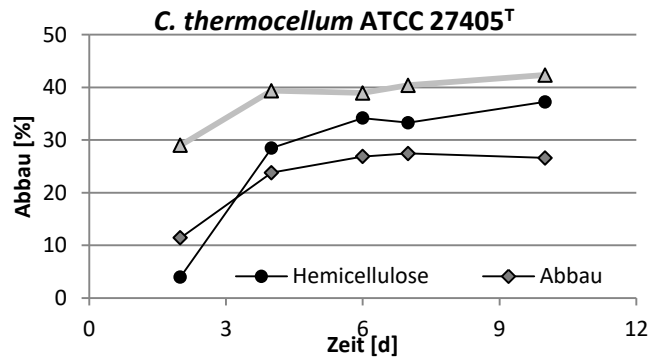


Anhang VI: Analyse des Abbaus in Abhängigkeit vom Entgasen der Kulturen (Van Soest)

Kinetik des fraktionierten Substratabbaus durch *C. thermocellum* ATCC 27405^T und DSM 4150 sowie *R. cellulolyticum* 5812^T [%] bei täglichem Entgasen auf 1,33 % SC Substrat in GS2 bei 60 bzw. 34°C;

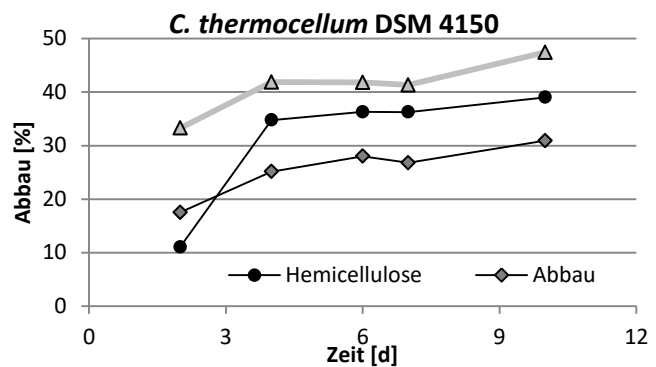
C. thermocellum ATCC 27405^T

Tage	Abbau	Hemicellulose	Cellulose
3	11,4192	3,9705	29,0032
4	23,7902	28,4669	39,3631
6	26,8775	34,1606	38,9306
7	27,4500	33,2761	40,4029
10	26,6089	37,2230	42,3369



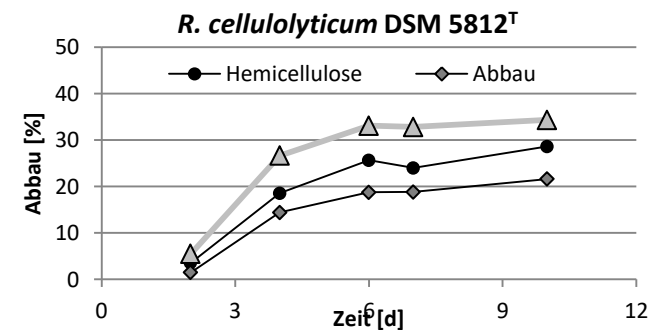
C. thermocellum DSM 4150

Tage	Abbau	Hemicellulose	Cellulose
3	17,5266	11,0624	33,2856
4	25,1454	34,7837	41,8477
6	28,0141	36,3010	41,7900
7	26,7970	36,2789	41,3138
10	30,9258	39,0271	47,4162

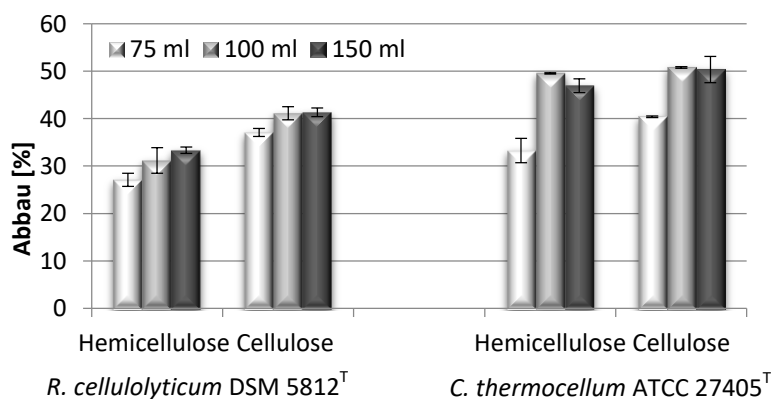


R. cellulolyticum DSM 5812^T

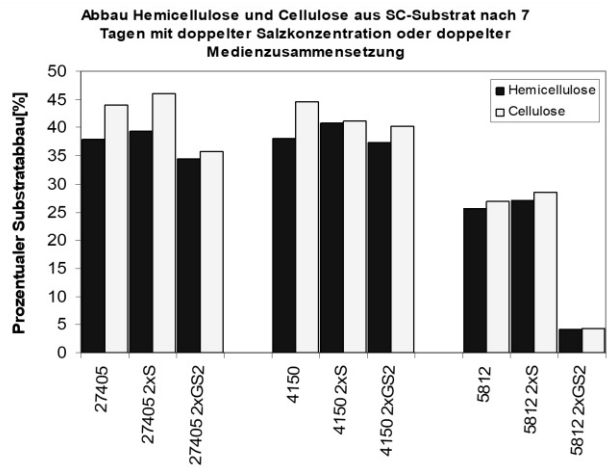
Tage	Abbau	Hemicellulose	Cellulose
2	1,49094	3,57619	5,50906
4	14,4116	18,5443	26,6495
6	18,7546	25,6532	33,0755
7	18,8293	23,9792	32,8179
10	21,6276	28,6238	34,3467



Anhang VII: Analyse des Abbaus in Abhängigkeit von der Substratkonzentration (Van Soest) nach 7 Tagen (*C. thermocellum*) und 10 Tagen (*R. cellulolyticum*); n=2 ± SD.



Anhang VIII: Analyse des Abbaus in Abhängigkeit von der Salz und Medium-Konzentration (nach Van Soest)



Kinetik Substratabbau nach 4, 6 und 8 Tagen bzw. 4, 6, 8 und 10 Tagen bei einfacher und doppelter Salzkonzentration

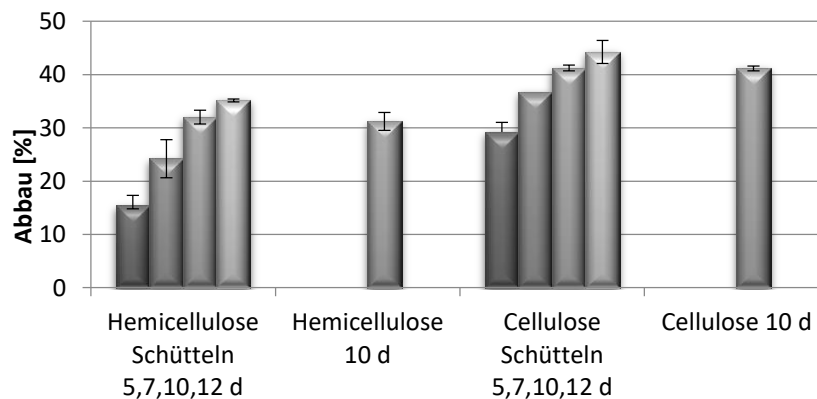
C. thermocellum ATCC 27405^T: keine besserer Abbau durch doppelte Salzkonzentration

	Abbau	Hemicellulose	Cellulose
4T (1xSalz)	22,59	32,5	41,9
6T (1xSalz)	28,68	38,34	42,89
8T (1xSalz)	29,49	41,12	47,63
4T (2xSalz)	18,26	33,78	40,26
6T (2xSalz)	26,29	40,7	43,4
8T (2xSalz)	24,74	40,86	41,87

R. cellulolyticum DSM 5812: kein verbesserter oder schnellerer Abbau durch doppelte Salzkonzentration

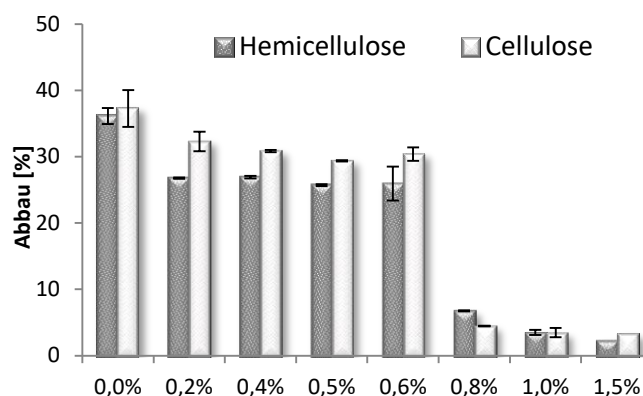
MW	Abbau	Hemicellulose	Cellulose
4T (1xSalz)	13,45	24,65	27,77
6T (1xSalz)	19,23	26,37	35,45
8T (1xSalz)	25,82	33,58	41
10T (1xSalz)	22,48	33,2	41,21
SD			
4T (2xSalz)	17,27	22,74	24,98
6T (2xSalz)	19,56	27,83	30,46
8T (2xSalz)	20,91	32,95	38,53
10T (2xSalz)	23,54	32,16	42,07

Anhang IX: Analyse des Abbaus von Hemicellulose und Cellulose unter Schütteln nach 5, 7, 10 und 12 Tagen in 100ml Medium durch *R. cellulolyticum* DSM 5812 n=2 ± SD.



Anhang X: Analyse des Substratabbaus durch *R. cellulolyticum* DSM 5812^T unter Zugabe von Butanol; n=2 ± SD.

	Hemicellulose	Cellulose
0,0 %	36,15	37,28
0,2 %	26,80	32,30
0,4 %	26,92	30,85
0,5 %	25,71	29,38
0,6 %	25,96	30,39
0,8 %	6,77	4,47
1,0 %	3,51	3,47
1,5 %	2,32	3,38



Anhang XI: Zusammensetzung der verwendeten Substrate Weizengrießkleie (WGK) und Weizennachmehl (WNM); Anhand dieser Daten wurde der Zuckergehalt (s. Anhang XII) bestimmt und entweder in 50 ml Grundmedium oder Leitungswasser mit 25mg/L Fe(II)SO₄ eingesetzt.

	Weizengrießkleie	Weizennachmehl
Trockenmasse	887,33 g/kg	899 g/kg
Rohasche (%)	5,30	4,30
Rohprotein (%)	16,30	23,30
Rohfaser (%)	9,90	3,50
Rohfett (%)	5,30	5,50
Stärke (%)	21,90	39,80
Zucker	68,6	54,5
MEind	11,19	13,56
NEL	6,76	8,54
MEschw	11,95	15,92
nXP	151,88	191,5
RNB	2,04	6,56
Kalzium	1,02	0,93
Phosphor	9,01	9,62
Magnesium	3,37	3,29
Natrium	0,05	0,04
Kalium	12,58	15,35
Chlor	0,37	0,2
Schwefel	2,15	1,85
FKAD	179,4	273,47
Kupfer	12,76	16,58
Zink	92,22	120,49
Mangan	98,29	103,55
Eisen	109,02	119,77

Anhang XII: Zuckergehalt (leicht zugängliche Kohlenhydrate: Zucker und Stärke) in Weizengrießkleie und Weizennachmehl und entsprechende Substratkonzentrationen im Medium

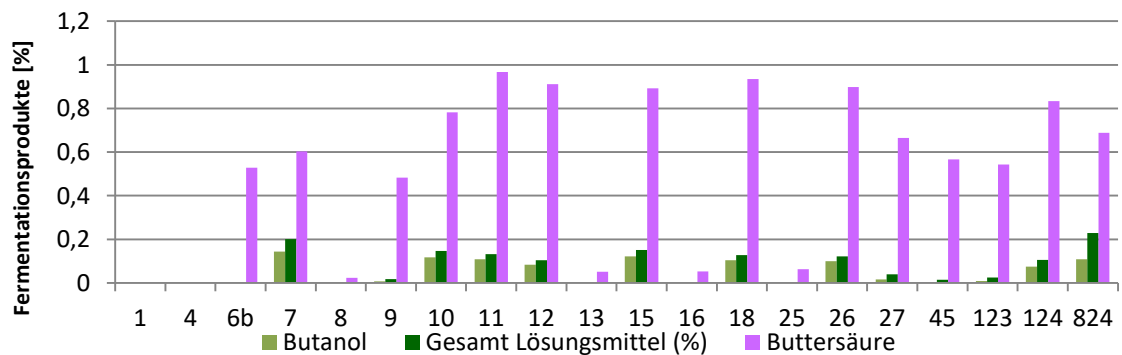
a) Weizengrießkleie

Zuckergehalt [%]	Substratkonzentration im Medium [%]
1	2,9
2	5,4
3	8,3
4	9,6
5	13
6	15,2
7	17,3

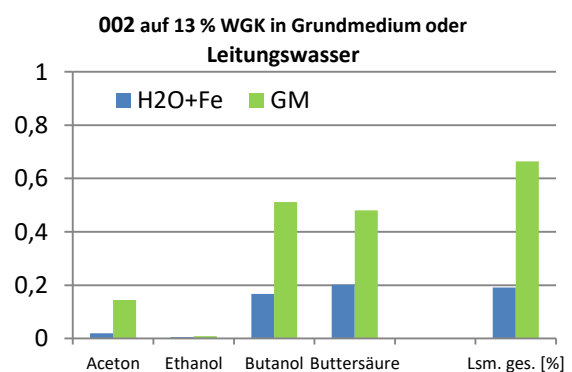
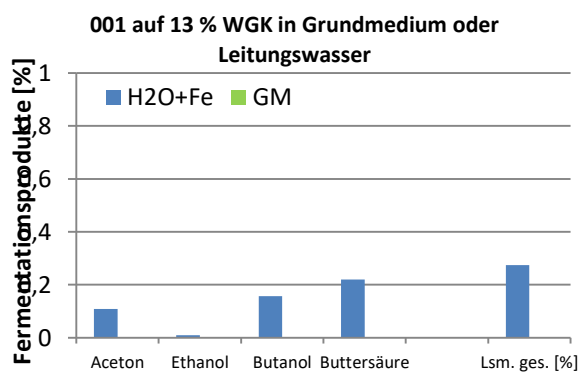
b) Weizennachmehl

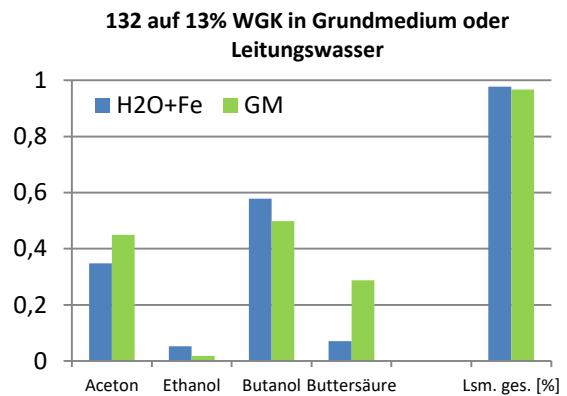
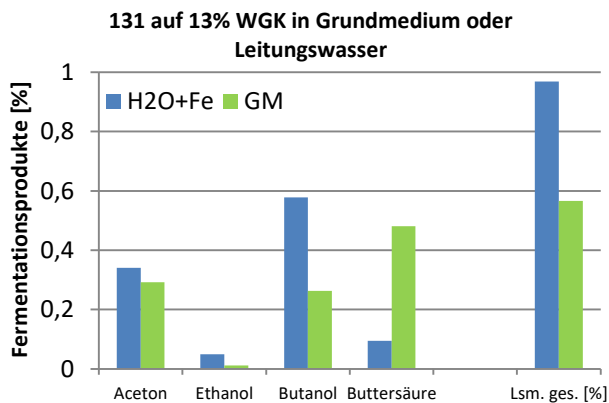
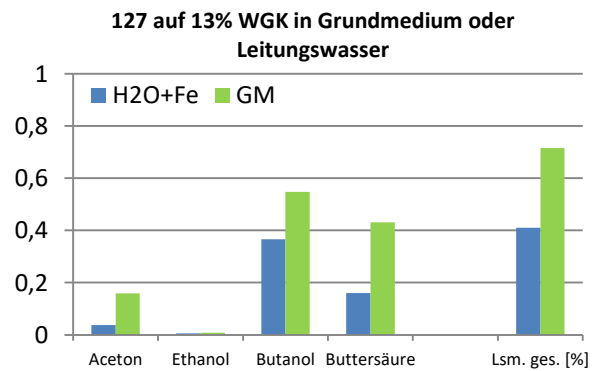
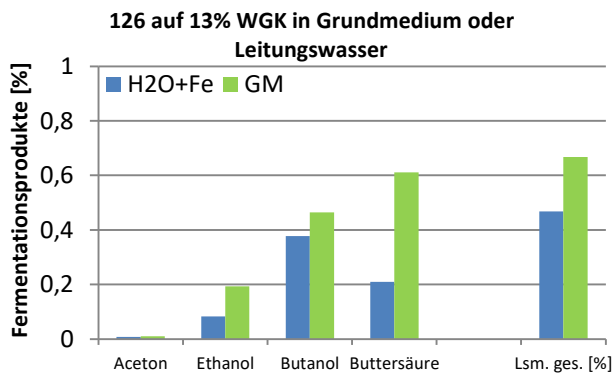
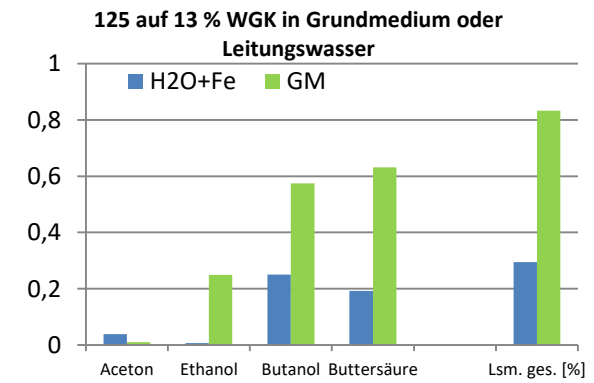
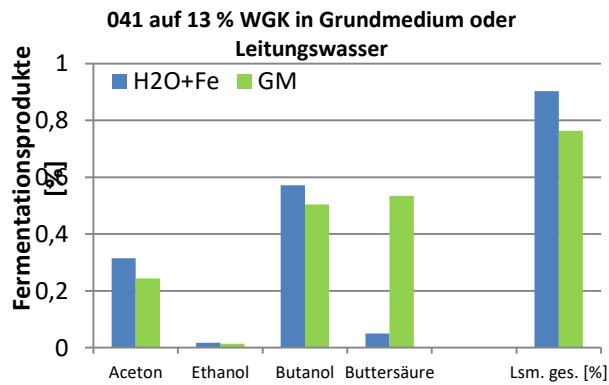
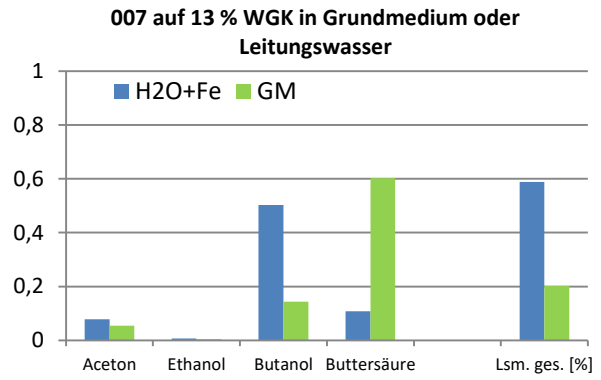
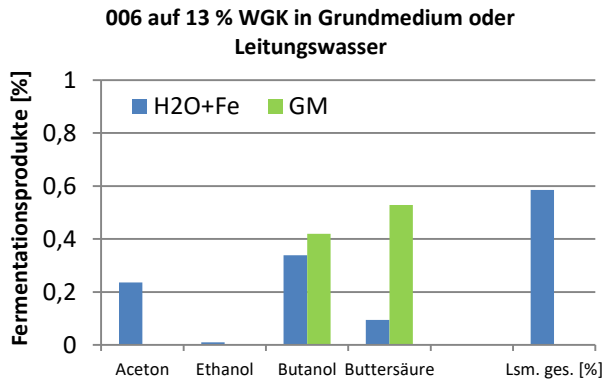
Zuckergehalt [%]	Substratkonzentration in Medium [%]
1	1,6
2	3,1
3	4,5
4	5,8
5	7,2
6	8,6
7	9,9
8	11,1
9	12,3
10	13,5
11	14,7
12	15,8

Anhang XIII: Screening der Stammsammlung - Fermentationsprodukte [in %] der schlechteren Lösungsmittelproduzenten (< 0,18 % Butanol) auf 13 % WGK; in Grundmedium bei 34°C; beispielhaft sind hier die Werte nach 7 Tagen gezeigt.



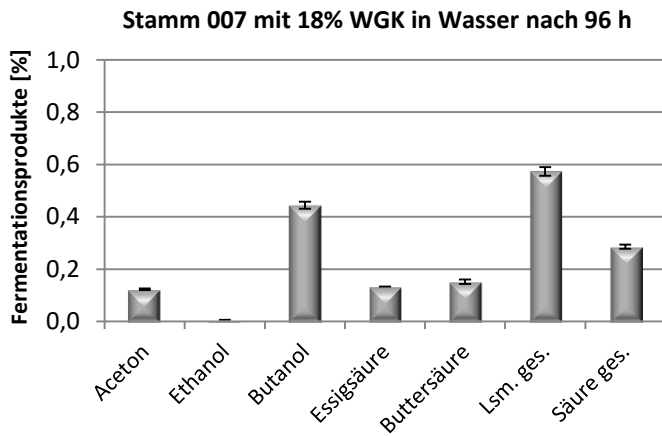
Anhang XIV: Direkter Vergleich der Fermentationsprodukte [in %] der besseren Lösungsmittelproduzenten (> 0,18 % Butanol) auf 13 % WGK; in Grundmedium oder Leitungswasser supplementiert mit 25 mg/L Fe(II)SO₄ bei 34°C; beispielhaft sind hier die 7 Tage Werte gezeigt.



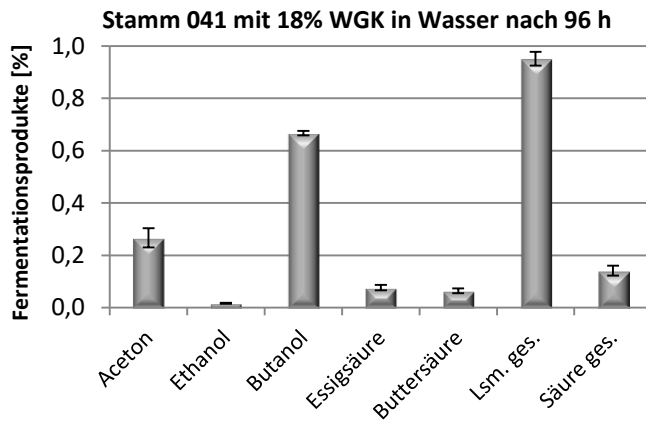


Anhang XV: Fermentationsprodukte [%] ausgewählter Stämme auf 18 % WGK nach 48, 96 und 144 h bei 34°C a) in Leitungswasser supplementiert mit 25 mg/L Fe(II)SO₄ (Stamm 7, 41, und 125 oder b) in Grundmedium (Stamm 2, 41, 131, 132)

a) Fermentationsprodukte in Leitungswasser supplementiert mit 25 mg/L Fe(II)SO₄ (Wasser)

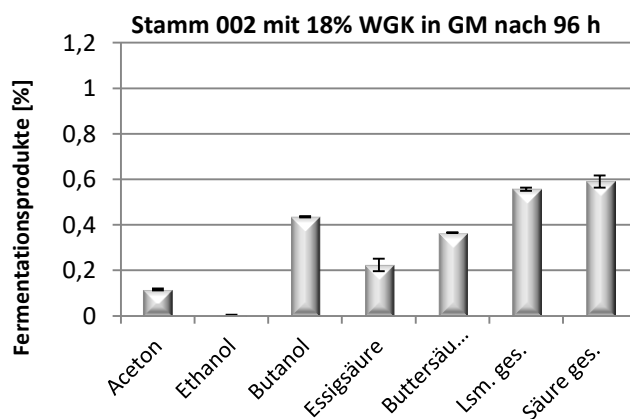


	Stamm 7		
	48h	96h	144h
Aceton	0,1154	0,1229	0,1222
Ethanol	0,0064	0,0065	0,0065
Butanol	0,4206	0,4442	0,4432
Essigsäu.	0,1099	0,1336	0,1409
Buttersäu.	0,1516	0,1522	0,1521
Lsm. ges.	0,5424	0,5735	0,5719
Säure ges.	0,2615	0,2858	0,2930

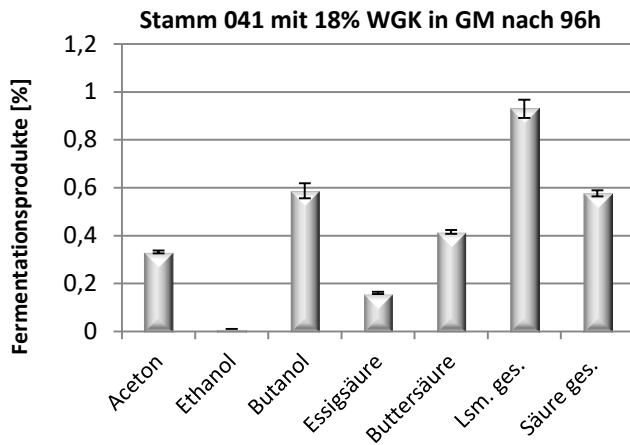


	Stamm 41		
	48h	96h	144h
Aceton	0,2410	0,2671	0,2669
Ethanol	0,0156	0,0168	0,0165
Butanol	0,6309	0,6675	0,6542
Essigsäu.	0,0469	0,0769	0,0685
Buttersäu.	0,2153	0,0645	0,0775
Lsm. ges.	0,8874	0,9513	0,9376
Säure ges.	0,2623	0,1414	0,1460

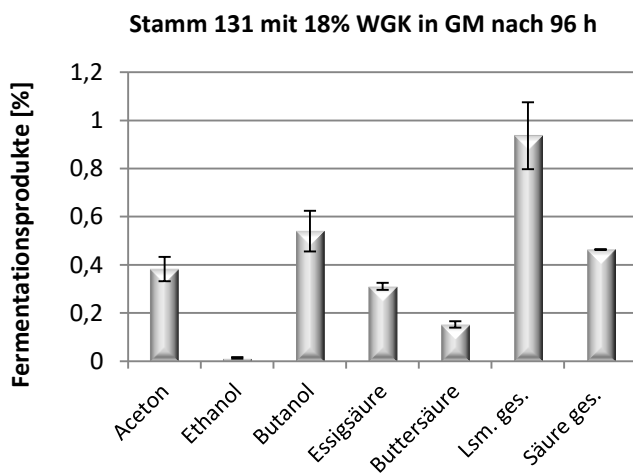
b) Fermentationsprodukte in Grundmedium (GM)



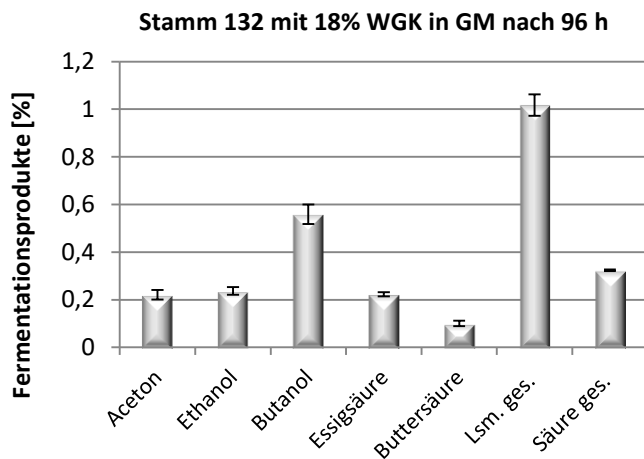
	Stamm 2		
	48h	96h	144h
Aceton	0,1072	0,1160	0,1154
Ethanol	0,0055	0,0056	0,0046
Butanol	0,4037	0,4353	0,4472
Essigsäu.	0,2497	0,2243	0,2427
Buttersäu.	0,3786	0,3659	0,3304
Lsm. ges.	0,5164	0,5568	0,5672
Säure ges.	0,6283	0,5901	0,5731



	Stamm 41		
	48h	96h	144h
Aceton	0,3257	0,3316	0,3394
Ethanol	0,0109	0,0109	0,0105
Butanol	0,5948	0,5873	0,5860
Essigsäu.	0,1512	0,1611	0,1762
Buttersäu.	0,3915	0,4157	0,3797
Lsm. ges.	0,9314	0,9298	0,9358
Säure ges.	0,5426	0,5768	0,5559

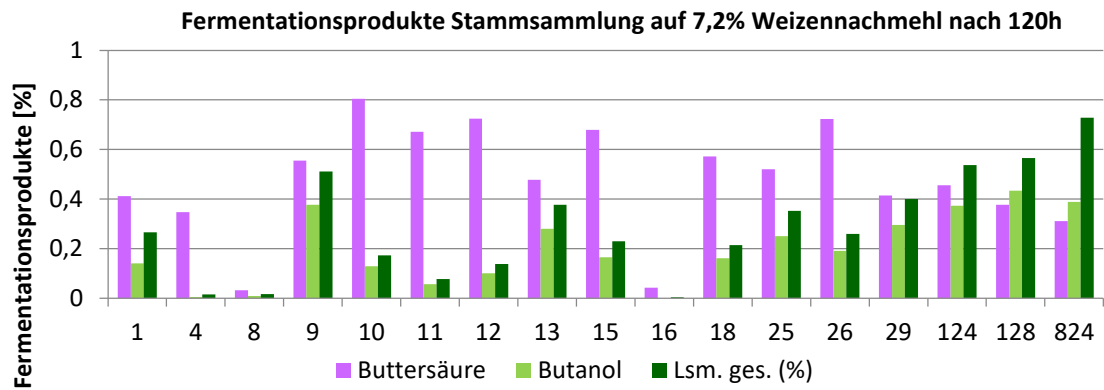


	Stamm 131		
	48h	96h	144h
Aceton	0,3363	0,3825	0,3832
Ethanol	0,0120	0,0133	0,0096
Butanol	0,4845	0,5404	0,5332
Essigsäu.	0,3159	0,3108	0,3369
Buttersäu.	0,1214	0,1527	0,1527
Lsm. ges.	0,8328	0,9362	0,9259
Säure ges.	0,4373	0,4634	0,4895

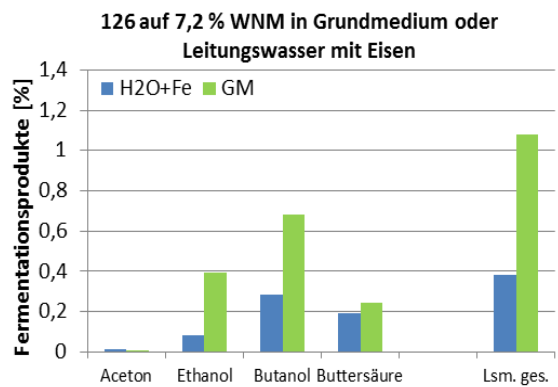
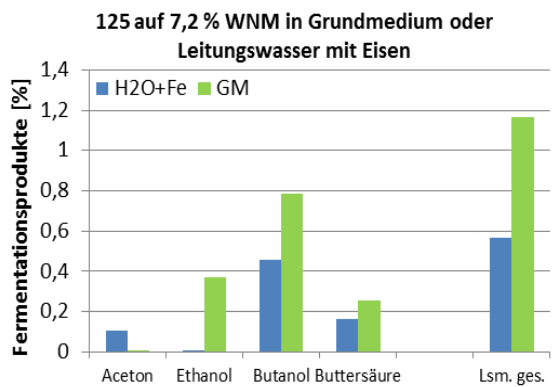
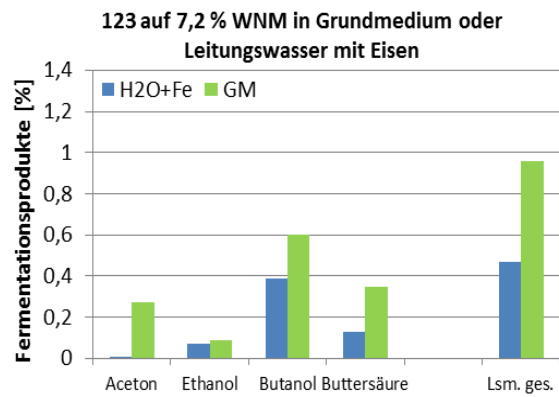
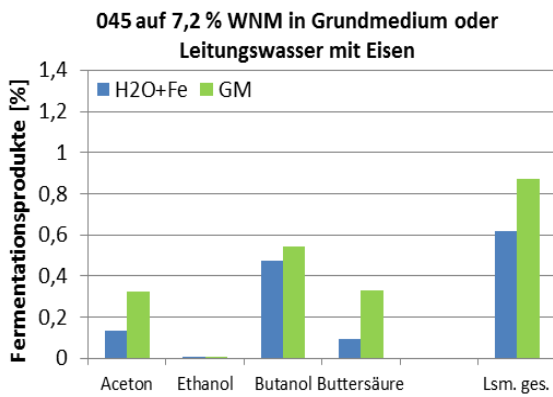


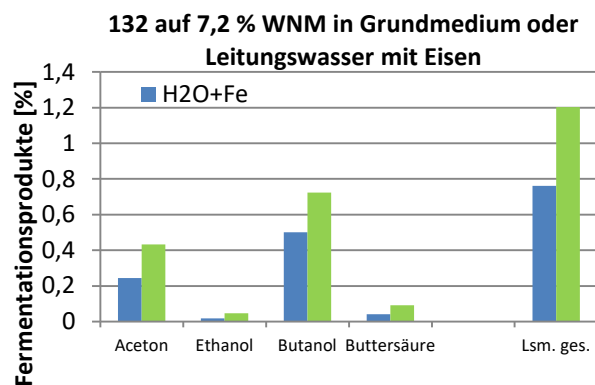
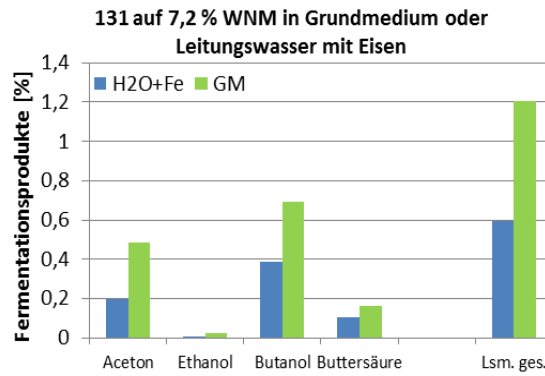
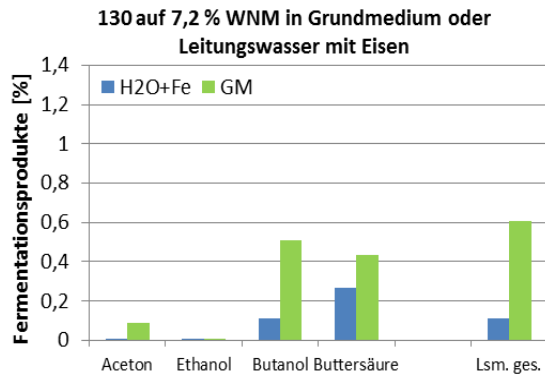
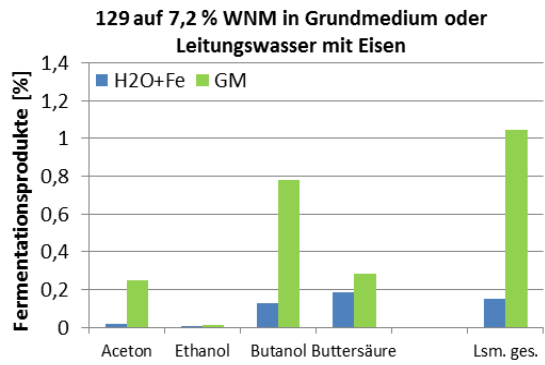
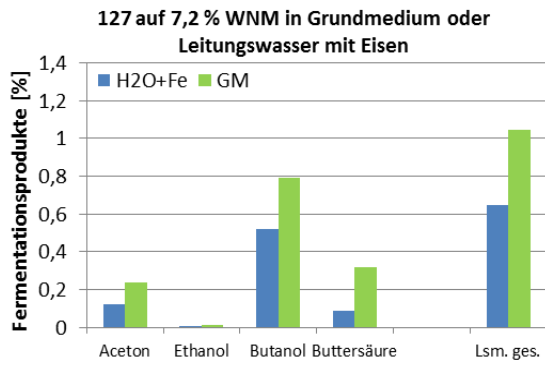
	Stamm 132		
	48h	96h	144h
Aceton	0,2293	0,2214	0,2495
Ethanol	0,2559	0,2368	0,2551
Butanol	0,5918	0,5590	0,6155
Essigsäu.	0,2445	0,2232	0,2716
Buttersäu.	0,1006	0,1005	0,1032
Lsm. ges.	1,0770	1,0172	1,1201
Säure ges.	0,3451	0,3237	0,3748

Anhang XVI: Fermentationsprodukte [%] der schlechteren (< 0,5 % Butanol) Lösungsmittelproduzenten auf 7,2 % WNM nach 120 h; in Grundmedium bei 34°C.

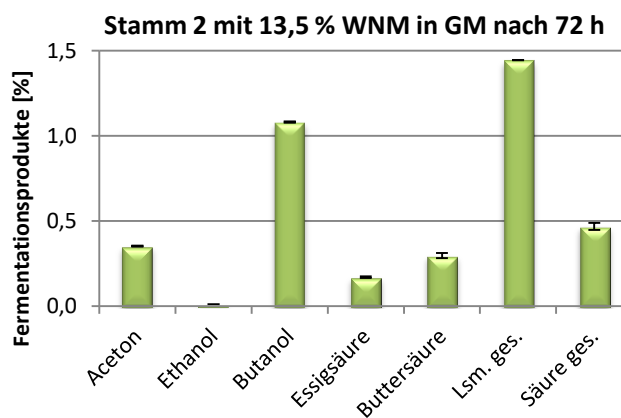


Anhang XVII: Direkter Vergleich der Fermentationsprodukte [%] der besseren Lösungsmittelproduzenten auf 7,2 % WNM; in Grundmedium oder Leitungswasser supplementiert mit 25 mg/L Fe(II)SO₄ nach 7 Tagen bei 34°C.

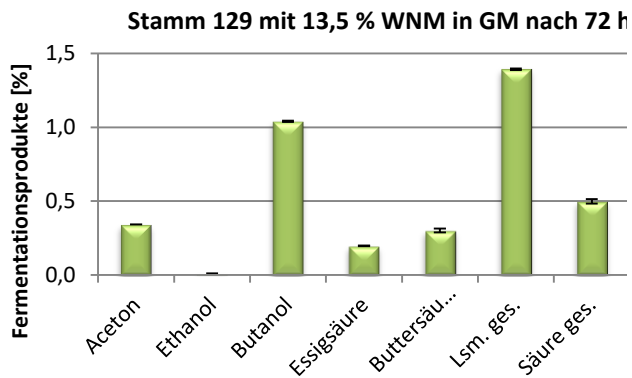




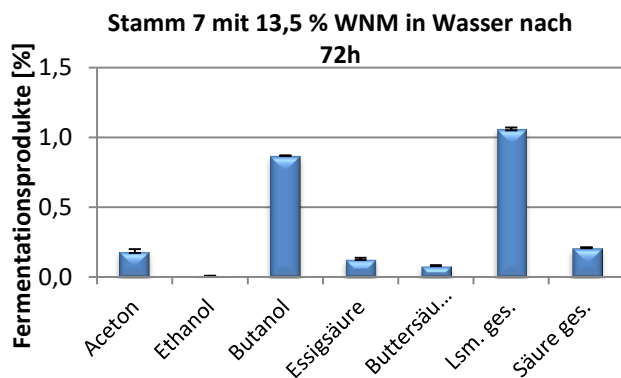
Anhang XVIII: Fermentationsprodukte [%] für Stamm 2 und 129 in Grundmedium sowie 7 und 132 in Leitungswasser supplementiert mit 25 mg/L Fe(II)SO₄ auf 13,5 % WNM nach 24, 48 und 72 h bei 34°C.



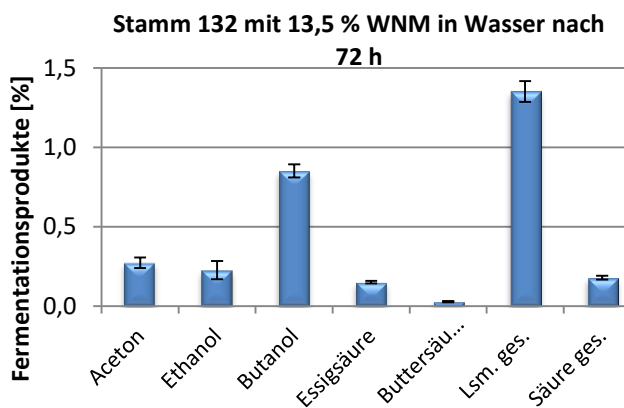
	Stamm 2		
	24 h	48 h	72 h
Aceton	0,13	0,34	0,35
Ethanol	0,00	0,01	0,01
Butanol	0,26	0,98	1,08
Essigsäure	0,24	0,14	0,17
Buttersäure	0,23	0,29	0,30
Lsm. ges.	0,39	1,33	1,44
Säure ges.	0,47	0,43	0,47



Stamm 129			
	24 h	48 h	72 h
Aceton	0,20	0,34	0,34
Ethanol	0,01	0,01	0,01
Butanol	0,43	0,99	1,04
Essigsäure	0,19	0,17	0,20
Buttersäure	0,18	0,27	0,30
Lsm. ges.	0,64	1,34	1,39
Säure ges.	0,37	0,45	0,50

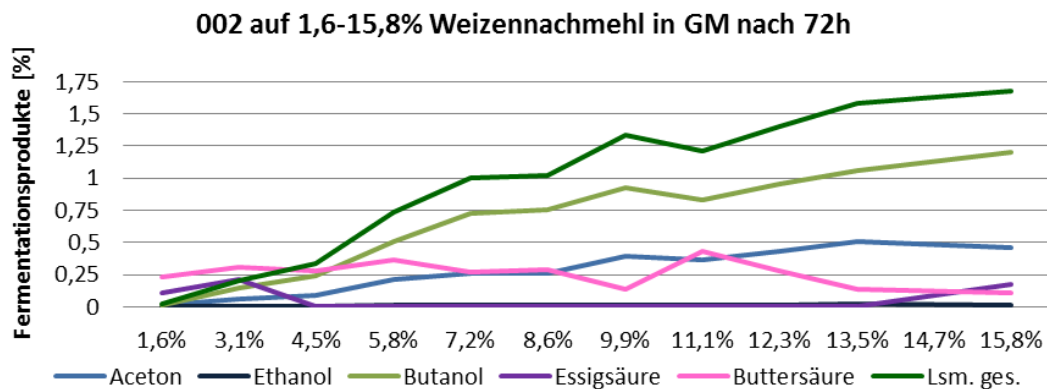


Stamm 7			
	24 h	48 h	72 h
Aceton	0,10	0,18	0,18
Ethanol	0,00	0,01	0,01
Butanol	0,31	0,84	0,87
Essigsäure	0,08	0,09	0,13
Buttersäure	0,06	0,07	0,08
Lsm. ges.	0,41	1,03	1,06
Säure ges.	0,15	0,15	0,21

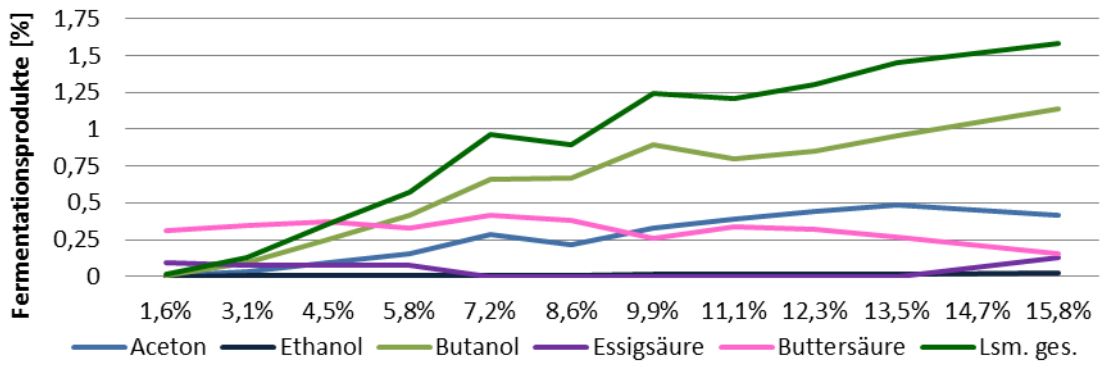


Stamm 132			
	24 h	48 h	72 h
Aceton	0,06	0,28	0,27
Ethanol	0,00	0,21	0,23
Butanol	0,08	0,83	0,85
Essigsäure	0,08	0,10	0,15
Buttersäure	0,09	0,02	0,03
Lsm. ges.	0,13	1,32	1,35
Säure ges.	0,17	0,13	0,18

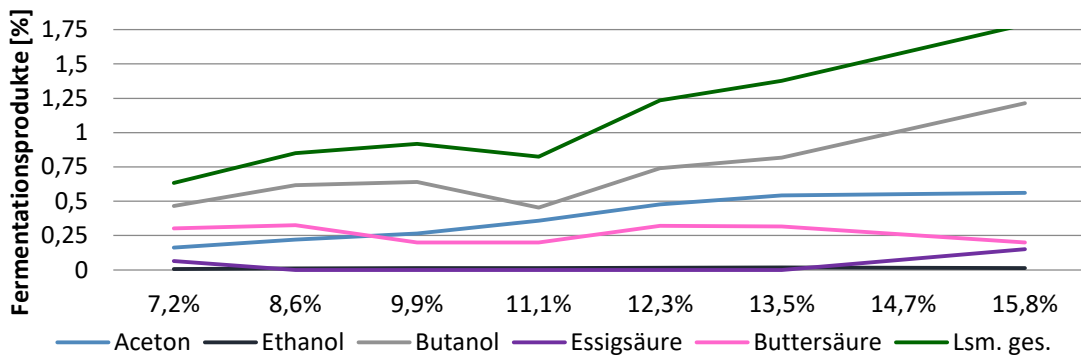
Anhang XIX: Fermentationsprodukte (in %) für Stamm 2, 7, 125, 127, 129, 131 und 132 in Grundmedium mit steigenden Substratkonzentrationen WNM nach 72 h bei 34°C.



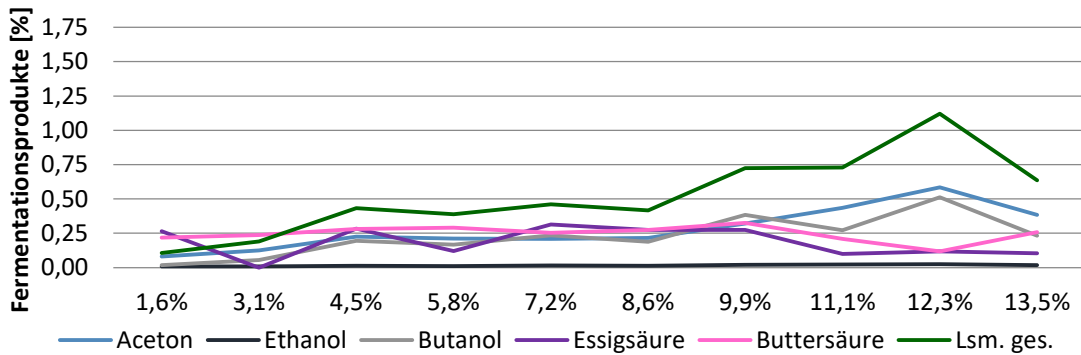
007 auf 1,6-15,8% Weizennachmehl in GM nach 72 h



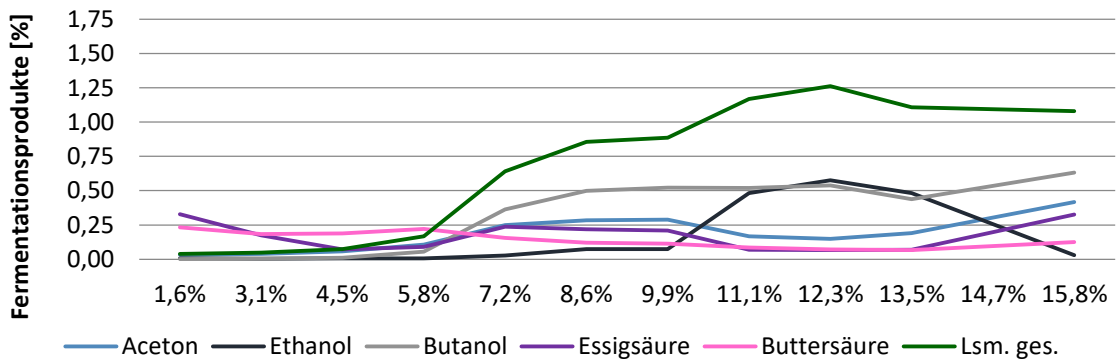
129 auf 7,2-15,8% Weizennachmehl in GM nach 72 h



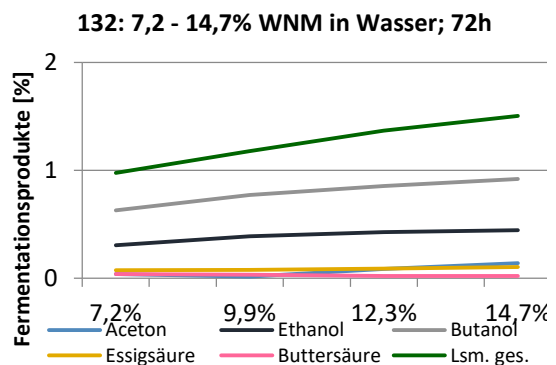
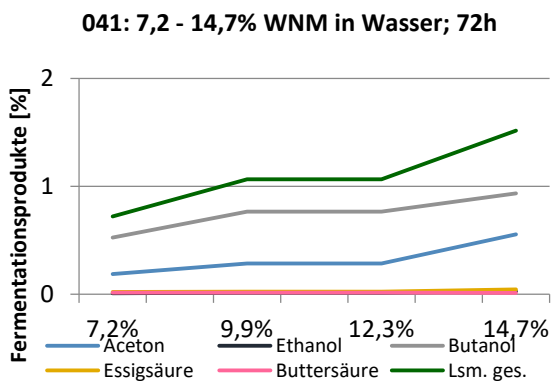
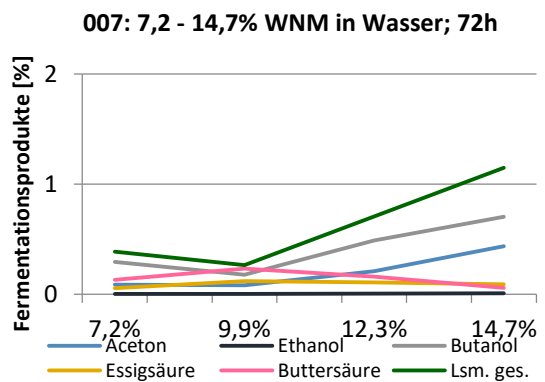
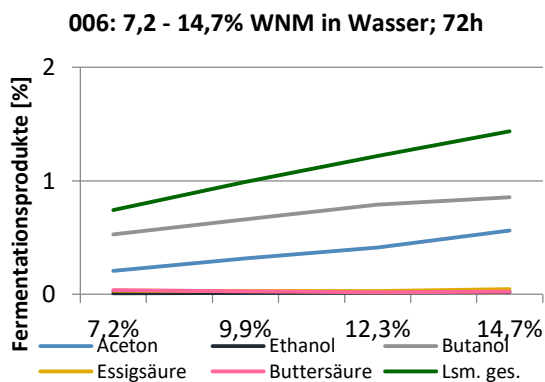
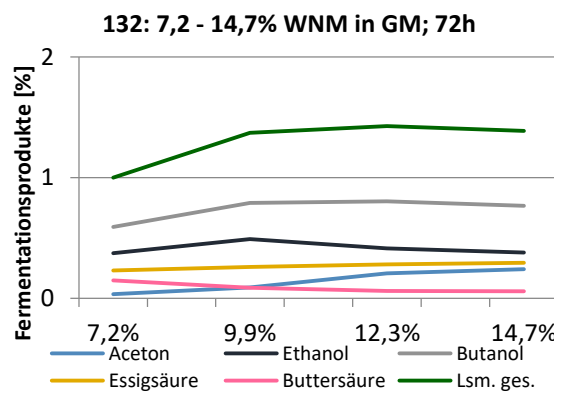
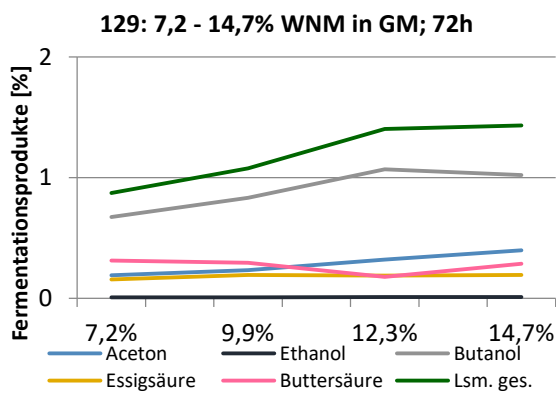
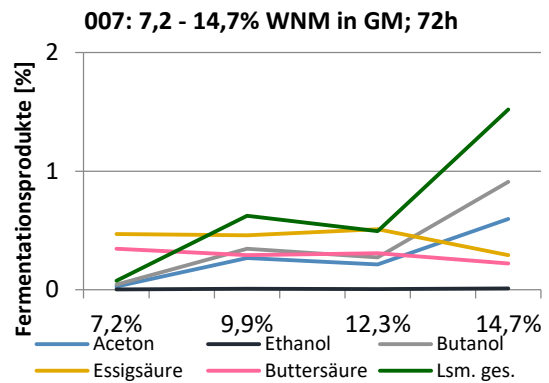
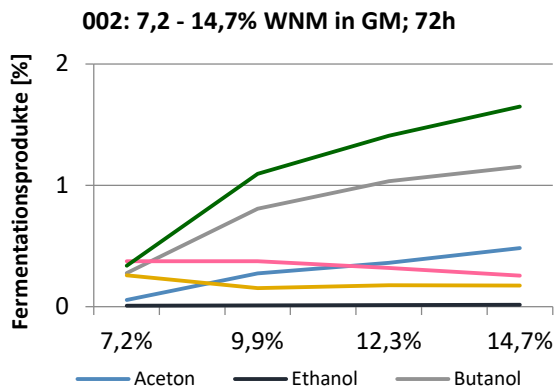
131 auf 1,6-13,5% Weizennachmehl in GM nach 72 h



132 auf 1,6-15,8% Weizennachmehl in GM nach 72 h

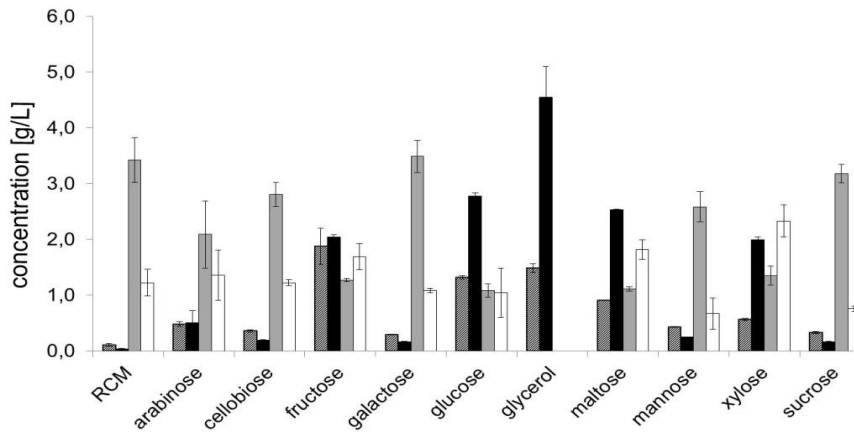


Anhang XX: Fermentationsprodukte (%) für Stamm 2, 7, 129 und 132 in Grundmedium und 6, 7, 41 und 132 in Leitungswasser supplementiert mit 25 mg/L Fe(II)SO₄ auf steigenden Substratkonzentrationen WNM nach 72 Stunden bei 34°C.

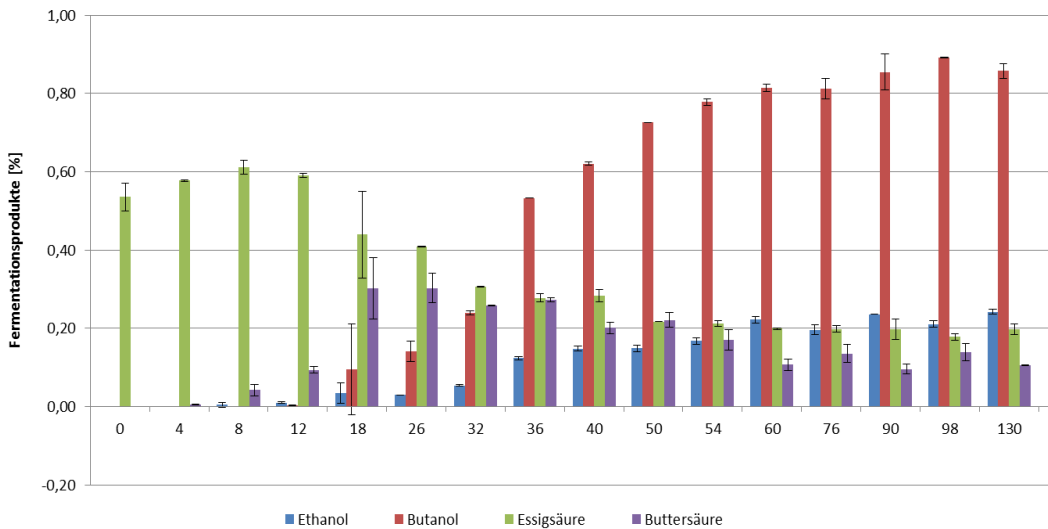


Anhang XXI: Zusammenfassung der Fermentationsprodukte von *C. tetanomorphum* GT6:

***C. tetanomorphum* GT6 auf unterschiedlichen Substraten:** in 50 ml RCM auf jeweils 2,5 % Kohlenhydraten, 7 mg/l FeSO₄ und 90 mM Ammoniumacetat bei 34°C; n=2 ± SD; Ethanol (dunkelgrau), Butanol (schwarz), Essigsäure (mittelgrau), und Buttersäure (weiß) sind angegeben;



***C. tetanomorphum* GT6 auf Glycerin:** in 250 ml RCM auf 3 % Glycerin, 7 mg/l FeSO₄ und 90 mM Ammoniumacetat bei 34°C; n=2±SD

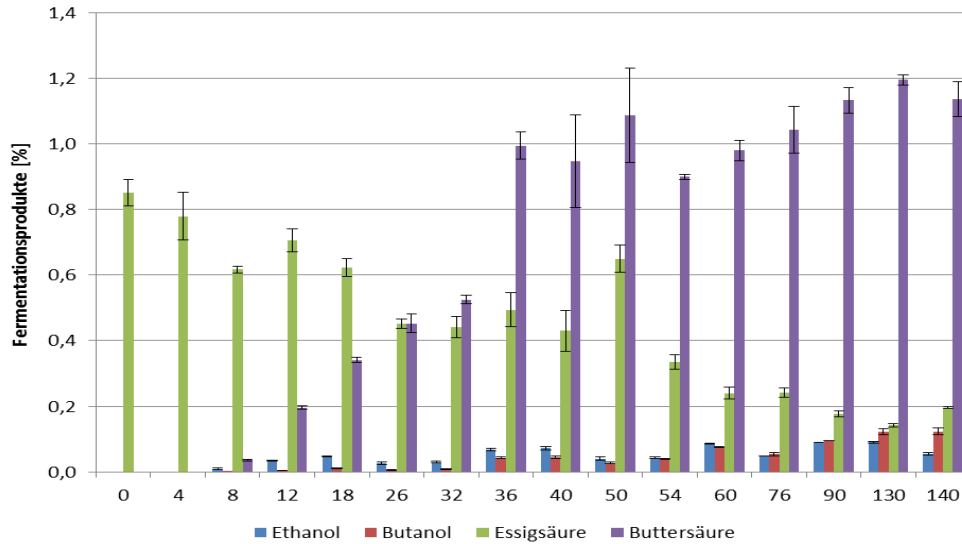


Zeit [h]	0	4	8	12	18	26	32	36	40
Ethanol	0,0000	0,0000	0,0043	0,0099	0,0343	0,0292	0,0537	0,1235	0,1473
Butanol	0,0000	0,0000	0,0000	0,0023	0,0953	0,1413	0,2384	0,5320	0,6200
Essigsäure	0,5354	0,5775	0,6118	0,5906	0,4390	0,4091	0,3062	0,2768	0,2834
Buttersäure	0,0000	0,0049	0,0421	0,0932	0,3019	0,3029	0,2577	0,2723	0,2012
	SD0	SD4	SD8	SD12	SD18	SD 26	SD 32	SD36	SD40
Ethanol	0,0000	0,0000	0,0061	0,0028	0,0260	0,0001	0,0021	0,0041	0,0064
Butanol	0,0000	0,0000	0,0000	0,0010	0,1162	0,0261	0,0056	0,0000	0,0044
Essigsäure	0,0355	0,0021	0,0178	0,0046	0,1103	0,0011	0,0011	0,0105	0,0158
Buttersäure	0,0000	0,0003	0,0151	0,0087	0,0789	0,0371	0,0003	0,0057	0,0148

Zeit [h]	50	54	60	76	90	98	130
Ethanol	0,1483	0,1676	0,2218	0,1957	0,2357	0,2103	0,2417
Butanol	0,7254	0,7785	0,8136	0,8119	0,8549	0,8917	0,8572
Essigsäure	0,2170	0,2119	0,1985	0,1979	0,1977	0,1782	0,1966
Buttersäure	0,2212	0,1705	0,1067	0,1349	0,0953	0,1389	0,1051

	SD50	SD54	SD60	SD76	SD90	SD98	SD130
Ethanol	0,0077	0,0082	0,0086	0,0129	0,0004	0,0085	0,0065
Butanol	0,0007	0,0085	0,0092	0,0256	0,0462	0,0018	0,0180
Essigsäure	0,0006	0,0076	0,0030	0,0084	0,0263	0,0087	0,0139
Buttersäure	0,0181	0,0266	0,0152	0,0229	0,0127	0,0225	0,0005

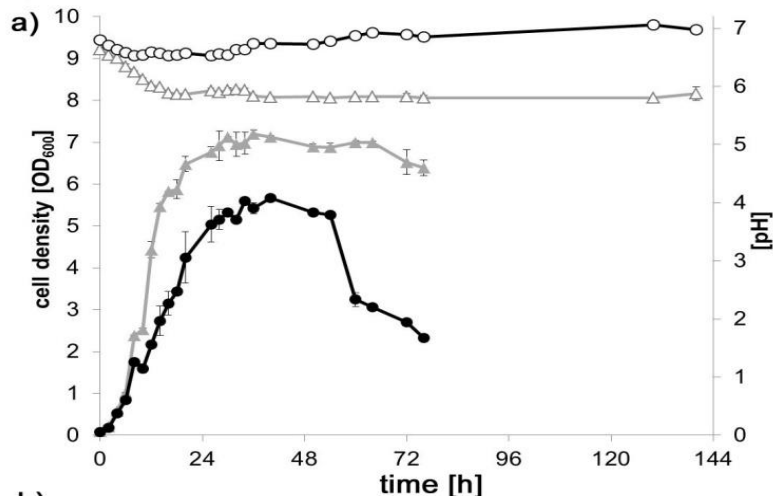
C. tetanomorphum GT6 auf Glucose: in 250 ml RCM auf 3 % Glucose, 7 mg/l FeSO₄ und 90 mM Ammoniumacetat bei 34°C; n=2 ± SD.



	0	4	8	12	18	26	32	36	40
Ethanol	0,00000	0,00000	0,09425	0,34225	0,47525	0,27125	0,30225	0,68975	0,72200
Butanol	0,00000	0,00000	0,00300	0,05150	0,10875	0,06925	0,09225	0,42875	0,44875
Essigsäure	8,50975	7,79250	6,72500	7,05675	6,22600	5,52650	4,41975	4,94225	4,29950
Buttersäure	0,00000	0,00000	0,35975	1,95900	3,40925	4,52950	5,25300	6,94650	7,47125
	SD 0	SD4	SD 8	SD 12	SD18	SD 26	SD 32	SD 36	SD40
Ethanol	0,00000	0,00000	0,00350	0,00124	0,00152	0,00407	0,00258	0,00350	0,00523
Butanol	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00025	0,00138	0,00173	0,00237	0,00400
Essigsäure	0,03956	0,07198	0,01018	0,03490	0,02807	0,01407	0,03228	0,05106	0,06300
Buttersäure	0,00000	0,00000	0,00329	0,00460	0,00711	0,02970	0,01294	0,04117	0,14188

	50	54	60	76	90	130	140
Ethanol	0,04008	0,04288	0,08588	0,04813	0,08993	0,09013	0,05600
Butanol	0,02785	0,03950	0,07485	0,05498	0,09440	0,12268	0,12340
Essigsäure	0,64980	0,33573	0,23995	0,24165	0,17658	0,14195	0,19575
Buttersäure	1,08725	0,89888	0,98015	1,04285	1,13210	1,19448	1,13703
	SD50	SD54	SD60	SD76	SD90	SD130	SD140
Ethanol	0,00513	0,00230	0,00194	0,00004	0,00110	0,00329	0,00410
Butanol	0,00318	0,00163	0,00134	0,00520	0,00035	0,00887	0,01117
Essigsäure	0,04052	0,02174	0,01768	0,01428	0,00958	0,00424	0,00325
Buttersäure	0,14453	0,00774	0,03118	0,07205	0,03804	0,01453	0,05314

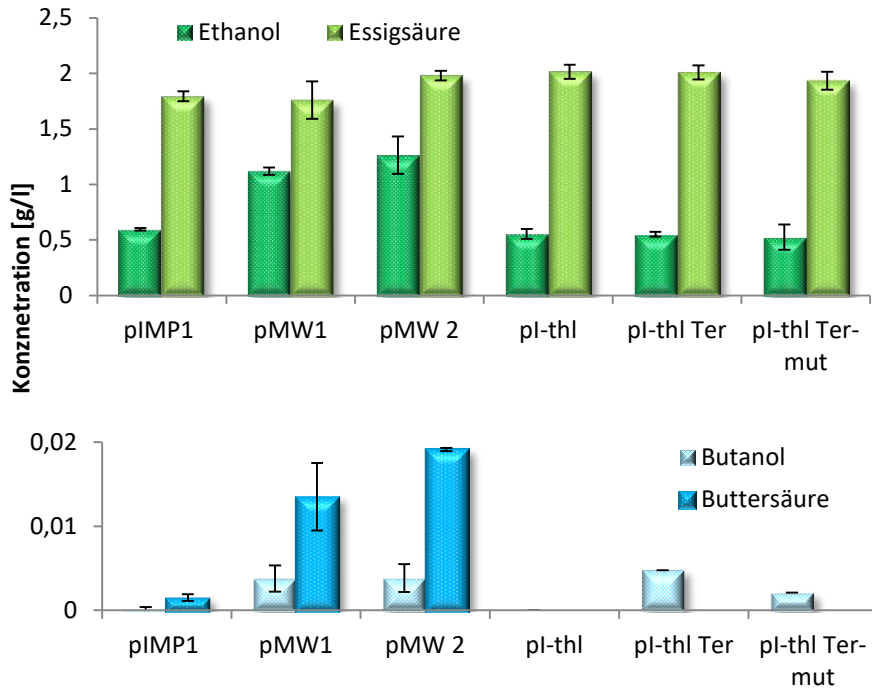
Wachstumskurve und pH-Analyse von *C. tetanomorphum* GT6 auf 3 % Glycerin (schwarz) und 3 % Glucose (grau); n=3 ± SD.



Vergleich der Butanol- und Gesamtalkohol-Produktion von *C. tetanomorphum* GT6 auf unterschiedlichen Substraten (nach 72 h Fermentation, n=2; aufsteigend geordnet nach Gesamtalkohol-Produktion)

Substrat	Gesamt-Alkohol	Butanol
5 % Xylose	0,192	0,151
5 % Glucose + 2xSL + 30mM AS	0,400	0,241
5 % Glucose + 2xSL + 30mM AAc	0,422	0,224
5 % Glucose + 2xSL	0,467	0,269
5 % Glucose	0,548	0,299
5 % Glycerin + 0,5 % Glucose	0,607	0,373
5 % Glycerin + 2xSL + 30mM AS	0,645	0,303
5 % Glycerin	0,665	0,327
5 % Glycerin + 2xSL	0,672	0,292
5 % Glycerin + 2,5 % Xylose	0,722	0,503
5 % Glycerin + 1 % Xylose	0,802	0,618
7,5 % Glycerin + 30mM AAc	0,809	0,607
5 % Glycerin + 30mM NaAc	0,859	0,661
5 % Glycerin + 0,5 % Glu + 30mM AAc	0,868	0,680
7,5 % Glycerin + 0,5 % Glu + 30mM AAc	0,907	0,727
5 % Glycerin + 2xSL + 30mM AAc	0,917	0,54
5 % Glycerin + 30mM AAc	0,919	0,687
7,5 % Glycerin + 1 % Xylose+ 30mM AAc	0,929	0,723
5 % Glycerin + 1 % Xylose + 30mM AAc	0,982	0,756
7,5 % Glycerin + 0,5 % Glu + 30mM AAc + FeSO ₄	0,997	0,688
5 % Glycerin + 0,5 % Glu + 30mM AAc + FeSO ₄	1,056	0,721
7,5 % Glycerin + 30mM AAc + FeSO ₄	1,071	0,690
7,5 % Glycerin + 1 %Xylose + 30mM AAc + FeSO ₄	1,144	0,762
5 % Glycerin + 30mM AAc + FeSO ₄	1,150	0,709
5 % Glycerin + 1 % Xylose + 30mM AAc + FeSO ₄	1,232	0,829

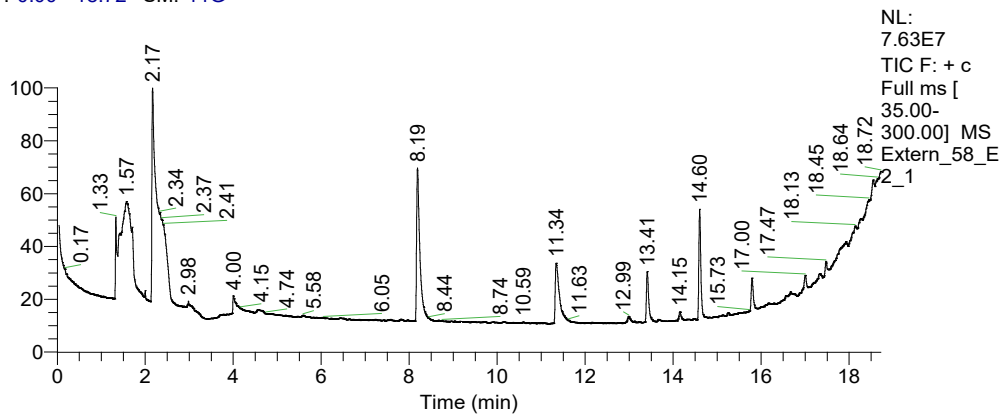
Anhang XXIV: Fermentationsprodukte von *E. coli* Top10 transformiert mit *pIMP1*, *pHYC-BCS-thl*, *pMW1*, *pMW2*, *pIMP1-thl*, *pIMP1-thl-ter*, *pIMP1-thl-ter_{mut}*; anaerob in GS2 mit 1 % Glucose nach 3 Tagen bei 37°C; n=2 ± SD.



Anhang XXV: GC-MS Analyse von a) *C. cellulolyticum* DSM 5812^T-*pHYc-BCS-thl* und b) *C. thermocellum* ATCC 27405^T und c) *C. thermocellum* ATCC 27405^T-*pHYc-BCS-thl*

a) *C. cellulolyticum* DSM 5812^T-*pHYc-BCS-thl*

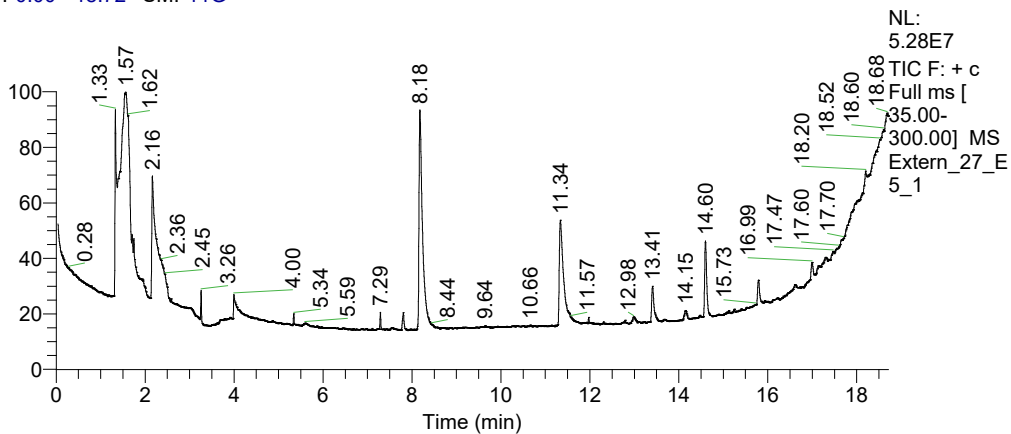
RT: 0.00 - 18.72 SM: 11G



RT	Substanz	Peak Area	Area %
2.16	Ethanol	413473021	33.59
8.19	Dimethylformamid	233080389	18.94
11.34	Essigsäure	108374391	8.80
13.41	Isobutansäure	51108180	4.15
14.60	2-Methylbutansäure oder 2-Methylhexansäure	101010255	8.21
15.79	Buttersäureethylester	34553638	2.81

b) *C. thermocellum* ATCC 27405^T

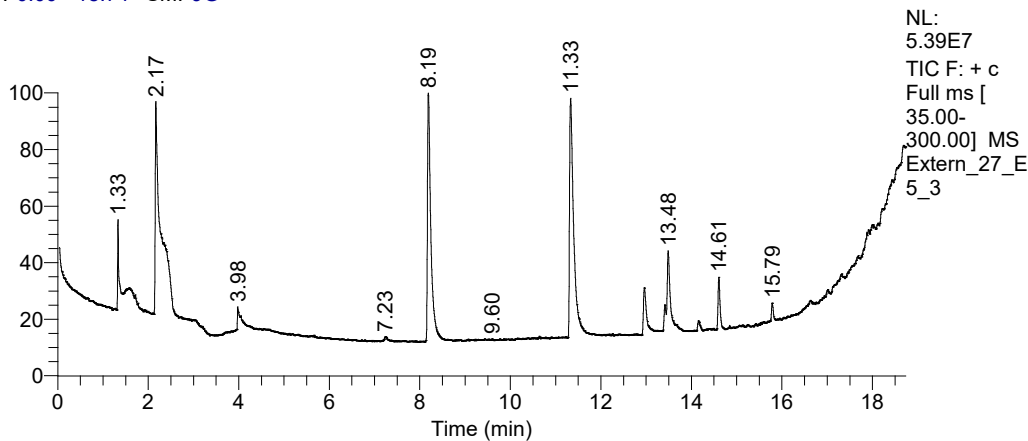
RT: 0.00 - 18.72 SM: 11G



RT	Substanz	Peak Area	Area %
2.16	Ethanol	156992648	23.31
7.29	Kohlenstoffdioxid	3975111	0.59
8.18	Dimethylformamid	235970791	35.03
11.34	Essigsäure	141588012	21.02
13.41	Isobutansäure	27246745	4.05
14.60	2-Methylbutansäure oder 2-Methylhexansäure	47843288	7.10
15.79	Buttersäureethylester	16165131	2.40

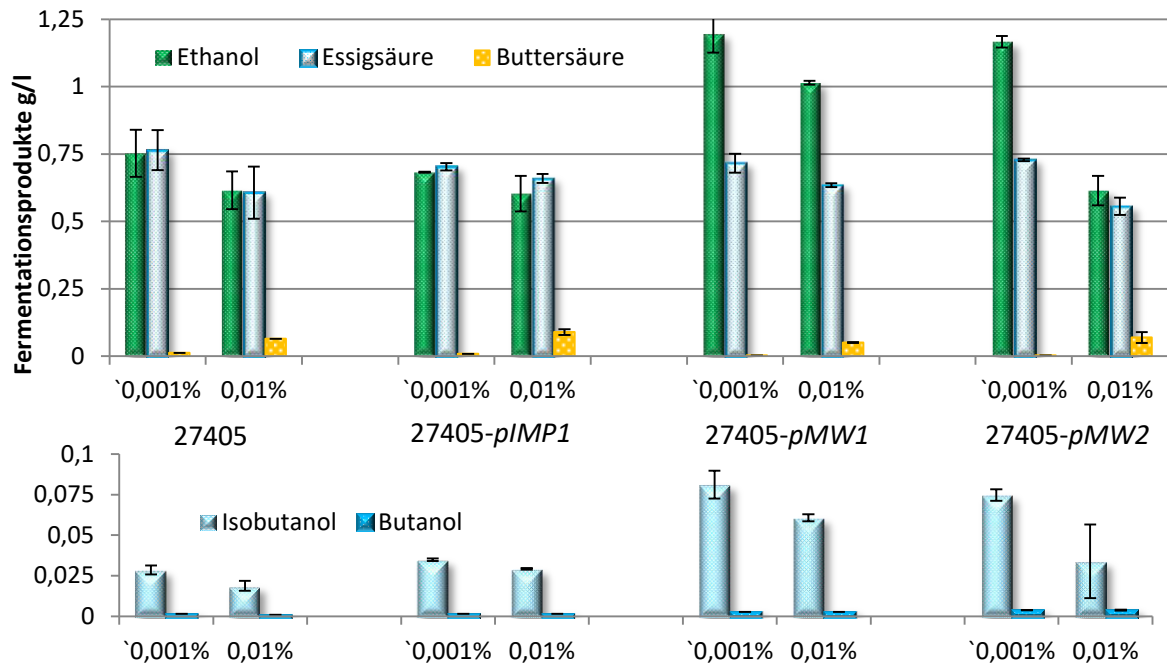
c) *C. thermocellum* ATCC 27405^T-pHYc-BCS-thl

RT: 0.00 - 18.74 SM: 9G



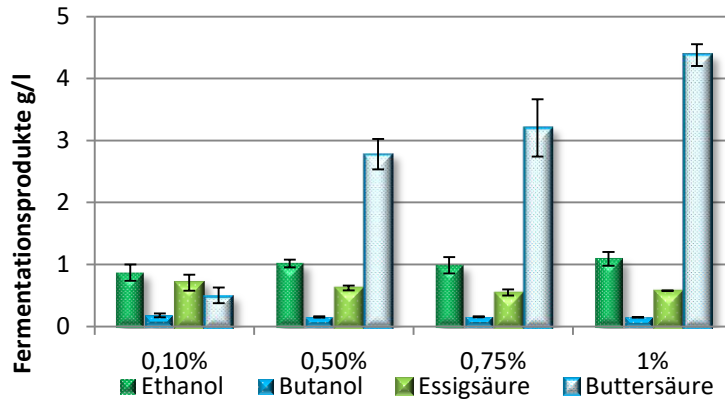
RT	Substanz	Peak Area	Area %
2.16	Ethanol	164845437	22.00
8.18	Dimethylformamid	229207065	30.60
11.33	Essigsäure	241289574	32.21
12.95	2,3-Butandiol	10108123	1.35
13.41	Isobutansäure	6731098	0.90
13.48	2,3-Butanediol	14905340	1.99
14.61	2-Methylbutansäure oder 2-Methylhexansäure	29392172	3.92
15.78	Buttersäureethylester	4949269	0.66

Anhang XXVI: Zugabe von Buttersäure zu Fermentationsansätzen von *C. thermocellum* ATCC 27405^T und Transformanten; *C. thermocellum* ATCC 27405^T, *C. thermocellum* ATCC 27405^T -*pIMP1*, -*pMW1* und -*pMW2* wurden je 1:20 auf GS2 mit 1 % Whatman-Paper und 4 µg/ml Clarithromycin angeimpft und bei 60°C 16 h inkubiert, anschließend wurden 0 %, 0,00025 %, 0,001 %, 0,01 % und 0,05 % Buttersäure zugeben und bei 42°C inkubiert; n=2 ± SD.

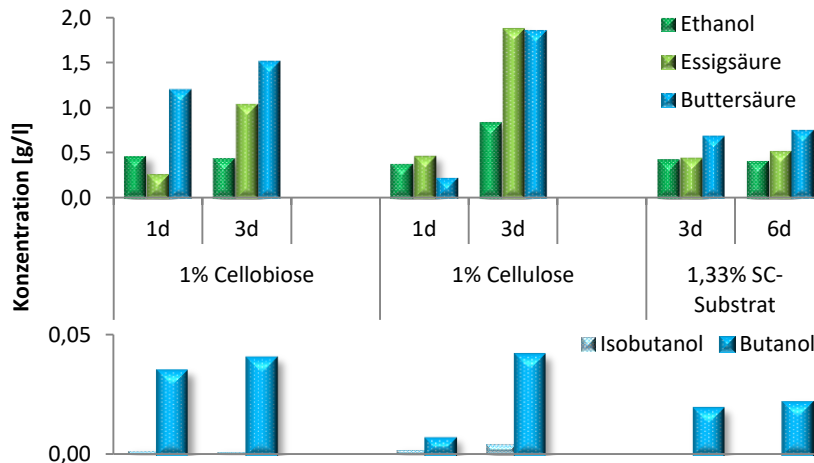


g/l	27405		pIMP1		pMW1		pMW2	
	0,001 %	0,01 %	0,001 %	0,01 %	0,001 %	0,01 %	0,001 %	0,01 %
Ethanol	0,7527	0,6153	0,6826	0,6029	1,1951	1,0146	1,1664	0,6142
Isobutanol	0,0286	0,0188	0,0349	0,0293	0,0811	0,0607	0,0747	0,0339
Butanol	0,0016	0,0009	0,0016	0,0016	0,0027	0,0028	0,0038	0,0038
Essigsäure	0,7642	0,6067	0,7027	0,6594	0,7158	0,6344	0,7283	0,5559
Buttersäure	0,0117	0,0637	0,0082	0,0893	0,0023	0,0505	0,0022	0,0688
	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd
	0,087	0,07	0,002	0,0659	0,0687	0,0071	0,0214	0,05469
	0,0027	0,003	0,0008	0,0005	0,0086	0,0021	0,0036	0,0226
	0	0	0	0,0001	0,0002	0,0001	0,0007	0,0024
	0,074	0,097	0,0142	0,0162	0,0347	0,0073	0,0051	0,03176
	0	0	0,0003	0,011	0,0002	0,001	0,0002	0,0203

Anhang XXVII: Zugabe von 0,1 – 1,0 % Buttersäure zu *C. thermocellum* 27405 WT bei gleichzeitigem Ausgleichen des pH-Werts auf pH 7,0; *C. thermocellum* ATCC 27405^T wurde 1:20 auf GS2 mit 1 % Whatman-Paper angeimpft und bei 60°C 16 h inkubiert, anschließend wurden 0,1 %, 0,5 %, 0,75 % und 1 % Buttersäure zugeben, der pH auf 7,0 eingestellt und die Ansätze bei 60°C inkubiert; n=2 ± SD.



Anhang XXVIII: Co-Kultur von *C. thermocellum* ATCC 27405^T mit *C. thermobutyricum*; in GS2 mit 1 % Cellobiose, 1 % Cellulose (Whatman-Paper) nach 1 und 3 Tagen oder 1,33 % SC-Substrat nach 3 und 6 Tagen bei 60°C



X Danksagung

Diese Arbeit wurde am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Technischen Universität München unter Leitung von Prof. Dr. Wolfgang Liebl angefertigt und im Rahmen des von CLARIANT (ehemals Süd-Chemie-AG) koordinierten BMBF Verbundprojekts BioFUEls 2021, Innovative Biokraftstoffe aus der Bioraffinerie der Zukunft“ finanziell unterstützt.

Sehr geehrter Prof. Liebl, besten Dank für Ihre stetige Unterstützung, insbesondere auch während der Projekttreffen, die interessierte Begleitung der Arbeit und dafür, dass Sie mir und allen anderen Doktoranden immer den Rücken freigehalten und uns die Möglichkeit gegeben haben, wissenschaftlich arbeiten lernen zu können. Nicht zuletzt möchte ich Ihnen auch für die Durchsicht des Manuskripts und die Vorschläge zur Korrektur danken und für Ihre Geduld. Außerdem möchte ich Ihnen und Prof. Ehrmann ganz herzlich für Ihren Einsatz als Prüfer und Prof. Langosch als Vorsitzenden bei der Verteidigung meiner Dissertation danken.

Sehr geehrter Herr Dr. Ketting und Herr Dr. Schirmmacher, vielen Dank Ihnen beiden für die immer überaus interessanten Projekttreffen, im großen wie im kleinen Kreis, sowie die ausgezeichnete und geduldige Koordination des Verbundprojekts. Außerdem bin ich Ihnen ausgesprochen dankbar dafür, dass ich - wenn auch nicht gerade freiwillig - ausführliche Quartalsberichte geschrieben hab. Wie Sie es bereits damals prophezeit hatten, war ich im Nachhinein sehr froh darüber und hab Ihnen im Geiste mehr als nur einmal gedankt.

Lieber Wolfgang, vielen lieben Dank für die hervorragende Betreuung und Deine Hilfe und dafür, dass Du immer ein offenes Ohr hattest, mich in allen Belangen unterstützt hast und auch bei experimentellen Fragen immer wieder eine hilfreiche alte Arbeit oder eine passende Publikation hervorzaubern konntest. Außerdem möchte ich Dir für das Korrekturlesen des Manuskripts und Deine Erinnerungen danken und für Deine Ermunterung, wenn es mal schwieriger war.

Lieber Vladimir, ganz herzlichen Dank, dass Du immer für mich da warst, ob als verlässlicher Diskussionspartner oder zur praktischen und moralischen Unterstützung. Auch dafür, dass Du aus den Untiefen des Labors immer genau das richtige Gerät zu Tage fördern konntest und es auch umgehend und nonchalant zum Laufen bringen konntest... wie auch Computer, den GC, das Anaerobenzelt, Zentrifugen oder alles andere, was sich sonst gerne mal verweigert. Danke auch für den Spaß, die netten Unterhaltungen und russischen Anekdoten und für die tolle Arbeitsatmosphäre, die die manchmal üble Luft im Labor immer gut übertünchen konnte.

Den stinkenden Clostridien sei an dieser Stelle für ihre strikt anaerobe Lebensweise gedankt.

Vielen Dank auch den anderen Arbeitsgruppenleitern, Postdocs, Doktoranden, Technischen Assistentinnen und Studenten am Lehrstuhl für Mikrobiologie für die schöne Zeit, eure Hilfe und das angenehme Arbeitsklima.

Meinen Arbeitsgruppenkollegen Bene, Claudia, Daniela, Jan, Sabine und Tanja danke ich ganz herzlich für die tolle Zeit, die gute Zusammenarbeit, den Spaß bei der Arbeit, die Grillaktionen und das sich Abwechseln beim Probennehmen, Überimpfen oder Entgasen zu Unzeiten.

Johannes, Katharina, Olga, Quirin, Sabrina, Thomas und Trang: auch euch einen herzlichen Dank für eure konstruktive und begeisterte Mitarbeit im Rahmen eurer Forschungsarbeiten. Es hat mir sehr große Freude bereitet, euch zu betreuen und zu sehen, wie ihr euch immer selbstständiger mit euren Themen auseinandergesetzt habt. Insbesondere meine liebe Trang ist mir ans Herz gewachsen und es freut mich sehr, dass wir weiterhin in Kontakt stehen.

Ganz herzlichen danken möchte ich auch Bernhard und Christoph, die mich mit ihren beständigen Nachfragen zwar sehr genervt aber gleichzeitig doch motiviert haben. Danke auch an den Rest meiner Familie, meine Erlanger Mädels und meine Freunde, die mich während der Doktorarbeit und darüber hinaus immer unterstützt haben und die ein oder andere Zeit mit wenig bis keinem Sozialleben ohne großes Murren oder Nachfragen hingenommen haben.

Besonders möchte ich mich bei meiner Mama, meiner Schwester und ihrem Mann und meiner Tante bedanken; nur dank eurer Hilfe bei der Kinderbespassung war es möglich, die Arbeit doch noch zu Ende zu bringen.

Und vor allem möchte ich mich bei meinem Mann und Linus und Lotti bedanken, die stets auf (und an) meiner Seite sind und dafür sorgen, dass neben der Arbeit und allem anderen, das gemacht werden muss, auch der Spaß nicht zu kurz kommt. Ohne euch wäre die Zeit bis zur Abgabe zwar deutlich kürzer gewesen, aber bei weitem nicht so freudvoll, unterhaltsam und lehrreich - wenn auch auf ganz anderen Gebieten...

XI Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die bei der TUM School of Life Sciences der Technischen Universität München zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel

„Verwertung von Weizenstroh und Mühlennebenprodukten zur Produktion von Butanol durch solventogene und cellulolytische Clostridien“

am Lehrstuhl für Mikrobiologie, Emil-Ramann- Str. 4, Freising unter der Anleitung und Betreuung von Prof. Dr. Wolfgang Liebl ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Ab. 6 und 7 Satz 2 angebotenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen und Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht, oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.

Ich habe die Dissertation in dieser oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt.

Ich habe den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben und bin nicht in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert.

Die öffentlich zugängliche Promotionsordnung der TUM ist mir bekannt, insbesondere habe ich die Bedeutung von § 28 (Nichtigkeit der Promotion) und § 29 (Entzug des Doktorgrades) zur Kenntnis genommen.

Ich bin mir der Konsequenzen einer falschen Eidesstattlichen Erklärung bewusst.

Mit der Aufnahme meiner personenbezogenen Daten in die Alumni-Datei der TUM bin ich einverstanden.