

**Etablierung der Produktion von 2,3-Butandiol aus CO₂ mit
Cupriavidus necator: Untersuchung von
Wachstumsbedingungen, Extraktionstechniken und
Biofilmbildung**

Vom Promotionsausschuss der
Technischen Universität Hamburg

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation (Monografie)

von

Janek Weiler

aus

Müllheim im Markgräflerland

2025

Gutachter: Prof. Dr. Johannes Gescher
Prof. Dr. Andreas Liese

Vorsitzende des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Anna-Lena Heins

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Juni 2024

DOI: <https://doi.org/10.15480/882.15242>

Handle: <https://hdl.handle.net/11420/55813>

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4930-5764>

Creative Commons Lizenzvertrag

Dieser Text steht, soweit nicht anders gekennzeichnet, unter der Creative-Commons-Lizenz Namensnennung 4.0 (CC BY 4.0). Das bedeutet, dass er vervielfältigt, verbreitet und öffentlich zugänglich gemacht werden darf, auch kommerziell, sofern dabei stets der Urheber, die Quelle des Textes und o. g. Lizenz genannt werden. Die genaue Formulierung der Lizenz kann unter <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.de> aufgerufen werden.

Zusammenfassung

Die Herstellung von Plattformchemikalien aus erneuerbaren Energiequellen ist ein entscheidender Schritt auf dem Weg zu einer postfossilen Wirtschaft. Diese Arbeit berichtet über die Produktion von Acetoin und 2,3-Butandiol, zwei wichtigen Plattformchemikalien, aus CO₂ als Kohlenstoffquelle, H₂ als Elektronendonator und O₂ als Elektronenakzeptor.

Cupriavidus necator ist dafür bekannt, unter diesen Bedingungen zu wachsen und hohe Zelldichten zu erreichen. In einer früheren Studie wurde der Stamm für die Produktion von Acetoin mit hoher Kohlenstoffeffizienz entwickelt. Acetoin kann als Vorläufer für die Synthese von 2,3-Butandiol durch Integration einer Butandioldehydrogenase dienen. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Plasmide und Butandioldehydrogenasen hinsichtlich ihrer Effizienz bei der CO₂-basierten Produktion von 2,3-Butandiol untersucht. Der entwickelte Stamm zeichnet sich durch eine Raum-Zeit-Ausbeute von 39,45 mg l⁻¹ h⁻¹, eine Kohlenstoffausbeute von 81,6 % und eine H₂-Effizienz von 33,46 % unter autotrophen Bedingungen aus.

Darüber hinaus wurden weitere Parameter einer vollumfänglichen mikrobiellen Produktion von 2,3-Butandiol untersucht. Hierbei zeigte sich, dass eine Aufreinigung des Produkts durch Oleylalkohol und Rizinusöl während einer laufenden Fermentation möglich ist. In Wachstumsversuchen mit dem Produkt zeigte 2,3-Butandiol bereits in Anwesenheit von Kleinstmengen des Produkts hemmende Einflüsse auf *C. necator*, die jedoch erst ab einer Konzentration von 500 mM toxische Wirkungen zeigten. In einer Langzeitproduktion wies der Organismus stabile Produktivität über 2 Monate hinweg auf. In diesem Zusammenhang wurden genetische Einflüsse untersucht, die die Produktion in Zukunft weiter stabilisieren könnten. Hierbei wurde offensichtlich, dass eine Integration der Produktionsgene in das Genom für eine möglichst stabile Produktion nötig ist. Zusätzlich wurden erste Schritte in der Identifizierung essentieller Gene für die Biofilmbildung von *C. necator* unternommen, um in Zukunft die Entwicklung von Biofilmen in Anwendungen verstehen und beeinflussen zu können.

Danksagung

Mein erster und größter Dank gilt meinem Betreuer Johannes Gescher. Danke, dass ich so lange Teil deiner Arbeitsgruppe und spannender sowie neuer Projekte sein durfte. Danke auch dafür, dass du mich über einen so langen Zeitraum vom Studenten zum Wissenschaftler begleitet und unterstützt hast und immer Vertrauen in mich hattest. Durch deine Art mit Dingen umzugehen und deiner fachlichen Kompetenz bist du über die Jahre eines meiner Vorbilder und mein Mentor geworden und warst einer der Gründe dafür, warum ich mich entschieden habe im Bereich der Mikrobiologie zu promovieren. Ich habe dein Bemühen, bei allen Projekten und Arbeiten informiert zu sein, und besonders unsere persönlichen Treffen und Gespräche immer sehr geschätzt und hoffe, dass ich in Zukunft weiterhin so viel Glück mit meinen Mentoren und Vorgesetzten habe. Danke für alles!

Außerdem möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe danken. Ihr seid die Besten! Eine großartige Mischung aus familiär und professionell mit der man was erreicht, aber mit der man auch gleichzeitig viel Spaß haben kann und die eine super Arbeitsatmosphäre ermöglicht. Auch weil wir diesen verrückten Laborumzug gemeinsam gemeistert haben und uns danach irgendwie alle noch mehr leiden konnten. Gerade dieser Zusammenhalt hat mich ursprünglich angezogen und ich bin froh, dass er sich über die turbulenten Jahre halten konnte. Da das natürlich nicht von ungefähr kommt, möchte ich auch allen Ehemaligen, mit denen ich einen Teil meiner Zeit verbracht habe und die die Basis für alles gelegt haben, danken. Apropos: Da ich sehr lange Teil der Arbeitsgruppe war, bin ich immer froh gewesen, dass ihr, Edi, Jonas, Laura und Miri, ebenso lange dabei wart und ich mich nicht total wie vom alten Eisen gefühlt habe – also auch einen großen Dank an die Gebliebenen mit denen mich mittlerweile eine gute Freundschaft verbindet. Besonders du, Edi, bist dabei von einer Kommilitonin über Teilzeit-Betreuerin zu einer guten Freundin geworden. Wir haben alles zusammen gut überstanden, uns gegenseitig unterstützt und abends zusammen geflucht oder waren spazieren – danke dir dafür! Und gemeinsam mit dir, Jonas, war auch Giglio zu dritt zu meistern und später dann die Arbeit, genauso wie viele gemeinsame Abende seither. Ich bin so froh, dass ich dir dabei zusehen konnte, wie du neben der Arbeit geheiratet hast, Familienvater geworden bist und ihr euch schlussendlich hier in Hamburg verwurzelt habt.

Danksagung

Ebenso bin ich dankbar für die ganzen Leute, die seither dazu gekommen sind. Ganz besonders natürlich für meine Projekt- und Promotionspartnerin Melanie. Ich bin so froh, dass wir das alles zusammen erlebt und erarbeitet haben und wir zusammen daran gewachsen sind. Vom ersten Orientieren in der wissenschaftlichen Welt bis hin zur Durchführung von Projekten und allem was dazu gehört, Texte schreiben, Poster designen, Daten auswerten und Studenten betreuen. Auch wenn wir uns manchmal etwas auf den Zeiger gegangen sind, waren wir ein super Team und ich bin so stolz darauf, wie wir das alles geschafft haben. Danke, dass du mich immer ausgehalten, unterstützt und in der Bahn gehalten hast. Danke, fürs Korrekturlesen und ehrliche Meinung abgeben. Und danke dafür, dass du mir eine so gute Freundin geworden bist.

Großer Dank gilt natürlich auch dem Rest unseres Büros. Danke, Lukas, dass du immer ein Ohr hattest, wenn ich eine zweite Hirnzelle benötigt hab, dass wir genauso viele Geschichten abends wie tagsüber generiert und zu erzählen haben und dass wir immer noch halbwegs regelmäßig was machen (wer hätte das von uns Wirtköpfen erwartet). Danke, Kerstin, für unsere Zeit in zwei (!) Bürokonstellationen. Du bist so ein liebevoller und rücksichtsvoller Mensch und das habe ich immer an dir wertgeschätzt. Danke fürs unterstützen bei bioinformatischen Auswertungen, wenn ich mal eine zweite Meinung gebraucht habe, und vor allem, wenn man gegen Knoll & Kneuer alleine nicht mehr ankam. Nikolai, du bist zwar spät zu Büro MJLK gestoßen, warst aber sofort ein Teil davon. Du warst direkt bei den Experimenten dabei und wurdest zu guter Letzt mein Sparringspartner bei Abschlussberichten, Paper schreiben und dem ganzen Drumherum um die Dissertation. Danke für die gute Zeit und all die Hilfe!

Bei den Leuten die dazu gekommen sind dürfen natürlich auch Carmen, Leonie, René und Vivi nicht fehlen. Danke euch für all die Hilfe, wenn ich was nicht wusste, was gebraucht hab oder einfach eine Umarmung nötig hatte. Ihr wart alle eine super Ergänzung zu unserem Team und ich bin froh, dass ich euch kennen lernen und mit euch viel Zeit verbringen durfte. Danke Carmen, dass du gemeinsam mit Miri weiter an meinen Stämmen arbeitest und das nicht einfach wegfällt. Besonders weil du (genau wie ich) einen kleinen Hang zur Perfektion und zum Verrücktsein hast - also weiß ich, dass es gut wird). Danke auch an dich, Leonie, für so viele Tipps und Hilfe, wenn ich plötzlich etwas Neues lernen musste und keine Ahnung hatte was eigentlich los war. Die von dir investierte Zeit war großartig und nicht selbstverständlich. Genauso dankbar bin ich für die ehrlichen Gespräche, wenn wir nachts gemeinsam den Heimweg angetreten haben. René, danke für all die gemeinsamen Zeiten im Labor und die

Danksagung

Zeiten außerhalb, dass du Vorlaut sein kannst aber wir auch ganz ruhige persönliche oder professionelle Gespräche führen können. Ich bin froh, dass unsere Freundschaft sich so entwickelt hat und wir auf jeden Fall noch viele Abenteuer erleben werden. Gemeinsam mit Vivi und Edi hat sich eine tolle Gruppe entwickelt und ich bin froh, Teil davon zu sein. Vivi, danke dass du so fürsorglich bist und für deine liebevolle und akzeptierende Art. Dass du immer als Erstes gefragt hast, wie es mir geht, oft nach mir gesehen hast und mich immer noch oft einlädst, um mit euch was zu machen.

Ganz besonders möchte ich auch Sigi und Petra danken, die uns in Hamburg so herzlich empfangen haben und immer alle unterstützen. Danke euch für die ganze Hilfe – ohne euch wären wir alle schon lange untergegangen!

Ich möchte ebenfalls all den armen Seelen danken, bei denen ich das Privileg hatte, sie zu betreuen. Danke, dass ihr mich ausgehalten und mir sogar meistens zugehört habt. Ihr wart großartig - ich hatte viel Spaß mit jedem Einzelnen und ich hoffe, ich konnte euch etwas von meiner Begeisterung für die Wissenschaft mitgeben.

Danke an all meine Freunde, die ich sträflich vernachlässigt habe je weiter das Studium voranschritt (was schlussendlich in der Promotion seinen Höhepunkt hatte). Es bedeutet mir viel, dass ihr immer noch da seid und euch für mich freut! Ganz besonderer Dank geht an Maxi, der mich oft abends zu sich eingeladen und dann gekocht hat, wenn ich wieder mal zu nichts kam. Du warst oft ein Retter vor viel zu späten, kalten Abendessen.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie danken. Ihr habt immer an mich geglaubt und habt mir das alles ermöglicht, egal, wie selten ich mich gemeldet habe oder zu Besuch gekommen bin. Auch musstet ihr meine Launen aushalten, wenn ich mal wieder eine stressige Phase hatte und wir uns gesehen haben – ich bin aus tiefstem Herzen dankbar.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	i
Danksagung	ii
Inhaltsverzeichnis	v
Abbildungsverzeichnis	viii
Tabellenverzeichnis	x
Abkürzungsverzeichnis	xi
1 Einleitung	1
1.1 Hintergrund	1
1.2 <i>Cupriavidus necator</i> H16	2
1.2.1 Taxonomie von <i>C. necator</i> H16	3
1.2.2 Lebensweisen und Eigenschaften	4
1.3 Plattformchemikalien	7
1.3.1 Acetoin	7
1.3.2 2,3-Butandiol	10
1.4 Produktive Biofilme	13
1.4.1 Definition von Biofilmen	15
1.4.2 Biofilmbildung von Prokaryoten	16
1.5 Zielsetzung	19
2 Material und Methoden	20
2.1 Stämme und Kultivierungen	20
2.2 Genetische Anpassung der Organismen	24
2.2.1 Vorarbeiten durch Windhorst und Gescher	24
2.2.2 Allgemeines	25
2.2.3 Herstellung der Produktionsstämme	25
2.2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)	27
2.2.5 Isothermale <i>in vitro</i> Ligation	29
2.2.6 Transformation	30
2.2.7 Konjugation	31
2.2.8 Gelelektrophorese	31
2.2.9 Restriktion	32
2.2.10 Kryokonservierung	33
2.3 Versuchsaufbau und -durchführungen	33

Inhaltsverzeichnis

2.3.1	Wachstumsexperimente mit <i>C. necator</i>	33
2.3.2	Produktionstests von Plattformchemikalien	34
2.3.3	Mutations- und Biofilmuntersuchungen an <i>C. necator</i>	34
2.3.4	Aufreinigung von 2,3-Butandiol	42
2.4	Analytische Auswertungen	44
2.4.1	Sequenzierungstechnologien	44
2.4.2	Analyse von Substraten, Produkten und Biofilmen	45
2.4.3	Bestimmung von Biomasse und Wirkungsgraden	48
3	Ergebnisse	53
3.1	Langzeitproduktion von Acetoin	53
3.1.1	Medienoptimierung und Zumischung von Tetracyclin	53
3.1.2	Langzeitproduktion von Acetoin durch den Ausgangsstamm	56
3.1.3	Genetische Einflüsse auf die Langzeitproduktion	58
3.2	Wachstumsverhalten von <i>C. necator</i> H16	60
3.3	Produktionsstämme für Plattformchemikalien	63
3.3.1	Heterotrophe Vergleichsstudien	63
3.3.2	Autotrophe Vergleichsstudien	66
3.3.3	2,3-Butandiol-Stereoisomerbildung	71
3.4	Aufreinigung von 2,3-Butandiol	75
3.4.1	Validierung der Produktextraktion	76
3.4.2	Wachstumsversuche mit Extraktionsmethoden	78
3.5	Biofilmbildung von <i>C. necator</i>	81
3.5.1	Verschiedene Stadien der Biofilmentwicklung	81
3.5.2	Änderung der Expression während der Biofilmentwicklung	84
4	Diskussion	92
4.1	Langzeitproduktion von Acetoin	92
4.1.1	Vorbereitungen und Durchführung	92
4.1.2	Genetische Einflüsse auf die Langzeitproduktion	93
4.2	Einflüsse auf das Wachstumsverhalten	97
4.3	Produktion von 2,3-Butandiol	98
4.3.1	Vergleich der Produktionsstämme	98
4.3.2	Vergleich zu anderen mikrobiellen Produzenten	102
4.3.3	2,3-Butandiolproduktion der Acetoinstämme	105
4.3.4	Stereoisomerbildung in den autotrophen Versuchen	106
4.4	Extraktion von 2,3-Butandiol	109

Inhaltsverzeichnis

4.4.1	Validierung der Extraktionsmethoden.....	109
4.4.2	Einfluss auf das Wachstum von <i>C. necator</i>	110
4.5	Biofilmbildung in <i>C. necator</i> H16.....	113
4.5.1	Genregulation während der Biofilmbildung.....	114
4.5.2	Transposon-induzierte Mutationen.....	118
5	Zusammenfassung und Ausblick	120
6	Literaturverzeichnis.....	124
7	Anhang	143

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: TEM-Aufnahmen von verschiedenen *C. necator* H16 Zellen 3

Abbildung 2: Schematische Darstellung des *C. necator* H16-Stoffwechsels. 5

Abbildung 3: Theoretisierte Beteiligung von Carboanhydrasen am CO₂-Transport in *C. necator* H16. 6

Abbildung 4: Darstellung des Ablaufs der mikrobiellen Acetoinherstellung am Beispiel von *C. necator*. 9

Abbildung 5: Darstellung des Ablaufs der mikrobiellen 2,3-Butandiolherstellung am Beispiel von *C. necator*. 12

Abbildung 6: Darstellung des aktualisierten Diagramms der Biofilm-Bildung. 17

Abbildung 7: Schematischer Elektronenfluss der Produktionsstämme unter autotrophem Wachstum. 24

Abbildung 8: Beispielhafte Darstellung eines in dieser Arbeit konstruierten pBBR1-Plasmids 26

Abbildung 9: Gussform aus Messing zur Herstellung von PDMS-Kultivierungsfließzellen 35

Abbildung 10: Schematischer Aufbau des Biofilmkultivierungssystems 36

Abbildung 11: Abbildung des pBAMD1-2 Plasmids..... 39

Abbildung 12: Schema der angewandten Sequenzier- und Anreicherungs-methode..... 41

Abbildung 13: Für Langzeitexperimente mit *C. necator* wurde die Medienoptimierung von MM81 mit verschiedenen Konzentrationen an Eisenammoniumcitrat über 48 h durchgeführt 54

Abbildung 14: Einfluss von Licht (L) und Dunkelheit (D) sowie von Wasser (ddH₂O) und Medium (MM 81) auf die Tetracyclinkonzentration bei RT. Es zeigte sich ein eindeutiger Einfluss des Minimalmediums auf die Konzentration von Tetracyclin über den Zeitraum eines Tages, während Licht einen nicht messbaren Einfluss zeigte. 55

Abbildung 15: Versuche zur Mischung von Medium und Antibiotikum im Kultivierungskanal 56

Abbildung 16: Langzeitexperiment zur Acetoinproduktion durch *C. necator* #1226. 57

Abbildung 17: Anteil der DNA-Sequenzen des Plasmids..... 60

Abbildung 18: Wachstumsexperimente 62

Abbildung 19: Vergleich von Produktionsplasmiden (oberer Teil) und Varianten von *budC* 64

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 20: Die Kohlenstoffeffizienzen der heterotrophen Vergleiche	65
Abbildung 21: Vergleich der Produktionsplasmide (obere Reihe) und der <i>budC</i> -Varianten	68
Abbildung 22: Exemplarische Darstellung der katalysierten Rückreaktion von 2,3-Butandiol zu Acetoin.....	69
Abbildung 23: Kohlenstoffausbeuten aus Produktionstests unter autotrophen Bedingungen	70
Abbildung 24: Stereoisomerzusammensetzung des produzierten 2,3-Butandiols	71
Abbildung 25: Stereoisomerzusammensetzung des produzierten 2,3-Butandiols der autotrophen Produktionsexperimente.....	72
Abbildung 26: Im Verlauf der autotrophen Experimente gebildetes 2,3-Butandiol der Produktionsstämme und die Rückreaktion zu Acetoin	73
Abbildung 27: Stereoisomerzusammensetzung des in den autotrophen Versuchen produzierten 2,3-Butandiols	74
Abbildung 28: HPLC-Chromatogramme heterotropher Produktionen nach 400 bzw. 600 Stunden.....	75
Abbildung 29: Versuche zur Extraktion von 2,3-Butandiol.....	77
Abbildung 30: Vergleichsexperiment der Wachstumsversuche mit Extraktionsmitteln	79
Abbildung 31: Gemesse OD ₆₀₀ der Wachstumsexperimente mit <i>C. necator</i> in Anwesenheit von Extraktionsmitteln	80
Abbildung 32: OCT-Aufnahmen der Biofilmentwicklung eines <i>C. necator</i> WT-Stamms...	83
Abbildung 33: Anteil der veränderten Gentranskription am gesamten Genom bei der Biofilmbildung	85
Abbildung 34: Verteilung einer ersten Testsequenzierung der Tn5-Transposonbibliothek .	91
Abbildung 35: Stereoisomerbildung von 2,3-Butandiol durch <i>K. pneumoniae</i> und <i>P. polymyxa</i>	107
Abbildung 36: Stereoisomerbildung von 2,3-Butandiol durch die Produktionsstämme dieser Arbeit.....	108

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Für diese Arbeit verwendete Stämme. Die getragenen Plasmide können in Tabelle 2 eingesehen werden.	21
Tabelle 2: Plasmide und für ihre Linearisierung verwendete Restriktionsenzyme.	22
Tabelle 3: Zusammensetzung des LB-Mediums (Lennox).	23
Tabelle 4: Zusammensetzung des Minimalmedium Nummer 81.	23
Tabelle 5: Zyklisches Programm einer Polymerasekettenreaktion.	27
Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Primer.	28
Tabelle 7: Zusammensetzung des Gibsonansatzes.	29
Tabelle 8: Zusammensetzung des 5x isothermalen Reaktionspuffers.	29
Tabelle 9: Zusammensetzung des Lagerpuffers der T5-Exonuklease.	30
Tabelle 10: Zusammensetzung des TAE-Puffers.	32
Tabelle 11: Zusammensetzung des 6x Ladepuffers.	32
Tabelle 12: Restriktionsansatz für das Linearisieren von Plasmiden.	32
Tabelle 13: Zusammensetzung der Testlösung nach Voges und Proskauer.	48
Tabelle 14: Verteilung der über die Dauer des Langzeitexperiments entwickelten Mutationen	58
Tabelle 15: Über die Dauer des Langzeitexperiments entwickelte Mutationen in kodierenden Regionen.	59
Tabelle 16: Maximale Produktivität der verschiedenen Stämme.	66
Tabelle 17: Berechnete Raum-Zeit-Ausbeuten der Stämme bei autotropher Produktion.	70
Tabelle 18: Optische Messungen bei 600 nm von MM 81 – Extraktionsmittelgemischen. ...	78
Tabelle 19: Die 5 am stärksten hochregulierten Gene.	86
Tabelle 20: Die 5 am stärksten herunterregulierten Gene.	87
Tabelle 21: Bekannte Gene und Genprodukte, die mit der Biofilmbildung in Verbindung stehen.	88
Tabelle 22: Raum-Zeit-Erträge der 2,3-Butandiolproduzierenden Stämme unter autotrophen Bedingungen einschließlich der simulierten Werte eines mathematischen Modells.	102

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
ATPS	<i>aqueous two phase system</i> (engl.: wässriges Zweiphasensystem)
bp	Basenpaare
c-di-GMP	<i>Cyclic diguanylate mono phosphate</i> (engl.: zyklisches Diguanylatmonophosphat)
CO₂	Kohlenstoffdioxid
d	Tag
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (DNS)
eDNA	Extrazelluläre DNA
EPS	Extrazelluläre polymere Substanzen
et al.	<i>et alteri</i> (lat.: und andere)
g	Gramm
h	Stunde
H₂	Wasserstoff
LB	<i>Lysogeny broth</i> (engl.: lysogene Brühe)
M	Molarität
Mb	Megabasenpaare
MM 81	Minimalmedium Nummer 81 der DSMZ
min	Minute
l	Liter
OCT	Optische Kohärenztomographie
OD	optische Dichte
PCR	<i>Polymerase-Chain-Reaction</i> (engl.: Polymerase-Ketten-Reaktion)
PDMS	Polydimethylsiloxan
PHB	Polyhydroxybutyrat
ppm	<i>parts per million</i> (engl.: Anteile von Millionen)

Abkürzungsverzeichnis

rpm	<i>rounds per minute</i> (engl.: Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Hintergrund

Aufgrund der Klimakrise hat die deutsche Bundesregierung am 31. August 2021 eine Verschärfung des Klimaschutzgesetzes erlassen, wonach bis 2030 die Treibhausgasemissionen im Vergleich zu 1990 um 65 % reduziert werden sollen und bis 2045 eine Treibhausgasneutralität als Ziel gesetzt wurde. Weiterhin steht im Synthesebericht zum sechsten IPCC - Sachstandbericht (*Intergovernmental Panel on Climate Change* der Vereinten Nationen) (AR6) in der Version vom 11. Juli 2023 bezüglich der Klimakrise: „Einige künftige Veränderungen sind unvermeidbar und/oder unumkehrbar, können aber durch eine tiefgreifende, rasche und anhaltende Minderung der globalen Treibhausgasemissionen begrenzt werden.“

Laut dem deutschen Umweltbundesamt waren Industrieprozesse im Jahr 2022 auf Platz 2 der Treibhausgas-Emissionskategorien und machten 6,9 % der anfallenden Treibhausgase aus. Um nachhaltigen Einfluss auf die Klimawende zu nehmen, muss die Bioökonomie gestärkt und durch neu entwickelte Methoden vorangebracht werden. Eine Möglichkeit hierzu ist die Nutzung und Verwertung von anfallenden Abfallströmen als erneuerbare und umweltfreundliche Substrat- und Energiequellen in mikrobiellen Produktionsprozessen. Hierbei ist die Verwertung von biobasierten, festen und gasförmigen Abfällen aus der landwirtschaftlichen Industrie, Abwasserwirtschaft und anderen industriellen Bereichen möglich. Um die Nutzung von biobasierten Abfallströmen und Biomasse in der Industrie zu fördern, wurde das Konzept der Plattformchemikalien eingeführt (Abschnitt 1.3), welche wichtige Intermediate der chemischen Industrie darstellen, die auf nachhaltige Weise hergestellt werden können. Diese können anschließend in bereits existierenden Produktionsprozessen zur Herstellung von gewünschten Endprodukten eingesetzt werden. Eine biotechnologische Produktion von Plattformchemikalien aus biobasierten Abfällen stellt eine Möglichkeit dar, anfallende und erneuerbare Rohstoffe effizient zu nutzen, indem die katalytischen Fähigkeiten von Mikroorganismen genutzt werden, um diese in höherwertige Produkte umzuwandeln.

1.2 *Cupriavidus necator* H16

Die mikrobielle lithoautotrophe Herstellung von Chemikalien, basierend auf der Nutzung von CO₂ als Kohlenstoff- und H₂ als Energiequelle, ist ein vielversprechender Weg, um aus einem weit verbreiteten Treibhausgas eine regenerierbare Ressource zu gewinnen. Obwohl die autotrophen Produktionsgeschwindigkeiten für komplexe Chemikalien bisher nicht hoch genug für industrielle Anwendungen sind, deuten Forschungsergebnisse darauf hin, dass Knallgasbakterien wie *Cupriavidus necator* H16, die O₂ als terminalen Elektronenakzeptor nutzen können, für die zukünftige Produktion komplexer Verbindungen auf der Basis von CO₂ entscheidend sein könnten (Alagesan *et al.*, 2018a).

C. necator H16 ist ein gram-negatives, nicht-pathogenes, fakultativ lithoautotrophes β -Proteo- (Pohlmann *et al.*, 2006; Cramm, 2009), Boden- und Süßwasserbakterium, das erstmals 1960 in einer Quelle bei Göttingen aus Schlammproben isoliert wurde (Schlegel *et al.*, 1961). Die Verfügbarkeit seines vollständigen Genoms, sowie die hohe Zelldichten und Wachstumsraten unter lithoautotrophen Bedingungen haben zu seiner Anerkennung als Modellorganismus und einer weitreichenden Anwendung in Fermentationen geführt. So wurde es beispielsweise bereits für die Synthese von Alkanen (Crépin *et al.*, 2016), Humulen (Krieg *et al.*, 2018), Isopropanol (Grousseau *et al.*, 2014) und Biokraftstoffen, darunter Alkoholen wie Ethanol und Isobutan, Ketonen, Terpenen und Methylketonen (Chakravarty and Brigham, 2018) eingesetzt. Zusätzlich konnte es für die Synthese von Polyamiden (z. B. Cyanophycin) eingesetzt werden (Reinecke and Steinbüchel, 2009).

Aufgrund seiner Fähigkeit das Biopolymer Polyhydroxybutyrat (Poly(3HB oder PHB) zu synthetisieren und dies mit einem fakultativen lithoautotrophen Stoffwechsel zu kombinieren wurde *C. necator* ursprünglich als Biokatalysator bekannt. PHB ist ein mikrobiell synthetisierter Polyester von dem *C. necator* große Mengen als granulare Partikel synthetisieren und akkumulieren kann, die bis zu 70 % seiner gesamten Biomasse ausmachen können (Panich *et al.*, 2021). Die Produktion der Granula erfolgt als Reaktion auf Mangel- und Stressphasen, wie sie zum Beispiel durch die Limitierung eines Elektronenakzeptors auftreten können (Chakravarty and Brigham, 2018). Während diesen Phasen werden die mikroskopisch sichtbaren Granula im Zytoplasma der mikrobiellen Zellen polymerisiert und können so als Kohlenstoffspeicher genutzt werden (Abbildung 1). PHB ist ein Thermoplast, der für eine Vielzahl von industriellen Anwendungen in Form von Co-Polymerisierungen

oder Polymergemischen genutzt werden kann, wie zum Beispiel für die Herstellung biologisch abbaubarer Spritzgussteile oder Werkzeuge (Reinecke and Steinbüchel, 2009).

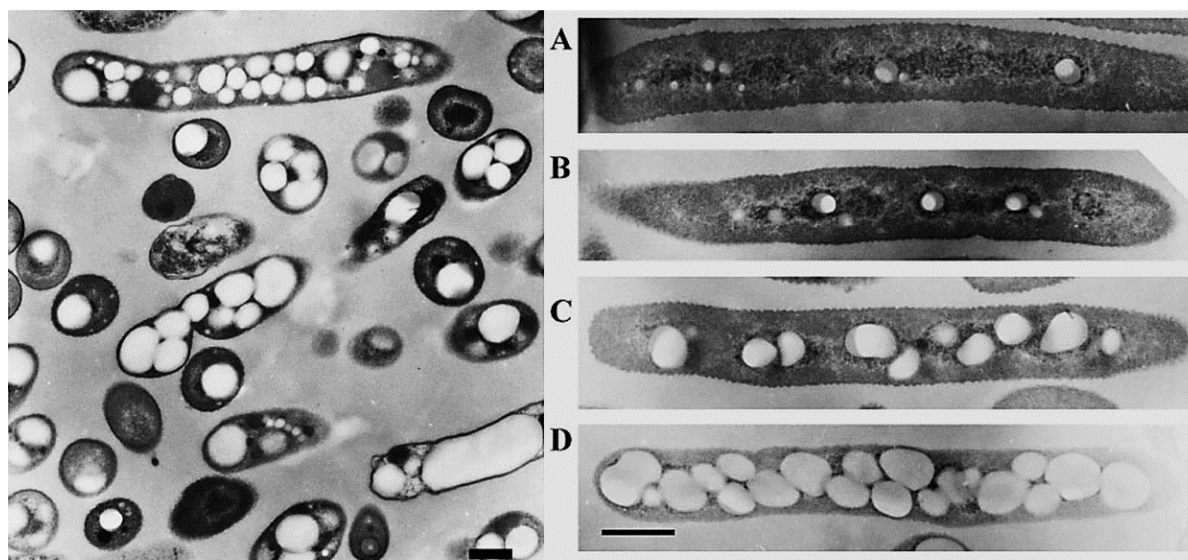


Abbildung 1: TEM-Aufnahmen von verschiedenen *C. necator* H16 Zellen, welche PHB-Granula aufweisen (links), und der Entwicklung der Granula im Zytoplasma in verschiedenen Stadien (rechts; A-D). Aufnahmen entnommen aus Tian *et al.*, 2005.

1.2.1 Taxonomie von *C. necator* H16

Der Name des Stammes H16 hat sich in der Vergangenheit aufgrund seiner Zugehörigkeit zu verschiedenen Taxa mehrfach geändert, wobei bis heute gelegentlich *Ralstonia eutropha* als Synonym verwendet wird. Ursprünglich im Jahre 1961 isoliert, wurde es aufgrund seiner Fähigkeit H_2 zu oxidieren als Mitglied der Gattung *Hydrogenomonas* identifiziert (Schlegel *et al.*, 1961; Wilde, 1962). Im Jahre 1969 wurde es der Gattung *Alcaligenes* zugeordnet und erhielt den Namen *Alcaligenes eutrophus* H16 (Davis *et al.*, 1969). Nach der Analyse des Phänotyps, der 16S rDNA-Sequenz sowie der Lipid- und Fettsäurezusammensetzung wurde es 1995 der Gattung *Ralstonia* zugeordnet und erhielt den Namen *Ralstonia eutropha* H16 (Yabuuchi *et al.*, 1995). 2004 wurde jedoch der Beweis erbracht, dass diese Gattung zwei Linien enthielt, woraufhin *R. eutropha* H16 in *Wautersia eutropha* H16 umbenannt wurde (Vanechoutte *et al.*, 2004). Noch im selben Jahr wurde entdeckt, dass es sich bei *W. eutropha* H16 um ein Synonym für den bereits 1987 beschriebenen Organismus *C. necator* handelte, weshalb er seither als *C. necator* H16 bezeichnet wird (Makkar and JR., 1987; Vandamme and Coenye, 2004).

1.2.2 Lebensweisen und Eigenschaften

Im Jahr 2007 wurde das vollständige Genom von *C. necator* veröffentlicht, welches aus drei DNA-Replikons, zwei Chromosomen und einem Megaplasmid besteht. Insgesamt kodiert es 6626 Gene und hat eine Genomgröße von 7,42 Megabasenpaaren (Mb) (Pohlmann *et al.*, 2006; Cramm, 2009). Chromosom 1 (4.052.032 Basenpaare (bp) enthält die wichtigsten Gene für den Stoffwechsel und lebensnotwendige Funktionen. Im Gegensatz dazu enthalten Chromosom 2 (2.912.490 bp) und das Megaplasmid pHG1 (452.156 bp) nur wenige essentielle Gene und überwiegend solche, die eine Nutzung eines größeren Substratspektrums und terminaler Elektronenakzeptoren für Wasserstoffoxidation, CO₂-Fixierung und Denitrifikation ermöglichen. Der GC-Gehalt der Replikons variiert zwischen 62,3 und 66,7 % (Pohlmann *et al.*, 2006).

Heterotroph weist es eine vielseitige Lebensweise auf, indem es verschiedene Kohlenstoffquellen und Elektronendonoren wie Fructose (Gottschalk *et al.*, 1964), Öle (Budde *et al.*, 2011), organische Säuren (Schlegel *et al.*, 1961), Fettsäuren (Dennis *et al.*, 1998) und Aminosäuren (Gottschalk *et al.*, 1964) nutzen kann. Der Abbau von Fructose findet dabei, katalysiert durch eine Fructokinase, über den Entner-Doudoroff-Weg statt (Pohlmann *et al.*, 2006; Cramm, 2009; Alagesan *et al.*, 2018a) welcher den Organismus ebenfalls befähigen würde Glucose abzubauen. Hierfür fehlen *C. necator* jedoch der nötige Transporter sowie eine Phosphorylierung durch eine Glucokinase (Orita *et al.*, 2012). *C. necator* ist in der Lage Sauerstoff, Nitrat, Nitrit oder Dimethylsulfoxid (DMSO) als terminale Elektronenakzeptoren zu verwenden (Abbildung 2), wobei Nitrat als vergleichsweise ineffizienter Akzeptor für den Organismus gilt (Pfitzner and Schlegel, 1973; Pohlmann *et al.*, 2006; Tiemeyer *et al.*, 2007).

Unter lithoautotrophen Bedingungen verwendet *C. necator* Kohlendioxid als Kohlenstoffquelle, wobei Wasserstoff als Elektronendonator fungiert (Pohlmann *et al.*, 2006; Cramm, 2009; Reinecke and Steinbüchel, 2009; Heinrich *et al.*, 2018). Zur Nutzung von H₂ als Energielieferant existieren zwei Hydrogenasen, eine zytoplasmatische und eine membrangebundene Form. Beide Hydrogenasen oxidieren H₂, jedoch nur die membrangebundene überträgt Elektronen an ein *b*-Typ-Cytochrom, welches über die Atmungskette eine ATPase antreibt. Im Gegensatz dazu kann die zytoplasmatische Hydrogenase NAD(P)H reduzieren (Schneider and Schlegel, 1976; Burgdorf *et al.*, 2006). Beide Hydrogenasen werden durch eine dritte, regulatorische Hydrogenase gesteuert, die

durch Bindung von H₂ die Expression beider Hydrogenasen über eine Translationskette induziert (Lenz *et al.*, 2002). Die Gene aller Hydrogenasen sind auf dem Megaplasmid pHG1 zu finden.

Der Organismus benutzt den Calvin-Benson-Bassham-Zyklus (CBB- oder Calvin-Zyklus) zur CO₂-Fixierung, wobei die Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RuBisCO) das Schlüsselenzym ist (Abbildung 2) (Bowien and Schlegel, 1981; Cramm, 2009). Der CBB-Zyklus besteht aus elf enzymatischen Schritten, von denen alle außer der Triose-3-phosphat-Isomerase und der Ribose-5-Phosphat-Isomerase in einem Operon auf Chromosom 2 und dem Megaplasmid in zwei aktiven Kopien vorhanden sind (Bowien and Kusian, 2002; Li *et al.*, 2020). Diese Kopien werden durch einen Transkriptionsfaktor (CbbR) reguliert, der das CBB-Operon während des heterotrophen Lebenszyklus unterdrückt, wenn hohe Mengen an Phosphoenolpyruvat vorhanden sind (Grzeszik *et al.*, 2000; Dangel and Tabita, 2015). Die Transkription wird ebenso durch die Verfügbarkeit von ATP, NADPH und Ribulose 1,5-bisphosphat beeinflusst (Dangel and Tabita, 2015).

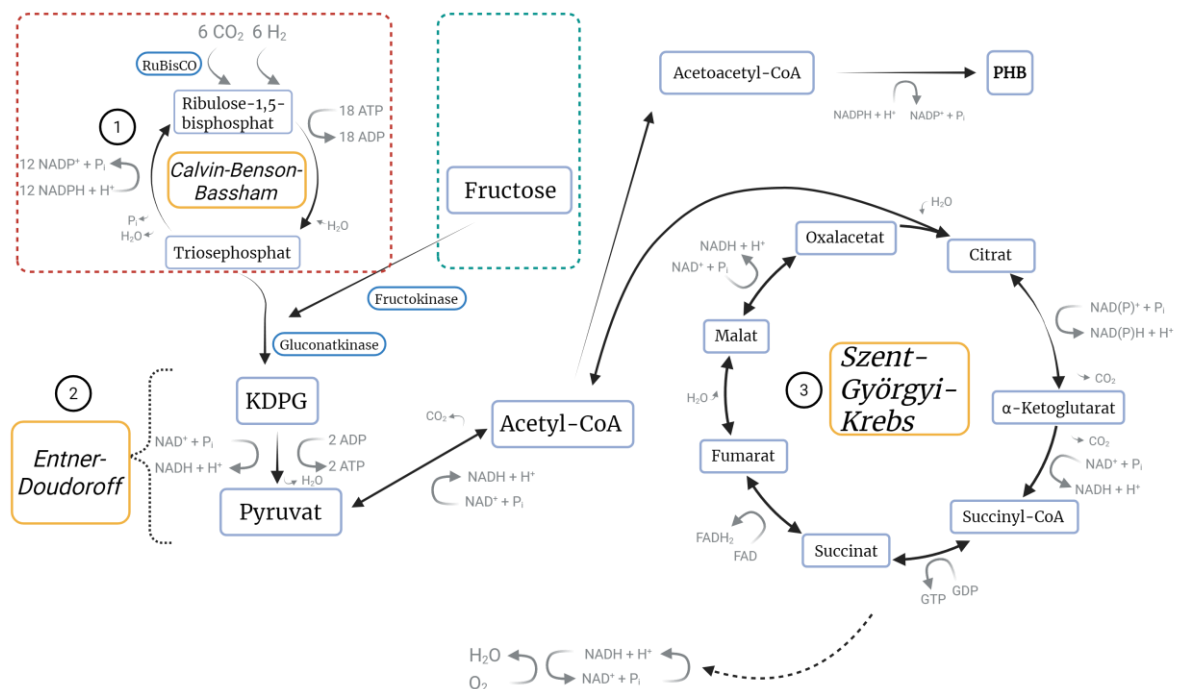


Abbildung 2: Schematische Darstellung des *C. necator* H16-Stoffwechsels. Die Darstellung bezieht sich auf die in der Arbeit verwendeten Substrate und markiert heterotrophe bzw. lithoautotrophe Wege mit grünen bzw. roten Markierungen. Der Organismus ist in der Lage, CO₂ autotroph durch den CBB-Zyklus (1) zu fixieren und H₂ als Energiequelle zu nutzen, bevor er zum Entner-Doudoroff-Weg (2) übergeht, welcher ebenfalls für die Verstoffwechslung von Fructose genutzt wird. Über Acetyl-CoA kann der Organismus entweder PHB als Kohlenstoffspeicher aufbauen oder den Citratzyklus (3) als zentralen Stoffwechselweg nutzen. In dieser Arbeit wurde O₂ als terminaler Elektronenakzeptor verwendet. Im Text genannte Enzyme sind blau umrandet während verbläute Pfeile nicht dargestellte Zwischenschritte anzeigen.

Ein Vorteil dieses Prozesses besteht darin, dass Kohlenstoff als C₃-Verbindung in den Entner-Doudoroff-Weg geleitet wird, was die Produktivität steigern kann. Ein Nachteil dieses Stoffwechselweges ist jedoch die unerwünschte Oxygenase-Aktivität von RuBisCO, die eine erhebliche Anzahl von Elektronen für die Reduktion von Sauerstoff anstelle von CO₂ benötigt, was zu einer geringeren Ausbeute an komplexen Chemikalien führt, die aus Stoffwechselzwischenprodukten erzeugt werden können (Pohlmann *et al.*, 2006). Vier Carboanhydrasen (CA) in *C. necator* dienen als Regulatoren des CO₂-Flusses (Abbildung 3) (Kusian *et al.*, 2002; Gai *et al.*, 2014). 2014 konnte durch Deletionsmutanten ermittelt werden, dass sie die Menge an verfügbarem CO₂ in den Zellen sowie in der direkten Umgebung der RuBisCO erhöhen, indem sie am Transport in die Zelle (Caa; periplasmatisch), an der CO₂-Versorgung des zentralen Metabolismus (Can), der pH-Regulation (Can2) und an der Versorgung der RuBisCO beteiligt sind, wodurch sie die Oxygenase-Reaktion hemmen (Can, Cag; Abbildung 3) (Gai *et al.*, 2014). Cag wurde hierbei für die gleiche Funktion wie Can beschrieben, wobei hierfür ein endgültiger Beweis ausblieb und diese Schlussfolgerung bisher als theoretisch angesehen werden muss. Deletionsmutanten der verschiedenen CAs zeigten in durchgeführten Versuchen starke Einschränkungen bezüglich des Wachstums, die nur durch die Expression aller CAs wieder aufgehoben werden konnte (Gai *et al.*, 2014).

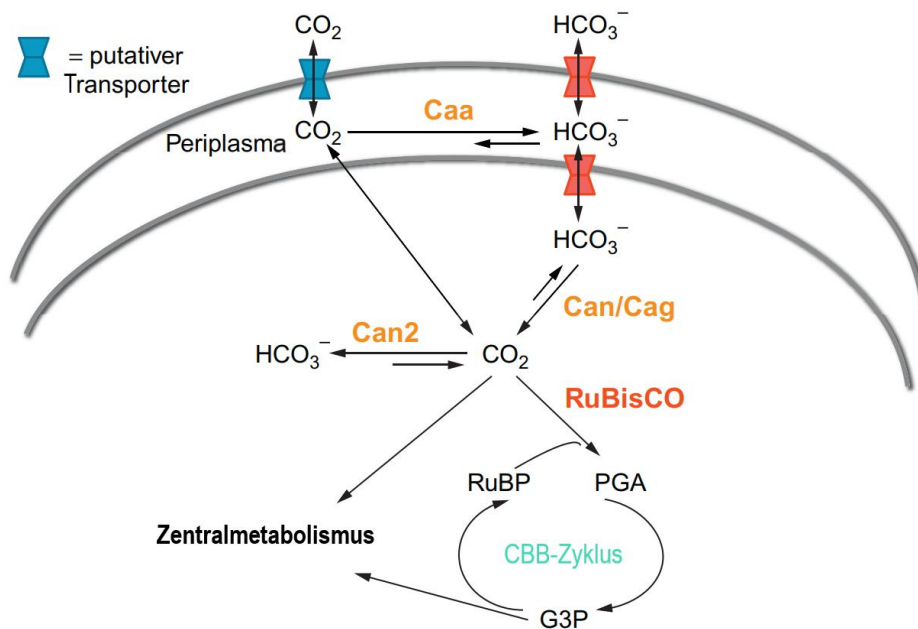


Abbildung 3: Theoretisierte Beteiligung von Carboanhydrasen am CO₂-Transport in *C. necator* H16. Eine aktive CO₂-Aufnahme wird als wahrscheinlich angesehen und wird über einen membranständigen Transporter vermutet (in Blau dargestellt). Caa reguliert den Fluss von CO₂ und Bicarbonat periplasmatisch. Can und Cag sind für die Versorgung des zentralen Stoffwechsels und der RuBisCO verantwortlich, während Can2 an der pH-Regulierung innerhalb der Zelle beteiligt ist. Die Abbildung wurde nach Lu *et al.* 2016 modifiziert.

1.3 Plattformchemikalien

Die Grundidee der Plattformchemikalien besteht darin, die chemische Industrie auf einige wenige wichtige Zwischenprodukte zu reduzieren, die biotechnologisch hergestellt werden können. Somit werden definierte Bausteine geschaffen, die anschließend in höherwertige Produkte umgewandelt werden können (Bomtempo *et al.*, 2017). Im Zuge dieser Entwicklung definierte das U.S.-Energieministerium (U.S.-Department of Energy) im Jahr 2004 30 wichtige biomassebasierte Intermediatchemikalien. Innerhalb dieser wurde Acetoin aufgeführt, welches als Zusatzstoff und Intermediat für viele weitere Chemikalien dient aber auch ein Ausgangsstoff für die Herstellung von 2,3-Butandiol, einem weiteren Zwischenprodukt mit hohem Stellenwert, verwendet werden kann (Werpy and Petersen, 2004).

1.3.1 Acetoin

Acetoin (3-Hydroxy-2-butanon) besitzt ein breites Anwendungsspektrum und zählt daher zu den vielversprechendsten chemischen Bausteinen, die aus Zucker gewonnen werden können. Bedingt durch die breitgefächerten Anwendungen nimmt jeder Mensch täglich mehrere mg Acetoin auf, was zu einem jährlichen Verbrauch von mehreren tausend Tonnen weltweit führt (U.S. National Institute of Environmental Health Science National Toxicology Program Report 98, 2023). Die jährlichen Produktionsmengen in den U.S.A. stiegen in den Jahren 1996 bis 2015 von 526 Tonnen auf 980 Tonnen und basierend auf den Jahren 2015 bis 2020 wird erwartet, dass der Gesamtverbrauch bis 2032 jährlich um 4-5 % weiter steigt (Hallagan, 2017; FMI - Future Market Insights Report: REP-GB-938, 2023). Aufgrund seines butterartigen Geruchs und Geschmacks wird es häufig als Aromastoff in der Lebensmittelindustrie eingesetzt. Darüber hinaus findet es Anwendungen in der Landwirtschaft, Zigarettenindustrie, Kosmetik, Pharmazie und ist Ausgangsmaterial für die Synthese von flüssigen Kohlenwasserstofftreibstoffen, heterozyklischen Verbindungen und von Butandiolen (Wang *et al.*, 2013; Xiao and Lu, 2014a; Cui *et al.*, 2022).

1.3.1.1 Herstellung von Acetoin

In der Regel wird es chemisch aus fossilen Rohstoffen synthetisiert, wobei jedoch radikalische Intermediate und Nebenprodukte entstehen können, welche im schlimmsten Fall umweltschädliche Auswirkungen haben (Zhang *et al.*, 2016). Natürlicherweise kommt es nur in geringen Konzentrationen, zum Beispiel in Früchten oder fermentierten Lebensmitteln wie Butter, Kakao, Käse, Joghurt und Wein, vor (Xiao and Lu, 2014b). Es ist jedoch auch bei vielen Mikroorganismen ein bedeutendes physiologisches Stoffwechselprodukt, was beispielsweise von *Bacillus pumilus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *Lactococcus lactis* und *Serratia marcescens* katalysiert werden kann (Xiao and Xu, 2007; Xiao and Lu, 2014a), wodurch mikrobielle Produktionen durch natürliche Produzenten oder entwickelte Produktionsstämme möglich sind.

1.3.1.2 Mikrobielle Produktion von Acetoin

Die mikrobielle Herstellung von Acetoin geht von Pyruvat, einem zentralen Zwischenprodukt des Stoffwechsels, aus (Abbildung 4). Pyruvat entsteht unter anderem durch den Abbau von Zuckern über die Glykolyse (Embden-Meyerhof-Parnas-Weg), den Entner-Doudoroff-Weg oder durch die Fixierung von Kohlenstoffdioxid (CO₂) über den CBB-Zyklus und der anschließenden Verstoffwechslung eines Intermediats. Anschließend erfolgt eine Kondensation von zwei Pyruvat-Molekülen zu Acetolactat, die durch die (α -)Acetolactat-Synthase (AlsS; EC 2.2.1.6) katalysiert wird, wobei gleichzeitig ein CO₂-Molekül freigesetzt wird. Die Aktivität der Acetolactat-Decarboxylase (AlsD; EC 4.1.1.5) führt im zweiten Schritt zur Freisetzung eines weiteren CO₂-Moleküls und der Bildung von Acetoin. Acetolactat ist vergleichsweise instabil und kann passiv in geringen Mengen durch oxidative Decarboxylierung bei Anwesenheit von Sauerstoff zu Diacetyl umgesetzt werden (Ui *et al.*, 1986). Dieses kann anschließend durch eine Diacetylreduktase (EC 1.1.1.303, EC 1.1.1.304) oder Butandioldehydrogenase zu Acetoin katalysiert werden (Boumerdassi *et al.*, 1996; Xiao and Xu, 2007). Acetoin kann in zwei stereoisomeren Formen auftreten, (3R)-Acetoin und (3S)-Acetoin (Zhang *et al.*, 2016).

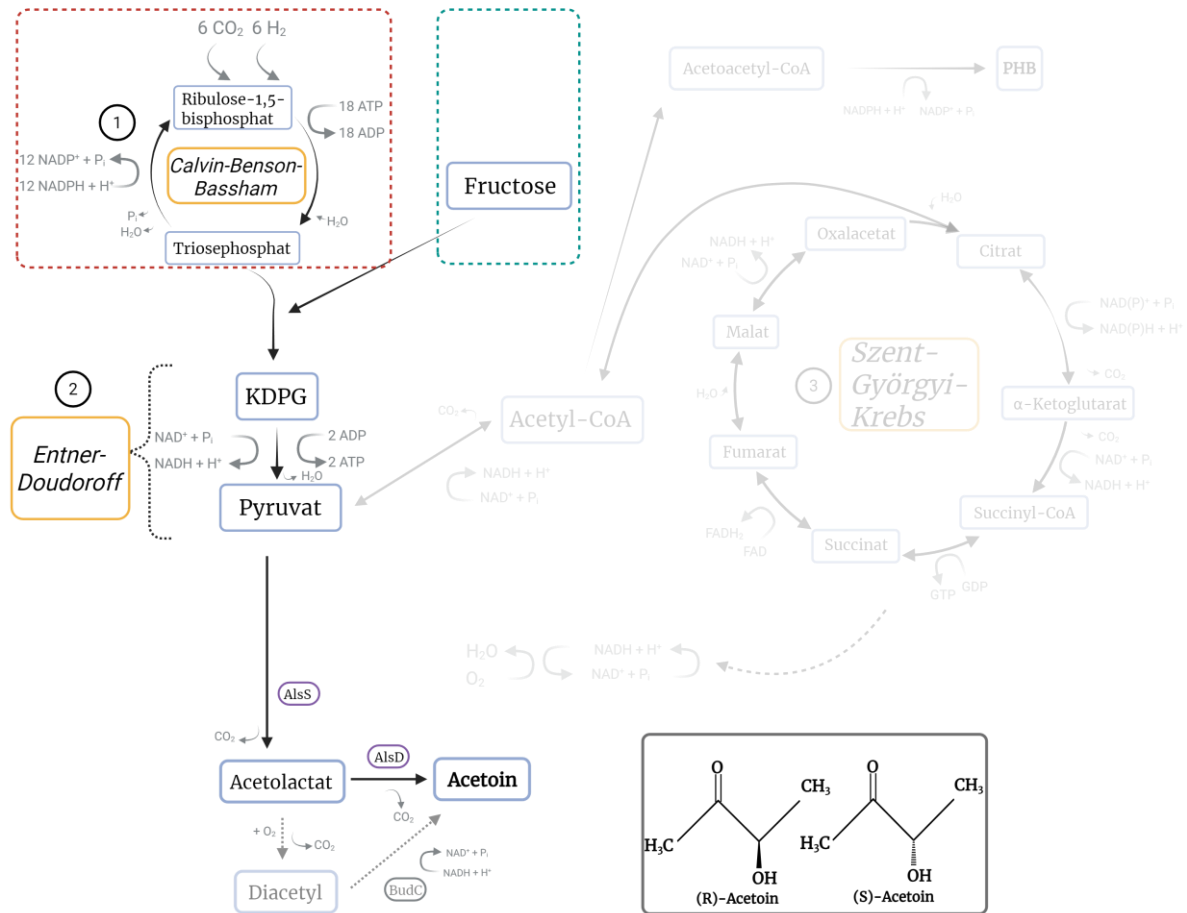


Abbildung 4: Darstellung des Ablaufs der mikrobiellen Acetoinherstellung am Beispiel von *C. necator*. Pyruvat kann über den Entner-Doudoroff-Weg (2; heterotropher Weg: Grün) oder zusätzlich den Calvin -Zyklus (1; autotropher Weg: Rot) hergestellt werden. Die mikrobielle Herstellung von Acetoin findet durch zwei Enzyme von Pyruvat ausgehend statt welche violett umrandet dargestellt sind. Acetoin kann hierbei in zwei Isomerformen vorkommen (unten rechts). Die Stoffwechselwegnamen sind gelb umrandet. Verblässende Pfeile geben nicht dargestellte Zwischenschritte an.

Dank einer hohen Produktivität und Ausbeute gilt *B. subtilis* als der bekannteste Acetoinproduzierende Vertreter, welcher bereits in zahlreichen Forschungen untersucht und beschrieben wurde. Ein mit UV-Mutagenese behandelter Stamm produzierte beispielsweise mehr als 50 g l^{-1} Acetoin mit einer Ausbeute von 73,5 % (Zhang *et al.*, 2013). Durch genetisch veränderte Organismen wurden auch unter anoxischen Bedingungen bereits Produktionsausbeuten von bis zu 90 % (mol Produkt mol⁻¹ Substrat) in Minimalmedien mit *Escherichia coli* beschrieben (Förster *et al.*, 2017).

2019 wurde ein acetoinproduzierender Stamm von *C. necator* vorgestellt, der unter lithoautotrophen Bedingungen bei Verwendung von CO_2 als Kohlenstoffquelle eine

Acetoinausbeute von nahezu 100 % zeigte (Windhorst and Gescher, 2019) und anschließend unter mixotrophen Bedingungen, bei zusätzlicher Verwendung von organischen Säuren als Substrat, weiter charakterisiert wurde, wobei ebenfalls hohe Kohlenstoffeffizienzen von 71 % nachgewiesen werden konnten (Harrer *et al.*, 2021). Um diese Effizienzen zu ermöglichen, wurden sowohl die natürlich im Organismus vorkommenden Gene für eine Verstoffwechslung von Acetoin (*acoABC*) als auch die PHB-bildenden Gene *phaC 1* und *phaC 2* genomisch deletiert. Zusätzlich wurden die Produktionsgene für Acetoin von *B. subtilis* integriert, um den Kohlenstofffluss auf die Acetoinproduktion umzulenken.

1.3.2 2,3-Butandiol

2,3-Butandiol (2,3-Butylenglykol, 2,3-Dihydroxybutan oder Dimethylethylenglykol) ist eine farblose, leicht viskose Flüssigkeit und wurde bereits 1981 aufgrund seiner vielfältigen Anwendungen als wichtige Biomasse-basierte Chemikalie eingestuft (Palsson *et al.*, 1981). So dient 2,3-Butandiol als Vorstufe für die Produktion von Methyl-Ethyl-Ketonen (Lösungsmittel), Kunststoffen (Tran and Chambers, 1987), 2-Butanon und damit einhergehend Kraftstoffen (Syu, 2001). Es wird für die Herstellung von Geschmacks- und Geruchszusätzen genutzt und dient so der Herstellung von Lebensmitteln, Kosmetika und Arzneimitteln sowie von Polyurethan (Bartowsky and Henschke, 2004; Wong *et al.*, 2014; Hakizimana *et al.*, 2020; Kirchberg *et al.*, 2022). Es kann zusätzlich als Gefrierschutzmittel eingesetzt werden (Soltys *et al.*, 2001) oder direkt zur Herstellung von Flugkraftstoff, Weichmachern und Antibiotika verwendet werden oder als Zusatzstoff in Druckfarben, Parfüms, Begasungsmitteln, Befeuchtungs- und Weichmachern sowie Sprengstoffen und Düngern dienen (van Haveren *et al.*, 2008; Ji *et al.*, 2011; Hakizimana *et al.*, 2020; Maina *et al.*, 2022). Daher lag der Marktanteil von 2,3-Butandiol im Jahre 2022 bei 270,4 Millionen US-Dollar, wobei ein jährlich um 3,5 % gesteigerter Bedarf für 2,3-Butandiol bis zum Jahre 2031 vorhergesagt wird, basierend auf der Möglichkeit diese Plattformchemikalie Biomasse-basiert durch verschiedene Organismen herstellen zu können (Transparency Market Research Report: TMRGL44105, 2023).

1.3.2.1 Herstellung von 2,3-Butandiol

Natürlicherweise kann 2,3-Butandiol von vielen Organismen hergestellt werden, wobei die bekanntesten unter ihnen *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *S. marcescens*, *Paenibacillus polymyxa*, *B. subtilis* sind. Aufgrund des hohen Bedarfs wird es jedoch hauptsächlich aus erdölbasierten Rohstoffen wie Acetylen, Butan, Propylen und Butadien hergestellt (Ji *et al.*, 2011; Maina *et al.*, 2022), wobei die Herstellung der reinen Isomerformen sehr viel teurer ist als die von Isomergemischen (Ge *et al.*, 2016).

1.3.2.2 Mikrobielle Produktion von 2,3-Butandiol

2,3-Butandiol ist die reduzierte Form von Acetoin. Die mikrobielle Herstellung verläuft identisch, wobei zusätzlich eine Reduktion durch eine allgemeine sekundäre Alkohol-Dehydrogenase oder eine spezifische 2,3-Butandioldehydrogenase (BudC; EC 1.1.1.4, EC 1.1.1.76) erfolgt (Abbildung 5) (Syu, 2001; Ji *et al.*, 2011). Diese Reaktion benötigt NADH als Co-Faktor und findet als reversible Gleichgewichtsreaktion statt, wobei bei der Hinreaktion jeweils ein NAD(P)H katalytisch oxidiert bzw. bei der Rückreaktion regeneriert wird (Ji *et al.*, 2011).

2,3-Butandiol ist ein Alkohol mit zwei chiralen Zentren wodurch es drei Stereoisomere aufweist: D-(+)-(2R,3R)-Butandiol, L-(+)-(2S,3S)-Butandiol und meso-2,3-Butandiol (Abbildung 5). Diese Stereoisomere unterscheiden sich in ihren Eigenschaften bezüglich optischer Aktivität sowie Schmelz- und Siedetemperatur (19,7 bis 32° C bzw. 177° C bis 182° C) und finden somit teilweise unterschiedliche Anwendungen (Maddox, 1996; Syu, 2001). Die unterschiedlichen Stereoisomere können durch selektive Enzyme synthetisiert werden, wobei die meisten natürlichen Produzenten ein Gemisch aus zwei der Isomere herstellen (Ji *et al.*, 2011). Das Verhältnis der Stereoisomere hängt hierbei von den Organismen und den Kulturbedingungen des Fermentationsprozesses ab (Otagiri *et al.*, 2010). So kann *B. polymyxa* (R,R)-Butandiol mit einer Reinheit von bis zu 98 % herstellen (De Mas *et al.*, 1988), jedoch gibt es für *K. pneumoniae* Berichte über Isomermischungen aus meso- und (2S,3S)-Butandiol (Ji *et al.*, 2011). Es wurde allerdings ebenfalls gezeigt, dass überwiegend reine, stereospezifische Produktionen der Isomere durch BudC von *K. pneumoniae* (Ui *et al.*, 1997) sowie von anderen Organismen möglich sind (Ui *et al.*, 2004;

Yan *et al.*, 2009). Durch ihre unterschiedlichen Eigenschaften sowie ihrer Bedeutung als Intermediate der Industrie ist eine Produktion mit hoher optischer Reinheit erstrebenswert (Liu *et al.*, 2011).

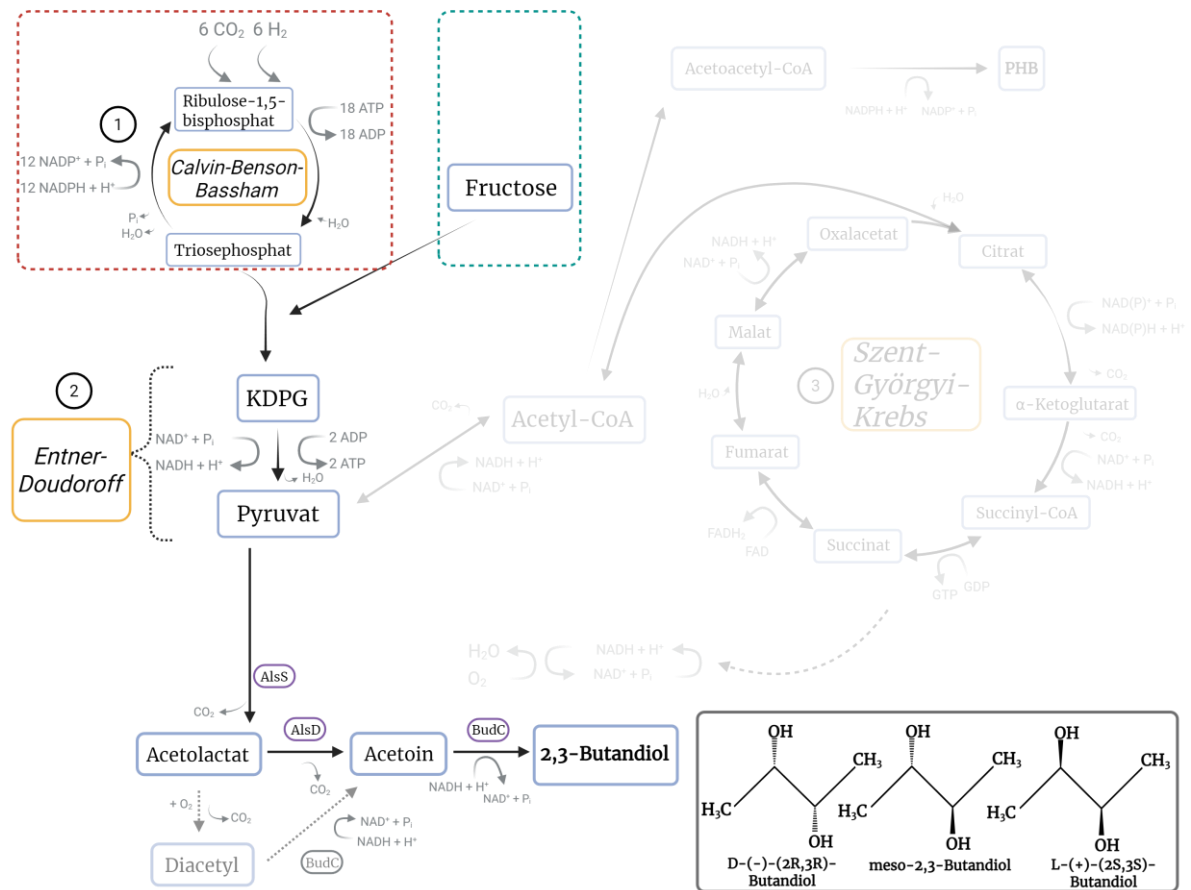


Abbildung 5: Darstellung des Ablaufs der mikrobiellen 2,3-Butandiolherstellung am Beispiel von *C. necator*. Pyruvat kann über den Entner-Doudoroff-Weg (2; heterotropher Weg: Grün) oder zusätzlich den Calvin -Zyklus (1; autotropher Weg: Rot) hergestellt werden. Die mikrobielle Herstellung von Acetoin findet durch zwei Enzyme von Pyruvat ausgehend statt welche violett umrandet sind. Die Produktion von 2,3-Butandiol wird durch BudC aus Acetoin katalysiert. 2,3-Butandiol kommt hierbei in Form von 3 Stereoisomeren vor (unten rechts). Die Stoffwechselwegnamen sind gelb umrandet. Verblässende Pfeile geben nicht dargestellte Zwischenschritte an.

Bekannte natürliche Produzenten wie *K. pneumoniae* (Ma *et al.*, 2009), *K. oxytoca* (Jantama *et al.*, 2015) und *S. marcescens* (Zhang *et al.*, 2010) zeigten in der Vergangenheit Produktionen von bis zu 150 g l⁻¹ aus Glucose oder Saccharose. In der wissenschaftlichen Literatur wurden weitere Ansätze zur mikrobiellen Produktion von 2,3-Butandiol vorgestellt, darunter gentechnisch veränderte Stämme, welche die Produktionsgene heterolog exprimieren wie *Escherichia coli* (Nakashima *et al.*, 2014) und *Saccharomyces cerevisiae* (Kim *et al.*, 2015). Diese konnten Kohlenstoffeffizienzen von über 90 % [mol Produkt mol⁻¹

Substrat] aufweisen, jedoch sind die meisten Produktionsstämme auf heterotrophe Kohlenstoffquellen angewiesen. Weitaus interessanter für heutige wirtschaftliche Anwendungen ist eine lithoautotrophe Produktion auf der Basis von CO₂ oder phototropher Herstellung. Eine solche autotrophe Herstellung von Butandiol wurde bei Acetogenen und Cyanobakterien beobachtet, konnte aber aufgrund der Komplexität der Stammtechnik und der Prozessentwicklung noch nicht vollständig ausgeschöpft werden. In einer Studie von Köpke *et al.*, 2011 wurde eine Konzentration von 0,18 g l⁻¹ für die acetogene Butandiol-Produktion angegeben. Im Gegensatz dazu produzierte ein genetisch modifizierter Stamm von *Synechococcus elongatus* insgesamt 2,38 g l⁻¹ 2,3-Butandiol (Oliver *et al.*, 2014), wofür dieser phototrophe Vorgang jedoch eine ausreichende Lichtquelle und damit einhergehend aufwendige Reaktormodelle benötigt.

Eine mikrobielle Herstellung von 2,3-Butandiol durch *C. necator* wurde 2020 vorgestellt, wobei der Produktionsstamm als Grundlage für die Modellierung einer zyklischen Produktionswirtschaft auf Basis der Nutzung von CO₂ und H₂ als nachhaltige Substrate diente (Bommareddy *et al.*, 2020). Der Stamm wies hierbei vergleichbare genomische Deletionen auf, wie der von Windhorst und Kollegen vorgestellte acetoinproduzierende Stamm (Windhorst and Gescher, 2019) und wurde zusätzlich um das Produktionsgen für 2,3-Butandiol von *Clostridium beijerinckii* erweitert. Für den Produktionsstamm wurde nach 600 h Fermentation unter autotrophen Bedingungen 32 g l⁻¹ 2,3-Butandiol mit einer Kohlenstoffeffizienz von 82 % nachgewiesen.

1.4 Produktive Biofilme

Die Vorteile mikrobieller Herstellungen wurden in dieser Arbeit bereits beschrieben, jedoch haben bisher vergleichsweise wenige Produktionen die industrielle Anwendung erreicht. Dies liegt vor allem an mangelnden Produktivitäten und vergleichsweise hohen Betriebskosten, die eine Wirtschaftlichkeit noch nicht vollauf ermöglichen (Muffler *et al.*, 2014). Biofilmsysteme stellen eine Besonderheit unter den mikrobiellen Systemen dar, die als besonders vorteilhaft für die Langzeitproduktion und den konventionellen planktonischen Reaktorsystemen als überlegen gelten (Schmeckeber *et al.*, 2022). Die Vorteile liegen in hohen Biomasseanteilen, die aufgrund der Beschaffenheit von Biofilmen in Durchflusssystemen selbstständig in Langzeitproduktionen erhalten bleibt und eine erleichterte Verwendung von Gassubstraten

erlaubt (Cuny *et al.*, 2019; Riegler *et al.*, 2019). Ebenso verleiht ein Biofilm den Organismen erhöhte Resistenzen (Manavathu and Vazquez, 2017) gegen toxische oder antimikrobielle Stoffe, Produkte und Umgebungen (Bland *et al.*, 1982; Reddy Kunduru and Pometto, 1996; Li *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2008; Halan *et al.*, 2011), erhöht die Resistenz gegenüber Kontaminationen durch andere Organismen (Weuster-Botz *et al.*, 1993; Van Groenestijn *et al.*, 2009; Dunsing *et al.*, 2019; Bond *et al.*, 2021) und teilweise Phagen (Yamamoto *et al.*, 2021). Zusätzlich gibt es Berichte über erhöhte Produktionen durch die Organismen in biotechnologischen Anwendungen (Doran and Bailey, 1986; Zhang *et al.*, 1989), welche wahrscheinlich durch vorteilhafte Evolution und Entwicklung von Subkulturen der Produktionsstämme im Biofilm entstehen (Woo *et al.*, 2012). Diese erhöhte Produktivitäten und Resistenzen, die hohe Zelldichte von bis zu 500 mg Trockenbiomasse pro ml Biofilm und die Tatsache, dass die Zellen in einem Durchflusssystem immobilisiert und somit zurückgehalten werden, sind wesentliche Vorteile von Biofilmen gegenüber planktonischen Zellen in industriellen Produktionsprozessen (Edel *et al.*, 2019; Leonov *et al.*, 2021).

Das Interesse an der Analyse von Biofilmen wurde ursprünglich vom medizinischen Sektor geweckt, da die zunehmende Resistenz und Toleranz von in Biofilmen lebenden Mikroorganismen gegenüber Antibiotika eine erhebliche Gefahr für die menschliche Gesundheit darstellen (Schmeckeber *et al.*, 2022). Jedoch auch im technischen Bereich werden Biofilme schon seit Jahrzehnten genutzt. Hier war es zunächst die Wasserwirtschaft, die Biofilme beispielsweise in Sandfiltern einzusetzen begann (Bouwer and Crowe, 1988). Seitdem steht der Wassersektor an der Spitze der Entwicklungen in der angewandten Biofilmtechnologie. Im Gegensatz dazu hat die Biotechnologie die Vorteile biofilmbasierter Verfahren mittlerweile erkannt, befindet sich aber noch im Entwicklungsstadium, und nur wenige Verfahren sind bis zur industriellen Anwendbarkeit entwickelt worden. Vermutlich ist ein Grund warum Biofilme in diesem Bereich bisher nicht häufiger eingesetzt werden, dass eine Wissenslücke in Bezug auf Prozessvorhersagbarkeit, Reaktortechnologie, und Biokatalysatorstabilität besteht (Weiler *et al.*, 2024a). Insbesondere aufgrund der höheren Komplexität von Biofilmsystemen, im Vergleich zu konventionellen Produktionen, ergeben sich Herausforderungen für die Prozessführung, den Betrieb und das skalieren von Labor- zu großtechnischen Systemen. Zusätzlich fehlen bisher effektive Methoden zur notwendigen Steuerung von Biofilmen (Leonov *et al.*, 2021). Ein tieferes Verständnis der biofilmbasierten Produktion, insbesondere der Biofilmentwicklung und der Schlüsselgene dieser Lebensweise,

sind daher essentiell. Dennoch ist über die Biofilmbildung der meisten, in der Forschung bereits traditionell eingesetzten Produktionsorganismen nur wenig bekannt.

1.4.1 Definition von Biofilmen

Biofilme sind charakterisiert als Aggregate von Mikroorganismen, die an Oberflächen oder aneinanderhaften und von einer selbstproduzierten Matrix umschlossen sind. Einiges deutet darauf hin, dass die Mehrzahl der Mikroorganismen in der Natur in Form dieser Aggregate vorkommt (Costerton *et al.*, 1995; Flemming *et al.*, 2016).

Diese Matrix besteht aus einer komplexen Zusammensetzung von Kohlenhydraten, Proteinen und Nukleinsäuren, den sogenannten extrazellulären polymeren Substanzen (EPS), welche 50 bis 90 % des gesamten organischen Kohlenstoffs in Biofilmen ausmachen können (Staudt *et al.*, 2004). Die Eigenschaften und die Zusammensetzung der EPS unterscheiden sich nicht nur von Spezies zu Spezies, sondern können auch innerhalb einer Spezies je nach äußeren Einflüssen stark variieren. Die EPS-Matrix verleiht dem Biofilm Stabilität und Widerstand gegen äußere Einflüsse wie schwankende Bedingungen, Schadstoffen und Scherbelastungen, wobei sie als eine Art Klebstoff fungiert, der die Zellen umgibt und zusammenhält (Stoodley *et al.*, 2002). Sie enthält eine Reihe aktiver Bestandteile, katalytische Proteine und kann zusätzlich für eine Oberflächenladung sorgen. All diese Faktoren tragen zu ihrer Funktion als Diffusionsbarriere und zur Robustheit von Biofilmen bei (Flemming and Wingender, 2010).

Dabei sind Biofilme keine statischen, sondern dynamische lebende Systeme, was zu Vor- aber auch Nachteilen führt und die Anwendung in produktiven Prozessen erschweren kann. Die Architektur von Biofilmen und ihre Zusammensetzung sind eine Reaktion der mikrobiellen Gemeinschaft auf die Prozessbedingungen, zu denen die Oberfläche, auf der sie wachsen (Substratum), aber auch die Scherbelastung und die Zusammensetzung des Mediums gehören (Flemming *et al.*, 2007). Das Verständnis des Wachstums von Biofilmen ist für die Entwicklung biofilmbasierter Prozesse von entscheidender Bedeutung, da es die Möglichkeit bietet, die Biologie und den Gesamtprozess für Biofilme mit maßgeschneiderten Eigenschaften zu gestalten und zu steuern. Zu diesen Merkmalen gehören die Höhe und Dichte des Biofilms, da dies den Stoffaustausch maßgeblich beeinflusst, weshalb immer mehr nicht-invasive Methoden entwickelt werden, um Biofilme in ihrer Gesamtheit zu analysieren (Wagner and Horn, 2017).

1.4.2 Biofilmbildung von Prokaryoten

Die Biofilmbildung ist ein komplexer Prozess, der in verschiedene Phasen unterteilt werden kann. Bis vor kurzem wurde zur Darstellung der Biofilmbildung und -ausbreitung häufig ein fünfstufiges Biofilmmodell verwendet (Stoodley *et al.*, 2002; Flemming and Wingender, 2010). Die erste Phase des fünfstufigen Biofilmmodells beschreibt die anfängliche, reversible Anheftung an ein Substrat. Daran kann sich eine irreversible Anheftung anschließen, auf welche die erste Reifungsphase folgt, in der extrazelluläre polymere Substanzen (EPS) gebildet und Zellcluster aufgebaut werden. Die vierte Biofilmphase beschreibt den reifen Biofilm, in dem sich Mikrokolonien bilden. Schließlich löst sich der reife Biofilm partiell auf und setzt einzelne Zellen und Zelleinheiten frei. In diesem Biofilmmodell sind jedoch nur Aggregate berücksichtigt, die an Oberflächen anhaften und somit auf eine Form beschränkt sind. Daher wurde von Sauer und Kollegen ein überarbeitetes Modell der Biofilmbildung veröffentlicht, das das bisherige Modell erweitern soll. Neben der oberflächenassoziierten Biofilmbildung berücksichtigt das neue Modell auch die Biofilmbildung in Lösungen und Übergänge zwischen Zuständen (Sauer *et al.*, 2022), um auch Phasengrenzen aller Art und planktonische Biofilmbildungen zu inkludieren (Abbildung 6). Im Gegensatz zum bisherigen statischen Modell sind nun Übergänge zwischen Medien und Oberflächen repräsentiert sowie die bisherigen Stadien auf festem Substratum (äußerer Ring) und reine planktonische Biofilmentwicklungen (innerer Ring). Die Stadien teilen sich nun auf in „Aggregation und Anheften“, in welchem sich Bakterien aneinander oder an biotische oder abiotische Oberflächen festsetzen, „Wachstum und Akkumulation“, in welchem die Zellen wachsen, sich vermehren und neue Zellen hinzukommen können und „Disaggregation und Lösung“, in welchem sich abhängig vom Mechanismus sowohl Aggregate als auch Einzelzellen vom Biofilm lösen können.

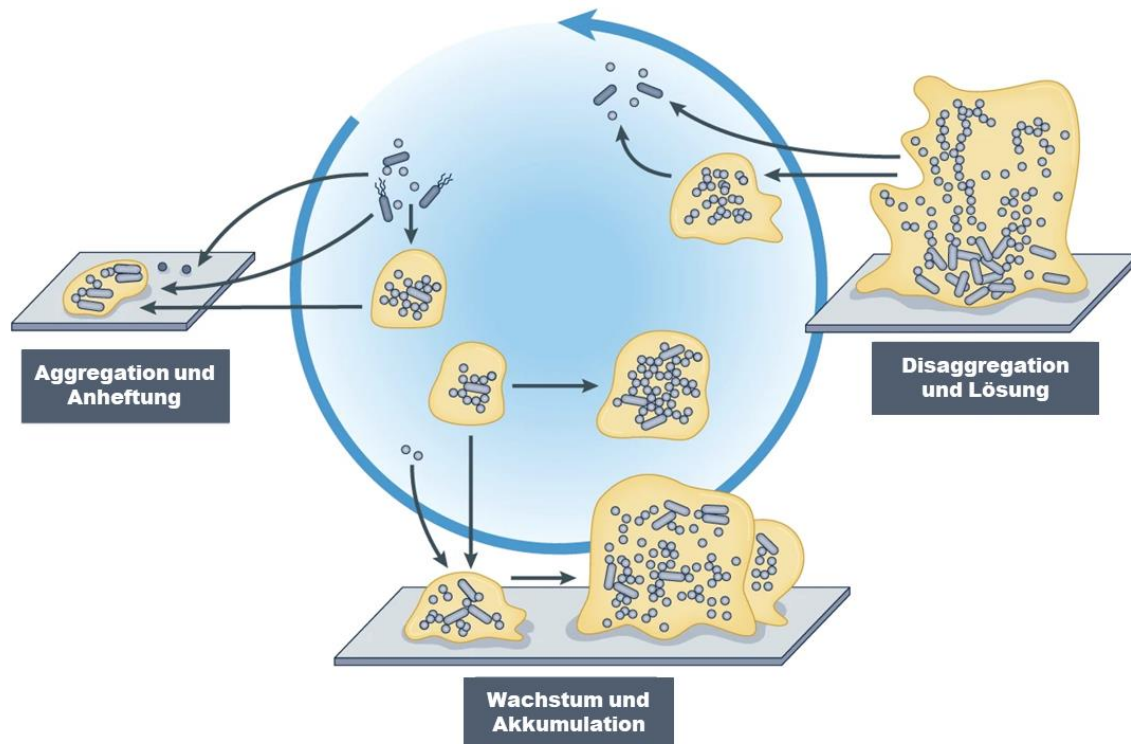


Abbildung 6: Darstellung des aktualisierten Diagramms der Biofilm-Bildung. Die Übergänge zwischen den Medien und Stadien sowie die bisherigen Stadien auf festem Substrat (äußerer Ring) und reine planktonische Biofilm-Entwicklungen (innerer Ring) werden dargestellt. Die Stadien des Biofilmwachstums lassen sich einteilen in "Aggregation und Anheften", bei dem Bakterien sowohl untereinander als auch an biotische oder abiotische Oberflächen haften, "Wachstum und Akkumulation", bei dem sich die Zellen vermehren und neue Zellen hinzukommen sowie "Disaggregation und Lösung", bei dem sich abhängig vom Mechanismus sowohl Aggregate als auch Einzelzellen vom Biofilm lösen können. Abgeändert nach Sauer *et al.* (2021).

Innerhalb dieser Stadien erfahren die Mikroorganismen im Vergleich zum kontinuierlichen planktonischen Wachstum erhebliche Veränderungen auf der Ebene der Genexpression (Gilmore *et al.*, 2003; Burne *et al.*, 2009). Die Regulierung während der verschiedenen Entwicklungsstadien ist ein sehr komplexer Prozess und variiert zusätzlich stark von Organismus zu Organismus. Es gibt jedoch einige regulatorische Elemente, die bei vielen Organismen beobachtet wurden und eine entscheidende, übergreifende Rolle bei der Biofilmbildung spielen. Basierend auf zahlreichen Studien wird die anfängliche Biofilmbildung durch einen Anstieg des Botenmoleküls zyklisches Diguanylat (c-di-GMP) ausgelöst (Hickman *et al.*, 2005; Thormann *et al.*, 2006; O'Connor *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2015; Ng *et al.*, 2020; Matsumoto *et al.*, 2021). Die Synthese und der Abbau von c-di-GMP in Bakterien wird durch zwei antagonistische Klassen von Proteinen reguliert (Hengge, 2009), wobei grundsätzlich die Synthese durch Diguanylatzyklasen mit einer GGDEF¹-Domäne

¹ Basierend auf dem Ein-Buchstabencode für Aminosäuren

katalysiert und der Abbau durch Phosphodiesterasen mit einer EAL- oder HD-GYP²-Domäne katalysiert wird. Nach der derzeitigen Hypothese können verschiedene Umweltfaktoren, wie z.B. die Anheftung an eine Oberfläche, die Produktion von c-di-GMP stimulieren, was wiederum die Produktion von Adhäsion und EPS-Verbindungen auslöst (Hickman *et al.*, 2005).

Neben der Oberflächenerkennung wird die Biofilmbildung auch maßgeblich durch Quorum-sensing-Mechanismen beeinflusst. Quorum-sensing ist ein Prozess, der physiologische Reaktionen abhängig von der Konzentration von Autoinduktoren auslöst (Flemming and Wingender, 2010). Gram-negative Bakterien verwenden hierfür kleine Moleküle, meist Acyl-Homoserin oder andere aus S-Adenosylmethionin hergestellte Moleküle, als Autoinduktoren, die frei durch Membranen diffundieren können (Wei *et al.*, 2011). Sobald die Konzentration der Autoinduktoren hoch genug ist, binden sie an zytoplasmatische Transkriptionsfaktoren, die die Transkription von Quorum-sensing-Genclustern aktivieren (Rutherford and Bassler, 2012). Mehrere Studien haben den Einfluss von Quorum-sensing auf die Biofilmbildung nachgewiesen. Bereits 1998 veröffentlichten Davies und Kollegen eine Studie, aus der hervorging, dass *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme mit einem Quorum-sensing-Defekt einen flachen und undifferenzierten Biofilm bildeten, während der Wildtyp unter ähnlichen Bedingungen große Strukturen aufwies (Davies *et al.*, 1998). Darüber hinaus hat sich gezeigt, dass Quorum-sensing eine wichtige Rolle bei der Freisetzung großer Mengen extrazellulärer DNA spielt, die ein Hauptbestandteil der EPS ausmacht. Daher bilden zumindest einige Mikroorganismen mit einer Mutation im Quorum-sensing-Mechanismus nur kleine und unstrukturierte Biofilme mit verringerter extrazellulärer DNA (Diggle *et al.*, 2003; Allesen-Holm *et al.*, 2006).

Bei vielen anderen Mikroorganismen sind die Mechanismen des Quorum-sensing und der Biofilm-Bildung kaum oder gar nicht untersucht worden, was auch auf *C. necator* H16 zutrifft. Angesichts der Vorteile biofilmbasierter Herstellungsverfahren ist es von großer Bedeutung, dass in Zukunft ein besseres Verständnis für diese Prozesse erlangt wird, um eine ausreichend hohe Produktion als Alternative zu herkömmlichen Herstellungsverfahren gewährleisten zu können.

² Basierend auf dem Ein-Buchstabencode für Aminosäuren

1.5 Zielsetzung

Aufgrund der zuvor genannten Vorteile mikrobieller Produktionen von wertvollen und wichtigen Plattformchemikalien sollte im Zuge dieser Arbeit die Produktion von 2,3-Butandiol unter hetero- und lithoautotrophen Bedingungen in *C. necator* H16 etabliert und charakterisiert werden. Ausgehend von einem bereits existierenden Acetoin-Produktionsstamm wurden hierfür der Einfluss zweier Produktionsplasmide, pKR und pBBR1, sowie verschiedener Varianten des BudC-Enzyms auf die Ausbeuten und Produktivitäten untersucht. Darüber hinaus wurde der Einfluss einer Überexpression einer CA (*cag*) auf die autotrophe Kohlenstoffeffizienz untersucht. Hierfür wurden Versuche unter hetero- und autotrophen Bedingungen durchgeführt und anschließend im Hinblick auf die Gesamtkonzentration der Produkte, sowie der volumetrischen Produktivität und der Kohlen- sowie Wasserstoffeffizienzen hin ausgewertet. Zusätzlich wurde die entstehenden Stereoisomerformen der Produktionsstämme untersucht.

Um eine Produktion der Plattformchemikalie sinnvoll für zukünftige Anwendungen zu etablieren, wurden ebenfalls weitere Parameter der 2,3-Butandiolproduktion untersucht. Hierfür wurden die Einflüsse der Substrate und Produkte auf das Zellwachstum von *C. necator* hin untersucht. Weiterhin wurden verschiedene Aufreinigungsstrategien für 2,3-Butandiol getestet und ihre Auswirkungen auf den Organismus untersucht.

Zusätzlich wurde die Stabilität einer biofilmbasierten Langzeitproduktion untersucht sowie im Anschluss eine Mutationsanalyse vorgenommen, um zu untersuchen, welchen genomischen Einflüssen die Produktion unterliegt. Um eine optimierte Anwendung zu ermöglichen und weitere Erkenntnisse über die Biofilmlbensweise von *C. necator* zu erzielen, wurde zusätzlich die Biofilmbildung von *C. necator* H16 untersucht. Hierfür wurden beteiligte genetische Faktoren mittels Transkriptomanalysen in verschiedenen Entwicklungsstadien analysiert.

2 Material und Methoden

Soweit nicht anders angegeben, wurden sämtliche verwendete Chemikalien und Gase von Tyczka Industrie-Gase (Mannheim, Deutschland), Westfalen (Münster, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Promega (Mannheim, Deutschland) oder Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

2.1 Stämme und Kultivierungen

Alle in dieser Studie verwendeten Stämme und Plasmide sind in Tabelle 1 und Tabelle 2 aufgeführt.

Für das Ansetzen aller Lösungen wurde Reinstwasser (ddH₂O) verwendet (PURELAB Plus, Veolia Water Technologies, Celle, Deutschland).

C. necator-Stämme wurden entweder in lysogeny Broth (LB)-Medium nach Lennox (Tabelle 3) oder in Minimalmedium (MM; Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Medienrezept 81 mit Lösung C: 2,5 mg l⁻¹ anstelle von 50 mg Eisen(III)-ammoniumcitrat; Tabelle 4) bei einer Temperatur von 30 °C und 180 rpm kultiviert. Bei Verwendung von Minimalmedium wurden 20 mM Fructose für heterotrophes Wachstum oder ein Gasgemisch aus 80% H₂, 5% CO₂ und 15% O₂ (Gasmischer EL-FLOW (Bronkhorst Deutschland Nord, Kamen, Deutschland) sowie 50 mg NaHCO₃ pro Liter für autotrophes Wachstum als Substrate zugegeben. Kulturen des *E. coli*-Stammes WM3064 wurden in LB-Medium bei 37 °C kultiviert, das mit 0,3 mM Diaminopimelinsäure (DAP) supplementiert war. Bei Bedarf wurde Kanamycin in einer Konzentration von 250 µg ml⁻¹ für *C. necator*-Stämme und 50 µg ml⁻¹ für *E. coli*-Stämme (Stammlösung 50 mg ml⁻¹ in Wasser) oder Tetracyclin in einer Konzentration von 15 µg ml⁻¹ (Stammlösung 15 mg/ml in DMSO) zugesetzt. Im Falle des Einsatzes von pBAMD1-2 (Abschnitt 2.3.3.2) wurde 100 µg ml⁻¹ Ampicillin für *E. coli*-Stämme eingesetzt. Für das Wachstum auf festen Platten wurde das Medium mit 2 % Agar-Agar angereichert. Alle verwendeten Medien oder Stammlösungen wurden nach ihrer Herstellung für 20 Minuten bei 121 °C und einem bar Überdruck autoklaviert. Antibiotika-, Vitamin- und Fructoselösungen wurden steril filtriert (Sterilfilter, 0,2 µm, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland).

Material und Methoden

Alle Versuche mit explosionsfähigen Gasgemischen wurden in Luftabzügen mit Sicherheitseinrichtungen durchgeführt, die eine kontinuierliche Freisetzung der Gasgemische unter Einhaltung des Explosionsschutzes ermöglichten.

Tabelle 1: Für diese Arbeit verwendete Stämme. Die getragenen Plasmide können in Tabelle 2 eingesehen werden.

<i>Organismus</i>	<i>Plasmid</i>	<i>Quelle</i>
<i>E. coli</i> WM 3064	relevanter Genotyp: <i>thrB1004 pro thi rpsL hsdS lacZ ΔM15RP4–1360</i>	W. Metcalf, Universität von
JG 98	$\Delta(\text{araBAD})567 \Delta\text{dapA1341}::[\text{erm pir}(\text{wt})]$	Illinois
	pKR_alsSD	pKR_{phb}_alsSD
JG1226		Windhorst & Gescher 2019
	pKR_budC (<i>K. pneumoniae</i>)	pKR_{phb}_alsSD_budC
JG 1304		Carina Windhorst; Diese Arbeit
	pBBR1_alsSD	pBBR1_{phb}_alsSD
JG 1880		Weiler <i>et al.</i> , 2024b
	pBBR1_budC (<i>K. aerogenes</i>)	pBBR1_{phb}_alsSD_budC
JG 1881		Weiler <i>et al.</i> , 2024b
	pBBR1_budC (<i>K. pneumoniae</i>)	pBBR1_{phb}_alsSD_budC
JG 1882		Weiler <i>et al.</i> , 2024b
	pBBR1_budC (<i>E. cloacae</i>)	pBBR1_{phb}_alsSD_budC
JG 1883		Weiler <i>et al.</i> , 2024b
	pBBR1_cag (<i>K. pneumoniae</i>)	pBBR1_{phb}_alsSD_budC_cag
JG 1841		Melanie Knoll; Weiler <i>et al.</i> , 2024b
	pBBR1_cag (<i>E. cloacae</i>)	pBBR1_{phb}_alsSD_budC_cag
JG 1851		Melanie Knoll; Weiler <i>et al.</i> , 2024b
<i>C. necator</i> H16		DSM 428, Schlegel
JG 1070		<i>et al.</i> , 1961; Wilde, 1962
<i>C. necator</i> H16 del	$\Delta\text{acoABC } \Delta\text{phaC1 } \Delta\text{phaC2}$	Windhorst & Gescher 2019
JG 1232		
	pKR_alsSD	pKR_{phb}_alsSD
JG 1233		Windhorst & Gescher 2019

Material und Methoden

<i>Organismus</i>	<i>Plasmid</i>	<i>Quelle</i>
JG 1304 pKR_{budC} (<i>K. pneumoniae</i>)	pKR _{phb_alsSD_budC}	Carina Windhorst; Diese Arbeit
JG 1884 pBBR1_alsSD	pBBR1 _{phb_alsSD}	Weiler <i>et al.</i> , 2024b
JG 1885 pBBR1_budC (<i>K. aerogenes</i>)	pBBR1 _{phb_alsSD_budC}	Weiler <i>et al.</i> , 2024b
JG 1886 pBBR1_budC (<i>K. pneumoniae</i>)	pBBR1 _{phb_alsSD_budC}	Weiler <i>et al.</i> , 2024b
JG 1887 pBBR1_budC (<i>E. cloacae</i>)	pBBR1 _{phb_alsSD_budC}	Weiler <i>et al.</i> , 2024b
JG 1843 pBBR1_cag (<i>K. pneumoniae</i>)	pBBR1 _{phb_alsSD_budC_cag}	Melanie Knoll; Weiler <i>et al.</i> , 2024b
JG 1852 pBBR1_cag (<i>E. cloacae</i>)	pBBR1 _{phb_alsSD_budC_cag}	Melanie Knoll; Weiler <i>et al.</i> , 2024b

Tabelle 2: Plasmide und für ihre Linearisierung verwendete Restriktionsenzyme.

<i>Plasmid</i>	<i>relevanter Genotyp</i>	<i>Restriktionsenzyme</i>	<i>Quelle</i>
pKR _{phb_alsSD}	<i>tc^R</i> , P _{phb} , RSF1010 <i>mob</i> und Replikationsursprung, <i>par</i> , <i>alsSD</i> (Codon optimiert*)	<i>NdeI</i> , <i>BsrGI</i>	Windhorst & Gescher 2019
pKR _{phb_alsSD_budC}	<i>tc^R</i> , P _{phb} , RSF1010 <i>mob</i> und Ursprung der Replikation, <i>par</i> , <i>alsSD</i> und <i>budC</i> (Codon optimiert*)	<i>HindIII</i> , <i>AP</i>	Carina Windhorst; Diese Arbeit
pBBR1MCS-2	<i>km^R</i> , P _{lac} , <i>oriV</i> , <i>mob</i> , <i>lacZa</i>		Kovach <i>et al.</i> , 1995
pBBR1 _{phb_alsSD}	<i>km^R</i> , P _{phb} , <i>oriV</i> , <i>mob</i> , <i>lacZa</i> und <i>alsSD</i> (Codon optimiert*)	<i>XbaI</i> , <i>BamHI</i>	Weiler <i>et al.</i> , 2024b

Material und Methoden

<i>Plasmid</i>	<i>relevanter Genotyp</i>	<i>Restriktionsenzyme</i>	<i>Quelle</i>
pBBR1 _{phb_alsSD_budC}	<i>km^R, P_{phb}, oriV, mob,</i> <i>lacZα, alsSD und budC</i> (Codon optimiert*)	<i>BamHI, HindIII</i>	Weiler <i>et al.</i> , 2024b
pBBR1 _{phb_alsSD_budC_cag}	<i>km^R, P_{phb}, oriV, mob,</i> <i>lacZα, alsSD, budC</i> (Codon optimiert*) und <i>cag</i>	<i>HindIII, XhoI</i>	Weiler <i>et al.</i> , 2024b

* Sequenz der optimierten Gene befindet sich im Anhang unter Anlage B (*alsS, alsD, alle budC* Versionen und *cag*).

Tabelle 3: Zusammensetzung des LB-Mediums (Lennox).

<i>Reagenz</i>	<i>Menge [g l⁻¹]</i>
Trypton	10
Hefeextrakt	5
NaCl	5

Tabelle 4: Zusammensetzung des Minimalmedium Nummer 81.

<i>Reagenz</i>	<i>Menge l⁻¹</i>
Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O	2,9 g
KH ₂ PO ₄	2,3 g
NH ₄ Cl	1 g
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,5 g
NaHCO ₃	0,5 g
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	10 mg
NaVO ₃ * H ₂ O	5 mg
FeNH ₄ Citrat	2,5 mg
Thiamin-HCl * 2 H ₂ O	2,5 mg
Nicotinsäure	2,5 mg
Pyridoxin-HCl	2,5 mg
Ca-Pantothenat	2,5 mg
H ₃ BO ₃	1,5 mg
CoCl ₂ * 6 H ₂ O	1 mg
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	0,5 mg
Riboflavin	0,5 mg
MnCl ₂ * 4 H ₂ O	0,15 mg
Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O	0,15 mg

<i>Reagenz</i>	<i>Menge l⁻¹</i>
NiCl ₂ * 6 H ₂ O	0,1 mg
CuCl ₂ * 2 H ₂ O	0,05 mg
Vitamin B12	0,05 mg
Folsäure	0,01 mg
Biotin	0,005 mg

2.2 Genetische Anpassung der Organismen

2.2.1 Vorarbeiten durch Windhorst und Gescher

Für die Etablierung von acetoinproduzierenden *C. necator* H16-Stämmen wurden die nötigen Produktionsgene für Acetoin von Windhorst und Gescher (2019) unter die Kontrolle des *phaCAB*-Promotorsystems gestellt, wofür zusätzlich der Kohlenstofffluss durch die Deletion der PHB-produzierenden Gene *phaC1* und *phaC2* umgeleitet wurde. Um die Metabolisierung von Acetoin zu verhindern, wurde zusätzlich das *acoABC*-Operon deletiert (Abbildung 7). Die Produktionsgene wurden in ein Produktionsplasmid (pKR) eingebracht und die Effizienzen der resultierenden Produktionsstämme unter verschiedenen Bedingungen bestimmt (Windhorst and Gescher, 2019; Härrer *et al.*, 2021). In dieser Arbeit wurden diese Stämme erweitert und verändert um die Produktion zu optimieren und die Produktion von 2,3-Butandiol zu etablieren.

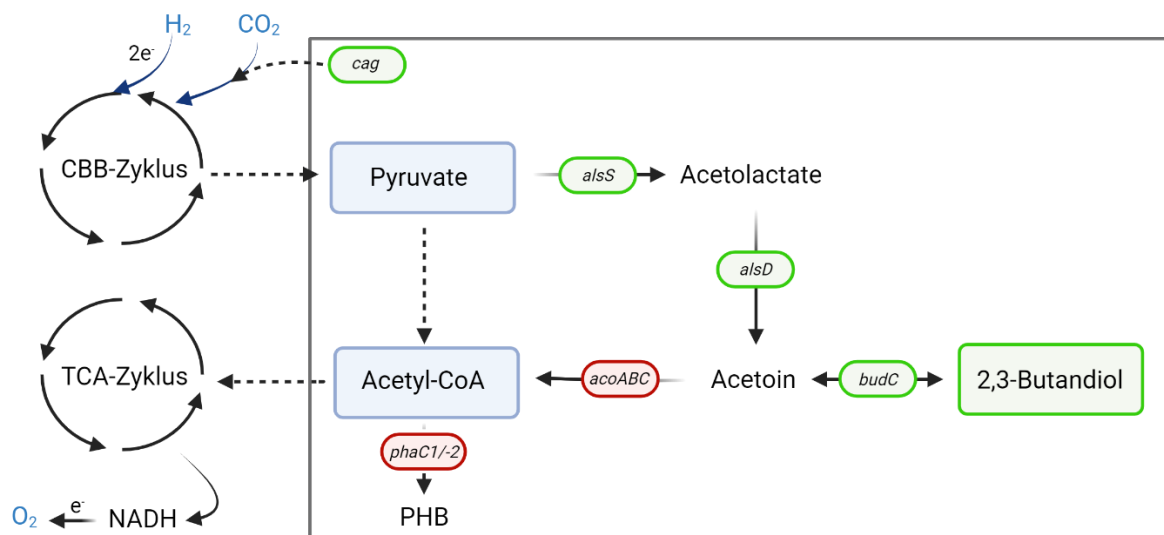


Abbildung 7: Schematischer Elektronenfluss der Produktionsstämme unter autotrophem Wachstum. Alle genetischen Veränderungen sind grau umrandet, wobei Gen(-operon)deletionen in rot und hinzugefügte / überexprimierte Gene in grün dargestellt sind.

2.2.2 Allgemeines

DNA wurde für diagnostische Polymerasekettenreaktionen (PCRs; Abschnitt Polymerasekettenreaktion (PCR) 2.2.42.2.4) mit dem MangoMix (Bioline, Luckenwalde, Deutschland) oder für präparative PCRs mit der Hifi Polymerase (Nippon Genetics Europe, Düren, Deutschland) nach Herstellerangaben amplifiziert. Anschließend wurden die Produkte mittels Gelelektrophorese (Abschnitt 2.2.8) analysiert und isoliert. Zur Aufreinigung der DNA-Produkte und Plasmide wurde entweder das Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System oder das Wizard®Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Mannheim, Deutschland) verwendet. Verwendete Restriktionsenzyme zur Linearisierung von Plasmiden (Abschnitt 2.2.9) wurden von New England Biolabs (Frankfurt, Deutschland) verwendet, während DNA-Oligonukleotide von Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen wurden. Endgültige Konstrukte wurden von Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) sequenziert (Mix2Seq Kit) und mit Unterstützung der molekularbiologischen Werkzeuge von Benchling (San Francisco, USA) mit den *in silico*-Sequenzen verglichen.

2.2.3 Herstellung der Produktionsstämme

Alle verwendeten Oligonukleotidpaare (Primer) und die zugehörigen Gene können in Tabelle 6 eingesehen werden. Konstruierte Plasmide, die hierzu verwendeten Restriktionsenzyme und die generierten Stämme sind in Tabelle 2 aufgeführt.

2.2.3.1 Plasmiderstellungen

Plasmide wurden gemäß Windhorst und Gescher (2019) durch Verwendung des natürlichen *phaCAB*-Promotorsystems sowie der Gene *alsS* und *alsD* zur Acetoin-Produktion aus *B. subtilis* PY79 und des *budC*-Gens zur 2,3-Butandiolproduktion aus *K. pneumoniae*, *K. aerogenes* oder *Enterobacter cloacae* konstruiert. Zusätzlich wurde für nachfolgende Vergleichsexperimente das *cag*-Gen aus *C. necator* hinzugefügt, um die korrespondierende Carboanhydrase höher zu exprimieren. Die *budC*-Gene wurden gemäß der organismenspezifischen Codon-Nutzung von *C. necator* H16 optimiert ((Nakamura *et al.*, 2000); nähere Informationen im Anhang Anlage B) und als DNA-Stränge von Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) synthetisiert. Sofern möglich, wiesen die erworbenen Stränge

bereits die erforderlichen Überlappungen für die entsprechenden Plasmide auf. Kopien der DNA-Stränge wurden durch präparative PCR (Abschnitt 2.2.4) gegebenenfalls unter Erzeugung von Überhängen erzeugt und mittels isothermaler *in vitro* Ligation (Abschnitt 2.2.5) in das entsprechende Plasmid kloniert (Gibson *et al.*, 2009). Leersequenzen, die keine kodierenden Abschnitte enthielten, aber eine Shine-Dalgarno-Sequenz aufwiesen, wurden als Übergänge zwischen den Genen in die DNA-Überhangsequenzen eingefügt. Anschließend wurden die Plasmide in die Zellen konjugiert (Abschnitt 2.2.7). Ein in dieser Arbeit erstelltes Plasmid ist in Abbildung 8 als Beispiel für den Aufbau der Plasmide dargestellt. Weitere Plasmide unterschieden sich lediglich in den *budC*-Varianten oder in der Anwesenheit von *cag*. Die erzeugten Stämme wurden gemäß 2.2.10 gelagert.

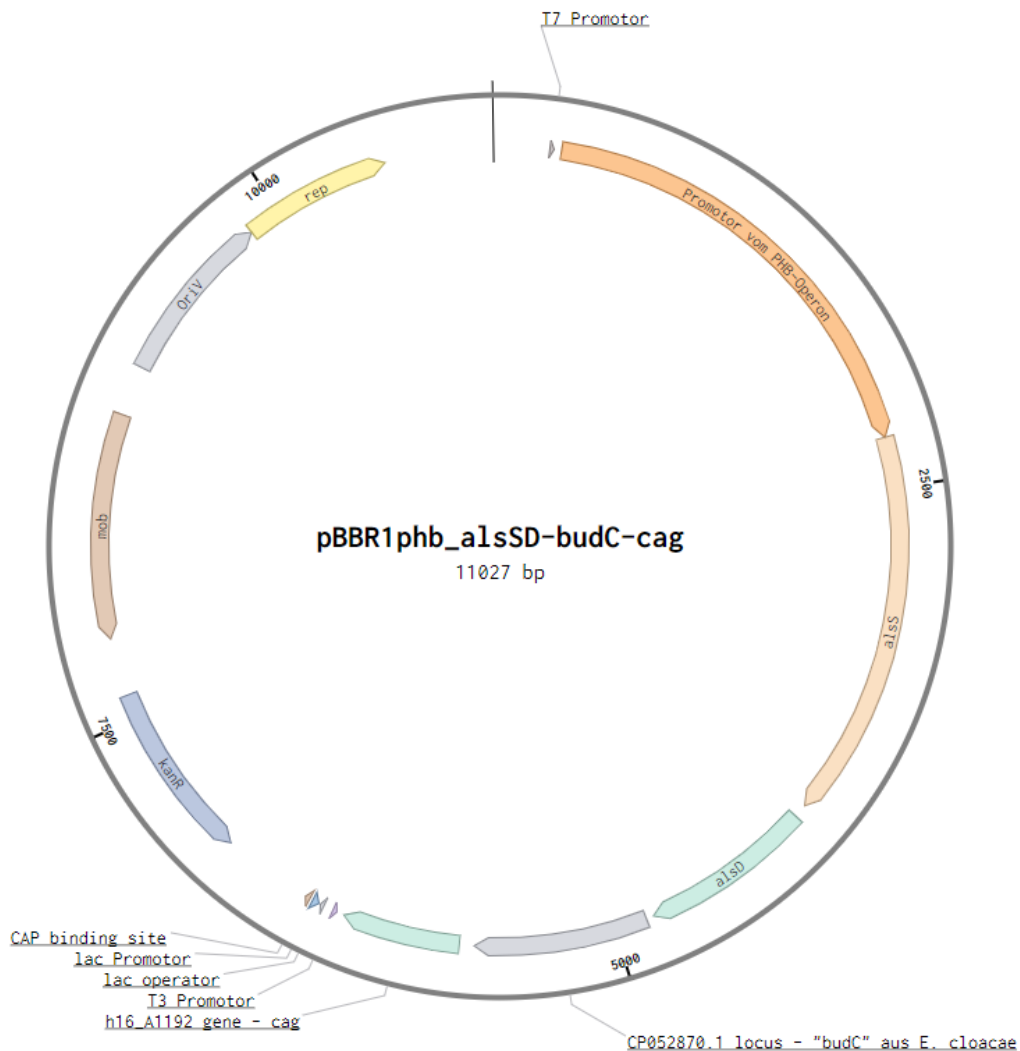


Abbildung 8: Beispielhafte Darstellung eines in dieser Arbeit konstruierten pBBR1-Plasmids mit allen integrierten Zielgenen. Alle weiteren pBBR1-Plasmide unterschieden sich lediglich in den *budC*-Varianten oder in der Anwesenheit von *cag*.

2.2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Spezifische DNA-Abschnitte und -stränge können mithilfe einer PCR amplifiziert und anschließend für Klonierungen oder zur Größenbestimmung in einer Gel-Elektrophorese verwendet werden. Hierfür werden jeweils spezifische Primer eingesetzt die in Tabelle 6 aufgelistet sind. Die PCR kann präparativ im Maßstab von 50 µl mit einer HiFi-Polymerase oder mit einer Taq-Polymerase analytisch im Maßstab von 15 µl oder als Kolonie-PCR durchgeführt werden. Bei einer Kolonie-PCR wird statt einer gelösten DNA-Probe eine Zellkolonie steril von einer Agar-Platte entnommen und in einem vorbereiteten PCR-Ansatz resuspendiert. Alle Ansätze wurden vor der PCR zusätzlich auf einer Sicherungsplatte ausgestrichen und anschließend inkubiert.

Die DNA wurde in PCR-Ansätzen mittels eines zyklischen Programms (Tabelle 5) in Thermozyklern (BioRad, München) amplifiziert. Die Schmelztemperatur der Primer wurde anhand ihrer Sequenz errechnet.

Tabelle 5: Zyklisches Programm einer Polymerasekettenreaktion. Die Schmelztemperatur (T_m) der Primer muss spezifisch anhand ihrer Sequenz bestimmt werden.

<i>Schritt</i>	<i>Dauer [s]</i>	<i>Temperatur [°C]</i>	<i>Zyklen</i>
Initiale Denaturierung	90	95	1
Denaturierung	15	95	
Primeranlagerung	15	T_m (48-72)	35
Elongation	30 / kb	72	
finale Elongation	400	72	1
Endkühlung	∞	4	1

Material und Methoden

Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Primer.

<i>Zielgene</i>	<i>Primer</i>		<i>Sequenz (5' -> 3')</i>	<i>Quelle</i>
<i>phaCAB</i> - Promotor- system	pKR:	2695	CTTCTGTTCTTGGTGGCCTTGGTCAGCATGATTT GATTGTCTCTCTGCCGTCAC	Windhorst & Gescher 2019
		2696	ATGCTTAATGAATTACAACAGTTTTTATGCGTGTG GGGCCGCACC	
	pBBR1:	3464	AATTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTGTGT GGGCCGCACCTAT	Weiler <i>et al.</i> , 2024b
	4126	TGATTTGATTGTCTCTCTGCCGTC		
<i>alsS</i>	pKR:	2588	TGGTCGATGTCTGCGATG	Windhorst & Gescher 2019
		2657	ATGAACAATTCTTAAGAAGGAGATATACATATGC TGACCAAGGCCACC	
	pBBR1:	3464	AATTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTGTGT GGGCCGCACCTAT	Weiler <i>et al.</i> , 2024b
	3465	TATCGAATTCCTGCAGCCCAGGGGATCCACTTATT CAGGCGAGCCTTCGG		
<i>alsD</i>	pKR:	2589	GCGACCGCACCATC	Windhorst & Gescher 2019
		2658	TCTTCTCTCATCCGCCAAAACAGCCAAGCTTTATT CAGGCGAGCCTTCG	
	pBBR1:	3464	AATTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTGTGT GGGCCGCACCTAT	Weiler <i>et al.</i> , 2024b
	3465	TATCGAATTCCTGCAGCCCAGGGGATCCACTTATT CAGGCGAGCCTTCGG		
<i>budC</i> (<i>K. aerogenes</i>)	pBBR1:	3292	ATCGAAACCACCGAAGGCT	Weiler <i>et al.</i> , 2024b
		3514	GAAACCACCGAAGGCTCGCCTGAATAAGTGCAGC ACTAAATAAAGGAGGT	
		3518	CCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTTAGT TGAACACCATGCCAC	
<i>budC</i> (<i>K. pneumoniae</i>)	pKR:	3292	ATCGAAACCACCGAAGGCT	Carina Windhorst
		3293	TAACTGTGATAAACTACCGCA	
	pBBR1:	3515	GAAACCACCGAAGGCTCGCCTGAATAAGTGCAGC ACTAAATAAAGGAGGT	Weiler <i>et al.</i> , 2024b
	3518	CCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTTAGT TGAACACCATGCCAC		
<i>budC</i> (<i>E. cloacae</i>)	pBBR1:	3515	GAAACCACCGAAGGCTCGCCTGAATAAGTGCAGC ACTAAATAAAGGAGGT	Weiler <i>et al.</i> , 2024b
		3519	CCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTTAGT TGAACACCATGCCAC	
<i>cag</i>	<i>K. pneumoniae</i> :	4077	CTGATCGACGGTGGCATGGTGTCAACTAAACCC TGGCCCTTTAAAGTCC	Melanie Knoll; Weiler <i>et al.</i> , 2024b
		4112	GGGAACAAAAGCTGGGTACCGGGCCCCCCCCGGTC GTCAGCCGATCCGC	
	<i>E. cloacae</i> :	4113	CTGATTGATGGTGGGATGGTGTCAACTAAACCCT GGCCCTTTAAAGTCC	Melanie Knoll; Weiler <i>et al.</i> , 2024b
		4112	GGGAACAAAAGCTGGGTACCGGGCCCCCCCCGGTC GTCAGCCGATCCGC	

2.2.5 Isothermale *in vitro* Ligation

Für das Zusammenfügen von DNA-Stücken wurde eine isothermale *in vitro* Ligation nach Gibson *et al.* (2009) durchgeführt, wofür äquimolare Mengen der DNA-Moleküle (linearisiertes Plasmid (Abschnitt 2.2.9) und Zielgen(e)) in ein Enzymgemisch (Tabelle 7) gegeben und anschließend inkubiert wurden. Die Sequenzen müssen hierbei eine Überlappung von 30-50 bp aufweisen, damit die Enzyme der homologen Rekombination entsprechend die Stücke miteinander ligieren können. Eine Exonuklease erzeugt ssDNA (*single stranded*-DNA) aus den überlappenden Bereichen. Anschließend synthetisiert eine Polymerase die DNA-Stränge neu, woraufhin eine Ligase die Rückgratstränge verbindet, wodurch vollständige dsDNA (*double stranded*-DNA) einer einzigen, zusammengefügen Sequenz entsteht. Um die erforderliche Enzymaktivität zu erreichen und die Reaktion zu starten, wird das Gemisch aus 5 µl äquimolaren DNA-Fragmenten (maximal 100 ng) und 15 µl Gibsonansatz für 90 Minuten bei 50 °C inkubiert (Gibson *et al.*, 2009).

Tabelle 7: Zusammensetzung des Gibsonansatzes. Die Zusammensetzung des isothermalen Reaktions- und des Lagerpuffers sind Tabelle 8 und Tabelle 9 zu entnehmen.

<i>Reagenz</i>	<i>Menge [µl]</i>
5x isothermaler Reaktionspuffer	80
iProof Polymerase (2 U µl ⁻¹)	5
Taq DNA-Ligase (40 U µl ⁻¹)	40
T5 Exonuklease (0,1 U µl ⁻¹ verdünnt mit Lagerpuffer)	16
ddH ₂ O	ad 400

Tabelle 8: Zusammensetzung des 5x isothermalen Reaktionspuffers.

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

Tabelle 9: Zusammensetzung des Lagerpuffers der T5-Exonuklease.

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>
1 M Tris / HCl pH 7,5	500 µl
1 M DTT	1 ml
1 M NaCl	10 µl
50 mM EDTA	20 µl
Triton X-100	10 mg
ddH ₂ O	ad 10 ml

Um einen isothermalen *in vitro* Ligationsansatz mittels Elektroporation zu transformieren, wurde der Ansatz zunächst für 30 Minuten auf einer Dialysemembran (MF-Milipore-Membran aus Celluloseestern mit einer Porengröße von 0,025 µm, Merck Milipore, Darmstadt) von Salzen befreit. Die Dialysemembran wurde hierfür auf ddH₂O platziert, woraufhin der Ansatz auf sie pipettiert wurde.

2.2.6 Transformation

Eine auf Elektroporation basierende Transformation wurde an einer *E. coli*-Kultur in der exponentiellen Phase wie nachfolgend beschrieben durchgeführt. Die Zellen wurden aus einer Übernachtskultur für einige Stunden in frischem LB-Medium bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) von 0,4 – 0,6 kultiviert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die optische Dichte bei 600 nm wurde mithilfe eines Thermo Fisher Scientific Spectronic Genesys 20 Spektrophotometers (Darmstadt, Deutschland) gemessen. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit eisgekühltem ddH₂O gewaschen, um die Salze des Mediums zu entfernen und ein Volumen von 150 µl wurde mit dem zu transformierenden DNA-Gemisch aus Abschnitt 2.2.5 vermischt. Die Probe wurde in eine gekühlte Elektroporationsküvette (Gene Pulser Küvetten, Elektrodenabstand 1 mm, Bio-Rad, München) pipettiert und in einen MikroPulser (Biorad, München) eingesetzt. Mittels einer Spannung von 1,5 kV für 5 ms wurde die Zellmembran der Bakterien depolarisiert, um den Eintritt von beigemischtem DNA-Konstrukten zu ermöglichen. Die Zellen wurden danach sofort in 1 ml LB-Medium aufgenommen und bei 37 °C inkubiert, um sie zu regenerieren. Anschließend wurden sie auf Agar-LB-Platten mit dem entsprechenden Selektionsfaktor ausgebracht.

2.2.7 Konjugation

Da die Methoden der chemischen Transformation oder Elektroporation für *C. necator* nur sehr schlechte Effizienzen aufweisen (Tee *et al.*, 2017), wurden Plasmide mithilfe einer Konjugationsmethode mit einem Donorstamm übertragen. Der Donorstamm *E. coli* WM 3064 lässt sich einfach kultivieren und transformieren und ist in der Lage Zell-Zell-Kontakte auszubilden, um DNA zu übertragen. Um den direkten Zellkontakt zu ermöglichen, wurden beide Stämme gemeinsam auf DAP-LB-Agar-Platten (0,3 mM) kultiviert, indem sie übereinander ausgestrichen wurden. Nach 24-stündiger Inkubation bei einer Temperatur von 30 °C wurden die Zellen mit einer LB-Medium-Lösung abgespült und gewaschen. Anschließend wurden sie in Volumina von 20, 50 und 200 µl auf LB-Agar-Platten ausgestrichen, die das jeweilige Antibiotikum für den entsprechenden Selektionsdruck enthielten. Um sicherzustellen, dass aufgrund des Plasmids der Empfänger- jedoch nicht der Donorstamm wachsen kann, wurde in diesem Schritt auf DAP verzichtet. Um ein Plasmid im Organismus zu etablieren wurde jeweils zuvor sichergestellt, dass es einen Replikationsursprung trägt der von *C. necator* verwendet werden kann.

2.2.8 Gelelektrophorese

Zur Größenauftrennung von DNA-Fragmenten wurde die Gelelektrophorese-Methode angewendet. Dazu wurde Agarose (0,6 % (w/v) für Fragmente größer als 10 kb, 1 % für Fragmente von 500 bp bis 10 kb und 2 % (w/v) für Fragmente kleiner als 500 bp) in 1x TAE-Puffer (TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)-Acetat-EDTA (Ethyldiamin-tetraessigsäure)-Puffer, Tabelle 10) aufgekocht und anschließend mit 0,5 µg µl⁻¹ Midori-Green (Nippon Genetics, Düren) versetzt. Nachdem das Gel auspolymerisiert war, wurden die DNA-Proben und der Referenzmarker (GeneRuler 1 kb, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt oder 50 bp DNA Ladder, New England Biolabs, Schwalbach) mit 6x DNA-Ladepuffer (Tabelle 11) versetzt. Zur Auftrennung der DNA entlang eines elektrischen Feldes wurde eine konstante Spannung von 120 V für 20 bis 30 Minuten angelegt.

Material und Methoden

Tabelle 10: Zusammensetzung des TAE-Puffers.

<i>Reagenz</i>	<i>Konzentration [g l⁻¹]</i>
TRIS	4,85
EDTA	0,37

pH-Wert wurde anschließend mit Acetat auf 8 eingestellt.

Tabelle 11: Zusammensetzung des 6x Ladepuffers.

<i>Komponente</i>	<i>Menge (für 15 ml)</i>
Xylene cyanol	0,05 g
Orange G	0,05 g
Glycerin	12 ml
50x TAE-Puffer	1,5 ml

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

2.2.9 Restriktion

Für die gezielte Öffnung von DNA-Fragmenten wurden Restriktionsenzyme (New England Biolabs, Schwalbach) verwendet. Der Restriktionsansatz (Tabelle 12) wurde für eine Stunde inkubiert, wobei die Inkubationstemperatur gemäß den Anweisungen des Herstellers gewählt wurde.

Tabelle 12: Restriktionsansatz für das Linearisieren von Plasmiden

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>
10x Puffer	5 µl
Plasmid	1-5 µg
Restriktionsenzym(-e; jeweils)	1 µl µg ⁻¹ Plasmid
ddH ₂ O	ad 50 µl

Die verwendeten Restriktionsenzyme sind in Tabelle 2 aufgelistet und den jeweiligen Plasmiden zugeordnet. Bei der Verwendung von lediglich einem Restriktionsenzym wurde für eine Dephosphorylierung der 3'-Enden und damit zur Verhinderung einer Religation nach 45 Minuten 1 μ l alkaline Phosphatase (AP) hinzugefügt.

2.2.10 Kryokonservierung

Für eine Langzeitaufbewahrung von erzeugten Bakterienstämmen erfolgte eine Kryokonservierung. Hierzu wurde 1 ml einer dicht bewachsenen Flüssigkultur in einem Gefriergefäß mit 300 μ l Glycerin versetzt und sofort in flüssigem N₂ eingefroren. Die anschließende Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.3 Versuchsaufbau und -durchführungen

2.3.1 Wachstumsexperimente mit *C. necator*

Experimente zur Analyse des Wachstums eines Wildtyp-Stamms von *C. necator* H16 (WT; Abschnitt 3.2) wurden mit einem Infinite200Pro-Plattenlesegerät (Tecan Trading AG, Schweiz) über mehrere Tage bis zum Erreichen einer Plateauphase durchgeführt. Vorkulturen wurden zwei Nächte in LB bei 30 °C und 180 rpm kultiviert. Die Experimente wurden in dreifacher Ausführung in einer 96-Well-Mikrotiterplatte bei 30 °C in MM mit 50 mM Fructose für Butandiol- und 10 mM Fructose für die pH-Wachstumsversuche durchgeführt. Die OD₆₀₀ wurde stündlich nach einer zweiminütigen Schüttelphase bei 180 rpm und einer einminütigen Ruhephase gemessen. In der Vorbereitung wurden die Platten mit 200 μ l des vorbereiteten Mediums befüllt, das aufsteigende Konzentrationen von 2,3-Butandiol oder Fructose sowie Medium mit aufsteigenden pH-Werten enthielt. Die Versuche wurden mit einem OD₆₀₀-Wert von 0,05 begonnen. Alle Werte wurden im Anschluss an die Vorbereitung durch HPLC-Messungen (Abschnitt 2.4.2.2) oder durch pH-Wert-Messungen (FiveEasy Standard-Tischmessgerät, Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland) bestätigt.

2.3.2 Produktionstests von Plattformchemikalien

Im Anschluss an die Herstellung wurden Produktionsversuche mit den Produktionsstämmen durchgeführt (Abschnitt 3.3). Hierfür wurden die Zellen zur Verkürzung der Adaptationsphase für Produktionsversuche über Nacht in LB-Medium vorkultiviert und anschließend zwei weitere Nächte in MM 81 entsprechend Abschnitt 2.1 angezogen. Für Versuche mit Tetracyclin wurde alle 48 h die Konzentration durch erneute Zugabe des Antibiotikums aufgefrischt. Für heterotrophe Versuche wurden sterile 500 ml Kolben mit 300 ml MM mit einer OD_{600} von 0,05 beimpft. Die autotrophen Versuche wurden hingegen bei einer $OD_{600} = 4$ in sterilen, gasdichten 1 l Flaschen mit Gummistopfen zur Probenahme durchgeführt, welche mit 50 ml MM 81 befüllt waren. Die Flaschen wurden für 30 Minuten in wechselnden 2-Minuten-Zyklen mit Vakuum und N_2 -Zugabe bei einem Druck von 1 bar entgast. Anschließend wurde für 20 Minuten ein Vakuum angelegt und die Flaschen wurden mit dem Gasgemisch für die Kultivierung unter atmosphärischem Druck befüllt. Die Zusammensetzung wurde darauffolgend durch eine Mikro-GC-Messung bestimmt (Abschnitt 2.4.2.4). Proben von je 1 ml wurden regelmäßig entnommen und mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC; Abschnitt 2.4.2.2) auf den Gehalt an Fructose und Acetoin hin untersucht. Für die Bestimmung der Konzentration von 2,3-Butandiol wurde die HPLC und für die Bestimmung der Isomere die Gaschromatographie (GC; Abschnitt 2.4.2.3) verwendet. Proben für die Gasmessungen wurden mit einer Kanüle durch Gummikappen entnommen und sofort manuell in die Mikro-GC gegeben (Abschnitt 2.4.2.4). Druckentwicklung, die durch Kultivierung oder Probenahme verursacht wurde, wurde durch Zugabe von N_2 auf atmosphärischen Druck ausgeglichen.

2.3.3 Mutations- und Biofilmuntersuchungen an *C. necator*

Um Mutationen zu untersuchen, die die Langzeitproduktion von Plattformchemikalien beeinträchtigen können (Abschnitt 3.1), und einen Einblick in die Biofilmbildung von *C. necator* zu gewinnen (Abschnitt 3.5), wurde ein etabliertes mikrofluidisches Biofilmkultivierungssystem verwendet (Hansen *et al.*, 2019). Dieses ermöglicht eine ständige Zufuhr von frischem Medium in einem geringen Volumen, wodurch eine zeitnahe Analyse des Durchflusses ermöglicht wird. Die mikrofluidischen Fließzellen wurden aus Polymethylsiloxan (PDMS) produziert und hatten einen geraden, eingebetteten Kanal mit

einem Volumen von 354 μl und den Maßen 54 x 3 x 2 mm (Länge x Breite x Höhe). Die hierbei verwendeten Zellen wurden mithilfe des Sylgard® 184 Silicone Elastomer Kit (Dow Corning, Michigan, USA) hergestellt. Dazu wurde PDMS in eine Messing-Negativform gegossen und bei 60 °C für 2 Stunden ausgehärtet. Während der Aushärtung wurden Platzhalterkanülen mit jeweils drei Auslässen für Medienz- und -abfluss sowie für die Inokulation der Organismen eingesetzt (Abbildung 9).

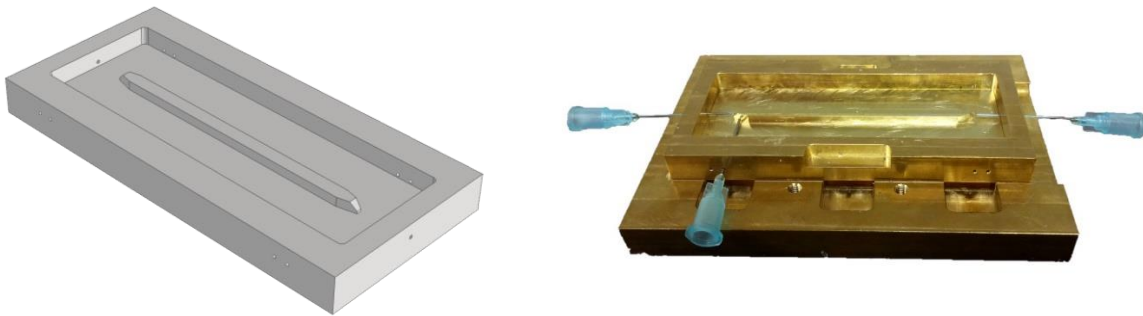


Abbildung 9: Gussform aus Messing zur Herstellung von PDMS-Kultivierungsfließzellen mit geradem Kanal. Auf der linken Seite ist ein digitales Modell dargestellt, während auf der rechten eine Fotografie zu sehen ist. Platzhalterkanülen werden nach dem Aushärten des Zellenkörpers entfernt, um einen Zugang zum Kanal zu ermöglichen.

Anschließend wurden sie durch Sauerstoffplasmabehandlung (SmartPlasma 10 Pro der Firma Plasma Technology, Herrenberg, Deutschland) kovalent an den Silikonkörper gebunden und mittels eines 1 mm dicken Deckglases verschlossen.

Um den Kultivierungskanal nach der Fertigstellung der Fließzelle zugänglich zu machen, wurden die stumpfen Platzhalterkanülen entfernt und durch durchlässige Kanülen (Durchmesser 0,8 mm) ersetzt. Über diese Kanülen wurden die Fließzellen an ein Silikonschlauchsystem angeschlossen, welches einen Innendurchmesser von 1,5 mm besaß (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und eine stabile Versorgung des Kultivierungskanals mit Medium durch Peristaltikpumpen (Modell: Reglo ICC, ISMATEC-Produktlinie, Cole-Parmer, Wertheim, Deutschland) erlaubte. Für den Zusammenbau der Komponenten wurden Luer-Verbinder verwendet, wobei zusätzlich Dreiweghähne eingesetzt wurden, um den Wechsel zwischen Inokulation oder Medien zu ermöglichen. Am Anfang und am Ende des Schlauchsystems waren Sammelgefäße positioniert, die der Medienver- und -entsorgung dienten. Zur Druckkompensation wurden an den Gefäßen Kanülen mit einem Sterilfilter (0,2 μm , Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) angebracht. Die Bestandteile des Systems wurden nach der Herstellung für 20 Minuten bei 121 °C und 1 bar Überdruck autoklaviert.

Anschließend wurden sie in einer Sterilbank zusammengesetzt (Thermo Scientific MSC-Advantage-Sicherheitswerkbank, Fisher-Scientific, Schwerte, Deutschland).

Falls notwendig, wurden Antibiotika von einem zusätzlichen Vorratsbehältnis vor der Fließzelle dem Medium zugemischt. Hierbei wurden Medium und Antibiotika in ein, der Fließzelle vorgeschaltetes Mischgefäß mit 1 ml Volumen, geleitet. Eine schematische Übersicht der Aufbauten ist in Abbildung 10 zu finden.

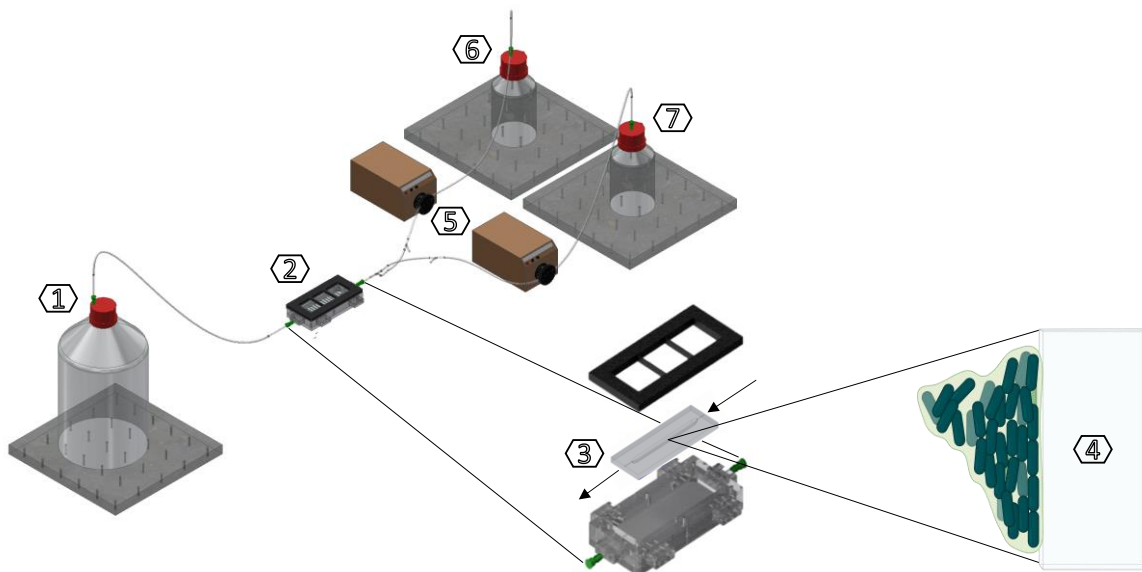


Abbildung 10: Schematischer Aufbau des Biofilmkultivierungssystems für die Mutations- und Biofilmuntersuchung an *C. necator* mit Nummerierungen an Auffangbehälter (1), Kultivierungsfließzelle (2), einer Vergrößerung der Kultivierungsfließzelle in einer Halterung (3), einer schematischen Darstellung des Biofilms an PDMS (4), Peristaltikpumpen (5), Medienbehältnis (6) und optionalem Antibiotikumsbehältnis (7).

Mit Hilfe des transparenten PDMS waren Aufnahmen des Biofilms durch optische Kohärenztomographie (*optical coherence tomography*; OCT; Abschnitt 2.4.2.1) möglich um das Volumen und die Höhe des entstehenden Biofilms zu messen.

2.3.3.1 Mutationen bei Langzeitproduktionen

Um Langzeitproduktionen mit *C. necator* zu untersuchen, wurden Kulturen des acetoinproduzierenden Stammes #1233 (Tabelle 1) in einem Triplikat heterotroph mit MM und 10 mM Fructose bei 30 °C im zuvor beschriebenen mikrofluidischen Kultivierungssystem kultiviert (Abschnitt 3.1). Das Durchflusssystem wurde eingesetzt, um die Produktion unmittelbar zu analysieren, indem Proben durch eine Kanüle direkt hinter der

Fließzelle entnommen wurden. Bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 4 ml h^{-1} des Mediums entsprach die Retentionszeit im Kanal 5,3 Minuten, sodass eine Analyse der Produktion innerhalb von Minuten möglich war. Das benötigte Antibiotikum Tetracyclin wurde aus einem zusätzlichen 5 l Vorratsbehälter direkt vor dem Kanal zum Medium hinzugefügt, um die Umsetzung des Antibiotikums durch die lange Lagerungszeit im Medium von 14 Tagen bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ zu minimieren. Aufgrund der langen Lagerzeit des Mediums und des Antibiotikums wurden Versuche zur Stabilität von beiden durchgeführt (Abschnitt 3.1.1). Proben wurden, wenn möglich, täglich genommen und mittels HPLC (Abschnitt 2.4.2.2) auf die Acetoin- und Fructosekonzentration hin untersucht. Aufgrund der geringen Mengen wurden die Acetoinmessungen durch einen optischen Voges-Proskauer-Test bestätigt (Abschnitt 2.4.2.5). Zusätzlich wurde das Biofilmvolumen der einzelnen Kulturen durch OCT bestimmt (Abschnitt 2.4.2.1). Die Versuche wurden beendet, sobald die Produktion unter $0,5 \text{ mM}$ Acetoin pro Minute fiel, indem der Biofilm mit einer 10 ml sterilen Spritze aus dem Kanal gedrückt und in einem $1,5 \text{ ml}$ Reaktionsgefäß aufgefangen wurde. Die Biofilmproben wurden mit 33% Glycerin gemischt, in flüssigem N_2 eingefroren und bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert um anschließend gDNA zu isolieren (Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega, Mannheim, Deutschland) und eine Genomsequenzierung durchzuführen.

Die Sequenzierung wurde mit zwei verschiedenen Techniken durchgeführt (Abschnitt 2.4.1), da diese jeweils eine hohe Auflösung im Bereich von Einzelbasen oder von großen Sequenzabschnitten ermöglichen. Somit wurde sichergestellt, dass sowohl Einzelbasenmutationen als auch Transposonintegrationen verlässlich erkannt werden konnten, wobei der ursprüngliche Inokulationsstamm als Referenz ebenfalls sequenziert wurde. Illuminasequenzierungen (Abschnitt 2.4.1.1) wurde von Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) mit einer Sequenziertiefe von 20 Millionen Sequenziersträngen pro Probe durchgeführt, während die Nanoporesequenzierung (Abschnitt 2.4.1.2) mit einer Sequenziertiefe von 80.000 Sequenziersträngen durchgeführt wurde. Hierfür wurde ein Native Barcoding Ligation Kit 24 (V14) (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK) eingesetzt. Die Sequenzierungen wurden im Anschluss mit der Software CLC Genomics Workbench Version 20 (Qiagen N.V., Venlo, Niederlande) analysiert, wobei eine Variantenhybriddatei aus beiden Sequenzierungen erstellt wurde, die als Vergleichssequenz die häufigsten Mutationen gemeinsam in eine Matrix zusammenführt, wodurch unterrepräsentierte Mutationen ausgeschlossen wurden. Diese Variantenmatrix wurde anschließend mit den Annotierungen eines *C. necator* H16-Genoms von der NCBI-

Datenbank (GeneBank Sequenz GCA_004798725.1) verglichen, sodass mutierte Gene durch ihre Namen identifiziert werden konnten. Im Anschluss wurde die Variantensequenz in RStudio Version 5.12.10 (Posit PBC, MA, USA) analysiert. Hierbei wurde der planktonische Referenzstamm, der ursprünglich als Inokulation diente, als Kontrolle verwendet, um bereits existierende Mutationen zu filtern und neue zu identifizieren.

2.3.3.2 Biofilmbildung in *C. necator*

Um Gene zu identifizieren, die bei *C. necator* einen Einfluss auf die Biofilmbildung haben, wurde der WT-Stamm (#1077; Tabelle 1) in Triplikaten über drei verschiedene Zeiträume heterotroph bei 30 °C und einem Durchfluss des MM mit 10 mM Fructose von 4 ml h⁻¹ kultiviert. Die Zeitpunkte wurden in einem vorherigen Versuch bestimmt, um einen Biofilm zu Beginn, in der Hochphase und am Ende der Entwicklung zu erfassen. Die Kultivierungen wurden nach 18,75, 75 und 300 Stunden beendet, indem der Biofilm aus den Kultivierungszellen mit einer 10 ml Spritze gedrückt und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgefangen wurde. Die Biofilmproben wurden anschließend sofort in RNAprotect (Qiagen N.V., Venlo, Niederlande) aufgenommen und mit flüssigem N₂ eingefroren. Als Referenz wurde der Inokulationsstamm dreifach planktonisch in LB-Medium in einem Kolben bei 180 rpm und 30 °C für 48 Stunden angezogen und vergleichbar geerntet. Die Proben wurden anschließend bei -80 °C gelagert, bis RNA isoliert und bei Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) mittels Illuminasequenzierung (Abschnitt 2.4.1.1) mit einer Sequenziertiefe von 100 Millionen Sequenzsträngen sequenziert wurde. Die Gene wurden bezüglich Änderungen in der Translation im Vergleich zu den planktonischen Proben untersucht, mit dem Kontrollstamm korreliert und mit einem Referenzgenom (GeneBank Sequenz GCA_004798725.1) bezüglich der Annotationen verglichen.

Für einen zusätzlichen Vergleichsversuch wurde im Inokulationsstamm eine Tn5-Mutationsbibliothek erstellt. Ziel dabei war es, in jedem nicht-letalen Gen eine Insertion einer Kanamycinresistenz zu erreichen, da diese im Anschluss als Signalsequenz genutzt werden kann, um die betroffenen Gene zu identifizieren. Hierzu wurde das Transposonplasmid pBAMD 1-2 (Addgene, Watertown, USA) verwendet, welches das bakterielle Transposonsystem Tn5 trägt. Durch dieses System findet eine Relokalisierung des Transposons nur statt, solange das Plasmid stabil in der Zelle vorliegt, da die Transposase nicht zwischen den Erkennungssequenzen des Transposons liegt (Abbildung 11). Da der

vorhandene Ori R6K von *E. coli* jedoch durch das Fehlen des Pi-Proteins nicht von *C. necator* verwendet werden kann, ist das Transposon lediglich zum Zeitpunkt der Konjugation aktiv. Daraus resultierend sind eine geringe Sprungfrequenz und Insertionsrate zu erwarten. Das Plasmid trägt zwei zusätzliche Antibiotikaresistenzkassetten, von denen eine für eine Kanamycinresistenz und die andere für eine Ampicillinresistenz kodiert. Die Kanamycinresistenz liegt innerhalb der Grenzsequenzen des Transposons, die Ampicillinresistenz ist jedoch auf dem Rückgrat des Plasmids gelegen wodurch die Stabilisierung des Plasmids oder der Genommutationen selektiv ermöglicht ist. Die Integration des Plasmids wurde gemäß dem Abschnitt 2.2.7 unter Verwendung von Ampicillin für *E. coli* WM 3064-Kulturen und Kanamycin für *C. necator*-Kulturen durchgeführt.

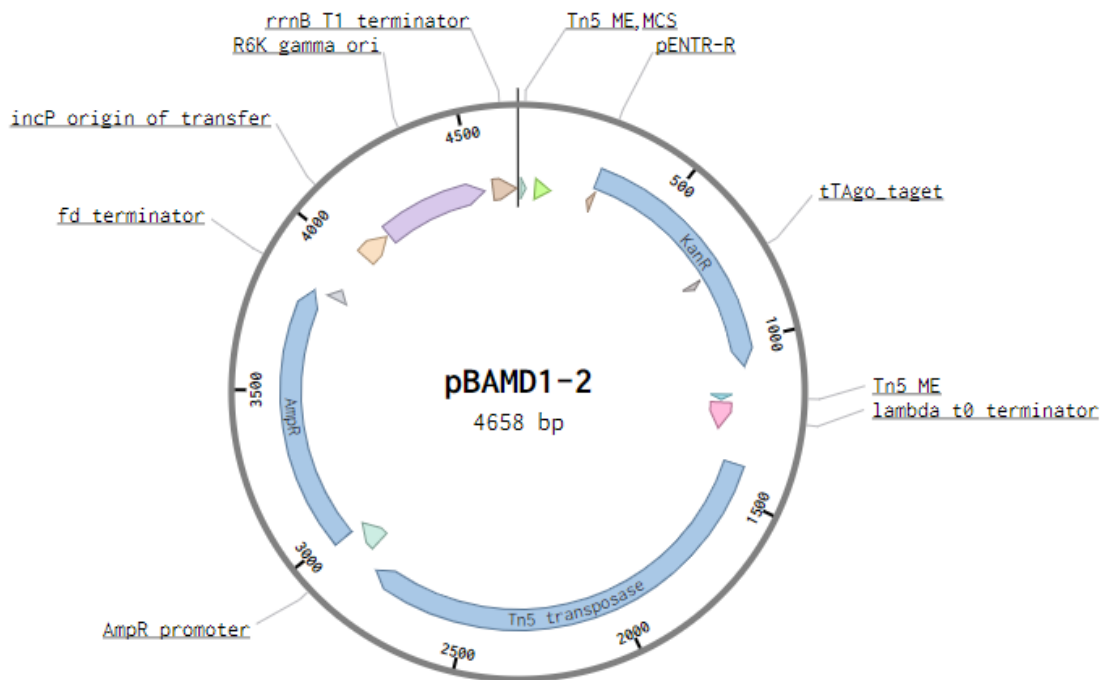


Abbildung 11: Abbildung des pBAMD1-2 Plasmids. Es sind alle für das System essentiellen Gene sowie die zugehörigen Promotoren, Terminatoren und der Replikations- und Transferursprung des Plasmids dargestellt. Die mobile Sequenz des Tn5-Transposons befindet sich zwischen den Erkennungssequenzen (TN5 ME) und beinhaltet eine Kanamycinresistenz (KanR) sowie eine Insertionsstelle (*multiple cloning site*, MCS). Auf dem Rückgrat des Plasmids befinden sich zusätzlich eine Ampicillinresistenz (AmpR), das Schlüsselenzym des Transposons (Tn5-Transposase), der Transferursprung (*incP origin of transfer*) sowie der Replikationsursprung (R6K gamma ori).

Um eine ausreichende Abdeckung an Transformanten zu erreichen, wurde berechnet welche minimale Anzahl an Konjugationen benötigt werden, um eine Abdeckung von mindestens

einer Mutation in jedem Gen zu einer Wahrscheinlichkeit von 90 % zu erzielen. Folgende Formel stellt den Zusammenhang zwischen der Anzahl an benötigten Transformanten (n) und der Wahrscheinlichkeit einer Integration der tDNA ($P = 90\%$) in alle Gene basierend auf der Genomgröße ($G = 7.400\text{ kb}$) und der durchschnittlichen Größe eines Gens ($x = 1\text{ kb}$) von *C. necator* dar, wobei die Annahme einer zufälligen Insertion zu Grunde gelegt wird (Krysan *et al.*, 1999).

$$\text{Integrationswahrscheinlichkeit [\%]} = 1 - \left(1 - \frac{x}{G}\right)^n$$

$$0,9 = 1 - \left(1 - \frac{1}{7.400}\right)^n$$

$$n = 17.038$$

Um die nötige Anzahl von > 17.000 Transformanten zu erreichen, wurden Verdünnungsreihen von Kulturen der an der Konjugation beteiligten Stämme angelegt und auf LB-Agar-Platten ausgestrichen, um die Anzahl koloniebildender Zellen zu testen. Anschließend wurden beide Kulturen getrennt in flüssigem LB-Medium angezogen bis eine $OD_{600} = 0,6$ erreicht wurde, woraufhin die entsprechende Menge von mindestens 1.000 koloniebildenden Zellen von beiden Organismen zusammen auf 20 Agar-LB-Platten ausgestrichen und anschließend für 2 Tage bei 30 °C inkubiert wurden. Durch Auszählung der Kolonien wurde sichergestellt, dass die mindestens nötige Koloniezahl beider Organismen erreicht wurde.

Nach der endgültigen Kultivierung der *C. necator*-Kulturen auf LB-Agar mit Kanamycin, jedoch ohne DAP, wurden die entstandenen Kolonien mit 10 ml flüssigem LB-Medium abgespült, erneut auf 20 LB-Platten mit Kanamycin ausgebracht, um etwaige *E. coli*-Zellen zu entfernen, anschließend gespült und mit 33 % Glycerin bei -80 °C eingelagert. Um die benötigte Verteilung der Mutationen zu bestätigen wurden die Kulturen genomisch sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte mit Nanoporesequenzierung (Abschnitt 2.4.1.2). Um die nötige Tiefe der Sequenzierung zu erreichen, wurde die Kanamycinsequenzen der Mutationen künstlich während der Sequenzierung angereichert. Hierfür wurde das Restriktionsenzym XmnI identifiziert, was durch seine Erkennungssequenz von 10 Basen hochspezifisch ist. Daher schneidet es genau einmal innerhalb der Resistenzsequenz jedoch nur wenige Male im Genom. Zusätzlich wurde adaptiv sequenziert (Abbildung 12), indem für jeden Strang lediglich die ersten 670 bp bestimmt wurden und dann mit der erwartbaren

Sequenz der Kanamycinresistenz um den XmnI-Schnitt verglichen wurden. Durch Vergleichsexperimente konnte bestimmt werden, dass durch dieses Verfahren die Mutationssequenz um das 7,7-fache angereichert und die nötige Zeit und die Kosten der Sequenzierung um das gleiche gesenkt werden konnten, um die statistisch nötige Tiefe der Sequenzierung zu erreichen.

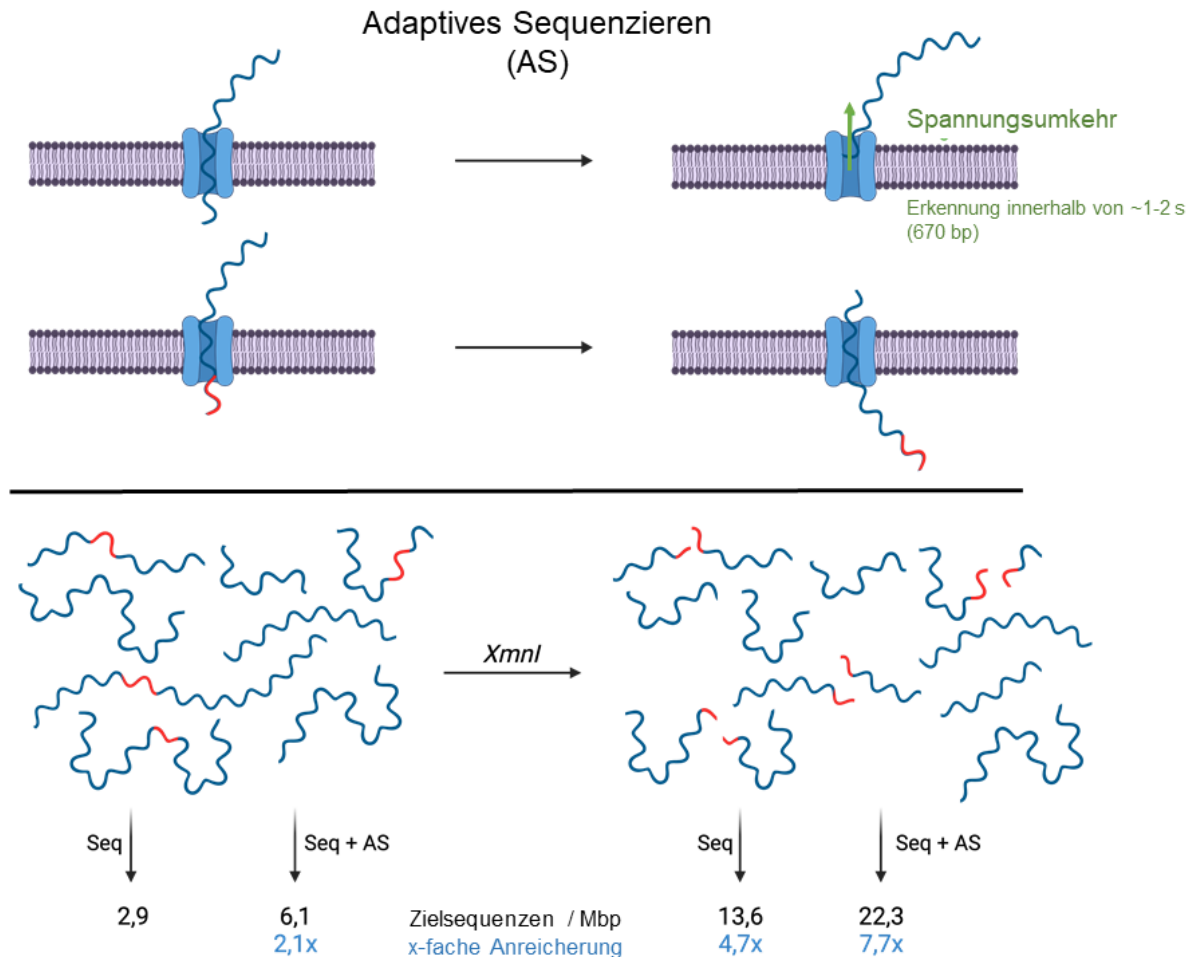


Abbildung 12: Schema der angewandten Sequenzier- und Anreicherungs-methode. Adaptives Sequenzieren ermöglicht die Erkennung und den Vergleich der ersten Basen einer Sequenz, welche nur weiter analysiert wird, wenn sie der Referenz entspricht (in Rot dargestellt) und sonst wieder aus der Pore ausgeworfen wird (obere Hälfte). Die untere Hälfte der Abbildung zeigt die Vergleichsversuche die zur Anreicherungs-technik durchgeführt wurden. Die Zielsequenz (in Rot dargestellt) trägt die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym XmnI. Seq = Sequenzieren; AS = adaptives Sequenzieren; XmnI = Restriktionsenzym mit 10 Basen Erkennungssequenz.

2.3.4 Aufreinigung von 2,3-Butandiol

Um die vollwertige Etablierung der Produktion von Plattformchemikalien durch *C. necator* zu gewährleisten, wurde die Aufreinigung der Produkte aus der Fermentationsflüssigkeit untersucht (Abschnitt 3.4). Dabei wurden verschiedene Techniken getestet und das Wachstum des Organismus in Verbindung mit den verwendeten Stoffen untersucht. Zur Aufreinigung wurden verschiedene Flüssig-Flüssig-Verfahren getestet, darunter ein wässriges Zweiphasensystem (*aqueous two phase system*; ATPS) aus 2-Propanol und Ammoniumsulfat (Sun *et al.*, 2009) sowie Extraktionen mit Oleylalkohol (Anvari and Khayati, 2009), Methylacetat (Pfaller and Rüdinger, 2012) und Rizinusöl. Die Auswahl der Verfahren erfolgte unter Berücksichtigung der Möglichkeit kontinuierliche Fermentationen durchzuführen, indem die Zellen nach den Extraktionen weiterhin Aktivität aufweisen. Während das ATPS eine Extraktion darstellt, bei der die die Aufreinigung in einem zweiten Schritt durchgeführt werden muss, wurde von den anderen Verfahren berichtet, dass eine Aufreinigung während der Fermentation möglich ist (Anvari and Khayati, 2009; Sun *et al.*, 2009), wobei die Extraktionsmittel zu der Fermentationsbrühe hinzugegeben werden.

Alle Verfahren wurden mit einer 2,3-Butandiollösung mit Konzentrationen von 75 bis 150 g l⁻¹ in ddH₂O und in einem Gesamtvolumen von 100 ml durchgeführt. Die Konzentration der Anfangslösungen wurde jeweils durch HPLC-Messungen (Abschnitt 2.4.2.2) bestimmt. Nach der Aufreinigung und der Trennung der Phasen wurde die 2,3-Butandiolkonzentration im wässrigen Anteil erneut gemessen, wobei die Differenz von 2,3-Butandiol als extrahiert betrachtet wurde. Die Lösungen wurden für 30 Minuten mithilfe eines Magnetrührers vermischt und anschließend mehrere Stunden bei Raumtemperatur ruhen gelassen, bis Phasen eindeutig unterschieden und mit einer Pipette getrennt werden konnten. Die Versuche wurden jeweils in Triplikaten durchgeführt.

Das ATPS wurde gemäß den Angaben der Autoren angewandt (Sun *et al.*, 2009), indem es unter Verwendung von 34 % (w/w) 2-Propanol und 20 % (w/w) Ammoniumsulfat angewendet wurde. Hierbei wurde untersucht ob die von den Autoren berichtete Aufreinigungseffizienz von 93 % reproduziert werden konnte. Bei diesem Verfahren führt das Ammoniumsulfat dazu, dass 2-Propanol aus der wässrigen Phase verdrängt wird, wobei das 2,3-Butandiol in der 2-Propanolphase verbleibt. Es wurden ebenfalls Ammoniumsulfatkonzentrationen von 15, 20 und 25 % sowie 2-Propanolkonzentrationen

von 20 und 40 % getestet, um eine optimale Extraktion mit möglichst niedrigen Konzentrationen zu identifizieren.

Die Extraktion mit Oleylalkohol erfolgte nach Angaben der Autoren (Anvari and Khayati, 2009) bei einer Konzentration von 20 % (v/v). Da Oleylalkohol in höheren Reinheitsgraden kostenintensiv ist und sich daher auf die Wirtschaftlichkeit auswirkt, wurden auch Anteile von 5, 10, 15 und 25 % (v/v) getestet.

Rizinusöl wurde als mögliche Alternative getestet, da es preisgünstig in hohen Reinheiten erhältlich ist und ähnliche Polaritäten wie Oleylalkohol aufweist. Um einen Vergleich zu ermöglichen, wurden Konzentrationen von 5, 10, 15, 20 und 25 % (v/v) für die Extraktion getestet.

Methylacetat wurde in einem Patent als effiziente Extraktionschemikalie für 2,3-Butandiol beschrieben (Pfaller and Rüdinger, 2012), wobei ebenfalls eine Extraktion während einer Fermentation mit *K. terrigena* gezeigt werden konnte. Hierbei wurde die Separation durch eine Zentrifugation (Sorvall RC-5C Plus, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bei 10.000 g für 10 min unterstützt. Es wurden ebenfalls Anteile von 5, 10, 15, 20 und 25 % (v/v) auf maximale Extraktion getestet.

Nachdem die Aufreinigung von 2,3-Butandiol durch unterschiedliche Konzentrationen bestätigt wurde, wurden die effizientesten Anteile der Mittel im Hinblick auf toxische Effekte in Wachstumsversuchen mit *C. necator* getestet. Zu diesem Zweck wurden Versuche in Triplikaten mit dem WT-Stamm (#1070) und einem 2,3-Butandiol-Produktionsstamm (#1885) durchgeführt. Die Kulturen wurden gemäß Abschnitt 2.1 80 Stunden lang bei 30 °C in 500 ml-Kolben mit 300 ml MM81 kultiviert. In den ersten 40 Stunden wurde die OD₆₀₀ zur Bestimmung des Wachstums alle 3 Stunden und anschließend einmal täglich gemessen. Das ATPS wurde während der Wachstumsversuche mit Stamm #1185 (Tabelle 1) in zwei unterschiedlichen Mengen angewandt, sodass 500 mM und 50 mM Ammoniumsulfat nach der Anwendung im Medium verblieben, um zu testen, ob negative Auswirkungen auf die Organismen vorhanden sind bzw. verringert werden können. Da die Mengen vom Volumen der eingesetzten Fermentationsflüssigkeit abhängig waren fand nur ein entsprechender Anteil Anwendung. Die Extraktionen fanden hierbei nach 22 und 38 h statt.

2.4 Analytische Auswertungen

2.4.1 Sequenzierungstechnologien

2.4.1.1 Illumina - Sequenzierung

Illumina ist die am weitesten verbreitete Methode in klinischen sowie Forschungsanwendungen, wobei über die Jahre ein großer Teil der zur Verfügung stehenden Computerwerkzeuge speziell für diese Technologie entwickelt wurde (de Souza *et al.*, 2023). Die Technologie von Illumina (Kalifornien, USA) basiert auf dem Prinzip der Sanger- oder Kettenabbruch-Sequenzierung (Sanger *et al.*, 1977). Hierzu werden proprietäre, fluoreszenzmarkierte und reversibel bindende Didesoxyribonukleosid-Triphosphate (ddNTPs) für eine Amplifikation der DNA aus Proben verwendet. Sobald das DNA-Fragment verlängert wird und das spezifische, gerade eingebaute Nukleotid durch den Nachweis des Fluoreszenzsignals identifiziert wurde, erfolgt ein Restaurierungsschritt, bei dem der Terminator und die Fluoreszenzmarkierung des letzten ddNTP der Kette entfernt werden. Dadurch kann das nächste Nukleotid hinzugefügt und gleichsam identifiziert werden (de Souza *et al.*, 2023). Diese Amplifikationsreaktion findet in einer Durchflusszelle mit Glasoberfläche statt, welche die Verarbeitung tausender DNA-Fragmente gleichzeitig ermöglicht und die Genauigkeit über die Menge der Basenerkennungen erhöht. Durch die Illumina-Methode ist es möglich, die Sequenzierung beider Enden eines DNA-Fragments durchzuführen. Dieses Merkmal wird als *paired-end* (Gepaarte Enden) bezeichnet und ermöglicht zusammen mit der reversiblen Terminatortechnologie eine unerreicht hohe Genauigkeit mit einer Fehlerquote von $< 0,1$ %. Die Illumina-Sequenzierung hat Nachteile, wie zum Beispiel lange Laufzeiten von bis zu 56 Stunden pro Lauf und weist durch die Zerstückelung in sehr kleine Sequenzstücke (< 500 bp) Herausforderungen bei der Durchführung von *de novo*-Assemblierungen sowie der Identifizierung von größeren Strukturvarianten auf (Kircher *et al.*, 2011).

Sequenzierungen dieser Arbeit wurden mit einem 2 x 150 bp Illumina HiSeq Kit durchgeführt (Illumina, Kalifornien, USA) und mit der Software CLC Genomics Workbench Version 20 (Qiagen N.V., Venlo, Niederlande) analysiert.

2.4.1.2 Nanoporensequenzierung

Im Gegensatz zu Illumina können durch diese Technologie lange DNA-Stränge von über 1 Mb sequenziert werden. Die Technologie basiert auf einer Quantifizierung der Änderung einer angelegten Spannung an eine synthetische Membran mit Nanoporen, durch die die Basenstränge geleitet werden. Ein DNA-Einzelstrang wird mit Hilfe eines Adapters enzymatisch durch eine Nanopore gezogen, welcher am 5'-Ende des Stranges in Vorbereitungsschritten angebracht wurde. Aufgrund der Unterschiede der Nukleotide variiert der gemessene Stromfluss je nach DNA-Sequenz, was zur Messung und Berechnung der Sequenz genutzt wird. Dieser Vorgang findet wie bei Illuminasequenzierungen in einer Fließzelle mit paralleler Sequenzierung, durch die Nutzung vieler Poren gleichzeitig, statt. Nanoporen-Sequenzierung hat sich bei der Analyse von Regionen mit geringer Komplexität und Strukturvarianten bewährt. Der Nachteil der Technologie liegt bislang in geringen Genauigkeit im Vergleich zur Illuminasequenzierung von etwa 98 bis 99,3 % (de Souza *et al.*, 2023).

Die in dieser Arbeit verwendeten Fließzellen besaßen 512 Kanäle, was der Anzahl der gleichzeitig aktiven Nanoporen entspricht. In dieser Studie kam ein Institutsinternes MinION System Mk1B, R10.4.1 (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, GB) und dem native Barcoding Kit SQK-NBD114.24 (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK) zum Einsatz, um Long-Read-Sequenzen zu generieren. Die Sequenzierungen wurden im Anschluss mit der Software CLC Genomics Workbench Version 20 (Qiagen N.V., Venlo, Niederlande) sowie Guppy Version 6.4.8 (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK) analysiert.

2.4.2 Analyse von Substraten, Produkten und Biofilmen

2.4.2.1 Optische Kohärenztomographie (OCT)

Zur nicht invasiven Analyse des Wachstums und der dreidimensionalen Struktur von Biofilmen innerhalb der Kultivierungskanäle aus Abschnitt 2.3.3 wurden OCT-Aufnahmen angefertigt. OCT ist ein bildgebendes Verfahren, das basierend auf der Lichtstreuung, -reflexion und -interferenz von Materialien zweidimensionale und dreidimensionale Aufnahmen im Mikrometerbereich erstellt. Ein Lichtstrahl geringer Kohärenzlänge im

infraroten Bereich (930 nm, 100 nm Bandbreite) wird aus einer Quelle im Gerät emittiert. Der austretende Lichtstrahl wird mittels eines Strahlteilers in einen Referenzstrahl und einen Messstrahl aufgeteilt. Nach Kontakt mit der Probe wird der Messstrahl reflektiert und mit dem Referenzstrahl in einem Interferometer überlagert. Das entstandene Interferenzsignal wird mittels eines Spektrometers erfasst und beinhaltet Informationen zu Strukturen und ihrer Position, welche von der entsprechenden Software berechnet werden. Die Informationen entlang der Z-Achse an den gemessenen Stellen ermöglichen über mehrere Messungen hinweg eine dreidimensionale Bildgebung entlang der X- und Y-Achsen (Wagner *et al.*, 2010; Klein *et al.*, 2022). Für die Aufnahmen wurde ein GANYMEDE-System eingesetzt, welches mit einer LSM03-BB Objektivlinse von Thorlabs ausgestattet war (Gan210-SP4, Thorlabs, Dachau, Deutschland). Die verwendeten Programme waren ThorImage Version 5.1.1 und Fiji (ImageJ Version 1.53 / 2.1.0; (Wagner *et al.*, 2010; Schindelin *et al.*, 2012)). Die Daten wurden nach (Wagner and Horn, 2017) ausgewertet wobei das Biofilmvolumen berechnet wurde, indem die Anzahl der weißen Pixelsignale mit der Voxelgröße der Bilder verrechnet wurde.

2.4.2.2 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

HPLC-Messungen wurden unter Verwendung eines Thermo Scientific™ UltiMate™ 3000 UHPLC-Systems von Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) durchgeführt. Vor der Auftrennung wurden 150 µl der Proben mittels einer 0,2 µm PTFE-Membran (VWR, Darmstadt, Deutschland) gefiltert und mit 15 µl 0,5 M Schwefelsäure in einer 96-Well-Mikrotiterplatte gemischt. Die Trennung der Proben erfolgte unter Verwendung einer Hi-Plex H PL1170-6830 (7,7 x 300 mm) 8 µm HPLC-Säule von Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland). Die Peaks der Brechungsindices der einzelnen Stoffe wurden mittels RefractoMax 521-Detektor von Thermo Fisher Scientific gemessen. Als Eluent wurde eine Lösung aus 5 mM Schwefelsäure in ddH₂O eingesetzt, während die Messung bei einer Säulentemperatur von 60 °C durchgeführt wurde. Die erhaltenen Ergebnisse wurden von der Software Chromeleon 7.2 SR4 anhand einer erstellten Eichgerade von mitgemessenen Messstandards ausgewertet.

2.4.2.3 Gaschromatographie (GC)

GC-Analysen wurden unter Verwendung eines Shimadzu GC-2000 Plus Systems durchgeführt, welcher mit einem Split / Splitless-Injektorsystem (AOC 20 s Auto Sampler, Shimadzu, Kyoto, Japan) und einem Flammenionisationsdetektor (FID; Det3ch, Shimadzu, Kyoto, Japan) ausgestattet war. Helium wurde mit einer Gesamtdurchflussrate von 22,7 ml min⁻¹ als Trägergas eingesetzt. Vor der Injektion wurde die Einspritzöffnung auf 230 °C vorgeheizt und bei Messungen im Split-Modus mit einem Split-Verhältnis von 1:10 eingesetzt. Die Proben wurden durch Verwendung einer Agilent CP-Chirasil-Dex CB-Säule (25 m x 0,25 mm) mit einer stationären Schichtdicke von 0,25 µm separiert. Bei laufenden Messungen wurde zunächst die Säulentemperatur für 3 Minuten auf 50 °C eingestellt und anschließend mit 10 °C min⁻¹ auf 160 °C erhöht. Die Endtemperatur wurde für 5 Minuten beibehalten. Die Temperaturen der Injektionsöffnung und des FID wurden konstant auf 230 °C gehalten.

2.4.2.4 Mikro-GC

Zur Bestimmung der Konzentrationen von H₂, O₂, N₂ und CO₂ wurde eine Gaschromatographie verwendet. Messungen wurden mit dem 490 Micro-GC von Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland) durchgeführt und mit der Software Agilent OpenLAB CDS (EZChrom Edition) ausgewertet. Die Methode beinhaltete eine Stabilisierungszeit von 5 Sekunden, eine Probenzeit von 20 Sekunden, eine Injektorzeit von 50 ms sowie eine Temperatur von 110 °C zwischen Probenleitung und Injektor. Die erste Säule des Modells MS5A hatte eine Länge von 10 Metern und wurde mit Argon als Trägergas bei einer Temperatur von 70 °C und einem Druck von 150 kPa betrieben. Die zweite Säule hatte ebenfalls eine Länge von 10 Metern und bestand aus einer PPQ-Säule mit Helium als Trägergas, welche bei einer Temperatur von 45 °C und einem Druck von 150 kPa betrieben wurde. Die Messung erfolgte mit einem TCD-Detektor (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland).

2.4.2.5 Voges-Proskauer Test

Die Konzentration von Acetoin wurde durch eine Farbreaktion nach Voges und Proskauer bestimmt, um die HPLC-Messungen bei geringen Konzentrationen zu verifizieren (Abschnitt

2.4.2.2) (Barry and Feeney, 1967). Dies ist nur möglich, wenn kein 2,3-Butandiol in den Proben vorhanden ist, da dieses ebenfalls mit den Chemikalien interagiert. 20 µl der Probe wurden in eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert und mit 140 µl der Testlösung (Tabelle 13) vermischt. Nach einer Inkubation von 20 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 490 nm mithilfe des iMark Microplate Readers und der Microplate Manager 6 Software von Bio-Rad (München, Deutschland) gemessen. Anhand einer Standardkurve mit Referenzwerten von 0, 0,5, 1, 3 und 5 mM konnte die Acetoin-Konzentration der Proben bestimmt werden.

Tabelle 13: Zusammensetzung der Testlösung nach Voges und Proskauer. Die Reagenzien müssen in absteigender Reihenfolge gemischt werden.

<i>Reagenz</i>	<i>Menge [ml]</i>
ddH ₂ O	10
10 mg ml ⁻¹ L-Arginin	1,4
50 mg ml ⁻¹ α-Naphtol in EtOH *	1
40 % KOH	1

*Das α-Naphtol / EtOH Gemisch muss für jede Messung frisch angesetzt werden.

2.4.3 Bestimmung von Biomasse und Wirkungsgraden

2.4.3.1 Bestimmung der Biomasse

Die OD₆₀₀ wurde mithilfe eines Thermo Fisher Scientific Spectronic Genesys 20 Spektrophotometers (Darmstadt, Deutschland) gemessen. Die Biomasse von Wachstumsexperimentproben wurde anhand eines Umrechnungsfaktors von optischer Dichte bei 600 nm in trockene Biomasse berechnet, der aus der Korrelation von Probentrockenmasse und gleichzeitig gemessener optischer Dichte bei 600 nm in einem Wachstumsexperiment abgeleitet wurde (Daten nicht gezeigt).

Der Umrechnungsfaktor wurde aus dem Experiment wie folgt bestimmt:

$$\text{Trockene Biomasse [g l}^{-1}\text{]} = 0.6416 \cdot OD_{600} + 0.0632$$

2.4.3.2 Biomasse-Ertrag

Der Biomasseertrag wurde anhand der folgenden Gleichung bestimmt:

$$\text{Ertrag } Y_{Biomasse} \left[\frac{g_{Biomasse}}{g_{Substrat}} \right] = \frac{\Delta c_x}{\Delta c_s} = \frac{c_{x,t_{Ende}} - c_{x,t_0}}{c_{s,t_{Ende}} - c_{s,t_0}}$$

Wobei x die bestimmte Biomasse, s das Substrat, Δc_x [g l⁻¹] die produzierte Biomasse und Δc_s [g l⁻¹] den Substratverbrauch darstellen.

Für den Vergleich mit der Kohlenstoffausbeute, wurde auch der Prozentanteil der von den Zellen für die Produktion von Biomasse genutzten Menge Substrat berechnet. Hierzu wurden die Molzahlen für Biomasse angenähert, wobei von einer chemischen Zusammensetzung von C₄H₇O_{1,5}N ausgegangen wurde, was einem Molekulargewicht von 93 g mol⁻¹ entspricht.

$$\text{Biomasseertrag anteilig } Y_{X/S}[\%] = \frac{\text{produzierte Biomasse [M]}}{\text{verbrauchtes Substrat [M]}} * 100 = \frac{\Delta n_x}{\Delta n_s} * 100$$

Wobei Δn_x [mol l⁻¹] die produzierte Biomasse als Stoffmengenkonzentration, errechnet aus der produzierten Biomasse Δc_x und der angenäherten Molzahl der Biomasse, darstellt. Δn_s [mol l⁻¹] ist die in den Experimenten bestimmte Stoffmengenkonzentration des Fructoseverbrauchs.

2.4.3.3 Spezifische Wachstumsrate

Die spezifische Wachstumsrate wurde unter Verwendung der ersten Messungen der exponentiellen Wachstumsphase als Nullpunkt und einer Zeitspanne von 10 Stunden berechnet:

$$\begin{aligned} \text{spezifische Wachstumsrate } \mu [h^{-1}] &= \frac{\text{Veränderung in optischer Dichte}}{\text{Zeitspanne}} = \frac{\Delta OD_{600}}{\Delta t} \\ &= \frac{\ln(OD_{600, t_{10}}) - \ln(OD_{600, t_0})}{t_{10} - t_0} \end{aligned}$$

Hierbei wurden die natürlichen Logarithmuswerte von OD_{t_0} und $OD_{t_{10}}$ für die Zeitpunkte t_0 und t_{10} verwendet.

2.4.3.4 Kohlenstoffausbeute unter heterotrophen Bedingungen

Die Kohlenstoffausbeute der heterotrophen Vergleichsexperimente wurde anhand der folgenden Gleichung berechnet:

$$\begin{aligned} \text{Ertrag } Y_{\text{heterotroph}} [\%] &= \frac{\text{Menge Produkt [M]}}{\text{katalysiertes Substrat [M]}} = \frac{n_{\text{Produkt}, t_{\text{Ende}}} - n_{\text{Produkt}, t_0}}{n_{\text{Substrat}, t_0} - n_{\text{Substrat}, t_{\text{Ende}}}} \\ &= \frac{([\text{Produkt in mM}]_{\text{Ende}} - [\text{Produkt in mM}]_0) * V_{\text{flüssig}}}{n_{\text{Substrat}, t_0} - n_{\text{Substrat}, t_{\text{Ende}}}} \end{aligned}$$

Für jedes Molekül Fructose können zwei Moleküle Pyruvat gebildet werden. Diese können dann durch Katalyse in ein Molekül Acetoin / 2,3-Butandiol und zwei Moleküle CO_2 umgewandelt werden. Unter idealen Bedingungen wird jedes Fructose-Molekül für die Acetoin- oder 2,3-Butandiolproduktion verwendet, was zu einer maximal theoretischen Ausbeute von 100 % führt.

Das Volumen der Flüssigphase $V_{\text{flüssig}}$ wurde durch jede Probenahme beeinflusst und wurde daher durch Subtraktion des Volumens der entnommenen Proben vom anfänglichen Flüssigkeitsvolumen berechnet. Für jede Probe wurde die extrahierten Stoffmenge berechnet und zur Menge der Endprodukte addiert.

2.4.3.5 Kohlenstoffausbeute unter autotrophen Bedingungen

Die Kohlenstoffausbeute unter autotrophen Bedingungen wurde anhand der folgenden Gleichung berechnet:

$$\begin{aligned} \text{Ertrag } Y_{\text{autotroph}} [\%] &= \frac{\text{Menge Produkt [M]}}{\text{katalysiertes Substrat [M]}} = \frac{n_{\text{Produkt}, t_{\text{Ende}}} - n_{\text{Produkt}, t_0}}{n_{C, t_0} - n_{C, t_{\text{Ende}}}} \\ &= \frac{([\text{Produkt in mM}]_{\text{Ende}} - [\text{Produkt in mM}]_0) * V_{\text{flüssig}}}{n_{C, t_0} - n_{C, t_{\text{Ende}}}} \end{aligned}$$

Wobei C der als Substrat verfügbare Kohlenstoff aus CO_2 und NaHCO_3 ist.

Das Volumen der Flüssigphase $V_{\text{flüssig}}$ wurde durch jede Probenahme beeinflusst und wurde daher durch Subtraktion des Volumens der entnommenen Proben vom anfänglichen Flüssigkeitsvolumen berechnet. Für jede Probe wurde die extrahierten Stoffmenge berechnet und zur Menge der Endprodukte addiert.

Die gesamte Stoffmenge des Gasgemischs in der Gasphase (n_{Gas}) wurden mithilfe des idealen Gasgesetzes bestimmt. Unter Berücksichtigung des Gasvolumens von $V_{\text{gas}} = 1,23$ l in den Flaschen sowie der Umgebungstemperatur und -druck bei der Probenahme ($T = 298,13$ K; $P = 1$ bar = 100 kPa) wurden die Gasstoffmenge wie folgt mit der idealen Gaskonstante ($R = 8,314$ JK * mol) bestimmt:

$$n_{\text{Gas}} = \frac{P * V_{\text{gas}}}{R * T} = \frac{100000 \text{ Pa} * 0,00108 \text{ m}^3}{8,314 \frac{\text{J}}{\text{K}} \text{ mol} * 298,15 \text{ K}} = 0,0435 \text{ mol} = 43,5 \text{ mmol}$$

Die Menge der einzelnen Komponenten im Gasgemisch wurde durch Multiplikation des Partialdrucks p_i [%] mit den Gesamtmolen des Gases bestimmt:

$$n_i = p_i * n_{\text{Gas}}$$

Unter autotrophen Bedingungen werden 6 Mol CO_2 benötigt, um 2 Mol Pyruvat zu bilden. Diese beiden Pyruvatmoleküle können dann weiter zu 1 Mol Acetoin / 2,3-Butandiol und 2

Mol CO₂ umgesetzt werden. Vereinfacht ausgedrückt, werden für jedes Mol Acetoin oder 2,3-Butandiol 4 Mol CO₂ verbraucht, was zu einer maximalen Ausbeute von 25 % führt. Zu Vergleichszwecken wurde eine Gesamtausbeute von 100 % berechnet, wenn das gesamte CO₂ zur Herstellung von Acetoin oder 2,3-Butandiol verwendet wurde. Die zu den jeweiligen Zeitpunkten entnommenen Gasproben wurden $V_{\text{flüssig}}$ entsprechend berücksichtigt und CO₂ sowie NaHCO₃ wurden als vorhandenes Substrat gewertet.

2.4.3.6 Wasserstoff-Effizienz

Der Wasserstoff-Wirkungsgrad ist ein Äquivalent dafür, wieviel Energie bei der Kohlenstofffixierung für die Produkte verbraucht wird. Er kann wie folgt berechnet werden:

$$H_{2\text{ eff}} [\%] = \frac{n_{H_2\text{ theoretisch}}}{n_{H_2\text{ verbraucht}}} * 100$$

Um die theoretisch benötigte Wasserstoffmenge n_{H_2} [mmol] zu ermitteln, wurde die Menge des gebundenen Kohlenstoffs aus den Produkten bestimmt und mit der Anzahl der Elektronen berechnet, die benötigt werden, um vom Substrat zum Produkt zu gelangen.

3 Ergebnisse

Basierend auf einem bereits etablierten *C. necator* Produktionsstamm für Acetoin von Windhorst und Gescher (2019), war das Ziel dieser Arbeit die autotrophe Produktion von 2,3-Butandiol in *C. necator* zu etablieren, zu charakterisieren und zu optimieren. Zusätzlich wurden weitere Aspekte einer großtechnischen Anwendung wie die Langzeitproduktion, das Verhalten in Gegenwart von Substraten und Produkten sowie verschiedenen Produktionsaufbereitungsverfahren und die auf Biofilmen basierende Lebensweise von *C. necator* untersucht.

3.1 Langzeitproduktion von Acetoin

Um mit dem Ausgangsstamm (#1226) eine Basis für weitere Arbeiten zu legen, wurden die Langzeitproduktion von Acetoin und genetische Einflüsse darauf untersucht. Das Ergebnis der Acetoinproduktion wurde als übertragbar auf die spätere Produktion von 2,3-Butandiol angesehen, da es sich um das Vorläuferprodukt von 2,3-Butandiol handelt und sich auch die genetischen Einflüsse durch den gleichbleibenden Organismus nicht ändern.

3.1.1 Medienoptimierung und Zumischung von Tetracyclin

Um die Beständigkeit von MM 81 für den Langzeitversuch zu untersuchen wurde 1 l vorbereitet und bei RT gelagert. Dabei zeigte sich nach bereits 48 h ein gelblicher Niederschlag (Daten nicht gezeigt). Da durch die Färbung des Niederschlags das Eisenammoniumcitrat der wahrscheinlichste Grund für das Ausfallen war, wurden Verdünnungsreihen des Mediums hergestellt, 48 h bei RT gelagert und anschließend auf Ausfällung untersucht (Abbildung 13). Zusätzlich wurde MM 81 ohne NaHCO_3 getestet, da es als Zusatz in den autotrophen Versuchen diente und so vom publizierten Rezept abwich. Dabei zeigten sich bei unverändertem MM 81 (Abschnitt 2.1), sowie dem ohne NaHCO_3 und bei Eisenammoniumcitrat-Konzentrationen von 50 mg l^{-1} und 25 mg l^{-1} nach 48 h Niederschläge, nicht jedoch bei Konzentrationen von 10 und 5 mg l^{-1} . Als Kontrolle wurde das Medium ohne die beiden Inhaltsstoffe verwendet.

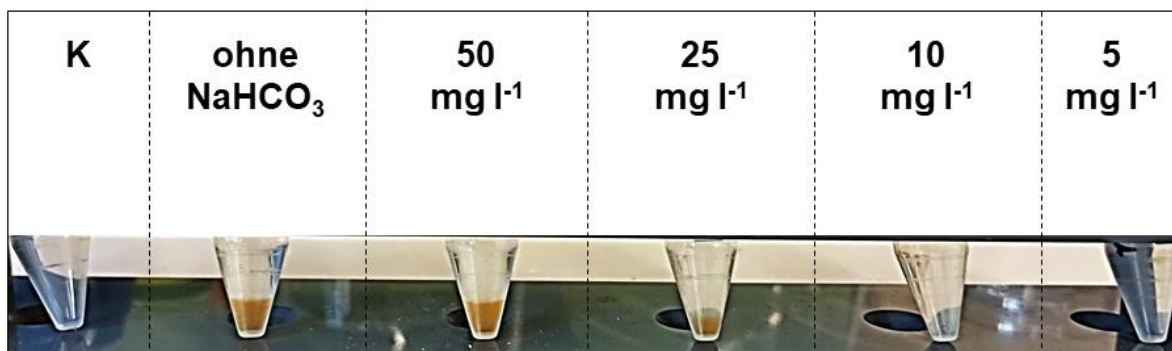


Abbildung 13: Für Langzeitexperimente mit *C. necator* wurde die Medienoptimierung von MM81 mit verschiedenen Konzentrationen an Eisenammoniumcitrat über 48 h durchgeführt und auf Niederschlag untersucht. Als Kontrolle (K) wurde Medium ohne NaHCO_3 und Eisenammoniumcitrat verwendet. Als zusätzlicher Test wurde MM81 mit 50 mg l^{-1} Eisenammoniumcitrat, jedoch ohne NaHCO_3 , getestet. Der Niederschlag ist in Gelb zu erkennen.

Um einen Einfluss der reduzierten Konzentration von Eisenammoniumcitrat auf das Wachstum der Organismen auszuschließen, wurde anschließend ein Wachstumsversuch mit dem acetoinproduzierenden Stamm in MM 81 mit $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ Eisenammoniumcitrat durchgeführt, bei dem keine Einschränkungen des Wachstums feststellbar waren und der nach 24 Stunden vergleichbare OD_{600} -Werte wie eine Kontrollkultur aufwies ($2,5 \text{ mg l}^{-1}$: 0,37 vs. 50 mg l^{-1} : 0,39; Daten nicht gezeigt). Die weiteren Versuche dieser Arbeit wurden daraus resultierend mit $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ Eisenammoniumcitrat im Medium durchgeführt.

Aufgrund der ungewissen langen Lagerungszeit bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ und einer Komplexbildung von Tetracyclin mit zweiwertigen Metallionen (Korać Jačić *et al.*, 2022) wurde als Zusatzexperiment die Stärke des Einflusses dieser Komplexbildung auf die Tetracyclinkonzentration getestet (Abbildung 14). Dabei zeigte sich über den Zeitraum eines Tages, dass entgegen der bisherigen Annahme Temperatur (durchgeführt bei RT) und Licht (Licht: L, Dunkel: D) wenig bis keinen Einfluss hatten, während die Komplexbildung in MM 81 zu einer fast vollständigen Umsetzung des Tetracyclins führte.

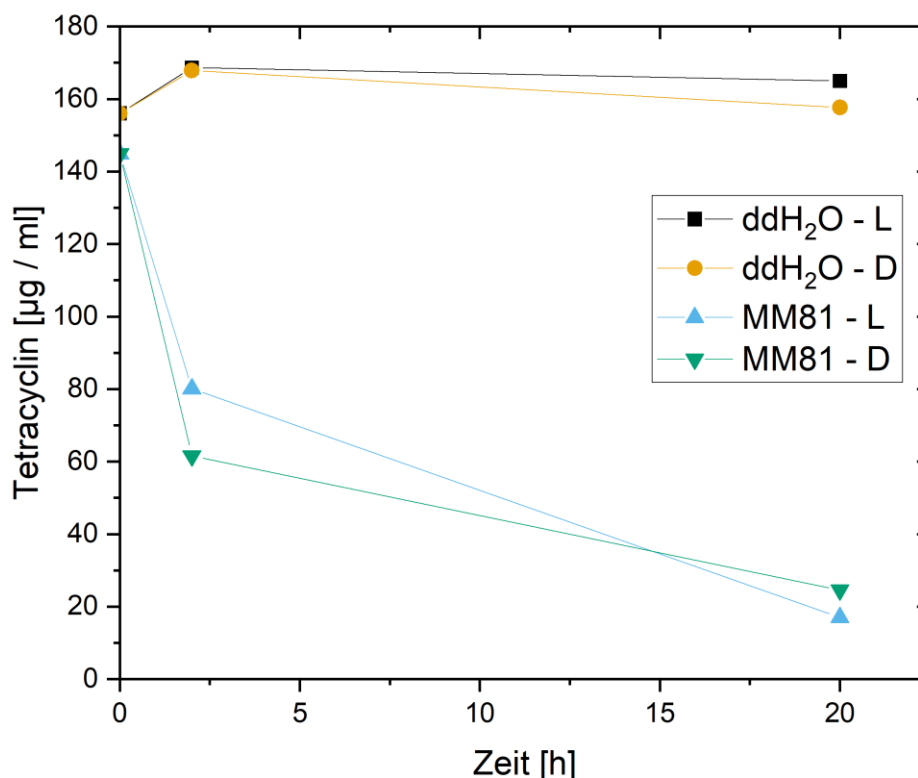


Abbildung 14: Einfluss von Licht (L) und Dunkelheit (D) sowie von Wasser (ddH₂O) und Medium (MM 81) auf die Tetracyclinkonzentration bei RT. Es zeigte sich ein eindeutiger Einfluss des Minimalmediums auf die Konzentration von Tetracyclin über den Zeitraum eines Tages, während Licht einen nicht messbaren Einfluss zeigte.

Basierend auf diesem Experiment, wurde Tetracyclin nicht über längere Zeit in MM81 beigemischt gelagert. Stattdessen sollten das Medium und das Antibiotikum direkt vor den Fließzellen aus getrennten Lagerungsbehältern gemischt werden. Um, trotz laminarer Ströme in mikrofluidischen Systemen, eine gleichmäßige Mischung in den Kultivierungskanälen zu gewährleisten, wurden Versuche zur Durchmischung durchgeführt. In den Kanal wurden wasserlösliche Farben (Rot und Grün) unterschiedlich eingeleitet und die Mischung optisch untersucht (Abbildung 15). Bei einer frontalen Zusammenführung entstanden nebeneinander liegende Strömungen (A1), bei einer orthogonalen Zusammenführung übereinander liegende Strömungen (A2) und bei der Nutzung eines zusätzlichen Eingangs zwei Strömungen in einer Hälfte des Kanals (A3). Bei Verwendung eines Mischgefäß vor der Fließzelle, entstand ein gleichmäßiger Strom einer Mischung aus roter und grüner Lösung (B1 und 2), weshalb dieser Aufbau im Langzeitexperiment Anwendung fand um das Nährmedium mit Tetracyclin zu mischen.

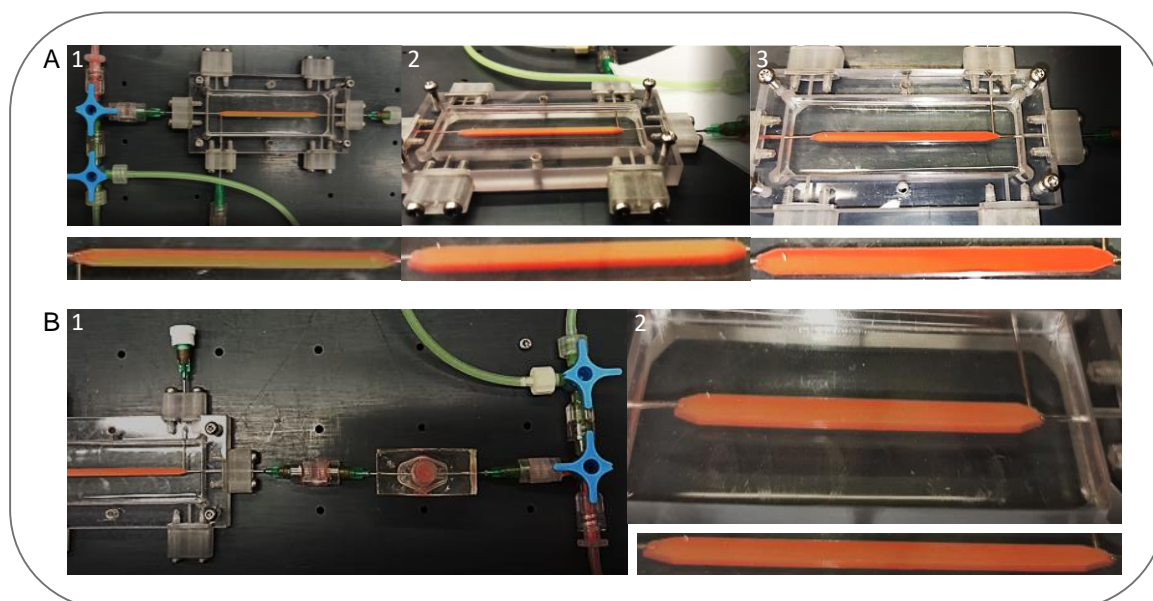


Abbildung 15: Versuche zur Mischung von Medium und Antibiotikum im Kultivierungskanal wurden mit rot und grün gefärbten Lösungen durchgeführt. Bei frontaler Zusammenführung der Farben waren nebeneinander liegende Strömungen zu erkennen (A1), während bei orthogonaler Zusammenführung übereinander liegende laminare Ströme zu erkennen waren (A3). Mit einem zusätzlichen Eingang konnte eine Trennung in der Hälfte des Kanals beobachtet werden (A3). Durch ein zusätzliches Mischgefäß vor der Fließzelle konnte eine gleichförmige Mischung erreicht werden (B1 und 2).

3.1.2 Langzeitproduktion von Acetoin durch den Ausgangsstamm

Gemäß Abschnitt 2.3.3.1 wurde die Langzeitproduktion mit drei Fließzellen bis zu einem Abfall der Acetoinproduktion unter $0,005 \text{ mM min}^{-1}$ durchgeführt. Dabei wurden Substratverbrauch und Biofilmvolumen über den Verlauf des Experiments hin überwacht, um die Vitalität der Zellen zu bestätigen. Das Biofilmvolumen musste, bedingt durch die lichtbasierte Methode des OCT, zwischen Unter- und Oberseite (PDMS) des Kanals unterschieden werden, da die Zunahme des Biofilmvolumens die Aufnahmen der Kanalunterseite über die Zeit limitierten (Abbildung 16). In der Abbildung ist neben dem Fructoseverbrauch, dem Biofilmvolumen und der produzierten Acetoinkonzentration der einzelnen Fließzellen eine Übersichtsdarstellung des produzierten Acetoins aller Zellen innerhalb einer Minute dargestellt (oben links). Die Fructosekonzentration zeigte sich über den Verlauf des Experiments hinweg als ausreichend und nicht limitierend, wobei bei allen Fließzellen der Substratverbrauch über die Zeit des Experiments nie unter 1 mM Fructose fiel. Dabei wurde in den ersten Tagen, in denen noch kein Verbrauch messbar war, von den angestrebten 10 mM Fructose 11 , 13 und 11 mM Fructose in den Fließzellen gemessen. Das Biofilmvolumen konnte ab 200 h quantifiziert werden und stieg in allen drei Fällen bis 1100

Ergebnisse

Stunden an, bis das Volumen der Unterseite des Kanals durch Bewuchs der Oberseite nicht weiter quantifizierbar wurde. Das Biofilmvolumen auf der Oberseite schwankte ab diesem Zeitpunkt bei allen Fließzellen um $120 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$. Die Acetoinproduktion unterschied sich zwischen allen Replikaten, die eine durchschnittliche Produktion von 0,057, 0,040 und 0,017 mM Acetoin pro Minute und eine durchschnittliche volumetrische Produktivität von 305, 212 und 91 $\text{mg l}^{-1} \text{h}^{-1}$ über den gesamten Verlauf des Experiments aufwiesen. Die Produktion von Fließzelle 3 sank nach 1412 h und die von Fließzelle 2 nach 1532 h auf unter $0,005 \text{ mM min}^{-1}$. Aus technischen Gründen wurde die Produktion von Fließzelle 1 nach 1765 h bei einer Produktion von $0,036 \text{ mM Acetoin min}^{-1}$ gestoppt.

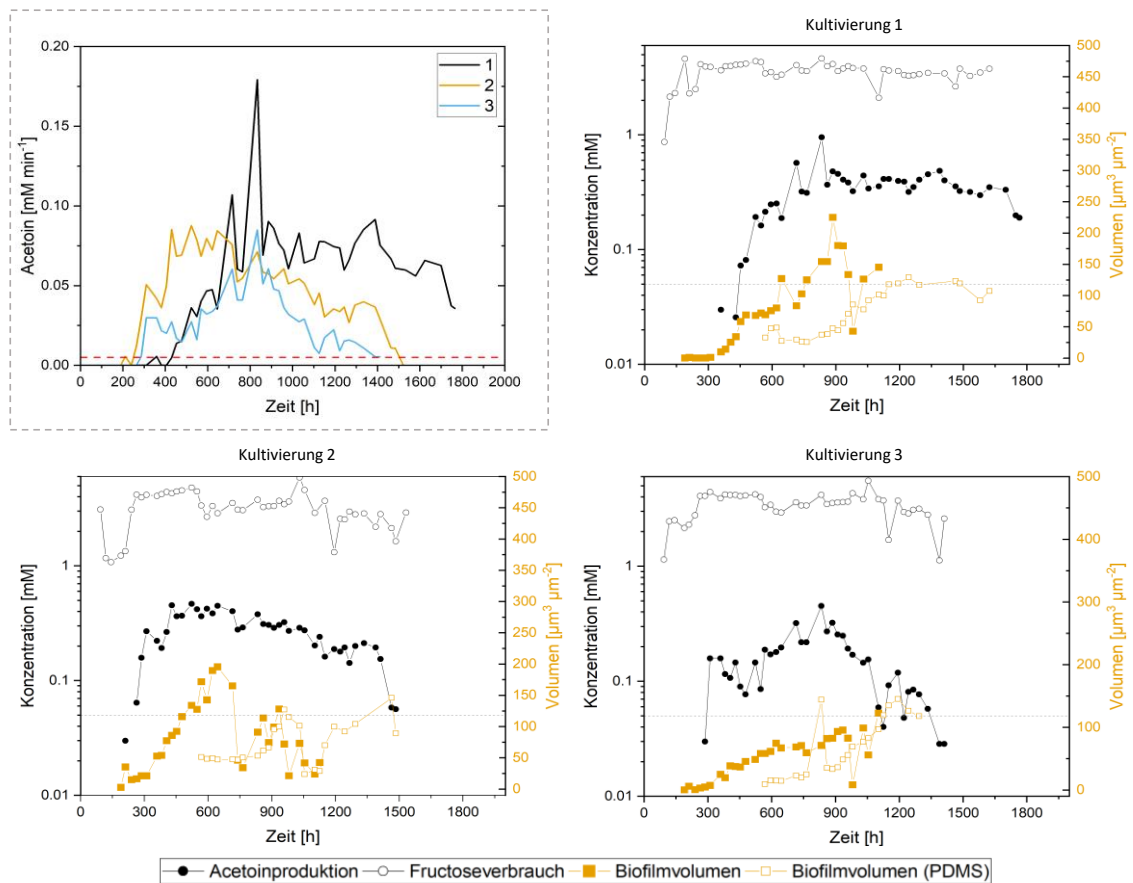


Abbildung 16: Langzeitexperiment zur Acetoinproduktion durch *C. necator* #1226. Es werden der Fructoseverbrauch, das Biofilmvolumen der Unter- und Oberseite (PDMS) des Kultivierungskanals und die Acetoinproduktion von 3 mikrofluidischen Fließzellen sowie eine Gesamtübersicht der Acetoinproduktion pro Minute dargestellt (oben links). Die Experimente wurden gestoppt sobald die Acetoinproduktion unter $0,005 \text{ mM min}^{-1}$ fiel (rote Linie in der Gesamtübersicht). Fließzelle 1 wurde nach 1765 h aus technischen Gründen gestoppt.

3.1.3 Genetische Einflüsse auf die Langzeitproduktion

Nach Ende des Experiments, wurden die Biofilmzellen auf Mutationen im Genom untersucht, um genetische Einflüsse zu identifizieren, die den Produktionsrückgang im Laufe der Zeit verursachten. Hierbei wurden die identifizierten Mutationen mit den bereits vorhandenen Mutationen des Inokulationsstammes verglichen und unterrepräsentierte Mutationen, die in weniger als 50 % der Zellgenome gefunden wurden, ausgeschlossen. Nach diesem Verfahren wurde 28 von 305 Mutationen identifiziert, von denen sich 4 auf Chromosom 1, 2 auf Chromosom 2 und 22 auf dem Produktionsplasmid befanden (Tabelle 14). Ein Einfluss der Produktion durch Transposonaktivität konnte nicht gefunden werden.

Tabelle 14: Verteilung der über die Dauer des Langzeitexperiments entwickelten Mutationen in den Fließzellen nach Ausschluss von bereits vorhandenen und unterrepräsentierten Mutationen, die in weniger als 50 % der Zellpopulationen identifiziert wurden.

<i>Replikon</i>	<i>Anzahl der Mutationen</i>
Chromosom 1	4
Chromosom 2	2
Megaplasmid	0
pKR _{phb_alsSD}	22

Von den identifizierten Mutationen waren lediglich 9 in genkodierenden Regionen lokalisiert (Tabelle 15) wovon 2 in Fließzelle 1 auf dem ersten Chromosom und 2 in Fließzelle 3 auf dem zweiten Chromosom 2 identifiziert wurden. 5 Mutationen waren hierbei in allen Fließzellen auf dem Produktionsplasmid vorhanden und befanden sich entweder in der Antibiotikaresistenz oder dem Replikationsursprung des Plasmids.

Ergebnisse

Tabelle 15: Über die Dauer des Langzeitexperiments entwickelte Mutationen in kodierenden Regionen in den Genomen der Zellen, sowie die Häufigkeit der auftretenden Mutationen, die betroffenen Gene, ihre Funktionen und in welcher Fließzelle diese detektiert wurden.

<i>Replikon</i>	<i>Häufigkeit</i> [%]	<i>betroffene</i> <i>Gene</i>	<i>Auswirkung</i>	<i>Funktion</i>	<i>Replikat</i>
Chromosom 1	98,80	rpsJ E6A55_19070	Val → Leu	30S ribosomales Protein S10	1
	97,62	E6A55_19070	Asp → His	Cyclohexan- Monooxygenase - Iontentransport	1
Chromosom 2	52,54	E6A55_19520	Leu → Deletion	Eisenionentransport / Iontentransport	3
	61,44	E6A55_RS21570	Leu → Arg	Signaltransduktion Histidinkinase	3
pKR_{phb}_alsSD	100	Tetracyclin- resistenz	gleiche Aminosäure	Antibiotikaresistenz	1-3
	100	Tetracyclin- resistenz	Thr → Ile	Antibiotikaresistenz	1-3
	99,66	Ori: RSF1010	Val → Leu	Replikationsursprung	1-3
	97,44	Ori: RSF1010	Glu → <i>Frame</i> <i>shift</i>	Replikationsursprung	1-3
	96,83	Ori: RSF1010	Val → <i>Frame</i> <i>shift</i>	Replikationsursprung	1-3

Da Mutationen auf den Produktionsplasmiden die Funktion der Plasmide beeinträchtigen können, wurde der Anteil der Plasmid-DNA-Sequenzen an der Gesamtheit der sequenzierten DNA-Stränge bestimmt und mit dem Anteil der Plasmidsequenzen in den Sequenzierungen des Inokulationsstamms verglichen (Abbildung 17). Hierbei konnte ein Rückgang der Plasmidanzahlen in allen Fließzellen im Vergleich zu dem Ausgangsstamm als Referenz festgestellt werden. Der durchschnittliche Rückgang in allen Replikaten betrug 49 % der anteiligen Plasmidsequenzen, wobei in Fließzelle 2 der stärkste Rückgang mit 59 % vorhanden war. Fließzellen 1 und 3 zeigten einen Rückgang von 52 bzw. 35 % der anteiligen Plasmidsequenzen.

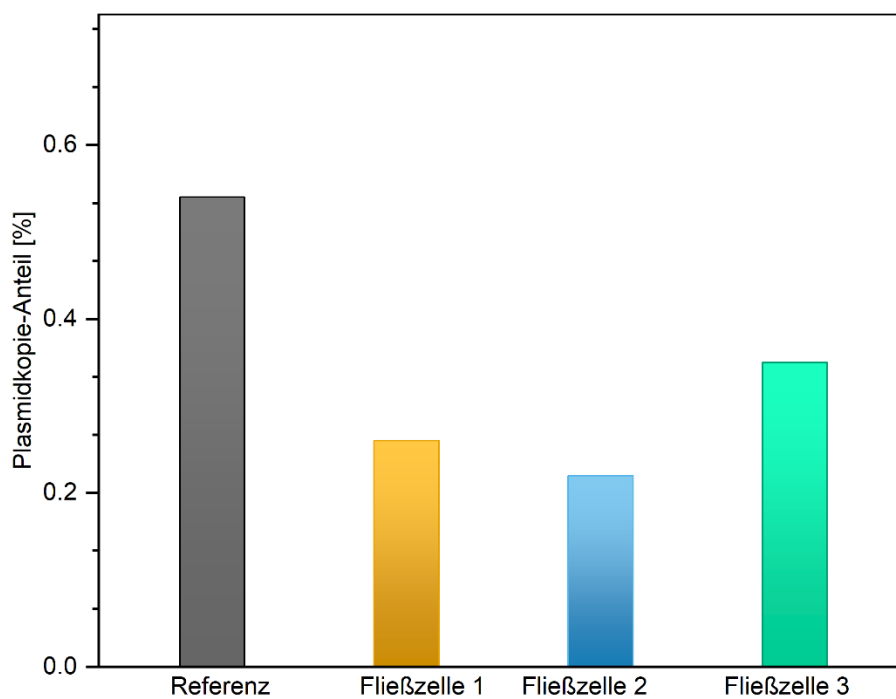


Abbildung 17: Anteil der DNA-Sequenzen des Plasmids im Vergleich zu den restlichen genomischen DNA-Sequenzen in den Sequenzierungen des Langzeitexperiments. Als Referenz wurde die Sequenzierung des Inokulationsstamms des Experiments verwendet. Es war eine Abnahme der Plasmidanteile im Vergleich zur Referenz feststellbar.

3.2 Wachstumsverhalten von *C. necator* H16

Da für 2,3-Butandiol bereits eine hemmende Wirkung auf manche Organismen nachgewiesen werden konnte (Syu, 2001), musste die Fähigkeit des Organismus, in dieser Arbeit eingesetzte Edukte sowie das Produkt zu tolerieren, getestet werden. Daher wurden gemäß Abschnitt 2.3.1 heterotrophe Versuche durchgeführt. Hierfür wurden Wachstumsexperimente mit einem *C. necator* H16 WT-Stamm in einem Medium mit steigenden Konzentrationen von Fructose bzw. 2,3-Butandiol von 0 bis 500 mM vorgenommen. Diese wurden um einen Test auf die Toleranz des Organismus gegenüber steigenden pH-Werten ergänzt, da bei höheren Werten mehr CO₂ im Medium gelöst werden kann (Abbildung 18). Die in Kapitel 3.2 präsentierten Ergebnisse wurden zum Teil in Weiler *et al.* (2024b) publiziert.

Über einen Zeitraum von 72-98 Stunden wurde bei Konzentrationen von bis zu 400 mM Fructose keine signifikante Auswirkung auf das Zellwachstum beobachtet, wobei die Zellen ein maximales Wachstum von OD₆₀₀ = 1,41 erreichten. Konzentrationen von 450 und

500 mM führten zu einer leicht verlängerten Wachstumsperiode, bis die Plateauphase mit einer Verzögerung von 10 Stunden erreicht wurde. Die Zellen verstoffwechselten geringere Konzentrationen von 10 und 20 mM Fructose nach 30 bzw. 60 Stunden und behielten während der restlichen Messungen ein stabiles Plateau der optischen Dichte bei. Alle Stämme zeigten eine vergleichbare spezifische Wachstumsrate zwischen $0,049$ und $0,059 \text{ h}^{-1}$ während der exponentiellen Wachstumsphase. Im Gegensatz dazu wurde das Zellwachstum bereits durch Konzentrationen von 2,3-Butandiol ab 10 mM beeinträchtigt, wobei alle Konzentrationen bis zu 450 mM ein vergleichbares Muster mit einer maximalen OD_{600} von $0,6$ - $0,8$ und einer spezifischen Wachstumsrate zwischen $0,014$ und $0,024 \text{ h}^{-1}$ zeigten. Im Gegensatz dazu zeigte die Kultur, die in Anwesenheit von 500 mM 2,3-Butandiol gewachsen war, nach 72 Stunden eine maximale optische Dichte von $0,25$ und eine Wachstumsrate von $\mu = 0,01 \text{ h}^{-1}$.

Die pH-Wachstumsversuche ergaben vergleichbare Wachstumsraten für pH 7 und 7,2 ($\mu = 0,103$ - $0,105 \text{ h}^{-1}$) sowie für pH 7,4 bis 9,4 ($\mu = 0,070$ - $0,089 \text{ h}^{-1}$). Für den pH-Wert von 9,6 wurde eine Wachstumsrate von $\mu = 0,058 \text{ h}^{-1}$ bestimmt. Ab einer OD_{600} von $0,26$ bis $0,34$ zeigten die Wachstumsraten von allen Kulturen bei pH 7,2 – 9,6 einen Einbruch. Es zeigten sich teilweise Schwankungen, was zu Verzögerungen beim Erreichen der Plateauphase von bis zu 10 Stunden führte. Die Endmessungen der OD_{600} lagen, der Reihenfolge der pH-Werte entsprechend absteigend, zwischen $0,67$ (Kultur bei pH 7) und $0,35$ (Kultur bei pH 9,4). Lediglich Kulturen mit einem pH-Wert von 8,3 und 8,9 erreichten einen höheren End- OD_{600} -Werte von $0,72$ bzw. $0,69$ jedoch die Plateauphase mit einer Verzögerung von bis zu 20 Stunden.

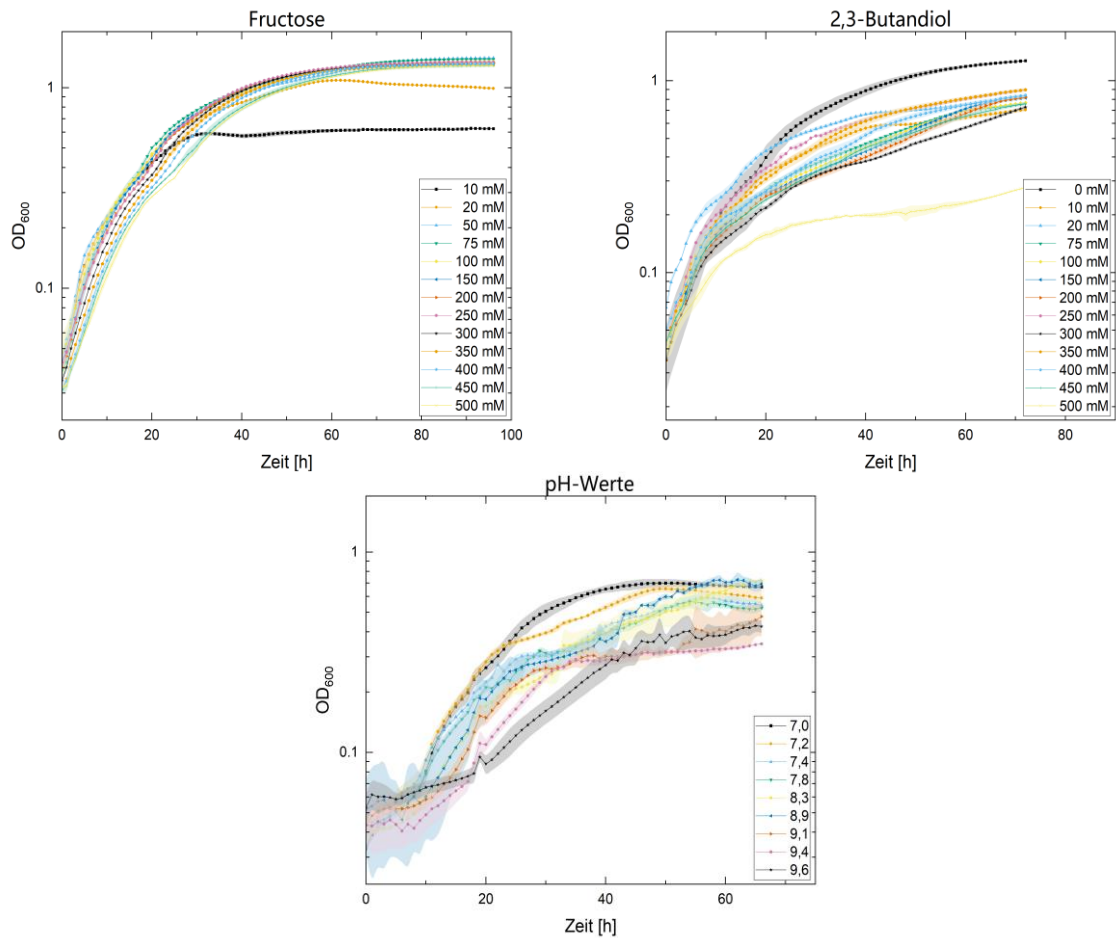


Abbildung 18: Wachstumsexperimente wurden mit *C. necator* H16 WT unter Verwendung steigender Konzentrationen von Fructose (oben links), 2,3-Butandiol (oben rechts) und pH-Werten (unten) über 72 und 98 Stunden durchgeführt. Die Standardabweichungen sind durch die umliegenden Farbwolken gekennzeichnet. Kein Einfluss von Fructose war feststellbar, während 2,3-Butandiol hemmende Wirkungen ab einer Konzentration von 10 mM zeigte. Höhere pH-Werte als 7,2 hatten ebenfalls einen negativen Effekt auf das Wachstum von *C. necator*.

Da die Langzeitexperimente mit dem Ausgangsstamm von Windhorst und Gescher (2019), sowie die Versuche mit dem WT-Stamm zeigten, dass die Basis für eine stabile Produktion von 2,3-Butandiol bei einer hohen Toleranz zum Substrat durch *C. necator* vorhanden war, wurden die Produktionsstämme Abschnitt 2.2 entsprechend kloniert und hinsichtlich ihrer Effizienz und Produktivität verglichen.

3.3 Produktionsstämme für Plattformchemikalien

Um eine hohe und stabile Produktion der Plattformchemikalie 2,3-Butandiol zu erreichen, wurden verschiedene Versionen des Produktionsgens *budC* untersucht und dem Ausgangsstamm gegenübergestellt. Aufgrund der zuvor erwähnten Tetracyclinunbeständigkeit wurde ebenfalls ein weiteres Produktionsplasmid getestet. Für die Vergleichsstudien wurden die Plasmide und Stämme sowohl hetero- als auch autotroph charakterisiert und verglichen. Zusätzlich wurde die endogene Carboanhydrase Cag mit dem Ziel überexprimiert, die autotrophe Kohlenstoffeffizienz zu optimieren (Gai *et al.*, 2014). Die in Kapitel 3.3.1 und 3.3.2 präsentierten Ergebnisse wurden zum Teil in Weiler *et al.* (2024b) publiziert.

3.3.1 Heterotrophe Vergleichsstudien

Zur Überprüfung der resultierenden Produktion unter heterotrophen Bedingungen wurden zwei Plasmide (pKR und pBBR1; Tabelle 2) getestet, die jeweils identische Gene enthielten. Die ausgewählten Plasmide zeigten in der Vergangenheit hohe Effizienzen in autotrophen Produktionsversuchen mit *C. necator* (Windhorst and Gescher, 2019; Wang *et al.*, 2022). Anschließend wurde das effizientere Plasmid ausgewählt und drei Versionen der *budC*-Sequenz aus verschiedenen Organismen wurden verglichen, um die effektivste Variante in Bezug auf Raum-Zeit-Ausbeute, Kohlenstoff-Effizienz und Acetoin / 2,3-Butandiol-Verhältnis zu ermitteln (Abbildung 19). Als Sequenzvarianten von *budC* wurden die Enzyme von *K. pneumoniae*, *K. aerogenes* (Basionym: *Enterobacter aerogenes*) und *E. cloacae* ausgewählt, da sie als effiziente 2,3-Butandiol-Produzenten bekannt sind und in der Vergangenheit in verschiedenen Ansätzen verwendet wurden (Syu, 2001; Celińska and Grajek, 2009; Białkowska, 2016). Im folgenden Abschnitt sind die entsprechenden Stämme jeweils durch den Namen des jeweiligen Enzyms und der Organismen gekennzeichnet.

Beim Vergleich der Plasmide pKR und pBBR1 zeigte sich, dass das pKR-Plasmid bei der Acetoinproduktion mit *alsSD* zu einer Metabolisierung von Fructose führte (36 im Vergleich zu 50 h), der Gesamttiter für Acetoin jedoch mit 13,8 zu 12,2 mM bei pBBR1 höher war. Von Plasmiden, die zusätzlich *budC* (*K. pneumoniae*) trugen, wurde Fructose vergleichbar schnell innerhalb von 60-63 h metabolisiert, jedoch zeigte sich der Titer durch pBBR1 erneut höher.

Ergebnisse

Daher wurden alle weitere Versuche zum Vergleich verschiedener Versionen des *budC*-Gens mit dem pBBR1-Plasmid durchgeführt.

Von den drei Varianten zeigte *budC* (*K. pneumoniae*) die höchste Acetoin-Akkumulation, während *budC* (*E. cloacae*) nach 48 h mit 10,2 mM die höchste Menge an 2,3-Butandiol aufwies. Die hierbei gemessenen optischen Dichten und Fructosekonzentrationen sind im Anhang unter Anlage A 1 und Anlage A 2 dargestellt. Nach dem Verbrauch der Fructose begannen alle Stämme, das produzierte 2,3-Butandiol zu Acetoin zu reoxidieren.

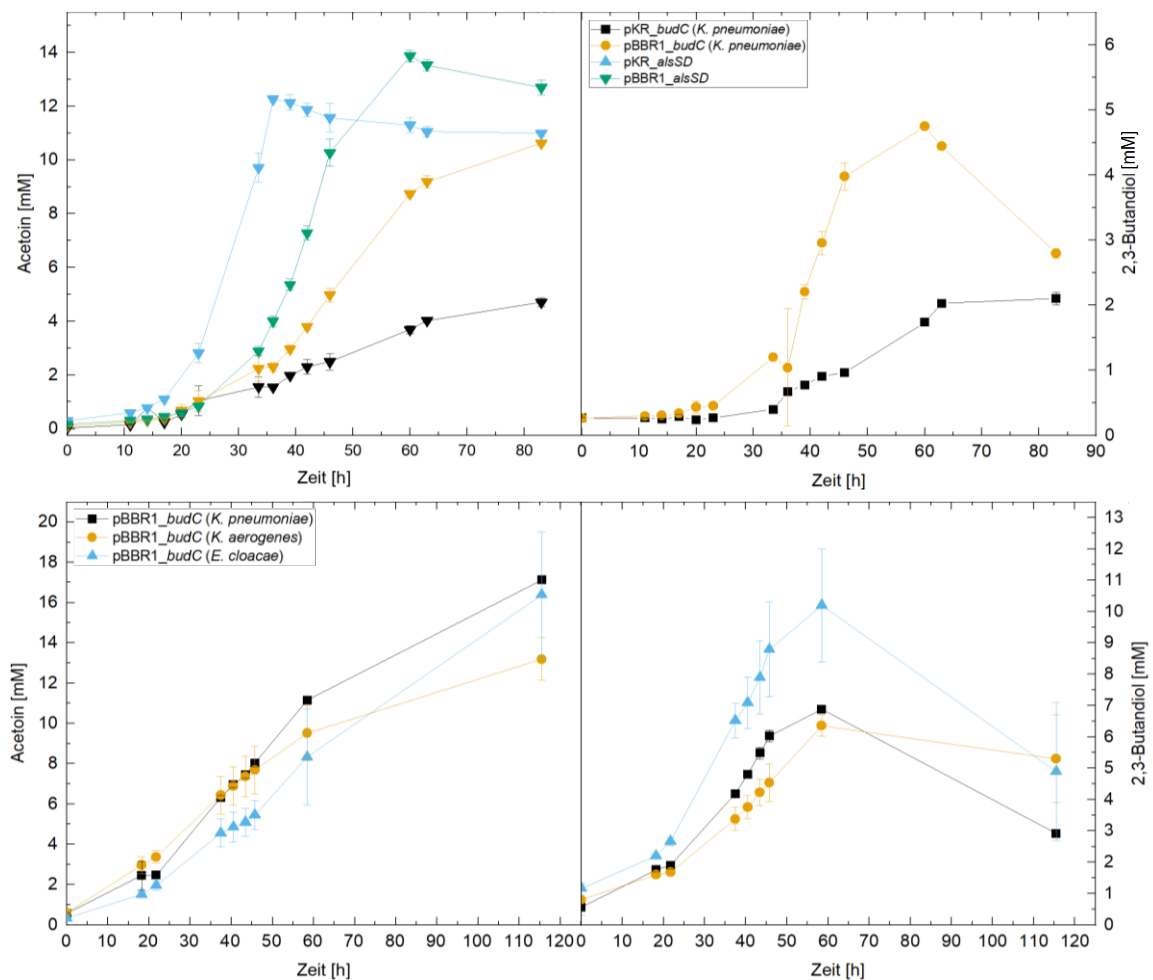
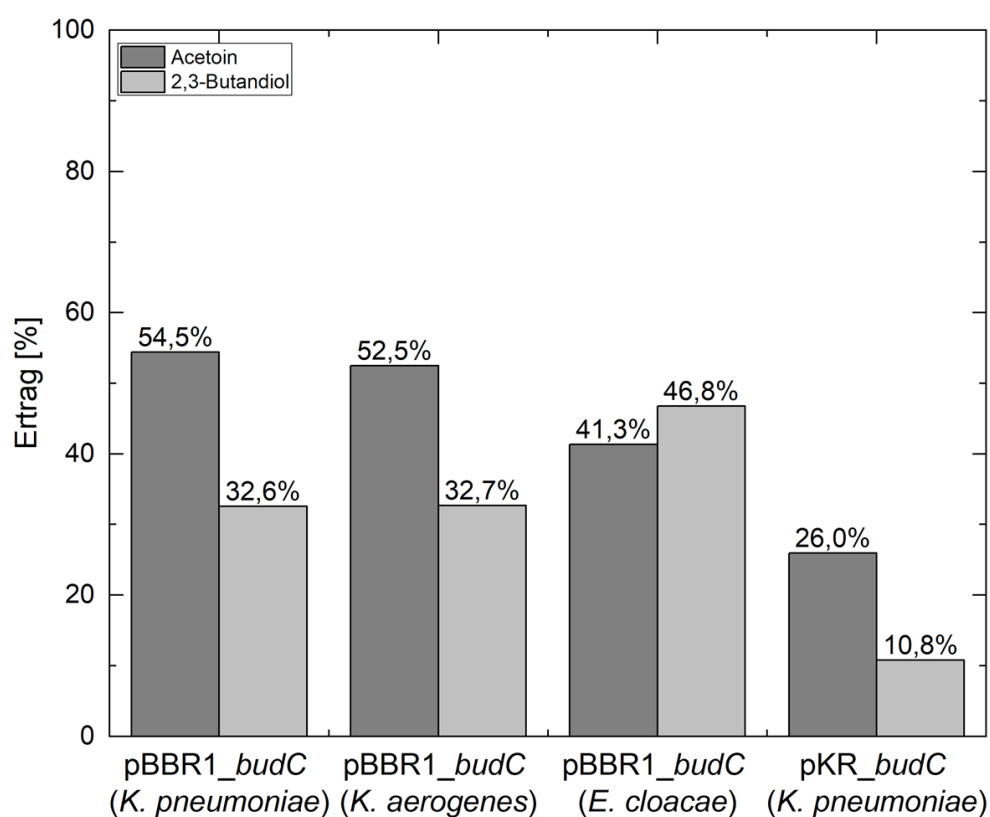


Abbildung 19: Vergleich von Produktionsplasmiden (oberer Teil) und Varianten von *budC* aus verschiedenen Organismen (unterer Teil; in Klammern ist der jeweilige Organismus gezeigt) unter heterotrophen Bedingungen in *C. necator*-Stämmen. Es werden Acetoin- und 2,3-Butandiol-Produktionen dargestellt, während die A1 und A2 die zugehörige optische Dichte und die Substratwerte enthalten. In diesem Vergleich zeigten sich pBBR1 und pBBR1_*budC* (*E. cloacae*) für die Produktion von 2,3-Butandiol als überlegen.

Von den Versuchen wurden jeweils die Kohlenstoffeffizienz und der Biomassertrag der Stämme berechnet. Die angegebenen Werte wurden zum Zeitpunkt der vollständigen

Metabolisierung von Fructose nach 60 h errechnet und zeigen so keine Verfälschung durch die anschließende Rückreaktion von 2,3-Butandiol zu Acetoin. Hierbei zeigte *budC* (*E. cloacae*) den höchsten Ertrag für 2,3-Butandiol mit 46,77 % und den höchsten Gesamtproduktertrag mit 88,11 %. Unter den pBBR1-Konstrukten wies es außerdem den geringsten Biomasse- und Acetoin-Kohlenstoff ertrag auf. Unter allen Konstrukten wies *budC* (*K. pneumoniae*) die höchste Acetoinausbeute auf, während *budC* (*K. aerogenes*) den höchsten Biomassertrag aufwies (Abbildung 20). In Bezug auf das Verhältnis zwischen akkumuliertem Acetoin und 2,3-Butandiol produzierte *budC* (*E. cloacae*) als einziger Stamm mehr 2,3-Butandiol als Acetoin.



<i>budC</i> -Sequenz	Biomasse- ertrag [g g ⁻¹]	Acetoin- ertrag [%]	2,3-Butandiol- ertrag [%]	Produktertrag [%]
<i>K. pneumoniae</i> (pKR)	0,23	25,96	10,8	36,74
<i>K. pneumoniae</i> (pBBR1)	0,08	54,45	32,55	87,00
<i>K. aerogenes</i>	0,08	52,48	32,70	85,19
<i>E. cloacae</i>	0,06	41,34	46,77	88,11

Abbildung 20: Die Kohlenstoffeffizienzen der heterotrophen Vergleichsversuche sind in Biomassertrag, Acetoinertrag und 2,3-Butandiol-ertrag unterteilt. Der Graph zeigt das Verhältnis von Acetoin zu 2,3-Butandiol, während in der darunter liegenden Auflistung die einzelnen Effizienzen aufgeführt sind. Dabei wies pBBR1_budC (*E. cloacae*) den höchsten Produktertrag mit dem geringsten Biomassertrag auf während pKR_budC (*K. pneumoniae*) den geringsten Kohlenstoff ertrag und den höchsten Biomassertrag zeigte.

Die Produktivität der Stämme wurde jeweils berechnet und in Tabelle 16 aufgezeigt, wobei sie als g Produkt pro g Biomasse pro h angegeben wurde, um Verzerrungen durch das Wachstum der Kulturen zu vermeiden. Obwohl *budC* (*K. pneumoniae*) und *budC* (*K. aerogenes*) vergleichbare Acetoin- und durchschnittliche Gesamtproduktivitäten aufwiesen, gab es Unterschiede bei der 2,3-Butandiol- und der Maximalproduktivität. Im Gegensatz dazu zeigte *budC* (*E. cloacae*) die niedrigste Produktivität für Acetoin, jedoch die höchste für 2,3-Butandiol und im gesamten Durchschnitt der Produkte.

Tabelle 16: Maximale Produktivität der verschiedenen Stämme mit unterschiedlichen Versionen von *budC* in den heterotrophen Vergleichsstudien. Dargestellt ist die jeweils maximale Produktivität sowie die durchschnittliche über den gesamten Verlauf des Experiments.

<i>Produktivität [g Produkt g⁻¹ Biomasse h⁻¹]</i>				
Produktionsstamm	Acetoin Maximum	2,3-Butandiol Maximum	Gesamt Maximum	Gesamt Durchschnitt
<i>K. pneumoniae</i>	0,066	0,049	0,115	0,083
<i>K. aerogenes</i>	0,067	0,037	0,104	0,079
<i>E. cloacae</i>	0,043	0,064	0,108	0,101

Die potenziell interessantesten Anwendungen für Produktionsstämme von Knallgasbakterien sind sowohl mixotroph als auch autotroph, da so anfallende Abfallströme von z. B. Treibhausgasen genutzt und aufgewertet werden können. Daher wurden die zwei leistungsfähigeren Konstrukte, *budC* (*E. cloacae*) und *budC* (*K. pneumoniae*), in autotrophen Effizienzversuchen getestet und verglichen, um die Produktivität der Stämme unter diesen Bedingungen zu untersuchen.

3.3.2 Autotrophe Vergleichsstudien

Autotrophe Versuche wurden, aufgrund des hohen Energiebedarfs des Calvin-Zyklus und der daraus resultierenden langsameren Biomasseproduktion der Zellen, als Zellsuspensionsversuche mit einer OD₆₀₀ von 4 durchgeführt (Abbildung 21). Um die Vergleichbarkeit zu den heterotrophen Versuchen zu unterstützen, wurde der Plasmidvergleich zwischen pKR und pBBR1 noch einmal durchgeführt. Im Anschluss,

wurden die zwei vorherig leistungsfähigeren Versionen, *budC* (*E. cloacae*) und *budC* (*K. pneumoniae*), auf dem pBBR1-Plasmid unter autotrophen Bedingungen verglichen.

Im autotrophen Plasmidvergleich zeigte pBBR1_alsSD nach 70 h Acetoinkonzentrationen von über 11 mM während pKR_alsSD nach 188 h ein Maximum von 13 mM Acetoin zeigte. Im Gegensatz zu den heterotrophen Vergleichen wiesen beide Acetoinproduktionsstämme geringe Akkumulationen von 2,3-Butandiol auf. Der Plasmidvergleich der butandiolproduzierenden Stämme verlief ähnlich wie in den heterotrophen Versuchen mit einer fast doppelt so hohen Ansammlung an 2,3-Butandiol durch das pBBR1 Plasmid im Vergleich zum pKR-Plasmid.

Bei direktem Vergleich der pBBR1_alsSD-Stämme produzierten die Zellen mit *budC* (*E. cloacae*) innerhalb von 22 Stunden bis zu 8,5 mM 2,3-Butandiol und 1,8 mM Acetoin. Der Stamm mit *budC* (*K. pneumoniae*) hingegen akkumulierte maximal 7,8 mM 2,3-Butandiol nach 70 Stunden und 5,9 mM Acetoin nach 118 Stunden.

Um die Kohlenstoffaufnahme in den Produktionsstämmen weiter zu optimieren, wurde eine natürlicherweise in *C. necator* vorkommende Carboanhydrase (Cag) in die Plasmide integriert, von der angenommen wird, dass sie für die direkte Zufuhr von CO₂ zur RuBisCO verantwortlich ist (Gai *et al.*, 2014). *cag* (*E. cloacae*) zeigte ein ähnliches Verhalten wie *budC* (*E. cloacae*), mit etwas niedrigeren Werten bei allen Messungen. Nach 47 Stunden erreichte der Stamm eine Konzentration von 8 mM 2,3-Butandiol. Nach 116 h wurde eine maximale Konzentration von 5,4 mM Acetoin erreicht. Die Überexpression von *cag* in *cag* (*K. pneumoniae*) führte zu einem Rückgang aller Raten und einer mehr als dreifachen Verringerung der Verbrauchsrate gasförmiger Substrate (Anlage A 5 und Anlage A 6). Erst nach 357 Stunden erreichten die Produktkonzentrationen das Niveau des ursprünglichen Stammes.

Ergebnisse

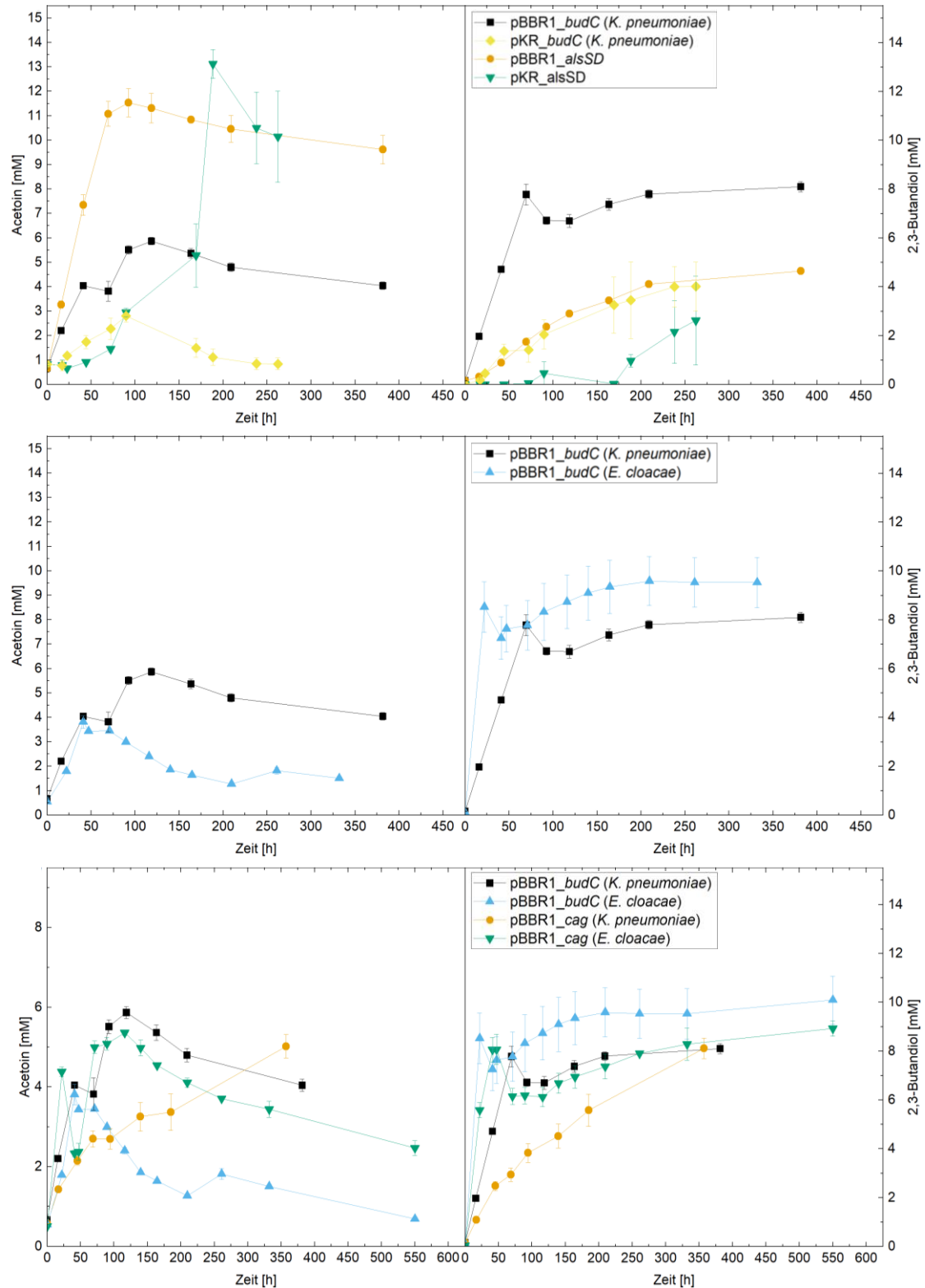


Abbildung 21: Vergleich der Produktionsplasmide (obere Reihe) und der *budC*-Varianten (mittlere Reihe) verschiedener Organismen (wie in Klammern angegeben) sowie Stämmen, in denen das *cag*-Gen überexprimiert wurde (untere Reihe), unter autotrophen Bedingungen. Es werden jeweils Acetoin- und 2,3-Butandiol-Werte gezeigt, während die zugehörigen optischen Dichten und die Gasmessungen im Anhang in Anlage A 3, Anlage A 4 und Anlage A 5 zu finden sind. Es zeigte sich eine Produktion mit dem *pBBR1*-Plasmid als effizienter als mit *pKR*, während der Stamm *budC (E. cloacae)* die schnellste und größte Akkumulation an 2,3-Butandiol zeigte.

Alle *budC*-tragenden, inklusive der *cag*-tragenden, Stämme zeigten eine zu den heterotrophen Experimenten vergleichbare Rückreaktion von 2,3-Butandiol zu Acetoin nach Erschöpfung der Kohlenstoffquelle. Die Umkehrreaktion stoppte jedoch, nachdem der Sauerstoff als Elektronenakzeptor verbraucht war, wie für *cag* (*E. cloacae*) in Abbildung 22 gezeigt wurde. Anschließend setzte sich die Reaktion zu 2,3-Butandiol fort.

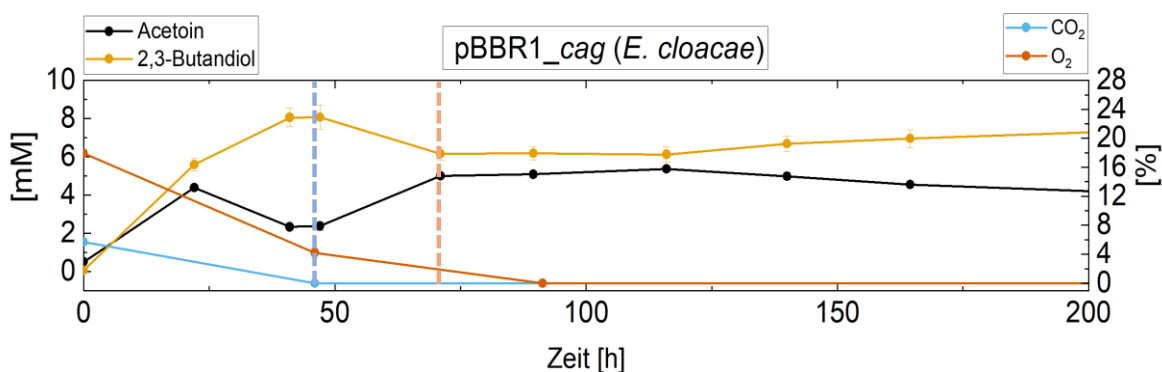


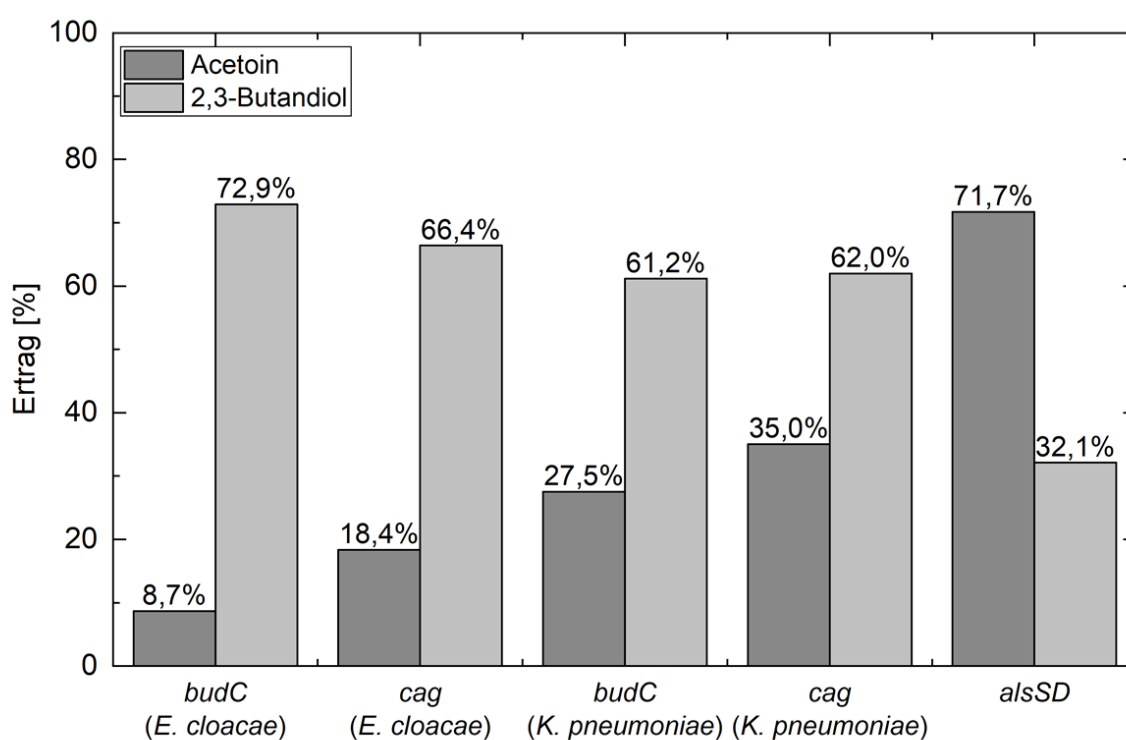
Abbildung 22: Exemplarische Darstellung der katalysierten Rückreaktion von 2,3-Butandiol zu Acetoin unter autotrophen Bedingungen von pBBR1_{phb}_{cag} (*E. cloacae*). Es werden zusätzlich CO₂- und O₂-Messungen dargestellt, um die Korrelation zwischen der Substratverfügbarkeit und den katalytischen Reaktionen des Enzyms aufzuzeigen. Hierbei beginnt nach dem Verbrauch von CO₂ eine Rückreaktion von 2,3-Butandiol zu Acetoin, die aufhört sobald O₂ verbraucht ist.

Die Kohlenstoff- und Wasserstoffausbeuten der getesteten Stämme wurden bestimmt und in Abbildung 23 dargestellt. Zusätzlich wurde die volumetrische Produktivität zum Zeitpunkt der vollständigen Metabolisierung von CO₂ berechnet und in Tabelle 17 aufgeführt. Das Fehlen der Rückreaktion zu Acetoin führte zu deutlich höheren Ausbeuten für 2,3-Butandiol im Vergleich zu den heterotrophen Versuchen. Beide Stämme, die die *budC*-Version von *E. cloacae* trugen (*budC* (*E. cloacae*) / *cag* (*E. cloacae*)), wiesen eine höhere Kohlenstoffausbeute für 2,3-Butandiol auf als ihre Vergleichsstämme jedoch eine geringere Ausbeute für Acetoin. Darüber hinaus zeigte *budC* (*E. cloacae*) die höchste Kohlenstoffausbeute für 2,3-Butandiol, die niedrigste Ausbeute für Acetoin und die höchste Raum-Zeit-Ausbeute von 39,45 mg l⁻¹ h⁻¹ unter allen Stämmen, was mit den heterotrophen Ergebnissen einherging (Abschnitt 3.3.1, Tabelle 16). Der Stamm *cag* (*K. pneumoniae*) wies mit 9,37 mg l⁻¹ h⁻¹ den niedrigsten Wert der volumetrischen Produktivität aller Stämme auf. Allerdings hatte er den höchsten Wasserstoff- und Gesamtkohlenstofffertrag aller Stämme sowie den höchsten Acetoin-Kohlenstofffertrag der *budC*-Stämme.

Ergebnisse

Tabelle 17: Berechnete Raum-Zeit-Ausbeuten der Stämme bei autotropher Produktion zum Zeitpunkt der vollständigen Metabolisierung von CO₂. *budC* (*E. cloacae*) und *cag* (*E. cloacae*) zeigten die höheren Gesamtproduktivitäten sowie für 2,3-Butandiol.

<i>vol. Produktivität [mg l⁻¹ h⁻¹]</i>			
Stamm	Acetoin	2,3-Butandiol	Gesamt
<i>budC</i> (<i>K. pneumoniae</i>)	8,45	10,21	18,67
<i>cag</i> (<i>K. pneumoniae</i>)	4,45	4,92	9,37
<i>budC</i> (<i>E. cloacae</i>)	4,97	34,48	39,45
<i>cag</i> (<i>E. cloacae</i>)	15,52	22,70	38,23



<i>Stamm</i>	Acetoin- ertrag [%]	2,3-Butandiol- ertrag [%]	Produktertrag [%]	Wasserstoff- effizienz [%]	H ₂ / CO ₂ * *+ NaHCO ₃
<i>budC</i> (<i>E. cloacae</i>)	8,68 ±0,4	72,92 ±3,8	81,6 ±4,2	33,46	6,62
<i>cag</i> (<i>E. cloacae</i>)	18,36 ±1	66,4 ±3,8	84,76 ±4,8	31,68	7,11
<i>budC</i> (<i>K. pneumoniae</i>)	27,52 ±1,6	61,16 ±3,2	88,68 ±4,8	36	6,63
<i>cag</i> (<i>K. pneumoniae</i>)	35,04 ±2,6	62 ±3,4	97,04 ±6	41,1	6,62
pBBR1_alsSD	71,72 ±4	32,12	103,84 ±5,7	38,55	7,00

Abbildung 23: Kohlenstoffausbeuten aus Produktionstests unter autotrophen Bedingungen mit Stämmen, die das pBBR1-Plasmid tragen. Die Acetoinausbeuten sind in dunkelgrau dargestellt, während die 2,3-Butandiol-Ausbeuten in hellgrau gezeigt werden, wodurch die Produktverhältnisse hervorgehoben werden. Die Produktausbeuten und Gesamtwasserstoffeffizienzen sowie die H₂ / CO₂-Verhältnisse sind in der nachstehenden Tabelle aufgeführt.

Die *cag*-tragenden Stämme wiesen leicht erhöhte Kohlenstoffeffizienzen im Vergleich zu ihren Vorgängerstämmen auf, jedoch zeigten sich diese bei einer Überprüfung durch einen t-Test zu einem Niveau von 0,05 als nicht signifikant unterschiedlich. Die Effizienzen der Stämme mit verschiedenen *budC*-Versionen konnten mit 0,036 zum gleichen Signifikanzniveau als verschieden angesehen werden.

3.3.3 2,3-Butandiol-Stereoisomerbildung

Die Proben der Produktionsexperimente wurden zusätzlich auf die Stereoisomerbildung der Stämme unter hetero- und autotrophen Bedingungen analysiert, da diese in Reinform von hohem Interesse für wirtschaftliche Anwendungen sind (Liu *et al.*, 2011). Unter heterotrophen Bedingungen konnte eine fast reine Isomerbildung aller Stämme von meso-2,3-Butandiol festgestellt werden (Abbildung 24). Dabei machten die zusätzlichen Isomere bei den pBBR1-Stämmen zwischen 6,1 und 8,24 % der Gesamtmenge aus. Lediglich das produzierte 2,3-Butandiol des pKR-Stamms akkumulierte nur zu 80 % das meso-Isomer.

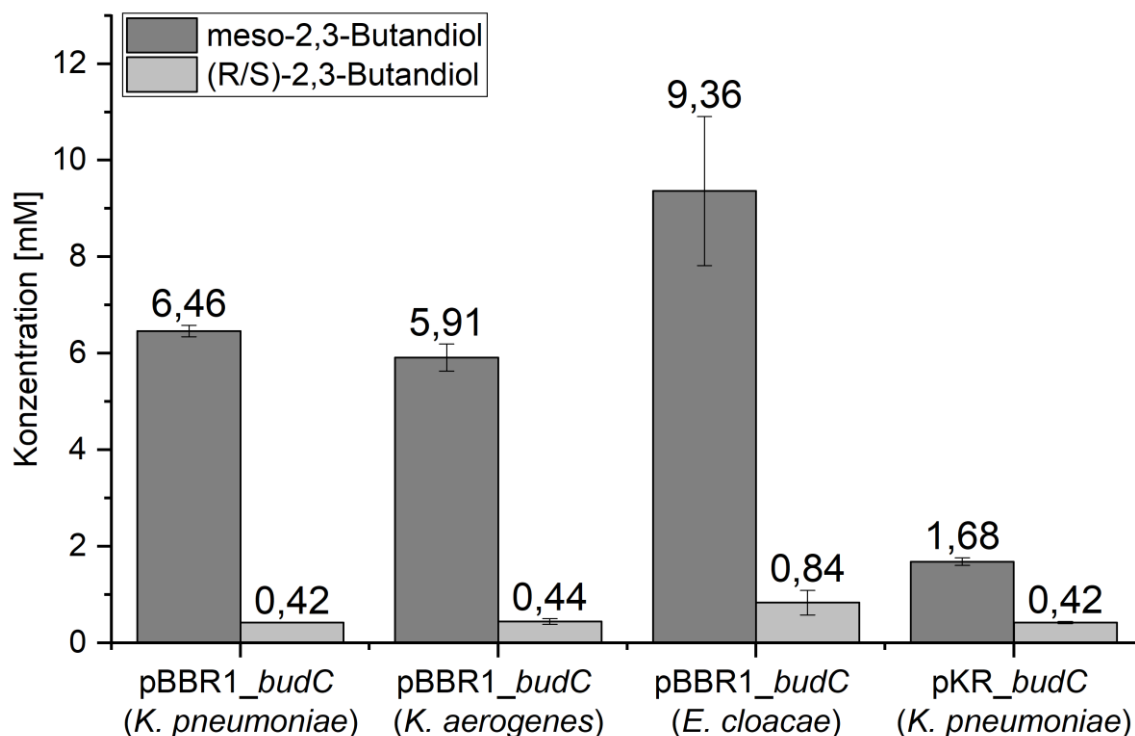


Abbildung 24: Stereoisomerzusammensetzung des produzierten 2,3-Butandiols bei heterotrophen Produktionsexperimenten. Alle pBBR1-basierten Produktionsstämmen zeigten fast reine Akkumulationen des meso-Isomers.

In den autotrophen Versuchen wurde 2,3-Butandiol produziert, welches eine größere Heterogenität der Stereoisomere aufwies (Abbildung 25). Es handelte sich in allen Fällen um eine Mischung, die lediglich aus 45,5 bis 50,6 % meso-2,3-Butandiol bestand und zu den weiteren Teilen aus R,R-/S,S-2,3-Butandiol bestand. Einzig das 2,3-Butandiol aus den autotrophen Versuchen mit dem acetoinproduzierenden Stamm pBBR1_alsSD setzte sich lediglich zu 19,8 % aus dem meso-Isomer und zu 80,2 % aus den weiteren Isomeren zusammen.

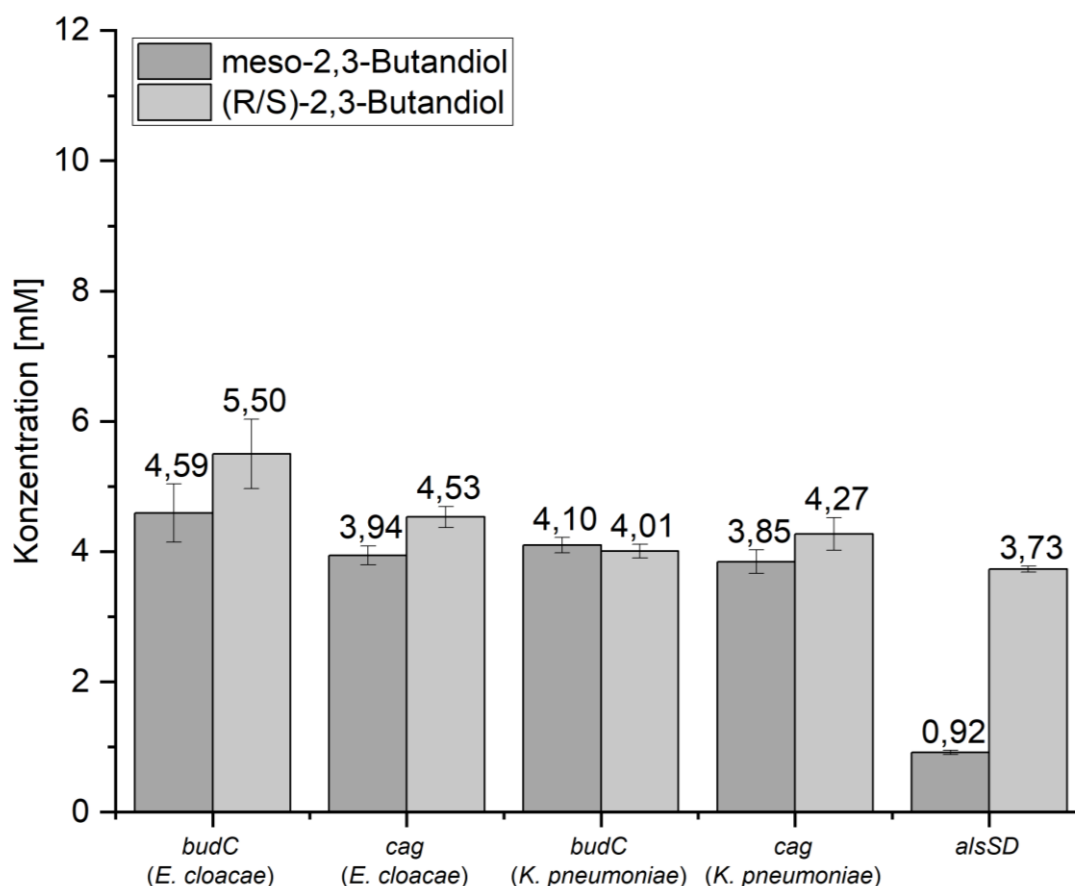


Abbildung 25: Stereoisomerzusammensetzung des produzierten 2,3-Butandiols der autotrophen Produktionsexperimente. In allen Isomermischungen zeigte sich lediglich eine Akkumulation von 45 – 50 % des meso-Isomers mit der Ausnahme des nachgewiesenen 2,3-Butandiols des acetoinproduzierenden Stamms.

Bei der Analyse der Isomere zeigte sich zusätzlich, dass die zuvor beobachtete Rückreaktion von 2,3-Butandiol zu Acetoin ausschließlich das meso-Isomer betraf. Das R/S-Butandiol sammelte sich langsamer, aber konstant über den Verlauf der Experimente an (Abbildung 26). Hierbei erreichte die Menge des meso-Isomers nur im Fall von *budC* (*K. pneumoniae*) wieder die des R,R/S,S-Isomergemischs.

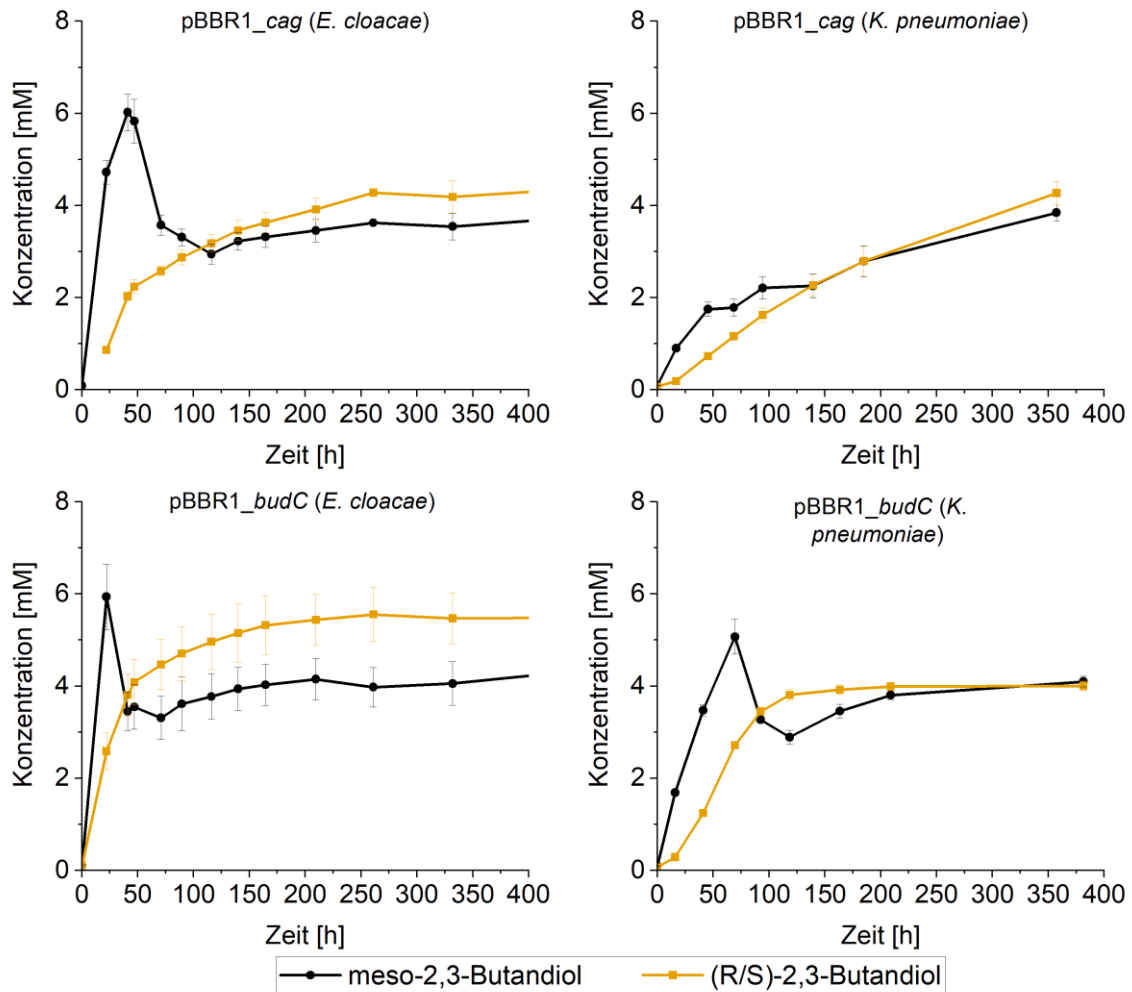


Abbildung 26: Im Verlauf der autotrophen Experimente gebildetes 2,3-Butandiol der Produktionsstämme und die Rückreaktion zu Acetoin nach Verbrauch von CO₂. Dieses wurde sowohl als meso- als auch als R,R-/S,S-Isomer dargestellt. Die Rückreaktion ist lediglich beim meso-Isomer feststellbar.

Da sich das 2,3-Butandiol der autotrophen Versuche zu großen Teilen nicht aus meso-Isomer zusammensetzte, wurden die Proben auf die Zusammensetzung und das Verhältnis zwischen dem R,R- und dem S,S-Isomer untersucht (Abbildung 27). Dabei zeigte sich, dass sich das Isomergemisch in allen Fällen zu etwa einem Viertel aus S,S-2,3-Butandiol und zu 20 % aus R,R-2,3-Butandiol zusammensetzte. Da die Isomertrennung lediglich auf einem GC möglich ist und die Gemische somit auf einem zu den vorherigen Analysen unterschiedlichen Gerät analysiert wurden (Abschnitt 2.3.2), veränderten sich die Zusammensetzungen geringfügig,

Ergebnisse

weshalb das meso-Isomer in diesen Messungen zwischen 52,1 und 57,6 % an 2,3-Butandiol ausmachte.

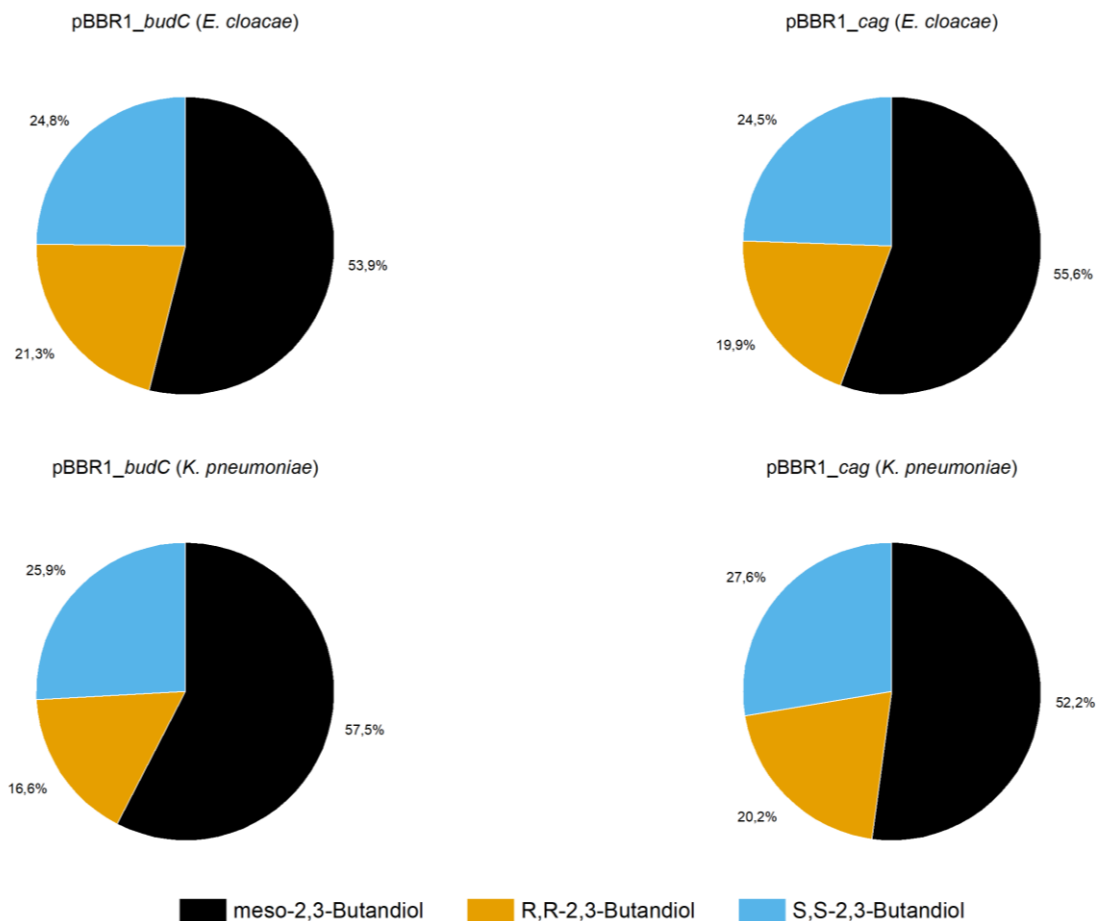


Abbildung 27: Stereoisomerzusammensetzung des in den autotrophen Versuchen produzierten 2,3-Butandiols aufgeteilt in das meso-, R,R- und S,S-Isomer. Es zeigte sich eine relativ konstante Aufteilung der Isomere bei allen Produktionsstämmen.

In zusätzlichen Experimenten (Daten nicht gezeigt) wurde beobachtet, dass auch unter heterotrophen Bedingungen in größeren Volumina von 1 l und nach längerer Zeit als in den oben beschriebenen Experimenten eine Isomermischung entsteht. Dabei zeigte sich eine größere Ansammlung an R-/S-Gemisch, wenn die Zellen Sauerstoffmangel erfuhren, während sich eine verhältnismäßig ähnliche Mischung zeigte, wenn eine dauerhafte Zugabe von O₂ vorhanden war. In Abbildung 28 sind hintereinandergelegte HPLC-Chromatogramme von jeweils zwei Proben mit (unteres Chromatogramm) und ohne (oberes Chromatogramm) konstanter Sauerstoffzugabe nach 400 bzw. 600 Stunden zu sehen.

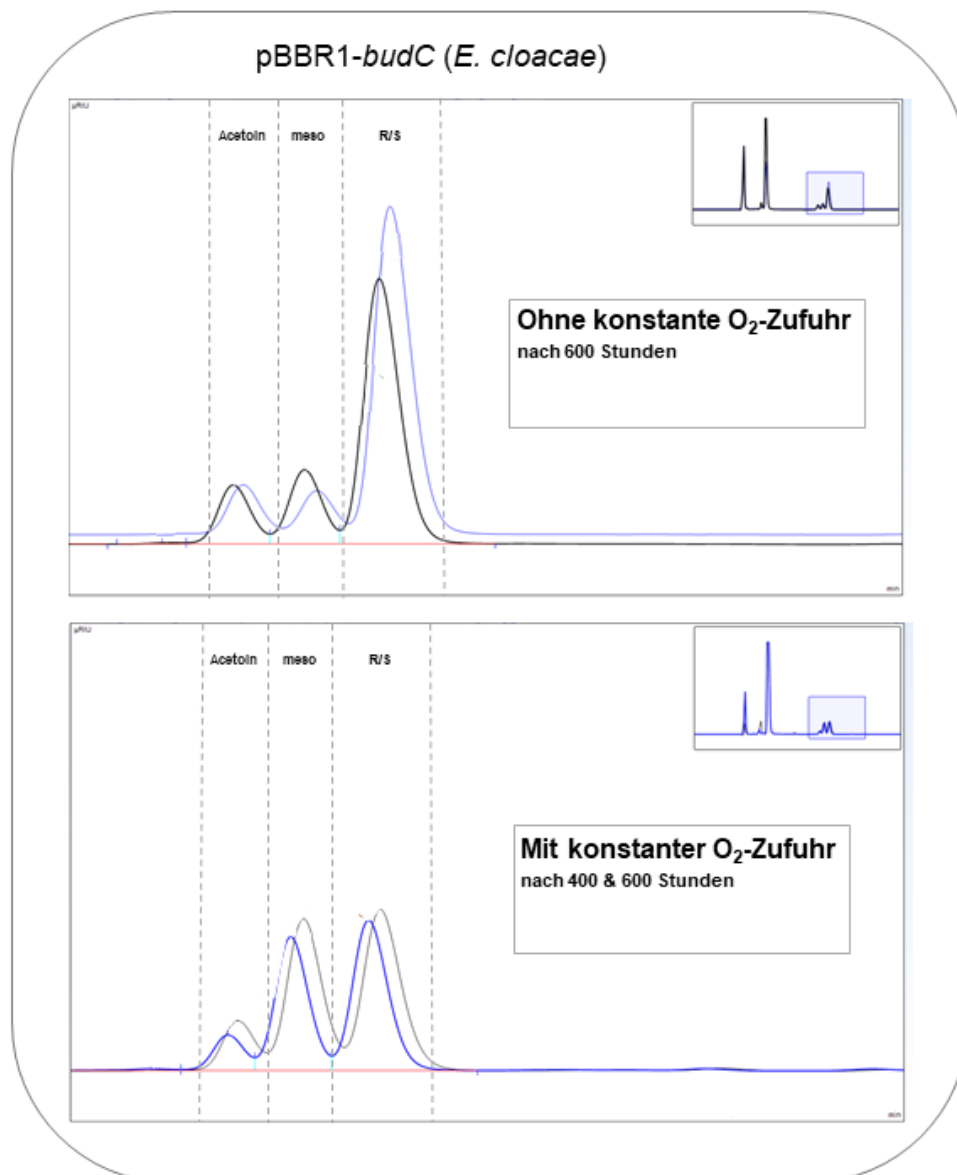


Abbildung 28: HPLC-Chromatogramme heterotropher Produktionen nach 400 bzw. 600 Stunden mit (unten) bzw. ohne (oben) dauerhafte O₂-Zugabe sind dargestellt. Es sind jeweils Acetoin-, meso- und R,R-/S,S-2,3-Butandiolpeaks in hintereinandergelegten Chromatogrammen zu sehen. Hierbei war ein aktiver Einfluss der Zufuhr von O₂ auf das Verhältnis der verschiedenen entstehenden Isomere feststellbar.

3.4 Aufreinigung von 2,3-Butandiol

Um eine vollständige Grundlage für eine industrielle Produktion von 2,3-Butandiol durch *C. necator* zu schaffen, wurde nach der Etablierung und Charakterisierung der Produktionsstämme die Aufreinigung des Produkts aus der Fermentationsflüssigkeit untersucht. Dabei wurde darauf geachtet, dass ausgewählte Methoden eine nachhaltige

Produktion ermöglichen, indem die Zellen im optimalen Fall während oder nach dem Aufreinigungsprozess kontinuierlich weiter produzieren können. Für eine potentielle Aufreinigung während der Fermentation wurden Extraktionen mit Oleylalkohol, Rizinusöl und Methylacetat ausgewählt, wobei für diese Extraktionswerte von zwischen 40 und 70 % angegeben waren. Hierbei handelt es sich um Extraktionsmittel, die sich über Zeit von der wässrigen Nährmedienphase trennen. Das 2,3-Butandiol geht nach einer Durchmischung der Phasen in die Extraktionsmittelphase über und kann so aus der Fermentationsflüssigkeit entfernt werden, ohne einen messbaren Einfluss auf die Produktion der Zellen in der wässrigen Phase aufzuweisen. Da es mit über 90 % Extraktion als effizienter als die zuvor genannten Methoden beschrieben wurde, wurde ebenfalls eine Endpunktaufreinigung durch ein wässriges Zweiphasensystem (ATPS) getestet (Sun *et al.*, 2009). Bei dieser Methode wird das 2,3-Butandiol durch 2-Propanol extrahiert, welches wiederum im Anschluss durch Ammoniumsulfat aus der wässrigen Phase verdrängt wird, wodurch ebenfalls zwei Phasen entstehen. Es wurde beschrieben, dass das Nährmedium hierbei im Anschluss von den Zellen abgetrennt werden muss, um diese weiterhin für die Fermentation nutzen zu können.

3.4.1 Validierung der Produktextraktion

In Validierungsversuchen wurden die Methoden im Triplikate wie beschrieben mit dem in den Fermentationen genutzten Medium getestet, um die Extraktionen, sowie die Effizienz in Zusammenhang mit dem genutzten Nährmedium zu untersuchen. Zusätzlich wurden im Unikat verschiedene weitere Mengen der Extraktionsmittel getestet, um mögliche Optimierungen oder ein größeres Extraktionspotential zu ermitteln (Abbildung 29). Dabei zeigte sich, dass von allen getesteten Verhältnissen 20 % des Volumens an Extraktionsmitteln für Oleylalkohol, Rizinusöl und Methylacetat die höchste Extraktion aufwies, während 34 % 2-Propanol und 20 % beim ATPS das optimalste Verhältnis darstellte. Diese Mengen entsprachen den angegebenen Literaturwerten, wobei ATPS 92 %, Methylacetat 51 %, Oleylalkohol 45 % und Rizinusöl 19 % des gelösten 2,3-Butandiols aus dem Medium extrahierten. Weitere getestete Anteile aller Extraktionsmittel erbrachten keine Hinweise auf eine mögliche Optimierung der jeweiligen Extraktion.

Ergebnisse

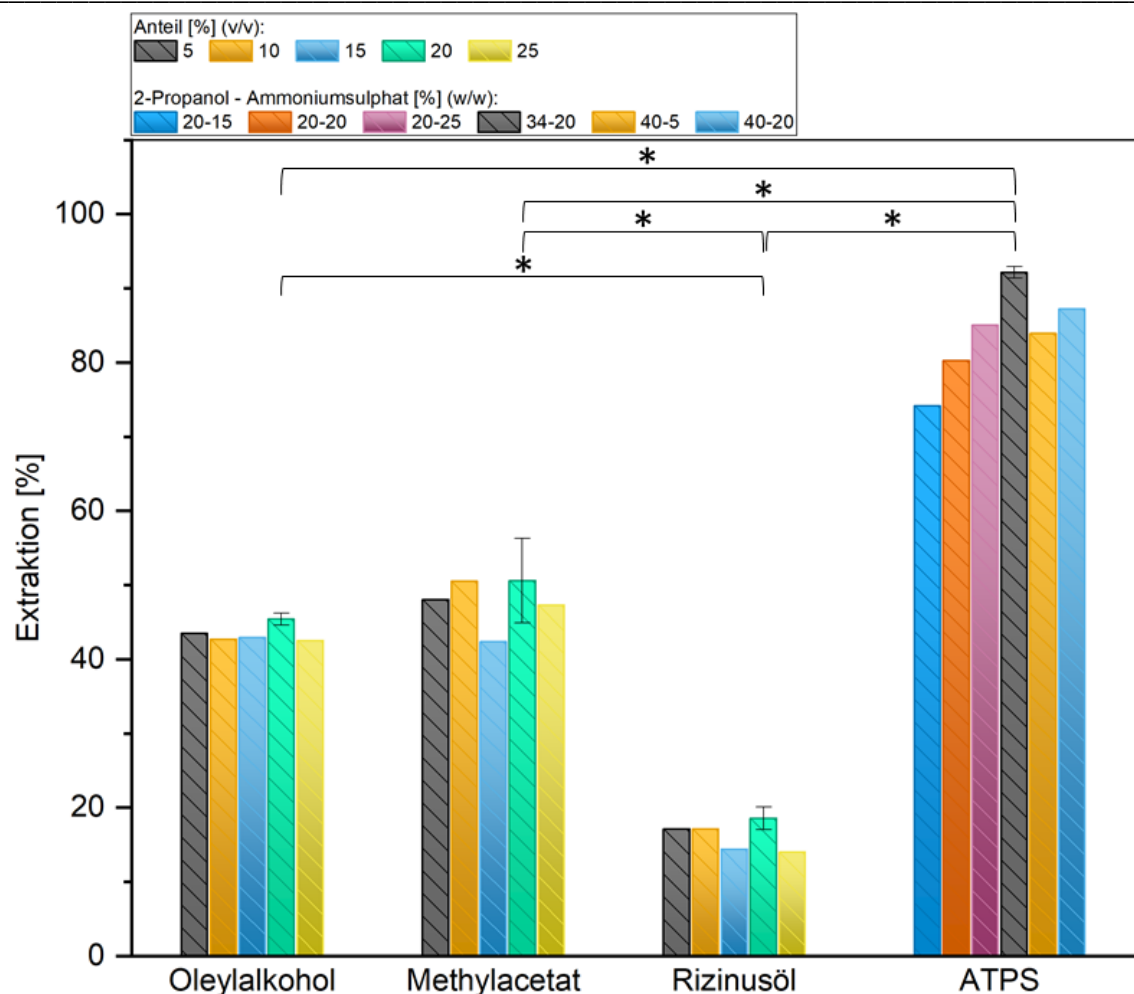


Abbildung 29: Versuche zur Extraktion von 2,3-Butandiol aus dem Fermentationsmedium, durchgeführt mit in MM81 gelöstem 2,3-Butandiol. Es wurden die Anteile der Extraktionsmittel aus den ursprünglichen Publikationen im Triplikate getestet, während zusätzliche Anteile im Unikat getestet wurden. Die im Triplikate getesteten Extraktionsmittel zeigten die höchsten Extraktionsraten. Sterne zeigen statistisch signifikante Unterschiede zu einem Niveau von 0,01 zwischen den Extraktionswerten an.

Um eine Extraktion durch die getesteten Extraktionsmittel von 2,3-Butandiol in Fermentationen mit *C. necator* zu ermöglichen, musste untersucht werden, ob ein negativer Einfluss durch die Extraktionsverfahren auf das Wachstum der Zellen vorhanden war. Da Wachstum im Zuge dieser Arbeit durch ein optisches Messverfahren bei 600 nm gemessen wurde, musste sichergestellt werden, dass die Extraktionsmittel dieses nicht beeinflussten. Um sicherzustellen, dass die gemessenen Werte nicht durch die während der Versuche beigemischten Extraktionsmittel verfälscht wurden, wurden sie in MM81 gemischt und eine optische Messreihe durchgeführt. Hierfür wurde das Medium mit den Extraktionsmitteln gemischt und anschließend von der sofort gebildeten Phase abgetrennt. Anschließend wurde die optische Dichte bei 600 nm über Zeit gemessen, um festzustellen, ob ein Einfluss der

Ergebnisse

Messungen vorlag und wie lange dies der Fall war. Da ein Einfluss nur vor einer vollständigen Phasentrennung vorliegen konnte, wurde hiermit ebenfalls die Ruhephase vor den OD₆₀₀-Messungen für die späteren Wachstumsversuche bestimmt. In Tabelle 18 sind die Messungen der optischen Dichte bei 600 nm aufgeführt, wobei bei Oleylalkohol und Rizinusöl ein Einfluss auf die optischen Messungen feststellbar war. Die Messungen ergaben hierbei einen Zeitraum von 60 min Ruhephase vor den Messungen, um in den Wachstumsexperimenten einen möglichst geringen Einfluss der Extraktionsmittel zu messen. Die Werte zu diesem Zeitpunkt wurden bei den Wachstumsexperimenten anschließend entsprechend verrechnet.

Tabelle 18: Optische Messungen bei 600 nm von MM 81 – Extraktionsmittelgemischen. Die Werte zeigen eine Messreihe über Zeit während einer Ruhephase in der eine vollständige Phasentrennung entsteht.

<i>Zeit [min]</i>	<i>OD₆₀₀</i>		
	Oleylalkohol	Rizinusöl	Methylacetat
10	1,16	1,18	0,04
20	0,85	0,89	0,02
30	0,12	0,75	0,03
40	0,08	0,61	0,01
50	0,07	0,54	0,02
60	0,03	0,35	0,01

3.4.2 Wachstumsversuche mit Extraktionsmethoden

Nachdem zuvor die optimalen Anteile der Extraktionsmittel, sowie die Zeit bis zur Phasentrennung ermittelt wurden, wurden Wachstumsversuche mit jeweils einem WT- und einem 2,3-Butandiol-produzierenden Stamm durchgeführt (Tabelle 1: #1070 und #1885). Als Referenz wurden die zwei Stämme ohne Zugabe der Extraktionsmittel mit 10 mM Fructose kultiviert (Abbildung 30) und mit den weiteren Wachstumsversuchen verglichen. Dabei zeigte der Wildtypstamm ein schnelleres und stärkeres Wachstum, wobei die Stämme eine maximale OD₆₀₀ von 2,0 bzw. 0,8 erreichten und nach 30 bzw. 37 h in die Plateauphase gelangten.

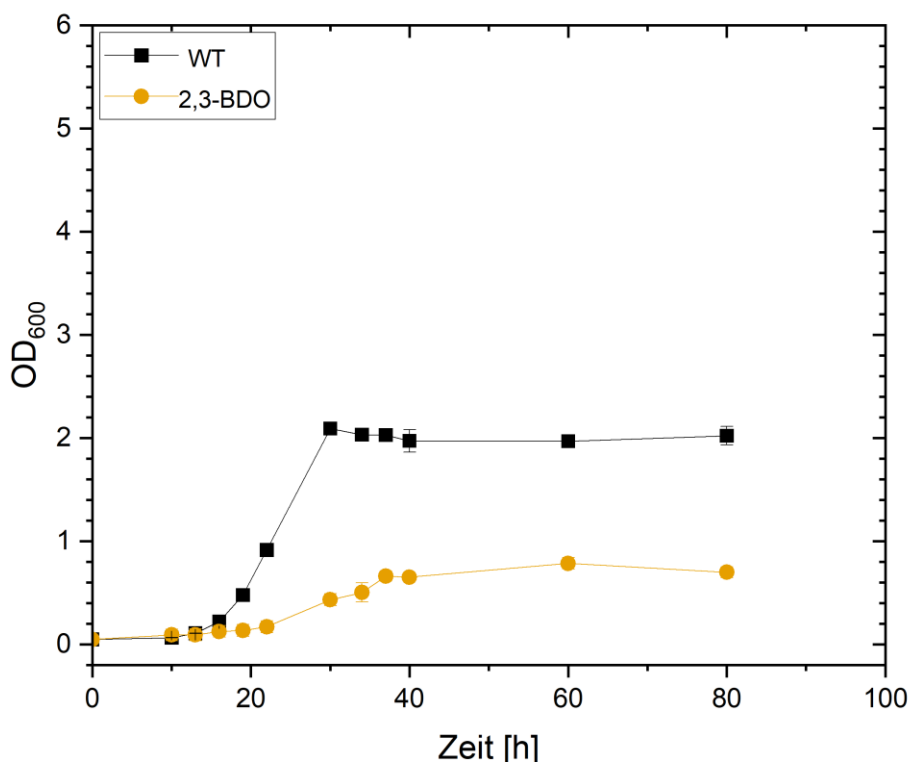


Abbildung 30: Vergleichsexperiment der Wachstumsversuche mit Extraktionsmitteln mit einem WT- und einem 2,3-Butandiolproduktionsstamm (2,3-BDO) ohne Extraktionsmittel. Die Ergebnisse dieses Versuchs wurden als Vergleich zu den nachfolgenden Versuchen verwendet. Die Skala wurde Abbildung 31 entsprechend gewählt.

Die Experimente wurden jeweils mit beiden Stämmen mit Fructose als Substrat für Oleylalkohol, Methylacetat und Rizinusöl sowie für ATPS mit dem 2,3-Butandiolproduktionsstamm nach 22 und nach 38 h durchgeführt. Für dieses wurden zwei verschiedene Konzentrationen, des im Medium verbleibenden Ammoniumsulphats, getestet (Abschnitt 2.3.4), um zu untersuchen, ob die Konzentrationen einen unterschiedlichen Einfluss auf die Zellen zeigen und das Abtrennen der Zellen von der Fermentationsflüssigkeit für eine Weiterverwendung im besten Fall unterlassen werden kann. Hierbei wurde das Verhältnis zwischen Ammoniumsulphat und 2-Propanol beibehalten, indem nur ein Teil des Nährmediums verwendet wurde. Zu Vergleichszwecken wurden die Wachstumsdaten mit der gleichen Skala dargestellt und gegebenenfalls noch einmal mit angepasster Achse aufgeführt (Abbildung 31). Keine Kultur mit zugesetztem Extraktionsmittel zeigte ein zum Referenzexperiment vergleichbares Wachstum. Bei Kultivierungen mit Methylacetat war kein Wachstum nachweisbar, während Rizinusöl und Oleylalkohol zu einem erhöhten Wachstum von bis zu einer maximalen OD₆₀₀ von 19,9 bzw. 7,31 beim WT-Stamm führten.

Ergebnisse

Im Falle des 2,3-Butandiol-produzierenden Stamms zeigte lediglich der mit Rizinusöl vermischte Stamm Wachstum bis zu einer maximalen OD₆₀₀ von 3,8.

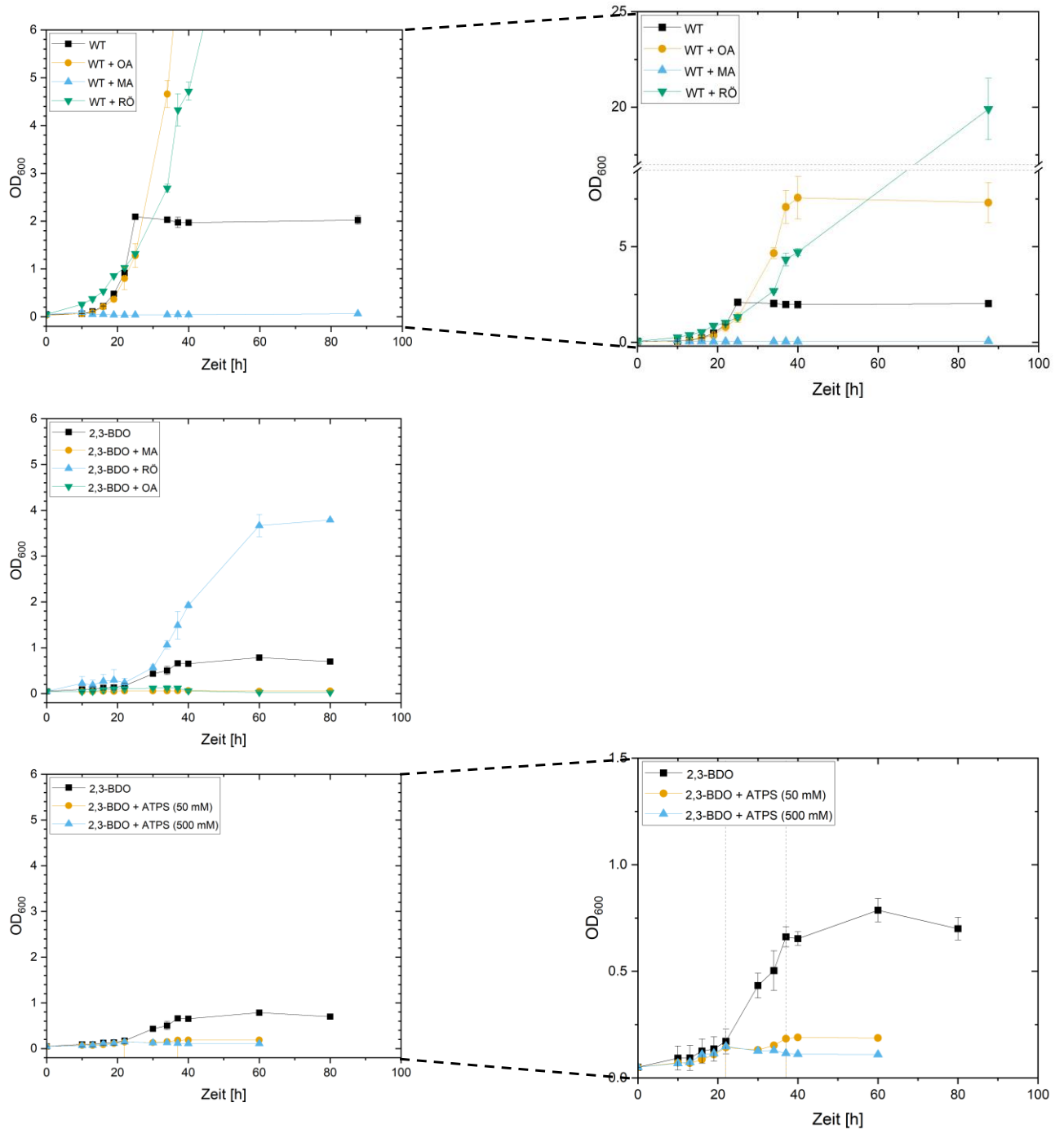


Abbildung 31: Gemessene OD₆₀₀ der Wachstumsexperimente mit *C. necator* in Anwesenheit von Extraktionsmitteln über Zeit mit Fructose als Substrat. Dabei wurden Oleylalkohol (OA), Methylacetat (MA) und Rizinusöl (RÖ) zu Kulturen eines WT- und eines 2,3-Butandiol-produzierenden Stamms (2,3-BDO) gegeben. Die Aufreinigung durch 2-Propanol und Ammoniumsulfat (ATPS) fand an zwei Zeitpunkten der Kultivierungen nach 22 und 38 h mit 50 und 500 mM an Ammoniumsulfat statt (untere Graphen; dargestellt mit grauen Linien). Die Werte des Referenzexperimentes sind in schwarz dargestellt. Es war ein verstärktes Wachstum durch Oleylalkohol und Rizinusöl, jedoch ein Ausbleiben von Wachstum durch das ATPS und Methylacetat festzustellen.

Bei der Aufreinigung durch das ATPS wurden die Kultivierungen zu zwei Zeitpunkten gestoppt und die Extraktion durchgeführt. Nach der ersten Extraktion kam es im Falle von 500 mM Ammoniumsulfat zu einem vollständigen Stopp des Wachstums. Bei einer Konzentration von 50 mM Ammoniumsulfat zeigten die Zellen innerhalb von 15 Stunden in den optischen Messungen weiterhin einen Anstieg von OD 0,14 auf 0,18. Nach der zweiten Extraktion konnte jedoch keine weitere Veränderung mehr festgestellt werden.

Da das erhöhte Wachstum unter Anwesenheit von Oleylalkohol und Rizinusöl auf eine Verstoffwechslung durch *C. necator* hindeutete, wurden die Versuche in zusätzlichen Experimenten ohne Fructose als Substrat wiederholt (Daten nicht gezeigt). Hierbei konnte ebenfalls Wachstum von *C. necator* bis zu einer OD₆₀₀ von 5 bzw. 7 innerhalb von 50 h nachgewiesen werden.

3.5 Biofilmbildung von *C. necator*

Nachdem in dieser Arbeit die Langzeitproduktion von Acetoin, die Produktion von 2,3-Butandiol sowie mögliche kontinuierliche Aufreinigungsprozesse mit *C. necator* etabliert und untersucht wurden, wurde abschließend die Biofilmentwicklung untersucht. Fermentationen in Biofilmsystemen werden als vielversprechend angesehen, haben jedoch die Limitierung, dass bislang zu wenig über die grundsätzlichen Mechanismen bekannt ist, um sie in Produktionen effizient ohne hohe Mehrkosten anzuwenden (Schmeckeber *et al.*, 2022). Da über die Biofilmbildung von *C. necator* bisher nichts bekannt ist, wurde in diesem Abschnitt die Biofilmbildung des Organismus untersucht, um essentielle Schlüsselgene der Biofilmbildung zu identifizieren und ein grundlegendes Verständnis für weitere Anwendungen zu schaffen.

3.5.1 Verschiedene Stadien der Biofilmentwicklung

Um die Biofilmentwicklung von *C. necator* zu untersuchen, sollten Zellen aus verschiedenen Stadien der Biofilmentwicklung transkriptomisch analysiert werden. Hierfür wurde in einem in einem ersten Experiment die Biofilmentwicklung eines WT-Stamms in drei mikrofluidischen Fließzellen (entsprechend Abschnitt 2.3.3 kultiviert) aufgenommen und

ausgewertet, um die Zeitpunkte einer sehr frühen, einer weiter fortgeschrittenen und einer vollständigen Biofilmentwicklung anhand der zeitlichen Volumenzunahme zu identifizieren. Das Ziel war, frisch angeheftete Zellen, Kolonien während der Biofilmbildung und vollständigen Biofilm zu analysieren. Hierfür wurde ein Biofilm ab einem Volumen von $120 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$ als vollständig entwickelt angesehen, da die Ergebnisse aus den Langzeitstudien zuvor zeigten, dass die Volumina von Biofilmen durch *C. necator* ab einem Wert von $120 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$ um diesen herum schwankten (Abschnitt 3.1.2).

Für die Identifizierung der drei Stadien wurden die Biofilmhöhe und das Volumen des Biofilms im Laufe der Zeit analysiert (Abbildung 32). Die Höhe der analysierten Biofilme wurde als farbkodierte Höhenkarte dargestellt, während das Biofilmvolumen als Graph dargestellt wurde. Die Kultivierungskanäle der Fließzellen wurden hierfür an drei Stellen des Kanals analysiert, da die Länge des Kanals die Flächenabdeckung von OCT-Aufnahmen überschreitet, jedoch Unterschiede zwischen den verschiedenen Abschnitten mit einbezogen werden mussten. In allen drei Fließzellen setzte die Biofilmbildung erst nach etwa 100 Stunden in den vorderen Bereichen ein, während sich in den mittleren und hinteren Bereichen bereits ab 24 Stunden nach der Inokulation Kolonien bildeten. Über den Verlauf bis zu 240 h glich sich das Volumen des Biofilms in allen drei Abschnitten an und erreichte schlussendlich Werte von $120\text{-}150 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$.

Da sich die ersten Kolonien bereits nach dem ersten Tag bildeten und eine nahezu flächige Ausbreitung im Kultivierungskanal nach 100 h zeigte, die sich im weiteren Verlauf vor allem durch Volumenzunahme auf über $100 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$ auszeichnete, wurden die Zeitpunkte der transkriptomischen Analysen auf 18,75, 75 und 300 h festgelegt.

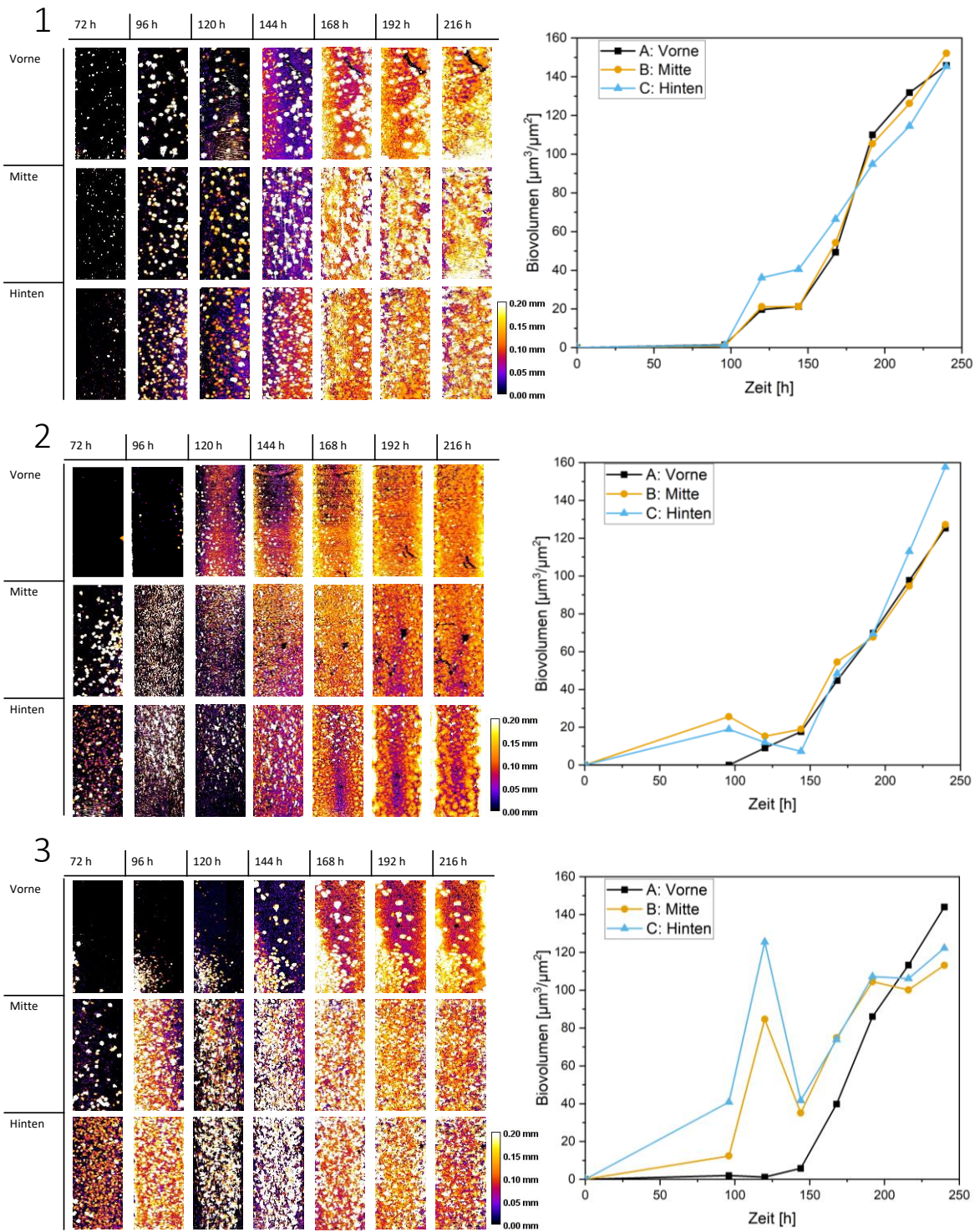


Abbildung 32: OCT-Aufnahmen der Biofilmentwicklung eines *C. necator* WT-Stamms in drei mikrofluidischen Fließzellen. Die Aufnahmen wurden hinsichtlich der Biofilmhöhe und des Biofilmvolumens analysiert, wobei die Biofilmhöhe als farblich kodierte Höhenkarte dargestellt ist (linke Seite) während die Volumenwerte rechts dargestellt sind. Es zeigte sich eine vergleichbare Biofilmbildung in allen Replikaten, die bereits nach 24 h einsetzte und sich über den Verlauf von 250 h zunehmend entwickelte.

3.5.2 Änderung der Expression während der Biofilmentwicklung

Für die Transkriptionsanalyse der Biofilmbildung von *C. necator* wurde ein WT-Stamm (#1070) Abschnitt 2.3.3 entsprechend kultiviert. Die Kultivierungen wurden nach den zuvor bestimmten Zeitpunkten bei 18,75, 75 und 300 h gestoppt und die mRNA der Zellen durch Sequenzierungen analysiert (Abschnitt 2.3.3.2). Die Transkription der Gene an den drei Stadien der Biofilmbildung wurde auf statistische Signifikanz der Unterschiede zu planktonischen Referenzkulturen in den RNA-Leveln, auf der Basis von einem Konfidenzintervall von 0,05, ausgewertet. Zusätzlich wurden die Veränderungen der Expressionen der Gene als *log₂-fold change* (log₂-FC; die x-fache Änderung ausgedrückt als Logarithmus zur Basis 2) umgerechnet, da hierdurch ein direkter Vergleich der Expressionslevel aller Gene ermöglicht wurde. Basierend auf dieser Analyse wurden 4472 Gene mit einem log₂-FC von mindestens 0,5 oder mehr identifiziert. Bei diesen kann mit Sicherheit von einer veränderten Transkription im Vergleich zur planktonischen Kultur gesprochen werden, da ein Wert von 0,5 einer 25 % Steigerung der zuweisbaren Expression entspricht und somit außerhalb von normalen Fluktuationen liegt. Diese 4472 machen 65 % der gesamten Genanzahl von *C. necator* aus, wobei die Anzahl der Gene die hoch- bzw. herunterreguliert waren, sich in den verschiedenen Stadien deutlich unterschied (Abbildung 33). Im Stadium der Zellanheftung waren mehr Gene hoch- während in den anderen Stadien mehr Gene herunterreguliert wurden. Insgesamt wurden nach 75 h mit 3998 Genen die meisten regulierten Gene nachgewiesen, nach 18,75 h waren es 3167 Gene und nach 300 h Biofilmkultivierung 3425 Gene im Vergleich zur Referenz.

Ergebnisse

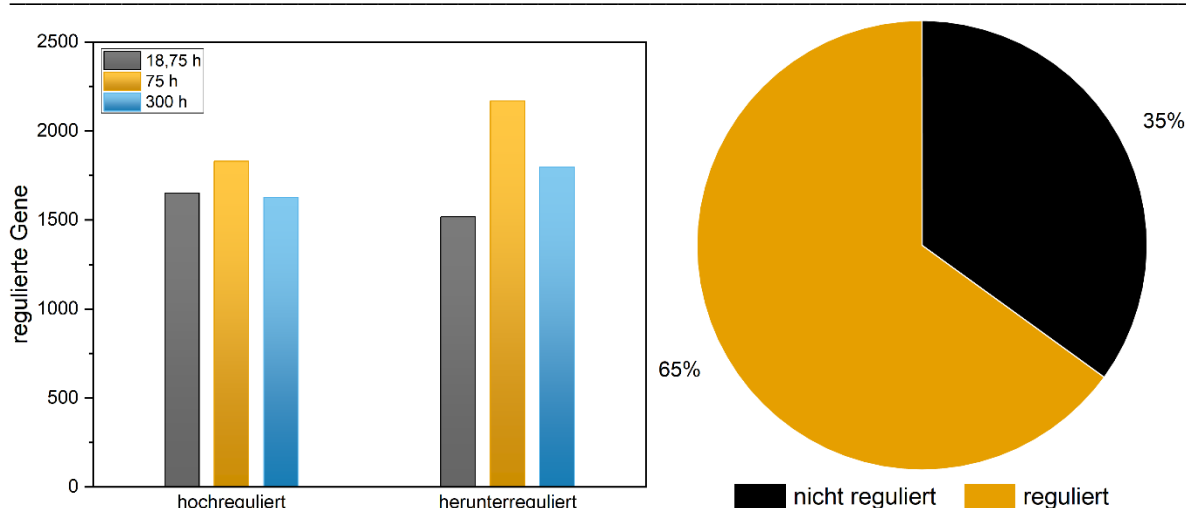


Abbildung 33: Anteil der veränderten Gentranskription am gesamten Genom bei der Biofilmbildung (rechts) sowie Anzahl der hoch- und herunterregulierten Gene zu den jeweilig analysierten Zeitpunkten (links). Insgesamt wurden 65 % der gesamten Gene nachweisbar verschieden reguliert als im Vergleich zu den planktonischen Referenzkulturen.

Bei Betrachtung der einzelnen Gene zu den verschiedenen Zeitpunkten unterscheiden sich die am stärksten regulierten Gene größtenteils zwischen den verschiedenen Stadien. In Tabelle 19 und Tabelle 20 wurden die jeweils 5 am stärksten regulierten Gene dargestellt, wobei es zwischen den Phasen Überschneidungen gab. Nach 75 und 300 h Stunden waren drei gleiche Gene unter den stark hochregulierten, während die am stärksten herunterregulierten Gene hingegen bei 18,75 und 75 h vier Überschneidungen aufwiesen. Diese in verschiedenen Phasen mehrfach auftretenden Gene sind in den folgenden Tabellen ersichtlich und zeigten in den jeweiligen Phasen ebenfalls unterschiedliche Expressionsstärken. Insgesamt schwankten die Log₂-FC-Werte der am stärksten regulierten Gene zwischen 7 und 9, wobei die am stärksten herunterregulierten Gene nach 75 h Werte von 13-14,8 aufwiesen und somit ein vielfaches stärker reguliert waren, als in den übrigen Phasen. Die Funktionen der jeweiligen Genprodukte wurden in den nachfolgenden Tabellen soweit sie bekannt waren aufgeführt. Diese basieren zumeist auf homologen Sequenzen oder simulierten Vorhersagen aus Genomsequenzierungen von Organismen, welche in der NCBI-Datenbank hinterlegt wurden. Die jeweiligen Werte sind den Phasen durch farbliche Markierungen zugewiesen.

Ergebnisse

Tabelle 19: Die 5 am stärksten hochregulierten Gene entsprechend den Phasen der Biofilmbildung eines *C. necator* WT-Stamms und ihre entsprechenden Expressionsanzahlen im Vergleich zur planktonischen Referenzkultur sowie die Funktion des Genprodukts. Die entsprechenden Werte nach 18,75 h sind in Rot, die nach 75 h in Grün und nach 300 h in Blau dargestellt und zusätzlich umrandet. Drei Gene zeigten sich sowohl nach 75 als auch nach 300 h als am stärksten reguliert.

<i>Gen</i>	<i>Log2-FC</i> (18,75 h)	<i>Log2-FC</i> (75 h)	<i>Log2-FC</i> (300 h)	<i>Genprodukt</i>
E6A55_RS21895	<u>9,0954</u>	5,8403	4,0414	Aromat / Alken - Monooxygenase - Hydroxylase Untereinheit beta
E6A55_RS21945	<u>8,1492</u>	4,7179	2,5770	2-Hydroxymuconat- Tautomerasenfamilien Protein
E6A55_RS21915	<u>8,1481</u>	5,2827	3,6318	2Fe-2S Eisen-Schwefel-Cluster- bindendes Protein
E6A55_RS21905	<u>8,0606</u>	4,9767	3,0658	Aromat/Alken/Methan - Monooxygenase - Hydroxylase/Oxygenase Untereinheit alpha
E6A55_RS21910	<u>7,9172</u>	4,8353	3,2732	Phenol - Hydroxylase Untereinheit P4
E6A55_RS19515	6,3153	<u>10,2875</u>	<u>8,5201</u>	Außenmembran beta-Fass Protein
E6A55_RS04670	6,9011	<u>9,3616</u>	<u>7,7823</u>	FAD-abhängige Monooxygenase
E6A55_RS30695	4,6075	<u>8,8003</u>	6,4979	Nitritreduktase
E6A55_RS04685	6,5008	<u>8,7762</u>	<u>7,5790</u>	Hypothetisches Protein
E6A55_RS24775	6,4545	<u>8,7097</u>	1,0356	Dihydrolipoyl-Dehydrogenase
E6A55_RS04675	6,9314	8,3790	<u>7,3689</u>	Asp/Glu Racemase
E6A55_RS04680	5,4324	8,5485	<u>7,3617</u>	Alpha/beta -Hydrolase

Ergebnisse

Tabelle 20: Die 5 am stärksten herunterregulierten Gene entsprechend den Phasen der Biofilmbildung eines *C. necator* WT-Stamms und ihre entsprechenden Expressionsanzahlen im Vergleich zur planktonischen Referenzkultur sowie die Funktion des Genprodukts. Die entsprechenden Werte nach 18,75 h sind in Rot, die nach 75 h in Grün und nach 300 h in Blau dargestellt und zusätzlich umrandet. Vier Gene zeigten sich sowohl nach 18,75 als auch nach 75 h als am stärksten reguliert.

<i>Gen</i>	<i>Log2-FC</i> (18,75 h)	<i>Log2-FC</i> (75 h)	<i>Log2-FC</i> (300 h)	<i>Genprodukt</i>
E6A55_RS19625	<u>-9,9090</u>	-12,4852	-0,5662	Ferredoxin - NAD - Reductase
E6A55_RS19605	<u>-9,5933</u>	<u>-14,8300</u>	-2,4417	Ybak/EsbC Familienprotein
E6A55_RS19640	<u>-9,5331</u>	<u>-14,7698</u>	-3,2332	Vier-Helix-Bündel kupferbindendes Protein
E6A55_RS19635	<u>-9,2843</u>	<u>-14,5210</u>	-2,4783	LysR-Familie Transkriptions- regulator
E6A55_RS19655	<u>-8,4581</u>	<u>-13,6948</u>	-0,4246	EAL-Domäne enthaltendes Protein
fumC	-7,8764	<u>-13,1131</u>	-0,6002	Klasse II Fumarat - Hydratase
E6A55_RS19840	-6,4134	-7,2953	<u>-7,1629</u>	FAD-abhängige Monooxygenase
E6A55_RS23175	-6,0109	-6,5871	<u>-6,8980</u>	Nitritreduktase
E6A55_RS19845	-5,5297	-6,9987	<u>-6,8468</u>	Hypothetisches Protein
E6A55_RS23170	-6,0302	-7,0196	<u>-6,7969</u>	dihydrolipoyl Dehydrogenase
E6A55_RS31100	-7,3619	-8,3166	<u>-6,7699</u>	Asp/Glu Racemase

Die Transkriptome wurden ebenfalls auf bekannte Biofilmbildungsfaktoren wie Quorum-sensing und c-di-GMP (Abschnitt 1.4) ausgewertet, soweit sie anhand der NCBI-Datenbank identifiziert werden konnten (Tabelle 21). Dabei zeigte sich, dass die Expression von Proteinen mit EAL-Domänen sowie weiteren Genprodukten, die mit Quorum-Sensing und c-di-GMP in Verbindung gebracht werden konnten, zu allen Zeitpunkten herunterreguliert waren. Die Expression eines Gens das für ein GGDEF-Domäne-enthaltendes Protein kodiert war in allen drei Stadien hochreguliert, während zwei weitere im adulten Biofilmstadium lediglich bei 300 h hochreguliert waren. In der genomischen Datenbank war nur ein für HD-GYP-Domänen-enthaltende Proteine annotiertes Gen enthalten, bei welchem die Expression

Ergebnisse

ebenfalls zu allen drei Zeitpunkten hochreguliert war. Gene, die mit S-Adenosylmethionin in Verbindung stehen, zeigten keine einheitliche Regulation. Sechs Gene waren in allen Stadien hochreguliert, drei waren in allen Stadien herunterreguliert und sieben zeigten unterschiedliche Regulationen je nach Zeitpunkt der Analyse. Hoch- und Herunterregulierungen der Gene sind in den folgenden Tabellen durch eine grüne bzw. rote Farbe markiert.

Tabelle 21: Bekannte Gene und Genprodukte, die mit der Biofilmbildung in Verbindung stehen, sowie ihre Regulierung im Vergleich zur planktonischen Referenz. Dabei waren Grün markierte Gene hoch- und Rot markierte Gene herunterreguliert während Blau markierte Werte im Signifikanztest keinen p-Wert unter 0,05 aufwiesen.

<i>Gen</i>	<i>Log2-FC</i> <i>(18,75 h)</i>	<i>Log2-FC</i> <i>(75 h)</i>	<i>Log2-FC</i> <i>(300 h)</i>	<i>Produkt</i>
<u>GGDEF-Domäne enthaltende</u>				
E6A55_RS25375	0,3067	1,9606	2,0464	GGDEF Domäne-enthaltendes Protein
E6A55_RS12480	-0,8087	-0,3421	0,2791	GGDEF Domäne-enthaltendes Protein
E6A55_RS30370	-1,6024	-0,3597	0,9657	GGDEF Domäne-enthaltendes Protein
E6A55_RS27245	-1,1877	-0,3605	-0,3846	GGDEF Domäne-enthaltendes Protein
E6A55_RS02050	-0,6766	-2,4349	-0,6441	GGDEF Domäne-enthaltendes Protein
<u>EAL-Domäne enthaltende</u>				
E6A55_RS07980	-1,9514	-1,0377	-1,0030	EAL Domäne-enthaltendes Protein
E6A55_RS34835	-4,3505	-2,2524	-1,6162	EAL Domäne-enthaltendes Protein
E6A55_RS00130	-1,8848	-2,4064	-1,6434	EAL Domäne-enthaltendes Protein
E6A55_RS11515	-3,6551	-2,4301	-1,5773	EAL Domäne-enthaltendes Protein
E6A55_RS14415	-3,5652	-3,1885	-2,1928	EAL Domäne-enthaltendes Protein
E6A55_RS06295	-3,8250	-3,5259	-1,2084	EAL Domäne-enthaltendes Protein
E6A55_RS19655	-8,4581	-13,6948	-0,4246	EAL Domäne-enthaltendes Protein
<u>HD-GYP-Domäne enthaltende</u>				
E6A55_RS09730	0,9658	0,7335	0,5924	HD-GYP Domäne-enthaltendes Protein

Ergebnisse

<i>Gen</i>	<i>Log2-FC</i> <i>(18,75 h)</i>	<i>Log2-FC</i> <i>(75 h)</i>	<i>Log2-FC</i> <i>(300 h)</i>	<i>Produkt</i>
<u>Quorum-sensing</u>				
cqsA	-1,5850	-1,8927	-1,3571	Autoinduktor CAI-1 Synthase
<u>c-di-GMP</u>				
E6A55_RS15605	-0,1402	-0,0687	-0,9535	YajQ Familie <i>cyclic di-GMP-bindendes Protein</i>
<u>S-Adenosylmethionin (in Zusammenhang stehend)</u>				
metK	0,9329	1,6117	0,9844	Methioninadenosyltransferase
prmA	0,5922	0,2676	1,1034	50S ribosomales Protein L11 Methyltransferase <i>(S-Adenosylmethionin-abhängige Aktivität)</i>
prmB	1,6263	0,9303	1,2304	50S ribosomales Protein L3 N(5)- Glutaminmethyltransferase <i>(S-Adenosylmethionin-abhängige Aktivität)</i>
prmC	-0,0623	-0,2488	0,5841	Peptidkettenlösungsfaktor N-(5)-Glutaminmethyl-Transferase <i>(S-Adenosylmethionin-abhängige Aktivität)</i>
miaB	0,4612	0,5057	0,8587	tRNA (N6-Isopentenyl Adenosin(37)-C2)- Methylthiotransferase MiaB <i>(S-Adenosyl-L-Methionin bindend)</i>
rimO	0,1921	0,3540	0,5092	30S ribosomales Protein S12 Methylthiotransferase RimO <i>(S-Adenosyl-L-Methionin bindend)</i>
rsmI	-0,0599	0,3009	0,3729	16S rRNA (Cytidin(1402)-2'-O)- Methyltransferase <i>(S-Adenosylmethionin-abhängige Aktivität)</i>
E6A55_RS17035	-0,7280	-0,1733	-0,1547	5'-Methylthioadenosin/ Adenosylhomocystein- Nucleosidase <i>(katalysiert S-Adenosylmethionin)</i>

Ergebnisse

<i>Gen</i>	<i>Log2-FC</i> <i>(18,75 h)</i>	<i>Log2-FC</i> <i>(75 h)</i>	<i>Log2-FC</i> <i>(300 h)</i>	<i>Produkt</i>
lipA	0,1483	0,4400	-0,2687	Lipoylsynthase (<i>S-Adenosyl-L-Methionin</i> bindend)
E6A55_RS10110	-1,2328	0,1384	-0,4987	Methioninadenosyl-Transferase
bioA	-1,7871	-2,6312	-2,0944	Adenosylmethionin--8-Amino-7-Oxononanoat - Transaminase
bioB	-1,4008	-1,6424	-1,8998	Biotinsynthase BioB (<i>S-Adenosyl-L-Methionin</i> bindend)
<u>S-Adenosylmethionin (Stoffwechselweg)</u>				
nirJ	3,4308	6,7697	4,3121	Häm-d1-Biosynthese <i>radical</i> SAM Protein NirJ
E6A55_RS10000	1,8663	-0,6845	-0,1497	<i>radical</i> SAM Protein

Um Gene zu identifizieren, die einen großen Einfluss auf die Biofilmbildung haben, wurde mit Hilfe eines Tn5-Plasmids eine Transposonbibliothek erstellt (Abschnitt 2.3.3.2). Diese sollte Mutationen in allen nicht-essentiellen Genen von *C. necator* enthalten, so dass in weiteren Experimenten Gene identifiziert werden können, deren Mutationen einen positiven oder negativen Einfluss auf die Fähigkeit der Organismen zur Biofilmbildung bewirken. Nach der Herstellung der Bibliothek gemäß Abschnitt 2.3.3.2 wurde eine erste Probesequenzierung durchgeführt, um zu prüfen, ob die Erstellung der Bibliothek erfolgreich war und eine umfassende, zeit- und kostenintensive Sequenzierung Sinn ergibt. Diese muss basierend auf den hier gezeigten Ergebnissen anschließend durchgeführt werden, um die Vollständigkeit der Bibliothek zu bestätigen. In diese Arbeit konnte aus zeitlichen Gründen nur diese erste Testsequenzierung aufgenommen werden.

Bei dieser Sequenzierung eines Teils der isolierten gDNA der Mutationsbibliothek wurden 239 Mutationen identifiziert, von denen sich 148 auf Chromosom 1, 89 auf Chromosom 2 und 2 auf dem Megaplasmid des Organismus befanden (Abbildung 34). Von diesen 239 Mutationen waren die meisten über das gesamte Genom verteilt, wobei das gleiche Gen in

Ergebnisse

den meisten Fällen ein- bis zweimal betroffen war. Lediglich in 20 Genen wurden mehr als 2 Mutationen gefunden.

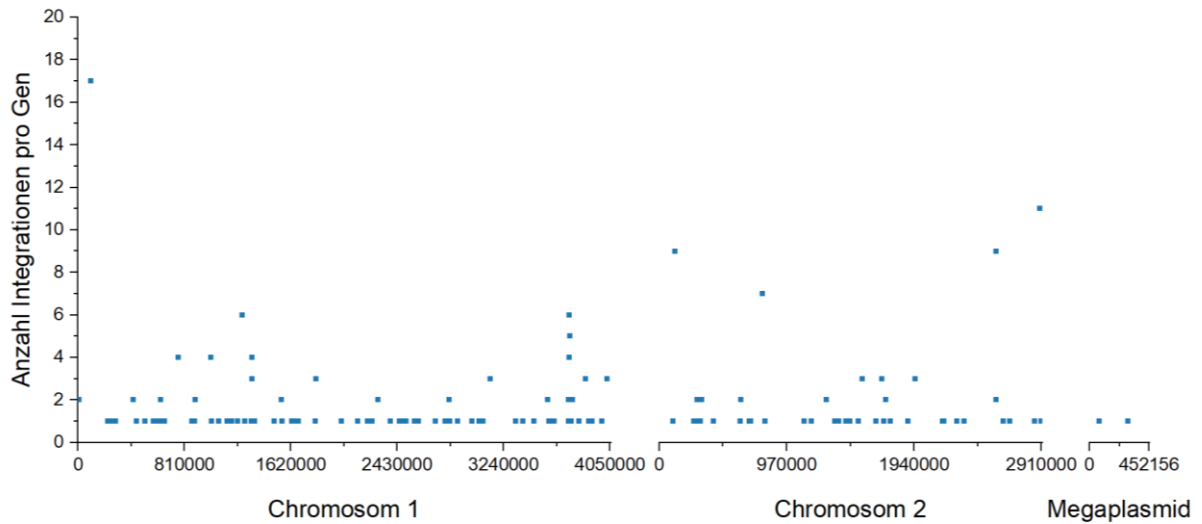


Abbildung 34: Verteilung einer ersten Testsequenzierung der Tn5-Transposonbibliothek aufgeteilt in die genomischen Replikons von *C. necator* und angezeigt in bp. Es wird dabei jeweils die Anzahl von Mutationssequenzen in den gleichen Genen angegeben. Es zeigten sich zufällige Integrationen, wobei Gene zumeist zwischen 1-2 Mal Mutationen aufwiesen.

4 Diskussion

Aufgrund der gegenwärtigen Klimakrise besteht ein Bedarf an Alternativen zur erdölbasierten Produktion von Chemikalien. Insbesondere die Nutzung von Abfallströmen ist ein vielversprechender Ansatz für eine nachhaltige Produktion als Alternative. Unter dem Gesichtspunkt des Treibhauseffekts ist CO₂ einer der relevantesten Abfallströme aus der industriellen Verarbeitung. Für eine effiziente Nutzung ist die Entwicklung stabiler autotropher sowie mixotropher Produktionsprozesse notwendig, da sie die Verwendung von CO₂ als Substrat ermöglichen um eine praktikable Alternative zur petrochemischen Verarbeitung zu entwickeln. *C. necator* gilt als vielversprechender lithoautotropher Organismus für die mikrobielle Herstellung verschiedener Produkte. Das Ziel dieser Arbeit war es daher, die autotrophe Produktion der Plattformchemikalie 2,3-Butandiol in *C. necator* zu charakterisieren und zu optimieren, sowie weitere relevante Aspekte wie die Langzeitnutzung, das Verhalten in Gegenwart von Substraten und Produkten sowie verschiedenen Aufarbeitungsmittel für 2,3-Butandiol und die auf Biofilmen basierende Lebensweise von *C. necator* zu untersuchen.

4.1 Langzeitproduktion von Acetoin

4.1.1 Vorbereitungen und Durchführung

In einer Langzeitproduktion wurde die Dauer einer stabilen Produktion von Acetoin durch den von Windhorst und Gescher (2019) etablierten Ausgangsstamm als Grundlage für die weiteren Arbeiten untersucht. Hierbei standen nicht nur die Dauer der stabilen Produktion, sondern auch die Gründe der Limitierung dieser im Fokus. Die Langzeitproduktion von Acetoin wurde auf der Grundlage der Biofilmlbensweise von *C. necator* durchgeführt, da dies eine einfache Kontrolle der Produktion innerhalb von Minuten ermöglicht. Zudem werden die Zellen auf natürliche Weise im Fermentationssystem immobilisiert, sodass ein Auswaschen der Zellen bei Durchflusssystemen verhindert ist. Bei den Vorarbeiten zu diesem Versuch zeigte sich, dass das Eisenammoniumcitrat in der ursprünglichen Konzentration bei der Lagerung des Mediums über mehrere Tage hinweg ausfiel, so dass der Anteil angepasst wurde, um die Konzentrationen im Lagerbehälter und im Kultivierungskanal konstant zu

halten und schwankende Bedingungen oder Verstopfungen des mikrofluidischen Systems zu vermeiden. Bei einer Reduzierung von 50 auf 10 und 5 mg l⁻¹ wurde über 48 h keine Ausfällung beobachtet, so dass für die größere Zeitspanne der anschließenden Produktion schließlich eine Konzentration von 2,5 mg l⁻¹ verwendet wurde. Ein möglicher negativer Effekt auf die Produktion konnte durch einen Wachstumsversuch ausgeschlossen werden und auch in der Langzeitproduktion wurde über mehrere Wochen kein verzögerter Niederschlag beobachtet.

Auch die Handhabung des Antibiotikums wurde an die Langzeitlagerung angepasst, da ein eindeutiger Einfluss des MM 81 auf die Konzentration von Tetracyclin gezeigt werden konnte. Hierfür wurde das Tetracyclin nicht direkt dem Medium zugesetzt, sondern in einem separaten Lagerbehälter aufbewahrt. Das Medium wurde entsprechend höher konzentriert, so dass nach dem Mischen unmittelbar vor den Chips die Konzentration von Medium und Tetracyclin der Arbeitskonzentration entsprach. Optische Mischversuche ergaben, dass ein vorgeschaltetes Mischgefäß eine Lösung darstellte, wobei die vollständige Durchmischung als bestätigt angesehen werden muss, wenn spätere Messungen von Fructose während den Läufen berücksichtigt werden. Nach Vermischung des doppelkonzentrierten Mediums mit dem Antibiotikum vor den Fließzellen, konnte die angestrebte Konzentration an Fructose in allen drei Replikaten nachgewiesen werden, so dass von einer vollständigen Durchmischung des Mediums ausgegangen werden kann (Abschnitt 3.1.2).

4.1.2 Genetische Einflüsse auf die Langzeitproduktion

Nachdem ein Wert von 0,005 mM Acetoin min⁻¹ der einzelnen Durchflusszellen im Langzeitexperiment gemessen wurde, wurden die Durchflusszellen gestoppt und der Biofilm auf Mutationen hin untersucht, die im Laufe der Zeit aufgetreten waren. Fließzelle 1 zeigte hierbei eine wesentlich längere stabile Produktion als die weiteren Replikate und musste aus technischen Gründen vor dem Erreichen des Schwellenwerts gestoppt werden. Wird jedoch der zeitliche Verlauf betrachtet, so zeigt sich, dass die Produktion ebenfalls rückläufig war (Abbildung 16). Hierdurch war jedoch ersichtlich, dass eine stabile Langzeitproduktion zu diesem Stadium bereits möglich war und anschließende Analysen zusätzlich mögliche Verbesserungen aufzeigen könnten. Durch die später in allen drei Replikaten identifizierten Mutationen in nahezu 100 % der Zellen, ist es wahrscheinlich, dass diese einen Einfluss auf

die Produktion hatten und bereits in Fließzelle 1 vorhanden waren, weshalb die Produktion ebenfalls am Absinken war.

Die zugrunde liegende Annahme, dass Mutationen in einem Langzeitexperiment mit prokaryotischen Zellen unvermeidbar sind, ist auf den natürlichen genetischen Drift von Prokaryoten bzw. die zellulären Sicherheitsmechanismen ihrer DNA-Replikation zurückzuführen (McInerney *et al.*, 2017). Dieser führt zu Variationen in den Genotypen, die in der Regel zufällig während der Zellteilung auftreten, verursacht durch Insertionen basierend auf homologen Regionen, aktive Transposons im Genom, fehlerhafte Replikation während der genomischen Verdopplung durch Polymerasen oder regulatorische Mechanismen (Arber, 1993). Ist ein solches Ereignis einmal eingetreten und eine Mutation im Genom entstanden, entscheidet der vorhandene Selektionsdruck darüber, ob sich die neue Genotypvariante durchsetzt oder ob sie aufgrund mangelnder Fitness oder Verdrängung durch andere, besser angepasste Varianten aussortiert wird (McInerney *et al.*, 2017).

Generell ist der Unterschied in der Laufzeit durch eine unterschiedliche Entwicklung der Zellsubpopulationen zu erklären. Der kontinuierliche Fructoseverbrauch und das vorhandene Biovolumen zeigten, dass die Kulturen zum Zeitpunkt der Endanalyse aktiv waren und Unterschiede nicht durch verschiedene Vitalitäten entstanden. Wahrscheinlicher ist, dass die in den Durchflusszellen 1 und 3 gefundenen Mutationen die Ursache für den großen Unterschied in den Laufzeiten von 353 h verantwortlich waren (Abschnitt 3.1.3). Für die betroffenen Gene aus Durchflusszelle 1 können lediglich aufgrund der NCBI-Annotationen des Genoms die Funktionen der Genprodukte, die in den Tabellen aufgeführt sind, vorhergesagt werden. Hierbei ist das Produkt von E6A55_19070 eine Monooxygenase und Teil des Ionentransports innerhalb der Zellen sowie RpsJ Teil der kleinen ribosomalen Untereinheit und somit an der Proteinsynthese beteiligt. Ob oder auf welche Weise die Mutationen einen positiven Einfluss auf die deutlich längere Produktion von Fließzelle 1 hatten ist nicht zu sagen. E6A55_RS21570 aus Durchflusszelle 3 kodiert für eine Histidinkinase, deren Ortholog CqsS (EC:2.7.13.3) in verschiedenen *Vibrio*-Spezies als Sensor für den Autoinduktor CAI-1 identifiziert wurde und dort somit Teil des Quorum-sensing-Apparates ist (Miller *et al.*, 2002; Henke and Bassler, 2004; Waters and Bassler, 2005; Milton, 2006). Es erscheint daher möglich, dass diese Mutation einen Einfluss auf die Biofilmbildung von *C. necator* hat und Zellen, die diese Mutation tragen, einen Vorteil gegenüber anderen Zellen bei der Biofilmbildung haben, wodurch sich alle weiteren Mutationen ebenfalls schnell vermehren.

Die Mutationen am Resistenzgen und am Replikationsursprung des Plasmids in allen Durchflusszellen, zusammen mit der um bis zu 63 % verringerten Plasmidzahl im Vergleich zum Referenzstamm, lassen darauf schließen, dass der Selektionsdruck des Antibiotikums über die Versuchsdauer nicht ausreichend war. Da das Vorratsgefäß des Antibiotikums spätestens alle 14 Tage ausgetauscht werden musste, ist ein Absinken der Konzentration als Grund auszuschließen. Stattdessen kann es durch Mutationen im Genom oder auf den Produktionsplasmiden erklärt werden. Genomische Mutationen müssten jedoch in den Zellen stark vertreten und damit in den Analysen erkennbar sein. Da in mikrobiellen Kulturen, insbesondere in Biofilmen, eine hohe Frequenz an neu auftretenden Mutationen durch Anpassungsdruck vorhanden ist (Woo *et al.*, 2012; Jo *et al.*, 2022), ist es auch möglich, dass sich mehrere Mutationen gleichzeitig entwickelt haben, die einzeln betrachtet weniger häufig auftreten, aber alle gemeinsam die natürliche Resistenz des Organismus erhöhen. Hierdurch könnten weniger Kopien der Resistenzgene ausreichend gewesen sein, um das Überleben der Zellen zu sichern. Da die Häufigkeit von Mutationen in den Analysen gefiltert wurde, müssten solche Mutationen in allen Fließzellen in vielen kleinen Subpopulationen verteilt auftreten um nicht detektiert zu werden. Grundsätzlich ist diese Annahme möglich, jedoch durch die hierdurch entstehenden Vorteile für das Überleben und Teilen der Zellen unwahrscheinlich. Mit größerer Wahrscheinlichkeit reichten die ohnehin schon hohe natürliche Resistenz gegen Antibiotika der *Cupriavidus*-Gattung (Massip *et al.*, 2020) kombiniert mit der schutzbietenden Matrix der Biofilme über Zeit aus (Schmeckebeier *et al.*, 2022), sodass eine verringerte Anzahl an Plasmiden pro Zelle die vollständige Resistenz gegen Tetracyclin ermöglichen. Somit nahm die Produktion ab, nicht jedoch das Biofilmvolumen und der Fructoseverbrauch. Da die Produktionsplasmide den Organismus zwingen, wertvolle Ressourcen in den eingeführten Stoffwechselweg umzuleiten, jedoch keinerlei direkten Vorteil für das Überleben bieten, ist es erwartbar, dass die Plasmidanzahl bis zu dem Limit absinkt, das benötigt wird um die vollständige Resistenz gegen Tetracyclin zu ermöglichen. Eine sinkende Expression von heterolog exprimierten Genen ist ein häufiges Phänomen bei der Untersuchung von Kulturen genetisch veränderter Organismen, da der verursachte Zellstress einen neuen Selektionsdruck erschafft. Dieser kann in einigen Fällen zu weiteren physiologischen Veränderungen und Mutationen führen, was schließlich zum Erliegen der Expression der Produktionsgene führen kann (Borkowski *et al.*, 2016).

Eine direkte Lösung für die sinkende Plasmidanzahl wäre die Integration der Produktionsgene in das Genom des Organismus, so dass der Selektionsdruck durch das Antibiotikum entfällt,

die Produktion von Acetoin bzw. Butandiol jedoch weiterhin aufrecht erhalten bleibt. Damit wäre das Problem der Resistenzbildung des Organismus und der Biofilme umgangen. Zwar bedeutet die Integration einen zusätzlichen Aufwand und die Gene müssten vielleicht mehrfach eingebracht werden, um die höhere Kopienzahl der Gene auf den Plasmiden auszugleichen, jedoch wird eine genomische Integration mit größerer Stabilität der Gene in Verbindung gebracht (Voss and Steinbüchel, 2006). Eine genaue Anzahl der Integrationen müsste durch zusätzliche Versuche bestimmt werden um die plasmidbasierte Produktion auszugleichen, jedoch konnte in der Vergangenheit bereits gezeigt werden, dass eine genomische Produktion in *C. necator* durch Integrationen der nötigen Gene auf ein vergleichbares Niveau zu einem Produktionsplasmid angehoben werden kann (Bommareddy *et al.*, 2020). Darüber hinaus würde eine solche Integration auch das Problem der Lagerung und Zufuhr frischer Antibiotika lösen und den Stämmen eine wesentlich längere stabile Produktion ermöglichen. Da im Zuge dieser Arbeit weitere Produktionsgene getestet und charakterisiert wurden, ist eine genomische Integration jedoch erst im Anschluss sinnvoll. Da hier jedoch bereits eine stabile Produktion von annähernd 3 Monaten gezeigt wurde, ist eine genomische Produktion von mehr als 6 Monaten vorstellbar, wie bereits in Biofilmproduktionen mit natürlichen Produzenten verschiedener Chemikalien gezeigt werden konnte (Liu *et al.*, 2005; Ferone *et al.*, 2018).

Ein Einfluss durch aktive Transposonmutationen wurde in den Analysen der Mutationen nicht gefunden. Transposons sind DNA-Sequenzabschnitte, die mit Hilfe eines Enzyms, der Transposase, ihre räumliche Position innerhalb des Genoms verändern können (Cain *et al.*, 2020). In *C. necator* konnten 32 Transposasegene identifiziert werden (Pohlmann *et al.*, 2006), jedoch wird die Analyse ihrer möglichen veränderten Positionen durch das Vorhandensein vieler Subkulturen innerhalb der Biofilmkulturen stark erschwert. Analyseprogramme die eine automatisierte Analyse für Transposonaktivitäten ermöglichen wie z.B. Sniffles oder CuteSV (Sedlazeck *et al.*, 2018; Jiang *et al.*, 2020), basieren auf Kulturen mit einem oder wenigen Genotypen, so dass für solche Langzeitexperimente mit einer hohen Dichte an genetischen Variationen keine adäquaten Programme zur Auswertung zur Verfügung stehen. Eine manuelle Durchsicht der Sequenzen ergab jedoch keine identifizierbaren transposonbasierten Mutationen die häufiger auftraten.

Zusätzlich wäre eine Normalisierung der Produktivität auf das Biofilmvolumen von großem Vorteil, um Vergleiche zwischen Stämmen zu normieren und zu ermöglichen. Aufgrund der derzeitigen Konstellation von Kultivierungssystem und optischer Nachweismethode mittels

OCT ist dies nicht möglich, da das Licht durch das Biofilmvolumen zu stark gebremst wurde (Wagner and Horn, 2017) sodass die Gesamtheit des Biofilmvolumens nicht feststellbar war.

Dennoch ist das Fazit der Langzeitexperimente eine vielversprechende stabile Produktion von fast 3 Monaten, die im Fall von Fließzelle 1 möglicherweise noch eine längere Zeitspanne umfasst hätte und bereits den Grundstein für großtechnische Anwendungen legte. Insbesondere die Raum-Zeit-Ausbeuten von bis zu $305 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ zeigten deutlich das Potential der Produktionen. Dass diese Ausbeuten im Vergleich zu den späteren planktonischen Experimenten deutlich höher waren, ist ein bei Biofilmfermentationen häufig zu beobachtendes Phänomen, das auch für die hier vorgestellten Produktionsstämme für 2,3-Butandiol vielversprechend erscheint (Carvalho *et al.*, 2022; Schmeckebeier *et al.*, 2022).

4.2 Einflüsse auf das Wachstumsverhalten

Um die optimalen Bedingungen für eine langfristige Produktion von 2,3-Butandiol mit *C. necator* zu ermitteln, wurde in dieser Arbeit die Resistenz gegenüber Substrat, Produkt und steigenden pH-Werten untersucht. Dabei zeigte Fructose in den getesteten Konzentrationen keinen signifikanten Effekt auf das Wachstum, während 2,3-Butandiol bereits zwischen 10 und 450 mM einen Effekt zeigte und schließlich bei 500 mM das Wachstum fast vollständig hemmte, was mit Untersuchungen an anderen Organismen vergleichbar ist (Köpke *et al.*, 2011; Okonkwo *et al.*, 2017). Für *C. necator* wurde in früheren Beschreibungen ein pH-Optimum zwischen 7 und 8 angegeben (Makkar and JR., 1987), der Wachstumsverlauf zeigte jedoch bereits ab pH 7,2 negative Einflüsse. Während pH 7 und 7,2 ähnliche Wachstumskurven aufwiesen, zeigten die weiteren pH-Werte deutliche Einflüsse auf das Wachstumsverhalten, die zu Verzögerungen oder niedrigeren Werten führten.

Interessanterweise zeigten die Kulturen bei pH 8 höhere Endwerte als die Vergleichskulturen. Da wie zuvor beschrieben bei höheren pH-Werten mehr CO₂ gelöst werden kann und mehr Biomasse durch die vermehrte Zellzahl zu höheren Produktionsraten führen kann, wäre es möglicherweise sinnvoll dies weiter zu untersuchen. Hierfür wäre möglicherweise eine evolutionäre Anpassung aufgrund der zuvor beschriebenen genetischen Variation eine Lösung, um die Stämme an den pH-Wert anzupassen (Achtman and Wagner, 2008; Steenackers *et al.*, 2016) wie es von Du und Kollegen mit *E. coli*-Stämmen bei einem pH-Wert von 5,5 erfolgreich durchgeführt wurde (Du *et al.*, 2020).

Basierend auf den gezeigten Ergebnissen in diesem Abschnitt ergab sich jedoch ein Optimum bei einem pH-Wert von 7, sowie ein Produkt- und damit ein Fructoseoptimum von unter 500 mM. In Kombination mit den in dieser Arbeit ebenfalls getesteten Aufreinigungsmethoden (Abschnitte 3.4 und 4.4) kann dieses Verhältnis vermutlich in laufenden Fermentationen weiter gesteigert werden, da 2,3-Butandiol aktiv extrahiert werden kann und die Konzentration somit unter 500 mM gehalten werden könnte.

4.3 Produktion von 2,3-Butandiol

Nach der Untersuchung der Langzeitproduktion und der Reaktion von *C. necator* auf Substrat, Produkt und pH-Wert, konzentrierte sich der folgende Abschnitt auf die Etablierung einer hetero- und autotrophen Produktion von 2,3-Butandiol und der Identifizierung eines möglichst effizienten Stamms, unter Verwendung verschiedener Plasmid- und Genkombinationen. Diese Arbeiten basierten auf der Studie von Windhorst und Gescher aus dem Jahr 2019, in der ein *C. necator*-Stamm für die autotrophe Produktion von Acetoin, der Vorstufe von 2,3-Butandiol, vorgestellt wurde.

4.3.1 Vergleich der Produktionsstämme

Zur Beurteilung der Produktionseffizienz wurden zwei Produktionsplasmide mit identischen Genen verglichen. Die heterotrophen Vergleichsstudien (Abschnitt 3.3.1) zeigten deutlich die Korrelation zwischen langsamem Wachstum und schneller Produktion der Stämme und umgekehrt, insbesondere beim Vergleich zwischen den verschiedenen Plasmiden. Wahrscheinlich ist dies dem erhöhten Kohlenstofffluss in die Produkte zuzuschreiben, da hierdurch weniger für die Bildung von Biomasse zur Verfügung steht. Unterschiede in der Produktivität könnten auf Unterschiede in der Plasmidgröße, Antibiotikaresistenz oder Variationen in der Anzahl der Plasmidkopien zurückzuführen sein. pBBR1, das sich durch eine geringere Größe und eine Resistenz gegen Kanamycin auszeichnet, wurde als Plasmid mit einer mittleren Kopienzahl dokumentiert, während für pKR unterschiedliche Kopienzahlen berichtet wurden (Frey *et al.*, 1992; Kovach *et al.*, 1995; Sydow *et al.*, 2017). Da Heterogenität der Stämme die Kopienzahlen der verschiedenen Plasmide erheblich beeinflusst (Jahn *et al.*, 2016), ist es schwierig zu bestimmen, welche, wenn nicht alle, der

oben genannten Unterschiede verantwortlich waren. Die Wahl der Antibiotikaresistenz kann aufgrund der unterschiedlichen zugrunde liegenden Mechanismen ebenfalls einen erheblichen Einfluss auf die Produktivität haben. Beispielsweise ist die hier verwendete Resistenz gegen Kanamycin auf eine Aminoglycosid-Phosphotransferase zurückzuführen, die die Phosphorylierung des Antibiotikums katalysiert und es mit der Zeit abbaut (van Elsas and Smalla, 1995), während energieabhängige Effluxpumpen die Resistenz gegen Tetracyclin ermöglichen, wodurch das Antibiotikum nicht abgebaut wird (Backman and Boyer, 1983). Es ist jedoch zu beachten, dass Tetracyclin mit verschiedenen Eisenionen Komplexe bildet und temperatur- und lichtempfindlich ist (Korać Jačić *et al.*, 2022 sowie Abschnitt 3.1.1), was ebenfalls zu einem schwankenden Selektionsdruck während des Versuchszeitraums führen kann, auch wenn die Konzentration des Antibiotikums regelmäßig aufgefrischt wurde. Auf der Grundlage der Vergleichsexperimente sowie des Nachweises der Komplexbildung aus (Abschnitt 3.1.1) wurde pBBR1 für die weiteren Experimente zur Herstellung von 2,3-Butandiol ausgewählt, da es eine stabilere Produktion ermöglichte und sich einfacher zu handhaben sowie schneller und effizienter bei der Katalyse von Fructose zum Produkt erwies. Diese Ergebnisse wurden in späteren Versuchen unter autotrophen Bedingungen bestätigt (Abschnitt 3.3.2), bei denen vergleichbare Ergebnisse erzielt wurden.

In den folgenden heterotrophen Vergleichen der 2,3-Butandiolproduktionsgene erwiesen sich alle Stämme mit *budC*-Varianten als lebensfähig, bezeugt durch das gemessene Wachstum. *budC* (*E. cloacae*) zeigte in diesen Versuchen mit Abstand das meiste 2,3-Butandiol, während *budC* (*K. pneumoniae*) die größte Acetoin-Akkumulation aufwies. Da die volumetrische Produktivität durch das unterschiedliche Wachstum der Stämme beeinflusst worden wäre und um die Vergleichbarkeit der Produktivität der Stämme zu gewährleisten, wurde die Menge der Produkte im Verhältnis zur akkumulierten Biomasse berechnet. Hierbei zeigten die beiden Stämme mit der besten Kohlenstoffeffizienz und Produktivität, die *budC*-Varianten von *E. cloacae* und *K. pneumoniae* trugen, Höchstwerte von 0,108 und 0,114 g Produkt pro g Biomasse pro h, die dann in Produktionsexperimenten (Abschnitt 3.3.2) unter autotrophen Bedingungen weiter untersucht wurden. Die Unterschiede zwischen den Produktivitäten der verschiedenen Stämme sind nur eingeschränkt erklärbar, da eine tiefgehende Analyse der isolierten Enzyme bisher nicht durchgeführt wurde. Die Enzyme unterscheiden sich in 7 bzw. 23 von 256 Aminosäuren und können so, bedingt durch auftretende unterschiedliche Bindungen und Faltungen, verschiedene Interaktionsstärken mit dem Substrat besitzen, welche ebenso ihre Umsatzraten beeinflussen können (Freitag, 1999; Faria *et al.*, 2023).

Beide 2,3-Butandiol-Stämme erzielten in den autotrophen Versuchen hohe Kohlenstoffausbeuten zwischen 81 und 97 %. *budC* (*E. cloacae*) zeigte die höchste 2,3-Butandiol-Akkumulation mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von 39,45 mg l⁻¹ h⁻¹, jedoch waren die Produktivität pro Biomasse im Vergleich zu den heterotrophen Versuchen relativ gering. Der Stamm mit *budC* (*K. pneumoniae*) lieferte Ausbeuten zwischen 0,005 und 0,009, während die *E. cloacae*-Variante 0,015 bis 0,016 g Produkt pro g Biomasse pro h lieferte. Das kann unter anderem durch eine generell langsamere Stoffwechselaktivität, bedingt durch den hohen Energieaufwand des CBB-Zyklus, unter autotrophen im Vergleich zu heterotrophen Bedingungen erklärt werden. Gleichzeitig aber auch durch die hohe und über die Zeit abnehmende optische Dichte der Experimente, da dies ein Hinweis auf das Absterben von Zellen, die nicht vital sind, ist, die Produktivität aber in diesem Fall auf die Biomasse bezogen wurde. Zusätzlich zeigten die autotrophen Produktionen, dass höhere Kohlenstoffausbeuten mit einem langsameren Gasverbrauch und niedrigeren Raum-Zeit-Ausbeuten einhergingen (Anlage A 6 und Tabelle 17).

Der Zusatz des CA-Gens *cag* führte nicht zu einer Erhöhung der Wasserstoffausbeuten. Die Stämme wiesen zwar, im Vergleich zu den ursprünglichen Stämmen, etwas höhere Wirkungsgrade auf, jedoch waren die Unterschiede statistisch nicht signifikant. Allerdings kommen in *C. necator* H16 vier verschiedene CA-Versionen vor, die jeweils unterschiedliche Funktionen im CO₂-Fluss haben, von der pH-Regulierung über die Bereitstellung von Bicarbonat für den Stoffwechsel bis hin zur CO₂-Versorgung des Enzyms RuBisCO. Daher könnte es erforderlich sein, die Konzentration aller CAs sorgfältig anzupassen, um von ihrer Katalyse in Bezug auf die Kohlenstoff- und Wasserstoffeffizienz zu profitieren (Gai *et al.*, 2014). Gerade in Bezug auf die Versorgung der RuBisCO könnten beide zuständigen Carboanhydrasen, *Cag* und *Can*, nötig sein um eine verbesserte Effizienz zu erreichen. Zusätzlich könnten Langzeitversuche die Unterschiede zwischen den Stämmen noch einmal verdeutlichen, sodass statistische Signifikanzen der Unterschiede möglicherweise erreicht werden können. Weiterhin könnte auch die zusätzlich höhere Belastung der Zellen durch die wachsende Anzahl an exprimierten Enzymen eine Rolle spielen. Verstärkt durch die Kopienanzahl des Produktionsplasmids könnte diese der Grund sein, dass die Stämme mit einer höheren *cag*-Expression im Vergleich zu den vorherigen Stämmen schlechtere Produktivitäten aufwiesen (Wu *et al.*, 2016).

Die Raum-Zeit-Ausbeuten wurden zu den Zeitpunkten berechnet, zu denen für den jeweiligen Stamm kein CO₂ mehr nachweisbar war. Bei *budC* (*E. cloacae*) und *cag* (*E. cloacae*) war dies

bereits zum Zeitpunkt der ersten Gasprobenahme der Fall. Daher ermöglicht das Experiment keine zeitliche Auflösung der ersten 2 Tage, in denen die Kohlenstoffquelle verarbeitet wurde. Aus diesem Grund könnte die Berechnung der Raum-Zeit-Ausbeuten höchstwahrscheinlich höher ausfallen, wenn diese zu einem Zeitpunkt berechnet werden an dem das Substrat noch vorhanden ist. Daher wurde ein mathematisches Modell für die 2,3-Butandiol-Produktion der Stämme dieser Arbeit erstellt, das die Produktionen beschreibt und eine Berechnung der Produktion zu weiteren Zeitpunkten ermöglicht (Weiler *et al.*, 2024b). Basierend auf den Verbrauchs- und Produktionsraten der heterotrophen und autotrophen Versuche konnten die Versuchsverläufe akkurat nachgestellt werden. Daher ist es damit möglich, die Zeiträume zwischen dem Beginn und dem Zeitpunkt der ersten Probenahme mathematisch vorherzusagen. Auf diese Weise konnten sowohl die Raum-Zeit-Ausbeuten zu den Zeitpunkten der Probenahmen als auch des gesamten restlichen Verlaufs der Experimente berechnet werden, wodurch die realen maximalen Raum-Zeit-Ausbeuten der Stämme in diesen Versuchen bestimmt werden konnten (Tabelle 22). Das Modell konnte zu den Zeitpunkten der Messungen vergleichbare Werte zu den real gemessenen bestimmen und gab die Raum-Zeit-Ausbeuten für die *E. cloacae*-Varianten am Zeitpunkt der in Tabelle 17 angegebenen vol. Produktivitäten mit 40,48 mg l⁻¹ h⁻¹ (*budC*) und 38,51 mg l⁻¹ h⁻¹ (*cag*) im Vergleich zu den *K. pneumoniae*-Varianten mit 18,98 mg l⁻¹ h⁻¹ (*budC*) und 10,17 mg l⁻¹ h⁻¹ (*cag*) an.

Zusätzlich wurde über die Berechnung der Produktionsexperimente ersichtlich, dass die maximalen Raum-Zeit-Ausbeuten aus den Simulationen für die *E. cloacae*-Varianten fast doppelt so hoch waren wie die experimentell bestimmten und innerhalb des ersten Tages vor dem ersten Probenahmepunkt lagen. Dies geht mit der vorherigen Annahme der möglichen höheren Raum-Zeit-Ausbeuten aufgrund des bereits erschöpften CO₂ einher, womit das mathematische Modell folglich eine höhere zeitliche Auflösung der Produktivität als die Probenahme ermöglicht. Dadurch können Raum-Zeit-Ausbeuten errechnet werden, die in langfristigen Produktionen ohne Substratverarmung zu erwarten wären und für skalierte Produktionsprozesse in Zukunft vielversprechend erscheinen.

Tabelle 22: Raum-Zeit-Erträge der 2,3-Butandiolproduzierenden Stämme unter autotrophen Bedingungen einschließlich der simulierten Werte eines mathematischen Modells der Produktion. Dargestellt sind die gemessenen Daten der Experimente sowie die simulierten Daten zum gleichen Zeitpunkt (obere Datenreihe) und die errechneten maximalen Produktivitäten (untere Datenreihe).

<i>vol. Produktivität [mg l⁻¹ h⁻¹]</i>						
Stamm	<i>Experimentdaten</i>			<i>Simulationsdaten</i>		
	Acetoin	2,3-Butandiol	Gesamt	Acetoin	2,3-Butandiol	Gesamt
<i>budC</i> (<i>K. pneumoniae</i>)	8,45	10,21	18,67	9,94	9,04	18,98
	max.:			12,11	10,86	22,97
<i>cag</i> (<i>K. pneumoniae</i>)	4,45	4,92	9,37	3,70	6,47	10,17
	max.:			4,12	7,21	11,33
<i>budC</i> (<i>E. cloacae</i>)	4,97	34,48	39,45	6,02	34,46	40,48
	max.:			11,47	65,62	77,09
<i>cag</i> (<i>E. cloacae</i>)	15,52	22,70	38,23	15,39	23,12	38,51
	max.:			29,43	44,56	73,99

Basierend auf den Produktivitäten und Effizienzen ist der Produktionsstamm *budC* (*E. cloacae*) der produktivste und vielversprechendste für eine skalierbare mikrobielle Produktion von 2,3-Butandiol. Weitere Vergleiche zu anderen mikrobiellen Produktionen von 2,3-Butandiol wurden deshalb auf diesen Stamm bezogen.

4.3.2 Vergleich zu anderen mikrobiellen Produzenten

Der Vergleich mit früheren Produktionsexperimenten von Chemikalien mit *C. necator* auf Basis von CO₂ ist stark eingeschränkt, da diese oft geringere Raum-Zeit-Ausbeuten zeigen, dafür aber größere und komplexere Endprodukte produzieren (Krieg *et al.*, 2018). Die einzige bisher veröffentlichte Produktion von 2,3-Butandiol durch *C. necator* ist Teil einer Arbeit, die sich mit der Etablierung einer Kreislaufwirtschaft unter Nutzung von CO₂ und H₂ anhand eines vorgeschlagenen und simulierten Reaktormodells beschäftigt (Bommareddy *et al.*, 2020). Als reale Anwendungsgrundlage für die Hochrechnungen im simulierten Modell

wurden zwei Produktionsstämme verwendet, von denen einer ein 2,3-Butandiol produzierender *C. necator*-Stamm mit vergleichbaren Gendelektionen zu Windhorst und Gescher (2019) ist. Für diesen Stamm wurde eine sekundäre Alkoholdehydrogenase (sADH) aus *C. beijerinckii* auf einem pBAD-Plasmid verwendet, die eine Mischung aus meso- und R,R-Isomeren von 2,3-Butandiol produzierte. Der Stamm zeigte heterotrophe Biomasseerträge von 5,7 %, vergleichbar mit den hier gezeigten 6 % durch *budC* (*E. cloacae*). Zusätzlich zeigte der sADH-basierte Stamm eine heterotrophe Kohlenstoffeffizienz von 16 %, die durch die überwiegende Entstehung von CO₂ erklärt wird. Dies steht im Gegensatz zu den Kohlenstoffausbeuten des Stamms dieser Arbeit, die für reines 2,3-Butandiol einen Wert von 46,77 % ergaben (Abbildung 20), wobei kein messbarer Kohlenstoff für eine CO₂-Entstehung verbraucht wurde. Dies deckt sich mit einer Arbeit an heterotrophen Kulturen von *C. necator*, in der gezeigt werden konnte, dass das gebildete CO₂ vom Organismus wieder verstoffwechselt wird, also selten bis nie eine reine heterotrophe, sondern immer eine mixotrophe Lebensweise von *C. necator* vorliegt (Alagesan *et al.*, 2018b). Daher ist nicht zu erwarten, dass solch eine Menge CO₂ gebildet wird, wie von den Autoren berechnet. Unter autotrophen Bedingungen zeigte der Stamm von Bommarreddy und Kollegen eine deutlich höhere Kohlenstoffeffizienz von 82 % für 2,3-Butandiol, im Gegensatz zu den hier berichteten 73 %, die nur zusammen mit Acetoin eine Effizienz von 82 % erreichten. Gleichzeitig wurde über eine Produktivität von 0,063 g g⁻¹ Biomasse pro h berichtet, was etwa dem Vierfachen der hier berichteten Produktivität von 0,016 g g⁻¹ Biomasse pro h entspricht. Dies lässt sich durch die Verwendung eines OD₆₀₀-zu-Biomasse-Faktors von $1 \text{ OD}_{600} = 0,30 \pm 0,03 \text{ g l}^{-1}$ erklären, der genau die Hälfte des hier verwendeten, experimentell bestimmten Faktors von $\text{g l}^{-1} = 0,6416 \cdot \text{OD}_{600} + 0,0632$ darstellt (Abschnitt 2.4.3.1). Berücksichtigt man zusätzlich die simulierte maximale, zweifach erhöhte Produktivität des hier verwendeten Stammes, so sind die Produktivitäten der Stämme gleich. Da die Versuche jedoch mit einer anderen Mediumvariation, in einem Dauerversuch ohne Substratlimitierung, erst nach 230 h die entsprechenden Raten des Stammes zeigten, sind direkte Vergleiche sehr schwierig. Letztendlich müsste ein direkter Vergleich durchgeführt werden, um die Stämme genauer vergleichen zu können.

Die Produktion von 2,3-Butandiol durch andere Organismen, wie das acetogene Bakterium *Clostridium autoethanogenum*, ergab 2 mM 2,3-Butandiol innerhalb von 3 Tagen (Köpke *et al.*, 2011), während das Cyanobakterium *S. elongatus* nach 21 Tagen eine Konzentration von 26,4 mM 2,3-Butandiol erreichte (Oliver *et al.*, 2014). Der in der vorliegenden Arbeit

vorgestellte *C. necator*-Stamm mit der höchsten Raum-Zeit-Ausbeute produzierte innerhalb von 22 Stunden 8,5 mM 2,3-Butandiol. Obwohl noch keine Langzeitproduktionsstudie durchgeführt wurde, zeigen die experimentellen Daten der Studie, dass dieser Stamm eine deutlich höhere maximale Produktivität von 34,5 mg l⁻¹ h⁻¹ spezifisch für 2,3-Butandiol aufwies, verglichen mit *C. autoethanogenum*, das 2,5 mg l⁻¹ h⁻¹, und *S. elongatus*, das 6,9 mg l⁻¹ h⁻¹ produzierte was 7 bzw. 20 % der Produktivität entspricht.

Zieht man die simulierten Daten und Produktionsraten des pKR-Produktionsplasmids aus dem Langzeitexperiment hinzu, so zeigt sich zusätzlich die Möglichkeit einer potentiellen Steigerung gegenüber den hier ermittelten Raten. Die deutlich höhere Produktivität in den Biofilm-Langzeitexperimenten war trotz des schlechter produzierenden Plasmids zu erwarten, da von Biofilmproduktionen im Vergleich zu planktonischen Fermentationen häufig eine erhöhte Produktion berichtet wird (Schmeckeber *et al.*, 2022). Für eine genaue Bestimmung der mittleren und maximalen Produktivität des hier vorgestellten Produktionsstamms ist daher in Zukunft ein autotrophes Langzeitexperiment, in dem sich die Produktivität über die Zeit stabilisiert, unerlässlich.

Allgemein wiesen in dieser Arbeit getestete Stämme, die autotroph schneller produzierten, niedrigere Ausbeuten auf, während diejenigen mit langsamerer Produktion höhere Werte zeigten (Abbildung 23). Die Wasserstoffeffizienzen waren mit 31-41 % zu denen anderer Studien mit *C. necator* (Windhorst and Gescher, 2019; Bommarreddy *et al.*, 2020) vergleichbar, lagen aber unter denen von Acetogenen, die üblicherweise in autotrophen Produktionen eingesetzt werden. Über acetogene Produzenten von 2,3-Butandiol wird häufig eine Wasserstoffeffizienz von etwa 90 % einschließlich der Nebenprodukte berichtet. Die Produktion von 2,3-Butandiol ist jedoch auf niedrige Konzentrationen beschränkt und führt zu großen Mengen an Nebenprodukten wie Acetat und Ethanol (Ricci *et al.*, 2021). Diese Wirkungsgrade können zusätzlich irreführend sein, da das Verfahren ein Upcycling von Acetat zu einem Endprodukt in einem zweiten Schritt erfordert, was zu einem erheblichen Rückgang des Gesamtwirkungsgrads führt. Die Fähigkeit, Synthesegas als Substrat zu nutzen, ist ein bedeutender Vorteil für Acetogene, da sie in der Lage sind, Gasgemische mit einem hohen Anteil an Kohlenmonoxid (CO) zu verbrauchen. Von Natur aus fehlt *C. necator* eine essentielle Kohlenmonoxid-Dehydrogenase, aber Forscher konnten zeigen, dass ein gentechnisch veränderter Stamm in der Lage ist, CO als Substrat zu verwerten (Heinrich *et al.*, 2018). Darüber hinaus wurden im Rahmen einer Laborevolution zwei Mutationen identifiziert, die eine CO-Toleranz erhöhen (Wickham-Smith *et al.*, 2023), was das Potenzial

für die Entwicklung eines lebensfähigen Stamms bietet, der CO als Substrat mit erhöhter Resistenz gegen die toxischen Auswirkungen von CO nutzen kann. Alternativ könnte die Mikrobe mit den genannten Mutationen auch dazu verwendet werden, CO in Abgasgemischen durch den Verbrauch von H₂ und CO₂ zu reinigen und es so als Reduktionsmittel für verschiedene industrielle Carbonylierungsreaktionen in der chemischen Produktion oder in katalytischen Prozessen bereitzustellen (Jiang *et al.*, 2022), während durch die hier charakterisierten Stämme gleichzeitig wertvolle Produkte wie 2,3-Butandiol hergestellt werden können.

4.3.3 2,3-Butandiolproduktion der Acetoinstämme

Überraschenderweise zeigten auch die Acetoinstämme in den autotrophen Versuchen eine Anreicherung von 2,3-Butandiol. *C. necator* besitzt eine unspezifische sADH (EC 1.1.1.1) kodiert durch das Gen *adh*, die verschiedene Substrate katalysieren kann (Steinbüchel and Schlegel, 1984). In einer Studie zeigte diese multifunktionale sADH Dehydrogenaseaktivitäten für 2,3-Butandiol, Ethanol und Acetaldehyd und Reduktaseaktivitäten für Diacetyl und Acetaldehyd. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Induktion von *adh* unter Bedingungen einer Sauerstofflimitierung auftritt (Steinbüchel and Schlegel, 1984). In den Untersuchungen von Windhorst und Gescher trat diese Katalyse vermutlich nicht auf, da in den Versuchen keine längere Sauerstofflimitierung vorlag oder die Produkte nicht spezifisch auf vorhandenes 2,3-Butandiol untersucht wurden.

Interessanterweise zeigte die 2,3-Butandiol-Akkumulation durch die sADH bei den acetoinproduzierenden Stämmen keine Rückreaktion zu Acetoin, sondern eine langsame Anreicherung über Zeit. Die von den anderen Stämmen gezeigte Rückreaktion von 2,3-Butandiol zu Acetoin durch BudC ist ein bemerkenswerter Prozess, der die NAD(P)H-Konzentration reguliert und in WT-Stämmen für die Nutzung von Butandiol / Acetoin als Kohlenstoffquelle notwendig ist (Pohlmann *et al.*, 2006; Ji *et al.*, 2011). Die Deletion der *acoABC*-Gene blockierte jedoch den weiteren Verbrauch von Acetoin in *C. necator* und ermöglichte so dessen Akkumulation. Die Reaktion von 2,3-Butandiol zu Acetoin wurde in den Stämmen beobachtet, wenn die Kohlenstoffquelle erschöpft war, stoppte aber in den autotrophen Experimenten, sobald der Elektronenakzeptor nicht mehr vorhanden war. Durch

eine kontinuierliche Produktion ohne Substratlimitierung scheint es also möglich zu sein, diese ungünstige Reaktion wirksam zu unterdrücken.

4.3.4 Stereoisomerbildung in den autotrophen Versuchen

Bei der Analyse der Isomere zeigte sich, dass die zuvor angesprochene Rückreaktion hauptsächlich über das meso-Isomer erfolgte. Unter der Annahme, dass nur BudC für die gesamte Hin- und Rückreaktion verantwortlich ist, scheint diese Beobachtung schwer erklärbar. Als jedoch das durch die sADH produzierte 2,3-Butandiol der Acetoinstämme genauer analysiert wurde, zeigte sich, dass es zu einem großen Teil aus dem R,R-Isomer und zu einem kleinen Teil aus dem meso-Isomer bestand. Von der *budC* aus *Klebsiella*- sowie *Enterobacter*-Organismen wird berichtet, dass sie meso- und S,S-Isomere herstellen (Syu, 2001). Somit erscheint logisch, dass die durch *budC* katalysierte Rückreaktion nur mit Isomeren abläuft, die durch das Enzym gebildet werden können, während das durch sADH produzierte R,R-Isomer weiter akkumuliert. Generell könnte diese Reaktion auch die Isormischungen der Stämme sowie die sauerstoffabhängigen Beobachtungen in den gezeigten HPLC- Chromatogrammen teilweise erklären.

Um die Isormischung der Stämme vollständig nachvollziehen zu können, ist es notwendig, die Entstehung der Stereoisomere genauer zu betrachten. Die Bildung scheint sowohl enzym- als auch organismusabhängig zu sein. Ein Modell der Isomerbildung von *K. pneumoniae* aus 1984 sowie eines in *P. polymyxa* von 1986 wird in Abbildung 35 dargestellt und ist bis heute als Grundlage für die Isomerentstehungen in den Organismen gültig (Ui *et al.*, 1984; Ui *et al.*, 1986). Ausgehend von Pyruvat wird hier über *alsS* Acetolactat gebildet, welches wiederum über *alsD* zu R-Acetoin oder durch eine spontane sauerstoffabhängige Reaktion zu Diacetyl umgesetzt wird, wobei diese Reaktion ebenfalls über Acetyl-CoA katalysiert werden kann. Dieses kann anschließend durch *budC* oder durch eine spezifische Diacetylreduktase zu S-Acetoin oder im Falle von *P. polymyxa* zu R-Acetoin katalysiert werden. Aus R- oder S-Acetoin kann dann durch das jeweilige *budC* der Organismen R- und meso-2,3-Butandiol oder S- und meso-2,3-Butandiol gebildet werden.

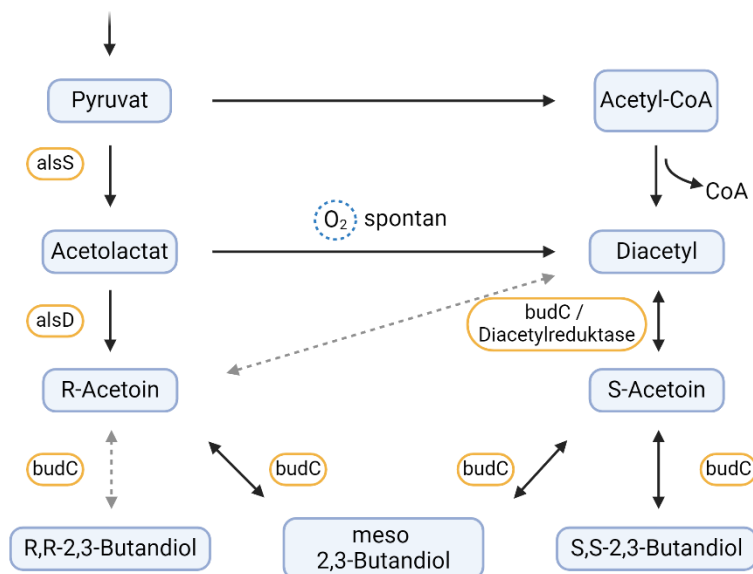


Abbildung 35: Stereoisomerbildung von 2,3-Butandiol durch *K. pneumoniae* und *P. polymyxa*. Enzyme sind gelb, Intermediate und Produkte in blau dargestellt. Gestrichelte Pfeile treffen nur auf *P. polymyxa* zu. Die Bildung der Stereoisomere ist jeweils abhängig von den zuvor vorhandenen Acetoin-Isomeren, welche auf unterschiedlichem Weg produziert werden. Abbildung erstellt nach Ui *et al.* 1984 / 1986.

Dieses Modell kann auch in dieser Arbeit angewendet werden (Abbildung 36). Wird in Betracht gezogen, dass von *B. subtilis* hauptsächlich das R-Acetoin, von den nahverwandten *Klebsiella*- und *Enterobacter*-Organismen jedoch die meso- und S,S-Isomere von 2,3-Butandiol hergestellt werden (Ji *et al.*, 2011) ist anzunehmen, dass hergestelltes R-Acetoin durch die eingefügten *budC* hauptsächlich zum meso-Isomer umgesetzt wird. In Gegenwart von Sauerstoff wird ein Teil zu Diacetyl und anschließend durch *budC* zu S-Acetoin umgesetzt. Dieses kann wiederum entweder zum meso- oder zum S,S-Isomer umgesetzt werden. Da die Umwandlung von Acetolactat zu Diacetyl nur spontan und bei hohem Metabolismus erfolgt, wird wahrscheinlich nur ein Bruchteil zu S-Acetoin umgewandelt, das wiederum teilweise zu meso- und teilweise zum S,S-Isomer umgewandelt wird, was die Isomergemische der heterotrophen Versuche (Abbildung 24) erklären würde.

In Anwesenheit von limitiertem Sauerstoff, wie in den autotrophen Versuchen, wird jedoch die sADH aktiv, die ihrerseits aus R-Acetoin R- und meso-2,3-Butandiol produzieren kann, jedoch nicht die Rückreaktion zu Acetoin des Hauptenzym *budC* aufweist, was eine Akkumulation des R,R-Isomers erklärt. Gleichzeitig katalysiert *budC* die Produktion des meso-Isomers oder die Produktion von S,S-2,3-Butandiol durch die Rückreaktion von meso- zu S-Acetoin. Höchstwahrscheinlich weisen die Enzyme dabei jeweils eine Präferenz für die

entsprechenden Isomerformen der Ursprungsorganismen auf, da natürliche Produzenten zumeist eine Isomerform überwiegend produzieren (Ji *et al.*, 2011). Die Umwandlung von Acetolactat zu Diacetyl kann in Versuchen in denen über Zeit Sauerstofflimitierung auftritt, wie in den autotrophen Versuchen, durch Gradienten im Nährmedium ebenfalls entstehen. Da sowohl Acetoin als auch 2,3-Butandiol membrangängig sind, wird in Abhängigkeit vom Gradienten meso- und S,S-2,3-Butandiol von einem nicht sauerstofflimitierten Teil, meso- und R,R-2,3-Butandiol von einem weiteren Teil der Kulturen gebildet. Da das meso-Isomer von beiden Enzymen gebildet wird, das Hauptenzym jedoch eine schnellere Katalyse aufweist, ist die Verteilung der Isomergemische aus den autotrophen Versuchen und den Chromatogrammen nachvollziehbar.

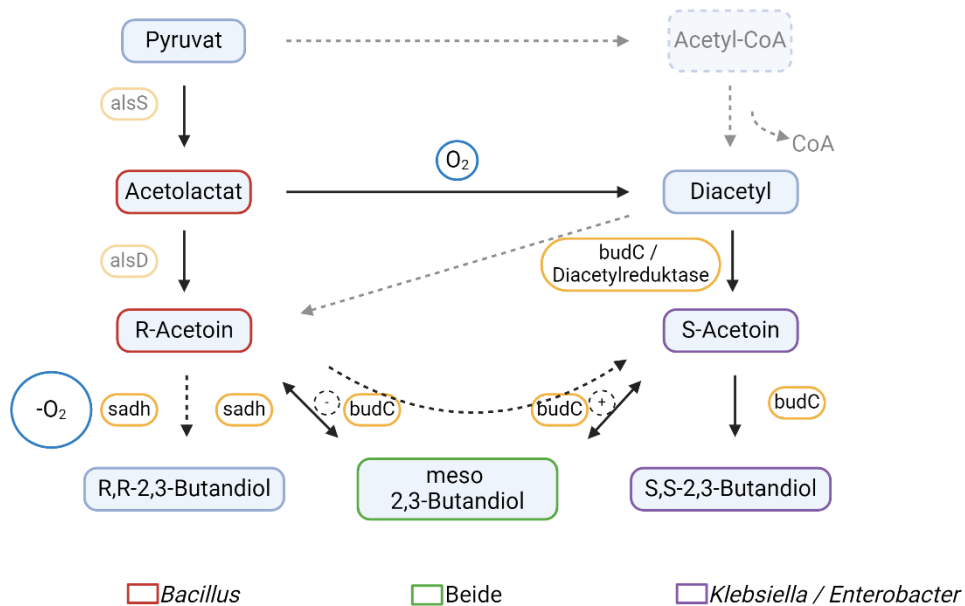


Abbildung 36: Stereoisomerbildung von 2,3-Butandiol durch die Produktionsstämme dieser Arbeit in Anlehnung an das Modell von Ui *et al.* 1984 / 1986 dargestellt. Enzyme sind gelb, Intermediate und Produkte in Blau gezeigt. Stereoisomere von *B. subtilis* sind in Rot, von *Klebsiella*- und *Enterobacter*-Organismen violett dargestellt. Über ausgegraute Verbindungen lässt sich aufgrund dieser Arbeit keine Aussage treffen.

Die Beobachtung der Bildung von Stereoisomeren erscheint nach diesem Modell logisch. Es existieren andere Modelle, die weitere Stoffwechselwege in Betracht ziehen, jedoch scheinen diese hier nicht zuzutreffen (Ui *et al.*, 1998; Ui *et al.*, 2004). Aufgrund dieses Modells erscheint eine gezielte Produktion reiner Isomere durch die hier vorgestellten Stämme in

Zukunft möglich. Wenn die Mischung keine Relevanz besitzt, wie es bei der Weiterverarbeitung für Kraftstoffe oder einige Polymere der Fall ist (Yang *et al.*, 2017; Kirchberg *et al.*, 2022), ist die Anwendung der hier vorgestellten Stämme ausreichend und wahrscheinlich am effizientesten. Bei einer dauerhaften Sauerstofflimitierung jedoch wird das Gemisch theoretisch mit der Zeit immer weiter zum R,R-Isomer tendieren, da dieses nicht wieder in Acetoin umgewandelt werden kann. Durch eine zusätzliche Deletion von *adh* könnte eine Sauerstofflimitierung mit ausreichend CO₂, um die Rückreaktion zu verhindern, zu einer Produktion von ausschließlich meso-Isomer führen, da der Umweg über Diacetyl zu S-Acetoin blockiert ist. Diese sADH-Deletionsmutante müsste natürlich erneut auf ihre Isomerproduktion getestet werden, um die hier formulierte Theorie zu untersuchen. Wenn diese eine generelle Tendenz zum S,S-Isomer zeigt, wäre auch eine fast reine Produktion dieses Isomers denkbar. Alternativ wären Versuche mit alternierender Sauerstoffzugabe vorstellbar, um die Umsetzung zu Diacetyl zu stimulieren oder die Rückreaktion des meso-Isomers zu S-Acetoin stoßweise herbeizuführen. Eine zusätzliche Analyse der Acetoin-Isomere wäre ebenfalls ratsam.

4.4 Extraktion von 2,3-Butandiol

4.4.1 Validierung der Extraktionsmethoden

Da ein Produkt für weiterführende Anwendungen extrahiert werden muss, wurden mögliche Methoden auf ihre Anwendbarkeit mit *C. necator* getestet. In Aufreinigungsversuchen wurden verschiedene Extraktionsmethoden mit 2,3-Butandiol getestet, die anschließend in Wachstumsversuchen mit *C. necator* auf mögliche Einflüsse getestet wurden. In den Validierungsexperimenten erwiesen sich alle Extraktionen als erfolgreich, wobei sich die ursprünglich berichteten Anteile der Extraktionsmittel von 20 bzw. 34-20 % für ATPS zum Nährmedium als die optimalen Parameter herausstellten. Dabei waren die Extraktionseffizienzen vergleichbar zu den berichteten Extraktionswerten von 93 % für ATPS (Sun *et al.*, 2009), basierend auf dem Anwendungsvolumen zwischen 40 und 60 % für Methylacetat (Pfaller and Rüdinger, 2012) und 45 bis 68 % für Oleylalkohol, wobei der letztgenannte Wert in einer Langzeitextraktion erlangt wurde (Anvari and Khayati, 2009). Die zusätzlich getesteten Mengen zeigten keine mögliche Optimierung. Das aufgrund seiner großen Verfügbarkeit und niedrigen Kostenfaktors zusätzlich getestete Rizinusöl zeigte mit

einer Aufnahme von knapp 20 % des gelösten 2,3-Butandiols das niedrigste Extraktionspotential. Die Extraktion von 2,3-Butandiol wurde durch dieses Öl bisher nicht beschrieben, jedoch fand es bereits für die Extraktion von 1,3-Propanandiol Anwendung. Da die Polarität des Öls eine Mischung mit der Fermentationsflüssigkeit verhindert und Extraktionsmethoden oft von 1,3-Propanandiol auf 2,3-Butandiol, aufgrund vieler geteilten Eigenschaften (Xiu and Zeng, 2008), übertragbar sind erschien die Extraktion von 2,3-Butandiol mit Rizinusöl als vielversprechend. Dennoch weisen Methoden unterschiedliche Effizienzen für die jeweiligen Chemikalien auf, sodass Versuche wie in dieser Arbeit nötig sind, um die endgültige Anwendbarkeit zu testen.

4.4.2 Einfluss auf das Wachstum von *C. necator*

In den Wachstumsversuchen war schnell ersichtlich, dass Methylacetat *C. necator* vollständig im Wachstum hemmt (Abschnitt 3.4.2). Im Gegensatz dazu erwiesen sich Rizinusöl und Oleylalkohol als für *C. necator* verwertbare Substrate, was in weiteren Versuchen ohne Fructose bestätigt werden konnte. Der WT-Stamm zeigte ein verstärktes Wachstum, das deutlich über den Werten der Referenzversuche lagen, da diese mit einer Limitierung von 20 mM Fructose durchgeführt wurden. Eine Metabolisierung von Oleylalkohol durch *C. necator* wurde bislang nicht beschrieben, jedoch gibt es Berichte über Rizinusöl als Substrat für den Organismus. In einer Studie über das Wachstum von *C. necator* und die Produktion von PHB basierend auf der Verwertung unterschiedlicher erneuerbarer Substrate zeigte der Organismus die geringsten Raten aller Substrate für Rizinusöl mit $0,07 \text{ g l}^{-1}$ Trockenmasse (Murugan *et al.*, 2016). Dies steht in großem Kontrast zu den hier gemessenen Werten von umgerechnet fast 13 g l^{-1} Trockenzellmasse. Ein Ausbleiben von Wachstum des Produktionsstamms in Gegenwart von Oleylalkohol kann wahrscheinlich durch einen vorzeitigen Eintritt der Vorkultur in die Ruhephase erklärt werden. Eine Wiederholung und eine anschließende neue Evaluierung des Versuchs sind daher notwendig. Dennoch ist aufgrund der Wachstumsversuche mit dem WT-Stamm zu erwarten, dass bei einer Wiederholung Wachstum nachweisbar sein wird, so dass beide Methoden als Möglichkeit der Extraktion angesehen werden können. Der Vorteil dieser beiden Methoden wäre, dass zum Einen eine kontinuierliche Produktion stattfinden könnte, die nicht durch die Entfernung des Produktes beeinflusst wird, und zum Anderen, dass eine Extraktion im Vergleich zu der untersuchten Endpunktaufreinigung mit weniger Aufwand verbunden wäre, da eine Trennung

des Extraktionsmittels von den Organismen nicht notwendig wäre, um die Biomasse weiter zu verwenden.

Das ATPS zeigte im Falle der verringerten Konzentration nach der ersten Anwendung nur noch geringes und nach der zweiten kein Wachstum mehr. In der Publikation von Sun und Kollegen wurde vom Überleben der Zellen berichtet, die nach einer Trennung vom Nährmedium durch Zentrifugation wiederverwendet werden können (Sun *et al.*, 2009). Da hier die Möglichkeiten von möglichst effizienten Methoden für Langzeitanwendungen identifiziert werden sollten, wurden zwei verschiedene Konzentration des in der Fermentationsflüssigkeit verbleibenden Ammoniumsulphats auf Teilen des Nährmediums verwendet, um zu testen, ob eine graduelle Extraktion des 2,3-Butandiol die Weiterverwendung der Fermentationsflüssigkeit ohne den Zentrifugationsschritt erlaubt. Da das Wachstum durch beide getesteten Konzentrationen fast gänzlich gestoppt wurde, müsste für die Anwendung von ATPS in skalierten Versuchen die Aufreinigung durchgeführt, die Zellen abzentrifugiert und frisches Nährmedium bereitgestellt werden.

Bei der Auswahl der Extraktionsmethoden wurde darauf geachtet, dass die Möglichkeit einer dauerhaften Fermentation, durch entweder nicht invasive Methoden oder der Wiederverwendung der Organismen, gegeben ist. Die hier beschriebenen Methoden stellen nur einen Bruchteil der bisher untersuchten Möglichkeiten zur Aufreinigung von 2,3-Butandiol dar. Jedoch haben die meisten davon den Nachteil, dass sie zur Aufreinigung lediglich am Ende einer Fermentation, ähnlich dem ATPS, eingesetzt werden können. Viele dieser Methoden, wie z. B. die Verwendung anderer Alkohole oder Esterverbindungen für Extraktionen, erfordern eine Entwässerung der Fermentationsbrühe oder erhöhen die Konzentration bestimmter Stoffe im Medium in ungünstiger Weise, wie dies bei Aussalzungen der Fall ist, was die Isolierung von 2,3-Butandiol erleichtert, jedoch eine kontinuierliche Produktion verhindert (Xiu and Zeng, 2008).

Die hier getesteten Methoden, insbesondere Oleylalkohol und Rizinusöl, zeigen jedoch ein großes Potenzial für Langzeitextraktionen einer Dauerfermentation, falls die Problematik der Verstoffwechslung verhindert werden kann. Dazu wären verschiedene Ansätze mit unterschiedlichem Aufwand denkbar. Eine Möglichkeit wäre, die Metabolisierung durch chemische Derivatisierung der Extraktionsmittel zu verhindern, da Derivate durch unterschiedliche Seitengruppen im Vergleich zum ursprünglichen Molekül oft unterschiedlich gut verwertet werden können. Dies zeigt sich beispielsweise in Studien zu

Bioremediation von toxischen Abfällen und ihren Derivaten, bei denen die Organismen teilweise das Hauptmolekül und seine Derivate unterschiedlich gut abbauen können (Krastanov *et al.*, 2013; Arora and Bae, 2014). Zusätzlich zur Identifikation oder Herstellung eines Derivats, würde im Anschluss ebenfalls eine erneute Validierung der Extraktion sowie der Toxizität auf den Organismus erforderlich sein. Eine zweite Möglichkeit wäre die Identifizierung und Deletion der verantwortlichen Gene im Produktionsstamm. Da dies jedoch höchstwahrscheinlich mehrere Gene betrifft und eine Identifizierung der Genfunktionen durch mangelnde Studien oft nicht möglich ist, wie in den Biofilmstudien dieser Arbeit gezeigt, ist dieses Vorgehen ebenfalls nicht trivial. Zusätzlich müssten die entstehenden Stämme erneut auf ihr Produktionseffizienzen getestet werden, was zusätzlichen Aufwand bedeutet. Eine Filtration der Organismen während der Fermentation wäre möglich, indem die Fermentation und die Extraktion räumlich getrennt werden. Gleichzeitig wäre das aber mit einem Mehraufwand an Systemaufbau und laufenden Energiekosten verbunden, da einerseits zusätzliche Energie für Pumpen benötigt wird und andererseits eingesetzte Membranen über Zeit angegriffen werden können (Kujundzic *et al.*, 2010).

Eine weitere Möglichkeit wäre die räumliche Trennung ohne Filtration jedoch unter O₂-Ausschluss. Hierbei könnte die Extraktion unter anoxischen Bedingungen stattfinden, wodurch der terminale Elektronenakzeptor des Organismus nicht mehr vorhanden wäre. Die Entfernung des Sauerstoffs könnte hierbei im besten Fall durch den Stoffwechsel der Zellen erreicht werden, während der Transport in das Extraktionsgefäß stattfindet. Bei der nötigen Durchmischung von Medium und Extraktionsmittel müsste sichergestellt werden, dass eine vollständige Phasentrennung erfolgt, bevor die Medienphase gewechselt wird. Da die Aufreinigung von 2,3-Butandiol in Extraktionsverfahren durch Oberflächenkontakt der Phasen stattfindet, welcher durch eine Vermischung vergrößert wird, stellt sich jedoch die Frage, ob eine Vermischung bei einem System wie diesem nötig wäre. Eine Durchströmung des Mediums unter einer gleichbleibenden Phase des Extraktionsmittels könnte im besten Fall einen ausreichenden Oberflächenkontakt für eine Extraktion über Zeit ermöglichen. Darüber hinaus wäre es möglich, dass die geringeren Extraktionseffizienzen von Oleylalkohol oder Rizinusöl unbedeutend werden, da im Laufe der Zeit eine wachsende Menge durch ansteigende Konzentrationsunterschiede in einem kontinuierlichen Prozess extrahiert werden könnte. Die postulierte, gesteigerte Effizienz wird unterstützt durch die hier mit Oleylalkohol gemessene Effizienz von 45 % in den Validierungsversuchen im Kontrast zur Extraktion aus

einer Dauerfermentation, in der 68 % des hergestellten 2,3-Butandiols mit Oleylalkohol extrahiert werden konnten (Anvari and Khayati, 2009). Ein zusätzlich interessanter Aspekt der Extraktion in einer laufenden Fermentation wurde in der Publikation ebenfalls berichtet. In einer Fermentation mit *K. pneumoniae* konnte das Verhältnis von Acetoin zu 2,3-Butandiol durch eine dauerhafte Extraktion in Richtung 2,3-Butandiol verschoben werden, was die Produktionsraten von 0,5 auf 0,66 g l⁻¹ h⁻¹ erhöhte (Anvari and Khayati, 2009). Da dies auch auf die hier vorgestellte Produktion übertragbar ist, sind weitere Versuche einer Langzeitproduktion unter dauerhafter Extraktion durch Oleylalkohol oder Rizinusöl sinnvoll. Eine räumliche, anoxische Trennung der Extraktion scheint hierbei die beste Strategie zu sein, um die Verstoffwechslung zu unterbinden, wobei die Möglichkeit einer erhöhten Extraktionseffizienz besteht. Zusätzlich wäre es sinnvoll zu untersuchen, inwieweit das Acetoin ebenfalls in die Extraktionsphase mitaufgenommen wird oder ob die Isomere unterschiedlich gut extrahiert werden, um eine unerwünschte Verschiebung der Produkte zu vermeiden oder wahlweise zu erreichen.

4.5 Biofilmbildung in *C. necator* H16

Die Biofilmbildung von mikrobiellen Organismen ist ein interessanter Parameter für industrielle Anwendungen, da Fermentationen in Biofilmsystemen sehr vielversprechende Produktionsraten aufweisen und die Biofilmmatrix zusätzlich Vorteile durch erhöhten Widerstand gegen hemmende Stoffe und durch eine erhöhte Biomasse ermöglicht (Rosche *et al.*, 2009; Schmeckeber *et al.*, 2022). Hierdurch stieg das Interesse der Biotechnologie an produktiven Biofilmen in den letzten Jahren, jedoch mangelt es bis heute an grundlegenden Kenntnissen zum Verständnis und zur Steuerung dieser Fermentationen (Leonov *et al.*, 2021). Wenn mikrobielle Produktionen als Alternativen zu chemischen Prozessen gehandelt werden sollen muss in Zukunft ein besseres Grundverständnis geschaffen werden, um die Lücke zwischen heutigen mikrobiellen Produktivitäten und den industriellen Anforderungen zu schließen. Biofilmfermentationen besitzen das Potential hierfür, jedoch sind die meisten Produktionen und Reaktoren bislang auf Planktonisch ausgerichtet (Abschnitt 1.4). Da bislang auch für *C. necator* keine umfassenden Studien zur Biofilmbildung verfügbar sind, wurden die transkriptionellen Unterschiede zwischen planktonischen und verschiedenen Stadien von Biofilmkulturen untersucht und verglichen. Ziel war es, Schlüsselgene der Biofilmbildung zu identifizieren, um zu verstehen, was die Bildung, die Stabilität und den

Übergang von der planktonischen zur Biofilm-Lebensweise bestimmt. So kann in Zukunft die Biofilmbildung und daraus resultierend die Produktion von 2,3-Butandiol optimiert werden.

In einem ersten Experiment wurde die Biofilmbildung von *C. necator* analysiert, um die Stadien der ersten angehefteten Zellen, der ersten Koloniebildungen beim Übergang zum flächigen Wachstum und des voll entwickelten Biofilms in Abhängigkeit von der Zeit zu identifizieren. In den zu diesem Zweck durchgeführten Experimenten zeigte sich, dass die Biofilmbildung häufig in den hinteren Bereichen der Kultivierungskanäle begann und sich erst nach einigen Tagen über die gesamte Oberfläche ausbreitete. Als optimale Zeitpunkte wurden für die gesuchten Stadien 18,75, 75 und 300 h identifiziert.

4.5.1 Genregulation während der Biofilmbildung

Die Zellen wurden zu den identifizierten Zeitpunkten der Biofilmbildung transkriptomisch untersucht (Abschnitt 2.3.3.2 und 3.5.2). Die verschiedenen transkribierten Gene wurden auf bekannte Faktoren der Biofilmbildung und die größten Unterschiede im Transkriptionsniveau untersucht. Dabei zeigte sich, dass 65 % der Gene von *C. necator* bei Biofilmwachstum im Vergleich zur planktonischen Kultivierung verschieden transkribiert wurden. Im Vergleich dazu schwankt der berichtete Anteil bei anderen Organismen stark, mit Berichten von wenigen hundert Genen bis zu großen Teilen des Genoms wie in dieser Arbeit (Donlan, 2002; Stoodley *et al.*, 2002; Sauer, 2003). So wurde mitunter von *P. aeruginosa* berichtet, dass mehr als 50 % von Genen des Proteoms mindestens sechsfach höher exprimiert wurden als bei planktonischer Lebensweise (Sauer *et al.*, 2002). Zusätzlich zeigte sich in der vorliegenden Arbeit nur ein geringer Unterschied zwischen der Anzahl der hoch- und herunterregulierten Gene, was im Kontrast zu einer anderen Studie steht, in welcher die meisten Gene von *Streptococcus gordonii* im Vergleich zur planktonischen Lebensweise herunterreguliert waren (Gilmore *et al.*, 2003).

Bekannterweise mit Biofilmbildung in Verbindung gebrachte Gene (Abschnitt 1.4.2) waren nicht unter den am stärksten hoch- und herunterregulierten Genen vertreten. Interessanterweise zeigten die Stadien nach 18,75 und 75 h eine große Überlappung bei den am stärksten herunterregulierten Genen, während bei 75 und 300 h die hochregulierten Gene eine Überlappung aufwiesen (Tabelle 19 und Tabelle 20), was impliziert, dass diese Gene eine wichtige Rolle über eine längere Zeit in den jeweiligen Phasen der Biofilmentwicklung des

Experiments spielten. Besonders stechen hierbei die Gene zwischen 18,75 und 75 h hervor (Tabelle 20), die nach 75 h um ein Vielfaches verstärkt herunterreguliert waren, jedoch nach 300 h kaum noch reguliert wurden.

Über die meisten der in den Tabellen 19 und 20 aufgeführten Gene kann keine Aussage getroffen werden, da sie bei Genomsequenzierungen identifiziert und durch homologe Strukturen oder bekannte Orthologe annotiert, aber nicht direkt untersucht wurden und ihre genaue Funktion daher noch weitgehend unbekannt ist. Im Wesentlichen handelt es sich um Teile der Transkriptionsmechanismen, substratbindende Proteine sowie eisenbindende oder-transportierende Proteine die mit der Substrataufnahme oder dem Ionentransport assoziiert werden.

Interessanterweise zeigte sich ein membranständiges β -Fass-Protein in den Stadien nach 75 und 300 h am stärksten hochreguliert. Porenproteine dieser Art dienen den Zellen als Schleuse durch die Membran, weshalb dieses Protein mit der Bildung der EPS-Matrix in Verbindung stehen könnte, für die eDNA, Zuckermoleküle und verschiedene Proteine aus den Zellen transportiert werden müssen (Flemming and Wingender, 2010). Hinweise auf einen Transport von Zuckermolekülen der EPS über β -Fass-Proteine konnten in *E. coli* sowie in *Myxococcus xanthus* bereits gefunden werden (Schwabe *et al.*, 2022; Saïdi *et al.*, 2022). Diese Funktion des Proteins könnte ebenfalls erklären, warum das Gen in den Stadien hochreguliert war, in denen der Übergang von Einzelkolonien zum flächigen Wachstum bzw. ein adulter Biofilm vorhanden war. Bestandteile der Matrix machen den größten Anteil am Kohlenstoff in einem ausgewachsenen Biofilm aus, welcher zwischen 50 und 90 % liegen kann, während Zellen lediglich einen kleinen Prozentsatz ausmachen (Staudt *et al.*, 2004). Daher ist ein Transport der EPS aus den Zellen zu den identifizierten Zeitpunkten notwendig und ein Transportmechanismus logisch.

Die Analysen zeigten, dass viele allgemein bekannte Regulationsmechanismen oder Gene, die in anderen Organismen mit Biofilmbildung in Verbindung gebracht werden (Abschnitt 1.4.2), im Vergleich zu den planktonischen Kulturen herunterreguliert waren (Tabelle 21). Gene für Proteine, die eine EAL-Domäne enthalten, waren alle stark herunterreguliert, was angesichts der Verbindung zum Abbau von c-di-GMP logisch erscheint, jedoch war das einzige Protein, das eine HD-GYP-Domäne enthält und die gleiche Funktion besitzt, in allen Phasen hochreguliert (Hickman *et al.*, 2005). Dies kann durch eine Regulationsfunktion von intrazellulärem c-di-GMP erklärt werden, wobei diese Proteine auch an der Regulation dreier

anderer zyklischer Dinukleotid-Signalmoleküle beteiligt sind (Sun and Pandelia, 2020). Da lediglich ein Gen im Genom von *C. necator* für ein HD-GYP-Domäne enthaltendes Protein annotiert ist, ist hierdurch keine Aussage zu treffen.

Es konnte ein c-di-GMP-bindendes Protein gefunden werden, das anhand einer konservierten Domäne annotiert wurde (siehe NCBI-Datenbank Gen E6A55_RS15605). jedoch in allen Stadien herunterreguliert war. Diese Regulation war in den ersten Stadien mit Log₂-FC-Werten von 0,1 und 0,06 sehr schwach und kann nicht als Unterschied zu den planktonischen Kulturen interpretiert werden, während sie schlussendlich im adulten Stadium doppelt verstärkt auftrat. Die Herunterregulierung im Stadium eines ausgewachsenen Biofilms geht einher mit Berichten, in denen das Botenmolekül c-di-GMP vor allem mit der frühen Bildung eines Biofilms in Verbindung gebracht wird (Hickman *et al.*, 2005; Thormann *et al.*, 2006; O'Connor *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2015; Ng *et al.*, 2020; Matsumoto *et al.*, 2021).

Von den 5 identifizierten Proteinen mit GGDEF-Domänen, die früheren Studien zufolge an der Bildung von c-di-GMP beteiligt sind, zeigte nur E6A55_RS25375 eine Hochregulation mit bis zu einer dreifachen Steigerung der mRNA-Mengen in allen untersuchten Stadien, wodurch es sich als einziges Gen von den zuvor besprochenen unterscheidet. Das kann auf eine essentielle Rolle in der Biofilmbildung hindeuten, jedoch ist eine definitive Schlussfolgerung ohne unterstützende Versuche nicht möglich. Entgegen der Annahme, dass c-di-GMP aufbauende Proteine vor allem in den frühen Stadien der Biofilmbildung aktiv sind, zeigten zwei weitere GGDEF-Domänen enthaltende Proteine erst im dritten Stadium eine leichte Hochregulation, nachdem sie in den ersten beiden Stadien herunterreguliert waren.

In *C. necator* H16 konnten bislang nur wenige Hinweise auf Quorum-sensing-Mechanismen gefunden werden, was unter anderem einer geringen Beforschung der Biofilmbildung des Organismus geschuldet ist. In einem anderen Stamm, *C. necator* JMP134, konnten Hinweise auf Quorum-sensing basierend auf einem Phc-Operon gefunden werden (Lykidis *et al.*, 2010). In der hier vorliegenden Auswertung der Biofilmbildung konnten die Gene des Operons jedoch nicht identifiziert werden, sodass Hinweise auf andere Quorum-sensing-Mechanismen gesucht wurden. Das einzige, aufgrund seiner homologen Sequenzen in direkten Zusammenhang mit Quorum-sensing gebrachte Gen, *cqsA*, war in allen drei Stadien mit log₂-FC-Werten von -1,3 bis -1,9 herunterreguliert (Tabelle 21). Wird das im Langzeitexperiment gefundene Gen E6A55_RS21570 hinzugezogen (Tabelle 15), dessen Ortholog in *Vibrio*-Organismen mit einem Autoinduktor für das Quorum-sensing-System, CAI-1, in

Verbindung gebracht wird (Wei *et al.*, 2011), so ist auch dieses mit log₂-FCs von -0,68, -0,99 und -0,54 herunterreguliert. Beide Regulationen der Gene indizieren somit keine essentielle Rolle für die Biofilmbildung. Dennoch ist der Autoinduktor CAI-1 bislang nur für *Vibrio*-Organismen bekannt, jedoch wird ein Zusammenhang mit CAI-1 für *cqsA* ebenfalls durch homologe Sequenzen zu anderen Enzymen in den Annotationen aufgeführt (siehe NCBI-Datenbank Gen: E6A55_RS21575). In *V. cholerae* konnte bislang kein Hinweis auf die oft von Gram-negativen Prokaryoten gezeigte Steuerung des Quorum-sensing-Apparates durch Signalmoleküle wie Acyl-Homoserin nachgewiesen werden. Stattdessen nutzt *V. cholerae* zwei Autoinduktor-Rezeptor Systeme, um die Biofilmbildung und Krankheitsfaktoren zu steuern (Wei *et al.*, 2011). Einer der beschriebenen Autoinduktoren ist CAI-1. Eine Schlussfolgerung, dass bei *C. necator* der Quorum-sensing-Apparat nicht auf Acyl-Homoserin basiert, sondern ebenfalls CAI-1 als Signalmolekül für die Biofilmbildung nutzt, ist mit den hier aufgeführten Daten nicht zu beweisen aber auch nicht auszuschließen.

Da S-Adenosylmethionin der Vorläufer des Hauptsignalmoleküls Acyl-Homoserin für die Biofilmbildung in Gram-negativen Bakterien ist, das die Transkription des Quorum-sensing-Apparates steuert (Wei *et al.*, 2011), wurden auch die entsprechend zugehörigen Gene analysiert. Hier waren viele nur leicht unter einem log₂-FC von 0,5 oder knapp darüber mit schwankenden Werten sowohl hoch- als auch herunterreguliert, was nicht als Unterschied zu den planktonischen Kulturen gewertet werden kann (Abschnitt 3.5.2). Lediglich die Gene *metK*, *prmA* und *prmB* waren in allen Phasen stärker hochreguliert, während *bioA* und *bioB* in allen Stadien mit höheren Werten herunterreguliert waren. Alle diese Gene stehen, basierend auf homologen Sequenzen, mit der Bildung von S-Adenosylmethionin und der Umsetzung in Signalmoleküle im Zusammenhang, jedoch korrespondieren die hier nachgewiesenen Werte maximal mit einer Verdopplung oder einer fünffachen Senkung der Expression. Zusätzlich zeigte *nirJ*, dessen Produkt zum S-Adenosylmethionin-Stoffwechselweg gehört, sehr hohe log₂-FC-Werte von über 3,4 in allen drei Stadien, was einer fast 1000 % erhöhten Expression entspricht. Da S-Adenosylmethionin jedoch an vielen Signalwegen in prokaryotischen Zellen beteiligt ist, ist auch hier eine Aussage über einzelne Gene schwierig (Lu, 2000). Da im Experiment drei verschiedene Stadien der Biofilmbildung im Vergleich zu einer planktonischen Kultur analysiert wurden, wäre zu erwarten, dass ein Gen, das eine essentielle Schlüsselrolle bei der Biofilmentwicklung trägt, in den entsprechenden Stadien deutlich identifiziert werden kann. Werden die log₂-FC-Werte der hier besprochenen Gene, mit Ausnahme von *nirJ*, mit maximal 2,6 mit den Werten der stärksten hoch- und

herunterregulierten Genen von bis zu 14 verglichen, wird deutlich, dass nur wenige Gene in Frage für eine essentielle Rolle kommen. Eine große Ausnahme ist hierbei *nirJ* mit einer Hochregulierung von bis zu 6,77, was einer 10.000fachen Expression entspricht. Dennoch zeigt die Analyse, dass die Annotierung von Genen aufgrund ihrer homologen Sequenzen zu anderen Enzymen ist im Genom von *C. necator* nicht ausreichend ist, um aufgrund der Funktionen Gene zweifelsfrei zu identifizieren und einen Zusammenhang mit der Biofilmbildung herzustellen.

4.5.2 Transposon-induzierte Mutationen

Klassische Ansätze für den Nachweis des Einflusses von Proteinen oder Genen sind Überexpressions- oder Deletionsstudien mit Mutantenstämmen. Für solche Ansätze muss jedoch klar definiert sein, welches Gen und welches Wirkungsgefüge untersucht werden soll. Auf Grundlage der vorliegenden Transkriptomstudie kämen einige Gene für diesen Ansatz in Frage. Das am stärksten regulierte Gen in der Studie des beta-Fass-Proteins, das einzige hochregulierte GGDEF-Domäne-enhaltende Protein E6A55_RS25375, *nirJ* aufgrund der insgesamt starken Hochregulierung sowie das in den Langzeitstudien identifizierte Gen E6A55_RS21570, da diese Mutation in Fließzelle 3 der Langzeitexperimente in über 50 % der Zellen auffindbar war und somit trotz geringer Regulation ein Einfluss auf die Biofilmbildung möglich ist.

Studien dieser Art sind jedoch in der Regel sehr aufwendig. Hinzu kommt, dass die Biofilmbildung in Prokaryoten durch komplexe Netzwerke molekularer Schalter reguliert wird (Teschler *et al.*, 2022), die durch die zunehmende Differenzierung von Subpopulationen zusätzlich beeinflusst werden können (Woo *et al.*, 2012). Die Anzahl der Gene, die in dieser Arbeit aufgrund der genomischen Annotationen mit der Biofilmbildung in Zusammenhang gebracht werden konnten, beträgt lediglich 31, wovon keines ohne Zweifel als essentiell identifiziert werden konnte. Aus diesem Grund wurde ein umgekehrter Ansatz, basierend auf den tatsächlichen Funktionen der Gene, gewählt, um neue Kandidaten zu identifizieren. Es wurde eine Transposon-induzierte Mutationsbibliothek in *C. necator* erstellt, die mindestens eine Mutation in jedem nicht lebenswichtigen Gen enthalten sollte. Transposons sind DNA-Sequenzabschnitte, die durch die Funktion eines Enzyms, der Transposase, ihre räumliche Position innerhalb eines Genoms verändern können und so die zufällige Einführung

identifizierbarer Zielsequenzen ermöglichen (MacPhee, 1991). Bei solchen Ansätzen können viele Gene über die Summe von einzelnen Zellen beeinflusst werden. Durch anschließende Sequenzierungsanalysen können Gene identifiziert werden, in denen die eingeführten Mutationen in Abhängigkeit von der jeweiligen Fragestellung einen nachweisbaren Effekt auf Trägerzellen hatten. Dieses Verfahren ist heutzutage ein häufig eingesetztes Verfahren, da die Komplexität der mittlerweile bekannten zellinternen Netzwerke an Proteinen, Genen und Signaltransduktionen weiter zunimmt und Kandidaten so über ihre Funktion und nicht umgekehrt identifiziert werden können (Tajima *et al.*, 2011; Kouzuma *et al.*, 2014; Pearcy *et al.*, 2022).

Die in dieser Arbeit erstellte Mutationsbibliothek in *C. necator*-Zellen kann in zukünftigen Versuchen dazu verwendet werden, durch eine erneute Kultivierung im zuvor verwendeten Biofilmkultursystem Mutationen zu identifizieren, die einen Vorteil bei der Biofilmbildung bedeuten. Hierfür kann die Biofilmkultur im adulten Biofilmstadium erneut sequenziert und die identifizierten Mutationen mit der zuvor erstellten Transkriptionsstudie verglichen werden. Dadurch kann die Anzahl der möglichen Genkandidaten drastisch reduziert werden, da von vielen potentiell vorteilhaften Mutationen nur diejenigen, mit dem größten Vorteil für die Zellen, ein Überleben sichern während Zellen mit weniger starken Vorteilen oder Nachteilen verdrängt werden. Bei der Erstellung der Bibliothek erwies sich die in dieser Arbeit vorgestellte erweiterte adaptive Sequenzierung als großer Vorteil (Abschnitt 2.3.3.2), da die Sequenzierung einzelner Mutationen in jeder Zelle einer Kultur ohne eine Anreicherung der identifizierbaren Mutationssequenzen statistisch gesehen einen zu hohen Kosten- und Zeitfaktor darstellen würde. Dies wird durch das verhältnismäßig große Genom von 7,4 Mb in *C. necator* noch verstärkt. Mit dieser Methode konnte die Anzahl der zu sequenzierenden DNA-Stränge um den Faktor 8 reduziert werden.

Eine erste Testsequenzierung (Abbildung 34) eines Teils der Bibliothek wies eine zufällige Verteilung der Mutationen auf. Damit kann sie in anschließenden Schritten vollständig sequenziert und damit validiert werden, um sicherzustellen, dass Mutationen in jedem Gen mindestens einmal vertreten sind. Sobald die Bibliothek validiert ist, kann sie in Zukunft nicht nur für die geplante Analyse der Biofilmbildung verwendet werden, sondern für jede weitere genetische Analyse der Gene in *C. necator*.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine umfassende Grundlage für die mikrobielle Produktion von 2,3-Butandiol mit dem Knallgasbakterium *C. necator* geschaffen. Dabei stand nicht nur die Herstellung und Identifizierung effizienter Produktionsstämme im Vordergrund, sondern auch die Charakterisierung der Produktionsparameter für die hetero- und autotrophe Langzeitproduktion während der Fermentation aber auch für die Aufreinigung des Endprodukts. Dazu wurde das Wachstumsverhalten von *C. necator* in Gegenwart von Substraten, Produkten und Extraktionsmitteln untersucht. Darüber hinaus wurde der Zeitrahmen einer stabile Langzeitproduktion bestimmt und eine Analyse für die Optimierung der Stabilität durchgeführt. Schließlich wurde die Basis zur Identifizierung von Schlüsselgenen der Biofilmbildung in *C. necator* unternommen, um das Spektrum möglicher Fermentationsstrategien zu erweitern.

Zur Etablierung der Produktion wurden verschiedene Stämme hergestellt und miteinander verglichen. Dabei wurde ein kohlenstoff- und wasserstoffeffizienter Produktionsstamm identifiziert, der in der Lage ist, das Produkt aus CO₂ mit einer Raum-Zeit-Gesamtausbeute von 39,45 mg L⁻¹ h⁻¹, einer Kohlenstoffausbeute von 81,6 %, einer H₂-Effizienz von 33,46 % und einer Produktivität von 0,016 g Produkt pro g Biomasse pro h unter herzustellen. Es zeigte sich hierbei ein deutlicher Schwerpunkt des Stammes auf der Produktion von 2,3-Butandiol im Vergleich zu Acetoin. Diese Werte wurden experimentell bestimmt, jedoch deuten mathematische Modellierungen des Prozesses darauf hin, dass die Raum-Zeit-Ausbeute in langfristigen Experimenten ohne Substratlimitierung auf bis zu 77 mg l⁻¹ h⁻¹ erhöht werden kann. Zusätzlich zeigte ein biofilmbasiertes Langzeitexperiment, dass die Produktivität unter diesen Bedingungen zusätzlich gesteigert werden kann.

Die Analyse des hergestellten 2,3-Butandiols ergab ein Gemisch der drei stereoisomeren Formen. Dabei konnte durch die Beobachtung unterschiedlicher Verhältnisse in Abhängigkeit der Parameter herausgefunden werden, wie die Bildung der einzelnen Isomere sowie deren Verhältnis zueinander unter verschiedenen Bedingungen entstehen. Dabei zeigte sich ein Einfluss von Sauerstoff auf die Bildung des S,S- sowie des R,R-Isomers durch die spontane Umsetzung von Acetolactat zu Diacetyl und die nachfolgende Bildung von S-Acetoin. Zusätzlich wurde eine sADH identifiziert, die unter Sauerstoffmangel das R,R-Isomer produzierte. Dies eröffnet die Möglichkeit, durch Steuerung der Fermentationsparameter und Deletion der sADH die Isomere gezielt herzustellen. Die Herstellung der reinen Isomerformen

ist dabei von hohem Interesse, da sie um ein Vielfaches wertvoller sind. Der Preis der Stereoisomergemische von 2,3-Butandiol beträgt momentan beim Kauf von 1 g 7,48 Euro. Der Preis für 1 g des meso-Isomers beträgt jedoch 25,60 Euro, für das R,R-Isomer 71,10 Euro und für das S,S-Isomer 130 Euro³. Es ist daher ersichtlich, dass eine Herstellung der reinen Isomerformen wünschenswert wäre und durch die hier vorgestellte Arbeit auf Basis von CO₂ als Substrat möglich sein könnte.

Die Wachstumsstudien mit *C. necator* zeigten, dass ein Gehalt an 2,3-Butandiol unter 500 mM das Wachstum leicht hemmte, jedoch nicht toxisch für die Stämme war. Für zukünftige Anwendungen muss daher der Gehalt des Fermentationsprodukts reguliert werden, wobei Oleylalkohol und Rizinusöl als die optimalsten der hier getesteten Verfahren identifiziert wurden. Diese zeigten keinen negativen Einfluss auf *C. necator* während des Wachstums, sodass eine Extraktion während der laufenden Produktion möglich wäre, welche die Produktion von 2,3-Butandiol zusätzlich steigern könnte (Anvari and Khayati, 2009). Die Extraktionseffizienz der untersuchten Verfahren könnte zusätzlich durch eine konstante Extraktion des Produktes weiter gesteigert werden, wobei Maßnahmen gegen die Metabolisierung durch den Organismus getroffen werden müssen. Eine räumliche oder zeitliche Trennung von Produktion und Extraktion unter Ausschluss von Sauerstoff scheint hierfür die einfachste Methode zu sein. Darüber hinaus zeigten Stämme in Gegenwart von bis zu 500 mM Fructose keine Einschränkungen, jedoch bei unterschiedlichen pH-Werten, dass die Fermentationen bei 7 bis 7,4 reguliert werden müssen. Dies kann entweder durch Puffersysteme im Medium oder durch die erhöhte Freisetzung von CO₂ erreicht werden, was entsprechend in der Anwendung stabil und kontrollierbar sein muss.

Das in dieser Arbeit durchgeführte Langzeitexperiment machte ersichtlich, dass eine stabile Produktion über einen Zeitraum von 2,5 bis 3 Monaten bereits möglich ist und eine vielversprechende Grundlage für zukünftige skalierte Produktionen bietet. Basierend auf den nachfolgenden Analysen der entstandenen Mutationen war der Einbruch der Produktion auf eine Abnahme der Kopienzahl des Produktionsplasmids zurückzuführen. Durch eine genomische Integration der Produktionsgene könnte dieser ohnehin schon lange Zeitraum höchstwahrscheinlich deutlich verlängert werden. Zusätzlich könnte hierdurch auf die Zugabe von Antibiotika verzichtet werden, was die Anwendung einfacher gestalten würde.

³ (Reinheiten von 97-99 %; Preise am 29.01.2024 um 13:46 Uhr aus dem Onlineverkauf von Sigma-Aldrich unter den Artikelnummern: B84904, 361461, 237639 und 300349 entnommen)

Die Analyse der Biofilmbildung von *C. necator* zeigte einen großen Mangel an annotierten und identifizierten Genen im Genom des Organismus. Durch den Einsatz der hier vorgestellten Mutationsbibliothek kann dieser umgangen werden, so dass in weiteren Arbeiten die Gene mit dem größten Einfluss auf die Biofilmbildung identifiziert werden können. Diese könnten in Zukunft durch Deletion oder Überexpression genutzt werden, um die Biofilmbildung zu verhindern oder zu steigern. Zusätzlich könnten sie im Genom gelöscht und unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors wieder in den Organismus eingebracht werden, so dass die Aktivität der Gene in Echtzeit kontrolliert werden könnte. Die so entstehenden genetischen Schalter, mit denen die Biofilmbildung an- oder abgeschaltet bzw. kontrolliert werden kann, würden das Anwendungsspektrum der Produktionsstämme noch einmal deutlich erweitern.

Diese Arbeit legte die Basis für eine industrielle Anwendung der Produktion von 2,3-Butandiol durch *C. necator*. Nachfolgend wäre ein auf den hier diskutierten Modifikationen basierendes hochskaliertes Experiment notwendig, um das Potential und die Raten des hier vorgestellten Produktionsweges vollständig zu evaluieren. Nach einer genomischen Integration der Produktionsgene und einer Deletion der im Produktionsstamm natürlich vorkommenden sADH wäre ein langfristiges Biofilmexperiment in größerem Maßstab mit anschließender Aufreinigung geeignet, um die Verknüpfung aller Teilbereiche dieser Arbeit herzustellen. Für eine hochskalierte biofilmbasierte Produktion würde sich ein Tröpfchen- oder Membranbiofilmreaktor anbieten, da bei diesen Aufbauten die entstehende Gasdiffusionsbarriere des Biofilms bei großen Volumina durch die Oberflächenverhältnisse weniger einschränkend wirken (Riegler *et al.*, 2019; Prato Fiorito *et al.*, 2021). Da diese Reaktoren nach dem Durchflussprinzip arbeiten, wäre die hemmende Wirkung von 2,3-Butandiol ab 500 mM sowie die örtliche Trennung der Aufreinigung als potentielle Problem minimiert. Durch die natürlich entstehende Biofilmmatrix würden die Zellen trotz der Durchflussbedingungen auf den Produktionsbereich beschränkt werden, was eine anoxische Umgebung in einem zweiten Extraktionsgefäß ermöglicht. Da das Medium darin nicht weiter mit den Organismen in Kontakt kommt, wäre eine sterile Handhabung des Extraktionsmediums zusätzlich nicht erforderlich. Hierdurch wäre die Aufreinigung weiter vereinfacht, wobei das Durchflussmedium im Extraktionsgefäß rezirkuliert werden könnte, um die Extraktion zu maximieren. Schließlich könnten Schlüsselgene der Biofilmbildung, die auf der Grundlage dieser Arbeit in Zukunft identifiziert werden, die Biofilmbildung kontrollierbar machen. Dadurch könnte, durch ein Verhindern von Zelldispersion oder einer

Erhöhung des Biofilmvolumens, zusätzlich eine Steigerung der Produktionsdauer bzw. der Prozessstabilität ermöglicht werden.

So kann, unter Einsatz des hier vorgestellten Produktionsstamms und durch die Anwendung der Ergebnisse dieser Arbeit, in Zukunft das problematische Treibhausgas CO₂ in die wertvolle Plattformchemikalie 2,3-Butandiol umgewandelt und das Potential dieses Produktionswegs voll ausgeschöpft werden.

6 Literaturverzeichnis

Achtman, M., and Wagner, M. (2008) Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. *Nat Rev Microbiol* **6**: 431–440.

Alagesan, S., Minton, N.P., and Malys, N. (2018a) ¹³C-assisted metabolic flux analysis to investigate heterotrophic and mixotrophic metabolism in *Cupriavidus necator* H16. *Metabolomics* **14**: 1–10.

Alagesan, S., Minton, N.P., and Malys, N. (2018b) ¹³C-assisted metabolic flux analysis to investigate heterotrophic and mixotrophic metabolism in *Cupriavidus necator* H16. *Metab* **14**: 1–10

Allesen-Holm, M., Barken, K.B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J.S., Kjelleberg, S., *et al.* (2006) A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol Microbiol* **59**: 1114–1128.

Anvari, M., and Khayati, G. (2009) In situ recovery of 2,3-butanediol from fermentation by liquid–liquid extraction. *J Ind Microbiol Biotechnol* **36**: 313–317.

Arber, W. (1993) Evolution of prokaryotic genomes. *Gene* **135**: 49–56.

Arora, P.K., and Bae, H. (2014) Bacterial degradation of chlorophenols and their derivatives. *Microb Cell Fact* **13**: 1–17.

Backman, K., and Boyer, H.W. (1983) Tetracycline resistance determined by pBR322 is mediated by one polypeptide. *Gene* **26**: 197–203.

Barry, A.L., and Feeney, K.L. (1967) Two Quick Methods for Voges-Proskauer Test. *Appl Microbiol* **15**: 1138–1141.

Bartowsky, E.J., and Henschke, P.A. (2004) The ‘buttery’ attribute of wine—diacetyl—desirability, spoilage and beyond. *Int J Food Microbiol* **96**: 235–252.

Białkowska, A.M. (2016) Strategies for efficient and economical 2,3-butanediol production: new trends in this field. *World J Microbiol Biotechnol* **32**: 200.

Bland, R.R., Chen, H.C., Jewell, W.J., Bellamy, W.D., and Zall, R.R. (1982) Continuous high rate production of ethanol by *Zymomonas mobilis* in an attached film expanded bed fermentor.

Biotechnol Lett **4**: 323–328.

Bommareddy, R.R., Wang, Y., Pearcy, N., Hayes, M., Lester, E., Minton, N.P., and Conradie, A. V (2020) A Sustainable Chemicals Manufacturing Paradigm Using CO₂ and Renewable H₂. *iScience* **23**: 101218.

Bomtempo, J.V., Chaves Alves, F., and Almeida Oroski, F. De (2017) Developing new platform chemicals: what is required for a new bio-based molecule to become a platform chemical in the bioeconomy? *Faraday Discuss* **202**: 213–225.

Bond, M.C., Vidakovic, L., Singh, P.K., Drescher, K., and Nadell, C.D. (2021) Matrix-trapped viruses can prevent invasion of bacterial biofilms by colonizing cells. *Elife* **10**.

Borkowski, O., Ceroni, F., Stan, G.B., and Ellis, T. (2016) Overloaded and stressed: whole-cell considerations for bacterial synthetic biology. *Curr Opin Microbiol* **33**: 123–130.

Boumerdassi, H., Desmazeaud, M., Monnet, C., Boquien, C.Y., and Corrieu, G. (1996) Improvement of Diacetyl Production by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CNRZ 483 Through Oxygen Control. *J Dairy Sci* **79**: 775–781.

Bouwer, E.J., and Crowe, P.B. (1988) Biological Processes in Drinking Water Treatment. *J Am Water Works Assoc* **80**: 82–93.

Bowien, B., and Kusian, B. (2002) Genetics and control of CO₂ assimilation in the chemoautotroph *Ralstonia eutropha*. *Arch Microbiol* **178**: 85–93.

Bowien, B., and Schlegel, H.G. (1981) Physiology and Biochemistry of Aerobic Hydrogen-Oxidizing Bacteria. *Annu Rev* **35**: 405–452.

Budde, C.F., Riedel, S.L., Willis, L.B., Rha, C.K., and Sinskey, A.J. (2011) Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from plant oil by engineered *Ralstonia eutropha* strains. *Appl Environ Microbiol* **77**: 2847–2854.

Burgdorf, T., Lenz, O., Buhrke, T., Linden, E. Van Der, Jones, A.K., Albracht, S.P.J., and Friedrich, B. (2006) [NiFe]-hydrogenases of *Ralstonia eutropha* H16: Modular enzymes for oxygen-tolerant biological hydrogen oxidation. *J Mol Microbiol Biotechnol* **10**: 181–196.

Burne, R.A., Chen, Y.-Y.M., Li, Y., Bhagwat, S., and Wen, Z. (2009) Gene Expression in Oral

- Biofilms. In *Medical Implications of Biofilms*. Cambridge University Press, pp. 212–228.
- Cain, A.K., Barquist, L., Goodman, A.L., Paulsen, I.T., Parkhill, J., and Opijnen, T. van (2020) A decade of advances in transposon-insertion sequencing. *Nat Rev Genet* 2020 219 **21**: 526–540.
- Carvalho, F.M., Azevedo, A., Ferreira, M.M., Mergulhão, F.J.M., and Gomes, L.C. (2022) Advances on Bacterial and Fungal Biofilms for the Production of Added-Value Compounds. *Biol* 2022, Vol 11, Page 1126 **11**: 1126.
- Celińska, E., and Grajek, W. (2009) Biotechnological production of 2,3-butanediol—Current state and prospects. *Biotechnol Adv* **27**: 715–725.
- Chakravarty, J., and Brigham, C.J. (2018) Solvent production by engineered *Ralstonia eutropha*: channeling carbon to biofuel. *Appl Microbiol Biotechnol* **102**: 5021–5031.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., and Lappin-Scott, H.M. (1995) Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* **49**: 711–745.
- Cramm, R. (2009) Genomic View of Energy Metabolism in *Ralstonia eutropha* H16. *J Mol Microbiol Biotechnol* **16**: 38–52.
- Crépin, L., Lombard, E., and Guillouet, S.E. (2016) Metabolic engineering of *Cupriavidus necator* for heterotrophic and autotrophic alka(e)ne production. *Metab Eng* **37**: 92–101.
- Cui, Z., Wang, Z., Zheng, M., and Chen, T. (2022) Advances in biological production of acetoin: a comprehensive overview. *Crit Rev Biotechnol* **42**: 1135–1156.
- Cuny, L., Pfaff, D., Luther, J., Ranzinger, F., Ödman, P., Gescher, J., et al. (2019) Evaluation of productive biofilms for continuous lactic acid production. *Biotechnol Bioeng* **116**: 2687–2697.
- Dangel, A.W., and Tabita, F.R. (2015) CbbR, the master regulator for microbial carbon dioxide fixation. *J Bacteriol* **197**: 3488–3498.
- Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W., and Greenberg, E.P. (1998) The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm. *Science (80)* **280**: 295–298.

Davis, D.H., Doudoroff, M., Stanier, R.Y., and Mandel, M. (1969) Proposal to reject the genus *Hydrogenomonas*: Taxonomic implications. *Int J Syst Evol Microbiol* **19**: 375–390.

Dennis, D., McCoy, M., Stangl, A., Valentin, H.E., and Wu, Z. (1998) Formation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by PHA synthase from *Ralstonia eutropha*. *J Biotechnol* **64**: 177–186.

Diggie, S.P., Winzer, K., Chhabra, S.R., Worrall, K.E., Cámara, M., and Williams, P. (2003) The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates rhl-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. *Mol Microbiol* **50**: 29–43.

Donlan, R.M. (2002) Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* **8**: 881–890.

Doran, P.M., and Bailey, J.E. (1986) Effects of immobilization on growth, fermentation properties, and macromolecular composition of *Saccharomyces cerevisiae* attached to gelatin. *Biotechnol Bioeng* **28**: 73–87.

Du, B., Olson, C.A., Sastry, A. V., Fang, X., Phaneuf, P. V., Chen, K., *et al.* (2020) Adaptive laboratory evolution of *Escherichia coli* under acid stress. *Microbiol (United Kingdom)* **166**: 141–148.

Dunsing, V., Irmischer, T., Barbirz, S., and Chiantia, S. (2019) Purely Polysaccharide-Based Biofilm Matrix Provides Size-Selective Diffusion Barriers for Nanoparticles and Bacteriophages. *Biomacromolecules* 3842-3854.

Edel, M., Horn, H., and Gescher, J. (2019) Biofilm systems as tools in biotechnological production. *Appl Microbiol Biotechnol* **103**: 5095–5103.

Elsas, J.D. van, and Smalla, K. (1995) Antibiotic (kanamycin and streptomycin) resistance traits in the environment. *Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, 1995* 61–69.

Faria, P.E., Castro, A.M., Freire, D.M.G., and Mesquita, R.D. (2023) Enzymes and pathways in microbial production of 2,3-butanediol and 3-acetoin isomers. *Crit Rev Biotechnol* **43**: 67–81.

Ferone, M., Raganati, F., Ercole, A., Olivieri, G., Salatino, P., and Marzocchella, A. (2018)

Continuous succinic acid fermentation by *Actinobacillus succinogenes* in a packed-bed biofilm reactor. *Biotechnol Biofuels* **11**: 1–11.

Flemming, H.C., Neu, T.R., and Wozniak, D.J. (2007) The EPS matrix: The “House of Biofilm Cells.” *J Bacteriol* **189**: 7945–7947.

Flemming, H.C., and Wingender, J. (2010) The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* **8**: 623–633.

Flemming, H.C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S.A., and Kjelleberg, S. (2016) Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol* **14**: 563–575.

FMI - Future Market Insights Report: REP-GB-938 (2023) Acetoin Natural Market Shares, Size & Forecasts 2022 – 2032 | FMI REP-GB-9381. <https://www.futuremarketinsights.com/reports/acetoin-natural-market>. Accessed February 5, 2024.

Förster, A.H., Beblawy, S., Golitsch, F., and Gescher, J. (2017) Electrode-assisted acetoin production in a metabolically engineered *Escherichia coli* strain. *Biotechnol Biofuels* **10**: 1–11.

Freitag, R. (1999) Utilization of enzyme–substrate interactions in analytical chemistry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **722**: 279–301.

Frey, J., Bagdasarian, M.M., and Bagdasarian, M. (1992) Replication and copy number control of the broad-host-range plasmid RSF1010. *Gene* **113**: 101–106.

Gai, C.S., Lu, J., Brigham, C.J., Bernardi, A.C., and Sinskey, A.J. (2014) Insights into bacterial CO₂ metabolism revealed by the characterization of four carbonic anhydrases in *Ralstonia eutropha* H16. *AMB Express* **4**: 2.

Ge, Y., Li, K., Li, L., Gao, C., Zhang, L., Ma, C., and Xu, P. (2016) Contracted but effective: production of enantiopure 2,3-butanediol by thermophilic and GRAS *Bacillus licheniformis*. *Green Chem* **18**: 4693–4703.

Gibson, D.G., Young, L., Chuang, R.Y., Venter, J.C., Hutchison, C.A., and Smith, H.O. (2009) Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods* **2009** **6**: 343–345.

Gilmore, K.S., Srinivas, P., Akins, D.R., Hatter, K.L., and Gilmore, M.S. (2003) Growth, development, and gene expression in a persistent *Streptococcus gordonii* biofilm. *Infect Immun* **71**: 4759–4766.

Gottschalk, G., Eberhardt, U., and Schlegel, H.G. (1964) Verwertung von Fructose durch *Hydrogenomonas* H16 (l.). *Arch Mikrobiol* **48**: 95–108.

Groenestijn, J.W. Van, Geelhoed, J.S., Goorissen, H.P., Meesters, K.P.M., Stams, A.J.M., and Claassen, P.A.M. (2009) Performance and population analysis of a non-sterile trickle bed reactor inoculated with *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*, a thermophilic hydrogen producer. *Biotechnol Bioeng* **102**: 1361–1367.

Grousseau, E., Lu, J., Gorret, N., Guillouet, S.E., and Sinskey, A.J. (2014) Isopropanol production with engineered *Cupriavidus necator* as bioproduction platform. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**: 4277–4290.

Grzeszik, C., Jeffke, T., Schäferjohann, J., Kusian, B., and Bowien, B. (2000) Phosphoenolpyruvate is a signal metabolite in transcriptional control of the cbb CO₂ fixation operons in *Ralstonia eutropha*. *J Mol Microbiol Biotechnol* .

Hakizimana, O., Matabaro, E., and Lee, B.H. (2020) The current strategies and parameters for the enhanced microbial production of 2,3-butanediol. *Biotechnol Reports* **25**: e00397.

Halan, B., Schmid, A., and Buehler, K. (2011) Real-time solvent tolerance analysis of *Pseudomonas* sp. Strain VLB120ΔC catalytic biofilms. *Appl Environ Microbiol* **77**: 1563–1571.

Hallagan, J.B. (2017) The use of diacetyl (2,3-butanedione) and related flavoring substances as flavorings added to foods—Workplace safety issues. *Toxicology* **388**: 1–6.

Hansen, S.H., Kabbeck, T., Radtke, C.P., Krause, S., Krolitzki, E., Peschke, T., *et al.* (2019) Machine-assisted cultivation and analysis of biofilms. *Sci Rep* **9**.

Härrer, D., Windhorst, C., Böhner, N., Novion Ducassou, J., Couté, Y., and Gescher, J. (2021) Production of acetoin from renewable resources under heterotrophic and mixotrophic conditions. *Bioresour Technol* **329**: 124866.

Haveren, J. van, Scott, E.L., and Sanders, J. (2008) Bulk chemicals from biomass. *Biofuels, Bioprod Biorefining* **2**: 41–57.

Heinrich, D., Raberg, M., and Steinbüchel, A. (2018) Studies on the aerobic utilization of synthesis gas (syngas) by wild type and recombinant strains of *Ralstonia eutropha* H16. *Microb Biotechnol* **11**: 647–656.

Hengge, R. (2009) Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat Rev Microbiol* **7**: 263–273.

Henke, J.M., and Bassler, B.L. (2004) Three parallel quorum-sensing systems regulate gene expression in *Vibrio harveyi*. *J Bacteriol* **186**: 6902–6914.

Hickman, J.W., Tifrea, D.F., and Harwood, C.S. (2005) A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 14422–14427.

Jahn, M., Vorpahl, C., Hübschmann, T., Harms, H., and Müller, S. (2016) Copy number variability of expression plasmids determined by cell sorting and droplet digital PCR. *Microb Cell Fact* **15**: 1–12.

Jantama, K., Polyiam, P., Khunnonkwao, P., Chan, S., Sangproo, M., Khor, K., *et al.* (2015) Efficient reduction of the formation of by-products and improvement of production yield of 2,3-butanediol by a combined deletion of alcohol dehydrogenase, acetate kinase-phosphotransacetylase, and lactate dehydrogenase genes in metabolically engineered *Klebsiella oxytoca* in mineral salts medium. *Metab Eng* **30**: 16–26.

Ji, X.J., Huang, H., and Ouyang, P.K. (2011) Microbial 2,3-butanediol production: A state-of-the-art review. *Biotechnol Adv* **29**: 351–364.

Jiang, T., Liu, Y., Jiang, Y., Li, J., Gao, Y., Cui, Z., *et al.* (2020) Long-read-based human genomic structural variation detection with cuteSV. *Genome Biol* **21**: 1–24.

Jiang, Y., Yang, X., Zeng, D., Su, Y., and Zhang, Y. (2022) Microbial conversion of syngas to single cell protein: The role of carbon monoxide. *Chem Eng J* **450**: 138041.

Jo, J., Price-Whelan, A., and Dietrich, L.E.P. (2022) Gradients and consequences of heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol* **20**: 593–607.

Kim, J.W., Seo, S.O., Zhang, G.C., Jin, Y.S., and Seo, J.H. (2015) Expression of *Lactococcus lactis* NADH oxidase increases 2,3-butanediol production in Pdc-deficient *Saccharomyces*

cerevisiae. *Bioresour Technol* **191**: 512–519.

Kirchberg, A., Esfahani, K., Röpert, M.-C., Wilhelm, M., Meier, M.A.R., Kirchberg, A., *et al.* (2022) Sustainable Synthesis of Non-Isocyanate Polyurethanes Based on Renewable 2,3-Butanediol. *Macromol Chem Phys* **223**: 2200010.

Kircher, M., Heyn, P., and Kelso, J. (2011) Addressing challenges in the production and analysis of illumina sequencing data. *BMC Genomics* **12**: 1–14.

Klein, E., Weiler, J., Wagner, M., Čelikić, M., Niemeyer, C.M., Horn, H., and Gescher, J. (2022) Enrichment of phosphate-accumulating organisms (PAOs) in a microfluidic model biofilm system by mimicking a typical aerobic granular sludge feast/famine regime. *Appl Microbiol Biotechnol* **106**: 1313–1324.

Köpke, M., Mihalcea, C., Liew, F.M., Tizard, J.H., Ali, M.S., Conolly, J.J., *et al.* (2011) 2,3-Butanediol production by acetogenic bacteria, an alternative route to chemical synthesis, using industrial waste gas. *Appl Environ Microbiol* **77**: 5467–5475.

Korać Jačić, J., Milenković, M.R., Bajuk-Bogdanović, D., Stanković, D., Dimitrijević, M., and Spasojević, I. (2022) The impact of ferric iron and pH on photo-degradation of tetracycline in water. *J Photochem Photobiol A Chem* **433**: 114155.

Kouzuma, A., Oba, H., Tajima, N., Hashimoto, K., and Watanabe, K. (2014) Electrochemical selection and characterization of a high current-generating *Shewanella oneidensis* mutant with altered cell-surface morphology and biofilm-related gene expression. *BMC Microbiol* **14**: 1–11.

Kovach, M.E., Elzer, P.H., Steven Hill, D., Robertson, G.T., Farris, M.A., Roop, R.M., and Peterson, K.M. (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**: 175–176.

Krastanov, A., Alexieva, Z., and Yemendzhiev, H. (2013) Microbial degradation of phenol and phenolic derivatives. *Eng Life Sci* **13**: 76–87.

Krieg, T., Sydow, A., Faust, S., Huth, I., and Holtmann, D. (2018) CO₂ to Terpenes: Autotrophic and Electroautotrophic α -Humulene Production with *Cupriavidus necator*. *Angew Chemie Int Ed* **57**: 1879–1882.

Krysan, P.J., Young, J.C., and Sussman, M.R. (1999) T-DNA as an Insertional Mutagen in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **11**: 2283–2290.

Kujundzic, E., Greenberg, A.R., Fong, R., Moore, B., Kujundzic, D., and Hernandez, M. (2010) Biofouling potential of industrial fermentation broth components during microfiltration. *J Memb Sci* **349**: 44–55.

Kusian, B., Sültemeyer, D., and Bowien, B. (2002) Carbonic Anhydrase Is Essential for Growth of *Ralstonia eutropha* at Ambient CO₂ Concentrations. *J Bacteriol* **184**: 5018.

Lenz, O., Bernhard, M., Buhrke, T., Schwartz, E., and Friedrich, B. (2002) The hydrogen-sensing apparatus in *Ralstonia eutropha*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**: 255–262.

Leonov, P.S., Flores-Alsina, X., Gernaey, K. V., and Sternberg, C. (2021) Microbial biofilms in biorefinery – Towards a sustainable production of low-value bulk chemicals and fuels. *Biotechnol Adv* **50**: 107766.

Li, X.Z., Webb, J.S., Kjelleberg, S., and Rosche, B. (2006) Enhanced benzaldehyde tolerance in *Zymomonas mobilis* biofilms and the potential of biofilm applications in fine-chemical production. *Appl Environ Microbiol* **72**: 1639–1644.

Li, Z., Xin, X., Xiong, B., Zhao, D., Zhang, X., and Bi, C. (2020) Engineering the Calvin–Benson–Bassham cycle and hydrogen utilization pathway of *Ralstonia eutropha* for improved autotrophic growth and polyhydroxybutyrate production. *Microb Cell Fact* **19**: 1–9.

Liu, T., Yu, Y.Y., Deng, X.P., Ng, C.K., Cao, B., Wang, J.Y., *et al.* (2015) Enhanced *Shewanella* biofilm promotes bioelectricity generation. *Biotechnol Bioeng* **112**: 2051–2059.

Liu, X., Chung, Y.K., Yang, S.T., and Yousef, A.E. (2005) Continuous nisin production in laboratory media and whey permeate by immobilized *Lactococcus lactis*. *Process Biochem* **40**: 13–24.

Liu, Z., Qin, J., Gao, C., Hua, D., Ma, C., Li, L., *et al.* (2011) Production of (2S,3S)-2,3-butanediol and (3S)-acetoin from glucose using resting cells of *Klebsiella pneumonia* and *Bacillus subtilis*. *Bioresour Technol* **102**: 10741–10744.

Lu, S.C. (2000) S-Adenosylmethionine. *Int J Biochem Cell Biol* **32**: 391–395.

- Lykidis, A., Pérez-Pantoja, D., Ledger, T., Mavromatis, K., Anderson, I.J., Ivanova, N.N., *et al.* (2010) The Complete Multipartite Genome Sequence of *Cupriavidus necator* JMP134, a Versatile Pollutant Degradar. *PLoS One* **5**: e9729
- Ma, C., Wang, A., Qin, J., Li, L., Ai, X., Jiang, T., *et al.* (2009) Enhanced 2,3-butanediol production by *Klebsiella pneumoniae* SDM. *Appl Microbiol Biotechnol* **82**: 49–57.
- MacPhee, D.G. (1991) The significance of deletions in spontaneous and induced mutations associated with movement of transposable DNA elements: possible implications for evolution and cancer. *Mutat Res Mol Mech Mutagen* **250**: 35–47.
- Maddox, I.S. (1996) Microbial Production of 2,3-Butanediol. *Biotechnology* 269–291.
- Maina, S., Prabhu, A.A., Vivek, N., Vlysidis, A., Koutinas, A., and Kumar, V. (2022) Prospects on bio-based 2,3-butanediol and acetoin production: Recent progress and advances. *Biotechnol Adv* **54**: 107783.
- Makkar, N.S., and JR., L.E.C. (1987) *Cupriavidus necator* gen. nov., sp. nov.; a Nonobligate Bacterial Predator of Bacteria in Soil†. *Int J Syst Evol Microbiol* **37**: 323–326.
- Manavathu, E.K., and Vazquez, J.A. (2017) The Functional Resistance of Biofilms. *Antimicrob Drug Resist* 149–162.
- Mas, C. De, Jansen, N.B., and Tsao, G.T. (1988) Production of optically active 2,3-butanediol by *Bacillus polymyxa*. *Biotechnol Bioeng* **31**: 366–377.
- Massip, C., Coullaud-Gamel, M., Gaudru, C., Amoureux, L., Doleans-Jordheim, A., Hery-Arnaud, G., *et al.* (2020) In vitro activity of 20 antibiotics against *Cupriavidus* clinical strains. *J Antimicrob Chemother* **75**: 1654–1658.
- Matsumoto, A., Koga, R., Kanaly, R.A., Kouzuma, A., and Watanabe, K. (2021) Identification of a Diguanylate Cyclase That Facilitates Biofilm Formation on Electrodes by *Shewanella oneidensis* MR-1. *Appl Environ Microbiol* **87**: 1–11.
- McInerney, J.O., McNally, A., and O’Connell, M.J. (2017) Why prokaryotes have pangenomes. *Nat Microbiol* 2017 24 **2**: 1–5.
- Miller, M.B., Skorupski, K., Lenz, D.H., Taylor, R.K., and Bassler, B.L. (2002) Parallel quorum

- sensing systems converge to regulate virulence in *Vibrio cholerae*. *Cell* **110**: 303–314.
- Milton, D.L. (2006) Quorum sensing in *Vibrios*: Complexity for diversification. *Int J Med Microbiol* **296**: 61–71.
- Muffler, K., Lakatos, M., Schlegel, C., Strieth, D., Kuhne, S., and Ulber, R. (2014) Application of biofilm bioreactors in white biotechnology. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **146**: 123–161.
- Murugan, P., Chhajer, P., Kosugi, A., Arai, T., Brigham, C.J., and Sudesh, K. (2016) Production of P(3HB-co-3HHx) with Controlled Compositions by Recombinant *Cupriavidus necator* Re2058/pCB113 from Renewable Resources. *CLEAN – Soil, Air, Water* **44**: 1234–1241.
- Nakamura, Y., Gojobori, T., and Ikemura, T. (2000) Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000. *Nucleic Acids Res* **28**: 292–292.
- Nakashima, N., Akita, H., and Hoshino, T. (2014) Establishment of a novel gene expression method, BICES (biomass-inducible chromosome-based expression system), and its application to the production of 2,3-butanediol and acetoin. *Metab Eng* **25**: 204–214.
- Ng, C.K., Xu, J., Cai, Z., Yang, L., Thompson, I.P., Huang, W.E., and Cao, B. (2020) Elevated intracellular cyclic-di-GMP level in *Shewanella oneidensis* increases expression of c-type cytochromes. *Microb Biotechnol* **13**: 1904.
- O'Connor, J.R., Kuwada, N.J., Huangyutitham, V., Wiggins, P.A., and Harwood, C.S. (2012) Surface sensing and lateral subcellular localization of WspA, the receptor in a chemosensory-like system leading to c-di-GMP production. *Mol Microbiol* **86**: 720–729.
- Okonkwo, C.C., Ujor, V., and Ezeji, T.C. (2017) Investigation of relationship between 2,3-butanediol toxicity and production during growth of *Paenibacillus polymyxa*. *N Biotechnol* **34**: 23–31.
- Oliver, J.W.K., Machado, I.M.P., Yoneda, H., and Atsumi, S. (2014) Combinatorial optimization of cyanobacterial 2,3-butanediol production. *Metab Eng* **22**: 76–82.
- Orita, I., Iwazawa, R., Nakamura, S., and Fukui, T. (2012) Identification of mutation points in *Cupriavidus necator* NCIMB 11599 and genetic reconstitution of glucose-utilization ability in wild strain H16 for polyhydroxyalkanoate production. *J Biosci Bioeng* **113**: 63–69.

- Otagiri, M., Ui, S., Takusagawa, Y., Ohtsuki, T., Kurisu, G., and Kusunoki, M. (2010) Structural basis for chiral substrate recognition by two 2,3-butanediol dehydrogenases. *FEBS Lett* **584**: 219–223.
- Palsson, B.O., Fathi-Afshar, S., Rudd, D.F., and Lightfoot, E.N. (1981) Biomass as a Source of Chemical Feedstocks: An Economic Evaluation. *Science (80-)* **213**: 513–517.
- Panich, J., Fong, B., and Singer, S.W. (2021) Metabolic Engineering of *Cupriavidus necator* H16 for Sustainable Biofuels from CO₂. *Trends Biotechnol* **39**: 412–424.
- Pearcy, N., Garavaglia, M., Millat, T., Gilbert, J.P., Song, Y., Hartman, H., et al. (2022) A genome-scale metabolic model of *Cupriavidus necator* H16 integrated with TraDIS and transcriptomic data reveals metabolic insights for biotechnological applications. *PLoS Comput Biol* **18**.
- Pfaller, R., and Rüdinger, C. (2012) Verfahren zur Extraktion von 2,3-Butandiol aus einer wässrigen Mischung. Deutsches Patent- und Markenamt. Aktenzeichen DE: 10 2011 004 915.0.
- Pfützner, J., and Schlegel, H.G. (1973) Denitrifikation bei *Hydrogenomonas eutropha* Stamm H16. *Arch Mikrobiol* **90**: 199–211.
- Pohlmann, A., Fricke, W.F., Reinecke, F., Kusian, B., Liesegang, H., Cramm, R., et al. (2006) Genome sequence of the bioplastic-producing “Knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Nat Biotechnol* 2006 2410 **24**: 1257–1262.
- Pratofiorito, G., Hackbarth, M., Mandel, C., Madlanga, S., West, S., Horn, H., and Hille-Reichel, A. (2021) A membrane biofilm reactor for hydrogenotrophic methanation. *Bioresour Technol* **321**: 124444.
- Reddy Kunduru, M., and Pometto, A.L. (1996) Continuous ethanol production by *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae* in biofilm reactors. *J Ind Microbiol Biotechnol* **16**: 249–256.
- Reinecke, F., and Steinbüchel, A. (2009) *Ralstonia eutropha* Strain H16 as Model Organism for PHA Metabolism and for Biotechnological Production of Technically Interesting Biopolymers. *J Mol Microbiol Biotechnol* **16**: 91–108.

- Ricci, L., Agostino, V., Fino, D., and Re, A. (2021) Screening of gas substrate and medium effects on 2,3-butanediol production with *C. ljungdahlii* and *C. autoethanogenum* aided by improved autotrophic cultivation technique. *Ferment* **7**: 264.
- Riegler, P., Bieringer, E., Chrusciel, T., Stärz, M., Löwe, H., and Weuster-Botz, D. (2019) Continuous conversion of CO₂/H₂ with *Clostridium acetivum* in biofilm reactors. *Bioresour Technol* **291**: 121760.
- Rosche, B., Li, X.Z., Hauer, B., Schmid, A., and Buehler, K. (2009) Microbial biofilms: a concept for industrial catalysis? *Trends Biotechnol* **27**: 636–643.
- Rutherford, S.T., and Bassler, B.L. (2012) Bacterial Quorum Sensing: Its Role in Virulence and Possibilities for Its Control. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**.
- Saïdi, F., Mahanta, U., Panda, A., Kezzo, A.A., Jolivet, N.Y., Bitazar, R., et al. (2022) Bacterial Outer Membrane Polysaccharide Export (OPX) Proteins Occupy Three Structural Classes with Selective β -Barrel Porin Requirements for Polymer Secretion. *Microbiol Spectr* **10**
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* **74**: 5463–5467.
- Sauer, K. (2003) The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biol* **4**: 1–5.
- Sauer, K., Camper, A.K., Ehrlich, G.D., Costerton, J.W., and Davies, D.G. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* **184**: 1140–1154.
- Sauer, K., Stoodley, P., Goeres, D.M., Hall-Stoodley, L., Burmølle, M., Stewart, P.S., and Bjarnsholt, T. (2022) The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nat Rev Microbiol* **20**: 608–620.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., et al. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* **9**: 676–682.
- Schlegel, H.G., Gottschalk, G., and Bartha, R. Von (1961) Formation and Utilization of Poly- β -Hydroxybutyric Acid by Knallgas Bacteria (*Hydrogenomonas*). *Nat* **191**: 463–465.

Schmeckeber, A., Zayed, A., and Ulber, R. (2022) Productive biofilms: from prokaryotic to eukaryotic systems. *J Chem Technol Biotechnol* **97**: 3049–3064.

Schneider, K., and Schlegel, H.G. (1976) Purification and properties of soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* H 16. *Biochim Biophys Acta - Enzymol* **452**: 66–80.

Schwabe, J., Pérez-Burgos, M., Herfurth, M., Glatter, T., and Sjøgaard-Andersen, L. (2022) Evidence for a Widespread Third System for Bacterial Polysaccharide Export across the Outer Membrane Comprising a Composite OPX/ β -Barrel Translocon. *MBio* **13**

Sedlazeck, F.J., Rescheneder, P., Smolka, M., Fang, H., Nattestad, M., Haeseler, A. Von, and Schatz, M.C. (2018) Accurate detection of complex structural variations using single-molecule sequencing. *Nat Methods* **2018 156 15**: 461–468.

Silver, L.L. (2011) Challenges of antibacterial discovery. *Clin Microbiol Rev* **24**: 71–109.

Soltys, K.A., Batta, A.K., and Koneru, B. (2001) Successful Nonfreezing, Subzero Preservation of Rat Liver with 2,3-Butanediol and Type I Antifreeze Protein. *J Surg Res* **96**: 30–34.

Souza, L.M. de, Oliveira, I.D. de, Sales, F.C.S., Costa, A.C. da, Campos, K.R., Abbud, A., *et al.* (2023) Technical comparison of Minlon and Illumina technologies for genotyping Chikungunya virus in clinical samples. *J Genet Eng Biotechnol* **21**: 1–8.

Staudt, C., Horn, H., Hempel, D.C., and Neu, T.R. (2004) Volumetric measurements of bacterial cells and extracellular polymeric substance glycoconjugates in biofilms. *Biotechnol Bioeng* **88**: 585–592.

Steenackers, H.P., Parijs, I., Foster, K.R., and Vanderleyden, J. (2016) Experimental evolution in biofilm populations. *FEMS Microbiol Rev* **40**: 373–397.

Steinbüchel, A., and Schlegel, H.G. (1984) A multifunctional fermentative alcohol dehydrogenase from the strict aerobic *Alcaligenes eutrophus*: purification and properties. *Eur J Biochem* **141**: 555–564.

Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., and Costerton, J.W. (2002) Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* **56**: 187–209.

Sun, L.H., Jiang, B., and Xiu, Z.L. (2009) Aqueous two-phase extraction of 2,3-butanediol from

-
- fermentation broths by isopropanol/ammonium sulfate system. *Biotechnol Lett* **31**: 371–376.
- Sun, S., and Pandelia, M.E. (2020) HD-[HD-GYP] Phosphodiesterases: Activities and Evolutionary Diversification within the HD-GYP Family. *Biochemistry* **59**: 2340–2350.
- Sydow, A., Pannek, A., Krieg, T., Huth, I., Guillouet, S.E., and Holtmann, D. (2017) Expanding the genetic tool box for *Cupriavidus necator* by a stabilized L-rhamnose inducible plasmid system. *J Biotechnol* **263**: 1–10.
- Syu, M.J. (2001) Biological production of 2,3-butanediol. *Appl Microbiol Biotechnol* **55**: 10–18.
- Tajima, N., Kouzuma, A., Hashimoto, K., and Watanabe, K. (2011) Selection of *Shewanella oneidensis* MR-1 gene-knockout mutants that adapt to an electrode-respiring condition. *Biosci Biotechnol Biochem* **75**: 2229–2233.
- Tee, K.L., Grinham, J., Othusitse, A.M., González-Villanueva, M., Johnson, A.O., and Wong, T.S. (2017) An Efficient Transformation Method for the Bioplastic-Producing “Knallgas” Bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Biotechnol J* **12**: 1700081.
- Teschler, J.K., Nadell, C.D., Drescher, K., and Yildiz, F.H. (2022) Mechanisms Underlying *Vibrio cholerae* Biofilm Formation and Dispersion. *Annu Rev* **76**: 503–532.
- Thormann, K.M., Duttler, S., Saville, R.M., Hyodo, M., Shukla, S., Hayakawa, Y., and Spormann, A.M. (2006) Control of Formation and Cellular Detachment from *Shewanella oneidensis* MR-1 Biofilms by Cyclic di-GMP. *J Bacteriol* **188**: 2681.
- Tian, J., Sinskey, A.J., Stubbe, J., Tian, J., He, A., Lawrence, A., et al. (2005) Kinetic studies of polyhydroxybutyrate granule formation in *Wautersia eutropha* H16 by transmission electron microscopy. *J Bacteriol* **187**: 3814–3824.
- Tiemeyer, A., Link, H., and Weuster-Botz, D. (2007) Kinetic studies on autohydrogenotrophic growth of *Ralstonia eutropha* with nitrate as terminal electron acceptor. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**: 75–81.
- Tran, A. V., and Chambers, R.P. (1987) The dehydration of fermentative 2,3-butanediol into methyl ethyl ketone. *Biotechnol Bioeng* **29**: 343–351.

Transparency Market Research Report: TMRGL44105 (2023) 2,3-Butanediol Market Size, Share, Sale & Industry Demand-2031 REP ID: TMRGL44105. <https://www.transparencymarketresearch.com/2-3-butanediol-market.html>. Accessed February 5, 2024.

U.S. National Institute of Environmental Health Science National Toxicology Program Report 98 (2023) Toxicity Report 98: NTP Technical Report on the Toxicity Studies of Acetoin (CASRN 513-86-0) and 2,3-Pentanedione (CASRN 600-14-6) Administered by Inhalation to Wistar Han [CrI:WI(Han)] Rats and B6C3F1/N Mice. National Toxicology Program, National Institute of Environmental Health Science, USA. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK589913/>. Accessed February 5, 2024.

Ui, S., Hosaka, T., Watanabe, K., and Mimura, A. (1998) Discovery of a new mechanism of 2,3-butanediol stereoisomer formation in *Bacillus cereus* YUF-4. *J Ferment Bioeng* **85**: 79–83.

Ui, S., Masuda, T., Masuda, H., and Muraki, H. (1986) Mechanism for the formation of 2,3-butanediol stereoisomers in *Bacillus polymyxa*. *J Ferment Technol* **64**: 481–486.

Ui, S., Matsuyama, N., Masuda, H., and Muraki, H. (1984) Mechanism for the Formation of 2,3-Butanediol Stereoisomers in *Klebsiella pneumoniae* : *J Ferment Technol* **62**: 551–559.

Ui, S., Okajima, Y., Mimura, A., Kanai, H., and Kudo, T. (1997) Molecular generation of an *Escherichia coli* strain producing only the meso-isomer of 2,3-butanediol. *J Ferment Bioeng* **84**: 185–189.

Ui, S., Takusagawa, Y., Sato, T., Ohtsuki, T., Mimura, A., Ohkuma, M., and Kudo, T. (2004) Production of L-2,3-butanediol by a new pathway constructed in *Escherichia coli*. *Lett Appl Microbiol* **39**: 533–537.

Vandamme, P., and Coenye, T. (2004) Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 2285–2289.

Vaneechoutte, M., Kämpfer, P., Baere, T. De, Falsen, E., and Verschraegen, G. (2004) *Wautersia* gen. nov., a novel genus accomodating the phylogenetic lineage including *Ralstonia eutropha* and related species, and proposal of *Ralstonia* [*Pseudomonas*] *syzygii* (Roberts et al. 1990) comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 317–327.

Voss, I., and Steinbüchel, A. (2006) Application of a KDPG-aldolase gene-dependent addiction system for enhanced production of cyanophycin in *Ralstonia eutropha* strain H16. *Metab Eng* **8**: 66–78.

Wagner, M., and Horn, H. (2017) Optical coherence tomography in biofilm research: A comprehensive review. *Biotechnol Bioeng* **114**: 1386–1402.

Wagner, M., Taherzadeh, D., Haisch, C., and Horn, H. (2010) Investigation of the mesoscale structure and volumetric features of biofilms using optical coherence tomography. *Biotechnol Bioeng* **107**: 844–853.

Wang, X., Luo, H., Wang, Y., Wang, Y., Tu, T., Qin, X., *et al.* (2022) Direct conversion of carbon dioxide to glucose using metabolically engineered *Cupriavidus necator*. *Bioresour Technol* **362**: 127806.

Wang, X., Lv, M., Zhang, L., Li, K., Gao, C., Ma, C., and Xu, P. (2013) Efficient bioconversion of 2,3-butanediol into acetoin using *Gluconobacter oxydans* DSM 2003. *Biotechnol Biofuels* **6**: 1–9.

Waters, C.M., and Bassler, B.L. (2005) Quorum sensing: Cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 319–346.

Wei, Y., Perez, L.J., Ng, W.L., Semmelhack, M.F., and Bassler, B.L. (2011) Mechanism of *Vibrio cholerae* autoinducer-1 biosynthesis. *ACS Chem Biol* **6**: 356–365.

Weiler, J., Edel, M., and Gescher, J. (2024a) Biofilms for Production of Chemicals and Energy. *Annu Rev Chem Biomol Eng* **15**: 361–387

Weiler, J.R., Jürgensen, N., Cornejo Infante, M., Knoll, M.T., and Gescher, J. (2024b) Strain and model development for auto- and heterotrophic 2,3-butanediol production using *Cupriavidus necator* H16. *Biotechnol Biofuels Bioprod* **17**: 1–16

Werpy, T., and Petersen, G. (2004) Top Value Added Chemicals from Biomass: Volume I -- Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas. *Rep., US Natl. Renew. Energy Lab., Golden, CO.*

Weuster-Botz, D., Aivasidis, A., and Wandrey, C. (1993) Continuous ethanol production by *Zymomonas mobilis* in a fluidized bed reactor. Part II: Process development for the

fermentation of hydrolysed B-starch without sterilization. *Appl Microbiol Biotechnol* **39**: 685–690.

Wickham-Smith, C., Malys, N., and Winzer, K. (2023) Improving carbon monoxide tolerance of *Cupriavidus necator* H16 through adaptive laboratory evolution. *Front Bioeng Biotechnol* **11**: 1178536.

Wilde, E. (1962) Untersuchungen über Wachstum und Speicherstoffsynthese von *Hydrogenomonas*. *Arch Mikrobiol* **43**: 109–137.

Windhorst, C., and Gescher, J. (2019) Efficient biochemical production of acetoin from carbon dioxide using *Cupriavidus necator* H16. *Biotechnol Biofuels* **12**: 1–11.

Wong, C.L., Yen, H.W., Lin, C.L., and Chang, J.S. (2014) Effects of pH and fermentation strategies on 2,3-butanediol production with an isolated *Klebsiella* sp. Zmd30 strain. *Bioresour Technol* **152**: 169–176.

Woo, J.K.K., Webb, J.S., Kirov, S.M., Kjelleberg, S., and Rice, S.A. (2012) Biofilm dispersal cells of a cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolate exhibit variability in functional traits likely to contribute to persistent infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* **66**: 251–264.

Wu, G., Yan, Q., Jones, J.A., Tang, Y.J., Fong, S.S., and Koffas, M.A.G. (2016) Metabolic Burden: Cornerstones in Synthetic Biology and Metabolic Engineering Applications. *Trends Biotechnol* **34**: 652–664.

Xiao, Z., and Lu, J.R. (2014a) Strategies for enhancing fermentative production of acetoin: a review. *Biotechnol Adv* **32**: 492–503.

Xiao, Z., and Lu, J.R. (2014b) Generation of acetoin and its derivatives in foods. *J Agric Food Chem* **62**: 6487–6497.

Xiao, Z., and Xu, P. (2007) Acetoin Metabolism in Bacteria. *Crit Rev Microbiol* **33**: 127–140.

Xiu, Z.L., and Zeng, A.P. (2008) Present state and perspective of downstream processing of biologically produced 1,3-propanediol and 2,3-butanediol. *Appl Microbiol Biotechnol* **78**: 917–926.

Yabuuchi, E., Yano, I., Hotta, H., Nishiuchi, Y., and Kosako, Y. (1995) Transfer of two

Burkholderia and an *Alcaligenes* Species to *Ralstonia* gen. nov. *Microbiol Immunol* **39**: 897–904.

Yamamoto, K., Kusada, H., Kamagata, Y., and Tamaki, H. (2021) Parallel Evolution of Enhanced Biofilm Formation and Phage-Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* during Adaptation Process in Spatially Heterogeneous Environments. *Microorganisms* **9**: 569.

Yan, Y., Lee, C.C., and Liao, J.C. (2009) Enantioselective synthesis of pure (R,R)-2,3-butanediol in *Escherichia coli* with stereospecific secondary alcohol dehydrogenases. *Org Biomol Chem* **7**: 3914–3917.

Yang, T., Rao, Z., Zhang, X., Xu, M., Xu, Z., and Yang, S.T. (2017) Metabolic engineering strategies for acetoin and 2,3-butanediol production: advances and prospects. *Crit Rev Biotechnol* **37**: 990–1005.

Zhang, L., Liu, Q., Ge, Y., Li, L., Gao, C., Xu, P., and Ma, C. (2016) Biotechnological production of acetoin, a bio-based platform chemical, from a lignocellulosic resource by metabolically engineered *Enterobacter cloacae*. *Green Chem* **18**: 1560–1570.

Zhang, L., Sun, J., Hao, Y., Zhu, J., Chu, J., Wei, D., and Shen, Y. (2010) Microbial production of 2,3-butanediol by a surfactant (serrawettin)-deficient mutant of *Serratia marcescens* H30. *J Ind Microbiol Biotechnol* **37**: 857–862.

Zhang, X., Bury, S., DiBiasio, D., and Miller, J.E. (1989) Effects of immobilization on growth, substrate consumption, β -galactosidase induction, and byproduct formation in *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol* **4**: 239–246.

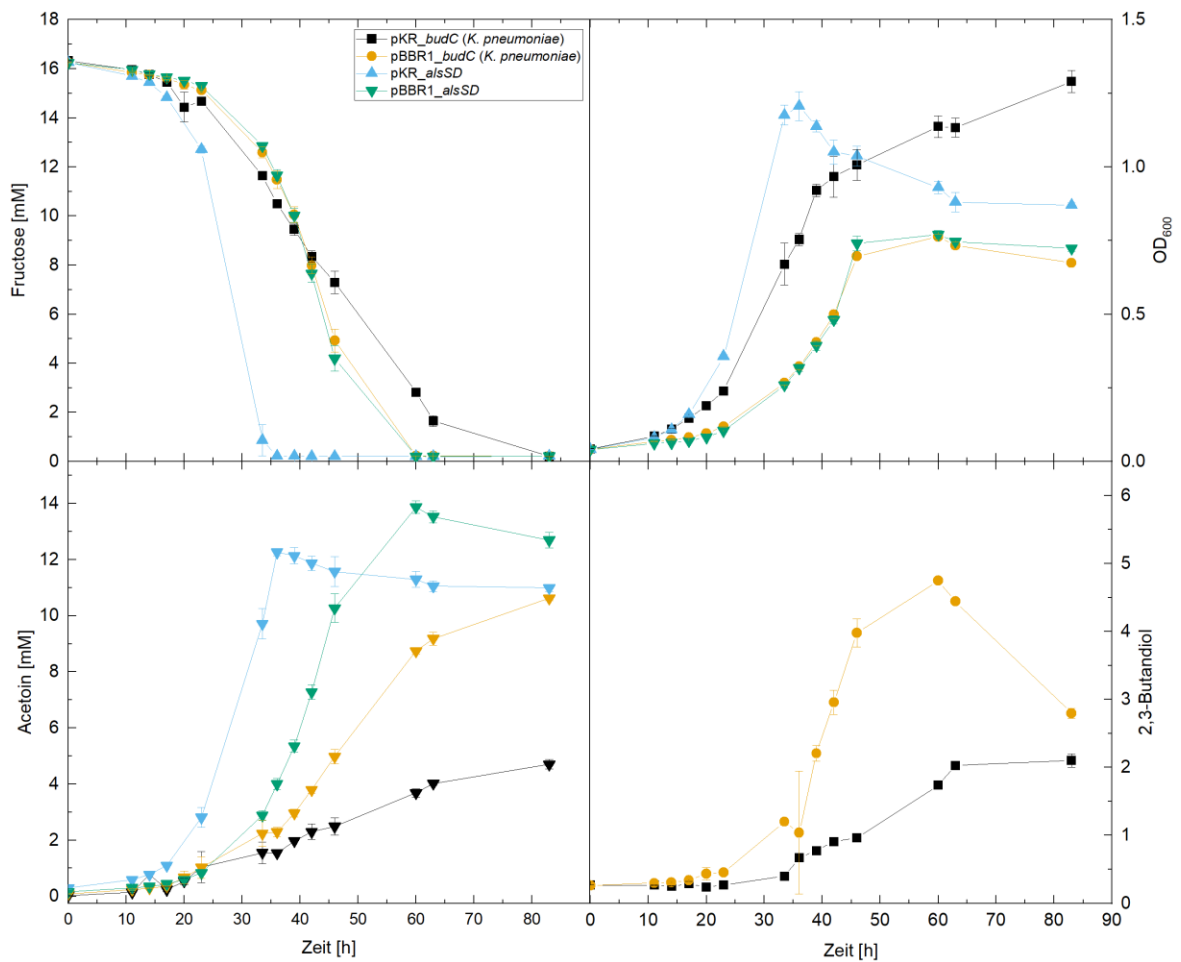
Zhang, X., Zhang, R., Yang, T., Zhang, J., Xu, M., Li, H., *et al.* (2013) Mutation breeding of acetoin high producing *Bacillus subtilis* blocked in 2,3-butanediol dehydrogenase. *World J Microbiol Biotechnol* **29**: 1783–1789.

Zhou, B., Martin, G.J.O., and Pamment, N.B. (2008) Increased phenotypic stability and ethanol tolerance of recombinant *Escherichia coli* KO11 when immobilized in continuous fluidized bed culture. *Biotechnol Bioeng* **100**: 627–633.

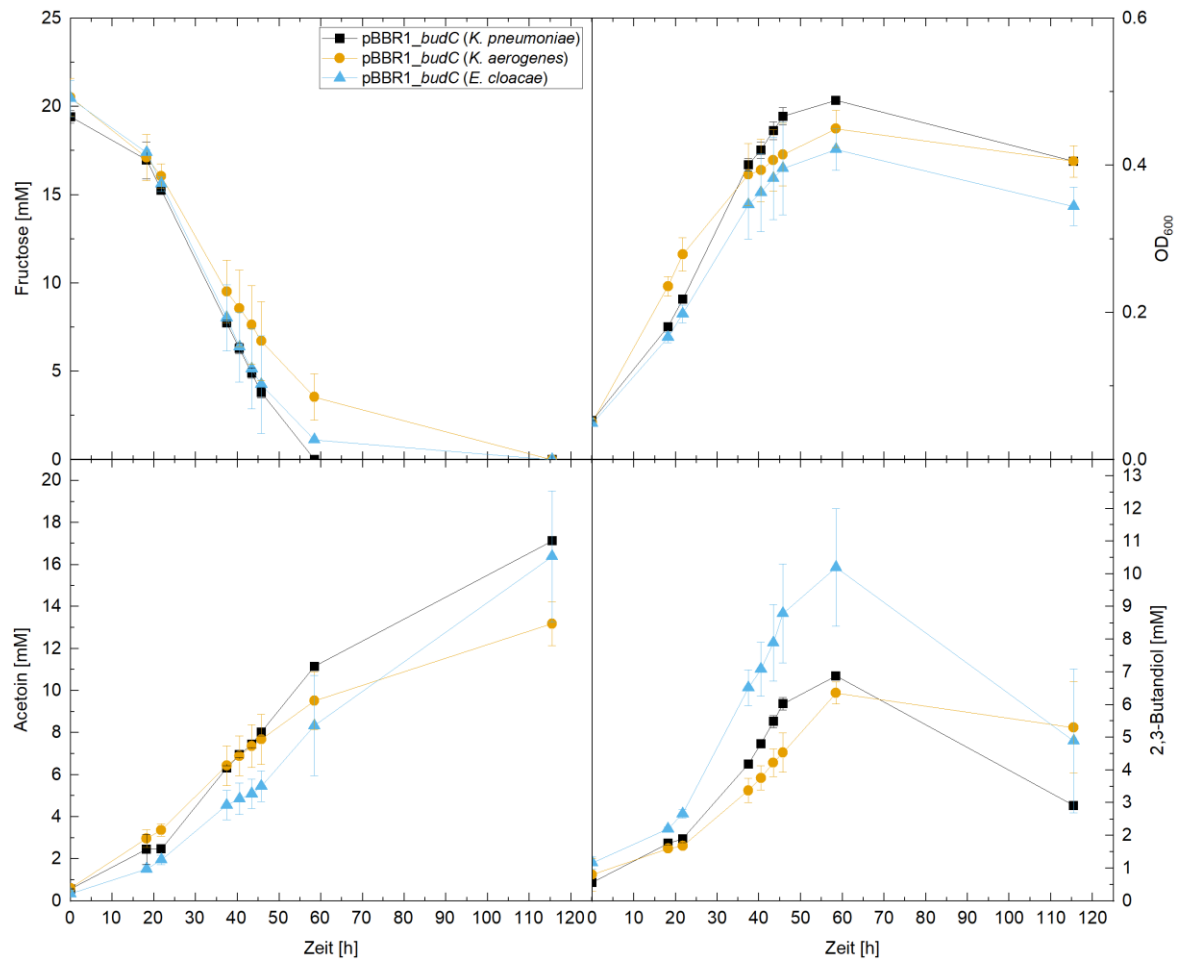
Abbildungen wurden mit BioRender.com und Origin erstellt.

7 Anhang

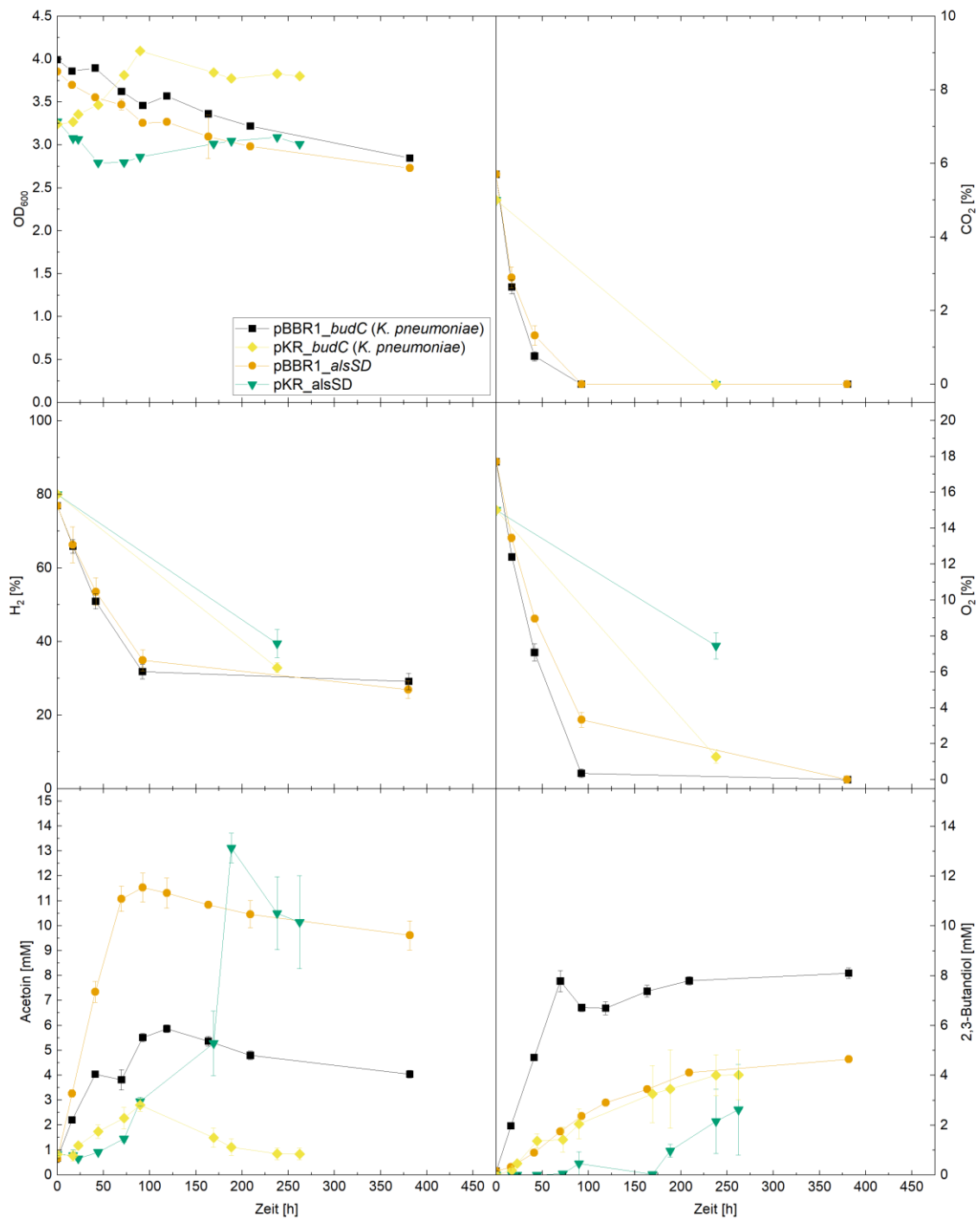
Anlagen A:



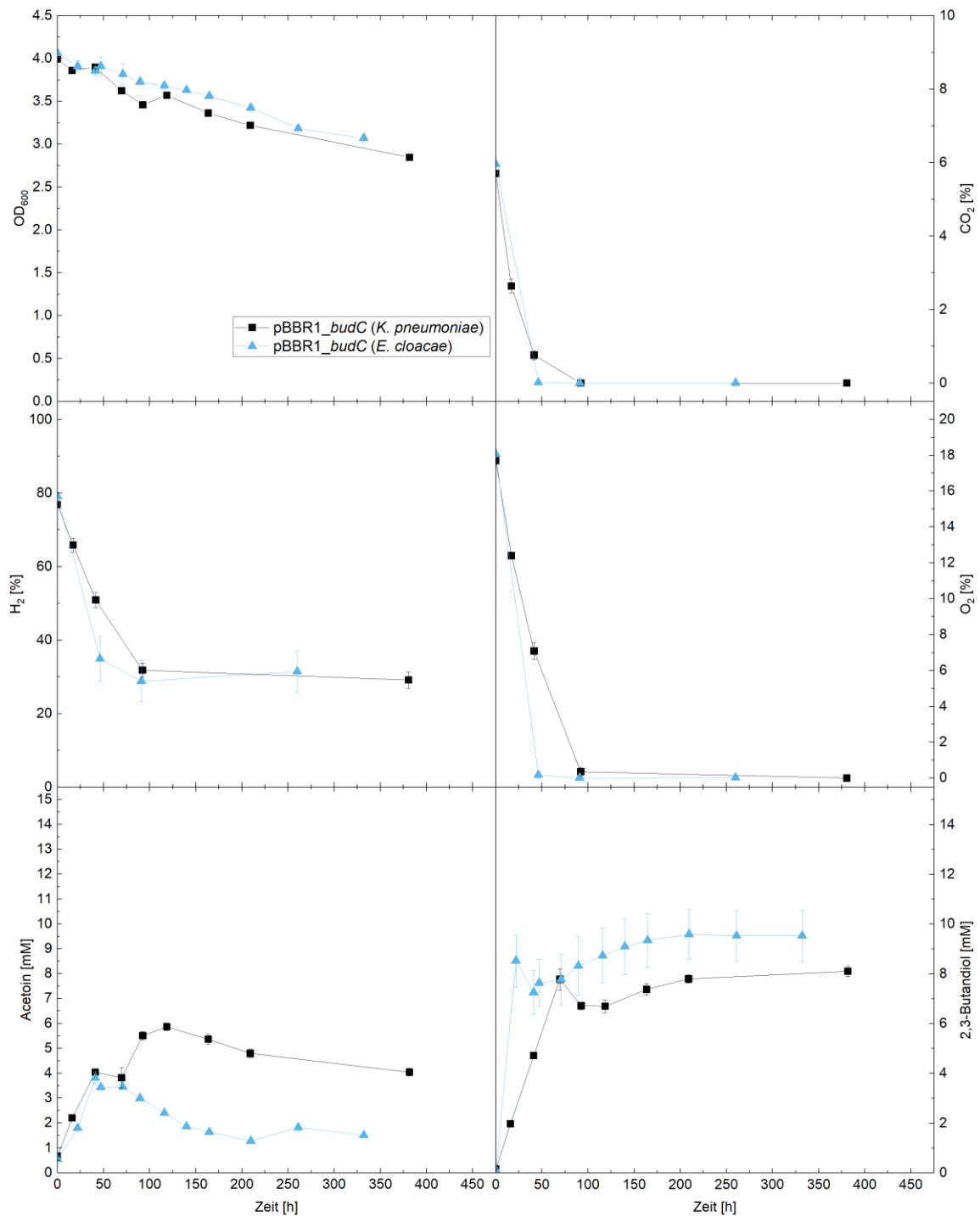
Anlage A 1: Vergleich von Produktionsplasmiden unter heterotrophen Bedingungen in *C. necator*-Stämmen mit jeweils identischen Genen für die Acetoin- und 2,3-Butandiolproduktion. Es werden Acetoin- und 2,3-Butandiol-Produktionen dargestellt, sowie die zugehörige optische Dichte und die Substratwerte. In diesem Vergleich zeigte sich eine Produktion durch pBBR1 für die Produktion von 2,3-Butandiol als effizienter.



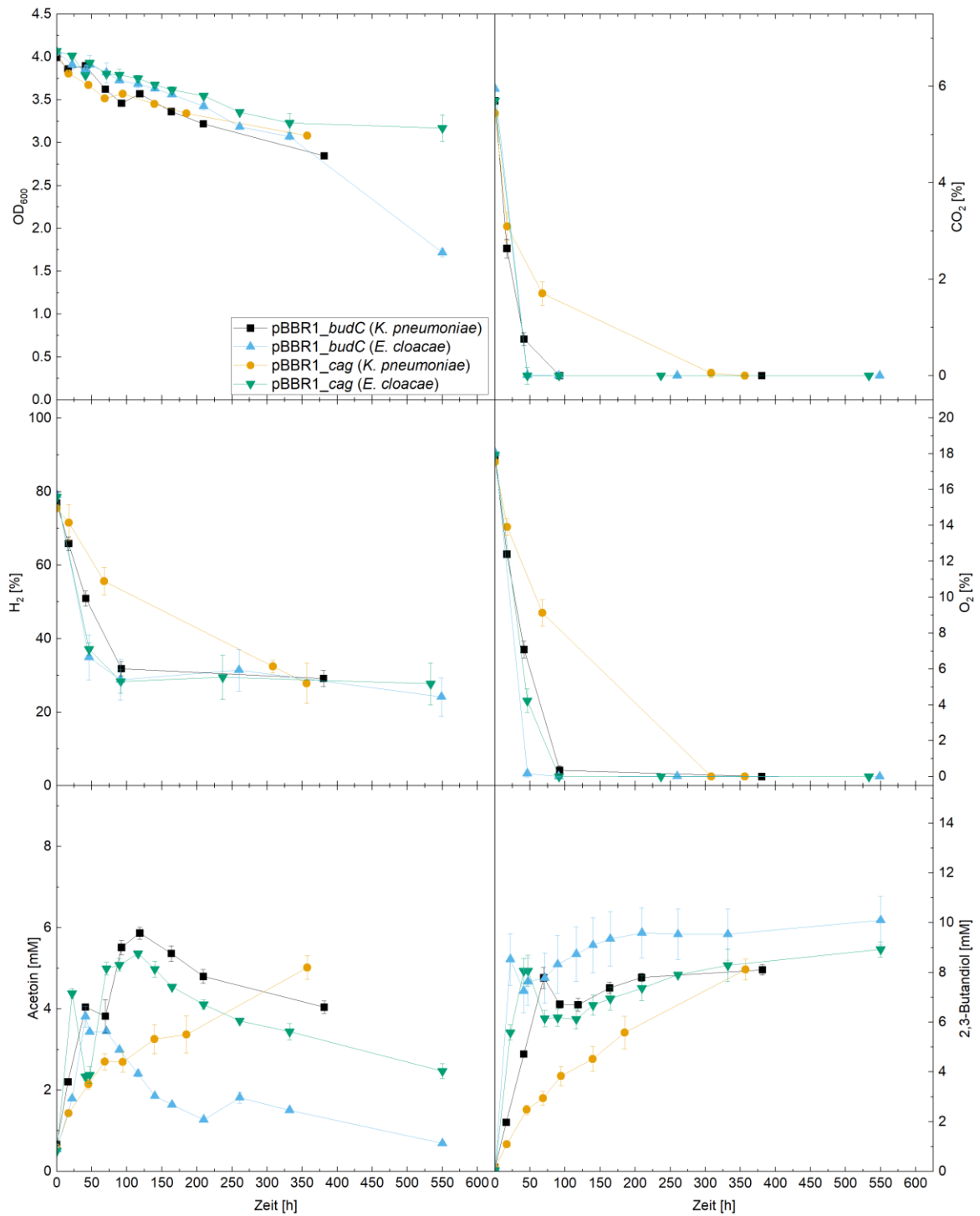
Anlage A 2: Vergleich von Varianten von *budC* aus verschiedenen Organismen (in Klammern ist der jeweilige Organismus angegeben) unter heterotrophen Bedingungen in *C. necator*-Stämmen. Es werden Acetoin- und 2,3-Butandiol-Produktionen dargestellt, sowie die zugehörige optische Dichte und die Substratwerte. In diesem Vergleich zeigten sich pBBR1_budC (*E. cloacae*) für die Produktion von 2,3-Butandiol als schneller und effizienter.



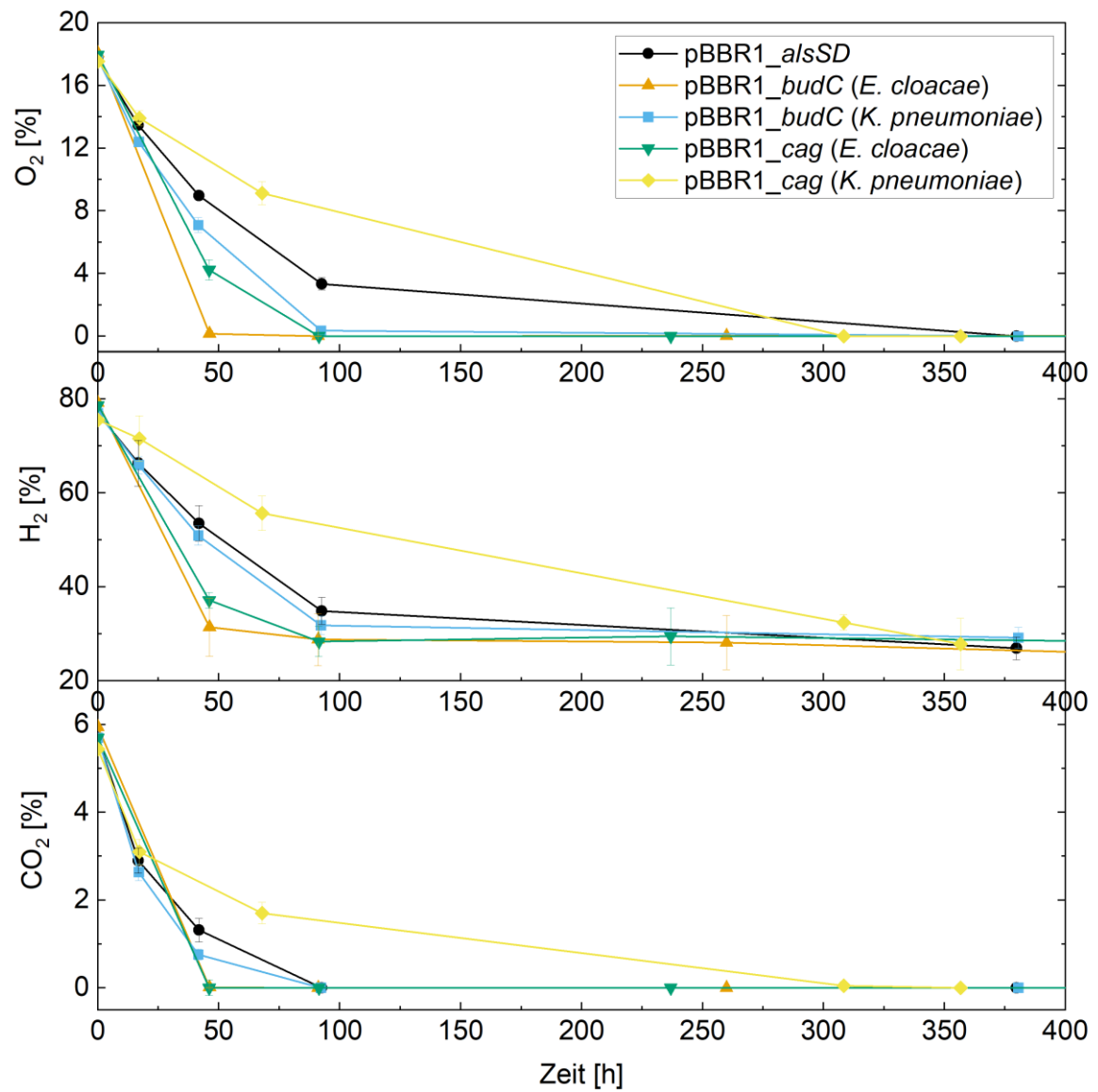
Anlage A 3: Vergleich der Produktionsplasmide unter autotrophen Bedingungen. Es werden jeweils Acetoin- und 2,3-Butandiol-Werte gezeigt, sowie die zugehörigen optischen Dichten und die Gasmessungen. Es zeigte sich eine Produktion mit dem pBBR1-Plasmid als effizienter als durch pKR.



Anlage A 4: Vergleich der *budC*-Varianten verschiedener Organismen (wie in Klammern angegeben) unter autotrophen Bedingungen. Es werden jeweils Acetoin- und 2,3-Butandiol-Werte gezeigt, sowie die zugehörigen optischen Dichten und die Gasmessungen. Es zeigte die Produktion des Stamms *budC* (*E. cloacae*) eine schnellere und größere Akkumulation an 2,3-Butandiol.



Anlage A 5: Vergleich der *budC*-Varianten verschiedener Organismen (wie in Klammern angegeben) sowie Stämmen, in denen das Cag-Gen überexprimiert wurde, unter autotrophen Bedingungen. Es werden jeweils Acetoin- und 2,3-Butandiol-Werte gezeigt, sowie die zugehörigen optischen Dichten und die Gasmessungen. Es zeigte eine Produktion des Stamms *budC* (*E. cloacae*) die schnellste und größte Akkumulation an 2,3-Butandiol aller Vergleichsstämme.



Anlage A 6: Gasverbrauch aller autotroph getesteten Produktionsstämme von *C. necator* als prozentualer Anteil der Gasphase. Der steigende Anteil an N₂, mit welchem entstehender Unterdruck ausgeglichen wurde, ist nicht dargestellt.

Anlage B:

Eingebrachte Gensequenzen*alsS*Lokus *alsS* 1716 bpOrganismus *Bacillus subtilis* PY79

Publikation: Windhorst und Gescher 2019

Sequenz:

1	ATGCTGACCA	AGGCCACCAA	GGAACAGAAG	TCGCTGGTGA	AGAACCGTGG	TGCCGAACTG
61	GTGGTGGACT	GCCTGGTGGA	ACAGGGCGTG	ACCCACGTGT	TCGGCATCCC	GGGTGCCAAG
121	ATCGACGCCG	TGTTGACGCG	CCTGCAGGAC	AAGGGTCCGG	AAATCATCGT	GGCACGCCAC
181	GAACAGAACG	CAGCCTTCAT	GGCCAGGCC	GTGGGTCCGC	TGACCCGCAA	GCCTGGCGTG
241	GTGCTGGTGA	CCTCGGGTCC	GGGAGCCTCG	AACCTGGCCA	CCGGCCTGCT	GACCGCCAAC
301	ACCGAAGGCG	ACCCGGTGGT	GGCCCTGGCA	GGCAACGTGA	TCCGTGCCGA	CCGCCTGAAG
361	CGCACCCACC	AGTCGCTGGA	CAACGCAGCC	CTGTTCCAGC	CGATCACCAA	GTACTCGGTG
421	GAAGTGCAGG	ACGTGAAGAA	CATCCCGGAA	GCCGTGACCA	ACGCCTTCCG	CATCGCCTCG
481	GCAGGCCAGG	CAGGTGCAGC	CTTCGTGTCT	TCCCCGACAG	ACGTGGTGAA	CGAAGTGACC
541	AACACCAAGA	ACGTGCGTGC	CGTGGCAGCA	CCGAAGCTGG	GTCTGCAGC	CGACGACGCC
601	ATCTCGGCAG	CCATCGCCAA	GATCCAGACC	GCCAAGCTGC	CGGTGGTGCT	GGTGGGCATG
661	AAGGTGGGCC	GTCCGGAAGC	CATCAAGGCC	GTGCGCAAGC	TGCTGAAGAA	GGTGCAGCTG
721	CCGTTCTGGG	AAACCTACCA	GGCAGCCGGC	ACCCTGTCTG	GCGACCTGGA	AGACCAGTAC
781	TTCGGTTCGCA	TCGGCCTGTT	CCGCAACCAG	CCTGGCGACC	TGCTGCTGGA	ACAGGCCGAC
841	GTGGTGCTGA	CCATCGGCTA	CGACCCGATC	GAATACGACC	CGAAGTTCTG	GAACATCAAC
901	GGCGACCGCA	CCATCATCCA	CCTGGACGAA	ATCATCGCAG	ACATCGACCA	CGCCTACCAG
961	CCGGACCTGG	AACTGATCGG	TGACATCCCG	TCGACCATCA	ACCACATCGA	ACACGACGCC
1021	GTGAAGGTGG	AATTCGCAGA	ACGCGAACAG	AAGATCCTGT	CGGACCTGAA	GCAGTACATG
1081	CACGAAGGCG	AACAGGTGCC	AGCCGACTGG	AAGTCGGACC	GTGCCCAACC	ACTGGAAATC
1141	GTGAAGGAAC	TGCGCAACGC	CGTGGACGAC	CACGTGACCG	TGACCTGCGA	CATCGGCTCG
1201	CACGCCATCT	GGATGTCGCG	CTACTTCCGC	TCGTACGAAC	CGCTGACCTT	GATGATCTCG
1261	AACGGCATGC	AGACCCTGGG	TGTGGCACTG	CCGTGGGCCA	TCGGTGCCCT	GCTGGTGAAG
1321	CCAGGCGAAA	AGGTGGTGTC	GGTGTCCGGT	GACGGTGGCT	TCCTGTTCTC	GGCCATGGAA
1381	CTGGAAGACTG	CCGTGCGTCT	GAAGGCACCG	ATCGTGCACA	TCGTGTGGAA	CGACTCGACC
1441	TACGACATGG	TGGCCTTCCA	GCAGCTGAAG	AAGTACAACC	GCACCTCGGC	AGTGGACTTC
1501	GGCAACATCG	ACATCGTGAA	GTACGCCGAA	TCGTTCCGGT	CCACTGGCCT	GCGTGTGGAA
1561	TCGCCAGACC	AGCTGGCAGA	CGTGCTGCGT	CAGGGCATGA	ACGCAGAAGG	TCCGGTGATC
1621	ATCGACGTGC	CGGTGGACTA	CTCGGACAAC	ATCAACCTGG	CCTCGGACAA	GCTGCCGAAG
1681	GAATTCGGCG	AACTGATGAA	GACCAAGGCA	CTGTAA		

alsDLokus *alsS* 768 bpOrganismus *Bacillus subtilis* PY79

Publikation: Windhorst und Gescher 2019

Sequenz:

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

cagLokus *cag* 525 bpOrganismus *Cupriavidus necator* H16

Sequenz:

1	ATGGCGCTTT	ACCAGCTCGG	CGACGTCAAG	CCCAATATCG	ACAGCGATGC	CTACGTGGCC
61	CCCGAAGCCA	CCGTCATCGG	CAACGTGACC	CTCAAGTCCC	GCGCCAGCGC	CTGGCCCGGT
121	GTCGTGATCC	GCGGCGACAA	CGAACCGATC	GTGGTGGGCG	AGGACACCAA	CATCCAGGAA
181	GGCTCGGTGC	TGCATACCGA	CCC GGCTGC	CCGCTGACCC	TGGGCGACAA	GGTCTCGATC
241	GGCCACCAGG	CCATGCTGCA	TGGCTGCACC	GTAGGCGAAG	GCTCGCTCAT	CGGGATCCAG
301	GCCGTGGTGC	TGAACCGCGC	CGTGATCGGC	AAGGAATGCC	TGGTCGGCGC	CGGTGCCGTG
361	GTGACCGAGG	GCAAGGTCTT	CCCGGACCGC	TCGCTGATCC	TGGGCGCGCC	GGCCAAGGTG
421	GTGCGCCAGC	TGACCGACGC	CGACGTGCGC	AACCTGTACC	GCAACGCCGA	GACCTACGCC
481	ACCCGCGCAGG	CCATGTACAA	GCAACAGCTC	AAGCGGATCG	GCTGA	

Eingebrachte Codon-optimierte Gensequenzen dieser Arbeit

budC aus *Klebsiella pneumoniae*

Lokus *budC* 771 bp

Organismus *Klebsiella pneumoniae* IAM1063

Sequenz:

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

Vergleich zur ursprünglichen Sequenz:

Anhang

Page 1 budC_K._pneumoniae_IAM1063

1 82
budC_K._p... ATGAAGAAGGTGGCCCTGGTGACCGGTGACGGCCAGGGCATCGGCAAGGCCATCGCCCTGCGCCTGGTGAAGGACGGCTTCG
budC_K._p... ATGAAGAAGGTGGCCCTGGTACCAGGCGCGCTCAGGGCATCGGTAAGCATTTCGCGCTGCGCCTGGTGAAGGACGGATTG
.....
83 164
budC_K._p... CCGTGGCCATCGCCGACTACAACGACGCCACCGCAAGGCCGTGGCCTCGGAAATCAACCAGGCAGGAGGCCACGCCGTGGC
budC_K._p... CCGTGGCATTGCCGATTACAACGATACCAGGCGCAAGGCCGTGGCCCGGAAATCAACCAGGACGGGGCCGGCGCTGGC
.....
165 246
budC_K._p... CGTGAAGGTGGACGTGTCGGACCGCAGCCAGGTGTTTCGAGCCGTGGAACAGGCACGCAAGACCCTGGGTGGCTTCGACGTG
budC_K._p... GGTGAAGGTGATGTCCTCCCGCCGCAACAGGTGTTTCGCGCCGTGAAACAGGCACGGTAACACTGGGTGGTTTCGACGT
.....
247 328
budC_K._p... ATCGTGAACAACGCAGGCGTGGCACCCTCGACCCCGATCGAATCGATCACCCCGAAATCGTGGACAAGGTGTACAACATCA
budC_K._p... ATCGTAACAACGCAGGCTGGCCTCCCTCACCGCATGAAAGATCGACGAGGAGACCTGATAAAGGTGTAAACATCA
.....
329 410
budC_K._p... ACGTGAAGGGCGTGATCTGGGGCATCCAGGCAGCCGTGGAAGCCTTCAAGAAGGAAGGCCACGGTGGCAAGATCATCAACGC
budC_K._p... ACGTGAAGGGCGTATCTGGGGCATCAGGCGCCGTGAGCGCTTAAAGAAAGAGGGCCACGGGGAAATCATCAACGC
.....
411 492
budC_K._p... CTGCTCGCAGGCAGGCCACGTGGGCAACCCGGAACCTGGCCGTACTCGTCTGTCGAAAGTTCGCCGTGCGTGGCCTGACCCAG
budC_K._p... CTGCTCGCAGGCAGGCACGTGGCAACCCGGAACCTGGCCGTACTCGTCTGTCGAAAGTTCGCCGTGCGTGGCCTGACCCAG
.....
493 574
budC_K._p... ACCGCAGCACGCGACCTGGCACCCTGGGCATCACCGTGAACGGCTACTGCCCTGGCATCGTGAAGACCCCGATGTGGGCAG
budC_K._p... ACCGCAGCACGCGACCTGGCACCCTGGGCATCACCGTGAACGGCTACTGCCCTGGCATCGTGAAGACCCCGATGTGGGCAG
.....
575 656
budC_K._p... AAATCGACCCGAGGTGTCGGAAGCCGAGGCAAGCCGCTGGGCTACGGCACTGCCGAATTCGCCAAGCGCATCACCCCTGGG
budC_K._p... AGATCGAATCGCAGATCTCGGAAGCGCGGGCAACCCGCTGGGCTACGGCACCGCAATTCGCCAAGCGCATCACCCCTGGG
.....
657 738
budC_K._p... TCGCCTGTGCGGAACCGAAGACGTGGCAGCCTGCGTGTCTACCTGGCCTCGCCGACTCGGACTACATGACCCGGCCAGTGC
budC_K._p... ACGCTGTGTCGAGCCGGAAGAGGTGGCGCCCTGCGTATCTAATCTGGCCAGCCCGACTCGACTAATGACCCGGCCAGTGC
.....
739 771
budC_K._p... CTGCTGATCGACGGTGGCATGGTGTCAACTAA
budC_K._p... CTGCTGATCGACGGTGGCATGGTGTCAACTAA
.....

budC aus *Klebsiella aerogenes*Lokus *budC* 771 bpOrganismus *Klebsiella aerogenes* AUH-KAM-9

Sequenz:

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

Vergleich zur ursprünglichen Sequenz:

Anhang

Page 1 budC_K._aerogenes_CP050067.1

```
1 82
budC_K._a... ATGAAGAAGGTGGCCCTGGTGACCGGTGCAGGCCAGGGCATCGGCAAGGCCATCGCCCTGCGCCTGGTGAAGGACGGCTTCG
budC_K._a... ATGAAAAAGTCGCACTTGTACCGGCGCGCGGCCCAGGGCATTGGAAAGCTATCGCGTTACGCCTCGTGAAGGACGGTTTG
.....
83 164
budC_K._a... CCGTGGCCATCGCCGACTACAACGACGTGACCGCCAAGGCCGTGGCCGACGAAATCAACCAGCACGGAGGCCGCGCCATCGC
budC_K._a... CGTGGCGATCGCCGATTACAATGACGTACAGCGAAGCCGTGGCGGATGAAATCAACCAGCACGGCGGGCCGGCATCGC
.....
165 246
budC_K._a... CGTGAAGGTGGACGTGTCGGACCGGAGCAGGTGTTTCGCAGCCGTGGAACAGGCACGCAAGACCCCTGGGTGGCTTCGAGGTG
budC_K._a... GGTCAAAGTGATGTTCGACCGTGAGCAGGTGTTTGCCCCGTGGAACAGGCCCGAAACCCTGGGCGGGATTCAAGTG
.....
247 328
budC_K._a... ATCGTGAACAACGCAGGCGTGGCACCCTGACCCCGATCGAATCGATCACCCCGAAATCGTGGACAAGGTGTACAACATCA
budC_K._a... ATCGTCAACAACGCCGGGTTGCCCCTCGACCCCTATCGAATCCATTACCCGGAGATTGTCGACAAGGTCTACAACATCA
.....
329 410
budC_K._a... ACGTGAAGGGCGTGATCTGGGGCATCCAGGCAGCCGTGGAAGCCTTCAAGAAGGAAGGCCACGGTGGCAAGATCATCAACGC
budC_K._a... ACGTTAAAGGGTGATCTGGGGGATTCAGGCCGCAGTGAGCCCCTTTAAAAAGAGCGGTCCAGGCCGGGCAAATCATCAACGC
.....
411 492
budC_K._a... CTGCTCGCAGGCAGGCCACGTGGGCAACCCGGAACCTGGCCGTGACTCGTCTGCGAAGTTCGCCGTGCGTGGCCTGACCCAG
budC_K._a... CTGTTCGCAGGCCGGCCACGTGGGCAACCCGGAACCTGGCGTCTACAGCTAAGCAAATTCGCCGTACCGGGTTACGCAA
.....
493 574
budC_K._a... ACCGCAGCACGCGACCTGGCACCGCTGGGCATCACCGTGAACGGCTACTGCCCTGGCATCGTGAAGACCCCGATGTGGGCAG
budC_K._a... ACCGCTGCCCGCACCTGGCCCCGTGGGATTACCGTAAACGGCTACTGCCCGGATTGTGAAACCCGGATGTGGGCCG
.....
575 656
budC_K._a... AAATCGACCGCCAGGTGTCGGAAGCCGCAGGCAAGCCGCTGGGCTACGGCACTGCCGAATTCGCCAAGCGCATCACCCCTGGG
budC_K._a... AGATCGATCGTCAGGTATCGAAGCGCGGTAAACCCTTGGGCTACGGACTGCCGAATTCGCCAAAGCGCATCACCCCTCG
.....
657 738
budC_K._a... TCGCCTGTCGGAACCCGGAAGACGTGGCAGCCTGCGTGTGCTACCTGGCCCTCGCCGGACTCGGACTACATGACCGGCCAGTGC
budC_K._a... CCGCTGTCTGAGCCAGAAGATGTGCCGCCTGCGTCTTATCTGCCAGCCGGATTCGATTAATGACCGGCANTCG
.....
739 771
budC_K._a... CTGCTGATCGACGGTGGCATGGTGTTCAACTAA
budC_K._a... CTGCTGATCGATGGCGGATGGTATTCAATTAA
```

budC aus *Enterobacter cloacae*Lokus *budC* 771 bpOrganismus *Enterobacter cloacae* 3849

Sequenz:

1	ATGCAAAGAG	TGGCTCTCGT	AACCGGCTCC	GGCCAGGGGA	TTGGCAAAGC	GATCGCGCTT
61	CGCCTGGTGA	AGGACGGCTT	TGCCGTCGCT	ATCGCGGATT	ACAACGAAGA	GACGGCGAAA
121	GCGGTCGCGG	ATGAGATCAC	CCGCAACGGC	GGGAAAGCCG	TCGCCGTGAA	GGTGGACGTC
181	TCTGACCGCG	ACCAGGTGTT	TGCGGCGGTG	GAAAAAGCCC	GCACTGCGCT	GGGCGGCTTC
241	AACGCCATTG	TCAATAACGC	CGGGGTGGCG	CCGTCTACCC	CTATCGAATC	CATCACGCCG
301	GAAATTGTCG	ACAAGGTCTA	CAACATCAAC	GTGAAAGGGG	TGATCTGGGG	CATTCAGGCC
361	GCGATTGACG	CGTTCCGCAA	AGAGGGGCAC	GGCGGTAAAA	TCATCAACGC	CTGCTCCCAG
421	GCGGGCCATA	CCGGCAACCC	GGAAGTGGCG	GTGTACAGCT	CCAGCAAGTT	CGCGGTGCGT
481	GGCTTAACCC	AGACCGCCGC	GCGGGATCTC	GCGCCGCTGG	GGATCACCGT	TAACGCCTAT
541	TGCCCCGGGCA	TCGTCAAAAC	GCCGATGTGG	GCGGAAATCG	ACCGTCAGGT	CTCCGAGGCG
601	GCGGGTAAAC	CGCTCGGCTA	CGGAACGGAA	ACCTTTGCCA	AACGCATCAC	GCTTGGCCGT
661	TTGTCCGAAC	CGGAAGATGT	GGCCGCCTGC	GTCTCTTACC	TCGCCGGACC	AGACTCCGAC
721	TACATGACCG	GTCAGTCGCT	GCTGATTGAT	GGTGGGATGG	TGTTCAACTA	A

Vergleich zur ursprünglichen Sequenz:

Anhang

Page 1 budC_E.cloacae_WP-063145235.1

```

1 82
budC_E.cl... ATGCAAAGAGTGGCTCTCGTAACCGGCTCCGGCCAGGGGATTGGCAAAGCGATCGCGCTTCGCCTGGTGAAGGACGGCTTTG
budC_E.cl... ATGCAAAAAGTGGCTCTCGTAACCGGCTCCGGCCAGGGGATTGGCAAAGCGATCGCGCTTCGCCTGGTGAAGGACGGCTTTG
.....

83 164
budC_E.cl... CCGTCGCTATCGCGGATTACAACGAAGAGACGGCGAAAGCGGTGCGGGATGAGATCACCCGCAACGGCGGGAAAGCCGTCGC
budC_E.cl... CCGTCGCTATCGCGGATTACAACGAAGAGACGGCGAAAGCGGTGCGGGATGAGATCACCCGCAACGGCGGGAAAGCCGTCGC
.....

165 246
budC_E.cl... CGTGAAGGTGGACGTCTCTGACCGCGACCAGGTGTTTGGCGGCGGTGGAAAAAGCCCGCACTGCGCTGGGCGGCTTCAACGCC
budC_E.cl... CGTGAAGGTGGACGTCTCTGACCGCGACCAGGTGTTTGGCGGCGGTGGAAAAAGCCCGCACTGCGCTGGGCGGCTTCAACGCC
.....

247 328
budC_E.cl... ATTGTCAATAACGCCGGGGTGGCGCCGCTACCCCTATCGAATCCATCACGCCGAAATTGTCGACAAGGTCTACAACATCA
budC_E.cl... ATGTCAATAACGCCGGGGTGGCGCCGTCACGCCATCGAATCCATCACGCCGAAATTGTCGACAAGGTCTACAACATCA
.....

329 410
budC_E.cl... ACGTGAAAGGGGTGATCTGGGGCATTACAGCCGCGATTGACGCGTTCCGCAAAGAGGGGCACGGCGGTAAAATCATCAACGC
budC_E.cl... ACGTGAAAGGGGTGATCTGGGGCATTACAGCCGCGATTGACGCGTTCCGCAAAGAGGGGCACGGCGGTAAAATCATCAACGC
.....

411 492
budC_E.cl... CTGCTCCCAGGCGGGCCATACCGGCAACCCGGAAGTGGCGGTGTACAGCTCCAGCAAGTTCGCGGTGCGTGGCTTAACCCAG
budC_E.cl... CTGCTCCCAGGCGGGCCATACCGGCAACCCGGAAGTGGCGGTGTACAGCTCCAGCAAGTTCGCGGTGCGTGGCTTAACCCAG
.....

493 574
budC_E.cl... ACCGCCGCGCGGGATCTCGCGCCGCTGGGGATCACCGTTAACGCCTATTGCCCGGGCATCGTCAAACGCCGATGTGGGCGG
budC_E.cl... ACCGCCGCGCGGGATCTCGCGCCGCTGGGGATCACCGTTAACGCCTATTGCCCGGGCATCGTCAAACGCCGATGTGGGCGG
.....

575 656
budC_E.cl... AAATCGACCGTCAGGTCTCCGAGGCGCGGGTAAACCGCTCGGCTACGGAACGGAAACCTTGCCAAACGCATCACGCTTGG
budC_E.cl... AATCGACCGTCAGGTCTCCGAGGCGCGGGTAAACCGCTCGGCTACGGAACGGAAACCTTGCCAAACGCATCACGCTTGG
.....

657 738
budC_E.cl... CCGTTTGTCCGAACCGGAAGATGTGGCCGCTGCGTCTCTTACCTCGCCGGACCAGACTCCGACTACATGACCGGTGAGTGC
budC_E.cl... CCGTTTGTCCGAACCGGAAGATGTGGCCGCTGCGTCTCTTACCTCGCCGGACCAGACTCCGACTACATGACCGGTGAGTGC
.....

739 771
budC_E.cl... CTGCTGATTGATGGTGGGATGGTGTCAACTAA
budC_E.cl... CTGCTGATTGATGGTGGGATGGTGTCAACTAA
.....
```