Schlussbericht

zum Vorhaben

Thema:

Erstellung eines Syngas-basierten Fermentations-prozesses für Isopren: Ein high-value chemischer Building Block für Polymere und Jetfuel

Zuwendungsempfänger:

Dr. Stefan Jennewein
Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie (Aachen)

Förderkennzeichen:

22027711

Laufzeit:

01.08.2012 bis **31.07.2012**

Monat der Erstellung:

10/2015

Gefördert durch:

Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft

aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages mit Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) über die Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR) als Projektträger des BMEL für das Förderprogramm Nachwachsende Rohstoffe unterstützt. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

Abschlussbericht

„Erstellung eines Syngas-basierten Fermentationsprozesses für Isopren: Ein high-value chemischer Building Block für Polymere und Jetfuel“

Inhaltsverzeichnis

I. Ziele 2
1. Aufgabenstellung 4
2. Stand der Technik 5
3. Zusammenarbeit mit anderen Stellen 5
II. Ergebnisse 6
1. Erzielte Ergebnisse 6
a. Einleitung 6
b. Zielsetzung 11
c. Ergebnisse 12
d. Zusammenfassung 35
e. Literatur 37
f. Arbeitspakete und Meilensteine 40
2. Verwertung 42
3. Erkenntnisse von Dritten 43
4. Veröffentlichungen 43

Schlussbericht

I. Ziele

Bedingt durch die Verknappung fossiler Energievorkommen und der damit einhergehenden Verteuerung wird die Nutzung alternativer Energieträger notwendig. Während elektrische Energie über eine Vielzahl regenerierbarer Quellen gewonnen werden kann, stellt die Nutzung der Biomasse den alleinigen Zugang zu nicht-fossilen Kohlenstoffverbindungen dar. Die Biomasse ist jedoch ein äußerst heterogenes Material aus zumeist biologisch schwer abbaubaren Verbindungen, wie z.B. Lignocellulose. Zudem fällt die Biomasse oftmals dezentral mit hohem Wassergehalt und saisonalen Schwankungen an, was sich in langen und kostenintensiven Transportwegen widerspiegelt. Aktuelle enzymatische Verfahren werden der Heterogenität der anfallenden Biomasse häufig nur unzureichend gerecht, dies spiegelt sich in hohen Kosten und geringer Effizienz dieser Verfahren wider. Im Gegensatz hierzu repräsentieren thermochemische Verfahren wie die Vergasung der Biomasse heute gut entwickelte und effiziente Verfahren. Das hierbei anfallende Syngas (CO_2, CO und H_2) ist zudem eine gut handhabbare Plattform für eine weitere Verarbeitung bzw. chemische, energetische und biotechnologische Nutzung. Technologien zur Gasreinigung und Konditionierung sind gut entwickelt und verfügbar, werden aber bei einer fermentativen Nutzung nicht benötigt, da die hierbei verwendeten Mikroorganismen eine hohe Toleranz gegenüber Schwefelverbindungen und Stickoxiden besitzen. Daher stellt die biotechnologischen Nutzung des Syngases eine besonders attraktive Verwendung des aus Biomasse erzeugten Syngases dar. Verschiedene anaerobe Mikroorganismen wie z. B. *Clostridium ljungdahlii*, *C. autoethanogenum*, *Eubacterium limosum*, *Butyribacterium methylotrophicum, Moorella thermoautotrophica* etc. besitzen mittels des Wood-Ljungdahl-Biosynthesewegs die Fähigkeit der effizienten Nutzung von Kohlendioxid und Kohlenmonoxid als C-Quelle. Einige dieser Organismen wie z.B. *C. ljungdahlii* und *C. autoethanogenum* setzen Syngas äußerst effizient in Ethanol und Acetate um.

Im Vergleich zur chemischen Umsetzung (Fischer-Tropsch Verfahren) verwenden die genannten Organismen neben dem Kohlenmonoxid auch das CO_2 und sind zudem relativ anspruchslos in Hinblick auf das verwendete Verhältnis der beiden Verbindungen. Die Umsetzung von Syngas oder auch von Kuppelgas (einem Nebenprodukt der Stahlgewinnung) erscheint als ökonomisch aussichtsreich und wird von mehreren Firmen bereits im Pilotmaßstab erprobt. So kündigte z.B. die Firma IneosBio den Bau einer auf Biomasse-basierten Syngas-Fermentationsanlage mit der Kapazität von bis zu 8 Million Gallonen Ethanol pro Jahr an. Mittels Metabolic Engineering sollten in dem

abgeschlossenen Vorhaben die Möglichkeit der Nutzung von Synthesegas als C-Quelle in Richtung höherwertiger chemischer Produkte erweitert werden. Im Besonderen beabsichtigte das Vorhaben, das durch Vergasung von Biomasse gewonnene Syngas in das Hemiterpene Isopren (2-Methyl-1,3-butadien, C_5H_8) biotechnologisch zu überführen. Isopren dient als etablierte Plattformchemikalie für die Herstellung verschiedener Polymere, im Besonderen von Elastomeren, welche im Bereich Motorenbau, Medizintechnik, Golfbällen, Schuhe etc. Anwendung finden: Vor allem aber wird Isopren als Monomer für die Herstellung von *cis*-Polyisopren bzw. von synthetischer Gummi benötigt. Eine weitere attraktive Verwendung des Isoprens ist der Einsatz in der Herstellung von alternativen Jetfuel (Kerosin). Seit Beginn des 19ten Jahrhunderts wurden mehrere chemische Syntheserouten zum Isopren entwickelt. Eine der ersten Syntheserouten war hier die Aceton/Acetylen-Route, welche in Deutschland während des Ersten Weltkriegs entwickelt wurde. Eine Gemeinsamkeit aller synthetischen Routen ist jedoch die Verwendung von fossilem Rohöl als Grundstoff und der extrem hohe energetische Aufwand der Synthese. Begründet auf den sehr hohen Energieeinsatz der Syntheseverfahren wird heute der Großteil an Isopren durch Extraktion und anschließender Destillation aus Olefin-Crackerfraktionen (Steamcracking) gewonnen. Bedingt durch Anlagenstillegungen (z.B. der Royal Dutch Shell Pernis Isopren Unit in 2009), der Abnahme von C_5 Fraktionen aus Steamcrackern durch veränderte Rohstoffverwendung, sowie eine Abnahme in der Bereitstellung von natürlichem Kautschuks, wird mit einem sehr stark steigenden Nachfrage nach Isopren in den kommenden Jahren gerechnet. Absolut gesehen stellt die pflanzliche Synthese die mit Abstand größte Menge an produziertem Isopren dar, jedoch scheidet eine industrielle Nutzung dieser aus praktikablen Gründen aus.

Neben der pflanzlichen Produktion ist auch bekannt, dass Mikroorganismen, wie z.B. *Bacillus amyloliquefaciens* Isopren synthetisieren können. Auch konnte durch die heterologe Expression der Isopren-Synthase aus Pappel (*Populus alba*) die prinzipielle Isopren-Produktion in *E. coli* gezeigt werden. Aufbauend auf diesen Resultaten startete die Firmen Genencor und Goodyear Tire & Rubber Company (beide USA) die Entwicklung eines rekombinanten *E. coli* Stamms zur Isopren-Fermentation. Das so gewonnene Isopren soll für die Herstellung von *cis*-Polyisopren und somit für Autoreifenproduktion verwendet werden. Mit Hilfe der durch Metabolic Engineering erhaltene *E. coli* Stämmen konnten angeblich schon Isopren-Titer von bis zu 100 g/l erzielt werden (Firma Genencor, Pablo Alto, USA). Im Gegensatz zu dem vorliegenden Projekt, verwendeten die Firmen Genencor/Goodyear jedoch Glucose als Kohlenstoffquelle, welches in direkter Konkurrenz zu Lebensmittelanwendungen steht. Im vorliegenden Projekt wurde jedoch die Verwendung von Syngas (bzw. von CO_2 und/oder Kohlenmonoxid) als Kohlenstoffquelle verfolgt, welches mittels rekombinanter Clostridien zu Isoprene umgesetzt wurde. Der verfolgte, bzw. realisierte Ansatz der Verwendung von Synthesegas als Kohlenstoffquelle ermöglicht nun die Nutzung einer sehr breiten

Masse an Rohstoffen insbesondere von verschiedenster Arten von Biomasse. Mittels der Vergasung können unterschiedliche Rohstoffe effizient und kostengünstig in ein homogenes Gas überführt werden, welches dann für die Fermentation genutzt werden kann.

Bis heute wurde Metabolic Pathway Engineering Ansätze nur in einem sehr geringen Umfang mit strikt anaeroben, acetogenen Mikroorganismen durchgeführt. Ziel des Vorhabens war es somit, aufbauend auf der Fähigkeit dieser Organismen Kohlendioxid effizient in Acetyl-CoA zu fixieren, dieses weiter für die Biosynthese von Isopren zu nutzen. In einem ersten Schritt soll zunächst im Rahmen des hier durchgeführten Projekts ein sogenanntes „Proof-of-Concept" erbracht werden. Mittels Metabolic Engineering sollte die Isopren-Synthase in das Genom von *C. autoethanogenum* oder *C. ljungdahlii* (beide Organismen unterscheiden sich nur geringfügig) eingebracht werden und die Bildung von Isopren auf Basis von Syngas gezeigt werden. In einem zweiten Schritt sollte dann zur Verbesserung der Isopren-Fermentation die heterologe Überexpression des Mevalonat-Wegs erfolgen.

1. Aufgabenstellung

Die Konversion des aus Biomasse gewonnenen Syngases soll durch anaerobe Fermentation mittels rekombinanter durch Metabolic Engineering erstellter Clostridien Stämme erfolgen.
Der Arbeitsplan für das auf drei Jahre geplante Vorhaben unterteilte sich in vier Arbeitspakete:
Arbeitspaket 1 befasste sich mit der heterologen Expression der Isopren-Synthase in *C. ljungdahlii (*ursprünglich sollte hierfür *C. autoethanogenum* verwendet werden, jedoch stellte sich im Laufe des Projektes eine bessere Eignung des nahen Verwandten *C. ljungdahlii* heraus). Hierfür sollte das für die Expression in Clostridien Codon-optimierte Gen in das Genom von *C. ljungdahlii* integriert werden. Die genomische Integration sollte mittels der in der Arbeitsgruppe entwickelten Transposase-Technologie erfolgen. Stämme mit integriertem Transgen sollten dann bezüglich des Orts der Isopren-Synthase Integration charakterisiert werden und die heterologen Expression mittels Targeted Proteomics sichergestellt werden.
Arbeitspaket 2 verfolgte die Fermentation des in Arbeitspaket 1 erstellten rekombinanten Clostridien Stamms auf Basis von Syngas als C-Quelle und der Etablierung einer geeigneten Probennahme-Methode für die qualitative und quantitative Analyse mittels GC/MS.
In Arbeitspaket 3 sollte dann zur Steigerung der Isopren-Mengen neben der Isopren-Synthase zudem der Mevalonat-Biosyntheseweg zur verbesserten Bereitstellung des Substrats Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) erfolgen. Abschließende sollte dann in **Arbeitspaket 4** analog zu Arbeitspacket 2 wiederum die Syngas basierte Fermentation des erhaltenen rekombinanten Clostridium Stamm mit Genom-integrierten Mevalonat-Biosyntheseweg und pflanzlicher Isopren-Synthase erfolgen.

2. Stand der Technik

Bei Projektstart (2012) wurde von mindestens drei Firmen (Coskata, IneosBio und LanzaTech) versucht Syngas-basierte Fermentationsprozesse zur Produktion von Ethanol zu kommerzialisieren. Alle drei Unternehmungen verwendeten hierfür wild-typ Clostridien Stämme, vermutlich bzw. bekanntermaßen *C. autoethanogenum* (LanzaTech). Als Quelle für das Syngas verwenden die Firmen Coskata und IneosBio Syngas erhalten aus der Vergasung von Biomasse, die Firma LanzaTech verwendete hingegen Konvertergase, welche als Nebenprodukte der Stahlherstellung anfallen. Laut den Unternehmen Coskata und IneosBio, setzte Coskata für die Biomassevergasung einen Plasmavergaser und die Firma IneosBio einen Festbettvergaser ein. Diese Verfahren zur thermochemischen Umsetzung von organischen Materialien wie z.B. Biomasse in Synthesegas waren gut etabliert und erreichen bekanntermaßen eine hohe Effizienz. Das Metabolic Engineering von acetogenen Clostridien wurde mit Ausnahme einer damals kürzlich erschienenen Arbeit, welche sich mit der Herstellung von Butanol in *C. ljungdahlii* befasste, noch nicht weiter beachtet (Köpke *et al*., 2010), obwohl schon eine Reihe von naheliegenden und kommerziell interessanten Produkte wie z.B. Isopren existierten.

3. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Eine Zusammenarbeit mit anderen Stellen wurde im Rahmen des vorliegenden Projektes nicht gefördert.

II. Ergebnisse

1. Erzielte Ergebnisse

a. Einleitung

Die Diskussion um den Klimawandel hat die Erforschung neuer, regenerativer Technologien stark in den Focus gerückt. So wird beispielsweise auf die biotechnologische Nutzung von photosynthetischen Mikroorganismen gerne verwiesen (Lindblad *et al.* 2012). Auch hier treten allerdings Probleme der Wirtschaftlichkeit auf. So bedarf es z.B. großflächiger Anlagen, die einen hohen Wasserbedarf aufweisen, um Algen effizient für die CO_2-Fixierung nutzen zu können. Viele biotechnologische Prozesse wie zum Beispiel die Produktion von Amorphadienen in Hefe (Westfall *et al.* 2012) oder Isopren in *E. coli* (Yang *et al.* 2012) demonstrieren zwar große Potentiale biotechnologischer Prozesse, diese stehen aber durch Verwendung von Glucose oder anderen Zuckern immer in Konkurrenz zu Nahrungsressourcen (Munasinghe and Khanal 2010).

Eine Alternative hierzu könnte die Syngasfermentation sein. Synthesegas, kurz Syngas, ist zum Großteil eine Mischung aus den Komponenten Kohlenmonoxid (CO), Kohlendioxid (CO_2) und Wasserstoff (H_2), hierbei ist allerdings das genaue Verhältnis der einzelnen Stoffe zueinander nicht definiert, da es stark je nach Entstehungsart und –quelle variiert (Bengelsdorf *et al.* 2013). Der große Vorteil von Syngas ist, dass es von verschiedenen Quellen aus synthetisiert werden kann, einschließlich natürlichem Gas, Kohle, Biomasse oder anderen Kohlenwasserstoffverbindungen (Latif *et al.* 2014). Im Jahr 2010 lag der globale Ausstoß von Syngas bei 70817 Megawatts thermal (MW_{th}), produziert von 144 Fabriken. Davon stammen alleine 51 % aus Kohleabgasen und 0,5 % aus der Vergasung von Biomasse und Abfall.[2] Dies zeigt ein großes Potential an ungenutzten Kohlenstoffen, die in der Industrie anderweitig genutzt werden könnten. Außerdem würde die Verwendung dieser Gase durch Fermentation auch dazu führen, dass weniger CO und CO_2 in die Atmosphäre abgegeben wird.

Im Klimawandel sind Treibhausgase ein großes Problem, ein Hauptbestandteil hiervon ist CO_2. Bei dem diesjährigen Klimagipfel in Paris wurde beschlossen, die Klimaerwärmung auf mindestens 2°C zu reduzieren, ein wichtiger Teil hiervon ist es, den Ausstoß von Treibhausgasen drastisch zu reduzieren.[3] In der Syngasfermentation lässt sich dieses Gas (CO, CO_2 und H_2) als Kohlenstoff- und Energiequelle für Mikroorganismen nutzen und durch genetische Manipulation signifikante Mengen an gewünschten Chemikalien produzieren. So werden zur Zeit schon von drei Firmen (Coskata,

[2]https://www.netl.doe.gov/File%20Library/Research/Coal/energy%20systems/gasification/worldwide%20database/2010_Worldwide_Gasification_Database.pdf

[3] http://www.zeit.de/thema/klimagipfel-2015

INEOS Bio, LanzaTech) Syngasfermentationen zur Herstellung von Biofuel verwendet (Bengelsdorf *et al.* 2013). Die Firma LanzaTech z.B. berichtet, dass sie mit Hilfe des Acetogenen Stammes *Clostridium autoethanogenum*, der durch Stammoptimierung ein verbessertes Wachstum auf Syngas aufweist, Ethanol im Industriemaßstab gewinnt (Mock *et al.* 2015) und im Jahr 2012 in einer Demoanlage in China 300t Ethanol herstellen konnten.[4]

Die Fixierung von CO/CO_2 in den Mikroorganismen erfolgt durch den Wood-Ljungdahl-Biosyntheseweg (Wood 1991) (Abb. 1), der in verschiedenen acetogenen Bakterien, wie z.B. *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium autoethanogenum*, *Eubacterium limosum*, *Butyribacterium methylotrophicum* und *Moorella thermoautotrophica* vorkommt (Köpke *et al.* 2011, Lynd *et al.* 1982, Roh *et al.* 2011). Der Wood-Ljungdahl-Biosyntheseweg, bestehend aus einem Cluster an mehreren Proteinen (CO Dehydrogenase, Acetyl-CoA-Synthase, Format-Dehydrogenase, Formyl-THF-Synthase, Methenyl-THF-Cyclohydrogenase, Methylen-THF- Dehydrogenase, Methyen-THF-Reductase, Methyltransferase), nutzt gezielt CO und CO_2 mit H_2 um diese bis zu Acetyl-Co umzusetzen (Ragsdale and Pierce 2008).

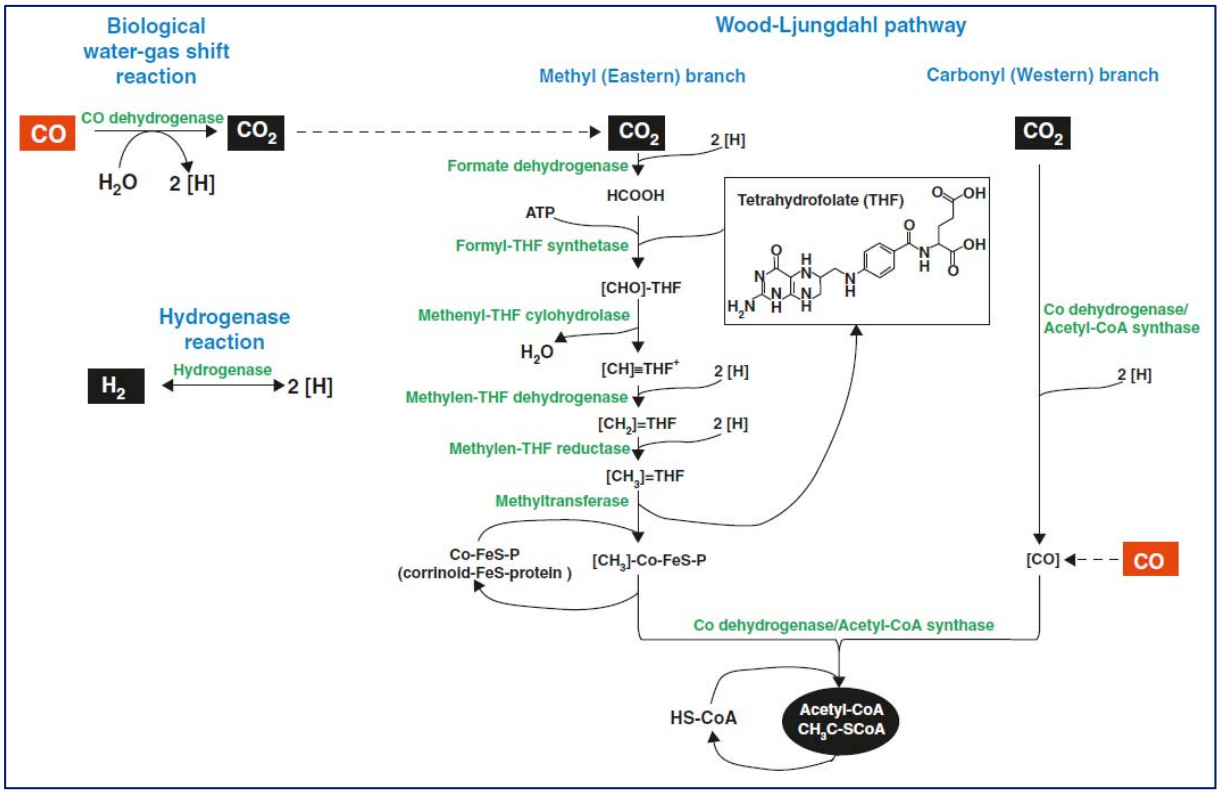

Abb. 1: Darstellung des Wood-Ljungdahl-Biosyntheseweg in *Clostridium ljungdahlii*. Der Wood-Ljungdahl-Weg ermöglicht die Fixierung von CO, bzw. CO_2 zu Acetyl-CoA. Er setzt sich aus folgenden Enzymen zusammen: CO Dehydrogenase, Acetyl-CoA-Synthase, Format-Dehydrogenase, Formyl-THF-Synthase, Methenyl-THF-Cyclohydrogenase, Methylen-THF-Dehydrogenase, Methyen-THF-Reductase, Methyltransferase (Abbildung aus Köpke *et al.* 2011).

[4] http://www.lanzatech.com/facilities/

Einer der am besten biotechnologisch erforschten CO/CO_2-Verwerter ist *C. ljungdahlii*, dessen Stoffwechsel Acetat und Ethanol als Endprodukte produziert (Cotter *et al.* 2009). *Clostridium ljungdahlii* ist ein homoacetogenes, grampositives Bakterium, das aus Hühnerexkrementen isoliert, erstmals 1993 beschrieben wurde (Tanner *et al.* 1993). Es ist mit einer Länge von 2-3 µm stäbchenförmig, peritrich begeißelt und kann auf verschiedenen Kohlenstoffquellen wie z.B. CO, CO_2/H_2, Arabinose, Xylose, Fruktose aber auch Ethanol wachsen. Als anaerober Organismus hat es nur eine geringe Sauerstofftoleranz (Tanner *et al.* 1993). Durch das Einbringen von drei zusätzlichen Genen (*thlA*, *bdhA* und *adhE*) konnte bereits die Produktion von Butanol demonstriert werden (Köpke *et al.* 2011).

Nach der Herstellung von Butanol (einem C_4-Körper) in diesem Organismus (Köpke *et al.* 2010) stellt die Produktion von C_5-Körpern den nächsten Schritt für die biotechnologische Nutzung von *C. ljungdahlii* dar. Unter den C_5-Körpern hat Isopren einen hohen industriellen Wert; Isopren (2-Methyl-1,3-butandien, C_5H_8) ist ein Hemiterpen (Terpen mit 5 C-Atomen), bildet die Grundeinheit der Terpene und hat einen Siedepunkt von 34°C. Diese kurze Kohlenstoffverbindung stellt eine Ausgangsverbindung für eine Reihe von Polymeren dar, wie z.B. Polyisopren, welches in der Herstellung von Autoreifen oder Latexhandschuhen Anwendung findet (Hess *et al.* 2013). Eine weitere attraktive Verwendung des Isoprens wäre der Einsatz in der Herstellung von alternativem Biofuels (Lindberg *et al.* 2010). Isopren wird im großtechnischen Maßstab (> 1,5 Mio/Jt) auf Basis von Steamcracking-Prozessen aus den petrochemischen Grundstoffen Naphthan oder Gasöl gewonnen (Weissermel and Arpe 1998).
In der Natur haben Pflanzen wie *Populus alba* hohe Isoprenemissionen von im Schnitt 30 nmol/m*s (Wiberley *et al.* 2008), die weltweit im Bereich von Teragramm pro Jahr liegen (Sharkey *et al.* 2013). Zum einen wird die Umsetzung von DMAPP (Dimethylallyldiphosphat) zu Isopren und Diphosphat durch die Isopren-Synthase (IspS) katalysiert (Abb. 2), welche allerdings bisher nur in Pflanzen gefunden wurde. Emission von Isopren wird aber auch bei Bakterien beobachtet (*Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Agrobacterium, Pseudomonas*) und Studien an Säugetieren belegen ebenfalls dessen Bildung (Jones and Rasmussen 1975, King *et al.* 2012, Kuzma *et al.* 1995). Im Gegensatz zu den Pflanzen konnte bei den Isopren-produzierenden Bakterien bisher allerdings kein Enzym gefunden werden, dass die Reaktion von DMAPP zu Isopren katalysiert.
In Mikroorganismen konnte bereits durch das Einbringen der Gene einer Isopren-Synthase (meist aus *Populus alba* oder *Pueraria montana* „kudzu“) die Isoprenproduktion gesteigert werden, allerdings wurden hier auch nur geringe Mengen Isopren produziert (Miller *et al.* 2001). Um dies zu steigern wurden zusätzlich noch Proteine des MEP- (Methylerythritolphosphatweg) oder MVA-Biosynthesewegs (Mevalonat-) mit in die Organsimen eingebracht, da diese beiden Biosynthesewege die Produktion von DMAPP deutlich zu steigern.

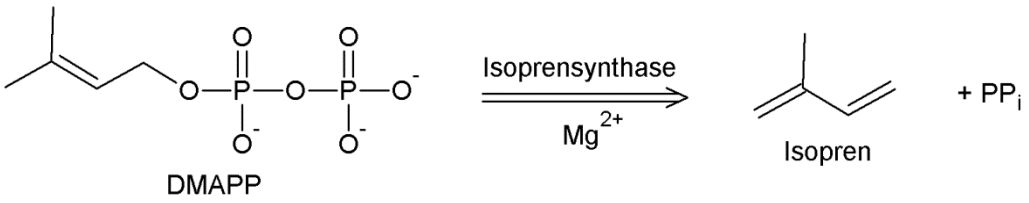

Abb. 2: Katalyse der Reaktion DMAPP zu Isopren durch die Isoprensynthase nach Silver und Fall, 1995. Diese Reaktion erfolgt unter Abspaltung einer Phosphatgruppe (PPi).

Nach der Fixierung der Kohlenstoffquelle in Acetyl-CoA bzw. Pyruvat können diese Verbindungen entweder über den MVA- (Mevalonat-) oder den MEP-Biosyntheseweg (Methylerythritolphosphatweg) zu DMAPP (Dimethylallyl-Diphosphat) umgewandelt werden (Abb.3). Der MVA-Biosyntheseweg kommt hauptsächlich bei Eukaryoten, Archaeen und im Cytosol höherer Pflanzen vor, während der MEP-Biosyntheseweg bei Bakterien, Grünalgen und in den Chloroplasten der Pflanzen genutzt wird (Kuzuyama 2002). So sind Bakterien wie *Clostridium ljungdahlii* in der Lage Pyruvat über den MEP-Biosyntheseweg bis hin zu IPP und DMAPP umzuwandeln und Substrat der Isoprene-Synthase zur Verfügung zu stellen.

Am MVA-Biosyntheseweg sind die folgenden Proteine beteiligt: Acetyl-CoA-Acetyl-Transferase (AtoB), Hmg-CoA-Synthase (HmgS), Hmg-CoA-Reduktase (HmgR), Mevalonatkinase (MVK), Phosphomevalonat-Kinase (PMK), Phosphomevalonat-Dekarboxylase (PMD), IPP-Isomerase (IDI). Durch Einbringen einer Isoprensynthase müsste *C. ljungdahlii* in der Lage sein, deutlich höhere Isopren-Mengen als der Wildtyp zu bilden.
Der MEP-Biosyntheseweg setzt sich aus folgenden Enzymen zusammen: Deoxyxylulose-5-Phosphat-Synthase (Dxs), Deoxyxylulose-5-Phosphat-Reductoisomerase (Dxr), Diphospho-cytidylyl-Methylerythritol-Synthase (IspD), Diphosphocytidylyl-Methylerythritol-Kinase (IspE), Methyl-Erythritol-2,4-Cyclophosphat-Synthase (IspF), Hydroxymethylbutenyl-Diphosphat-Synthase (IspG), Hydroxymethylbutenyl-Diphosphat-Reductase (IspH), IPP-Isomerase (Ipi).

Yang *et al*. konnten 2012 zeigen, dass sie bis zu 6,3 g/L Isopren nach einer 40 h Kultivierung von gentechnisch veränderten *Escherichia coli* auf Glucose-Basis produzieren konnten. Neben *E. coli* wurden auch Cyanobakterien und *Saccharomyces cerevisiae* für die Isoprenproduktion getestet. Im Cyanobakterium *Synechocystis* wurden ~50 µg Isopren pro g Trockengewicht pro Tag in einer

lichtabhängigen Produktion erreicht (Lindberg *et al.* 2010). Hingegen konnten in *S. cerevisiae* 500 µg/L Isopren in 72 h mit 2 % Galactose als C-Quelle produziert werden (Hong *et al.* 2012).

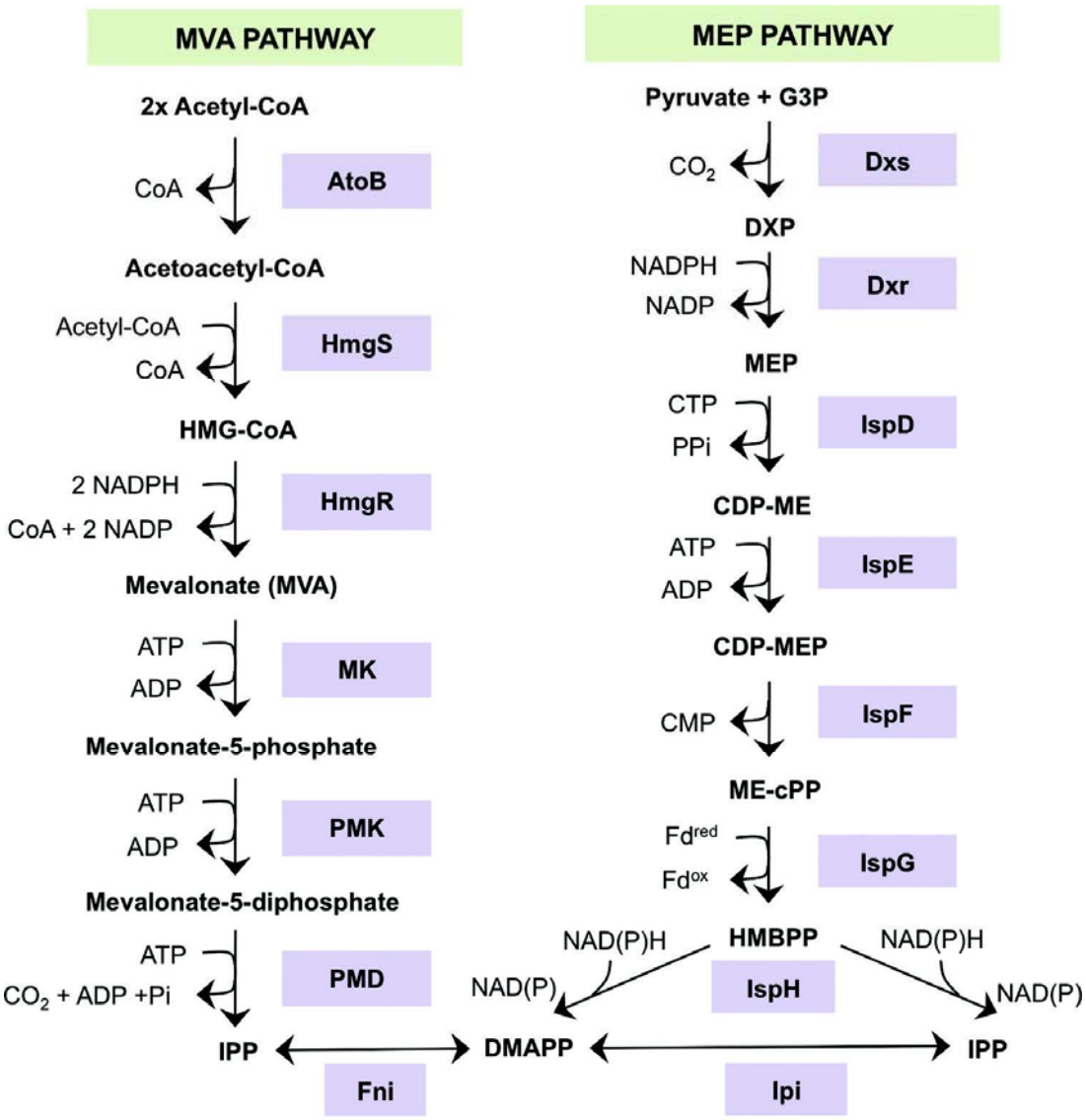

Abb. 3: Vergleich des MVA- und MEP-Stoffwechselwegs. Die Umwandlung von Acetyl-CoA, bzw. Pyruvat zu DMAPP (Dimethylallyl-Diphosphat) erfolgt entweder über den MVA- (Mevalonat-) oder den MEP-Biosyntheseweg (2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway/non-mevanolate pathway). MVA-Biosyntheseweg: AtoB, Acetyl-CoA-Acetyl-Transferase; HmgS, Hmg-CoA-Synthase; HmgR, Hmg-CoA-Reduktase; MK, Mevalonatkinase; PMK, Phosphomevalonat-Kinase; PMD, Phosphomevalonat-Decarboxylase; Fni, IPP-Isomerase. MEP-Biosyntheseweg: Dxs, Deoxyxylulose-5-Phosphat-Synthase; Dxr, Deoxyxylulose-5-Phosphat-Reductoisomerase; IspD, Diphosphocytidylyl-Methylerythritol-Synthase; IspE, Diphosphocytidylyl-Methylerythritol-Kinase; IspF, Methyl-Erythritol-2,4-Cyclophosphat-Synthase; IspG, Hydroxymethylbutenyl-Diphosphat-Synthase; IspH, Hydroxymethylbutenyl-Diphosphat-Reductase; Ipi, IPP-Isomerase; IspS, Isopren-Synthase (Bentley et al. 2014).

b. Zielsetzung: Syngas-basierte Produktion von Isopren in *Clostridium ljungdahlii*

Ziel des Vorhabens war die Erzeugung von rekombinante Clostridien-Stämme für die Syngas-basierte Isopren-Fermentation. Die Nutzung von Syngas als Kohlenstoffquelle für rekombinante Mikroorganismen birgt ein großes, aber nur in Ansätzen und bei weitem noch nicht ausgenutztes Potential in sich. Metabolic Engineering Ansätze wurden nur in einem sehr geringen Umfang mit obligat anaeroben, acetogenen Mikroorganismen durchgeführt (Köpke *et al.* 2011). Das Projekt baute somit auf der Fähigkeit von *C. ljungdahlii* auf, Kohlendioxid und Kohlenmonoxid effizient in Acetyl-CoA zu fixieren und dieses weiter für die Biosynthese von Isopren zu nutzen. In einem ersten Schritt sollte die Isopren-Synthase aus *Populus alba* in das Genom von *C. ljungdahlii* eingebracht und die gesteigerte Bildung von Isopren in Syngasfermentationen gezeigt werden. In einem zweiten Schritt sollte dann die Isopren-Produktion durch die heterologe Expression des Mevalonat-Biosyntheseweges zusätzlich zur IspS in *C. ljungdahlii* erhöht werden.

c. Ergebnisse

Test/Auswahl von Syngas verwertenden Organismen

Es existieren verschiedene Syngas-fermentierende Mikroorgansimen aus unterschiedlichen Gattungen, wie z.B. *Clostridium autoethanogenum*, *Eubacterium limosum*, *Butyribacterium methylotrophicum* und *Moorella thermoautotrophica.*

Bekannte Syngas-verwertende Mikroorganismen sind unter anderem *C. ljungdahlii* und *C. autoethanogenum,* die nahezu identisch sind; sie besitzen dieselbe 16S-rRNA und unterscheiden sich in ihren Genomsequenzen nur um etwa 1 % (Bruno-Barcena *et al.* 2013). Das Genom der beiden ist vollständig sequenziert (Bruno-Barcena *et al.* 2013, Köpke *et al.* 2010). Die beiden Stämme wurden bei der DSMZ bestellt (*C. ljungdahlii* DSM-13528; *C. autoethanogenum* DSM-10061) und anschließend in ATCC1754-Medium mit Zugabe von 0,5 % Fructose kultiviert und auf ihr Wachstumsverhalten hin untersucht. So zeigt sich bei Kultivierung auf Fructose als Kohlenstoffquelle, dass *C. autoethanogenum* nur eine OD_{600} von ca. 1 annimmt, während *C. ljungdahlii* eine OD_{600} von über 2,1 erreicht (Abb. 5). Für die weiteren Versuche wurde *C. ljungdahlii* ausgewählt, da es das beste Wachstum unter den getesteten Bedingungen aufwies und zu dem Zeitpunkt auch bereits eine Transformationsmethode publiziert war.

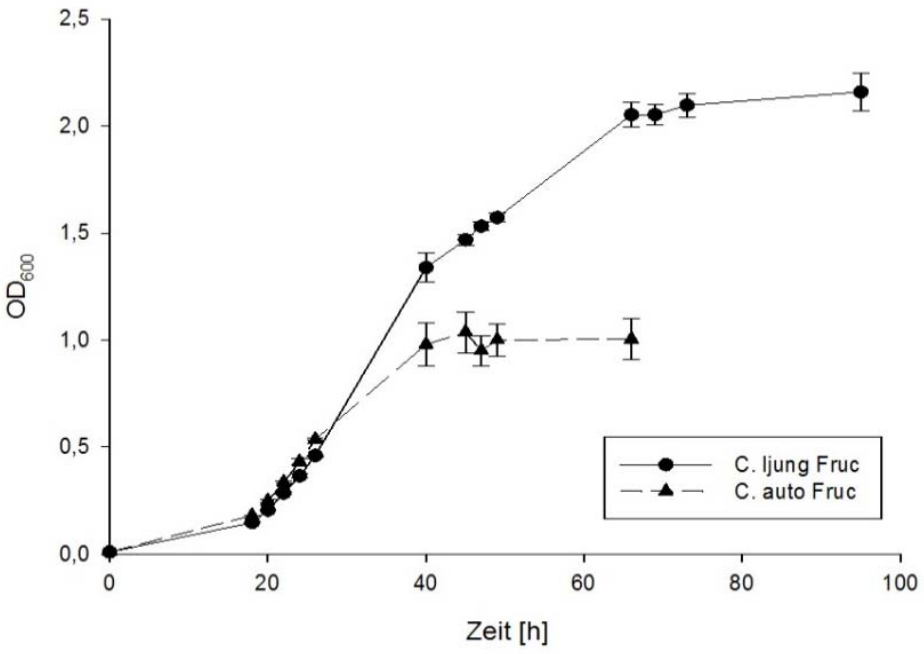

Abb. 5: Wachstumskurve zum Vergleich von *C. ljungdahlii* und *C. autoethanogenum*. Beide Kulturen wuchsen auf ATCC1754-Medium mit 0,5 % Fructose versetzt. *C. ljungdahlii* (●) und *C. autoethanogenum* (▲) wurden in Serumflaschen bei 37°C kultiviert. Es wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Targeted Proteomics – Methode zum Peptidnachweis

Herkömmliche Methoden wie SDS-Gelelektrophorese und Western-Blot waren lange Zeit die Methoden der Wahl, um in Geweben oder Zellkulturen die (Über-)Expression einzelner Proteine nachzuweisen. Problematisch gestaltet sich eine Methode basierend auf Immunmarkierung u.a. dadurch, dass sie schlecht quantifizierbar ist, außerdem müssten einige spezifische Antikörper hergestellt und getestet werden, was sehr arbeits-, zeit- und kostenaufwendig wäre. Eine Alternative bietet die Methode „Targeted Proteomics“ (TP), welche von der Zeitschrift „Nature Methods“ zur Methode des Jahres 2012 ausgezeichnet wurde.[5] Beim TP werden die Peptidfragmente einer mit Trypsin verdauten Probe über Flüssigkeitschromatographie aufgetrennt und über ein Tandem Massenspektrometer im sogenannten „Multiple Reaction Monitoring“-Modus Peptid-spezifische Übergänge zur eindeutigen Identifizierung herangezogen (Abb. 6). Neben der qualitativen Analyse der verschiedenen Zielpeptide in einem Analyselauf erlaubt diese Methode außerdem die absolute Quantifizierung der Peptide durch den Gebrauch synthetischer, interner Standardpeptide mit $^{13}C/^{15}N$ Markierung.

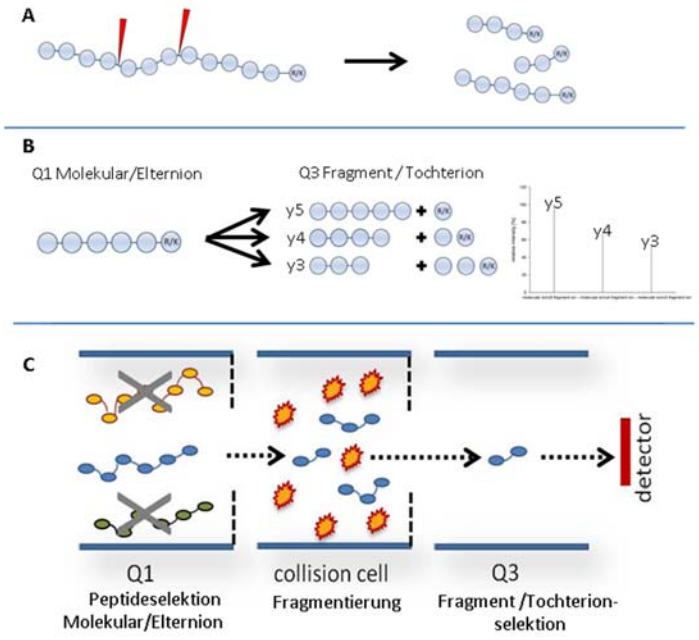

Abb. 6: Schema der Methodenentwicklung. A – *In silico* tryptischer Verdau der Ziel-Proteinsequenz. B – Prognose der „mass transitions“ für Massenspektrometrieanalysen im MRM Modus (gezeigt in C) C – Schema des MRM Modus der Tandemmassenspektrometrie. Selektion der doppelt geladenen Peptidionen (Molekular/Elternionen) im Quadrupol 1, Fragmentierung in der Kollisionszelle („collision cell“) und Selektion der einfachgeladenen Fragmente/Tochterionen im Quadrupol 3.

[5] http://www.nature.com/nmeth/journal/v10/n1/full/nmeth.2329.html

Für die Analyse von Zielproteinen in dem biologischen Organismus ist es notwendig proteotypische Peptide zu bestimmen. Proteotypische Peptide werden ausgewählt durch die Signalintensität in der Analyse (zeigt die maximale Sensitivität eines Zielpeptids) und die Einmaligkeit der Peptidsequenz in dem gewählten Expressionssystem für rekombinante Produkte, beziehungsweise im Proteom des Organismus für interne Organismus-Kontrollen. Die Methodenentwicklung für jedes Ziel-Protein beginnt mit dem *in silico* tryptischen Verdau des Proteins. Jedes Peptid mit einer Größe von mindestens sechs Aminosäuren (vorhergesagt durch den theoretischen Verdau) bis hin zu 16 Aminosäuren (Größenlimitierung für die massenspektrometrische Analyse) wird für das sogenannte proteotypische Peptidscreening ausgewählt. Diese Prozedur ist notwendig, da nicht jedes Peptid des *in silico* Verdaus in einer realen biologischen Probe aufgrund einer Sequenz spezifischen Effizienz der Protease Trypsin auftritt. Des Weiteren lassen sich nicht alle Peptide gleich gut ionisieren und mittels der LC-MS/MS detektieren.

Für das Peptidscreening wurden die Gene aller Zielproteine zuerst in das *E. coli* Expressionsplasmid pET41(a) kloniert, um über das T7-Polymerase System in *E. coli* BL21 eine detektierbare Menge aller selektierten Peptidfragmente zu gewährleisten. Dieser Arbeitsablauf für die Probenvorbereitung wird in Abbildung 7 gezeigt.

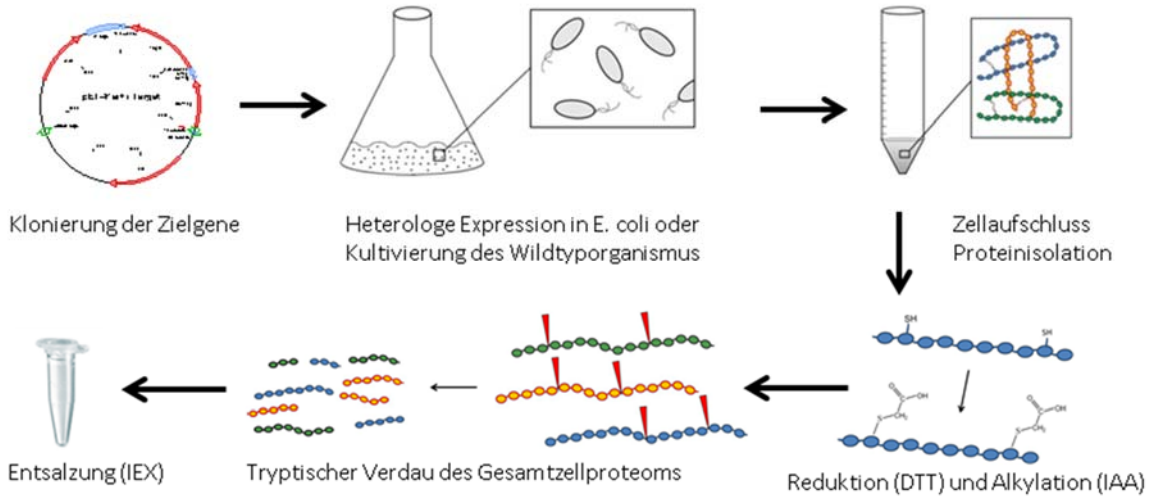

Abb. 7: Arbeitsablauf für die Probenvorbereitung. Nach der Klonierung der Zielgene in den Expressionsvektor pET41(a) wird das Zielprotein heterolog in *E. coli* produziert. Anschließend werden die Zellen aufgeschlossen und eine Reduktion und Alkylation der Proteine durchgeführt. Zum Schluss wird das Gesamtzellproteom mit Trypsin verdaut und die Probe entsalzt.

Die Bestimmung der proteotypischen Peptide war für alle Zielproteine erfolgreich. In dem folgenden Abschnitt wird ein Beispiel für ein Peptidscreening gezeigt. Dieses Beispiel (Abb. 8) zeigt das Peptidscreening der Isopren-Synthase aus *P. alba* (IspS). 13 Peptide wurden für das Screening der proteotypischen Peptide ausgewählt (markiert in der Aminosäure-Sequenz). Sechs von diesen konnten in der Targeted Proteomics Analyse detektiert werden.

Das Peptid VLSVITEPILPFER wurde aufgrund der höchsten Signalintensität und der Einzigartigkeit der Sequenz, durch BLASTp Analysen bestätigt (*C. ljungdahlii* protein database), ausgewählt.

MEARRSANYEPNSWDYDYLLSSDTDESIEVYKDKAKKLEAEVRREINNEKAEF
LTLLELIDNVQRLGLGYRFESDIRGALDRFVSSGGFDAVTKTSLHGTALSFRLLR
QHGFEVSQEAFSGFKDQNGNFLENLKEDIKAILSLYEASFLALEGENILDEAKVF
AISHLKELSEEKIGKELAEQVNHALELPLHRRTQRLEAVWSIEAYRKKEDANQV
LLELAILDYNMIQSVYQRDLRETSRWWRRVGLATKLHFARDRLIESFYWAVGV
AFEPQYSDCRNSVAKMFSFVTIIDDIYDVYGTLDELELFTDAVERWDVNAINDL
PDYMKLCFLALYNTINEIAYDNLKDKGENILPYLTKAWADLCNAFLQEAKWLY
NKSTPTFDDYFGNAWKSSSGPLQLVFAYFAVVQNIKKEEIENLQKYHDTISRPS
HIFRLCNDLASASAEIARGETANSVSCYMRTKGISEELATESVMNLIDETWKKM
NKEKLGGSPFAKPFVETAINLARQSHCTYHNGDAHTSPDELTRKRVLSVITEPIL
PFER.

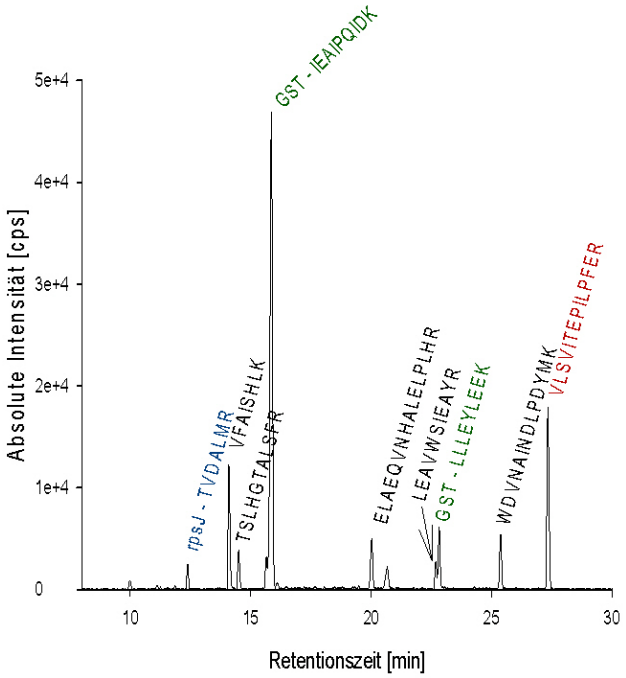

Abb. 8: Oberer Bereich – Aminosäuresequenz der IspS von *P. alba*. Gelb: ausgewählte Peptide für die Analyse, die aber nicht messbar waren; Lila: ausgewählte Peptide, die detektiert werden konnten; Hellrot: ausgewählte proteotypische Peptide. Unterer Bereich – LC-MS/MS Chromatogramm des IspS- Peptidscreenings. Dunkelblau: Referenzpeptide für *E. coli* (rpsJ – ribosomal protein S10); Dunkelgrün: proteotypische Peptide der N-terminalen GST-Fusion (Positivkontrolle der Überexpression); Dunkelrot: proteotypisches Peptid für die IspS.

Alle ausgewählten proteotypischen Peptide sind in der unten stehenden Tabelle aufgelistet. Für die Etablierung der Methode zur absoluten Quantifizierung der Peptide in Proben des tryptischen Verdaus aus Gesamtzellextrakten wurden synthetische Peptide bestellt. Für alle Peptide wurden außerdem schwere ($^{13}C/^{15}N$) Peptide als interner Standard für die Normalisierung bestellt. Die Markierung in C-terminalen Lysinen (K) beziehungsweise Argininen (R) führt zu einer Massenverschiebung von + 8 Da (K) und + 10 Da (R). Durch diese Massenverschiebung ist es möglich, die gleichzeitig eluierenden Peaks während der massenspektrometischen Untersuchung zu differenzieren und mit Hilfe einer zuvor erstellten Eichgrade die analysierten Peptide zu quantifizieren. Eine Übersicht über die verwendeten Peptidsequenzen ist in Tabelle 1 gegeben.

Tab. 1: Auswahl der spezifischen Peptide für die Targeted Proteomics-Analysen

Protein	**Abkürzung**	**Ursprungs-organismus**	**Peptid**
HMG-CoA-Reductase	MvaE	*E. faecalis*	YASLDPYR
HMG-CoA-Synthase	MvaS	*E. faecalis*	VLVVAADIAK
Mevalonate kinase	MVK	*M. mazei*	ELVANVR
Phosphomevalonate kinase	PMK	*E. faecalis*	NGELVLDIR
Phosphomevalonate decarboxylase	PMD	*E. faecalis*	LGEIIEANGLR
Isopentenyl diphosphate isomerase	IDI	*S. cerevisiae*	TMFADPSYK
Isoprene synthase	IspS	*P. alba*	VLSVITEPILPFER
Isoprene synthase	IspS	*P. montana*	AFLQEAK
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase [1]	G3PDH	*E. coli*	FDGTVEVK
Ribosomal protein S10 [1]	rpsJ	*E. coli*	TVDALMR
Methyltetrahydrofolate:corrinoid/iron-sulfur protein methyltransferase [1]	MT	*C. ljungdahlii*	AIEAGLK
CO dehydrogenase/acetyl-CoA synthase complex [1]	ACS	*C. ljungdahlii*	DFEPVLER
Formate-tetrahydrofolate ligase [1]	FTHFL	*C. ljungdahlii*	IVVGYTR

[1] Referenzgene, die bereits im Zielorganismus vorkommen

Erstellung des Shuttle-Vektors mit *ispS*-Gen

Der Shuttle-Vektor (pIM) trägt eine durch Xylose regulierte Himar-Transposase (H1), die bei Expression die Genabschnitte zwischen den Mycomar-Erkennungssequenzen ungerichtet ins *Clostridium*-Genom integrieren soll. Außerdem enthält der Vektor neben zwei Antibiotika-Resistenzgenen, die für Clostridien genutzt werden können (*catP* und *mlsR*), auch eine *oriT*- Region (*origin of transferation*), die wichtig für die Konjugation ist. Das Codon-optimierte *ispS*-Gen (aus *P. alba*) wurde in diesen Integrationsvektor mittels Gateway-Technologie (Hartley *et al.* 2000)

eingebracht (Abb. 9). Bei Der Gateway-technologie handelt es sich um ein System, welches auf der sequenzspezifischen Rekombination des Bakteriophagen Lambda aufbaut (Landy 1989) und gezielt ein Fragment mit den richtigen Überhängen in einen Vektor mit den spezifischen Erkennungssequenzen rekombiniert. Dabei wird eine für normale *E. coli*-Klonierungsstämme toxische *ccdB*-Kassette aus dem Vektor entfernt, wodurch das Screening nach positiven Klonen erleichtert wird (Vgl. Manual Gateway). Das *ispS*-Gen liegt zusammen mit dem *mlsR*-Resistenzmarker zwischen den Mycomar-Erkennungssequenzen und soll als ein Cluster in das Genom eingebracht werden.

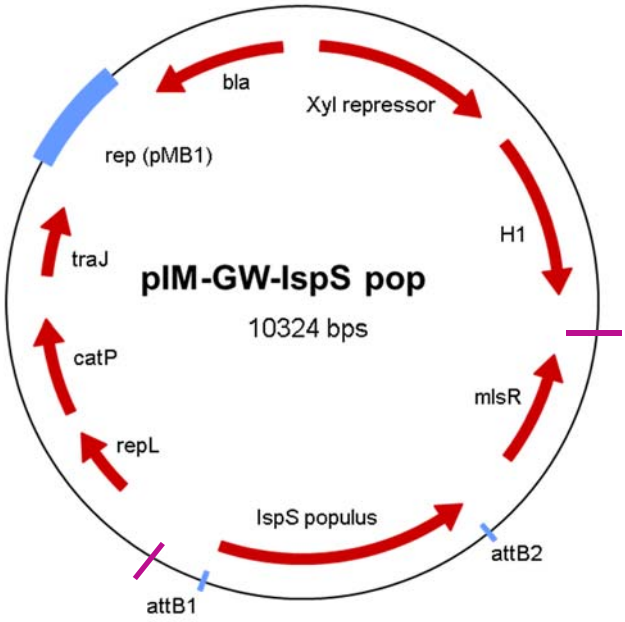

Abb. 9: Vektorkarte des Integrationsplasmides pIM-GW-ispS. Das codon-optimierte *ispS*-Gen (aus *P. alba*) wurde mittels Gateway-Technologie in den Vektor pIM eingebracht. Das Gen liegt Codon-optimiert für *C. ljungdahlii* vor und wird durch einen Ptb-Promotor reguliert. Der Vektor trägt neben den beiden Resistenzgenen *mlsR* und *catP*, das Gen für die Himar-Transposase (H1), die durch einen Xylose-Repressor (XylR) reguliert wird. Die Mycomar-Sites (pink) dienen als Erkennungssequenzen für die Himar-Transposase. Der Vektor ist durch die *oriT*-Region (*origin of transferation*) und das *traI*-Gen zur Übertragung mittels Konjugation fähig und durch den *origin of replication* (repL) zur Replikation in grampositiven Mikroorganismen.

Da nicht viel über die gentechnische Manipulation von *C. ljungdahlii* bekannt war, und auch nicht, ob die eingebrachten Gene, Promotoren, etc. in diesem Organismus funktional sind, wurden sie zuerst in *E. coli* TOP 10 getestet. Aus Erfahrungen war bekannt, dass für Clostridien optimierte Gene und Regulationseinheiten wie Clostridien-Promotoren (*thl* und *ptb*) in *E. coli* funktional sind (Petersen *et al.* 1991).

Es konnte hier gezeigt werden, dass die Isoprensynthase in *E. coli* funktionsfähig ist und Isopren in den Zellen gebildet wird. Hierzu wurden die Stämme in LB-Medium (mit Antibiotika) in verschlossenen Schüttelkulturen angezogen. Die Isopren-Analysen erfolgten mittels Solid Phase Micro Extraction (SPME) (Abb. 10). Bei dieser Methode wird eine Fiber in den Gasraum des Fermenters eingebracht, flüchtige Substanzen werden von der Fiber absorbiert, anschließend wird die Fiber im Injektionsport der GC-MS/MS ausgeheizt und die absorbierten Substanzen vermessen. Zum anderen konnte mittels Targeted Proteomics durch das spezifische Peptid (VLSVITEPILPFER) die Bildung der Isopren-Synthase gezeigt werden (Abb. 10 C).

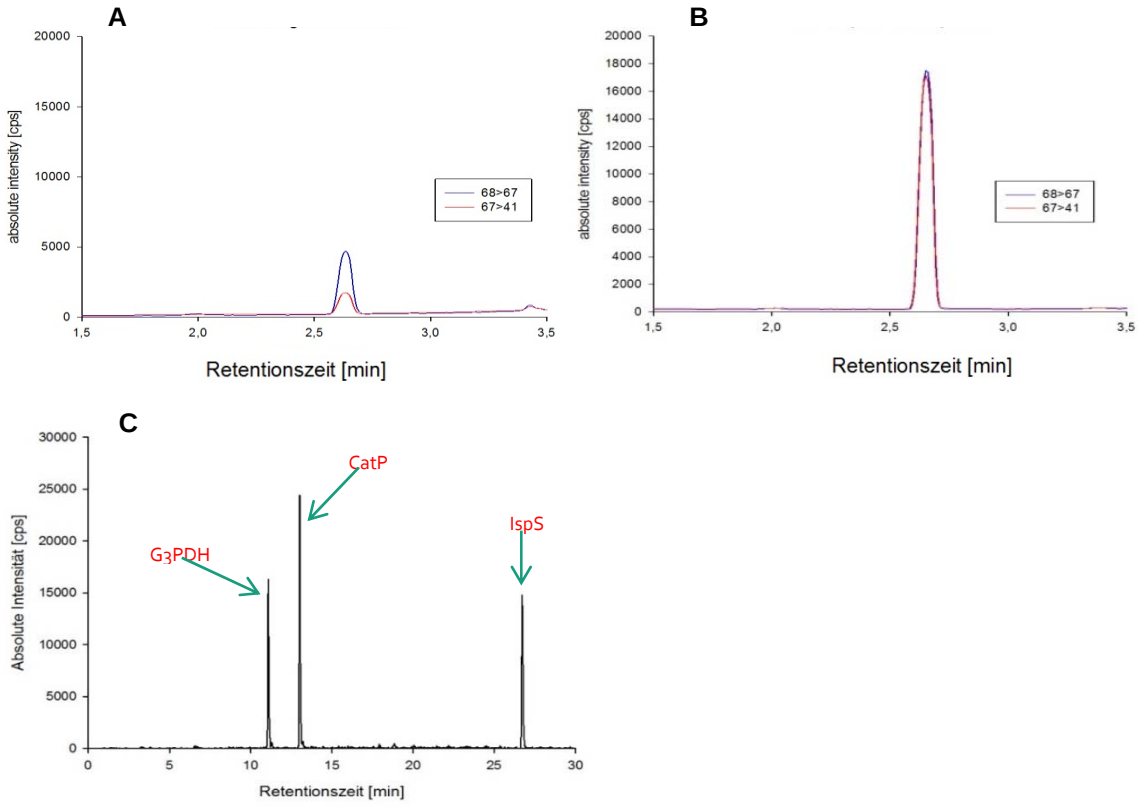

Abb. 10: Nachweis der Funktionsfähigkeit der IspS in *E. coli* TOP10 Mittels GC-MSMS und LC-MSMS-Analysen.
(A) Mit Hilfe von SPME wurde an der GC-MS/MS Isopren in der Gasphase des *E. coli* TOP10 Kontrollstammes gemessen. Die spezifischen MRM-Übergänge (blau: 68>67 m/z; rot: 67>41 m/z) und die Retentionszeit bei 2,7 min weisen Isopren nach. Dieser Stamm wurde als Negativkontrolle verwendet, da er bereits eine Isopren-Hintergrundproduktion aufweist. (B) zeigt das GC-MS/MS-Spektrum eines Klons (#1), der das Plasmid pIM-GW-ispS trägt. (C) Targeted Proteomics zum Nachweis des IspS-Peptides in *E. coli* pIM-GW-ispS #1. Das für CatP codierende Gen befindet sich ebenfalls auf dem eingebrachten Vektor und G3PDH ist ein *E. coli* Referenz-Protein.

Transformation der Konstrukte in Clostridien

Für die Erzeugung rekombinanter Clostridien sind in der Literatur zwei Methoden mehrfach beschrieben worden: Elektroporation und Konjugation (Leang *et al.* 2013, Williams *et al.* 1990). Bei der Elektroporation wurde nach dem Protokoll von Leang *et al.* verfahren (Leang *et al.* 2013). Zuerst wurde *C. ljungdahlii* um die Zellwand zu instabilisieren entweder in Anwesenheit von D/L- Threonin oder Glycin kultiviert. Beide Stoffe erhöhen durch Schwächung der Zellwandstruktur die Transformationseffizienz. Sobald die Hauptkulturen eine OD_{600} von 0,1-0,2 erreicht haben, werden die Zellen mit Puffer gewaschen und anschließend mit 0,625 kV geschockt. In dieser Publikation wird außerdem erwähnt, in wie weit der Replikationsursprung bei der Etablierung des Plasmids in der Zelle (copy number, Replikationseffizienz, Segregationsverhalten) nach der Transformation von *C. ljungdahlii* von Bedeutung ist und dass die unterschiedlichen Replikationsursprünge eine große Auswirkung auf die Anzahl der erhaltenen Transformanten haben. Der Integrationsvektor pIM-traJ trägt den Replikationsursprung repL, bei dem im Schnitt nur ein Klon auf 1 µg eingesetzter DNA wächst.

Ein Problem bei der Elektroporations-Methode ist, dass es sehr schwierig, bzw. nicht möglich ist, sehr große DNA-Konstrukte in die Clostridien einzubringen. Die Konjugation auf der anderen Seite ist nicht limitiert durch die Größe der einzubringenden DNA. Bei der Konjugationsmethode dient das Plasmid pRK2013 als Helferplasmid (Figurski and Helinski 1979), das die für den Konjugationsprozess notwendigen Proteine codiert. Für den DNA-Transfer bei der Konjugation werden ein Helferplasmid tragender *E. coli* Stamm (StBl3), *E. coli* NEB 10beta mit pIM-Konstrukten und *Clostridium ljungdahlii* unter anaeroben Bedingungen gemischt und eine bestimmte Zeit inkubiert. Hierbei spricht man auch von einem Triparental-Mating, durch das die Plasmid-DNA in die Clostridien-Zelle übertragen wird. Es wurden für das Mating verschiedene Bedingungen ausgetestet. Zum einen wurde die Mating-Art variiert; es erfolgte auf Agar-Platte mit YTF-Vollmedium, auf Filter und in 2 ml Flüssigkeit (Abb. 11). Außerdem wurde die Mating-Zeit untersucht: 4-24 h. Bei der anschließenden Selektion wurde neben Clarithromycin (Endkonzentration 5 µg/ml) auch D-Cycloserin (Endkonzentration 200 µg/ml) oder Trimethoprim (Endkonzentration 5 µg/ml) eingesetzt, welche als Bakteriostatikum das Wachstum von *E. coli* Zellen hemmen. Hingegen ist bei *Clostridium ljungdahlii* kein Effekt auf das Wachstum durch D-Cycloserin bis zu einer getesteten Konzentration von 400 µg/ ml erkennbar. Die Konjugationsversuche ergaben, dass das Mating auf Agar-Platte und Filter zu ähnlichen Resultaten führt, hingegen bringt ist das Mating in Flüssigkultur deutlich weniger Klone auf. Eine mittlere Matingzeit (ca. 12-18 h) brachte dabei die meisten Klone hervor.

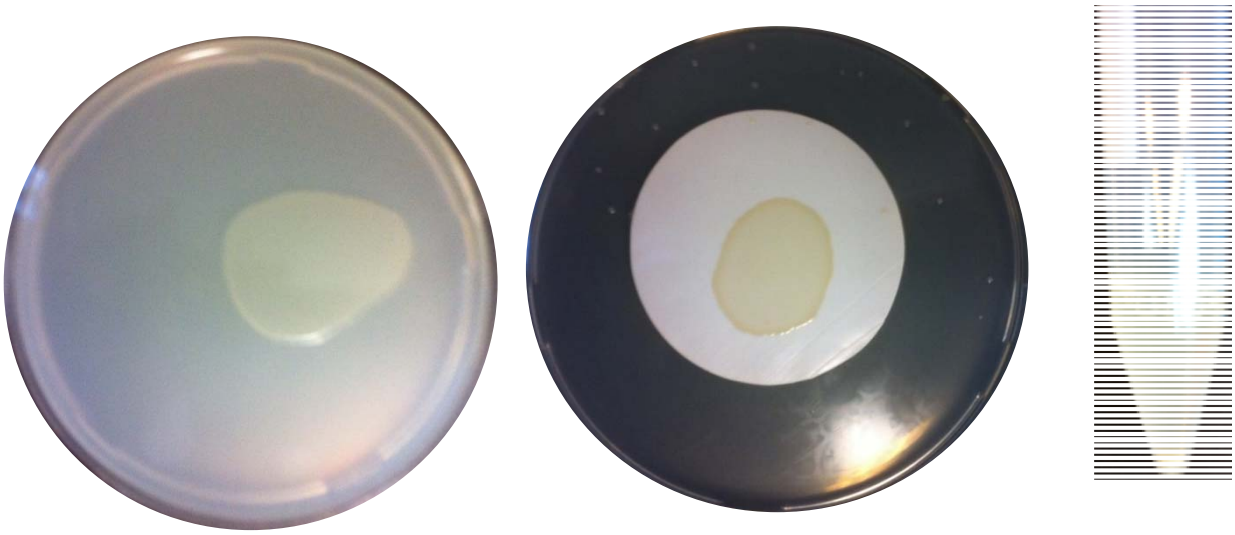

Abb. 11: Verschiedene Mating-Arten der Konjugation. Bei einer Konjugation werden die Zellen, die konjugiert werden sollen zusammen mit dem Donor und dem Helferstamm gemischt und für das sogenannte Mating eine Zeit lang inkubiert. Dieses kann direkt auf YTF-Vollmedium Agar-Platte (links) erfolgen, auf einem Filter, der auf einer Agar-Platte aufliegt (mitte) oder in flüssigem YTF-Vollmedium (rechts).

Genomische Integration des Isoprensynthase-Gens in *C. ljungdahlii*

Das Konstrukt pIM-GW-ispS wurden in *C. ljungdahlii* eingebracht. Zum einen gelang die Transformation mittels Elektroporation, zum anderen konnten die Vektoren mithilfe von Konjugation in die Zellen eingebracht werden (Vgl. Abschnitt „Transformation der Konstrukte in Clostridien“). Der nächste Schritt war die Integration der Gene (*ispS* und *mlsR*) in das Genom von *C. ljungdahlii*. Die hier verwendeten Vektoren enthalten Gene, die für die Himar-Transposase codieren und tragen flankierend zu den Genen von Interesse spezifische Sequenzen, die von der Himar-Transposase erkannt und der davon begrenzte DNA-Abschnitt ungerichtet ins Genom rekombiniert werden kann (Abb. 12). Erfolgreiche genomische Integrationen konnten in der Arbeitsgruppe mit diesem System bereits in *E. coli* und *Clostridium cellulolyticum* gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).

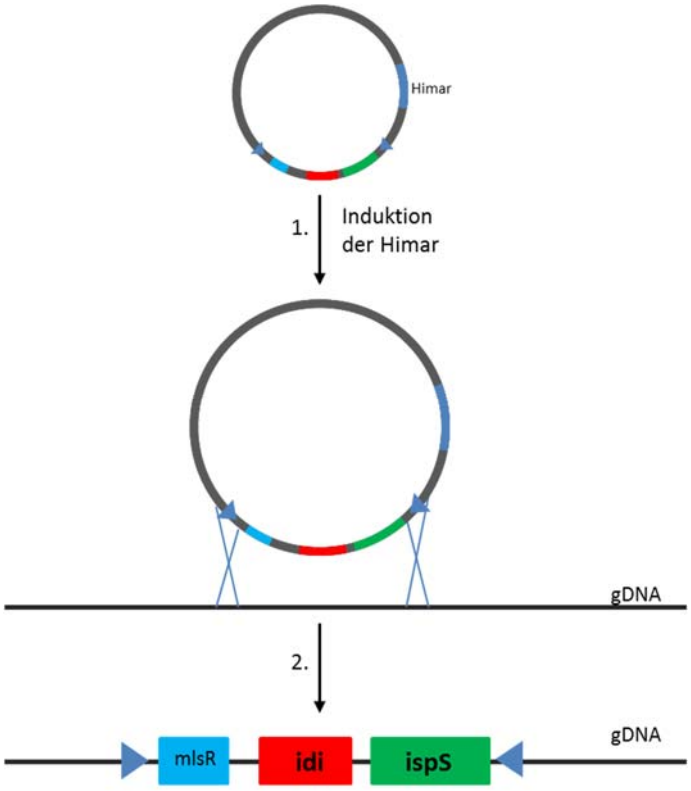

Abb. 12: Schema der genomischen Integrationsmethode. Für die genomische Integration wird der Integrationsvektor pIM verwendet, der zum einen die Himar-Transposase trägt und zum anderen Mycomar-Sites (blaue Pfeile) um den zu integrierenden Bereich hat. Nach Induktion der Himar-Transposase (1) rekombiniert diese über die Mycomar-Sites die enthaltenen DNA-Sequenzen ungerichtet in das Genom (2).

Nach erfolgreich gezeigter Transformation von *C. ljungdahlii* mit dem Plasmid pIM-GW-ispS wurden die Kulturen anschließend in Anwesenheit von Xylose angezogen. Dadurch sollte die Himar induziert werden. Die Kulturen wurden mehrfach in frisches YTF-Vollmedium mit Xylose überimpft, sowohl in Flüssigmedium als auch auf Agar-Platten, hierbei allerdings ohne die Zugabe von Antibiotika. Nach längerer Kultivierung wurden die Klone sowohl auf Clarithromycin-haltigen wie auch auf Thiamphenicol-haltigen Agar-Platten ausplattiert. Die Klone hatten die Fähigkeit verloren, auf Thiamphenicol (5 µg/ml) zu wachsen, der Resistenzmarker hierfür befindet sich auf dem Vektor-Backbone (Vgl. Abb. 9). Hingegen konnten die Kulturen weiterhin in Anwesenheit von Clarithromycin (5 µg/ml) wachsen, da das Resistenzgen hierfür (*mlsR*) zusammen mit dem *ispS*-Gen ins Genom integriert werden sollte (Abb. 13).

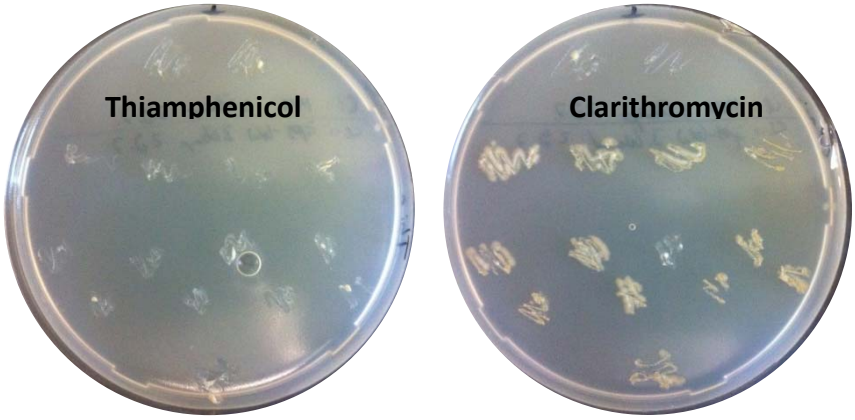

Abb. 13: Einzelne Klone auf einer Platte mit Thiamphenicol und einer mit Clarithromycin. Zum Test der Integration werden die Klone zum einen auf Thiamphenicol und zum anderen auf Clarithromycin getestet. Genomische Integranten, welche das Plasmid verloren haben dürfen nur noch auf Clarithromycin, aber nicht mehr auf Thiamphenicol wachsen.

In molekularbiologischen Versuchen konnte das *ispS*-Gen in extrahierter gDNA der Klone nachgewiesen werden (Abb. 14 A). Anschließend wurde mit Inverse PCR (Abb. 14 B) der Integrationsort bestimmt. Bei der Methode der inverse PCR wird die extrahierte DNA mit einem Restriktionsenzym verdaut, anschließend religiert und dann mit spezifischen entgegengesetzt ausgerichteten (inversen) Oligonukleotiden amplifiziert (Abb. 15). Die Sequenzierung der PCR-Produkte ergab, dass das Konstrukt in das Genom von *C. ljungdahlii* integriert wurde an Position 977.589 bp zwischen den Genen CLJU_c08840 und CLJU_c08850. Anschließend wurde das Genom der Integrante noch komplett sequenziert um evtl. weitere Integrationsorte zu finden und zu überprüfen, ob der integrierte Bereich korrekt vorliegt. Es zeigte sich, dass das Gen-Konstrukt (*ispS-mlsR*) nur einfach - an der bereits erwähnten Stelle - ins Genom von *C. ljungdahlii* integriert wurde und fehlerfrei vorliegt.

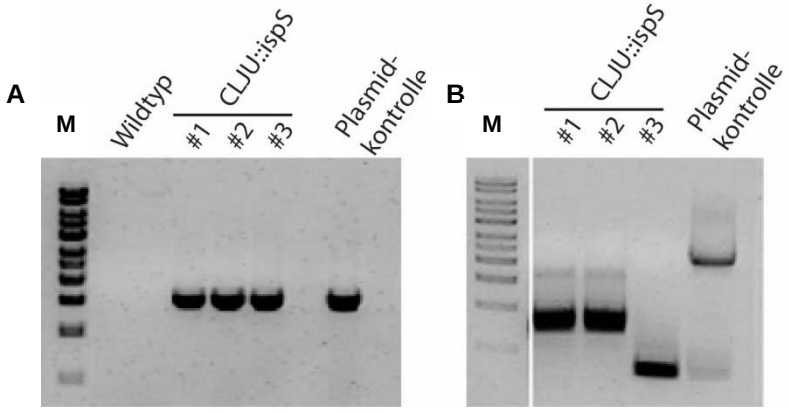

Abb. 14: Molekularbiologische Untersuchungen der Klone *C. ljungdahlii* mit genomisch integrierter *ispS*.
(A) Check-PCR auf *ispS*-Gen mit gDNA aus *C. ljungdahlii* Wildtyp, drei möglichen Klonen (CLJU::ispS) und als Positivkontrolle mit dem Plasmid pIM-GW-ispS (Plasmidkontrolle).
(B) Inverse PCR zum Nachweis des Integrationsortes. Die hier erhaltenen Fragmente wurden eluiert und zur Sequenzierung gegeben.

Zur weiteren Analyse dieses Klones wurden Headspacemessungen an der GC-MS/MS durchgeführt, die Kultivierung hierfür erfolgte in 10 ml Headspacetubes mit 5 ml YTF-Vollmedium mit Fructose als C-Quelle. Diese Endpunktmessungen zeigten, dass die Isopren-Bildung in diesem Stamm nicht signifikant höher als die Bildung im Wildtyp war (Daten nicht gezeigt). Um die Gründe hierfür genauer zu beleuchten, wurden zuerst qPCR Analysen von Kulturen in der exponentiellen Phase des Wachstums (OD_{600nm} ~ 0,6) durchgeführt; im Stamm mit der genomischen Integration konnte im Gegensatz zum Wildtypstamm eine Bildung an mRNA des *ispS*-Gens nachgewiesen werden (Abb. 16).

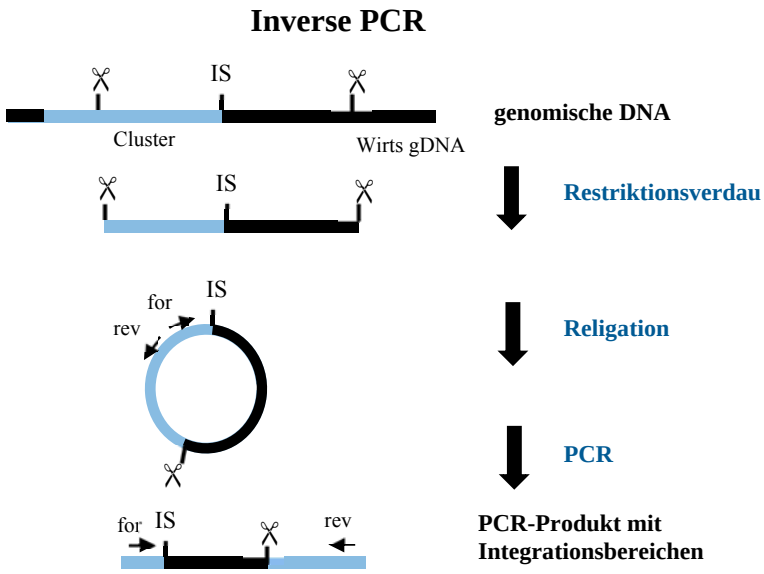

Abb. 15: Schema der Inverse PCR. Bei der Methode der inverse PCR wird die extrahierte genomische DNA mit einem Restriktionsenzym verdaut, anschließend religiert und dann mit spezifischen entgegengesetzt ausgerichteten (inversen) Oligonukleotiden amplifiziert. Das hieraus resultierende PCR-Produkt kann anschließend sequenziert werden um den Integrationsort (IS) zu identifizieren.

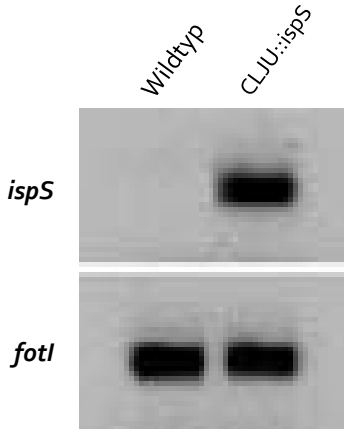

Abb. 16: RT-PCR an der gesamt-RNA von *C. ljungdahlii* WT und *C. ljungdahlii* mit genomisch integrierter *ispS*. Nach der RNA-Extraktion aus *C. ljungdahlii* WT und CLJU::ispS (*C. ljungdahlii* mit genomisch integrierter *ispS*) erfolgte eine RT-Reaktion und anschließend die semiquantitative RT-PCR mit spezifischen Oligonukleotiden für das *ispS*-Gen. *fotI* dient als Referenz Gen (es codiert für ein Protein des Wood-Ljungdahl-Biosynthesewegs in *C. ljungdahlii*). Nach der qPCR wurden die PCR-Produkte auf ein Agarose-Gel aufgetragen.

Bei Targeted Proteomics-Versuchen mit der Shimadzu LCMS-8050 konnte eine geringe Menge des spezifischen Peptids für die Isopren-Synthase (VLSVITEPILPFER) in den Proben des Integrationsstammes nachgewiesen werden (Abb. 17). Eine Möglichkeit, für die geringe Isopren-Produktion bzw. geringe Menge des IspS-Proteins, könnte eine Protease sein, die dieses eingebrachte Protein proteolytisch degradiert.

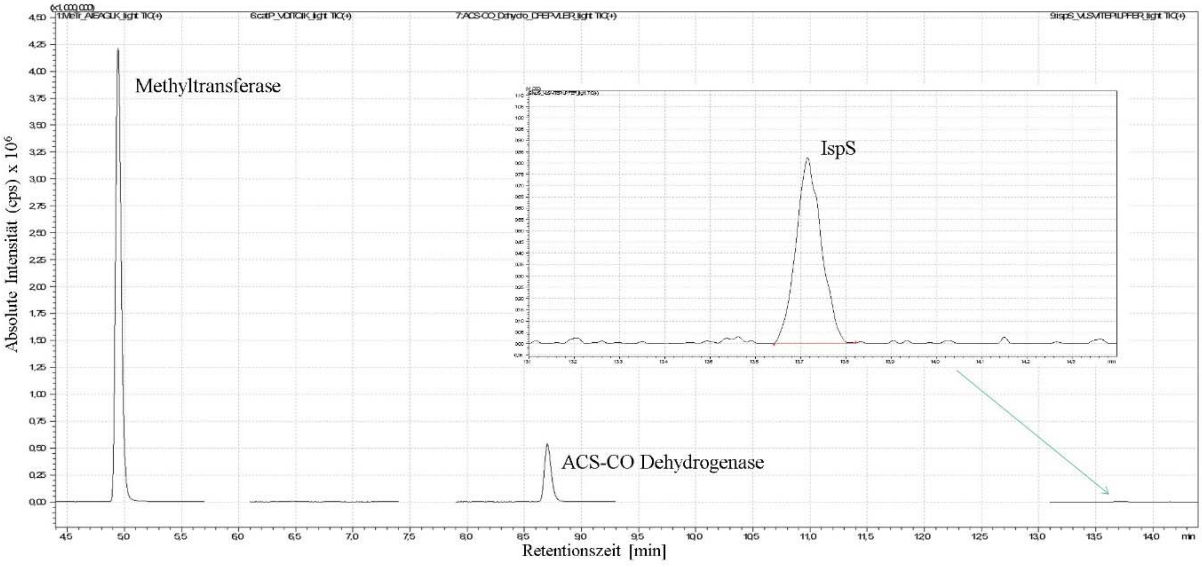

Abb. 17: Targeted Proteomics Analyse des Stammes CLJU::ispS-pop an der Shimadzu LCMS-8050. Das Chromatogramm zeigt nur sehr schwach das Vorhandensein der IspS. Als Positivkontrolle wurden die Methyltransferase und die ACS-CO Dehydrogenase aus *C. ljungdahlii* verwendet.

Überprüfung der Möglichkeit einer IspS-abbauenden Protease

Zur Überprüfung der Theorie, dass die Isoprensynthase (aus *P. alba*) in *C. ljungdahlii* von einer Protease abgebaut werden könnte, wurde ein *in vitro*-Protease-Test durchgeführt. Zuerst wurde der Vektor N1 (pDEST-his-ispS, bereitgestellt von Dr. C. Janke) und der Vektor pET41-ispS (GST-His-ispS) in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert und durch Induktion des T7-Systems mit 1 mM IPGT exprimiert. Um die Isoprensynthase, welche mit einem 6x His-tag versehen ist, anzureinigen wurde eine Ni-NTA-Säule verwendet und das Protein mit 250 mM Imidazol-Puffer von der Säule eluiert (Abb. 18).

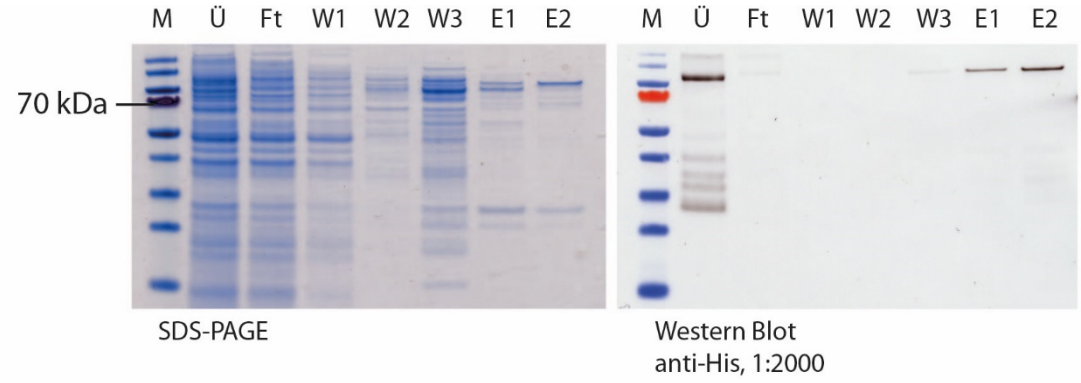

Abb. 18: SDS-PAGE und Western Blot der Aufreinigung von His-IspS aus *E. coli*. (M: Marker; Ü: Überstand; Ft: Durchfluss; W: Waschfraktion; E: Elutionsfraktion). Das erwartete Fusionsprotein ist 94 kDa schwer.

Von *C. ljungdahlii* und *E. coli* wurden Proteingesamtextrakte hergestellt. Anschließend wurde das angereinigte Protein (His-IspS) mit den jeweiligen Proteinextrakten anaerob über 24 h bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden mittels Western Blot mit dem Monoclonal Anti-polyHistidine-Peroxidase-Antikörper (SigmaAldrich) untersucht (Abb. 19). In den hier durchgeführten Versuchen findet sich kein Hinweis auf einen proteolytischen Abbau der Isoprensynthase, da die Bandenintensität nach der Inkubation nicht deutlich abnahm.

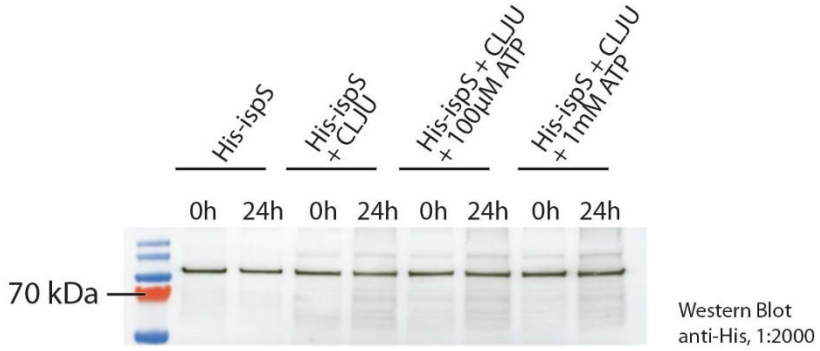

Abb. 19: Western Blot eines *in vitro* Protease-Versuchs. Angereinigtes Protein (His-ispS) wurde anaerob mit Proteinrohextrakt von *C. ljungdahlii* und *E. coli* über einen Zeitraum von 24 h inkubiert. Hier unter Verwendung eines Hepes-Puffers (10 mM Hepes, pH 7; 10 µM $ZnCl_2$, 10 µM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 200 mM KCl, 10 mM NaCl). Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines anti-His-Antikörpers.

Untersuchung weiterer Konstrukte in *C. ljungdahlii* (IspS kudzu und MVA-Cluster)

Da die *P. alba* Version der IspS in *C. ljungdahlii* auch nach verschiedenen Analysen nicht zu einer signifikanten Produktion an Isopren in dem Organismus führte und das Protein selbst im Targeted Proteomics kaum erkennbar war, wurde eine weitere Isoprensynthase – die aus Kudzu (*Pueraria montana*) – ausgewählt und untersucht.

Außerdem wurde im pIM-Shuttlevektor der *origin of replication* repL gegen den repH ausgetauscht. Der repH soll im Gegensatz zum repL deutlich stabiler in *C. ljungdahlii* sein und dadurch die Transformation durch Elektroporation (oder Konjugation) erleichtern (Leang *et al.* 2013). Der pIM-H-ispS_kudzu wurde erstellt (Dr. C. Janke, Abb. 20 A) und mittels Konjugation in *C. ljungdahlii* eingebracht. Parallel hierzu wurde ein Vektor, der einen kompletten MVA-Cluster enthält (pIM-H-MVA) kloniert (Dr. A. Wittgens und Dr. G. Philipps, Abb. 20 B) und ebenfalls in *C. ljungdahlii* mittels Konjugation eingebracht.

Die hieraus entstandenen *C. ljungdahlii* Konjuganten wurden auf ihre Isoprenproduktion hin getestet und zeigten im Vergleich zum *C. ljungdahlii* Wildtyp nach Wachstum auf YTF-Vollmedium mit 0,5 % Fructose eine gesteigerte Produktion an Isopren: der Stamm, der das Plasmid pIM-H-ispS_kudzu enthält produziert etwa 3,5x mehr Isopren und der Stamm mit dem Plasmid pIM-H- MVA mit einer Isoprenkonzentration von ca. 3,7 µM etwa 50x mehr (Abb. 21).

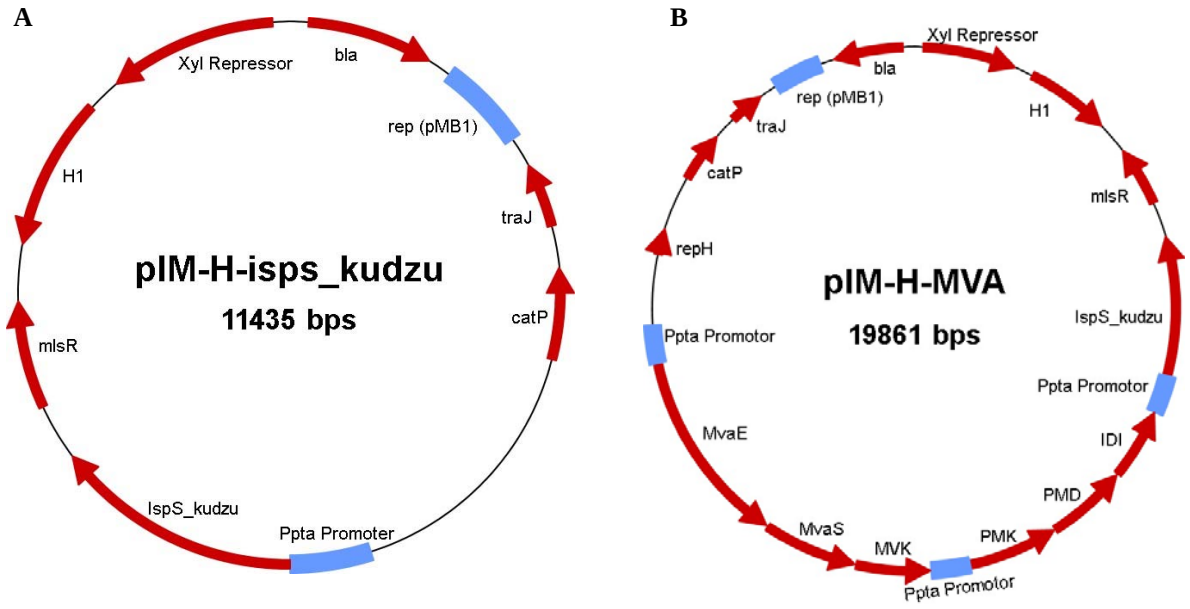

Abb. 20 A und B Plasmidkarten der hier verwendeten Plasmide pIM-H-ispS_kudzu und pIM-H-MVA. Ppta. Der Grundbaustein dieser Vektoren ist wieder der pIM-Vektor mit denen in Abb. 9 beschriebenen Elementen. Der *origin of replication* wurde hier zum repH gewechselt und es wird der Ppta Promotor verwendet. Gene, die für MVA-Pathway kodieren: MvaE-hmgR, Hmg-CoA-Reduktase; MvaS-hmgS, Hmg-CoA-Synthase; MVK, Mevalonatkinase; PMK, Phosphomevalonat-Kinase; PMD, Phosphomevalonat-Decarboxylase; IDI, IPP-Isomerase.

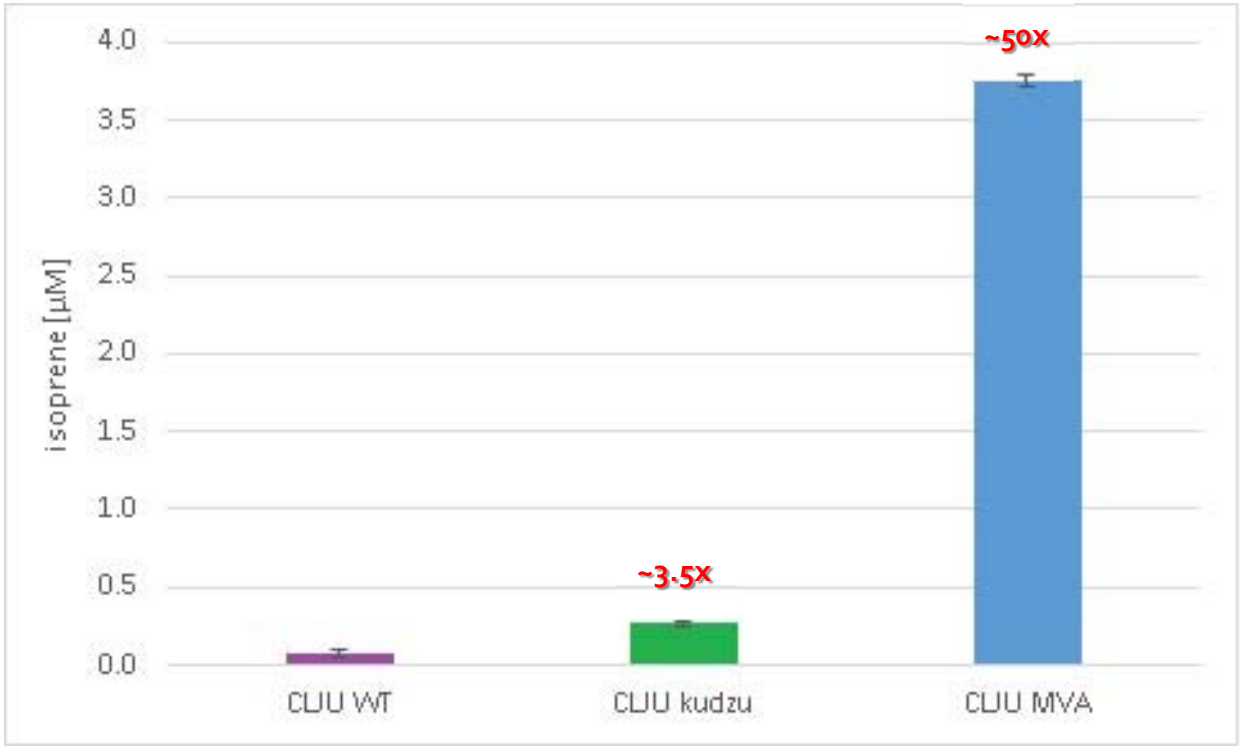

Abb. 21: Vergleich der Isoprenproduktion in verschiedenen *C. ljungdahlii* Stämmen. Hier wurden *C. ljungdahlii* Wildtyp, mit *C. ljungdahlii* mit pIM-H-ispS_kudzu und *C. ljungdahlii* mit pIM-H-MVA verglichen. In Mehrfachbestimmung wurde das Headspace Volumen von den drei verschiedenen Stämmen entnommen und mit Hilfe einer GC-MSMS das Isopren gemessen.

Um die Klone weiter zu untersuchen wurde Targeted Proteomics Analysen durchgeführt (Abb.22), hierzu wurden jeweils 50 ml YTF-Vollmedium mit 0,5 % Fructose mit den Kulturen bis zu einer OD600 von 1-1,5 kultiviert. Hierbei zeigte sich, dass die Stämme jeweils die Isoprensynthase enthielten, wenn auch mit schwachem Signal. In den Ergebnissen des TP bei den Klonen von *C. ljungdahlii* mit pIM-H-MVA konnten die meisten Peptide der Proteine des MVA-Clusters gefunden werden: HMGS, PMD, PMK. Allerdings war das Peptid der HMGR nicht detektierbar. Um dieses Problem zu untersuchen wurde von diesen Stämmen eine Plasmid-Rescue (Extraktion der eingebrachten Plasmide aus *C. ljungdahlii* und anschließende Retrafo in *E. coli* zur Untersuchung der Plasmide) durchgeführt, mit anschließendem Testverdau mit *Eco*RI (Abb. 23).

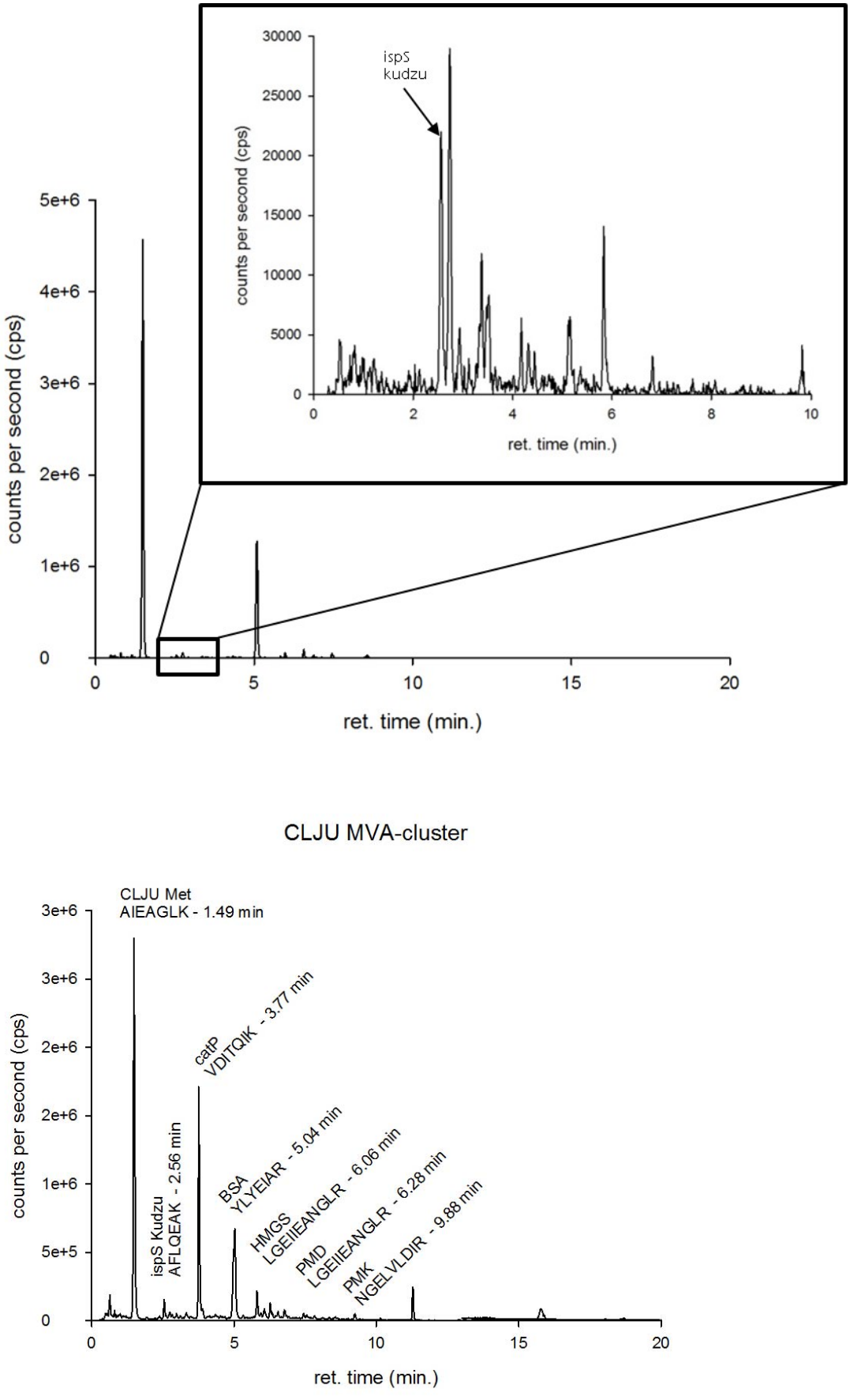

Abb. 22: Targeted Proteomics der Stämme *C. ljungdahlii* pIM-H-ispS_kudzu und *C. ljungdahlii* pIM-H-MVA.

Der Testverdau der Plasmide wies das erwartete Bandenmuster auf. Allerdings zeigte die anschließende Sequenzierung der aus den *C. ljungdahlii* Konjuganten extrahierten Plasmide eine Mutation im *hmgR*-Gen, die zu einem Frame Shift führt, sodass das Protein hiervon nicht korrekt gebildet werden kann. Die deutliche Steigerung der Isoprenproduktion im Vergleich zum Wildtyp und auch zu den Mutanten, mit pIM-H-ispS_kudzu, könnte bereits durch das zusätzliche Einbringen der IDI hervorgebracht werden (Vgl. Pathway, Abb. 3). Bereits in der Literatur ist beschrieben, dass die IDI zu einer deutlichen Steigerung der Isoprenproduktion in Stämmen mit IspS führt, da die Isomerase eine Steigerung von DMAPP erzeugt.

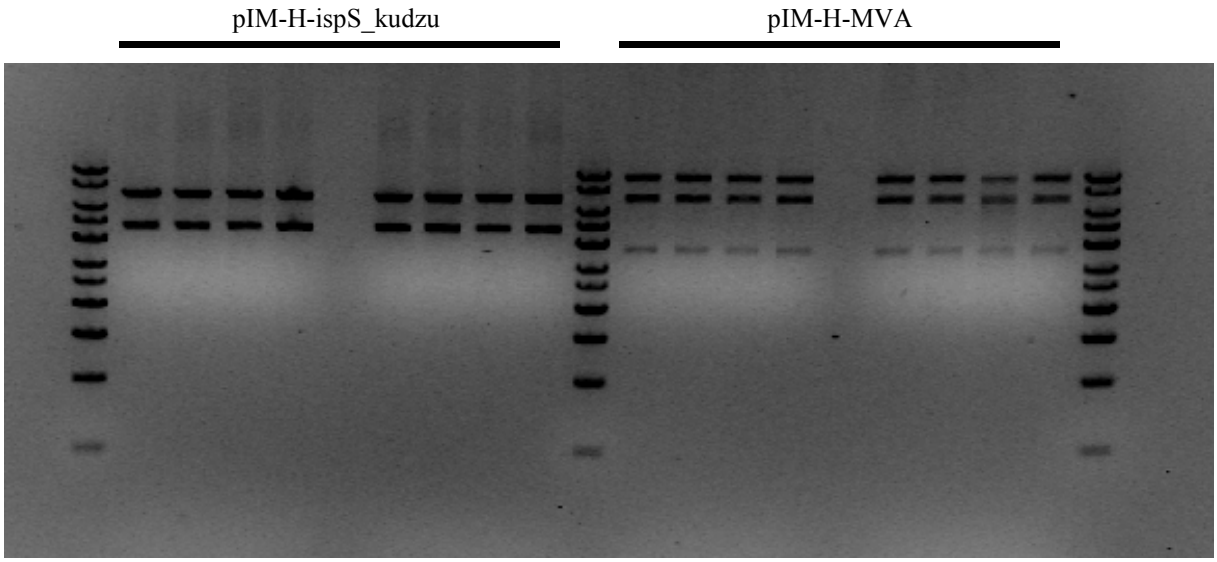

Abb. 23: Plasmid-Rescue und *Eco*RI-Verdau con individuellen Retransformanten. Plasmide wurden aus *C. ljungdahlii* pIM-H-ispS_kudzu und *C. ljungdahlii* pIM-H-MVA isoliert, in *E. coli* retransformiert und jeweils mehrere Klone mittels Testrestriktion auf Korrekheit getestet. Erwartete Frgamentgrößen: pIM-H-ispS_kudzu: 6849 und 4586 bp; pIM-H-MVA: 9442, 6849 und 3570 bp.

Anschließend wurde das Konstrukt pIM-H-MVA in das Genom von *C. ljungdahlii* integriert (vgl. Abschnitt „Genomische Integration des Isoprensynthase-Gens in *C. ljungdahlii*“). Es wurde eine Inverse PCR durchgeführt und die Sequenzierung der PCR-Produkte ergab, dass das Konstrukt in das Genom von *C. ljungdahlii* integriert wurde an Position 3.328.944 bp in das Gen CLJU_c30160. Das Gen CLJU_c30160 kodiert für ein ATP-bindendes Protein eines ABC-Transporters. Anschließend wurde das Genom der Integrante noch komplett sequenziert um evtl. weitere Integrationsorte zu finden und zu überprüfen, ob der integrierte Bereich korrekt vorliegt. Es zeigte sich, dass das Gen-Konstrukt (*MVA-ispS-mlsR*) nur einfach - an der bereits erwähnten Stelle - ins Genom von *C. ljungdahlii* integriert wurde und fehlerfrei vorliegt. Anschließend wurde die Isoprenproduktion untersuch; der Stamm produziert nur etwa 2x mehr Isopren als der Wildtyp Stamm.

Syngas-Fermentation

Nachdem die Isoprenproduktion in den rekombinanten *C. ljungdahlii*-Stämmen in YTF-Vollmedium mit Fruktose als Kohlenstoffquelle gezeigt werden konnte, war es nun wichtig die Produktion auf Syngas zu demonstrieren und die Fermentation zu optimieren.
Serumflaschen sind ein gängiges Kultivierungsgefäß für Anaerobier. Die Flüchtigkeit des Isoprens machen allerdings eine Regulierung des pH-Wertes und regelmäßige Syngaszufuhr unmöglich, da in beiden Fällen Produktverlust aus dem Gasraum auftritt. Ein konstanter pH-Wert der Kultur ist wichtig, da *C. ljungdahlii* Säuren produziert, die bei einer zu hohen Übersäuerung zum Absterben der Zellen führt und somit die Produktbildung begrenzen. Weiterhin ist auch eine regelmäßige Syngaszufuhr obligat notwendig, da die Menge an zugeführter Kohlenstoffquelle im Gas (~µg) verglichen mit Zuckern (~mg-g) deutlich geringer ist. Deshalb wurde eine bereits vorhandene Syngasfermentationsanlage erweitert und optimiert, sodass in drei Bioreaktoren parallele Fermentation möglich sind (siehe Abb. 24) mit einer Gasmischanlage, die das Syngas in variierbarer Zusammensetzung an die Fermenter abgibt. Zunächst wurde die Fermentationsoptimierung mit Hilfe des *C. ljungdahlii* Wildtyps durchgeführt.

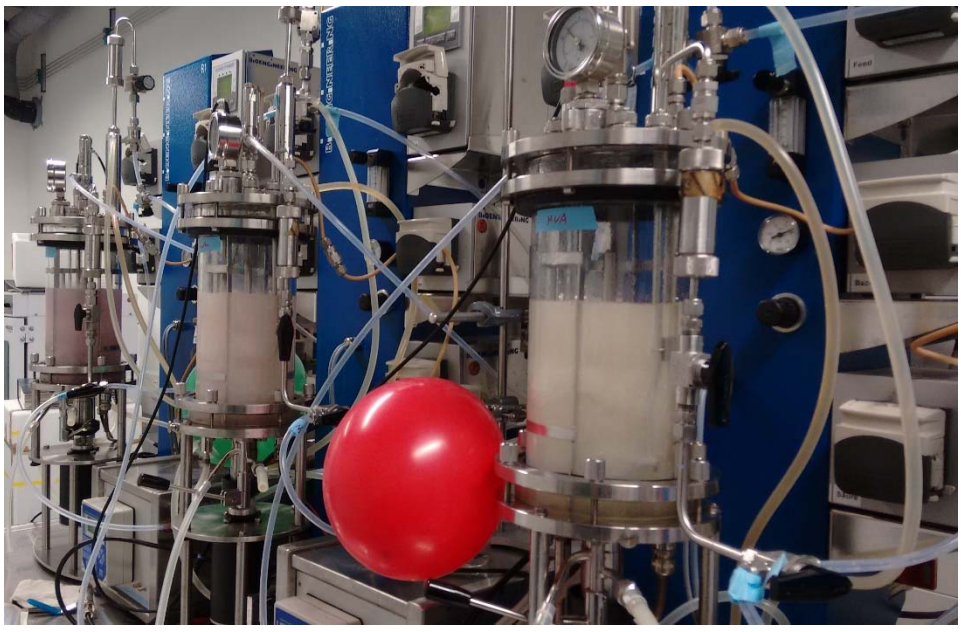

Abb. 24: Diese Abbildung zeigt die vorhandene Syngasfermentationsanlage. Syngasfermentationen werden hier im 2L Maßstab über einen Zeitraum von 7-10 Tagen durchgeführt. Es können drei Fermenter parallel unter Zufuhr von Syngas mit pH-Regulation betrieben werden.

Bei einem Fermentationslauf wurde ATCC1754-Medium verwendet, dessen pH-Wert auf 6 eingestellt war. Die pH-Regulation erfolgte über eine Pumpe durch Zugabe von NaOH oder NH_3. Mit einem Gasfluss von 0,3-0,6 Ln pro Minute (Ln/min) wurde Syngas (33% CO, 33% CO_2, 33% H_2) in

die drei Fermenter gebracht und so ein Überdruck erzeugt. Bei einer diskontinuierlich-begasten Fermentation wurde die Abluft geschlossen und ein Überdruck von 1 bar im Fermenter eingestellt. Nachdem die Kulturen in den Fermentern leicht angewachsen waren, wurde auf kontinuierliche Begasung umgestellt, um das Wachstum und die Biomasseproduktion zu erhöhen.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass mit Hilfe der kontinuierlichen Begasung, in Verbindung mit der Regulation des pHs, eine Verdopplung der Zelldichte auf ca. OD_{600} 2 erreicht werden kann (Abb. 25). Bei diesem Versuch wurde die Kultivierung in Serumflaschen (Batch-Versuch) mit der Kultivierung im Fermenter mit pH-Kontrolle verglichen. Bei der Kultivierung im Fermenter erfolgte zuerst eine diskontinuierliche Begasung, ab Tag 5 wurde die Kultur kontinuierlich mit Syngas begast. Deutlich zu sehen ist der Wachstums-steigernde Effekt der kontinuierlichen Begasung, was auf eine vermehrte Zufuhr an Kohlenstoffquelle zurückzuführen ist.

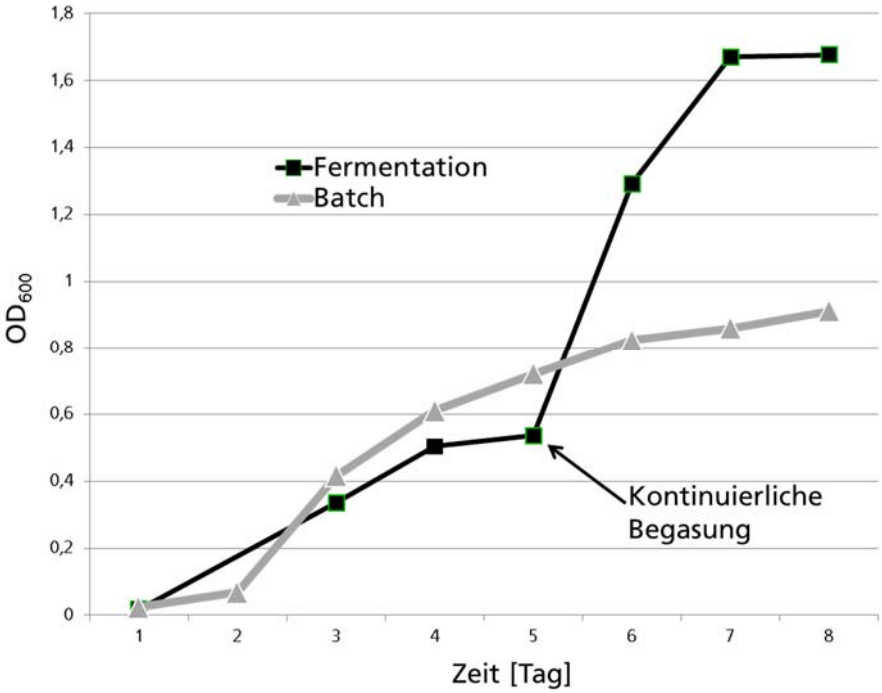

Abb. 25. Vergleich der Syngas-Kultivierung von *C. ljungdahlii* in Serumflaschen und im Fermenter. Bei der Batch-Kultur handelte es sich um Serumflaschen, die verschlossen und dann mit ca. 1 bar Überdruck mit Syngas begast wurden. Bei dem Fermentationslauf wurde 1 bar Überdruck aufgebaut und ab Tag 5 kontinuierlich begast (Dr. S. de Vries).

Der Massetransfer des Gases ins Medium ist ein kritischer Parameter. Hier ist es wichtig, dass möglichst viel Gas im Medium gelöst ist und von den Bakterien aufgenommen werden kann. Um dies zu erreichen wurden verschiedene Möglichkeiten getestet: Zu einem wurde Sintermetall im Vergleich zu einem Begasungsring (Durchmesser ca. 8 cm) betrachtet und der Rührertyp (axial/radial) wurde variiert. Die besten Ergebnisse brachte die Begasung mit dem Sintermetall und mit dem axialen Rührtyp (Daten nicht gezeigt).

Neben den Wachstumsversuchen an *C. ljungdahlii* wurde außerdem getestet, ob das Fermentersystem zur Isopren-Fermentation geeignet ist. Anhand der Zugabe einer definierten Menge an deuteriertem

Isopren (D5-Isopren) in den Fermenter und die Probennahme mittels Headspace-Spritze und anschließender GC-MS/MS Analyse konnte gezeigt werden, dass in einem Batch Prozess ohne kontinuierliche Begasung selbst geringe Menge an Isopren (µg/L) in der Gasphase des Reaktors nach 5 Tagen noch detektierbar sind. Somit wäre zum einen die Identifizierung von Isopren produzierenden Stämmen zum anderen die Quantifizierung von Isopren selbst in geringen Konzentrationen mittels der gezeigten Probenahme möglich. Anhand einer Standardreihe für D5-Isopren-Messungen (Abb. 26) konnte die D5-Isopren-Menge bestimmt werden. Die Standardreihe zeigt eine lineare Abhängigkeit, somit eignet sich die Fermentationsanlage für die Kultivierung Isopren-produzierender Organismen. Des Weiteren gibt es noch weitere Möglichkeiten der Isopren Analytik. Zum einen kann im kleinen Maßstab (10-20 mL Kulturen) die Überschichtung mit einem höher siedenden Lösemittel wie Hexan genutzt werden; eine Flüssig-Flüssig Extraktion, die auch noch zu einer

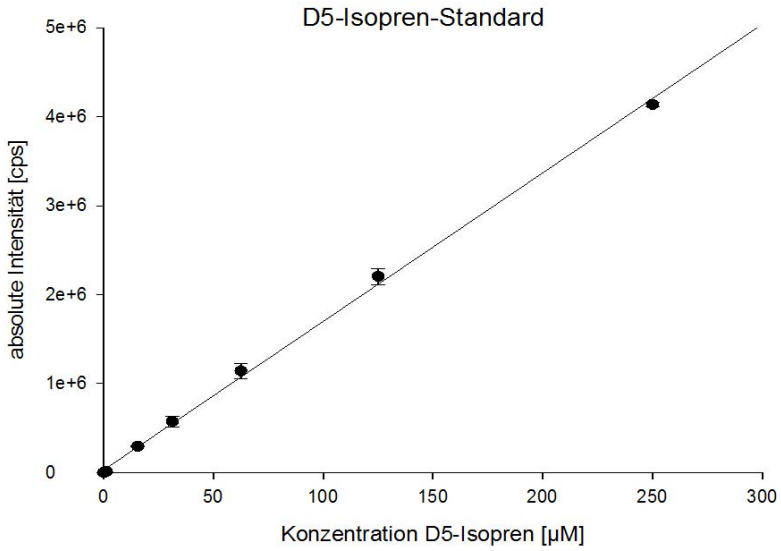

Abb. 26: Standard-Reihe für D5-Isopren. Mit Headspace-Sampling an der GC-MSMS wurden D5-Isopren Proben mit Konzentrationen von 0,003 bis 250 µM in einem Kulturvolumen:Gasvolumen von 1:1 vermessen. Die detektierten Intensitäten zeigen im Vergleich zur Konzentration eine lineare Abhängigkeit.

Anreicherung von Isopren führen könnte. Zum anderen kann für die Fermentation die Nachschaltung einer Kühlfalle bei kontinuierlicher Begasung erfolgen und so das Isopren durch Abkühlung in flüssiger Form gewonnen werden. Oder Absorbermaterial wie z.B. Carbopack X (von SigmaAldrich) kann in die Abluft eingesetzt werden und so eine Gesamtmenge des produzierten Isoprens bestimmt werden.

Die im Kapitel „Untersuchung weiterer Konstrukte in *C. ljungdahlii* (IspS kudzu und MVA-Cluster)“ erstellten rekombinanten *C. ljungdahlii* Stämme wurden parallel zum *C. ljungdahlii* Wildtyp auf

Syngas fermentiert um die Isoprenproduktion vergleichen zu können. Die drei Stämme *C. ljungdahlii* Wildtyp (WT), *C. ljungdahlii* pIM-H-ispS_kudzu (kudzu) und *C. ljungdahlii* pIM-H-MVA (MVA) zeigten mit Syngas (33% CO, 33% CO_2, 33% H_2) als Kohlenstoffquelle und pH-Kontrolle ein sehr ähnliches Wachstumsverhalten bis zu einer OD_{600} von ca. 1,3 (Abb. 27). Die Isoprenproduktion in den drei Stämmen unterschied sich allerdings erheblich (Abb. 28). Nach ca. 62 h der Fermentation wurden die Fermenter für drei Stunden geschlossen, damit das in dem Zeitraum gebildetet Isopren nicht veloren geht und nach dieser Zeit mit der Headspacemethode gemessen. So ist bei dem WT keine Isoprenproduktion erkennbar, bei Kudzu nur eine sehr geringe und bei MVA eine höhere mit einer Konzentration von 0,25 µM in einem Zeitraum von 3 Stunden.

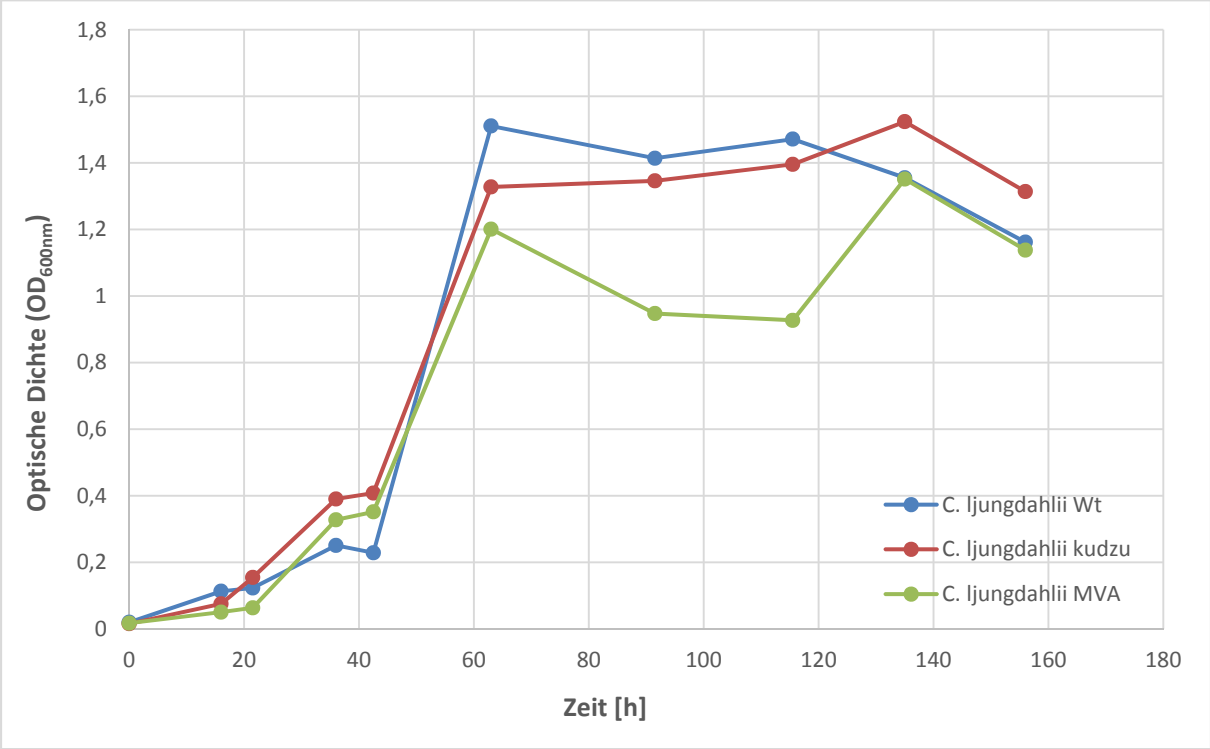

Abb. 27: Wachstumskurven der Parallelfermentationen von *C. ljungdahlii* WT, kudzu und MVA auf Syngas. Die Fermentation fand unter einer kontinuierlichen Begasung von 0,1 nL/min pro Fermenter mit Syngas (33% CO, 33% CO_2, 33% H_2) statt. Außerdem wurde der pH-Wert bei pH 6,0 mit NaOH reguliert.

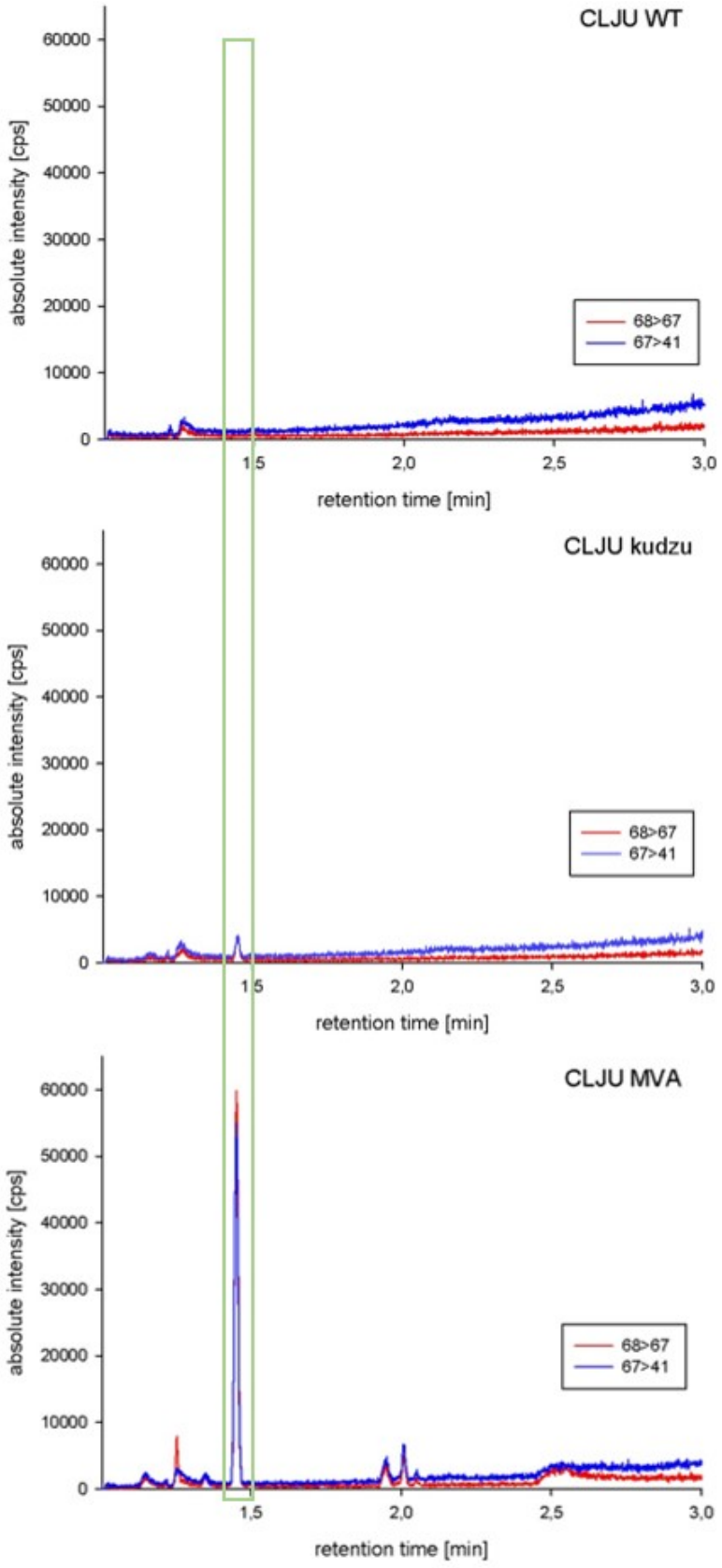

Abb. 28: Chromatogramme der Isoprenmessungen der Fermentationen mit *C. ljungdahlii* WT, *C. ljungdahlii* kudzu und *C. ljungdahlii* MVA. Der Isoprenpeak ist mit einem grünen Kasten markiert. Hier sind die spezifischen MRM-Übergänge (rot: 68>67 m/z; blau: 67>41 m/z) des Isoprens gezeigt. Der Isoprenpeak des WT und von *C. ljungdahlii* kudzu sind zu gering für die Quantifizierung, bei *C. ljungdahlii* MVA wurde 0,25 µM Isopren ermittelt.

d. Zusammenfassung

Ziel dieses Projektes war es, rekombinante Clostridien-Stämme zu erzeugen, die für eine Syngas-basierte Isopren-Fermentation verwendet werden können und diese weiter zu optimieren.

Zu diesem Zweck wurden zunächst verschiedene Syngas-fermentierende Mikroorganismen (*C. autoethanogenum* und *C. ljungdahlii*) untersucht, um einen geeigneten Organismus für die weiteren Arbeiten auszuwählen. Beide Organismen haben mittlerweile ein komplett sequenziertes Genom (ca. 4,5 Mbp), allerdings sind wenige bis gar keine molekularbiologische Werkzeuge für diese Organismen bekannt; so war am Anfang dieser Arbeit für keinen dieser Mikroorganismen eine Transformationsmethode publiziert. *C. autoethanogenum* und *C. ljungdahlii* sind strikt anaerobe Mikroorganismen mit einer geringen Sauerstofftoleranz. Da zur Produktbildung eine gewisse Biomasse notwendig ist, wurde schließlich *C. ljungdahlii* als Wirtsorganismus und für die weiteren Untersuchungen und Forschungen ausgewählt. Nachdem *C. ljungdahlii* für die weitern Experimente ausgewählt wurde, wurde er eingehender untersucht, und verschiedene Methoden hierfür entwickelt und optimiert. So wurde z.B. ein Vektorsystem entwickelt und optimiert, ein *E. coli*/Clostridien-Shuttlevektor erstellt, der eine *oriT*-Region für die Konjugation und Elemente für die genomische Integration von DNA-Fragmenten enthält. Darüber hinaus wurden Transformationsmethoden (Elektroporation und Konjugation) entwickelt und weiter optimiert. Ein Vektor mit *ispS*-Gen (codonoptimiert für *C. ljungdahlii* aus *P. alba*) wurde erstellt, in *E. coli* untersucht und schließlich erfolgreich in *C. ljungdahlii* eingebracht und ins Genom integriert. Bei diesem Stamm konnte keine signifikante Isoprenproduktion festgestellt werden, weder auf Basis von Syngas, noch auf Basis von Zucker. In den *C. ljungdahlii* Stämmen mit integrierter *P. alba* war das Gen nachweisbar, ebenso wie die mRNA der IspS, allerdings konnte nur sehr wenig bis gar kein Protein im Targeted Proteomics gezeigt werden und auch keine Isoprenproduktion, die über das Level der Wildtyp-Produktion hinaus geht, mit der GC-MS/MS detektiert werden. Als denkbare Ursache hierfür wurde die Möglichkeit einer IspS-abbauenden Protease in Betracht gezogen und mit Protein-Verdau-Versuchen untersucht. Unter den hier getesteten Bedingungen konnte allerdings kein proteolytischen Abbau der IspS aus *P. alba* festgestellt werden. Da einige Isoprensynthasen (alle aus Pflanzen) bekannt sind, wurde eine andere bereits in der Literatur gut beschriebene IspS aus *Pueraria montana* (Kudzu) in den Clostridien getestet. Das codonoptimierte Gen wurde in den Shuttlevektor kloniert und mittels Konjugation in *C. ljungdahlii* eingebracht. Mit heterologer Expression zeigte dieser Stamm im Vergleich zum Wildtyp-Stamm eine um 3,5x erhöhte Isoprenproduktion. Da die Isoprenmengen noch sehr gering waren, wurden die Gene des Mevalonatbiosynthesewegs (MVA) ebenfalls in einen Shuttlevektor kloniert und in *C. ljungdahlii* konjugiert. Der hieraus resultierende Stamm zeigte im

Vergleich zum Wildtypstamm eine deutliche Steigerung um das 50-fache der Isoprenproduktion. Diese Stämme wurden anschließend in einer 2 L Fermentation mit Syngas (1:1:1) als Kohlenstoffquelle kultiviert. Auch hier waren deutliche Unterschiede in der Isoprenproduktion zwischen *C. ljungdahlii* Wildtyp, *C. ljungdahlii* mit IspS-kudzu und *C. ljungdahlii* mit MVA-Biosyntheseweg detektierbar. Der *C. ljungdahlii*-Stamm mit pIM-H-MVA produziert bis zu 0,25 µM Isopren in 3 Stunden. Dies ist eine sehr geringe Menge Isopren, zeigt aber, dass *C. ljungdahlii* durch gentechnische Manipulation in der Lage ist, Isopren auf Basis von Syngas zu produzieren.

e. Literatur

Bengelsdorf, F.R., Straub, M. and Dürre, P. (2013) Bacterial synthesis gas (syngas) fermentation. *Environmental technology*, **34**, 1639-1651.

Bentley, F.K., Zurbriggen, A. and Melis, A. (2014) Heterologous expression of the mevalonic acid pathway in cyanobacteria enhances endogenous carbon partitioning to isoprene. *Molecular plant*, **7**, 71-86.

Bruno-Barcena, J.M., Chinn, M.S. and Grunden, A.M. (2013) Genome sequence of the autotrophic acetogen *Clostridium autoethanogenum* JA1-1 Strain DSM 10061, a producer of ethanol from carbon monoxide. *Genome announcements*, **1**.

Choi, K.H., Kumar, A. and Schweizer, H.P. (2006) A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. *Journal of microbiological methods*, **64**, 391-397.

Cotter, J.L., Chinn, M.S. and Grunden, A.M. (2009) Ethanol and acetate production by *Clostridium ljungdahlii* and *Clostridium autoethanogenum* using resting cells. *Bioproc Biosyst Eng*, **32**, 369-380.

Figurski, D.H. and Helinski, D.R. (1979) Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **76**, 1648-1652.

Hartley, J.L., Temple, G.F. and Brasch, M.A. (2000) DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome research*, **10**, 1788-1795.

Hess, B.M., Xue, J., Markillie, L.M., Taylor, R.C., Wiley, H.S., Ahring, B.K. and Linggi, B. (2013) Coregulation of terpenoid pathway genes and prediction of isoprene production in *Bacillus subtilis* using transcriptomics. *Plos One*, **8**, e66104.

Hong, S.Y., Zurbriggen, A.S. and Melis, A. (2012) Isoprene hydrocarbons production upon heterologous transformation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Microbiol*, **113**, 52-65.

Jones, C.A. and Rasmussen, R.A. (1975) Production of isoprene by leaf tissue. *Plant Physiol*, **55**, 982-987.

King, J., Mochalski, P., Unterkofler, K., Teschl, G., Klieber, M., Stein, M., Amann, A. and Baumann, M. (2012) Breath isoprene: muscle dystrophy patients support the concept of a pool of isoprene in the periphery of the human body. *Biochemical and biophysical research communications*, **423**, 526-530.

Köpke, M., Held, C., Hujer, S., Liesegang, H., Wiezer, A., Wollherr, A., Ehrenreich, A., Liebl, W., Gottschalk, G. and Dürre, P. (2010) *Clostridium ljungdahlii* represents a microbial production platform based on syngas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**, 13087-13092.

Köpke, M., Mihalcea, C., Bromley, J.C. and Simpson, S.D. (2011) Fermentative production of ethanol from carbon monoxide. *Current opinion in biotechnology*, **22**, 320-325.

Kuzma, J., Nemecekmarshall, M., Pollock, W.H. and Fall, R. (1995) Bacteria produce the volatile hydrocarbon isoprene. *Curr Microbiol*, **30**, 97-103.

Kuzuyama, T. (2002) Mevalonate and nonmevalonate pathways for the biosynthesis of isoprene units. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, **66**, 1619-1627.

Landy, A. (1989) Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annu Rev Biochem*, **58**, 913-949.

Latif, H., Zeidan, A.A., Nielsen, A.T. and Zengler, K. (2014) Trash to treasure: production of biofuels and commodity chemicals via syngas fermenting microorganisms. *Current opinion in biotechnology*, **27**, 79-87.

Leang, C., Ueki, T., Nevin, K.P. and Lovley, D.R. (2013) A genetic system for *Clostridium ljungdahlii*: a chassis for autotrophic production of biocommodities and a model homoacetogen. *Appl Environ Microbiol*, **79**, 1102-1109.

Lindberg, P., Park, S. and Melis, A. (2010) Engineering a platform for photosynthetic isoprene production in cyanobacteria, using *Synechocystis* as the model organism. *Metab Eng*, **12**, 70-79.

Lindblad, P., Lindberg, P., Oliveira, P., Stensjo, K. and Heidorn, T. (2012) Design, engineering, and construction of photosynthetic microbial cell factories for renewable solar fuel production. *Ambio*, **41 Suppl 2**, 163-168.

Lynd, L., Kerby, R. and Zeikus, J.G. (1982) Carbon monoxide metabolism of the methylotrophic acidogen *Butyribacterium methylotrophicum*. *Journal of bacteriology*, **149**, 255-263.

Miller, B., Oschinski, C. and Zimmer, W. (2001) First isolation of an isoprene synthase gene from poplar and successful expression of the gene in *Escherichia coli*. *Planta*, **213**, 483-487.

Mock, J., Zheng, Y., Mueller, A.P., Ly, S., Tran, L., Segovia, S., Nagaraju, S., Köpke, M., Dürre, P. and Thauer, R.K. (2015) Energy conservation associated with ethanol formation from H_2 and CO_2 in *Clostridium autoethanogenum* involving electron bifurcation. *Journal of bacteriology*, **197**, 2965-2980.

Munasinghe, P.C. and Khanal, S.K. (2010) Syngas fermentation to biofuel: evaluation of carbon monoxide mass transfer coefficient (kLa) in different reactor configurations. *Biotechnology progress*, **26**, 1616-1621.

Nieto, C., Fernandez-Tresguerres, E., Sanchez, N., Vicente, M. and Diaz, R. (1990) Cloning vectors, derived from a naturally occurring plasmid of *Pseudomonas savastanoi*, specifically tailored for genetic manipulations in *Pseudomonas*. *Gene*, **87**, 145-149.

Petersen, D.J., Welch, R.W., Walter, K.A., Mermelstein, L.D., Papoutsakis, E.T., Rudolph, F.B. and Bennett, G.N. (1991) Cloning of an NADH-dependent butanol dehydrogenase gene from *Clostridium acetobutylicum*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **646**, 94-98.

Ragsdale, S.W. and Pierce, E. (2008) Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl pathway of CO_2 fixation. *Biochimica et biophysica acta*, **1784**, 1873-1898.

Roh, H., Ko, H.J., Kim, D., Choi, D.G., Park, S., Kim, S., Chang, I.S. and Choi, I.G. (2011) Complete genome sequence of a carbon monoxide-utilizing acetogen, *Eubacterium limosum* KIST612. *Journal of bacteriology*, **193**, 307-308.

Sharkey, T.D., Gray, D.W., Pell, H.K., Breneman, S.R. and Topper, L. (2013) Isoprene synthase genes form a monophyletic clade of acyclic terpene synthases in the TPS-B terpene synthase family. *Evolution; international journal of organic evolution*, **67**, 1026-1040.

Tanner, R.S., Miller, L.M. and Yang, D. (1993) *Clostridium ljungdahlii* sp. nov., an acetogenic species in clostridial rRNA homology group I. *International journal of systematic bacteriology*, **43**, 232-236.

Weissermel, K. and Arpe, H.J. (1998) *Industrielle Organische Chemie: Bedeutende Vor- und Zwischenprodukte. 5th Ed. Wiley-VCH. Weinheim*.

Westfall, P.J., Pitera, D.J., Lenihan, J.R., Eng, D., Woolard, F.X., Regentin, R., Horning, T., Tsuruta, H., Melis, D.J., Owens, A., Fickes, S., Diola, D., Benjamin, K.R., Keasling, J.D., Leavell, M.D., McPhee, D.J., Renninger, N.S., Newman, J.D. and Paddon, C.J. (2012) Production of amorphadiene in yeast, and its conversion to dihydroartemisinic acid, precursor to the antimalarial agent artemisinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**, E111-118.

Wiberley, A.E., Donohue, A.R., Meier, M.E., Westphal, M.M. and Sharkey, T.D. (2008) Regulation of isoprene emission in *Populus trichocarpa* leaves subjected to changing growth temperature. *Plant Cell Environ*, **31**, 258-267.

Williams, D.R., Young, D.I. and Young, M. (1990) Conjugative plasmid transfer from *Escherichia coli* to *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of general microbiology*, **136**, 819-826.

Wood, H.G. (1991) Life with CO or CO_2 and H_2 as a source of carbon and energy. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **5**, 156-163.

Yang, J.M., Xian, M., Su, S.Z., Zhao, G., Nie, Q.J., Jiang, X.L., Zheng, Y.N. and Liu, W. (2012) Enhancing production of bio-isoprene using hybrid MVA pathway and isoprene synthase in *E. coli*. *Plos One*, **7**.

f. In diesem Projekt wurden unterschiedliche Arbeitspakete und Meilensteine festgelegt:

Arbeitspaket 1: Isoprensynthase IspS aus Pappel (*Populus alba*) soll ins Genom von *C. autoethanogenum* integriert werden. Zeigen der heterologen Expression mittels Targeted Proteomics. Überprüfung des Integrations-Locus mittels Genomsequenzierung. Anschließend Resistenz aus dem Genom wieder herausrekombinieren.

Ergebnis: Die Isoprensynthase aus *P. alba* (codonoptimiert) konnte in das Genom von *C. ljungdahlii* eingebracht werden. Allerdings zeigte dieser Stamm keine Isoprenproduktion, die signifikant über der des Wildtypstammes lag. Die alternative Isoprensynthase, die hier verwendet wurde aus *Pueraria montana* (kudzu), zeigt in *C. ljungdahlii* eine deutliche Isoprenproduktion und das Peptid IspS-kudzu ist auch im Zellextrakt von *C. ljungdahlii* nachweisbar, allerdings liegt das *ispS*-kudzu-Gen bisher noch nicht genomisch integriert vor und kann daher nicht direkt mit dem Integrationsstamm verglichen werden.

Arbeitspaket 2: Fermentationsanlage auf die Gewinnung von Isopren auslegen. GC/MS Messungen auf Isopren auslegen. Fermentation.

Ergebnis: Die Fermentationsanlagen wurden von zwei Fermenter auf drei aufgerüstet und stehen zur Syngasfermentation bereit. Sie können durch eine Gasmischanlage mit verschiedenen Gas-Mixturen begast werden. Zur Detektion und Quantifizierung von Isopren wurden an der GC-MS/MS Headspace-Methoden entwickelt. Die entwickelten Stämme konnten auf Basis von Syngas (33% CO, 33% CO_2, 33% H_2) fermentiert werden.

Arbeitspaket 3: Zusammenbau des MVA-Wegs im pIM-traJ. Genomische Integration in einen *C. autoethanogenum*-Stamm, der bereits die IspS trägt. Analyse.

Der MVA-Biosyntheseweg wurde zusammen mit der IspS aus Kudzu in den pIM-Shuttlevektor kloniert und in *C. ljungdahlii* konjugiert. Es konnte eine deutlich gesteigerte Isoprenproduktion ermittelt werden und die Peptide der meisten Proteine im Targeted Proteomics gezeigt werden.

Arbeitspaket 4: Fermentation rekombinanter Stämme + Untersuchung der Isopren-Produktion. Fermentationsparameter variieren. Verschiedene Syngas-Zusammensetzungen testen.

Ergebnis: Die erstellten *C. ljungdahlii* Stämme wurden in den Fermentern mit Syngas (33% CO, 33% CO_2, 33% H_2) als Kohlenstoffquelle kultiviert und der Stamm *C. ljungdahlii* mit pIM-H-MVA zeigte

unter diesen Bedingungen eine Isoprenproduktion von 0,25 µM in 3 Stunden. Auch im Targeted Proteomics konnten die meisten Proteine gezeigt werden.

Darüber hinaus sollten zur Unterstützung und Überprüfung zwei Meilensteine die Arbeit erleichtern:

Meilenstein 1 (zu erreichen innerhalb der ersten 12 Projektmonate): Genomische Integration der *P. alba* Isopren-Synthase in das Genom von *C. ljungdahlii* und Etablierung einer geeigneten Analytik für den Isopren-Nachweis in der Syngas-Fermentation.

Ergebnis: Die genomische Integration der *P. alba* Isopren-Synthase in *C. ljungdahlii* Zellen war erfolgreich und konnte durch Inverse PCR und Sequenzierung bestätigt werden. Für die Isoprenanalytik konnten sowohl eine SPME-Methode als auch eine Headspace Spritzen Methode entwickelt werden, welche die Detektion von Isopren bis in den ng/ L – Bereich ermöglichen.

Meilenstein 2 (zu erreichen innerhalb der ersten 18 Projektmonate): Nachweis der Fermentation von Isopren auf Basis von Syngas (Proof-of-Concept).

Ergebnis: Mit den Konstrukten pIM-H-ispS_kudzu und pIM-H-MVA konnte in einer Endpunktbestimmung eine Isoprenproduktion von 0,3 µM (pIM-H-ispS_kudzu) und 3,7 µM (pIM-H-MVA) auf Basis von Zucker (Fruktose) und eine Produktion von 0,25 µM in 3 h in *C. ljungdahlii* mit pIM-H-MVA in einer Syngasfermentation (33% CO, 33% CO_2, 33% H_2) festgestellt werden.

2. Verwertung

Die Herstellung von Aceton, Butanol und Ethanol mittels des Weizmann-Prozesses (Clostridien basierte Fermentation) stellte ein sehr frühes fermentatives Verfahren dar, welches schon in einem sehr großen Maßstab industriell eingesetzt wurde. Ebenfalls zeichnet sich ab, dass die Synthesegas-basierte Fermentation von Ethanol mittels *Clostridium ljungdahlii* industriell umsetzbar ist. Somit besitzt das Feld der anaeroben Fermentation mittels Clostridien (nicht gentechnologisch verändert) einen sogenannten guten „Track-Record“. Prozesse basierend auf rekombinanten Clostridien-Stämmen wurden bis heute industriell noch nicht umgesetzt, eine zu überkommende Limitierung stellt hier noch die zu geringe Leistungsfähigkeit dar (volumetrische Ausbeute an Produkten). Jedoch ist davon auszugehen, dass mittels traditioneller und moderner Stammverbesserungsmethoden diese Limitierungen überkommen werden können. Somit besitzen rekombinante Clostridien-basierte Prozesse erhebliches Potential im Besonderen auch im Bereich heute nicht konventionell genutzter Kohlenstoffquellen wie industrieller Abgase (Konvertergas) oder auch in der Verwertung von Hausmüll, welcher auch zu einem Großteil aus Cellulose bestehen kann. Eine industrielle Umsetzung hängt aber sehr stark von den wirtschaftlichen und auch regulatorischen Gegebenheiten (z.B. Werthaltigkeit von CO_2 Zertifikaten) ab. Bei dem aktuellen Überangebot an fossilen Kohlenstoffquellen ist eine Umsetzung schwierig, jedoch ist eine Änderung dieser Rahmenbedingungen auf mittelfristige und vor allem langfristige Sicht absehbar. Gegenüber konkurrierenden im Besonderen aeroben Fermentationsverfahren zu Biokraftstoffen, stellt sich die anaerobe Fermentation als äußerst kostengünstig dar. Mit der Verwendung von Syngas können zusätzlich Limitierungen konventioneller Biokraftstofferzeugung überkommen werden, wie z.B. im Bereich von heterogener verfügbarer Biomasse oder auch der Konkurrenz zu Lebensmittelanwendungen. Prinzipiell kann jedes organisches Material in Syngas überführt werden und somit für die Syngas-Fermentation genutzt werden. Außerdem besitzen anaerobe Fermentationsverfahren eine für aerobe Fermentationen unerreichbare Kohlenstoffeffizienz.

Durch mehrere laufende Projekte im Bereich Metabolic Engineering ist eine wissenschaftliche Anschlussfähigkeit bzw. Kontinuität der begonnenen Arbeiten hergestellt. Die im Projekt begonnenen Arbeiten werden im Rahmen einer Industrie-Kooperation mit der japanischen Firma Sekisui fortgeführt.

3. Erkenntnisse von Dritten

In 2014 wurden zwei Patentanmeldungen offengelegt (WO2013180584A1 und WO20133181647A2), welche sich ebenfalls mit dem Thema der Synthesegas basierten Isopren-Biosynthese befassen. Interessanter Weise gelang es jedoch in keiner der beiden Anmeldungen eine Isopren-Synthese durch die rekombinanten Clostridium-Stämme nachzuweisen. Nach Rücksprache mit unseren Patentanwälten bestehen daher kaum große Aussichten darauf, dass die beiden eingereichten Patentanmeldungen zu einer Erteilung der darin gemachten Ansprüche führen. Nach Auffassung unserer Patentanwälte stellen die beiden gemachten Anmeldungen selbst Ihre technische Durchführbarkeit in Frage. Ebenfalls ist uns eine Publikation aufgefallen Kiriukin M & Tyurin M (2014) Bioprocess. Biosyst. Eng. 37: 245-260, in welcher es gelang basierend auf Syngas bis zu 18 g/l Mevalonat zu fermentieren. Mevalonat eine Zwischenprodukt des Mevalonatwegs, stellt somit eine Vorstufe des Isoprens dar. Ansonsten sind uns keine weiteren Publikationen/Ergebnisse Dritter bekannt geworden die für die Durchführbarkeit des Vorhabens von direkter Relevanz gewesen wären.

4. Veröffentlichungen

Aktuell werden 2 Publikationen vorbereitet, eine Publikation zum Thema Metabolic Engineering von *C. ljungdahlii* zur Isopren Produktion, und eine zweite Publikation über die erstellten und verwendeten Shuttle-Vektoren und molekularbiologischen Arbeiten im Bereich der Transformation/Konjugation von *C. ljungdhalii*.

Konferenzen:

2014

Poster: Nicole Schnaß, Gabriele Philipps, Sebastian de Vries, Christian Janke und Stefan Jennewein “Development of a Highly Efficient Gene Delivery System for Syngas Fermenting Clostridia“ Clostridium 2014 Conference, 19.-21. September 2014, Shanghai, China

Präsentation: Nicole Schnaß, Christian Janke und Stefan Jennewein „Metabolic engineering of Clostridia to produce isoprene from syngas“ ProcessNet Jahrestagung und 31. Dechema Jahrestagung der Biotechnologen , 30.September-2.Oktober 2014, Aachen, Deutschland

2015

Poster: Christian Janke, Gabriele Philipps, Nicole Schnaß, Jens Lennartz, Andreas Wittgens und Stefan Jennewein “Development of a Syngas-based Fermentation for Isoprenoid Synthesis” Terpnet 2015, 1.-5. Juni 2015, Vancouver, Canada

Poster: Nicole Schnaß, Gabriele Philipps, Sebastian de Vries, Christian Janke und Stefan Jennewein “Development of a Highly Efficient Gene Delivery System for Syngas Fermenting Clostridia“ SSBSS Taormina 2015, 5.-9.July 2015, Taormina, Italien