

Bernburg
Dessau
Köthen



Hochschule Anhalt
Anhalt University of Applied Sciences

**Fachbereich Angewandte Biowissenschaften
und Prozesstechnik**

Ermittlung und Untersuchung von Bakterien zur Herstellung von Acetoin und 2,3-Butandiol

Bachelorarbeit

zur Erlangung des akademischen Grades

Bachelor of Science (B.Sc.)

Haberland, Claudia

Mat.- Nr.: 4058143

Studiengang: Biotechnologie

1. Gutachter: Prof. Reinhard Pätz

2. Gutachter: Dipl.-Wirtsch.-Ing. Jan-Henryk Richter-Listewnik

Datum der Abgabe: 27.10.2016

Inhaltsverzeichnis

1.	Abkürzungsverzeichnis.....	III
2.	Abbildungsverzeichnis.....	IV
3.	Tabellenverzeichnis.....	VI
4.	Zielstellung dieser Arbeit.....	1
5.	Theoretische Grundlagen.....	1
5.1.	Allgemeine Übersicht über Acetoin.....	1
5.2.	Allgemeine Übersicht über 2,3-BDO.....	2
5.3.	Bakterielle Produzenten von Acetoin und 2,3-BDO.....	4
5.4.	Der Acetoin/2,3-BDO-Stoffwechselweg in den verschiedene Bakterien.....	6
6.	Materialien und Methoden.....	10
6.1.	Chemikalien.....	10
6.2.	Geräte.....	10
6.3.	Der Biostat Q – Aufbau und Funktionsweise.....	12
6.4.	Mikroorganismen-Stämme.....	13
6.5.	Vorkultur- und Medien-Herstellung.....	13
6.6.	Übersicht über die verwendete Analytik.....	16
7.	Ergebnisse.....	17
7.1.	Fermentation mit <i>Bacillus subtilis</i> DSM 2109.....	17
7.2.	Fermentation mit <i>Methylobacter rhodesianum</i> MB 126, MB 127.....	18
7.3.	Fermentation mit <i>Bacillus pumilus</i> DSM 361.....	20
7.4.	Fermentation mit <i>Bacillus pumilus</i> DSM 27.....	23
7.5.	Fermentation mit <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM 7.....	24
7.6.	Fermentation mit <i>Geobacillus kaustophilus</i> DSM 7263.....	25
8.	Diskussion.....	27
8.1.	Wachstum der verschiedenen Stämme.....	27
8.2.	Produktbildung der verschiedenen Stämme.....	32
8.2.1.	Produkte bei <i>B. subtilis</i> DSM 2109.....	32
8.2.2.	Produkte bei <i>M. rhodesianum</i> MB 126, MB 127.....	34
8.2.3.	Produkte bei <i>Bacillus pumilus</i> DSM 361.....	37
8.2.4.	Produkte bei <i>Bacillus pumilus</i> DSM 27.....	40
8.2.5.	Produkte bei <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM 7.....	42
8.2.6.	Produkte bei <i>Geobacillus kaustophilus</i> DSM.....	44
9.	Zusammenfassung.....	46

10. Ausblick	48
Literaturverzeichnis.....	49
11. Eidesstattliche Erklärung.....	52

1. Abkürzungsverzeichnis

2,3 -BDO = 2,3 -Butandiol

B. amyloliquefaciens = *Bacillus amyloliquefaciens*

B. pumilus = *Bacillus pumilus*

B. subtilis = *Bacillus subtilis*

BTS = Biotrockensubstanz

G. kaustophilus = *Geobacillus kaustophilus*

GC = Gaschromatograph

Glc.-Konz. = Glucose-Konzentration

GRAS = Generally Recognized as Safe

HB = 3-hydroxy-2-butanon (Acetoin)

M rhodesianum = *Methylobacter rhodesianum*

MO = Mikroorganismus

NADH/H⁺ = Nicotinamidadenindinukleotid

PHB = Polyhydroxybuttersäure

S1 = Sicherheitsklasse 1

2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 R-Acetoin (Yikrazuul, 2010).....	2
Abbildung 2 Die verschiedenen Stereoisomere von 2,3-BDO in der FISCHER-Projektion, zu sehen ist bei a) die linksdrehende Variante, bei b) die rechtsdrehende und bei c) die optisch inaktive meso-Form (Syu, 2001).....	3
Abbildung 3 Bakterielle Produzenten von Acetoin in ihren jeweiligen Gattungen zusammengefasst (Xiao, et al., 2014).....	6
Abbildung 5 Die beiden HB/2,3-BDO-Stoffwechselwege, die am häufigsten in Bakterien beschriftet werden	7
Abbildung 4 Der am häufigsten beschriftete Stoffwechselweg in Bakterien zur Produktion von Acetoin bzw. 2,3-Butandiol (Celinska, et al., 2009).....	7
Abbildung 6 Die verschiedene Wachstumsphasen einer Mikroorganismen-Kultur, logarithmisch über der Zeit aufgetragen als lebensfähige Organismen pro ml und als optische Dichte (Spektrum Akademischer Verlag, 2001)	9
Abbildung 7 Der Biostat Q während einer Fermentation	12
Abbildung 8 Die Glucose-Konzentration während der Fermentation mit <i>B. subtilis</i> unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen	17
Abbildung 9 Die BTS-Konzentration während der <i>B. subtilis</i> Fermentation in Abhängigkeit von verschiedenen Sauerstoffbedingungen	18
Abbildung 10 Die Glucose-Konzentration im Verlauf der Fermentation mit <i>M. rhodesianum</i> ohne Ethanol unter Einwirkung verschiedener Sauerstoffbedingungen	18
Abbildung 11 Die BTS-Konzentration während der Fermentation mit <i>M. rhodesianum</i> ohne Ethanol unter Einwirkung verschiedener Sauerstoffkonzentrationen.....	19
Abbildung 12 Der Verlauf der Glucose-Konzentration während der Fermentation mit <i>M. rhodesianum</i> mit Ethanol unter Einwirkung verschiedener Sauerstoffbedingungen.....	19
Abbildung 13 Die BTS-Konzentration während der Fermentation mit <i>M. rhodesianum</i> mit Ethanol unter Einwirkung verschiedener Sauerstoffbedingungen	20
Abbildung 14 Die BTS-Konzentrationen aller 4 Fermentoren mit <i>B. pumilus</i> in Abhängigkeit von der Begasungsrate	20
Abbildung 15 Die Glucose-Konzentration aller 4 Fermentoren in Abhängigkeit von der Begasungsrate über der Laufzeit von 24 h	21
Abbildung 16 Die BTS-Konzentration der fed-batch Fermentation mit <i>B. pumilus DSM 361</i> in Abhängigkeit von den Sauerstoffbedingungen.....	22
Abbildung 17 Die Glucose-Konzentration während der fed-batch Fermentation mit <i>B. pumilus DSM 361</i> in Abhängigkeit von den Sauerstoffbedingungen	22
Abbildung 18 Die BTS-Konzentration von <i>B. pumilus DSM 27</i> während der fed-batch Fermentation in Abhängigkeit von der Begasungsrate.....	23
Abbildung 19 Die Glucose-Konzentration der <i>B. pumilus DSM 27</i> fed-batch Fermentation in Abhängigkeit von den Sauerstoffbedingungen	24
Abbildung 20 Die Glucose-Konzentration im Verlauf der <i>B. amyloliquefaciens</i> Fermentation in Abhängigkeit von verschiedenen Sauerstoffbedingungen	25
Abbildung 21 Die BTS-Konzentration von <i>G. kaustophilus</i> in Abhängigkeit von verschiedenen Sauerstoffbedingungen	26
Abbildung 22 Die Glucose-Konzentration während der Fermentation von <i>G. kaustophilus</i> in Abhängigkeit von verschiedenen Sauerstoffbedingungen.....	26

Abbildung 23 Die Acetoin-Konzentration bei <i>B. subtilis</i> in Abhängigkeit von verschiedenen Sauerstoffbedingungen	32
Abbildung 24 Die 2,3-BDO-Konzentration in Abhängigkeit von der Sauerstoffzufuhr	33
Abbildung 25 Die Acetoin-Konzentration während der Fermentation mit <i>M. rhodesianum</i> ohne Ethanol in Abhängigkeit von der Sauerstoffzufuhr	34
Abbildung 26 Die 2,3-Butandiol-Konzentration während der Fermentation mit <i>M. rhodesianum</i> ohne Ethanol in Abhängigkeit von der Sauerstoffzufuhr	34
Abbildung 27 Die Acetoin-Konzentration während der Fermentation mit <i>M. rhodesianum</i> mit Ethanol in Abhängigkeit von verschiedenen Sauerstoffbedingungen	35
Abbildung 28 Die 2,3-Butandiol-Konzentration während der Fermentation mit <i>M. rhodesianum</i> mit Ethanol in Abhängigkeit von verschiedenen Sauerstoffbedingungen	36
Abbildung 29 Die Acetoin-Konzentration während der batch-Fermentation mit <i>B. pumilus DSM 361</i> in Abhängigkeit von verschiedenen Sauerstoffbedingungen	37
Abbildung 30 Die 2,3-Butandiol-Konzentration während der batch-Fermentation mit <i>B. pumilus DSM 361</i> in Abhängigkeit von verschiedenen Sauerstoffbedingungen.....	37
Abbildung 31 Die Acetoin-Konzentration während der fed-batch Fermentation mit <i>B. pumilus DSM 361</i> in Abhängigkeit von verschiedenen Sauerstoffmilieus	38
Abbildung 32 Die 2,3-Butandiol-Konzentration während der fed-batch Fermentation mit <i>B. pumilus DSM 361</i> in Abhängigkeit von verschiedenen Sauerstoffmilieus	39
Abbildung 33 Die Acetoin-Konzentration während der fed-batch Fermentation bei <i>B. pumilus DSM 27</i> in Abhängigkeit von verschiedenen Sauerstoffbedingungen	40
Abbildung 34 Die 2,3-Butandiol-Konzentration während der fed-batch Fermentation mit <i>B. pumilus DSM 27</i> in Abhängigkeit von den Sauerstoffbedingungen	41
Abbildung 35 Die Acetoin-Konzentration während der <i>B. amyloliquefaciens</i> Fermentation in Abhängigkeit von verschiedenen Sauerstoffbedingungen	42
Abbildung 36 Die 2,3-Butandiol-Konzentration während der Fermentation mit <i>B. amyloliquefaciens</i> in Abhängigkeit von verschiedenen Sauerstoffbedingungen	42
Abbildung 37 Die Acetoin-Konzentration während der Fermentation mit <i>G. kaustophilus</i> unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen	44
Abbildung 38 Die 2,3-Butandiol-Konzentration während der Fermentation mit <i>G. kaustophilus</i> unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen	44

3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Verwendete Chemikalien	10
Tabelle 2 Verwendete Geräte	10
Tabelle 3 Zusammensetzung des LB-Mediums im batch-Betrieb	13
Tabelle 4 Fermentationsmedium für den fed-batch-Versuch.....	14
Tabelle 5 Fermentationsmedium für <i>B. amyloliquefaciens</i> DSM 7	14
Tabelle 6 Vorkulturmedium für <i>B. amyloliquefaciens</i> DSM 7	15
Tabelle 7 Fermentationsmedium für <i>G. kaustophilus</i> DSM 7263	15
Tabelle 8 Vergleich der verschiedenen Bakterien-Stämme mithilfe weiterer Wachstumsparameter	30

4. Zielstellung dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Bachelor-Arbeit sollte auf den Erfahrungen des vorangegangenen Praktikums aufgebaut werden, um weitere Erkenntnisse zu gewinnen. Es sollten weiterhin Bakterien auf ihre Eigenschaft hin, Acetoin und/oder 2,3-Butandiol zu produzieren, untersucht werden. Grundlage hierfür war eine vorhergehende Literaturrecherche, die eigenständig durchzuführen war. Das Augenmerk lag dabei auf GRAS-Mikroorganismen oder solchen, die der Sicherheitsklasse 1 angehören. Nach der Auswahl geeigneter Kandidaten sollten die Versuche im Labor unter den vorgegebenen Bedingungen wiederholt werden, um belastbare Ergebnisse zu erzielen. Des Weiteren sollten die gewonnenen Erfahrungen bzgl. des selbsttätigen Fermentierens und Analysierens vertieft und trainiert werden. Ebenso das Schreiben von wissenschaftlichen Arbeiten. Zum Schluss sollten aus den untersuchten Kandidaten 2 oder 3 Kandidaten gewählt werden, mit denen in Zukunft eine Mischkulturfermentation mit einer Hefe durchgeführt wird.

5. Theoretische Grundlagen

5.1. Allgemeine Übersicht über Acetoin

Acetoin, chemisch 3-Hydroxy-2-butanon, ist eine Chemikalie organischen Ursprungs, die insbesondere in der Lebensmittel-, Kosmetik- und landwirtschaftlichen Industrie Anwendung findet. Des Weiteren dient sie auch als Precursor für weitere Chemikalien in der chemischen Industrie. Dazu gehört unter anderem 2,3-Butandiol, ein Grundlagenstoff in der Kautschuk- und Frostschutzmittelherstellung. Die bisherige Herstellung, die auf fossilen Energieträgern beruht, ist stark umweltschädlich und muss unter aggressiven Konditionen durchgeführt werden. Daher rückt langsam der Fokus der Industrie auf die biotechnologische Herstellung mithilfe von Mikroorganismen. Hefen erwiesen sich dabei als schlechte Kandidaten mit einer maximalen Ausbeute von 6,9 g/l Acetoin bei *Candida colliculosa* (Yadav, et al., 1975). Bakterien hingegen konnten mit dem Vorhandensein eines eigenen Stoffwechselweges für Acetoin und 2,3-BDO überzeugen. Weitere Informationen zu bakteriellen Produzenten sind im nächsten Kapitel zu finden.

Acetoin wird im Allgemeinen als weißlich-gelbliche Flüssigkeit beschrieben, die mit einem joghurtähnlichem Geruch und einem buttrigen Geschmack aufwartet. Es wird von

der Lebensmittelindustrie zur Aromatisierung verschiedenster Produkte benutzt. Wegen seines angenehmen Geruchs wird es auch in der Kosmetik-Industrie angewendet, um Cremes und Lotionen aufzuwerten. Auch Zigaretten oder Waschmittel werden mit dieser Substanz versetzt. Sie ist seit 1998 von der WHO als ungefährlicher Aromastoff anerkannt (World Health Organization, 2010). Ein weiterer oben genannter Schwerpunkt ist die Landwirtschaft, wo es zweierlei Nutzen erfüllt. Zu einen wirkt Acetoin wachstumsstimulierend auf Pflanzen (Ping, et al., 2004), zum anderen wurde beobachtet, dass es anziehend auf Insekten wirkt. Dies kann genutzt werden, um biologische Fallen auszulegen, um Schädlinge zu eliminieren. (Chen, et al., 2011) Solche Fallen wären umweltfreundlicher und leichter in der Handhabung für die Landwirte anstelle der bisher verwendeten Pestizide. Des Weiteren wird es vielfach in der chemischen Industrie als Precursor eingesetzt.

Chemisch betrachtet gehört Acetoin zur Gruppe der Alkohole, die unter anderem bei der gemischten Säurefermentation als Zwischenschritt entsteht. Es ist ein C₄-Stoff, der sowohl in Bakterien als auch in Säugetieren und Pflanzen natürlich vorkommt. (PubChem Open Chemistry Database, 2016). Da 4 Kohlenstoff-Atome vorliegen kann sich ein Chiralitätszentrum bilden, sodass wir 2 Stereoisomere vorliegen haben. Es gibt ein R-Isomer und ein S-Isomer. Der Unterschied zwischen beiden ist die Lage der Hydroxygruppe am 3. Kohlenstoffatom.

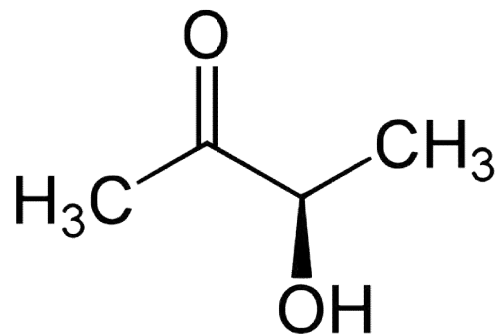


Abbildung 1 R-Acetoin (Yikrazuul, 2010)

5.2. Allgemeine Übersicht über 2,3-BDO

2,3-BDO hingegen ist eine farb- und geruchlose Flüssigkeit, die überwiegend in der chemischen Industrie genutzt wird. Sie dient als Basis für die Produktion von synthetischem Kautschuk, Frostschutzmittel oder Kraftstoffzusatz. (Syu, 2001). Früher erfolgte die Herstellung von 2,3-BDO mithilfe einer gemischten Säuregärung, in der Biotechnologie bekannt als ABE/ABI-Prozess. Bei diesem wurde mithilfe von *Clostridium acetobutylicum* oder *C. beijerinckii* aus zuckerhaltigen Abfallstoffen ein Gemisch verschiedenster Säuren und Alkohole wie Ethanol, Butanol oder Essigsäure

gewonnen. (Maddox, 1989) Die Probleme hierbei waren jedoch die geringen Konzentrationen an Produkt die entstanden, da die genannten Stoffe in größeren Mengen inhibierend auf die MO wirken. Die Nutzung von fed-batch-Verfahren oder solchen mit Biomasserückhaltung vergrößerte zwar die Ausbeute. Aufgrund der Konkurrenz zum günstigen Erdöl verlor dieser Prozess in den 60er Jahren an Attraktivität. Hinter dem „Eisernen Zaun“ hingegen, in der damaligen Sowjetunion, wurde dieser Prozess weiter genutzt und optimiert. Die Basis bildeten lignocellulosehaltige Abfälle, die nicht in Konkurrenz zu Lebensmitteln standen und mithilfe von optimierten *Candida acetobutylicum*-Stämmen umgewandelt wurden. Durch die Optimierung konnten sogar Werke im industriellen Maßstab betrieben werden. (Zverlov, et al., 2006). Da sich in den letzten zwei Jahrzehnten der zunehmende Klimawandel aufgrund der massenhaften Nutzung von fossilen Brennstoffen abzeichnet, gewinnen solche biotechnologischen Prozesse wieder vermehrt an Bedeutung. Manche Wissenschaftler vermuten sogar, dass bis zu 50 % der wichtigsten Chemikalien auf biotechnologischem Wege herstellbar sind. (Renneberg, et al., 2013)

Bei 2,3-BDO sind 3 Stereoisomere vorhanden. Hier liegt der Unterschied in der Lage von 2 Hydroxygruppen, die sich am 2. bzw. 3. Kohlenstoffatom befinden. Neben den beiden optisch aktiven Formen gibt es hier auch eine optisch inaktive Form, bei der sich beide Hydroxy-Gruppen auf einer Seite befinden.

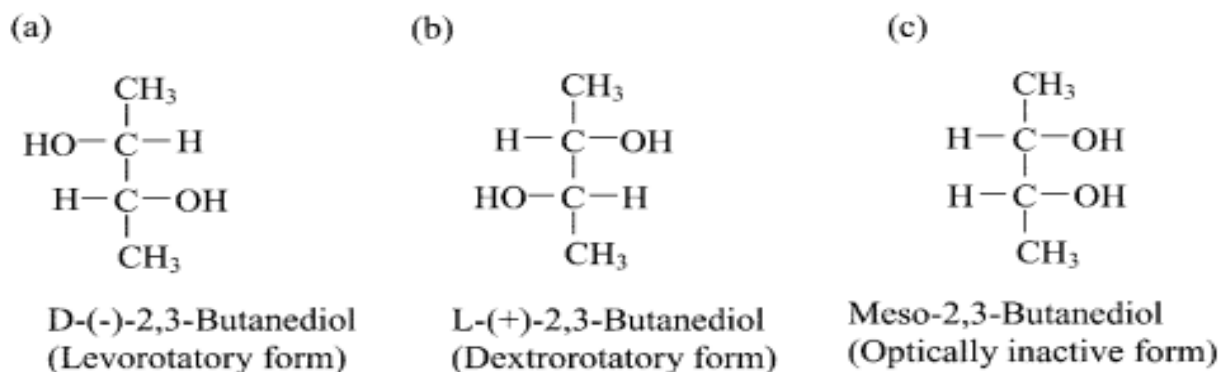


Abbildung 2 Die verschiedenen Stereoisomere von 2,3-BDO in der FISCHER-Projektion, zu sehen ist bei a) die linksdrehende Variante, bei b) die rechtsdrehende und bei c) die optisch inaktive meso-Form (Syu, 2001)

Zu beachten ist weiterhin, dass jeder Mikroorganismen-Stamm die 3 Varianten in unterschiedlichen Mengenanteilen produziert. Einige Stämme wie z.B. *Paenibacillus polymyxa* bilden fast nur ein Isomer, in dem Fall die linksdrehende Form mit bis zu 98% Anteil an der Gesamtmenge an 2,3-BDO (Syu, 2001). Bei den meisten hingegen liegt ein Gemisch der verschiedenen Isomere vor. Durch den Ansatz der genetischen Optimierung ließ sich auch dieses Problem lösen, indem man die dafür zuständigen Enzyme blockiert oder Mutanten erzeugt, die nur ein Isomer produzieren.

Beide Stoffe sind aufgrund ihrer vielfältigen Nutzung auf dem Weltmarkt sehr gefragt, sodass eine biotechnologische Produktion aus Abfallstoffen durchaus eine reizvolle Alternative zur chemischen oder enzymatischen Synthese darstellt. Der Bedarf für 2,3-BDO liegt in der weiterhin steigenden Mobilität der Weltbevölkerung begründet. Der Anstieg des Absatzmarktes für Autos ist ungebrochen, insbesondere in den asiatischen Länder, allen voran China. Einige Wissenschaftler hoffen darauf, dass Stoffe wie 2,3-BDO aufgrund ihres hohen Heizwertes Erdöl als Hauptkraftstoff Nummer 1 in Zukunft ersetzen, um die fossilen Ressourcen zu schonen. Ein weiterer positiver Nebeneffekt ist die steigende Nachfrage der Verbraucher nach biologisch bzw. ökologisch verträglichen Konsummitteln. Dies wird durch die Nutzung von fermentativ hergestellten Produkten aus ökologisch nachwachsenden Quellen bedient. Als günstige und nachwachsende Rohstoffe für die Produktion von HB und 2,3-BDO sind unter anderem lignocellulosehaltige Häcksel von verschiedenen Baumarten (ERA-IB, 2012) oder auch Abfallstoffe aus der Stärke-Industrie in den Fokus geraten. Auch andere Reststoffe wie Sojamehlhydrolysat oder Melassen wurden schon erfolgreich fermentiert (Xiao, et al., 2007). Die Nutzung solcher Abfallstoffe sorgt für einen niedrigen Produktionspreis, was die Attraktivität dieser Prozesse für die Industrie erhöht. Laut (Celinska, et al., 2009) lag der Marktpreis für 2,3-BDO bei unter 1\$ pro kg. Für Acetoin ließen sich Werte von ca. 116€ pro kg finden (Sigma-Aldrich).

5.3. Bakterielle Produzenten von Acetoin und 2,3-BDO

Acetoin ist ein wichtiges Zwischenprodukt im Stoffwechsel verschiedener Bakterienarten. Dazu zählen Milchsäurebakterien, Vertreter der Gattung *Bacillus* und Enterobakterien (Spektrum, 1999).

Zuerst die Milchsäurebakterien: sie wandeln unter anderem spontan Diacetyl in Acetoin um. Beide Stoffe haben ein angenehmes buttrig-cremiges Aroma und Odeur. Dies wird zur Aromatisierung von Nahrungsmitteln, insbesondere Backwerk benutzt (Xiao, et al., 2014). Aufgrund der geschmacksfördernden Wirkung von Milchsäurebakterien wurden ihr Nutzen und ihre Wirkung in verschiedenen Ländern wie Frankreich oder Spanien erforscht. Das Augenmerk der Franzosen lag hierbei vor allen Dingen auf der Käseherstellung, da Frankreich für seine Vielfalt an Käse auf der ganzen Welt berühmt ist. Insbesondere der Anteil an Acetoin und Diacetyl sollte erhöht werden, um die typischen buttrigen Aromen von Käsesorten wie Camembert oder Cheddar zu garantieren (Passerini, et al., 2013). Durch ihre langjährige Nutzung im Lebensmittel-Bereich sind die Mikroorganismen aus der Gattung der Milchsäurebakterien auch alle als GRAS eingestuft. Nachteilig hingegen sind die Konzentrationen an Acetoin, die gebildet werden. Die höchste im Labor erreichte Konzentration lag bei 9,3 g/l für einen *Lactococcus*-Stamm (Kaneko, et al., 1990).

Bei den Bakterien der Gattung *Bacillus* haben wir deutlich höhere Konzentrationen an Acetoin, die gebildet werden können. Insbesondere *Bacillus subtilis* soll hier genannt werden. Selbst bei Wildstämmen konnten bis zu 30 g/l an Acetoin beobachtet werden. Zur Optimierung dieser Mengen wurde vielfach noch gentechnisch optimiert. Ansätze hierbei waren z.B. die Blockierung des Enzyms AR, welches Acetoin zu 2,3-Butandiol umwandelt (Zhang, et al., 2014). Andere Forscherteams konzentrierten sich mehr auf die Erhöhung des 2,3-BDO-Spiegels, indem sie z.B. den NAD/NADH-Spiegel manipulierten, da dieser einen direkten Einfluss auf die Produktion von 2,3-BDO hat (Yang, et al., 2015). Weitere nützliche Vertreter dieser Gattung sind z.B. *Paenibacillus polymyxa* oder *Bacillus pumilus*. Ersterer war auch schon Gegenstand vorhergehender Untersuchungen an der Hochschule Anhalt (Naschitzki, et al., 2013) (Lamazaz, et al.) (Hofman, et al., 2014). *Paenibacillus polymyxa* ist in der Lage als Wildstamm bis zu 30 g/l an Acetoin zu produzieren. (Xiao, et al., 2014) Ein weiterer positiver Aspekt dieser Gattung ist die Tatsache, dass bei diesen Mikroorganismen, sobald eine passende Kohlenstoff-Quelle und Stickstoff-Quelle vorlag, ein üppiges Wachstum erfolgte. Des Weiteren gilt *Bacillus* auch als GRAS Mikroorganismus, der problemlos in der lebensmittelverarbeitenden Industrie angewendet werden kann.

Die letzte Gattung der Enterobakterien scheidet leider von vornherein aus, da die MO der Sicherheitsstufe 2 zugeordnet werden. Allerdings sind hier die Vertreter mit der

höchsten Konzentration an Acetoin zu finden, nämlich *Klebsiella pneumoniae* und *Serratia marcescens*.

Weitere Beispiele für bakterielle Produzenten von Acetoin und 2,3-Butandiol sind z.B. Cyanobakterien, die mithilfe von Licht und CO₂ die genannten Stoffe produzieren können. (Atsumi, et al., 2013) Inzwischen wurde sogar veröffentlicht, dass ein Bakterium aus der Gattung der Archaea in der Lage ist, Acetoin zu produzieren (Nguyen, et al., 2016). Auch Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae* rücken inzwischen wieder in den Fokus der Forscher, da sie relativ einfach zu handhaben und gentechnisch zu manipulieren sind. (Seo, et al., 2014).

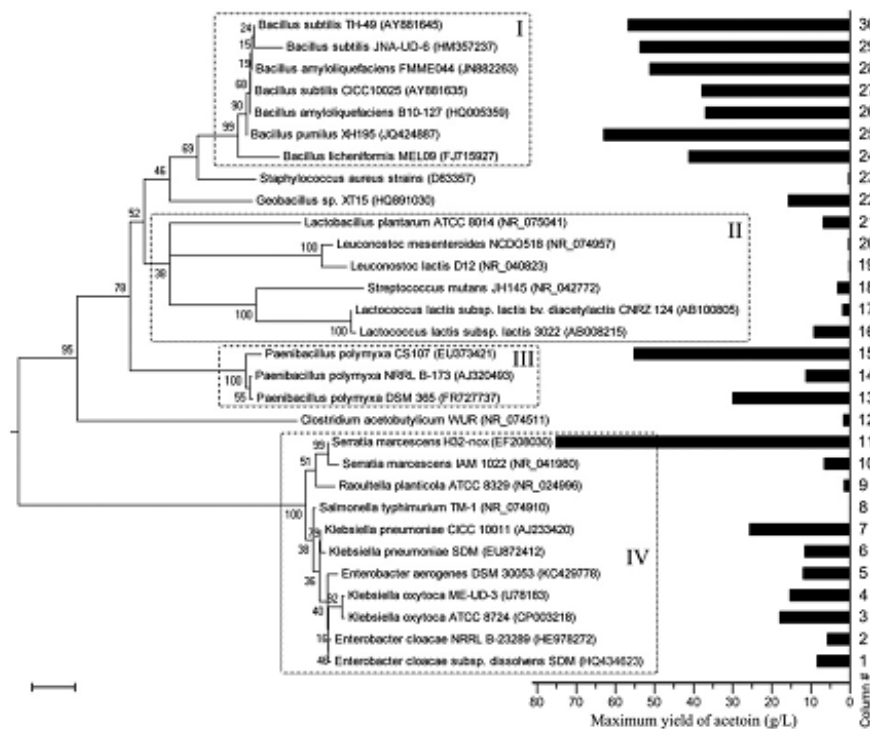


Abbildung 3 Bakterielle Produzenten von Acetoin in ihren jeweiligen Gattungen zusammengefasst (Xiao, et al., 2014)

5.4. Der Acetoin/2,3-BDO-Stoffwechselweg in den verschiedene Bakterien

Der von der Vielzahl der genannten Bakterien benutzte Stoffwechselweg zur Produktion von Acetoin bzw. 2,3-BDO ist relativ simpel. Er wird nur durch 3 Enzyme reguliert, die meist in einem Operon zusammengefasst werden. Die Biosynthese läuft folgendermaßen ab: Pyruvat, welches meist aus der Glykolyse entstammt, wird mithilfe

des Enzyms 2-Acetylactat-Synthase (ALS) zu 2-Acetylactat umgewandelt. Dazu müssen 2 Moleküle Pyruvat unter Abspaltung von Kohlenstoffdioxid fusionieren. Anschließend sorgt das Enzym 2-Acetylactat-Decarboxylase (ALDC) für die Umwandlung von 2-Acetylactat zu Acetoin unter Abspaltung eines weiteren Moleküls Kohlendioxid. Es kann jedoch vorkommen, dass es zu einer spontanen Umwandlung von 2-Acetylactat zu Diacetyl kommt. Anschließend erfolgt unter Nutzung des Enzyms Diacetyl-Reduktase (DAR) die Umwandlung zu Acetoin (Celinska, et al., 2009). Beachtet werden muss, dass alle bisherigen Stoffwechselprozesse unidirektional verlaufen, also nur in

eine Richtung ablaufen können. Dies gilt jedoch, nicht für den letzten Schritt. Hierbei wird Acetoin mithilfe des Enzyms 2,3-Butandiol-

Dehydrogenase (BDH) oder auch Acetoin-Reduktase (AR) zu 2,3-BDO umgewandelt. Dieser Schritt ist

bidirektional und Abbildung 5 kann somit in Bakterien

beiden Richtungen ablaufen. Interessant ist auch, dass für diesen letzten Schritt ein Coenzym benötigt wird. NADH/H⁺ wird zu

NAD⁺ reduziert, während der Umwandlung von

Acetoin zu 2,3-BDO. Durch den bidirektionalen Charakter des letzten Schrittes und der Kopplung mit dem Coenzym wird dies von Bakterien genutzt, um den intrazellulären

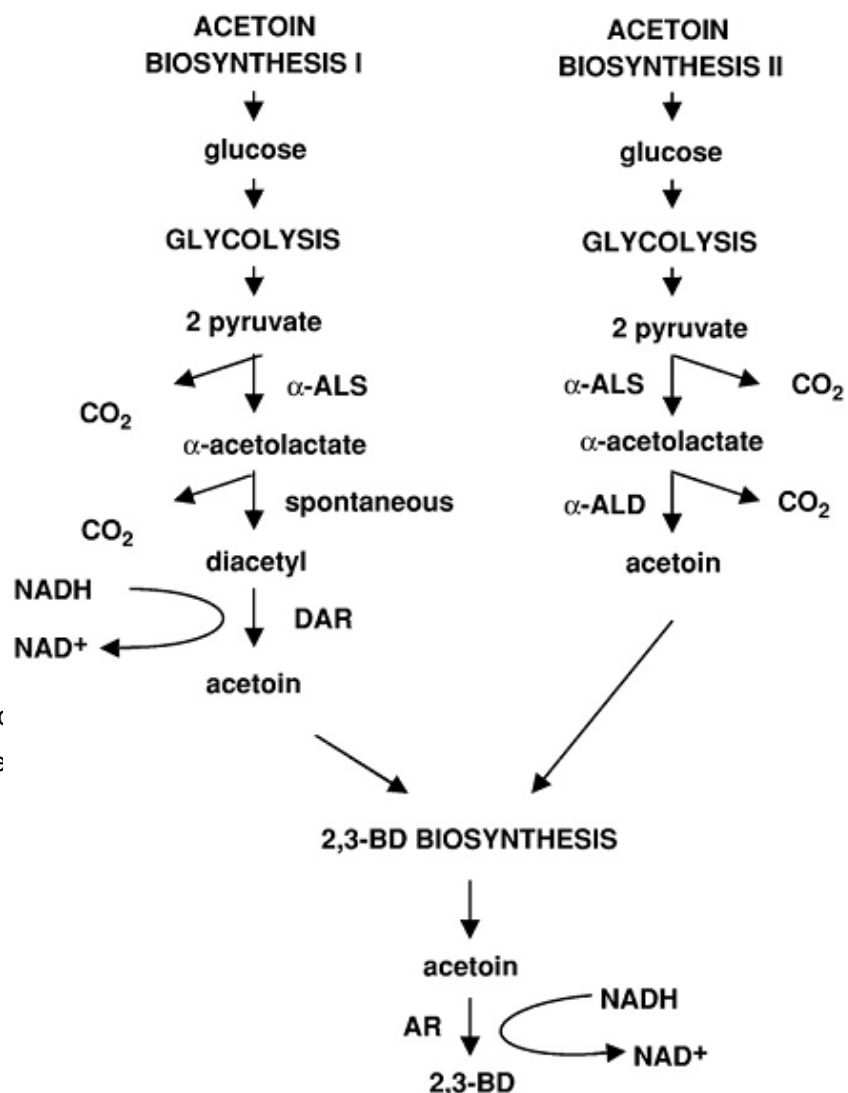


Abbildung 5 Der am häufigsten beschriebene Stoffwechselweg in Bakterien zur Produktion von Acetoin bzw. 2,3-Butandiol (Celinska, et al., 2009)

NADH/NAD-Spiegel zu regulieren (Xiao, et al., 2007). Des Weiteren wird dieser Stoffwechselweg auch von den Bakterien beschriftet, wenn es zu einer Akkumulierung von Pyruvat im Zellinneren kommt. Dies würde zur einer Übersäuerung führen. Pyruvat ist eine starke Säure mit einem pKs-Wert von 2,9 und eine Anhäufung im Zellinneren würde den pH-Wert stark absenken. Eine weitere Strategie der MO ist die Energiespeicherung in Form von HB bzw. 2,3-BDO. Solange eine C-Quelle ausreichend vorhanden ist, werden die Bakterien diese verstoffwechseln. Kommt es zu Mangelerscheinungen im Verlauf der stationären Phase, so können die Mikroorganismen auf die gebildeten C₄-Komponenten zurückgreifen und diese verstoffwechseln. Die meisten Bakterien besitzen neben dem Metabolismus für die Biosynthese auch Stoffwechselwege für den Abbau dieser Stoffe. Dies muss insbesondere bei *B. subtilis* beachtet werden, da hier von einer chinesischen Forschergruppe ein Phänomen der Umwandlung von 2,3-BDO zu Acetoin im Verlauf einer Fermentation beobachtet wurde (Zhang, et al., 2011). Um dies zu vermeiden, sollte die Fermentation vorher abgebrochen werden. Neben den hier genannten Mikroorganismen gibt es auch andere, die in der Lage sind Acetoin bzw. 2,3-Butandiol abzubauen. Als Beispiele sollen hier nur *Acetobacterium woodii* (Hess, et al., 2015) oder auch *Gluconobacter oxydans* (Wang, et al., 2013) genannt werden. Dabei werden teilweise auch andere Stoffwechselwege beschriftet.

Zur feineren Regulierung der Biosynthese von HB und 2,3-BDO wird das Operon in einigen Bakterien von einem protein-ähnlichem Gen, das dem der LysR-Familie gleicht, kontrolliert. Dieses Gen ist essentiell für den Ablauf des Stoffwechselweges. Wird es bei der Transkription unterbrochen, wird der Weg nicht beschriftet und es kommt zu keinerlei Produktion von HB oder 2,3-BDO.

5.5. Wachstumsmodell der verschiedenen Stämme

Das Mikroorganismen-Wachstum wird i.A. in 5 Phasen unterteilt: als erstes die lag-Phase, in der sich die MO auf das Medium und die veränderten Parameter anpassen müssen. Diese Phase sollte immer so kurz wie möglich gehalten werden, damit der Prozess insgesamt effektiv ablaufen kann. In den vorliegenden Versuchen wurde dies dadurch gewährleistet, dass das gleiche Medium benutzt wurde und die optimale Temperatur und Durchmischung im Schüttelschrank eingestellt wurde. Als zweites folgt dann bereits die exponentielle Phase, in der sich die Biomasse am stärksten vermehrt. Das Wachstum läuft mit maximaler Geschwindigkeit ab und das Substrat wird am

schnellsten umgesetzt. Nach der exponentiellen Phase erfolgt eine Abflachung des Wachstums hinüber in die stationäre Phase, wie in Abbildung 6 deutlich zu erkennen. Hier ist die Biomassekonzentration maximal und es erfolgt nur noch geringes Wachstum, da die C-Quelle meist aufgebraucht wurde. Würde nun die erneute Zugabe eines Substrates erfolgen könnte die Biomassekonzentration noch weiter gesteigert werden, da sich eine neue lag- und exponentielle Phase anschließen würde. Mithilfe solcher Hochzelldichte-Fermentation lassen sich meist noch höhere Produktkonzentrationen erzielen, wenn eine hohe Biomasse vonnöten ist, um Produkte zu bilden. Als letztes würde dann die Absterbephase erfolgen, was aber eher vermieden werden soll. Meistens wird während der stationären Phase im batch-Betrieb die Fermentation beendet und es erfolgt die Produktgewinnung.

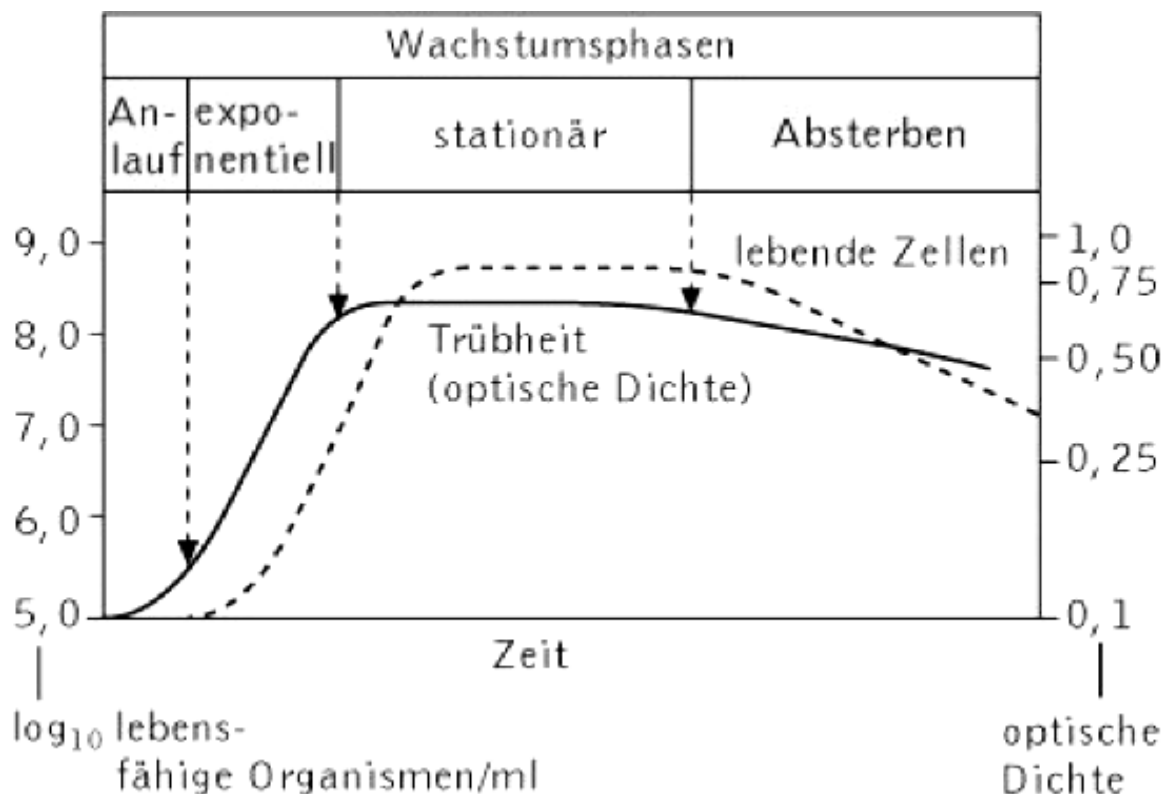


Abbildung 6 Die verschiedene Wachstumsphasen einer Mikroorganismen-Kultur, logarithmisch über der Zeit aufgetragen als lebensfähige Organismen pro ml und als optische Dichte (Spektrum Akademischer Verlag, 2001)

6. Materialien und Methoden

6.1. Chemikalien

Tabelle 1 Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Ammoniumhydrogencitrat	Merck
Bernsteinsäure	Merck
CSL	Sigma Aldrich
FeSO ₄ * 7H ₂ O	Roth
Hefeextrakt	Roth
Trypton	Merck
Natriumchlorid	Merck
Glucose	Roth
K ₂ HPO ₄ * 7H ₂ O	Roth
MgSO ₄ * 7H ₂ O	VWR
MnSO ₄ * 7H ₂ O	Roth
H ₂ SO ₄ (5%ige Lsg.)	
NaOH (5%ige Lsg.)	VWR International GmbH
Struktol	Schill+Seilacher
Sojamehl	

6.2. Geräte

Tabelle 2 Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
YSI	Yellow Springs Instrument Co.
Biostat Q	B. Braun Biotech International
pH-Sonden	Mettler-Toledo GmbH
pO ₂ -Sonden	Ingold AG
Mikroskop Axiolab HB 50	Carl Zeiss Jena
Zentrifuge Biofuge Fresco	Heraeus
GC mit Autosampler Clarus 480	Perkin Elmer
Photometer DR 5000	Hach Lange

Micro Zentrifuge SD

Roth

Schüttelschrank

Gesellschaft für Labortechnik mbH

6.3. Der Biostat Q – Aufbau und Funktionsweise

Das während der gesamten Zeit verwendete Fermentersystem stammt von ehemals B. Braun, inzwischen Sartorius. Es besteht aus einer zentralen Steuereinheit, der DCU, sowie einem Kühl- und Heizaggregat und den Glasfermentoren mit einem Fassungsvermögen von maximal 250 ml. Über die DCU können die Parameter pH, Temperatur, pO_2 , Rührerdrehzahl und Luftzufuhr geregelt werden. Die beiden letzten Parameter konnten jedoch nur manuell geregelt werden.

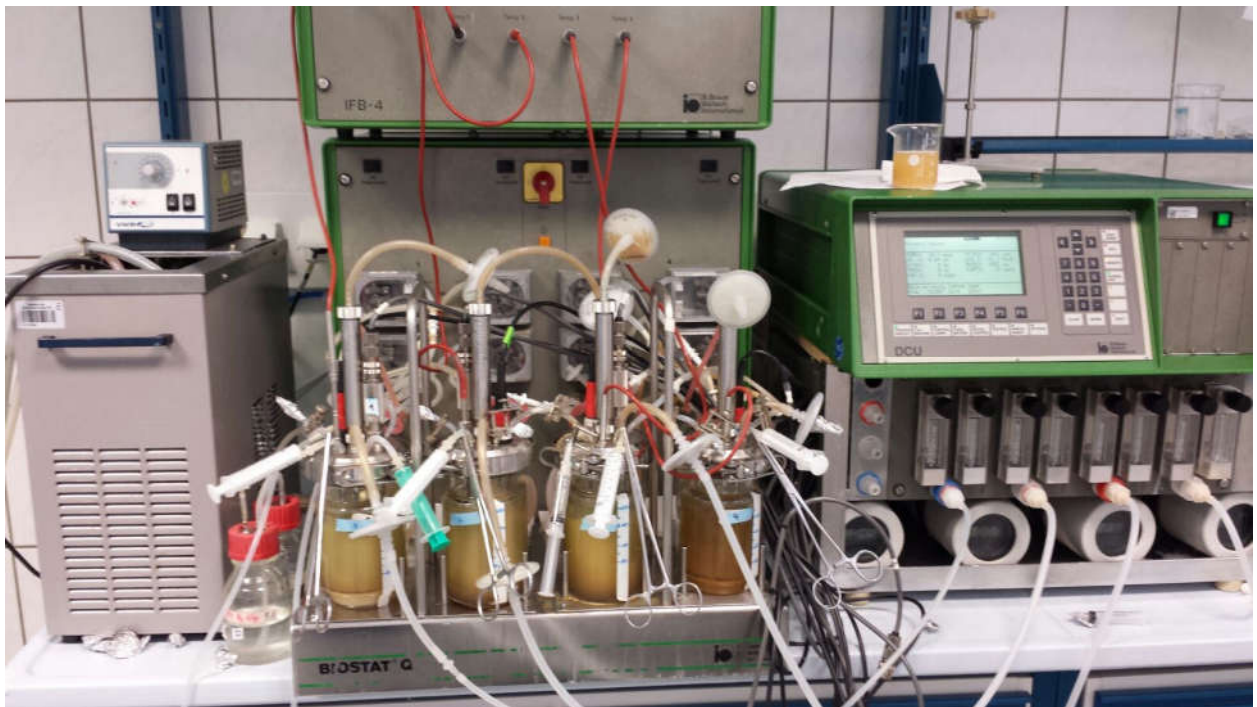


Abbildung 7 Der Biostat Q während einer Fermentation

6.4. Mikroorganismen-Stämme

Die verwendeten Mikroorganismen-Stämme waren teilweise schon im Bestand der Hochschule, während andere noch bestellt werden musste. Insgesamt wurden 4 Stämme fermentiert:

Bacillus pumilus DSM 361

Bacillus pumilus DSM 27

Bacillus amyloliquefaciens DSM 7

Geobacillus kaustophilus DSM 7263

Die Auswahl der Stämme erfolgte nach der Literaturrecherche. Einige Stämme konnten nicht original wie in der Literatur bestellt werden, da sie patentrechtlich geschützt oder Mutanten waren.

6.5. Vorkultur- und Medien-Herstellung

Um die zu erwartenden Ergebnisse mit denen aus der Literatur vergleichen zu können, sollte für jeden Mikroorganismus das jeweilige Laborsubstrat verwendet werden.

Bei den beiden *Bacillus pumilus* Stämmen wurde dabei auf den Versuch von (Xiao, et al., 2010) zurückgegriffen. Der Stamm mit der DSM-Nr. 361 ist dabei exakt derselbe wie der im Versuch verwendete. Im Versuch wurde dabei auf das Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) zurückgegriffen. In dieser Arbeit wurde ein vorgefertigtes LB-Medium nach Miller verwendet. In der Vorkultur und bei dem batch-Versuch wurden noch 3,6 g/l Glucose hinzugefügt, sodass am Ende folgendes Medium genutzt wurde:

Tabelle 3 Zusammensetzung des LB-Mediums im batch-Betrieb

Bestandteil	Menge
Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
Natriumchlorid	10 g/l
Glucose	3,6 g/l

Die Vorkultur erfolgte im oben beschriebenen Medium in einem Schüttelschrank bei 30°C und 150 rpm. In der Literaturstelle wurde weiterhin ein Versuchsaufbau beschrieben, in dem anstelle der 3,6 g/l Glucose 200 g/l Glucose benutzt wurden. Dabei sollte die höchste Ausbeute an Acetoin entstanden sein. Um dies zu prüfen wurde ein 2. Versuch durchgeführt, allerdings in einem fed-batch-Verfahren. Es wurde mit weniger Anfangsmedium fermentiert und nach einer Laufzeit von 7 h wurden in jeden Fermenter 50 ml des zweiten Mediums zugegeben. Dies sollte die längere lag-Phase durch die hohe Substratkonzentration minimieren. Das verwendete Fermentationsmedium für den fed-batch-Versuch beider *B. pumilus* Stämme lautete:

Tabelle 4 Fermentationsmedium für den fed-batch-Versuch

Bestandteil	Menge
Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
Natriumchlorid	10 g/l
Glucose	200 g/l

Hier erfolgte die Anzucht der Vorkultur in demselben Medium wie beim batch-Versuch.

Der Versuchsaufbau für den Stamm *Bacillus amyloliquefaciens* DSM 7 wurde der Quelle von (Yang, et al., 2012) entnommen. Es handelt sich dabei um ein Komplexmedium, dass bereits optimiert wurde.

Tabelle 5 Fermentationsmedium für *B. amyloliquefaciens* DSM 7

Bestandteil	Menge
Glucose	150 g/l
CLS	31,9 g/l
Sojabohnenmehl	22 g/l
Ammoniumhydrogencitrat	5,58 g/l
K ₂ HPO ₄	2,5 g/l
MgSO ₄ *7 H ₂ O	0,3 g/l
MnSO ₄ *7 H ₂ O	0,05 g/l
FeSO ₄ *7 H ₂ O	0,05 g/l

Bernsteinsäure	0,3 g/l
----------------	---------

Da das Wachstum der Vorkultur im Schüttelkolben zu gering ausfiel, wurde ein Kolben mit YEPG-Medium zum Animpfen des Reaktorsystems benutzt. Das YEPG-Medium setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen:

Tabelle 6 Vorkulturmedium für *B. amyloliquefaciens* DSM 7

Bestandteil	Menge
Hefeextrakt	20 g/l
Pepton	10 g/l
Glucose	10 g/l

Auch hier erfolgte das Anziehen der Vorkultur im Schüttelschrank bei 37°C und einer Rotation von 150 rpm.

Für den letzten Mikroorganismus wurde wiederum ein anderes Medium benötigt. Dieses wurde der Literaturstelle von (Xiao, et al., 2012) entnommen. Zu beachten bei diesem Stamm war die relativ hohe Temperatur von 50°C und einem leicht basischen pH-Wert von 8,0. Das Medium setzte sich folgendermaßen zusammen:

Tabelle 7 Fermentationsmedium für *G. kaustophilus* DSM 7263

Bestandteil	Menge
Glucose	220 g/l
CSL	60 g/l
Hefeextrakt	10 g/l

Die Kohlenstoffquelle, in diesem Fall Glucose, wurde getrennt autoklaviert und erst zu Beginn der Fermentation zugegeben. Die Vorkultur erfolgte auch hier im Schüttelschrank, allerdings bei 50 °C und einer Rotation von 145 rpm.

6.6. Übersicht über die verwendete Analytik

Die Analytik erfolgte wie in der Praktikumsarbeit beschrieben (Haberland, 2016). Erweiternd wurde im Rahmen dieser Bachelor-Arbeit auch der Gaschromatograph der Fam. Perkin-Elmer benutzt, um die Bestandteile des Fermentationsmediums zu analysieren. Der GC mit Autosampler besitzt folgende Parameter:

Säule: Elite-624

Länge = 30 m

Innendurchmesser = 0,25 mm

Filmdicke = 1,4 μm

Max. Temperatur: 240°C

Trärgas: Stickstoff

Detektor: Flammenionisationsdetektor

Injektortemperatur: 230°C

Detektortemperatur: 250° C

7. Ergebnisse

Auf den nächsten Seiten werden die Ergebnisse der insgesamt sieben Versuche aufgelistet. Die Auswertung umfasst Wachstum, sowie die Produktbildung. Die Versuche in der vorhergehenden Praktikumsarbeit wurden mit *Bacillus subtilis* und *Methylobacter rhodesianum* durchgeführt. Weitere Informationen zu den Prozessbedingungen können der Praktikumsarbeit (Haberland, 2016) entnommen werden. Die Werte für die Glucose-Konzentration, die Biotrockensubstanz-Konzentration, sowie die Produktkonzentrationen wurden jeweils einer Polynomregression unterzogen. Die tatsächlich aufgenommenen Werte befinden sich auf der beigefügten CD.

7.1. Fermentation mit *Bacillus subtilis* DSM 2109

Trotz der bereits vorhandenen Auflistung in der Praktikumsarbeit werden die Daten für *Bacillus subtilis* DSM 2109 der Übersichtlichkeit halber hier noch einmal dargestellt:

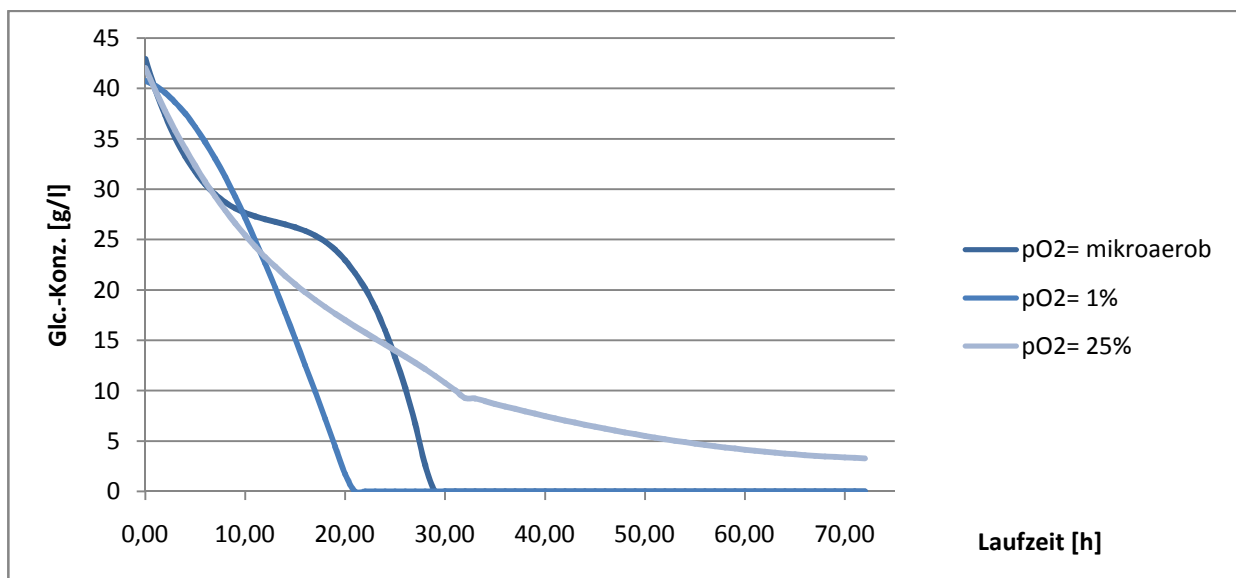


Abbildung 8 Die Glucose-Konzentration während der Fermentation mit *B. subtilis* unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen

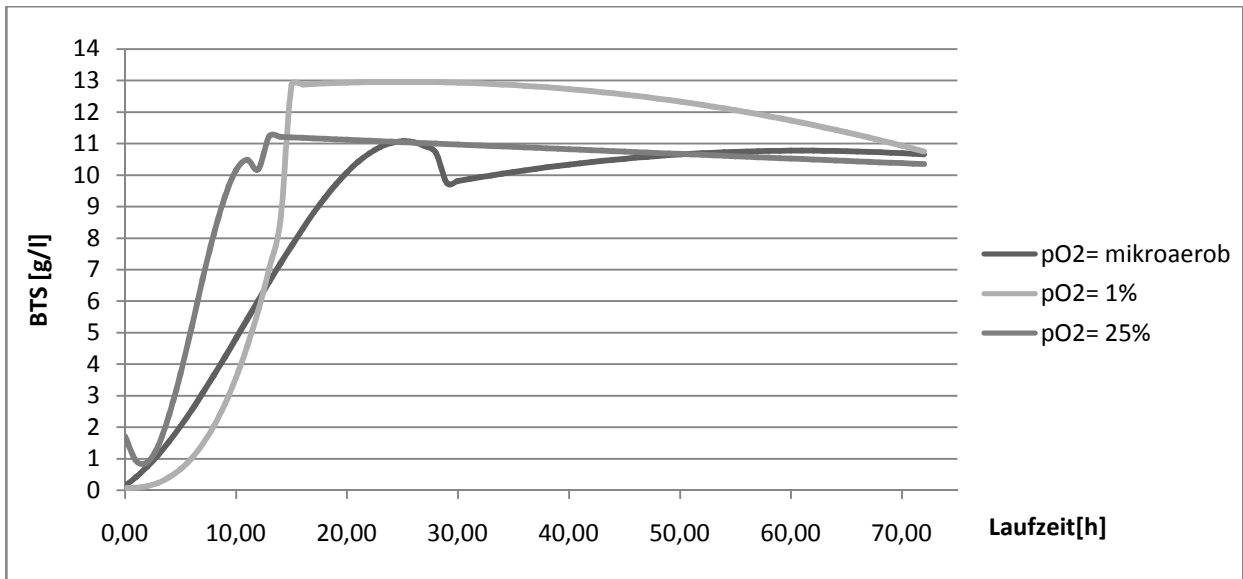


Abbildung 9 Die BTS-Konzentration während der *B. subtilis* Fermentation in Abhängigkeit von verschiedenen Sauerstoffbedingungen

7.2. Fermentation mit *Methylobacter rhodesianum* MB 126, MB 127

Auch für diesen Organismus werden die Daten noch einmal dargestellt. Zuerst wird dabei die Fermentation ohne Ethanol betrachtet:

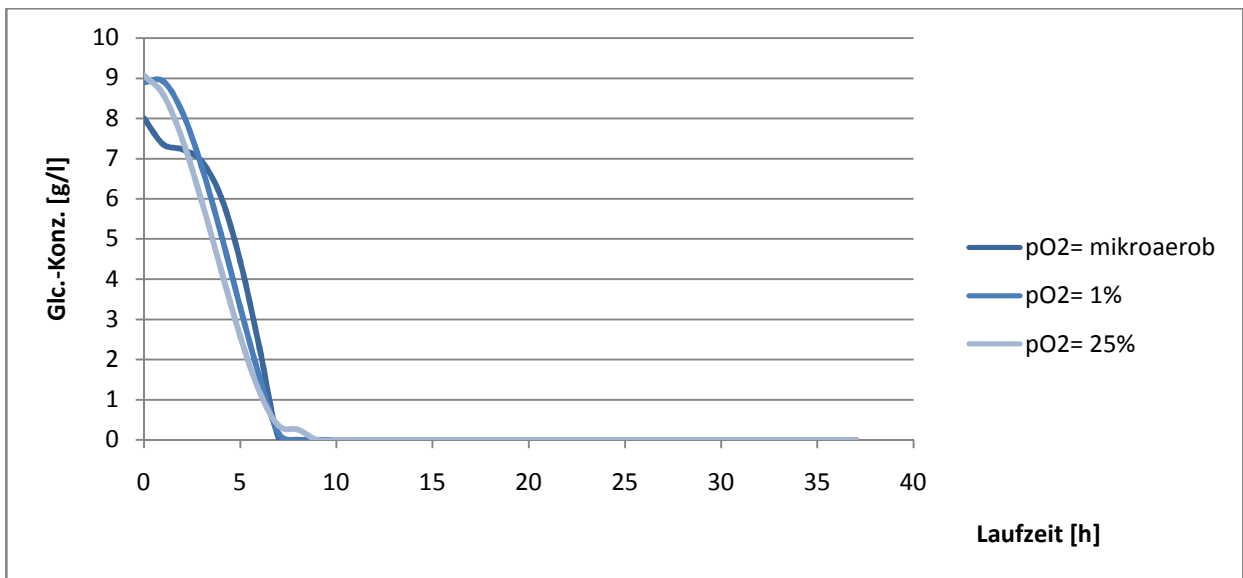


Abbildung 10 Die Glucose-Konzentration im Verlauf der Fermentation mit *M. rhodesianum* ohne Ethanol unter Einwirkung verschiedener Sauerstoffbedingungen

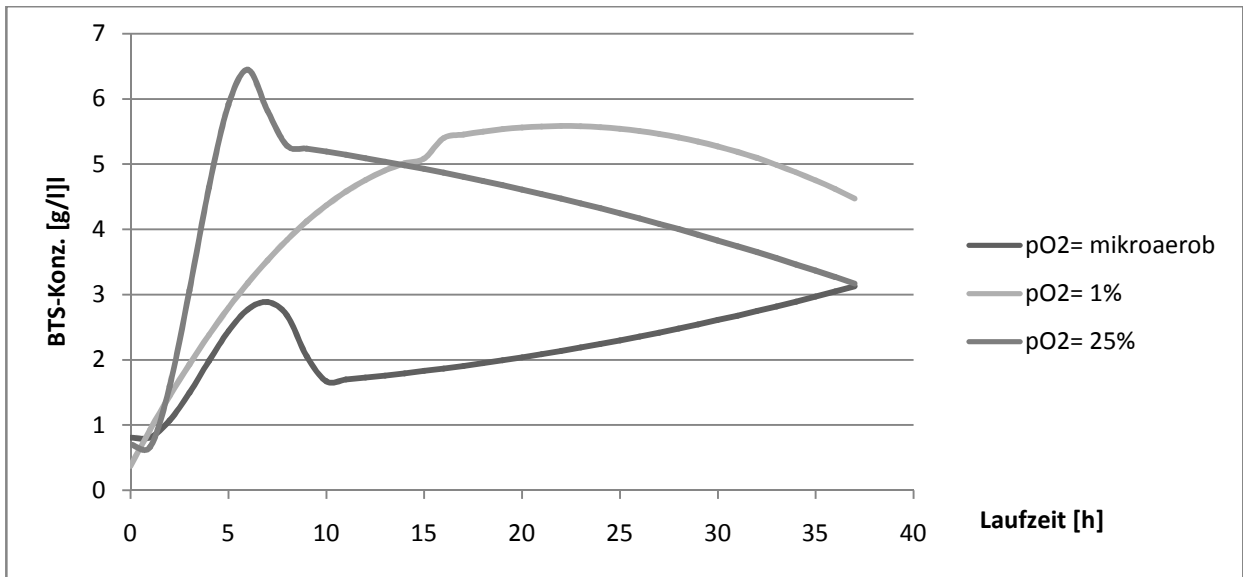


Abbildung 11 Die BTS-Konzentration während der Fermentation mit *M. rhodesianum* ohne Ethanol unter Einwirkung verschiedener Sauerstoffkonzentrationen

In der zweiten Versuchsreihe wurde dann bereits bei der Vorkultur reiner Ethanol zugegeben und jeweils nach den Probenahmen 5% reiner Ethanol bezogen auf das Reaktorvolumen zugegeben. Die erzielten Ergebnisse sahen folgendermaßen aus:

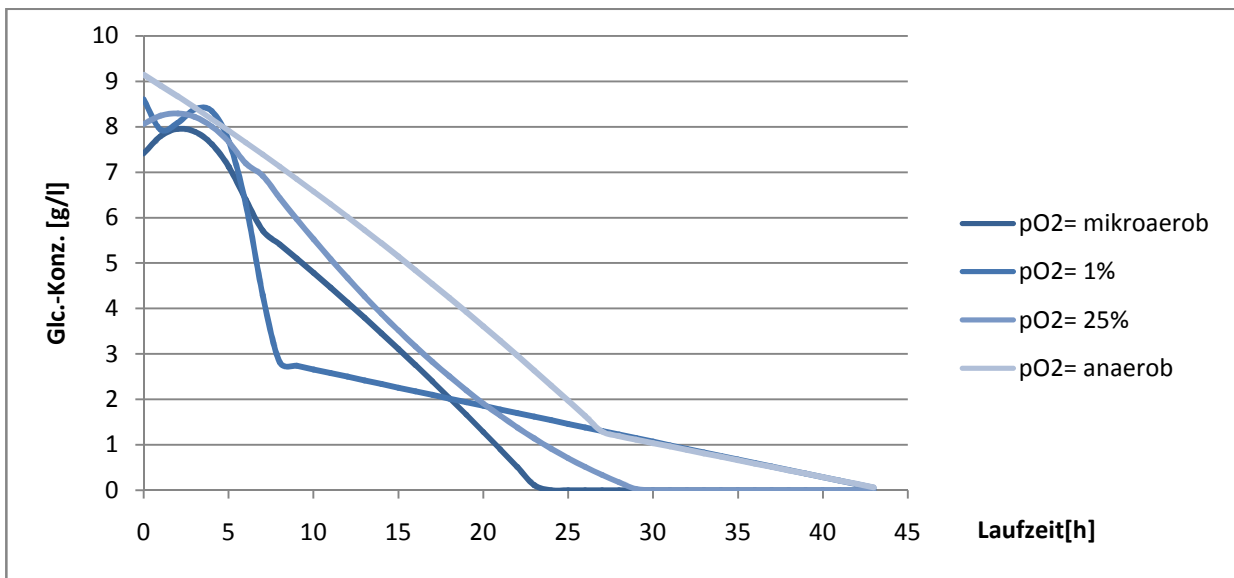


Abbildung 12 Der Verlauf der Glucose-Konzentration während der Fermentation mit *M. rhodesianum* mit Ethanol unter Einwirkung verschiedener Sauerstoffbedingungen

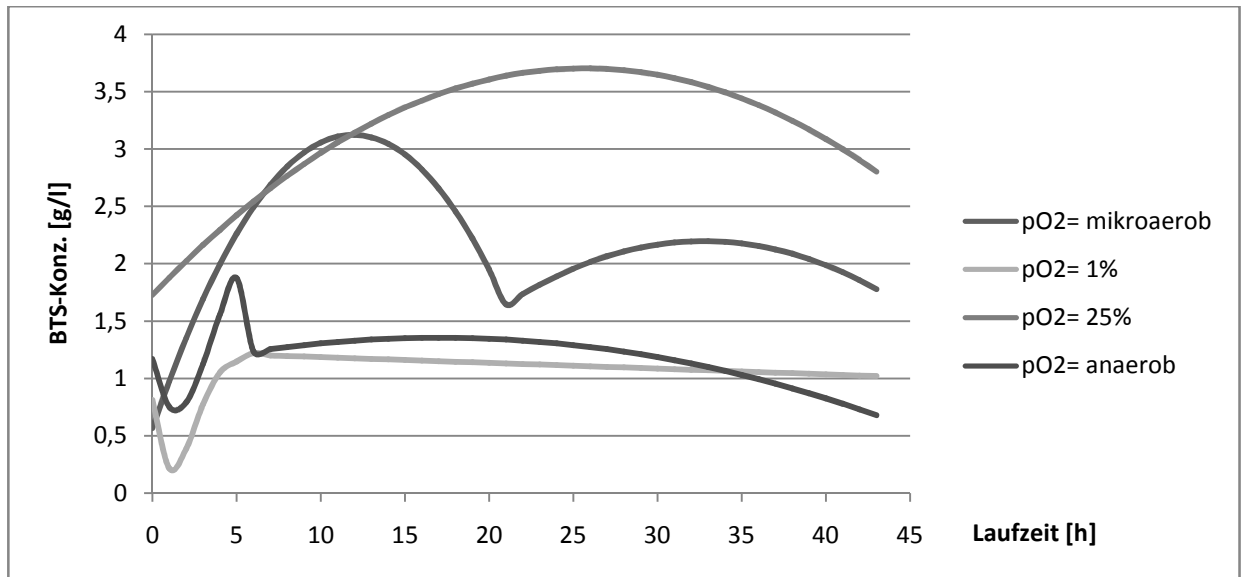


Abbildung 13 Die BTS-Konzentration während der Fermentation mit *M. rhodesianum* mit Ethanol unter Einwirkung verschiedener Sauerstoffbedingungen

7.3. Fermentation mit *Bacillus pumilus* DSM 361

Die ersten beiden Versuchsreihen erfolgten mit dem Mikroorganismus *B. pumilus* DSM 361. Der erste Versuch erfolgte mit dem LB-Medium nach Miller. Der pH-Wert lag bei 7,0 und die Temperatur bei 30°C. Es handelte sich um einen reinen batch-Versuch, bei dem der Einfluss der Begasungsrate auf das Wachstum und die Produktbildung untersucht werden sollten. In Abbildung 4 sind dazu die BTS-Konzentrationen der vier verschiedenen Fermentoren in Abhängigkeit vom pO₂-Wert abgebildet.

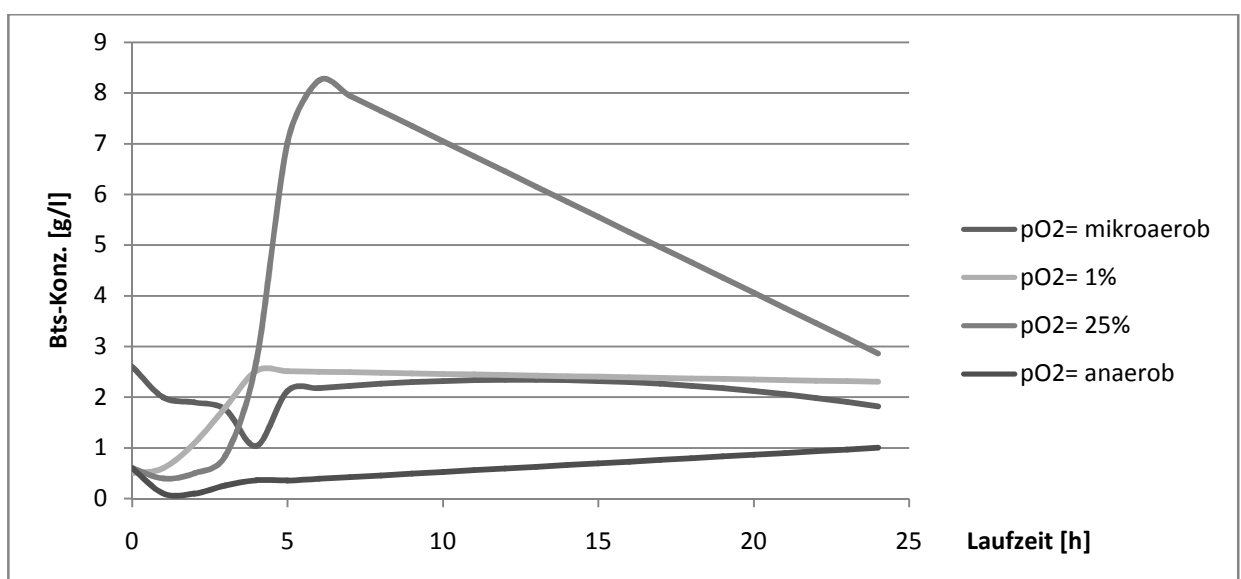


Abbildung 14 Die BTS-Konzentrationen aller 4 Fermentoren mit *B. pumilus* in Abhängigkeit von der Begasungsrate

Ein weiterer Parameter, der während der Fermentation regelmäßig kontrolliert wurde, war die Glucose-Konzentration im jeweiligen Fermenter. Die Ergebnisse dieses Parameters sind in Abbildung 15 dargestellt:

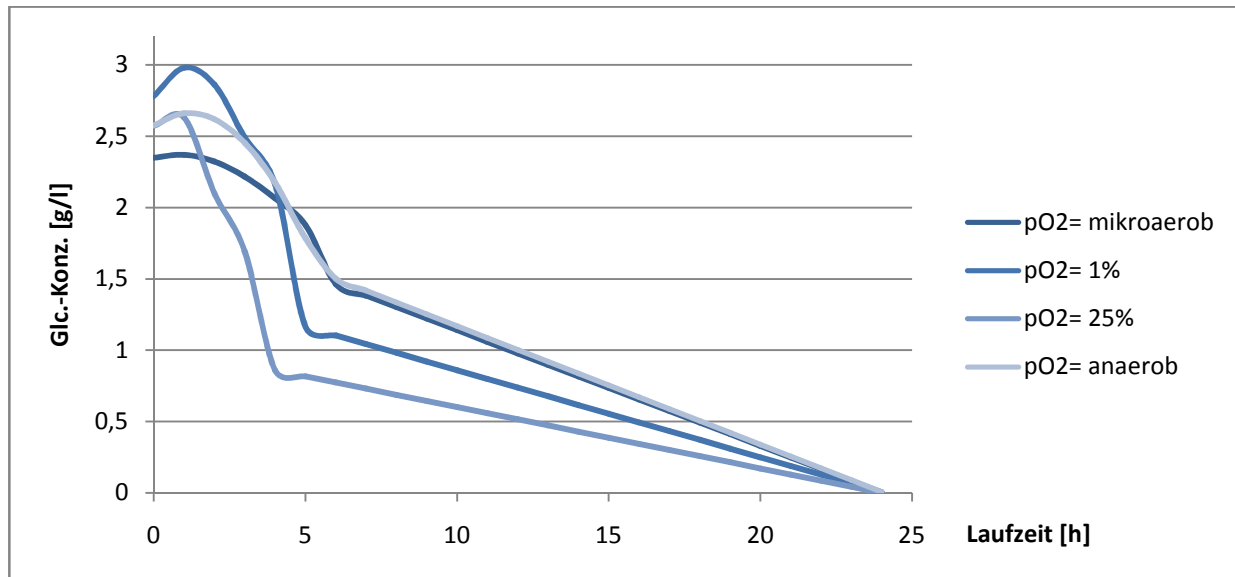


Abbildung 15 Die Glucose-Konzentration aller 4 Fermentoren in Abhängigkeit von der Begasungsrate über der Laufzeit von 24 h

In der zweiten Versuchsreihe wurde eine Idee aus der Literatur (Xiao, et al., 2010) aufgegriffen. Die Autoren des Artikels bezogen sich dabei auf einen patentierten *B. pumilus*-Stamm (Xu, et al., 2005), der große Mengen an Acetoin produzieren kann. Jener konnte auch gut große Mengen an Glucose verstoffwechseln, ohne signifikant in seinem Wachstum beeinträchtigt zu werden. Dies wurde also auch mit dem hier verwendeten *B. pumilus* DSM 361 erprobt. In dieser Arbeit wurde der Versuch jedoch etwas abgewandelt durchgeführt. Um die längere Laufzeit und das verringerte Wachstum zu vermeiden wurde erst mit dem LB-Medium mit geringem Glucose-Gehalt angefüllt. Nachdem hier die Kohlenstoffquelle im zweiten und dritten Fermenter aufgebraucht war, wurde ein LB-Medium mit 200 g/l Glucose zugegeben. Nun wurde erneut bis zum Aufbrauchen der C-Quelle fermentiert. Dieses Verfahren wurde als fed-batch deklariert. Unabhängig davon sollte auch hier die Abhängigkeit des Wachstums von der Begasungsrate überprüft werden, was auch geschah. Die anderen Fermentationsparameter wurden wie im batch-Versuch gehandhabt. Durch diesen Versuchsaufbau ließen sich deutliche Änderungen gegenüber dem ersten Versuch erzielen, wenn man sich die BTS- und Glc.-Konzentrationen in den folgenden Abbildungen betrachtet:

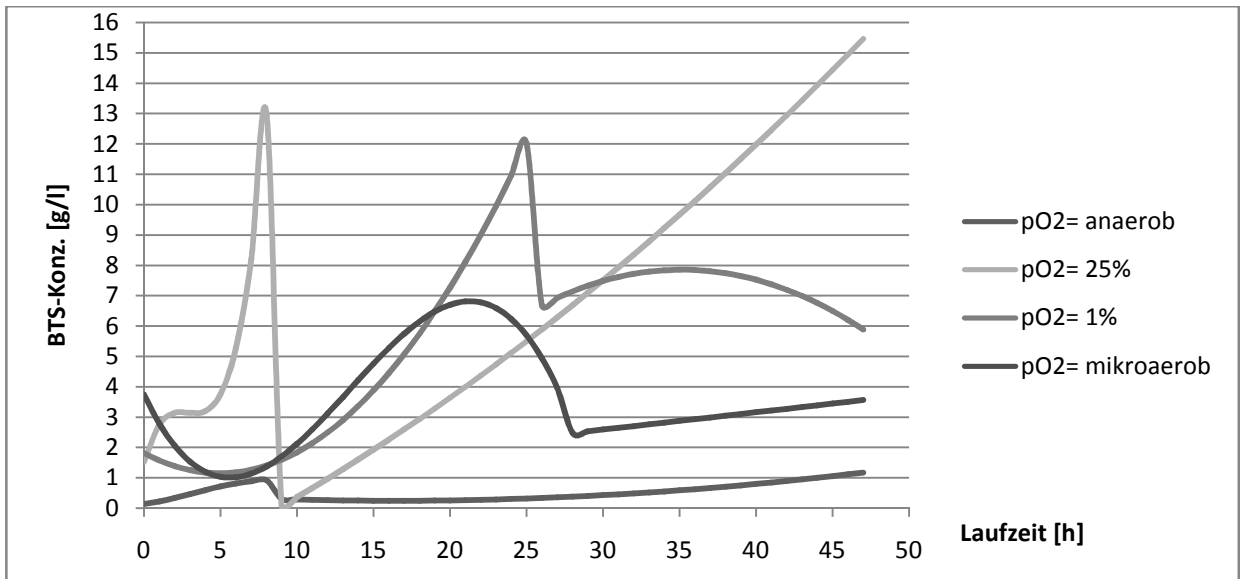


Abbildung 16 Die BTS-Konzentration der fed-batch Fermentation mit *B. pumilus* DSM 361 in Abhängigkeit von den Sauerstoffbedingungen

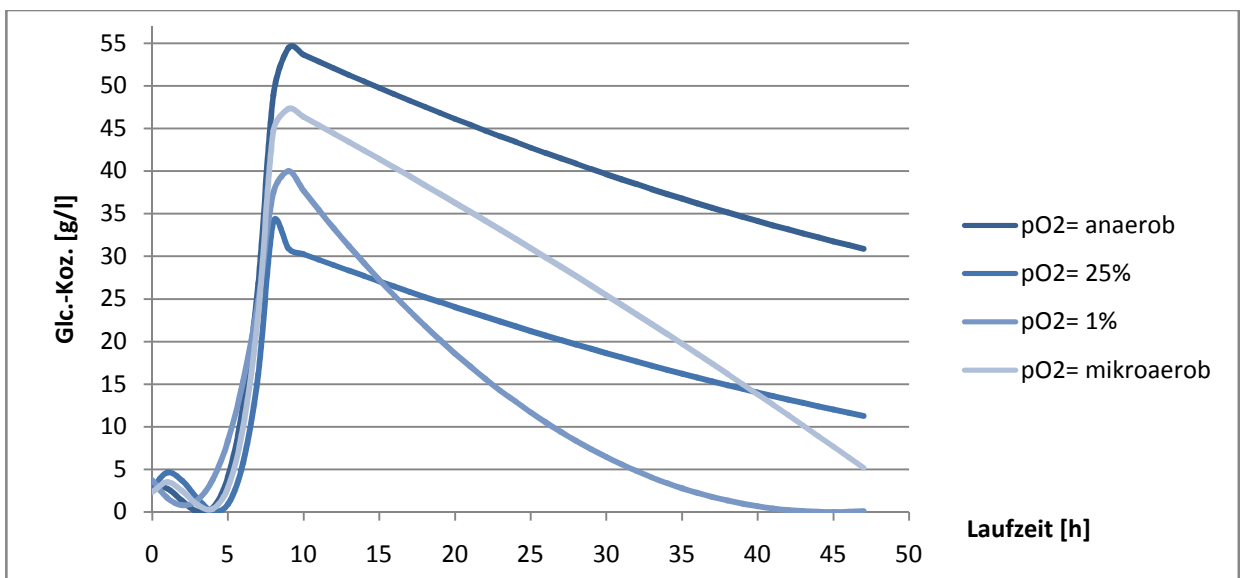


Abbildung 17 Die Glucose-Konzentration während der fed-batch Fermentation mit *B. pumilus* DSM 361 in Abhängigkeit von den Sauerstoffbedingungen

7.4. Fermentation mit *Bacillus pumilus* DSM 27

Als nächstes erfolgte ein weiterer Versuch mit einem anderen *B. pumilus* Stamm. Dafür wurde der oben beschriebene zweite Versuchsaufbau genutzt. Es wurden dieselbe Temperatur und der gleiche pH-Wert genutzt wie bei der vorhergehenden Fermentation mit *B. pumilus* DSM 27. Auch hier wurde der Einfluss der Begasungsrate während des fed-batch-Versuches untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse werden in den folgenden beiden Abbildungen aufgeführt:

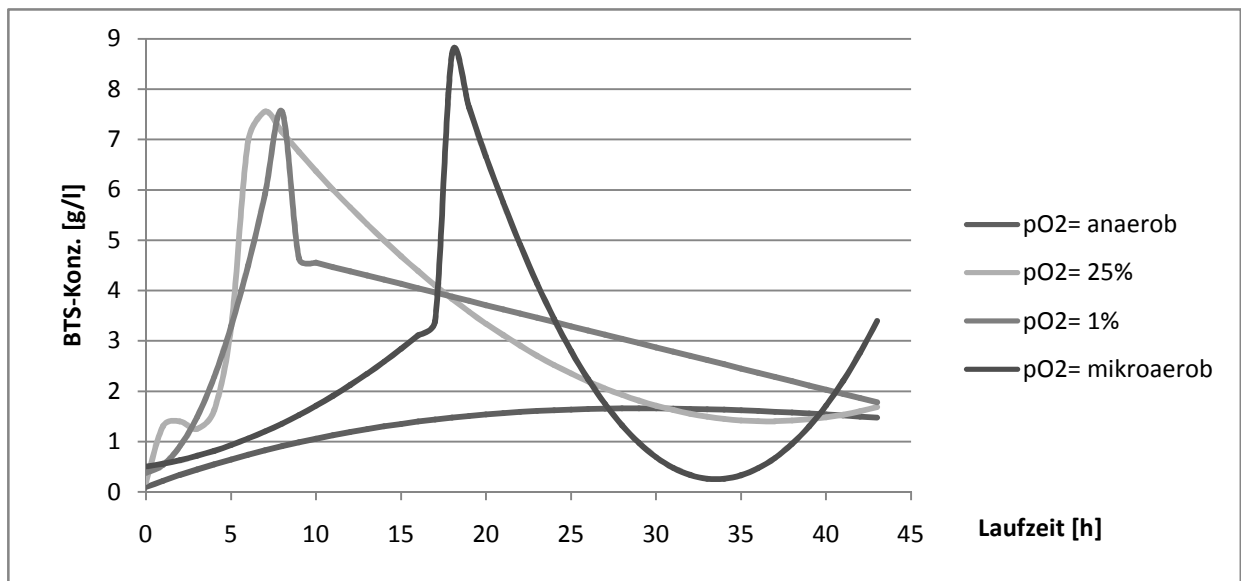


Abbildung 18 Die BTS-Konzentration von *B. pumilus* DSM 27 während der fed-batch Fermentation in Abhängigkeit von der Begasungsrate

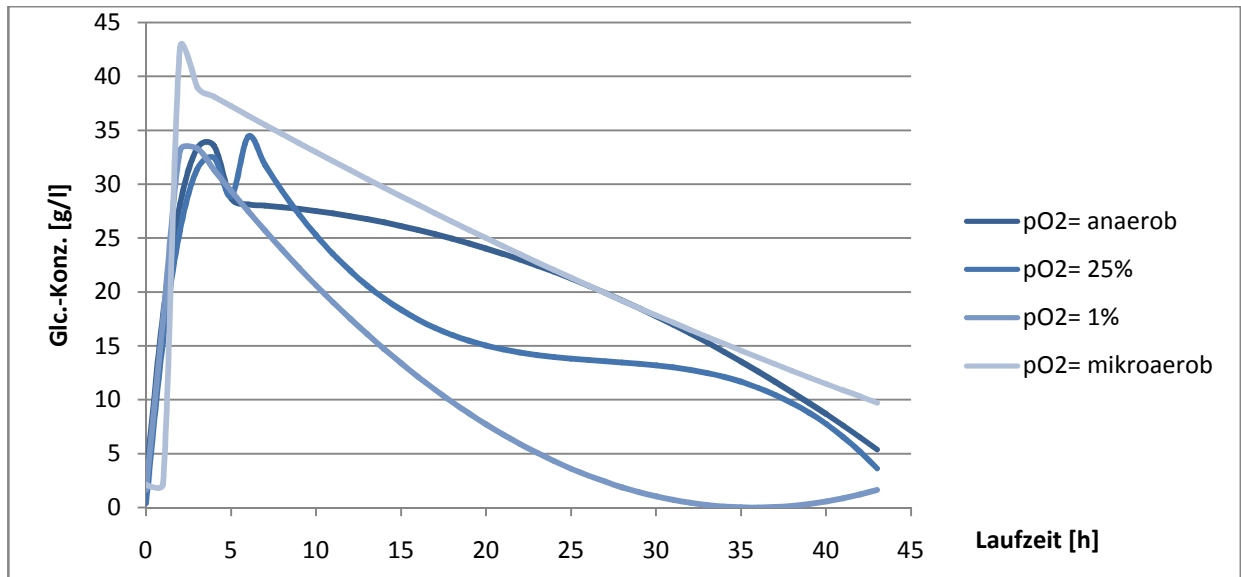


Abbildung 19 Die Glucose-Konzentration der *B. pumilus* DSM 27 fed-batch Fermentation in Abhängigkeit von den Sauerstoffbedingungen

7.5. Fermentation mit *Bacillus amyloliquefaciens* DSM 7

Als nächstes wurde ein weiterer Vertreter der Gattung *Bacillus* untersucht. Auch hier wurde das in der Literatur empfohlene Laborsubstrat verwendet (Yang, et al., 2012). Aufgrund der komplexen Bestandteile des Mediums war es leider nicht möglich eine BTS-Bestimmung mithilfe von Filtern oder dem Photometer durchzuführen. Dieser Stamm wird also nur über den Substratverbrauch bzw. die Produktbildung charakterisiert. Auch hier sollte der Einfluss der Begasungsrate aufgezeichnet werden. Die Substratkonzentrationen in den einzelnen Fermentern wurden in der Abbildung 20 zusammengefasst:

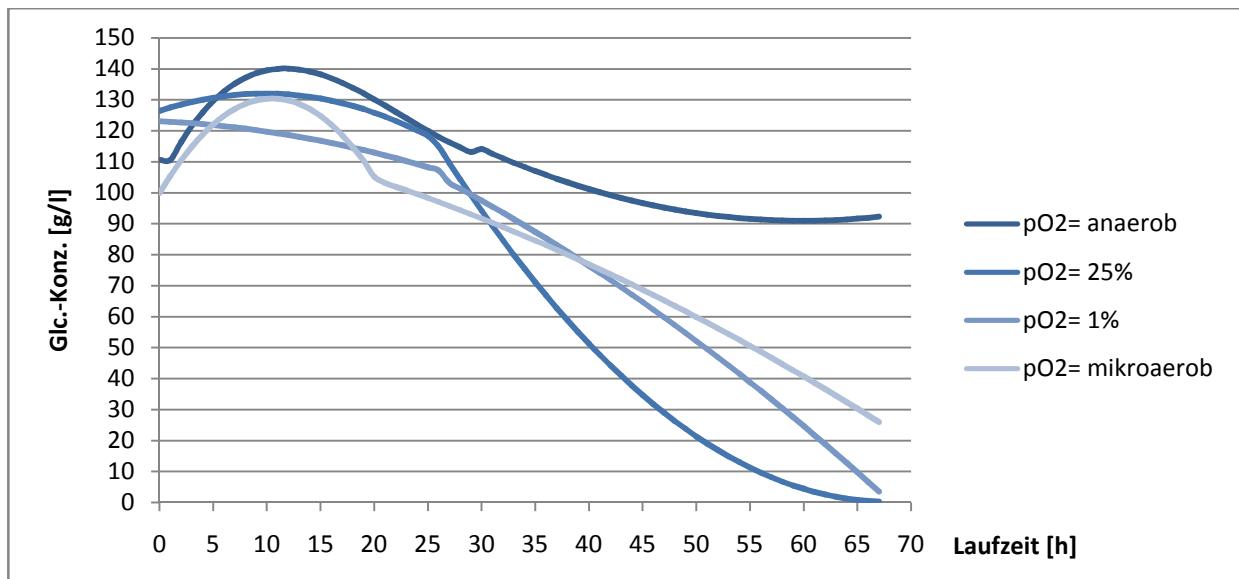


Abbildung 20 Die Glucose-Konzentration im Verlauf der *B. amyloliquefaciens* Fermentation in Abhängigkeit von verschiedenen Sauerstoffbedingungen

7.6. Fermentation mit *Geobacillus kaustophilus* DSM 7263

Die letzte Fermentation erfolgte mit dem thermophilen Bakterium *Geobacillus kaustophilus* DSM 7263. Hierfür wurde ebenfalls das in der Literatur angegebene Medium verwendet (Xiao, et al., 2012), wobei die C-Quelle getrennt von den restlichen Bestandteilen sterilisiert wurde. Der Einfluss der Begasungsrate wurde auch hier untersucht, wobei in einem Fermenter während der Fermentation die pO₂-Sonde ausfiel und von daher mit einem konstanten Luftstrom von 10 ml/ min begast wurde. Die BTS-Konzentration wurde hier über die optische Dichte bei 600 nm bestimmt. Dabei entsprach eine OD₆₀₀ von 1 einer BTS-Konzentration von 0,39 g/l (Xiao, et al., 2012). Die folgenden Abbildungen zeigen die jeweiligen Konzentrationen an Glucose und BTS in den unterschiedlich begasteten Fermentern auf:

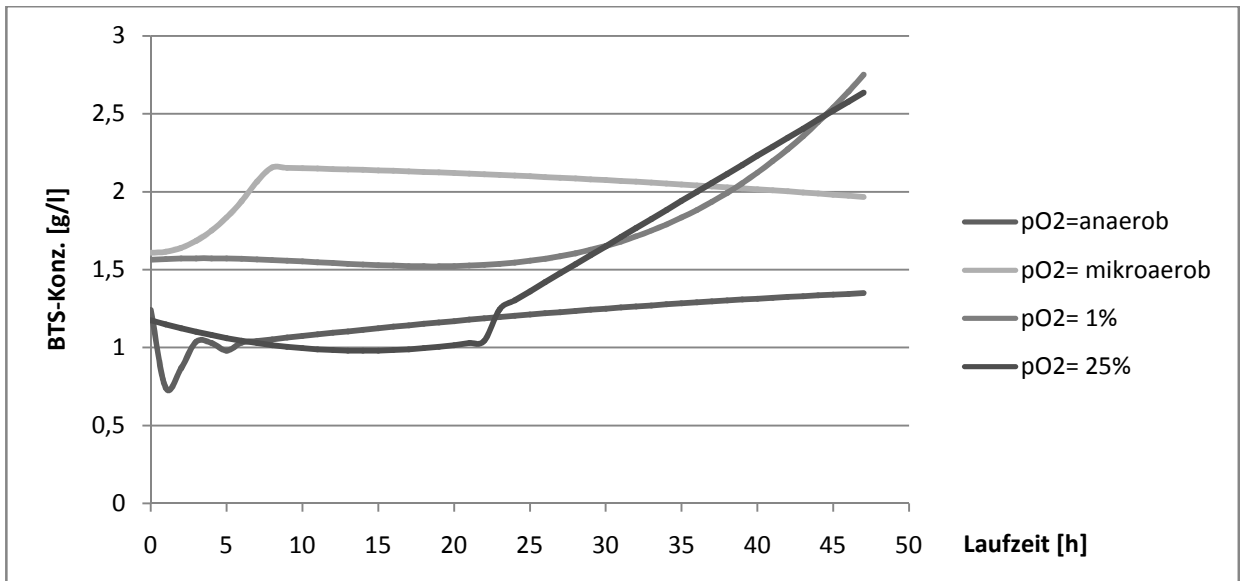


Abbildung 21 Die BTS-Konzentration von *G. kaustophilus* in Abhängigkeit von verschiedenen Sauerstoffbedingungen

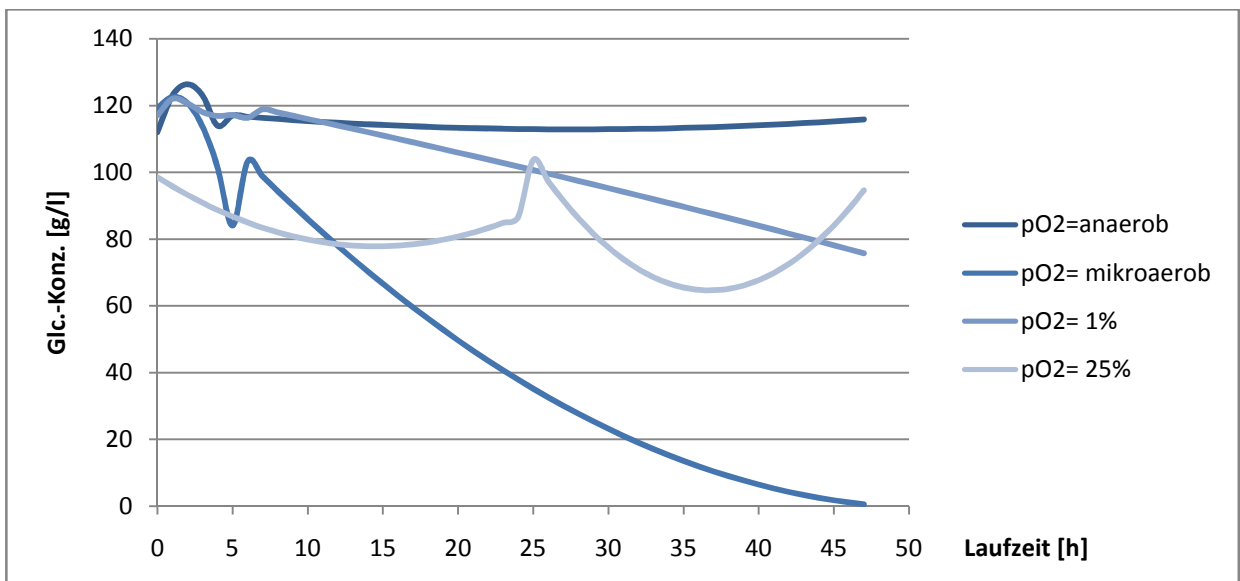


Abbildung 22 Die Glucose-Konzentration während der Fermentation von *G. kaustophilus* in Abhängigkeit von verschiedenen Sauerstoffbedingungen

8. Diskussion

8.1. Wachstum der verschiedenen Stämme

Zuerst wird der Fermentationsverlauf der einzelnen Experimente mit dem aus der Literatur verglichen. Beginnend bei *B. subtilis* DSM 2109 lässt sich feststellen, dass das hier benutzte Medium nach Yang (Yang, et al., 2015) nur als Vorkulturmedium eingesetzt wurde, was einen direkten Vergleich schwer macht. Das eigentliche komplexe Fermentationsmedium beinhaltet eine doppelt so hohe Glucose-Konzentration von 100 g/l, die innerhalb von 60 h komplett abgebaut. Im Vergleich dazu wurden die 40 g/l, die in dieser Arbeit verwendet wurden nach ca. 30 h abgebaut, wenn auch nicht in allen Fermentoren. In anderen Quellen wie (Zhang, et al., 2011) wurde teilweise sogar mit noch höheren Glucose-Konzentrationen gearbeitet, welche auch vollständig abgebaut wurden. Der MO scheint somit auch mit hohen Glucose-Konzentrationen zurecht zu kommen, ohne dass eine Substratinhibierung eintritt. Die in der Quelle angegebenen BTS-Werte wurden mithilfe der Optischen Dichte berechnet und erreichten einen Höchststand zum Ende der Fermentation von 9 g/l. Ähnliche Werte konnten hier in dieser Arbeit erreicht werden, was auf die Nutzung eines Fermentersystem mit regelbaren Parametern anstelle der Nutzung von Schüttelkolben zurückzuführen ist.

Bei *Methylobacter rhodesianum* hingegen ließen sich keinerlei Quellen für eine Fermentation zur Produktion von C₄-Stoffen wie Acetoin oder 2,3-Butandiol finden. Dieses Alkohol-verwertende Bakterium wurde bisher nur zur fermentativen Herstellung von PHB genutzt. (Khosravi-Darani, et al., 2013) Das hier genutzte Medium nach Papert arbeitete mit 16 g/l Glucose, von denen nach der Sterilisation nur noch 9 g/l nachgewiesen werden konnten. Diese wurden innerhalb von ca. 7-8 h komplett abgebaut. Dazu muss erwähnt werden, dass dieses Bakterium ursprünglich nur auf Alkoholen wie Methanol und Ethanol wuchs und erst nachträglich befähigt wurde Glucose zu verwerten. Um somit vielleicht eine Verbesserung des Wachstums herbeizuführen, wurde in der zweiten Versuchsreihe reiner Ethanol zugegeben. Jedoch war ein gegenteiliger Effekt zu beobachten. Die Abbauzeit für Glucose verdreifachte sich und die BTS-Werte, welche vorher bei 5-6 g/l lagen, sanken auf Werte zwischen 3 und 1,5 g/l. Die Begründung für dieses Phänomen könnte in der Nutzung zwischen den verschiedenen Stoffwechselwegen des Bakteriums liegen. Zum Abbau von Alkoholen, insbesondere Methanol, wird der Serin-Stoffwechselweg in *M. rhodesianum* beschritten

(Babel, 1992). Nachdem der Ethanol verbraucht wurde, was vermutlich relativ schnell geschieht, wird anschließend wieder auf einen Glucose-abbauenden Weg gewechselt. Durch diesen Wechsel braucht das Bakterium länger, um Glucose vollständig abzubauen. Es kann auch längst nicht so viel Biomasse aufgebaut werden, da die Nutzung verschiedener Stoffwechselwege viel Energie erfordert.

Bei *B. pumilus DSM 361* wurde auf den Artikel von (Xiao, et al., 2010) zurückgegriffen. Es handelt sich hierbei um den gleichen Mikroorganismus. Laut Artikel wurde unter Nutzung des LB-Mediums mit 3,6 g/l Glucose im Schnitt BTS-Werte von 2,34 g/l erreicht. Dies deckt sich ungefähr mit den Ergebnissen, die während dieser Arbeit erhalten wurden, bis auf den Fermenter mit der optimalen Sauerstoffversorgung, wo sogar 6 g/l BTS erreicht wurden. Im weiteren Verlauf des Artikels wurde ein Versuch mit hoher Glucose-Konzentration beschrieben, welcher abgewandelt auch hier durchgeführt wurde. Laut den Autoren wurde bei Nutzung eines LB-Mediums mit 200 g/l Glucose BTS-Werte von bis zu 3,25 g/l nach 25 h erreicht. Im abgewandelten Experiment betrug der BTS-Wert im optimal begasteten Fermenter 6 g/l nach 25 h, was zum einen an der Tatsache liegen könnte, dass eine erste Wachstumsphase mit dem Medium mit wenig Glucose vorher durchgeführt wurde. Des Weiteren wurden im Artikel nur Erlenmeyerkolben und kein Fermenter zur Kultivierung benutzt, was die Regelung von Parametern wie Sauerstoff oder pH ausschließt.

Das beschriebene Experiment wurde anschließend auch mit dem zweiten *B. pumilus DSM 27* durchgeführt. Auch hier wurden wieder größere Werte an BTS aufgenommen, wobei das Maximum an Biomasse relativ früh im Verlauf der Biomasse auftrat.

Insgesamt lässt sich über die beiden *B. pumilus*-Stämme sagen, dass sie problemlos hohe Glucose-Konzentrationen verkraften und keinerlei Substrat-Inhibierung auftritt. Auch scheint die Abhängigkeit des Wachstums von den Sauerstoffbedingungen im Fermenter nicht sehr stark zu sein, da selbst im anaeroben Fermenter die Glucose bis auf 5 g/l abgebaut wurde und ein maximaler Wert von 1,5 g/l BTS erzielt wurde.

Der vorletzte Fermentationsversuch erfolgte mit *B. amyloliquefaciens DSM 7*. Hierfür wurde auf den Artikel von (Yang, et al., 2012) zurückgegriffen, und das optimierte Medium für die Fermentation benutzt. Im Gegensatz zum Großteil der anderen Artikel wurde hier ebenfalls ein Fermenter benutzt, unter anderem mit einem Volumen von 3 l. Die eingesetzte Glucosekonzentration von 150 g/l wurde in 32 h abgebaut, wobei an die

8 g/l BTS entstanden. In dieser Arbeit wurde die angegebene Glucose-Konzentration im sauerstoffreichsten Fermenter nach 67 h komplett abgebaut. Die BTS-Konzentration konnte aufgrund der komplexen Bestandteile leider nicht ermittelt werden. Der Unterschied in der Laufzeit liegt vermutlich in der unterschiedlichen Stamm-Auswahl begründet. Der von Yang benutzte Stamm wurde erst 2012 von ihm in China entdeckt und ist auch in der Lage Reste aus der Alkohol-Herstellung zu verwerten (Yang, et al., 2015). Dies wäre ein interessanter Ansatz, um die Kosten bei der Produktion zu senken.

Der letzte Kandidat für die bakterielle Produktion von Acetoin bzw. 2,3-Butandiol war *Geobacillus kaustophilus* DSM 7263. Dabei handelt es sich um ein thermophiles Bakterium, dessen Temperaturoptimum bei 50-55°C liegt. Der hier als Quelle fungierende Artikel stammt von (Xiao, et al., 2012) und behandelt einen neuen Stamm namens *Geobacillus* XT15. Da dieser in Deutschland nicht verfügbar war, wurde der in dem Artikel als genetisch am ähnlichsten beschriebene Stamm namens *G. kaustophilus* gewählt. Das verwendete Medium wies wie in den meisten vorherigen Versuchen eine hohe Glucose-Konzentration von 220 g/l auf. Diese wurde im Artikel, während einer zweitägigen Fermentationsdauer, nur um 70 g/l abgebaut. Dagegen wurde im am stärksten begasten Fermenter im hier beschriebenen Versuch die Glucose vollständig nach 45 h abgebaut. Dieser Unterschied lässt sich zum einen auf eine schlussendlich geringere Substratkonzentration zurückführen, sowie eine Fermentation im Fermenter anstelle im Schüttelkolben.

Um das Wachstum der verschiedenen Stämme miteinander vergleichen zu können werden weitere Parameter neben der Glucose-Konzentration und der BTS-Konzentration betrachtet. Dazu gehören die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit μ , der spezifische Ausbeutekoeffizient für das Substrat Y_x^s , die Substrataufnahmerate r_s , die Wachstumsgeschwindigkeit r_x . In der Einleitung 5.4 wird auf die Theorie des mikrobiellen Wachstums der MO Bezug genommen.

Die aufgeführten Werte in der Tabelle entstammen der exponentiellen Phase, da diese relativ gut Auskunft über das mikrobielle Wachstum gibt. Desweiteren handelt es sich um gerundete Mittelwerte, um eine Verzerrung der Daten zu vermeiden.

Tabelle 8 Vergleich der verschiedenen Bakterien-Stämme mithilfe weiterer Wachstumsparameter

	pO ₂ [%]	μ [1/h]	rx[g/l*h]	rs [g/l*h]	Y _x ^s [g/g]
<i>B. subtilis</i> DSM 2109	0,1	0,0107	0,1044	1,9543	0,0011
	1	0,2689	0,7887	1,911	0,6455
	25	0,1328	0,6167	1,126	0,0526
<i>M. rhodesianum</i> MB 126, MB 127 ohne Ethanol	0,1	0,182	0,3339	1,139	0,1259
	1	0,3194	0,537	1,25	0,3083
	25	0,3016	0,9532	1,245	0,1604
<i>M. rhodesianum</i> MB 126, MB 127 mit Ethanol	0	0,0307	0,0467	0,279	0,0307
	0,1	0,0455	0,0803	0,3407	0,0314
	1	0,1872	0,1677	0,8779	0,2723
	25	0,0321	0,0928	4,4565	0,0126
<i>B. pumilus</i> DSM 27 fed-batch	0	0,0646	0,0644	0,5939	0,0734
	0,1	0,1034	0,3642	-1,0150	-0,4441
	1	0,1017	0,2676	0,5073	0,0900
	25	0,0962	0,4891	1,2814	0,2460
<i>B. pumilus</i> DSM 361 batch	0	0,0218	0,0680	0,1893	0,0100
	0,1	0,0211	0,0478	0,1345	0,0100
	1	0,2371	0,3956	0,3228	0,2004
	25	0,4982	1,9042	0,3165	0,3572
<i>B. pumilus</i> DSM 361 fed-batch	0	0,0091	0,0032	0,72	0,0279
	0,1	0,0400	0,0514	1,021	0,0392
	1	0,1284	0,6341	1,532	0,0387
	25	0,0508	0,4676	0,477	0,0059
<i>G. kaustophilus</i> DSM 7263	0	0,0180	0,0147	0,847	0,0211
	0,1	0,0175	0,0336	4,080	0,0002
	1	0,0257	0,0504	1,129	0,0134
	25	0,0326	0,0473	0,590	0,0241

Die grün hervorgehobenen Felder sind die Zahlenwerte für die Fermentoren, die laut Lehrmeinung optimal mit Sauerstoff begast wurden. Teilweise liegen diese Werte jedoch unter den Werten, die in den anderen Fermentoren zustande kamen. Die Erklärung für dieses Phänomen liegt zum einen in der manuellen Regelung des Airflows, sodass es manchmal zu einer Überversorgung einzelner Fermenter kann. Weitere Gründe liegen in der Biochemie der Mikroorganismen begründet. Im Kapitel 9 wird dazu mehr geschrieben. Allgemein lässt sich jedoch erkennen, dass insbesondere die anaerob betriebenen Fermentoren geringere Werte bei allen Parametern aufweisen, da es sich bei allen fermentierten Bakterien um Aerobier handelt.

Bei *B. subtilis* scheint es, dass die Begasung mit nur 1% pO₂ keinerlei negativen Einfluss auf das Wachstum hat, da hier sogar höhere Werte für die Parameter ermittelt werden konnten anstelle des Fermenters mit der höchsten Begasung.

Das gleiche scheint für *M. rhodesianum* zu gelten. Zwischen den Fermentern mit 1% bzw. 25% scheint kein so großer Unterschied zu bestehen im Vergleich zu denen, die mikro- oder anaerob betrieben wurden. Dies erscheint überraschend, da dieses Bakterium obligat aerob ist. Erklärungen könnten in der ebenfalls hohen Biomassekonzentration des Fermenters mit 1% Gelöstsauerstoff liegen. Weiterhin gut zu erkennen ist der Unterschied im Wachstum, der durch die Zugabe von Ethanol verursacht wurde. Die Wachstumsparameter sind bis auf eine Ausnahme alle deutlich geringer, was für die Theorie eines höheren Energieaufwandes zum Wechsel zwischen den verschiedenen Stoffwechselwegen spricht.

Bei dem ersten *B. pumilus* Stamm mit der DSM-Nr. 27 liegen die höchsten Werte, bis auf μ , für den Fermenter mit den idealen Sauerstoffbedingungen vor. Hier scheint also eine Versorgung mit ausreichend Sauerstoff einen stärkeren Einfluss auf das Wachstum der Mikroorganismen zu haben, als dies bei den ersten beiden Stämmen der Fall war. Die negativen Werte für den Fermenter mit 0,1% pO₂ sind eigentlich nicht möglich, werden der Vollständigkeit halber hier aber mit aufgeführt.

Im Vergleich dazu wurden für den anderen *B. pumilus* DSM 361 zwei Versuchsreihen mit verschiedenen Fahrweisen durchgeführt. Dies scheint wie an den Werten erkennbar durchaus einen großen Einfluss auf die betrachteten Parameter zu haben. Im batch-Versuch ist wie zu erwarten der Fermenter mit der höchsten Luftzufuhr am üppigsten gewachsen, sodass hier die jeweiligen Geschwindigkeiten für den Substratabbau bzw. den Biomasseaufbau am höchsten sind. Im fed-batch-Versuch hingegen liegen die Werte im Fermenter mit nur 1% pO₂ am höchsten, gefolgt von den anderen beiden begasten Fermentern. Abgeschlagen hingegen ist wiederum der Fermenter der gänzlich ohne Sauerstoff betrieben wurde, was allerdings zu erwarten war, aufgrund des aeroben Wachstumscharakters der Bakterien.

Für den letzten Mikroorganismus, nämlich *G. kaustophilus* zeichnet sich wiederum ein anderes Bild ab. Hier liegt der Fermenter mit der höchsten Luftzufuhr wieder vorne, dicht gefolgt von demjenigen mit nur 1% pO₂. Die Zugabe von viel Luft scheint das Wachstum also zu stimulieren.

8.2. Produktbildung der verschiedenen Stämme

Dieses Kapitel betrachtet die gebildeten Produkte, die während der Fermentation der einzelnen Stämme entstanden sind. Das Augenmerk liegt hierbei auf den C₄-Komponenten Acetoin und 2,3-Butandiol. Der Nachweis dieser Produkte erfolgte wie weiter oben beschrieben mit dem GC der Fam. Perkin Elmer. Für Acetoin erfolgte keinerlei Unterscheidung der Stereoisomere, da dies gerätetechnisch nicht möglich war. Bei 2,3-Butandiol hingegen konnte das R/S-Isomer von der meso-Form unterschieden werden. Für eine bessere Übersichtlichkeit in den Diagrammen werden beide jedoch zusammengefasst.

8.2.1. Produkte bei *B. subtilis* DSM 2109

Bei diesem Mikroorganismus konnten folgende Produkt-Konzentrationen während der Fermentation ermittelt werden:

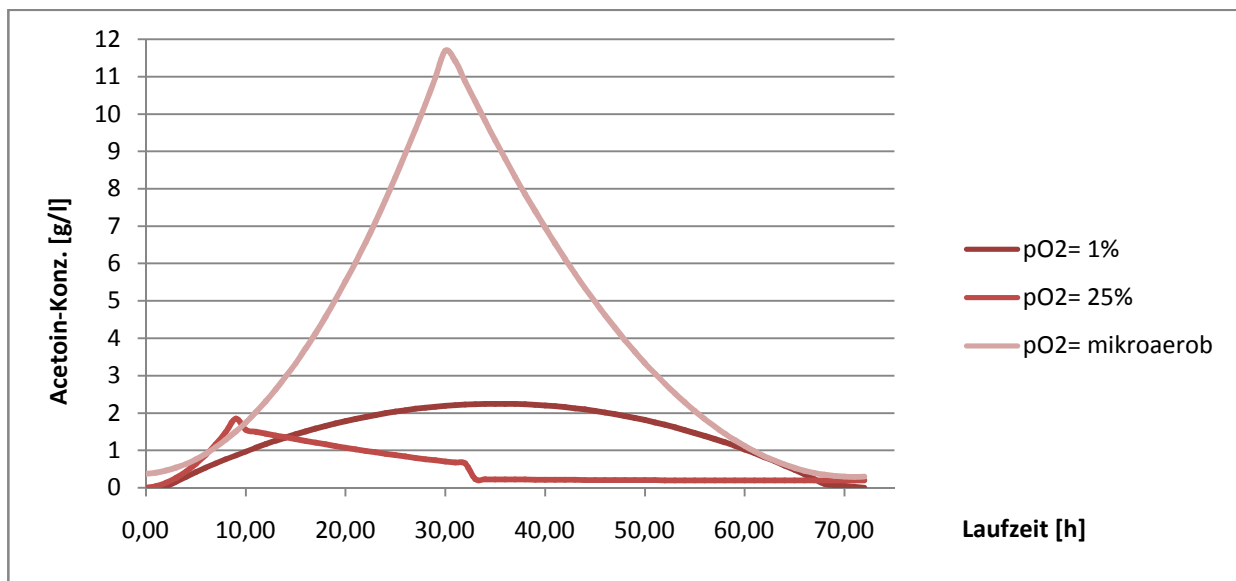


Abbildung 23 Die Acetoin-Konzentration bei *B. subtilis* in Abhängigkeit von verschiedenen Sauerstoffbedingungen

Auffällig ist hier, die extrem hohe Konzentration bei dem mikroaerob betriebenen Fermenter.

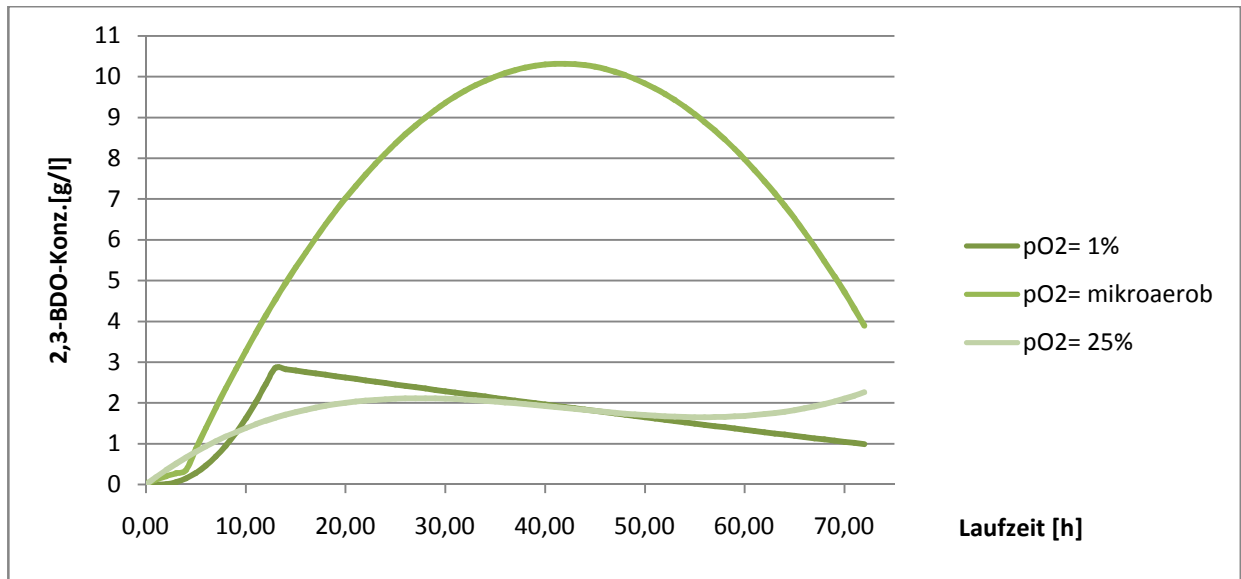


Abbildung 24 Die 2,3-BDO-Konzentration in Abhängigkeit von der Sauerstoffzufuhr

Auch bei der 2,3-BDO-Konzentration liegt der mikroaerobe Fermenter deutlich höher als die anderen beiden begasten Fermenter. Da dies jedoch unrealistisch erscheint, wird davon ausgegangen, dass es sich hierbei um einen Fehler während der Auswertung mithilfe des GC handelt.

Zur Überprüfung dieser Theorie werden die Werte aus der Literaturquelle herangezogen. Dabei handelt es sich um (Yang, et al., 2015). Hier konnten, zwar unter Nutzung eines anderen Mediums, Maximalwerte für Acetoin von ca. 8 g/l und für 2,3-Butandiol von 35 g/l unter Einsatz von 100 g/l Glucose während einer Laufzeit von 60 h erzielt werden. Allerdings handelte es sich um einen anderen Stamm aus dem Stammbaum von *B. subtilis*. Also erscheinen die Ergebnisse für den mikroaeroben Fermenter unter Betrachtung dieser Werte unrealistisch, sodass die Werte für den optimal begasten bzw. mikroaeroben Fermenter eher der Realität entsprechen. Auffällig ist hierbei, dass der andere weniger begaste Fermenter trotz allem höhere Werte produziert als der am stärksten begaste Fermenter. Dieses Phänomen wird bei (Celinska, et al., 2009) erklärt. Geringe Begasung fördert die 2,3-Butandiol-Produktion, da bei hoher Sauerstoffzufuhr die 2-Acetolactatsynthese abgeschaltet wird. Dies wurde zwar nur bei *Klebsiella sp.* und *Bacillus polymyxa* beobachtet, scheint jedoch auch für andere Vertreter der Gattung *Bacillus* zu gelten. Nebenprodukte, die in größeren Mengen während dieser Fermentation beobachtet werden konnten, waren Ethanol und 1-Propanol.

8.2.2. Produkte bei *M. rhodesianum* MB 126, MB 127

Bei dem nächsten Mikroorganismus namens *M. rhodesianum* ohne Zugabe von Ethanol konnten folgende Konzentrationen an Produkt ermittelt werden:

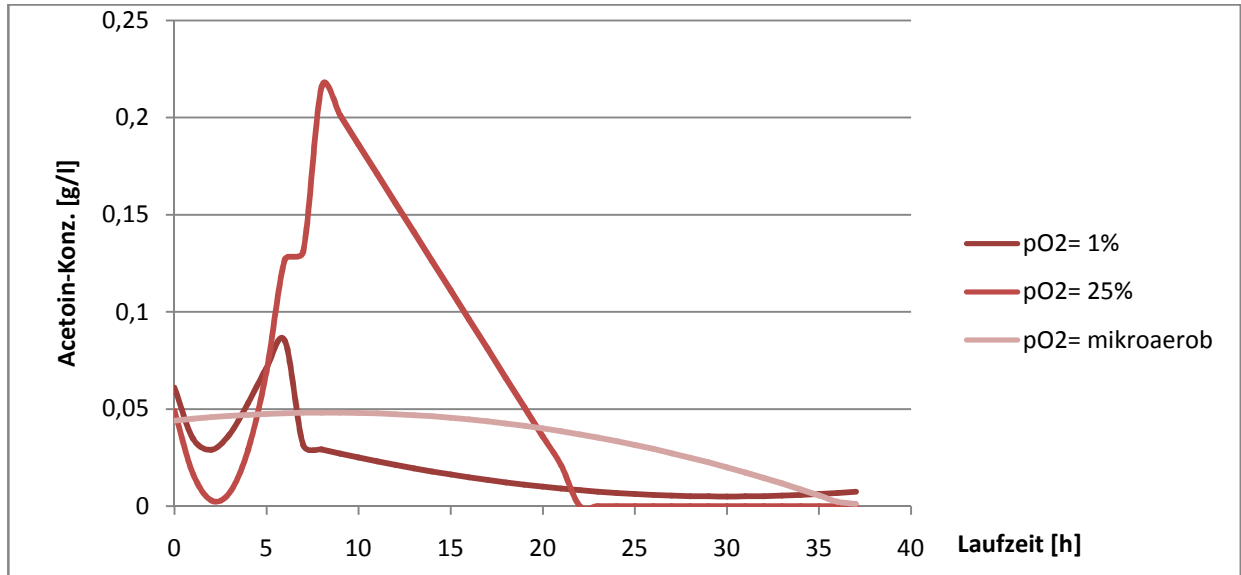


Abbildung 25 Die Acetoin-Konzentration während der Fermentation mit *M. rhodesianum* ohne Ethanol in Abhängigkeit von der Sauerstoffzufuhr

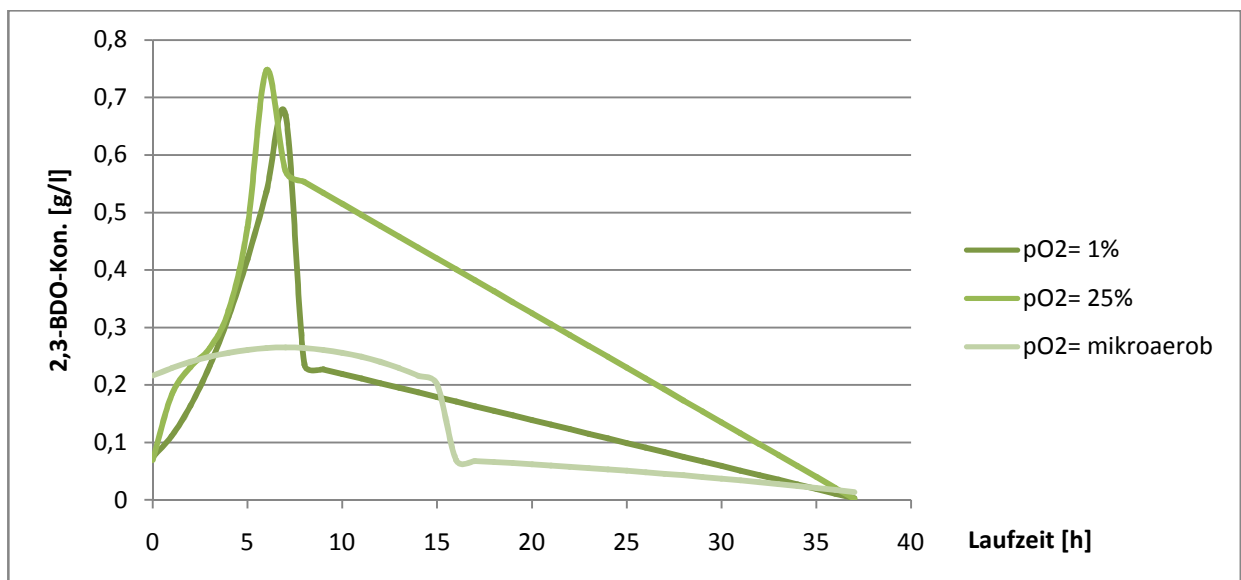


Abbildung 26 Die 2,3-Butandiol-Konzentration während der Fermentation mit *M. rhodesianum* ohne Ethanol in Abhängigkeit von der Sauerstoffzufuhr

Im Vergleich zum vorherigen Mikroorganismus konnten bei *M. rhodesianum* MB 126, MB 127 geringere Konzentrationen erzielt werden, sowohl bei Acetoin als auch bei 2,3-

Butandiol. Die Höchstwerte konnten im Fermenter mit der stärksten Begasung beobachtet werden, insbesondere bei Acetoin gibt es einen deutlich erkennbaren Einfluss der Begasung auf die Produktbildung. Bei 2,3-Butandiol hingegen scheint der Einfluss geringer zu sein, da die Kurven von 25% pO₂ und 1%pO₂ hier deutlich enger zusammen liegen. Da zur Acetoin- bzw. 2,3-Butandiol-Produktion keinerlei Literatur für dieses Bakterium vorliegt, können keine Daten zum Vergleich herangezogen werden. Allerdings scheint die geringe Höhe der Konzentration darauf hinzuweisen, dass auch in Zukunft keine vermehrte industrielle Produktion beider C₄-Stoffe erfolgen wird.

In der 2. Versuchsreihe mit diesem MO unter Zugabe von Ethanol wurden folgende Ergebnisse erzielt:

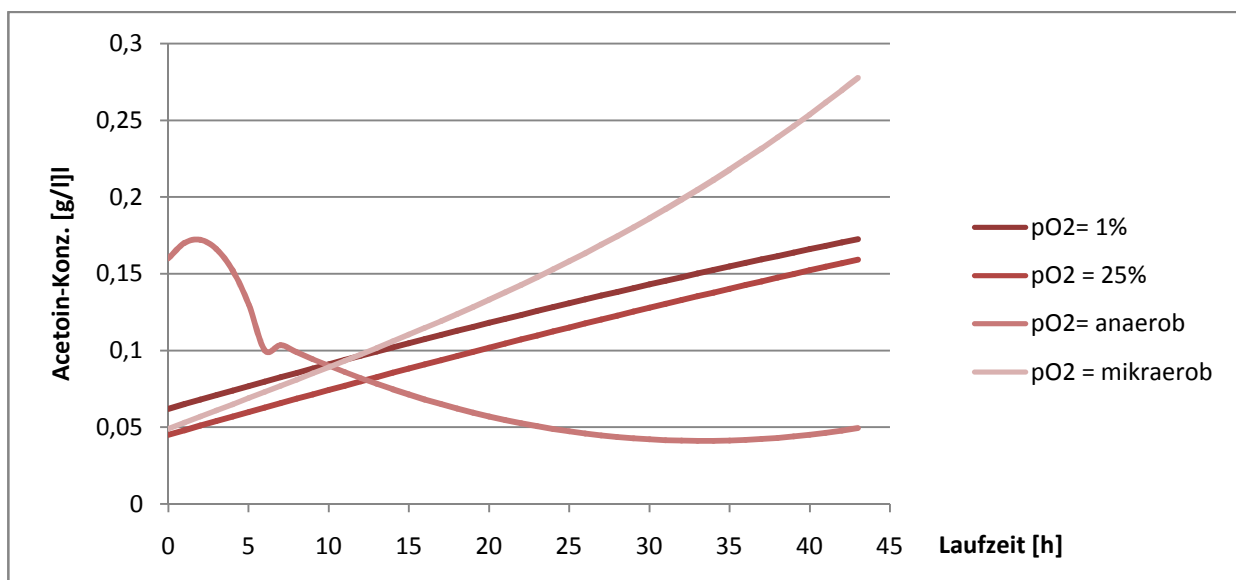


Abbildung 27 Die Acetoin-Konzentration während der Fermentation mit *M. rhodesianum* mit Ethanol in Abhängigkeit von verschiedenen Sauerstoffbedingungen

Bei Betrachtung der Abbildung 26 fällt auf, dass die gebildete Konzentration an Acetoin höher ist als bei der vorherigen Fermentation ohne Ethanol. Wie weiter oben in den Ergebnissen bereits ausgeführt wurde, war bei der Fermentation eine geringere Biomasse und eine längere Abbaupzeit für Glucose zu beobachten. Dies scheint die Produktbildung nicht negativ beeinflusst zu haben. Es stellt sich nun allerdings die Frage, aus welcher Substratquelle Acetoin gebildet wurde. Würde es sich dabei um den Ethanol handeln, wäre es vielleicht möglich die Acetoin-Konzentration weiter zu steigern, wenn nur Alkohol als Substrat verwendet werden würde.

Für 2,3-Butandiol hingegen bietet sich ein anderes Bild:

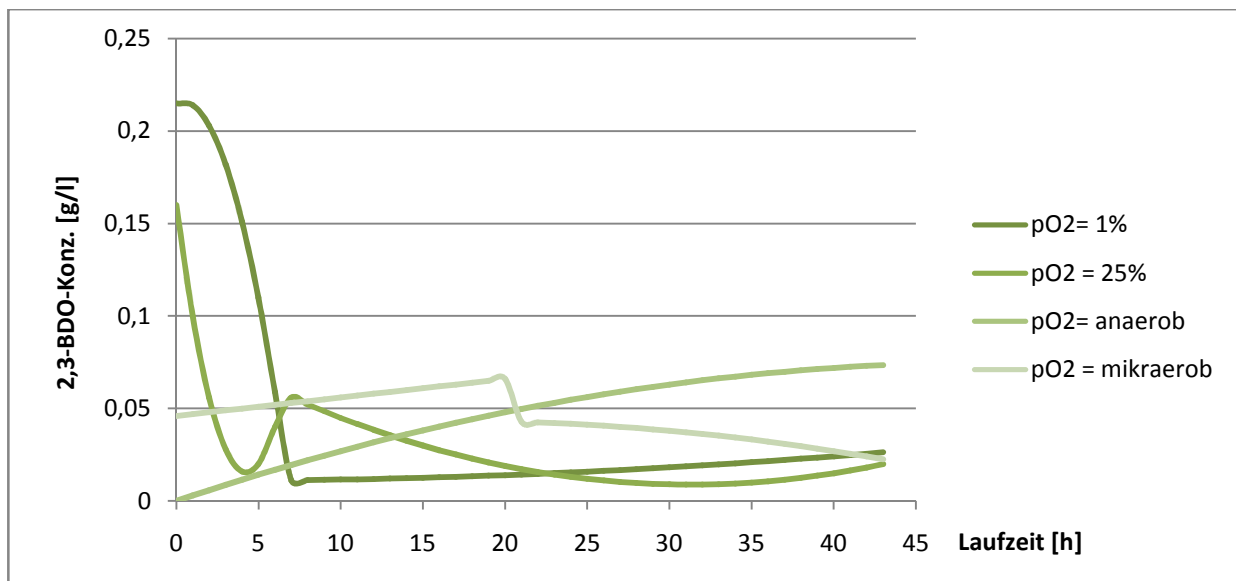


Abbildung 28 Die 2,3-Butandiol-Konzentration während der Fermentation mit *M. rhodesianum* mit Ethanol in Abhängigkeit von verschiedenen Sauerstoffbedingungen

Die Höchstwerte für diesen C₄-Körper sind zu Beginn der Fermentation zu finden und pegeln sich anschließend im unteren Bereich von 0 bis 0,05 g/l ein. Auffällig ist hierbei, dass im Gegensatz zur vorhergegangenen Fermentation die Produktbildung zum Ende der Fermentation nicht abnimmt, sondern sogar zunimmt. Dies trifft insbesondere auf den anaeroben Fermenter zu. Gründe hierfür könnten in dem verlangsamten Glucose-Abbau liegen. In diesem Fermenter war bis zum Ende der Fermentation Glucose vorhanden, sodass die Glucose vermutlich direkt zu 2,3-Butandiol umgewandelt wurde und nur der Alkohol für den Erhaltungsstoffwechsel und den Biomasseaufbau verwendet wurde. Durch das Hin- und Herschalten zwischen den verschiedenen Stoffwechselwegen zum Abbau von Glucose und Ethanol wird jedoch insgesamt zu viel Energie verbraucht, sodass die Produktion zu gering ausfällt. Eine Abhilfe für dieses Problem wäre die Nutzung von nur einem Substrat, in diesem Fall vermutlich Ethanol.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass hier der mikroaerobe Fermenter bei beiden Stoffen derjenige mit den höchsten Werten ist, ganz im Gegensatz zur ersten Versuchsreihe mit diesem MO, wo der am stärksten begaste Fermenter die Höchstwerte erzielte. Die Begasung scheint also bei diesem Bakterium unter Nutzung von Alkoholen wie Ethanol nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Nebenprodukte, die während dieser Fermentation auftraten waren 1- und 2-Propanol.

8.2.3. Produkte bei *Bacillus pumilus* DSM 361

Bei dem nächsten Mikroorganismus handelt es sich dagegen um einen Vertreter aus der Familie der Bacillii, nämlich *B. pumilus* DSM 361. Hier wurden allerdings auch zwei Versuchsreihen durchgeführt, einer als batch und der andere als fed-batch. Im Verlauf des batch-Versuches konnten folgende Konzentrationen an Acetoin und 2,3-Butandiol beobachtet werden:

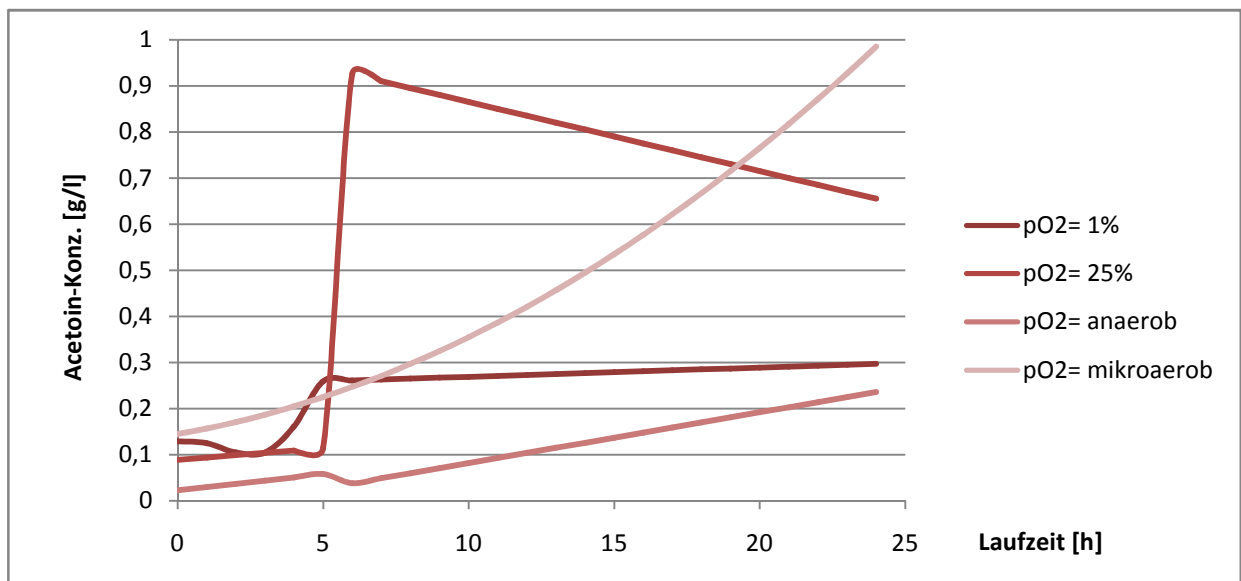


Abbildung 29 Die Acetoin-Konzentration während der batch-Fermentation mit *B. pumilus* DSM 361 in Abhängigkeit von verschiedenen Sauerstoffbedingungen

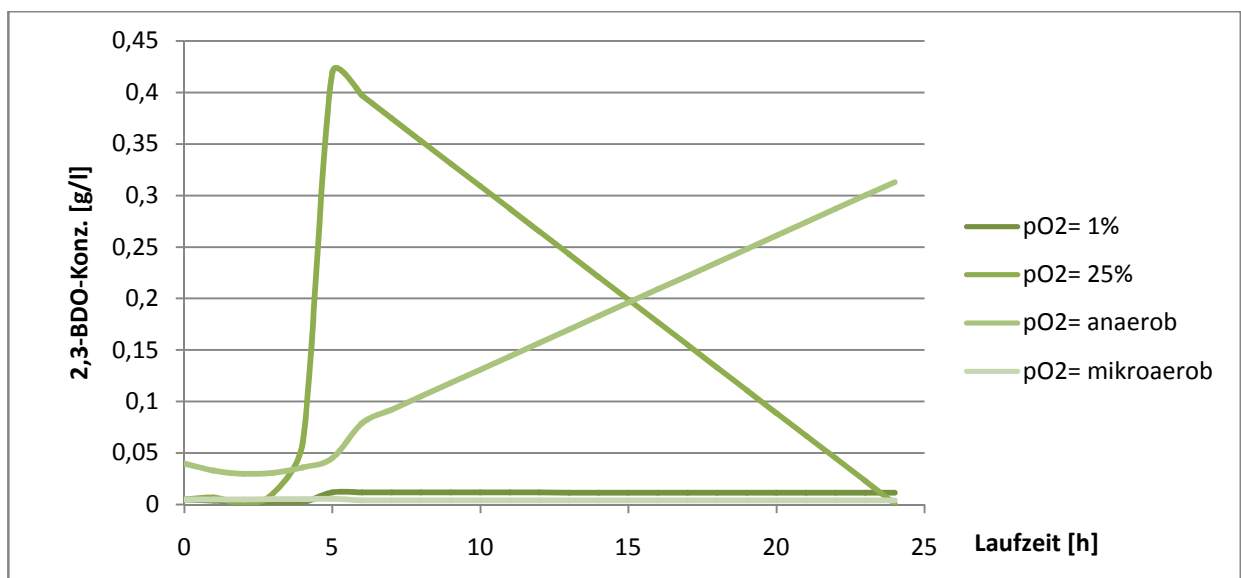


Abbildung 30 Die 2,3-Butandiol-Konzentration während der batch-Fermentation mit *B. pumilus* DSM 361 in Abhängigkeit von verschiedenen Sauerstoffbedingungen

Wie zu erwarten war, liegt im Fermenter mit der optimalen Begasung bei beiden Produkten die höchste Konzentration vor. Hier konnte auch die höchste Biomasse zum Zeitpunkt der Acetoin-Bildung betrachtet werden. Erstaunlicherweise jedoch folgt als nächstes der mikroaerobe Fermenter, der zum Ende der Fermentation sogar höhere Konzentrationen bei Acetoin bildet. Gründe hierfür, könnten in der zu starken Begasung über Nacht liegen, da der am nächsten Morgen gemessene pO_2 -Wert bei knapp 18% lag. Dies liefert somit den Beweis dafür, dass die Begasung bei diesem Bakterium eine wichtige Rolle spielt. Zum einen begünstigt es den Biomasseaufbau, welche dann vermehrt Produkt bilden kann. In der Literaturquelle (Xiao, et al., 2010) wurden bei einer Glucose-Konzentration von 3,6 g/l maximal 0,5 g/l Acetoin produziert, während hier mit 3,6 g/l Glucose die doppelte Menge von max. 1 g/l Acetoin gebildet wurde. Die Biomasse betrug laut Quelle 2,34 g/l, während hier sogar knapp 6 g/l erzielt werden konnten. Dies liegt vermutlich an der Nutzung eines besser kontrollierbaren Fermentersystems anstelle von Erlenmeyerkolben. Nebenprodukte, die während dieser Fermentation in größeren Mengen gebildet wurden, waren Ethanol und 2-Propanol.

Im nächsten Versuch wurde ein fed-batch ähnlicher Versuch mit dem gleichen Bakterium durchgeführt, bei dem eine deutliche Steigerung der Produktkonzentrationen beobachtet werden konnte:

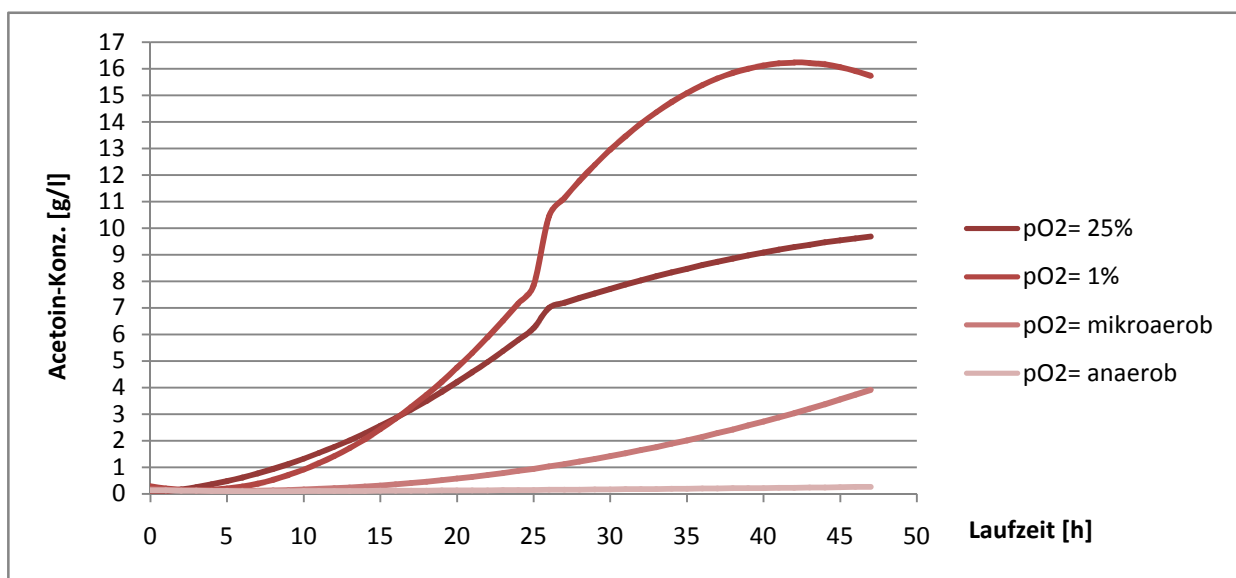


Abbildung 31 Die Acetoin-Konzentration während der fed-batch Fermentation mit *B. pumilus* DSM 361 in Abhängigkeit von verschiedenen Sauerstoffmilieus

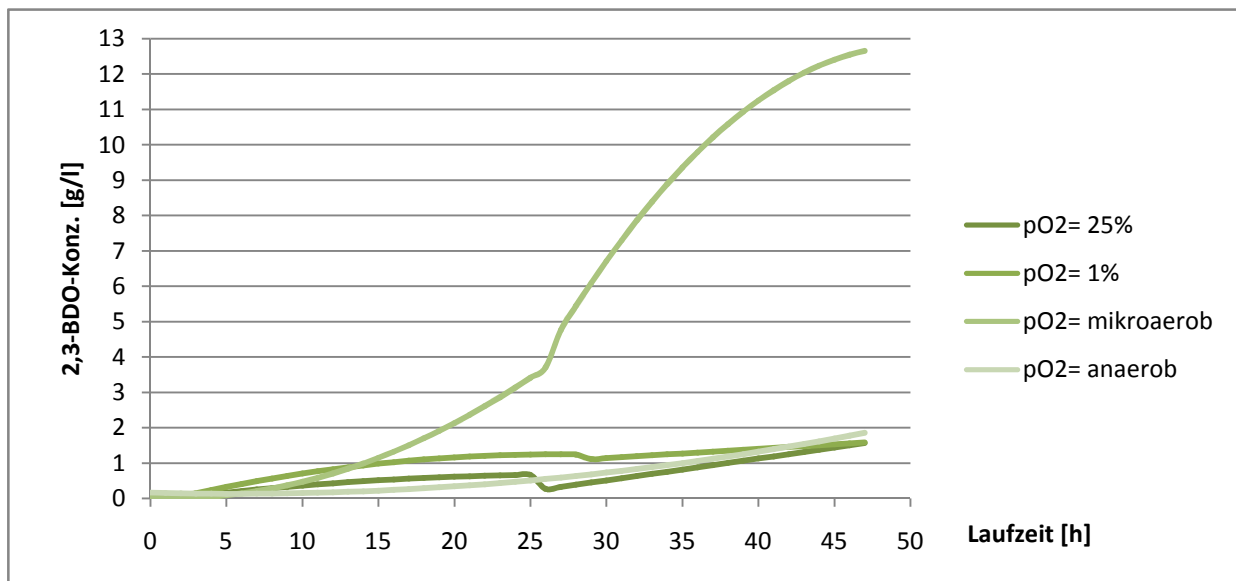


Abbildung 32 Die 2,3-Butandiol-Konzentration während der fed-batch Fermentation mit *B. pumilus* DSM 361 in Abhängigkeit von verschiedenen Sauerstoffmilieus

Die Produktkonzentration ist erheblich gestiegen, nachdem anstelle des Mediums mit nur 3,6 g/l Glucose ein zweites Medium mit 200 g/l Glucose zugeführt wurde. Die reale Glucose-Konzentration lag jedoch bei 50 g/l, welche jedoch auch vollständig konsumiert wurden. Der Zeitpunkt, ab der die Produktbildung vermehrt stattfand, liegt bei ca. 25 h. Dort ist insbesondere bei dem mikroaeroben Fermenter ein verstärkter Abbau der Glucose zu beobachten, bei einem gleichzeitigen Peak der Biomasse, die erst ab der 30. Stunde auf ein niedrigeres Niveau sinkt. Betrachtet man die real aufgenommenen Werte, stellt man jedoch fest, dass die Biomasse später sogar eine noch höhere Konzentration erreicht. Wie bei *B. subtilis* DSM 2109 scheint auch hier der Zusammenhang zwischen den wenig begasten Fermentern und einer hohen Produktkonzentration feststellbar. Allerdings gilt dies nur für den Versuch mit der hohen Glucose-Konzentration. Laut (Celinska, et al., 2009) ist die Aufnahmerate für Glucose im mikroaeroben Bereich am höchsten, während es danach zu einem Abfall der Glucoseaufnahme kommt. Die Begasung beeinflusst auch welches Produkt favorisiert entsteht. Im mikroaeroben Bereich ist es eindeutig 2,3-Butandiol, während für Acetoin der Fermenter mit 1% pO₂ am besten produziert. Dies kann genutzt werden, um die Produktion zu lenken. Im Fall dieser Arbeit würde man mehr Wert auf das Acetoin legen. Des Weiteren scheint die Menge an aktiver Biomasse die Produktbildung zu fördern. Dieser lineare Zusammenhang wurde durch Xiao (Xiao, et al., 2010) nachgewiesen, ebenso wie die Tatsache, dass Acetoin als Substrat genutzt werden

kann, wenn Glucose aufgebraucht wurde. Dies konnte hier nicht beobachtet werden, da die Fermentation abgebrochen wurde, als die Glucose vollständig aufgebraucht war. Die erzielten Produktkonzentrationen waren wie bei dem vorhergehenden Versuch im Vergleich zur Literatur doppelt so hoch, was vermutlich auch hier wieder auf den Einsatz des Fermentersystems zurückzuführen ist. 2,3-Butandiol wurde laut Xiao sogar nur in Spuren nachgewiesen, was in dieser Arbeit jedoch nicht der Fall war. Nebenprodukte, die hier nachgewiesen werden konnten, waren Ethanol, 2-Propanol und Essigsäure.

8.2.4. Produkte bei *Bacillus pumilus* DSM 27

Für den zweiten *B. pumilus* Stamm wurde nur die fed-batch Fermentation des vorhergehenden Versuchs durchgeführt. Dabei wurden folgende Konzentrationen festgestellt:

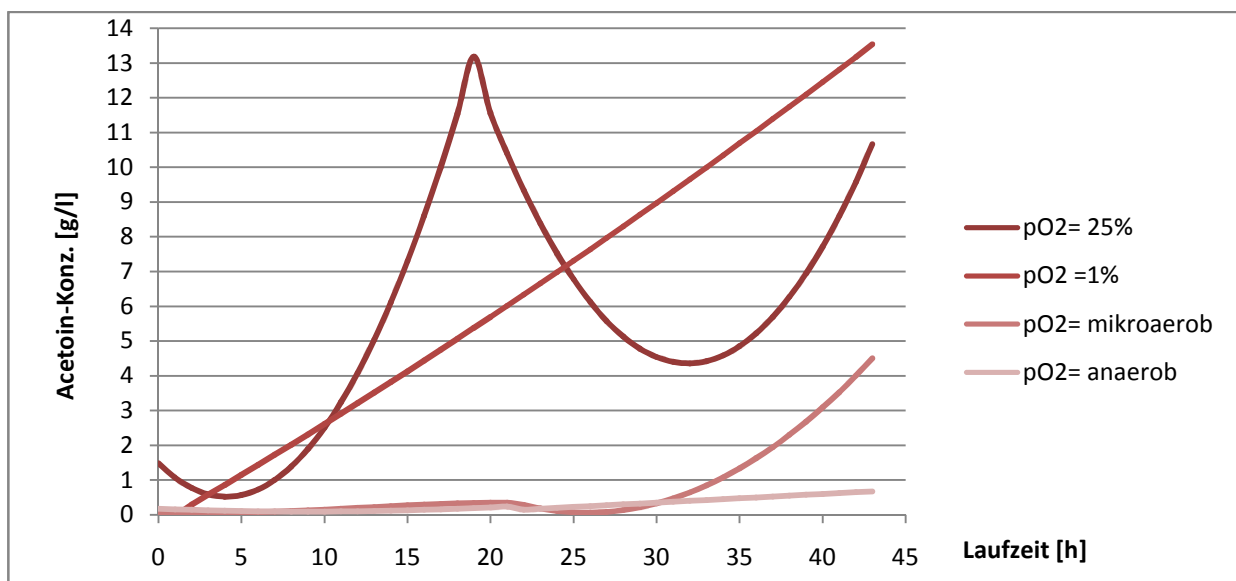


Abbildung 33 Die Acetoin-Konzentration während der fed-batch Fermentation bei *B. pumilus* DSM 27 in Abhängigkeit von verschiedenen Sauerstoffbedingungen

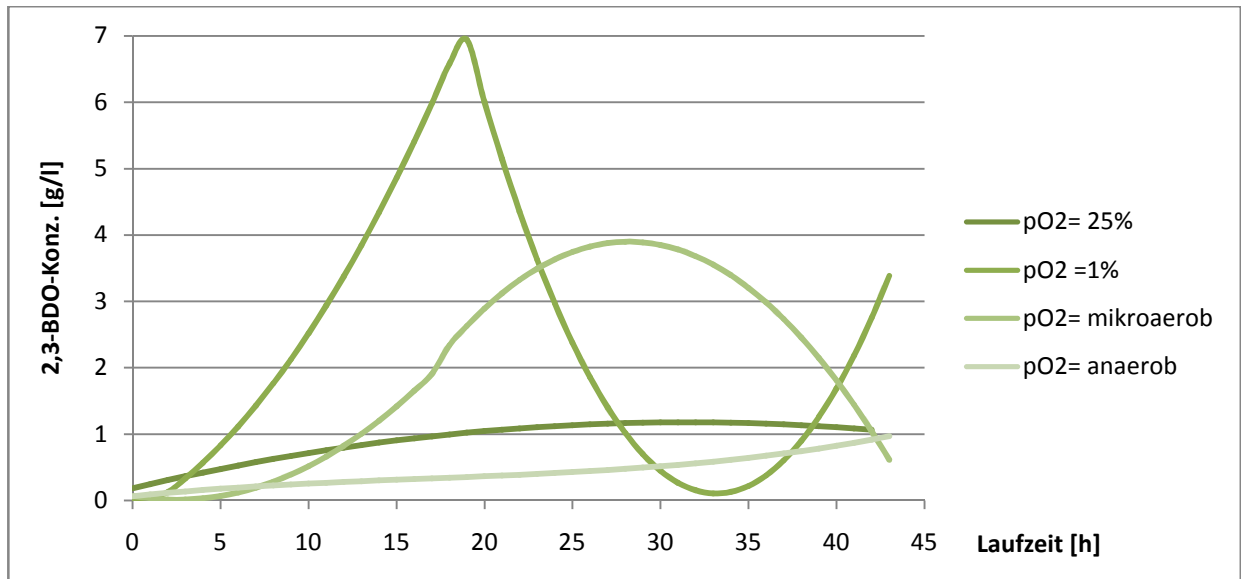


Abbildung 34 Die 2,3-Butandiol-Konzentration während der fed-batch Fermentation mit *B. pumilus* DSM 27 in Abhängigkeit von den Sauerstoffbedingungen

Wie in den beiden Diagrammen ersichtlich, wurden auch mit diesem Stamm und dem Medium mit 200 g/l Glucose hohe Produktkonzentrationen erzielt, allerdings nicht ganz so hoch wie bei dem ersten Stamm. Dafür ist insbesondere die 2,3-Butandiol-Konzentration insgesamt höher als es bei *B. pumilus* DSM 361 der Fall war. Am stärksten tut sich hierbei der Fermenter mit 1% Gelöstsauerstoff hervor mit einer Konzentration von 7 g/l. Danach folgt der mikroaerobe Fermenter, während der am stärksten begaste Fermenter und der anaerobe Fermenter jeweils bei unter 1 g/l an 2,3-BDO landen. Für Acetoin hingegen haben wir die höchsten Werte im optimal begasten Fermenter mit ca. 13 g/l. Den gleichen Wert erhält man am Ende der Fermentation bei dem Fermenter mit 1% pO₂. Auch der mikroaerobe Fermenter zeigt zum Ende der Laufzeit einen Produktanstieg von über 4 g/l. Die Begasung mit nur wenig Sauerstoff scheint somit auch hier einen positiven Einfluss auf die Produktbildung zu haben (Celinska, et al., 2009). Ob dies nur bei hohen Glucose-Konzentrationen gilt, kann aufgrund der fehlenden Daten nicht nachgewiesen werden. Da das favorisierte Endprodukt Acetoin ist, kann hier ebenfalls durch die Wahl einer mittleren bis hohen Sauerstoffzufuhr die Produktbildung geregelt werden. Nebenprodukte, die während dieser Fermentation auftraten, waren 2-Propanol und Essigsäure.

8.2.5. Produkte bei *Bacillus amyloliquefaciens* DSM 7

Der nächste potentielle Kandidat ist ebenfalls ein *Bacillus* und zwar *Bacillus amyloliquefaciens* DSM 7. Hier konnten folgende Konzentrationen festgestellt werden:

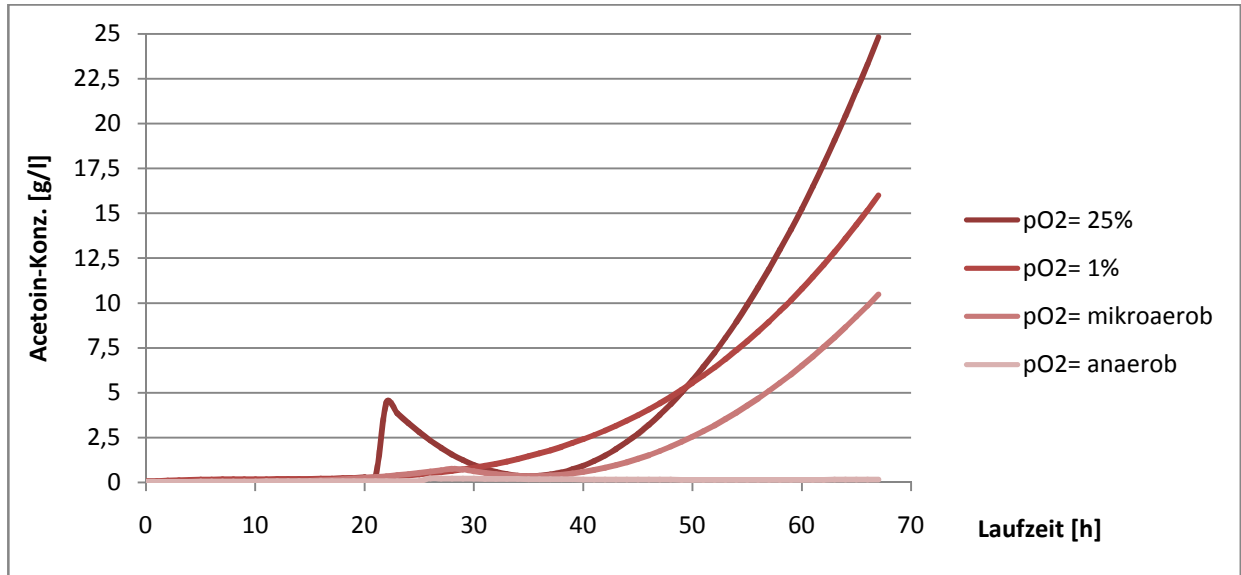


Abbildung 35 Die Acetoin-Konzentration während der *B. amyloliquefaciens* Fermentation in Abhängigkeit von verschiedenen Sauerstoffbedingungen

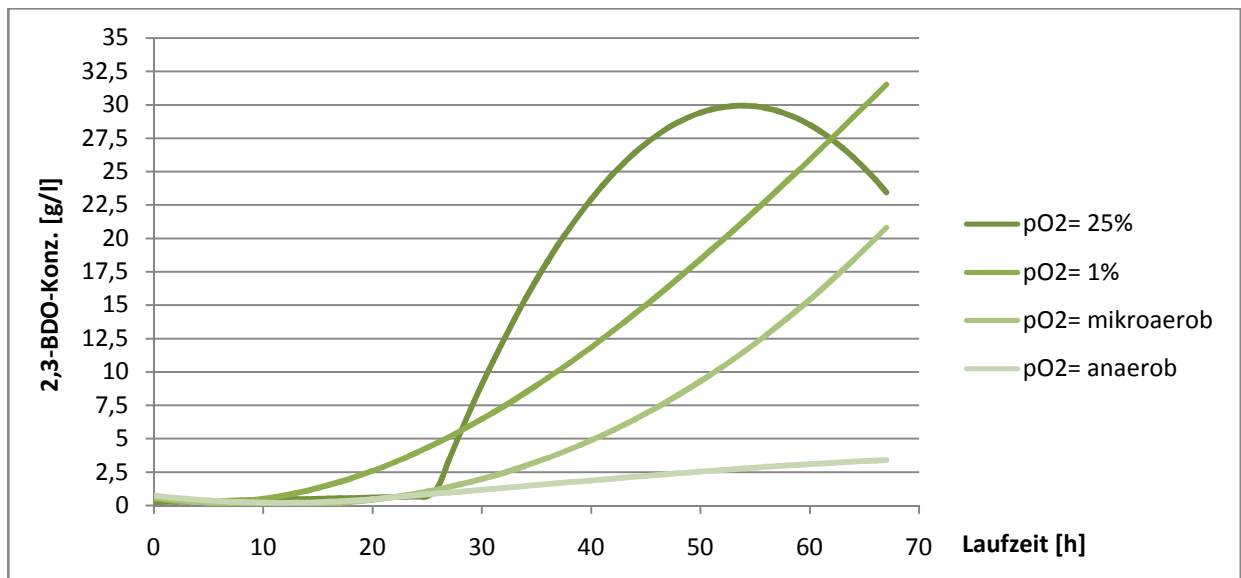


Abbildung 36 Die 2,3-Butandiol-Konzentration während der Fermentation mit *B. amyloliquefaciens* in Abhängigkeit von verschiedenen Sauerstoffbedingungen

Dieser Mikroorganismus erbrachte die höchsten Produktkonzentrationen aller untersuchten Bakterien mit knapp 25 g/l an Acetoin und 30 g/l an 2,3-Butandiol. In der Literatur (Yang, et al., 2012) wurde eine Konzentration im Schüttelkolben von 62,7 g/l

an 2,3-Butandiol erzielt, nachdem das Fermentationsmedium einer Optimierung unterzogen wurde. Dieses wurde hier angewandt und erzielte die entsprechenden Ergebnisse. Die Begasung hat einen großen Einfluss auf die Produktkonzentration, da der Fermenter mit der höchsten Begasung bei Acetoin den höchsten und bei 2,3-Butandiol den zweithöchsten Wert für die Konzentration erzielte. Die Produktbildung beginnt erst zum Ende der Fermentation. Inwiefern ein Zusammenhang mit der Biomasse besteht, kann aufgrund der fehlenden Daten nicht nachgewiesen werden. Bei der 2,3-Butandiol-Konzentration für den am stärksten belüfteten Fermenter fällt auf, dass die Kurve bei knapp 54 h ihren Höhepunkt erreicht und anschließend zum Ende hin abfällt und das obwohl zu diesem Zeitpunkt noch 20 g/l an Glucose im Fermenter nachgewiesen wurden. Wahrscheinlich wurde hier für den stark belüfteten Fermenter die maximal mögliche Produktkonzentration erreicht. Für 2,3-Butandiol scheint auch hier wieder der Zusammenhang zwischen geringer Belüftung und hoher Produktkonzentration gegeben, wenn auch schwächer als bei den bisherigen Bakterien aus der Familie der *Bacillii* (Celinska, et al., 2009). Wie man deutlich erkennt, erreicht der Fermenter mit 1% Gelöstsauerstoff nach dem am stärksten begasten Fermenter eine höhere Konzentration an 2,3-Butandiol, ohne dass die Kurve nennenswert abflacht. Bei einer längeren Laufzeit und noch höheren Substratkonzentrationen wäre also eine noch höhere Konzentration an Produkt möglich. Um möglichst viel Acetoin zu produzieren sollte jedoch eine hohe Begasung gewählt werden. Die Nebenprodukte, die in größeren Mengen gemessen wurden, waren 2-Propanol und Essigsäure.

8.2.6. Produkte bei *Geobacillus kaustophilus* DSM

Für den letzten potentiellen Kandidaten konnten folgende Konzentrationen beobachtet werden:

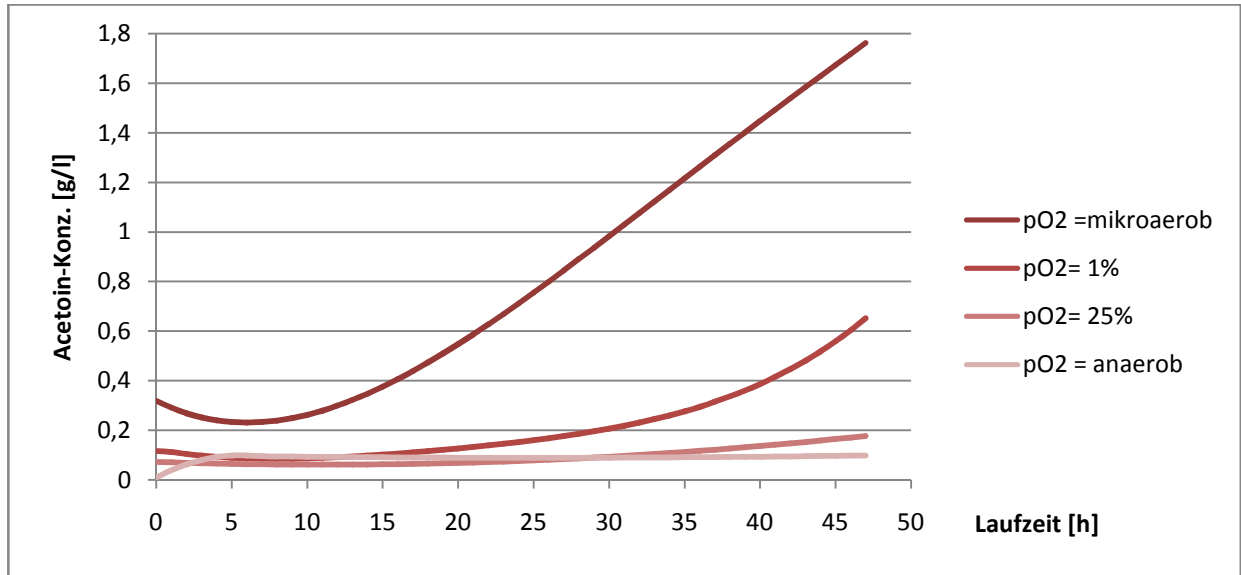


Abbildung 37 Die Acetoin-Konzentration während der Fermentation mit *G. kaustophilus* unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen

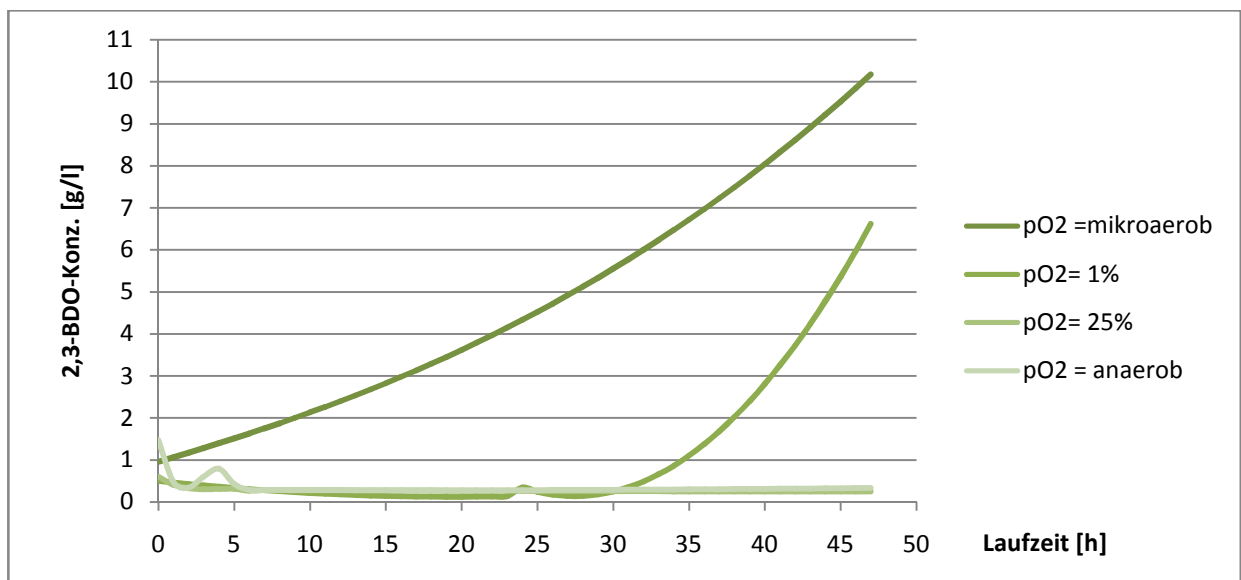


Abbildung 38 Die 2,3-Butandiol-Konzentration während der Fermentation mit *G. kaustophilus* unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen

Die Literaturquelle zu diesem Mikroorganismus (Xiao, et al., 2012) betrachtete einen neu entdeckten Stamm dieser Gruppe von Bakterien. Dort konnte nach einer Optimierung verschiedenster Parameter eine Acetoin-Konzentration von 7,7 g/l, sowie eine 2,3-Butandiol-Konzentration von 14,5 g/l erreicht werden. Die erreichten Werte in diesem Versuch lagen für Acetoin bei maximal 1,75 g/l und für 2,3-Butandiol bei knapp 10 g/l. Beide Werte wurden jeweils im mikroaeroben Fermenter erzielt, während der am stärksten begaste Fermenter kaum Produkt produzierte. Der Grund hierfür liegt zum einen in der stabilen Biomasse-Konzentration von 2 g/l, die dafür sorgte, dass die Glucose in diesem Fermenter am schnellsten abgebaut wurde. Laut Xiao (Xiao, et al., 2012) ist die Produktion beider Stoffe stark von der Biomasse abhängig, was die gewonnenen Daten belegen würde. Andererseits kann vermutlich auch hier wieder auf den Einfluss der Begasung nach (Celinska, et al., 2009) Bezug genommen werden. *Geobacillus* ist mit den Bakterien der Familie *Bacillus* eng verwandt. Das Phänomen der hohen Produktkonzentration bei geringer Begasung trat bisher bei fast allen Vertretern in dieser Arbeit auf. Die durchaus großen Unterschiede der Konzentrationen zueinander liegen zum einen an den jeweils verwendeten Stämmen. Der in der Literatur beschriebene Stamm wurde von Xiao entdeckt und benötigt andere Kulturbedingungen als der hier verwendete. Allerdings wurden die Kulturbedingungen aus der Literatur auch hier angewendet, um eine bessere Vergleichbarkeit zu garantieren.

9. Zusammenfassung

Die Aufgabenstellung dieser Arbeit war es, potentielle bakterielle Kandidaten für eine Mischkulturfermentation mit einer Hefe zu finden, um 2,3-Butandiol herzustellen. Nach der Auswertung der Ergebnisse lässt sich feststellen, dass alle untersuchten Bakterien in der Lage waren, Acetoin bzw. 2,3-Butandiol zu produzieren. Die Konzentrationen waren dabei sehr unterschiedlich, von sehr hohen Werten bei *B. amyloliquefaciens* DSM 7 zu sehr niedrigen Werten bei *M. rhodesianum* MB 126, MB 127. Die Konzentrationen lagen meist im erwarteten Bereich, bis auf die batch Fermentation bei *B. pumilus* DSM 361, wo sogar eine höhere Produktkonzentration erzielt werden konnte (Xiao, et al., 2010). Auch die hohen Konzentrationen von jeweils 25 g/l für Acetoin und 31 g/l für 2,3-Butandiol bei *Bacillus amyloliquefaciens* DSM 7 übertrafen die anfänglichen Erwartungen. Als großer Einflussfaktor bei vielen Fermentationen erwies sich die Begasung. Für fast alle Vertreter der Gattung *Bacillus* konnte nachgewiesen werden, dass eine mikroaerobe bzw. geringe Begasung zu besseren Produktkonzentrationen führte als eine starke Begasung. Dies gilt insbesondere für 2,3-Butandiol. Dieses Phänomen lässt sich durch die Beeinflussung der Enzyme, vor allen Dingen der 2-Acetolactatsynthase erklären. Diese wird unter stark aeroben Bedingungen irreversibel abgeschaltet, was zu einer geringen Konzentration an 2,3-Butandiol führt (Celinska, et al., 2009). In diesem Zusammenhang wurde von (Moes, et al., 1985) für eine *B. subtilis*-Kultur ein starker Einfluss der Gelöstsauerstoffkonzentration publiziert. Dabei erfolgte die Umwandlung von Acetoin zu 2,3-Butandiol bzw. umgekehrt, wenn eine bestimmte Grenzkonzentration über- bzw. unterschritten wurde. In neueren Arbeiten wie der von (Chan, et al., 2016) wurde ebenfalls ein Zusammenhang von mikroaerober Begasung auf die Produktkonzentration nachgewiesen, in diesem Fall bei *Klebsiella oxytoca*. Ein weiterer wichtiger Faktor ist dabei auch die Rührerdrehzahl, da diese die Gelöstsauerstoffkonzentration direkt mit beeinflusst. Für jeden untersuchten Kandidaten in dieser Arbeit konnte die optimale Sauerstoffzufuhr aufgezeigt werden, um entweder Acetoin oder 2,3-Butandiol zu produzieren. Dies gilt natürlich nur unter den angegebenen Bedingungen. Ein weiterer Einflussfaktor war auch die Fahrweise bei den jeweiligen Mikroorganismen. Bei den beiden *Bacillus pumilus* Stämmen ließ sich nachweisen, dass eine fed-batch Fermentation wesentlich mehr Produkt erzeugt als eine batch Fermentation. Dabei spielte auch die jeweilige C- bzw. N-Quelle eine wichtige Rolle. Die teilweise sehr hohen Glucose-Konzentrationen von über 200 g/l bewirkten keinerlei Inhibierung bei

allen untersuchten Bakterien. Bei fast allen begasten Fermentern wurde die Glucose im Verlauf der Fermentation vollständig abgebaut. Dabei lagen die Konzentrationen so gut wie immer unterhalb der Angaben in der Literatur. Für *B. amyloliquefaciens* DSM 7 konnte jedoch bei dem am stärksten begasten Fermenter eine Abflachung bzw. Abfall der Produktkonzentration beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung hierzu wäre vielleicht eine Produktinhibierung, wobei dies bisher nur von den Nebenprodukten bekannt war. Ein weiterer Parameter, welcher teilweise einen Einfluss ausüben soll, wäre die Stickstoff-Quelle. Bei *B. pumilus* DSM 361 ließe sich laut (Xiao, et al., 2010) eine Verbesserung der Produktkonzentrationen durch Einsatz einer Stickstoff-Quelle erzielen. Andere Arbeiten betrachteten gleich den Einfluss verschiedener Stickstoffquellen wie bei (Xiao, et al., 2007). Die Erkenntnisse aus diesen Arbeiten wurden hier allerdings bereits angewandt. Andere Parameter wie die Temperatur oder der pH-Wert wurden spezifisch nach der Literatur angepasst. Schlussendlich lässt sich feststellen, dass *Bacillus amyloliquefaciens* DSM 7, sowie die beiden *Bacillus pumilus* DSM 361 und *Bacillus pumilus* DSM 27 als die geeignetsten Kandidaten für eine Mischkulturfermentation mit einer Hefe erscheinen. Dies liegt zum einen an ihrer einfachen Handhabung, gepaart mit einem relativ günstig zu produzierenden Medium, welches auch für eine Hefe geeignet erscheint. Des Weiteren lieferten sie die besten Produktkonzentrationen im Vergleich zu den anderen Kandidaten.

10. Ausblick

Nach Beendigung dieser Arbeit im Rahmen des Bachelor-Studiums lässt sich folgendes sagen: Es gibt Stämme, die die Anforderung an ein Bakterium der Sicherheitsklasse S1, dass zuverlässig und schnell Acetoin und/oder 2,3-Butandiol bilden kann, erfüllen. Jedoch wurden die bisherigen Versuche nur mit dem jeweiligen Laborsubstrat durchgeführt wurden. Es fehlen Daten und Kenntnisse darüber, ob die Mikroorganismen auch das Industriesubstrat verwerten können und welche Produktkonzentrationen dabei entstehen. Des Weiteren müsste in den nächsten Versuchen geklärt werden, ob eine Koexistenz der gentechnisch veränderten Hefe mit dem jeweiligen Bakterium im Bioreaktor möglich ist. Bei Nutzung des Industriesubstrates müsste auch geprüft werden, welche Stoffe wie N-Quellen oder Spurenelemente zugesetzt werden müssten. Um den Prozess so kostengünstig wie möglich zu gestalten, müssten auch verschiedenen N-Quellen herangezogen werden. (Yang, et al., 2015) berichtet sogar für *Bacillus amyloliquefaciens* DSM 7 von Versuchen mit Reststoffen aus anderen lebensmittelherstellenden Industrien. Somit dürfte für dieses Bakterium eine Fermentation mit dem Industriesubstrat möglich sein. Auch ließen sich wie bei *B. pumilus* DSM 361 durch die Nutzung anderer Fahrweisen vielleicht bessere Ergebnisse erzielen. Bei *Geobacillus kaustophilus* DSM 7263 wurde mit einem zu hohen pH-Wert gearbeitet, eine Absenkung könnte somit bessere Ergebnisse erzielen. Bisher wurde auch nur im relativ kleinen Maßstab mit einem Fermentervolumen von maximal 250 ml gearbeitet. Es stellt sich die Frage, inwiefern die gewonnenen Ergebnisse auf größere Volumina zu übertragen sind. Falls diese Fragestellungen beantwortet wurden, müsste auch noch die Frage nach der Produktgewinnung und –Aufarbeitung gestellt werden. Die Produkte werden zwar in das Fermentationsmedium abgegeben. Allerdings konnte insbesondere bei den Fermentationen mit hohen Substratkonzentrationen auch eine starke Nebenproduktbildung beobachtet werden. Dies müsste entweder unterbunden werden, oder es muss eine geeignete Lösung gefunden werden, um die Produkte voneinander zu trennen.

Literaturverzeichnis

Journals und Bücher

Babel, Wolfgang. 1992. Peculiarities of methylotrophs concerning overflow metabolism, especially the synthesis of polyhydroxyalkanoates. *FEMS Microbiology Reviews*. 1992, 103.

Bormann, E. J. und Roth, M. 1999. The production of polyhydroxybutyrate by *Methylobacterium rhodesianum* and *Ralstonia eutropha* in media containing glycerol and casein hydrolysates. *Biotechnology Letters*. 1999, 21.

Celinska, E. und Grajek, W. 2009. Biotechnological production of 2,3-butanediol—Current state and prospects. *Biotechnology Advances*. 2009, Bd. 27.

Chan, Sitha, et al. 2016. Process Optimization on Micro-Aeration Supply for High Production Yield of 2,3-Butanediol from Maltodextrin by Metabolically-Engineered *Klebsiella oxytoca*. *Public Library of Science One*. 2016.

Chen, Ri-zhao und Li, Yu. 2011. A novel plant volatile attractant scheme to protect corn in China from the white-spotted flower chafer (Coleoptera: Scarabaeidae: Cetoniinae). *Journal of Pest Science*. 2011, Bd. 84, 3.

Chmiel, Horst. 2011. 13 Mikrobielle Prozesse 13.1 Mikrobielle Stoffproduktion. *Bioprozesstechnik*. Heidelberg : Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 2011.

ERA-IB, European Research Area Industrial Biotechnology. 2012. *ERA-IB: Herstellung und Veredelung von 2,3-Butandiol aus Biomasse (PUBB); Teilvorhaben A - E*. Braunschweig : s.n., 2012.

Haberland, Claudia. 2016. *Untersuchung des Wachstums verschiedener bakterieller Acetoin- und 2,3-Butandiolbildener*. Köthen : s.n., 2016.

Hess, Verena, et al. 2015. 2,3-Butanediol Metabolism in the Acetogen *Acetobacterium woodii*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2015, Bd. 81, 14.

Hofman, Uta und Prokoph, Alexandra. 2014. *Bakterielle Produktion von 2,3-Butandiol*. Köthen : s.n., 2014.

Kaneko, Tsutomu, Takahashi, Masahiro und Suzuki, Hideki. 1990. Acetoin Fermentation by Citrate-Positive *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 3022 Grown Aerobically in the Presence of Hemin or Cu²⁺. *Applied and Environmental Microbiology*. 1990, Bd. 56, 9.

Khosravi-Darani, Kianoush, et al. 2013. Microbial production of poly(hydroxybutyrate) from C1 carbon sources. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013, Bd. 97.

Lamazaz, Lahlali und Preylowski, Bettina. *Untersuchungen zur bakteriellen Produktion von 2,3-Butandiol auf verschiedenen Substraten und in Mischkultur*. Köthen : s.n.

Maddox, Ian S. 1989. The Acetone-Butanol-Ethanol Fermentation: Recent Progress in Technology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 1989, Bd. 7, 1.

- Moes, J., et al. 1985.** A Microbial Culture With Oxygen Sensitive Product Distribution as a Potential Tool for Characterizing Bioreactor Oxygen Transport. *Biotechnology and Bioengineering*. 1985, Bd. 27.
- Naschitzki, Nikola und Hoffman, Franz. 2013.** *Bakterielle Fermentation von 2,3-Butandiol*. Köthen : s.n., 2013.
- Nguyen, Diep, M.N., et al. 2016.** Temperature-dependent acetoin production by *Pyrococcus furiosus* is catalyzed by a biosynthetic acetolactate synthase and its deletion improves ethanol production. *Metabolic Engineering*. 2016, Bd. 34.
- Passerini, Delphine, et al. 2013.** New insights into *Lactococcus lactis* diacetyl- and acetoin-producing strains isolated from diverse origins. *International Journal of Food Microbiology*. 2013, 160.
- Ping, Liyan und Boland, Wilhelm. 2004.** Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science*. 2004, Bd. 9.
- Renneberg, Reinhard und Berkling, Viola. 2013.** 6.9 Chemierohstoffe aus Biomasse? *Biotechnologie für Einsteiger*. Heidelberg : Springer-Verlag Berlin, 2013.
- Seo, Jin Ho, Kim, Soo, Jung und Seo, Seung Oh. 2014.** *Method of producing 2, 3-butanediol using recombinant yeast. US 9328358 B2 USA*, 2. Juni 2014. Verfahren.
- Syu, M.-J. 2001.** Biological production of 2,3-Butanediol. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2001, Bd. 55.
- Wang, Xiuqing, et al. 2013.** Efficient bioconversion of 2,3-butanediol into acetoin using *Gluconobacter oxydans* DSM 2003. *Biotechnology for Biofuels*. 2013, Bd. 6.
- Xiao, Z.J., et al. 2007.** Statistical optimization of medium components for enhanced acetoin production from molasses and soybean meal hydrolysate. *Applied Microbiology and Biotechnology* . 2007, Bd. 74.
- Xiao, Zijun und Lu, Jian R. 2014.** Strategies for enhancing fermentative production of acetoin: A review. *Biotechnology Advances*. 2014, Bd. 32.
- Xiao, Zijun, et al. 2010.** Acetoin production associated with the increase of cell biomass in *Bacillus pumilus* ATCC 14884. *African Journal of Microbiology Research* . 2010, Bd. 4, 18.
- Xiao, Zijun, et al. 2012.** Thermophilic fermentation of acetoin and 2,3-butanediol by a novel *Geobacillus* strain. *Biotechnology for Biofuels*. 2012, Bd. 5.
- Xiao, Zujin und Xu, Ping. 2007.** Acetoin Metabolism in Bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*. 2007, Bd. 33, 2.
- Xu, Ping, et al. 2005.** *An Acetoin High Yield Bacillus pumilus Strain. EP 1 820 848 B1 China*, 4. November 2005. Mikroorganismus
- Yadav, N.K. und Gupta, K.G. 1975.** Effect of substrates on acetoin production by *Torulopsis colliculosa* and *Enterobacter* species. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1975, Bd. 30, 6.
- Yang, Taowei, et al. 2015.** Economic conversion of spirit-based distillers' grain to 2,3-butanediol. *Process Biochemistry*. 2015, Bd. 50.

Yang, Taowei, et al. 2015. Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for redistributing the carbon flux to 2,3-butanediol by manipulating NADH levels. *Biotechnology for Biofuels*. 2015, Bd. 8.

Yang, Taowei, et al. 2012. Optimization and scale-up of 2,3-butanediol production by *Bacillus amyloliquefaciens* B10-127. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2012, Bd. 28.

Zhang, Xian, et al. 2011. Isolation and identification of an acetoin high production bacterium that can reverse transform 2,3-butanediol to acetoin at the decline phase of fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2011, 27.

Zhang, Xian, et al. 2014. The rebalanced pathway significantly enhances acetoin production by disruption of acetoin reductase gene and moderate-expression of a new water-forming NADH oxidase in *Bacillus subtilis*. *Metabolic Engineering*. 2014, Bd. 23.

Zverlov, V.V., et al. 2006. Bacterial acetone and butanol production by industrial fermentation in the Soviet Union: use of hydrolyzed agricultural waste for biorefinery. *Applied and Microbiological Biotechnology*. 2006, 71.

Internetquellen

Yikrazuul. 2010. R-Acetoin . *Wikimedia Commons*. [Online] 24. Februar 2010. [Zitat vom: 26. September 2016.] [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:\(R\)-Acetoin.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:(R)-Acetoin.svg).

World Health Organization. 2010. Evaluations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) Acetoin. *World Health Organization*. [Online] WHO, 2010. [Zitat vom: 26. September 2016.] <http://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/chemical.aspx?chemID=4135>.

Atsumi, Shota, Oliver, John, W.K. und Machado, Iara, M.P. 2013. *Verfahren zur Herstellung von Acetoin und 2,3-Butandiol unter Verwendung von photosynthetischen Mikroorganismen. DE 112013004785 T5* Deutschland, 27. September 2013. Verfahren.

Spektrum. 1999. Lexikon der Biologie - Acetoin. *Spektrum.de*. [Online] Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH, 1999. [Zitat vom: 2. August 2016.] <http://www.spektrum.de/lexikon/biologie/acetoin/490>.

Spektrum Akademischer Verlag. 2001. Kompaktlexikon der Biologie mikrobielles Wachstum. *Spektrum.de*. [Online] 2001. [Zitat vom: 23. September 2016.] <http://www.spektrum.de/lexikon/biologie-kompakt/mikrobielles-wachstum/7597>.

PubChem Open Chemistry Database. 2016. PubChem Open Chemistry Database Compound Summary for CID 179 Acetoin. *PubChem Open Chemistry Database*. [Online] National Center for Biotechnology Information, US National Library of Medicine, 24. September 2016. [Zitat vom: 26. September 2016.] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/acetoin#section=Top>.

Sigma-Aldrich. W200808 Aldrich Acetoin. Sigma-Aldrich A Part of Merck. [Online] [Zitat vom: 26. September 2016.] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/w200808?lang=de®ion=DE>.

11. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Bachelor-Arbeit zum Thema „Entwicklung und Untersuchung von Bakterien zur Herstellung von Acetoin und 2,3-Butandiol“ selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen wurden als solche gekennzeichnet.

Köthen, den 25.10.2016

Claudia Haberland

