



# **Modifikation des Glucosestoffwechsels in *Gluconobacter oxydans***

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Vera Krajewski**  
aus Aachen

Düsseldorf, Oktober 2008

aus dem Institut für Biotechnologie 1  
des Forschungszentrums Jülich

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. H. Sahm  
Koreferent: Prof. Dr. M. Bott

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2008

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen .....	6
1 Einleitung .....	9
1.1 Das Essigsäurebakterium <i>Gluconobacter oxydans</i> .....	9
1.2 Die Atmungskette von <i>G. oxydans</i> .....	11
1.3 Der Glucosestoffwechsel von <i>G. oxydans</i> .....	13
1.4 Ziel der Arbeit .....	15
2 Material und Methoden .....	16
2.1 Bakterienstämme .....	16
2.2 Vektoren .....	18
2.3 Oligonukleotide .....	20
2.4 Chemikalien .....	23
2.5 Kulturbedingungen und Nährmedien .....	23
2.5.1 Nährmedien und Medienzusätze für <i>E. coli</i> .....	23
2.5.2 Nährmedien und Medienzusätze für <i>G. oxydans</i> .....	23
2.6 Kultivierung von <i>E. coli</i> und <i>G. oxydans</i> .....	26
2.7 Kultivierung von <i>G. oxydans</i> in der „Fedbatch-Pro“-Fermentationsanlage .....	26
2.8 Bestimmung der Biotrockenmasse .....	27
2.9 Bestimmung der Kohlenstoffbilanz .....	28
2.9.1 TOC/DOC Messung .....	28
2.10 Stammhaltung .....	29
2.11 Molekularbiologische Methoden .....	29
2.11.1 Transformation von <i>E. coli</i> und <i>G. oxydans</i> .....	29
2.11.2 Isolierung chromosomaler DNA .....	30

---

2.11.3	Isolierung von Plasmid-DNA .....	30
2.11.4	Isolierung von RNA.....	31
2.11.5	Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen.....	31
2.11.6	Methoden zur DNA-Präparation.....	31
2.11.7	Polymerasekettenreaktion .....	33
2.11.8	Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion.....	34
2.11.9	Ortsspezifische Mutagenese.....	34
2.11.10	Disruption des Gens für die membrangebundene Glucose-Dehydrogenase .....	35
2.11.11	Disruption des Gens für die cytosolische Glucose-Dehydrogenase .....	35
2.11.12	DNA-Sequenzierung.....	36
2.12	Proteinchemische Methoden .....	36
2.12.1	Herstellung von Proteinrohextrakten.....	36
2.12.2	Proteingehaltsbestimmung .....	37
2.12.3	Messung von Enzymaktivitäten .....	37
2.12.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	40
2.12.5	Quantitative Analyse von Metaboliten im Medium.....	40
2.12.6	Quantitative Bestimmung von Acetat mittels GC.....	41
2.12.7	Bestimmung von Glucose, Sorbit und Zuckersäuren mittels HPLC.....	42
2.12.8	Bestimmung von intra- und extrazellulären Metaboliten mittels GC-MS .....	42
3	Ergebnisse.....	44
3.1	Charakterisierung der Stämme IFO 3293, N44-1 und N44-1 <i>mgdh::kan</i> .....	44
3.2	Optimierung der Biomasseproduktion bei Wachstum auf dem Substrat Glucose .....	48
3.2.1	Disruption des Gens für die cytosolische Glucose-Dehydrogenase und dessen Einfluss auf den Glucosestoffwechsel .....	48
3.2.2	Überexpression des Gens für die Glucose-Kinase und dessen Einfluss auf den Glucosestoffwechsel.....	51
3.2.3	Überexpression des Gens für die Glucose-Kinase in der Doppeldisruptante und dessen Einfluss auf den Glucosestoffwechsel .....	55

---

3.2.4	Überexpression des Gens für die Glucose-Permease und dessen Einfluss auf den Glucosestoffwechsel.....	57
3.2.5	Expression des Gens für den Glucose-Fascilitator von <i>Z. mobilis</i> in der Doppeldisruptante und dessen Einfluss auf den Glucosestoffwechsel.....	58
3.2.6	Sorbitumsetzung der <i>G. oxydans</i> -Stämme IFO 3293, N44-1, N44-1 <i>mgdh::kan</i> und N44-1 $\Delta$ <i>mgdh sgdh::kan</i> .....	62
3.2.7	Auswirkungen der Überexpression der Enzyme Phosphoglucose-Isomerase und Transaldolase auf den Glucosestoffwechsel der Doppeldisruptante .....	63
3.2.8	Nachweis der Acetatproduktion der <i>G. oxydans</i> -Stämme N44-1 <i>mgdh::kan</i> und N44-1 $\Delta$ <i>mgdh sghd::kan</i> .....	67
3.3	Batch-Kultivierung von <i>G. oxydans</i> in einer Fermentationsanlage zur Verbesserung der Wachstumsbedingungen .....	70
4	Diskussion .....	79
4.1	Glucoseverstoffwechslung der Ausgangsstämme.....	79
4.2	Glucoseverstoffwechslung der Einfachdisruptante.....	81
4.3	Konstruktion und Untersuchung der Doppeldisruptante .....	82
4.4	Optimierungsversuche der Glucoseverstoffwechslung.....	84
4.5	Acetatbildung der Einfach- und der Doppeldisruptante .....	86
4.6	C-Bilanzierung.....	87
5	Zusammenfassung .....	89
6	Abstract .....	90
7	Literaturverzeichnis.....	91
8	Anhang .....	107

## Abkürzungen

$\lambda$	Wellenlänge (nm)
$\epsilon$	molarer Extinktionskoeffizient
2,5-DKGA	2,5-Di-Keto-Gluconat
2-KGA	2-Keto-D-Gluconat
2-KGR	2-KGA-Reduktase
2-KGLA	2-Keto-L-Gulonat
2-KGDH	2-Ketogluconat-Dehydrogenase
5-KGA	5-Keto-D-Gluconat
6-PGH	6-Phosphogluconat-Dehydrase
6-PGDH	6-Phosphogluconat-Dehydrogenase
Abb.	Abbildung
ADH	Alkohol-Dehydrogenase
ALDH	Acetaldehyd-Dehydrogenase
Am	Ampicillin
ATP	Adenosin-Triphosphat
bp	Basenpaare
BTM	Biotrockenmasse
C	Kohlenstoff
Cef	Cefoxitin
CTR	Kohlenstoffdioxidtransferrate
Da	Dalton
DTT	Dithiothreitol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOC	dissolved organic carbon; gelöster organischer Kohlenstoff
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EDW	Entner-Doudoroff-Weg
EP	Elektroporation
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
HClO <sub>4</sub>	Perchlorsäure
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	„High Performance Liquid Chromatography“; hochauflösende Flüssigkeitschromatographie
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid
GA-2-DH	Gluconat-2-Dehydrogenase
GA-5-DH	Gluconat-5-Dehydrogenase
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektroskopie
GK	Glucose-Kinase
GntK	Gluconat-Kinase
GNO	Gluconat-Dehydrogenase
Glyc3P-DH	Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase
Gm	Gentamycin
G6PH	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
FAD	Flavinadenindinukleotid
Kan	Kanamycin
kDa	Kilodalton

---

KDPG	2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat-Aldolase
LDH	Lactat-Dehydrogenase
LB	Luria Bertani
M	Molar; Mol pro Liter
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
mGDH	membrangebundene Glucose-Dehydrogenase
MS	Massenspektroskopie
NAD <sup>+</sup> (H)	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
x N HCl	x normale Salzsäure
OD <sub>x nm</sub>	optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
PPW	Pentosephosphat-Weg
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDC	Pyruvat-Decarboxylase
PGI	Glucose-6-phosphat-Isomerase
PQQ	Pyroloquinoline Chinone
pH	Potentia Hydrogenii
rpm	rounds per minute; Umdrehungen pro Minute
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
sGDH	cytosolische Glucose-Dehydrogenase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Stl/h	Standardliter pro Stunde
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Acetat
TAL	Transaldolase
TG	Trockengewicht
TOC	total organic carbon; Gesamtheit an organisch gebundenem Kohlenstoff
TPI	Triosephosphat-Isomerase
Tris	Tri-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (mg Protein/ml)
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	“weight per volume”; Gewicht pro Volumen

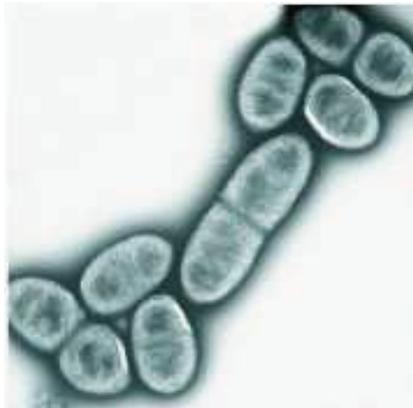


## 1 Einleitung

### 1.1 Das Essigsäurebakterium *Gluconobacter oxydans*

*Gluconobacter oxydans* ist ein gram-negatives Essigsäurebakterium, das zu der Familie der *Acetobacteriaceae* gehört. Essigsäurebakterien bevorzugen nährstoffreiche Lebensräume wie Blüten, Früchte, Pflanzen, wo zuckerreiche Säfte frei werden, und kommen zudem in süßen und alkoholischen Getränken und Fruchtsäften vor (Swings, 1992; Gupta *et al.*, 2001; Battey und Schaffner, 2001). Essigsäurebakterien sind säuretolerant, sie wachsen noch unterhalb eines pH-Wertes von 3,7 und sind obligat aerob (Olijve und Kok, 1979). Die Familie wird heute in 10 Gattungen unterteilt: *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Acidomonas*, *Glucoacetobacter*, *Asaia*, *Kozakia*, *Swaminathania*, *Saccharibacter*, *Neoasaia* und *Granulibacter* (Yamada und Yakphan, 2008). Die Spezies der Gattung *Gluconobacter* sind im Gegensatz zu den Spezies der Gattungen *Acetobacter* nicht in der Lage, Lactat oder Essigsäure zu Kohlenstoffdioxid und Wasser umzusetzen zu können; eine klare Trennung der Gattungen *Gluconobacter* und *Acetobacter* gelang erst mittels 16S-rRNA-Sequenzanalysen (Sievers *et al.*, 1995). Die Gattung *Gluconobacter* besteht aus vier Arten, *G. asaii*, *G. cerinus*, *G. frateurii* und *G. oxydans*, die jeweils in mehrere Unterarten unterteilt werden (Sievers *et al.*, 1995; Tanaka *et al.*, 1999).

Die *G. oxydans*-Zellen besitzen eine Ellipsen- oder Stäbchen-Form, sind zwischen 0,5 x 0,8 und 0,9 x 4,2 µm groß und treten einzeln, in Paaren oder Ketten auf (Abb. 1). Unter Sauerstoffmangel kommt es bei dem Bakterium zur Ausbildung von 3-8 polaren Flagellen; eine Endosporenbildung erfolgt nicht (De Ley und Swings, 1981; De Ley *et al.*, 1984; Gupta *et al.*, 2001).



**Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *G. oxydans***

Mit freundlicher Genehmigung von Dr. A. Ehrenreich, Institut für Mikrobiologie und Genetik, Georg-August-Universität Göttingen

Die optimalen Kulturbedingungen des Bakteriums liegen bei Temperaturen zwischen 25-30°C und pH-Werten zwischen 5,5-6,0 (Gupta *et al.*, 2001). *Gluconobacter*-Stämme bevorzugen D-Mannit als C-Quelle, sie wachsen aber auch gut mit D-Sorbit, Glycerin, D-Fructose und D-Glucose (Olijve und Kok, 1979; Gosselé *et al.*, 1980). Auf definiertem Medium ist das Wachstum schwach (Stokes und Larsen, 1945; Rao und Stokes, 1953); Komplexmedien, bestehend aus z.B. Hefeextrakt, Mannit als C-Quelle und Pepton sind für ein gutes Wachstum erforderlich (Raspor und Goranovič, 2008). Genauere Einblicke in den Stoffwechsel lieferte die Genomsequenzierung von *G. oxydans* 621H (Prust *et al.*, 2005). Die Größe des Genoms beträgt 2.922.384 bp inklusive 5 identifizierter Plasmide (Verma *et al.*, 1997; Prust *et al.*, 2005). Der GC-Gehalt der genomischen DNA beträgt 61%, was im Vergleich zu anderen Bakterien, wie z.B. von *Escherichia coli* (chromosomaler GC-Gehalt 51%) recht hoch ist (De Ley *et al.*, 1984; Shimizu *et al.*, 1999; Prust *et al.*, 2005). Das Auffinden von 18 Insertions-elementen und 103 Transposasen (Prust *et al.*, 2005) verdeutlicht die beobachtete genetische Instabilität und Variabilität (Kondo *et al.*, 1997). Die Genomsequenzierung bestätigte, dass *Gluconobacter* für wichtige katabole Stoffwechselwege die Enzyme fehlen. Die Gene für die 6-Phosphofruktokinase des Embden-Meyerhof-Weges sowie die Succinat-Dehydrogenase und Succinyl-CoA-Synthetase des Zitronensäurezyklus sind nicht vorhanden; beide Wege dienen daher lediglich der Bildung von Vorläufermolekülen (Greenfield *et al.*, 1972; Fritsche, 1999; Prust *et al.*, 2005). Als funktioneller Stoffwechselweg wurde der Pentosephosphat-Weg (PPW) nachgewiesen (Deppenmeier *et al.*, 2002). Die Enzyme für den Entner-Doudoroff-Weg (EDW) können von *G. oxydans* gebildet werden, was auch Untersuchungen von Kersters *et al.* (1968) bereits zeigten.

*Gluconobacter* ist in der Lage, eine Vielzahl organischer Substanzen, wie Zucker, Alkohole und Polyole schnell und unvollständig mittels membranständiger Dehydrogenasen zu oxidieren (Kulhanek, 1989), was das Bakterium für zahlreiche biotechnische Anwendungen interessant macht. *G. oxydans* wird z.B. für die Produktion von Essigsäure genutzt, aber auch für einen Syntheseschritt des Medikaments Miglitol gegen Diabetes mellitus (Campbell *et al.*, 2000; Schedel, 2000) und des Bräunungsmittels Dihydroxyaceton (Claret *et al.*, 1994). Das Substrat Glucose wird von *G. oxydans* zu Gluconsäure (Meiberg *et al.*, 1983; Pronk *et al.*, 1989) umgesetzt, die z.B. in der Textilindustrie als Schmutzlöser verwendet wird. Industrielle Bedeutung hat auch die L-Weinsäuresynthese, für die 5-Keto-D-gluconat (5-KGA) als Vorläufermolekül genutzt werden kann (Klasen *et al.*, 1992; Elfari *et al.*, 2005; Merfort *et al.*, 2006), und die Bildung der 2-Keto-L-Gulonsäure (2-KGLA) als Vorstufe für die Vitamin C-Synthese. Die weltweite Vitamin C-Produktion beträgt 100.000 Tonnen pro Jahr (Macauley *et al.*, 2001). Ein Mangel an Vitamin C führt zu Krankheiten wie z.B. Skorbut. Vitamin C wird daher als Zusatzstoff, aber auch als Antioxidans, Kon-

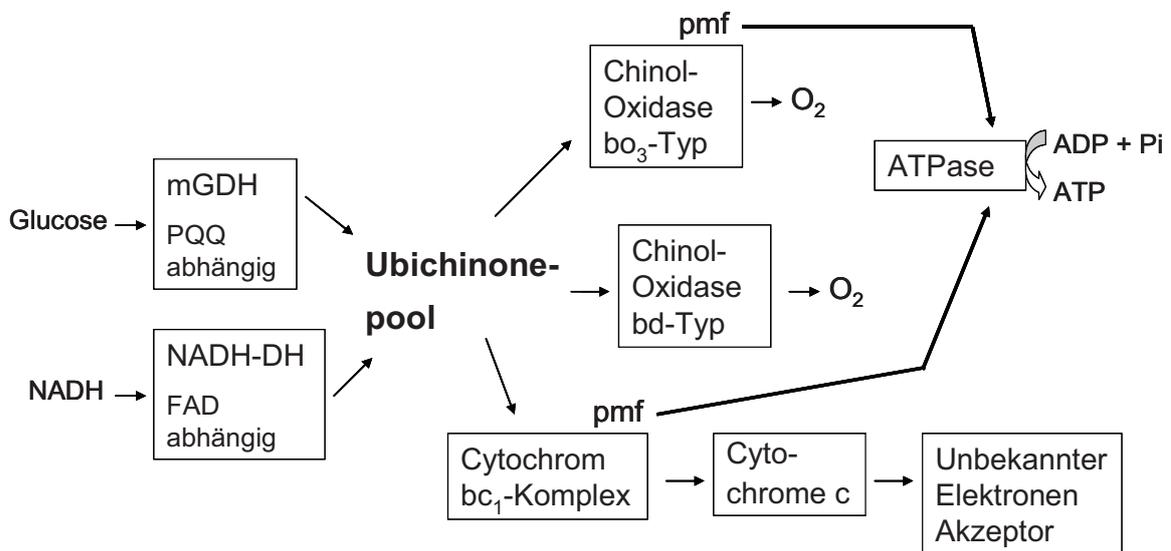
servierungs- und Säuerungssubstanz in der Lebensmittel- und Pharmaindustrie eingesetzt (Scherf, 1997; Hancock und Viola, 2005; Bremus *et al.*, 2006). Noch vor 5-10 Jahren wurde der größte Teil der Ascorbinsäure mittels des traditionellen „Reichstein-Verfahrens“ produziert. Hierbei erfolgte die regiospezifische Umsetzung von D-Sorbit zu L-Sorbose mittels *G. oxydans*, wodurch eine aufwendige chemische Synthese mit Schutzgruppen umgangen werden konnte (Boudrant, 1990). Da sehr hohe Temperaturen und Drücke für die weiteren chemischen Syntheseschritte benötigt wurden, erfolgte die Suche nach einem biotechnologischen Vitamin C-Herstellungsverfahren (Hancock und Viola, 2002). So wurde in China ein mikrobieller Zweischnitt-Fermentationsprozess entwickelt, der mittlerweile von Merck, Cerestar und DSM genutzt wird (Hancock und Viola, 2002). Der Firma DSM Nutritional Products gelang es, einen Stamm zu konstruieren, der 60 g 2-KGLA aus 100 g L-Sorbit oder L-Sorbose produziert (Sugisawa *et al.*, 1990). Weiterhin gelang eine Stammverbesserung durch Expression heterologer, 2-KGLA produzierender Enzyme in *Gluconobacter* (Shinjoh *et al.*, 1994; Saito *et al.*, 1996).

*G. oxydans* besitzt für die Oxidation von organischen Substanzen zwei alternative Enzymsysteme: zum einen die membrangebundenen Dehydrogenasen, die entweder Pyrroloquinolin Chinon (PQQ) oder ein kovalent gebundenes Flavinadenin-dinukleotid (FAD) als Kofaktor besitzen und zum anderen die cytoplasmatischen NAD<sup>+</sup>(P<sup>+</sup>)-abhängigen Dehydrogenasen. Die membrangebundenen Enzyme dienen der direkten Substratoxidation, wobei die Elektronen zur Energiegewinnung durch Übertragung auf Ubichinon in die Atmungskette eingeschleust werden (Olijve und Kok, 1979a; Van Schie *et al.*, 1985). Die aktiven Zentren der Dehydrogenasen liegen im periplasmatischen Raum, die Produkte werden über Poren der äußeren Membran der Zellwand ausgeschleust und akkumulieren im Medium. Dieses Enzymsystem ist für die schnelle Produktion biotechnologisch wichtiger Substanzen verantwortlich. Für die cytosolischen Enzyme, die an den Biomasseerträgen der Zelle beteiligt sind, ist hingegen die Aufnahme der Substrate in die Zelle notwendig (Matsushita *et al.*, 1994). Im Gegensatz zu den membrangebundenen Dehydrogenasen katalysieren die im Cytoplasma lokalisierten Dehydrogenasen auch die reversiblen Reaktionen (Prust *et al.*, 2005). Die entstehenden Intermediate werden mittels substratspezifischer Kinasen phosphoryliert und über den Pentosephosphat-Weg oder den Entner-Doudoroff-Weg metabolisiert.

## 1.2 Die Atmungskette von *G. oxydans*

Durch die Genomanalyse von *G. oxydans* 621H konnten einige Komponenten der Atmungskette identifiziert werden (Deppenmeier *et al.*, 2002; Prust *et al.*, 2005). Die Elektronentransportkette des Bakteriums (Abb. 2) besteht aus verschiedenen Cyto-

chrom *c*-Typen, Cytochrom *b* und Ubichinon. Die vom Substrat stammenden Reduktionsäquivalente werden im Falle der membrangebundenen PQQ-abhängigen Enzyme, z.B. der Glucose-Dehydrogenase, auf PQQ übertragen. Das intrazellulär beim Substratabbau anfallende NADH wird durch eine NADH-Dehydrogenase vom Typ II, die keine Protonen durch die Membran transportiert, oxidiert; der bei vielen Prokaryoten vorkommende Komplex I fehlt in *G. oxydans* (Prust, 2004). Die Elektronen werden vom PQQ und über die NADH-Dehydrogenase direkt in den Ubichinonpool geleitet. An der Stelle des Ubichinons verzweigt sich die Atmungskette von *G. oxydans*. Entweder werden die Elektronen vom reduzierten Ubichinon auf den Cytochrom-*bc*<sub>1</sub>-Komplex übertragen, wobei gleichzeitig eine Protonentranslokation durch die Membran erfolgt, oder auf eine der beiden Endoxidasen. Als Endoxidasen wurden zwei Chinoloxidasen vom *bo*<sub>3</sub>- und *bd*-Typ identifiziert. Die *bo*<sub>3</sub>-Chinol-Oxidase transportiert im Gegensatz zur *bd*-Chinol-Oxidase Protonen durch die Membran (Prust, 2004). Ausgehend von den Endoxidasen werden die Elektronen auf Sauerstoff übertragen. Der bereits erwähnte Cytochrom-*bc*<sub>1</sub>-Komplex überträgt die Elektronen auf Cytochrom *c*. Da keine Cytochrom *c*-Oxidase in *G. oxydans* vorhanden ist (Matsushita *et al.*, 1994), die Elektronen vom Cytochrom *c* aufnimmt, wird über die Funktion des Cytochrom *bc*<sub>1</sub>-Komplexes und eines potentiellen Elektronenakzeptor noch spekuliert. Das durch den Protonentransport über die Membran aufgebaute Protonenpotential führt schließlich zur ATP-Regeneration mittels einer F<sub>1</sub>F<sub>o</sub>-Typ ATP-Synthase (Prust *et al.*, 2005).

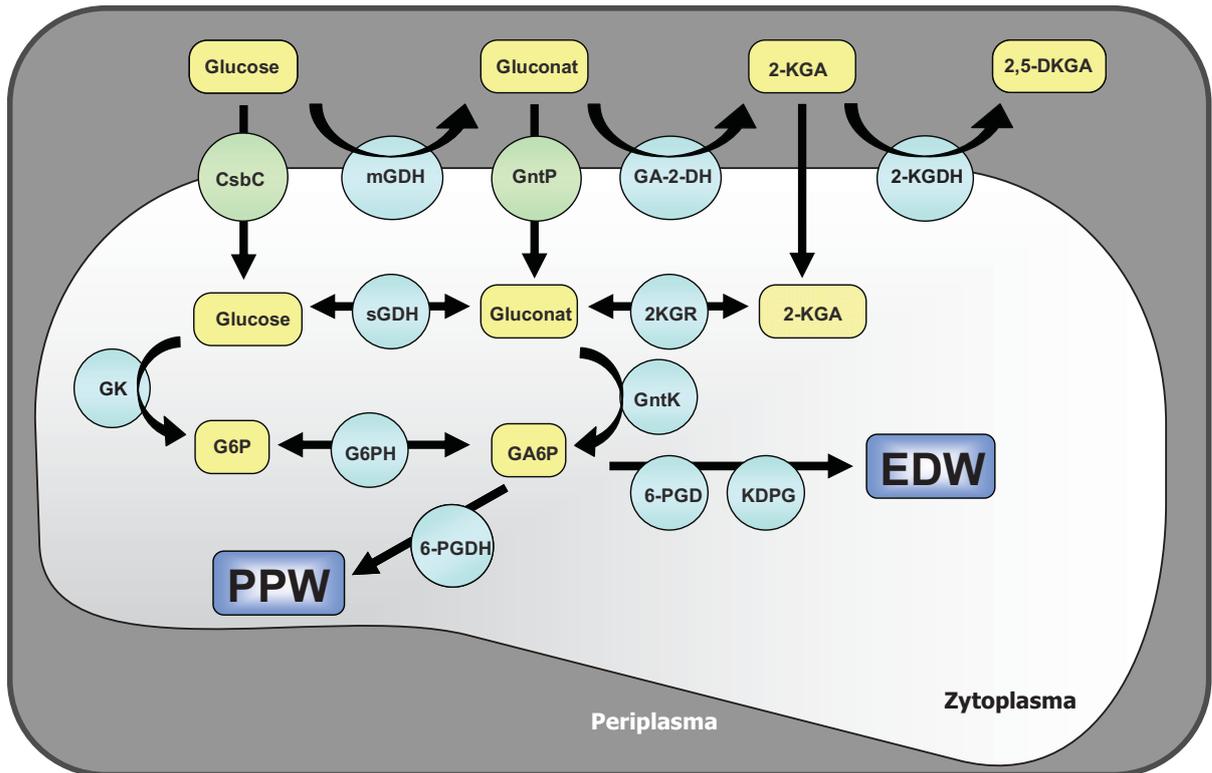


**Abb. 2: Schematische Darstellung der Elektronentransportkette von *G. oxydans*.** Abkürzungen: pmf, Protonenmotorische Kraft; NADH-DH, NADH-Dehydrogenase; mGDH, membrangebundene Glucose-Dehydrogenase.

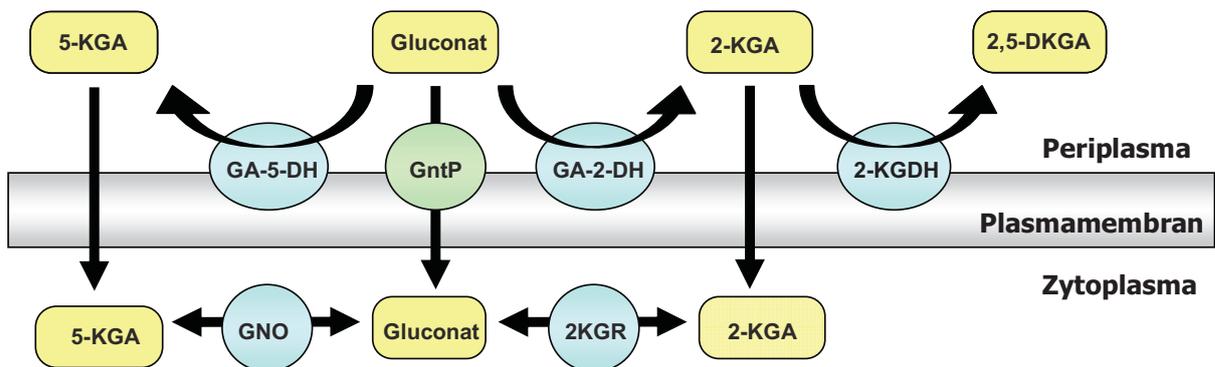
### 1.3 Der Glucosestoffwechsel von *G. oxydans*

*G. oxydans* kann Glucose über verschiedene Wege verstoffwechseln (Abb. 3). An der Membran wird Glucose zu Gluconat oxidiert und kann je nach Stamm weiter zu 2-Keto-D-Gluconat (2-KGA), 5-Keto-D-Gluconat (5-KGA) und 2,5-Di-Keto-Gluconat (2,5-DKGA) umgesetzt werden. Ohne pH-Kontrolle entsteht aus Glucose nur Gluconat, da ein niedriger pH-Wert zur Inhibition der an der Gluconat-Oxidation beteiligten Enzyme führt (Weenk *et al.*, 1984). Wird der pH konstant auf 5,5-6,0 gehalten, laufen bei *G. oxydans* nacheinander drei Oxidationsreaktionen ab: Glucose wird mittels der membrangebundenen, PQQ-abhängigen Glucose-Dehydrogenase (mGDH) zu Gluconat oxidiert (Ameyama *et al.*, 1981a; Matsushita *et al.*, 1989; Pronk *et al.*, 1989). Es kommt zunächst zur intermediären Anreicherung von Gluconat, vermutlich ist die Affinität der membrangebundenen Gluconat-2-Dehydrogenase (mGA-2-DH) zu Gluconat gering (Weenk *et al.*, 1984). Die FAD-abhängige mGA-2-DH setzt das entstandene Gluconat zu 2-KGA um, welches über die membrangebundene FAD-abhängige 2-Ketogluconat-Dehydrogenase (2-KGDH) zum Endprodukt 2,5-DKGA oxidiert wird (Shinagawa *et al.*, 1981; Gupta *et al.*, 2001; Prust *et al.*, 2005; Toyama *et al.*, 2007). 2,5-DKGA ist bei einem pH von 4,5 instabil und führt bei Zersetzung zu einer rötlich/braune Verfärbung des Nährmediums (Weenk *et al.*, 1984; Schlegel, 1992; Kersters *et al.*, 2006).

Einige *G. oxydans*-Stämme verfügen zusätzlich zur mGA-2-DH über eine membrangebundene, PQQ-abhängige Gluconat-5-Dehydrogenase (mGA-5-DH), die Gluconat zu 5-KGA oxidieren, welches nicht weiter oxidiert wird (Abb. 4) (Shinagawa *et al.*, 1983, 1999; Adachi *et al.*, 2001; Matsushita *et al.*, 2003).



**Abb. 3: Schema des Glucosestoffwechsels von *G. oxydans*.** Die Glucose-Oxidation kann über das membrangebundene oder das cytoplasmatische Enzymsystem erfolgen. Abkürzungen: G6PH, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und Gluconolactonase; 6-PGDH, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase; 6-PGD, 6-Phosphogluconat-Dehydrase; KDPG, 2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat-Aldolase.



**Abb. 4: Umsetzung von Gluconat zu Ketogluconaten in *G. oxydans*.** Abkürzungen: GNO, Gluconat-Dehydrogenase; 2KGR, 2-KGA-Reduktase.

Glucose, Gluconat, 2-KGA und 5-KGA können auch von der Zelle aufgenommen und nach Umsetzung zu 6-Phosphogluconat (GA6P) in den zentralen Stoffwechsel eingeschleust werden (Deppenmeier *et al.*, 2002). So wird Glucose in *G. oxydans* über einen putativen Transporter, die Glucose-Permease (CsbC) von der Zelle aufgenommen. Gluconat gelangt über die Gluconat-Permease (GntP) in die Zelle. Eine 2-KGA-Permease konnte bisher nicht identifiziert werden (Prust *et al.*, 2005), jedoch kann 2-KGA wie auch 5-KGA von der Zelle aufgenommen werden (Gupta *et al.*, 2001).

Innerhalb der Zelle kann Glucose über zwei alternative Wege weiter umgesetzt werden. Über eine Glucose-Kinase (GK) wird Glucose zu Glucose-6-Phosphat (G6P) und dann mittels einer cytosolischen NADP<sup>+</sup>-abhängigen Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PH) weiter zu 6-Phosphogluconat umgesetzt. Alternativ wird das Substrat über die cytosolische NADP<sup>+</sup>-abhängigen Glucose-Dehydrogenase (sGDH) zu Gluconat oxidiert, und dieses wird anschließend über die Gluconat-Kinase (GntK) zu 6-Phosphogluconat phosphoryliert. 6-Phosphogluconat wird in den Pentosephosphat-Weg (PPW) oder Entner-Doudoroff-Weg (EDW) eingeschleust (Levering *et al.*, 1988; Pronk *et al.*, 1989). 2-KGA wird innerhalb der Zelle wieder zu Gluconat reduziert, wahrscheinlich über eine cytosolische NADPH-abhängige 2-KGA-Reduktase (2KGR) (Ameyama *et al.*, 1981a; 1982b), die auch Gluconat zu 2-KGA oxidieren kann. Einige *G. oxydans*-Stämme verfügen intrazellulär über eine cytosolische Gluconat-Dehydrogenase (GNO), die Gluconat zu 5-KGA oxidieren bzw. das 5-KGA auch wieder reduzieren kann (Abb. 4) (Klasen *et al.*, 1995).

#### 1.4 Ziel der Arbeit

Da die geringe Biomasseausbeute für die biotechnologische Nutzung von *G. oxydans* nachteilig ist, war es das Ziel dieser Arbeit, eine *G. oxydans* Mutante mit hoher Wachstumsrate und Biomasseausbeute auf dem Substrat Glucose zu entwickeln. Hierbei wurde versucht, im ersten Schritt die schnell und zu annähernd 100% ablaufende extrazelluläre Oxidation von Glucose zu Gluconat sowie zu 2-KGA und 2,5-DKGA zu verhindern. Glucose sollte effektiv von der Zelle aufgenommen und in den zentralen Stoffwechsel eingeschleust werden. Deshalb wurden verschiedene Gene, wie z.B. die Glucose-Permease, oder die Glucose-Kinase überexprimiert und andere Gene, wie die mGDH und sGDH, disruptiert mit dem Ziel, die Glucosenutzung von *G. oxydans* zu optimieren. Die Auswirkungen der Gen-Überexpressionen bzw. -Disruptionen wurden anhand des Wachstums, der Produktbildung und dem Substratverbrauch der konstruierten Mutanten untersucht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Bakterienstämme

Eine Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme ist in Tab. 1 und 2 zu finden.

**Tab. 1: Bakterienstämme, die in dieser Arbeit eingesetzt wurden**

Stamm	Genotyp	Referenz
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> , $\Phi$ 80d <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169	(Hanahan, 1983; Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
HB101	F <sup>-</sup> , <i>hsdS20</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> , m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ), <i>supE44</i> , <i>ara-14</i> , <i>galK-2</i> , <i>lacY1</i> , <i>proA2</i> , <i>rpsL20</i> , <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>recA13</i> , <i>Kan<sup>R</sup></i> , <i>oriColE1</i> , <i>RK2-Mob<sup>+</sup></i> , <i>RK2-Tra<sup>+</sup></i> , <i>mH-1</i> mit Plasmid pRK2013	(Boyer & Roulland-Dussoix, 1969; Figurski & Helinski, 1979; Lam <i>et al.</i> , 1985)
<b><i>Gluconobacter oxydans</i></b>		
IFO 3293	Wildtyp, Cef <sup>R</sup> , (produziert 2,77 g/l 2-KGLA aus 25 g/l Sorbose)	(Sugisawa <i>et al.</i> , 1990; Hoshino <i>et al.</i> , 1990)
N44-1	Cef <sup>R</sup> , (durch Mutagenese aus <i>G. oxydans</i> IFO 3293 entstanden; produziert 50 g/l 2-KGLA aus 100 g/l Sorbit)	(Sugisawa <i>et al.</i> , 1990)
N44-1 <i>mgdh::kan</i>	Cef <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Disruption des <i>mgdh</i> -Gens	DSM Nutritional Products (Kaiseraugst, Schweiz)
N44-1 <i>sgdh::kan</i>	Cef <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Disruption des <i>sgdh</i> -Gens	Eigene Arbeit
N44-1 $\Delta$ <i>mgdh</i>	Cef <sup>R</sup> , chromosomale Disruption des <i>mgdh</i> -Gens	Eigene Arbeit
N44-1 $\Delta$ <i>mgdh sgdh::kan</i>	Cef <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Disruption des <i>sgdh</i> -Gens; chromosomale Disruption des <i>mgdh</i> -Gens	Eigene Arbeit

Tab. 2: Weitere im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Bakterien-Stämme

Konstruierter Stamm	Stammbezeichnung
<b><i>E. coli</i></b>	
DH5 $\alpha$ pBBR1MCS2	DH5 $\alpha$ -MCS2
DH5 $\alpha$ pBBR1MCS2- <i>gkl</i>	DH5 $\alpha$ - <i>gkl</i>
DH5 $\alpha$ pEXGOXA- <i>gkl</i>	DH5 $\alpha$ pEXGOXA- <i>gkl</i>
DH5 $\alpha$ pBBR1MCS4- <i>gklI</i>	DH5 $\alpha$ - <i>gklI</i>
DH5 $\alpha$ pBBR1MCS4- <i>csbC</i>	DH5 $\alpha$ - <i>csbC</i>
DH5 $\alpha$ pBBR1MCS4- <i>glf</i>	DH5 $\alpha$ - <i>glf</i>
DH5 $\alpha$ pUC18- <i>sgdh</i>	DH5 $\alpha$ pUC18- <i>sgdh</i>
DH5 $\alpha$ pUC18- <i>sgdh::kan</i>	DH5 $\alpha$ pUC18- <i>sgdh::kan</i>
DH5 $\alpha$ pSUP202- <i>sgdh::kan</i>	DH5 $\alpha$ pSUP202- <i>sgdh::kan</i>
DH5 $\alpha$ pK19 <i>mobsacB</i> - $\Delta$ <i>mgdh</i>	DH5 $\alpha$ pK19 <i>mobsacB</i> - $\Delta$ <i>mgdh</i>
DH5 $\alpha$ pBBR1MCS2- <i>tufB-pgi/tal-fw</i> N57A	DH5 $\alpha$ -PGI-Überproduzent 1
DH5 $\alpha$ pBBR1MCS2- <i>tufB-pgi/tal-fw</i> K153A	DH5 $\alpha$ -PGI-Überproduzent 2
DH5 $\alpha$ pBBR1MCS2- <i>tufB-pgi/tal-fw</i> T531A/E533A	DH5 $\alpha$ -TAL-Überproduzent 1
DH5 $\alpha$ pBBR1MCS2- <i>tufB-pgi/tal-fw</i> R589A	DH5 $\alpha$ -TAL-Überproduzent 2
<b><i>G. oxydans</i></b>	
N44-1 pBBR1MCS2	N44-1
N44-1 pBBR1MCS4	N44-1
N44-1 <i>mgdh::kan</i> pBBR1MCS4	Einfachdisruptante
N44-1 $\Delta$ <i>mgdh sgdh::kan</i> pBBR1MCS4	Doppeldisruptante
N44-1 pBBR1MCS2- <i>gkl</i>	N44-1- <i>gkl</i>
N44-1 $\Delta$ <i>mgdh</i> pEXGOXA- <i>gkl</i>	N44-1 $\Delta$ <i>mgdh</i> pEXGOXA- <i>gkl</i>
N44-1 $\Delta$ <i>mgdh sgdh::kan</i> pEXGOXA- <i>gkl</i>	GKI-Überproduzent
N44-1 pBBR1MCS4- <i>gklI</i>	N44-1- <i>gklI</i>
N44-1 <i>mgdh::kan</i> pBBR1MCS4- <i>gklI</i>	GKII-Überproduzent
N44-1 pBBR1MCS4- <i>csbC</i>	N44-1- <i>csbC</i>
N44-1 <i>mgdh::kan</i> pBBR1MCS4- <i>csbC</i>	CsbC-Überproduzent
N44-1 $\Delta$ <i>mgdh</i> pBBR1MCS4- <i>csbC</i>	N44-1 $\Delta$ <i>mgdh-csbC</i>
N44-1 $\Delta$ <i>mgdh sgdh::kan</i> pBBR1MCS4- <i>glf</i>	GLF-Überproduzent
N44-1 $\Delta$ <i>mgdh</i> pBBR1MCS2- <i>tufB-pgi/tal-fw</i>	N44-1 $\Delta$ <i>mgdh-tufB-pgi/tal-fw</i>
N44-1 $\Delta$ <i>mgdh sgdh::kan</i> pBBR1MCS5- <i>tufB-pgi/tal-fw</i>	PGI/TAL-Überproduzent
N44-1 $\Delta$ <i>mgdh sgdh::kan</i> pBBR1MCS5- <i>tufB-pgi/tal-fw</i> N57A	PGI-Überproduzent 1
N44-1 $\Delta$ <i>mgdh sgdh::kan</i> pBBR1MCS5- <i>tufB-pgi/tal-fw</i> K153A	PGI-Überproduzent 2
N44-1 $\Delta$ <i>mgdh sgdh::kan</i> pBBR1MCS5- <i>tufB-pgi/tal-fw</i> T531A/E533A	TAL-Überproduzent 1
N44-1 $\Delta$ <i>mgdh sgdh::kan</i> pBBR1MCS5- <i>tufB-pgi/tal-fw</i> R589A	TAL-Überproduzent 2

## 2.2 Vektoren

Folgende Vektoren wurden in dieser Arbeit verwendet (Tab. 3).

**Tab. 3: Vektoren, die in dieser Arbeit eingesetzt wurden**

Vektor	Eigenschaften	Referenz
pBBR1MCS2	Kan <sup>R</sup> , <i>lacI</i> , <i>lacZ</i> , <i>P<sub>lac</sub></i> , pBBR1 replicon	(Kovach <i>et al.</i> , 1995)
pBBR1MCS2- <i>gkl</i>	Überexpression des <i>gkl</i> -Gens aus <i>G. oxydans</i> N44-1	Eigene Arbeit
pBBR1MCS2- <i>tufB-pgi/tal-fw</i>	Überexpression des <i>pgi/tal</i> -Gens aus <i>G. oxydans</i> DSM 2343; richtig orientiert unter Kontrolle des <i>tufB</i> -Promotors	(Bremus, 2006)
pBBR1MCS2- <i>tufB-pgi/tal-fw</i> N57A	Plasmid zur Inaktivierung des PGI/TAL-Fusionsproteins; Nucleotidwechsel: Aminosäureaustausch N zu A an Position 57	Eigene Arbeit
pBBR1MCS2- <i>tufB-pgi/tal-fw</i> K153A	Plasmid zur Inaktivierung des PGI/TAL-Fusionsproteins; Nucleotidwechsel: Aminosäureaustausch K zu A an Position 153	Eigene Arbeit
pBBR1MCS2- <i>tufB-pgi/tal-fw</i> T531A/E533A	Plasmid zur Inaktivierung des PGI/TAL-Fusionsproteins; Nucleotidwechsel: Aminosäureaustausch T zu A an Position 531 und E zu A an Position 533	Eigene Arbeit
pBBR1MCS2- <i>tufB-pgi/tal-fw</i> R589A	Plasmid zur Inaktivierung des PGI/TAL-Fusionsproteins; Nucleotidwechsel: Aminosäureaustausch R zu A an Position 589	Eigene Arbeit
pBBR1MCS4	Amp <sup>R</sup> , <i>lacI</i> , <i>lacZ</i> , <i>P<sub>lac</sub></i> , pBBR1 replicon	(Kovach <i>et al.</i> , 1995)
pBBR1MCS4- <i>gkII</i>	Überexpression des <i>gkII</i> -Gens aus <i>G. oxydans</i> N44-1	Eigene Arbeit
pBBR1MCS4- <i>csbC</i>	Überexpression des <i>csbC</i> -Gen (putativer Zucker-Transporter) aus <i>G. oxydans</i> N44-1	Eigene Arbeit
pBBR1MCS4- <i>glf</i>	Expression des <i>glf</i> -Gens aus <i>Zymomonas mobilis</i>	Eigene Arbeit
pBBR1MCS5	Gm <sup>R</sup> , <i>lacI</i> , <i>lacZ</i> , <i>P<sub>lac</sub></i> , pBBR1 replicon	(Kovach <i>et al.</i> , 1995)
pBBR1MCS5- <i>tufB-pgi/tal-fw</i>	Überexpression des <i>pgi/tal</i> -Gens aus <i>G. oxydans</i> DSM 2343; richtig orientiert unter Kontrolle des <i>tufB</i> -Promotors	Eigene Arbeit

Vektor	Eigenschaft	Referenz
pBBR1MCS5- <i>tufB-pgi/tal-fw</i> N57A	Plasmid zur Inaktivierung des PGI/TAL-Fusionsproteins; Nucleotidwechsel: Aminosäureaustausch N zu A	Eigene Arbeit
pBBR1MCS5- <i>tufB-pgi/tal-fw</i> K153A	Plasmid zur Inaktivierung des PGI/TAL-Fusionsproteins; Nucleotidwechsel: Aminosäureaustausch K zu A	Eigene Arbeit
pBBR1MCS5- <i>tufB-pgi/tal-fw</i> T531A/E533A	Plasmid zur Inaktivierung des PGI/TAL-Fusionsproteins; Nucleotidwechsel: Aminosäureaustausch T und E zu A	Eigene Arbeit
pBBR1MCS5- <i>tufB-pgi/tal-fw</i> R589A	Plasmid zur Inaktivierung des PGI/TAL-Fusionsproteins; Nucleotidwechsel: Aminosäureaustausch R zu A	Eigene Arbeit
pEXGOX-A	Amp <sup>R</sup> , P <sub><i>tufB</i></sub> , Derivat von pEXGOX-G	(Schleyer <i>et al.</i> , 2007)
pEXGOXA- <i>gkl</i>	Überexpression des <i>gkl</i> -Gens aus <i>G. oxydans</i> N44-1	Eigene Arbeit
pZY507- <i>glf</i>	pACYC Derivat; <i>glf</i> , <i>lacI</i> <sup>q</sup> , Cm <sup>R</sup> , P <sub><i>tac</i></sub> , P15A	(Weisser <i>et al.</i> , 1995)
pRK2013	Kan <sup>R</sup> , <i>oriColE1</i> , <i>RK2-Mob</i> <sup>+</sup> , <i>RK2-Tra</i> <sup>+</sup> , <i>mH-1</i> ( <i>tra</i> -Gene, <i>mob</i> -Region)	(Ditta <i>et al.</i> , 1980)
pDrive	Konjugations-Helferplasmid Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , P <sub><i>lac</i></sub> , T7 promotor, SP6 promotor, f1 origin	Qiagen (Hilden)
pUC18	Amp <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> , <i>lacZ</i> , P <sub><i>lac</i></sub> , pBBR1 replicon	
pUC18- <i>sgdh</i>	Expression des <i>sgdh</i> -Gens aus <i>G. oxydans</i> N44-1	Eigene Arbeit
pUC18- <i>sgdh::kan</i>	Disruption des <i>sgdh</i> -Gens aus <i>G. oxydans</i> N44-1	Eigene Arbeit
pSUP202	Vektor zur Gendisruption; pBR325-Mob, Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	(Simon <i>et al.</i> 1983)
pSUP202- <i>sgdh::kan</i>	Disruption des <i>sgdh</i> -Gens aus <i>G. oxydans</i> N44-1	Eigene Arbeit
pK19 <i>mobsacB</i>	Integrationsvektor, Kan <sup>R</sup> , <i>sacB</i> , <i>oriV<sub>E.C.</sub></i> , <i>oriT</i>	(Schäfer <i>et al.</i> , 1994)
pK19 <i>mobsacB-Δmgdh</i>	Disruption des <i>mgdh</i> -Gens aus <i>G. oxydans</i> N44-1	Eigene Arbeit

## 2.3 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen Operon (Hilden) und Microsynth AG (Balgach, Schweiz) bezogen. Die Oligonukleotid-Sequenzen sind in 5`-3`-Richtung angegeben. Eingeführte Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen, und der Enzymname ist hinter der Sequenz in Klammern aufgeführt. Überlappende Sequenzen der cross-over-PCR sind „fett“ geschrieben.

**Tab. 4: Oligonukleotide, die in dieser Arbeit verwendet wurden**

Oligonukleotid (Verwendung)	Sequenz
<b>Überexpression</b>	
<b>sgdh_GoxKpnIF</b> (Amplifikation des <i>sgdh</i> -Gens (for))	GGA GAG GTG AGG <u>TAC CAT</u> GCC TGC CCC ( <i>KpnI</i> )
<b>sgdh_GoxSaclR</b> (Amplifikation des <i>sgdh</i> -Gens (rev))	GGA TCA TCA GGA <u>GCT CGT</u> CTG TCC AGA CTG G ( <i>SacI</i> )
<b>gk-SacII-5</b> (Amplifikation des <i>gkl</i> -Gens (for))	GGG CCA TGG <u>CCG CGG</u> GAA CAC C ( <i>SacII</i> )
<b>gk-SacI-3</b> (Amplifikation des <i>gkl</i> -Gens (rev))	GGT CAA GGA <u>TGA GCT CTA</u> CCG GGT CGG ( <i>SacI</i> )
<b>gkl-5-blunt</b> (Amplifikation des <i>gkl</i> -Gens (for) Vektor pEXGOX)	GTG ACC CCC TCC CTG TCC CG
<b>gkl-3-blunt</b> (Amplifikation des <i>gkl</i> -Gens (rev) Vektor pEXGOX)	CCA TGG ATC AGT CCG CCG CC
<b>gkII-Pst-5</b> (Amplifikation des <i>gkII</i> -Gens (for))	GCA TCG CCA GAG GAT <u>CTG CAG</u> TGC CAT GAG GG ( <i>PstI</i> )
<b>gkII-XbaI-3-r</b> (Amplifikation des <i>gkII</i> -Gens (rev))	CCG GAA <u>ATC TAG ACT</u> TGT TTT TTC GTT TTT ACG ( <i>XbaI</i> )
<b>gkII-5-blunt</b> (Amplifikation des <i>gkl</i> -Gens (for) Vektor pEXGOX)	ATG AGG GAA ATC GTA GCC GTC G
<b>gkII-3-blunt</b> (Amplifikation des <i>gkl</i> -Gens (rev) Vektor pEXGOX)	TTA CGG ATG CGC TTC CGC GTA TGC
<b>gkGoxXhoI_F</b> (Amplifikation des <i>gntK</i> -Gens (for))	GGA CGG TGT GGA <u>GCC TCG AGA</u> GCC ATG AAG ATG ( <i>XhoI</i> )

Oligonukleotid (Verwendung)	Sequenz
<b>gkGoxBglII_R</b> (Amplifikation des <i>gntK</i> -Gens (rev))	CGA CCC GGT <u>AGA TCT</u> CAT CCT TGA CC ( <i>BglII</i> )
<b>csbC-XmaI_F</b> (Amplifikation des <i>csbC</i> -Gens (for))	CGG TTT TCT <u>CCC GGG CCT</u> GAA AAA CC ( <i>XmaI</i> )
<b>csbC-sacII_R</b> (Amplifikation des <i>csbC</i> -Gens (rev))	GCT GCC ACA TCC <u>CGC GGC</u> AGC AAC CC ( <i>SacII</i> )
<b>g6pdh- SphI-fwd</b> (Amplifikation des <i>g6pdh</i> -Gens (for))	GGA ATT ATG <u>TGC ATG CTT</u> CAT GAA CGC ( <i>SphI</i> )
<b>g6pdh- Sall-rev</b> (Amplifikation des <i>g6pdh</i> -Gens (rev))	CGT TGC GCT TTT <u>GTC GAC</u> GCT CA ATG C ( <i>Sall</i> )
<b>Disruption (<i>mgdh</i>-Gen)</b>	
<b>coPCR-gdh-5F</b> (Amplifikation des linken stromaufwärts gelegenen Fragments (for))	GCA CGG CCG <u>GGC ATG CCA</u> CTT GTG GC ( <i>SphI</i> )
<b>coPCR-gdh-5R</b> (Amplifikation des linken stromaufwärts gelegenen Fragments (rev))	<b>CCC ATC CAC TAA ACT TAA ACA</b> CGT GCC GCC GAT CTG GCG GGA GAC G
<b>coPCR-gdh-3F</b> (Amplifikation des rechten stromabwärts gelegenen Fragments (for))	<b>TGT TTA AGT TTA GTG GAT GGG</b> CTC TCC ACG GCT GGC AAC CTC GGC TTC C
<b>coPCR-gdh-3R</b> (Amplifikation des rechten stromabwärts gelegenen Fragments (rev))	CCG GTT GTG AGG <u>CGG TCG ACT</u> GGC AGT CGG TGG ( <i>Sall</i> )
<b>gdh-control-5</b> (Nachweis der Disruption (for))	CGG GCA GGA ATG TTG AGC TGT AGG
<b>gdh-control-3</b> (Nachweis der Disruption (rev))	CCC TCG CCG TAA ACG ATT GGT CC
<b>Sequenzierung</b>	
<b>pBBRMCS2_fwd</b> (Seq. von pBBR1MCS2-Derivaten (for))	ATA CGA CTC ACT ATA GGG C
<b>pBBRMCS2_rev</b> (Seq. von pBBR1MCS2-Derivaten (rev))	GCT ATG ACC ATG ATT ACG C
<b>pEXGOX-SEQ002</b> (Seq. von pEXGOX-Derivaten (for))	GCT TCA TGT GAA TGA TGA CAA CC
<b>pEXGOX-SEQ001</b> (Seq. von pEXGOX-Derivaten (rev))	GCA GTG TGT CGA TCT CAG GAT CG
<b>pK19MCS5282F</b> (Seq. von pK19 <i>mobsacB</i> -Derivaten (for))	ATA CGC AAA CCG CCT CTC CC

Oligonukleotid (Verwendung)	Sequenz
<b>pK19MCS5607R</b> (Seq. von pK19 <i>mobsacB</i> -Derivaten (rev))	CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC G
<b>sgdh-rev1</b> (Seq. von pUC18- <i>sgdh</i> (rev))	CGG CCT TGT ACT GTT CGG G
<b>pUC18-rev</b> (Seq. von pUC18-Derivaten (rev))	TTG TGT GGA ATT GTG AGC GG
<b>Site-directed Mutagenese</b>	
<b>N57A-Sful-1</b> (for)	GGT GTG ACC TCC GCC CCG GCC ATC <u>TTC GAA</u> AAG GCC ATC GGG ( <i>Sful</i> )
<b>N57A-Sful-2</b> (rev)	CCC GAT GGC CTT <u>TTC GAA</u> GAT GGC CGG GGC GGA GGT CAC ACC
<b>K153A-DBcII-1</b> (for)	CCG AAC CTG ATG <u>ATC GCG</u> ATT CCG GGT ACG G ( <i>Nurl</i> )
<b>K153A-DBcII-2</b> (rev)	CCG TAC CCG GAA <u>TCG CGA</u> TCA TCA GGT TCG G
<b>T531A/E533A-NarI-1</b> (for)	GCA AGT CCG GCG GCG CGC <u>TGG CGC CGA</u> ACA TCC TGT TCG ( <i>NarI</i> )
<b>T531A/E533A-NarI-2</b> (rev)	CGA ACA GGA TGT <u>TCG GCG CCA</u> GCG CGC CGC CGG ACT TGC
<b>R589A-NarI-1</b> (for)	CGA AAA TTG GTG <u>GCG CCT</u> ATT CGG TTC TGT CC ( <i>NarI</i> )
<b>R589A-NarI-2</b> (rev)	GGA CAG AAC CGA ATA <u>GGC GCC</u> ACC AAT TTT CG
<b>SD-pEXgkII-5-invers</b>	CCA TCT AGA GGC TTT CAT TTA TGA GGG AAA TCG TAG CC
<b>SD-pEXgkII-5</b>	GGC TAC GAT TTC CCT CAT AAA TGA AAG CCT CTA GAT GG
<b>SD-pEXgkII-3</b>	CGC GGA AGC GCA TCC GTA AAA ATC GAA TAC TTA TGG C

## 2.4 Chemikalien

Es wurden Chemikalien der Firmen Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen), Merck KGaA (Darmstadt), Fluka (Neu-Ulm) und Roth GmbH + Co.KG (Karlsruhe), soweit nicht anders angegeben, der Reinheitsstufe p.A. verwendet. Biochemikalien und Enzyme mit den zugehörigen Puffern wurden von Roche Diagnostics GmbH (Mannheim), New England Biolabs (Frankfurt) und Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Die Enzyme Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Glucose-6-Phosphat-Isomerase, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase, Triosephosphat-Isomerase, Phosphogluconat-Isomerase, Glucose-6-Phosphat-Isomerase, Acetaldehyd-Dehydrogenase, Pyruvat-Decarboxylase und Alkohol-Dehydrogenase für Enzymaktivitätsmessungen waren von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen). Die Testsysteme zum Nachweis von Bernsteinsäure (Succinat), D-/L-Milchsäure (D-/L-Lactat), Acetaldehyd, D-Gluconsäure und Essigsäure (Acetat) wurden von R-Biopharm AG (Darmstadt) bezogen. Der DNA-Größenmarker „Lambda DNA/Eco130I (Styl)“ stammte von Fermentas GmbH (St. Leon-Rot), der „DNA Molecular Weight Marker IX“ von Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) und die „100 bp DNA Ladder“ von New England Biolabs (Frankfurt).

## 2.5 Kulturbedingungen und Nährmedien

Die Medien wurden zur Sterilisation 20 min bei 121°C autoklaviert. Zur Herstellung von festen Nährmedien wurde, soweit nicht anders angegeben, 15 g/l Agar vor dem Autoklavieren zugesetzt.

### 2.5.1 Nährmedien und Medienzusätze für *E. coli*

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte in Luria-Bertani-(LB)-Vollmedium (Sambrook und Russel, 2000) bei 37°C. Flüssigkulturen wurden in Schüttelkultur herangezogen. Zur Selektion von Bakterien, die ein Plasmid trugen, wurden Antibiotika in entsprechender Konzentration (Tab. 5) dem Medium zugesetzt. Die kompetenten Zellen für die Transformation von *E. coli* wurden in SOB-Medium (Hanahan, 1985) kultiviert. Die anschließende Regeneration der Zellen erfolgte ebenfalls in SOB-Medium. Für die Selektion wurden zusätzlich 0,1 mM Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid (IPTG) und 40  $\mu$ g/ml 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-Gal) den Selektivplatten zugefügt.

### 2.5.2 Nährmedien und Medienzusätze für *G. oxydans*

Die Komponenten „Bacto-Peptone“ und „Bacto-Agar“ stammten von Becton Dickinson GmbH (Heidelberg). Die Kultivierung von *G. oxydans* erfolgte in No.5-

Medium bei 30°C (Tab. 5) (Shinjoh *et al.*, 1995). Das zum Puffern verwendete CaCO<sub>3</sub> (particle size: powder) wurde von Fluka (Neu-Ulm) bezogen und separat und trocken im Erlenmeyerkolben autoklaviert. Danach wurde das sterile Medium hinzugegeben. Zur Stammhaltung, Mini-Plasmidpräparation sowie für die Elektroporation wurde *G. oxydans* in EP-Medium herangezogen. Zur Regeneration nach der Elektroporation wurden die Zellen ebenfalls in EP-Medium inkubiert. Die Selektion rekombinanter Zellen erfolgte durch Zugabe von Antibiotika (Tab. 8) in das EP-Medium.

**Tab. 5: Nährmedien für *G. oxydans***

<b>No.5-Medium</b>	
C-Quelle	50 g/l (Glucose, Sorbit, Gluconate)
Hefeextrakt	15 g/l
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	2,5 g/l
Glycerin	0,5 g/l
CaCO <sub>3</sub>	15 g/l
<b>Elektroporationsmedium (EP)-Medium (sterilfiltriert)</b>	
Mannit	80 g/l
Hefeextrakt	15 g/l
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	2,5 g/l
Glycerin	0,5 g/l
CaCl <sub>2</sub>	1,5 g/l
(pH 6,0 mit HCl)	
<b>MB-Agar</b>	
Mannit	25 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
Bacto-Peptone	3 g/l
Bacto-Agar	18 g/l

Zur Wachstumsverbesserung von *G. oxydans*-Stämmen wurden dem No.5-Medium die in Tab. 6 aufgelisteten Substanzen in folgenden Konzentrationen einzeln hinzugefügt.

**Tab. 6: Zugesezte Substanzen zum No.5-Medium**

<b>Zusätze zum No.5-Medium</b>	
Ammoniumphosphat	1 g/l
Biotin	2 µg/l
Folsäure	2 µg/l
Glutamin	10 mg/l
Kaliumphosphat	1 g/l
Niacin	400 µg/l
Pantothensäure	400 µg/l
Riboflavin	200 µg/l

Anstelle eines Komplexmediums wurde das definierte Hefemedium „Yeast Nitrogen Base- (YNB)-Medium“ für die Kultivierung von *G. oxydans* verwendet. Das YNB-Medium wurde in zwei Varianten, mit und ohne die Aminosäuren L-Histidine, LD-Methionine und LD-Tryptophan, von der Firma Difco Laboratories (Detroit, USA) bezogen. Das Medium enthält Ammoniumsulfat (Stickstoffquelle), verschiedene Salze, Vitamine und Spurenelemente (Tab. 7).

**Tab. 7: Zusammensetzung des YNB-Mediums**

<b>YNB-Medium</b>	
Ammoniumsulfat	5 g/l
Biotin	2 µg/l
Calciumpantothenat	400 µg/l
Folsäure	2 µg/l
Inositol	2000 µg/l
Niacin	400 µg/l
p-Aminobenzoesäure	200 µg/l
Pyridoxinhydrochlorid	400 µg/l
Riboflavin	200 µg /l
Thiaminhydrochlorid	400 µg/l
Borsäure	500 µg/l
Kupfersulfat	40 µg/l
Kaliumjodid	100 µg/l
Eisenchlorid	200 µg/l
Magnesiumsulfat	400 µg/l
Natriummolybdat	200 µg/l
Zinksulfat	400 µg /l
Monokaliumphosphat	1,0 g/l
Magnesiumsulfat	0,5 g/l
Natriumchlorid	0,1 g/l
Calciumchlorid	0,1 g/l

Zur Selektion von *E. coli* und *G. oxydans*-Stämmen wurden sterilfiltrierte Antibiotika-Lösungen in folgenden Konzentrationen (Tab. 8) den autoklavierten und abgekühlten Medien zugesetzt. Die verwendeten Antibiotika stammten von Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen).

Tab. 8 Antibiotika, die in dieser Arbeit verwendet wurden

<b><i>Escherichia coli</i></b>		
<b>Antibiotikum</b>	<b>Stammlösung (mg/ml)</b>	<b>Endkonzentration (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>
Ampicillin (Na-Salz)	100 in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	100
Gentamycin (-Sulfat)	10 in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	10
Kanamycin (-Sulfat)	50 in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	50
<b><i>Gluconobacter oxydans</i></b>		
<b>Antibiotikum</b>	<b>Stammlösung (mg/ml)</b>	<b>Endkonzentration (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>
Cefoxitin (Na-Salz)	50 in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	50
Ampicillin (Na-Salz)	100 in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	100
Gentamycin (-Sulfat)	10 in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	10
Kanamycin (-Sulfat)	50 in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	50

## 2.6 Kultivierung von *E. coli* und *G. oxydans*

Zur Anzucht von Vorkulturen oder zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden 5 ml LB- oder EP-Medium in sterilen Reagenzgläsern verwendet. Vorkulturen für Wachstums-Experimente oder Fermentationen wurden in 100 ml-Erlenmeyerkolben mit 25 ml LB- oder No.5-Medium kultiviert. Je nach Stamm wurden Selektivantibiotika dem Medium hinzugefügt. Da *G. oxydans* eine natürliche Resistenz gegen Cefoxitin hat (Merfort *et al.*, 2006) wurde zur Anzucht von *G. oxydans*-Stämmen Cefoxitin ins Medium gegeben. Weitere Kultivierungsansätze erfolgten in 500 ml-Erlenmeyerkolben mit 50 ml Medium. Die Bakterienstämme wurden bei 220 rpm (Rotationsdurchmesser 0,5 m) in einem Schüttelschrank bis zur gewünschten Zelldichte inkubiert. Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte bei 37°C. Stämme von *G. oxydans* wurden bei 30°C angezogen, und die Hauptkulturen wurden mit einer  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  von ca. 0,25 aus den Vorkulturen angeimpft. Zur weiteren Verwendung der Kulturen sowie zur Messung der optischen Dichte wurde das dem No.5-Medium zur Pufferung zugesetzte  $\text{CaCO}_3$  durch Zentrifugation in einer Eppendorfzentrifuge, Modell 5810R (6 min, 300 x g), abgetrennt. Die OD-Messung erfolgte in einer 1:10 bzw. 1:100 Verdünnung mit 1 N HCl, wodurch  $\text{CaCO}_3$ -Reste entfernt wurden. Das bei der Reaktion von HCl mit  $\text{CaCO}_3$  entstehende  $\text{CaCl}_2$  ist wasserlöslicher als  $\text{CaCO}_3$ .

## 2.7 Kultivierung von *G. oxydans* in der „Fedbatch-Pro“-Fermentationsanlage

Da *G. oxydans* zum Wachsen viel Sauerstoff benötigt und ein neutraler pH-Wert zu einem guten Bakterienwachstum beiträgt, wurde ein Fermentationssystem mit pH- und Begasungskontrolle gewählt. Verwendet wurde das „Fedbatch-Pro“-Parallel-

fermentations-System der Firma DASGIP AG (Jülich), ausgestattet mit einem Bioblock (DASGIP AG, Jülich), bei dem es sich um eine Einheit von 4 Fermentationsgefäßen (Füllvolumen je Gefäß 200 ml) handelt, die jeweils mit einer pH- und Sauerstoffelektrode ausgestattet waren, einem Begasungssystem und einem Säure/Laugen-Dosiersystem. Die genannten Systeme in Verbindung mit einer pH/pO<sub>2</sub>-Überwachungseinheit und einer Abgasanalytik ermöglichten eine Kontrolle und Regelung des pH-Wertes, der Temperatur, der Rührergeschwindigkeit, des Sauerstoffpartialdruckes (pO<sub>2</sub>) und der Begasungsrate. Die Zusammensetzung der Zu- und Abluft wurde während der Kultivierung aufgezeichnet, so dass eine Kohlenstoffbilanzierung möglich war. Die Aufzeichnung aller Daten sowie die Kontrolle und Regelung der Systeme erfolgte mittels der Software „Fedbatch-Pro“ (DASGIP AG, Jülich). Für die Kultivierung von *G. oxydans* wurde das No.5-Medium mit Glucose als C-Quelle verwendet. Vor der Kultivierung wurden in jedes medienbefüllte Fermentationsgefäß 2-3 Tropfen Antischaummittel „Antifoam 204, autoclaved“ (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) gegeben sowie die entsprechenden Antibiotika. Angeimpft wurde aus einer exponentiell gewachsenen 50 ml-Vorkultur mit einer optischen Dichte<sub>600nm</sub> von 0,3. Das Fermentationsvolumen pro Gefäß betrug 200 ml, die Rührerdrehzahl 700 rpm, die Begasungsrate 12 Stl/h, der pH-Wert 6 und die Temperatur 30°C. Die Konzentration an gelöstem Sauerstoff im Kulturmedium betrug über die gesamte Versuchsdauer 15% bzw. im Parallelansatz 30%, so dass den Bakterien immer genügend Sauerstoff zur Verfügung stand. Zu Beginn der Kultivierung wurde der 15% bzw. 30% Sauerstoffpartialdruck im Medium durch Zufuhr von Luft (21% O<sub>2</sub>) eingestellt; in der exponentiellen Wachstumsphase benötigten die Bakterien so viel Sauerstoff, dass zusätzlich die Zufuhr von reinem Sauerstoff in das Kultivierungsmedium nötig war, damit konstant 15% O<sub>2</sub> im Medium gelöst waren.

## 2.8 Bestimmung der Biotrockenmasse

Die quantitative Bestimmung der Biotrockenmasse von *G. oxydans* erfolgte mittels Membranfiltration. Cellulosenitrat-Filter mit dem Porendurchmesser 0,45 µm (Millipore, Schwalbach) wurden vor ihrer Verwendung für 24 h bei 110°C getrocknet, anschließend in einem Exsikkator abgekühlt und gewogen. Zur Trockenmassenbestimmung wurden von einer wachsenden *G. oxydans*-Kultur zu bestimmten Zeitpunkten 10 ml-Proben genommen. Die Proben wurden abfiltriert und die Filter mit 200 ml kaltem, destilliertem Wasser nachgespült. Nach dem Trocknen für 24 Stunden bei 110°C und Abkühlen im Exsikkator wurden die Filter erneut gewogen, und das Nettogewicht der getrockneten Biomasse wurde ermittelt. Für *G. oxydans* ergab sich folgende Korrelation zwischen Biomasse und optischer Dichte: Gramm Zelltrockengewicht/Liter [g/l] = 0,2345 x OD<sub>600nm</sub>. Dieser Wert stimmte mit den von

Bremus (2006) ermittelten Daten von Gramm Zelltrockengewicht/Liter [g/l] = 0,23 x OD<sub>600nm</sub> überein (pers. Mitteilung C. Bremus).

## 2.9 Bestimmung der Kohlenstoffbilanz

Zur Bestimmung der Kohlenstoffbilanz wurden der gesamte organisch gebundene und der gelöste organische Kohlenstoff (TOC/DOC) einer Bakterienkultur bestimmt. Anhand der TOC- und DOC-Messergebnisse konnte der Kohlenstoffanteil in der Zelle berechnet werden. Die Gesamtheit des organisch gebundenen Kohlenstoffs (TOC) ergab sich aus der Summe folgender Kohlenstoffanteile:

$$C_{\text{TOC}} = C_{\text{DOC}} + C_{\text{Zellen}} + C_{\text{CO}_2}$$

(C = Kohlenstoffanteil [mmol]; CO<sub>2</sub> = Kohlenstoffdioxid)

Der Kohlenstoffanteil der Biomasse wurde anhand der Biotrockenmasse berechnet. Dabei wurde angenommen, dass der Anteil an Kohlenstoff 51% der Trockenmasse beträgt. (Quelle: <http://www.wasser-wissen.de/abwasserlexikon/b/bakterien.htm>). Die Kohlenstoffdioxidbildung wurde mittels der Abgasanalytik (Zweistrahlinfrarot-Messverfahren) des „Fedbatch-Pro“-Parallelfertigungs-Systems der Firma DASGIP AG (Jülich) bestimmt. Über eine im Abgasanalysator integrierte Massendurchflussmessung wurde die Kohlenstoffdioxidtransfer rate (CTR) bestimmt. Die Massenbilanz für einen Fermentationsansatz wurde in „g C-Atom“ angegeben. Die allgemeine Formel für die Kohlenstoffbilanzierung lautet:

$$\text{Bilanz} = C_S = C_{\text{SR}} + C_P + C_{\text{CO}_2} + C_X$$

(C = Kohlenstoffanteil [mmol]; S = Substrat; SR = Substratrest; P = Produkt; CO<sub>2</sub> = Kohlenstoffdioxid; X = Biomasse)

### 2.9.1 TOC/DOC Messung

Für die Kohlenstoffbilanzierung wurde der gesamte organisch gebundenen Kohlenstoff (TOC: total organic carbon) und der gelöste organischen Kohlenstoff (DOC: dissolved organic carbon) bestimmt. Die TOC/DOC Analyse wurde in Kooperation mit der „Zentralabteilung für chemische Analysen (ZCH)“ des Forschungszentrums Jülich durchgeführt. Vor der Messung wurden je 100 ml Probe eines Fermentationsansatzes entnommen und lyophilisiert. Mittels temperaturfraktionierter Verbrennung im Sauerstoffstrom mit anschließender IR-Detektion wurde der organische und anorganische Kohlenstoffs in Gewichtsprozent ermittelt (Dunsbach, 2007). Die TOC-Menge ergab sich aus der Summe des organischen und anorganischen Kohlenstoffgehaltes. Die Ofentemperatur wurde auf 110°C eingestellt, langsam auf 600°C

erhöht und auf dieser Temperatur gehalten, bis der gesamte organische Kohlenstoff verbrannt war. Anschließend wurde auf eine Temperatur von 1000°C erhöht, die konstant gehalten wurde, bis der anorganische Kohlenstoff verbrannt war (pers. Mitteilung M. Michulitz, ZCH).

## 2.10 Stammhaltung

Zur Lagerung von Bakterienkulturen über einen längeren Zeitraum wurden Glycerinkulturen angelegt. Hierbei wurde eine exponentiell und unter Selektionsdruck gewachsene Kultur der rekombinaten *E. coli*- bzw. *G. oxydans*-Stämme zu gleichen Teilen mit sterilem Glycerin gemischt und bei -70°C gelagert (Sambrook und Russel, 2000). Die Dauerkulturen wurden zum Beimpfen von Agarplatten oder 5 ml-Flüssigkulturen genutzt. Auf Selektivagarplatten können Kulturen maximal 6 Wochen bei 4°C aufbewahrt werden.

## 2.11 Molekularbiologische Methoden

### 2.11.1 Transformation von *E. coli* und *G. oxydans*

#### Transformation von *E. coli*

Die kompetenten *E. coli*-Zellen wurde gemäß der RbCl-Methode nach Cohen *et al.* (1972) hergestellt. Die Transformation der kompetenten *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA erfolgte nach Hanahan (1983). Anschließend plattiert man die Bakterien auf einem selektiven Medium aus und inkubiert sie über Nacht bei 37°C.

#### Transformation von *G. oxydans*

Die Transformation von *G. oxydans* erfolgte durch Elektroporation (Trevors und Stradoub, 1990; Choi *et al.*, 2006) oder mittels di- und triparentaler Konjugation (Fischer-Fantuzzi und Di Girolamo, 1961; Condon *et al.*, 1991; Connell *et al.*, 1995). Die Vorbereitung der Zellen und die Durchführung der Elektroporation erfolgt entweder nach der Methode von Mostafa *et al.* (2002) oder von Choi *et al.* (2006). Beide Protokolle wurden leicht abgewandelt. Die Zellanzucht erfolgte immer in EP-Medium (2.5.2) bei 30°C. Bei ersterwähnter Methode wurden die Zellen anstatt mit 10%iger Glycerinlösung zweimal mit 1 mM HEPES-Puffer (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure-Puffer) gewaschen. Für die Elektroporation wurden 50 ng - 1 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Die Methode von Chio *et al.* (2006) unterscheidet zwischen der DNA-Konzentration von „non-replicative“ und „replicative“ Plasmiden, mit denen die Zellen transformiert werden. Zu einem Ansatz von 100 µl Zellen wurden 300-500 ng „non-replicative“ Plasmid-DNA und 10-50 ng „replicative“ Plasmid-DNA gegeben. Vor der Elektroporation wurden die *G. oxydans*-Zellen mit 300 mM

Sucrose gewaschen. Für die Elektroporation wurde der „Gene Pulser Xcell“ (BioRad, München) verwendet. Die Einstellung betrug 2,5 kV/25  $\mu$ F/200  $\Omega$  bei Verwendung einer Elektroporationsküvette mit 2 mm Elektrodenabstand. Nach dem Puls wurden die Zellen zur Regeneration in 1 ml EP-Medium aufgenommen und für 3 Stunden schüttelnd bei 30°C inkubiert. Danach erfolgte die Ausplattierung der Zellen auf Selektivmedium. Die Koloniebildung dauerte 2 bis 3 Tage.

Für die Transformation von *G. oxydans* wurde zudem die di- und triparentale Konjugation angewandt. Hierbei wurde der Helferstamm *E. coli* HB101 genutzt, der die Gene für die Mobilisierung auf dem Plasmid pRK2013 trägt (Figurski und Helinski, 1979; Lam *et al.*, 1985). Die drei Stämme, der *G. oxydans*-Akzeptorstamm, der *E. coli*-Donorstamm und der *E. coli*-Helferstamm, wurden für die triparentale Konjugation in 3 ml LB- oder EP-Medium bis zur mittleren exponentiellen Phase angezogen. Für das eigentliche „Mating“ wurden 50  $\mu$ l jedes Stammes vermischt und auf eine trockene EP-Agarplatte aufgetropft, trocknen gelassen und anschließend ca. 30 h bei 30°C inkubiert. Die gewachsenen Zellen wurden mit 1 ml EP-Medium abgeschwemmt und in den Verdünnungen 1:10 und 1:100 auf EP-Selektivagarplatten mit 50  $\mu$ g Cefoxitin ausplattiert. Das Cefoxitin verhinderte das Wachstum von *E. coli*-Zellen. Durch das Selektivantibiotikum konnten nur *G. oxydans*-Mutanten wachsen, die das Plasmid des *E. coli*-Donorstammes aufgenommen hatten.

### **2.11.2 Isolierung chromosomaler DNA**

Die genomische DNA aus *G. oxydans* wurde mit dem DNeasy Tissue Kit „DNA purification from bacteria“ von Qiagen (Hilden) oder mit dem Wizard SV Genomic DNA Purification System „Isolation of Genomic DNA from Gram Positive and Gram Negative Bacteria“ der Firma Promega AG (Dübendorf, Schweiz) nach Angaben des Herstellers isoliert. Bei einer Temperatur von 4°C wurde die genomische DNA gelagert.

### **2.11.3 Isolierung von Plasmid-DNA**

Zur Klonierung, Sequenzierung und Transformation wurde Plasmid-DNA durch alkalische Lyse der Bakterienzellen und anschließender Silikatadsorption (Birnboim und Doly, 1979) mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) aus *E. coli* und *G. oxydans* isoliert. Die Plasmid-DNA wurde mit Nidrigsalzpuffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) von der Säule eluiert und bei -20°C gelagert.

#### 2.11.4 Isolierung von RNA

Die RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) aus *G. oxydans*-Zellen isoliert. Hierfür wurden 25 ml einer exponentiell wachsenden *G. oxydans*-Kultur (mit 25 g Eis vorgekühlt auf  $-20^{\circ}\text{C}$ ) abzentrifugiert (5 min,  $2000 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ ), das Zellpellet in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die eingefrorenen Zellen wurden in  $700 \mu\text{l}$  RLT-Puffer (Qiagen, Hilden) aufgenommen und mit einem Ultraschallprozessor „UP200s“ (Hielscher GmbH, Stuttgart) 5 min aufgeschlossen. Der Aufschluss erfolgte in einem 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß im Eisbad (Zyklus: 0,5 Zyklen, Amplitude: 70). Nach erneuter Zentrifugation zum Abtrennen der Zellreste wurde die RNA gemäß Herstellerangaben aus dem Überstand isoliert. Zur Entfernung von DNA wurden die Proben mit DNase I (Qiagen, Hilden) gemäß Angabe des Herstellers behandelt. Die Menge an isolierter RNA wurde mit dem NanoDrop ND-1000 UV-Vis Spektralphotometers (Peqlab, Erlangen) bestimmt.

#### 2.11.5 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

Die Konzentration von Nucleinsäure-Lösungen wurde mit Hilfe des NanoDrop ND-1000 UV-Vis Spectralphotometers (Peqlab, Erlangen) über die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Reinheit der DNA-Präparation wurde anhand des Verhältnisses  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  überprüft, wobei proteinfreie Nucleinsäure-Lösungen einen Quotienten zwischen 1,8 und 2,0 aufweisen (Gallagher und Desjardins, 2007). Die Quantifizierung geringer Mengen an DNA erfolgte über ein Agarosegel. Dabei wurde die Konzentration der unbekannt Banden durch Vergleich der Bandenintensität einer DNA-Größenmarker-Bande bekannter Konzentration abgeschätzt.

#### 2.11.6 Methoden zur DNA-Präparation

Alle Methoden zur Restriktion, Präzipitation und Ligation von DNA-Fragmenten wurden nach Sambrook und Russell (2000) durchgeführt (Sambrook und Russell, 2000).

##### Restriktion von DNA

Für den analytischen Restriktionsverdau wurden steriles Wasser, die zu verdauende DNA, ein geeigneter Puffer und das bzw. die Restriktionsenzym(e) zusammengegeben und - soweit vom Hersteller nicht anders angegeben - bei  $37^{\circ}\text{C}$  über Nacht inkubiert. Das Volumen des Ansatzes betrug  $20 \mu\text{l}$ , die Menge an eingesetzter DNA  $0,5\text{-}1 \mu\text{g}$ . Für einen vollständigen Verdau wurden 5-10 Units des entsprechenden Restriktionsenzym(s) eingesetzt. Für präparative Ansätze wurde ein Volumen von  $100 \mu\text{l}$

gewählt, wobei 1-5 µg DNA und 10-50 Units Enzym zum Restriktionsansatz gegeben wurden.

### **Agarosegel-Elektrophorese**

Die Auftrennung und Identifikation von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Agarosegel-Elektrophorese (Sambrook und Russell, 2000). Als Laufpuffer wurde Tris-Acetat-EDTA-Puffer verwendet (TAE-Puffer: 40 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,35% (v/v) Essigsäure, pH 8,0). Die Gele enthielten je nach DNA-Fragmentgröße 0,8 bis 2% Agarose. Das gegossene und erstarrte Gel wurde horizontal in die Gelelektrophoresekammer „Sub-cell GT“ (Biorad Laboratories, München) platziert und mit Laufpuffer bedeckt. Die DNA-Proben wurden mit 6-fach konzentriertem Ladepuffer (0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol FF, 30% Glycerin und 69,5% steriles H<sub>2</sub>O) versetzt und separat in die Geltaschen pipettiert. Als Größenmarker diente entweder der „Lambda DNA/Eco130I (Styl)“ (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot), der „DNA Molecular Weight Marker IX“ von Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) oder die „1kb DNA Ladder“ von New England Biolabs (Frankfurt). Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei einer Spannung von 75–100 Volt. Im Anschluss daran wurde das Gel für 5-30 min mit dem in die DNA interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid gefärbt (0,5 µg/ml), mit Wasser gewaschen und unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 312 nm betrachtet und fotografiert (Image Master, VDS-System, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg).

### **Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Zur Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde die gewünschte DNA-Bande unter UV-Licht mit Hilfe eines Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die DNA wurde mittels des „MinElute Gelextraction Kit“ (Qiagen, Hilden) aus dem Agarosegelstück isoliert und aufgereinigt.

### **Aufreinigung von DNA aus PCR-Ansätzen**

Zur Abtrennung von Proteinen, Primern, Nucleotiden und Salz wurden PCR-Produkte mittels des „Qiaquick PCR Purification Kit“ (Qiagen, Hilden) gereinigt und in 10 mM Tris-HCl, pH 8,5 oder Wasser eluiert.

### **Ligation von DNA**

Ligationen wurden mit Hilfe des „Rapid DNA Ligation Kit“ (Roche Diagnostic, Mannheim) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Inkubation des Ligationansatzes erfolgte 20 min bei 21 °C.

### **Dephosphorylierung von Vektor-DNA**

Um nach der Restriktion die Selbstligation des Vektors zu vermeiden und die Integration der Fragment-DNA während der anschließenden Ligation zu fördern, wurden

die Phosphatreste am 5'-Ende der Vektor-DNA mittels alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) entfernt (Sambrook und Russell, 2000). Die Dephosphorylierung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

### **Modifikation der DNA**

Die Erzeugung glatter DNA-Enden erfolgte mit Hilfe der Pfu-DNA-Polymerase. Dieses Enzym besitzt eine 3'-5'-Exonuclease-Aktivität, die eine Korrekturaktivität ermöglicht, wodurch keine Basenüberhänge, sondern glatte DNA-Enden entstehen (Sambrook und Russell, 2000). Verwendet wurde das „PCR Polishing Kit“ der Firma Stratagene (Basel, Schweiz) nach Herstellerangaben. Zudem wurde die große Untereinheit der DNA-Polymerase I von *E. coli*, das Klenow-Fragment (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Freiburg) genutzt, um überhängende 5'-Enden zu glatten Enden aufzufüllen und gleichzeitig überhängende 3'-Enden abzubauen (Sambrook und Russell, 2000).

### **2.11.7 Polymerasekettenreaktion**

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde zur *in vitro*-Amplifikation von doppelsträngigen DNA-Fragmenten, wie Plasmid- oder genomische DNA, verwendet (Mullis und Faloona, 1987; Rabinow, 1996). Zudem diente sie der analytischen Überprüfung von Deletionsmutanten. Die Primer, bestehend aus zwei synthetischen Oligonucleotiden (Tab. 4), sind komplementär zur Matrizen-DNA. Sie wurden so konstruiert, dass sie den zu amplifizierenden DNA-Bereich flankieren. Als Kontrolle und zum Nachweis der Deletionsmutanten wurden Zelllysate als DNA-Matrizen eingesetzt. Vor dem Start der PCR wurden die Bakterienzellen in 100 µl sterilem H<sub>2</sub>O bei 96°C für 10 min aufgeschlossen. Für die Durchführung der PCR wurde der „Mastercycler personal“ (Eppendorf, Hamburg) genutzt. Die Denaturierung der DNA erfolgte bei 94°C, dabei trennen sich die DNA-Doppelstränge. Die Annealing-Temperatur der Primer ist abhängig von der Basenzusammensetzung der Primer und liegt 4°C unterhalb der niedrigsten Schmelztemperatur der beiden verwendeten Oligonucleotide. Mit Hilfe der folgenden Formel wurde die Temperatur zur Primeranlagerung abgeschätzt:  $T_M$  (Schmelztemperatur) = 4x (Guanin+Cytosin) + 2x (Adenin+Thymin) (Ashen *et al.*, 2001). Zusätzlich wurde die Annealing-Temperatur mittels Thermo Scientific (Ulm) berechnet. Für die Polymerisation der DNA (Elongation) wurde die Temperatur auf 72°C erhöht. Die Elongationszeit hing von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments ab, wobei standardmässig 1 min je kb angenommen wurde. Die Zyklenanzahl betrug 30-50. Für Routineamplifikationen und Kontrollansätze wurde das „Taq-PCR Core Kit“ (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Für Klonierungen, bei der die vervielfältigte Gensequenz fehlerfrei sein sollte, und zur Überprüfung der Deletionsmutanten wurde das „Expand

High Fidelity PCR System“ (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) gemäß Herstellerangabe verwendet. Bei letzterem handelt es sich um ein Gemisch von *Taq*- und *Pwo*-Polymerase, welches sich aufgrund der Proofreading-Aktivität der *Pwo*-Polymerase durch eine geringere Fehlerrate auszeichnet. Für nachfolgende Arbeitsschritte wurde das PCR-Produkt mittels Agarosegelelektrophorese überprüft und mittels des „Qiaquick PCR Purification Kit“ (Qiagen, Hilden) aufgereinigt.

### **2.11.8 Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion**

Die Transkription eines Gens in *G. oxydans* wurde mittels Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) nachgewiesen (Kubista, 2008). Hierfür wurde aus isolierter mRNA cDNA synthetisiert und anschließend als Template in eine PCR-Reaktion eingesetzt. Die cDNA Synthese erfolgte durch den Gebrauch des „Omniscript RT Kits“ (Qiagen, Hilden) und wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Negativ-Kontrolle diente eine „No Template Control (NTC)“, bei der H<sub>2</sub>O anstelle der mRNA-Probe eingesetzt wurde, und eine „No Amplification Control (NAC)“, bei der kein Enzym, also keine RTase in den Ansatz gegeben wurde. Als Positiv-Kontrolle wurde die mRNA eines konstitutiv exprimierten Gens verwendet. In einer 1:10 Verdünnung wurde die cDNA direkt als Template in die PCR eingesetzt.

### **2.11.9 Ortsspezifische Mutagenese**

Der gezielte Austausch von Nucleotiden zur Einführung von Mutationen in die doppelsträngige, zirkuläre DNA wurde mittels des „QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene, Heidelberg) und nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierfür wurde ein Primer mit der gewünschten Mutation sowie der dazu komplementäre Primer konstruiert. Mit einer Proofreading-Polymerase (PfuTurbo DNA polymerase), die eine hohe Korrekturaktivität besitzt, sowie den beiden Primern und der Template-Plasmid-DNA wurde eine PCR gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Anschließend wurde das PCR-Produkt mit dem Restriktionsenzym *DpnI* verdaut, das die Eigenschaft besitzt, spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA abzubauen. Die bakterieneigene *dam*-methylierte Plasmid-DNA wurde verdaut, die unmethylierte mutagenisierte DNA blieb erhalten (Hemsley *et al.*, 1989). Nach der Transformation von *E. coli* mit dem DNA-Template-Gemisch wurden die DNA-Stücke mittels des zelleigenen Reparatursystems zu einem doppelsträngigen Plasmid ligiert.

### 2.11.10 Disruption des Gens für die membrangebundene Glucose-Dehydrogenase

Die markerfreie Disruption des Gens für die membrangebundene Glucose-Dehydrogenase (*mgdh*) in *G. oxydans* N44-1 erfolgte mit dem Plasmid pK19*mobsacB* nach der Methode von Schäfer *et al.* (1994) und dem Protokoll von P. Simic (DSM Nutritional Products, Kaiseraugst, Schweiz). Mit Hilfe der Primerpaare coPCR-gdh-5F/coPCR-gdh-5R und coPCR-gdh-3F/coPCR-gdh-3R (Tab. 1.1) wurden anteilig das *mgdh*-Gen und die Region stromabwärts und stromaufwärts des Gens amplifiziert. Die beiden PCR-Produkte wurden durch einen 21-bp Überhang mittels cross-over-PCR (Link *et al.*, 1997) zu einem Fragment vereinigt (Anhang, Abb. 27a,b). Das DNA-Fragment mit der gewünschten Disruption des *mgdh*-Gens und dessen homologen Nachbarbereichen wurde in den Kanamycin-Resistenz vermittelnden Vektor pK19*mobsacB* (Schäfer *et al.*, 1994) (Anhang, Abb. 31) ligiert und anschließend in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert. Das *sacB*-Gen des Vektors kodiert für die Levan-Sucrase, die Sucrose zu dem für die Zellen toxischen Levan umsetzt (Schwarzer und Pühler, 1991; Bramucci und Nagarajan, 1996). Die Transformanten, die den Vektor aufgenommen hatten, konnten auf Agarplatten mit Sucrose nicht überleben, sie wuchsen auf LB-Agarplatten mit 25  $\mu$ g Kanamycin ohne 10% Sucrose. Durch Sequenzierung wurde das Vektor-Konstrukt verifiziert und danach mittels Elektroporation oder Konjugation in den Stamm *G. oxydans* N44-1 eingebracht. Die Transformanten wurden durch Kanamycin (50  $\mu$ g/ml) und/oder 10% Sucrose-Agarplatten auf die chromosomale Integration des Vektors überprüft (erstes Rekombinationsereignis). Sucrose-sensitive Klone wurden über Nacht in EPM inkubiert, anschließend erneut auf Selektivplatten ausgestrichen und sollten den Vektor durch ein zweites Rekombinationsereignis wieder aus dem Chromosom entfernt haben. Dadurch entstand entweder der Wildtyp (50%) oder die Disruptionsmutante (50%). Klone, die den Phänotyp „Kanamycin-sensitiv und Sucrose-resistent“ zeigten, wurden mittels Kolonie-PCR auf die Disruption des *mgdh*-Gens überprüft (Primerpaar: gdh-control-5/gdh-control-3; Tab. 1.1).

### 2.11.11 Disruption des Gens für die cytosolische Glucose-Dehydrogenase

Zur Disruption des Gens für die cytosolische Glucose-Dehydrogenase (*sgdh*) in *G. oxydans* mittels Resistenzkassette wurde das *sgdh*-Gen mit den Primern *sgdh\_GoxKpnIF* und *sgdh\_GoxSacIR* amplifiziert, in den Vektor pUC18 ligiert und das DNA-Konstrukt in den *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  eingebracht. Nach Sequenzierung des pUC18-*sgdh*-Vektors (Primer: *sgdh-rev1* und pUC18-*rev*; Tab. 1.1) wurde der mittlere Genbereich mittels Restriktion entfernt und eine Kanamycinresistenzkassette aus dem Vektor pDrive eingefügt. Das Plasmid wurde in DH5 $\alpha$  transformiert und

durch Sequenzierung verifiziert. Das Konstrukt *sgdh::kan* wurde aus dem nicht mobilisierbaren Vektor pUC18 ausgeschnitten und in den Disruptionsvektor pSUP202 ligiert. Anschließend erfolgte die Transformation elektrokompetenter *G. oxydans*-Zellen mit dem Vektor pSUP202 *sgdh::kan* (Anhang, Abb. 28, 32) Klone, die auf Kanamycin-Selektivplatten wuchsen, wurden mittels Kolonie-PCR (Primerpaar: *sgdh\_GoxKpnIF/sgdh\_GoxSacIR*; Tab. 1.1) auf den Austausch der chromosomalen *sgdh*-Gensequenz gegen die *sgdh::kan*-Antibiotikaresistenzkassette überprüft. Damit ausgeschlossen werden konnte, dass zufällig ein dem *sgdh::kan*-Gen ähnliches Fragment amplifiziert worden war, wurde aus den positiven Klonen die genomische DNA isoliert und mittels PCR verifiziert (Primerpaar: *sgdh\_GoxKpnIF/sgdh\_GoxSacIR*; Tab.1.1).

### 2.11.12 DNA-Sequenzierung

Zur Überprüfung der neu konstruierten Plasmiden wurden diese nach der Kettenabbruch-Methode (Sanger *et al.*, 1977; Ansorge *et al.*, 1987) sequenziert. Die Sequenzierung wurde entweder durch das EMBL-European Bioinformatics Institute (Hinxton, Cambridge, England) oder selbst durchgeführt. Die Sequenzierungsreaktion wurde mittels des „BigDye Terminator Kit V3.1“ (Applied Biosystems, Darmstadt) nach Angaben des Herstellers im PCR-Thermocycler „Mastercycler personal“ (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Die eingesetzte Template-DNA betrug dabei 200 ng pro 3µl. Anschließend wurden die Sequenzierungsansätze mittels des „DyeEx-Kit“ (Qiagen, Hilden) aufgereinigt, um überschüssige Nukleotide zu entfernen. Die DNA-Sequenz der aufgereinigten Ansätze wurde mittels Kapillarsequenzier „ABI Prism 3100 Avant Genetic Analyzer“ (Applied Biosystems, Darmstadt) und der Auswertesoftware „Sequencing Analysis Software, Version 5.1.1“ (Applied Biosystems, Darmstadt) bestimmt.

## 2.12 Proteinchemische Methoden

### 2.12.1 Herstellung von Proteinrohextrakten

Zur Messung der Enzymaktivität wurde *G. oxydans* im Schüttelkolben kultiviert (2.6), 25 ml der Zellen in der exponentiellen Phase durch Zentrifugation (7 min, 2000 x g, 25°C) geerntet und einmal mit 50 mM Kalium-Phosphat-Puffer (pH 7,0) gewaschen. Das Zellpellet wurde in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur Verwendung bei -70°C gelagert. Die Zellen wurden in 1,5 ml 50 mM Kalium-Phosphat-Puffer mit „Complete Protease Inhibitor Tablets“ (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) resuspendiert und mit dem Ultraschallprozessor „UP200s“ (Hielscher, GmbH) abgeschlossen. Der Aufschluss erfolgte in einem 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß im

Eisbad durch 5 min Beschallung bei einer Amplitude von 70% und 50 Zyklen. Nach der Ultraschallbehandlung wurden Zelltrümmer und intakte Zellreste 20 min bei 16000 x g und 4°C abzentrifugiert. Der zellfreie Überstand wurde als Enzymrohextrakt für nachfolgende Aktivitätstests eingesetzt.

### 2.12.2 Proteingehaltsbestimmung

Die Konzentration einer Proteinlösung wurde nach der Bradford-Methode (Bradford, 1976) bestimmt. Der Test beruht auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie brilliant blue G-250 an Proteine, wodurch sich das Absorptionsmaximum von 465 nm zu 595 nm verändert. Für die Farblösung (Bradford-Reagenz) wurden 10 mg „Coomassie brilliant blue G-250“ (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) in 5 ml Ethanol gelöst und mit 10 ml Ortho-Phosphorsäure (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) und 85 ml sterilem H<sub>2</sub>O in einer lichtundurchlässigen Glasflasche vermischt. Die Lösung wurde 20 min gerührt und danach abfiltriert, um nicht gelöste Farbstoffpartikel abzutrennen. Zur Ermittlung der Proteinkonzentration wurde 1 ml des Bradford-Reagenz mit 0,1 ml Probe versetzt. Nach 5 min wurde die Extinktion der Protein-Farbstoff Komplexe photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Zur Quantifizierung wurde eine Eichgerade mit 0-100 µg Rinderserumalbumin erstellt.

### 2.12.3 Messung von Enzymaktivitäten

Die Enzymaktivitäten wurden photometrisch bei einer Temperatur von 30°C durch die Aufnahme von Enzymkinetiken mittels des „Ultrospec 3000 pro“ Photometers der Firma Amersham Bioscience (Freiburg) bestimmt. Anhand der aufgezeichneten Kinetik wurde die spezifische Enzymaktivität A [U/mg Protein] mit folgender Formel berechnet:

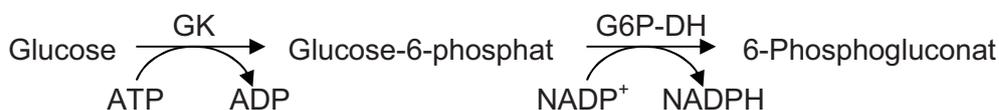
$$A \text{ [U/mg Protein]} = [(\Delta E / t \times V) / (v \times d \times \epsilon)] / (\text{mg Protein/ml})$$

( $\Delta E$ , Extinktionsänderung; t, Zeit [min]; V, Gesamtvolumen [µl]; v, Probenvolumen [µl]; d, Schichtdicke der Küvette [cm];  $\epsilon$ , molarer dekadischer Extinktionskoeffizient von NAD(P)H = 6,22 [1 / mM x cm]). Die Proteingehaltsbestimmung erfolgte nach der Bradford-Methode (2.13.3). Eine Unit (U) Enzymaktivität wurde definiert als diejenige Menge Enzym, die 1 µmol NAD(P)H in einer Minute bei 30°C zu NAD<sup>+</sup>(P<sup>+</sup>) umsetzt.

### Glucose-Kinase-Aktivität

(modifiziert nach der Methode von Mukai *et al.*, 2003)

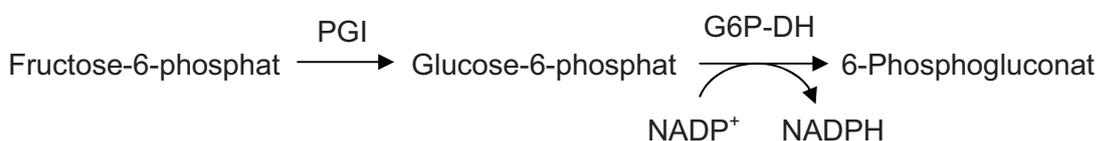
Die Glucose-Kinase (GK) katalysiert die Phosphorylierung von Glucose zu Glucose-6-phosphat unter Umsetzung von ATP zu ADP. Das gebildete Glucose-6-phosphat wurde über das Hilfsenzym Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) durch die Absorption von NADPH bei  $\lambda = 340 \text{ nm}$  photometrisch bestimmt. Der Reaktionsansatz (1 ml) enthielt 200 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,2; 14 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 50 mM ATP; 5 mM  $\text{NADP}^+$ ; 500 mM Glucose und 2 U Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase. Durch die Zugabe des Enzymrohextraktes wurde die Reaktion gestartet. Die Messung erfolgte über einen Zeitraum von 2 min.



### Glucose-6-phosphat-Isomerase-Aktivität

(modifiziert nach der Methode von Sugiyama *et al.*, 2003)

Die Glucose-6-phosphat-Isomerase (PGI) katalysiert die reversible Umsetzung von Fructose-6-phosphat zu Glucose-6-phosphat. Die Menge des entstandenen Glucose-6-phosphats wurde mittels der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) durch die Bildung von NADPH photometrisch bestimmt. Der Reaktionsansatz (1 ml) enthielt: 500 mM Kalium-Phosphat-Puffer, pH 7,0; 10 mM  $\text{NADP}^+$ ; 200 U Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und Enzymrohextrakt. Durch die Zugabe von 100 mM Fructose-6-phosphat wurde die Reaktion gestartet. Die Messung erfolgte über einen Zeitraum von 2 min.

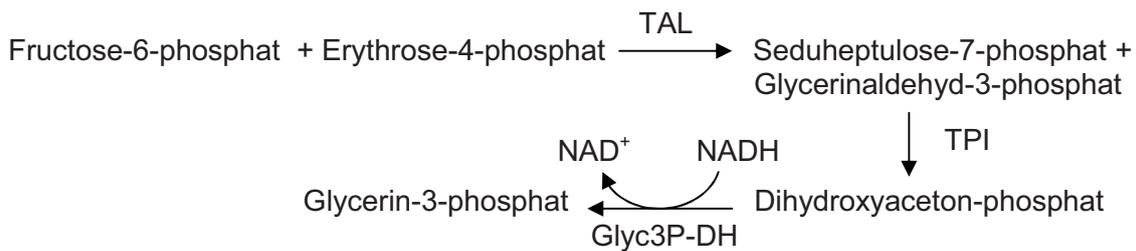


### Transaldolase-Aktivität

(modifiziert nach der Methode von Sugiyama *et al.*, 2003)

Die Transaldolase (TAL) katalysiert die Umsetzung von Fructose-6-phosphat und Erythrose-4-phosphat zu Seduheptulose-7-phosphat und Glycerinaldehyd-3-phosphat. Der Nachweis der Transaldolaseaktivität erfolgte mittels der Hilfsreaktionen

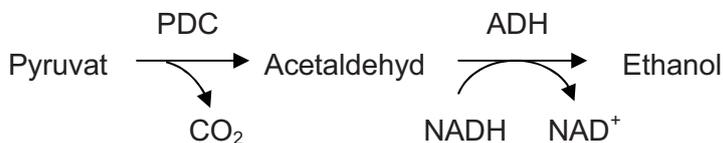
durch die Triosephosphat-Isomerase (TPI) und Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase (Glyc3P-DH) über die Abnahme der NADH-Konzentration. Der Testansatz (1 ml) enthielt 500 mM Kalium-Phosphat-Puffer, pH 7; 5 mM NADH; 100 mM Erythrose-4-phosphat 100 U Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase, 100 U Triosephosphat-Isomerase und Enzymrohextrakte. Der Reaktionsstart erfolgte durch Zugabe von 100 mM Fructose-6-phosphat. Bei 30°C und 340 nm wurde die Extinktion 2 min lang gemessen.



### Pyruvat-Decarboxylase-Aktivität

(modifiziert nach der Methode von Bringer-Meyer *et al.*, 1986)

Die Pyruvat-Decarboxylase (PDC) katalysiert die Reaktion von Pyruvat zu Acetaldehyd und CO<sub>2</sub>. Der gebildete Acetaldehyd wurde über eine Hilfsreaktion mit dem Enzym Alkohol-Dehydrogenase (ADH) durch die Abnahme der Absorption von NADH über die Zeit photometrisch bestimmt. Der Reaktionsansatz (1 ml) enthielt 120 mM Na-Citrat; 24 mM MgCl<sub>2</sub>; 300 mM Thiaminpyrophosphat, pH 6,0; 2 mM NADH; 45 U Alkohol-Dehydrogenase und Enzymrohextrakt. Die Reaktion wurde mit der Zugabe von 10 mM Pyruvat gestartet. Die Messung erfolgte bei 30°C und  $\lambda = 340$  nm über einen Zeitraum von 3 min.

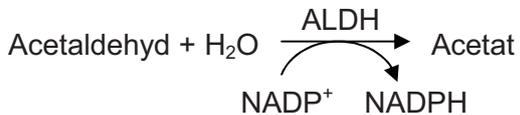


### Acetaldehyd-Dehydrogenase-Aktivität

(modifiziert nach der Methode von Izu *et al.*, 1996)

Die Acetaldehyd-Dehydrogenase (ALDH) katalysiert die Reaktion von Acetaldehyd zu Acetat. Die Bestimmung der ALDH-Aktivität erfolgte photometrisch durch die Zunahme der Absorption von NADPH bei  $\lambda = 340$  nm, bei einer Temperatur von 30°C über einen Zeitraum von 2 min. Der Testansatz (1 ml) enthielt 50 mM Tris-HCl-Puffer,

pH 8,3; 10 mM Dithiothreitol (DDT); 2 mM NADP<sup>+</sup> und Enzymrohextrakt. Durch die Zugabe von 22 mM Acetaldehyd wurde die Reaktion gestartet.



#### 2.12.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) diente als Nachweis für die Translation überexprimierter Gene. Die Trennung der Proteine erfolgte nach ihrem Molekulargewicht unter denaturierenden Bedingungen gemäß der Methode nach Laemmli (1970). Das SDS-Gel besteht aus einem Sammelgel (4% (w/v) Acrylamid; pH 6,8) und einem Trenngel (11,5% (w/v) Acrylamid; pH 8,8). Die Elektrophorese wurde in SDS-Laufpuffer (10fach: 0,25 M Tris; 1,92 M Glyzin; 1% (w/v) SDS) über 1,5 h bei einer Stromstärke von 50-60 mA unter Verwendung der Gelelektrophoresekammer „Mini Protean III“ (Biorad Laboratories, München) durchgeführt. Als Molekulargewichtsstandard dienten 5 µl des bereits vorgefärbten „Prestained Protein Marker“ (New England Biolabs, Frankfurt). Die Proteinrohextrakt-Proben (max. 20 µg Gesamtprotein) wurden vor der elektrophoretischen Auftrennung mit Laemmli-Probenpuffer (2fach: 50 mM Tris-HCl-Puffer; pH 6,8; 10% (v/v) Glycerin; 2% (w/v) β-Mercaptoethanol; 4% (w/v) SDS; 0,03% (w/v) Bromphenolblau) versetzt, 5 min bei 65°C denaturiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde das SDS-Gel 30 min in Wasser gewaschen, mind. 1 h in „PageBlue™ Protein Staining Solution“ (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) gefärbt, anschließend erneut 1 h zur Entfernung überschüssigen Farbstoffs gewaschen, im Geltrocknungsrahmen (Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers getrocknet und danach bei Raumtemperatur gelagert.

#### 2.12.5 Quantitative Analyse von Metaboliten im Medium

Zur Bestimmung der Konzentration von Metaboliten im Medium wurden einer Bakterienkultur während und am Ende der Kultivierung Proben entnommen. Die Quantifizierung der Metaboliten erfolgte mittels eines UV-Testsystems (R-BIOPHARM AG, Darmstadt). Für den Einsatz in das UV-Testsystem wurden die Kulturproben zur Abtrennung der darin enthaltenen Zellen zentrifugiert (5 min, 16000 x g, 21°C). Der Kulturüberstand wurde zum Abstoppen enzymatischer Reaktionen 15 min in einem

Wasserbad erhitzt. Anschließend wurde der Überstand, wenn erforderlich, verdünnt und zur Analyse in das Testsystem eingesetzt.

### **Acetat**

Acetat wurde enzymatisch mit einem UV-Test (Best. Nr. 10 148 261 035, R-BIOPHARM AG, Darmstadt) nach den Angaben des Herstellers ermittelt. Die Bestimmung beruht auf einem optischen Test. Die Messung erfolgt bei 20 bis 25°C im Photometer „Ultrospec 3000 pro“ der Firma Amersham Bioscience (Freiburg).

### **Succinat, Acetaldehyd, D- und L-Lactat**

Die Bestimmungen von Succinat (Best. Nr. 10 176 281 035), Acetaldehyd (Best. Nr. 10 668 613 035) und D-/L-Lactat (Best. Nr. 11 112 821 035) erfolgten enzymatisch mit den UV-Testsystemen der Firma R-BIOPHARM AG (Darmstadt). Die Messungen wurden gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

### **6-Phosphogluconat**

6-Phosphogluconat wurde enzymatisch mittels UV-Test bestimmt. Hierbei wurde der D-Gluconsäuretest (Best. Nr. 10 428 191 035, R-BIOPHARM AG, Darmstadt) modifiziert. Gluconat-6-phosphat wurde durch 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (6-PGDH) zu Ribulose-5-phosphat oxidiert. Das bei dieser Reaktion entstandene NADPH wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 340$  nm bestimmt und war äquivalent zu der 6-Phosphogluconat-Menge. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Enzyms 6-PGDH gestartet.

### **Pyruvat**

Die Pyruvatkonzentration wurde enzymatisch mit einem UV-Test ermittelt. Das Pyruvat wurde unter Oxidation von NADH in Anwesenheit des Enzyms L-Lactat-Dehydrogenase (L-LDH) zu L-Lactat reduziert. Über die Abnahme der Extinktion von NADH bei  $\lambda = 340$  nm wurde die Konzentration von Pyruvat bestimmt. Der Reaktionsstart erfolgte durch Zugabe von L-LDH (230 U).

## **2.12.6 Quantitative Bestimmung von Acetat mittels GC**

Die Quantifizierung von Acetat im Medium wurde mit einem Agilent HP-6890A-Gaschromatographen mit einer Carbowax Permabond 20M-Säule (50 m x 0,32 mm i.D., Macherey-Nagel, Düren) durchgeführt. Die Detektion von Acetat erfolgte mit einem Flammen-Ionisations-Detektor (FDI) (Schroer *et al.*, 2007). Zur Auftrennung von Acetat wurde ein Temperaturgradient von 50°C bis 160°C mit einer Heizrate von 40°C pro Minute und isothermen Plateaus bei anfänglich 50°C für 5 min und abschließend 160°C für 9 min gefahren. Als interner Standard wurde n-Butanol

verwendet. Vor dem Einsatz in den Gaschromatographen wurden die Kulturproben zu Abtrennung der Zellen zentrifugiert (5 min, 16000 x g, 21°C) und der Überstand wurde im Verhältnis 1:1 mit einer 50 mM n-Butanol-Lösung versetzt. Zur Acetat-Quantifizierung wurde eine Eichgerade mit n-Butanol/Kalium-Acetat erstellt.

### **2.12.7 Bestimmung von Glucose, Sorbit und Zuckersäuren mittels HPLC**

Die Konzentrationen von Glucose/Gluconat, 5-KGA, 2-KGA/2,5-DKGA und Glykolsäure wurde mittels hochauflösender Flüssigkeitschromatographie (HPLC) mit einer Umkehrphasenchromatographie-Säule (Shodex DE-613, 150 x 6,0 mm, Phenomenex, Aschaffenburg) bestimmt. Die Durchflussrate betrug 0,5 ml/min. Die Auftrennung der Substanzen erfolgte in 2 mM HClO<sub>4</sub>-Lösung (Laufmittel) bei 30°C über einen Zeitraum von 25 min. Die Quantifizierung der Substanzen erfolgte mittels UV-Detektor (L-7400, Merck Hitachi, Darmstadt) bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 210$  nm und Brechungsindex-(RI)-Detektor (L-7490, Merck Hitachi, Darmstadt) (Merfort, 2006)

Die Konzentrationsbestimmung von Sorbit, Sorbose, Sorboson und 2-KGLA erfolgte mit der Kationenaustauschchromatographie-Säule Aminex HPX-87 H, 300 x 7,8 mm (Biorad Laboratories, München). Bei einer Temperatur von 60°C wurden die Substanzen in 6 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Laufmittel) über 25 min aufgetrennt. Die Durchflussrate betrug 0,6 ml/min. Die Konzentration der Metabolite wurden bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 190$  nm im UV-Detektor (L-7200, Merck Hitachi, Darmstadt) und mittels RI-Detektor (L-7490, Merck Hitachi, Darmstadt) bestimmt (Bremus, 2006).

Vor der chromatographischen Auftrennung wurden die Kulturproben zur Abtrennung der Bakterienzellen zentrifugiert (5 min, 16000 x g, 21°C) und durch eine 0,1  $\mu$ m-Nitrozellulosemembran (Schleicher und Schuell, Dassel) sterilfiltriert. Die Probe wurde anschließend 1:10 im jeweiligen Laufmittel verdünnt und zur Analyse eingesetzt (10  $\mu$ l Injektionsvolumen). Die Auswertung der Metabolitdaten erfolgte anhand einer substanzspezifischen Kalibriergeraden für den UV- und RI-Detektor mit der Software „HSM D-7000, Multi HSM Manager, Version 4.1“ (Merck Hitachi, Darmstadt).

### **2.12.8 Bestimmung von intra- und extrazellulären Metaboliten mittels GC-MS**

Zur Ermittlung der Metabolitkonzentration wurde eine Kulturprobe einer Bakterienkultur entnommen, die darin enthaltenen Zellen abzentrifugiert (5 min bei 2000 x g und 4°C), die Zellen in 0,9% NaCl-Lösung gewaschen und in 1 ml 65°C warmem Methanol 15 min bei 65°C im Ultraschallbad „Ultraso nic Cleaner“ (VWR International,

Darmstadt) aufgeschlossen. Nach Zentrifugation (5 min, 2000 x g, 4°C) zur Abtrennung von Zelltrümmern und unaufgeschlossenen Zellen wurden 130 µl des Überstandes in ein frisches Zentrifugegefäß überführt und mittels Vakuumzentrifugation (Eppendorf, Hamburg) getrocknet. Die getrocknete Probe wurde in 50 µl Methoxyhydroxylamin in Pyridin (20 mg/ml) resuspendiert und bei 35°C für 90 min inkubiert. Die Derivatisierung der Probe erfolgte durch Zugabe von 80 µl N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid (MSTFA) und anschließender Inkubation für 30 min bei 35°C (Strelkov *et al.*, 2004). 1 µl der derivatisierten Probe wurden mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) im „GCT Primer“ der Firma Waters (Eschborn) analysiert (Halket *et al.*, 2005). Zur genaueren Identifikation des Metabolitgemisches wurden Reinsubstanzen, wie z.B. 1 mM 6-Phosphogluconat, ebenfalls mittels GC-MS untersucht.

### **Baseninduzierte Lactonspaltung**

Zur Spaltung der ringkettigen Form eines Moleküls wurden 100 mM der Lactone mit 4%-igem Natriumcarbonat in einem 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß im PCR-Thermocycler „Mastercycler personal“ (Eppendorf, Hamburg) bei 70°C für 20 min aufgeschlossen (Morgunov und Perchenko, 1978).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Charakterisierung der Stämme IFO 3293, N44-1 und N44-1 *mgdh::kan*

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Produktbildung von *G. oxydans*, ausgehend von dem Substrat Glucose, zugunsten eines erhöhten Biomasseertrages zu unterbinden. Verschiedene Gene des Glucosstoffwechsels von *G. oxydans* N44-1 sollten dafür überexprimiert oder deletiert werden. Als Ausgangsstamm diente der L-Sorbose bildende *G. oxydans*-Stamm IFO 3293, aus dem durch klassische Mutagenese der 2-KGLA-Produzent N44-1 entstanden ist (Sugisawa *et al.*, 1990; Hoshino *et al.*, 1990; Sugisawa *et al.*, 1991a,b). Der Industriestamm N44-1 wurde von der Firma DSM Nutritional Products zur Vitamin C-Produktion entwickelt. Ausgehend von 100 g D-Sorbit oder L-Sorbose produziert der *G. oxydans*-Stamm N44-1 60 g 2-KGLA, eine Vorstufe von Vitamin C (Sugisawa *et al.*, 1990).

Glucose sollte als preiswertes Substrat für das Wachstum von *G. oxydans* N44-1 dienen. Um zu überprüfen, wie der Stamm N44-1 auf Glucose wächst, führte die Firma DSM Nutritional Products Kultivierungsversuche auf dieser C-Quelle durch, die zeigten, dass der Stamm N44-1 schlecht auf dem Substrat Glucose wuchs. Um die extrazelluläre Umsetzung von Glucose zu Gluconat bis zu 2,5-DKGA zu unterbinden, disruptierte die Firma DSM in dem Stamm N44-1 die membrangebundene Glucose-Dehydrogenase (mGDH). Der Stamm N44-1 *mgdh::kan* bildete im Verlauf einer kontinuierlichen Fermentation jedoch wenig Biomasse und reicherte große Mengen des Endproduktes 2,5-DKGA an (pers. Mitteilung P. Simic, DSM Nutritional Products). Wahrscheinlich wurde das intrazellulär gebildete Gluconat und 2-KGA während der kontinuierlichen Kultivierung wieder aus der Zelle geschleust und an der Membran zu 2,5-DKGA umgesetzt.

Zur näheren Charakterisierung der Wachstumsparameter sollten die Stämme *G. oxydans* IFO 3293, N44-1 und N44-1 *mgdh::kan* im Schüttelkolben kultiviert werden. Einige Autoren beschrieben ein reduziertes Wachstum auf definiertem Medium (Stokes und Larsen, 1945; Rao und Stokes, 1953). Kultivierungsversuche mit *G. oxydans* auf dem definierten Hefemedium "Yeast Nitrogen Base-(YNB)-Medium" (Tab. 7) bestätigten diese Beobachtung. Zur Kultivierung von *G. oxydans* wurde daher Komplexmedium verwendet (Tab. 5). Um das Wachstum von *G. oxydans* auf Komplexmedium zu optimieren, wurden verschiedene Nährstoffe wie Ammoniumphosphat, Kaliumphosphat, Glutamin, Riboflavin, Pantothen säure, Biotin, Niacin und Folsäure dem Komplexmedium No.5 zugesetzt (Tab. 6), die jedoch keinen positiven Wachstumseffekt zeigten. Als Kontrolle diente das No.5-Medium ohne Zusätze. Nach weiteren Versuchen zur Mediums- und Kultivierungsoptimierung wurden die drei

*G. oxydans*-Stämme in dem No.5-Medium mit 50 g/l Glucose angezogen. Die ermittelten Wachstumskurven, -raten, Substratumsätze und Biomasseerträge sind Mittelwerte aus mehreren voneinander unabhängigen Kultivierungen. Zur zukünftigen Vergleichbarkeit wurde in die Stämme N44-1 und N44-1 *mgdh::kan* bereits das Leerplasmid pBBR1MCS4 kloniert.

Der *G. oxydans*-Stamm N44-1 wuchs nur bis zu einer optischen Dichte von 3,7 und erreichte die niedrigste Zellausbeute ( $Y_{X/S}$ ) mit 0,05 g BTM/g Glucose (Abb. 5, Tab. 9). Der Stamm IFO 3293 erreichte eine  $OD_{600nm}$  von 7,8 und die höchste Zellausbeute mit 0,09 g Biotrockenmasse pro g Glucose. Da der Stamm N44-1 durch klassische Mutagenese aus dem Stamm IFO 3293 entstanden ist, können genetische Veränderungen im Glucosestoffwechsel zu dem geringen Wachstum des Stammes N44-1 führen (Sugisawa *et al.*, 1991a,b). Die Stämme IFO 3293 und N44-1 setzten die anfänglichen ca. 250 mM Glucose innerhalb von 20 Stunden zu ungefähr 120 mM Gluconat um. Im weiteren Wachstumsverlauf wurde das gebildete Gluconat weiter zu ca. 120 mM 2-KGA und 2,5-DKGA umgesetzt (Abb. 6). Die drei *G. oxydans*-Stämme produzierten sehr geringe Mengen 5-KGA (~8 mM), die im weiteren Verlauf der Arbeit nicht mehr dargestellt, aber in die Produktsumme einbezogen wurden. Das Wachstum des Stammes N44-1 endete bereits nach ca. 30 Stunden. Zu diesem Zeitpunkt waren ca. 110 mM Gluconat und ca. 115 mM 2-KGA/2,5-DKGA entstanden, demnach wurden nur ~15 mM Glucose von den Stämmen IFO 3293 und N44-1 für das Wachstum genutzt (Abb. 6). Das Gluconat wurde nach Wachstumsstopp zu 2-KGA und dieses zu 2,5-DKGA weiteroxidiert, daher nahm die Gluconat-Konzentration weiter ab. Die aus dieser Oxidation gewonnene Energie diente dem Zellerhalt (Abb. 5). Die Abnahme der 2-KGA/2,5-DKGA-Menge nach Wachstumsstopp war eine Folge der Zersetzungsreaktion (möglicherweise eine Decarboxylierung) des instabilen 2,5-DKGA, sichtbar an der parallel stärker werdenden Braunfärbung des Mediums (Schlegel, 1992; Weenk *et al.*, 1984).

Die Einfachmutante N44-1 *mgdh::kan* erreichte die höchste optische Dichte von 10,1; die Zellausbeute ( $Y_{X/S}$ ) betrug 0,08 g BTM/g Glucose (Tab. 9). Das Wachstum endete nach ca. 50-60 Stunden unter Verbrauch von 165 mM Glucose. Die Glucose wurde langsam von der Zelle aufgenommen, ohne die Bildung der genannten Produkte, und in den intrazellulären Stoffwechsel eingeschleust (Abb. 6). Aus diesen Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass die Disruption des Gens für die mGDH die Produktbildung von Gluconat, 2-KGA und 2,5-DKGA bei Wachstum im Schüttelkolben unterbindet und im Vergleich zum Stamm N44-1 zu einem höheren Biomasseertrag führt (Tab. 9).

Die Glucose wurde von der Einfachmutante nicht vollständig aufgenommen. Ein Glucoseanteil ca. 80 mM wurde nach Beenden des Wachstums verbraucht, die restliche Glucose verblieb ungenutzt im Medium. Der Verbleib der Glucose und die Ursache für die unverbrauchte Glucose sollten im weiteren Verlauf der Arbeit untersucht werden. Weitere Optimierungen für eine effiziente Glucoseverstoffwechslung des *G. oxydans*-Stammes N44-1 *mgdh::kan* waren notwendig.

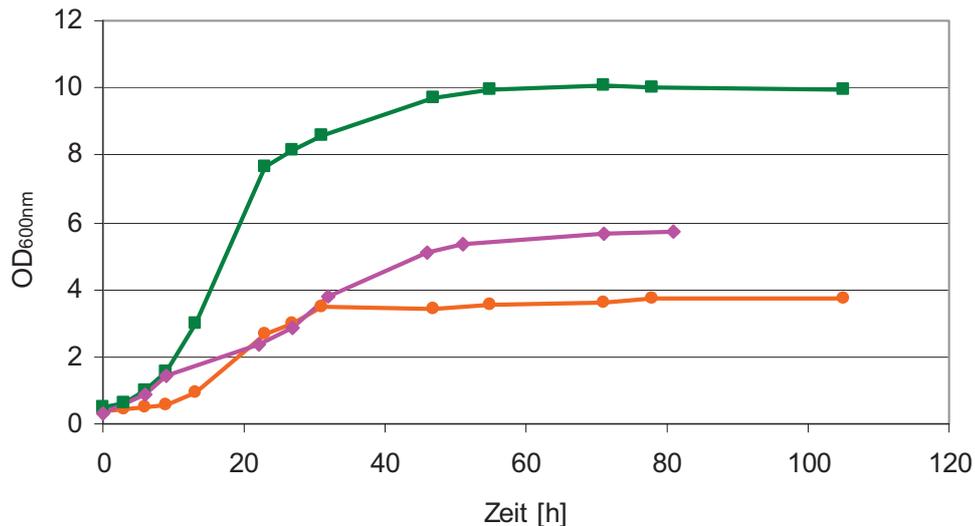
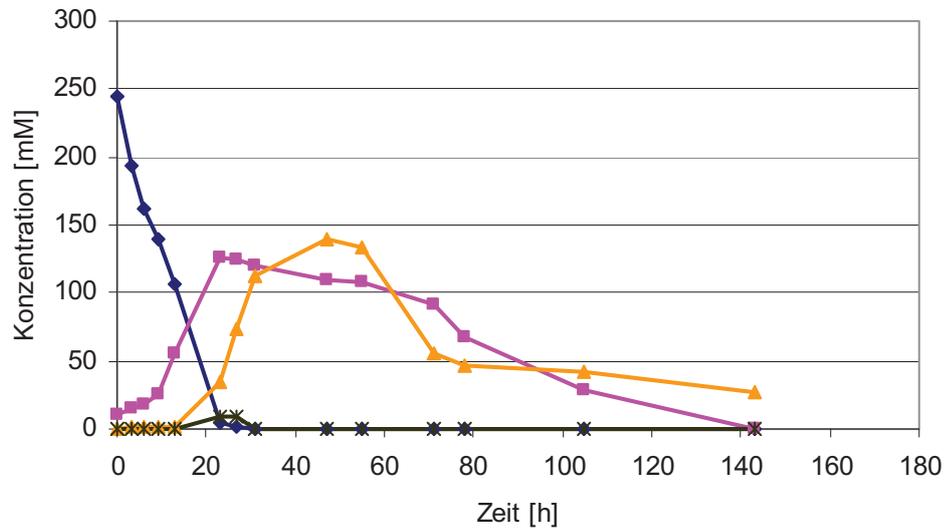


Abb. 5: Wachstum der *G. oxydans*-Stämme IFO 3293 (◇), N44-1 pBBR1MCS4 (●) und N44-1 *mgdh::kan* pBBR1MCS4 (■) in No.5-Medium mit 50 g/l Glucose.

Tab. 9: Wachstumsdaten der *G. oxydans*-Stämme IFO 3293, N44-1 und N44-1 *mgdh::kan* bei Wachstum in No.5-Medium mit 50 g/l Glucose. Abkürzungen: BTM: Bio-trockenmasse;  $\mu_{\max}$ : maximale Wachstumsrate;  $t_d$ : Verdopplungszeit;  $Y_{x/s}$ : Biomasseausbeutekoeffizient

<i>G. oxydans</i> -Stamm	End-OD	BTM [g/l]	$\mu_{\max}$ [h <sup>-1</sup> ]	$t_d$ [h]	$Y_{x/s}$ [g BTM/g Glucose]
IFO 3293	7,8	1,8	0,16	4,3	0,09
N44-1 pBBR1MCS4	3,7	0,9	0,11	6,3	0,05
N44-1 <i>mgdh::kan</i> pBBR1MCS4	10,1	2,4	0,16	4,3	0,08

A)



B)

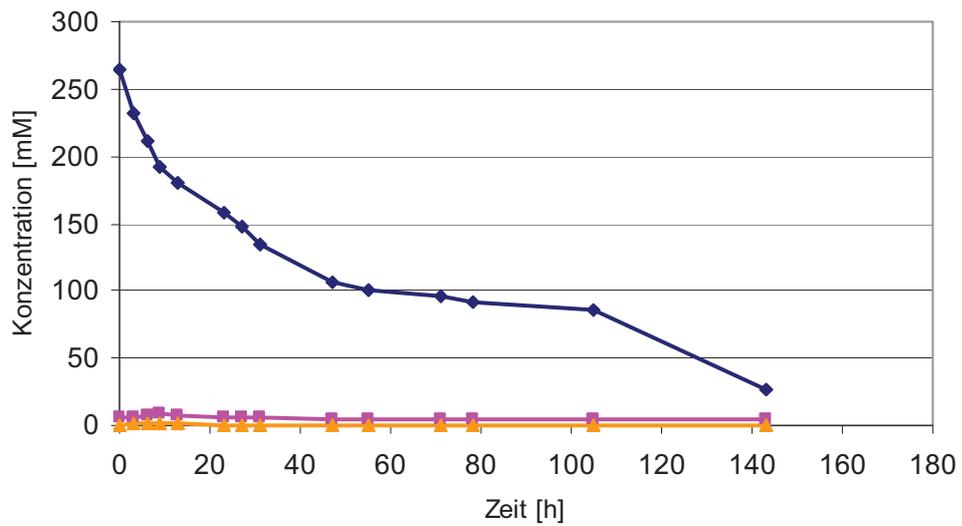


Abb. 6: Substratverbrauch und Produktbildung beim Wachstum des *G. oxydans*-Stammes N44-1 pBBR1MCS4 (A) und N44-1 *mgdh::kan* pBBR1MCS4 (B) in No.5-Medium mit 50 g/l Glucose. Glucose (♦), Gluconat (■), 2-KGA/2,5-DKGA (▲) und 5-KGA (⌘)

### 3.2 Optimierung der Biomasseproduktion bei Wachstum auf dem Substrat Glucose

Bei der Optimierung des Wachstums und der Biomassebildung auf dem Substrat Glucose wurden der *G. oxydans*-Stamm N44-1 und N44-1 *mgdh::kan* verwendet. Da die Einfachdisruptante N44-1 *mgdh::kan* eine signifikant höhere optische Dichte erreichte als der Ausgangsstamm N44-1, wurden größere Erfolge bei diesem Stamm erwartet. Da über den in dieser Arbeit verwendete *G. oxydans*-Stamm N44-1 keine Sequenzierungsergebnisse zur Verfügung stehen, wurden zur Identifizierung und Suche von Genen die Sequenzierungsdaten des *G. oxydans*-Stammes 621H (DSM2343) (Prust *et al.* 2005) verwendet. Die „offenen Leserahmen“ der Gene wurden von Prust *et al.* (2005) durchnummeriert und beginnen mit den Buchstaben „GOX“ für *G. oxydans*. Diese GOX-Nummern wurden in dieser Arbeit zur Kennzeichnung der Gene verwendet.

#### 3.2.1 Disruption des Gens für die cytosolische Glucose-Dehydrogenase und dessen Einfluss auf den Glucosstoffwechsel

Um zusätzlich zu der Unterbindung der membranabhängigen Gluconat-Bildung die intrazelluläre Gluconat-Bildung zu verhindern, da Gluconat das Zellwachstum von *G. oxydans* hemmt (Olijve und Kok, 1979a/b; Pöhland *et al.*, 1993; Hogema *et al.*, 1997; Peekhaus *et al.*, 1998; Velizarov und Beschkov, 1998; Godjevargova *et al.*, 2004), wurde die cytosolische Glucose-Dehydrogenase in einem *G. oxydans*-Stamm N44-1 mit disruptiertem *mgdh*-Gen inaktiviert.

Die Einfachdisruptante, deren *mgdh*-Gen (GOX0265) mittels einer Kanamycin-resistenzkassette disruptiert wurde, lag vor, jedoch wurde für die Stammkonstruktion der Doppeldisruptante eine markerfreie Disruption des Gens für die mGDH in dem Stamm N44-1 durchgeführt. Ein Grund hierfür war das möglicherweise auftretende schlechtere Bakterienwachstum bei der Kultivierung mit zwei oder mehr Antibiotika im Medium (Martinez und Baquero, 2002). In der Doppeldisruptante sollten zudem weitere Gene überexprimiert werden, wofür Resistenzmarker notwendig waren. Zudem standen für *G. oxydans* N44-1 aufgrund seiner natürlich vorhandenen Antibiotika-Resistenzen nur drei Resistenzmarker zur Verfügung.

Für die markerfreie Disruption wurde die genomische DNA von *G. oxydans* N44-1 isoliert und das Gen für die mGDH mittels cross-over PCR und den entsprechenden Primerpaaren disruptiert und in den Vektor pK19*mobsacB* kloniert (Schäfer *et al.*, 1994; Link *et al.*, 1997) (Anhang, Abb. 27a,b; 31). Die korrekte Gensequenz des Vektorkonstrukts pK19*mobsacB*- $\Delta$ *mgdh* wurde mittels Sequenzierungsreaktion überprüft und in den Stamm N44-1 eingebracht. Mittels Selektivagarplatten und PCR

wurden vier Klone als markerfreie *mgdh*-Disruptanten verifiziert. Im Anschluss sollte untersucht werden, ob es Unterschiede z.B. bezüglich des Wachstums zwischen dem N44-1-Stamm mit der markerfreien *mgdh*-Disruption und dem der Kanamycin bedingten *mgdh*-Disruption gab. Hierfür wurden Wachstumskurven mit 50 g/l Glucose durchgeführt mit anschließender HPLC-Analyse zur Untersuchung der Substratumsatzung während der Kultivierung. Der Stamm N44-1  $\Delta mgdh$  mit der markerfreien Disruption erreichte annähernd die gleiche optische Dichte (End-OD<sub>600nm</sub>: 10,7) wie der Stamm N44-1 *mgdh::kan* (End-OD<sub>600nm</sub>: 10,1) und ließ den gleichen Verlauf des Glucoseverbrauchs ohne die Entstehung der Produkte Gluconat, 2-KGA, 2,5-DKGA erkennen. Das zeigte, dass sich die Stämme gleich verhielten und die Kanamycin-resistenzkassette keinen Einfluss auf die Vitalität des Stammes N44-1 hatte.

Nun sollte in der markerfreien Einfachdisruptante N44-1  $\Delta mgdh$  das Gen für die sGDH disruptiert werden. Dafür wurde das *sgdh*-Gen (GOX2015) durch PCR mit den entsprechenden Primern aus *G. oxydans* N44-1 amplifiziert und in den Vektor pUC18 kloniert. Der mittlere Bereich des *sgdh*-Gens wurde entfernt und anstelle dessen eine Kanamycinresistenzkassette eingefügt. Mittels Sequenzierung wurde die Gensequenz des Vektorkonstrukts pUC18 *sgdh::kan* verifiziert. Das Konstrukt *sgdh::kan* wurde aus dem Vektor ausgeschnitten und in den mobilisierbaren Vektor pSUP202 eingebracht (Anhang, Abb. 28; 32). Die Transformation des Vektors pSUP202 *sgdh::kan* in den Stamm N44-1  $\Delta mgdh$  gelang dann mittels elektrokompenter *G. oxydans* Zellen, nicht mittels Konjugation. Die genomische DNA der auf Kanamycin wachsenden Klone wurde isoliert und mittels PCR bestätigt.

Um festzustellen, wie sich die Inaktivierung der membrangebundenen und cytosolischen GDH im Stamm N44-1 auswirkt, wurden Wachstumsversuche mit der Stamm N44-1  $\Delta mgdh$  *sgdh::kan* auf 50 g/l Glucose mit anschließender Substrat- und Produktanalyse durchgeführt und mit den bekannten Daten der Stämmen N44-1 und N44-1 *mgdh::kan* verglichen. Der Doppeldisruptionsstamm N44-1  $\Delta mgdh$  *sgdh::kan* erreichte beim Wachstum auf Glucose, im Vergleich zum Ausgangsstamm N44-1 und der Einfachdisruptante N44-1 *mgdh::kan*, die höchste optische Dichte (End-OD<sub>600nm</sub>: 13,0) und bildete am meisten Biotrockenmasse (3,0 g/l), was somit zu der höchsten Zellausbeute ( $Y_{x/s}$ ) mit 0,10 g BTM pro g Glucose führte (Abb. 7 und Tab. 9). Die Glucose konnte intrazellulär vermutlich noch über die Glucose-Kinase umgesetzt werden, was zu einer effektiveren Glucoseverwertung führte, sichtbar anhand der höheren Zellausbeute im Vergleich zur Einfachmutante (Tab. 9). Die Nutzung der Glucose zur Biomasseproduktion wurde ebenfalls durch die HPLC-Analyse, die der genauen Überprüfung des Glucoseverbrauchs und der Produktentstehung diente, bestätigt. Die Doppelmutante produzierte, ebenso wie die Einfachmutante, keine Glucose-Oxidationsprodukte wie Gluconat, 2-KGA und 2,5-DKGA

(Abb. 8). Die Glucose wurde jedoch auch so langsam aufgenommen wie bei der Einfachmutante. Bei Wachstumsstopp nach ca. 60 Stunden waren noch ungefähr 100 mM Glucose übrig. Da Faktoren wie fehlende Nährstoffe oder ein suboptimaler pH-Wert als limitierende Wachstumsfaktoren nicht in Frage kamen, da sie bereits überprüft wurden, war anzunehmen, dass andere Faktoren das Wachstum von *G. oxydans* vorzeitig beendeten. So konnten die Autoren Snoep *et al.* (1994) das geringe Wachstum auf Glucose einer *E. coli*-Mutante, deren Glucoseaufnahme- und Phosphorylierungssystem gehemmt war, durch Expression der Gene für die Glucose-Kinase und den Glucose-Facilitator von *Z. mobilis*, in der *E. coli*-Mutanten wieder erhöhen. Daher wurde vermutet, dass eine unzureichende Glucose-Zufuhr in die Zelle oder eine zu langsame intrazelluläre Phosphorylierung der Glucose zum Wachstumsstopp von *G. oxydans* führten. Zur Klärung sollte der Glucose-Transport in die Zelle verstärkt und das Gen für die Glucose-Kinase überexprimiert werden.

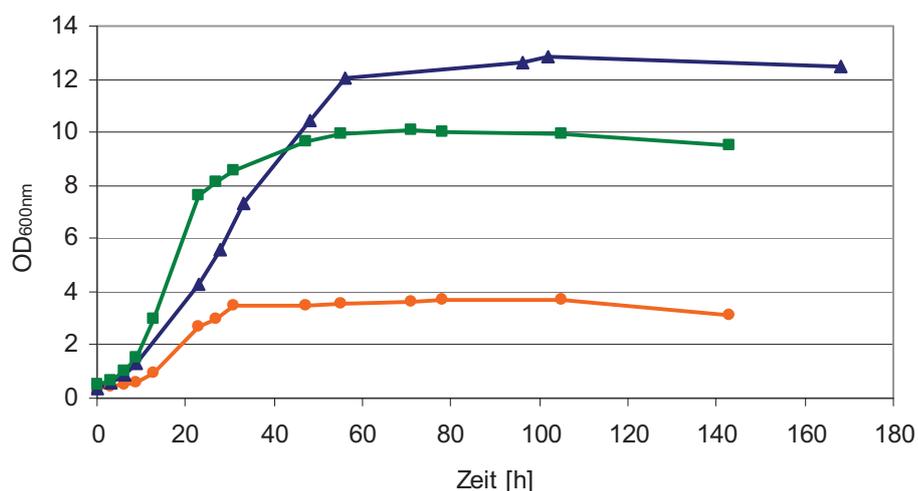


Abb. 7: Wachstum des *G. oxydans*-Stammes N44-1 pBBR1MCS4 (●), N44-1 *mgdh::kan* pBBR1MCS4 (■) und N44-1  $\Delta$ *mgdh sgdh::kan* pBBR1MCS4 (▲) in No.5-Medium mit 50 g/l Glucose.

Tab. 9: Wachstumsdaten des *G. oxydans*-Stammes N44-1  $\Delta$ *mgdh sgdh::kan* pBBR1-MCS4 bei Wachstum in No.5-Medium mit 50 g/l Glucose. Abkürzungen: BTM: Biotrockenmasse;  $\mu_{\max}$ : maximale Wachstumsrate;  $t_d$ : Verdopplungszeit;  $Y_{x/s}$ : Biomasseausbeutekoeffizient

<i>G. oxydans</i> -Stamm	End-OD	BTM [g/l]	$\mu_{\max}$ [h <sup>-1</sup> ]	$t_d$ [h]	$Y_{x/s}$ [g BTM/g Glucose]
N44-1 $\Delta$ <i>mgdh sgdh::kan</i> pBBR1MCS4	13,0	3,0	0,16	4,3	0,10

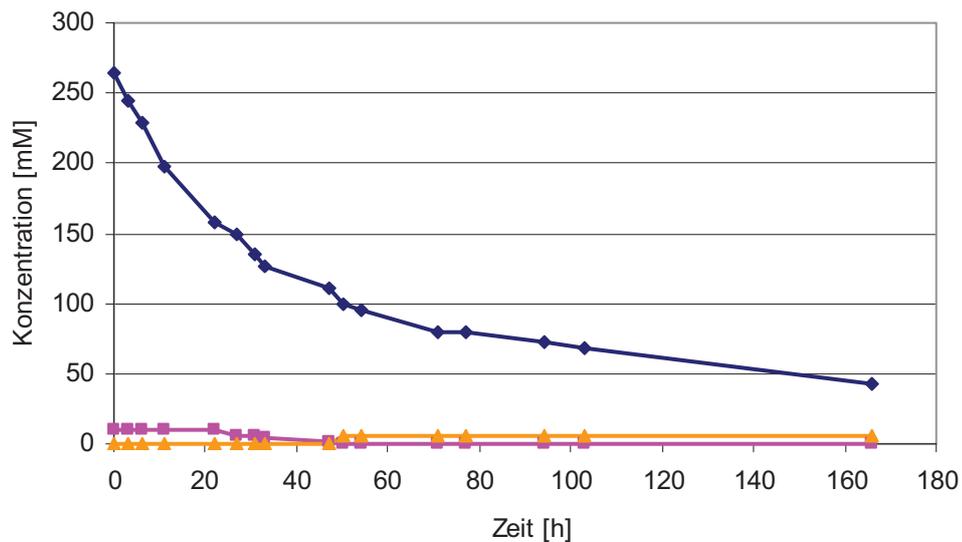


Abb. 8: Substratverbrauch und Produktbildung beim Wachstum des *G. oxydans*-Stammes N44-1  $\Delta mgdh\ sgdh::kan$  pBBR1MCS4 in No.5-Medium mit 50 g/l Glucose. Glucose (◆), Gluconat (■) und 2-KGA/2,5-DKGA (▲).

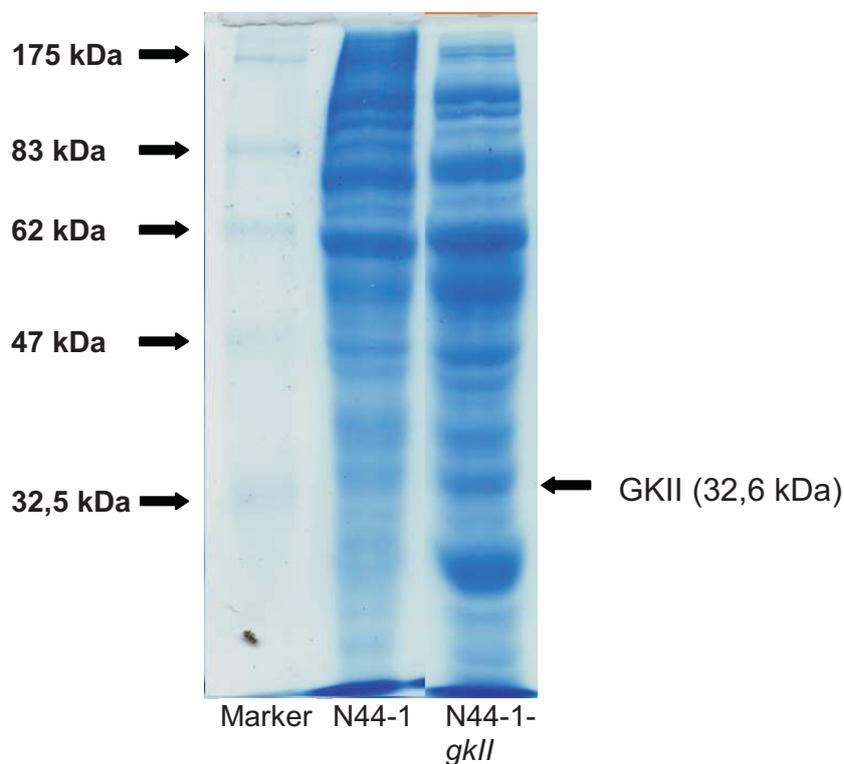
### 3.2.2 Überexpression des Gens für die Glucose-Kinase und dessen Einfluss auf den Glucosestoffwechsel

Die Glucose-Kinase katalysiert intrazellulär die Phosphorylierung von Glucose zu Glucose-6-phosphat mit Hilfe von ATP. Um die intrazelluläre Umsetzung von Glucose zu beschleunigen und dadurch die Menge an in den Zentralstoffwechsel gelangende phosphorylierte Glucose zu steigern, sollte das Gen für die Glucose-Kinase (GK) überexprimiert werden. *G. oxydans* verfügt über zwei Gene, die beide für eine Glucose-Kinase kodieren. Mittels PCR und den entsprechenden Primern wurde das Gen für die Glucose-Kinase I (GOX1182: putative Glucose-Kinase) und Glucose-Kinase II (GOX2419) aus der genomischen DNA von *G. oxydans* N44-1 amplifiziert und über Restriktionsschnittstellen in den Vektor pBBR1MCS (Kovach *et al.*, 1995) eingebracht. Die Plasmide pBBR1MCS2-*gki* und pBBR1MCS4-*gkii* wurden sequenziert und nach Bestätigung des richtigen Konstruktes aus *E. coli* mittels Elektroporation in den *G. oxydans*-Stamm N44-1 eingebracht. Es wurden 2 GKII- und 3 GKI-Überproduzenten konstruiert. Die Überexpression wurde mittels SDS-Gel und die funktionelle Expression durch einen Aktivitätstest ermittelt. Da die GK möglicherweise ein Substrat-induziertes Enzym ist, wurden die Vor- und Hauptkulturen der GK-Überproduzenten und des Kontrollstammes N44-1 mit 50 g/l Glucose als Substrat angezogen.

Auf einem SDS-Gel konnte die Überproduktion der GKI nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt); allerdings zeigte ein GKI-Aktivitätstest keine Erhöhung der

spezifische Aktivität der GKI in den drei konstruierten Stämme N44-1 pBBR1MCS2-*gkl* im Vergleich zum Stamm N44-1. Die GKI-Aktivität betrug im Stamm N44-1 und in den drei Stämmen N44-1 pBBR1MCS2-*gkl* ~0,45 U/mg Protein.

Die Überproduktion der GKII ließ sich im Rohextrakt von *G. oxydans* N44-1 pBBR1MCS4-*gkII* anhand einer 32,6 kDa-Bande im SDS-Gel nachweisen (Abb. 9). Das anhand der Aminosäuresequenz berechnete Molekulargewicht für die GKII von 32,6 kDa (Prust *et al.*, 2005) stimmte mit dem aus dem SDS-Gel ermittelten Molekulargewicht überein. Ein Aktivitätstest zeigte zudem eine höhere spezifische GKII-Aktivität in den beiden GKII-Überproduzenten im Vergleich zum Stamm N44-1 (Tab. 10).



**Abb. 9:** Mit „PageBlue™ Protein Staining Solution“ gefärbtes SDS-Gel eines GKII-Überproduzenten (*G. oxydans* N44-1 pBBR1MCS4-*gkII*) im Vergleich zum Ausgangsstamm (*G. oxydans* N44-1). Als Molekulargewichtsstandard wurde der „Prestained Protein Marker“ verwendet. 10 µg Gesamtprotein wurde pro Spur von den Proteinrohextraktproben aufgetragen. Die dritte Spur zeigt den GKII-Überproduzenten-Stamm.

Tab. 10: Spezifische Enzymaktivitäten der Glucose-Kinase II in verschiedenen *G. oxydans*-Stämmen.

<i>G. oxydans</i> -Stamm	Glucose-Kinase II-Aktivität [U/mg Protein]
N44-1	0,46 ± 0,02
N44-1 pBBR1MCS4	0,51 ± 0,01
N44-1 pBBR1MCS4- <i>gkII</i> ; Klon 1	0,58 ± 0,02
N44-1 pBBR1MCS4- <i>gkII</i> ; Klon 2	0,67 ± 0,01

Die spezifische Aktivität der GKII im Ausgangsstamm N44-1 betrug ca. 0,46 U/mg Protein. Die Aktivität konnte durch die Überproduktion nur 1,5-fach, auf max. 0,67 U/mg Protein gesteigert werden (Tab. 10). Um festzustellen, wie die Überexpression des *gkII*-Gens das Wachstum der Stämme beeinflusst, wurden die GKII-Überproduzenten und der Kontrollstamm mit 50 g/l Glucose kultiviert. Die Mutanten erreichten nur eine optische Dichte von 2,7 (Klon 1) und 2,1 (Klon 2) im Vergleich zum Ausgangsstamm, der auf eine optische Dichte von 3,7 wuchs (Abb. 10).

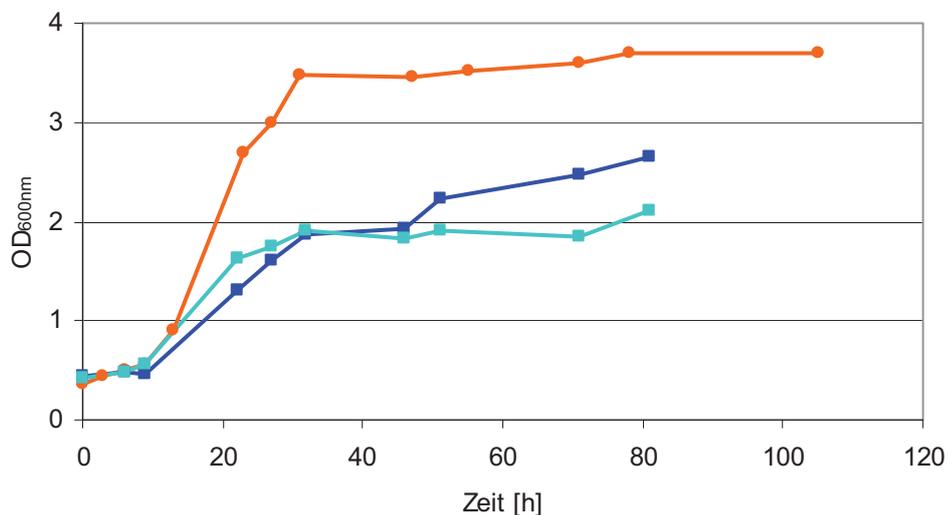


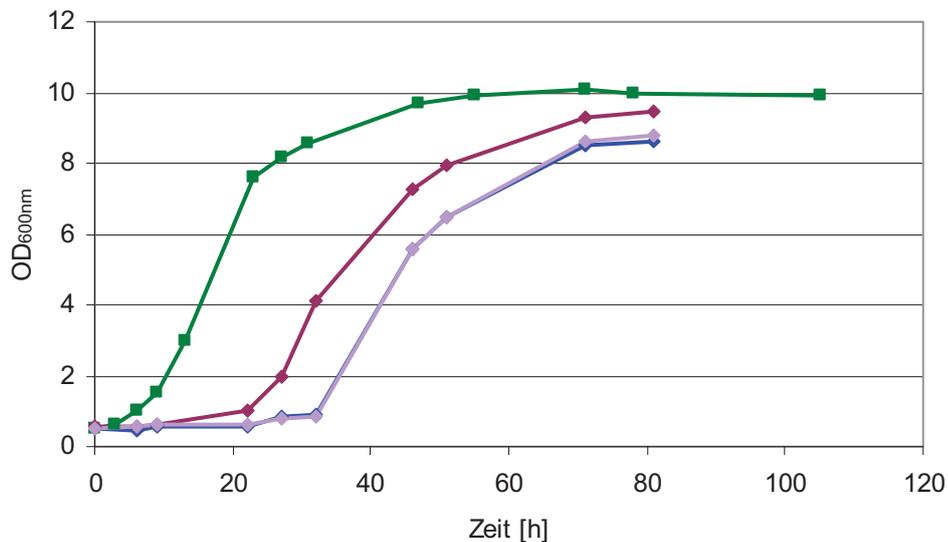
Abb. 10: Wachstum des *G. oxydans*-Stammes N44-1 pBBR1MCS4-*gkII* (Klon 1) (■), N44-1 pBBR1MCS4-*gkII* (Klon 2) (■) und N44-1 pBBR1MCS4 (●) in No.5-Medium mit 50 g/l Glucose.

Der *G. oxydans*-Stamm N44-1 pBBR1MCS4 oxidierte die Glucose über das membrangebundene Enzymsystem schnell zu den Oxidationsprodukten und nahm nur eine geringe Menge an Glucose in die Zelle auf. Daher stand für die GKII vermutlich zu wenig Glucose zur Verfügung, so dass folglich die Überproduktion keinen positiven Wachstumseinfluss erkennen ließ. Das geringere Wachstum der Mutanten im Vergleich zum Ausgangsstamm N44-1 zeigte, dass sich die Überexpression des *gkII*-Gens negativ auf das Wachstum von *G. oxydans* N44-1 auswirkte. Das konnte an dem zusätzlichen Energieaufwand für die vermehrte Expression des *gkII*-Gens liegen oder an bisher unbekanntem Auswirkungen des Gens auf den Stoffwechsel von *G. oxydans* (Mülhardt, 2006).

In dem Stamm N44-1 *mgdh::kan* sollte genügend Glucose in die Zelle gelangen; deswegen wurde das Plasmid mit dem Gen für die GKII in den Stamm N44-1 *mgdh::kan* eingebracht. Mit dem neu konstruierten Stamm wurden ein Aktivitätstest und ein Kultivierungsversuch durchgeführt um festzustellen, wie sich die Überexpression des *gkII*-Gens in der Einfachmutante auswirkt. Die Aktivität der GKII in der Einfachmutante war mit  $\sim 0,73$  U/mg Protein 1,6-fach höher als im Ausgangsstamm (Tab. 11). Durch die Inaktivierung der mGDH nahm die Einfachmutante vermehrt Glucose in die Zelle auf. Dadurch wurde das Gen für die GKII induziert, größere Mengen an aktivem Protein wurden gebildet, wodurch die GKII-Aktivität in der Einfachmutante höher war als im Ausgangsstamm. Die spezifische GKII-Aktivität konnte durch die Überproduktion 1,6-fach gesteigert werden auf 0,21 U/mg Protein (Tab. 11). Die Wachstumsversuche mit 50 g/l Glucose zeigten jedoch, dass die drei Mutanten im Vergleich zum Stamm N44-1 *mgdh::kan* auf eine geringere optische Dichte von 8,6 (Klon 1), 9,5 (Klon 2) und 8,8 (Klon 3) wuchsen (Abb. 11), so dass die Überexpression des *gkII*-Gens zu keinem höheren Wachstum von *G. oxydans* führte.

**Tab. 11: Spezifische Enzymaktivitäten der Glucose-Kinase II in verschiedenen *G. oxydans*-Stämmen.**

<i>G. oxydans</i> -Stamm	Glucose-Kinase II-Aktivität [U/mg Protein]
N44-1 <i>mgdh::kan</i>	0,73 $\pm$ 0,02
N44-1 <i>mgdh::kan</i> pBBR1MCS4	0.80 $\pm$ 0,02
N44-1 <i>mgdh::kan</i> pBBR1MCS4- <i>gkII</i> ; Klon 1	1,08 $\pm$ 0,04
N44-1 <i>mgdh::kan</i> pBBR1MCS4- <i>gkII</i> ; Klon 2	1.20 $\pm$ 0,03
N44-1 <i>mgdh::kan</i> pBBR1MCS4- <i>gkII</i> ; Klon 3	1.21 $\pm$ 0,04



**Abb. 11: Wachstum der *G. oxydans*-Stämme N44-1 *mgdh::kan* pBBR1MCS4-*gkII* (Klon 1) (◆), N44-1 *mgdh::kan* pBBR1MCS4-*gkII* (Klon 2) (◆), N44-1 *mgdh::kan* pBBR1MCS4-*gkII* (Klon 3) (◆) und N44-1 *mgdh::kan* pBBR1MCS4 (■) in No.5-Medium mit 50 g/l Glucose.**

Die Steigerung der Enzymaktivität der GKII in den Stämmen N44-1 pBBR1MCS4-*gkII* und N44-1 *mgdh::kan* pBBR1MCS4-*gkII* war sehr gering. Eine Erhöhung der spezifischen Aktivität der GKI in den Stämmen N44-1 pBBR1MCS2-*gkI* wurde nicht festgestellt. Der Grund für keine oder eine schwache Steigerung der GK-Aktivität war die geringe Expression der *gk*-Gene (Abb. 9). Bisher war der schwache *lacZ*-Promotor des pBBR1MCS Vektors verwendet worden. Zur Erhöhung der Expression sollte die Glucose-Kinase unter Kontrolle des starken *G. oxydans tufB*-Promotors gestellt werden (Bremus, 2006; Merfort, 2006; Schleyer *et al.*, 2008).

### 3.2.3 Überexpression des Gens für die Glucose-Kinase in der Doppeldisruptante und dessen Einfluss auf den Glucosestoffwechsel

Bisherige Experimente zeigten, dass die Inaktivierung der mGDH und sGDH in dem *G. oxydans* Stamm N44-1 zu einem höheren Biomasseertrag führte, dass jedoch die Glucose nicht vollständig verbraucht wurde. Zur besseren Glucoseverwertung sollte die intrazelluläre Phosphorylierung der Glucose gesteigert werden. Das bereits überexprimierte Gen für die Glucose-Kinase I wurde verwendet; die Proteinbildung wurde bereits mittels SDS-Gel überprüft (3.2.2). Zur Erhöhung der GKI-Aktivität wurde das *gkI*-Gen hinter den starken *G. oxydans tufB*-Promotor des Plasmids pEXGOXA kloniert (Schleyer *et al.*, 2008; Anhang, Abb. 30). Danach erfolgte die

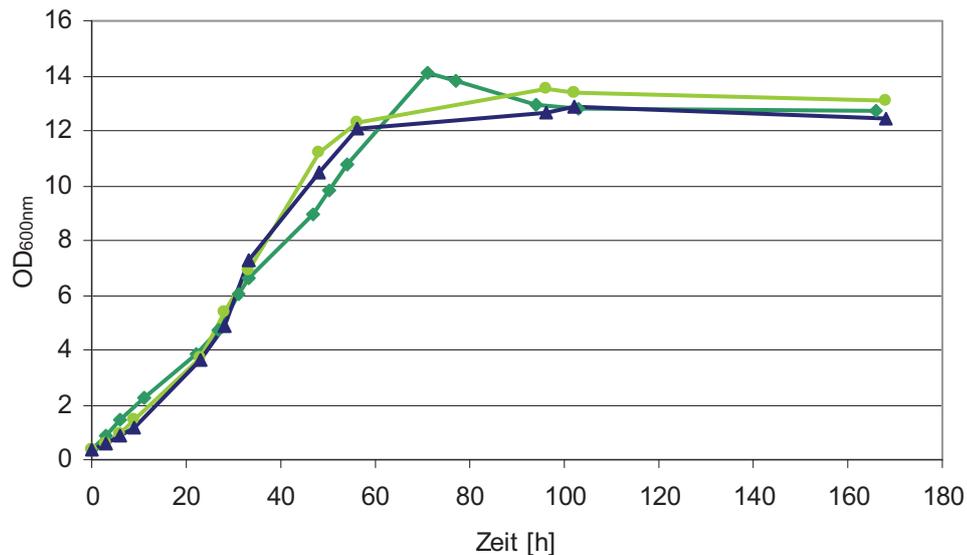
Transformation des Plasmidkonstrukts in die Doppeldisruptante. Zunächst wurde die GKI-Enzymaktivität in den zwei Stämme N44-1  $\Delta mgdh sgdh::kan$  pEXGOXA-*gkl* und in den Vergleichsstämme N44-1  $\Delta mgdh sgdh::kan$  und N44-1  $\Delta mgdh sgdh::kan$  pEXGOXA gemessen.

**Tab. 12: Spezifische Enzymaktivitäten der Glucose-Kinase I in verschiedenen *G. oxydans*-Stämmen**

<i>G. oxydans</i> -Stamm	Glucose-Kinase I-Aktivität [U/mg Protein]
N44-1 $\Delta mgdh sgdh::kan$	0,06 ± 0,01
N44-1 $\Delta mgdh sgdh::kan$ pEXGOXA	0,05 ± 0,01
N44-1 $\Delta mgdh sgdh::kan$ pEXGOXA- <i>gkl</i> ; Klon 1	0.25 ± 0,03
N44-1 $\Delta mgdh sgdh::kan$ pEXGOXA- <i>gkl</i> ; Klon 2	0.29 ± 0,03

Die Aktivität der Glucose-Kinase in der Doppeldisruptante war mit 0,06 Units/mg Protein gering (Tab. 12). Die GKI-Aktivität der Überproduzenten betrug maximal 0,29 U/mg Protein. Die spezifische Aktivität der GKI konnte demnach um ein 5-faches gesteigert werden. Es blieb jedoch fraglich, warum die Aktivität der Glucose-Kinase im Stamm N44-1 höher war als in der Doppeldisruptante. Durch die Inaktivierung der mGDH und sGDH sollte die Aktivität der GK unverändert bleiben oder leicht höher sein, da in der Zelle mehr Glucose zur Verfügung steht. Die Aktivität der GKI und GKII ließen sich im GK-Enzymtest in *G. oxydans*-Rohextrakten nicht voneinander unterscheiden.

Zur Überprüfung, ob die GKI-Überproduzenten die Glucose schneller umsetzen und dadurch schneller wachsen, wurden die drei Mutanten und der Vergleichsstamm mit 50 g/l Glucose kultiviert; Proben wurden zu verschiedenen Zeiten auf Substratverbrauch und Produktbildung untersucht.



**Abb. 12: Wachstum des *G. oxydans*-Stammes N44-1  $\Delta mgdh sgdh::kan$  pEXGOXA-gkl (Klon 1) (◆), N44-1  $\Delta mgdh sgdh::kan$  pEXGOXA-gkl (Klon 2) (●) und N44-1  $\Delta mgdh sgdh::kan$  pEXGOXA (▲) in No.5-Medium mit 50 g/l Glucose.**

Die beiden Stämme N44-1  $\Delta mgdh sgdh::kan$  pEXGOXA-gkl erreichten nur eine geringfügig höhere optische Dichte von ca. 13,8 im Vergleich zum Leerplasmidstamm N44-1  $\Delta mgdh sgdh::kan$  pEXGOXA (End-OD<sub>600nm</sub>: 12,9) (Abb. 12). Die HPLC-Analyse zeigte, dass die GKI-Überproduzenten die Glucose nicht schneller aufnahmen als der Leerplasmidstamm und die GKI-Mutanten wie auch der Leerplasmidstamm ihr Wachstum beendeten, obwohl noch ca. 100 mM Glucose im Medium vorhanden waren. Insgesamt führte die GKI-Überexpression in der Doppeldisruptante nicht zu einer effektiveren Glucoseverwertung und damit zu keiner Erhöhung der Zellausbeute.

### 3.2.4 Überexpression des Gens für die Glucose-Permease und dessen Einfluss auf den Glucosestoffwechsel

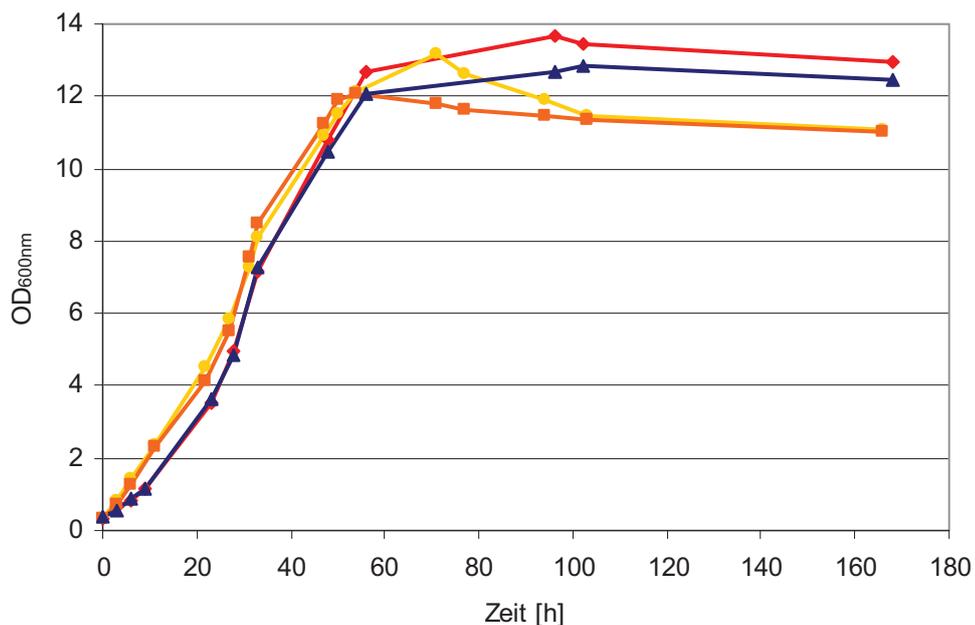
Über die putative Glucose-Permease (*csbC*) von *G. oxydans* wird Glucose von der Zelle aufgenommen (Prust *et al.*, 2005). Um die Glucoseaufnahme in die Zelle zu verbessern und dadurch möglicherweise ein schnelleres und höheres Wachstum von *G. oxydans* zu erreichen, sollte das Gen für die Glucose-Permease von *G. oxydans* N44-1 überexprimiert und hierzu hinter den *lacZ*-Promotor in den Vektor pBBR1MCS4 kloniert werden. Das hergestellte Vektorkonstrukt pBBR1MCS4-*csbC* wurde in die Stämme N44-1 und N44-1 *mgdh::kan* eingebracht. Nach Auftrennung des Gesamtproteinrohextraktes der *CsbC*-Überproduzenten auf einem SDS-Gel zur Bestätigung der Proteinexpression war bei allen Überproduzenten eine prominente

Bande von 53 kDa zu erkennen. Das aus der Aminosäuresequenz abgeleitete Molekulargewicht des CsbC-Proteins betrug ebenfalls 53 kDa (Prust *et al.*, 2005). Es erfolgte die Charakterisierung der drei konstruierten N44-1 *mgdh::kan* pBBR1MCS4-*csbC* Stämme, da sich die Auswirkungen der Überexpression des *csbC*-Gens in dem Stamm N44-1 *mgdh::kan* deutlicher zeigen werden als in dem Stamm N44-1, der kaum Glucose in die Zelle aufnimmt (3.1). Die Wachstumsversuche mit 50 g/l Glucose zeigten keine erhöhte Wachstumsrate oder höhere End-OD der CsbC-Überproduzenten (End-OD<sub>600nm</sub>: 8,8) im Vergleich zum Kontrollstamm N44-1 *mgdh::kan* pBBR1MCS4 (End-OD<sub>600nm</sub>: 10,1). Zudem wurden der Substratverbrauch und die Produktbildung mittels HPLC bestimmt. Die Mutanten zeigten annähernd den gleichen Verlauf des Glucoseabbaus wie der Kontrollstamm; die Glucoseaufnahme war nicht erhöht, Nebenprodukte wie Gluconat, 2-KGA und 2,5-DKGA wurden erwartungsgemäß nicht gebildet. Die Überexpression des Gens für die Glucose-Permease wirkte sich möglicherweise nicht positiv auf das Wachstum oder die Glucoseaufnahme aus, da das *csbC*-Gen nicht für eine Glucose-Permease kodiert. Die Funktionalität des CsbC-Proteins als Glucose-Permease wurde experimentell noch nicht bewiesen, sondern wurde anhand von Sequenzähnlichkeiten zu bekannten *G. oxydans*-Permeasen, wie z.B. der Gluconat-Permease abgeleitet.

### **3.2.5 Expression des Gens für den Glucose-Fascilitator von *Z. mobilis* in der Doppeldisruptante und dessen Einfluss auf den Glucosestoffwechsel**

Der Stamm *G. oxydans* N44-1  $\Delta$ *mgdh* *sgdh::kan* erreichte eine höhere optische Dichte als der Ausgangsstamm N44-1, allerdings endete das Zellwachstum, trotz 36% Restglucose im Medium. Die Ursache konnte eine limitierte Glucoseaufnahme in Verbindung eines während der Kultivierung entstehenden zu geringen Glucosegradienten über die Membran sein (Meins *et al.*, 1988; Nicholls und Ferguson, 2001). Zur effizienten Steigerung der Aufnahmegeschwindigkeit von Glucose in die Zelle sollte deswegen (anstelle des bereits verwendeten putativen Gens für die Glucose-Permease) das Gen für den Glucose-Fascilitator (*glf*) von *Z. mobilis* in *G. oxydans*  $\Delta$ *mgdh* *sgdh::kan* exprimiert werden. *Z. mobilis* ist ein Ethanol produzierendes Bakterium (Arcuri *et al.*, 1982; Zajic *et al.*, 1982; Bringer-Meyer und Sahm, 1987), das Glucose ohne Phosphorylierung durch erleichterte Diffusion mittels des Glucose-Fascilitators (GLF) aufnehmen kann ( $K_m$ -Wert für Glucose, 4,1 mM;  $V_{max}$  bei 15°C, 75 nmol/min/mg TG; Weisser *et al.*, 1995) (DiMarco und Romano, 1985). Nachweislich wird das *glf*-Gen auch in *E. coli* funktionell exprimiert (Snoep *et al.*, 1994; Parker *et al.*, 1995; Weisser *et al.*, 1995). Der Glucose-Fascilitator lag in dem *E. coli*-Expressionsvektor pZY507 vor, der über eine

Chloramphenicolresistenzkassette verfügt (Weisser *et al.*, 1995). Da der Stamm *G. oxydans* N44-1, sowie die konstruierten Mutante N44-1  $\Delta mgdh$   $sgdh::kan$  resistent, gegenüber Chloramphenicol sind und der Replikationsursprung P15A von pZY507 wahrscheinlich in *G. oxydans*, wie in *C. glutamicum* und *B. megaterium* (Bäumchen, 2007), nicht erkannt würde, wurde das Gen für den Glucose-Fascilitator durch Restriktion und anschließende Ligation in den *G. oxydans*-Expressionsvektor pBBR1MCS4 umkloniert und nach Bestätigung der fehlerfreien Sequenz durch Sequenzierung in den Stamm N44-1  $\Delta mgdh$   $sgdh::kan$  transformiert. Im Anschluss daran sollten Wachstumsversuche die Auswirkung der Expression auf die Glucoseverstoffwechslung verdeutlichen. Die Kultivierung der drei hergestellten *G. oxydans*-Stämme N44-1  $\Delta mgdh$   $sgdh::kan$  pBBR1MCS4-*glf* mit 50 g/l Glucose bei gleichzeitiger Substrat- und Produktanalyse zeigte kein verändertes Wachstum, weder in bezug auf die erreichte End-OD (End-OD<sub>600nm</sub>: 13,0) noch auf die Wachstumsgeschwindigkeit (Abb. 13) und keinen veränderten Glucoseverbrauch im Vergleich zum Leerplasmidstamm N44-1  $\Delta mgdh$   $sgdh::kan$  pBBR1MCS4.

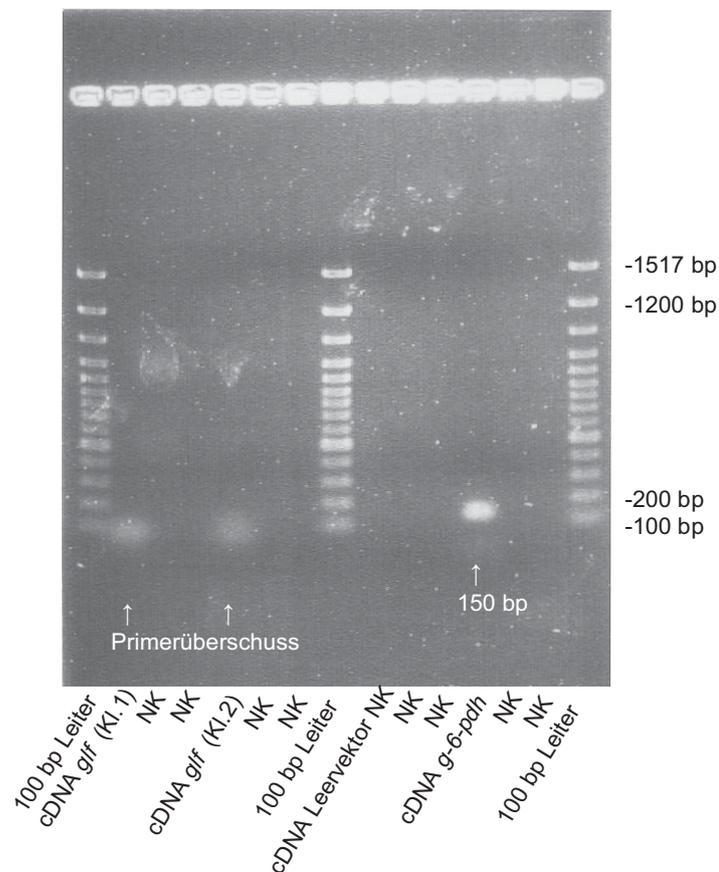


**Abb. 13: Wachstum der *G. oxydans*-Stämme N44-1  $\Delta mgdh$   $sgdh::kan$  pBBR1MCS4-*glf* (Klon 1) (♦), N44-1  $\Delta mgdh$   $sgdh::kan$  pBBR1MCS4-*glf* (Klon 2) (●), N44-1  $\Delta mgdh::kan$  pBBR1MCS4-*glf* (Klon 3) (■) und N44-1  $\Delta mgdh$   $sgdh::kan$  pBBR1MCS4 (▲) in No.5-Medium mit 50 g/l Glucose.**

Um festzustellen, ob das Wachstum der Stämme N44-1  $\Delta mgdh$   $sgdh::kan$  pBBR1MCS4-*glf* aufgrund eines abnehmenden Glucosegradienten über die Membran endete, wurden die Stämme N44-1  $\Delta mgdh$   $sgdh::kan$  pBBR1MCS4-*glf* erneut mit 50 g/l Glucose kultiviert. Bei Wachstumsstopp wurden 8% Glucose ins Medium ge-

geben. Dadurch wurde der für die Aufnahme von Glucose über den Glucose-Fascilitator erforderliche Glucosegradient wieder hergestellt. Die *G. oxydans*-Stämme nahmen ihr Wachstum nach der Glucosezugabe jedoch nicht wieder auf (Daten nicht gezeigt). Die Analyse des Glucoseverbrauchs mittels HPLC zeigte, dass die zudosierte Glucose nicht von den *G. oxydans*-Stämmen verbraucht wurde (Daten nicht gezeigt). Ein fehlender Glucosegradient über die Membran war demnach nicht die Ursache für den Wachstumsstopp der Stämme N44-1  $\Delta mgdh\ sgdh::kan$  pBBR1-MCS4-*glf* bei Restglucose im Medium.

Da die Expression des Gens für den Glucose-Fascilitator in der Doppeldisruptante nicht zu einer Steigerung des Bakterienwachstums führte, sollte mittels quantitativer Real-Time PCR überprüft werden, ob und in welcher Menge das Gen für den Glucose-Fascilitator transkribiert wird. Zunächst wurde die RNA aus den drei *G. oxydans*-Stämmen N44-1  $\Delta mgdh\ sgdh::kan$  pBBR1MCS4-*glf* und dem Leerplasmidstamm N44-1  $\Delta mgdh\ sgdh::kan$  pBBR1MCS4 isoliert, und im Anschluss daran wurde aus der mRNA cDNA synthetisiert (Omniscript RT Kit; Qiagen, Hilden). Als Negativ-Kontrollen diente ein Ansatz, der keine mRNA enthielt, in dem anderen Ansatz fehlte das Enzym „RTase“, und ein Ansatz enthielt die mRNA des Leerplasmidstammes anstelle der *glf*-mRNA. Als Positiv-Kontrolle wurde die mRNA des Gens für die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (*g-6-pdh*) gewählt; das *g-6-pdh*-Gen wird konstitutiv exprimiert. Um bei der quantitativen RT-PCR die PCR-Produkte über die Schmelzkurvenanalyse zu identifizieren, hatten die *glf*- und *g-6-pdh*-cDNA inklusive Primer die gleiche Fragmentlänge von 150 bp. Anstelle einer quantitativen Real-Time PCR wurde zunächst eine „normale“ Kontroll-PCR mit der *Taq*-DNA-Polymerase durchgeführt um zu überprüfen, ob die RNA-Probe möglicherweise zuviel DNA enthielt, da in diesem Falle die Negativ-Kontrollen falsch positive Banden zeigen würden.



**Abb. 14: Agarosegel zum Transkriptnachweis des *glf*-Gens.** Als Größenmarker wurde die „100 bp DNA-Leiter“ aufgetragen. Abkürzungen: NK, Negativ Kontrolle; cDNA *glf*, komplementäre DNA bzw. Transkript des Gens für den Glucose-Fascilitator; Kl., Klon; cDNA *g-6-pdh*, komplementäre DNA bzw. Transkript des Gens für die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase.

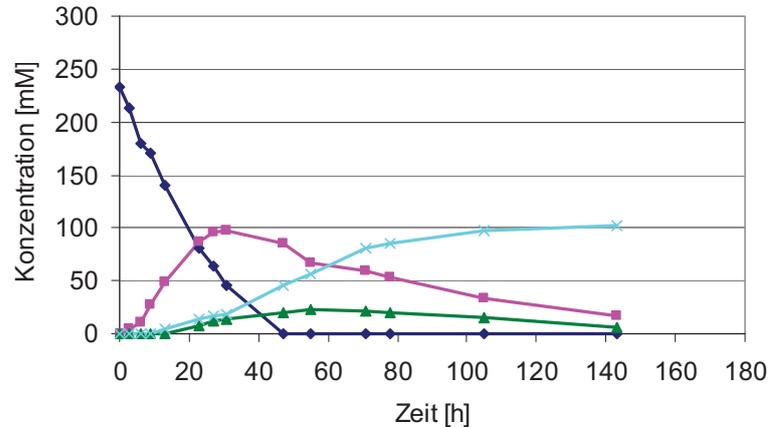
Ein 150 bp PCR-Produkt ließ sich nur bei der Positiv-Kontrolle (*g-6-pdh*-cDNA) nachweisen (Abb. 14); das Transkript der G-6-PDH wurde demnach gebildet. Die cDNA-Proben der Stämme N44-1  $\Delta$ *mgdh sgdh::kan* pBBR1MCS4-*glf* zeigten keine PCR-Produkte (Daten von Klon 3 nicht gezeigt), das *glf*-Gen wurde nicht transkribiert. Als diffuse Bande, unterhalb der 100 bp Marker-Bande war der Überschuss an nicht eingebauten Primern zu erkennen. Die Negativ-Kontrollen zeigten keine Banden, eine Verunreinigung der Proben mit DNA konnte demnach ausgeschlossen werden. Die cDNA-Probe des Leerplasmidstammes war negativ, der Leerplasmidstamm stellte wie erwartet kein *glf*-Transkript her. Um sicher zu gehen, dass kein *glf*-Transkript entstand, wurde der Versuch mit demselben Ergebnis wiederholt, daher wurde keine quantitative Real-Time PCR durchgeführt. Allerdings wurde überprüft, warum es nicht zur Bildung des *glf*-Transkripts gekommen war. Die Möglichkeiten, dass ein Frameshift, ein zufällig eingefügtes Stopp-Codon oder ein fehlerhafter oder falsch orientierter *tac*-Promotor für die fehlende Transkript-Bildung verantwortlich

waren (Mülhardt, 2006), trafen nicht zu. Das *glf*-Gen befand sich zudem in der richtigen Orientierung im Vektor, so dass es korrekt abgelesen werden konnte.

### **3.2.6 Sorbitumsetzung der *G. oxydans*-Stämme IFO 3293, N44-1, N44-1*mgdh::kan* und N44-1 $\Delta$ *mgdh sgdh::kan***

Es ist bekannt, dass einige der membrangebundenen Dehydrogenasen von *G. oxydans* in der Lage sind, mehr als ein Substrat zu oxidieren. Als Beispiel sei die Glycerin/Sorbit-Dehydrogenase (GOX854-855) genannt, die auch als Polyol-Dehydrogenase (Shinjo *et al.*, 2002b) bezeichnet wird und viele Substrate wie z.B. D-Sorbit, D-Gluconat, D-Glycerin umsetzt (Shinagawa *et al.*, 1999; Sugisawa und Hoshino, 2002; Matsushita *et al.*, 2003; Salusjarvi *et al.*, 2004). Daher war es denkbar, dass durch die Inaktivierung der mGDH industriell wichtige Produktionssubstrate wie z.B. Sorbit in dem Disruptionsstamm nicht mehr oder unzureichend über das membrangebundene Enzymsystem umgesetzt werden. Dieser Einfluss war im Hinblick auf die Produktausbeute biotechnologisch wichtiger Substanzen (z.B. Vitamin C) nicht erwünscht. Daher wurden die Stämme IFO 3293, N44-1 sowie die Einfach- und die Doppeldisruptante in No.5-Medium mit 50 g/l Sorbit kultiviert. Sorbit diente der 2-KGLA-Produktion, einer Vorstufe von Vitamin C. Die Stämme erreichten alle eine optische Dichte von 8-10 und bildeten, ausgehend von Sorbit, über Sorbose und Sorboson ca. 100 mM 2-KGLA (Abb. 15). Der restliche Anteil des umgesetzten Sorbits diente bei den Stämmen IFO 3293 und N44-1 sowie den Mutanten dem Zellwachstum. Das bedeutete, dass die Sorbitoxidation mittels membrangebundener Dehydrogenasen durch die Inaktivierung der mGDH nicht beeinflusst wurde. Zudem wurde für die Oxidation von Sorbit zu Sorbose das Vorkommen vier verschiedener Enzyme beschrieben (Asai, 1968; Matsushita *et al.*, 2003), von denen drei membrangebunden sind (Shinagawa *et al.*, 1982). Die Sorbitoxidation konnte demnach über mehrere Enzyme erfolgen. Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass *G. suboxydans* eine mGDH besitzt, die nur Glucose umsetzt (Ameyama *et al.*, 1981a), was laut Genomsequenzierung ebenfalls für *G. oxydans* zutrifft (Prust *et al.*, 2005). Sorbit ist somit kein Substrat für die mGDH.

A)



B)

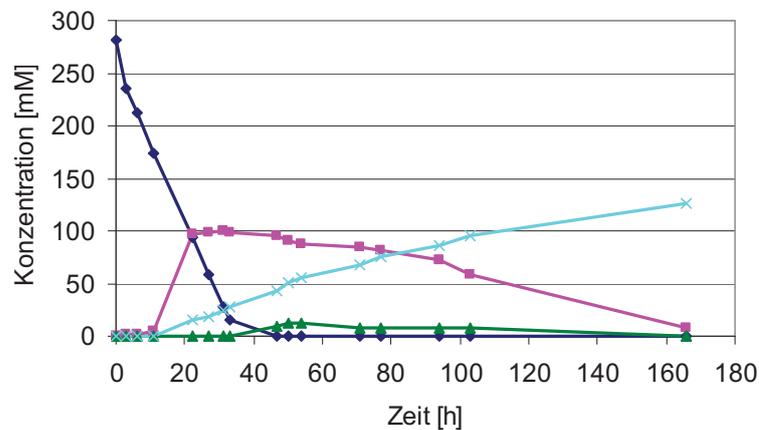


Abb. 15: Sorbitumsetzung beim Wachstum der *G. oxydans*-Stämme N44-1 *mgdh::kan* pBBR1MCS4 A) und N44-1  $\Delta$ *mgdh sgdh::kan* pBBR1MCS4 B) in No.5-Medium mit 50 g/l Sorbit. Sorbit (◆), Sorbose (■), Sorboson (▲) und 2-KGLA (×)

### 3.2.7 Auswirkungen der Überexpression der Enzyme Phosphoglucose-Isomerase und Transaldolase auf den Glucosestoffwechsel der Doppeldisruptante

Der Pentosephosphat-Weg ist in *G. oxydans* der vorwiegend genutzte Weg der Zuckerverstoffwechslung (De Ley und Swings; 1984; Asai, 1968) und als solcher für die Glucoseumsetzung von Interesse. Insbesondere die Phosphoglucose-Isomerase, die in *G. oxydans* mit der Transaldolase, einem weiteren Enzym des PPW, als bifunktionales Protein gebildet wird (GOX1704) (Sugiyama *et al.*, 2003; Prust, 2005), zeigte Einfluss auf die Biomasse- und CO<sub>2</sub>-Bildung des Bakteriums (Bremus, 2006). So konnte Bremus (2006) nachweisen, dass die PGI/TAL-Überproduktion in *G. oxydans* bei Wachstum auf dem Substrat Sorbit zu einer gesteigerten Biomasse-

produktion bei gleichzeitiger Erhöhung der CO<sub>2</sub>-Bildung führte, was auf eine gesteigerte Leistung des PPW zurückzuführen war (Sugiyama *et al.*, 2003; Bremus, 2006). Hingegen führte die Kultivierung des PGI/TAL-Überproduktion-Stammes *G. oxydans* N44-1 *pgi/tal-fw* auf Glucose nur zu einer sehr geringen Wachstumssteigerung (Bremus, 2006). Um zu sehen, welchen Einfluß die PGI/TAL-Überproduktion in der Doppeldisruptante N44-1  $\Delta mgdh sghd::kan$  hatte, wurde das Gen für die PGI und TAL im Stamm N44-1  $\Delta mgdh sghd::kan$  überexprimiert. Zudem wurde die PGI- oder TAL-Aktivität in der Doppeldisruptante gesteigert, um die Auswirkungen der Überexpression nur eines Gens festzustellen. Das überexprimierte Gen für die Phosphoglucose-Isomerase (*pgi*) und Transaldolase (*tal*), das zur Steigerung der Genexpression unter Kontrolle des starken *G. oxydans tufB*-Promotor gestellt worden war, wurde aus dem Vektor pBBR1MCS2, der eine Kanamycin-resistenzkassette besaß und deswegen für die Doppeldisruptante nicht verwendet werden konnte, in den Vektor pBBR1MCS5 umkloniert, der über eine Gentamycin-resistenzkassette verfügte. Der *G. oxydans*-Stamm N44-1  $\Delta mgdh sghd::kan$  wurde erfolgreich mit dem Plasmid pBBR1MCS5-*tufB-pgi/tal-fw* transformiert und im Anschluss sequenziert.

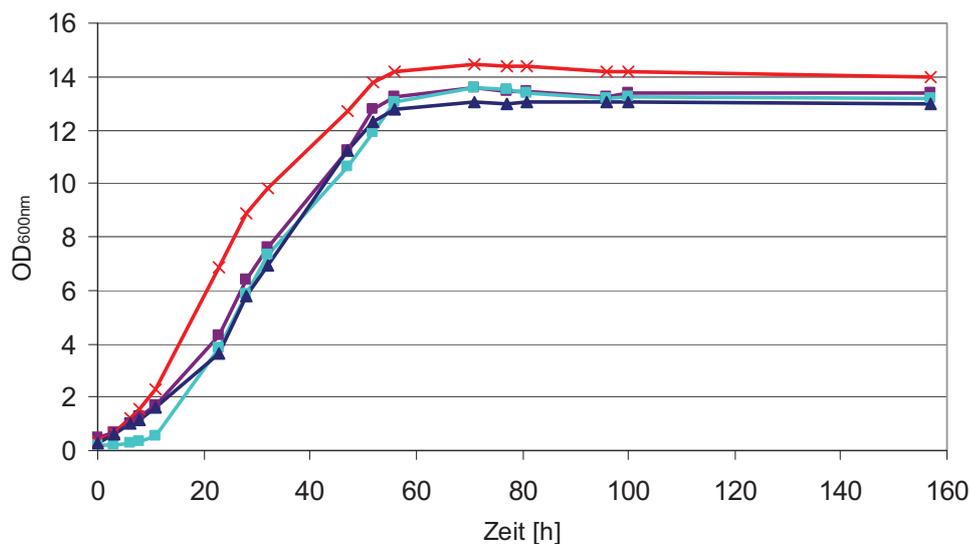
Um selektiv die Enzymaktivität des *pgi*- oder *tal*-Gens auszuschalten, wurden durch gezielten Nucleotidaustausch Mutationen in die DNA eingefügt. Nach Proteinexpression sollten die Mutationen in der DNA durch Austausch einzelner Aminosäuren im aktiven Zentrum des PGI- oder TAL-Proteins zur Synthese eines inaktiven Enzyms geführt haben. Zunächst wurden je 2 Nucleotide im *pgi*- bzw. *tal*-Gen mittels Site-directed-Mutagenese ausgetauscht. Die veränderten Genkonstrukte wurden in den Vektor pBBR1MCS5 umkloniert. Nach Verifizierung der Sequenz wurden die Plasmide in den Stamm N44-1  $\Delta mgdh sghd::kan$  eingebracht. Es wurden zwei PGI-Überproduzenten (*G. oxydans* N44-1  $\Delta mgdh sghd::kan$  pBBR1MCS5-*tufB-pgi/tal-fw* N57A und K153A) und zwei TAL-Überproduzenten (*G. oxydans* N44-1  $\Delta mgdh sghd::kan$  pBBR1MCS5-*tufB-pgi/tal-fw* T531A/E533A und R589A) konstruiert (Tab. 3). Um zu überprüfen, wie sich die Überexpression des *pgi/tal*-Gens bzw. die Aktivitätsausschaltung der PGI/TAL in der Doppeldisruptante auswirkt, wurden Aktivitätsmessungen, Kultivierungen im Schüttelkolben auf Glucosemedium und eine Analyse der Produkte und Substrate mittels HPLC durchgeführt.

**Tab. 13: Spezifische Enzymaktivität der Phosphoglucose-Isomerase und/oder Transaldolase in verschiedenen *G. oxydans*-Stämmen.** Als Leerplasmidkontrolle diente der *G. oxydans*-Stamm N44-1  $\Delta mgdh sghd::kan$  pBBR1MCS5.

<b><i>G. oxydans</i>-Stamm</b>	<b>PGI-Aktivität [U/mg Protein]</b>	<b>TAL-Aktivität [U/mg Protein]</b>
Leerplasmidkontrolle	2,57 +/- 0,01	0,31 +/- 0,01
PGI/TAL-Überproduzent	<b>6,53</b> +/- 1,21	<b>1,15</b> +/- 0,21
PGI-Überproduzent 1	<b>6,32</b> +/- 0,81	0,28 +/- 0,03
PGI-Überproduzent 2	<b>6,69</b> +/- 0,78	0,32 +/- 0,02
TAL-Überproduzent 1	2,48 +/- 0,07	<b>1,16</b> +/- 0,18
TAL-Überproduzent 2	2,15 +/- 0,02	<b>1,03</b> +/- 0,22

Die spezifische „Grund“-Aktivität der Phosphoglucose-Isomerase in der Doppel-disruptante war mit 2,57 U/mg Protein ca. 9-fach höher als die spezifische Aktivität der Transaldolase (0,31 U/mg Protein) (Tab. 13). Die PGI-Aktivität konnte durch die Überexpression erfolgreich um das 3-fache erhöht werden (PGI-Überproduzent 2: 6,69 U/mg Protein). Die TAL-Aktivität wurde um das 4-fache gesteigert (TAL-Überproduzent 1: 1,16 U/mg Protein). Die gemessenen Enzymaktivitäten stimmen mit den von C. Bremus (2006) ermittelten Werten überein.

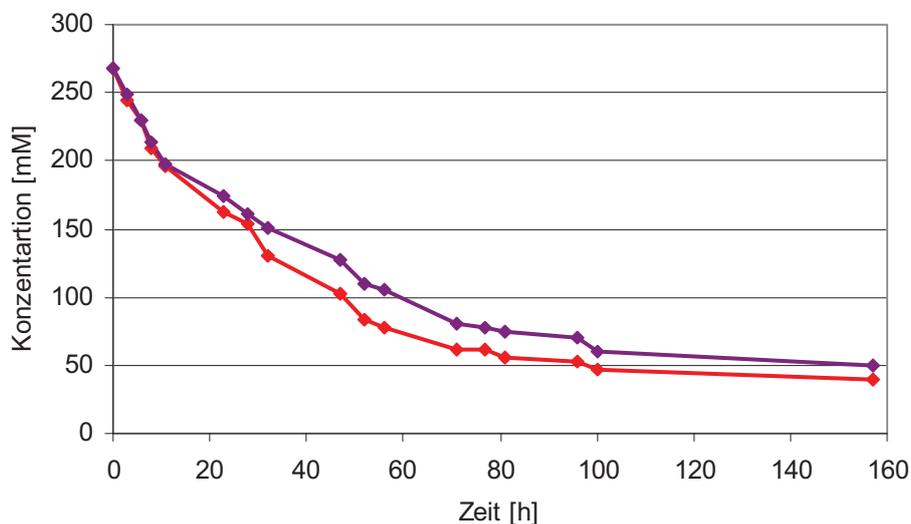
Die im Anschluss durchgeführten Wachstumsversuche auf 50 g/l Glucose zeigten ein gering höheres Wachstum des PGI/TAL-Überproduzenten (N44-1  $\Delta mgdh sghd::kan$  pBBR1MCS5-*tufB-pgi/tal-fw*) auf eine optische Dichte von 14,5 im Vergleich zum Leerplasmidstamm N44-1  $\Delta mgdh sghd::kan$  pBBR1MCS5 (End-OD<sub>600nm</sub>: 13,1) und den PGI- oder TAL-Überproduzenten (End-OD<sub>600nm</sub>: 13,6) (Abb. 16).



**Abb. 16:** Wachstum der *G. oxydans*-Stämme N44-1  $\Delta mgdh sghd::kan$  pBBR1MCS5-tufB-pgi/tal-fw (×), N44-1  $\Delta mgdh sghd::kan$  pBBR1MCS5-tufB-pgi/tal-fw K153A (PGI-Überproduzent 1) (■), N44-1  $\Delta mgdh sghd::kan$  pBBR1MCS5-tufB-pgi/tal-fw R589A (TAL-Überproduzent 2) (■) und N44-1  $\Delta mgdh sghd::kan$  pBBR1MCS5 (▲) in No.5-Medium mit 50 g/l Glucose.

Wachstumsversuche von Bremus (2006) mit dem Stamm N44-1 zeigten ebenfalls eine geringfügige Erhöhung der optischen Dichte durch die PGI/TAL-Überproduktion. Gründe für die nur geringe Wachstumssteigerung waren laut Bremus (2006) die schnelle Umsetzung von Glucose über das membrangebundene Enzymsystem und damit die geringe Einschleusung der Glucose in den PPW (Shinjo *et al.*, 1990; Bremus, 2006). Diese Begründung erklärte jedoch nicht die Wachstumsergebnisse dieser Arbeit, da in der vorliegenden Arbeit die PGI/TAL-Überproduktion in einem *G. oxydans*-Stamm mit inaktivierter mGDH und sGDH durchgeführt wurde. Die Glucose wurde bei diesem Disruptionstamm in die Zelle aufgenommen und in den PPW oder EDW eingeschleust, sichtbar an der höheren OD und ausbleibender Produktbildung von Gluconat, 2-KGA und 2,5-DKGA des Stammes N44-1  $\Delta mgdh sghd::kan$  im Vergleich zum Ausgangstamm (3.1). Die geringe Wachstumssteigerung der Doppeldisruptante durch die PGI/TAL-Überproduktion zeigte, dass die Stoffwechsellistung des PPW gesteigert wurde. Die Ergebnisse des Glucoseverbrauchs unterstützen diese Aussage, da der PGI/TAL-Überproduzent geringfügig mehr Glucose nutzte und die Glucose schneller aufnahm als der PGI-Überproduzent, der keine Wachstumssteigerung zeigte (Abb. 17). Allerdings wurde durch die PGI/TAL-Überproduktion keine vollständige Glucose-Verwertung erreicht; ca. 50 mM Glucose verblieben im Medium (Abb. 17). Die Glucoseverstoffwechslung des *G. oxydans*-Stammes N44-1  $\Delta mgdh sghd::kan$  pBBR1MCS5-tufB-pgi/tal-fw war aus bisher unbekanntem Gründen limitiert. Die selektive Steigerung der Aktivität der PGI

oder TAL-Aktivität zeigte keine positive Auswirkung auf das Wachstum. Demnach war bei Wachstum auf Glucose die gleichzeitige Aktivitätssteigerung beider Enzyme für ein erhöhtes Wachstum erforderlich. Das ist nachvollziehbar, da die PGI und TAL wie weitere Enzyme des PPW für den zyklischen Ablauf des PPW notwendig sind (Bremus, 2006). Für eine Steigerung der Leistung des PPW, ist die Erhöhung der Geschwindigkeit beider Reaktionen, der Wiedereinschleusung von Fructose-6-phosphat (PGI) und die Umsetzung von Sedoheptulose-7-Phosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat (TAL) notwendig. Bremus (2006) vermutete zudem, dass nicht nur die PGI und TAL sondern zusätzlich auch die Steigerung der Aktivität der Fructose-1,6-bisphosphatase für einen schnelleren zyklischen Ablauf der PPW-Reaktionen erforderlich ist.

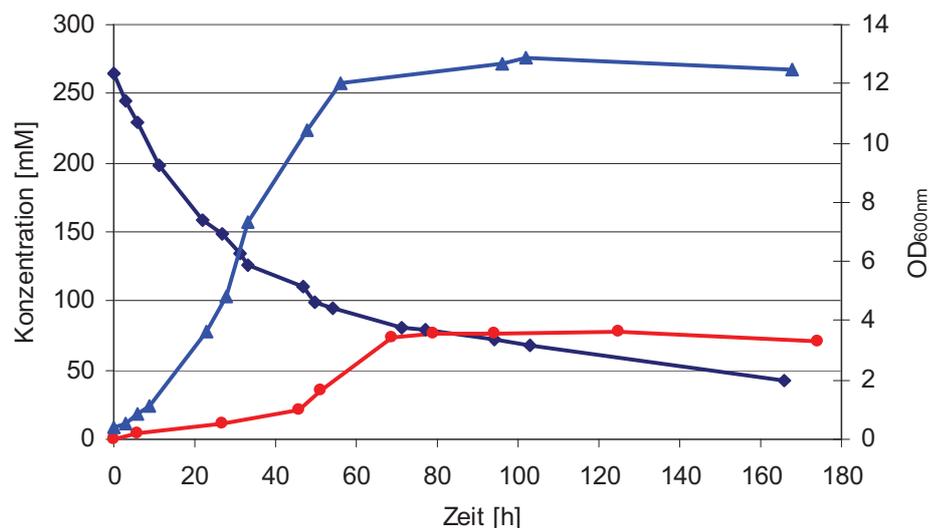


**Abb. 17: Glucoseverbrauch der *G. oxydans*-Stämme N44-1  $\Delta mgdh sghd::kan$  pBBR1MCS5-tufB-pgi/tal-fw (◆) und N44-1  $\Delta mgdh sghd::kan$  pBBR1MCS5-tufB-pgi/tal-fw K153A (PGI-Überproduzent 1) (♦) in No.5-Medium mit 50 g/l Glucose.**

### 3.2.8 Nachweis der Acetatproduktion der *G. oxydans*-Stämme N44-1 $mgdh::kan$ und N44-1 $\Delta mgdh sghd::kan$

Nachdem die *G. oxydans*-Stämme N44-1  $mgdh::kan$  (Einfachdisruptante) und N44-1  $\Delta mgdh sghd::kan$  (Doppeldisruptante) ihr Wachstum im Schüttelkolben auf Glucose beendet hatten, wurden 50-80 mM der restlichen Glucose weiter von den Stämmen verbraucht. Untersucht werden sollte, ob dieser Glucoseanteil zu Produkten umgesetzt wurde. Da die Glucose überwiegend über den PPW verstoffwechselt wird (Asai, 1968; De Ley und Swings; 1984), wurden intra- und extrazellulär die Konzentrationen von möglicherweise entstandenen PPW-Intermediaten wie Gluconat-6-phosphat, Lactat, Succinat, Pyruvat und Acetat mittels GC-MS und UV-Testsystemen

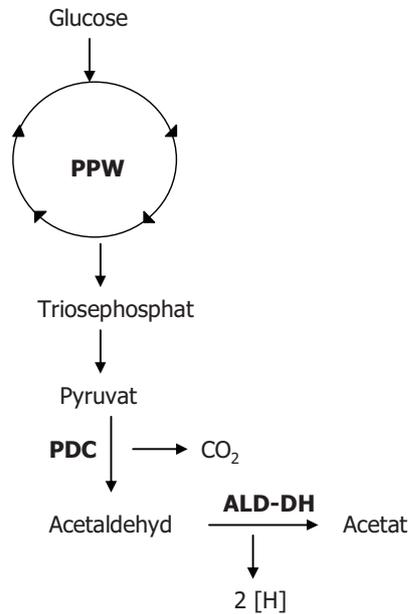
gemessen. Hierfür wurden Zellüberstände und aufgeschlossene Zellen des Ausgangsstammes N44-1, der Einfach- und der Doppeldisruptante während der Kultivierung im Schüttelkolben verwendet. Im Überstand der Einfach- und der Doppelmutterante konnten größere Mengen an Acetat festgestellt werden. Der Ausgangsstamm produzierte kein Acetat. Die Einfach- und die Doppeldisruptante bildeten ca. 78 mM Acetat. Da beide Mutanten die gleiche Menge produzierten, erklärte die Acetatbildung nicht das geringere Wachstum der Einfachmutante im Vergleich zur Doppeldisruptante. Im Schüttelkolben endete die Acetatproduktion mit dem Wachstum von *G. oxydans*. Die verbliebene Glucose wurde auch nach Wachstumsstopp und dem Ende der Acetatbildung verbraucht (Abb. 18). Die Acetatbildung ist demnach keine Erklärung für die Abnahme der Restglucose. Bei der Acetatproduktion handelte es sich sehr wahrscheinlich um einen Überflussmetabolismus, der auch bei anderen Mikroorganismen wie *E. coli* und *Bacillus subtilis* auftritt (Holm, 1996; Tobisch *et al.*, 1999).



**Abb. 18: Wachstum des *G. oxydans*-Stammes N44-1  $\Delta mgdh sgdh::kan$  pBBR1MCS4 (▲) im Schüttelkolben in No.5-Medium mit 50 g/l Glucose. Dargestellt sind die Abnahme der Glucosekonzentration (◆) und die Zunahme der Acetatkonzentration (●) während der Kultivierung.**

Über welche Wege die Einfach- und die Doppeldisruptante bei Wachstum auf Glucose Acetat bilden bzw. bilden können, ist noch nicht bekannt. Daher wurde nach Recherche der möglichen Wege anhand annotierter *G. oxydans* Enzyme (Prust *et al.* 2005), Literatur und anderen Acetat-bildenden Bakterien wie z.B. *E. coli*, ein möglicher Acetatbildungsweg prognostiziert (Holm, 1996; Tobisch *et al.*, 1999; Veit, 2005; Schweiger *et al.*, 2007). Angenommen wurde, dass Pyruvat mittels der Pyruvat-Decarboxylase (GOX1081) zu Acetaldehyd und CO<sub>2</sub> umgesetzt wird. Aus

Acetaldehyd würde dann durch die cytosolische Acetaldehyd-Dehydrogenase (GOX2018) und unter Entstehung von Reduktionsäquivalenten (NADH, NADPH) Acetat gebildet (Abb. 19).



**Abb. 19: Schematischer Weg der vermutlichen Acetatbildung in *G. oxydans*.** Abkürzungen: PDC, Pyruvat-Decarboxylase; ALD-DH, Acetaldehyd-Dehydrogenase; [H], Reduktionsäquivalente

Um festzustellen, ob Acetat über die PDC und ALD-DH in *G. oxydans* gebildet wird, wurde die Aktivität der beiden Enzyme gemessen. Hierfür wurden der Ausgangsstamm N44-1 und die Doppeldisruptante N44-1  $\Delta mgdh\ sgdh::kan$  im Schüttelkolben auf 50 g/l Glucose kultiviert. In der exponentiellen und der stationären Wachstumsphase wurden Zellen geerntet und in den Zellrohextrakten die Aktivitäten der PDC und ALD-DH bestimmt.

**Tab. 14: Aktivität der Pyruvat-Decarboxylase (PDC) und der Acetaldehyd-Dehydrogenase (ALD-DH) des Ausgangsstammes N44-1 und der Doppeldisruptante N44-1  $\Delta mgdh\ sgdh::kan$**

<i>G. oxydans</i> -Stamm	PDC-Aktivität [U/mg Protein]	ALD-DH-Aktivität [U/mg Protein]
N44-1	0,77 ± 0,11	6,80 ± 0.01
N44-1 $\Delta mgdh\ sgdh::kan$	0,79 ± 0,09	23,16 ± 0.01

In der Doppeldisruptante N44-1  $\Delta mgdh\ sghd::kan$  war die spezifische Aktivität der Pyruvat-Decarboxylase (Tab. 14) mit durchschnittlich 0,79 U/mg Protein deutlich geringer als die spezifische Aktivität der Acetaldehyd-Dehydrogenase mit 23,16 U/mg Protein. Im Stamm N44-1, der im Gegensatz zur Doppeldisruptante kein Acetat produzierte, wurde ebenfalls eine durchschnittliche PDC-Aktivität von 0,77 U/mg Protein gemessen. Die spezifische Aktivität der ALD-DH war mit 6,8 U/mg Protein geringer als in der Doppeldisruptante. Ein Vergleich der gemessenen PDC-Aktivität mit der spezifischen Aktivität der PDC in *G. suboxydans* (2,0 U/mg Protein) und *Z. mobilis* (7,5-11,0 U/mg Protein) zeigte, dass die PDC-Aktivität von *G. oxydans* N44-1 mit 0,78 U/mg Protein nur geringfügig unter dem Literaturwert von *G. suboxydans* lag (De Ley *et al.*, 1962; Bringer-Meyer *et al.*, 1986). Für die membran-gebundene Aldehyd-Dehydrogenase von *G. oxydans* wurde von Hoshino *et al.* (2005) eine Aktivität von 54,0 U/mg Protein bestimmt. Dieser Wert entsprach in der Größenordnung den in dieser Arbeit ermittelten Daten der cytosolischen ALD-DH von maximal 23,2 U/mg Protein. Zudem ist die Aktivität der membrangebundene Enzyme meist höher als der cytosolischen Enzyme (Deppenmeier *et al.*, 2002).

Wahrscheinlich wurde die ALD-DH-Synthese der Doppeldisruptante durch einen Pyruvat- und damit Acetaldehyd-Überschusses induziert. Wenn es sich bei der ALD-DH um ein Substrat induzierbares Enzym handelt, sollte die Zugabe von Acetaldehyd die ALD-DH aktivieren. Um diese These zu bestätigen, wurde die Doppeldisruptante erneut kultiviert. Zu Beginn der exponentiellen Phase wurden 20 mM Acetaldehyd ins Medium gegeben. Ein zweiter Ansatz ohne Zugabe von Acetaldehyd diente als Kontrollansatz. Nach 6 Stunden wurden die Zellen geerntet und die Aktivität der ALD-DH wurde bestimmt. Der Aktivitätsunterschied zwischen der induzierten Kultur und dem Kontrollansatz betrug 3,6 U/mg Protein. Demnach induzierte das Substrat Acetaldehyd die ALD-DH. Zudem wurde überprüft, ob die ALD-DH, deren Kofaktor NADP<sup>+</sup> ist, auch mit NAD<sup>+</sup> aktiv ist. Jedoch wurde nahezu keine Aktivität mit NAD<sup>+</sup> als Kofaktor gemessen. Daher handelt es sich bei der Acetaldehyd-Dehydrogenase von *G. oxydans* um ein NADP<sup>+</sup>-abhängiges Enzym.

### **3.3 Batch-Kultivierung von *G. oxydans* in einer Fermentationsanlage zur Verbesserung der Wachstumsbedingungen**

Bisher wurde die vollständige Aufnahme und Umsetzung von Glucose in der Doppeldisruptante N44-1  $\Delta mgdh\ sghd::kan$  nicht erreicht. Das Wachstum der Kultur endete, bevor die Glucose verbraucht war. Da es Hinweise mit Versuchen in Schüttelkolben gab, dass eine mangelnde Sauerstoffversorgung den Wachstumsstopp von *G. oxydans* N44-1  $\Delta mgdh\ sghd::kan$  verursacht, sollte die Doppeldisruptante unter kontinuierlicher Sauerstoffzufuhr und verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen in

einer Fermentationsanlage mit 50 g/l Glucose kultiviert werden. Die Konzentration an gelöstem Sauerstoff im Kulturmedium betrug über die gesamte Versuchsdauer 15% bzw. im Parallelansatz 30%. Der Ausgangsstamm N44-1 und die Einfachmutante N44-1 *mgdh::kan* wurden zur besseren Vergleichbarkeit ebenfalls in der Fermentationsanlage kultiviert. Die Sauerstoffkonzentration im Medium wurde während der Kultivierung konstant auf 15% gehalten. Das Arbeitsvolumen des Fermentersystems betrug 200 ml (Abb. 20). Im Fermentersystem wurden die Parameter Begasungsrate, Rührergeschwindigkeit, Temperatur, pH-Wert, Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxidpartialdruck konstant gehalten, wodurch die Wachstumsbedingungen verbessert wurden. Über die gesamte Kultivierungsdauer wurde die entstehende CO<sub>2</sub>-Menge gemessen, wodurch Rückschlüsse auf die im PPW verstoffwechselte Glucosemenge möglich waren. Da der Zitronensäurezyklus und die Glykolyse in *G. oxydans* unvollständig ablaufen, kann Glucose nur über den PPW oder EDW abgebaut werden (Asai, 1968; Macauley *et al.*, 2001). Da CO<sub>2</sub> nur beim Glucoseabbau mittels des PPW gebildet wird, ist eine Unterscheidung der beiden Stoffwechselwege anhand der CO<sub>2</sub>-Bildung möglich (Fluckiger und Ettlinger, 1977).

A)



B)



**Abb. 20: „Fedbatch-Pro“-Fermentationsanlage:** A) Aufbau des „Fedbatch-Pro“-Fermentersystems B) Detaillierte Darstellung des Fermentationssystems mit vier Kultivierungsgefäßen.

Wie bereits bei den vorherigen Versuchen im Schüttelkolben, erreichte der Stamm N44-1 die niedrigste und die Doppeldisruptante N44-1  $\Delta mgdh sgdh::kan$  die höchste optische Dichte. Insgesamt erhöhten sich jedoch bei allen drei Stämmen die Wachstumsdaten im Vergleich zum Schüttelkolben (Abb. 21; Tab. 15). Der Ausgangsstamm N44-1 wuchs auf eine OD<sub>600nm</sub> von 9,0 an und die Zellausbeute ( $Y_{X/S}$ ) betrug 0,09 g BTM/g Glucose. Verglichen mit den Zellausbeuten anderer *G. oxydans*-Stämme, z.B. von DSM 2343 ( $Y_{X/S} = 0,014$ ; Bremus, 2006) oder DSM 3504 ( $Y_{X/S} = 0,04$ ; Bremus, 2006), war die Ausbeute des Stammes N44-1 relativ hoch. Der Grund für die unter-

schiedlichen Biomasseausbeuten war die unterschiedliche Substratverwertung der Stämme. So oxidierte der *G. oxydans*-Stamm DSM 2343 93% der anfänglichen Glucose zu den Produkten 2-KGA und 5-KGA (Bremus, 2006) und verwendete 7% der Glucose für die Biomasseproduktion und CO<sub>2</sub>-Bildung. Der *G. oxydans*-Stamm N44-1 setzte 50% der Glucose zu 2-KGA/2,5-DKGA um (Abb. 22), was HPLC-Messungen zur Untersuchung des Substratverbrauchs und der Produktbildung zeigten. Die restlichen 50% standen der Biomasseproduktion und CO<sub>2</sub>-Bildung zur Verfügung.

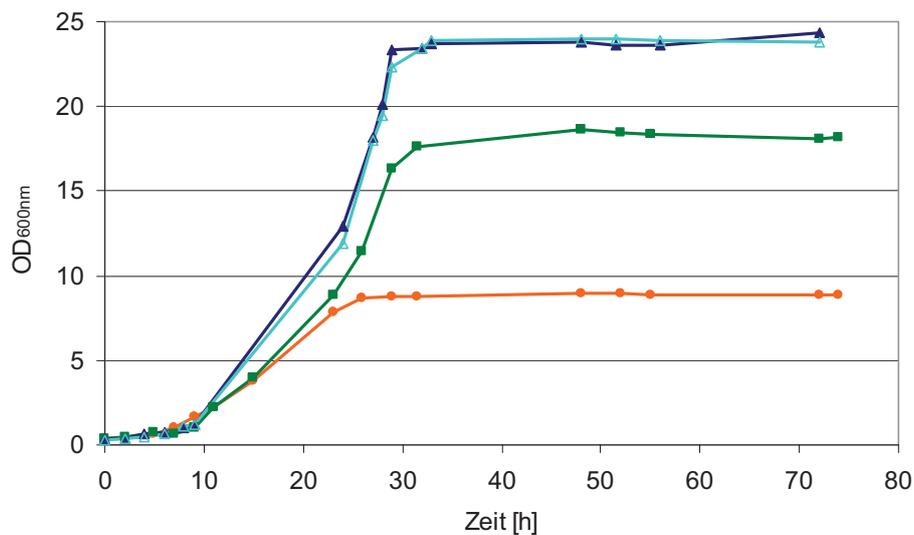


Abb. 21: Wachstum der *G. oxydans*-Stämme N44-1 pBBR1MCS4 (●), N44-1 *mgdh::kan* pBBR1MCS4 (■) und N44-1  $\Delta$ *mgdh sgdh::kan* pBBR1MCS4 mit 15% (▲) und 30% Gelöst-Sauerstoff (△) in Fermentern in No.5-Medium mit 50 g/l Glucose.

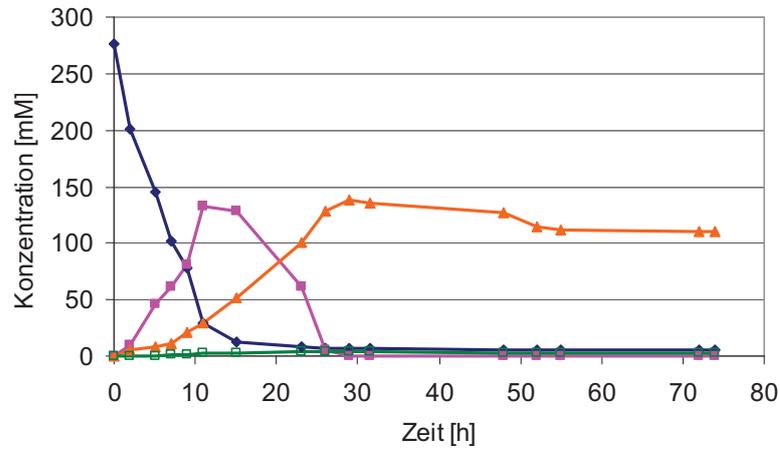
Tab. 15: Wachstumsdaten der *G. oxydans*-Stämme N44-1 in Fermentern mit 15% Gelöst-Sauerstoff bei Wachstum in No.5-Medium mit 50 g/l Glucose. Abkürzungen: BTM: Biotrockenmasse;  $\mu_{\max}$ : maximale Wachstumsrate;  $t_d$ : Verdopplungszeit;  $Y_{x/s}$ : Biomasseausbeutekoeffizient.

<i>G. oxydans</i> -Stamm	End-OD	BTM [g/l]	$\mu_{\max}$ [h <sup>-1</sup> ]	$t_d$ [h]	$Y_{x/s}$ [g BTM/g Glucose]
N44-1 pBBR1MCS4	9,0	2,1	0,18	3,9	0,09
N44-1 <i>mgdh::kan</i> pBBR1MCS4	18,7	4,4	0,25	2,8	0,12
N44-1 $\Delta$ <i>mgdh sgdh::kan</i> pBBR1MCS4	24,4	5,7	0,32	2,2	0,14

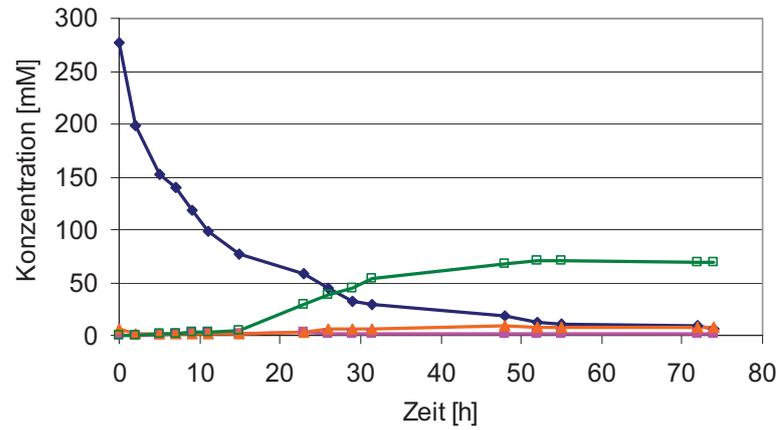
Die Doppeldisruptante erreichte die höchste optische Dichte von 24,4 und bildete am meisten Biomasse 5,7 g/l (Abb. 21 und Tab. 15). Die Zellausbeute ( $Y_{X/S}$ ) betrug 0,14 g BTM/g Glucose. Die Einfachmutante wuchs auf eine optische Dichte von 18,6 und hatte eine Zellausbeute ( $Y_{X/S}$ ) von 0,12 g BTM/g Glucose. Die Steigerung der Biomasseausbeute durch die Inaktivierung der sGDH in der Einfachmutante wurde bereits bei Versuchen im Schüttelkolben festgestellt und beruht auf einer effektiveren Glucoseverstoffwechslung (Tab. 15).

Die Analyse des Substratverbrauchs und der Produktbildung (Abb. 22) zeigten, dass die Einfach- und die Doppelmutante im Gegensatz zum Ausgangsstamm während der Fermentation kein Gluconat, 2-KGA und 2,5-DKGA produzierten, jedoch Acetat bildeten (ca. 85 mM), wie bereits bei Versuchen im Schüttelkolben gesehen. Erkennbar war, dass der Ausgangsstamm die Glucose (ca. 280 mM) sehr schnell zu Gluconat (ca. 140 mM) und das Gluconat sehr schnell weiter zu 2-KGA/2,5-DKGA (ca. 140 mM) oxidierte. Nach ca. 25 Stunden war das Wachstum beendet, ebenso die Substratumsetzung. Die Einfach- und die Doppelmutante hörten nach ca. 35 Stunden auf zu wachsen. Zu diesem Zeitpunkt war die Glucose nahezu verbraucht. Demnach endete das Wachstum der beiden *G. oxydans*-Stämme, weil kein Substrat mehr zur Verfügung stand. Das bestätigte die vermutete Limitierung der Glucoseumsetzung durch Sauerstoff. Andere Autoren berichten ebenfalls, dass eine ausreichende Sauerstoffzufuhr für den Stoffwechsel und das Wachstum von *G. oxydans* essentiell ist, da Sauerstoff z.B. als terminaler Elektronenakzeptor dient und die Bildung von Enzymen, die an der Glucose-Oxidation beteiligt sind, fördert (Buse *et al.*, 1992; Hemmerling, 1995; Gupta *et al.*, 2001; Macauley *et al.*, 2001). Die Doppeldisruptante erreichte bei einer Gelöst-Sauerstoffkonzentration von konstant 15% (entspricht 1,2 mg O<sub>2</sub>/l H<sub>2</sub>O; 1 bar, 25°C) die gleiche optische Dichte und Biomassebildung wie bei einer Konzentration von 30% (entspricht 2,4 mg O<sub>2</sub>/l H<sub>2</sub>O; 1 bar, 25°C) gelöstem Sauerstoff im Medium. Folglich reichte ein kontinuierlicher „Überschuss“ von 15% Sauerstoff im Medium für *G. oxydans* N44-1  $\Delta mgdh\ sgdh::kan$  aus, das Substrat Glucose optimal umzusetzen (Abb. 21, 22).

A)



B)



C)

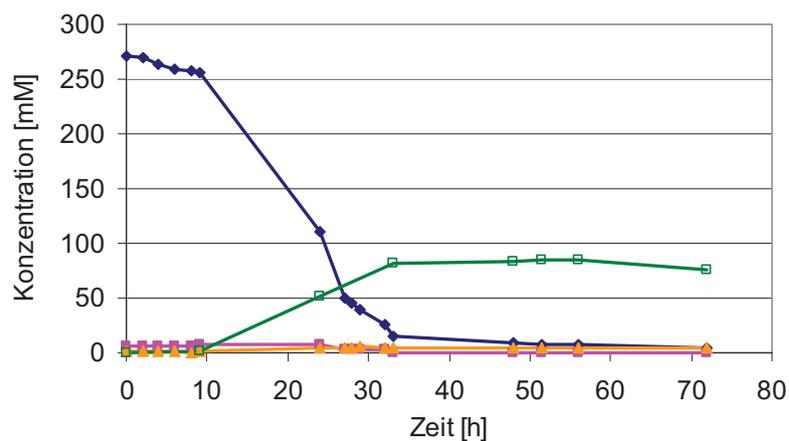
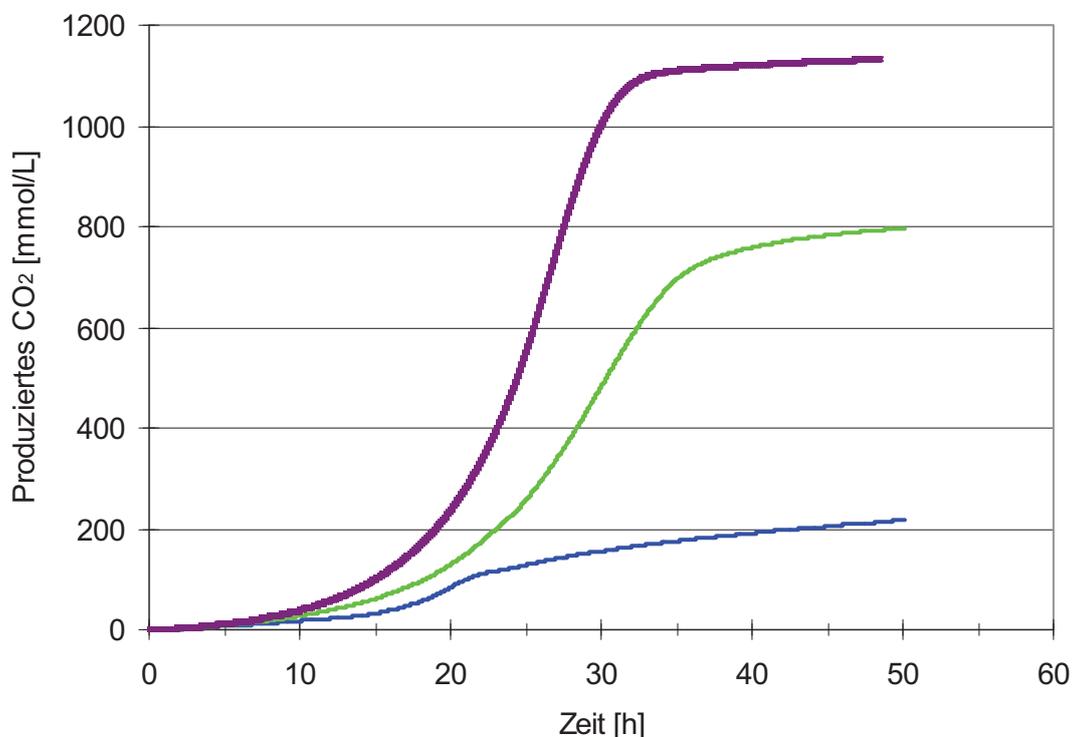


Abb. 22: Glucoseverbrauch und Produktbildung beim Wachstum des *G. oxydans*-Stammes N44-1 pBBR1MCS4 A), N44-1 *mgdh::kan* pBBR1MCS4 B) und N44-1  $\Delta$ *mgdh sgdh::kan* pBBR1MCS4 C) im Fermenter in No.5-Medium mit 50 g/l Glucose. Glucose (♦), Gluconat (■), 2-KGA/2,5-DKGA (▲) und Acetat (□)

Um zu bestätigen, dass die Glucose tatsächlich größtenteils über den PPW verstoffwechselt wird (De Ley und Swings; 1984; Asai, 1968), wurde zunächst die CO<sub>2</sub>-Produktion, die Biomassebildung und die Menge an assimiliertes Glucose der drei Stämme miteinander verglichen, was zeigte, dass ein Zusammenhang zwischen diesen Größen bestand. (Abb. 23, 24; Tab. 15, 16). Der Stamm N44-1 bildete 2,1 g BTM/l, nahm 6% Glucose auf und produzierte 0,3 mol/l CO<sub>2</sub>. Die Doppelmutante hingegen bildete mehr Biotrockenmasse 5,7 g BTM/l, nahm 70% Glucose auf und produzierte 1,1 mol/l CO<sub>2</sub>. Die CO<sub>2</sub>-Produktion steigerte sich mit Zunahme der assimilierten Glucose deutlich, was bedeutet, dass die Glucose intrazellulär hauptsächlich über den PPW verstoffwechselt wird.



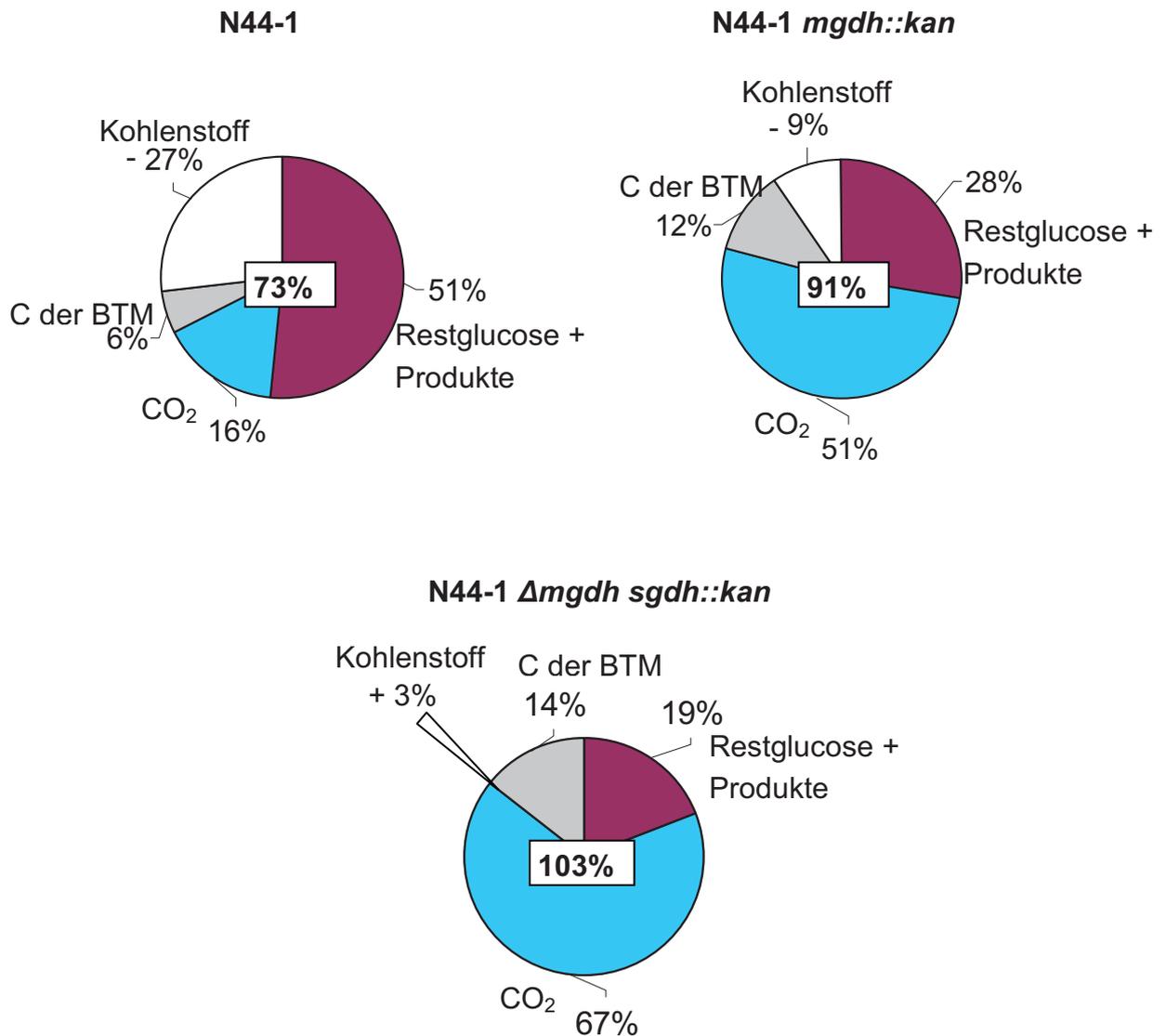
**Abb. 23: Produziertes CO<sub>2</sub> der *G. oxydans*-Stämme N44-1 pBBR1MCS4 (—), N44-1 *mgdh::kan* pBBR1MCS4 (—) und N44-1  $\Delta$ *mgdh sgdh::kan* pBBR1MCS4 mit 15% Gelöst-Sauerstoff (—) bei Kultivierung in No.5-Medium mit 50 g/l Glucose in Fermentern.**

Eine Kohlenstoffbilanzierung (Schell, 2002) unter Einbeziehung der CO<sub>2</sub>-Bildung während der Kultivierung und unter Berücksichtigung der nur für die Doppelmutante N44-1  $\Delta$ *mgdh sgdh::kan* durchgeführten TOC/DOC-Messung zeigte, dass die C-Bilanz der Doppelmutante (103%) im Gegensatz zu der Einfachmutante und dem Ausgangsstamm geschlossen war (Tab. 16, Abb. 24). Die Kohlenstoffbilanz des Stammes N44-1 war zu 73%, die C-Bilanz der Einfachmutante zu 91%

geschlossenen, die Bilanz war unvollständig; anzunehmen war, dass noch nicht alle Stoffwechselprodukte erfasst wurden (Schell, 2002). Der Ausgangsstamm bildete, vermutlich ausgehend von Glucose, bisher unbekannte Produkte; ebenso die Einfachmutante, was die genaue Betrachtung der Wachstums- und Kohlenstoffbilanzdaten bestätigte. Die Einfachdisruptante erreichte eine geringere optische Dichte als die Doppeldisruptante, obwohl sie die gleiche Menge an Glucose verbrauchte, die gleiche Acetatmenge bildete und keine Produkte wie Gluconat, 2-KGA und 2,5-DKGA produzierte (Abb. 22). Jedoch war die Zellausbeute der Einfachmutante mit 0,12 g BTM/g Glucose und die gebildete CO<sub>2</sub>-Menge (0,8 mol/l) geringer als bei der Doppelmutante (0,14 g BTM/g Glucose; 1,1 mol/l CO<sub>2</sub>) (Abb. 23, 24; Tab. 14, 16), was bedeutete, dass die Einfachmutante weniger Glucose für ihre Biomasseproduktion nutzte und weitere, bisher unbekannte Nebenprodukte bildete, eventuell über das intrazellulär mittels der sGDH entstehende Gluconat. Um herauszufinden, um welche Produkte es sich handelte, wurden Überstände aller drei Stämme mittels GC-MS untersucht.

**Tab. 16: Daten der Kohlenstoffbilanz der *G. oxydans*-Stämme N44-1 bei Wachstum im Fermenter in No.5-Medium mit 50 g/l Glucose.** Die angegebenen Zahlenwerte beziehen sich auf atomaren Kohlenstoff. Beispiel: Zu Beginn der Fermentation, zum Zeitpunkt 0 h, befinden sich 19,9 g atomarer Glucose-Kohlenstoff in 1 Liter Medium, also 0,276 mol Glucose-Moleküle (50 g/l), im Medium. Abkürzungen: C, Kohlenstoff; C in BTM = 51%, der Kohlenstoffanteil der Biotrockenmasse beträgt 51% (Quelle: <http://www.wasser-wissen.de/abwasserlexikon/b/bakterien.htm>); C in BTM, Kohlenstoffanteil der Biotrockenmasse.

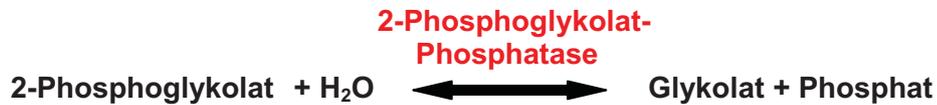
<i>G. oxydans</i> -Stamm	Glucose 0h [g C/l]	Restglucose + Produkte 33h [g C/l]	CO <sub>2</sub> [g C/l]	(C in BTM = 51%) C der BTM [g C/l]	Bilanz
N44-1 pBBR1MCS4	19,9	10,3	3,2	1,1	73%
N44-1 <i>mgdh::kan</i> pBBR1MCS4	19,7	5,5	10,1	2,3	91%
N44-1 $\Delta$ <i>mgdh</i> <i>sgdh::kan</i> pBBR1MCS4	19,5	3,9	13,4	2,9	103%



**Abb. 24: Kohlenstoffbilanz der *G. oxydans*-Stämme N44-1.** Zur besseren Veranschaulichung sind die Ergebnisse der Tab. 16 graphisch dargestellt.

Es stellte sich heraus, dass der Stamm N44-1, in geringeren Mengen aber auch die Einfach- und die Doppeldisruptante, Glykolsäure produzierten. Für eine bessere Quantifizierung wurden die Überstände in der HPLC erneut auf Glykolsäure hin untersucht (Friedrich und Schink, 1993). Die HPLC-Ergebnisse bestätigten die Bildung von Glykolsäure, insbesondere beim Ausgangsstamm, allerdings in vernachlässigbarer Konzentration von maximal 26 mM (Daten nicht gezeigt), die nicht merklich zur Schließung der C-Bilanz des Stammes beitrug. In *G. oxydans* kann Glykolat aus 2-Phosphoglykolat über die 2-Phosphoglykolat-Phosphatase (GOX0579) gebildet werden (Prust *et al.* 2005) (Abb. 25; Anhang, Abb. 29).

Anscheinend reichert sich die Glykolsäure im Medium an, da *G. oxydans* über kein Glykolsäure abbauendes Enzyme verfügt (Prust *et al.* 2005).



**Abb. 25: Schematischer Stoffwechselweg zur Glykolatbildung in *G. oxydans*.**

Durch die GC-MS-Analyse wurden bei dem Wildstamm auch größere Mengen an Pentonsäuren wie Xylonsäure, Ribonsäure und Arabinonsäure gemessen. Pentosen wie L- und D-Arabinose, D-Xylose und D-Ribose entstehen im PPW aus Hexosen (z.B. Glucose) durch Decarboxylierung. Bekannt ist, dass *Pseudomonaden* und *Acetobacter*-Arten Pentosen weiteroxidieren, wobei die entsprechenden Lactone entstehen, die mittels Lactonasen zu Pentonsäuren umgesetzt werden (Lockwood und Nelson, 1946; Lampen, 1953; Weimberg, 1960; Gleason und Barker, 1970; Brouns *et al.*, 2006). Eventuell handelte es sich bei der Pentonsäureentstehung, wie bei der Acetatbildung, um eine Überflusreaktion.

Um zu überprüfen, ob es sich bei den gemessenen Substanzen tatsächlich um Pentonsäuren handelte, wurden D-Arabino-1,4-lacton und D-Ribono- $\gamma$ -lacton als Positiv-Kontrollen in einer erneuten GC-MS-Messung mitgeführt. Da zudem festgestellt werden sollte, ob die Pentonsäuren in der ring- oder offenkettigen Form vorkamen, wurden die Lactone gespalten (Morgunov und Perchenko, 1978) und ebenfalls als Positiv-Kontrolle in die GC-MS Messung eingesetzt. Die GC-MS-Analyse bestätigte mit 99 %iger Sicherheit die beim Stamm N44-1 gefundenen Substanzen als Pentonsäuren. Die offenkettige Form wurde beim Ausgangsstamm gefunden, nicht die Lactone, feststellbar unter anderem anhand der unterschiedlichen Retentionszeiten. Die Menge der entstandenen Pentonsäuren wurden durch Vergleich mit der bekannten Positiv-Kontroll-Konzentration ermittelt und ergaben, dass ca. 20 mM Pentonsäuren vom Stamm N44-1 gebildet wurden.

## 4 Diskussion

*G. oxydans* wird auf Grund seiner schnellen, unvollständigen Oxidation vieler Zucker und Alkohole für verschiedene biotechnologische Prozesse eingesetzt (Gupta *et al.*, 2001; Deppenmeier *et al.*, 2002; De Muyneck *et al.*, 2007; Raspor und Goranovič, 2008). Ein Nachteil beim Einsatz von *G. oxydans* für die Gewinnung industriell wichtiger Produkte, wie z.B. Vitamin C, ist seine geringe Biomassebildung. Bislang sind keine Arbeiten bekannt, in denen der Biomasseertrag von *G. oxydans* erhöht werden konnte. Daher sollte in dieser Arbeit versucht werden, einen *G. oxydans*-Stamm zu konstruieren, der auf Glucose eine hohe Biomasseproduktion aufweist.

### 4.1 Glucoseverstoffwechslung der Ausgangsstämme

Um festzustellen, wie die *G. oxydans*-Ausgangsstämme IFO 3293 und N44-1 (entstanden durch Mutagenese aus dem Stamm IFO 3293) das Substrat Glucose verwerten, wurden die Stämme bezüglich ihres Wachstums, ihres Substratverbrauches und ihrer Produktbildung untersucht. Zunächst durchgeführte Versuche zur Medienoptimierung bestätigten das geringere Wachstum von *G. oxydans* auf chemisch definiertem Medium, was bereits von anderen Autoren beobachtet wurde (Stokes und Larsen, 1945; Rao und Stokes, 1953). Laut Wethmar und Deckwer (1999) ist der höhere Energiebedarf, der für die Biosynthese verschiedener Monomere nötig ist, Grund für das geringe Wachstum. Diese Energie steht nicht mehr für das Wachstum der Zellen zur Verfügung. Stokes und Larsen (1945) beobachteten ebenfalls das beste Wachstum auf Hefeextrakt-Medium. Als essentielle Wachstumsfaktoren für *G. oxydans* sind Pantothenensäure, Niacin, Thiamine, p-Aminobenzoesäure und eine C-Quelle wie Sorbit oder Glucose bekannt (Gosselé *et al.*, 1980). Die Zugabe von verschiedenen Nährstoffen, wie unter anderem Pantothenensäure, Niacin, Glutamin und Ammoniumphosphat zum Komplexmedium zeigten keine positiven Auswirkungen auf das Wachstum; diese Substanzen lagen demnach nicht in wachstumslimitierenden Konzentrationen vor. Aminosäuren sind für *G. oxydans* nicht essentiell (Gosselé *et al.*, 1981), da Ammoniumionen als Stickstoffquelle genutzt werden (Stokes und Larsen, 1945) oder die Synthese der Aminosäuren über den unvollständigen Zitronensäurezyklus erfolgt (Macauley *et al.*, 2001); ihre Zugabe führt zu keinem erhöhten Zellwachstum (Gosselé *et al.*, 1981). Allerdings erzielten Wethmar und Deckwer (1999) durch Zugabe der Aminosäuren Glutamin und Serin ein höheres Wachstum von *G. oxydans*, was für Glutamin in dieser Arbeit nicht bestätigt werden konnte. Das Wachstum von *G. oxydans* N44-1 erhöhte sich durch die Zugabe von Glutamin nicht.

Der *G. oxydans*-Stamm IFO 3293 und insbesondere der Stamm N44-1 wuchsen im Schüttelkolben auf Glucose nur auf eine sehr geringe optische Dichte an, was Untersuchungen der Firma DSM Nutritional Products bestätigten. Der Stamm N44-1 erreichte eine  $OD_{600nm}$  von 3,7 und Biomasseerträge von 0,05 g BTM/g Glucose. Vergleiche mit Biomasseausbeuten von z.B. *Corynebakterium glutamicum* ( $Y_{X/S} \sim 0,4$  g BTM/g C-Quelle; Wendisch *et al.*, 2000) und *E. coli* ( $Y_{X/S} \sim 0,5$  g BTM/g C-Quelle; Hernandez und Johnson, 1967; Tempest und Neijssel, 1987) zeigten, dass die Biomasseausbeuten von *G. oxydans* deutlich geringer sind. Bereits andere Autoren stellten fest, dass *G. oxydans* ein schlechter Biomasseproduzent ist (Hernandez und Johnson, 1967; Olijve, 1978; Deppenmeier *et al.*, 2002). Die schlechte Biomassebildung von *G. oxydans* erklärt sich dadurch, dass Glucose (C-Quelle) nicht wie bei *E. coli* und *C. glutamicum* intrazellulär über den zentralen Stoffwechsel abgebaut wird, sondern an der Membran zu unvollständig oxidierten Produkten umgesetzt wird, die im Medium akkumulieren (Gupta *et al.*, 2001; De Muijnck *et al.*, 2007). Die Stämme IFO 3293 und N44-1 setzten Glucose zu den Oxidationsprodukten Gluconat, 2-KGA und 2,5-DKGA um (Abb. 6A). Die Membranoxidation der Substrate mittels der membrangebundenen Dehydrogenasen liefert *G. oxydans* Energie (Olijve und Kok, 1979; Linton und Rye, 1989; Prust *et al.*, 2005; Raspor und Goranovič, 2008). Zur Biomassebildung jedoch müssen die Substrate (Glucose) von der Zelle aufgenommen und intrazellulär verstoffwechselt werden (Prust *et al.*, 2005).

Vergleicht man allerdings den Stamm N44-1 mit dem Stamm IFO 3293, dann nutzte der Stamm IFO 3293 die Glucose effektiver zur Biomasseproduktion, sichtbar an der hohen Zellausbeute von 0,09 g BTM/g Glucose. Substrat- und Produktanalysen ergaben jedoch, dass beide Stämme die gleiche Menge Glucose über die membrangebundenen Dehydrogenasen zu Gluconat, 2-KGA und 2,5-DKGA umsetzten. Der Stamm N44-1 bildete mit der gleichen Menge an Glucose weniger Biomasse als der Stamm IFO 3293. Da der Stamm N44-1 durch ungerichtete Mutagenese aus dem Stamm IFO 3293 entstanden ist, sind die molekularen Gründe für die ineffiziente Glucoseverstoffwechslung, die zu einer geringeren Biomassebildung führten, nicht bekannt (Sugisawa *et al.*, 1991a,b). Die assimilierte Glucose wird bei *G. oxydans* hauptsächlich über den PPW verstoffwechselt (Macauley *et al.*, 2001), was anhand der Korrelation zwischen assimilierter Glucose und gebildetem  $CO_2$  während einer Kultivierung in dieser Arbeit bestätigt werden konnte (3.3). Enzyme des PPW könnten daher bei dem Stamm IFO 3293 eine höhere Aktivität besitzen, was zu einer effektiveren Glucoseverstoffwechslung führen würde (Bremus, 2006). Die Enzymaktivitäten der Fructokinase, Phosphoglucose-Isomerase und Transaldolase unterschieden sich bei Stämmen N44-1 und IFO 3293 jedoch kaum (Bremus, 2006). Versuche zur Verstoffwechslung von Sorbit zeigten, dass beide Stämme eine optische Dichte von ca. 10 erreichten, wobei beide Stämme die gleiche Sorbitmenge zum

Wachstum nutzten (3.2.6). Demnach ist nur die Glucose- nicht die Sorbitverstoffwechslung des Stammes N44-1 ineffizient.

Um das Wachstum und die Biomassebildung des Stammes N44-1 auf Glucose zu erhöhen, disruptierte die Firma DSM Nutritional Products das Gen für die membrangebundenen Glucose-Dehydrogenase.

#### 4.2 Glucoseverstoffwechslung der Einfachdisruptante

*G. oxydans* N44-1 nutzt vornehmlich die membrangebundene Enzyme zur Glucoseumsetzung, sichtbar an der schnellen Oxidation von Glucose zu Gluconat mittels der membrangebundenen Glucose-Dehydrogenase (Abb. 6A). Olijve und Kok (1979a) berichten ebenfalls, dass unter Aufrechterhaltung eines neutralen pH-Wertes während der Kultivierung von *G. oxydans*, Glucose über die membrangebundenen Dehydrogenasen oxidiert wird. Glucosekonzentrationen von über 15 mM im Medium führen laut der Autoren zur Hemmung der Enzyme des PPW, verhindern daher die intrazelluläre Verstoffwechslung von Glucose (Olijve und Kok, 1979a; Tramper *et al.*, 1983). Erst nach Absinken der Glucosekonzentration unter 15 mM erfolgt die Aufnahme von Glucose, Gluconat und 2-KGA von der Zelle und deren Verstoffwechslung über den PPW (Olijve und Kok, 1979a). Daher war es fraglich, ob und wie gut der *G. oxydans*-Stamm N44-1 nach der Disruption der mGDH wachsen würde. Wachstumsversuche auf Glucose zeigten, dass die Mutante im Vergleich zum Stamm N44-1 die höchste optische Dichte ( $OD_{600nm}:10,1$ ) und die höchste Zellausbeute mit 0,08 g BTM/g Glucose erreichte. Die Glucose wurde bei dem Stamm N44-1 *mgdh::kan* vermehrt von der Zelle aufgenommen und zur Biomassebildung genutzt. Diese Annahme wurde dadurch bestätigt, dass die beim Ausgangsstamm N44-1 auftretenden Oxidationsprodukte Gluconat, 2-KGA und 2,5-DKGA von der Einfachdisruptante nicht mehr gebildet wurden. Die Ergebnisse zeigten, dass *G. oxydans* N44-1 ohne die membrangebundene Glucose-Dehydrogenase in der Lage ist, Glucose zu metabolisieren.

Die Einfachdisruptante N44-1 *mgdh::kan* assimilierte die Glucose auch bei Konzentrationen von 276 mM im Medium. Zudem bildete der Stamm größere Mengen an CO<sub>2</sub>, was bedeutet, dass Glucose über den PPW verstoffwechselt wurde und die Enzyme des PPW nicht gehemmt waren. Anzunehmen ist, dass es zur Hemmung der Enzyme des PPW (Olijve und Kok; 1979a) nur kommt, wenn beide Wege, die Oxidation von Glucose an der Membran und die intrazelluläre Verstoffwechslung, möglich sind.

Dadurch, dass der *G. oxydans*-Stamm N44-1 *mgdh::kan* die Glucose über den PPW verstoffwechselt, gewinnt der Organismus mehr Energie als über die unvollständige

Oxidation an der Membran, und es entstehen zudem Reduktionsäquivalente für reduktive Biosynthesen (Matsushita *et al.*, 1994; Luttk *et al.*, 1997; Sugiyama *et al.*, 2003; Raspor und Goranovič, 2008), die für die Biomasseproduktion verantwortlich sind (Bremus, 2006), was die erhöhte Zellausbeute (0,08 g BTM/g Glucose) des Stammes N44-1 *mgdh::kan* verdeutlicht. Die Zellerträge von z.B. *E. coli* sind jedoch auch im Vergleich zum Stamm N44-1 *mgdh::kan* deutlich höher (Hernandez und Johnson, 1967), da Organismen wie *E. coli* über den Abbau der Substrate mittels Glykolyse und Zitronensäurezyklus mehr Reduktionsäquivalente, nötig als Endoxidasen in der Atmungskette und mehr Energie (ATP) gewinnen, als *G. oxydans* beim Substratabbau über den PPW (Schlegel, 1992).

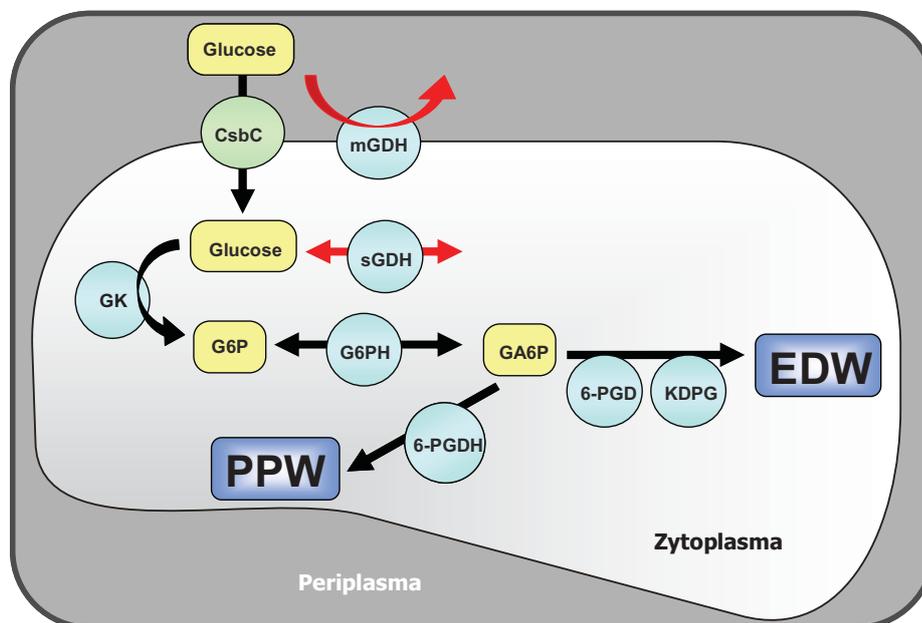
Gupta *et al.* (1997) deletierten in dem Stamm *G. oxydans* ATCC 9937 ebenfalls das Gen für die membrangebundene Glucose-Dehydrogenase und zwar durch Transposon-Mutagenese. Die Autoren stellten fest, dass sich die spezifische Aktivität der membrangebundenen Gluconat-2-Dehydrogenase verdoppelte und der membrangebundenen 2-Keto-Gluconat-Dehydrogenase verfünffachte. Eine Kultivierung der Mutante auf Glucose wurde nicht durchgeführt, daher liegen keine Ergebnisse zum Wachstum der GDH<sup>-</sup>Mutanten vor. Wenn Glucose an der Membran jedoch nicht mehr zu Gluconat oxidiert werden kann, da die mGDH inaktiv ist, dann steht für die mGA-2-DH und im Folgenden auch für die membrangebundene 2-KGDH kein Substrat zur Verfügung, was umgesetzt werden könnte. Daher sollte die GDH<sup>-</sup>Mutanten des Stammes ATCC 9937 wie der Stamm N44-1 *mgdh::kan* die Glucose intrazellulär verstoffwechseln und dadurch höhere Wachstumsraten und Zellausbeuten erreichen. Der Grund für die erhöhte Steigerung der Enzymaktivität waren laut der Autoren polare Effekte, hervorgerufen durch die Methode der Transposon-Mutagenese. Merfort (2006) nimmt hingegen an, dass sich durch den Wegfall eines Membranproteins die Gesamtproteinkonzentration der Membranproteine verringerte, was zu einer Erhöhung der spezifischen Aktivität der verbleibenden Proteine führte.

### 4.3 Konstruktion und Untersuchung der Doppeldisruptante

Mehrere Autoren berichten, dass die Bildung von Gluconat und Gluconsäure das Zellwachstum von *G. oxydans* hemmt (Olijve und Kok, 1979a/b; Pöhland *et al.*, 1993; Velizarov und Beschkov, 1998; Peekhaus *et al.*, 1998; Godjevargova *et al.*, 2004). Pöhland *et al.* (1993) postulierten, dass Gluconsäure in hohen Konzentrationen (210 g/l Medium) indirekt, durch Absenkung des pH-Wertes auf 1,8-2,0, das Wachstum und die Atmung von Essigsäurebakterien hemmt. In sehr saurem Milieu (pH < 3) kommt es bei *G. oxydans* zur Bildung einer inaktiven Alkohol-Dehydrogenase, was weitere Enzyme von *Gluconobacter* betreffen könnte (Velizarov und Beschkov, 1998). Velizarov und Beschkov (1998) verdeutlichten, dass Gluconat in hohen Kon-

zentrationen die Enzymaktivität, z.B. der membrangebundenen Glucose-Dehydrogenase hemmt, was zur Inhibierung des Zellwachstums von *G. oxydans* führte. Bei einer Konzentration von 0,7 mol Gluconsäure im Medium stellte *G. oxydans* sein Wachstum ein (Velizarov und Beschkov, 1998). Um zusätzlich zur membranabhängigen Gluconat-Bildung, auch die intrazelluläre Gluconat-Bildung zu unterbinden und dadurch die intrazelluläre Glucoseumsetzung zu erhöhen, wurde das Gen für die cytosolische Gluconat-Dehydrogenase in der Einfachmutante disruptiert.

Die Inaktivierung der sGDH in der mGDH-Mutante (Abb. 26) führte bei Kultivierung im Schüttelkolben zu einer 3,5-fachen Wachstumssteigerung auf 50 g/l Glucose ( $OD_{600nm}$ : 13) und zu einer Verdopplung der Biomasseausbeute (0,10 g BTM/g Glucose) im Vergleich zum Stamm N44-1. Dieses Resultat zeigte, dass *G. oxydans* N44-1 die Glucose durch Inaktivierung der sGDH noch effektiver für seine Biomassebildung nutzte. Zunächst wurde Glucose über die Glucose-Permease (CsbC) von der Zelle aufgenommen; *G. oxydans* verfügt nicht über ein PTS-System (Prust *et al.*, 2005). Intrazellulär konnte die Glucose nur noch über die Glucose-Kinase (GK) verstoffwechselt werden (Abb. 26). Die intrazelluläre Bildung von Gluconat und 2-KGA wurde verhindert. Demnach stand mehr Glucose für eine direkte Phosphorylierung und Einschleusung in den zentralen Metabolismus zur Verfügung, wodurch mehr Energie gewonnen wurde, die *G. oxydans* für sein Wachstum nutzte.



**Abb. 26: Schema des Glucosestoffwechsels von *G. oxydans* N44-1  $\Delta mgdh$   $sgdh::kan$ .** Glucose wird in der Doppeldisruptante intrazellulär verstoffwechselt. Abkürzungen: G6P, Glucose-6-Phosphat; GA6P, 6-Phosphogluconat; G6PH, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und Gluconolactonase; 6-PGDH, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase; 6-PGD, 6-Phosphogluconat-Dehydrase; KDPG, 2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat-Aldolase.

Die Kultivierung des Stammes N44-1, der Einfachmutante N44-1 *mgdh::kan* und der Doppeldisruptante N44-1  $\Delta$ *mgdh sgdh::kan* im Fermentersystem zeigte, dass *G. oxydans* durch Verbesserung der Wachstumsbedingungen höhere optische Dichte und Zellausbeuten erreichte. So erreichte die Doppeldisruptante eine im Vergleich zum Schüttelkolben doppelt so hohe optische Dichte von 24,4. Speziell führte eine ausreichende und kontinuierliche Sauerstoffversorgung dazu, dass Glucose vollständig von den drei *G. oxydans*-Stämmen metabolisiert wurde. Auch Macauley *et al.* (2001) stellte fest, dass eine Erhöhung der Sauerstoffzufuhr das Wachstum von *G. oxydans* steigert. Eine Konzentration von 30% gelöstem Sauerstoff erhöht die Glucoseverstoffwechslung, da Sauerstoff (durch Induktion der Gene) die Produktion von Enzymen, die am Glucosestoffwechsel beteiligt sind, steigert; insbesondere die Aktivität der membrangebundenen Glucose-Dehydrogenasen ist abhängig vom Sauerstoff (Buse *et al.*, 1990; Silberbach *et al.*, 2003). Höhere Sauerstoffkonzentrationen verbessern das Wachstum nicht (Buse *et al.*, 1990), möglicherweise wirkt dann der Sauerstofftransport in die Zelle limitierend (Tramper *et al.*, 1983).

Olijve und Kok (1979) berichten, dass der molare Wachstumsertrag von *G. oxydans* in kontinuierlicher Kultur im Chemostaten bei einer Verdünnungsrate von  $0,05 \text{ h}^{-1}$  (Volumenwechsel pro Stunde)  $19,5 \text{ g TG/mol Glucose}$ , also  $0,11 \text{ g TG/g Glucose}$  beträgt. In dieser Arbeit wurden für *G. oxydans* N44-1 im Fermentersystem Zellausbeuten von  $0,09 \text{ g BTM/g Glucose}$  gemessen. Für den Stamm N44-1  $\Delta$ *mgdh sgdh::kan* lagen die Ausbeuten sogar bei  $0,14 \text{ g BTM/g Glucose}$ , was über den von Olijve und Kok (1979b) ermittelten Ausbeuten liegt. Allerdings sind die Ergebnisse dieser Arbeit nicht direkt vergleichbar mit den Werten von Olijve und Kok (1979b), da die Wachstumsbedingungen unterschiedlich waren. Olijve und Kok (1979b) kultivierten *G. oxydans* unter Stickstoff oder Glucose limitierenden Bedingungen im Chemostaten. Anstatt kontinuierlich eine bestimmte Glucosemenge zuzuführen, wurde in dieser Arbeit die gesamte Glucosemenge zu Beginn in den Kultivierungsansatz gegeben. Die unterschiedliche Glucose- und Nährstoffzufuhr führt bei *G. oxydans* vermutlich zu verschiedenen Zellausbeuten (Fritsche, 1999).

#### 4.4 Optimierungversuche der Glucoseverstoffwechslung

Zur Verbesserung der intrazellulären Glucoseverstoffwechslung wurde das Gen für die Glucose-Kinase überexprimiert. Im *G. oxydans*-Stamm N44-1 kodieren zwei Gene für je eine Glucose-Kinase. Der sequenzierte *G. oxydans*-Stamm 621H besitzt ebenfalls zwei Genprodukte zur Phosphorylierung von Glucose zu Glucose-6-Phosphat, eine Glucose-Kinase mit der Genbezeichnung GOX1182 und eine mit der Genbezeichnung GOX2419 (Prust *et al.*, 2005). Bei beiden Enzymen handelt es sich,

um nur das Substrat Glucose phosphorylierende Glucose-Kinasen (Doelle, 1982; Edey *et al.*, 1990; Quaade *et al.*, 1991; Mukai *et al.*, 2003; Prust *et al.*, 2005) und nicht um verschiedene Substrate phosphorylierende Hexokinasen (Lunin *et al.*, 2004). Eine Hexokinase wurde z.B. bei *E. coli* nachgewiesen mit einem  $K_m$ -Wert von 0,15 mM für das Substrat Glucose (Arora und Pedersen, 1995). Für die Glucose-Kinase von *Z. mobilis* wurde ein  $K_m$ -Wert von 0,25 mM für das Substrat Glucose ermittelt (DiMarco und Romano, 1984) und bei Wachstum auf Glucose eine Aktivität von 0,041 U/mg Protein festgestellt (Ait-Abdelkader *et al.*, 1996). Die in dieser Arbeit gemessene spezifische Aktivität der Glucose-Kinase von 0,06 U/mg Protein, gemessen in der *G. oxydans*-Doppeldisruptante, entsprach diesem Literaturwert. Im Stamm N44-1 und der Einfachdisruptante N44-1 *mgdh::kan* wurden sehr viel höhere Aktivitätswerte gemessen (0,46 und 0,73 U/mg Protein). Woher diese *in vitro* ermittelten Aktivitätsunterschiede stammen, ist fraglich; denn anscheinend ruft allein die Inaktivierung der sGDH diesen Aktivitätsabfall hervor. Möglicherweise sind intrazelluläre Regulationsmechanismen, die sich auf die Enzymsynthese auswirken, für den „*in vitro*“ gemessenen Aktivitätsverlust verantwortlich (Fritsche, 1992). So könnte die gebildete sGDH als Induktor fungieren und die Synthese der GK regulieren. Bekannt sind verschiedene Mechanismen wie Substrat- oder Produkthemmung, mit denen Bakterien *in vivo* die Enzymsynthese oder -aktivität regulieren (Fritsche, 1999; Brown, 1999). In *Z. mobilis* kommen Gene, die für Enzyme des Glucosestoffwechsels kodieren, wie der Glucose-Fascilitator, die Glucose-Kinase, die 6-Phosphogluconat-Dehydratase und die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, in einem Gencluster vor und unterliegen einer gemeinsamen Regulation (Barnell *et al.*, 1990; Barnell *et al.*, 1992). Da die Gene für die GK und den GLF in einem Operon vorkommen, vermutete Parker *et al.* (1995), dass in *Z. mobilis* die gebildeten Enzyme, also die Glucose-Kinase und der Glucose-Fascilitator, miteinander interagieren, indem z.B. die GK die Affinität von Glucose zum Glucose-Fascilitator erhöht; mögliche Mechanismen wurden nicht diskutiert (Parker *et al.*, 1995). Daher ist es ebenfalls denkbar, dass, obwohl die *sgdh* und *gk*-Gene nicht in einem Operon vorkommen, die Genprodukte, die sGDH und GK, sich gegenseitig beeinflussen, da beide an der Glucoseverstoffwechslung beteiligt sind. Da beide Enzyme um das Substrat Glucose konkurrieren, wurde durch die Inaktivierung der sGDH eigentlich eine Steigerung der GK-Aktivität in dem Stamm N44-1  $\Delta mgdh sgdh::kan$  erwartet.

Die Aktivität der GKI und der GKII konnte durch die Überexpression der Gene gesteigert werden, in der Doppeldisruptante sogar um das 5-fache. Jedoch führte diese Steigerung in keinem der *G. oxydans*-Stämme zu einer gesteigerten Glucoseverstoffwechslung oder zu einem höheren Wachstum auf Glucose.

#### 4.5 Acetatbildung der Einfach- und der Doppeldisruptante

Eine Analyse weiterer Nebenprodukte lieferte das Ergebnis, dass die Einfachmutante N44-1 *mgdh::kan* und die Doppeldisruptante N44-1  $\Delta$ *mgdh sgdh::kan* während der Kultivierung auf Glucose im Gegensatz zum Ausgangsstamm N44-1 Acetat bildeten. Bei der aeroben Acetatbildung der *G. oxydans*-Stämme N44-1 *mgdh::kan* und N44-1  $\Delta$ *mgdh sgdh::kan* handelt es sich sehr wahrscheinlich um einen so genannten Überflusmetabolismus, bei dem Metabolite des Zentralstoffwechsels ins Medium ausgeschieden werden, und der auch bei anderen Organismen wie *E. coli* beobachtet wurde (Veit, 2005). Bei *E. coli* tritt die aerobe Acetatbildung z.B. unter hohen Glucosekonzentrationen auf (Holms, 1996; Veit, 2005). Die molekularen Grundlagen und Regulationsmechanismen konnten bei *E. coli* weitestgehend aufgeklärt werden. Demnach ist die Leistung der zentralen Stoffwechselwege wie des Zitronensäurezyklus im Vergleich zur Glucoseaufnahme zu gering (Holms, 1996). Veit (2005) konnte nachweisen, dass sich bei Glucoseüberfluss die Synthese der Enzyme des Zitronensäurezyklus verringert, was zu einer reduzierten Aktivität des Zitronensäurezyklus führt, wodurch die aerobe Acetatbildung hervorgerufen wird.

Bei *G. oxydans* kann wie bei *E. coli* ein Glucoseüberfluss zur Acetatbildung führen. Der Stamm N44-1 oxidiert das Substrat Glucose über das membrangebundene Enzymsystem. Nur ein sehr geringer Glucoseanteil gelangt in die Zelle und wird über den PPW verstoffwechselt, was das Auftreten eines Überflusmetabolismus verhindert. Die Einfach- und die Doppeldisruptante nehmen hingegen durch die Inaktivierung der mGDH die Glucose in die Zelle auf und metabolisieren die Glucose im zentralen Stoffwechsel. Da *G. oxydans* die Enzyme für eine vollständig ablaufende Glykolyse und Zitronensäurezyklus fehlen (Macauley *et al.*, 2006), kann die gesamte Glucose nur über den PPW, der hauptsächlich für die Glucoseverstoffwechslung genutzt wird (De Ley und Swings, 1984), abgebaut werden. Da es bei der Einfach- und der Doppelmutter zur Anhäufung von Acetat kommt, ist demnach die Kapazität des zyklisch ablaufenden PPW zu hoch; es kommt zur Anreicherung von Pyruvat, dass zu Acetat umgesetzt wird.

Zur Aufklärung, über welchen enzymatischen Weg die *G. oxydans*-Mutanten bei Wachstum auf Glucose Acetat bilden, wurden mögliche annotierte Wege (Prust *et al.*, 2005) überprüft und mit bekannten Acetatbildnern wie *E. coli* (Veit, 2005) verglichen. Enzymmessungen ergaben die intrazelluläre Acetatbildung in *G. oxydans* über die cytosolische Pyruvat-Decarboxylase und die cytosolische Acetaldehyd-Dehydrogenase. Der Kofaktor NADP<sup>+</sup> der ALD-DH wurde experimentell bestätigt. Über die ALD-DH abhängige Acetatbildung gewinnen die *G. oxydans*-Mutanten demnach Reduktionsäquivalente in Form von NADPH. Die PDC- und ALD-DH Aktivitäts-

messungen verdeutlichten, dass es sich bei der PDC um ein schwach aktives, konstitutiv exprimiertes Enzym handelt (0,78 U/mg Protein), wohingegen die ALD-DH ein durch Acetaldehyd induzierbares Enzym mit einer Schwankungsbreite von 6,8 bis 23,2 U/mg Protein ist. In *Acetobacter pasteurianus* konnte ebenfalls eine PDC-Aktivität nachgewiesen werden. Die Höhe der Aktivität hing von der C-Quelle ab und war auf dem Substrat Lactat mit 2,6 U/mg Protein am stärksten (Raj *et al.*, 2001). Die PDC setzte das durch die Lactat-Dehydrogenase entstandene Pyruvat weiter zu Acetaldehyd um, welches toxisch für die Zelle ist (Wecker und Zell, 1987; Jokelainen *et al.*, 1994). Acetaldehyd inhibierte die PDC Aktivität (Bauchop und Dawes, 1959). Die Autoren Raj *et al.* (2001) vermuteten daher, dass die ebenfalls in *Acetobacter pasteurianus* vorhandene Aldehyd-Dehydrogenase (Acetaldehyd-Dehydrogenase) die Inaktivierung der PDC durch Acetaldehyd verhinderte. Die Aldehyd-Dehydrogenase oxidiert Acetaldehyd unter NAD(P)H-Entstehung zu Acetat (Raj *et al.*, 2001). Die Acetaldehyd-Dehydrogenase in der *G. oxydans* Einfach- und der Doppeldisruptante katalysiert die gleiche Reaktion und schützt demnach die PDC ebenfalls vor Inaktivierung durch Acetaldehyd. Eine NADP<sup>+</sup>-abhängige cytosolische Aldehyd-Dehydrogenase (GOX1122), die bevorzugt Acetaldehyd als Substrat umsetzt, wurde kürzlich auch in *G. oxydans* 621H entdeckt (Schweiger *et al.*, 2007).

#### 4.6 C-Bilanzierung

Für die Doppeldisruptante war die Kohlenstoffbilanz, die mittels der TOC/DOC-Messung und unter Berücksichtigung des gebildeten CO<sub>2</sub> während der Kultivierung aufgestellt wurde, mit 103% geschlossen. Demnach wurde während der Kultivierung im Fermentersystem das Substrat Glucose vollständig umgesetzt. Das bedeutet, dass *G. oxydans* ohne die mGDH und sGDH effizient auf Glucose wächst und das Substrat Glucose dabei vollständig metabolisiert.

Der Stamm N44-1 (73%) und die Einfachmutante (91%) zeigten im Gegensatz zur Doppeldisruptante (103%) keine geschlossene C-Bilanz, da die C-Bilanz nicht auf TOC/DOC-Messergebnissen beruht, die alle C-Verbindungen erfasst, sondern auf der Addition des Kohlenstoffs der Produkte, des Kohlenstoffs der Biotrockenmasse und des gebildeten CO<sub>2</sub>. Weitere Untersuchungen mittels GC-MS zur Auffindung von Nebenprodukten führten zu der Vermutung, die vom Stamm N44-1 in höheren Konzentrationen und von der Einfach- und der Doppelmutter in geringeren Konzentrationen produzierte Glykolsäure könnte die fehlende C-Menge ausgleichen. Allerdings war die von den *G. oxydans*-Stämmen produzierte Glykolsäuremenge mit maximal 26 mM zu gering, als dass sie zur Schließung der C-Bilanz hätte beitragen können. Die Ermittlung weiterer Nebenprodukte zur Schließung der C-Bilanz des Ausgangsstammes und der Einfachmutante zeigten, dass der *G. oxydans*-Stamm

N44-1 Pentonsäuren bildete, allerdings nur in Konzentrationen von ca. 20 mM. Einige *Acetobacter*-Stämmen sind laut Literatur in der Lage, Pentosen zu den entsprechenden Pentonsäuren zu oxidieren (Bernhauer und Riedl-Tumova, 1950; Colowick und Kaplan, 1951; Ferrier *et al.*, 1962), jedoch konnten Bernhauer und Riedl-Tumova (1950) nicht beweisen, dass die entstandenen Pentonsäuren von *Acetobacter* weiter zu Keto-Pentonsäuren oxidiert wurden, obwohl der gleiche Organismus nachweislich aus Hexosen Keto-Hexonsäuren bildete. Auch *Gluconobacter*-Arten, wie *G. liquefaciens*, oxidieren Hexosen und Pentosen zu Hexonaten und Pentonaten (De Ley, 1960), wobei *Gluconobacter* die Pentonsäuren ebenfalls nicht weiteroxidiert, sondern anhäuft. Laut De Ley und Dochy (1960a) finden die Pentose- und Hexose-Oxidationen an der Membran statt, was auch Hoshino *et al.* (2001) bestätigten. Die Autoren Hoshino *et al.* (2001) isolierten aus *G. oxydans* DSM 4025 eine membrangebundene Aldehyd-Dehydrogenase (ADH), die verschiedene Aldehyde zu den entsprechenden Karbonsäuren oxidierte. Die Pentosen D-Xylose, D-Ribose und D-Arabinose wurden von der PQQ-abhängigen ADH mit relativ hoher Aktivität zu den Pentonsäuren D-Xylonsäure, D-Ribonsäure und D-Arabinonsäure oxidiert (Hoshino *et al.*, 2001). Die genannten Literaturbeispiele zeigen, dass *G. oxydans* Pentonsäuren über das membran-gebundene Enzymsystem herstellen kann. Die während des Glucoseabbaus im PPW entstandenen Pentosen können wieder ausgeschleust und an der Membran oxidiert werden, wobei in Form von Reduktionsäquivalenten zusätzlich Energie gewonnen wird (Brouns *et al.*, 2006).

Fasst man abschließend alle ermittelten Daten der Kohlenstoffbilanz zusammen, inklusive der Glykolsäure- und Pentonsäurekonzentration, so schließt sich die C-Bilanz des Stammes N44-1 zu 84%. Da eine Unterscheidung der Pentonsäuren mittels GC-MS nicht möglich war, könnte eine chromatographischer Analyse, wie HPLC (Weimberg, 1960; Rangappa *et al.*, 1998), eine 100 %ige Bestimmung der gemessenen Substanz als Pentonsäure, bzw. als D-Xylonsäure, D-Ribonsäure oder D-Arabinonsäure, ermöglichen. Die bisherige Identifizierung der mittels GC-MS ermittelten Substanz beruhte auf Retentionszeitenvergleich mit den Positiv-Kontrollen D-Ribonsäure und D-Arabinonsäure.

## 5 Zusammenfassung

*Gluconobacter oxydans* dient der großtechnischen Produktion einiger biotechnologisch wichtiger Substanzen. Nachteilig bei diesen mikrobiellen Verfahren ist die geringe Biomasseausbeute des Bakteriums. Es war deshalb das Ziel dieser Arbeit, einen *G. oxydans*-Stamm mit hoher Wachstumsrate und Biomasseausbeute zu konstruieren.

Wie die Untersuchungen zur Glucoseverwertung ergaben, oxidiert der *G. oxydans*-Stamm N44-1 die Glucose über membrangebundene Enzyme zu Gluconat, 2-Keto-D-Gluconat und 2,5-Di-Keto-Gluconat; nur eine geringe Substrat-Menge wurde intrazellulär für das Wachstum verstoffwechselt. Hingegen zeigte die Mutante, bei der das Gen für die membrangebundene Glucose-Dehydrogenase disruptiert war, eine erhöhte Biomassebildung auf dem Substrat Glucose, da kein Gluconat, 2-Keto-D-Gluconat und 2,5-Di-Keto-Gluconat gebildet wurde.

Zur gezielten Erhöhung der intrazellulären Glucoseumsetzung und Biomassebildung wurde danach auch das Gen für die cytosolische Glucose-Dehydrogenase in dem *G. oxydans*-Stamm mit der inaktiven membrangebundenen Glucose-Dehydrogenase disruptiert. Diese Doppeldisruptante bildete eine zweifach höhere Biomassekonzentration als der Ausgangsstamm.

Um die Glucosenutzung weiter zu verbessern, wurden die Gene für die Glucose-Kinase und die Glucose-Permease in den *G. oxydans*-Stämmen überexprimiert. Jedoch konnte dadurch die Biomassebildung nicht gesteigert werden.

Interessanterweise bilden die Mutanten im Gegensatz zum Ausgangsstamm als Nebenprodukt Acetat. Dabei handelt es sich vermutlich um einen Überflussmetabolismus. Wie Enzymmessungen ergaben, erfolgte die Acetatbildung vermutlich aus Pyruvat über die Pyruvat-Decarboxylase und die Acetaldehyd-Dehydrogenase.

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass ein *G. oxydans*-Stamm ohne die membrangebundene Glucose-Dehydrogenase in der Lage ist, effizient auf Glucose bei ausreichender Sauerstoffversorgung zu wachsen. Wie eine C-Bilanz gezeigt hat, wurde das Substrat Glucose dabei vollständig metabolisiert.

## 6 Abstract

*Gluconobacter oxydans* is used for the commercial production of a number of biotechnologically important substances. A disadvantage of this microbial process is the low biomass yield of the bacterium. The aim of the work presented here was therefore to construct a *G. oxydans* strain with a high growth rate and biomass yield.

As revealed by the studies on glucose utilization, *G. oxydans* strain N44-1 oxidizes glucose via membrane-bound enzymes to gluconate, 2-keto-D-gluconate and 2,5-diketo-gluconate. Only a low quantity of substrate was metabolized intracellularly for growth. In contrast, the mutant in which the gene for membrane-bound glucose dehydrogenase was disrupted displayed increased biomass formation on the glucose substrate since no gluconate, 2-keto-D-gluconate or 2,5-diketo-gluconate was formed.

In order to selectively increase the intracellular glucose conversion and biomass formation, the gene for cytosolic glucose dehydrogenase in the *G. oxydans* strain with inactive membrane-bound glucose dehydrogenase was then also disrupted. The biomass concentration formed by this double disruptant was twice that of the original strain.

For a further improvement in glucose utilization, the genes for glucose kinase and glucose permease were overexpressed in the *G. oxydans* strains. However, this did not increase biomass formation.

It is interesting to note that, in contrast to the original strain, the mutants form acetate as a by-product. This is probably an excess metabolism. As shown by enzyme measurements, acetate was probably formed from pyruvate via pyruvate decarboxylase and acetaldehyde dehydrogenase.

The present work showed for the first time that with a sufficient supply of oxygen a *G. oxydans* strain without the membrane-bound glucose dehydrogenase is capable of growing efficiently on glucose. As shown by a C balance, the glucose substrate was completely metabolized.

## 7 Literaturverzeichnis

**Adachi, O., Fujii, Y., Ghaly, M. F., Toyma, H., Shinagawa, E., Matsushita, K. (2001).** Membrane-bound quinoprotein D-arabitol dehydrogenase of *Gluconobacter suboxydans* IFO 3257: a versatile enzyme for the oxidative fermentation of various ketoses. *Biosci Biotechnol Biochem* **65**: 2755-62.

**Adachi, O., Moonmangmee, D., Shinagawa, E., Toyma, H., Yamada, M., Matsushita, K. (2002).** New quinoproteins in oxidative fermentation. *Biochim Biophys Acta* **164**: 10-7.

**Ahsen, N., Wittwer, C. T., Schütz, E. (2001).** Oligonucleotide melting temperatures under PCR conditions: Nearest-neighbor corrections for  $Mg^{2+}$ , deoxynucleotide triphosphate, and dimethyl sulfoxide concentrations with comparison to alternative empirical formulas. *Clin Chem* **47**: 1956-61.

**Ait-Abdelkader, N., Pencreach, G., Joset, F., Baratti, J. (1996).** Isolation and properties of mutants of *Zymomonas mobilis* deficient in sugar assimilation. *Appl Environ Microbiol* **62**: 1096-8.

**Ameyama, M., Shinagawa, E., Matsushita, K., Adachi, O. (1981a).** D-Glucose dehydrogenase of *Gluconobacter suboxydans*: solubilization, purification and characterization. *Agric Biol Chem* **45**: 851-61.

**Ameyama, M., Adachi, O. (1982b).** 2-Ketogluconate reductase from acetic acid bacteria. *Meth Enzymol* **89**: 203-10.

**Ansorge, W., Sproat, B., Stegemann, J., Schwager, C., Zenke, M. (1987).** Automated DNA sequencing: ultrasensitive detection of fluorescent bands during electrophoresis. *Nucl Acid Res.* **15**: 4593-602.

**Arcuri, E. J. (1982).** Continuous ethanol production and cell growth in an immobilized-cell bioreactor employing *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol Bioeng* **24**: 596-604.

**Arora, K. K., Pedersen, P. L. (1995).** Glucokinase of *Escherichia coli*: Induction in response to the stress of overexpressing foreign proteins. *Arch Biochem Biophys* **319**: 574-8.

**Asai, T. (1968).** Acetic acid bacteria. Classification and biochemical activities. University of Tokyo Press. ISBN: 68-24816.

**Bäumchen, C. (2007).** Reduktive Ganzzellbiotransformation zur Gewinnung chiraler Alkohole mit *Bacillus megaterium* und *Corynebacterium glutamicum*. Berichte des Forschungszentrums Jülich. **Jül-Bericht 4265.**

**Barnell, W. O., Cheol, K., Conway, T. (1990).** Sequence and genetic organization of a *Zymomonas mobilis* gene cluster that encodes several enzymes of glucose metabolism. *J Bacteriol* **172**: 7227-40.

**Barnell, W. O., Liu, J., Hesman, T. L., O'Neill, M. C., Conway, T. (1992).** The *Zymomonas mobilis* *glf*, *zwf*, *edd*, and *glk* genes form an operon: Localization of the promoter and identification of a conserved sequence in the regulatory region. *J Bacteriol* **174**: 2816-23.

**Bathey, A. S., Schaffner, D. W. (2001).** Modelling bacterial spoilage in cold-filled ready to drink beverages by *Acinetobacter calcoaceticus* and *Gluconobacter oxydans*. *J Appl Microbiol* **91**: 237-47.

**Bauchop, T., Dawes, E. A. (1959).** Metabolism of pyruvic and formic acids of *Zymosarcina ventriculi*. *Biochim Biophys Acta* **36**: 294-6.

**Bernhauer, K., Riedl-Tumova, E. (1950).** Oxidation by *Acetobacter*. 10. Oxidation of enantiomorphic forms of xylose and arabinose. *Biochem Z* **321**: 26-30.

**Birnboim, H. C., Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Acid Res* **7**: 1513-23.

**Boudrant, J. (1990).** Microbial processes for ascorbic acid biosynthesis: a review. *Enzym Microb Technol* **12**: 322-9.

**Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-54.

**Bremus, C. (2006).** Untersuchungen zur Bildung der Vitamin C-Vorstufe 2-Keto-L-Gulonsäure mit *Gluconobacter oxydans*. Berichte des Forschungszentrums Jülich. **Jül-Bericht 4233.**

**Bremus, C., Herrmann, U., Bringer-Meyer, S., Sahm, H. (2006).** The use of microorganisms in L-ascorbic acid production. *J Biotechnol.* **124**: 1096-205.

**Bringer-Meyer, S., Schmiz, K.-L., Sahm, H. (1986).** Pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. Isolation and partial characterization. *Arch Microbiol* **146**: 105-10.

- Bringer-Meyer, S., Sahm, H. (1987).** Ethanol Herstellung mit Bakterien. Chem Ing Tech **59**: 695-700.
- Brouns, S. J. J., Walther J., Snijders, A. P. L., Van de Werken, H. J. G., Willemen, H. L. D. M., Worm, P., De Vos, M. G. J., Andersson, A., Lundgren, M., Mazon, H. F. M., Van den Heuvel, R. H. H., Nilsson, P., Salmon, L., De Vos, W. M., Wright, P. C., Bernander, R., Van der Oost, J. (2006).** Identification of the missing links in prokaryotic pentose oxidation pathways. J Biological Chem **281**: 27378-88.
- Brown, T. A. (1999).** Moderne Genetik. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin.
- Buse, R., Qazi, G. N., Träger, M., Onken, U. (1990).** Influence dissolved oxygen tension on the production rate of 2,5-diketogluconic acid by *Gluconobacter oxydans*. Biotechnol. Lett. **12**:111-6.
- Buse, R., Onken, U., Qazi, G. N., Sharman, N., Parshad, R., Verma, V. (1992).** Influence of dilution rate and dissolved oxygen concentration on continuous keto acid production by *Gluconobacter oxydans* subsp. *melanogenum*. Enz Micro Technol **14**: 1001-6.
- Campbell, L. K., Baker, D. E., Campbell, R. K. (2000).** Miglitol: assessment of its role in the treatment of patients with diabetes mellitus. Ann Pharmacother **34**: 1291-1301.
- Choi, K-H., Kumar, A., 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. J Microbiol Methods **64**: 391-397.
- Claret, C., Salmon, J. M., Romieu, C., Bories, A. (1994).** Physiology of *Gluconobacter oxydans* during dihydroxyacetone production from glycerol. Appl Microbiol Biotechnol **41**: 359-65.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., Hsu, L. (1972).** Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. Proc Natl Acad Sci **69**: 2110-4.
- Colowick, S. P., Kaplan, N. O. (1951).** Carbohydrate metabolism. Annu Rev Biochem **20**: 513-58.

**Condon, C., FitzGerald, R. J., O`Gara, F. (1991).** Conjugation and heterologous gene expression in *Gluconobacter oxydans* ssp. *suboxydans*. FEMS Microbiol Let **80**: 173-8.

**Connell, T. D., Martone, A. J., Holmes, R. K. (1995).** A new mobilizable cosmid vector for use in *Vibrio cholerae* and other Gram<sup>-</sup> bacteria. Genec **153**: 85-7.

**De Ley, J. (1960).** Comparative carbohydrate metabolism and localization of enzymes in *Pseudomonas* and related micro-organisms. J Appl Bact **23**: 400-41.

**De Ley, J., Dochy R. (1960).** On the localisation of oxidase systems in *Acetobacter* cells. Biochim Biophys Acta **40**:277-89.

**De Ley, J., Schell J. (1962).** Lactate and pyruvate catabolism in acetic acid bacteria. J Gen Microbiol **29**: 589-601.

**De Ley, J., Swings, J. (1981).** The genera *Gluconobacter* and *Acetobacter*. In: The Prokaryotes. A handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria. Hrsg.: Starr, M. P., Stolp, H., Tröper, H. G., Balows, A., Schlegel, H. G..Springer Verlag, Berlin:771-8.

**De Ley, J., Gillis, M., Swings, J. (1984).** Genus *Gluconobacter*. In: Bergey`s manual of systematic bacteriology, vol 1. Hrsg.: Krieg, N. R., Holt, J.G.. Williams and Wilkins, Baltimore: 267-78.

**De Muynck, C., Pereira, C. S., Naessens, M., Parmentier, S., Soetaert, W., Vandamme, E. J. (2007).** The genus *Glucocobacter oxydans*: comprehensive of biochemistry and biotechnological applications. Crit Rev Biotechnol **27**: 147-71.

**Deppenmeier, U., Hoffmeister, M., Prust, C. (2002).** Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains. Appl Microbiol Biotechnol **60**: 233-42.

**DiMarco, A. A., Romano, A. H. (1984).** D-glucose transport system of *Zymomonas mobilis*. Appl Environ Microbiol **49**: 151-7.

**Doelle, H. W. (1982).** Kinetic characteristics and regulatory mechanisms of glucokinase and fructokinase from *Zymomonas mobilis*. Appl Microbiol Biotechnol **14**: 241-6.

**Dunsbach, R. (2007).** Eine heiße Spur Chem Tech **5**: 68-70.

**Edge, L. A., Kositanont, Ch., Doelle, H. W. (1990).** Fructose phosphorylation by *Zymomonas mobilis* glucokinase. Acta Biotechnol **1**: 49-53.

- Elfari, M., Ha, S.-W., Bremus, C., Merfort, M., Khodaverdi, V., Herrmann, U., Sahm, H., Görisch, H. (2005).** A *Gluconobacter oxydans* mutant converting glucose almost quantitatively to 5-keto-D-gluconic acid. *Appl Microbiol Biotechnol* **66**: 668-74.
- El-Mansi, E. M. T., Holms, W. H. (1989).** Control of carbon flux to acetate excretion during growth of *Escherichia coli* in batch and continuous cultures. *J Gen Microbiol* **135**: 2875-83.
- Ferrier, R. J., Bowman, H., Moses, V. (1962).** The oxidation of free sugars and aldonic acid derivatives by *Acetobacter suboxydans*. In: Bio-organic chemistry quarterly report. Lawrence Berkeley National Laboratory. University of California (2008). Paper UCRL-10156.
- Figurski, D. H., Helinski, D. R. (1979).** Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc Natl Acad Sci* **76**: 1648-52.
- Fischer- Fantuzzi, L., Di Girolamo, M. (1961).** Triparental matings in *Escherichia coli*. *Genetics* **46**: 1305-15.
- Fluckiger, J., Ettliger, L. (1977).** Glucose metabolism in *Acetobacter aceti*. *Arch Microbiol* **114**:183-7.
- Friedrich, M., Schink, S. (1993).** Hydrogen formation from glycolate driven by reversed electron transport in membrane vesicles of a syntrophic glycolate-oxidizing bacterium. *Eur J Biochem* **217**: 233-40.
- Fritsche, W. (1999).** Mikrobiologie. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin.
- Gallagher, P. R., Desjardins, P. R. (2007).** Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy. *Curr Protoc Hum Genet Appendix* 3D.
- Gleason, W. B., Barker, R. (1970).** Oxidation of Pentoses in Alkaline Solution. *J Chemistry* **49**:1425-32.
- Godjevargova, T., Dayal, R., Turmanova, S. (2004).** Gluconic acid production in bioreactor with immobilized glucose oxidase plus catalase on polymer membrane adjacent to anion-exchange membrane. *Macromol Biosci* **4**: 950-6.
- Gosselé, F., Swings, J., De Ley, J. (1980).** Growth factor requirements of *Gluconobacter*. *Zbl Bakt* **4**: 348-50.

**Gosselé, F., van den Mooter, M., Verdonck, L., Swings, J., De Ley, J. (1981).** The nitrogen requirements of *Gluconobacter*, *Acetobacter* and *Frateuria*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **47**: 289-96.

**Greenfield, S., Claus, G. W. (1972).** Nonfunctional tricarboxylic acid cycle and the mechanism of glutamate biosynthesis in *Acetobacter suboxydans*. *J Bacteriol* **112**: 1295-301.

**Gupta, A., Verma, V., Qazi, G. N. (1997).** Transposon induced mutation in *Gluconobacter oxydans* with special references to its direct-glucose oxidation metabolism. *FEMS Microbiol Lett* **147**: 181-8.

**Gupta, A., Singh, V. K., Qazi, G. N., Kumar, A. (2001).** *Gluconobacter oxydans*: Its biotechnological applications. *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**: 445-56.

**Halket, J. M., Waterman, D., Przyborowska, A. M., Patel, R. K. P., Fraser, P. D. (2005).** Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS. *J Experim Botany* **56**: 219-43.

**Hancock, R. D., Viola, R. (2002).** Biotechnical approaches for L-ascorbic acid production. *Trends Biotechnol* **20**: 299-305.

**Hancock, R. D., Viola, R. (2005).** Improving the nutritional value of crops through enhancement of L-ascorbic acid (vitamin C) content: rationale and biotechnological opportunities. *J Agric Food Chem* **53**: 5248-57.

**Hemmerlin, C. (1995).** Isolierung einer membrangebundenen Gluconat-Dehydrogenase aus *Gluconobacter oxydans* und Untersuchungen zur Induktion. Institut für Mikrobiologie der Georg-August-Universität zu Göttingen.

**Hemsley, A., Arnheim, N., Toney, M. D., Cortopassi, G., Galas, D. J. (1989).** A simple method for site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. *Nucl Acids Res*: **17**: 6545-51.

**Hernandez, E., Johnson, M. J. (1967).** Energy supply and cell yield in aerobically grown microorganisms. *J Bacteriol* **94**: 996-1001.

**Hölscher, T., Görisch, H. (2006).** Knockout and Overexpression of Pyrroloquinoline Quinone Biosynthetic genes in *Gluconobacter oxydans* 621H. *J Bacteriol* **188**: 7668-76.

- Hogema, B. M., Arents, J. C., Inada, T., Aiba, H., van Dam, K., Postma, P. W. (1997).** Catabolite repression by glucose-6-phosphate, gluconate and lactose in *Escherichia coli*. *J Mol Microbiol* **24**: 857-67.
- Hoshino, T., Sugisawa, T., Tazoe, M., Shinjoh, M., Fujiwara, A. (1990).** Metabolic pathway for 2-keto-L-gulonic acid formation in *Gluconobacter melanogenus* IFO 3293. *Agric Biol Chem* **54**: 1211-8.
- Hoshino, T., Miyazaki, T., Sugisawa, T. (2001).** Aldehyde dehydrogenase. US Patent 6242233.
- Hoshino, T., Miyazaki, T., Sugisawa, T. (2005).** Method of making an aldehyde dehydrogenase with *Gluconobacter*. US Patent 6846660.
- Holms, H. (1996).** Flux analysis and control of the central metabolic pathways in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev* **19**: 85-116.
- Izu, H., Adachi, O., Yamada M. (1996).** Purification and characterization of the *Escherichia coli* thermoresistant gluconokinase encoded by the *gntK* gene. *FEBS Letters* **394**: 14-6.
- Jokelainen, K., Roine, R. P., Väänänen, M., Salaspuro, M. (1994).** In vitro acet-aldehyde formation by human colonic bacteria. *Gut* **35**: 1271-4.
- Kerstens, K., De Ley, J. (1968).** The occurrence of the Entner-Doudoroff pathway in bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **34**: 393-408.
- Kerstens, K., Lisdiyanti, P., Komagata, K., Swings, J. (2006).** The family *Acetobacteraceae*: The genera *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asai*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter* and *Kozakia*. *Prokaryotes* **5**: 163-200.
- Klasen, R., Bringer-Meyer, S., Sahm, H. (1992).** Incapability of *Gluconobacter oxydans* to produce Tartaric Acid. *Biotechnol Bioeng* **40**: 183-86.
- Klasen, R., Bringer-Meyer, S., Sahm, H. (1995).** Biochemical characterization and sequence analysis of the gluconate:NADP 5-oxidoreductase gene from *Gluconobacter oxydans*. *J Bacteriol* **177**: 2637-43.
- Kondo, K., Horinouchi, S. (1997).** Characterization of an insertion sequence, *IS12528*, from *Gluconobacter suboxydans*. *Appl Environ Microbiol* **63**: 1139-42.

**Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Stahlberg, A., Zoric, N. (2006).** The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* **27**: 95-125.

**Kulhanek, M. (1989).** Microbial dehydrogenations of monosaccharides. *Adv Appl Microbiol* **34**: 141-81.

**Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-5.

**Lam, S. T., Lam, B. S., Strobel, G. (1985).** A vehicle for the introduction of transposons into plant-associated *pseudomonads*. *Plasmid* **13**: 200-4.

**Lampen, J. O. (1953).** Pentose and desoxypentose metabolism in bacteria. *J Cell Physiol Suppl* **41**: 183-205.

**Levering, P. R., Weenk, G., Olijve, W., Harder, W. (1988).** Regulation of gluconate and ketogluconate production in *Gluconobacter oxydans* ATCC 621-H. *Arch Microbiol* **149**: 534-9.

**Link, A. J., Phillips, D., Church, G. M. (1997).** Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. *J Bacteriol* **179**: 6228-37.

**Linton, J. D., Rye, A. J. (1989).** The relationship between the energetic efficiency in different micro-organisms and the rate and type of metabolite overproduced. *J Ind Microbiol* **4**: 85-96.

**Lockwood, L. B., Neson, G. E. N. (1946).** The oxidation of pentoses by *Pseudomonas*. *J. Bacteriol* **52**: 581-6.

**Lunin, V. V., Li, Y., Schrag, J. D., Iannuzzi, P., Cygler, m., Matte, A. (2004).** Crystal structures of *Escherichia coli* ATP-dependent glucokinase and its complex with glucose. *J Bacteriol* **186**: 6915-27.

**Macauley, S., McNeil, B., Harvey, L. M. (2001).** The genus *Gluconobacter* and its applications in biotechnology. *Crit Rev Biotechnol* **21**: 1-25.

**Martinez, L. J., Baquero, F. (2002).** Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. *Clin Microbiol* **15**: 647-9.

- Matsushita, K., Shinagawa, E., Adachi, O., Ameyama, M. (1989).** Reactivity with ubiquinone of quinoprotein D-glucose dehydrogenase from *Gluconobacter oxydans*. *J Biochem* **105**: 633-7.
- Matsushita, K., Toyoma, H., Adachi, O. (1994).** Respiratory chains and bioenergetics of acetic acid bacteria. *Adv Microb Physiol* **36**: 247-301.
- Matsushita, K., Fujiil, Y., Ano, Y., Toyama, H., Shinjoh, M., Tomiyama, N., Miyazaki, T., Sugisawa, T., Hoshino, T., Adachi, O. (2003).** 5-keto-D-gluconate production is catalyzed by a quinoprotein glycerol dehydrogenase, major polyol dehydrogenase, in *Gluconobacter* species. *Appl Environ Microbiol* **69**: 1959-66.
- Meiberg, J. B. M., Spa, H. A. (1983).** Microbial production of gluconic acids and gluconates. *J Microbiol* **49**: 89-90.
- Meins, M., Zanolari, B., Rosenbusch, J. P., Erni, B. (1988).** Glucose Permease of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **263**: 12986-93.
- Merfort, M. (2006).** Dissertation: Untersuchungen zur 5-Keto-D-Gluconat Bildung mit *Gluconobacter oxydans*. Berichte des Forschungszentrums Jülich. **Jül-Bericht 4222**.
- Merfort, M., Herrmann, U., Ha, S.-W., Elfari, M., Bringer-Meyer, S., Görisch, H., Sahm, H. (2006).** Modification of the membrane-bound glucose oxidation system in *Gluconobacter oxydans* significantly increases gluconate and 5-Keto-D-gluconic acid accumulation. *Biotechnol J* **1**: 556-63.
- Morgunov, A. N., Perchenko, A. A. (1978).** Kinetics of saponification of alkylbutyrolactones by aqueous Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution. *Zh Fiz Khim*: **8**: 32-4.
- Mostafa, H. E., Heller, K. J., Geis, A. (2002).** Cloning of *Escherichia coli lacZ* and *lacY* genes and their expression in *Gluconobacter oxydans* and *Acetobacter liquefaciens*. *Appl Environ Microbiol* **68**: 2619-23.
- Mülhardt, C. (2006).** Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Mullis, K. B., Faloona, F. A. (1987).** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**: 335-50.
- Mukai, T., Kawai, S., Matsukawa, H., Matuo, Y., Murata, K. (2003).** Characterization and molecular cloning of a novel enzyme, inorganic polyphosphate/ATP-glucomannokinase, of *Arthrobacter* sp. strain KM. *Appl Environ Microbiol* **69**: 3849-57.

**Nicholls, D. G., Ferguson, S. (2001).** Bioenergetics 3. Academic Press, Amsterdam-Boston-London-NewYork-Oxford-Paris-San Diego-San Francisco-Singapore-Sydney-Tokyo.

**Olijve, W. (1978).** PhD Thesis: Glucose metabolism in *Gluconobacter oxydans*. University of Groningen, The Netherlands.

**Olijve, W., Kok, J. J. (1979a).** Analysis of growth of *Gluconobacter oxydans* in glucose containing media. Arch Microbiol **121**: 283-90.

**Olijve, W., Kok, J. J. (1979b).** Analysis of growth of *Gluconobacter oxydans* in chemostat cultures. Arch Microbiol **121**: 291-7.

**Parker, C., Barnell, W. O., Snoep, J. L., Ingram, L. O., Conway, T. (1995).** Characterization of the *Zymomonas mobilis* glucose facilitator gene product (*glf*) in recombinant *Escherichia coli*: examination of transport mechanism, kinetics and the role of glucokinase in glucose transport. Mol Microbiol **15**: 795-802.

**Peekhaus, N., Conway, T. (1998).** What's for Dinner?: Entner-Doudoroff metabolism in *Escherichia coli*. J Bacteriol **180**: 3495-502.

**Pöhland, H.-D., Schierz, V., Schuhmann, R. (1993).** Optimization of gluconic acid synthesis by removing limitations and inhibitions. Acta Biotechnol **13**: 257-68.

**Pronk, J. T., Levering, P. R., Olijve, W., Van Dijken, J. P. (1989).** Role of NADP-dependent and quinoprotein glucose dehydrogenase in gluconic acid production by *Gluconobacter oxydans*. Enzyme Microb Technol **11**: 160-4.

**Prust, C. (2004).** Dissertation: Entschlüsselung des Genoms von *Gluconobacter oxydans* 621H – einem Bakterium von industriellem Interesse. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultäten der Georg-August-Universität zu Göttingen.

**Prust, C., Hoffmeister, M., Liesegang, H., Wiezer, A., Fricke, W. F., Ehrenreich, A., Gottschalk, G., Deppenmeier, U. (2005).** Complete genome sequence of the acetic acid bacterium *Gluconobacter oxydans*. Nat Biotechnol **23**: 195-200.

**Quaade, C., Hughes, D. S., Coats, S. W., Sestak, L. A., Iynedjian, P. B., Newgard, C. B. (1991).** Analysis of the protein products encoded by variant glucokinase transcripts via expression in bacteria. FEBS **280**: 47-52.

**Rabinow, P. (1996).** Making PCR: A story of biotechnology. University of Chicago Press.

- Raj, K. C., Ingram, L. O., Maupin-Furlow, J. A. (2001).** Pyruvate decarboxylase: a key enzyme for the oxidative metabolism of lactic acid by *Acetobacter pasteurianus*. *Arch Microbiol* **176**: 443-51.
- Rangappa, K. S., Paghavendra, M. P., Mahadevappa, D. S., Gowda, D. C. (1997).** Kinetics and mechanism of oxidation of erythro-series pentoses and hexoses by *N*-chloro-*p*-toluenesulfonamide. *Elsev Sci* **306**: 57-67.
- Rao, M. R. R., Stokes, J. L. (1953).** Nutrition of the acetic acid bacteria. *J Bacteriol* **65**: 405-12.
- Raspor, P., Goranovič, D. (2008).** Biotechnological applications of acetic acid bacteria. *Crit Rev Biotechnol* **28**: 101-24.
- Ruiz, A., Poblet, M., Mas, A., Guillamon, J. M. (2000).** Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16S rRNA and 16S-23S rDNA intergenic spacer. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**: 1981-87.
- Saito, Y., Ishii, Y., Hayashi, H., Inao, Y., Akashi, T., Yoshikawa, K., Noguchi, Y., Soeda, S., Yoshida, M., Niwa, M., Hosoda, J., Shimomura, K. (1996).** Cloning of genes for L-sorbose and L-sorbosone dehydrogenases from *Gluconobacter oxydans* and microbial production of 2-keto-L-gluconate, a precursor of L-ascorbic acid, in a recombinant *G. oxydans* strain. *Appl Environ Microbiol* **63**: 454-60.
- Salusjarvi, T., Povelainen, M., Hvorslev, N., Eneyskaya, E. V., Kulminskaya, A. A., Shabalin, k. A., Neustroev, K. N., Kalkkinen, N., Miasnikov, A. N. (2004).** Cloning of a gluconate/polyol dehydrogenase gene from *Gluconobacter suboxydans* IFO 12528, Characterization of the enzyme and its use for the production of 5-ketogluconate in a recombinant *Escherichia coli* strain. *Appl Environ Microbiol* **63**: 454-60.
- Sambrook, J., Russel, D.W. (2000).** Molecular cloning: a laboratory manual (3. Auflage). Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977).** DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* **74**: 5463-7.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., Puhler, A. (1994).** Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69-73.

**Schedel, M. (2000).** Regioselective oxidation of aminosorbitol with *Gluconobacter oxydans*, a key reaction in the industrial synthesis of 1-deoxynojirimycin. In: Biotechnology, Biotransformations I. Hrsg.: Kelly, D. R.. Wiley-VCH, Weinheim, S. 296-308.

**Schell, D. J., Saez, J. C., Hamilton, J., Tholudur, A., Millan, J. D. M. (2002).** Use of measurement uncertainty analysis to assess accuracy of carbon mass balance closure for a cellulose production process. Appl Biochem Biotechnol **98**: 509-23.

**Scherf, G. (1997).** In: Wörterbuch der Biologie. Deutscher Taschenbuch Verlag, München.

**Schlegel, H. G. (1992).** In: Allgemeine Mikrobiologie. Thieme Verlag, Stuttgart.

**Schleyer, U., Bringer-Meyer, S., Sahm, H. (2008).** An easy cloning and expression vector system for *Gluconobacter oxydans*. J Food Microbiol **125**: 91-5.

**Schroer, K., Mackfeld, U., Ai Wei Tan, I., Wandrey, C., Heuser, F., Bringer-Meyer, S., Weckbecker, A., Hummel, W., Daußmann, T., Pfaller, R., Liese, A., Lütz, S. (2007).** Continuous asymmetric ketone reduction processes with recombinant *Escherichia coli*. J Biotech **132**:438-444.

**Schwarzer, A., Pühler, A. (1991).** Manipulation of *Corynebacterium glutamicum* by gene disruption and replacement. Biotechnol **9**: 84-7.

**Schweiger, P., Volland, S., Deppenmeier, U. (2007).** Overproduction and characterization of two distinct aldehyde-oxidizing enzymes from *Gluconobacter oxydans* 621H. J Mol Microbiol Biotechnol **13**: 147-55.

**Shimizu, T., Yamasaki S., Tsukamoto, T., Takeda, Y. (1999).** Analysis of the genes responsible for the O-antigen synthesis in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* 0157. Microb Pathog **26**: 235-47.

**Shinagawa, E., Matsushita, K., Adachi, O., Ameyama, M. (1981).** Purification and characterization of 2-keto-D-gluconate dehydrogenase from *Gluconobacter melanogenus*. Agric Biol Chem **45**: 1079-85.

**Shinagawa, E., Matsushita, K., Adachi, O., Ameyama, M. (1982).** Purification and characterization of D-sorbitol dehydrogenase from membrane of *Gluconobacter suboxydans* var.  $\alpha$ . Agric Biol Chem **46**: 135-41.

**Shinagawa, E., Matsushita, K., Adachi, O., Ameyama, M. (1983).** Selective production of 5-keto-D-gluconate by *Gluconobacter* strains. *J Ferment Technol* **61**: 359-63.

**Shinagawa, E., Matsushita, K., Toyama, H., Adachi, O. (1999).** Production of 5-keto-D-gluconate by acetic acid bacteria is catalyzed by pyrroloquinoline quinone (PQQ)-dependent, membrane-bound D-gluconate dehydrogenase. *J Mol Catal B: Enzym* **6**: 341-50.

**Shinjo, M., Setoguchi, Y., Hoshino, T., Fujiwara, A. (1990).** L-sorbose dissimilation in 2-keto-L-gulonic acid-producing mutant UV10 derived from *Gluconobacter melanogenus* IFO 3293. *Agric Biol Chem* **54**: 2257-63.

**Shinjo, M., Tomiyama, N., Asakura, A., Hoshino, T. (1994).** Cloning and nucleotide sequencing of the membrane-bound L-sorbose dehydrogenase gene of *Acetobacter liquefaciens* IFO 12258 and its expression in *Gluconobacter oxydans*. *Appl Environ Microbiol* **61**: 413-20.

**Shinjo, M., Tomiyama, N., Miyazaki, T., Hoshino, T. (2002b).** NADPH-dependent L-sorbose reductase is responsible for L-sorbose assimilation in *Gluconobacter suboxydans* IFO 3291. *J Bacteriol* **184**: 861-3.

**Sievers M, Gaberthül C, Boesch C, Ludwig W, Teuber M (1995).** Phylogenetic position of *Gluconobacter* species as a coherent cluster separated from all *Acetobacter* species on the basis of 16S ribosomal RNA sequences. *FEMS Microbiol Lett* **126**:123-26.

**Silberbach, M. (2001).** Dissertation: Prozessoptimierung der biotechnologischen Synthese von Ketogluconsäuren durch *Gluconobacter oxydans*. Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen.

**Silberbach, M., Maier, B., Zimmermann, M., Büchs, J. (2003).** Glucose oxidation by *Gluconobacter oxydans*: characterization in shaking-flasks, scale-up and optimization of the pH profile. *Appl Microbial Biotechnol* **62**: 92-8.

**Snoep, J. L., Arfman, N., Yomano, L. P., Fliege, R. K., Conway, T., Ingram, L. O. (1994).** Reconstitution of glucose uptake and phosphorylation in a glucose-negative mutant of *Escherichia coli* by using *Zymomonas mobilis* genes encoding the glucose facilitator protein and glucokinase. *J Bacteriol* **176**: 2133-5.

**Sugisawa, T., Hoshino, T., Masuda, S., Nomura, S., Setoguchi, Y., Tazoe, M., Shinjo, M., Someha, S., Fujiwara, A. (1990).** Microbial production of 2-keto-L-

gulonic acid from L-sorbose and L-sorbitol by *Gluconobacter melanogenus*. Agric Biol Chem **45**: 1201-9.

**Sugisawa, T., Hoshino, T., Nomura, S., Fujiwara, A. (1991a)**. Isolation and characterization of membrane-bound L-sorbose dehydrogenase from *Gluconobacter melanogenus* UV10. Agric Biol Chem **55**: 363-70.

**Sugisawa, T., Hoshino, T., Fujiwara, A. (1991b)**. Purification and properties of NADPH-linked L-sorbose reductase from *Gluconobacter melanogenus* N44-1. Agric Biol Chem **55**: 2043-9.

**Sugiyama, M., Suzuki, S., Tonouchi, N., Yokozeki, K. (2003)**. Transaldolase/glucose-6-phosphate isomerase bifunctional enzyme and ribulokinase as factors to increase xylitol production from D-arabitol in *Gluconobacter oxydans*. Biosci Biotechnol Biochem **67**:2524-32.

**Stokes, J. L., Larsen, A. (1945)**. Amino acid requirements *Acetobacter suboxydans*. J Bacteriol **49**: 495-507.

**Strelkov, S., Elstermann, M., Schomburg, D. (2004)**. Comprehensive analysis of metabolites in *Corynebacterium glutamicum* by gas chromatography/mass spectrometry. Biol Chem **385**: 853-61.

**Swings, J. (1992)**. The genera *Acetobacter* and *Gluconobacter*. In: Barlows A., Trüper H. G., Dworkin M., Harder W., Schleifert K.-H. (Hrsg.). The Prokaryotes. Springer Verlag, New York, 2268-86.

**Tanaka M, Murakami S, Shinke R, Aoki K (1999)**. Reclassification of the strains with low G+C contents of DNA belonging to the genus *Gluconobacter* Asai 1935. Biosci Biotechnol Biochem **63**: 989-92.

**Tempest, D. W., Neijssel, O. M. (1987)**. Growth yield and energy distribution. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Hrsg.: Neidhardt, F. C. American Society for Microbiology. 1. Auflage. 797-806.

**Tobisch, S., Zühlke, D., Bernhardt, J., Stülke, J., Hecker, M. (1999)**. Role of CcpA in regulation of the central pathways of carbon catabolism in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol **181**: 696-704.

**Tonouchi, (2003)**. Coenzyme specificity of enzymes in the oxidative pentose phosphate pathway of *Gluconobacter oxydans*. Biosci Biotechnol Biochem **67**: 2648-51.

- Toyama, H., Furuya, N., Saichana, I., Ano, Y., Adachi, O., Matsushita, K. (2007).** Membrane-bound, 2-keto-D-gluconate-yielding D-gluconate dehydrogenase from "*Gluconobacter dioxyaceticus*" IFO 3271: Molecular properties and gene disruption. *Appl Environ Microbiol* **73**: 6551-6.
- Tramper, J., Luyben, K. Ch. A. M., van den Tweel, W. J. J. (1983).** Kinetic Aspects of Glucose Oxidation by *Gluconobacter oxydans* Cells Immobilized in Calcium Alginate. *European J Appl Microbiol Biotechnol* **17**: 13-18.
- Trevors, J. T., Stradoub, M. E. (1990).** Electroporation of pKK1 silver-resistance plasmid from *Pseudomonas stutzeri* AG259 into *Pseudomonas putida* CYM318. *Curr Microbiol* **21**: 103-7.
- Van Schie, B. J., Hellingwerf, K. J., Van Dijken, J. P., Elferink, M. G. L., van Dijk, J. M., Kuenen, J. G., Konings, W. N. (1985).** Energy transduction by electron transfer via a pyrrolo-quinoline quinone-dependent glucose dehydrogenase in *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter calcoaceticus* (var. *lwoffii*). *J Bacteriol* **163**: 493-9.
- Veit, A. (2005).** Untersuchungen zum Überflußmetabolismus in *Escherichia coli*. Berichte des Forschungszentrums Jülich. **Jül-Bericht 4199**.
- Velizarov, S., Beschkov, V. (1998).** Biotransformation of glucose to free gluconic acid by *Gluconobacter oxydans*: substrate and product inhibition situations. *Process Biochem* **33**: 527-34.
- Verma, V., Qazi, P., Cullum, J., Qazi, G. M. (1997).** Genetic heterogeneity among Keto-acid-producing strains of *Gluconobacter oxydans*. *World J Microbiol Biotechnol* **13**: 289-94.
- Wecker, M. S. A., Zall, R. R. (1987).** Production of Acetaldehyde by *Zymomonas mobilis*. *Appl Environ Microbiol* **53**: 2815-20.
- Weenk, G., Olijve, W., Harder, W. (1984).** Ketogluconate formation by *Gluconobacter* species. *Appl Microbial Biotechnol* **20**: 400-5.
- Weimberg, R. (1960).** Pentose oxidation by *Pseudomonas fragi*. *J Biological Chem* **236**: 629-35.
- Wethmar, M., Deckwer, W. D. (1999).** Semisynthetic culture medium for growth and Dihydroxyacetone by *Acetobacter suboxydans* 621. *J Ferment Technol* **57**: 221-6.

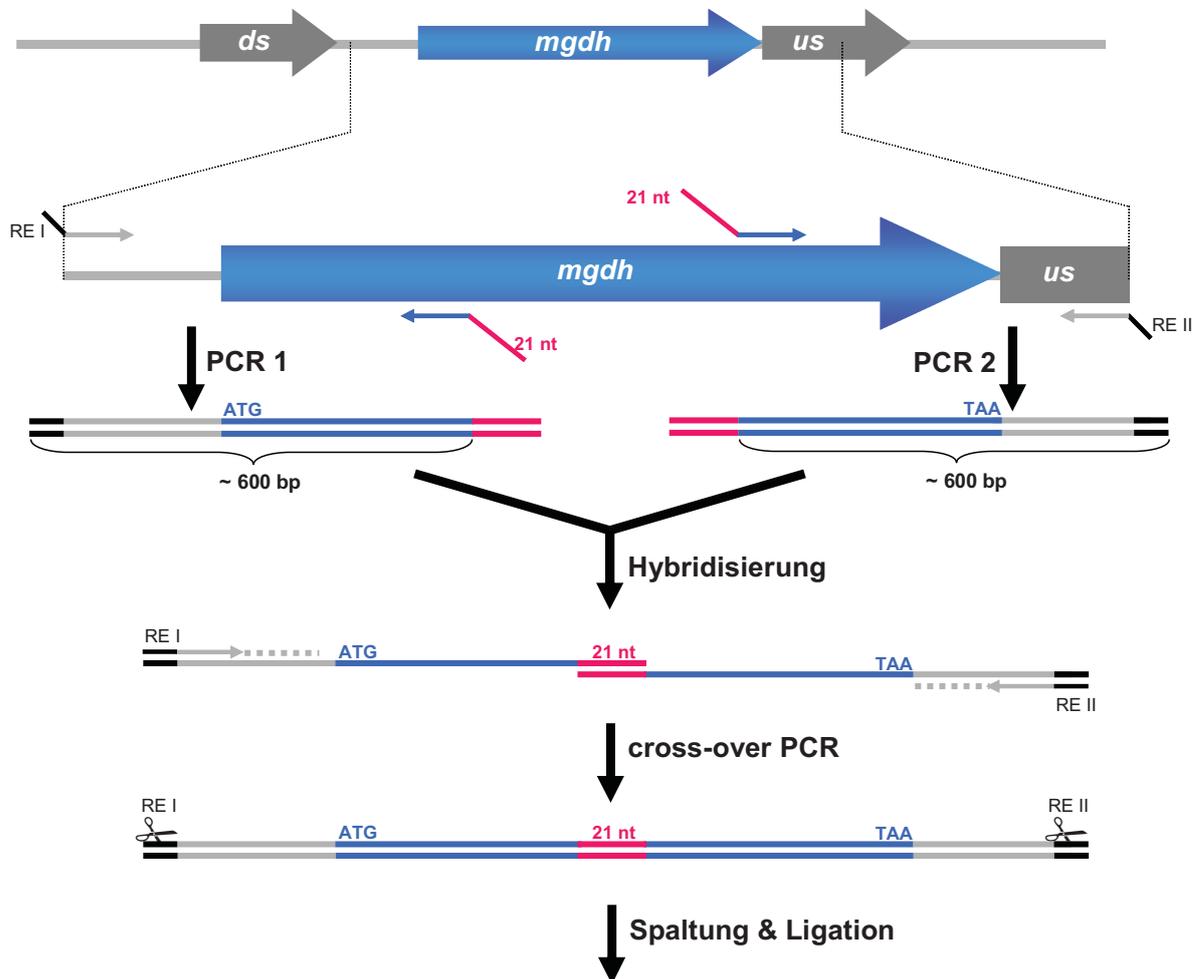
**Wendisch, V. F., de Graaf, A. A., Sahm, H., Eikmanns, B. J. (2000).** Quantitative determination of metabolic fluxes during cointilization of two carbon sources: comparative analyses with *Corynebacterium glutamicum* during growth on acetate and/or glucose. *J Bacteriol* **182**: 3088-96.

**Weisser, P., Krämer, R., Sahm, H., Sprenger, G. A. (1995).** Functional expression of the glucose transporter of *Zymomonas mobilis* leads to restoration of glucose and fructose uptake in *Escherichia coli* mutants and provides evidence for its facilitator action. *J Bacteriol* **177**: 3351-4.

**Yamada, Y., Yukphan, P. (2008).** Genera and species in acetic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* **125**: 15-24.

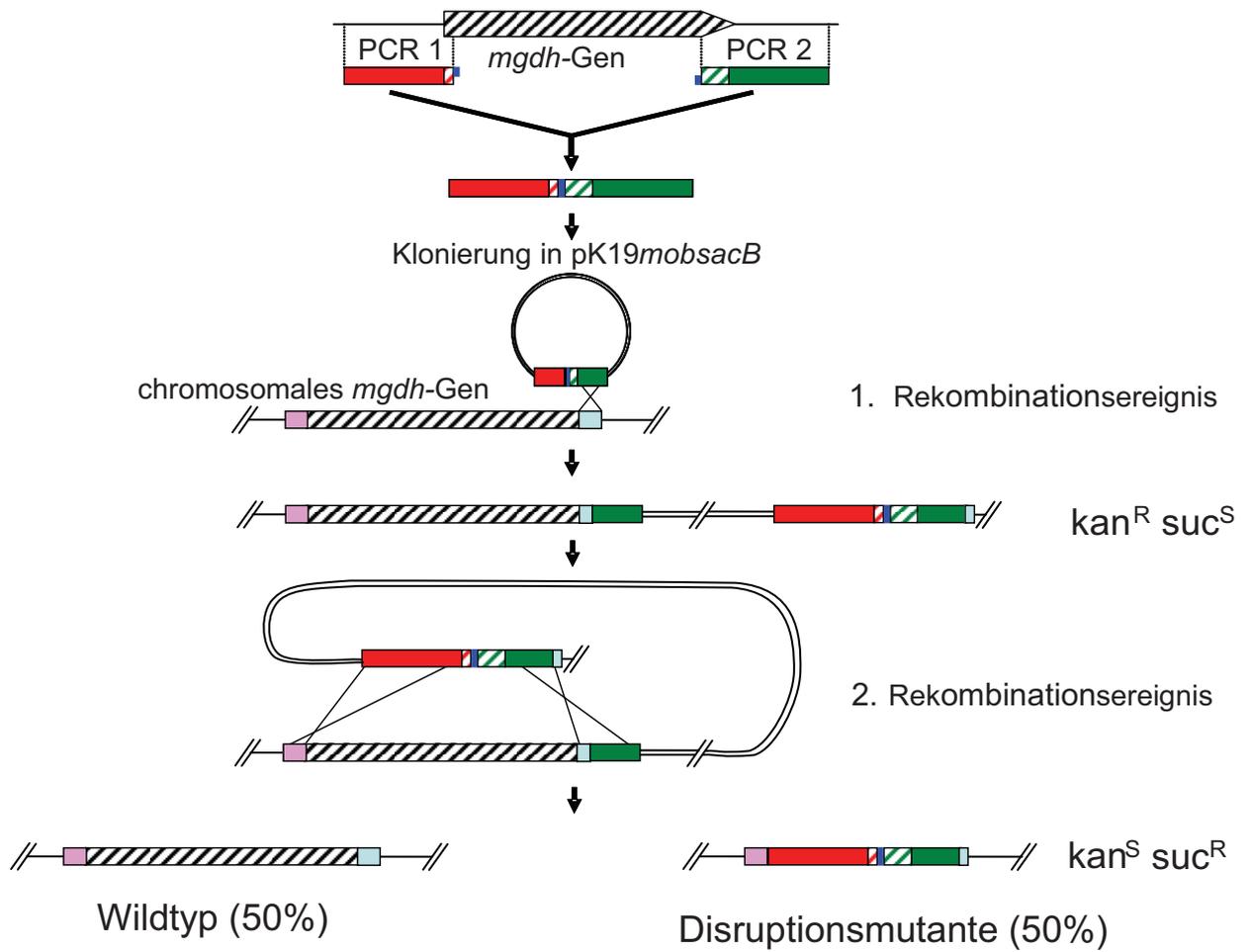
**Zajic, J. E., Maddux, N. L., Jones, L. P. (1982).** Ethanol from *Zymomonas*, a Bacterium. *Acta Biotechnol* **4**: 307-15.

## 8 Anhang

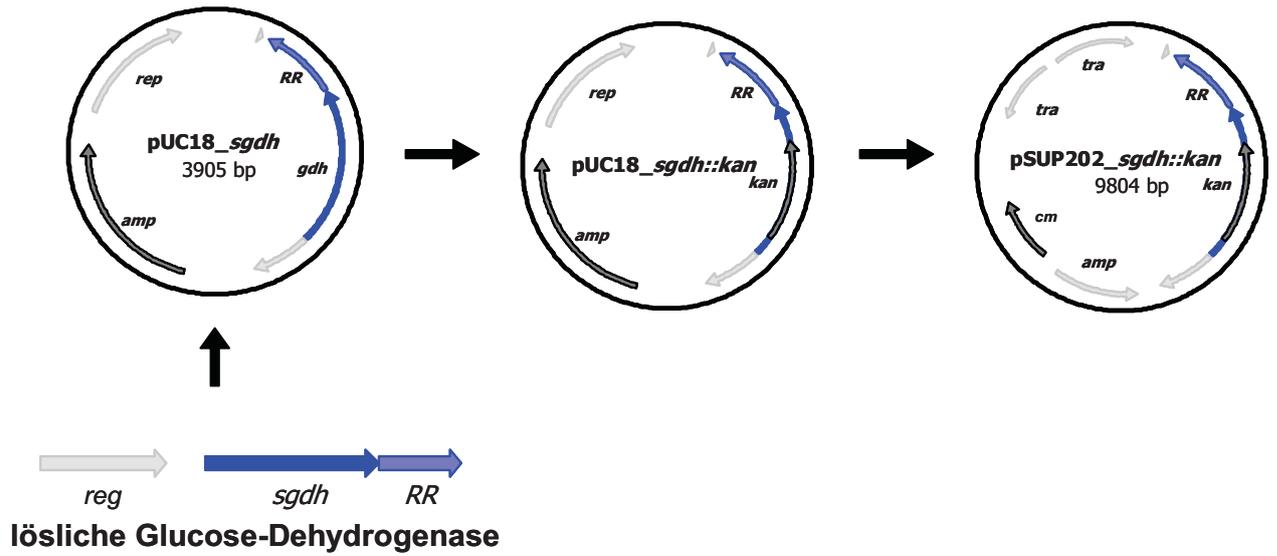


**Abb. 27a: Schema der cross-over PCR für die markerlosen Disruption des *mgdh*-Gens in *G. oxydans* N44-1.** Abkürzungen: RE, Restriktionsenzym; RE I: *Sph*I, RE II: *Sal*II; ds, downstream, stromabwärts; us, upstream, stromaufwärts; die grauen Pfeile, bezeichnet mit ds und us stellen hypothetische Proteine dar; nt, Nucleotide

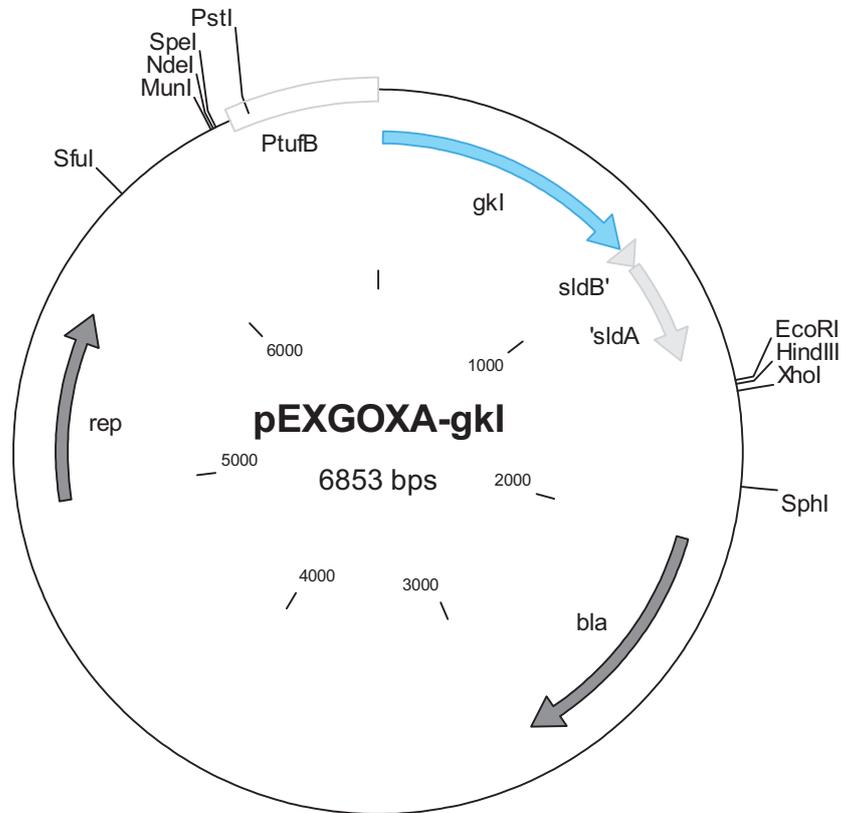
- Primerpaar für die erste PCR (PCR 1): coPCR-gdh-5F/coPCR-gdh-5R
- Primerpaar für die zweite PCR (PCR 2): coPCR-gdh-3F/coPCR-gdh-3R
- Primerpaar für die cross-over PCR: gdh-control-5/gdh-control-3
- 21 bp-Überhang: CCC ATC CAC TAA ACT TAA ACA GGG TAG GTG ATT TGA ATT TGT
- *mgdh*: Gen für die mGDH mit einer Sequenzlänge von 2427 bp



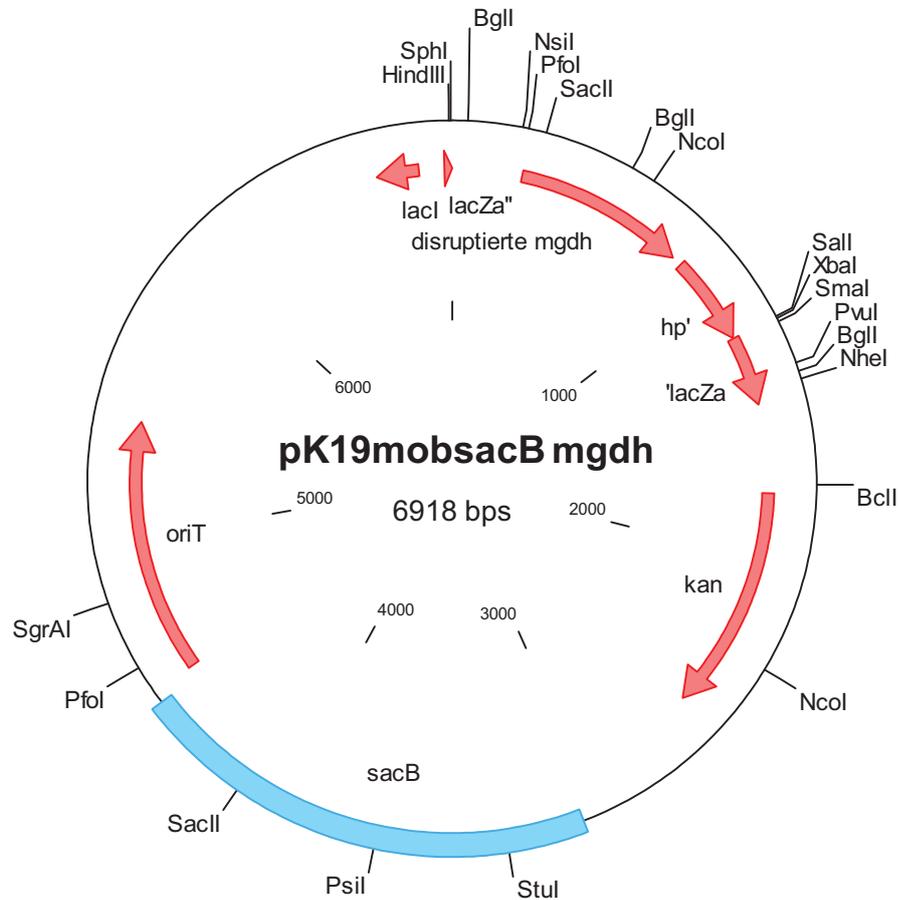
**Abb. 27b: Schema des Selektionsverfahrens zur markerlosen Disruption des *mgdh*-Gens in *G. oxydans* N44-1.** Abkürzungen: kan, Kanamycin; suc, Sucrose; R, resistant; S, sensitiv; | 21 bp-Überhang



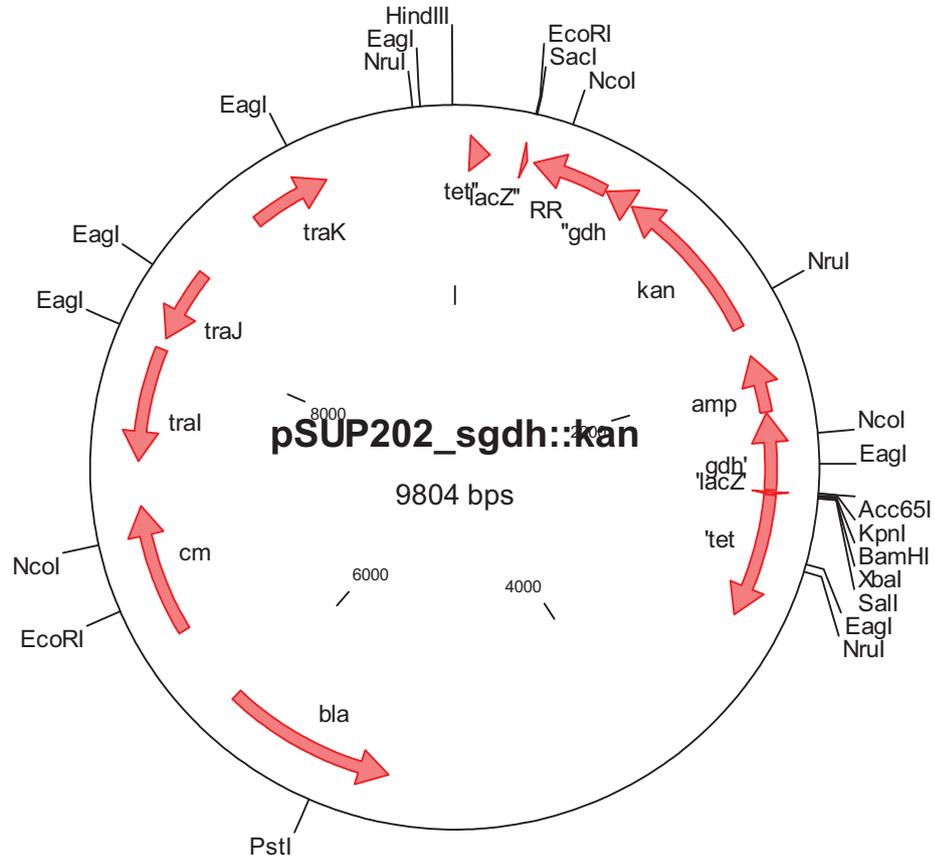




**Abb. 30: Schema des Plasmids pEXGOXA-gkl zur Überexpression des *gkl*-Gens in *G. oxydans*.** Abkürzungen: rep, Replikationsursprung; PtufB, *G. oxydans* eigener *tufB*-Promotor; gk, Glucose-Kinase I-Gen; bla, Gen codoert für die  $\beta$ -Lactamase, die Resistenz gegenüber Ampicillin vermittelt; sldA' und sldB', Fragmente des Gens für die Sorbitol-Dehydrogenase;



**Abb. 31: Schema des Plasmids pK19mobsacB-mgdh zur markerfreien Disruption des *mgdh*-Gens in *G. oxydans*.** Abkürzungen: oriT, Replikationsursprung für den DNA-Transfer; lacI, Lac-Promotor; 'lacZa und lacZa'', N-terminales  $\alpha$ -Fragment der  $\beta$ -Galactosidase; kodiert für die  $\beta$ -Galactosidase; disruptierte *mgdh*, disruptiertes Gen für die mGDH; hp', hypothetisches Protein; Kan, Kanamycin; sacB, Gen von *B. subtilis* kodiert für die Levansucrase, die durch Saccharose exprimiert wird. In Medien mit Saccharose führt die exprimierte Levansucrase zur Lyse der Zellen



**Abb. 32: Schema des Plasmids pSUP202-*sgdh::kan* zur Disruption des *sgdh*-Gens in *G. oxydans*.** Abkürzungen: bla, Gen codoert für die  $\beta$ -Lactamase, die Resistenz gegenüber Ampicillin vermittelt; cm, Chloramphenicol; tra, transfer-Gene für die Konjugation: tra I, DNA-Relaxase; tra J und tra K, oriT-Bindeproteine; tet' und 'tet, Tetracyclin; 'lacZa und lacZa', N-terminales  $\alpha$ -Fragment der  $\beta$ -Galactosidase; kodiert für die  $\beta$ -Galactosidase; RR, response regulator; "sgdh, sgdh' disruptiertes Gen für die sGDH; kan, Kanamycin; amp, Ampicillin.



## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biotechnologie 1 des Forschungszentrums Jülich angefertigt.

Herrn Prof. Dr. H. Sahm danke ich für die Überlassung des Themas, seine Unterstützung und sein Interesse am Fortgang der Arbeit sowie seine konstruktive Kritik in wissenschaftlichen Diskussionen, die diese Arbeit bereicherte und vorantrieb.

Herrn Prof. M. Bott danke ich für die Übernahme des Korreferats und seine Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. St. Bringer-Meyer und Frau Dr. U. Schleyer, die mir stets engagiert, diskussionsfreudig und mit guten Ratschlägen zur Lösung vieler experimenteller Fragestellungen zur Seite standen.

Meinen Industriepartner der Firma „DSM Nutritional Products“ danke ich sehr für die gute Kooperation, ihre Unterstützung und den regelmässigen Informationsaustausch. Besonderer Dank gilt hierbei meinen Betreuern bei der DSM Petra Simic und Günter Pappenberg.

Herrn S. Küppers und Herrn M. Michulitz (ZCH, Forschungszentrum Jülich) danke ich für die TOC/DOC Messungen.

Meinen Arbeitskollegen, insbesondere Tanja Hanke, Jens Schiffler, Ursula Degner, Cornelia Gätgens, Frau M. Chmielus, Beat Thalmann, Verena Engels, Christoph Bremus und Marcel Merfort danke ich für ihre große Hilfsbereitschaft und die vielen guten Ratschläge.

Allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts danke ich herzlich für ihre Unterstützung und kollegiale Zusammenarbeit.

Danken möchte ich auch den Kollegen am Institut für Biotechnologie 2 für die gute Zusammenarbeit, besonders Kirsten Schroer und Brigitte Osterrat.

Herzlich danke ich Andreas Wilden, der mir während der Endphase meiner Doktorarbeit geduldig und verständnisvoll zur Seite gestanden hat.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern, die mich während meiner Doktorandenzeit immer unterstützt und ermutigt haben.



## **Erklärung**

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen oder Hilfsmittel benutzt habe. Diese Arbeit habe ich in der vorgelegten oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht.

Jülich im Oktober 2008