

**Untersuchungen zur 5-Keto-D-Gluconat Bildung mit
*Gluconobacter oxydans***

Inaugural-Dissertation

zur

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

vorgelegt von
Marcel Merfort
aus Essen

Juni 2006

Aus dem Institut für Biotechnologie I, Forschungszentrum Jülich
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. H. Sahm
Korreferent: Prof. Dr. K.-E. Jäger
Tag der mündlichen Prüfung: 12.06.2006

***Untersuchungen zur 5-Keto-D-Gluconat Bildung
mit *Gluconobacter oxydans****

Marcel Merfort

Teile der vorliegenden Dissertation erschienen in folgenden Publikationen:

- **MERFORT, M., HERRMANN, U., BRINGER-MEYER, S., SAHM, H. (2006).** High yield 5-Keto-D-gluconic acid formation is mediated by soluble and membrane-bound gluconate-5-dehydrogenases of *Gluconobacter oxydans*. *Appl Microbiol Biotechnol* (akzeptiert)
- **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. *J Biotechnol* **1**(5): 556-563
- **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**(6): 668-674.
- **HERRMANN, U., MERFORT, M., JEUDE, M., BRINGER-MEYER, S., SAHM, H. (2004).** Biotransformation of glucose to 5-Keto-D-gluconic acid by recombinant *Gluconobacter oxydans* DSM 2343. *Appl Microbiol Biotechnol* **64**(1): 86-90.

Teile der vorliegenden Dissertation erschienen in folgenden Patentanmeldungen:

- **BREMUS, C., MERFORT, M., HERRMANN, U., BRINGER-MEYER, S., SAHM, H., ELFARI, M., KHODAVERDI, V., HA, S. W., GÖRISCH, H. (2004).** Mikroorganismus und Verfahren zur Herstellung von Weinsäure. *Deutsche Patentanmeldung, DE 10 2004 010 786.6-41, PT 1.2126 (05.03.04).*

Research in the 5-keto-D-gluconate formation with *Gluconobacter oxydans*

The aim of this work was a rational strain development of the acetic acid bacterium *Gluconobacter oxydans* DSM 2343 for whole-cell-biotransformation of glucose to 5-keto-D-gluconic acid (5-KGA), a precursor of L-(+)-tartaric acid.

G. oxydans exhibits two separately localised enzyme systems for the oxidation of glucose to 5-KGA. On the one hand, there is a system of pyrrolochinoline-quinone-dependent (PQQ) dehydrogenases which are orientated to the periplasmatic space. On the other hand, there are cytosolic, NADP⁺-dependent oxidoreductases which perform the oxidation of glucose to 5-KGA, too. Besides the favoured oxidation product 5-KGA, *G. oxydans* was also able to accumulate the undesired structural isomer, 2-keto-D-gluconic acid (2-KGA). By inserting a gene-sequence of a kanamycine-resistance protein into the chromosomal part of the gluconate-2-dehydrogenase (mGA2DH), the formation of 2-KGA was completely prevented. This action led to an increase in the total 5-KGA-formation rate and final concentration, respectively.

By homologues overexpression of the *cga5dh*-gene, which encodes for a cytosolic NADP⁺-dependent gluconate-5-dehydrogenase (cGA5DH), the 5-KGA concentration could be enhanced by 20%, as compared to the wild-type. To ensure the availability of the necessary cofactor NADP⁺, the gene for a transhydrogenase (UDHA) of *E. coli* was heterologously coexpressed thus guaranteeing the reoxidation of NADPH via NAD and the respiratory chain.

By inactivating the *mga5dh*-gene it could be demonstrated that the membrane-bound gluconate-5-dehydrogenase (mGA5DH) was the enzyme mainly responsible for 5-KGA formation. The resulting mutant strain showed a basal 5-KGA formation of 20% as compared to the wild-type strain. Exchanging the native promoter of the *mga5dh*-gene against the stronger *tufB* and *mgdh*-promoter led to an increase of the 5-KGA formation activity and the final 5-KGA concentration. Finally, a 5-KGA production strain could be developed, which showed an enhanced final 5-KGA concentration (300 mM), which was 20-fold higher than that of the wild-type strain.

Untersuchungen zur 5-keto-D-Gluconat Bildung mit *Gluconobacter oxydans*

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines *Gluconobacter oxydans* Stammes für die Biotransformation von Glucose zu 5-Keto-D-Gluconat (5-KGA). Es wurde im ersten Schritt ein geeigneter Stamm ausgewählt, der die höchsten 5-KGA-Ausbeuten erreichte. *G. oxydans* besitzt für die Oxidation von Glucose zu 5-KGA ein cytosolisches System aus NADP⁺-abhängigen Dehydrogenasen und ein System aus Membran-assoziierten, PQQ-abhängigen Dehydrogenasen.

Durch Insertionsmutagenese des *mga2dh*-Gens, welches in *G. oxydans* für eine membrangebundene, FAD-abhängige Gluconat-2-Dehydrogenase (mGA2DH) kodiert, konnte die Bildung des Nebenproduktes 2-Keto-D-Gluconat unterbunden werden. Zur Steigerung der 5-KGA-Produktivität, wurde dann das Gen für die cytosolische Gluconat:NADP⁺ 5-Oxidoreduktase (GNO) homolog überexprimiert, wodurch 5-KGA-Konzentrationen von 200 mM erzielt wurden. Die Regeneration des Cofaktors NADP⁺ konnte durch heterologe Coexpression des Gens der cytosolischen Pyridinnukleotid Transhydrogenase (UDHA) aus *E. coli* gesteigert werden. Untersuchungen des Membran-assoziierten Systems in *G. oxydans* zeigten die Bedeutung der PQQ-abhängigen Gluconat-5-Dehydrogenase (mGA5DH) bei der 5-KGA-Bildung. Nach der Inaktivierung der mGA5DH verblieb eine Restaktivität der 5-KGA-Bildung von 20 %, die der cytosolischen GNO zuzuordnen war. Damit wurde die mGA5DH als das Enzym identifiziert, welches in *G. oxydans* primär für die 5-KGA-Bildung verantwortlich ist. Zur weiteren Verbesserung der 5-KGA-Produktivität wurden anschließend sowohl das Gen der membrangebundenen, PQQ-abhängigen Glucose-Dehydrogenase (mGDH) als auch das Gen der Gluconat-5-Dehydrogenase (mGA5DH) homolog in *G. oxydans* überexprimiert. Ein Austausch des *mga5dh*-Promotors des Gluconat-5-Dehydrogenase Gens gegen den *tufB*-Promotor des Elongationsfaktors (EF-Tu) aus *G. oxydans* resultierte in einer weiteren Steigerung der 5-KGA-Konzentration (300 mM). Um die Glucosekonzentration bei der Biotransformation möglichst niedrig zu halten, wurde ein fed-batch Verfahren entwickelt, was zu einer weiteren Steigerung der 5-KGA-Bildung führte. Das gebildete Produkt konnte durch Zugabe von CaCl₂ als Ca(5-KGA)₂-Salz in nahezu reiner Form isoliert werden.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Einleitung	1
Material und Methoden	9
1. Organismen und Kultivierung.....	9
1.1 Verwendete Organismen.....	9
1.2 Kulturmedien	10
1.3 Kultivierung von <i>E. coli</i> und <i>G. oxydans</i>	11
1.4 Erstellung einer Wachstumskurve und Bestimmung der Wachstumsparameter.....	11
1.5 Transformation von <i>E. coli</i> und <i>G. oxydans</i>	12
2. Molekularbiologische Methoden.....	12
2.1 Isolierung von DNA.....	12
2.2 Restriktion von DNA	13
2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)	14
2.4 Sequenzierung von DNA.....	15
2.5 Agarose-Gelelektrophorese.....	16
2.6 Northern Blot Analyse.....	17
3. Biochemische Methoden	18
3.1 Ultraschallaufschluss von Zellen	18
3.2 Bestimmung von Enzym-Aktivitäten	18
3.3 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.....	20
4. Analytische Methoden	21
4.1 Bestimmung von Metaboliten mittels HPLC	21
4.2 Infrarot-Analytik von isolierten Metaboliten.....	21
5. Biotransformation von Glucose mit <i>G. oxydans</i> Stämme	22

Ergebnisse.....	23
1. Untersuchung des Wachstums von <i>G. oxydans</i> DSM 2343, DSM 3503 und DSM 3504.....	23
2. Umsetzung von Glucose zu 5-KGA im Cytosol von <i>G. oxydans</i>.....	27
2.1 Homologe Überproduktion der Gluconat:NADP ⁺ 5-Oxidoreduktase	27
2.2 Heterologe Überproduktion einer cytosolischen Transhydrogenase aus <i>E. coli</i>	29
2.3 Vermeidung der 2-KGA-Bildung in <i>G. oxydans</i>	31
2.4 Ganzzell-Biotransformation von Glucose mit wachsenden Zellen von <i>G. oxydans</i> DSM 2343 und <i>G. oxydans</i> MF1	32
2.5 Biotransformation von Glucose mit <i>G. oxydans</i> MF1 und <i>G. oxydans</i> MF1 pRS201P/ <i>gno</i>	36
3. Umsetzung von Glucose zu 5-KGA im Periplasma von <i>G. oxydans</i>.....	40
3.1 Homologe Überproduktion der membrangebundenen Glucose- und Gluconat-5-Dehydrogenasen	40
3.2 Bestimmung der Aktivität der membrangebundenen Glucose-Dehydrogenase, mGDH	41
3.3 Umsetzung von Glucose mit wachsenden Zellen von <i>G. oxydans</i> DSM 2343, pTB9008 und pTB9017	44
3.4 Homologe Überproduktion der membrangebundenen Gluconat-5-Dehydrogenase mGA5DH.....	45
3.5 Umsetzung von Glucose mit wachsenden Zellen von <i>G. oxydans</i> MF1, pTB9014 und pTB9017.....	48
4. Optimierung der Kultivierungsparameter für die 5-KGA-Bildung	49
4.1 Steigerung der Glucose-Konzentration	49
4.2 Umsetzung von kontinuierlich zugeführter Glucose mit wachsenden Zellen von <i>G. oxydans</i> MF1	53
5. Expression des <i>mga5dh</i>-Gens	57
5.1 Steigerung der <i>mga5dh</i> -Expression durch Austausch des nativen Promotors	57
5.2 Umsetzung von 550 mmol l ⁻¹ Glucose mit wachsenden Zellen der <i>G. oxydans</i> <i>mga5dh</i> -Überproduzenten	60
5.3 Disruption des chromosomalen <i>mga5dh</i> -Gens.....	64

Diskussion	71
Literaturverzeichnis	83
Anhang	95
Danksagung.....	104

Abkürzungsverzeichnis

2-KGA	2-Keto-D-Gluconat
2,5-dKGA	2,5-di-Keto-Gluconat
5-KGA	5-Keto-D-Gluconat
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
Cef	Cefoxitin
Cyt	Cytochrom
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Nukleotidtriphosphat-Mix
DCIP	2,6-Dichloro-indophenol
DMF	N,N-Dimethylformamid
EC	Enzyme Commission, Enzymatisch Nomenklatur nach Funktionalität
FAD	Flavinadenindinukleotid
Gen	Gentamycin
h	Stunde
HPLC	engl. High Performance Liquid Chromatographie, Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie
IPTG	Isopropyl-beta-D- <i>thiogalactopyranosid</i>
Kan	Kanamycin
kb	kilo-Basenpaare
LB	Luria Bertani
M	Molar, bzw. mol l ⁻¹
Mb	mega (10 ⁶) Basenpaare
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfon-Säure
MQW	Maisquellwasser
n.d.	nicht detektierbar
NAD ⁺	Nicotinadenindinukleotid, oxidierte Form

NADH	Nicotinadenindinukleotid, reduzierte Form
NADP ⁺	Nicotinadenindinukleotidphosphat, oxidierte Form
NADPH	Nicotinadenindinukleotidphosphat, reduzierte Form
<i>thio</i> -NAD ⁺	<i>thio</i> -Nicotinadenindinukleotid, oxidierte Form
OD	optische Dichte
PES	Phenazinethosulfat
PCR	engl. polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
Str	Streptomycin
TG	Trockengewicht
T _m	DNA-Schmelztemperatur
U	Unit [$\mu\text{mol min}^{-1}$]
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolettes Licht
VE	voll entsalztes (Wasser)
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	"weight per volume", Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside

Einleitung

1. *Gluconobacter oxydans*

Viele Gram-negative aerobe Bakterien oxidieren Substrate vollständig zu H₂O und CO₂. Nur unter ungünstigen Wachstumsbedingungen, wie z.B. Sauerstoffmangel, werden die Substrate unvollständig oxidiert (Fritsche, 1999). Eine Ausnahme bilden die Essigsäurebakterien (*Acetobacteraceae*). Bei Wachstum mit Ethanol oder Glucose als C-Quelle führen diese Bakterien eine unvollständige Oxidation der Substrate durch, wobei z.B. Ethanol zu Essigsäure umgesetzt wird, welche sich im Medium ansammelt (De Ley *et al.*, 1984; Matsushita *et al.*, 1992). Diese Eigenschaft machte die *Acetobacteraceae* schon vor über 2000 Jahren zu den ersten Speiseessig-Produzenten (De Ley & Swings, 1981; De Ley *et al.*, 1984; Ruiz *et al.*, 2000).

Die strikt aeroben, 0,6 - 0,8 x 1,0 - 4,0 µm langen, stäbchenförmigen *Acetobacteraceae* lassen sich in die Gattungen *Acetobacter*, *Gluconacetobacter* und *Gluconobacter* unterteilen. Die Gattung *Gluconobacter* kann dabei nicht, wie die Gattung *Acetobacter*, Acetat und Lactat zu H₂O und CO₂ zu oxidieren (De Ley *et al.* 1984). Eine eindeutige molekularbiologische Differenzierung *Gluconobacters* von *Acetobacter* konnte durch 16S-rRNA-Vergleiche erreicht werden (Sievers *et al.*, 1995). Innerhalb der Gattung *Gluconobacter* lassen sich die vier Arten *asaii*, *cerinus*, *frateurii* und *oxydans* unterscheiden (De Ley *et al.*, 1984). Dabei können *Gluconobacter cerinus*, *asaii* und *oxydans* im Vergleich zu *Gluconobacter frateurii* weder mit L-Arabitol noch mit meso-Ribitol als C-Quelle wachsen. Das Wachstum ist zudem von dem Vorhandensein des Vitamins Nicotinsäure (Niacin, B5) abhängig (Katsura *et al.*, 2002).

Die natürlichen Habitate von *G. oxydans* sind Blütennektar, Gartenerde, gegorene Getränke wie Wein und Bier, aber auch Bienenhonig und Früchte (Battey & Schaffner, 2001; Gupta *et al.*, 2001). *G. oxydans* wächst optimal bei 25 bis 30°C; bei Temperaturen über 37°C ist kein Wachstum mehr nachweisbar (De Ley *et al.*, 1984). Bei einem pH-Wert von 5 bis 6 kann *G. oxydans* unter Verwendung unterschiedlicher C-Quellen wie z.B. Glucose, Fructose, Glycerin oder Sorbit wachsen (Olijve & Kok, 1979), wobei Mannit die für das Wachstum optimale C-Quelle darstellt (Gosselé *et al.*, 1980). Bei pH-Werten unterhalb von 3 findet in *G. oxydans* aufgrund der Inhibition der Enzyme

des zentralen Pentose-Phosphat-Wegs nur sehr geringes Wachstum statt (Olijve & Kok, 1979).

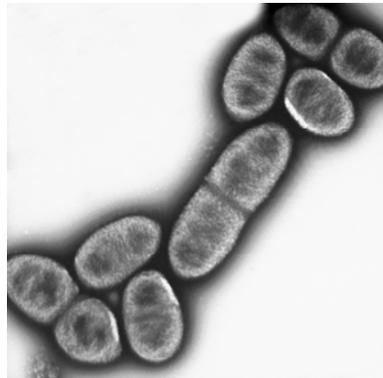


Abbildung 1, Elektronenmikroskop Aufnahme von *Gluconobacter oxydans* DSM 2343

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

G. oxydans DSM 2343 (Abbildung 1) ist das erste Essigsäurebakterium dessen Genom vollständig sequenziert wurde. Der GC-Gehalt der genomischen DNA ist mit 61 % im Vergleich zu anderen Bakterien relativ hoch (De Ley *et al.*, 1984; Prust *et al.*, 2005). Neben dem bakteriellen Chromosom von 2.702 kb besitzt *G. oxydans* DSM 2343 zusätzlich fünf Plasmide (163,1 kb; 26,6 kb; 14,6 kb; 13,2 kb und 2,7 kb), womit das gesamte Genom von *G. oxydans* DSM 2343 eine Größe von 2.922 kb aufweist (Prust *et al.*, 2005). Bis zum heutigen Zeitpunkt konnten sowohl 2664 putative Proteinkodierende, offene Leserahmen, als auch vier Kopien für rRNA Operons und 55 tRNA Gene identifiziert werden. Es wird angenommen, dass das *G. oxydans* DSM 2343 Genom zu 89,9 % für Proteine oder stabile RNA kodiert, wobei 1877 offenen Leserahmen eine tatsächliche Funktionalität zugeordnet wurde (Prust *et al.*, 2005). Das Vorhandensein von 18 Insertionselemente und 103 Transposasen verdeutlicht die beobachtete relative Instabilität bzw. Variabilität des Genoms (Kondo & Horinouchi, 1997; Prust *et al.*, 2005).

2. Glucoseoxidation

Wie der Name *Gluconobacter* impliziert, kann diese Gattung Glucose zu Gluconat und weiter zu Keto-Gluconsäuren oxidieren. Die Oxidation von Glucose zu Gluconat wird in *G. oxydans* hauptsächlich durch eine membrangebundene PQQ-abhängige Glucose-Dehydrogenase (mGDH) katalysiert (Ameyama *et al.*, 1981; Pronk *et al.*, 1989). Das gebildete Gluconat kann dann entweder durch eine membrangebundene, FAD-abhängige Gluconat-2-Dehydrogenase (mGA2DH) zu 2-Keto-D-Gluconat (2-KGA) oxidiert werden oder wird durch eine membrangebundene, PQQ-abhängige Gluconat-5-Dehydrogenase (mGA5DH) zu 5-Keto-D-Gluconat (5-KGA) oxidiert (Abbildung 2), (Olijve & Kok, 1979; Shinagawa *et al.*, 1981; Matsushita *et al.*, 1982; Matsushita *et al.*, 2003). Das durch die mGDH gebildete Gluconat kann aber ebenso von der Zelle aufgenommen werden, wo es über eine Gluconokinase zu 6-Phosphogluconat umgesetzt wird, welches dann in den Pentose-Phosphat-Weg oder den Entner-Doudoroff-Weg eingeschleust und verstoffwechselt werden kann (Kitos *et al.*, 1958) (Anhang, Abbildung 29).

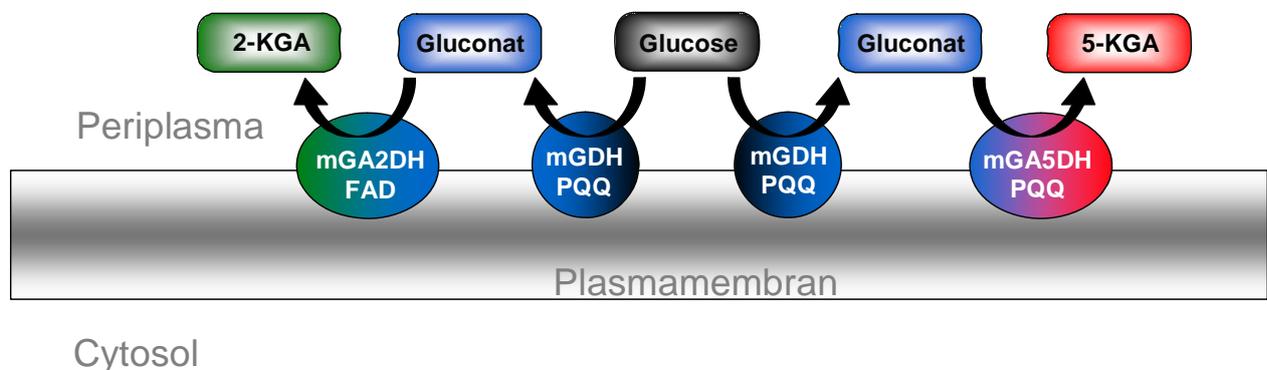


Abbildung 2, Umsetzung von Glucose zu Gluconat bzw. Keto-Gluconaten durch membranassoziierte Dehydrogenasen in *G. oxydans*

Abkürzungen: mGA2DH, FAD-abhängige Gluconat-2-Dehydrogenase; mGDH, PQQ-abhängige Glucose-Dehydrogenase; mGA5DH, PQQ-abhängige Gluconat-5-Dehydrogenase

Das gebildete 2-KGA und 5-KGA kann ebenfalls in die Zelle aufgenommen werden, wo es wieder zu Gluconat reduziert und schließlich zu 6-Phosphogluconat phosphoryliert werden kann (Weenk *et al.*, 1984; Gupta *et al.*, 2001). In *Pseudomonas aeruginosa*

PAO1 soll 2-KGA durch einen spezifischen 2-KGA-Transporter in das Cytosol aufgenommen und durch eine 2-KGA-Kinase zu 2-KGA-6-Phosphat umgesetzt werden (Swanson *et al.*, 2000). Darauf folgt eine Reduktion des 2-KGA-6-Phosphats zu 6-Phosphogluconat und eine anschließende Verstoffwechslung im Pentose-Phosphat-Weg (Swanson *et al.*, 2000). Eine cytosolische NADPH-abhängige 2-KGA-Reduktase, (2KGR) wurde aus *G. oxydans* isoliert und proteinbiochemisch untersucht (Ameyama, 1982). Aus diesem Grund sind für die Verstoffwechslung von 2-KGA und 5-KGA in *G. oxydans* ähnliche Wege anzunehmen (Gupta *et al.*, 2001).

Die Bildung von 5-KGA im Cytosol von *G. oxydans* wird durch zwei Oxidationsreaktionen katalysiert. Dabei wird Glucose zunächst von einer cytosolischen Glucose-Dehydrogenase (cGDH) zu Gluconat oxidiert und dieses anschließend durch die Gluconat:NADP⁺ 5-Oxidoreduktase (GNO) zu 5-KGA weiteroxidiert (Abbildung 3) (Ameyama *et al.*, 1981; Pronk *et al.*, 1989; Klasen *et al.*, 1995).

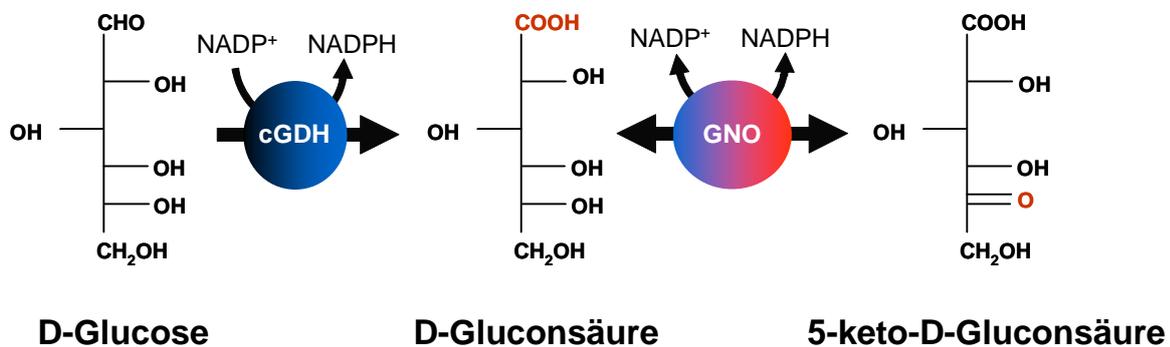


Abbildung 3, Oxidation von Glucose zu Gluconat bzw. 5-Keto-D-Gluconat im Cytosol von *G. oxydans*

Abkürzungen: cGDH, cytosolische Glucose-Dehydrogenase; GNO, Gluconat: NADP-5-Oxidoreduktase

Die beiden Dehydrogenasen cGDH und GNO benötigen für diese Reaktionen NADP⁺ als Cofaktor welches zu NADPH reduziert wird. Da *G. oxydans* DSM 2343 keine NADP⁺ regenerierende Transhydrogenase vom Typ UDHA besitzt, stellen die cytosolischen Oxidoreduktasen wie z.B. GNO oder 2KGR eine Möglichkeit dar, NADPH zu oxidieren (Eagon, 1963; Boonstra *et al.*, 1999; Prust *et al.*, 2005). Das so genannte „Old yellow

enzyme“, welches aus Hefen bekannt ist und dort die Oxidation von NADPH katalysiert, wurde aus einem *G. oxydans* Stamm isoliert (Adachi *et al.*, 1979a). Allerdings liegen keine Anzeichen dafür vor, dass diese NADPH-Oxidase in *G. oxydans* DSM 2343 vorhanden ist (Prust *et al.*, 2005). Ist daher anzunehmen, dass *G. oxydans* DSM 2343 das Pyridinnukleotid NADPH über reduktive, anabole Stoffwechselreaktionen zu NADP⁺ regeneriert (Mowshowitz *et al.*, 1974; Englard & Avigad, 1975; Csonka & Fraenkel, 1977; Parmentier *et al.*, 2003; Parmentier *et al.*, 2005). Alle Oxidationsreaktionen der erwähnten Dehydrogenasen folgen der Bertrand-Hudson-Regel (Abbildung 4), die die regioselektive Oxidation von Polyolen mit D-erythro- oder L-threo-Konfiguration zu Ketonen beschreibt (Kulhanék, 1989; Schedel, 2000).

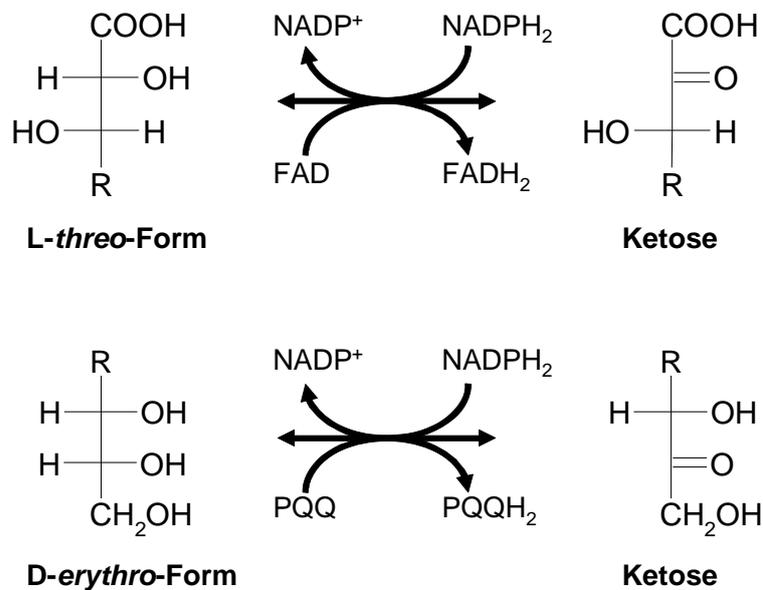


Abbildung 4, Bertrand-Hudson-Regel für die Oxidation von Polyolen

Molekülkonformationen, für die die Bertrand-Hudson-Regel zutrifft. Die L-threo-Form beschreibt, z.B. den oberen Molekülteil von Gluconat, die D-erythro-Form z.B. den unteren Teil von Gluconat. Durch Oxidation der L-threo-Form können Produkte wie, z.B. 2-Keto-D-Gluconat entstehen; aus der D-erythro-Form wird z.B. 5-Keto-D-Gluconat gebildet. Abkürzung: R, Rest

Produkte, die aus der L-threo-Form gebildet werden sind z.B. 2-Keto-D-Gluconat aus Gluconat oder Sorbose aus Sorbit, aus der D-erythro-Form wird z.B. 5-Keto-D-Gluconat aus Gluconat oder Dihydroxyaceton aus Glycerin gebildet. Ein Polyhydroxy-Substrat mit

drei bis sechs Kohlenstoffatomen, welches eine der Konfigurationen aufweist, wird entsprechend der Bertrand-Hudson-Regel oxidiert. Da sich die *L-threo*- wie auch die *D-erythro*-Form nur auf einen Teil eines Moleküls bezieht, kann man die Vielfalt der durch *G. oxydans* gebildeten Oxidationsprodukte nachvollziehen.

3. Weinsäure und 5-KGA

Weinsäure (2,3-Dihydroxybernsteinsäure) wurde erstmals 1769 von dem schwedischen Chemiker Carl Wilhelm Scheele aus dem bei der Weinkelterei ausgefallenen Weinstein (Kaliumhydrogentartrat) kristallisiert (Scheele, 1793). Sie wird in der Textilindustrie als Reduktionsmittel eingesetzt, in der Pharmaindustrie als chirales Agens verwendet und findet in der Lebensmittelindustrie als Säuerungs- und Konservierungsmittel Anwendung (Hungerbühler & Seebach, 1981; Haberstroh & Hustede, 1983; Bestmann & Philipp, 1991). Die jährliche Produktion betrug 2002 ca. 35.000 t zu einem Preis von 6 €/kg (Lichtenthaler, 2002). Chemisch wird Weinsäure durch Oxidation von Fumarsäure oder Maleinsäureanhydrid mit Wasserstoffperoxid, Kaliumpermanganat oder anderen Persäuren hergestellt. Aus dem Racematgemisch von *meso*-, *L*(+)- und *D*(-)-Weinsäure muss dann die *L*(+)-Weinsäure durch z.B. kinetische Racematspaltung isoliert werden (Beyer & Walter, 2004). Für die Gewinnung der Weinsäure aus natürlichen Rohstoffen werden die bei der Weinkelterei anfallenden Abfallstoffe verwendet: Bodensatz, welcher sich als schleimiges Sediment in den Weinfässern bildet; Filterkuchen, der bei der Filtration von Wein anfällt und kristalline Krusten, welche in den Weinfässern ausfallen (Palma & Barroso, 2002). Der in diesen Rohstoffen vorhandene Weinstein wird mit Calciumhydroxid zu Calciumtartrat umgesetzt und anschließend durch Zugabe von Schwefelsäure in *L*(+)-Weinsäure und Gips (Calciumsulfat) getrennt (Haberstroh & Hustede, 1983). Bei diesen Prozessen ist von entscheidendem Nachteil, dass die Qualität des Ausgangsstoff nicht gleich bleibend ist und dass es bei der Verarbeitung zu Weinsäure zu Kontaminationen durch Sulfate kommen kann.

Die ersten beschriebenen Versuche zur chemischen Darstellung von Weinsäure aus 5-KGA wurden 1933 durch Barch unternommen (Barch, 1933). Dabei wurde 5-KGA mit Salpetersäure (HNO_3), bei gleichzeitiger Verwendung des Schwermetalls Vanadium

(Natrium *ortho*-Vanadat), zu einem Gemisch aus D(-)-, L(+)- und *meso*-Weinsäure, Trihydroxyxyloglutarsäure und Oxalsäure oxidiert. Die Wahl des Substrates 5-KGA wurde damals mit der relativ einfachen Oxidierbarkeit begründet (Barch, 1933). Ebenso wurde der Effekt von Carbonat und Phosphat-Ionen auf die Spaltung von 5-KGA in Weinsäure und Oxalsäure durch Vanadat untersucht. Die Verwendung von Carbonat-Puffer zeigte, dass sich die Selektivität der Weinsäurebildung von 30 % auf 80 % steigern ließ (Matzerath *et al.*, 1995). Experimente, 5-KGA intrazellulär in *G. oxydans* durch Überproduktion von Transketolasen vom Typ TktA, bzw. TktB aus *E. coli* und Bäckerhefe in *E. coli* zu Weinsäure umzusetzen, wurden erst kürzlich beschrieben (Salusjärvi *et al.*, 2004). Dabei setzte man voraus, dass die verwendeten Transketolasen die Ketol-Gruppe des 5-KGA entfernen und so ein Weinsäure-Semialdehyd bilden (Salusjärvi *et al.*, 2004). Dieses Semialdehyd soll dann im Anschluss durch eine z.B. NAD⁺/NADP⁺-abhängige Transhydrogenase zu L-(+)-Weinsäure oxidiert werden (Salusjärvi *et al.*, 2004). Die Überproduktion der Transketolasen TktA und TktB in *E. coli* und anschließende Enzymtests zeigten, dass 5-KGA mit einer 10-fach verringerten Affinität und einer 4-fach verringerten Aktivität im Vergleich zu dem bevorzugten Substrat Xylulose-5-Phosphat von diesen Enzymen akzeptiert wird. Eine Bildung von Weinsäure wurde nicht beschrieben (Salusjärvi *et al.*, 2004).

Die Ketocarbonsäure 5-KGA ist deshalb ein industriell interessantes Ausgangs-Substrat, da es sich chemisch durch eine relativ einfache, katalytische Reaktion mit Vanadat in L-(+)-Weinsäure und Oxalsäure spalten lässt (Klasen *et al.*, 1992; Matzerath *et al.*, 1995). Die derzeit etablierten Verfahren zu Darstellung von Weinsäure aus Kaliumtratarat sind von den Nebenprodukten der Weinkeltereie und dem dabei anfallenden Ausgangsstoff abhängig. Im Vergleich dazu ist die Bildung von Weinsäure bzw. 5-KGA aus Glucose ökonomisch sinnvoller: Der Ausgangsstoff Glucose ist preiswert, nahezu unbegrenzt verfügbar und das selektive Ausfällen/Isolieren des stereospezifischen Produkts 5-KGA relativ einfach (Kotera *et al.*, 1972b); 5-KGA kann durch Zugabe von Calciumsalzen selektiv ausgefällt werden. Hinzu kommt, dass die katalytische Umsetzung von 5-KGA mit Vanadat zu Weinsäure unabhängig von den lebenden Kulturen in isolierten Systemen erfolgen kann, wodurch die Bildung von Nebenprodukten vermieden wird (Barch, 1933; Matzerath *et al.*, 1995).

Zielsetzung der Arbeit

Gluconobacter oxydans sollte mit Glucose als Substrat in Ganzzell-Biotransformationsprozessen für die Produktion von 5-KGA eingesetzt werden. Zunächst wurden die vorhandenen *G. oxydans* Stämme hinsichtlich der 5-KGA-Produktivität verglichen und ein geeigneter Kandidat für die weitere Stammverbesserung ausgewählt. Durch die Überproduktion der NADP⁺-abhängigen GNO wurde die Bildung von 5-KGA im Cytosol verbessert (Klasen *et al.*, 1995). Die von Klasen *et al.* (1995) beobachtete verstärkte Reduktion des NADP⁺-Pools zu NADPH sollte durch Expression des Gens einer heterologen Transhydrogenase (UDHA) aus *E. coli* verringert werden und so die Verfügbarkeit des Cofaktors NADP⁺ für die Oxidation von Gluconat durch das GNO Enzym sichergestellt sein (Eagon, 1963; Klasen, 1995; Boonstra *et al.*, 2000). Durch Überproduktion der membrangebundenen, PQQ-abhängigen Glucose-Dehydrogenase (mGDH) und Gluconat-5-Dehydrogenase (mGA5DH) konnte die 5-KGA-Bildung zusätzlich verbessert werden (Ameyama *et al.*, 1981; Pronk *et al.*, 1989; Matsushita *et al.*, 2003). Die genomische Inaktivierung des Gens der membrangebundenen Gluconat-2-Dehydrogenase (mGA2DH) sollte die Bildung des Nebenprodukt 2-Keto-D-Gluconat verhindern (Matsushita *et al.*, 1982). Nach Konstruktion eines geeigneten Produktionsstammes ist es im Anschluß notwendig, die optimalen Produktionsparameter und Protokolle zur Bildung von 5-KGA zu etablieren. Es wurde eine Methode zur Quantifizierung der Fermentationsprodukte Gluconat, 2-KGA und 5-KGA entwickelt. Da die Bildung von 5-KGA in *G. oxydans* sowohl durch das GNO als auch durch das mGA5DH Enzym katalysiert werden, sollte ermittelt werden, welches der beiden Enzyme hauptsächlich für die Bildung von 5-KGA verantwortlich ist. Die Inaktivierung des mGA5DH Proteins und der anschließende Vergleich der Mutante mit dem Elternstamm wurde zur Identifizierung der Hauptaktivität der 5-KGA-Bildung durchgeführt (Shinagawa *et al.*, 1999; Hoshino *et al.*, 2003; Matsushita *et al.*, 2003). Ziel der Arbeit war ein optimierter *G. oxydans* Stamm, der 5-KGA mit hohen Ausbeuten und Raten bildet. Dieser Stamm würde den Ausgangsstoff 5-KGA liefern, der durch chemische Katalyse mit Vanadat in L-(+)-Weinsäure umgesetzt werden kann und somit eine Alternative zur herkömmlichen Weinsäureproduktion darstellt.

Material und Methoden

1. Organismen und Kultivierung

1.1 Verwendete Organismen

Tabelle 1, Verwendeten Organismen

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i>		
DH5 α	F ⁻ , ϕ 80d lacZ Δ M15, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> ¹ , <i>hsdR17</i> (r _k ⁻ ,m _k ⁺), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , Δ (lacZYA-argF)U169	(Hanahan, 1983)
JM109 (DE3)	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> ¹ , <i>hsdR17</i> (r _k ⁻ ,m _k ⁺), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , Δ (lac-proAB), [F ⁻ , <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , lac ^q Z Δ M15], λ (DE3)	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
HB101 (mit Plasmid pRK2013)	F ⁻ , <i>hsdS20</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻), <i>supE44</i> , <i>ara</i> ⁻¹ 4, <i>galK-2</i> , <i>lacY1</i> , <i>proA2</i> , <i>rpsL20</i> , <i>xyl-5</i> , <i>mtl-12</i> , <i>recA13</i> , Km ^R , <i>oriColE1</i> , <i>RK2-Mob</i> ⁺ , <i>RK2-Tra</i> ⁺	(Boyer & Roulland-Dussoix, 1969; Figurski & Helinski, 1979; Lam <i>et al.</i> , 1985)
S17-I	294 (<i>recA</i> , <i>pro res mod</i> ⁺) Tp ^R Sm ^R (pRP4-2-Tc::MuKm::Tn7)	(Simon <i>et al.</i> , 1983)
<i>G. oxydans</i>		
DSM 2343	Wildtyp, Cef ^R	(De Ley <i>et al.</i> , 1984)
DSM 3503	Wildtyp, Cef ^R	(De Ley <i>et al.</i> , 1984)
MF1	DSM 2343 <i>mga2dh::kan</i> ^R , Kan ^R	(Ha, 2004)
DSM 2343/ <i>gno</i>	DSM 2343 pRS201P/ <i>gno</i> , Sm ^R , Kan ^R	diese Arbeit
DSM 2343/ <i>gno/udhA</i>	DSM 2343 pRS201P/ <i>gno/udhA</i> , Sm ^R , Kan ^R	diese Arbeit
MF1/ <i>gno</i>	MF1 pRS201P/ <i>gno</i> , Kan ^R , Sm ^R	diese Arbeit
pTB9003	DSM 2343 pBBR1MCS2/ <i>mgdh</i> , Kan ^R	(Ha, 2004)
pTB9008	MF1 pBBR1MCS5/ <i>mgdh</i> , Gm ^R , Kan ^R	(Ha, 2004)
pTB9014	MF1 pBBR1MCS5/ <i>mga5dh</i> , Gm ^R , Kan ^R	(Ha, 2004)
pBT9017	MF1 pBBR1MCS5/ <i>mgdh/mga5dh</i> , Gm ^R , Kan ^R	(Ha, 2004)
MF1 <i>pgdh_{gox}_mga5dh</i>	MF1 pBBR1MCS5/ <i>pgdh_{gox}_mga5dh}</i> , Gm ^R , Kan ^R	diese Arbeit
MF1 <i>ptufB_{gox}_mga5dh}</i>	MF1 pBBR1MCS5/ <i>ptufB_{gox}_mga5dh}</i> , Gm ^R , Kan ^R	diese Arbeit
MF1 <i>ptufB_{ecoli}_mga5dh}</i>	MF1 pBBR1MCS5/ <i>ptufB_{ecoli}_mga5dh}</i> , Gm ^R , Kan ^R	diese Arbeit
MF1/ <i>mga5dh::strAB</i>	MF1 <i>mga5dh::strAB</i> , Kan ^R , Sm ^R	diese Arbeit
<i>G. oxydans</i> sp.		
DSM 3504	Wildtyp, Cef ^R	(De Ley <i>et al.</i> , 1984)

1.2 Kulturmedien

Für die Kultivierung der Organismen in dieser Arbeit wurden folgenden Nährmedien verwendet.

a) *E. coli*

Luria Bertani (LB) Medium (Sambrook *et al.*, 1989)

Hefeextrakt	5 g l ⁻¹
Trypton	10 g l ⁻¹
NaCl	10 g l ⁻¹
Agar (für Platten)	15 g l ⁻¹

b) *G. oxydans*

Vollmedium (Buchert & Viikari, 1988)

Hefeextrakt	5 g l ⁻¹
Trypton	3 g l ⁻¹
D-Mannit	10 g l ⁻¹
CaCO ₃	5 g l ⁻¹ (als Puffer bei acidogener C-Quelle)
Agar (für Platten)	15 g l ⁻¹
pH	6 mit HCl eingestellt

Eine Zugabe von CaCO₃ erfolgte z.B. bei Wachstum von *G. oxydans* mit Glucose als C-Quelle. Alternativ wurden anstatt D-Mannit auch gleiche Mengen an D-Glucose, D-Gluconat und D-Sorbit eingesetzt.

Maisquellwasser-Medium (MQW) (Elfari *et al.*, 2005)

MQW-Konzentrat	7,5 g l ⁻¹
Ca(CH ₃ COO) ₂	0,5 g l ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,41 g l ⁻¹
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,1 g l ⁻¹
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,07 g l ⁻¹
Glucose	25 - 100 g l ⁻¹ (je nach Versuchsbedingungen)

Antifoam (Silikonöl)	1 Tropfen
pH	5 mit HCl eingestellt

Das MQW-Medium wurde bei der Kultivierung der Stämme im DASGIP Fermenter verwendet, um eine anschließende HPLC-Analytik zu ermöglichen.

5-KGA Produktionsmedium (Herrmann *et al.*, 2004)

K ₂ HPO ₄	8,7 g l ⁻¹
Glucose	25 g l ⁻¹
CaCl ₂	10 g l ⁻¹
pH	6 mit HCl eingestellt

CaCl₂ wurde separat im Erlenmeyerkolben autoklaviert und erst bei Versuchsbeginn zur Lösung hinzu gegeben. Die anderen Nährmedien wurden nach der Zusammenstellung standardgemäß 20 min bei 120 °C und 2 bar autoklaviert.

1.3 Kultivierung von *E. coli* und *G. oxydans*

Zur Kultivierung von *G. oxydans* wurden jeweils Einzelkolonien in 5 ml Vollmedium mit 100 µg ml⁻¹ Cefoxitin inokuliert und über Nacht bei 30°C und 160 Upm inkubiert. Für Aktivitätsmessungen, Ganzzell-Biotransformationen oder Wachstums-Experimente wurden anschließend 50 ml Vollmedium in 500 ml Erlenmeyerkolben mit einer optischen Dichte von 0,1 angeimpft und je nach verwendetem Stamm (Tabelle 1) Antibiotikum (Cefoxitin, Ampicillin, Kanamycin, Streptomycin jeweils 100 µg ml⁻¹, Gentamycin 50 µg ml⁻¹) hinzu gegeben. Die Kultivierung von *E. coli* Stämmen erfolgte analog mit LB-Medium, die Inkubationstemperatur betrug dann jedoch 37°C.

1.4 Erstellung einer Wachstumskurve und Bestimmung der Wachstumsparameter

Zur Charakterisierung der unterschiedlichen Stämme wurden Wachstumskurven erstellt. In 500 ml Erlenmeyerkolben wurden 50 ml Vollmedium mit 500 µl einer *G. oxydans* Vorkultur inokuliert und alle 1-2 Stunden die optische Dichte bei 600 nm im

Photometer (Ultrospec 3000 pro, Amersham Bioscience) bestimmt. Die erhaltenen Werte wurden gegen die Zeit aufgetragen und anhand der maximale Steigung die Wachstumsrate μ_{\max} und die Verdopplungszeit t_d des verwendeten *G. oxydans* Stammes bestimmt.

1.5 Transformation von *E. coli* und *G. oxydans*

Die Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen erfolgte nach der RbCl-Methode (Cohen *et al.*, 1972), die Transformation mit Plasmid-DNA nach Hanahan (1983). Nach der Transformation wurden die Zellen bei 37°C für 30 min in LB-Medium kultiviert und anschließend auf Agar-Platten plattiert. Für die Transformation von *G. oxydans* wurden elektro-kompetente Zellen hergestellt (Trevors & Stradoub, 1990) und diese mit 0,5 bis 2 μg Plasmid-DNA transformiert. Im Anschluss wurden die Transformanden 3 Stunden in Vollmedium bei 30°C kultiviert und danach auf Agar-Platten plattiert. Neben Elektroporation wurde *G. oxydans* ebenso über di- und triparentale Konjugation transformiert (Fischer-Fantuzzi & Di Girolamo, 1961; Condon *et al.*, 1991; Connell *et al.*, 1995). Als Helferstamm wurde *E. coli* HB101, welcher die Gene für die Mobilisierung auf dem Plasmid pRK2013 trägt, eingesetzt (Figurski & Helinski, 1979; Lam *et al.*, 1985). Der *G. oxydans* Ziel-, *E. coli* Helfer- und *E. coli* Donorstamm wurden in jeweils 5 ml des LB- bzw. Vollmedium bis zur mittleren exponentielle Phase kultiviert. Ein Konjugationsansatz bestand jeweils aus 50 μl der einzelnen Kulturen mit jeweils gleicher, angepasster OD. Die Mischung wurde als Tropfen auf Vollmedium-Platten aufgebracht, getrocknet und für ca. 16 bis 30 Stunden bei 30°C inkubiert. Die wachsenden Kolonien wurden mit Vollmedium abgeschwemmt und davon 1:10 und 1:100 Verdünnungen auf Vollmedium-Platten mit 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Cefoxitin ausplattiert; es konnten nur jene *G. oxydans* Klone wachsen, die aus dem Donorstamm das Plasmid erhalten hatten.

2. Molekularbiologische Methoden

2.1 Isolierung von DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab aus *E. coli* und *G. oxydans* erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) gemäß der Angaben des

Herstellers. Zusätzlich zum Protokoll wurde bei Isolierung von DNA aus *G. oxydans* nach der Neutralisierung des alkalischen Zellysats das Reaktionsgefäß für 30 Sekunden bei -20°C inkubiert, um Proteine vollständig auszufällen. Für die Isolierung von Plasmid-DNA im mittleren Maßstab (> 20 µg) wurde gemäß der Angaben des Herstellers das Qiagen Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Die Lagerung der Plasmid-DNA erfolgte bei -20°C im Gefrierschrank. Genomische DNA von *E. coli* und *G. oxydans* wurde durch das Verwenden des Puregene DNA Purification Kits laut Angaben des Herstellers (Gentra, Minneapolis, MN, USA) isoliert. Genomische DNA wurde bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Die Bestimmung der Konzentration von DNA-Lösungen erfolgte durch Verwendung des NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometers (Nanodrop Technology, Wilmington, USA).

2.2 Restriktion von DNA

Die Spaltung von Plasmid-DNA an spezifischen Sequenzen erfolgte mit Restriktions-Endonukleasen gemäß der Angaben des Herstellers (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). Ein 50 µl Reaktionsansatz wurde wie folgt erstellt:

Plasmid-DNA	x µl (2-4 µg)
Restriktionsenzym (10 U µl ⁻¹)	1 µl
Enzympuffer 10x	5 µl
H ₂ O	(50 - x) µl

Der Reaktionsansatz wurde bei 37°C für eine Stunde inkubiert. In einem analytischen Ansatz von 20 µl wurden 500 ng Plasmid-DNA und 0,5 U des Enzyms eingesetzt. Bei einer Restriktion mit 2 Enzymen wurde wenn möglich der Puffer verwendet, bei dem beide Enzyme die maximale Aktivität aufwiesen. Bei einer Spaltung mit zwei oder mehr Enzymen mit unterschiedlicher optimaler Temperatur wurde zunächst der Ansatz bei der niedrigeren Temperatur inkubiert und nach einer Stunde die höhere Temperatur eingestellt. Für die Ligation von geschnittenen Vektoren und DNA-Fragmenten (z.B. PCR-Amplifikate) wurden die Vektoren mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Ein Dephosphorylierungsansatz mit der Shrimp alkalische Phosphatase (SAP) wurde nach Angaben des Herstellers (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) durchgeführt.

Die dephosphorylierte Plasmid-DNA (ca. 50 ng) wurde zusammen mit DNA-Fragmenten (ca. 150 ng) gemischt und mittels Rapid DNA Ligation Kit nach Angaben des Herstellers (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) ligiert. Die Ligation wurde bei 4°C über Nacht durchgeführt.

2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die *in vitro*-Synthese eines Bereichs doppelsträngiger DNA von einem Plasmid oder aus genomischer DNA wurde mittels PCR durchgeführt (Mullis & Faloona, 1987). Die dazu notwendigen flankierenden Primer wurden von der Firma Operon (Köln) synthetisiert. Das molare Verhältnis der Nucleotide des dNTP-Mixes wurde aufgrund des hohen GC-Gehalts (60,8 %) (Prust *et al.*, 2005) des *G. oxydans* Genoms angepasst, so dass ein 1,5-facher Überschuss an cCTP- und cGTP-Nukleotiden vorlag.

$$c(\text{CTP, GTP}) : c(\text{ATP, TTP}) = 1,5 : 1$$

Ein 50 µl PCR Ansatz zur Amplifikation von DNA wurde wie folgt erstellt.

Primer 5'->3' (20 pmol µl ⁻¹)	1 µl
Primer 3'->5' (20 pmol µl ⁻¹)	1 µl
DNA Matrize (~ 10 ng µl ⁻¹)	1 µl
DNA Polymerase Puffer 10x	5 µl
dNTPs (1 - 1,5 mmol l ⁻¹)	10 µl
DNA-Polymerase (5 U µl ⁻¹)	0,5 µl
H ₂ O	22,5 µl

Die Anlagerungstemperatur der Primer wurde so gewählt, dass sie 5 - 7 °C unter dem niedrigsten T_m-Wert der beiden verwendeten Oligonukleotide lag. Die Elongationszeit wurde abhängig von der eingesetzten DNA-Polymerase *Pwo* oder *Taq* nach Angaben des Herstellers (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) gewählt. Die PCR-Reaktion wurde in einem Peltier Thermal Cycler (PTC-200, MJ Research, Waltham, MA) durchgeführt. Die Reinigung von linearer DNA z.B. aus einer PCR-Reaktion, als auch

die Isolierung von DNA aus Agarosegelen, erfolgte durch das QIAquick PCR Purification bzw. Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers.

2.4 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von neu konstruierten Plasmiden wurde mit dem BigDye Terminator Kit 3.1 (Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt (Mullis & Faloona, 1987). Die Templatekonzentration wurde auf $200 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ verdünnt, die Konzentration der verwendeten Oligonukleotide betrug $2,5 \text{ pmol } \mu\text{l}^{-1}$. Ein Ansatz zur Sequenzierung von DNA wurde wie folgt zusammengestellt:

Template-DNA	3 μl
Primer	1 μl
5x Sequenzierpuffer	4 μl
BigDye Terminormix	2 μl

Die Sequenzierreaktion wurde in einem Peltier Thermal Cycler (PTC-200, MJ Research, Waltham, MA, USA) durchgeführt. Nach der Reaktion wurden Nukleotide aus den Sequenzieransätze mittels DyeEX Kit (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers entfernt. Die DNA wurde anschließend im Kapillarsequenziergerät (3100 Avant Genetic Analyser, Applied Bioscience, Darmstadt) analysiert und über die Sequencing Analysis Software (Applied Bioscience, Version 5.1.1, Darmstadt) ausgewertet.

Oligonukleotide

Folgende Oligonukleotide wurden in dieser Arbeit zur Amplifikation von DNA-Fragmenten verwendet:

udhASalF3	(5'-GCG GTC GAC GAA ACA GAC AAA GCA AAG GC-3')
udhAR1Sal1	(5'-CGC GTC GAC CTA TTG GCC TGG TTT ATC G-3')
p_sldh_Gox_for	(5'-GGA CTT TCA GTT CTA GAG GCT TTC ACC-3')
p_sldh_Gox_rev	(5'-GCT TCC CAC CCG AAT TCT GGA AAA AAC G-3')
p_gdh_for	(5'-CGG TTG ATG AGC TCA TGG CGC T-3')
p_gdh_rev	(5'-CAC GGT GAC TTC TAG ACA AAG CAC AT-3')

p_tufB_Gox_for (5'-CGA TGG TAA GAG CTC CAC TGC CG-3')
p_tufB_Gox_rev (5'-CCC CGC TCT AGA TGG AAC GGG-3')
p_tufB_Ecoli_for (5'-CAC CAC CGA GCT CGG CCA C-3')
p_tufB_Ecoli_rev (5'-GTC CCT TCT AGA CAC GGA TAA ATC GG-3')
DsldA2600F (5'-CCT AGG GGT TGT CAG AAT TCT GGT GGG GC-3')
DsldA5400R (5'-GGT GAT TGC CGC GGC ATG CTC GAC AGC CC-3')
pACYC_tetR_for (5'-GTT TGA CAG CTT ATC ATC GAT AAG CTT TAA TGC GG-3')
pACYC_tetR_rev (5'-CGC TGC CCG AGA TCT GCC GCG TGC GGC TGC-3')
p_sldh_Gox_for (5'-GGA CTT TCA GTT CTA GAG GCT TTC ACC-3')
SmR_Rev_Dsldh (5'-CCT CGG GGC AAG CCA CAC C-3')

2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese diente zur größenabhängigen Auftrennung linearer DNA-Fragmente (Sambrook *et al.*, 1989). Die DNA-Proben wurden mit 6x Probenpuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Je nach DNA-Fragmentlänge wurden 0,8 bis 2 % Agarosegele verwendet. Nach der Auftrennung der DNA-Fragmente wurde das Gel 5 min in 2 % Ethidiumbromid gefärbt, 15 min in VE-H₂O entfärbt und anschließend unter UV-Licht photographiert (Image Master, VDS-System, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg).

6x Probenpuffer

Bromphenolblau	2,5 g l ⁻¹
Glycerin	30 %
Tris / HCl	7,9 g l ⁻¹
pH	7,6 mit HCl eingestellt

50x TAE-Puffer

Tris / HCl	242 g l ⁻¹
Titriplex III	18,61 g l ⁻¹
pH	8 mit Essigsäure eingestellt

2.6 Northern Blot Analyse

Die für die Transkriptionsanalyse notwendige mRNA aus *G. oxydans* wurde durch Verwendung des RNeasy Kits (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers isoliert.

10x MOPS-Puffer

MOPS	500 mmol l ⁻¹
Na ₂ EDTA	10 mmol l ⁻¹
pH	7,0 mit H ₂ SO ₄ eingestellt

RNA-Probenpuffer (Lagerung -20°C)

10x MOPS-Puffer	10 % (v/v)
Formamid 100 %	50 % (v/v)
Formaldehyd 37 %	6,8 % (v/v)
Glycerin 87 %	11,7 % (v/v)
Xylencyanol konz.	1 % (v/v), gesättigte Lösung
Bromphenolblau konz.	1 % (v/v). gesättigte Lösung
Ethidiumbromid (10mg ml ⁻¹)	5 % (v/v)

Die isolierte Gesamt-RNA wurde mit 4-fachem Probenpuffer versetzt und 10 min auf 65°C erhitzt. Anschließend erfolgte eine Auftrennung der RNA über Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook *et al.*, 1989). Vor dem Transfer auf eine Nylonmembran wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt und die Verteilung der RNA-Banden dokumentiert. Der Transfer von RNA erfolgte mittels Kapillartransfer (Löw & Rausch, 1994; Ming *et al.*, 1994) und wurde über Nacht durchgeführt. Die Hybridisierung der fixierten mRNA mit den jeweiligen spezifischen Digoxigenin-markierten DNA-Sonden erfolgte für 16 h bei 45°C im Hybridisierungsofen (Davies *et al.*, 1996). Anschließend wurden die an die mRNA gebundenen Sonde mit dem DIG Luminescence Detection Kit nach den Angaben des Herstellers (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) detektiert (Davies *et al.*, 1996).

3. Biochemische Methoden

3.1 **Ultraschallaufschluss von Zellen**

Für die Bestimmung der Aktivität cytosolischer und membrangebundener Enzyme von *G. oxydans* wurden 50 ml Vollmedium in einem 500 ml Erlenmeyerkolben mit 1 ml einer 5 ml Übernachtkultur angeimpft und bis zu einer optischen Dichte von 1,5 bis 1,8 inkubiert (200 Upm, 30°C). Die Zellen wurden geerntet (Sigma 2k 15, Rotor 12148, 4 min, 6000 g, 4 °C) und mit 20 ml 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen. Je nach Aktivitätstest wurden die Zellen in 1,6 ml des entsprechenden Reaktionspuffers gelöst und in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Der Ultraschallaufschluss (Dr. Hielscher Ultraschallprozessor UP200s; 0,5 Zyklen; Amplitude 0,55 bis 0,6; 4 min) erfolgte unter Eisbadkühlung des Reaktionsgefäßes. Anschließend wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation entfernt (Sigma 2k 15, Rotor 12149, 10 min, 21300 g, 4°C). Im Fall der Aktivitätsbestimmung cytosolischer Enzyme wurde der Überstand 1:10 verdünnt, für die Bestimmung der Aktivität der membranständigen Enzyme folgte die weitere Reinigung durch Ultrazentrifugation (Beckmann L8-70M, 40000 g, 1 Stunde, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 1 ml Resuspensionspuffer für eine Stunde im Eisbad oder im 4°C Kühlraum gelöst. Anschließend wurden die gelösten Membranfraktionen hinsichtlich ihrer Enzym-Aktivitäten untersucht.

Resuspensionspuffer

CaCl ₂	5 mmol l ⁻¹
MgCl ₂ x 7 H ₂ O	5 mmol l ⁻¹
Na ⁺ (CH ₃ COO ⁻)	100 mmol l ⁻¹
n-Octyl-β-D-glucopyranosid	1,5 %
pH	5 mit CH ₃ COOH eingestellt

3.2 **Bestimmung von Enzym-Aktivitäten**

a) Lösliche Gluconat:NADP⁺ 5-Oxidoreduktase:

Die Bestimmung der Aktivität des Enzyms GNO aus *G. oxydans* beruht auf der Oxidation von Gluconat zu 5-KGA und der damit verbundenen Reduktion des Cofaktors

NADP⁺ zu NADPH (Klasen *et al.*, 1995). Die Zunahme von NADPH ($\epsilon(\text{NADPH})_{340\text{nm}} = 6220 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) wurde bei 340 nm im Photometer (Spectramax Plus, Molecular Devices, München) ermittelt. Ein 250 μl Reaktionsansatz enthielt die folgenden Substanzen (Okamoto, 1963b; Klasen *et al.*, 1995):

GNO-Ansatz

Na ₂ CO ₃	100 mmol l ⁻¹
Na-Gluconat	300 mmol l ⁻¹
NADP ⁺	0,5 mmol l ⁻¹
Rohextrakt	20 μl , ca. 2 μg Protein
pH	10 mit NaOH eingestellt

Die Messungen wurden bei 30°C durch Zugabe von Gluconat gestartet und die Zunahme der Absorption gegen die Zeit in Minuten aufgetragen (Softmax Pro, Molecular Devices, München, Version 2.4.1). Aus der Kurve wurde die maximale Steigung ermittelt und nach Bestimmung der Proteinkonzentration die spezifische Aktivität des GNO Proteins in U mg⁻¹ Protein errechnet, wobei 1 U = 1 $\mu\text{mol min}^{-1}$ entspricht.

b) Lösliche Transhydrogenase:

Die Transhydrogenase UDHA aus *E. coli* katalysiert den Hydridtransfer von NADPH auf NAD⁺ (Boonstra *et al.*, 1999), wobei bei diesem Test anstatt NAD⁺ *thio*-NAD⁺ verwendet wurde. Die Bildung von *thio*-NADH ($\epsilon(\text{thio-NADH})_{400\text{nm}} = 11300 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) konnte bei 30°C im Photometer bei 400 nm ermittelt und die spezifische Aktivität in U mg⁻¹ Protein errechnet werden. Ein 250 μl Reaktionsansatz enthielt folgende Substanzen:

UDHA-Ansatz

Tris/HCl	50 mmol l ⁻¹
NADPH	0,1 mmol l ⁻¹
<i>thio</i> -NAD ⁺	0,1 mmol l ⁻¹
pH	7 mit HCl eingestellt

Die Reaktion wurde durch Zugabe von NADPH gestartet (Boonstra *et al.*, 1999; Sauer *et al.*, 2004).

c) Membrangebundene Glucose- und Gluconat-5-Dehydrogenase:

Die Bestimmung der spezifischen mGDH- und mGA5DH-Aktivität erfolgte durch Oxidation der Substrate Glucose, Gluconat, Sorbit und Mannit (Wood *et al.*, 1962; Matsushita *et al.*, 1982). Als artifizieller Elektronenakzeptor wurde 2,6-Dichlorphenol-indophenol (DCIP) und als Elektronenmediator Phenazinethosulfat (PES) verwendet. Die Messung erfolgte bei 30°C und wurde durch Zugabe des jeweiligen Substrates gestartet. Ein 250 µl Reaktionsansatz wurde wie folgt angesetzt:

Reaktionspuffer

CaCl ₂	5 mmol l ⁻¹
MgCl ₂ x 7 H ₂ O	5 mmol l ⁻¹
DCIP	0,11 mmol l ⁻¹
PES	0,2 mmol l ⁻¹
Substrat	100 mmol l ⁻¹
Na ⁺ (CH ₃ COO ⁻)	100 mmol l ⁻¹
n-Octyl-β-D-glucoopyranosid	1,5 %
pH	5 mit CH ₃ COOH eingestellt

Die Abnahme der Absorption des reduzierten DCIP ($\epsilon(\text{DCIP})_{525\text{nm}} = 6110 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) bei 525 nm wurde photometrisch bestimmt (Spectramax Plus, Molecular Devices, München). Aus der Steigung der Geraden im linearen Bereich und der ermittelten Proteinkonzentration wurde die spezifische Aktivität der Enzyme in U mg⁻¹ Protein ermittelt.

3.3 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Konzentration von unbekanntem Proteinlösungen wurde in einem UV/VIS-Photometer (Spectramax Plus, Molecular Devices, München) bei einer Wellenlänge von 595 nm ermittelt (Bradford, 1976). Zuvor wurde eine Kalibriergerade mit

Rinderserumalbumin bekannter Konzentration erstellt (Bradford, 1976). Die Berechnung der unbekanntenen Proteinkonzentrationen erfolgte mit der Software Softmax Pro (Version 2.4.1, Molecular Devices, München).

4. Analytische Methoden

4.1 Bestimmung von Metaboliten mittels HPLC

Die hochauflösende Flüssigchromatographie (HPLC) wurde zur Bestimmung der Biotransformations-Produkten eingesetzt. Die Auftrennung der Metabolite erfolgte über eine Umkehrphasenchromatographie-Säule (Shodex DE-613, Phenomenex, Aschaffenburg) mit $2 \text{ mmol l}^{-1} \text{ HClO}_4$ als Laufmittel, einer Temperatur von 30°C (Säulenofen Jetstream plus) und einer Flussrate von $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ (Pumpe L-7100, Hitachi Merck). Die Parameter zur Trennung der Metabolite wurden in dieser Arbeit entwickelt. Die Substanzen konnten innerhalb von 15 Minuten sowohl bei 210 nm im UV-Detektor (L-7400, Hitachi Merck) als auch im Brechungsindex-Detektor (L-7490, Hitachi Merck) nachgewiesen werden. Die automatische Berechnung der Konzentrationen der einzelnen Komponenten in der Probe erfolgte über substanzspezifische Kalibriergeraden für den UV und RI-Detektor (HSM D-7000, Multi HSM Manager, Version 4.1, Hitachi Merck).

4.2 Infrarot-Analytik von isolierten Metaboliten

Der bei Fermentationen durch die Zugabe von CaCl_2 (Kotera *et al.*, 1972a) ausgefällte Feststoff wurde gereinigt und für 8 Stunden bei 60°C getrocknet. Zur Analyse der Reinheit wurde anschließend ein Feststoffinfrarotspektrum aufgenommen. Von 1 bis 2 mg der Probe und 1 g KBr wurde in einer Kugelmühle eine homogene Mischung hergestellt (Yozgatli, 2002). Anschließend wurde aus dem Gemisch mit einer Presse bei 200 kp cm^{-2} ein KBr-Pressling hergestellt. Als Referenz wurde aus dem Reinstoff 5-KGA ebenfalls ein KBr-Pressling hergestellt. Von beiden Feststoffen wurde anschließend ein Infrarot-Spektrum aufgenommen und diese beiden Spektren miteinander verglichen. Die charakteristischen Schwingungen, z.B. COOH , C=O , OH , wurden für die Identifikation besonders berücksichtigt.

5. Biotransformation von Glucose mit *G. oxydans* Stämme

Die Kultivierung der Wildtypen als auch der rekombinanten *G. oxydans*-Stämme erfolgte im pH-statischen Multifermentersystem „Fedbatch-Pro“ (DASGIP, Jülich). Das mit vier 250 ml Gefäßen ausgestattete System erlaubte es, sowohl den pH-Wert, die Rührerdrehzahl, die Temperatur, als auch die Partialdrücke für CO₂, O₂, N₂ und Luft zu regulieren. Vor Beginn eines Experiments wurden die Gefäße und Schlauchverbindungen autoklaviert, und die pH- und O₂-Sonden kalibriert. Eine Vorkultur mit 200 ml Vollmedium wurde mit 1 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bis zu 24 Stunden bei 200 Upm und 30°C inkubiert. Die Zellen wurden geerntet (Sigma 2k 15, 6000 g, 4 min, 4°C) und mit 30 ml 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen. Die Zellen der Vorkultur wurden in 5 ml 0,9 % NaCl-Lösung resuspendiert, die optischen Dichten bestimmt und jeweils 150 ml Maisquellwasser-Lösung in jedem Fermenter mit gleicher OD inokuliert. Nach Inokulation wurde die Software „Fedbatch-Pro“ (DASGIP, Jülich) gestartet und der pH-Wert und der Sauerstoff-, bzw. CO₂-Partialdruck geregelt. Nach Beendigung des Experiments wurden die Kulturen entfernt, autoklaviert und das Fermentersystem gereinigt.

Ergebnisse

1. Untersuchung des Wachstums von *G. oxydans* DSM 2343, DSM 3503 und DSM 3504

Für die Ganzzell-Biotransformation von Glucose zu 5-KGA standen am Anfang der Arbeit die drei *G. oxydans* Stämme DSM 2343, DSM 3503 und DSM 3504 zur Verfügung. Die ersten Experimente sollten Aufschluss über das Wachstumsverhalten und die Oxidations-Produkte bei Umsetzung von Glucose geben. Anschließend sollte ein Stamm für die Optimierung der 5-KGA-Bildung ausgewählt werden, der schon als Wildtyp, im Vergleich zu den anderen Wildtypen die höchsten 5-KGA-Mengen aus Glucose bildet. Die *G. oxydans* Stämme wurden parallel in Vollmedium bei 30 °C kultiviert und aus den Wachstumsdaten (Abbildung 5) die Rate μ_{\max} und die Verdopplungszeit t_d bestimmt (Tabelle 2).

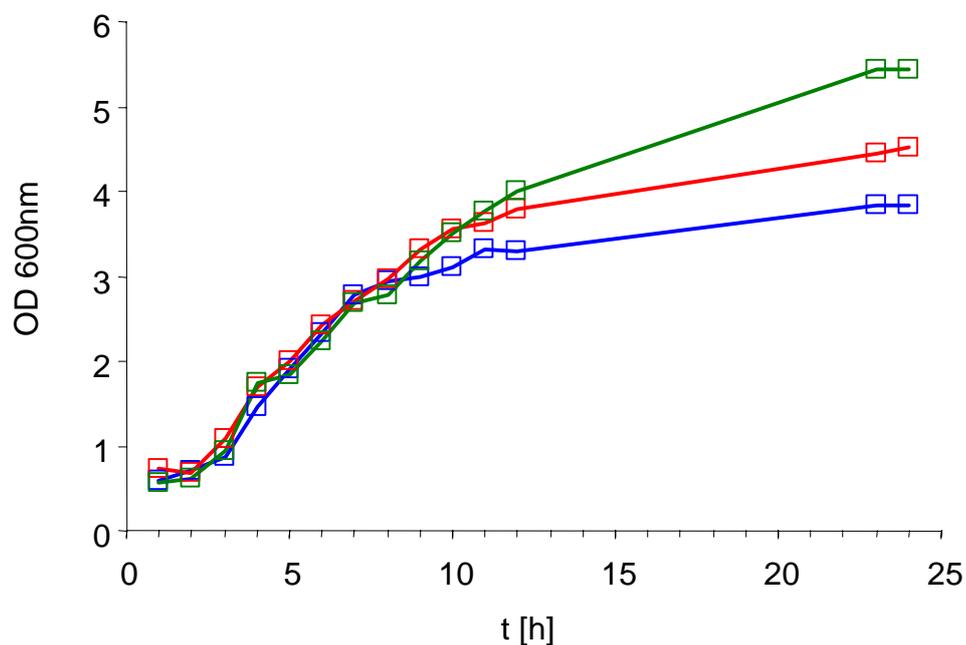


Abbildung 5

Vergleich des Wachstums der *G. oxydans* Stämme DSM 2343 —■—, DSM 3503 —■— und DSM 3504 —■— bei Kultivierung mit 55 mmol l⁻¹ Mannit als C-Quelle

Dabei zeigte sich, dass die drei *G. oxydans* Stämme vergleichbare maximale Wachstumsraten ($\mu_{\max} = 0,4 \text{ h}^{-1}$) aufwiesen, jedoch Unterschiede in der maximalen optischen Dichte erreichten. *G. oxydans* DSM 2343 erreichte die geringste optische Dichte von 3,8 und bildete somit in 24 Stunden am wenigsten Biomasse, DSM 3504 erreichte die höchste optische Dichte von 5,4.

Tabelle 2, Wachstumsparameter unterschiedlicher *G. oxydans* Stämme

Die charakteristischen Wachstumsparameter von *G. oxydans* DSM 2343, DSM 3503 und DSM 3504 beim Wachstum auf Mannit

Stamm	DSM 2343	DSM 3503	DSM 3504
Wachstumsrate μ_{\max} [h^{-1}]	0,42	0,39	0,41
Verdopplungszeit t_d [h]	1,66	1,76	1,67
Maximale OD	3,8	4,5	5,4

Für die Wahl eines geeigneten 5-KGA-Produktionsstammes wurde daraufhin eine Biotransformation von 110 mmol l^{-1} Glucose mit ruhenden Zellen von *G. oxydans* DSM 2343, DSM 3503 und DSM 3504 durchgeführt. Dazu wurden die Stämme jeweils in Schüttelkolben bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ kultiviert und nach 5, 10 und 24 Stunden Proben entnommen und diese auf die Produkte 2-KGA, 5-KGA und Gluconat hin untersucht (Abbildung 6).

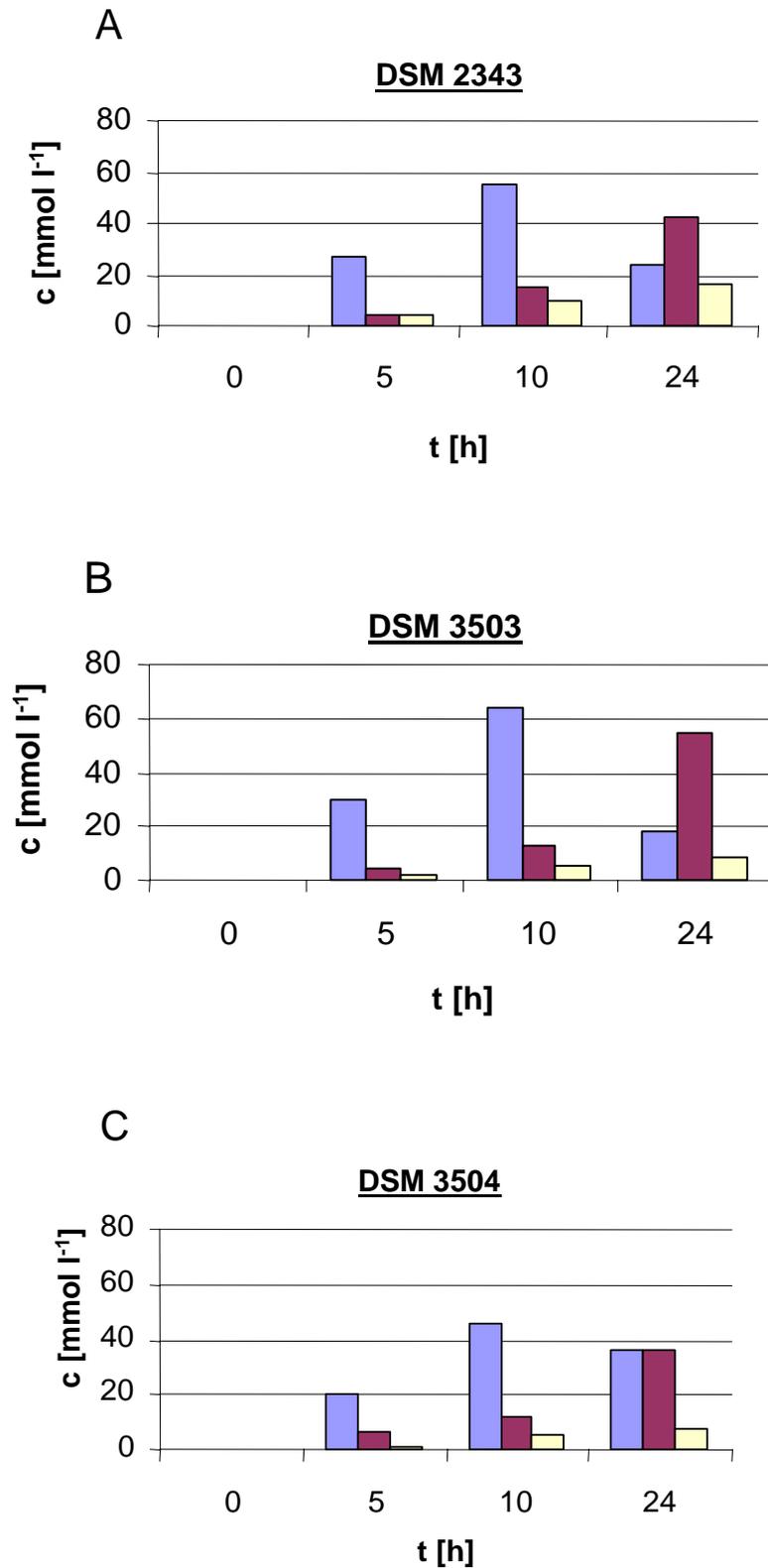


Abbildung 6, Vergleich der *G. oxydans* Stämme DSM 2343, DSM 3503 und DSM 3504

Produktbildung mit ruhenden Zellen der *G. oxydans* Stämme DSM 2343 A), DSM 3503 B) und DSM 3504 C) mit einer pH 6 gepufferten 110 mmol l⁻¹ Glucoselösung. Dargestellt sind die Konzentrationen in mmol l⁻¹ der unterschiedlichen Oxidationsprodukte Gluconat ■, 2-KGA ■ und 5-KGA ■.

Die drei *G. oxydans* Stämme DSM 2343, DSM 3503 und DSM 3504 oxidierten die eingesetzte Glucose zu unterschiedlichen Konzentrationen Gluconat, 2-KGA und 5-KGA. Nach 24 Stunden hatten DSM 2343, DSM 3503 und DSM 3504 aus der eingesetzten Glucose jeweils 24 mmol l⁻¹, 18 mmol l⁻¹, und 37 mmol l⁻¹ Gluconat gebildet. Das Gluconat selbst wurde in den 24 Stunden weiter zu 2-KGA und 5-KGA oxidiert, wobei die 2-KGA-Konzentration am Ende der Umsetzung bei DSM 2343, DSM 3503 und DSM 3504 jeweils 42 mmol l⁻¹, 55 mmol l⁻¹ und 36 mmol l⁻¹ betrug. Die maximale 5-KGA-Konzentration von 15,8 mmol l⁻¹ wurde nach 24 Stunden mit ruhenden Zellen des Stammes DSM 2343 und einer Ausbeute ($Y_{5\text{-KGA}/\text{Glucose}}$) von 14,5 % erreicht. *G. oxydans* DSM 3503 und DSM 3504 produzierten verglichen mit DSM 2343 nach 24 Stunden etwa nur die Hälfte an 5-KGA, nämlich 8,2 mmol l⁻¹ ($Y_{5\text{-KGA}/\text{Glucose}} = 7,5 \%$) bzw. 7,8 mmol l⁻¹ ($Y_{5\text{-KGA}/\text{Glucose}} = 7,1 \%$). Relativ vergleichbare Ergebnisse zur Umsetzung von Glucose mit DSM 3503 und DSM 3504, bzw. NCIMB 8084, einem *G. oxydans* DSM 3504 ähnlichen Stamm, konnten durch Silberbach *et al.* (2003) gezeigt werden. In den Experimenten oxidierten wachsende Zellen von DSM 3503 550 mmol l⁻¹ Glucose, also die fünffache anfängliche Glucose-Menge zu 310 mmol l⁻¹ Gluconat, 10 mmol l⁻¹ 2-KGA und 20 mmol l⁻¹ ($Y_{5\text{-KGA}/\text{Glucose}} = 4,0 \%$) 5-KGA in 24 Stunden. *G. oxydans* DSM 3504 (NCIMB 8084) oxidierte 500 mmol l⁻¹ Glucose in 24 Stunden zu 210 mmol l⁻¹ Gluconat, 230 mmol l⁻¹ 2,5-Di-Keto-Gluconat und nicht detektierbare Mengen 5-KGA (Silberbach *et al.*, 2003). Die Experimente von Silberbach *et al.* (2003) bestätigen die Beobachtungen dieser Arbeit, dass die *G. oxydans* Stämme DSM 3503 und DSM 3504 nicht für die 5-KGA-Bildung geeignet sind. *G. oxydans* DSM 2343 wurde somit aufgrund der höchsten vergleichbaren 5-KGA-Ausbeute für die weiteren Arbeiten zur 5-KGA-Bildung ausgewählt. Ein weiterer Gesichtspunkt für die Wahl von *G. oxydans* DSM 2343 war der Umstand, dass dieser der einzige verfügbare Stamm war, bei dem die Genomsequenz vorlag und zugänglich war. Für die Steigerung der 5-KGA-Bildung sollten daher im weiteren Verlauf die an der Umsetzung von Glucose zu 5-KGA beteiligten Enzyme überexprimiert und dadurch die 5-KGA-Bildung verbessert werden.

2. Umsetzung von Glucose zu 5-KGA im Cytosol von *G. oxydans*

2.1 Homologe Überproduktion der Gluconat:NADP⁺ 5-Oxidoreduktase

Zur Verbesserung der 5-KGA-Bildung mit *G. oxydans* DSM 2343 sollte das Gen der Gluconat:NADP⁺ 5-Oxidoreduktase (GNO) überexprimiert werden, welche im Cytosol die NADP⁺-abhängige Umsetzung von Gluconat zu 5-KGA katalysiert. Durch die Überproduktion der GNO könnte so eine gesteigerte 2-Schritt-Oxidation im Cytosol von Glucose zu Gluconat und weiter zu 5-KGA erreicht werden, ohne dass das Zwischenprodukt Gluconat außerhalb der Zelle im Medium akkumuliert. Der ausgewählte 5-KGA-Produktionsstamm, *G. oxydans* DSM 2343, wurde dazu mit dem Plasmid pRS201P/*gno* (Anhang, Abbildung 21) (Klasen *et al.*, 1995) über diparentale Konjugation transformiert und die erhaltenen Klone anschließend in Enzym-Aktivitätstests im Vergleich zum Elternstamm DSM 2343 untersucht. Für die Bestimmung der GNO-Aktivität wurde die Zunahme von NADPH, welches bei der Umsetzung von Gluconat zu 5-KGA durch Reduktion des Cofaktors NADP⁺ gebildet wird, im Photometer gemessen und aus der Steigung der Geraden die GNO-Aktivität in U mg⁻¹ Protein errechnet. Als Substrat wurde Gluconat mit einer Endkonzentration von 300 mmol l⁻¹ verwendet. Es zeigte sich, dass die *G. oxydans* DSM 2343 pRS201P/*gno* Klone mit dem überproduzierten GNO-Protein im Mittel eine Aktivität von 7,0 U mg⁻¹ Protein aufwiesen. Der Elternstamm hingegen oxidierte Gluconat mit einer Aktivität von 0,2 U mg⁻¹ Protein. Durch die Überproduktion des cytosolischen GNO-Proteins konnte somit im *G. oxydans* Stamm DSM 2343 pRS201P/*gno* die spezifische Aktivität der GNO im Vergleich zum Elternstamm DSM 2343 um den Faktor 35 erhöht werden. Klasen (1995) erreichte eine 85-fach erhöhte Aktivität von 6,8 U mg⁻¹ Protein, durch die Überexpression des *gno*-Gens in *G. oxydans* DSM 3503 pRS201P/*gno* im Vergleich zum Elternstamm *G. oxydans* DSM 3503 (0,08 U mg⁻¹ Protein). Die in *G. oxydans* DSM 2343 pRS201P/*gno* gemessene spezifische GNO-Aktivität von 7,0 U mg⁻¹ Protein ist daher trotz unterschiedlicher Ausgangsstämme vergleichbar mit der in *G. oxydans* DSM 3503 pRS201P/*gno* erreichten spezifischen GNO-Aktivität von 6,8 U mg⁻¹ Protein (Klasen, 1995).

Neben der Oxidation von Gluconat zu 5-KGA durch die GNO wurde ebenso die Reduktion von 5-KGA zu Gluconat untersucht. Anders als bei der Oxidation von

Gluconat zu 5-KGA wurde nun die Abnahme von NADPH im Photometer detektiert und aus der Geraden die reduktive Aktivität des GNO-Proteins in U mg^{-1} Protein errechnet. Der Wildtyp-Stamm *G. oxydans* DSM 2343 reduzierte 5-KGA mit einer Aktivität von $0,2 \text{ U mg}^{-1}$ Protein, wohingegen der GNO-Überproduzent *G. oxydans* DSM 2343 pRS201P/*gno* mit $1,6 \text{ U mg}^{-1}$ Protein eine 8-fache Steigerung der 5-KGA-Reduktion aufwies. Einen Wert in vergleichbarer Größenordnung von $1,8 \text{ U mg}^{-1}$ Protein für die Reduktion von 5-KGA wurde durch Klasen (1995) mit dem GNO-Überproduzenten *G. oxydans* Stamm DSM 3503 pRS201P/*gno* erreicht. Auffällig war, dass in *G. oxydans* DSM 2343 pRS201P/*gno* die Oxidation von Gluconat zu 5-KGA mit einer Aktivität von $7,0 \text{ U mg}^{-1}$ Protein erfolgte, die Reduktion von 5-KGA jedoch mit einer Aktivität von $1,6 \text{ U mg}^{-1}$ Protein. Klasen (1995) isolierte und charakterisierte das GNO-Protein aus *G. oxydans* DSM 3503 und konnte zeigen, dass die Reduktion von 5-KGA zu Gluconat mit nur 26 % der Aktivität der Oxidation von Gluconat zu 5-KGA stattfand. Diese Eigenschaft des GNO-Proteins erklärt daher die unterschiedlichen Aktivitäten der sowohl oxidativen als auch reduktiven *in vitro* Reaktion in *G. oxydans* DSM 2343 pRS201P/*gno*.

Nach Bestimmung der GNO-Aktivität sollte auch die Umsetzung von Glucose zu 5-KGA mit *G. oxydans* DSM 2343 und *G. oxydans* DSM 2343 pRS201P/*gno* untersucht werden. Dazu wurden 110 mmol l^{-1} Glucose im Schüttelkolben mit ruhenden Zellen der beiden Stämme umgesetzt und die Konzentration der Oxidationsprodukte mittels HPLC-Analytik bestimmt. Nach 24 Stunden hatte der *G. oxydans* Wildtyp DSM 2343 $42,2 \text{ mmol l}^{-1}$ 2-KGA, $23,2 \text{ mmol l}^{-1}$ Gluconat und $15,5 \text{ mmol l}^{-1}$ 5-KGA gebildet. Der GNO-Überproduzent *G. oxydans* DSM 2343 pRS201P/*gno* dahingegen setzte in derselben Zeit Glucose zu $16,0 \text{ mmol l}^{-1}$ 2-KGA, $62,3 \text{ mmol l}^{-1}$ Gluconat und $12,3 \text{ mmol l}^{-1}$ 5-KGA um. Trotz Überexpression des *gno*-Gens in *G. oxydans* DSM 2343 pRS201P/*gno*, und trotz 35-facher Erhöhung der GNO-Aktivität *in vitro*, konnte *in vivo* keine Steigerung der 5-KGA-Konzentration erzielt werden. Vielmehr war die 5-KGA-Konzentration im Vergleich zum Wildtyp um 21 % verringert. Klasen (1995) konnte zeigen, dass durch die Überexpression des *gno*-Gens eine Verringerung des NADP^+ -Pools um 70 %, von $0,75 \text{ nmol mg}^{-1}$ TG im Wildtyp DSM 3503 auf $0,23 \text{ nmol mg}^{-1}$ TG, in dem analogen GNO-Überproduzent *G. oxydans* DSM 3503 pRS201P/*gno* zu beobachten war. Die erhöhte NADPH-Konzentration verschob das

Reaktionsgleichgewicht des GNO-Proteins auf die Seite der Reduktion von 5-KGA zu Gluconat, was ebenso anhand der gesteigerten Gluconat-Konzentration von $62,3 \text{ mmol l}^{-1}$ in *G. oxydans* DSM 2343 pRS201P/*gno* im Vergleich zu $23,2 \text{ mmol l}^{-1}$ Gluconat in DSM 2343 zu beobachten war. Die Verfügbarkeit des Cofaktors NADP^+ , bzw. die Oxidation von NADPH zu NADP^+ stellte daher einen Engpass für die Umsetzung von Gluconat zu 5-KGA dar.

2.2 Heterologe Überproduktion einer cytosolischen Transhydrogenase aus *E. coli*

Eine Erhöhung der cytosolischen NADPH-Konzentration, und die damit ebenso erhöhte reduktive Aktivität der Gluconat: NADP^+ 5-Oxidoreduktase, wurde als Grund für die in *G. oxydans* DSM 2343 pRS201P/*gno* verringerte 5-KGA-Produktivität angenommen. Die Bildung von NADPH aus NADP^+ wird im Cytosol von *G. oxydans* DSM 2343 sowohl durch die Reaktion der Glucose-Dehydrogenase (cGDH), als auch der Gluconat: NADP^+ 5-Oxidoreduktase katalysiert (Ameyama *et al.*, 1981; Klasen *et al.*, 1995). Beide Enzyme verwenden den Cofaktor NADP^+ und reduzieren diesen bei Oxidation von Glucose bzw. Gluconat zu NADPH. Da *G. oxydans* DSM 2343 keine Enzyme für die Rückreaktion, also die Oxidation von NADPH besitzt, sollte in *G. oxydans* DSM 2343 zur Regeneration von NADP^+ eine heterologe, cytosolische Transhydrogenase aus *E. coli* überexprimiert werden (Prust *et al.*, 2005). Eine Transhydrogenase vom Typ UDHA würde den Hydridtransfer von NADPH auf NAD^+ katalysieren, die NADP^+ -Konzentration könnte stabilisiert und die 5-KGA-Produktivität im *G. oxydans* Stamm DSM 2343 pRS201P/*gno* dadurch verbessert werden (Sauer *et al.*, 2004). Aus *E. coli* DH5 α wurde das Gen der Transhydrogenase UDHA amplifiziert, in den Vektor pRS201P/*gno* hinter das *gno*-Gen kloniert und *G. oxydans* DSM 2343 mit dem Plasmid pRS201P/*gno/udhA* (Anhang, Abbildung 22) transformiert (Boonstra *et al.*, 1999; Sauer *et al.*, 2004). Die erhaltenen *G. oxydans* DSM 2343 pRS201P/*gno/udhA* Klone wurden in Vollmedium kultiviert, mittels Ultraschall aufgeschlossen und in Enzymtests die Aktivität des UDHA-Proteins bestimmt. Dazu wurde der Zellextrakt des Wildtyps *G. oxydans* DSM 2343 und des UDHA-Überproduzenten *G. oxydans* pRS201P/*gno/udhA* jeweils mit NADPH und thio- NADP^+ versetzt und im Photometer die Zunahme des reduzierten thio-NADPH gemessen. Aus der Steigung der Geraden ließ

sich die Aktivität der UDHA in U mg^{-1} Protein errechnen. Die Messungen ergaben, dass der Wildtyp *G. oxydans* DSM 2343 keine nachweisbare Aktivität für die Umsetzung von NADPH zu thio-NADPH aufwies und somit NADP^+ nicht regenerieren konnte. Dieses Ergebnis entsprach den Erwartungen, da aus den Genomanalysen bekannt war, dass *G. oxydans* DSM 2343 keine Transhydrogenase vom Typ UDHA aufweist (Prust, 2004; Prust *et al.*, 2005). Der *G. oxydans* Stamm mit dem heterolog überexprimierten *udhA*-Gen, DSM 2343 pRS201P/*gno/udhA*, wies hingegen eine Aktivität von 40 mU mg^{-1} Protein auf. In Experimenten zur Deletion des *udhA*- und des *pntAB*-Gens in *E. coli* konnte gezeigt werden, dass eine *E. coli* Δ *pntAB*-Mutante eine restliche Transhydrogenase-Aktivität von 8 mU mg^{-1} Protein aufweist (Sauer *et al.*, 2004). Da in besagtem Stamm das *udhA*-Gen noch vorhanden ist entspricht diese Aktivität von 8 mU mg^{-1} Protein somit der Wildtyp UDHA-Aktivität in *E. coli*. Die in *G. oxydans* DSM 2343 pRS201P/*gno/udhA* gemessene Aktivität von 40 mU mg^{-1} lässt daher darauf schließen, dass das UDHA-Protein in diesem Stamm im Vergleich zum *E. coli* Wildtyp fünfmal überproduziert worden ist.

Nachdem im Aktivitätstest die Funktionalität der UDHA in *G. oxydans* DSM 2343 pRS201P/*gno/udhA* nachgewiesen werden konnte, sollte die Umsetzung von 110 mmol l^{-1} Glucose im Vergleich zu *G. oxydans* DSM 2343 und *G. oxydans* DSM 2343 pRS201P/*gno* untersucht werden. *G. oxydans* DSM 2343 pRS201P/*gno/udhA* wurde wie in Kapitel 2.1 beschrieben mit 110 mmol l^{-1} Glucose über einen Zeitraum von 24 Stunden kultiviert und die Konzentration der Produkte bestimmt. Durch Biotransformation von 110 mmol l^{-1} Glucose konnten mit *G. oxydans* DSM 2343 pRS201P/*gno/udhA* $39,6 \text{ mmol l}^{-1}$ 2-KGA, $26,5 \text{ mmol l}^{-1}$ Gluconat und $18,7 \text{ mmol l}^{-1}$ 5-KGA mit einer Ausbeute von $Y_{5\text{-KGA}/\text{Glucose}} = 17 \%$ gebildet werden. Verglichen mit dem Wildtyp DSM 2343 wurden ca. 20 % mehr 5-KGA gebildet, und verglichen mit *G. oxydans* DSM 2343 pRS201P/*gno* konnte die 5-KGA-Konzentration um 34 % erhöht werden. Die Transhydrogenase UDHA konnte somit funktionell in *G. oxydans* DSM 2343 pRS201P/*gno/udhA* überproduziert und die 5-KGA-Konzentration gesteigert werden. Wie bereits erwähnt hatte Klasen (1995) bei Überexpression des *gno*-Gens in *G. oxydans* DSM 3503 pRS201P/*gno* festgestellt, dass der NADPH-Pool verringert wurde. Durch Überexpression des *oye*-Gens, einer NADPH-Oxidase aus *Saccharomyces carlsbergensis* (Adachi *et al.*, 1979a) versuchte Klasen (1995), die

Regeneration von NADP⁺ in *G. oxydans* DSM 3503 zu erreichen. Das Enzym konnte in *G. oxydans* DSM 3503 pRS201P/*oye* mit einer Aktivität von 90 mU mg⁻¹ Protein überproduziert werden (Klasen, 1995). Der Einsatz eines *G. oxydans* DSM 3503 pRS201P/*gno/oye* Stammes in Biotransformationen von 550 mmol l⁻¹ Glucose hatte jedoch, anders als in der vorliegenden Arbeit, keinerlei Einfluss auf die 5-KGA-Bildung. Sowohl die Überproduktion des GNO-Enzyms alleine in *G. oxydans* DSM 3503 pRS201P/*gno* als auch die gleichzeitige Überproduktion des GNO- und OYE-Enzyms in *G. oxydans* DSM 3503 pRS201P/*gno/oye* führten nicht zu einer erkennbaren Verbesserung der 5-KGA-Bildung (Klasen, 1995). Die aus diesen Experimenten resultierenden 5-KGA-Konzentrationen betragen nach drei Tagen im *G. oxydans* DSM 3503 Wildtyp 72 mmol l⁻¹, in *G. oxydans* pRS201P/*gno* 79 mmol l⁻¹ und in *G. oxydans* DSM 3503 pRS201P/*gno/oye* 80 mmol l⁻¹.

Die 5-KGA-Bildung konnte mit cytosolischen Enzymen durch homologe Überexpression des *gno*-Gens und gleichzeitige, heterologe Überexpression des *E. coli udhA*-Gens in *G. oxydans* DSM 2343 pRS201P/*gno/udhA* gesteigert und 5-KGA mit einer Ausbeute von $Y_{5\text{-KGA}/\text{Glucose}} = 17,0\%$ produziert werden.

2.3 Vermeidung der 2-KGA-Bildung in *G. oxydans*

Die Experimente zur Biotransformation von Glucose mit *G. oxydans* DSM 2343 haben gezeigt, dass neben Gluconat und 5-KGA auch das unerwünschte Nebenprodukt 2-KGA gebildet wird. Gluconat wird dabei im periplasmatischen Raum durch eine membrangebundene, FAD-abhängige Gluconat-2-Dehydrogenase (mGA2DH) (Matsushita *et al.*, 1982) zu 2-KGA oxidiert, welches sich im Medium ansammelt. Für eine effiziente Umsetzung von Glucose zu 5-KGA sollte daher das *mga2dh*-Gen inaktiviert und so das Nebenprodukt 2-KGA vermieden werden. Das *mga2dh*-Gen wurde in *G. oxydans* DSM 2343 über homologe Rekombination durch Insertion einer Kanamycin-Kassette in den chromosomalen Bereich zerstört (Elfari *et al.*, 2005). Diese Schritte wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. Görisch (Fachgebiet Technische Biochemie, TU Berlin) durchgeführt und die resultierende Mutante *G. oxydans* DSM 2343 *mga2dh::kan^R* (Abkürzung: MF1) anschließend im Rahmen der Genomik Netzwerk Kooperation charakterisiert. Zunächst wurde

untersucht, welche Produkte *G. oxydans* MF1 bei Biotransformation von Glucose bildet. Die Umsetzung von 110 mmol l^{-1} Glucose im Schüttelkolben wurde wie in Kapitel 2.1 beschrieben durchgeführt, wobei 1 % (w/v) CaCO_3 als Puffer verwendet wurde; nach 24 Stunden wurde die Konzentrationen der Produkte mittels HPLC bestimmt. Die Mutante *G. oxydans* MF1 wies nach 24 Stunden $93,0 \text{ mmol l}^{-1}$ Gluconat, und $11,7 \text{ mmol l}^{-1}$ 5-KGA auf. Es konnte kein 2-KGA über HPLC-Analytik nachgewiesen werden. Die Disruption des *mga2dh*-Gens führte somit im Stamm *G. oxydans* MF1 zum Verlust des membrangebundenen, FAD-abhängigen mGA2DH-Proteins und damit zum Verlust der Bildung des Nebenproduktes 2-KGA. Trotz Verwendung von CaCO_3 als Puffersubstanz sank der pH-Wert während der Biotransformation von Glucose, was durch die Bildung von Gluconsäure zu erklären ist. Um in den weiteren Experimenten ein Absinken des pH-Wertes zu vermeiden und eine kontinuierliche Sauerstoffversorgung zu gewährleisten, wurden die nachfolgenden Umsetzungen von Glucose in einem Fermentersystem mit einem Arbeitsvolumen von 150 bis 200 ml durchgeführt. In diesem Fermentersystem konnten die Parameter pH-Wert, Rührgeschwindigkeit, Temperatur, Begasungsrate und der Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdruck konstant gehalten und so die Produktionsbedingungen optimiert werden.

2.4 Ganzzell-Biotransformation von Glucose mit wachsenden Zellen von *G. oxydans* DSM 2343 und *G. oxydans* MF1

Aus Experimenten zur Ganzzell-Biotransformation von Fructose zu Mannit war bekannt, dass der zellinterne Nukleotidpool der eingesetzten ruhenden Zellen während der Umsetzung stark abnimmt, und damit die Produktivität verringert wird (Kaup, 2004). Da die cytosolischen *G. oxydans* Proteine Glucose-Dehydrogenase und Gluconat:NADP⁺ 5-Oxidoreduktase ebenfalls den Cofaktor NADP⁺ für die Umsetzung von Glucose zu 5-KGA benötigten, sollte durch das Verwenden von wachsenden Zellen der Nukleotidpool stabilisiert bzw. NADPH regeneriert werden (Csonka & Fraenkel, 1977). Neben einer Stabilisierung der Nukleotidkonzentration würden reduktive Reaktionen des *G. oxydans* Zentralstoffwechsels in wachsenden Zellen zusätzlich zur Bildung von NADP⁺ aus NADPH beitragen (Adachi *et al.*, 1999b; Ji & Gao, 2001; Shinjoh *et al.*, 2002a). *G. oxydans* DSM 2343 und *G. oxydans* MF1 wurden zur Biotransformation von 138 mmol l^{-1} Glucose unter konstanten Kultivierungsbedingungen in 200 ml Fermentern

bei pH 5,0, einer Begasungsrate von 10 l h^{-1} und einem Sauerstoff- und CO_2 -Partialdruck von 10 % bzw. 0,05 % eingesetzt. Stündlich wurden Proben entnommen, die optische Dichte bestimmt, die charakteristischen Wachstumsparameter errechnet (Tabelle 3) und die Konzentration der Produkte über HPLC ermittelt (Abbildung 7 A und B).

Tabelle 3, Wachstumsparameter von *G. oxydans* DSM 2343 und MF1 während der Ganzzell-Biotransformation von 138 mmol l^{-1} Glucose

Stamm	DSM 2343	MF1
Wachstumsrate μ_{max} [h^{-1}]	0,24	0,22
Verdopplungszeit t_D [h]	2,87	3,12
Maximale OD	1,86	2,63

Vergleicht man die Wachstumsraten und die maximalen optischen Dichten aus Tabelle 3 mit denen von Tabelle 2 so sieht man, dass die Wachstumsrate von *G. oxydans* in den Versuchen im Fermenter geringer ausfallen. Die Unterschiede kann man mit der Zusammensetzung der eingesetzten Medien erklären. Im Fall von Tabelle 2 wurde die für das *G. oxydans* Wachstum optimale C-Quelle Mannit und ebenso Hefeextrakt und Trypton verwendet. In den Fermenter-Experimenten musste auf die Bestandteile Hefeextrakt und Trypton verzichtet werden, da diese die HPLC-Analytik der Produkte behinderten. Als Ersatz wurde neben der C-Quelle Glucose ein Maisquellwasserextrakt (Liggett & Koffler, 1948) benutzt welcher den Metabolit-Hintergrund bei der HPLC-Analytik minimierte. Die unterschiedlichen Wachstumsraten konnten daher auf die unterschiedlichen Medienzusammensetzungen und besonders auf die Verwendung von Glucose als C-Quelle zurückgeführt werden (Gosselé *et al.*, 1980).

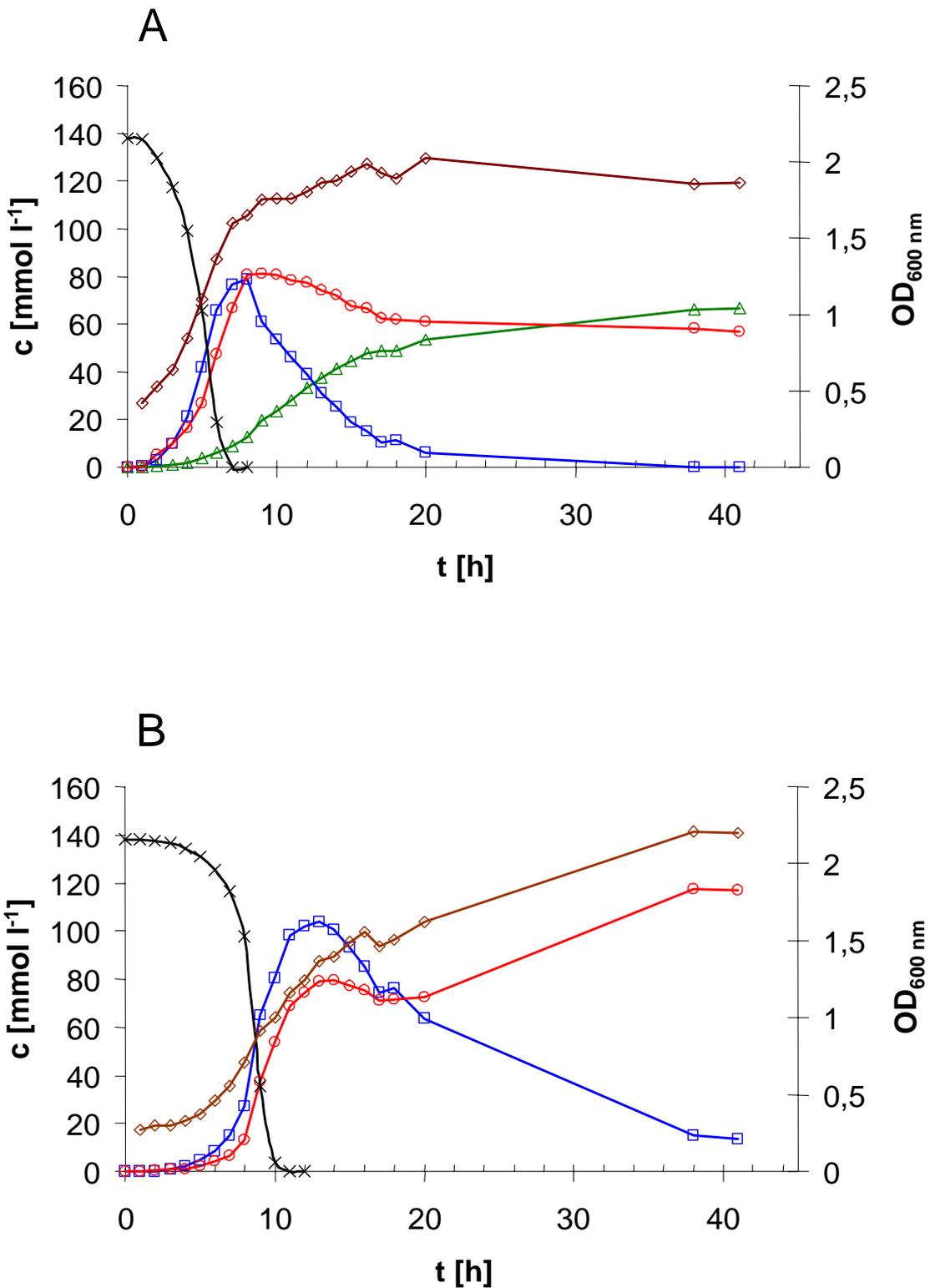


Abbildung 7, Umsetzung von Glucose mit wachsenden Zellen von *G. oxydans* DSM 2343 und *G. oxydans* MF1 über einen Zeitraum von 41 Stunden unter konstanten Bedingungen
 Oxidationsprodukte von A) *G. oxydans* DSM 2343 und B) *G. oxydans* MF1 während der Fermentation von 138 mmol l⁻¹ Glucose. Symbole und Farben: × Glucose [mmol l⁻¹]; □ Gluconat [mmol l⁻¹]; ○ 5-KGA [mmol l⁻¹]; △ 2-KGA [mmol l⁻¹]; ◇ optische Dichte bei 600 nm

Während der Biotransformation von Glucose mit dem *G. oxydans* Wildtyp DSM 2343 wurden innerhalb 41 Stunden annähernd gleiche Konzentrationen 2-KGA von 67 mmol l⁻¹ und 5-KGA von 57 mmol l⁻¹ mit Ausbeuten von $Y_{2\text{-KGA}/\text{Glucose}} = 49\%$ bzw. $Y_{5\text{-KGA}/\text{Glucose}} = 41\%$ gebildet. Gluconat konnte am Ende der Umsetzung nicht mehr detektiert werden; es wurde vollständig zu 2-KGA und 5-KGA umgesetzt. Ca. 10 % der C-Quelle wurden für das Wachstum von *G. oxydans* DSM 2343 verwendet. Die Mutante *G. oxydans* MF1 setzte im gleichen Zeitraum 138 mmol l⁻¹ Glucose zu 117 mmol l⁻¹ 5-KGA mit einer Ausbeute von $Y_{5\text{-KGA}/\text{Glucose}} = 85\%$ um, wobei nach 41 Stunden noch 13 mmol l⁻¹ Gluconat im Medium vorhanden war. Wie in den Experimenten zeigte sich auch hier, dass *G. oxydans* MF1 kein 2-KGA mehr bilden kann. Die Mutante *G. oxydans* MF1 verwendete ca. 6 % der C-Quelle für das Wachstum.

Tabelle 4, Biotransformation von 138 mmol l⁻¹ Glucose mit *G. oxydans* DSM 2343 und MF1

Die Produktionsraten geben die maximale Konzentrationsänderung von Gluconat, 2-KGA und 5-KGA in mmol l⁻¹ pro Stunde und Gramm Trockengewicht (TG) an, 1 OD_{600nm} entspricht einem TG von 0,4 g. Die Ausbeuten errechneten sich aus dem Quotient des Produktes 2-KGA oder 5-KGA in Bezug auf die eingesetzte Glucose ($Y_{P/S}$).

Stamm	DSM 2343	MF1
Gluconat-Produktionsrate [mmol l ⁻¹ h ⁻¹ g ⁻¹ TG]	26,9	40,1
2-KGA-Produktionsrate [mmol l ⁻¹ h ⁻¹ g ⁻¹ TG]	5,9	-
5-KGA-Produktionsrate [mmol l ⁻¹ h ⁻¹ g ⁻¹ TG]	20,1	36,3
Maximale 2-KGA-Konzentration [mmol l ⁻¹]	66,8	-
Maximale 5-KGA-Konzentration [mmol l ⁻¹]	80,6	117,2
Maximale Gluconat-Konzentration [mmol l ⁻¹]	78,6	103,7
2-KGA Ausbeute, t=41h [%]	49	-
5-KGA Ausbeute, t=41h [%]	41	85

Vergleicht man die Gluconat-Produktionsraten von *G. oxydans* DSM 2343 und *G. oxydans* MF1, so ist der Wert bei der Mutante mit 40,1 mmol l⁻¹ h⁻¹ g⁻¹ TG um 49 % höher als im Wildtyp. Da sich dieser Wert aus der Gluconat-Konzentrationsänderung pro Zeit errechnet, kann man den Unterschied mit der Disruption des *mga2dh*-Gens in der Mutante erklären. In *G. oxydans* MF1 fehlt eines der beiden Enzyme, welches Gluconat weiter oxidieren kann, wodurch sich zunächst höhere Gluconat-

Konzentrationen im Medium anreichern und sich im Vergleich zum Wildtyp langsamer verringern. Es ergibt sich somit rechnerisch eine gesteigerte Gluconat-Bildung. Auf der anderen Seite besitzt die *G. oxydans* Mutante MF1 eine um 80 % erhöhte Rate der 5-KGA-Bildung. Diese kann ebenso durch den Verlust des mGA2DH-Enzyms erklärt werden, da die Konkurrenzreaktion der 2-KGA-Bildung in diesem Stamm ausbleibt. Somit konnte durch Inaktivierung der membrangebundenen Gluconat-2-Dehydrogenase die 5-KGA-Bildung in der *G. oxydans* MF1 Mutante um 105 % auf eine Konzentration von 117 mmol l^{-1} im Vergleich zum Elternstamm *G. oxydans* DSM 2343 erhöht werden.

2.5 Biotransformation von Glucose mit *G. oxydans* MF1 und *G. oxydans* MF1 pRS201P/*gno*

Durch die Disruption des *mga2dh*-Gens wurde eine Mutante konstruiert, die zum einen kein Nebenprodukt 2-KGA mehr bildete und zum anderen eine gesteigerte 5-KGA-Bildung aufwies. In diesem *G. oxydans* MF1 Stamm sollte daher nun das Gen der cytosolischen Gluconat:NADP⁺ 5-Oxidoreduktase überexprimiert und so eine zusätzliche Verbesserung der 5-KGA-Bildung erzielt werden. Auf die gleichzeitige Überexpression der Transhydrogenase UDHA aus *E. coli* wurde in diesem Fall verzichtet, da die Biotransformation von Glucose mit wachsenden *G. oxydans* Zellen im Fermenter erfolgen sollte, und nicht, wie in Kapitel 2.2 beschrieben, mit ruhenden *G. oxydans* Zellen im Schüttelkolben. Durch reduktive Prozesse des Zentralstoffwechsels von *G. oxydans* wird NADPH während des Wachstums zu NADP⁺ oxidiert. Die Verfügbarkeit von NADP⁺ für die Umsetzung von Gluconat zu 5-KGA mit dem GNO-Enzym sollte daher bei wachsenden Zellen sichergestellt sein (Adachi *et al.*, 1999b; Ji & Gao, 2001; Shinjoh *et al.*, 2002a). *G. oxydans* MF1 wurde mit dem Plasmid pRS201P/*gno* (Anhang, Abbildung 21) transformiert und der resultierende Stamm in einer Biotransformation von 550 mmol l^{-1} Glucose eingesetzt. Da in vorherigen Experimenten die eingesetzte Glucose in der Konzentration von 110 mmol l^{-1} vollständig in Gluconat, bzw. 5-KGA umgesetzt worden war, wurde in den Biotransformationen mit *G. oxydans* MF1 pRS201P/*gno* die Konzentration auf 550 mmol l^{-1} erhöht, um so eine Steigerung der maximalen 5-KGA-Konzentration zu erreichen.

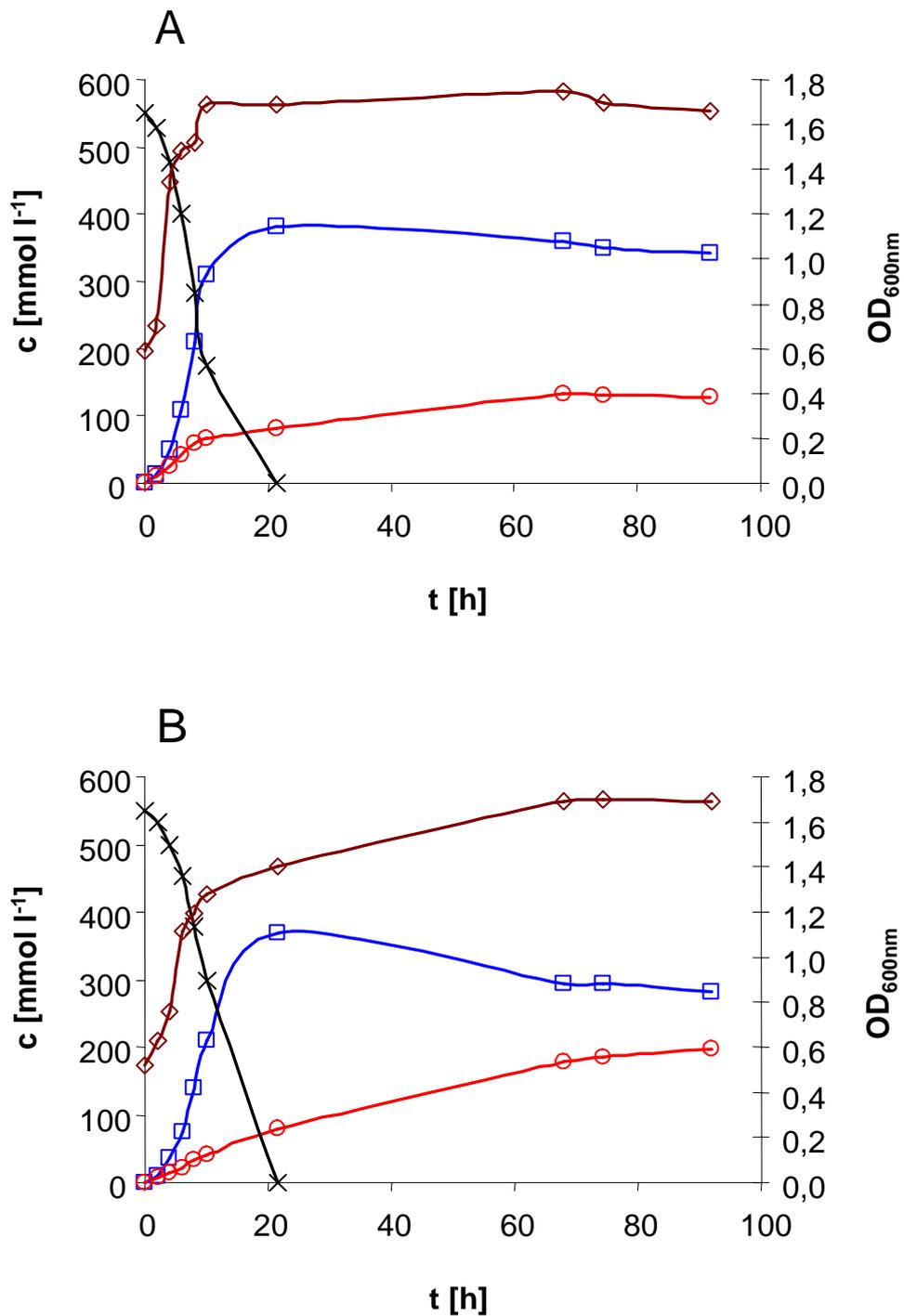


Abbildung 8, Umsetzung von Glucose mit wachsenden Zellen von *G. oxydans* MF1 und *G. oxydans* MF1 pRS201P/*gno* unter konstanten Bedingungen

Oxidationsprodukte von A) *G. oxydans* MF1 und B) *G. oxydans* MF1 pRS201P/*gno* während der Biotransformation von 550 mmol l⁻¹ Glucose. Symbole und Farben: × Glucose [mmol l⁻¹]; □ Gluconat [mmol l⁻¹]; ○ 5-KGA [mmol l⁻¹]; ◇ optische Dichte bei 600 nm

Die Zellen der beiden Stämme wurden wie in Kapitel 2.4 beschrieben kultiviert und die optische Dichte und die Konzentration der gebildeten Produkte bestimmt (Abbildung 8). Der Elternstamm *G. oxydans* MF1 erreichte eine zum Experiment aus Kapitel 2.4 vergleichbare 5-KGA-Konzentration von 129 mmol l^{-1} , die 5-KGA Ausbeute war jedoch stark verringert mit $Y_{5\text{-KGA}/\text{Glucose}} = 23 \%$. Neben 5-KGA befand sich noch Gluconat mit einer Konzentration von 381 mmol l^{-1} im Medium. Die 5-KGA-Bildung fand hauptsächlich während der exponentiellen Wachstumsphase statt. Eine ähnliche Beobachtung konnte in *Acetobacter suboxydans* durch Galante *et al.* (1966) gemacht werden, die die Abhängigkeit der Keto-Gluconat-Bildung vom Wachstum untersucht haben und ebenfalls feststellen konnten, dass die höchste ketogene Aktivität in *Acetobacter suboxydans* NRRL B223 während der exponentiellen Phase auftrat (Galante *et al.*, 1966). Der GNO-Überproduzent *G. oxydans* MF1 pRS201P/*gno* bildete über den Zeitraum von 94 Stunden kontinuierlich 5-KGA, so dass am Ende des Experimentes eine 5-KGA-Konzentration von 198 mmol l^{-1} mit einer Ausbeute von $Y_{5\text{-KGA}/\text{Glucose}} = 36 \%$ vorlag. In diesem GNO-Überproduktionsstamm war keine direkte Abhängigkeit der 5-KGA-Bildung von der Wachstumsphase zu beobachten. Da die Expression des Plasmid-kodierten *gno*-Gens in *G. oxydans* MF1 pRS201P/*gno* jedoch unter der Kontrolle des *tac*-Promotors erfolgte, war die beobachtete kontinuierliche Bildung von 5-KGA über den gesamten Zeitraum von 94 Stunden möglicherweise durch diese Deregulation zu erklären. Neben 5-KGA war nach 94 Stunden ebenso Gluconat mit einer Konzentration von 282 mmol l^{-1} im Medium vorhanden. Trotz Erhöhung der eingesetzten Glucose-Konzentration zu Beginn der Biotransformation konnten keine höheren Ausbeuten mit den beiden verwendeten *G. oxydans* Stämmen MF1 bzw. MF1 pRS201P/*gno* erzielt werden. Vergleicht man die Experimente zur Biotransformation von 110 mmol l^{-1} Glucose durch *G. oxydans* MF1 Stamm mit den Versuchen zur Biotransformation von 550 mmol l^{-1} Glucose mit *G. oxydans* MF1, so verringerte sich die 5-KGA-Ausbeute sogar um 49 % von $Y_{5\text{-KGA}/\text{Glucose}} = 85 \%$ auf $Y_{5\text{-KGA}/\text{Glucose}} = 36 \%$ bei gleichen Kultivierungs-Parametern, mit Ausnahme der Glucose-Konzentration. Vergleichbare Beobachtungen konnte Silberbach (2003) mit *G. oxydans* NCIMB 8084 machen, als sie ebenfalls versuchte, eine Verbesserung der 2,5-Di-Keto-Gluconat-Bildung durch Erhöhung der Glucose-Konzentration zu erreichen. In den Experimenten mit $1,2 \text{ mol}$ Glucose verringerte sich die DKGA-Ausbeute um 21 % von $Y_{2,5\text{-Di-Keto-Gluconat}/\text{Glucose}} = 39 \%$ bei 500 mmol l^{-1} Glucose auf $Y_{2,5\text{-Di-Keto-Gluconat}/\text{Glucose}} = 18 \%$

(Silberbach, 2001). Neben der 5-KGA-Ausbeute zeigte sich auch beim Wachstum eine Verringerung der optischen Dichte im Vergleich zu den in Kapitel 2.4 dargestellten Experimenten (Tabelle 3). Verantwortlich für das verminderte Wachstum ist möglicherweise die deutlich erhöhte Gluconat-Konzentration von mehr als 300 mmol l^{-1} . Wachstums-Experimente mit unterschiedlichen Gluconat-Mengen haben gezeigt, dass ab einer Gluconat-Konzentration von mehr als 300 mmol l^{-1} eine Wachstums-Hemmung bei *G. oxydans* NBIMCC 1043 eintritt, und diese mit weiter ansteigender Konzentration verstärkt wird (Velizarov & Beschkov, 1998).

Die Gluconat:NADP⁺ 5-Oxidoreduktase, GNO konnte erfolgreich in *G. oxydans* MF1 pRS201P/*gno* überproduziert werden und bei der Biotransformation von Glucose mit wachsenden *G. oxydans* Zellen erstmals 5-KGA-Konzentrationen von annähernd 200 mmol l^{-1} erreicht werden. Für die weitere Verbesserung der 5-KGA-Bildung sollten im Folgenden die membrangebundene Glucose-Dehydrogenase und Gluconat-5-Dehydrogenase überproduziert werden.

3. Umsetzung von Glucose zu 5-KGA im Periplasma von *G. oxydans*

3.1 Homologe Überproduktion der membrangebundenen Glucose- und Gluconat-5-Dehydrogenasen

Die Bildung von 5-KGA mit membranständigen Enzymen in *G. oxydans* beginnt mit der Oxidation von Glucose zu Gluconat durch die membrangebundene, PQQ-abhängige Glucose-Dehydrogenase, mGDH (Abbildung 2) (Pronk *et al.*, 1989; Cleton-Jansen *et al.*, 1991). Vergleichende Experimente mit der cytosolischen Glucose-Dehydrogenase (cGDH) und der mGDH konnten zeigen, dass das mGDH-Protein eine ca. 30-fach höhere Aktivität für die Oxidation von Glucose zu Gluconat aufwies, als das cytosolische Enzym (Pronk *et al.*, 1989). Eine Erhöhung der mGDH-Aktivität sollte daher die Umsetzung von Glucose zu Gluconat weiter verbessern und die Gesamtreaktion zur Bildung von 5-KGA beschleunigen. Das durch die mGDH gebildete Gluconat kann weiter durch die membrangebundenen, PQQ-abhängige Gluconat-5-Dehydrogenase zu 5-KGA umgesetzt werden (Abbildung 2) (Matsushita *et al.*, 2003; Salusjärvi *et al.*, 2004). Eine homologe Überexpression des *mga5dh*-Gens in *G. oxydans* sollte daher ebenso zu einer Steigerung der 5-KGA-Bildung führen. Im Rahmen der Genomik Netzwerk Kooperation wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. Görisch (Fachgebiet Technische Biochemie, TU Berlin) unterschiedliche *G. oxydans* mGDH und mGA5DH-Überproduktionsstämme konstruiert. Dazu wurde das *mgdh*- und *mga5dh*-Gen aus *G. oxydans* DSM 2343 amplifiziert und in die in Tabelle 5 aufgelisteten Vektoren kloniert. Über Elektroporation wurde anschließend *G. oxydans* DSM 2343 bzw. MF1 mit den entsprechenden konstruierten Plasmiden transformiert.

Tabelle 5, Übersicht der *G. oxydans mgdh* und *mga5dh* Überproduktionsstämme

Die Tabelle gibt das resultierende Stamm-Konstrukt, den Stammhintergrund, den Expressionsvektor und das jeweilige in den Vektor klonierte Dehydrogenase-Gen an.

Konstruktnamen	<i>G. oxydans</i> Stamm	verwendeter Vektor	exprimiertes Gen
pTB9003	DSM 2343	pBBR1MCS2	<i>mgdh</i>
pTB9008	MF1	pBBR1MCS5	<i>mgdh</i>
pTB9014	MF1	pBBR1MCS5	<i>mga5dh</i>
pTB9017	MF1	pBBR1MCS5	<i>mgdh/mga5dh</i>

Nach Erhalt der *G. oxydans* Konstrukte pTB9003, pTB9008, pTB9014 und pTB9017 wurde zunächst die Aktivität der membrangebundenen Glucose-Dehydrogenase im Vergleich zu den Elternstämmen *G. oxydans* DSM 2343 und MF1 bestimmt.

3.2 Bestimmung der Aktivität der membrangebundenen Glucose-Dehydrogenase, mGDH

Zur Überprüfung der funktionellen Überexpression des *mgdh*-Gens in den jeweiligen *G. oxydans* Stämmen wurde die spezifische mGDH-Aktivität in Enzymtests bestimmt. Die Ermittlung der mGDH-Aktivität (Tabelle 6) in isolierten Membranfraktionen der *G. oxydans* Stämme DSM 2343, MF1, pTB9003, pTB9008, pTB9014 und pTB9017 erfolgte im Photometer bei 525 nm durch Oxidation des Substrats Glucose und Messung der Zunahme von reduziertem DCIP (Wood *et al.*, 1962).

Tabelle 6, Spezifische Aktivität der membrangebundenen Glucose-Dehydrogenase in den *G. oxydans* Stämmen DSM 2343, MF1, pTB9003, pTB9008, pTB9014 und pTB9017

<i>G. oxydans</i> Stamm	mGDH-Aktivität [U/mg Protein]
DSM 2343	0,5
MF1	0,2
pTB9003	5,8
pTB9008	7,5
pTB9014	0,7
pTB9017	0,7

Die Elternstämme *G. oxydans* DSM 2343 und MF1, sowie der *mga5dh*-Überexpressionsstamm *G. oxydans* pTB9014 zeigten vergleichbare mGDH-Aktivitäten von 0,5 und 0,2, bzw. 0,7 U mg⁻¹ Protein. Die leichten Unterschiede in den Aktivitäten können zum einen mit der unterschiedlichen Protein-Zusammensetzung der Plasmamembran erklärt werden, und zum anderen durch die Art der Solubilisierung der Membranfraktionen nach dem Zellaufschluss, bzw. der Ultrazentrifugation. Es konnte gezeigt werden, dass die Art des Detergenz und die Solubilisierungszeit für die Proteine der Membranfraktionen einen erheblichen Einfluss auf die spezifische Aktivität der

gemessenen Membranproteinen haben (Shinagawa *et al.*, 1999). Die mGDH-Überproduzenten *G. oxydans* pTB9003 und pTB9008 zeigten hingegen eine signifikante 11,6-fach bzw. eine 38-fach erhöhte mGDH-Aktivität im Vergleich zu den Elternstämmen *G. oxydans* DSM 2343 und MF1. Der *G. oxydans* Stamm pTB9017, welcher sowohl das *mgdh*- als auch das *mga5dh*-Gen Plasmid-kodiert überexprimierte, zeigte keine erhöhte Aktivität des mGDH-Proteins. Daher sollte im Folgenden die Transkription des *mgdh*-Gens mittels Northern Blot Analyse untersucht werden.

Um zu untersuchen, ob sich die konstruierten Stämme in der Expression des *mgdh*-Gens unterscheiden, wurden Flüssigkulturen von *G. oxydans* von der mittleren exponentiellen bis zur frühen stationären Phase kultiviert und bei optischen Dichten von 0,5; 0,8; 1,0 und 1,5 Proben entnommen. Im Anschluss daran wurde aus den Proben die RNA isoliert und mit einer *mgdh*-spezifischen Sonde eine Northern Blot Analyse durchgeführt (Abbildung 9).

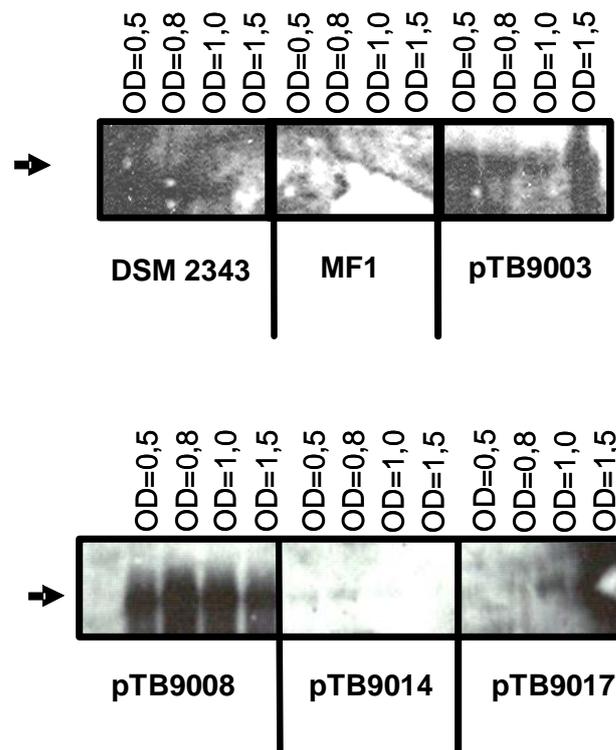


Abbildung 9, Northern Blot Analyse von *G. oxydans* DSM 2343, MF1, pTB9003, pTB9008, pTB9014 und pTB9017 mit einer *mgdh*-Sonde bei Wachstum mit Sorbit als C-Quelle

Es wurden ~ 300 ng RNA aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach Northern Transfer wurde die Membran mit einer spezifischen *mgdh*-Sonde hybridisiert. Die Expositionszeit des Röntgenfilms auf der Membran betrug 5 min. Der Pfeil weist auf das Vorhandensein des *mgdh*-Signals hin.

Für die Elterstämme *G. oxydans* DSM 2343 und MF1 und den *mga5dh*-Überexpressionsstamm *G. oxydans* pTB9014 war unter den gewählten Bedingungen kein *mgdh*-Transkript nachweisbar. Auch im Lauf des Wachstums zeigten die Stämme keine Erhöhung der Transkriptmenge. Im Gegensatz dazu konnten für die mGDH-Überproduktionsstämme *G. oxydans* pTB9003 und pTB9008, bei denen das Gen der Glucose-Dehydrogenase Plasmid-kodiert überexprimiert wird, ein sehr starkes Signal für die *mgdh*-mRNA nachgewiesen werden. Über den Wachstumsverlauf von einer optischen Dichte von 0,5 bis 1,5 war in beiden Stämmen ein vergleichbarer hoher Level an *mgdh*-mRNA festzustellen. Der *mgdh/mga5dh*-Überexpressionsstamm *G. oxydans* pTB9017 hingegen zeigte keine Erhöhung des *mgdh*-mRNA Transkriptlevels, obwohl das Konstrukt pBBR1MCS5/*mgdh/mga5dh* bis auf das zusätzlich klonierte *mga5dh*-Gen keine Unterschiede zu *G. oxydans* pTB9008 (pBBR1MCS5/*mgdh*) aufwies. Die Transkriptanalysen aller *G. oxydans* Stämme unterstützten die Ergebnisse der gemessenen spezifischen mGDH-Aktivitäten (Tabelle 6). Die mGDH-Überproduktionsstämme *G. oxydans* pTB9003 und pTB9008 wiesen die höchste mGDH-Aktivität und die höchsten mRNA-Transkriptlevel auf. Der *G. oxydans* Stamm pTB9017, welcher sowohl das *mgdh*- als auch das *mga5dh*-Gen Plasmid-kodiert überexprimierte, zeigte in beiden Experimenten weder eine Erhöhung der spezifischen mGDH-Aktivität noch eine Erhöhung des *mgdh*-mRNA Transkriptlevels. Es ist daher nicht auszuschließen, dass bei der Konstruktion des Plasmids pBBR1MCS5/*mgdh/mga5dh* durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. Görisch (Fachgebiet Technische Biochemie, TU Berlin) Mutationen aufgetreten sind, die eine Transkription des *mgdh*-Gens, und damit die Expression des Gens der Glucose-Dehydrogenase im resultierenden *G. oxydans* Stamm pTB9017 verhinderten.

3.3 Umsetzung von Glucose mit wachsenden Zellen von *G. oxydans* DSM 2343, pTB9008 und pTB9017

Nachdem sowohl eine Steigerung der *mgdh*-Transkriptmenge (Abbildung 9), als auch der spezifischen mGDH-Aktivität (Tabelle 6) gezeigt werden konnte, wurde nun die Umsetzung von Glucose zu Gluconat in Fermentern unter konstanten Bedingungen untersucht. Die Zellen der *G. oxydans* Stämme DSM 2343, pTB9008 und pTB9017 wurden bei pH 5, einem Sauerstoff- bzw. CO₂-Partialdruck von 10 % bzw. 0,05 % und einer Begasungsrate von 10 l h⁻¹ mit 138 mmol l⁻¹ Glucose als Substrat kultiviert. Aus der Änderung der Gluconat-Konzentration pro Zeit wurde die Gluconat-Produktionsrate errechnet (Tabelle 7).

Tabelle 7, Umsetzung von 138 mmol l⁻¹ Glucose mit wachsenden Zellen von *G. oxydans* DSM 2343, pTB9008 und pTB9017

Stamm	Gluconat Produktionsrate [mmol l ⁻¹ h ⁻¹ g ⁻¹ TG]
<i>G. oxydans</i> DSM 2343	41,5
<i>G. oxydans</i> pTB9008	46,0
<i>G. oxydans</i> pTB9017	35,3

Durch die Überexpression des *mgdh*-Gens konnte bei dem *G. oxydans* Stamm pTB9008 eine Steigerung der Gluconat-Bildungsrate um 10 % von 41,5 mmol l⁻¹ h⁻¹ g⁻¹ TG auf 46 mmol l⁻¹ h⁻¹ g⁻¹ TG erreicht werden. *G. oxydans* pTB9017, welcher bei der Bestimmung der spezifischen mGDH-Aktivität (Tabelle 6) die geringsten Werte aufwies, zeigte auch bei der Umsetzung von Glucose eine Verringerung der Gluconat-Produktionsrate um 15 % (35,3 mmol l⁻¹ h⁻¹ g⁻¹ TG). Im Falle von *G. oxydans* pTB9008 konnte somit eine Steigerung der Gluconat-Bildungsrate bei der Umsetzung von Glucose erzielt werden. *G. oxydans* pTB9017 zeigte trotz Plasmid-kodierter Überexpression des *mgdh*-Gens eine Verringerung der Gluconat-Bildungsrate. Die Unterschiede zwischen der gemessenen *in vitro* mGDH-Aktivität und der resultierenden Gluconat-Bildungsrate während der Umsetzung von Glucose im Fermenter können durch die unterschiedlichen Elektronenakzeptoren erklärt werden.

Während der Bestimmung der spezifischen Aktivität der Glucose-Dehydrogenase *in vitro* wird DCIP als artifizieller Elektronenakzeptor verwendet, wohingegen während der *in vivo* Umsetzung von Glucose im Fermenter die Elektronen an die Atmungskette bzw. den Ubichinon-Pool von *G. oxydans* weiter abgegeben werden müssen. In den *in vitro* Experimenten ist zusätzlich der Elektronentransport-Mediator Phenazinethosulfat (PES) vorhanden, der die Elektronen von der mGDH direkt und ohne Verwendung der Atmungskette an DCIP weitergibt. Bei der Umsetzung von Glucose mit ganzen *G. oxydans* Zellen hängt die Gluconat-Bildungsrate dagegen von der Aktivität der Atmungskette, bzw. der Re-Oxidation von PQQH₂ ab. Dieses wird während der Oxidation von Glucose zu Gluconat aus PQQ gebildet und muss für die weitere Oxidationsreaktionen der mGDH wieder zu PQQ oxidiert werden. Die gesteigerte, spezifische *in vitro* Aktivität von membrangebundenen, PQQ-abhängigen Enzymen, welche an die Atmungskette gekoppelt sind, steht somit nicht in direkter Korrelation mit der erzielten Gluconat-Bildungsrate der *in vivo*-Umsetzung im Fermenter.

3.4 Homologe Überproduktion der membrangebundenen Gluconat-5-Dehydrogenase mGA5DH

Durch die Überproduktion der membrangebundenen Glucose-Dehydrogenase konnte in *G. oxydans* eine Verbesserung der Gluconat-Bildung erreicht werden. Um eine Erhöhung der 5-KGA-Bildung zu erzielen, sollte nun das *mga5dh*-Gen der membrangebundenen Gluconat-5-Dehydrogenase (Abbildung 2) homolog überexprimiert werden. Im Rahmen des Genomik Netzwerkes wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. Görisch (Fachgebiet Technische Biochemie, TU Berlin) zwei unterschiedliche *mga5dh*-Expressions-Vektoren konstruiert (Tabelle 5) und *G. oxydans* MF1 mit diesen transformiert. Die erhaltenen Stämme enthielten die Plasmide pBBR1MCS5/*mga5dh* und pBBR1MCS5/*mgdh/mga5dh* und wurden pTB9014 bzw. pTB9017 benannt. Nach Isolierung der mGA5DH-Überproduzentenstämme *G. oxydans* pTB9014 und *G. oxydans* pTB9017 wurde die spezifische *in vitro* Aktivität der Gluconat-5-Dehydrogenase in Enzymtests ermittelt. Die Anzucht der Zellen und die Präparation der Membranfraktion der *G. oxydans* Stämme pTB9014, pTB9017 und der Kontrolle *G. oxydans* MF1 pBBR1MCS5 wurde analog zur Bestimmung der mGDH-Aktivität durchgeführt. Die spezifische Aktivität des solubilisierten Membranenzym

(mGA5DH) wurde durch die Oxidation von Gluconat zu 5-KGA und der damit verbundenen Reduktion von DCIP bestimmt (Tabelle 8).

Tabelle 8, Spezifische Aktivität der membrangebundenen Gluconat-5-Dehydrogenase in *G. oxydans* MF1 pBBR1MCS5, pTB9014 und pTB9017

Die Oxidation von 50 mmol l⁻¹ Gluconat zu 5-KGA wurde bei pH 5 durch die Reduktion von DCIP bei einer Wellenlänge von 525 nm photometrisch bestimmt.

<i>G. oxydans</i> Stamm	mGA5DH-Aktivität [U/mg Protein]
MF1 pBBR1MCS5	0,196
pTB9014	0,271
pBT9017	0,220

Der mit dem Leervektor transformierte Stamm *G. oxydans* MF1 pBBR1MCS5 wies eine spezifische Aktivität der mGA5DH von 196 mU mg⁻¹ Protein auf. *G. oxydans* pTB9014 mit dem zusätzlich Plasmid-kodierten *mga5dh*-Gen hatte eine spezifische mGA5DH-Aktivität von 271 mU mg⁻¹ Protein, was einer Steigerung von 38 % entspricht. Der *G. oxydans* Stamm pTB9017, welcher sowohl das *mgdh*- als auch das *mga5dh*-Gen überexprimierte wies allerdings eine im Vergleich zu pTB9014 geringere Aktivität von 220 mU mg⁻¹ Protein auf, was nur einer Aktivitätssteigerung von 12 % im Vergleich zum Kontrollstamm entsprach. Aufgrund der geringen Erhöhung der spezifischen *in vitro* Aktivität der Gluconat-5-Dehydrogenase in den *mga5dh*-Überexpressions-Stämmen *G. oxydans* pTB9014 und *G. oxydans* pTB9017 sollte die Transkription des *mga5dh*-Gens über Northern Blot Analyse untersucht werden. Die zu untersuchenden *G. oxydans* Stämme DSM 2343, MF1, pTB9014 und pTB9017 wurden in Flüssigmedium kultiviert und von der mittleren exponentiellen bis zur frühen stationären Phase bei optischen Dichten von 0,5 bis 1,5 Proben entnommen. Die Zellen wurden geerntet, die RNA der *G. oxydans* Stämme isoliert und mit einer *mga5dh*-spezifischen Sonde eine Northern Blot Analyse durchgeführt (Abbildung 10).

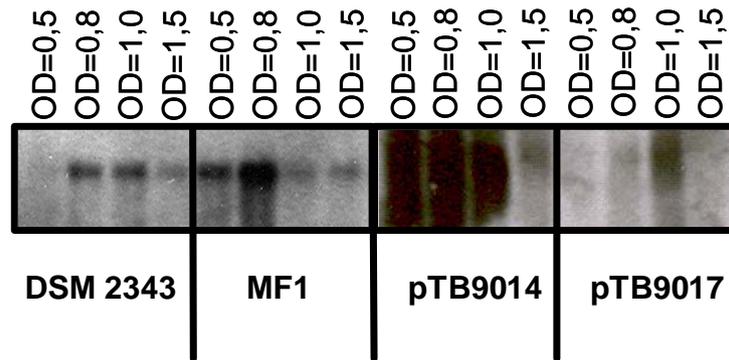


Abbildung 10, Northern Blot-Analyse von *G. oxydans* DSM 2343, MF1, pTB9014 und pTB9017 bei Wachstum mit Glucose als C-Quelle

Die RNA der unterschiedlichen *G. oxydans* Stämme wurde mit einer spezifischen *mga5dh*-Sonde nachgewiesen. Die Probenentnahmen für die RNA wurden bei einer optischen Dichte von 0,5; 0,8; 1,0 und 1,5 durchgeführt.

Die *G. oxydans* Stämme DSM 2343, MF1, pTB9014 und pTB9017 zeigten unterschiedliche Level an *mga5dh*-mRNA. Der Wildtypstamm *G. oxydans* DSM 2343 und *G. oxydans* MF1 wiesen bei Wachstum auf Glucose vergleichbare Mengen *mga5dh*-mRNA auf. Der mGA5DH-Überproduktionsstamm pTB9014 zeigte dahingegen ein erhöhtes *mga5dh*-mRNA Level, was durch die Plasmid-kodierte Überexpression zu erklären ist. *G. oxydans* pTB9017 zeigte die geringste Transkription der *mga5dh*-mRNA verglichen mit allen untersuchten Stämmen. Die Ergebnisse der Northern Blot Analysen zur Transkription des *mga5dh*-Gens korrelieren somit mit den Ergebnissen aus den Bestimmungen der *in vitro* mGA5DH-Aktivität (Tabelle 8). Der mGA5DH-Überproduktionsstamm *G. oxydans* pTB9014 zeigte verglichen mit dem Elternstamm *G. oxydans* MF1 eine Erhöhung der mGA5DH-Aktivität und eine Steigerung des *mga5dh*-mRNA Transkripts. *G. oxydans* pTB9017, welcher sowohl das *mgdh*- als auch das *mga5dh*-Gen Plasmid-kodiert überexprimierte, wies weder eine derart erhöhte *in vitro* mGA5DH-Aktivität, noch eine Erhöhung der *mga5dh*-Transkript-Menge auf, so dass man davon ausgehen kann, dass während der Klonierung Mutationen auftraten, welche die Expression der Gluconat-5-Dehydrogenase negativ beeinflussten. Nachdem die Aktivität des mGA5DH-Enzyms in *G. oxydans* MF1 pTB9014 gesteigert werden konnte, sollte nun die Umsetzung von Glucose mit diesen Überproduzenten-Stämmen untersucht werden.

3.5 Umsetzung von Glucose mit wachsenden Zellen von *G. oxydans* MF1, pTB9014 und pTB9017

Zur Überprüfung der Produktivität der *G. oxydans* Stämme MF1, pTB9014 und pTB9017 wurden die Zellen wie in Kapitel 3.3 beschrieben angezogen, geerntet und mit gleichen optischen Dichten angeimpft. Die Probenentnahme erfolgte stündlich und anhand der Konzentrationsänderung der Produkte in Abhängigkeit von der Inkubationszeit wurden die Produktionsraten errechnet (Tabelle 9).

Tabelle 9, Umsetzung von Glucose zu Gluconat und 5-KGA mit wachsender Zellen von *G. oxydans* MF1, pTB9014 und pTB9017

Die Fermentation von 138 mmol l^{-1} Glucose wurde bei einem pH-Wert von 5,0 und 30°C durchgeführt. Die Änderung der Konzentration des Zwischenproduktes Gluconat sowie des 5-KGA mit der Zeit wurde als Kurve aufgetragen und anhand der maximalen Steigung, die Bildungsrate im Bezug auf die Zelltrockenmasse errechnet.

<i>G. oxydans</i> Stamm	Gluconat-Bildungsrate [mmol h ⁻¹ g ⁻¹ TG]	5-KGA-Bildungsrate [mmol h ⁻¹ g ⁻¹ TG]
MF1	62,9	17,0
pTB9014	36,3	19,9
pTB9017	35,3	7,9

Durch die Überexpression des *mga5dh*-Gens konnte in *G. oxydans* pTB9014 die 5-KGA-Bildungsrate während der Umsetzung von Glucose gegenüber dem Elternstamm *G. oxydans* MF1 um ca. 20 % gesteigert werden. *G. oxydans* pTB9017 zeigte die geringste 5-KGA-Bildungsrate, welche möglicherweise auf eine Mutation des Plasmid-kodierten *mga5dh*-Gens zurückzuführen ist. Von Salusjärvi *et al.* (2004) konnte zudem gezeigt werden, dass die Expression des *mga5dh*-Gens aus *G. oxydans* in *E. coli* bei Verwendung des *tac*-Promotors toxisch ist. Die Zellen veränderten ihre Struktur und lysierten sogar bei Induktion mit IPTG (Salusjärvi *et al.*, 2004). Neben der beschriebenen Toxizität bei Überproduktion des mGA5DH-Proteins müssen ebenso die enzymatischen Eigenschaften berücksichtigt werden. Die membrangebundene Gluconat-5-Dehydrogenase weist mit einem K_m -Wert von 420 mmol l^{-1} eine relativ

niedrige Affinität zu Gluconat auf (Adachi *et al.*, 2001). Daher sind die zu erwartenden Gluconat-Bildungsraten bei einer Glucose-Konzentration von 138 mmol l^{-1} nur gering.

Der *G. oxydans* Stamm pTB9014, welcher das Gen des mGA5DH-Proteins Plasmid-kodiert überexprimierte, stellte sich als der für die 5-KGA Produktion durch membrangebundene Proteine am besten geeignete Stamm heraus und wurde als Ausgangskonstrukt für die nachfolgenden Optimierungen verwendet. Die Produktivität der 5-KGA-Bildung sollte im Folgenden durch Variation der Produktionsparameter wie, Glucose-Konzentration und Art und Weise der Glucose-Zuführung, verbessert werden.

4. Optimierung der Kultivierungsparameter für die 5-KGA-Bildung

4.1 Steigerung der Glucose-Konzentration

Es konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der 5-KGA-Konzentration sowohl durch die Disruption der membrangebundenen Gluconat-2-Dehydrogenase als auch durch die homologe Überexpression des *mga5dh*-Gens der membrangebundenen Gluconat-5-Dehydrogenase erreicht wurde. Zur Steigerung der maximalen 5-KGA-Konzentration und Ausbeute wurde die eingesetzte Glucose-Konzentration von 138 mmol l^{-1} auf 550 mmol l^{-1} erhöht. Um die Ergebnisse der Biotransformation von 550 mmol l^{-1} Glucose mit Ganzzell-Biotransformationen von 138 mmol l^{-1} Glucose vergleichen zu können, wurden die *G. oxydans* Stämme DSM 2343 und MF1 für diese Experimente ausgewählt. Die *G. oxydans* Stämme wurden angezogen und in einer diskontinuierlichen Biotransformation analog zum in Kapitel 2.4 beschriebenen Experiment eingesetzt. Es wurden stündliche Proben entnommen, die optische Dichte bestimmt und die Konzentration der Produkte über HPLC Analytik ermittelt (Abbildung 11).

15 Stunden nach Beginn der Biotransformation von 550 mmol l^{-1} Glucose erschien die Umsetzung der Glucose zu Gluconat und 5-KGA als abgeschlossen, da keine weitere Bildung von 5-KGA mehr beobachtet werden konnte. Um auszuschließen, dass die Zellen möglicherweise inaktiviert worden waren, wurde 25 Stunden nach Beginn der Biotransformation zusätzlich ca. 100 mmol Glucose zu den Ansätzen hinzugegeben und der Einfluss der Glucose auf die 5-KGA-Bildung untersucht (Abbildung 11B, Pfeil).

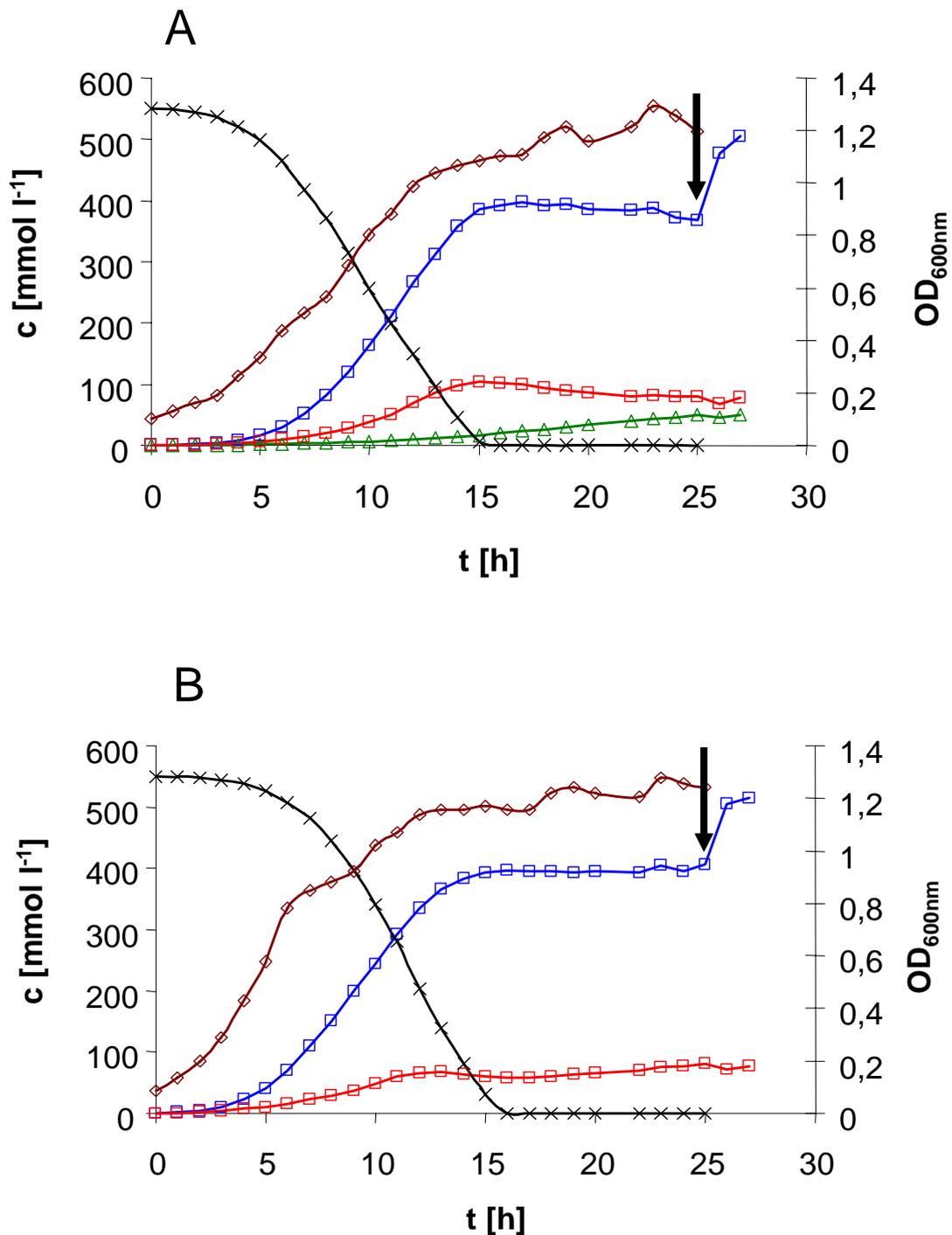


Abbildung 11, Umsetzung von 550 mmol l⁻¹ Glucose mit *G. oxydans* DSM 2343 und MF1
 Die Umsetzung von 550 mmol l⁻¹ Glucose wurde mit *G. oxydans* DSM 2343 (A) und MF1 (B) bei einem pH-Wert von 6 und 30 °C durchgeführt. Nach 25 Stunden wurde erneut jeweils 100 mmol Glucose als konzentrierte Lösung in die Fermenter gegeben. Symbole und Farben: ×× Glucose [mmol l⁻¹]; □ Gluconat [mmol l⁻¹]; □ 5-KGA [mmol l⁻¹]; △ 2-KGA [mmol l⁻¹], ◇ optische Dichte bei 600 nm, ↓ Zugabe von Glucose

Die Zugabe von Glucose zu den Fermentern mit den *G. oxydans* Stämmen DSM 2343 und MF1 führte zu keiner weiteren Bildung von 5-KGA. Die Glucose wurde ausschließlich in Gluconat umgesetzt. Da sowohl die membrangebundene Glucose-Dehydrogenase als auch die membrangebundene Gluconat-5-Dehydrogenase PQQ-abhängige Enzyme sind, konnte eine limitierte Verfügbarkeit des Cofaktors PQQ als Grund für den Stopp der 5-KGA-Bildung ausgeschlossen werden, denn die Umsetzung von Glucose zu Gluconat fand weiterhin statt. Vergleicht man die Biotransformation von 550 mmol l⁻¹ Glucose mit der Biotransformation von 138 mmol l⁻¹ Glucose, so sieht man auch hier, dass die eigentliche Bildung von 5-KGA während des Wachstums der Zellen stattfindet. In der stationären Phase, ca. 15 Stunden nach Beginn der Umsetzung, ist trotz Gluconat-Überschuss keine weitere Erhöhung der 5-KGA-Konzentration zu erkennen. Daher stimmen die Ergebnisse der Umsetzung von 138 mmol l⁻¹ Glucose und von 550 mmol l⁻¹ Glucose mit den Beobachtungen von Stadler-Szöke *et al.* (1980) überein. Sie konnten zeigen, dass die 5-KGA-Bildung mit dem Vorhandensein von Gluconat beginnt, und nicht erst dann, wie von Weenk *et al.* (1984) behauptet, wenn die eingesetzte Glucose vollständig zu Gluconat umgesetzt worden ist (Stadler-Szöke *et al.*, 1980; Weenk *et al.*, 1984).

Tabelle 10, Biotransformation von 550 mmol l⁻¹ Glucose mit *G. oxydans* DSM 2343 und MF1
Die Umsetzung der Glucose wurde unter konstanten Bedingungen bei 30°C und pH 5 durchgeführt. Die Werte für die Produktivität der beiden Stämme wurden aus der Konzentrationsänderung pro Zeit errechnet.

Stamm	DSM 2343	MF1
Gluconat Produktionsrate [mmol l ⁻¹ h ⁻¹ g ⁻¹ TG]	82,3	92,3
2-KGA Produktionsrate [mmol l ⁻¹ h ⁻¹ g ⁻¹ TG]	6,2	-
5-KGA Produktionsrate [mmol l ⁻¹ h ⁻¹ g ⁻¹ TG]	20,5	12,1
Maximale 2-KGA Konzentration [mmol l ⁻¹]	50	-
Maximale 5-KGA Konzentration [mmol l ⁻¹]	103	81
Maximale Gluconat Konzentration [mmol l ⁻¹]	397	407
Gluconat Ausbeute, t=25 h [%]	66,7	73,8
2-KGA Ausbeute, t=25 h [%]	9,1	-
5-KGA Ausbeute, t=25 h [%]	14,2	14,7

Vergleicht man die Werte der Umsetzung von 550 mmol l^{-1} Glucose aus Tabelle 10 mit den Werten der Umsetzung von 138 mmol l^{-1} Glucose aus Tabelle 4, so erkennt man, dass die Gluconat-Bildungsraten bei *G. oxydans* DSM 2343 um den Faktor 3 und bei *G. oxydans* MF1 um den Faktor 2,3 erhöht sind. Durch Erhöhung der Glucose-Konzentration konnte somit eine Steigerung der Gluconat-Bildung durch die membrangebundene Glucose-Dehydrogenase erzielt werden. Dies führte dazu, dass innerhalb von 15 Stunden ca. 400 mmol l^{-1} Gluconat durch *G. oxydans* DSM 2343 und *G. oxydans* MF1 gebildet wurden und im Medium akkumulierten. Anders als erwartet konnte jedoch keine Erhöhung der 5-KGA-Konzentration erreicht werden.

Tabelle 11, Wachstumsparameter von *G. oxydans* DSM 2343 und MF1 während der Ganzzell-Biotransformation von 550 mmol l^{-1} Glucose

Stamm	DSM 2343	MF1
Wachstumsrate μ_{\max} [h^{-1}]	0,24	0,34
Verdopplungszeit t_D [h]	2,94	2,07
Maximale OD	1,31	1,29

Die Ergebnisse der Biotransformation von 138 mmol l^{-1} und 550 mmol l^{-1} Glucose durch *G. oxydans* DSM 2343 sind untereinander vergleichbar. In beiden Umsetzungen wurden jeweils ca. $80\text{-}100 \text{ mmol l}^{-1}$ 5-KGA und $50\text{-}67 \text{ mmol l}^{-1}$ 2-KGA gebildet. Dabei waren die 2-KGA- und 5-KGA-Bildungsraten annähernd gleich. Auch die Wachstumsrate von *G. oxydans* DSM 2343 zeigte keine Änderung im Bezug auf die Kultivierung mit 138 mmol l^{-1} bzw. 550 mmol l^{-1} Glucose (Tabelle 11). Anders dahingegen verhielt sich das Wachstum von *G. oxydans* MF1, dessen Wachstumsrate sich bei Kultivierung mit 550 mmol l^{-1} Glucose um 50 % verringerte. Velizarov *et al.* (1998) bestätigten, dass ab einer Gluconat-Konzentration von 300 mmol l^{-1} eine Hemmung des Wachstums von *G. oxydans* NBIMCC 1043 eintrat (Velizarov & Beschkov, 1998). Unter Berücksichtigung dieser Kenntnisse konnte so auch die verringerte 5-KGA-Bildungsrate bei Biotransformation von 550 mmol l^{-1} Glucose mit *G. oxydans* MF1 erklärt werden. Durch die verstärkte Gluconat-Bildung wurde das Wachstum von *G. oxydans* MF1 behindert, was in einer Verringerung der 5-KGA-

Bildung um 66 % von $36,3 \text{ mmol l}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ TG auf $12,1 \text{ mmol l}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ TG führte. Da die Parameter bei den Biotransformationen von 138 mmol l^{-1} bzw. 550 mmol l^{-1} Glucose mit *G. oxydans* DSM 2343 und *G. oxydans* MF1 bis auf die eingesetzten Glucose-Konzentration gleich waren, wurde ein Einfluss der Glucose- bzw. Gluconat-Konzentration auf die 5-KGA-Produktivität nicht ausgeschlossen. Um dennoch eine Steigerung der 5-KGA-Konzentration zu erzielen, sollte im Folgenden die Art der Glucose-Zugabe geändert werden. Statt einer hohen Glucose-Anfangskonzentration sollte Glucose kontinuierlich als Konzentrat zu den Zellen gegeben werden, und so eine Akkumulation von Gluconat verhindert werden.

4.2 Umsetzung von kontinuierlich zugeführter Glucose mit wachsenden Zellen von *G. oxydans* MF1

Um auf der einen Seite die 5-KGA-Menge zu erhöhen, und auf der anderen Seite eine Akkumulation von Gluconat zu verhindern, welche sich möglicherweise hemmend auf die 5-KGA-Produktivität auswirkt, wurde versucht, dem Kulturmedium Glucose kontinuierlich in Form einer konzentrierten Lösung zuzuführen. Dabei wurde der Zufluss einer 2,8 M Glucose-Lösung so berechnet, dass die Bildung von Gluconat genauso schnell verläuft, wie die Bildung von 5-KGA, und somit praktisch keine Akkumulation von Gluconat erfolgen kann. Bei einer Zuflussrate von $0,5 \text{ ml h}^{-1}$, einer Glucose-Konzentration von 2,8 M und einem Startvolumen von 150 ml Kulturlösung in den Reaktionsgefäßen sollte eine Glucose-Zugabe von ca. $10 \text{ mmol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erfolgen. Da die 5-KGA-Bildungsrate in den Experimenten mit *G. oxydans* MF1 mit 550 mmol l^{-1} Glucose höher war (Tabelle 10), als die zugeführte Glucose-Menge pro Zeit, sollte somit keine Anreicherung von Gluconat erfolgen und 5-KGA kontinuierlich gebildet werden. Von *G. oxydans* MF1 wurde eine Vorkultur angezogen, die Zellen geerntet und die Reaktionsgefäße mit den Zellen inokuliert. Die Biotransformation von Glucose erfolgte bei einem pH-Wert von 5,0, einem Sauerstoff- und CO_2 -Partialdruck von 10 % bzw. 0,05 %, einer Begasungsrate von 10 l h^{-1} und einer Temperatur von $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Es wurden in regelmäßigen Abständen Proben entnommen, die optische Dichte und die Produktkonzentrationen bestimmt (Abbildung 12) und die Gluconat- und 5-KGA-Bildungsraten berechnet (Tabelle 12).

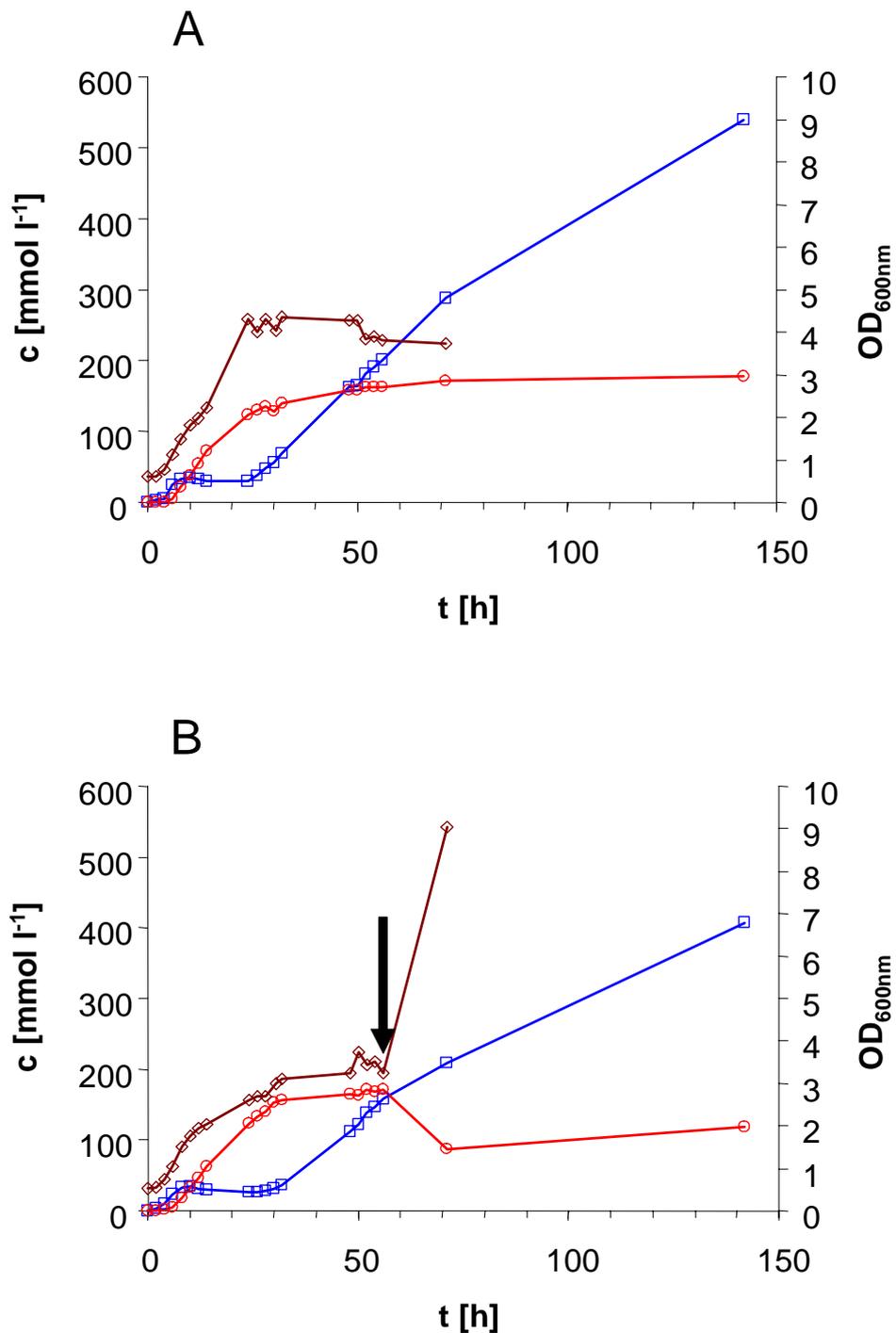


Abbildung 12, Umsetzung von kontinuierlich zugegebener Glucose mit *G. oxydans* MF1

Eine konzentrierte Glucose-Lösung wurde mit einer Flussrate von $0,5 \text{ ml h}^{-1}$ zu den *G. oxydans* MF1 Zellen gegeben. Es wurden Proben entnommen, analysiert und die Konzentrationen gegen die Zeit aufgetragen. Nach 56 Stunden wurde zu den Zellen in B) CaCl_2 gegeben, so dass eine CaCl_2 -Konzentration von 50 mmol l^{-1} vorhanden war. Zu den Zellen in Ansatz A) wurde zum Vergleich kein CaCl_2 hinzu gegeben. Symbole und Farben: \square Gluconat, \circ 5-KGA, \diamond optische Dichte bei 600 nm, \blacktriangleleft Zugabe von CaCl_2

Die theoretisch berechnete und zugesetzte Glucose-Menge von ca. $10 \text{ mmol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ führte zu Beginn der Umsetzung dazu, dass ausschließlich 5-KGA gebildet wurde. Neben 5-KGA war eine basale Gluconat-Konzentration von ca. 30 mmol l^{-1} vorhanden, deren Konzentration sich aber über einen Zeitraum von 24 h nicht änderte.

Tabelle 12, Wachstumsparameter und Bildungsraten von *G. oxydans* MF1 bei Biotransformation von kontinuierlich zugeführter Glucose

Stamm	MF1	MF1 + CaCl ₂
Wachstumsrate μ_{max} [h ⁻¹]	1,2	1,3
Verdopplungszeit t_D [h]	5,7	5,3
Maximale OD	3,65	3,74
Gluconat Produktionsrate [mmol l ⁻¹ h ⁻¹ g ⁻¹ TG]	9,8	9,3
5-KGA Produktionsrate [mmol l ⁻¹ h ⁻¹ g ⁻¹ TG]	8,4	8,1

Die geringe Glucose-Konzentration zeigte auch Auswirkungen auf das Wachstum von *G. oxydans* MF1. Die Wachstumsraten waren verringert, die maximale optische Dichte wurde nach ca. 28 Stunden erreicht. Ab einem bestimmten Zeitpunkt stoppte die 5-KGA-Bildung und wie aus den vorangegangenen Experimenten bekannt, startete die Akkumulation von Gluconat. Dieser Zeitpunkt war in beiden Reaktionsansätzen gleichzeitig der Eintritt der *G. oxydans* MF1 Zellen in die stationäre Wachstumsphase, der bei Ansatz A) nach 26 bzw. bei Ansatz B) 32 Stunden erfolgte (Abbildung 12). Ab diesem Zeitpunkt war die 5-KGA-Bildung in allen Ansätzen nahezu beendet. Bis zu diesem Zeitpunkt waren ca. 150 mmol l^{-1} 5-KGA gebildet worden und es wurde vermutet, dass das gebildete 5-KGA möglicherweise mit dem Ca²⁺ aus dem aktiven Zentrum der membrangebundenen Gluconat-5-Dehydrogenase konkurriert und das Enzym dadurch inaktiviert wird. Dieses Problem der Bildung eines Ca(5-KGA)₂ Salzes und die damit verbundene mögliche Inaktivierung des mGA5DH-Proteins wurde bereits beschrieben (Ameyama *et al.*, 1985b; Matsushita *et al.*, 1994; Matsushita *et al.*, 2003). Durch Zugabe von Ca²⁺ konnte das mGA5DH holo-Enzyms wiederhergestellt werden (Shinagawa *et al.*, 1999). Nach 56 Stunden wurde in Ansatz B eine CaCl₂-

Konzentration von 50 mmol l^{-1} eingestellt (Abbildung 12). Nach Zugabe des CaCl_2 bildete sich sofort ein weißer Niederschlag und die 5-KGA-Konzentration sank von 170 mmol l^{-1} auf 87 mmol l^{-1} . Nach anschließender Zugabe von Ca^{2+} kam es jedoch zu keiner erneuten 5-KGA-Bildung, so dass die von Shinagawa *et al.* (1999) postulierte Hypothese der Bildung eines mGA5DH *apo*-Enzyms vermutlich nicht der Grund war. Zusätzlich konnte auch ein inhibitorischer Effekt von 5-KGA auf die Aktivität des mGA5DH-Enzyms ausgeschlossen werden, da in Ansatz B trotz Verringerung der 5-KGA-Konzentration keine erneute 5-KGA-Bildung zu beobachten war. Die Gluconat-Bildung blieb während des Wechsels in die stationäre Phase und auch nach Zugabe von CaCl_2 in beiden Ansätzen unverändert. Der Versuch wurde nach 127 Stunden abgebrochen, da keine signifikante Änderung der 5-KGA-Konzentration mehr zu beobachten war, die Gluconat-Bildung jedoch kontinuierlich weiter stattfand. Somit konnte auch ein mögliches Absterben der Zellen als Grund für den Stopp der 5-KGA-Bildung ausgeschlossen werden. Der in Ansatz B ausgefallene Feststoff sorgte dafür, dass die optische Dichte stark anstieg und somit ein Wachstum der Zellen nicht mehr dokumentiert werden konnte. Nach Isolierung und Reinigung des Feststoffes wurde ein Festphasen-Infrarotspektrum der unbekannt Substanz und 5-KGA als Referenz erstellt, und der Stoff als nahezu reines 5-KGA identifiziert. Die selektive Fällung von 5-KGA als $\text{Ca}(5\text{-KGA})_2$ aus einem Biotransformationsprozess wurde schon früher durch Kotera *et al.* (1972a) beschrieben. Die Möglichkeit, 5-KGA selektiv und nahezu rein aus einem Prozess durch Fällung zu isolieren, stellt dabei eine kostengünstige Methode dar, die eine aufwendige „downstream“-Prozessierung überflüssig macht.

Durch die kontinuierliche Zugabe einer konzentrierten Glucose-Lösung konnte eine stetige 5-KGA-Bildung durch *G. oxydans* MF1 erreicht werden. Der lineare Verlauf der 5-KGA-Bildung stoppte bei Eintritt in die stationäre Wachstumsphase von *G. oxydans* MF1 und konnte weder durch Zugabe von CaCl_2 noch durch Fällung des Reaktionsproduktes 5-KGA wiederhergestellt werden. Durch die Zugabe einer konzentrierten Glucose-Lösung konnte die Gluconat-Akkumulation vermieden und vergleichbar hohe optische Dichten erreicht werden (Tabelle 12). Nach Eintritt in die stationäre Wachstumsphase fand die Gluconat-Bildung unbeeinflusst von CaCl_2 -Zugabe über einen Zeitraum von ca. 90 Stunden statt.

5. Expression des *mga5dh*-Gens

5.1 Steigerung der *mga5dh*-Expression durch Austausch des nativen Promotors

In den Versuchen zur Umsetzung von 550 mmol l⁻¹ Glucose bzw. von Glucose, die kontinuierlich als Substrat zugefügt wurde, konnte beobachtet werden, dass die Bildung von 5-KGA hauptsächlich während der exponentiellen Wachstumsphase von *G. oxydans* stattfindet. Daher kann angenommen werden, dass die Regulation der Expression des *mga5dh*-Gens Wachstumsphasen-abhängig ist. Zur Vermeidung von möglichen Wachstumseffekten sollte aus diesem Grund der Promotor des *mga5dh*-Gens gegen Promotoren von konstitutiv exprimierten, bzw. durch Glucose induzierbaren Genen ausgetauscht werden. Auf diese Weise sollte die *mga5dh*-Expression dereguliert und so die 5-KGA-Produktivität erhöht werden.

Versuche zur homologen Überexpression von *G. oxydans* Genen haben bereits gezeigt, dass der *tufB* Promotor des Elongationsfaktors EF-Tu aus *E. coli* erfolgreich eingesetzt werden konnte (An & Friesen, 1980; Saito *et al.*, 1997). Bei den beschriebenen Versuchen wurde der *tufB*-Promotor gegen den Promotor des *G. oxydans* *sdh/sndh*-Genclusters (SDH, Sorbose-Dehydrogenase, SNDH, Sorboson-Dehydrogenase) ausgetauscht und auf diese Weise eine gesteigerte Genexpression erreicht (Saito *et al.*, 1997). Da der *E. coli* *tufB*-Promotor für die Genexpression in *G. oxydans* geeignet war, wurde dieser für die Überexpression des *mga5dh*-Gens verwendet. In dieser Arbeit wurde zudem der homologe *G. oxydans* *tufB*-Promotor für den Austausch des *mga5dh*-Promotors ausgewählt. Es wurde dabei vorausgesetzt, dass aufgrund der Verwendung eines *G. oxydans* eigenen Promotors die Expression ebenfalls stark und konstitutiv verläuft, wie es bei dem Promotor des EF-Tu Homologs in *E. coli* der Fall war. In den Northern Blot-Analysen zur Transkription des *mgdh*-Gens der membrangebundenen Glucose-Dehydrogenase konnte gezeigt werden, dass durch Wachstum des *mgdh*-Überexpressions-Stammes pTB9008 mit Glucose als C-Quelle, eine starke Induktion der *mgdh*-Expression im Vergleich zum Wachstum mit Sorbit erreicht werden konnte. Daher wurde der *mgdh*-Promotor ebenfalls für die Expression des *mga5dh*-Gens in einem Überproduktionsstamm ausgewählt. Für den Austausch des nativen Promotors wurde das *mga5dh*-Gen (2758 bp) (Matsushita *et al.*, 2003)

ohne den Promotorbereich mit den Primern p_sldh_Gox_for und p_sldh_Gox_rev aus genomischer *G. oxydans* DSM 2343 DNA amplifiziert, in den Vektor pBBR1MCS5 (4738 bp) ligiert und das resultierende Plasmid pMM_ *mga5dh* (7468 bp) genannt. Der Bereich der Austauschpromotoren wurde 380 bis 480 Basenpaare stromaufwärts vom ATG-Codon des jeweiligen Gens, *mgdh* bzw. *tufB*, gewählt und mit den Primern p_gdh_for / p_gdh_rev (*mgdh G. oxydans*), p_tufB_Gox_for / p_tufB_Gox_rev (*tufB G. oxydans*) und p_tufB_Ecoli_for / p_tufB_Ecoli_rev (*tufB E. coli*) amplifiziert.

Tabelle 13, Promotoren zur Expression des *mga5dh*-Gens

Promotor-bezeichnung	Organismus	Gen [Alias]	Größe [bp]
P_{mgdh_{gox}}	<i>G. oxydans</i> 621H	<i>mgdh</i> [GOX0265]	387
P_{tufB_{gox}}	<i>G. oxydans</i> 621H	<i>tufB</i> [GOX0382]	482
P_{tufB_{ecoli}}	<i>E. coli</i> DH5α	<i>tufB</i> [REC03870]	390

Das Plasmid pMM_ *mga5dh* wurde linearisiert und die Promotor-Fragmente jeweils mit diesem Vektor ligiert. Es wurden die folgenden Überexpressions-Vektoren erhalten (Abbildung 13):

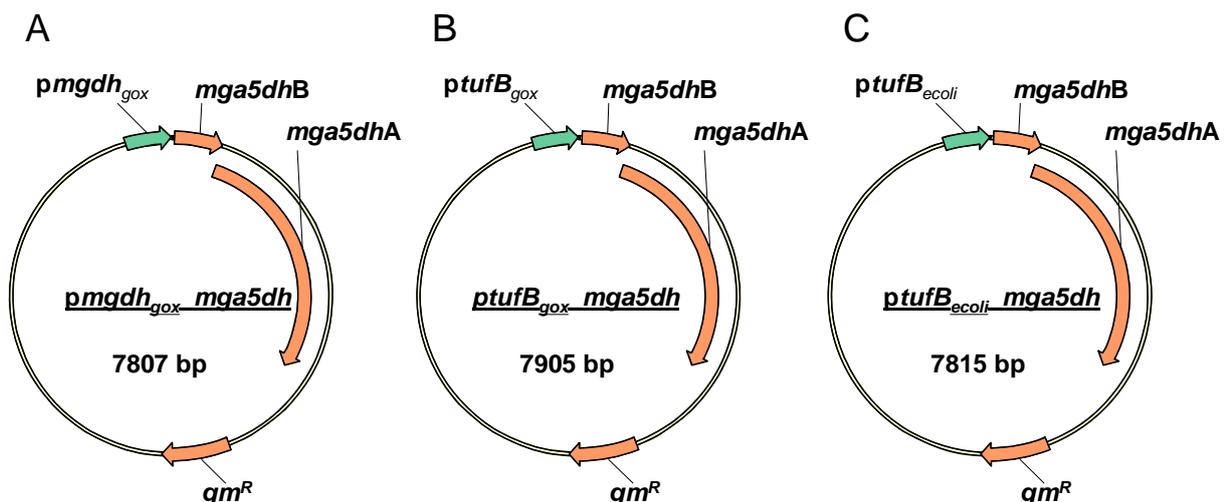


Abbildung 13, *mga5dh*-Promotor-Austauschkonstrukte

A) p_{mgdh_{gox}}-*mga5dh*, Promotor des *mgdh*-Gens der Glucose-Dehydrogenase aus *G. oxydans*; B) p_{tufB_{gox}}-*mga5dh*, Promotor des *tufB*-Gens des Elongationsfaktors EF-Tu aus *G. oxydans*; C) p_{tufB_{ecoli}}-*mga5dh*, analog zu B) nur stammt der Promotor aus *E. coli*.

Nach der Klonierung der *mga5dh*-Promotor-Austauschplasmide wurde *E. coli* JM109 mit diesen transformiert, aus den Gentamycin-resistenten Klonen die Plasmid-DNA isoliert und die Plasmide jeweils sequenziert. Anschließend wurde *G. oxydans* MF1 mit den erfolgreich erstellten Vektoren über Elektroporation transformiert. Die *mga5dh*-Überproduktionsstämme und *G. oxydans* MF1 pBBR1MCS5 als Kontrolle wurden kultiviert und jeweils die Membranfraktionen isoliert. Bei der Bestimmung der mGA5DH-Aktivität wurde neben Gluconat wurde auch Sorbit eingesetzt. Neben Gluconat (Shinagawa *et al.*, 1999) oxidiert die membrangebundene Gluconat-5-Dehydrogenase (Salusjärvi *et al.*, 2004) ebenso Sorbit (Shinagawa & Ameyama, 1982b), Arabitol (Adachi *et al.*, 2001), Glycerin (Matsushita *et al.*, 2003) und Mannit (Peterson *et al.*, 1956), weshalb dieses Enzym auch als Polyol-Dehydrogenase (Kerstens *et al.*, 1965; Shinjoh *et al.*, 2002b) bezeichnet wird. Sorbit konnte von der mGA5DH als Substrat bevorzugt umgesetzt werden und so eine höhere spezifische Aktivität gemessen werden (Sugisawa & Hoshino, 2002). Die spezifische mGA5DH-Aktivität der Membranfraktionen der unterschiedlichen Stämme wurde anhand der Zunahme des reduzierten DCIP pro Zeit aus der Steigung der Geraden errechnet (Tabelle 14).

Tabelle 14, Spezifische Aktivität der membrangebundenen Gluconat-5-Dehydrogenase in verschiedenen *G. oxydans* Stämmen

mGA5DH-Überproduktionsstamm	Aktivität [U/mg Protein]	
	Sorbit	Gluconat
<i>G. oxydans</i> MF1 pBBR1MCS5	1,54 ± 0,05	0,24 ± 0,01
<i>G. oxydans</i> MF1 <i>pmgdh_{gox}-mga5dh</i>	2,40 ± 0,12	0,43 ± 0,02
<i>G. oxydans</i> MF1 <i>ptufB_{gox}-mga5dh</i>	2,64 ± 0,02	0,59 ± 0,01
<i>G. oxydans</i> MF1 <i>ptufB_{ecoli}-mga5dh</i>	1,72 ± 0,03	0,27 ± 0,00

Wie aus Tabelle 14 zu ersehen ist, konnte durch den Austausch des natürlichen *mga5dh*-Promotors eine Steigerung der mGA5DH-Aktivität bei Oxidation von Gluconat und Sorbit erreicht werden. In *G. oxydans* MF1 *pmgdh_{gox}-mga5dh* konnte die spezifische Aktivität der membrangebundenen Gluconat-5-Dehydrogenase um 80 % bei

Oxidation von Gluconat und 56 % bei Oxidation von Sorbit gesteigert werden. In *G. oxydans* MF1 *ptufB_{gox}_mga5dh* wurde die höchste spezifische Aktivität gemessen, wobei sich die Oxidation von Gluconat um 146 % und die Oxidation von Sorbit um 71 % verbessern lies. Das Verwenden des *E. coli* *tufB*-Promotors resultierte in einer Steigerung der Gluconat-Oxidation um 13 % und der Sorbit-Oxidation um 12 % in *G. oxydans* *ptufB_{ecoli}_mga5dh*. Der *tufB*-Promotor aus *G. oxydans* DSM 2343 war somit für die homologe Gen-Expression besser geeignet, als das heterologe *tufB*-Promotor Analogon aus *E. coli*. Die in der Kontrolle gemessenen Aktivitäten bei Oxidation von Sorbit sind vergleichbar mit den spezifischen Aktivitäten, die in den Membranfraktionen von *G. suboxydans* IFO 3255 mit 1,94 U mg⁻¹ Protein (Hoshino *et al.*, 2003) und *G. suboxydans* IFO 3257 mit 1,64 U mg⁻¹ Protein (Matsushita *et al.*, 2003) bestimmt worden sind. Obwohl auch von Adachi *et al.* (2001) der *G. suboxydans* Stamm IFO 3257 untersucht worden ist, wurde mit 0,86 U mg⁻¹ Protein eine deutlich geringere spezifische mGA5DH-Aktivität bei Oxidation von Sorbit gemessen. Damit bestätigten sich die Beobachtungen, dass die Messung der spezifischen Enzymaktivität in *G. oxydans* stark von der Art der Dauer der Solubilisierung, dem Zusatz von Ca²⁺ oder dem eingesetzten Detergenz abhängig ist (Shinagawa *et al.*, 1999).

Die Messungen zeigten somit, dass durch den Austausch des nativen *mga5dh*-Promotors gegen einen konstitutiven Promotor (*tufB*), bzw. durch Glucose induzierbaren Promotor (*mgdh*), eine deutliche Steigerung der spezifischen mGA5DH-Aktivität erreicht werden konnte. Daher sollte nun die Fermentation von Glucose mit diesen mGA5DH-Überproduktionsstämmen untersucht werden.

5.2 Umsetzung von 550 mmol l⁻¹ Glucose mit wachsenden Zellen der *G. oxydans* *mga5dh*-Überproduzenten

Von den *G. oxydans* Stämmen MF1 pBBR1MCS5, pTB9014, MF1 *pgdh_{gox}_mga5dh* und MF1 *ptufB_{gox}_mga5dh* wurden Vorkulturen angezogen und Reaktionsgefäße mit einer optischen Zelldichte von jeweils 1,5 inokuliert. Als Substrat wurde 550 mmol l⁻¹ Glucose eingesetzt, die unter konstanten Bedingungen mit einem Sauerstoff- und CO₂-Partialdruck von 10 % bzw. 0,05 %, einer Begasungsrate von 10 l h⁻¹ und einem pH-Wert von 5,0 zu 5-KGA umgesetzt wurden. Es wurden in regelmäßigen Abständen

Proben entnommen, die Gluconat- und 5-KGA-Konzentrationen über HPLC-Analytik ermittelt (Abbildung 14) und die Bildungsrate und Ausbeuten errechnet (Tabelle 15).

Tabelle 15, Umsetzung von 550 mmol l⁻¹ Glucose mit mGA5DH-Überproduzenten

Die Produktionsraten wurden anhand der Änderung der Substratkonzentration pro Zeit und Gramm Trockengewicht errechnet, die maximalen Konzentrationen sind die Konzentrationen, die während des gesamten Versuchs maximal erreicht werden konnte. Die 5-KGA Ausbeute bezieht sich auf die eingesetzte Glucosekonzentration

<i>G. oxydans</i> Stamm	MF1 pBBR1MCS5	MF1 pTB9014
Gluconat-Produktionsrate [mmol l ⁻¹ h ⁻¹ g ⁻¹ TG]	35,9	36,9
5-KGA-Produktionsrate [mmol l ⁻¹ h ⁻¹ g ⁻¹ TG]	9,0	6,6
Maximale Gluconat-Konzentration [mmol l ⁻¹]	377	348
Maximale 5-KGA-Konzentration [mmol l ⁻¹]	137	246
5-KGA-Ausbeute, t=72h [%]	25	45
<i>G. oxydans</i> Stamm	MF1 p <i>mgdh</i> _{gox} - <i>mga5dh</i>	MF1 p <i>tufB</i> _{gox} - <i>mga5dh</i>
Gluconat-Produktionsrate [mmol l ⁻¹ h ⁻¹ g ⁻¹ TG]	28,1	29,6
5-KGA-Produktionsrate [mmol l ⁻¹ h ⁻¹ g ⁻¹ TG]	11,2	12,5
Maximale Gluconat-Konzentration [mmol l ⁻¹]	300	285
Maximale 5-KGA-Konzentration [mmol l ⁻¹]	283	280
5-KGA-Ausbeute, t=72h [%]	51	51

Durch den Austausch des natürlichen *mga5dh*-Promotors gegen die Promotoren *pmgdh*_{gox} und *ptufB*_{gox} konnte sowohl eine Steigerung der mGA5DH-Aktivität (Tabelle 14) als auch der Produktbildungsrate (Tabelle 15) um bis zu 30 % erzielt und die maximale 5-KGA-Konzentration im Vergleich zum Elternstamm *G. oxydans* MF1 pBBR1MCS5 nahezu verdoppelt werden. Der Stamm *G. oxydans* MF1 *ptufB*_{gox}-*mga5dh* mit dem unter der Kontrolle des *tufB*-Promotors konstitutiv exprimierten *mga5dh*-Gen, stellte sich dabei als derjenige mit den höchsten 5-KGA-Bildungsrate von 12,5 mmol l⁻¹ h⁻¹ g⁻¹ TG dar, so dass dieser Stamm als 5-KGA-Produktionsstamm bzw. für weitere Optimierungen zur 5-KGA-Bildung geeignet war.

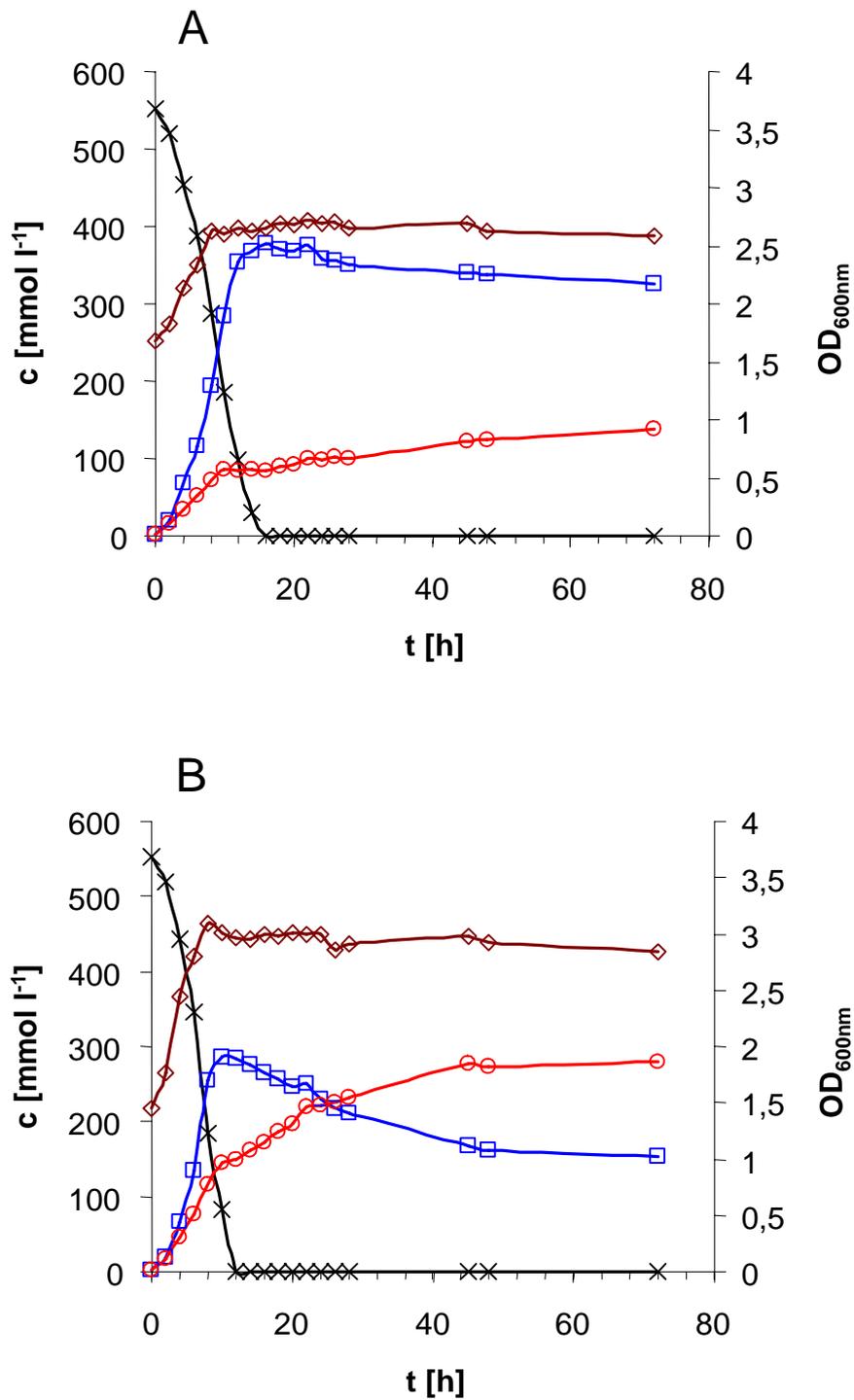


Abbildung 14, Umsetzung von 550 mmol l⁻¹ Glucose mit *G. oxydans* MF1 pBBR1MCS5 und MF1 *ptufBgox_mga5dh*

550 mmol l⁻¹ Glucose wurden durch A) *G. oxydans* MF1 pBBR1MCS5 als Kontrolle ohne Überexpression des *mga5dh*-Gens und B) *G. oxydans* MF1 *ptufBgox_mga5dh* über einen Zeitraum von 72 Stunden umgesetzt. Symbole und Farben: × Glucose [mmol l⁻¹]; □ Gluconat [mmol l⁻¹]; ○ 5-KGA [mmol l⁻¹], ◇ optische Dichte bei 600 nm

Vergleicht man die 5-KGA-Bildung der beiden *G. oxydans* Stämme MF1 pBBR1MCS5 und MF1 *ptufBgox_mga5dh* im zeitlichen Verlauf, so wird die maximale 5-KGA-Bildungsrate innerhalb der ersten 10 Stunden nach Beginn der Biotransformation von Glucose erreicht (Abbildung 14 A und B). In diesem Zeitraum befinden sich die Zellen im exponentiellen Wachstum. Bei Eintritt in die stationäre Wachstumsphase, d.h. 8 bis 10 Stunden nach Beginn der Glucose-Biotransformation, ist sowohl ein deutlicher Einbruch der 5-KGA-Bildung bei *G. oxydans* MF1 pBBR1MCS5, als auch bei *G. oxydans* MF1 *ptufBgox_mga5dh* zu erkennen. Die Gluconat-Bildung scheint dabei in beiden Stämmen Wachstumsphasen-unabhängig zu sein, was schon bei der Biotransformation von 550 mmol l⁻¹ Glucose mit *G. oxydans* DSM 2343 und *G. oxydans* MF1 in Kapitel 4.1 beobachtet werden konnte. Wies die *G. oxydans* Kontrolle MF1 pBBR1MCS5 während der exponentiellen Wachstumsphase noch eine 5-KGA-Bildungsrate von ca. 9 mmol l⁻¹ h⁻¹ g⁻¹ TG auf, so verringerte sich diese Rate in der stationären Phase um 90 % auf ca. 0,9 mmol l⁻¹ h⁻¹ g⁻¹ TG (Abbildung 14 A). 72 Stunden nach Beginn der Biotransformation wurden durch den Kontrollstamm *G. oxydans* MF1 pBBR1MCS5 137 mmol l⁻¹ 5-KGA mit einer Ausbeute von 25 % gebildet. Der *G. oxydans* Stamm MF1 *ptufBgox_mga5dh*, bei dem die Expression des *mga5dh*-Gens unter der Kontrolle des *tufB*-Promotors steht, zeigte im Vergleich zur Kontrolle *G. oxydans* MF1 pBBR1MCS5 ebenfalls einen Einbruch in der 5-KGA-Bildungsrate bei Eintritt in die stationäre Wachstumsphase (Abbildung 14 B). Im Gegensatz zur *G. oxydans* Kontrolle MF1 pBBR1MCS5 wurde die 5-KGA-Bildung aber nicht um 90 %, sondern nur um ca. 50 % von 12,5 auf 5,7 mmol l⁻¹ h⁻¹ g⁻¹ TG verringert. Die 5-KGA-Konzentration nahm stetig zu, so dass 72 Stunden nach Beginn der Biotransformation von 550 mmol l⁻¹ Glucose 280 mmol l⁻¹ 5-KGA mit einer Ausbeute von 51 % gebildet wurden. In beiden Fällen lagen am Ende der Umsetzung von 550 mmol l⁻¹ Glucose noch 325 mmol l⁻¹ Gluconat bei *G. oxydans* MF1 pBBR1MCS5 und 153 mmol l⁻¹ Gluconat bei *G. oxydans* MF1 *ptufBgox_mga5dh* vor, welches nicht weiter zu 5-KGA umgesetzt wurde.

Da die 5-KGA-Bildung hauptsächlich während des Wachstums von *G. oxydans* stattfand, wäre eine Umsetzung von Glucose unter kontinuierlichen Bedingungen die wahrscheinlich optimale Voraussetzung für eine weitere Steigerung der 5-KGA-Produktivität. In diesem Fall müssten die *G. oxydans* Zellen permanent im Stadium der

exponentiellen Wachstumsphase kultiviert werden, was durch kontinuierliche Verdünnung des Mediums und dem Verwerfen von überschüssigem Zellmaterial realisiert werden könnte.

5.3 Disruption des chromosomalen *mga5dh*-Gens

Die Überexpression des *gno*-Gens der cytosolischen Gluconat:NADP⁺ 5-Oxidoreduktase auf der einen Seite, und die Überexpression des *mga5dh*-Gens der membrangebundenen Gluconat-5-Dehydrogenase auf der anderen Seite führten zu einer Steigerung der 5-KGA-Konzentration in *G. oxydans*. Um den relativen Anteil dieser beiden Enzyme an der 5-KGA-Bildung bestimmen zu können, sollte das membrangebundenen mGA5DH-Enzym durch Insertion einer Antibiotikumresistenzgen-Kassette in das chromosomale *mga5dh*-Gen inaktiviert werden. Die Inaktivierung des *mga5dh*-Gens sollte dabei durch einen die Insertion tragenden Vektor über doppelt homologe Rekombination in die genomischen Region des *mga5dh*-Gens erfolgen. Der Cluster des *mga5dh*-Gens (Abbildung 15), welcher aus den Genen *mga5dhA* und *mga5dhB* besteht (Shinjoh *et al.*, 2002b; Hoshino *et al.*, 2003; Salusjärvi *et al.*, 2004), wurde dazu aus dem Genom von *G. oxydans* DSM 2343 amplifiziert und in den Vektor pUC18 ligiert.

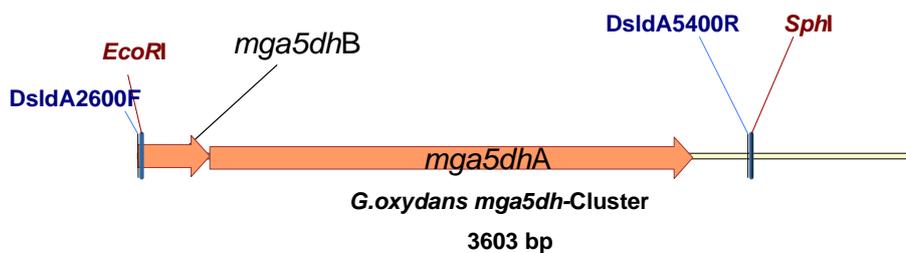


Abbildung 15, *G. oxydans mga5dh*-Cluster

Abkürzungen: *DsldA2600F*, *DsldA5400R*: Vorwärts- und Rückwärts-Primer zu Amplifikation des *mga5dh*-Clusters; *mga5dhA* und *mga5dhB*: Offene Leserahmen A und B des *mga5dh*-Clusters; *EcoRI* und *SphI*: Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme

Der resultierende Vektor wurde pUC18/*mga5dh* genannt. Für die Insertion einer Tetracyclinresistenz-Kassette (*tet^R*) wurde die *tet^R*-Sequenz durch Amplifikation aus

dem Vektor pACYC184 erhalten, mit dem Plasmid pUC18/*mga5dh* ligiert und das Konstrukt pUC18/*mga5dh::tet^R* genannt (Abbildung 16).

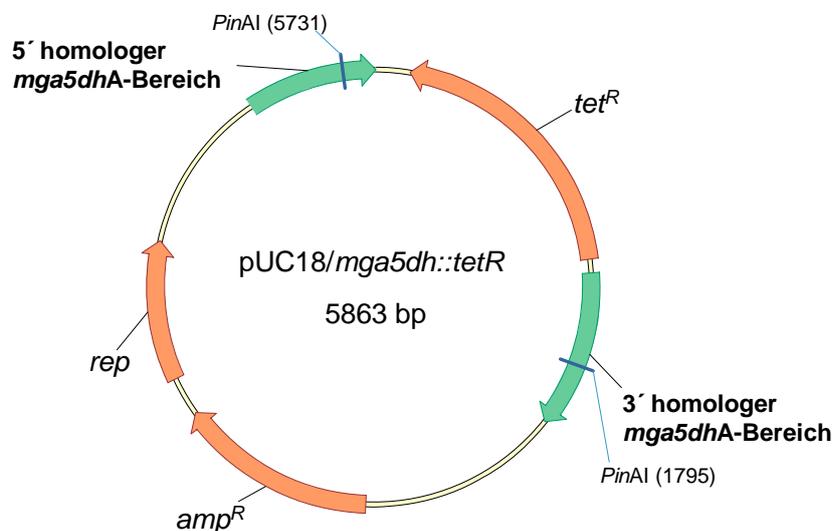


Abbildung 16, Plasmid pUC18/*mga5dh::tet^R*

Abkürzungen: *tet^R*, Tetracyclinresistenzgen; *amp^R*, Ampicillinresistenzgen; *rep*, Plasmid-Replikations Protein. *PinAI*, Erkennungssequenz des Restriktionsenzym *PinAI*

G. oxydans DSM 2343 wurde mit dem Plasmid pUC18/*mga5dh::tet^R* transformiert und die Klone durch Selektion auf Tetracyclin erhalten. Das Verwenden von Tetracyclin erwies sich jedoch als nicht optimal, da nach einigen Tagen reproduzierbar auch die Plasmid-freien *G. oxydans* Kontrollen auf den mit Tetracyclin supplementierten Agar-Platten wuchsen und somit ein effizientes Screening der Mutanten nicht möglich war.

Tetracyclin wirkt in Gram-negativen Bakterien bakteriostatisch, indem es an die 30S-Untereinheit des Ribosoms bindet und so die Translation behindert (Buck & Cooperman, 1990). Dabei ist die Bindung reversibel, weshalb Tetracyclin bakteriostatisch und nicht bakteriozid wirkt (Chopra *et al.*, 1992). Die Resistenz gegen Tetracyclin beruht auf der Expression von Tetracyclin-Transportern, die das Antibiotikum aus dem Cytosol entfernen (Levy, 2002). Eine Datenbankrecherche des *G. oxydans* DSM 2343 Genoms ergab, dass dieser Stamm Gene für mehrere Multi-Drug Resistance Proteine aufweist, von denen einige die Funktion von Efflux-Proteinen

bzw. Permeasen oder ABC-Transportern haben. Ein Austransport von Tetracyclin durch diese Proteine bzw. ein Zerfall von Tetracyclin unter den gewählten Inkubationsbedingungen kann daher als Grund für das Wachstum der Kontrollen angenommen werden. Da die Verwendung des bakteriostatisch wirkenden Tetracyclins nicht zu einer eindeutigen Selektion der positiven Klone führte, sollte das Konstrukt zur Disruption des *mga5dh*-Gens umkloniert werden. Die verwendete Sequenz des Tetracyclin-Gens wurde durch Restriktion des Vektors pUC18/*mga5dh::tetR* entfernt und die Gene *strA* und *strB*, die für eine Streptomycin-Resistenz (Streptomycin-Kinase) kodieren, aus dem Plasmid pRS201/*gno* (Anhang, Abbildung 21) kloniert. Das Plasmid pUC18/*mga5dh::tetR* ohne die Tetracyclin-Sequenz wurde anschließend mit dem *strAB*-Cluster ligiert und pUC18/*mga5dh::strAB* genannt (Abbildung 17). *G. oxydans* DSM 2343 wurde mit pUC18/*mga5dh::strAB* transformiert und Klone durch Wachstum auf Streptomycin-haltigen Platten selektiert. Die Elektroporation lieferte allerdings nur eine sehr geringe Anzahl an Kolonien (10^0 bis $10^1 \mu\text{g}^{-1}$ DNA), wobei sich diese nach Überprüfung mittels PCR als einfach-Rekombinanten herausstellten. Ein doppelt homologes Rekombinationsereignis konnte nicht festgestellt werden. Als alternatives Deletionssystem sollte daher das bei *Corynebacterium glutamicum* erfolgreich etablierte *sacB*-System (Schäfer *et al.*, 1994) benutzt werden.

Der Vektor pk19*mobsacB* wird bei *Corynebacterium glutamicum* für die „in-frame“-Deletion von Genen benutzt. Dieser trägt dabei terminale, homologe Bereiche des Ziel-Gens, sowie ein Kanamycinresistenzgen. Der Zielorganismus wird mit dem Vektorkonstrukt transformiert. Zellen, bei denen der Vektor über homologe Rekombination in das Genom integriert ist, sind Kanamycin-resistent und können in Anwesenheit von Kanamycin wachsen. Die Besonderheit des *sacB*-Systems liegt in der Expression des auf dem Plasmid zusätzlich befindlichen *sacB*-Gens. Dieses kodiert für eine cytosolische Levansucrase, ein Enzym, welches intrazellulär die Polymerisation von Saccharose mit D-Glucose zu Levan katalysiert und so das Wachstum stark beeinträchtigt, und schließlich zum Tod der Zellen führt (Schäfer *et al.*, 1994) (Anhang, Abbildung 25). Nach dem ersten Rekombinationsereignis werden die erhaltenen Klone auf Saccharose-Platten ausgestrichen und nur die Klone, bei denen die zweite Rekombination stattgefunden hat, können, aufgrund des Verlustes des Vektors und somit des *sacB*-Gens, weiter wachsen. Die Klone, bei denen der Vektor nicht durch

Rekombination aus dem Genom entfernt wird, bilden durch die Levansucrase Levan. Auf diese Weise wird die zweite homologe Rekombination erzwungen, und der Restvektor aus dem Genom entfernt (Schäfer *et al.*, 1994) (Anhang, Abbildung 26).

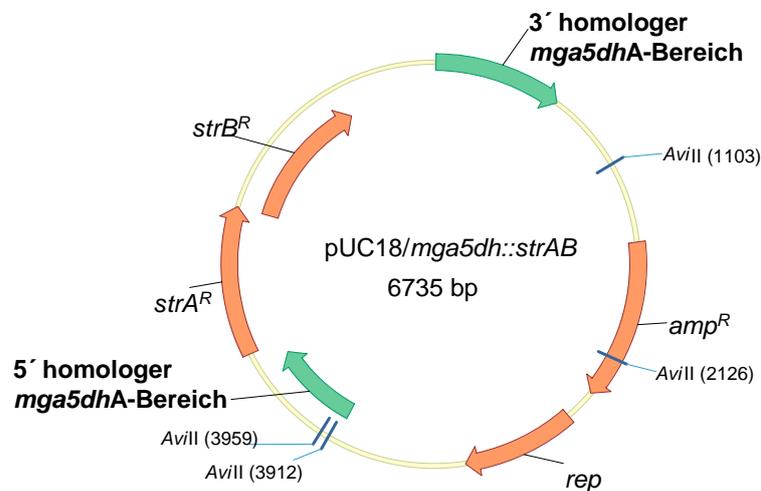


Abbildung 17, pUC18/mga5dh::strAB

Abkürzungen: *strA^R*, *strB^R* Gene für Streptomycinresistenz; *amp^R*, Gen für eine Ampicillinresistenz; *rep*, Plasmid-Replikations Protein

Für die Konstruktion eines pk19*mobsacB*-basierenden Deletionsvektors wurde das Plasmid pUC18/mga5dh::strAB (Abbildung 17) mit *AvII* geschnitten, das Plasmid pk19*mobsacB* mit *SmaI* geschnitten und anschließend dephosphoryliert. Der homologe Bereich mit dem integrierten *strAB*-Cluster (Anhang, Abbildung 27) wurde daraufhin mit pk19*mobsacB* ligiert und das fertige Konstrukt pk19*mobsacB*/mga5dh::strAB genannt (Abbildung 18). *G. oxydans* MF1 wurden mit dem Helferstamm *E. coli* HB101, und dem Donorstamm, *E. coli* pk19*mobsacB*/mga5dh::strAB über Konjugation transformiert. Nach ca. 16 stündigem Wachstum der drei Stämme, wurden diese abgeschwemmt und auf Streptomycin-haltigen Platten kultiviert. Die erhaltenen *G. oxydans* Klone wurden anschließend auf Saccharose-Platten kultiviert und mittels PCR hinsichtlich der Insertion des *strAB*-Clusters in das *mga5dh*-Zielgen untersucht (Anhang, Abbildung 27). Für den Nachweis der Integration des *strAB*-Operons in das *mga5dh*-Operon wurden PCR-Reaktionen mit dem Vorwärts-Primer p_sldh_Gox_for und dem Rückwärtsprimer strA-primer1 durchgeführt (Abbildung 19).

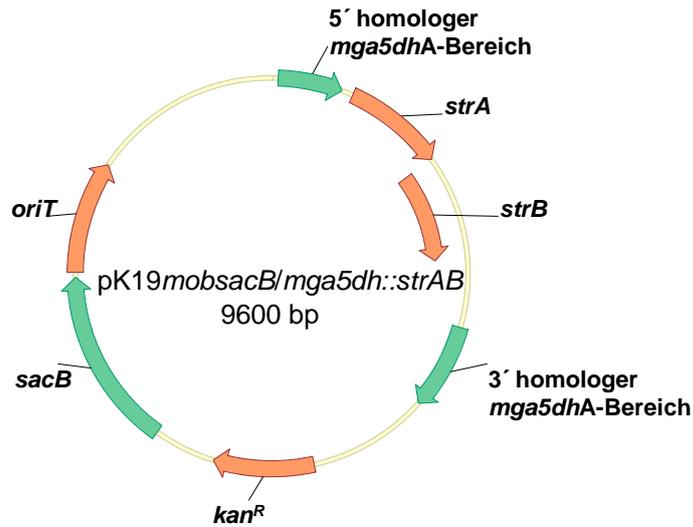


Abbildung 18, Plasmid pK19mobsacB/*mga5dh::strAB*

Abkürzungen: *strA^R*, *strB^R* Gene für Streptomycinresistenz; *kan^R*, Gen für eine Kanamycinresistenz; *oriT*, „Origin of transfer“, Region, an denen die Konjugationsproteine den Plasmidtransfer einleiten; *sacB*, Gen für eine Levansucrase

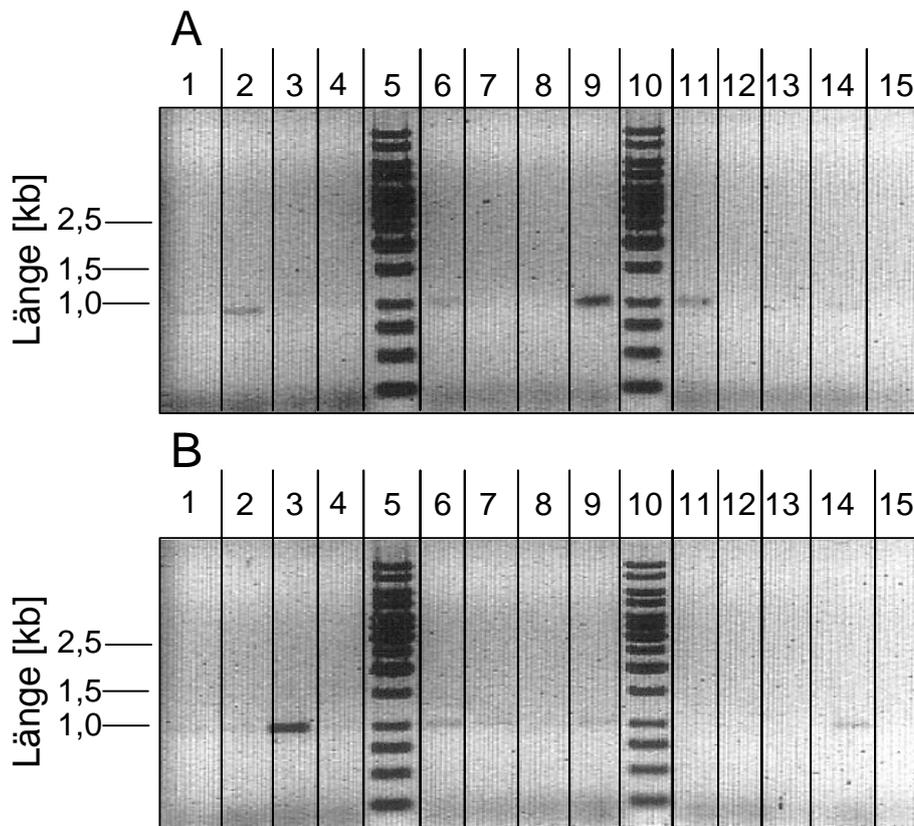


Abbildung 19, PCR zum Nachweis der Deletion des chromosomalen *mga5dh*-Gens

Abkürzungen: A) 1 bis 14 und B) 1 bis 14, getestete *G. oxydans* MF1 Klone. 15 A) und 15 B), Kontrolle, *G. oxydans* DSM 2343

Die PCR-Amplifikate für die Integration der *strAB*-Gensequenz in das *mga5dh*-Gen hatten eine erwartete Länge von 1106 bp (Abbildung 19). In insgesamt 11 *G. oxydans* MF1 Klonen konnte anhand des amplifizierten PCR-Fragments eine Insertion der *strAB*-Gensequenz in das genomische *mga5dh*-Gen nachgewiesen werden. Die Kontrolle *G. oxydans* DSM 2343 zeigte kein Signal unter den gleichen Bedingungen. Eine Inaktivierung des *mga5dh*-Gens durch Insertion einer Streptomycin-Kassette war somit durch den Einsatz des *pk19mobsacB*-Systems über doppelt homologe Rekombination erreicht worden. Die resultierenden *G. oxydans* MF1 Mutanten wurden daraufhin hinsichtlich der 5-KGA Bildung bei Umsatz von Glucose und Gluconat untersucht. Zur Überprüfung der Inaktivierung des mGA5DH-Proteins durch Insertion des *strAB*-Clusters in das chromosomale *mga5dh*-Gen wurden *G. oxydans* MF1 *mga5dh::strAB* Klone und der Elternstamm MF1 als Kontrolle in 6 ml Vollmedium mit 200 µg ml⁻¹ Streptomycin und jeweils 100 mmol l⁻¹ Glucose/Gluconat als Substrat über einen Zeitraum von 48 h kultiviert. Nach 24 und 48 Stunden wurden Proben entnommen und die Gluconat- und 5-KGA-Konzentration bestimmt (Tabelle 16).

Tabelle 16, Umsetzung von 100 mmol l⁻¹ Glucose/Gluconat mit *G. oxydans* MF1 und *G. oxydans* MF1 *mga5dh::strAB*

Die Proben für die HPLC-Analytik wurden jeweils nach 24 und 48 h entnommen und die 5-KGA- und Gluconat-Konzentrationen bestimmt.

<i>G. oxydans</i> Stamm	MF1	MF1 <i>mga5dh::strAB</i>
Gluconat [mmol l ⁻¹] t = 24 h	98,6	127,2
Gluconat [mmol l ⁻¹] t = 48 h	82,9	114,6
5-KGA [mmol l ⁻¹] t = 24 h	45,0	7,1
5-KGA [mmol l ⁻¹] t = 48 h	71,3	14,2

Vergleicht man die maximalen 5-KGA-Konzentrationen von *G. oxydans* MF1 und MF1 *mga5dh::strAB* nach 48 h, so wurde durch die Inaktivierung des *mga5dh*-Gens die 5-KGA-Konzentration in MF1 *mga5dh::strAB* um ca. 80 % verringert. Die geringen 5-KGA-Konzentrationen, die trotz Inaktivierung des *mga5dh*-Gens am Ende des

Experiments vorlagen, wurden sehr wahrscheinlich durch die cytosolische Gluconat:NADP⁺ 5-Oxidoreduktase (GNO) gebildet, welche in *G. oxydans* MF1 *mga5dh::strAB* weiterhin aktiv war. Durch die Insertion einer Streptomycin-Kassette in das chromosomale *mga5dh*-Gen von *G. oxydans* MF1 konnte die Inaktivierung der membrangebundenen mGA5DH erreicht, und die 5-KGA Produktion um 80 % im Vergleich zum *G. oxydans* Elternstamm MF1 verringert werden. Folglich wurde nachgewiesen, dass die membrangebundene mGA5DH in *G. oxydans* MF1 unter den gewählten Bedingungen hauptsächlich für die Bildung von 5-KGA verantwortlich ist.

Diskussion

Weinsäure wird in der Lebensmittel- und Pharmaindustrie eingesetzt und herkömmlich über ein aufwendiges chemisch/physikalisches Verfahren aus dem bei der Weinkelterei anfallenden Weinstein gewonnen (Hungerbühler & Seebach, 1981; Haberstroh & Hustede, 1983; Palma & Barroso, 2002). Das Essigsäurebakterium *Gluconobacter oxydans* besitzt Oxidoreduktasen und Dehydrogenasen, mit denen Glucose regiospezifisch zu der Zuckersäure 5-Keto-D-Gluconsäure (5-KGA) oxidiert werden kann (Shinagawa *et al.*, 1983; De Ley *et al.*, 1984; Adachi *et al.*, 2001). 5-KGA kann dabei als Vorläufermolekül chemisch-katalytisch in Weinsäure und Oxalsäure gespalten werden (Kheshgi *et al.*, 1954; Matzerath *et al.*, 1995). Ziel dieser Arbeit war es, einen *Gluconobacter* Stamm zu entwickeln, der 5-KGA mit hohen Ausbeuten und gesteigerten Bildungsraten aus dem Substrat Glucose produziert und in dem die Bildung von Nebenprodukten ausgeschaltet ist. Die 5-KGA-Bildung mit einem derartig modifizierten *G. oxydans* Stamm, in Kombination mit einer anschließenden chemischen Katalyse, stellt eine Alternative zur herkömmlichen chemischen Weinsäuregewinnung dar.

Auswahl eines geeigneten 5-KGA Produktionsstammes

Zu Beginn der Arbeit wurden die vorhandenen *G. oxydans* Stämme bezüglich der Produktspektren bei Oxidation von Glucose untersucht und dabei besonders hinsichtlich der Bildung von 5-KGA verglichen. Grundsätzlich wurde festgestellt, dass jedem *G. oxydans* Stamm ein unterschiedliches Produktspektrum und unterschiedliche Produktbildungsraten zugeordnet werden können, so dass die *G. oxydans* Stämme DSM 2343, DSM 3503 und DSM 3504 aus dem Substrat Glucose unterschiedliche Mengen der möglichen Oxidationsprodukte Gluconat, 2-KGA, 5-KGA und 2,5-DKGA bildeten (Weenk *et al.*, 1984). Die Variationen der Produkte und Bildungsraten innerhalb der *Gluconobacter* Gattung sind dabei auf die Vielzahl der verschiedenen Enzyme und deren Aktivitäten zurückzuführen, die sich von Stamm zu Stamm unterscheiden (Weenk *et al.*, 1984). Da zu Beginn der Arbeit *G. oxydans* DSM 2343 der einzige Stamm war, dessen vollständige Genomsequenz vorlag, war ein Vergleich mit anderen Stämmen auf Genomebene nicht möglich (Prust *et al.*, 2005). Der *G. oxydans* Stamm DSM 2343

bildete im Vergleich die höchsten 5-KGA-Konzentrationen bei Biotransformation von Glucose und wurde daher als Ausgangsstamm für die Verbesserung der 5-KGA-Bildung ausgewählt.

Weenk *et al.* (1984) untersuchten 11 unterschiedliche *G. oxydans* Stämme mit Schwerpunkt auf der Keto-Gluconat-Bildung und zeigten, dass *G. oxydans* DSM 2343 hauptsächlich 5-KGA bildet, während die Experimente mit *G. oxydans* DSM 3503, die diesen Stamm als Gluconat-Produzenten kennzeichnen, durch die Arbeiten von Silberbach *et al.* (2003) bestätigt werden konnten. Im Gegensatz zu *G. oxydans* DSM 2343 und DSM 3503 besitzt *G. oxydans* DSM 3504 ein zusätzliches Enzym, wodurch 2,5-di-Keto-Gluconat (2,5-DKGA) als Hauptprodukt gebildet wurde (Pujol & Kado, 2000). Diese Ergebnisse stimmen nicht mit den Daten von Beschkov *et al.* (1995) überein, die den *G. oxydans* Stamm NBIMCC 1043, einen *G. oxydans* DSM 3504 - ähnlicher Stamm, als besten 5-KGA Produzenten beschrieben. Die dort erzielte 5-KGA Ausbeute von 70 % wurde dabei mit einem pH-Wert von 3,5 und einer Temperatur von 28 °C erreicht. Dies ist erstaunlich, da für die 5-KGA-Bildung gemäß Weenk *et al.* (1984) ein pH-Wert zwischen 5,0 und 6,0 optimal ist und unterhalb von pH 4,0 keine Keto-Gluconate mehr gebildet werden. In den Arbeiten von Silberbach *et al.* (2003) konnte zudem gezeigt werden, dass der *G. oxydans* Stamm NBIMCC 1043 (Beschkov *et al.*, 1995) hauptsächlich 2,5-di-Keto-Gluconat und nur zu ca. 10 % 5-KGA bildet. Daher sind sowohl die Angaben zur 5-KGA Menge als auch zur Ausbeute in den Arbeiten von Beschkov *et al.* (1995) vermutlich falsch und *G. oxydans* NIBMCC 1043, anders als beschrieben, eher zur 2,5-DKGA- und nicht zur 5-KGA-Bildung geeignet.

Produktion von 5-KGA mit cytosolischen Enzymen

Schon 1964 wurde erkannt, dass 5-KGA in *Gluconobacter oxydans*, bzw. *Acetobacter suboxydans*, sowohl durch cytosolische, NADP⁺-abhängige Enzyme, als auch durch membrangebundene, PQQ-abhängige Enzyme gebildet werden kann (Galante *et al.*, 1964). Ein aus *G. oxydans* IFO 12528 isoliertes, cytosolisches Enzym wurde als 5-KGA Reduktase (c5KGR) beschrieben und zeigte bei Verwendung des Cofaktors NADP⁺ bzw. NADPH neben Gluconat-oxidierenden auch 5-KGA-reduzierende Eigenschaften (Adachi *et al.*, 1979b; Ameyama & Adachi, 1982). Klasen *et al.* (1995) isolierten und

charakterisierten eine Gluconat:NADP⁺ 5-Oxidoreduktase (GNO) aus *G. oxydans* DSM 3503, die vergleichbare Reaktionen mit Gluconat und 5-KGA aufwies, wie das beschriebene Enzym aus den Arbeiten von Ameyama und Adachi (1982). Das GNO-Protein wurde als eine so genannte „Short-Chain“ Dehydrogenase identifiziert und das entsprechende Gen mit Hilfe des Plasmids pRS201P/*gno* in *G. oxydans* DSM 3503 überexprimiert (Klasen *et al.*, 1995). Durch die Überexpression des *gno*-Gens konnte mit *G. oxydans* DSM 3503 eine 85-fache Erhöhung der *in vitro* Gluconat-5-Dehydrogenase Aktivität erzielt werden (Klasen *et al.*, 1995). Die Verwendung des *gno*-Überexpressionsplasmids pRS201P/*gno* von Klasen *et al.* (1995) führte im Rahmen der vorliegenden Arbeit in *G. oxydans* DSM 2343 ebenso zu einer Überproduktion des cytosolischen GNO-Proteins, jedoch nur zu einer 25-fachen Erhöhung der spezifischen Enzymaktivität. Dabei sind die Unterschiede in den gemessenen GNO-Aktivitäten zwischen der Arbeit von Klasen *et al.* (1995) und der vorliegenden Arbeit vermutlich auf die verschiedenen *G. oxydans* Stammhintergründe zurückzuführen; Klasen *et al.* (1995) verwendete zur Überproduktion der GNO den *G. oxydans* Stamm DSM 3503.

Der GNO-Überproduzent *G. oxydans* DSM 2343 pRS201P/*gno* zeigte bei der Biotransformation von Glucose, im Vergleich zum Elternstamm *G. oxydans* DSM 2343, eine verringerte 5-KGA Bildung und eine erhöhte Gluconat-Konzentration. In den Arbeiten von Klasen *et al.* (1995) führte die Umsetzung von Glucose mit dem GNO-Überproduktionsstamm *G. oxydans* DSM 3503 pRS201P/*gno* ebenfalls zu keiner signifikanten Erhöhung der 5-KGA-Konzentration. Eine Überprüfung des NADP-Nukleotidpools ergab hingegen, dass die Konzentration von NADP⁺ in *G. oxydans* DSM 3503 pRS201P/*gno* stark verringert und die Konzentration von reduziertem NADPH dementsprechend stark erhöht war. Da das von Klasen *et al.* (1995) überproduzierte GNO-Protein die Funktion einer cytosolischen 5-KGA/Gluconat-Oxidoreduktase hat, waren sowohl die Oxidation von Gluconat mit NADP⁺, als auch die Reduktion von 5-KGA mit NADPH möglich (Klasen, 1995). Eine Konzentrationserhöhung des Cofaktors NADPH, wie sie von Klasen *et al.* (1995) beobachtet wurde, führte daher bei der Umsetzung von Glucose möglicherweise zur einer Verschiebung des Reaktionsgleichgewichtes auf die Seite der 5-KGA Reduktion, und damit zu einer Zunahme der Gluconat-Konzentration. Zusätzlich zur cytosolischen GNO hat *G. oxydans* DSM 2343 eine cytosolische Glucose-Dehydrogenase (cGDH) welche

Glucose ebenfalls unter Verwendung des Cofaktors NADP^+ zu Gluconat reduziert und damit das Redox-Gleichgewicht weiter auf die Seite des NADPH verschiebt (Adachi *et al.*, 1980; Pronk *et al.*, 1989). Die Erhöhung des NADPH -Pools führte somit sowohl in *G. oxydans* DSM 2343 pRS201P/*gno* als auch *G. oxydans* DSM 3503 pRS201P/*gno* zu keiner Verbesserung der 5-KGA-Produktivität (Okamoto, 1963b; Okamoto, 1963a). Aus diesem Grund sollte durch die Expression des Gens einer cytosolischen Transhydrogenase (UDHA) aus *E. coli* in dem *gno*-Expressionsstamm *G. oxydans* DSM 2343 pRS201P/*gno* der Hydridtransfer von NADPH zu NAD^+ erreicht werden und somit das Reaktionsgleichgewicht wieder auf die Seite der 5-KGA Bildung verschoben werden (Boonstra *et al.*, 1999; Sauer *et al.*, 2004). Diese Methode der Cofaktorregenerierung wurde bereits bei der Bildung des semisynthetischen Opiats Hydromorphon zur Produktivitätssteigerung angewendet (Boonstra *et al.*, 2000). In der vorliegenden Arbeit verlief die Umsetzung von Glucose mit *G. oxydans* DSM 2343 pRS201P/*gno/udha*, in dem das *udhA*-Gen der cytosolischen Transhydrogenase coexprimiert wurde, verstärkt in Richtung der 5-KGA-Bildung. Klasen *et al.* (1995) versuchten während ihrer Arbeiten eine Reoxidation des NADPH -Pools durch die Expression einer NADPH -Oxidase, OYE (old yellow enzyme) aus *S. carlsbergensis* zu erreichen. In Experimenten zur Umsetzung von Glucose mit dem auf diese Weise modifizierten *G. oxydans* Stamm konnte jedoch kein Effekt auf die NADP^+ -Regeneration und damit auf die 5-KGA-Produktivität nachgewiesen werden, vermutlich wegen der zu geringen Aktivität von OYE (Klasen, 1995). Das Prinzip der NADP^+ -Cofaktorregenerierung durch eine zusätzlich eingeführte heterologe Transhydrogenase konnte in dieser Arbeit erfolgreich zur 5-KGA-Bildung in *G. oxydans* eingesetzt werden.

Inaktivierung der membrangebundenen Gluconat-2-Dehydrogenase, mGA2DH

Die Umsetzungen von Glucose mit *G. oxydans* DSM 2343 haben gezeigt, dass dieser Organismus 2-KGA, 5-KGA und Gluconat als Oxidationsprodukte bildet. Um eine möglichst hohe 5-KGA-Ausbeute und Produktivität zu erzielen wurde das Gen der membrangebundenen, FAD-abhängigen Gluconat-2-Dehydrogenase (mGA2DH) durch Insertion einer Kanamycin-Kassette inaktiviert (Shinagawa & Ameyama, 1982a; Elfari *et al.*, 2005). Die so konstruierte Mutante *G. oxydans* MF1 zeigte keine Bildung des unerwünschten Produktes 2-KGA und wies zudem im Vergleich zum Wildstamm eine

erhöhte 5-KGA-Produktivität und eine 5-KGA-Ausbeute bis zu ca. 95 % auf. Durch Tn5-Transposon Mutagenese wurde in *G. oxydans* ATCC 9937 das *ribF*-Gen inaktiviert, und führte in der entsprechende Mutante zur einer Verringerung der 2-KGA-bildenden Aktivität um 77 % (Gupta *et al.*, 1999). Das *ribF*-Gen kodiert für ein Protein, welches den Cofaktor FAD bildet (Mack *et al.*, 1998). Da FAD in der membrangebundenen Gluconat-2-Dehydrogenase kovalent gebunden und essentiell für die Oxidation von Gluconat zu 2-KGA ist, konnte auf diese Weise die 2-KGA-Bildung ebenfalls verringert werden (Gupta *et al.*, 1999). Matsushita *et al.* (2003) deletierten das Gen einer Glycerin-Dehydrogenase in *G. oxydans* IFO 3257 und zeigten, dass die 5-KGA-Bildung in der resultierenden Mutante ausblieb. Zusätzlich war in dieser Mutante die 2-KGA-Produktivität erhöht, die Aktivität der membrangebundenen Glucose-Dehydrogenase jedoch verringert (Matsushita *et al.*, 2003). Als Erklärung für die höheren 2-KGA-Ausbeuten nahmen sie an, dass sowohl die im Periplasma befindliche membrangebundene Gluconat-2-Dehydrogenase, als auch die Glycerin-Dehydrogenase (Gluconat-5-Dehydrogenase) um das Substrat Gluconat konkurrieren, und dass bei Ausschaltung eines der beiden Enzyme, das andere Gluconat ungehindert umsetzen kann (Matsushita *et al.*, 2003). Ein Grund für die um ca. 30 % herabgesetzte spezifische Aktivität der membrangebundenen Glucose-Dehydrogenase (mGDH) in der Mutante, wurde jedoch nicht formuliert. Gupta *et al.* (1997) deletierten das mGDH-Gen in *G. oxydans* ATCC 9937 und beobachteten in der Mutante, dass sich die spezifischen Aktivitäten der membrangebundenen Enzyme Gluconat-2-Dehydrogenase und 2-Keto-Gluconat-Dehydrogenase verdoppelten, bzw. verfünffachten. Sie erklärten die Zunahme der spezifischen Aktivität beider Enzyme mit dem Einfluss polarer Effekte, verursacht durch die Methode der Transposon-Mutagenese. Dadurch sollte die Regulation der Expression beider Gene aufgehoben und somit die entsprechenden Proteine verstärkt gebildet worden sein (Gupta *et al.*, 1997). Es erscheint sehr unwahrscheinlich, dass durch die Transposon-Mutagenese des *mgdh*-Gens genau diese beiden Gene anderer membrangebundener Dehydrogenasen dereguliert wurden. Vielmehr ist anzunehmen, dass sich sowohl in der Mutante von Matsushita *et al.* (2003), als auch in der von Gupta *et al.* (1997) die Zusammensetzung der Proteine geändert hat, welche in der Periplasmamembran verankert sind. Durch die Mutation, und den damit bedingten Wegfall eines Membranproteins, verringerte sich die Gesamtprotein Konzentration der Membranen und führte damit zu einer Erhöhung der spezifischen Aktivitäten der

verbleibenden Proteine. Der Wegfall des konkurrierenden mGA2DH-Enzyms war daher auch für die Zunahme der 5-KGA Produktivität und Ausbeute in *G. oxydans* MF1 im Vergleich zum Elternstamm *G. oxydans* DSM 2343 verantwortlich.

Inaktivierung der membrangebundenen Gluconat-5-Dehydrogenase, mGA5DH

Es wurde postuliert, dass die cytosolische GNO hauptsächlich für die Bildung von 5-KGA in *G. oxydans* DSM 3503 verantwortlich ist (Klasen 1995). Shinagawa *et al.* (1999) bezweifelten diese Vermutung und gaben an, dass in *G. oxydans* IFO 12528 ein membrangebundenes, PQQ-abhängiges Enzym die Oxidation von Gluconat zu 5-KGA katalysiert (Hoshino *et al.*, 2003; Matsushita *et al.*, 2003; Salusjärvi *et al.*, 2004). Wegen dieser Unklarheit sollte die Frage der Lokalisation der 5-KGA-Bildung im Rahmen dieser Arbeit für *G. oxydans* DSM 2343 geklärt werden. Dazu wurde das *mga5dh*-Gen der membrangebundenen Gluconat-5-Dehydrogenase in *G. oxydans* DSM 2343 durch Insertion einer Streptomycinkassette inaktiviert. Die resultierende Mutante zeigte eine um 80 % verringerte 5-KGA-Bildung, wobei die Restaktivität von 20 % auf das Vorhandensein des cytosolischen GNO-Proteins zurückgeführt werden kann. Dieses Ergebnis zeigte die Dominanz der mGA5DH hinsichtlich der 5-KGA Bildung in dem untersuchten *G. oxydans* Stamm DSM 2343. Shinjoh *et al.* (2002b) inaktivierten das *sldA*-Gen einer membrangebundenen Sorbit-Dehydrogenase in *G. suboxydans* IFO 3255 und *G. suboxydans* IFO 3257 und beobachteten ebenfalls eine Reduktion der 5-KGA-Bildung. Eine andere Arbeitsgruppe deletierte das gleiche Gen und konnte zusätzlich beobachten, dass auch die Umsetzung von Mannit zu Fructose, Sorbit zu Sorbose und Glycerin zu Dihydroxyaceton verhindert wird (Matsushita *et al.*, 2003). Dieses mGA5DH-Protein, welches unter anderem als D-Gluconat-Dehydrogenase (Shinagawa *et al.*, 1999), D-Arabitol-Dehydrogenase (Adachi *et al.*, 2001), D-Sorbit-Dehydrogenase (Sugisawa & Hoshino, 2002) oder auch D-Glycerin-Dehydrogenase (Matsushita *et al.*, 2003) beschrieben wurde, weist ein breites Substratspektrum auf und wurde daher als Polyol-Dehydrogenase bezeichnet (Shinjoh *et al.*, 2002b), wobei die höchste spezifische Aktivität mit dem Substrat *meso*-Erythritol erzielt wurden (Matsushita *et al.*, 2003).

Es konnte somit gezeigt werden, dass die membrangebundene Gluconat-5-, bzw. Polyol-Dehydrogenase (mGA5DH) in *G. oxydans* DSM 2343, verglichen mit der

cytosolischen Gluconat:NADP⁺ 5-Oxidoreduktase (GNO), hauptsächlich für die 5-KGA-Bildung verantwortlich ist.

Optimierung der 5-KGA-Bildung in *G. oxydans*

Neben der Produktion von 5-KGA mit cytosolischen Enzymen wurde versucht, die 5-KGA-Bildung durch die Überproduktion membrangebundener Dehydrogenasen zu erhöhen. Das *mga5dh*-Gen wurde daher sowohl mit eigenem Promotor, als auch mit Promotoren anderer homologer und heterologer Gene exprimiert. Dabei konnte der von Saito *et al.* (1997) bereits erfolgreich für die Expression des Sorbose/Sorboson-Dehydrogenase Gen-Clusters (*sdh/sndh*) verwendete *tufB*-Promotor aus *E. coli* zur Steigerung der *mga5dh*-Genexpression in *G. oxydans* eingesetzt werden. Neben dem *tufB*-Promotor aus *E. coli* wurden auch erstmals *G. oxydans*-eigene Promotoren zur Steigerung der homologen Genexpression eingesetzt. So wurde in Anlehnung an den *tufB*-Promotor aus *E. coli* der entsprechende homologe *tufB*-Promotor aus *G. oxydans* für die Expression des *mga5dh*-Gens verwendet. Da sich anhand der durchgeführten Transkriptanalysen eine konstitutive Expression des *mgdh*-Gens gezeigt hatte, wurde auch dieser *mgdh*-Promotor für die *mga5dh*-Expression genutzt. Die Überexpression des *mga5dh*-Gens mit diesen homologen und heterologen Promotoren führte zu einer Steigerung der 5-KGA-Bildung in *G. oxydans* DSM 2343, so dass 5-KGA-Konzentrationen von bis zu 300 mmol l⁻¹ erreicht werden konnten. Salusjärvi *et al.* (2004) isolierten das *mga5dh*-Gen aus *G. suboxydans* IFO 12528 und exprimierten dieses anschließend in *E. coli* XL-1 Blue über. Die Biotransformation von Glucose zu 5-KGA war, ungeachtet der Tatsache, dass der notwendige Cofaktor PQQ in *E. coli* supplementiert und die *mga5dh*-Genexpression induziert wurde, nicht erfolgreich (Matsushita *et al.*, 1997). Dieses Ergebnis entspricht nicht den Erwartungen, da gezeigt wurde, dass die membrangebundene Glucose-Dehydrogenase (mGDH) in *E. coli* als *apo*-Enzym vorliegt und durch Zugabe von PQQ und CaCl₂ zum *holo*-Enzym aktiviert werden kann (Dewanti & Duine, 1998; Yamada *et al.*, 2003; Elias *et al.*, 2004). Unter Verwendung des Substrats Gluconat wurde erstaunlicherweise eine Bildung von 5-KGA durch die ebenfalls PQQ-abhängige membrangebundene Gluconat-5-Dehydrogenase beobachtet, was die Ergebnisse von Salusjärvi *et al.* (2004) inkonsistent erscheinen lässt.

In dieser Arbeit wurde versucht, durch Erhöhung der Glucose-Konzentration die 5-KGA-Bildung zu steigern (Kapitel 4.1). Die in den entsprechenden Biotransformationen erzielten 5-KGA-Konzentrationen waren überraschenderweise geringer, als in den Versuchen mit weniger Glucose (Kapitel 2.4). Der hemmende Einfluss von hohen Glucose-Konzentrationen auf die 5-KGA-Bildung wurde bereits in früheren Experimenten beobachtet (Stubbs *et al.*, 1940; Kheshgi *et al.*, 1954). Neben der resultierenden 5-KGA-Konzentration war sowohl das Wachstum als auch die maximale optische Dichte bei Biotransformationen mit der 4-fachen Glucose-Menge (550 mmol l^{-1}) verringert. Levering *et al.* (1988) stellten folgende Hypothese auf, die beide Beobachtungen erklären könnte. Bei der Oxidation von Glucose zu Gluconat werden in *G. oxydans* die Elektronen über die membrangebundene Glucose-Dehydrogenase auf Ubichinon-10 (Q_{10}) übertragen und das reduzierte $Q_{10}H_2$ über eine Cytochrom *o* Oxidase wieder zu Ubichinon oxidiert (Daniel, 1970; Matsushita *et al.*, 1987; Matsushita *et al.*, 1989). Die Oxidation von Glucose findet dabei mit einer sehr hohen Aktivität statt, so dass der in der Periplasmamembran befindliche Ubichinon Pool schneller reduziert wird, als er durch die Cytochrom *o* Oxidase oxidiert werden kann (Levering *et al.*, 1988; Pronk *et al.*, 1989). Nachfolgende Reaktionen, wie die Umsetzung von Gluconat zu 5-KGA durch die membrangebundene, PQQ-abhängige Gluconat-5-Dehydrogenase, können nur mit verringerter Aktivität stattfinden, da der für die Elektronenaufnahme notwendige oxidierte Cofaktor Q_{10} nicht ausreichend zur Verfügung steht. Erst nach Verringerung der Glucose Konzentration konnte das mGA5DH-Enzym Gluconat mit maximaler Aktivität zu 5-KGA umsetzen. Die dennoch insgesamt geringere Einspeisung von Elektronen in die Atmungskette führt zu einem niedrigeren Membranpotential und Energiestatus der Zelle. Folglich verlangsamt sich das Wachstum des Organismus. In *Acetobacter calcoaceticus* wurde eine vergleichbare Beobachtung gemacht. Dieser Organismus zeigte bei Wachstum mit den C-Quellen Acetat und Glucose ein besseres Wachstum, als mit Acetat alleine (van Schie *et al.*, 1987). Die Oxidation von Glucose verlief in *A. calcoaceticus* ebenfalls über eine membrangebundene Glucose-Dehydrogenase zu Gluconat und die damit verbundene Erzeugung eines Protonengradienten bzw. Energie in Form von ATP verstärkte das Wachstum der Zellen (van Schie *et al.*, 1985). Ein weiteres Beispiel für die Rolle membrangebundener, PQQ-abhängiger Polyol-Dehydrogenasen bei der Energiebereitstellung konnte in

Gluconacetobacter diazotrophicus beobachtet werden, bei dem die Oxidation von Xylose zu Xylonat mit der Wachstumsrate korrelierte (Luna *et al.*, 2002).

Die Biotransformation von Glucose über Gluconat zu 5-KGA wurde als sequentielle Reaktion beschrieben, bei der die 5-KGA-Bildung erst dann eintritt, wenn Glucose fast verbraucht war (Weenk *et al.*, 1984). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass die 5-KGA-Bildung unmittelbar mit dem Vorhandensein von Gluconat begann, was bereits von Stadler-Szöke *et al.* (1980) beobachtet wurde. Daher hängt die maximale 5-KGA-Konzentration und der zeitliche Verlauf der 5-KGA-Bildung mit großer Wahrscheinlichkeit von der Glucose Anfangskonzentration und dem durch die mGDH überlasteten Atmungskette ab (Levering *et al.*, 1988).

Der negative Einfluss hoher Glucose-Konzentrationen auf die 5-KGA-Produktivität wurde sowohl in dieser Arbeit als auch in den Arbeiten von Weenk *et al.* (1984) festgestellt. Daher wurde die Glucosekonzentration während des Wachstums kontrolliert. Durch kontinuierliche Zugabe einer Glucose-Lösung zu den wachsenden *G. oxydans* Zellen konnte eine lineare Zunahme der 5-KGA-Konzentration bei gleichzeitiger, verringerter Gluconat-Bildung erreicht werden. Nachdem die Zellen die stationäre Wachstumsphase erreicht hatten, endete die 5-KGA-Bildung und Gluconat akkumulierte. Im Gegensatz dazu war die Aktivität der mGDH von der Wachstumsphase unabhängig. Da beide an der 5-KGA-Bildung beteiligten Enzyme mGDH und mGA5DH an die Atmungskette gekoppelt sind, konnte eine Abnahme des Ubichinonpools oder eine Inaktivierung der Cytochrom o Oxidase als Grund für die Beendigung der 5-KGA-Bildung ausgeschlossen werden (Ameyama *et al.*, 1981). Es stellte sich somit die Frage nach dem Grund für dieses unterschiedliche Verhalten der beiden *G. oxydans* Enzyme. Von der membrangebundenen Glucose-Dehydrogenase aus *G. suboxydans* IFO 12528 ist bekannt, dass nach Isolierung und Rekonstitution des Enzyms mit Ca^{2+} , PQQ, Ubichinon-10 und der Cytochrom o Oxidase in Proteoliposomen ein Minimalsystem erzeugt wird, welches sowohl die Oxidation von Glucose zu Gluconat, als auch das Ausbilden eines Membranpotentials ermöglicht (Matsushita *et al.*, 1989). Dabei sind das divalente Ca^{2+} -Kation und der Cofaktor PQQ essentiell für die Umsetzungsreaktion von Glucose zu Gluconat, bzw. für alle PQQ-abhängigen Dehydrogenasen, die an die Atmungskette gekoppelt sind (Hommes *et al.*,

1991; Zheng & Bruice, 1997; Anthony, 2001; Sato *et al.*, 2001; Anthony, 2004). Zusätzlich ist von der mGDH aus *G. suboxydans* IFO 12528, einem *G. oxydans* DSM 2343 ähnlichen Stamm, bekannt, dass durch Zugabe des Metallkomplexbildners EDTA, PQQ bzw. Ca^{2+} nicht aus dem Enzym entfernt werden kann, und dass dieses daher als sehr stabil beschrieben wurde (Ameyama *et al.*, 1981; Matsushita *et al.*, 1994). Von der membrangebundenen Glycerin-Dehydrogenase aus *G. industrius*, dem Enzym, das der Polyol-Dehydrogenase und damit der mGA5DH entspricht, ist wiederum bekannt, dass die Affinität von PQQ zu diesem Enzym sehr gering ist (Ameyama *et al.*, 1985b; Matsushita *et al.*, 1994; Matsushita *et al.*, 2003). Experimente, in denen Zellen von *Acetobacter aceti* IFO 3284 wiederholt mit Wasser gewaschen wurden zeigten zudem, dass PQQ aus dem Protein ausgelöst werden konnte (Ameyama *et al.*, 1985a). In anderen Experimenten wurde beim Abbau von membranständigen, PQQ-haltigen Enzymen in der stationären Wachstumsphase der Cofaktor in das Medium abgegeben und dort durch Aminosäuren oder andere nukleophil reagierenden Moleküle inaktiviert (van Kleef & Duine, 1989).

Die Ergebnisse der Experimente in Kapitel 4.2 mit kontinuierlicher Zugabe von Glucose zeigten, dass die 5-KGA-Bildung nur bis zur stationären Wachstumsphase von *G. oxydans* DSM 2343 stattfand. Zu späteren Zeitpunkten der Biotransformation von Glucose zu 5-KGA war eine Verfärbung des Mediums zu erkennen, die wahrscheinlich mit dem Vorhandensein von PQQ korrelierte. PQQ absorbiert bei 475 nm, bildet eine ziegelrote Farbe in Lösung, reagiert mit Aldehyden, Ketonen und basischen Aminosäuren (s.o.) (Duine *et al.*, 1986). Da eine Zugabe von Ca^{2+} keine Auswirkungen auf die Aktivität der 5-KGA-Bildung zeigte, fand vermutlich eine Inaktivierung des mGA5DH Enzyms statt. Diese könnte durch 5-KGA selbst hervorgerufen worden sein, denn 5-KGA bildet mit Ca^{2+} -Kationen ein schwer-lösliches Salz, welches während der Biotransformation von Glucose ausfällt (Kheshgi *et al.*, 1954). Durch hohe 5-KGA-Konzentrationen könnte Ca^{2+} daher aus dem aktiven Zentrum der membrangebundenen Gluconat-5-Dehydrogenase entfernt, PQQ freigesetzt und anschließend abgebaut worden sein. Eine Rekonstitution des Enzyms mit PQQ durch Zugabe von Ca^{2+} war aufgrund der geringen Löslichkeit des Ca-5-KGA Salzes nicht möglich. Die Glucose-Dehydrogenase, welche ebenfalls PQQ und Ca^{2+} im katalytischen

Zentrum aufweist, blieb aufgrund der erhöhten Stabilität gegenüber Chelatoren in ihrer Aktivität unbeeinträchtigt (Ameyama *et al.*, 1981; Matsushita *et al.*, 1994).

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die Bildung von 5-Keto-D-Gluconsäure mit membrangebundenen Dehydrogenasen von *Gluconobacter oxydans* und die dadurch neu entstandenen Fragen, verdeutlichen die enorme Komplexität der Atmungskettenvorgängen in dem untersuchten Bakterium. Die Resultate schaffen eine viel versprechende Grundlage für zukünftige Forschungsprojekte, die diese spannenden Fragen klären können.

Literaturverzeichnis

ADACHI, O., ANO, Y., MOONMANGMEE, D., SHINAGAWA, E., TOYAMA, H., THEERAGOOL, G., LOTONG, N., MATSUSHITA, K. (1999a). Crystallization and properties of NADPH-dependent L-sorbose reductase from *Gluconobacter melanogenes*. *Biosci Biotechnol Biochem* **63**: 2137-2143.

ADACHI, O., FUJII, Y., GHALY, M. F., TOYAMA, 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**(12): 2755-2762.

ADACHI, O., MATSUSHITA, K., SHINAGAWA, E., AMEYAMA, M. (1979a). Occurrence of old yellow enzyme in *Gluconobacter suboxydans*, and the cyclic regeneration of NADP⁺. *J Biochem* **86**(3): 699-709.

ADACHI, O., MATSUSHITA, K., SHINAGAWA, E., AMEYAMA, M. (1980). Crystallization and characterization of NADP⁺-dependent D-glucose dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*. *Agr Biol Chem Tokyo* **44**(2): 301-308.

ADACHI, O., SHINAGAWA, E., MATSUSHITA, K., AMEYAMA, M. (1979b). Crystallization and properties of 5-keto-D-gluconate reductase from *Gluconobacter suboxydans*. *Agric Biol Chem* **43**(1): 75-83.

ADACHI, O., TOYAMA, H., MATSUSHITA, K. (1999b). Crystalline NADP-dependent D-mannitol dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*. *Biosci Biotech Bioch* **63**(2): 402-407.

AMEYAMA, M., ADACHI, O. (1982). 5-keto-D-gluconate reductase from *Gluconobacter suboxydans*. *Method Enzymol* **89**: 198-202.

AMEYAMA, M., SHINAGAWA, E., MATSUSHITA, K., ADACHI, O. (1981). D-glucose dehydrogenase of *Gluconobacter suboxydans*: Solubilization, purification and characterization. *Agric Biol Chem* **45**(4): 851-861.

AMEYAMA, M., SHINAGAWA, E., MATSUSHITA, K., ADACHI, O. (1985a). How many times should the inoculum cells be rinsed before inoculation in the assay for growth stimulating activity of pyrroloquinoline quinone ? *Agric Biol Chem* **49**(3): 853-854.

AMEYAMA, M., SHINAGAWA, E., MATSUSHITA, K., ADACHI, O. (1985b). Solubilization, purification and properties of membrane-bound glycerol dehydrogenase from *Gluconobacter industrius*. *Agric Biol Chem* **49**(4): 1001-1010.

AMEYAMA, M. A., O (1982). 2-keto-D-gluconate reductase from acetic acid bacteria. *Methods Enzymol* **89**: 203-209.

AN, G., FRIESEN, J. D. (1980). The nucleotide sequence of *tufB* and four nearby tRNA structural genes of *Escherichia coli*. *Gene* **12**(1-2): 33-39.

ANTHONY, C. (2001). Pyrroloquinoline quinone (PQQ) and quinoprotein enzymes. *Antioxid Redox Signal* **3**(5): 757-774.

ANTHONY, C. (2004). The quinoprotein dehydrogenases for methanol and glucose. *Arch Biochem Biophys* **428**(1): 2-9.

BARCH, W. E. (1933). The oxidation of 5-keto-gluconic acid with nitric acid in the presence of vanadium. *J Am Chem Soc* **55**(9): 3653-3658.

BATTEY, 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**(2): 237-247.

BESCHKOV, V., VELIZAROV, S., PEEVA, L. G. (1995). Some kinetic aspects and modelling of biotransformation of D-glucose to keto-D-gluconates. *Bioprocess Eng* **13**: 301-305.

BESTMANN, H. J., PHILIPP, U. C. (1991). Enzymatische Synthese chiraler C₄-Bausteine aus meso-Weinsäure. *Angew Chem* **103**: 78-79.

BEYER, H., WALTER, W. (2004). Lehrbuch der organischen Chemie. *Hirzel Verlag, Stuttgart* (23).

BOONSTRA, B., FRENCH, C. E., WAINWRIGHT, I., BRUCE, N. C. (1999). The *udhA* gene of *Escherichia coli* encodes a soluble pyridine nucleotide transhydrogenase. *J Bacteriol* **181**(3): 1030-1034.

BOONSTRA, B., RATHBONE, D. A., FRENCH, C. E., WALKER, E. H., BRUCE, N. C. (2000). Cofactor regeneration by a soluble pyridine nucleotide transhydrogenase for biological production of hydromorphone. *Appl Environ Microbiol* **66**(12): 5161-5166.

BOYER, H. W., ROULLAND-DUSSOIX, D. (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **41**(3): 459-472.

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**: 248-254.

BUCHERT, J., VIIKARI, L. (1988). Oxidative D-xylose metabolism of *Gluconobacter oxydans*. *Appl Microbiol Biot* **29**(4): 375-379.

BUCK, M. A., COOPERMAN, B. S. (1990). Single protein omission reconstitution studies of tetracycline binding to the 30S subunit of *Escherichia coli* ribosomes. *Biochemistry* **29**(22): 5374-5379.

-
- CHO, N. C., KIM, K., JHON, D. Y. (1990).** Purification and characterization of polyol dehydrogenase from *Gluconobacter melanogenus*. *Han'guk Saenghwa Hakhaochi* **23**: 172-178.
- CHOI, E.-S., LEE, E.-H., RHEE, S.-K. (1995).** Purification of a membrane-bound sorbitol dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*. *FEMS Microbiology Letters* **125**(1): 45-49.
- CHOPRA, I., HAWKEY, P. M., HINTON, M. (1992).** Tetracyclines, molecular and clinical aspects. *J Antimicrob Chemother* **29**(3): 245-277.
- CLETON-JANSEN, A. M., DEKKER, S., VAN DE PUTTE, P., GOOSEN, N. (1991).** A single amino acid substitution changes the substrate specificity of quinoprotein glucose dehydrogenase in *Gluconobacter oxydans*. *Mol Gen Genet* **229**(2): 206-212.
- COHEN, S. N., CHANG, A. C., HSU, L. (1972).** Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**(8): 2110-2114.
- CONDON, C., FITZGERALD, R. J., OGARA, F. (1991).** Conjugation and heterologous gene expression in *Gluconobacter oxydans* ssp *suboxydans*. *Fems Microbiology Letters* **80**(2-3): 173-178.
- CONNELL, T. D., MARTONE, A. J., HOLMES, R. K. (1995).** A new mobilizable cosmid vector for use in *Vibrio cholerae* and other Gram⁻ bacteria. *Gene* **153**(1): 85-87.
- CSONKA, L. N., FRAENKEL, D. G. (1977).** Pathways of NADPH formation in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **252**(10): 3382-3391.
- DANIEL, R. M. (1970).** The electron transport system of *Acetobacter suboxydans* with particular reference to cytochrome *o*. *Biochim Biophys Acta* **216**(2): 328-341.
- DAVIES, E., HODGE, R., ISAAC, P. G. (1996).** Hybridization and detection of digoxigenin probes on RNA blots. *Mol Biotechnol* **6**(1): 75-77.
- DE LEY, J., GILLIS, M., SWINGS, J. (1984).** *Acetobacteraceae*. *Krieg NR, Holt JG (eds) Bergey's manual of systematic bacteriology vol 1*(3): 267-278.
- DE LEY, J., SWINGS, J. (1981).** The genera *Gluconobacter* and *Acetobacter*. *The Prokaryotes. A handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria.*: 771-778.
- DEWANTI, A. R., DUINE, J. A. (1998).** Reconstitution of membrane-integrated quinoprotein glucose dehydrogenase apoenzyme with PQQ and the holoenzyme's mechanism of action. *Biochemistry* **37**(19): 6810-6818.
- DUINE, J. A., FRANK, J., JONGEJAN, J. A. (1986).** PQQ and quinoprotein enzymes in microbial oxidations. *FEMS Microbiol Rev* **32**: 165-178.
-

- EAGON, R. G. (1963).** Rate limiting effects of pyridine nucleotides on carbohydrate catabolic pathways of Microorganisms. *Biochem Biophys Res Commun* **12**(4): 274-8.
- 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**(6): 668-674.
- ELIAS, M., TANAKA, M., SAKAI, M., TOYAMA, H., MATSUSHITA, K., ADACHI, O., YAMADA, M. (2001).** C-terminal periplasmic domain of *Escherichia coli* quinoprotein glucose dehydrogenase transfers electrons to ubiquinone. *J Biol Chem* **276**(51): 48356-48361.
- ELIAS, M. D., NAKAMURA, S., MIGITA, C. T., MIYOSHI, H., TOYAMA, H., MATSUSHITA, K., ADACHI, O., YAMADA, M. (2004).** Occurrence of a bound ubiquinone and its function in *Escherichia coli* membrane-bound quinoprotein glucose dehydrogenase. *J Biol Chem* **279**(4): 3078-3083.
- ENGLARD, S., AVIGAD, G. (1975).** 5-Keto-D-fructose reductase from *Gluconobacter cerinus*-1. *Methods Enzymol* **41**: 127-131.
- 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 U S A* **76**(4): 1648-1652.
- FISCHER-FANTUZZI, L., DI GIROLAMO, M. (1961).** Triparental matings in *Escherichia coli*. *Genetics* **46**: 1305-1315.
- FRITSCHÉ, W. (1999).** Mikrobiologie. *Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg - Berlin*.
- GALANTE, E., LANZANI, G. A., SCALAFFA, P. (1964).** Enzymatic activities in *Acetobacter suboxydans*. II. Production of 5-ketogluconate. *Enzymologia* **27**(3): 176-8.
- GALANTE, E., LANZANI, G. A., SEQUI, P. (1966).** Variations of 2-ketogluconate and 5-ketogluconate oxidoreductases during growth in *Acetobacter suboxydans*. *Enzymologia* **30**(4): 257-264.
- GOSSELÉ, F., SWINGS, J., DE LEY, J. (1980).** Growth-factor requirements of *Gluconobacter*. *Zbl Bakt* **1**(4): 348-350.
- GUPTA, A., FELDER, M., VERMA, V. V., CULLUM, J., QAZI, G. N. (1999).** A mutant of *Gluconobacter oxydans* deficient in gluconic acid dehydrogenase. *FEMS Microbiol Lett* **179**(2): 501-506.
- GUPTA, A., SINGH, V. K., QAZI, G. N., KUMAR, A. (2001).** *Gluconobacter oxydans*: its biotechnological applications. *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**(3): 445-456.
-

-
- GUPTA, A., VERMA, V., QAZI, G. N. (1997).** Transposon induced mutation in *Gluconobacter oxydans* with special reference to its direct-glucose oxidation metabolism. *FEMS Microbiol Lett* **147**(2): 181-188.
- HA, S. W. (2004).** Overexpression of PQQ-dependent membran-bound dehydrogenases in *Gluconobacter oxydans*. *Diplomarbeit, Institut für Biotechnologie, TU Berlin*.
- HABERSTROH, H. J., HUSTEDE, H. (1983).** Enzyklopädie der technischen Chemie. 4. Auflage, Verlag Chemie, Weinheim Germany. **24**: 431-437.
- HANAHAN, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**(4): 557-580.
- HERRMANN, U., MERFORT, M., JEUDE, M., BRINGER-MEYER, S., SAHM, H. (2004).** Biotransformation of glucose to 5-keto-D-gluconic acid by recombinant *Gluconobacter oxydans* DSM 2343. *Appl Microbiol Biotechnol* **64**(1): 86-90.
- HOMMES, R. W., SIMONS, J. A., SNOEP, J. L., POSTMA, P. W., TEMPEST, D. W., NEIJSEL, O. M. (1991).** Quantitative aspects of glucose metabolism by *Escherichia coli* B/r, grown in the presence of pyrroloquinoline quinone. *Antonie Van Leeuwenhoek* **60**(3-4): 373-382.
- HOSHINO, T., SUGISAWA, T., SHINJOH, M., TOMIYAMA, N., MIYAZAKI, T. (2003).** Membrane-bound D-sorbitol dehydrogenase of *Gluconobacter suboxydans* IFO 3255 - enzymatic and genetic characterization. *Bba-Proteins Proteom* **1647**(1-2): 278-288.
- HUNGERBÜHLER, E., SEEBACH, D. (1981).** Chirale elektrophile Synthesebausteine mit vier verschiedenen funktionellen Gruppen aus Weinsäure, 2,3- und 3,4-Epoxybutandiolderivate in allen vier stereoisomeren Formen. *Helv. Chim. Acta* **64**: 687-702.
- JI, A., GAO, P. (2001).** Substrate selectivity of *Gluconobacter oxydans* for production of 2,5-diketo-D-gluconic acid and synthesis of 2-keto-L-gulonic acid in a multienzyme system. *Appl Biochem Biotechnol* **94**(3): 213-223.
- KATSURA, K., YAMADA, Y., UCHIMURA, T., KOMAGATA, K. (2002).** *Gluconobacter asaii* Mason and Claus 1989 is a junior subjective synonym of *Gluconobacter cerinus* Yamada and Akita 1984. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**(Pt 5): 1635-1640.
- KAUP, B. (2004).** Gewinnung von D-Mannitol mit rekombinanten *Escherichia coli* Stämmen. *Berichte des Forschungszentrums Jülich* **4155**.
- KERSTERS, K., WOOD, W. A., DELEY, J. (1965).** Polyol dehydrogenases of *Gluconobacter Oxydans*. *J Biol Chem* **240**: 965-974.
- KHESHGI, S., ROBERTS, H. R., BUCEK, W. (1954).** Studies on the production of 5-ketogluconic acid by *Acetobacter suboxydans*. *Appl Microbiol* **2**(4): 183-190.
-

KITOS, P. A., WANG, C. H., MOHLER, B. A., KING, T. E., CHELDELIN, V. H. (1958). Glucose and gluconate dissimilation in *Acetobacter suboxydans*. *J Biol Chem* **233**(6): 1295-1298.

KLASEN, R. (1995). Dissertation: Molekularbiologische Untersuchungen zur 5-Ketogluconatbildung bei *Gluconobacter oxydans*. *Berichte des Forschungszentrums Jülich Jül-3001*.

KLASEN, R., BRINGER-MEYER, S., SAHM, H. (1992). Incapability of *Gluconobacter oxydans* to produce tartaric acid. *Biotechnol Bioeng* **40**: 183-186.

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**(10): 2637-2643.

KLEMM, P., TONG, S., NIELSEN, H., CONWAY, T. (1996). The *gntP* gene of *Escherichia coli* involved in gluconate uptake. *J Bacteriol* **178**(1): 61-67.

KONDO, K., HORINOUCI, S. (1997). Characterization of an insertion sequence, IS12528, from *Gluconobacter suboxydans*. *Appl Environ Microb* **63**(3): 1139-1142.

KOTERA, U., KODAMA, T., YAMADA, K., MINODA, Y. (1972a). Microbial formation of tartaric acid glucose -5- Isolation and chemical structure of new oxidation product of 5-ketogluconic acid, and a hypothetical pathway from glucose to tartaric acid through this new compound. *Agric Biol Chem* **36**(8): 1315-1316.

KOTERA, U., YAMADA, K., UMEHARA, K., KODAMA, T. (1972b). Microbial formations of tartaric acid from glucose. 4. Isolation method of highly tartaric acid producing mutants of *Gluconobacter suboxydans*. *Agr Biol Chem Tokyo* **36**(8): 1307-&.

KULHANÉK, M. (1989). Microbial dehydrogenations of monosaccharides. *Adv Appl Microbiol* **34**: 141-182.

LAM, S. T., LAM, B. S., STROBEL, G. (1985). A vehicle for the introduction of transposons into plant-associated *pseudomonads*. *Plasmid* **13**(3): 200-204.

LEVERING, P. R., WEENK, G., OLIJVE, W., DIJKHUIZEN, L., HARDER, W. (1988). Regulation of gluconate and ketogluconate production in *Gluconobacter oxydans* ATCC 621-H. *Arch Microbiol* **149**(6): 534-539.

LEVY, S. B. (2002). Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance. *Symp Ser Soc Appl Microbiol* (31): 65S-71S.

LICHTENTHALER, F. W. (2002). Unsaturated O- and N-heterocycles from carbohydrate feedstocks. *Acc Chem Res* **35**(9): 728-737.

LIGGETT, R. W., KOFFLER, H. (1948). Corn Steep Liquor in Microbiology. *Bacteriol Rev* **12**(4): 297-311.

-
- LÖW, R., RAUSCH, T. (1994).** Sensitive, nonradioactive northern blots using alkaline transfer of total RNA and PCR-amplified biotinylated probes. *Biotechniques* **17**(6): 1026-1030.
- LUNA, M. F., BERNARDELLI, C. E., MIGNONE, C. F., BOIARDI, J. L. (2002).** Energy generation by extracellular aldose oxidation in N₂-fixing *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Appl Environ Microbiol* **68**(4): 2054-2056.
- MACK, M., VAN LOON, A. P., HOHMANN, H. P. (1998).** Regulation of riboflavin biosynthesis in *Bacillus subtilis* is affected by the activity of the flavokinase/flavin adenine dinucleotide synthetase encoded by *ribC*. *J Bacteriol* **180**(4): 950-955.
- MATSUSHITA, K., ARENTS, J. C., BADER, R., YAMADA, M., ADACHI, O., POSTMA, P. W. (1997).** *Escherichia coli* is unable to produce pyrroloquinoline quinone (PQQ). *Microbiology* **143** (Pt 10): 3149-3156.
- MATSUSHITA, K., FUJII, 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**(4): 1959-1966.
- MATSUSHITA, K., SHINAGAWA, E., ADACHI, O., AMEYAMA, M. (1987).** Purification, characterization and reconstitution of cytochrome *o*-type oxidase from *Gluconobacter suboxydans*. *Biochim Biophys Acta* **894**(2): 304-312.
- MATSUSHITA, K., SHINAGAWA, E., ADACHI, O., AMEYAMA, M. (1989).** Reactivity with ubiquinone of quinoprotein D-glucose dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*. *J Biochem* **105**(4): 633-637.
- MATSUSHITA, K., SHINAGAWA, E., AMEYAMA, M. (1982).** D-Gluconate dehydrogenase from bacteria, 2-keto-D-gluconate-yielding, membrane-bound. *Methods Enzymol* **89 Pt D**: 187-193.
- MATSUSHITA, K., TAKAKI, Y., SHINAGAWA, E., AMEYAMA, M., ADACHI, O. (1992).** Ethanol oxidase respiratory chain of acetic acid bacteria - Reactivity with ubiquinone of pyrroloquinoline quinone-dependent alcohol dehydrogenases purified from *Acetobacter aceti* and *Gluconobacter suboxydans*. *Biosci Biotech Bioch* **56**(2): 304-310.
- MATSUSHITA, K., TOYAMA, H., ADACHI, O. (1994).** Respiratory chains and bioenergetics of acetic acid bacteria. Rose, A. Tempest, D.W. (EDS.) *Adv Microb Physiol* **36**: 247-301.
- MATZERATH, I., KLÄUI, W., KLASSEN, R., SAHM, H. (1995).** Vanadate catalyzed oxidation of 5-keto-D-gluconic acid to tartaric acid - the unexpected effect of phosphate and carbonate on rate and selectivity. *Inorg Chim Acta* **237**(1-2): 203-205.
- MELOCHE, H. P., WOOD, W. A. (1964).** The mechanism of 6-phosphogluconic dehydrase. *J Biol Chem* **239**: 3505-3510.
-

- MING, Y. Z., DI, X., GOMEZ-SANCHEZ, E. P., GOMEZ-SANCHEZ, C. E. (1994).** Improved downward capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Biotechniques* **16**(1): 58-59.
- MOWSHOWITZ, S., AVIGAD, G., ENGLARD, S. (1974).** 5-Keto-D-fructose: formation and utilization in the course of D-fructose as similation by *Gluconabacter cerinus*. *J Bacteriol* **118**(3): 1051-1058.
- MULLIS, K. B., FALOONA, F. A. (1987).** Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**: 335-350.
- OKAMOTO, K. (1963a).** Enzymatic studies on the formation of 5-ketogluconic acid by *Acetobacter suboxydans*. I. Glucose dehydrogenase. *J Biochem (Tokyo)* **53**: 348-353.
- OKAMOTO, K. (1963b).** Enzymatic studies on the formation of 5-ketogluconic acid by *Acetobacter suboxydans*. II. 5-ketogluconate reductase. *J Biochem* **53**: 448-452.
- OLIJVE, W., KOK, J. J. (1979).** Analysis of growth of *Gluconobacter oxydans* in glucose containing media. *Arch Microbiol* **121**(3): 283-290.
- PALMA, M., BARROSO, C., G. (2002).** Ultrasound-assisted extraction and determination of tartaric and malic acids from grapes and winemaking by-products. *Anal Chim Acta* **458**(1): 119-130.
- PARMENTIER, S., ARNAUT, F., SOETAERT, W., VANDAMME, E. J. (2003).** Application of NAD-dependent polyol dehydrogenases for enzymatic mannitol/sorbitol production with coenzyme regeneration. *Commun Agric Appl Biol Sci* **68**(2 Pt A): 255-262.
- PARMENTIER, S., BEAUPREZ, J., ARNAUT, F., SOETAERT, W., VANDAMME, E. J. (2005).** *Gluconobacter oxydans* NAD-dependent, D-fructose reducing, polyol dehydrogenases activity: screening, medium optimisation and application for enzymatic polyol production. *Biotechnol Lett* **27**(5): 305-311.
- PETERSON, M. H., FRIEDLAND, W. C., DENISON, F. W., SYLVESTER, J. C. (1956).** The Conversion of Mannitol to Fructose by *Acetobacter-Suboxydans*. *Applied Microbiology* **4**(6): 316-322.
- PRONK, J. T., LEVERING, P. R., OLIJVE, W., VAN DIJKEN, J. P. (1989).** Role of NADP-dependent and quinoprotein glucose dehydrogenases in gluconic acid production by *Gluconobacter oxydans*. *Enzyme Microb Tech* **11**(3): 160-164.
- PRUST, C. (2004).** Entschlüsselung des Genoms von *Gluconobacter oxydans* 621H – einem Bakterium von industriellem Interesse. *Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftlichen 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**(2): 195-200.

PUJOL, C. J., KADO, C. I. (2000). Genetic and biochemical characterization of the pathway in *Pantoea citrea* leading to pink disease of pineapple. *J Bacteriol* **182**(8): 2230-2237.

RUIZ, A., POBLET, M., MAS, A., GUILLAMÓN, J. M. (2000). Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16S rDNA and 16S-23S rDNA intergenic spacer. *Int J Syst Evol Microbiol* **50 Pt 6**: 1981-1987.

SAITO, Y., ISHII, Y., HAYASHI, H., IMAO, Y., AKASHI, T., YOSHIKAWA, K., NOGUCHI, Y., SOEDA, S., YOSHIDA, M., NIWA, M., HOSODA, J., SHIMOMURA, K. (1997). Cloning of genes coding for L-sorbose and L-sorbosone dehydrogenases from *Gluconobacter oxydans* and microbial production of 2-keto-L-gulonate, a precursor of L-ascorbic acid, in a recombinant *G. oxydans* strain. *Appl Environ Microbiol* **63**(2): 454-460.

SALUSJÄRVI, 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, characterisation of the enzyme and its use for the production of 5-ketogluconate in a recombinant *Escherichia coli* strain. *Appl Microbiol Biotechnol* **65**(3): 306-314.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual (2nd ed.). *Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York*.

SATO, A., TAKAGI, K., KANO, K., KATO, N., DUINE, J. A., IKEDA, T. (2001). Ca²⁺ stabilizes the semiquinone radical of pyrroloquinoline quinone. *Biochem J* **357**(Pt 3): 893-898.

SAUER, U., CANONACO, F., HERI, S., PERRENOUD, A., FISCHER, E. (2004). The soluble and membrane-bound transhydrogenases UdhA and PntAB have divergent functions in NADPH metabolism of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **279**(8): 6613-6619.

SCHÄFER, A., TAUCH, A., JÄGER, W., KALINOWSKI, J., THIERBACH, G., PÜHLER, 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**(1): 69-73.

SCHEDL, M. (2000). Regioselective oxidation of aminosorbitol with *Gluconobacter oxydans*, key reaction in the industrial 1-deoxynojirimycin-synthesis. *Kelly DR (ed) Biotechnology; Wiley-VCH, Weinheim, vol 8b (Biotransformations II)*: pp 296–308.

SCHEELE, C. W. (1793). Sämtliche physische und chemische Werke. *Niederwalluf b. Wiesbaden : M. Sändig*.

SHINAGAWA, E., AMEYAMA, M. (1982a). 2-keto-D-gluconate dehydrogenase from *Gluconobacter melanogenus*, membrane-bound. *Method Enzymol* **89**: 194-198.

SHINAGAWA, E., AMEYAMA, M. (1982b). D-Sorbitol Dehydrogenase from *Gluconobacter-Suboxydans*, Membrane-Bound. *Method Enzymol* **89**: 141-145.

SHINAGAWA, E., MATSUSHITA, K., ADACHI, O., AMEYAMA, M. (1983). Selective production of 5-keto-D-gluconate by *Gluconobacter* strains. *J Ferment Technol* **61**(4): 359-363.

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**(5): 1079 - 1085.

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**(1): 135-141.

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. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **6**(3): 341-350.

SHINJOH, M., TAZOE, M., HOSHINO, T. (2002a). NADPH-dependent L-sorbose reductase is responsible for L-sorbose assimilation in *Gluconobacter suboxydans* IFO 3291. *Journal of Bacteriology* **184**(3): 861-863.

SHINJOH, M., TOMIYAMA, N., MIYAZAKI, T., HOSHINO, T. (2002b). Main polyol dehydrogenase of *Gluconobacter suboxydans* IFO 3255, membrane-bound D-sorbitol dehydrogenase, that needs product of upstream gene, *sldB*, for activity. *Biosci Biotechnol Biochem* **66**(11): 2314-2322.

SIEVERS, M., GABERTHUEL, 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**(2): 123-126.

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

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 Microbiol Biotechnol* **62**(1): 92-98.

SIMON, R., PRIEFER, U., PÜHLER, A. (1983). A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic-engineering - Transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Bio-Technol* **1**(9): 784-791.

-
- STADLER-SZÖKE, A., NYESTE, L., HOLLÓ, J. (1980).** Studies on the factors affecting gluconic acid and 5-ketogluconic acid formation by *Acetobacter*. *Acta Alimentaria* **9**(2): 155-162.
- STUBBS, J. J., LOCKWOOD, L. B., ROE, E. T., TABENKEN, B., WARD, G. E. (1940).** Bacterial production of keto-gluconic acids from glucose. *Ind. Eng. Chem.* **32**: 1626-1632.
- SUGISAWA, T., HOSHINO, T. (2002).** Purification and properties of membrane-bound D-sorbitol dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans* IFO 3255. *Biosci Biotechnol Biochem* **66**(1): 57-64.
- SUGIYAMA, M., SUZUKI, S., TONOUCI, 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**(12): 2524-2532.
- SWANSON, B. L., HAGER, P., PHIBBS, P., JR., OCHSNER, U., VASIL, M. L., HAMOOD, A. N. (2000).** Characterization of the 2-ketogluconate utilization operon in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mol Microbiol* **37**(3): 561-573.
- TORRONTGUEI, D., DIAZ, R., CANOVAS, J. L. (1976).** The uptake of 2-ketogluconate by *Pseudomonas putida*. *Arch Microbiol* **110**(1): 43-48.
- TREVORS, J. T., STRADOUB, M. E. (1990).** Electroporation of pKK1 silver resistance plasmid from *Pseudomonas stutzeri* AG259 into *Pseudomonas putida* CYM318. *Curr Microbiol* **21**: 103-107.
- VAN KLEEF, M. A., DUINE, J. A. (1989).** Factors relevant in bacterial pyrroloquinoline quinone production. *Appl Environ Microbiol* **55**(5): 1209-1213.
- VAN SCHIE, B. J., HELLINGWERF, K. J., VAN DIJKEN, J. P., ELFERINK, M. G., VAN DIJL, 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. Iwoffii). *J Bacteriol* **163**(2): 493-499.
- VAN SCHIE, B. J., ROUWENHORST, R. J., DE BONT, J. A. M., VAN DIJKEN, J. P., KUENEN, J. G. (1987).** An *in vivo* analysis of the energetics of aldose oxidation by *Acinetobacter calcoaceticus*. *Appl Microbiol Biotechnol* **26**: 560-567.
- VELIZAROV, S., BESCHKOV, V. (1998).** Biotransformation of glucose to free gluconic acid by *Gluconobacter oxydans*: substrate and product inhibition situations. *Process Biochem* **33**(5): 527-534.
- WEENK, G., OLIJVE, W., HARDER, W. (1984).** Ketogluconate formation by *Gluconobacter* species. *Appl Microbiol Biotechnol* **20**: 400-405.
-

WOOD, W. A., FETTING, R., HERTLEIN, B. (1962). Gluconic dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens*. *Colowick SP, Kaplan NO (EDS.) Methods Enzymol* **5**: 287-291.

YAMADA, M., ELIAS, M. D., MATSUSHITA, K., MIGITA, C. T., ADACHI, O. (2003). *Escherichia coli* PQQ-containing quinoprotein glucose dehydrogenase: its structure comparison with other quinoproteins. *Biochim Biophys Acta* **1647**(1-2): 185-192.

YANISCH-PERRON, C., VIEIRA, J., MESSING, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**(1): 103-119.

YOZGATLI, H. P. (2002). Dissertation: Unsicherheitsbilanzen in der quantitativen FT-IR-Spektroskopie. Kapitel 5. *Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin*.

ZHENG, Y. J., BRUICE, T. C. (1997). Conformation of coenzyme pyrroloquinoline quinone and role of Ca^{2+} in the catalytic mechanism of quinoprotein methanol dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(22): 11881-11886.

Anhang

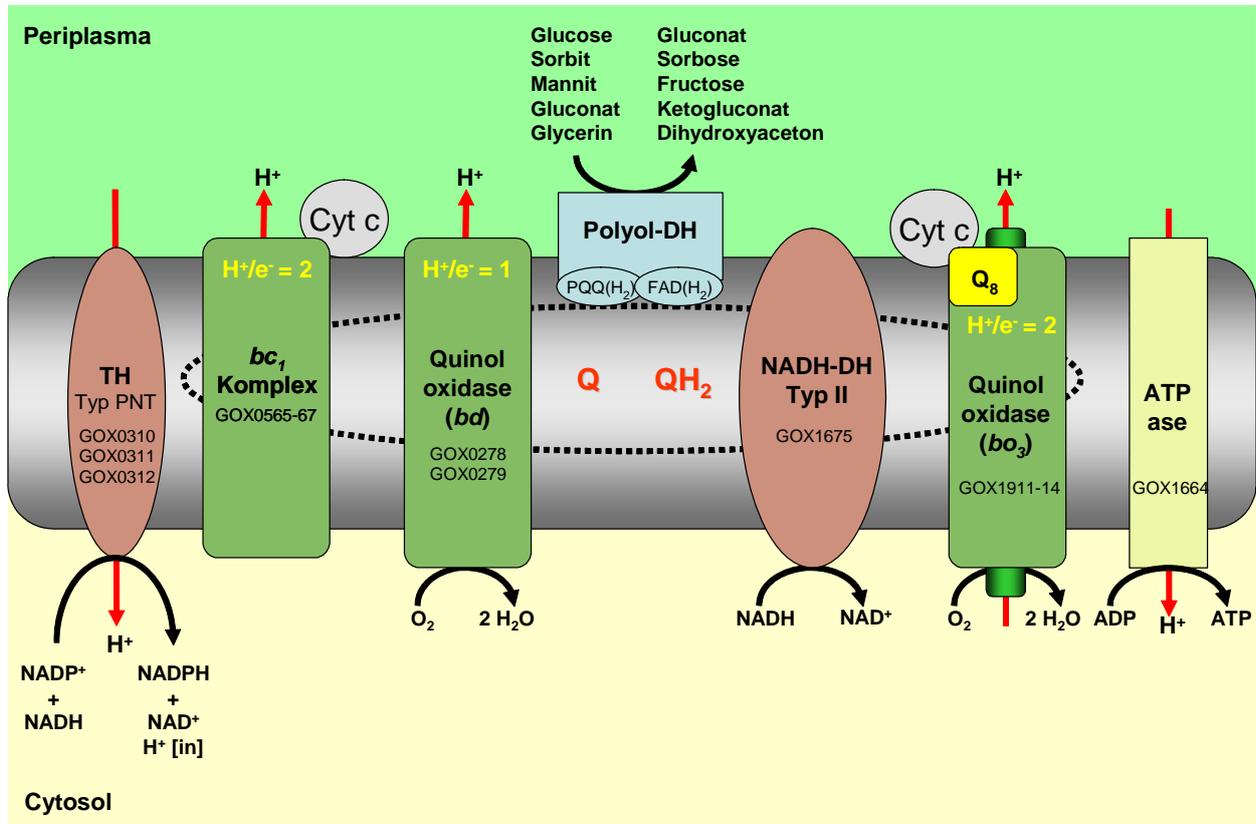


Abbildung 20, Schema der *G. oxydans* Atmungskette

Abkürzungen: DH, Dehydrogenase; TH Typ PNT, Transhydrogenase vom Typ PNT; NADH II, NADH Dehydrogenase vom Typ II; UQ, UQH_2 , oxidierte und reduzierte Form des Ubichinons; Cyt c, Cytochrom c; GOX Offene Leserahmen im Genom von *G. oxydans* 621H; Q_8 , Ubichinon-8. Die gestrichelte Linie stellt den Ubichinon-Pool dar.

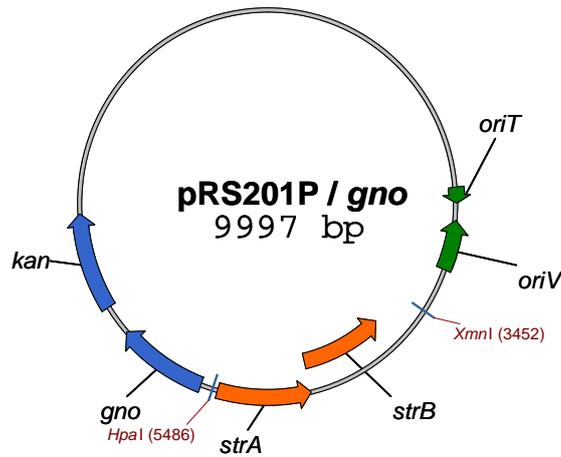


Abbildung 21, Schematische Darstellung des Vektors pRS201P/gno für die homologe Überexpression des *gno*-Gens aus *G. oxydans* DSM 2343

Abkürzungen: *oriT*, Ursprung für die Transfer-Replikation; *oriV*, Ursprung für die vegetative Replikation; *strB*, Gen der Streptomycin Kinase B; *strA*, Gen der Streptomycin-Kinase A; *gno*, Gen der *G. oxydans* Gluconat:NADP⁺ 5-Oxidoreduktase; *kan*, Gen einer Kanamycin-Kinase

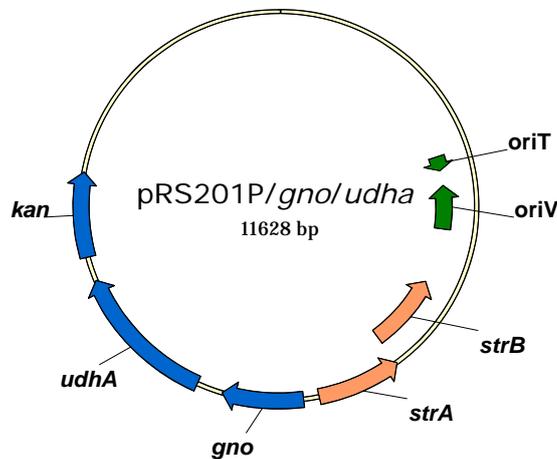


Abbildung 22, Schematische Darstellung des Plasmids pRS201P/gno/udhA

pRS201P/gno/udhA kodiert für die Gluconat:NADP⁺ 5-Oxidoreduktase aus *G. oxydans* und die cytosolische Transhydrogenase UDHA aus *E. coli*

Abkürzungen: *oriT*, Ursprung für die Transfer-Replikation; *oriV*, Ursprung für die vegetative Replikation; *strB*, Gen der Streptomycin Kinase B; *strA*, Gen der Streptomycin-Kinase A; *gno*, Gen der *G. oxydans* Gluconat:NADP⁺ 5-Oxidoreduktase; *kan*, Gen einer Kanamycin-Kinase

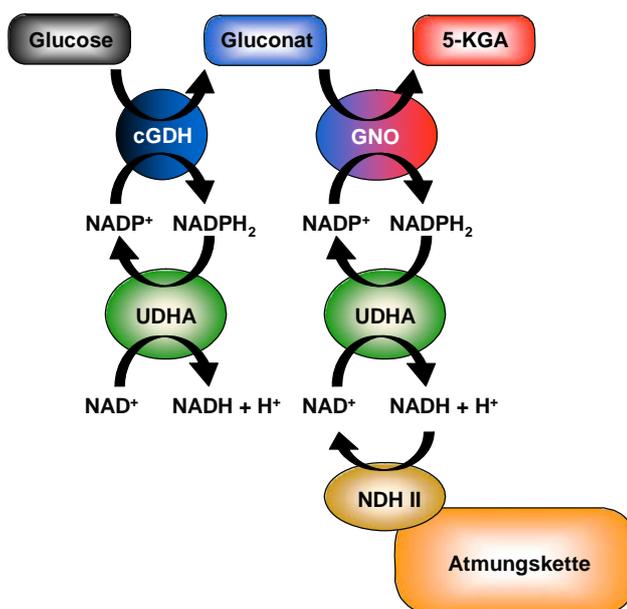


Abbildung 23, Schematische Abbildung der Oxidation von Glucose im Cytosol von *G. oxydans* mit den beteiligten Enzymen und einer zusätzlichen, heterolog überproduzierten Transhydrogenase UDHA aus *E. coli*

Abkürzungen: cGDH, cytosolische Glucose-Dehydrogenase; GNO, Gluconat:NADP⁺ 5-Oxidoreduktase; UDHA, heterologe Transhydrogenase UDHA aus *E. coli*; NDH, membrangebundene NADH-Dehydrogenase (Typ II), gekoppelt an die Atmungskette

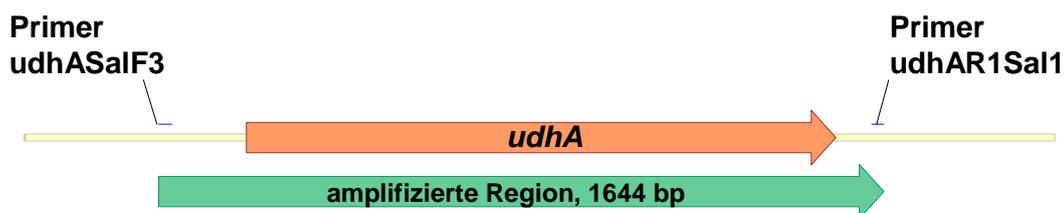


Abbildung 24, Schematische Darstellung des amplifizierten Bereichs des *udhA* Gens aus *E. coli*

Der 1644 bp *udhA* Bereich wurde durch flankierende Primer mit SalI Schnittstellen amplifiziert.

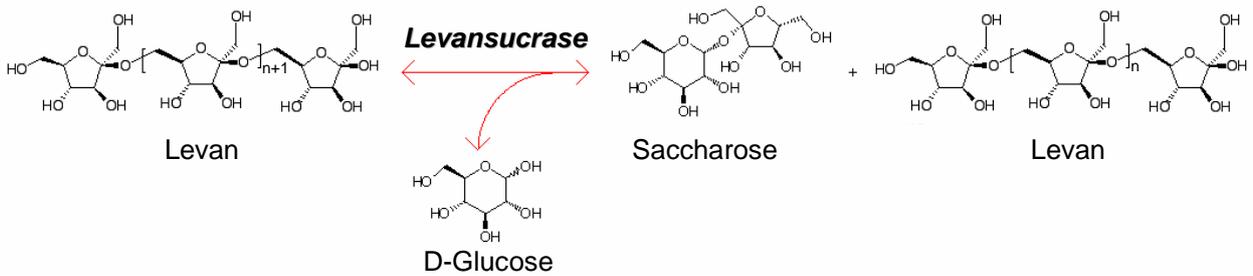


Abbildung 25, Reaktion der Levansucrase (EC 2.4.1.10)

Das für die Zelle störenden Levan wird durch die Verknüpfung von D-Glucose mit Saccharose gebildet. D-Glucose entsteht dabei wahrscheinlich aus der Spaltung von Saccharose in D-Glucose und D-Fruktose durch die cytosolische Invertase (EC 3.2.1.26), welche *G. oxydans* DSM 2343 genomisch kodiert (Quelle: ERGO, Integrated Genomics).

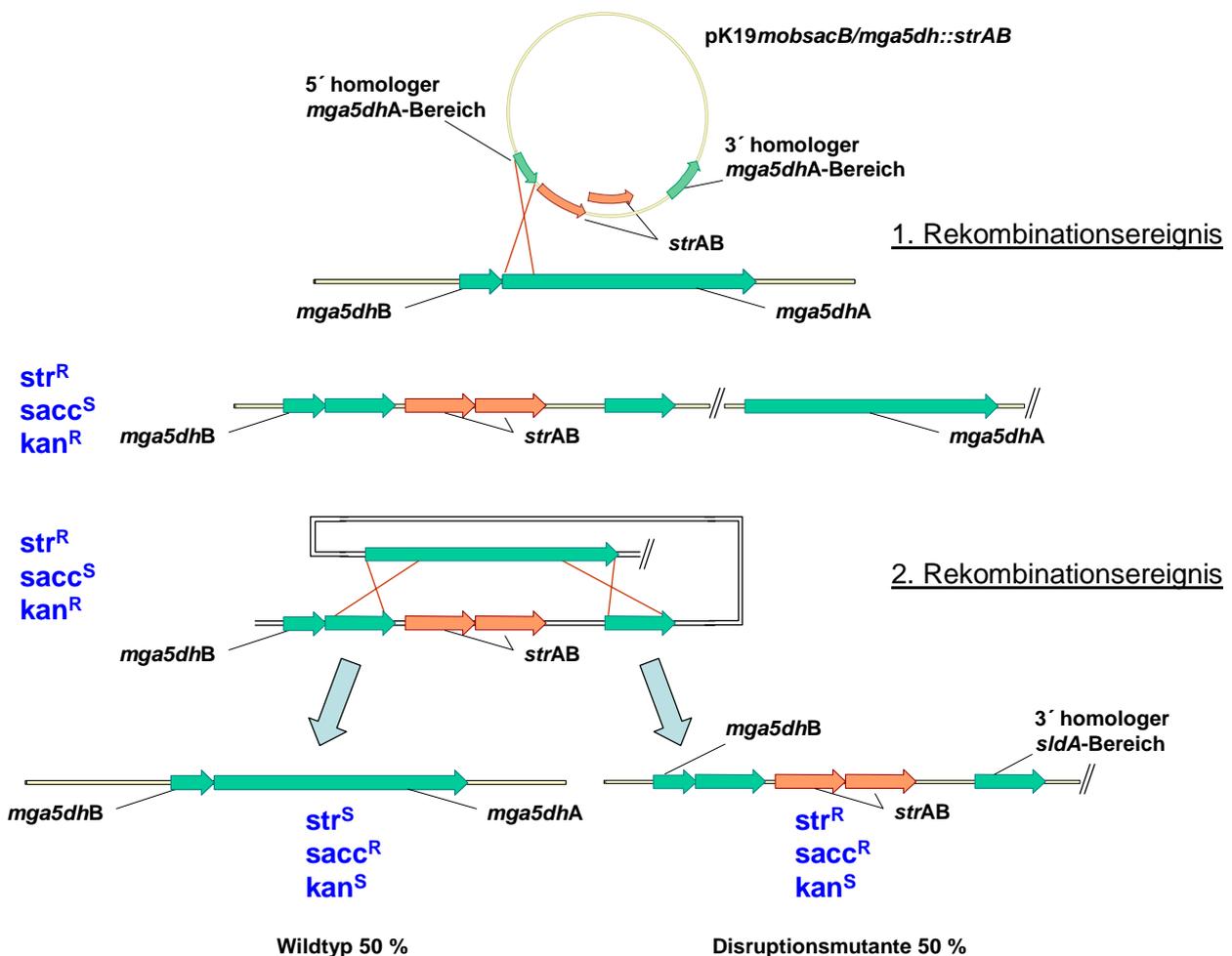


Abbildung 26, Doppelt homologen Rekombination mit dem pk19mobsacB-System

Der Vektor pk19mobsacB/mga5dh::strAB integriert im ersten Rekombinationsereignis in den genomischen homologen Bereich des *mga5dhA*-Gens. Die Zelle ist nun Saccharose-sensitiv und Streptomycin und Kanamycin-resistent. Bei Kultivierung mit Saccharose können nur die Zellen wachsen, bei denen die zweite homologe Rekombination stattgefunden hat. Der gewünschte Zielklon ist Saccharose insensitiv und Streptomycin-resistent.

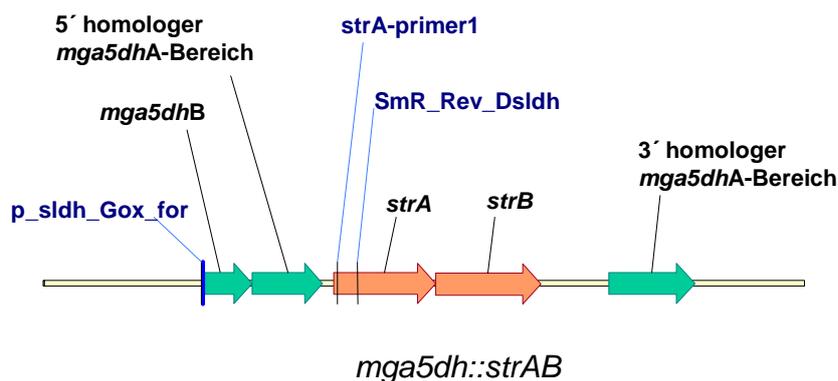


Abbildung 27, Genomischer *mga5dh*-Bereichs nach Rekombination

Abkürzungen: p_sldh_Gox_For, Primer vorwärts; strA-primer1, Primer rückwärts; SmR_Rev_Dsldh, Primer rückwärts.

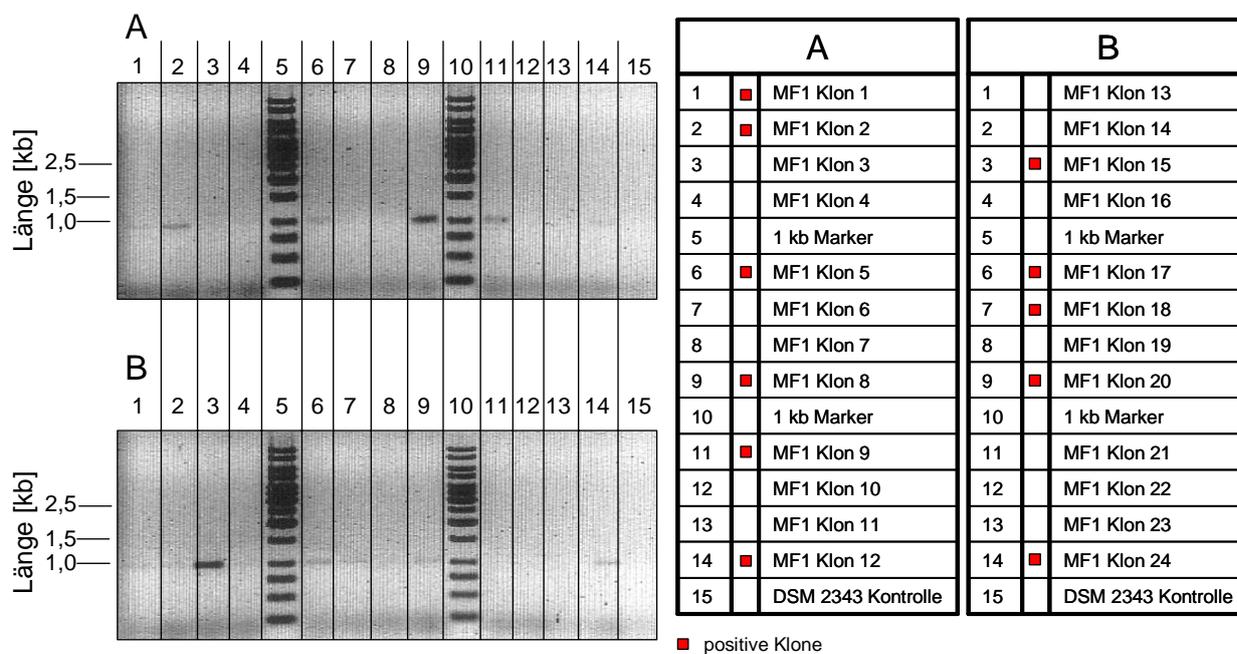


Abbildung 28, Ergebnisse der PCR mit den Primern p_sldh_Gox_for und SmR_Dsldh_Rev, invertiertes Bild

Die PCR-Produkte zum Nachweis der Integration des *strAB*-Operons in das *mga5dhA*-Gen wurden über ein 0,8 % Agarosegel aufgetrennt. Bei 11 *G. oxydans* MF1 Klonen konnte eine Bande von ca. 1106 bp nachgewiesen werden, welche der erwarteten Länge für eine Integration entspricht

Tabelle 17, Auflistung der Enzyme des Zuckermetabolismus in *G. oxydans* DSM 2343

Die am Zuckermetabolismus beteiligten Enzyme sind in dieser Tabelle. Mit Name, EC-Nummer, Nummer des Offenen Leserahmens aus *G. oxydans* DSM 2343, bzw. der Gennummer und der ggfs. vorhandener Literaturnachweise

#	Name des Enzyms	EC Nummer	ORF	Referenzen
01	Glucose-Dehydrogenase, mGDH, PQQ	1.1.5.2	GOX0516	(Ameyama <i>et al.</i> , 1981; Elias <i>et al.</i> , 2001)
02	Gluconolactonase	3.1.1.17	GOX1375 GOX1381	
03	Gluconat-2-Dehydrogenase, mGA2DH, FAD	1.1.99.3	GOX1230-1232	(Matsushita <i>et al.</i> , 1982)
04	Sorbit-Dehydrogenase, PQQ	1.1.99.21	GOX0854	(Shinagawa <i>et al.</i> , 1982; Shinjoh <i>et al.</i> , 2002b)
05	Zucker-Protonen Symporter	-	GOX1047 GOX0925	
06	Gluconat-Permease, gntP	-	GOX2188	(Klemm <i>et al.</i> , 1996)
07	2-KGA Transporter	-		(Torrontegui <i>et al.</i> , 1976)
08	Zucker Aufnahme Protein	-		-
09	Glucose-1-Dehydrogenase, cGDH, NADP ⁺	1.1.1.47	GOX2015	
10	Gluconat-2-Reduktase, 2-KGAR	1.1.1.215	GOX0417	(Ameyama, 1982)
11	Gluconat:NADP ⁺ 5-Oxidoreduktase, GNO	1.1.1.69	GOX2187	(Klasen <i>et al.</i> , 1995)
12	Aldose-1-Epimerase	5.1.3.3	GOX0748	
13	Glucokinase	2.7.1.2	GOX2419	
14	Glucose-6-Phosphat Isomerase, PGI	5.3.1.9	GOX1704	(Sugiyama <i>et al.</i> , 2003)
15	Glucose-6-Phosphat-1-Dehydrogenase	1.1.1.49	GOX0145	
16	6-Phosphogluconolactonase	3.1.1.31	GOX1707	
17	Gluconokinase, gntK	2.7.1.12	GOX1709	
18	6-Phosphogluconate-Dehydratase	4.2.1.12	GOX0431	(Meloche & Wood, 1964)
19	6-Phosphogluconate-Dehydrogenase	1.1.1.44	GOX1705	
20	Sorbit/Mannit Transport Protein	-	GOX2183-2185	
21	L-Sorbose Reduktase, NADP ⁺	1.1.1.14	GOX2430	(Shinjoh <i>et al.</i> , 2002a)
22	Sorbit-Dehydrogenase, NAD ⁺	1.1.1.14	GOX0313	(Adachi <i>et al.</i> , 1999a)

23	Fructokinase	2.7.1.4	GOX0612	
24	(Sorbit)/Mannit-Dehydrogenase	1.1.2.2	GOX0854	(Cho <i>et al.</i> , 1990; Shinjoh <i>et al.</i> , 2002b)
25	Mannit-2-Dehydrogenase, NAD(P) ⁺	1.1.1.67	GOX0849	
26	Fructose-1,6-bis-Phosphatase	3.1.3.11	GOX1516	
27	Ribose-5-Phosphat-Isomerase	5.3.1.6	GOX1708 GOX2218	
28	Ribulose-Phosphat-3-Epimerase	5.1.3.1	GOX1352	
29	6-Phospho-Gluconate-Dehydratase, edd	4.2.1.12	GOX0431	
30	Transketolase	2.2.1.1	GOX1703	
31	Transaldolase, TAL	2.1.1.2	GOX1704	(Sugiyama <i>et al.</i> , 2003)
32	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase	1.2.1.12	GOX0508	
33	3-Phosphoglycerat Kinase, PGK	2.7.2.3	GOX0507	
34	Phosphoglycerat Mutase	5.4.2.1	GOX0330 GOX0965	
35	Enolase, ENO	4.2.1.11	GOX2279	
36	Pyruvat Kinase, PYK	2.7.1.40	GOX2250	
37	Fructose-bis-Phosphat Aldolase	4.1.2.13	GOX0780 GOX1540	
38	Triose-Phosphat Isomerase	5.3.1.1	GOX2217 GOX2284	
39	Dihydroxy-Aceton Kinase	2.7.1.29	GOX2222	
40	(Sorbit)/Glycerin Dehydrogenase	1.1.99.22	GOX0854	(Ameyama <i>et al.</i> , 1985b; Shinjoh <i>et al.</i> , 2002b)
41	Sorbit-Dehydrogenase, FAD, Cyt c	1.1.99.21	GOX2094- 2097	(Choi <i>et al.</i> , 1995)

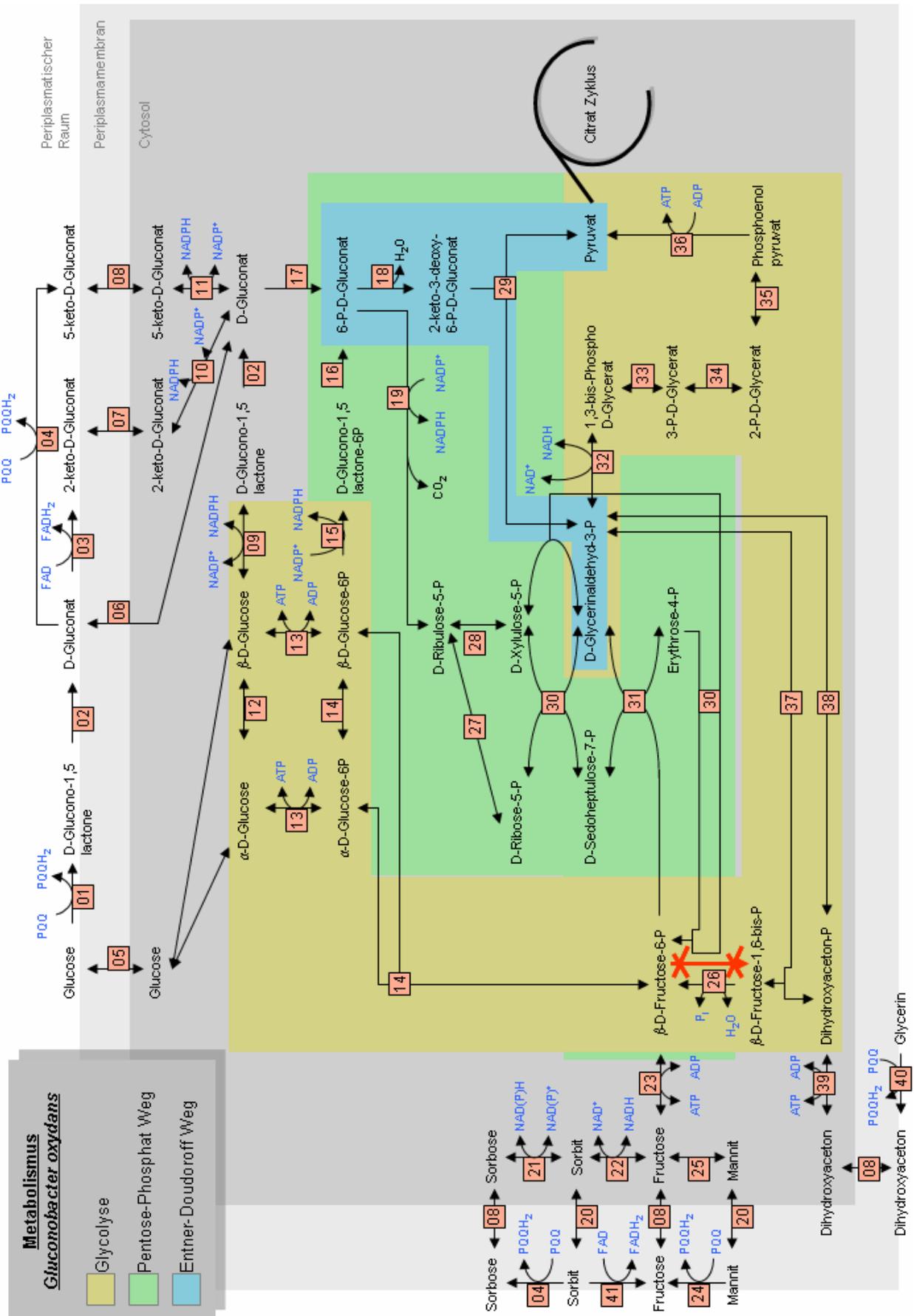


Abbildung 29, Postulierter Zuckermetabolismus in *G. oxydans* DSM 2343

Danksagung

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

Zuallererst danke ich Herrn Prof. Dr. H. Sahm für die Bereitstellung des Themas, sein großes Interesse an der Entwicklung und dem Fortschritt der Ergebnisse und für seine Unterstützung bei Fragen und Problemen.

Herrn Prof. Dr. K.-E. Jäger danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Frau Dr. S. Bringer-Meyer und Frau Dr. U. Herrmann danke ich für die vielen aufschlussreichen Gespräche, Ratschläge und Anregungen, die ich während meiner Promotion erhalten habe.

Herrn Prof. Dr. H. Görisch danke ich für die Bereitstellung des *G. oxydans* Stammes MF1, sowie für den freundlichen Aufenthalt an der TU Berlin im Rahmen der Kooperation.

Mein herzlicher Dank gilt meinen Büro- und Laborkollegen Sandra Johnen, Verena Werner, Vera Krajewski, Christoph Bremus, Tobias Georgi und Peter Kreutzenbeck für die sehr gute und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und die immer große Hilfsbereitschaft.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Biotechnologie 1, insbesondere Ursula Degner, Conny Gätgens, Christina Mack und Doris Rittmann für die ständige Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Frau Nadja, die mir während der Promotion zusammen mit unserer dreijährigen Tochter Leonie mit viel Verständnis, Geduld und Unterstützung zur Seite gestanden hat.

Ebenso herzlich danke ich meinem Vater und meiner Mutter, die mir meine Ausbildung erst ermöglicht haben.

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 30.04.2006

(Marcel Merfort)

