

**Untersuchungen zur Bildung der Vitamin C-Vorstufe
2-Keto-L-Gulonsäure mit *Gluconobacter oxydans***

Inaugural-Dissertation

zur

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

vorgelegt von
Christoph Bremus
aus Düsseldorf

Oktober 2006

Teile der vorliegenden Dissertation erschienen in folgenden Publikationen:

- **Bremus, C., Bringer-Meyer, S., Herrmann, U., Sahm, H. (2007).** The influence of *pgi/tal* gene on growth yield of *Gluconobacter oxydans*. (in Vorbereitung).
- **Bremus, C., Herrmann, U., Bringer-Meyer, S., Sahm, H. (2006).** The use of microorganisms in L-ascorbic acid production. *J Biotechnol* **124**: 196-205.
- **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.

Teile der vorliegenden Dissertation erschienen in folgenden

Patentanmeldungen:

- **Bremus, C., Bringer-Meyer, S., Herrmann, U., Mouncey, N., Sahm, H. (2006a).** Novel biological process. Europäische Patentanmeldung, EP 06013092.9, PT 0.2522.
- **Bremus, C., Bringer-Meyer, S., Herrmann, U., Mouncey, N., Sahm, H. (2006b).** Novel biological process. Europäische Patentanmeldung, EP 06013091.1, PT 0.2522.
- **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.

Aus dem Institut für Biotechnologie I
des Forschungszentrums Jülich GmbH

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

Referent: Prof. Dr. Hermann Sahm

Koreferent: Prof. Dr. Karl-Erich Jäger

Tag der mündlichen Prüfung: 10.11.2006

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis	1
II. Einleitung	3
1. Das Essigsäurebakterium <i>Gluconobacter oxydans</i> und dessen Stoffwechsel	3
2. Verwendung, Eigenschaften und Herstellung von Vitamin C	6
3. Die Oxidation von Sorbitol zu 2-Keto-L-Gulonsäure.....	8
4. Zielsetzung der Arbeit	11
III. Material und Methoden	12
1. Bakterienstämme	12
2. Plasmide und DNA-Fragmente	14
2.1 Plasmide.....	14
2.2 Oligonukleotide.....	15
3. Chemikalien, Biochemikalien und Enzyme	16
4. Antibiotika	17
5. Nährmedien	17
6. Lösungen und Puffer.....	19
7. Laborgeräte, Filter und Gefäße.....	20
8. Kultivierung und Stammhaltung	20
9. Molekularbiologische Methoden.....	23
9.1 Plasmid-Transformation von <i>E. coli</i> und <i>G. oxydans</i>	23
9.2 Isolierung von DNA aus <i>E. coli</i> und <i>G. oxydans</i>	24
9.3 Agarosegelelektrophorese von DNA	24
9.4 Reinigung und Aufkonzentration von DNA	24
9.5 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen.....	25
9.6 Enzymatische DNA-Reaktionen	25
9.7 Polymerase-Kettenreaktion	26
9.8 Ortsgerichtete Mutagenese	27
9.9 Kassettenmutagenese.....	27
9.10 DNA-Sequenzierung.....	28
9.11 Northern Blot-Analyse	28
9.12 DNA-Mikroarray-Analyse	29
10. Biochemische Methoden.....	29
10.1 Proteinkonzentrationsbestimmung	29
10.2 Zellaufschluss und Fraktionierung.....	29
10.3 Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen.....	30
10.4 Bestimmung von Enzymaktivitäten.....	31
11. Bioanalytische Methoden	36
11.1 Enzymatische Glukosebestimmung.....	36
11.2 Bestimmung von Metaboliten mittels HPLC	36
11.3 Massenspektroskopie.....	37
IV. Ergebnisse	39
1. Wachstum und Produktbildung verschiedener <i>G. oxydans</i> -Stämme	39
1.1 Wachstum und Substratumsatz mit Sorbitol als C-Quelle	39
1.2 Wachstum und Substratumsatz mit Glukose als C-Quelle	41
1.3 Wachstum und Substratumsatz mit Mannitol als C-Quelle.....	45
1.4 Wachstum mit Glycerin als C-Quelle	46
1.5 Auswahl von <i>G. oxydans</i> DSM 2343 zur Konstruktion von rekombinanten 2-KGLA- Produktionsstämmen.....	46
1.6 Bestimmung der optimalen Sorbitolkonzentration für <i>G. oxydans</i> DSM 2343	48

2. Konstruktion von 2-KGLA-Produktions-Stämmen und Expressionsanalysen ...	49
2.1 Klonierung der Gene von SDH, cSNDH und mSNDH	49
2.2 Expression der heterolog eingebrachten Gene	53
3. Ganzzellbiotransformation von Sorbitol zu 2-Keto-L-Gulonsäure	59
3.1 Ganzzellbiotransformation mit ruhenden Zellen	59
3.2 Ganzzellbiotransformation mit wachsenden Zellen	61
4. Untersuchungen zur Sorboseassimilation.....	68
4.1 Identifizierung des Pentosephosphatwegs als Hauptstoffwechselweg bei Wachstum auf Sorbitol	70
4.2 Einfluss der Phosphoglucoseisomerase- und Transaldolase-Aktivitäten auf den Pentosephosphatweg	74
5. Einfluss der PGI/TAL-Überproduktion auf den Glukosestoffwechsel	79
V. Diskussion	81
1. Stammauswahl zur Konstruktion eines mikrobiellen 2-KGLA-Produktions- systems.....	81
2. Konstruktion und Charakterisierung von 2-KGLA-Produktionsstämmen.....	82
3. Sorbitol-Ganzzellbiotransformation/ 2-KGLA-Produktion	84
4. Sorboseassimilation in verschiedenen <i>G. oxydans</i> -Stämmen	88
5. Vorteile von <i>G. oxydans</i> DSM 2343 gegenüber dem Industriestamm <i>G. oxydans</i> N44-1	90
VI. Zusammenfassung.....	92
VII. Literaturverzeichnis	93
VIII. Anhang.....	104

I. Abkürzungsverzeichnis

2,5-dKGA	2,5-di-Keto-Glukonat
2-KGA	2-Keto-D-Glukonat
2-KGLA	2-Keto-L-Gulonat
5-KGA	5-Keto-D-Glukonat
ADH	Alkoholdehydrogenase
BFM/ BTM	Biofeuchtmasse/ Biotrockenmasse
bp, Kb, Mb	Basenpaare, Kilo-Basenpaare (10^3 bp), Mega-Basenpaare (10^6 bp)
Cef	Cefoxitin
cSLDH	zytosolische Sorbitoldehydrogenase
cSNDH	zytosolische Sorbosondehydrogenase
Cyt c	Cytochrom c
DPIP	2,6-Dichlor-indophenol
EC	Enzyme Commission, Enzymatisch Nomenklatur nach Funktionalität
F-1,6-BPase	Fruktose-1,6-bis-phosphatase
FK	Fruktokinase
Glyc-3-@-DH	Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase
Gm	Gentamycin
HPLC	„High Performance Liquid Chromatographie“= hochauflösende Flüssigchromatographie
Kan	Kanamycin
KPP-Puffer	Kaliumphosphat-Puffer
LDH	Laktatdehydrogenase
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight - MS
mLDH	membrangebundene Laktatdehydrogenase
MQW	Maisquellwasser
MS	Massenspektroskopie
mSLDH	membrangebundene Sorbitoldehydrogenase
mSNDH	membrangebundene Sorbosondehydrogenase
n.d.	„not determined“ = nicht bestimmt
NP-H ₂ O	Nanopure-Wasser = bidestilliertes Wasser
OD _{x nm}	optische Dichte bei Wellenlänge x nm
ORF	„open reading frame“ = offener Leserahmen

I. Abkürzungsverzeichnis

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	„polymerase chain reaction“ = Polymerasekettenreaktion
PDC	Pyruvatdecarboxylase
PGI	Phosphoglukoseisomerase
PMS	Phenazinmethasulfat
PPW	Pentosephosphatweg
RT	Raumtemperatur
SDH	Sorbosedehydrogenase
SDS	Natriumdodecylsulfat
Str	Streptomycin
TAL	Transaldolase
TCC	Tricarbonsäure-Zyklus
TE	Tris/EDTA-Puffer
T _m	Schmelztemperatur
TPI	Triosephosphatisomerase
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
(v/v)	Volumen pro Volumen
VE-H ₂ O	voll entsalztes Wasser
(w/v)	„weight per volume“ = Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
ε _x	molarer Extinktionskoeffizient bei Wellenlänge x nm

Die in dieser Arbeit verwendeten Ein- und Dreibuchstaben-Notierungen für Aminosäuren sowie die benutzten Abkürzungen für Nukleinsäure-Bausteine und alle physikalischen Größen entsprechen der Konvention der „International Union for Biochemistry“ (Lébecq, 1978).

II. Einleitung

1. Das Essigsäurebakterium *Gluconobacter oxydans* und dessen Stoffwechsel

Das Gram-negative und obligat aerobe Bakterium *G. oxydans* (Abb. 1) gehört zu der Familie der *Acetobacteraceae*, ist stäbchenförmig und $0,8\ \mu\text{m} \times 4,0\ \mu\text{m}$ groß. Die Bezeichnung *Acetobacteraceae* (Essigsäurebakterien) beruht auf der Tatsache, dass diese Organismen sehr effizient Ethanol zu Acetat oxidieren (De Ley und Swings, 1981; De Ley *et al.*, 1984; Ruiz *et al.*, 2000; Matsushita *et al.*, 1992; Toyama *et al.*, 2004). Die *Acetobacteraceae* lassen sich in die Gattungen *Acetobacter* und *Gluconobacter* unterteilen. Dabei können *Gluconobacter*-Spezies im Gegensatz zu *Acetobacter*-Spezies weder Acetat noch Laktat zu H_2O und CO_2 oxidieren (De Ley *et al.*, 1984). Aus der Gattung *Gluconobacter* gehen die Spezies *G. asaii*, *G. cerinus*, *G. frateurii* und schließlich auch *G. oxydans* hervor (De Ley *et al.*, 1984). Zwischen den vier Spezies ist eine Differenzierung anhand der Fähigkeit, auf bestimmten Zuckeralkoholen bzw. ohne das Vitamin Nicotinsäure zu wachsen, möglich (Katsura *et al.*, 2002). Eine eindeutigere Differenzierung von *Gluconobacter* Spezies ist nur durch 16S-rRNA-Vergleich möglich (Sievers *et al.*, 1995).

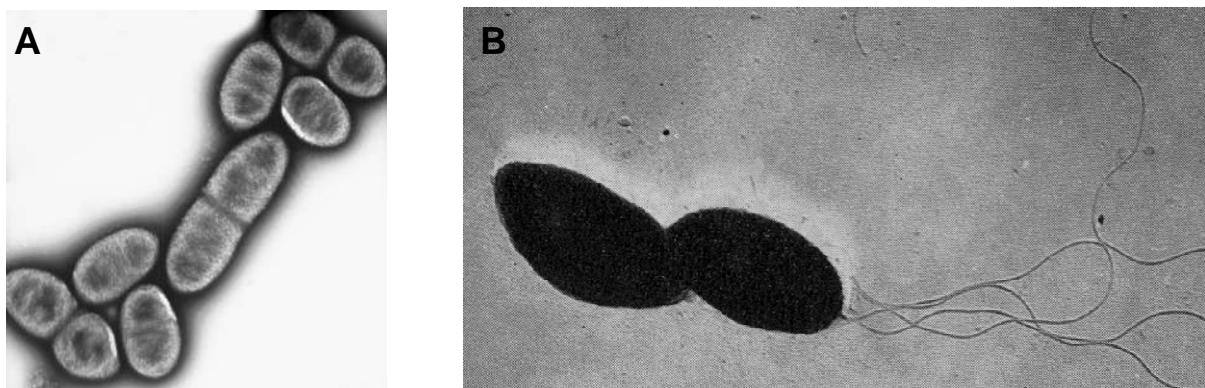


Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *G. oxydans*: A) mit freundlicher Genehmigung von Dr. A. Ehrenreich, Institut für Mikrobiologie und Genetik, Georg-August-Universität Göttingen); B) Auf Sauerstofflimitierung reagiert *G. oxydans* mit Ausbildung einer polaren Begeißelung.

Die natürlichen Habitate von *G. oxydans* sind z. B. Früchte, Blütennektar, Wein, Bier und andere vergorene Getränke (Battey und Schaffner, 2001; Gupta *et al.*, 2001). *G. oxydans* wächst besonders gut bei Temperaturen zwischen 25 und 30°C auf den C-Quellen Mannitol, Glukose, Fruktose, Glycerin oder Sorbitol (De Ley *et al.*, 1984; Olijve und Kok, 1979a), wobei Mannitol die für die Biomasseproduktion optimale C-Quelle darstellt (Gosselé *et al.*, 1980). Das pH-Optimum liegt zwischen pH 5 und pH 6, jedoch ist *G. oxydans* auch unterhalb von pH 3 noch in der Lage, zu wachsen (Olijve und Kok, 1979a).

Während *Acetobacter* und die meisten aeroben Bakterien ihre Substrate vollständig zu H_2O und CO_2 veratmen und nur unter limitierenden Wachstums-

bedingungen Zwischenprodukte angehäuft werden (Fritsche, 1999), bildet *Gluconobacter* eine Ausnahme (Asai, 1968). Aufgrund der fehlenden Succinat-Dehydrogenase und Succinyl-CoA-Synthetase (Prust *et al.*, 2005) und des somit unterbrochenen Zitratzyklusses (TCC) werden die C-Quellen nur unvollständig oxidiert und Zwischenprodukte akkumuliert. Dadurch werden, im Gegensatz zur vollständigen Oxidation, weniger Reduktionsäquivalente (NADH, FADH) für die Energiegewinnung bei der Endoxidation in der Atmungskette bereitgestellt. Dies wird in *G. oxydans* durch eine Vielzahl von Membran- bzw. Atmungsketten-assoziierten Dehydrogenasen (>20 Zucker-/Polyol-DH, >30 Alkohol-DH und >80 DH/ Reduktasen mit unbekannter Funktion) ausgeglichen, da die bei den Oxidationsreaktionen entstehende Elektronen direkt über PQQ und FAD in die Atmungskette eingeschleust werden und somit zur Erzeugung eines Protonengradienten beitragen (Prust *et al.*, 2005). Die große Anzahl stereo- und regioselektiver Dehydrogenasen, die relativ unspezifisch, aber sehr effizient viele verschiedene Zucker, Zuckeralkohole, Alkohole und Polyole oxidieren, macht *G. oxydans* interessant für zahlreiche biotechnische Anwendungen. Ein weiterer Vorteil von *G. oxydans* für biotechnische Produktionsmethoden ist die Fähigkeit, in konzentrierten Zuckerlösungen und bei niedrigen pH-Werten zu wachsen. Darüber hinaus findet eine oft quantitative Umsetzung der Substrate in die oxidierten Produkte bei sehr geringer Biomassebildung statt. Da ein Großteil der Oxidationsreaktionen an der Membran stattfindet und die Produkte in den periplasmatischen Raum bzw. ins Medium abgegeben werden, entfällt häufig der Substrat- und Produkt-Transport durch die Zellmembran als limitierender Faktor und die Produktaufreinigung ist einfacher als die von zytosolischen Produkten, da ein Zellaufschluss nicht notwendig ist. Beispiele für biotechnische Anwendungen von *G. oxydans* findet man in der Produktion von Speiseessig, verschiedenen Geschmacks- bzw. Süßstoffen und dem Diabetesmedikament Miglitol (Schedel, 2000). Auch die Umsetzungen von Glycerin zu dem Bräunungsmittel Dihydroxyaceton (Claret *et al.*, 1994) und von Glukose zu Glukonat (Pronk *et al.*, 1989), das als Schmutzlöser in der Textilindustrie Verwendung findet, werden mit Hilfe von *G. oxydans* durchgeführt. Weitere Einsatzgebiete sind die Produktion von 5-Keto-Glukonat (Vorstufe von L-(+)-Weinsäure) aus Glukose (Merfort *et al.*, 2006; Elfari *et al.*, 2005) und bereits etablierten Verfahren zur Herstellung von Vitamin C (Kap. II/3).

Um einen Überblick über das Stoffwechselfpotential zu bekommen, wurde die vollständige Sequenz des Genoms von *G. oxydans* DSM 2343 ermittelt (Prust, 2004). Neben dem bakteriellen Chromosom von 2,7 Mb besitzt *G. oxydans* DSM 2343 vier Plasmide (26,6 Kb; 14,6 Kb; 13,2 Kb und 2,7 Kb) und ein Mega-

plasmid (163,1 Kb). Der GC-Gehalt der genomischen DNA ist mit 61 % im Vergleich zu anderen Bakterien hoch (De Ley *et al.*, 1984; Prust *et al.*, 2005). Bis heute wurden 2664 putative proteinkodierende ORFs annotiert, wovon 1877 ORFs eine Funktion zugeordnet werden konnte (Prust *et al.*, 2005). Das Vorhandensein von 18 Insertionselementen und 103 Transposasen (Prust *et al.*, 2005) verdeutlicht die von Kondo und Horinouchi (1997) beobachtete Instabilität bzw. Variabilität des *G. oxydans*-Genoms.

Der Stoffwechsel von *G. oxydans* ist zweigeteilt (Kitos *et al.*, 1958). Mit dem membrangebundenen Enzymsystem, bestehend aus zahlreichen Dehydrogenasen zur direkten Oxidation verschiedener Zucker und Polyole, werden Elektronen generiert, die unmittelbar zur Energiegewinnung in die Atmungskette (Abb. 29, im Anhang) eingeschleust werden (Olijve und Kok, 1979a; Shinjoh *et al.*, 1990). Zur Biomassebildung hingegen müssen die C-Quellen in die Zelle geschleust werden, wofür jedoch kein vollständiges PTS-System zur Verfügung steht (Prust *et al.*, 2005). Im Zellinneren erfolgt dann die Oxidation der phosphorylierten Substrate im Zentralstoffwechsel (Shinjoh *et al.*, 1990). Dabei ist der TCC, wie oben beschrieben, unterbrochen und dient in *G. oxydans* nur als Vorstufenlieferant für verschiedene Biosynthesewege. Zum internen Abbau der C-Quelle bleiben *G. oxydans* deshalb nur Teile der Glykolyse (Prust *et al.* (2005) konnten im Genom von *G. oxydans* DSM 2343 kein Phosphofruktokinase-Gen annotieren), der Entner-Doudoroff-Weg (KDPG-Weg) und der Pentosephosphat-Weg (PPW, Shinjoh *et al.*, 1990). Die aus der Genomsequenz abgeleiteten Stoffwechselwege zum Zuckerabbau sind in Abb. 28 und Tab. 25 im Anhang aufgezeigt (Prust *et al.*, 2005). Es wurden verschiedene Hinweise darauf gefunden, dass der C-Quellen-Abbau hauptsächlich über den PPW erfolgt (Kitos *et al.*, 1958; De Ley und Swings, 1984; Shinjoh *et al.*, 1990). So zeigten radioaktive C¹⁴-Markierungsexperimente, in denen 6 % der Glukose zu CO₂ abgebaut wurden und die Decarboxylierung ausschließlich am C₁-Atom erfolgte, dass in *Acetobacter aceti*, einem nahen Verwandten von *G. oxydans*, der PPW den Hauptabbauweg für Glukose darstellt (Fluckiger und Ettliger, 1977). Sowohl der PPW als auch der KDPG-Weg werden in *G. oxydans* reguliert. Ein Beispiel dafür ist die Hemmung beider Stoffwechselwege durch Glukonat und dessen Folgeprodukte (Godjevargova *et al.*, 2004; Velizarov und Beschkov, 1998). Insbesondere werden die 6-Phosphoglukonat-Dehydratase (Meloche und Wood, 1964; Robin und Kepes, 1975; Peekhaus *et al.*, 1998), die 6-Phosphoglukonat-DH (Moritz *et al.*, 2000) und die Phosphoglukose-Isomerase (Takama und Nosoh, 1982) in verschiedenen Organismen auf diese Weise reguliert.

2. Verwendung, Eigenschaften und Herstellung von Vitamin C

Vitamin C (L-Ascorbinsäure), ein wasserlösliches Vitamin (Rosenberg, 1942), ist essentiell für Primaten und einige andere Säugetiere, weil diese nicht in der Lage sind, es selbst zu synthetisieren (Chatterjee, 1973; Sauberlich, 1994; Smirnoff, 2001). Die Haupteigenschaft von Vitamin C ist seine Reduktionskraft, die ausreicht um Cytochrom a, Cytochrom c und molekularen Sauerstoff zu reduzieren. Deshalb dient Vitamin C in der Zelle, und dort speziell in den Mitochondrien, als Sauerstoffradikalfänger und Antioxidant sowie im Blut als Redoxpuffer (Wenzel *et al.*, 2004; Linetsky *et al.*, 1998, Kojo, 2004; Jacob und Sotoudeh, 2002). Des Weiteren wird Vitamin C beim Katabolismus von Tyrosin als Kofaktor benötigt (Powers *et al.*, 1994) und spielt bei der Synthese bzw. Regeneration von Vitamin E, Epinephrin, Gallensäure und Steroiden (Wenzel *et al.*, 2004, Chan, 1993) sowie im Immunsystem und bei der Signaltransduktion eine Rolle (De Tullio und Arrigoni, 2004). Die wichtigste Reaktion, bei der Vitamin C als Kofaktor dient, ist die Hydroxylierung von Prolin bei der Kollagensynthese; Vitamin C reduziert das Eisenatom im aktiven Zentrum der Prolylhydroxylase (Salnikow, *et al.*, 2004; Counts *et al.*, 1978). Somit ist Vitamin C essentiell für die Entstehung und Reparatur von verschiedenen Geweben und Knochensubstanz. Als Folge von Vitamin C-Mangel treten daher Krankheiten wie z. B. Skorbut auf (May und Qu, 2005). Daher ergeben sich zahlreiche Anwendungen in der pharmazeutischen Industrie und etwa 50 % der kommerziell produzierten L-Ascorbinsäure wird in Pharmaprodukten eingesetzt (Bremus *et al.*, 2006). Beispiele sind Lotionen für die Hautpflege und Wundheilung (Lupo, 2001), sowie Medikamente zur Prophylaxe von degenerativen Erkrankungen, Infektionen und Krebs (Chen *et al.*, 2005). Im Zusammenhang mit Krebs wurde nachgewiesen, dass Vitamin C in der Zellapoptose involviert ist und darüber hinaus die spontanen Mutationsraten senkt (Wenzel *et al.*, 2004; Salnikow, *et al.*, 2004). Ein weiterer Konsument von kommerziell produziertem Vitamin C ist die Lebensmittel- (25 %), Getränke- (15 %) und Tierfutter-Industrie (10 %), wo Vitamin C als Antioxidant, Konservierungs- und Säuerungsmittel Verwendung findet (Mihalev *et al.*, 2004; Pilizota und Subaric, 1998; Bauernfeind und Pinkert, 1970; Hancock und Viola, 2005; Lindley, 1998; Chauhan *et al.* 1998; Madej und Grzeda, 1998; Maeland und Waagbo, 1998). So ergibt sich ein stetig steigender Markt von mittlerweile ca. 110.000 Tonnen produziertem Vitamin C pro Jahr (Macauley *et al.*, 2001), was bei einem Marktpreis von 6 – 8 US\$/kg einem Jahresumsatz von mehr als 600 Millionen US\$ entspricht (Chotani *et al.*, 2000).

Im Jahr 1928 wurde Vitamin C erstmals aus Nebennieren (Szent-Györgyi, 1928) und wenig später auch aus Pflanzengewebe isoliert (Herbert *et al.*, 1933; Svirbely und Szent-Györgyi, 1933; Svirbely und Szent-Györgyi, 1932; Waugh und King,

1932). In China wird Vitamin C auch heute noch größtenteils aus Zitrusfrüchten gewonnen. Die erste chemische Synthese aus L-Xyloson wurde 1933 durchgeführt (Haworth and Hirst, 1933; Reichstein *et al.*, 1933) und ein Jahr später wurde von Reichstein die Vitamin C-Synthese aus D-Glukose beschrieben (Reichstein und Grüssner, 1934). Mit diesem so genannten „Reichstein-Verfahren“ wird heute noch von den Firmen Roche, BASF und Takeda ein Großteil des kommerziell produzierten Vitamin C hergestellt (Boudrant, 1990). Einer chemischen Reduktion von D-Glukose zu D-Sorbitol folgt eine regiospezifische Biotransformation von D-Sorbitol zu L-Sorbose mit *G. oxydans*. Da nur das L-Isomer der Ascorbinsäure biologisch aktiv ist (Florent, 1986), war diese stereospezifische Oxidation mit *G. oxydans* ein großer Fortschritt und eine aufwändige Schutzgruppen-Chemie kann umgangen werden (Boudrant, 1990). Durch sich anschließende chemische Reaktionen entsteht 2-Keto-L-Gulonsäure (2-KGLA), die mit einer Gesamtausbeute von 50 % in L-Ascorbinsäure überführt werden kann (Boudrant, 1990).

Aufgrund der hohen Temperaturen und Drücke, die einige der chemischen Schritte erfordern, ist das industrielle Interesse nach einem biotechnologischen Verfahren groß. In den letzten 20 Jahren gab es daher viele Ansätze, Vitamin C (Rao und Sureshkumar, 2000) oder die Vitamin C-Vorstufe 2-KGLA mikrobiell zu produzieren (Bremus *et al.*, 2006; Hancock und Viola, 2002; Delic *et al.*, 1989). Abbildung 2 fasst die häufigsten mikrobiellen 2-KGLA-Produktionsmethoden, die benötigten Enzyme und die verwendeten Stämme zusammen. Ausgehend von Glukose, Sorbitol oder Sorbose erfolgte die 2-KGLA-Produktion durch Ein- oder Zwei-Stufen-Fermentation mit Stämmen der Gattungen *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Ketogulonicigenium*, *Pseudomonas*, *Erwinia* und *Corynebacterium* (Urbance *et al.*, 2001; Sugisawa *et al.*, 1990; Isono *et al.*, 1968) bzw. mit Mischkulturen dieser Stämme (Xu *et al.*, 2004; Nogami *et al.*, 1987; Zinsheng *et al.*, 1981; Aiguo und Peiji, 1998; Feng, 2000). Ein Beispiel ist der von Sonoyama *et al.* (1982) entwickelte Zwei-Stufen-Fermentationsprozess, bei dem in einem ersten Schritt mittels *Erwinia* Glukose zu 2,5-di-Keto-Glukonat (2,5-dKGA) und in einem zweiten Schritt mittels *Corynebacterium* 2,5-dKGA zu 2-KGLA umgesetzt wird (Abb. 2). Ein weiterer Ansatz war die Stammverbesserung durch heterologe Überproduktion von Enzymen mit 2-KGLA bildenden Aktivitäten (Shibata *et al.*, 2000a; Saito *et al.*, 1997; Shinjoh *et al.*, 1995). Zum Beispiel konstruierten Anderson *et al.* (1985) und Grindley *et al.* (1988) rekombinante *Erwinia herbicola*-Stämme mit der 2,5-dKGA-Reduktase aus *Corynebacterium* (Abb. 2). Mit den rekombinanten *Erwinia*-Stämmen wurde der oben beschriebene Zwei-Stufen-Prozess vereinfacht und eine direkte Produktion von bis zu 120 g/l 2-KGLA ermöglicht (Chotani *et al.*, 2000).

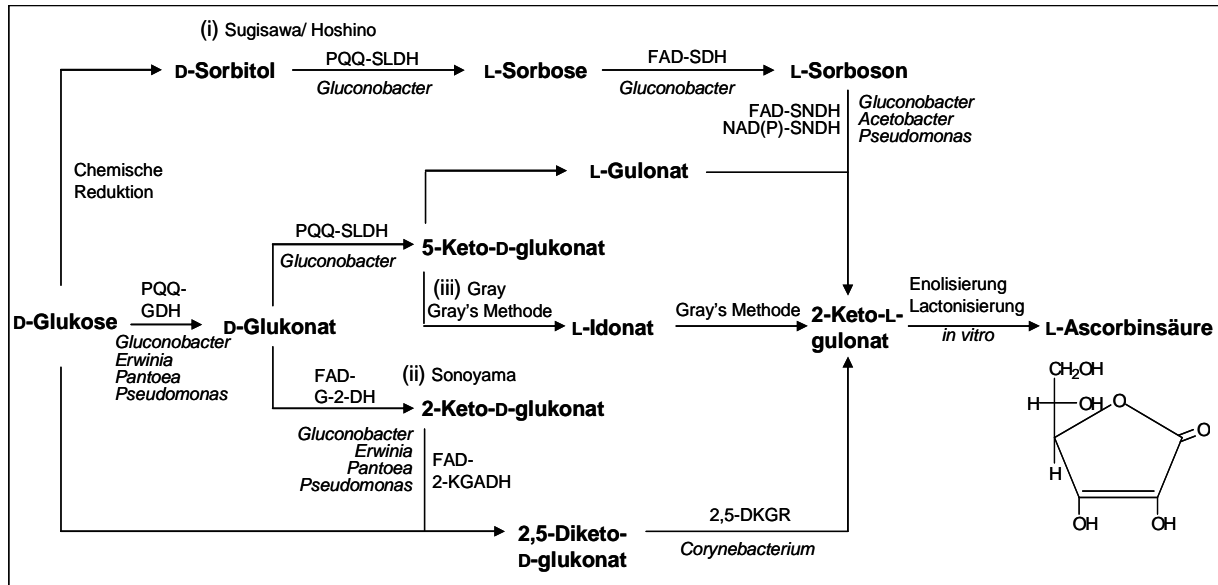


Abb. 2: Produktionswege für 2-KGLA mit Bakterien: (i) Verfahren über die Sorbitol-DH (SLDH), Sorbose-DH (SDH) und Sorboson-DH (SNDH) nach Sugisawa *et al.* (1990) und Hoshino *et al.* (1990); (ii) Verfahren über Glukose-DH (GDH), Glukonat-2-DH (G-2-DH), 2-Keto-D-Glukonat-DH (2-KGA-DH) und 2,5-Diketo-D-Glukonat-Reduktase (2,5-DKGR) nach Sonoyama *et al.* (1982); (iii) Umsetzung von D-Glukonat über 5-Keto-D-Glukonat zu 2-KGLA nach Gray (1945a, b).

Neben der 2-KGLA-Produktion mit Bakterien sind auch verschiedene Ansätze zur Vitamin C-Produktion mit Hefen (Roland *et al.*, 1990; Hancock *et al.*, 2000; Sauer *et al.*, 2004) und Mikroalgen (Running *et al.*, 1994, 1999, 2002, 2003) beschrieben. Ausgehend von D-Glukose erfolgt in einigen Hefen, Mikroalgen und höheren Pflanzen die Umsetzung bis zur L-Ascorbinsäure. Die Synthese erfolgt dabei über die Zwischenprodukte L-Galaktose und L-Galaktono-1,4-lacton und weicht somit von den bakteriellen Synthesewegen ab (Bremus *et al.*, 2006). Die bisher erzielten Ausbeuten sind jedoch zu gering für eine rentable industrielle Anwendung.

3. Die Oxidation von Sorbitol zu 2-Keto-L-Gulonsäure

Bei den meisten mikrobiellen Ansätzen zur Vitamin C-Produktion erfolgt die Synthese der Vorstufe 2-KGLA ausgehend von Sorbitol. Mit den drei Dehydrogenasen Sorbitol-DH (SLDH), Sorbose-DH (SDH) und Sorboson-DH (SNDH) ist in *G. oxydans* über den so genannten „L-Sorboson-Pathway“ (Hoshino *et al.*, 1990; Shinjoh *et al.*, 1990, 1995, 2002a) die sequenzielle Oxidation von Sorbitol über Sorbose und Sorboson zu 2-KGLA möglich (Abb. 3). Der erste Schritt – die Oxidation von Sorbitol zu Sorbose – erfolgt in den meisten *G. oxydans*-Stämmen nahezu quantitativ (Shinjoh *et al.*, 1990). Von der für diese Reaktion verantwortlichen SLDH sind vier verschiedene Isoenzyme in *G. oxydans* beschrieben (Asai, 1968; Matsushita, *et al.*, 2003). Drei dieser Isoenzyme sind membran-gebunden, wovon das erste FAD-abhängig ist und aus drei Untereinheiten besteht (Shinagawa *et al.*, 1982). Das zweite ist PQQ-abhängig und setzt sich ebenfalls aus

drei Untereinheiten zusammen (Choi *et al.*, 1995), und das dritte ist PQQ-abhängig und besteht nur aus einer Untereinheit (Sugisawa und Hoshino, 2002; Miyazaki *et al.*, 2002; Kersters und De Ley, 1966). Nur von der zuletzt genannten SLDH konnte durch Gendisruption nachgewiesen werden, dass sie *in vivo* für die quantitative Umsetzung von Sorbitol zu Sorbose verantwortlich ist (Shinjoh *et al.*, 2002b). Die vierte, NADP-abhängige SLDH ist zytosolisch und spielt nur eine untergeordnete Rolle für die *in vivo*-Umsetzung von Sorbitol zu Sorbose, da sie beim intrazellulär vorherrschenden pH-Wert vornehmlich die Rückreaktion katalysiert (Asai, 1968, Shibata *et al.*, 2000b). Des Weiteren existiert noch eine zweite zytosolische SLDH, die jedoch Sorbitol zu Fruktose umsetzt und bei der Assimilation von Sorbose eine Rolle spielt (Anhang, Abb. 36; Shinjoh *et al.*, 1990, 2002a).

Nach der periplasmatischen Umsetzung von Sorbitol zu Sorbose erfolgt im nächsten Schritt die Oxidation von Sorbose zu Sorboson (Abb. 3), die von einer FAD-abhängigen, 58 kDa großen und membrangebundenen SDH katalysiert wird (Sugisawa *et al.*, 1991a). Im letzten Schritt wird Sorboson in *G. oxydans* von der 53 kDa großen, NAD-abhängigen löslichen cSNDH zu 2-KGLA oxidiert (Hoshino *et al.*, 1991). In *A. liquefaciens* hingegen wird dieser Schritt von einer membrangebundenen Sorboson-DH (mSNDH) katalysiert (Shinjoh *et al.*, 1994), so dass alle Reaktionsschritte von Sorbitol bis 2-KGLA im Periplasma stattfinden können und kein Membrantransport von Zwischenprodukten notwendig ist. Aufgrund eines fehlenden PQQ-Bindemotivs in der Aminosäuresequenz dieses Enzyms wird davon ausgegangen, dass die mSNDH kein Quinoprotein ist, sondern FAD als Kofaktor verwendet (Shinjoh *et al.*, 1995). Während Studien von Isono *et al.* (1968) darauf hinwiesen, dass nur *Gluconobacter*, *Acetobacter* und *Pseudomonas* die oben beschriebenen Enzyme des „L-Sorboson-Pathways“ besitzen, wurden kürzlich zwei *Ketogulonigenium*-Spezies isoliert, die mit Hilfe einer bifunktionalen SDH/SNDH ausgehend von 20 g/l Sorbose bis zu 9.3 g/l 2-KGLA produzierten und somit ebenfalls alle Enzyme des „L-Sorboson-Pathways“ enthalten (Sugisawa *et al.*, 2005; Urbance *et al.*, 2001; Asakura und Hoshino, 1999).

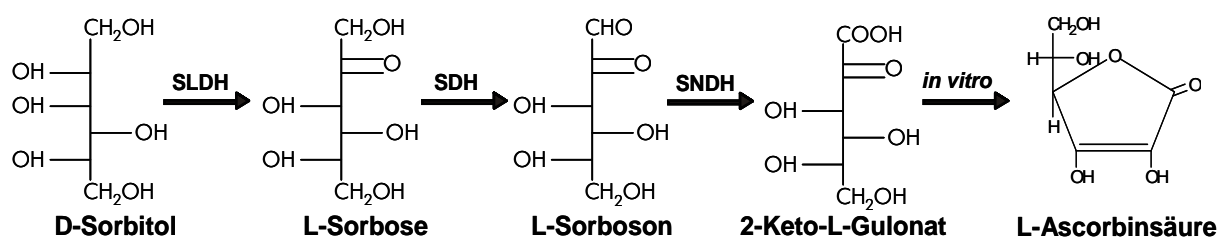


Abb. 3: Reaktions-Sequenz von Sorbitol zu L-Ascorbinsäure („L-Sorboson-Pathway“). SLDH: Sorbitol-DH, SDH: Sorbose-DH und SNDH: Sorboson-DH

Ein Beispiel für die großtechnische Umsetzung von Sorbitol zu 2-KGLA ist ein in China entwickelter und angewandter Zwei-Stufen-Fermentationsprozess, mit dem mittlerweile auch die Firmen Roche und Cerestar Vitamin C produzieren (Ning *et al.*, 1988; Yin *et al.*, 2001). Nach der Biotransformation von D-Sorbitol zu L-Sorbose mit *G. oxydans* erfolgen in einer zweiten Fermentationsstufe mit einem undefinierten Bakteriengemisch die beiden Oxidationen von L-Sorbose über L-Sorboson zu 2-KGLA. Im Gegensatz dazu beschrieben Saito *et al.* (1997, 1998) und Shinjoh *et al.* (1995) Methoden zur mikrobiellen 2-KGLA-Produktion aus Sorbitol, bei denen der Fokus auf Ein-Stamm- und Ein-Stufen-Fermentationen mit definierten Organismen lag. Da nur wenige *G. oxydans*-Stämme mit allen Enzymen des „L-Sorboson-Pathways“ ausgestattet sind und die mit den Wildtypen erzielten 2-KGLA-Ausbeuten aufgrund niedriger SDH- und SNDH-Aktivitäten nur gering sind (Sugisawa *et al.*, 1990; Tsukada und Perlman, 1972), wurde durch Überproduktion von SDH und SNDH versucht, die 2-KGLA-Produktivität zu steigern. So konnten durch Überexpression der Gene für die SDH und die lösliche SNDH aus *G. oxydans* T-100 in einem Sorbose-akkumulierenden *G. oxydans*-Stamm sowie durch Suprimierung des Synthesewegs für das Nebenprodukt L-Idonat eine 2,3-fache Steigerung der 2-KGLA-Produktion auf 130 g/l 2-KGLA aus 150 g/l Sorbitol erzielt werden (Saito *et al.*, 1997, 1998). Durch Überexpression des Gens einer membrangebundenen SNDH aus *A. liquefaciens* in dem Sorboson-akkumulierenden Stamm *G. oxydans* IFO 3293 wurden mit ruhenden Zellen Sorbose und Sorboson, nicht jedoch Sorbitol zu 2-KGLA umgesetzt. Darüber hinaus konnte mit wachsenden Zellen die 2-KGLA-Ausbeute nicht verbessert werden (Shinjoh *et al.*, 1995), so dass dieser Stamm, wie auch die von Saito *et al.* (1997) konstruierten Stämme, nicht zur großtechnischen 2-KGLA-Produktion eingesetzt werden konnten.

Im Gegensatz zur 2-KGLA-Produktionssteigerung durch gezielte Überexpression der 2-KGLA-Synthesegene, versuchten Sugisawa *et al.* (1990) durch ungerichtete Mutagenese und Selektion Stämme zu isolieren, die vermehrt 2-KGLA produzieren. Auf diese Weise entstanden zahlreiche Mutanten des Stammes *G. oxydans* IFO 3293, der als Wildtyp bereits 2,8 g/l 2-KGLA aus 25 g/l Sorbose produziert (Hoshino *et al.*, 1990). Die Mutanten *G. oxydans* UV-10 und *G. oxydans* N44-1 waren in der Lage 70 g/l Sorbitol zu 26 g/l 2-KGLA (*G. oxydans* UV-10) bzw. 100 g/l Sorbitol zu 30-50 g/l 2-KGLA (*G. oxydans* N44-1) umzusetzen, wobei die molekularen Gründe für die gesteigerte 2-KGLA-Produktion nicht aufgeklärt werden konnten (Sugisawa *et al.*, 1990). Berry *et al.* (2005) konnten kürzlich *G. oxydans* N44-1 so modifizieren, dass erstmals nicht nur die Vitamin C-Vorstufe 2-KGLA, sondern direkt L-Ascorbinsäure produziert wurde. Für die direkte Umsetzung von Sorboson zu

Vitamin C ist eine membrangebundene Sorbosondehydrogenase (SNDH_{ai}) verantwortlich, die aus *G. oxydans* N44-1 und *Ketogulonicigenium vulgare* (früher *G. oxydans* DSM 4025) isoliert werden konnte (Berry *et al.*, 2005; Miyazaki *et al.*, 2006). Die homologe Überproduktion der SNDH_{ai} in *G. oxydans* N44-1 führte zur Bildung von 4,2 g/l Vitamin C aus 10 g/l L-Sorbose. Aus bislang ungeklärten Gründen war die Vitamin C-Produktion jedoch nur mit ruhenden Zellen und nicht mit Sorbose oder Sorbitol als Substrat möglich (Berry *et al.*, 2005). Im Gegensatz dazu ist *K. vulgare* in der Lage, mit ruhenden und wachsenden Zellen aus 5 g/l Sorbose bis zu 1,4 g/l Vitamin C zu produzieren (Sugisawa *et al.*, 2005). Darüber hinaus wurden auch D-Sorbitol, L-Sorbose und L-Gulose zu L-Ascorbinsäure umgesetzt.

Abgesehen von dem oben beschriebenen Zwei-Stufen-Verfahren mit einem undefinierten Bakteriengemisch (Ning *et al.*, 1988; Yin *et al.*, 2001) ist bislang mit keinem der beschriebenen Stämme und Methoden eine rentable großtechnische 2-KGLA-Produktion möglich, so dass der Großteil der Vitamin C-Produktion immer noch durch das ökonomisch und ökologisch bedenkliche Reichstein-Verfahren abgedeckt wird (Boudrant, 1990). Um in Zukunft Vitamin C biotechnisch herstellen zu können, müssen die molekularen Hintergründe der 2-KGLA-Bildung weiter untersucht und noch besser verstanden werden.

4. Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Konstruktion und Charakterisierung eines mikrobiellen 2-KGLA-Produktionssystems mit *G. oxydans* in einer Ein-Stamm- und Ein-Stufen-Biotransformation (Abb. 28). Um der 2-KGLA-Synthese zugrunde liegende Mechanismen und Verknüpfungen zum Zentralstoffwechsel aufzuklären, sollten die rekombinanten Stämme nicht durch Mutagenese, sondern definiert und zielgerichtet konstruiert werden. Dafür sollten zunächst verschiedene *G. oxydans*-Stämme bezüglich Biomasse- und Produktbildung charakterisiert und ein geeigneter Wildtyp für die Konstruktion von 2-KGLA-Produktionsstämmen ausgewählt werden. In diesem sollten anschließend alle notwendigen Enzyme der 2-KGLA-Synthese aus Sorbitol funktionell überproduziert werden (SDH, cSNDH, mSNDH). Um hohe 2-KGLA-Ausbeuten zu erzielen, ist es notwendig, den zellinternen Katabolismus von Intermediaten der 2-KGLA-Synthese zu verhindern, da dieser in Konkurrenz zur periplasmatischen 2-KGLA-Produktion steht. Deshalb sollte im letzten Teil der Arbeit der Sorbitolstoffwechsel in *G. oxydans* untersucht werden.

III. Material und Methoden

1. Bakterienstämme

Tab. 1: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Eigenschaften/ Genotyp/ Phänotyp/ Resistenz	Quelle/Referenz
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ , Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169	(Hanahan, 1983; Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
<i>E. coli</i> HB101	F ⁻ , <i>hsdS20</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻), <i>supE44</i> , <i>ara-14</i> , <i>galk-2</i> , <i>lacY1</i> , <i>proA2</i> , <i>rpsL20</i> , <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>recA13</i> , <i>Kan^R</i> , <i>oriColE1</i> , <i>RK2-Mob⁺</i> , <i>RK2-Tra⁺</i> , <i>mH-1</i> mit Plasmid pRK2013	(Boyer und Roulland-Dussoix, 1969; Figurski und Helinski, 1979; Lam <i>et al.</i> , 1985)
<i>G. oxydans</i> DSM 2343	Wildtyp Cef ^R	(De Ley <i>et al.</i> , 1984)
<i>G. oxydans</i> DSM 3503	Wildtyp Cef ^R	(De Ley <i>et al.</i> , 1984; Klasen <i>et al.</i> , 1995)
<i>G. oxydans</i> DSM 3504	Wildtyp, Cef ^R (Donor des <i>sndh/sdh</i> -Genclusters, produziert 0,08 g/l 2-KGLA aus 25 g/l Sorbose)	(De Ley <i>et al.</i> , 1984; Sugisawa <i>et al.</i> , 1990)
<i>G. oxydans</i> IFO 3293	Wildtyp, Cef ^R (produziert 2,77 g/l 2-KGLA aus 25 g/l Sorbose)	(Sugisawa <i>et al.</i> , 1990 ; Hoshino <i>et al.</i> , 1990)
<i>G. oxydans</i> NCIMB 8084	Wildtyp, Cef ^R	(Silberbach <i>et al.</i> , 2003; Beschkov <i>et al.</i> , 1995)
<i>G. oxydans</i> UV-10	Cef ^R , (durch Mutagenese aus <i>G. oxydans</i> IFO 3293 entstanden; produziert 26 g/l 2-KGLA aus 70 g/l Sorbitol)	(Sugisawa <i>et al.</i> , 1990)
<i>G. oxydans</i> N44-1	Cef ^R , (durch Mutagenese aus <i>G. oxydans</i> IFO 3293 entstanden; produziert 50 g/l 2-KGLA aus 100 g/l Sorbitol)	(Sugisawa <i>et al.</i> , 1990)
<i>A. liquefaciens</i> DSM 5603	Wildtyp, Cef ^R , (Donor des <i>msndh</i> -Gens)	(De Ley <i>et al.</i> , 1981)
<i>A. liquefaciens</i> LU9082	Wildtyp, Cef ^R , (alternativer Donor des <i>msndh</i> -Gens)	BASF AG, Ludwigshafen
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	Wildtyp, Strep ^R (alternativer Donor des <i>sndh/sdh</i> -Genclusters)	(Capela <i>et al.</i> , 2001; Galibert <i>et al.</i> , 2001)
<i>Zymomonas mobilis</i>	Wildtyp Cef ^R	(Neveling <i>et al.</i> , 1999)

Zusätzlich zu den in Tab. 1 aufgeführten Stämmen wurden verschiedene rekombinante Stämme in dieser Arbeit konstruiert. Dazu wurden *Escherichia coli* DH5 α sowie *G. oxydans* DSM 2343, DSM 3504, IFO 3293 und N44-1 mit den in Tab. 3 aufgelisteten Plasmiden transformiert. Tab. 2 gibt eine Übersicht über die konstruierten Stämme und die in dieser Arbeit verwendeten Stammabkürzungen.

Tab. 2: In der Arbeit konstruierte Stämme mit den dazugehörigen Abkürzungen

Konstruierte <i>E. coli</i> - und <i>G. oxydans</i> -Stämme	Verwendete Stammabkürzung
<i>E. coli</i> DH5α mit pBBR1MCS2	DH5α-pBBR
<i>E. coli</i> DH5α mit pBBR1MCS2- <i>csndh</i>	DH5α- <i>csndh</i>
<i>E. coli</i> DH5α mit pBBR1MCS2- <i>sdh</i>	DH5α- <i>sdh</i>
<i>E. coli</i> DH5α mit pBBR1MCS2- <i>csndh/sdh</i>	DH5α- <i>csndh/sdh</i>
<i>E. coli</i> DH5α mit pBBR1MCS2- <i>csndh-tufB</i>	DH5α- <i>csndh-tufB</i>
<i>E. coli</i> DH5α mit pBBR1MCS2- <i>sdh-tufB</i>	DH5α- <i>sdh-tufB</i>
<i>E. coli</i> DH5α mit pBBR1MCS2- <i>csndh/sdh-tufB</i>	DH5α- <i>csndh/sdh-tufB</i>
<i>E. coli</i> DH5α mit pBBR1MCS2- <i>msndh-tufB</i>	DH5α- <i>msndh-tufB</i>
<i>E. coli</i> DH5α mit pBBR1MCS2- <i>msndh/sdh-tufB</i>	DH5α- <i>msndh/sdh-tufB</i>
<i>E. coli</i> DH5α mit pBBR1MCS2- <i>msndh/sdh-tufB-tracou</i>	DH5α- <i>msndh/sdh-tufB-tracou</i>
<i>E. coli</i> DH5α mit pEXGOX- <i>pgi/tal-fw-tufB</i>	DH5α-pEXGOX- <i>pgi/tal-fw-tufB</i>
<i>E. coli</i> DH5α mit pEXGOX- <i>pgi/tal-rev-tufB</i>	DH5α-pEXGOX- <i>pgi/tal-rev-tufB</i>
<i>E. coli</i> DH5α mit pBBR1MCS2- <i>pgi/tal-fw-tufB</i>	DH5α- <i>pgi/tal-fw-tufB</i>
<i>E. coli</i> DH5α mit pBBR1MCS2- <i>pgi/tal-rev-tufB</i>	DH5α- <i>pgi/tal-rev-tufB</i>
<i>E. coli</i> DH5α mit pEXGOX- <i>mldh-fw-tufB</i>	DH5α-pEXGOX- <i>mldh-fw-tufB</i>
<i>E. coli</i> DH5α mit pEXGOX- <i>mldh-rev-tufB</i>	DH5α-pEXGOX- <i>mldh-rev-tufB</i>
<i>E. coli</i> DH5α mit pBBR1MCS2- <i>mldh-fw-tufB</i>	DH5α- <i>mldh-fw-tufB</i>
<i>E. coli</i> DH5α mit pBBR1MCS2- <i>mldh-rev-tufB</i>	DH5α- <i>mldh-rev-tufB</i>
<i>G. oxydans</i> DSM 2343 mit pBBR1MCS2	DSM 2343-pBBR
<i>G. oxydans</i> DSM 2343 mit pBBR1MCS2- <i>csndh</i>	DSM 2343- <i>csndh</i>
<i>G. oxydans</i> DSM 2343 mit pBBR1MCS2- <i>sdh</i>	DSM 2343- <i>sdh</i>
<i>G. oxydans</i> DSM 2343 mit pBBR1MCS2- <i>csndh/sdh</i>	DSM 2343- <i>csndh/sdh</i>
<i>G. oxydans</i> DSM 2343 mit pBBR1MCS2- <i>csndh-tufB</i>	DSM 2343- <i>csndh-tufB</i>
<i>G. oxydans</i> DSM 2343 mit pBBR1MCS2- <i>csndh/sdh-tufB</i>	DSM 2343- <i>csndh/sdh-tufB</i>
<i>G. oxydans</i> DSM 2343 mit pBBR1MCS2- <i>msndh-tufB</i>	DSM 2343- <i>msndh-tufB</i>
<i>G. oxydans</i> DSM 2343 mit pBBR1MCS2- <i>msndh/sdh-tufB</i>	DSM 2343- <i>msndh/sdh-tufB</i>
<i>G. oxydans</i> DSM 2343 mit pBBR1MCS2- <i>msndh/sdh-tufB-tracou</i>	DSM 2343- <i>msndh/sdh-tufB-tracou</i>
<i>G. oxydans</i> DSM 2343 mit pBBR1MCS2- <i>pgi/tal-fw-tufB</i>	DSM 2343- <i>pgi/tal-fw</i>
<i>G. oxydans</i> DSM 2343 mit pBBR1MCS2- <i>pgi/tal-rev-tufB</i>	DSM 2343- <i>pgi/tal-rev</i>
<i>G. oxydans</i> DSM 2343 mit pBBR1MCS2- <i>mldh-fw-tufB</i>	DSM 2343- <i>mldh-fw</i>
<i>G. oxydans</i> DSM 2343 mit pBBR1MCS2- <i>mldh-rev-tufB</i>	DSM 2343- <i>mldh-rev</i>
<i>G. oxydans</i> DSM 3504 mit pBBR1MCS2	DSM 3504-pBBR
<i>G. oxydans</i> DSM 3504 mit pBBR1MCS2- <i>csndh/sdh</i>	DSM 3504- <i>csndh/sdh</i>
<i>G. oxydans</i> DSM 3504 mit pBBR1MCS2- <i>csndh-tufB</i>	DSM 3504- <i>csndh-tufB</i>
<i>G. oxydans</i> DSM 3504 mit pBBR1MCS2- <i>sdh-tufB</i>	DSM 3504- <i>sdh-tufB</i>
<i>G. oxydans</i> DSM 3504 mit pBBR1MCS2- <i>csndh/sdh-tufB</i>	DSM 3504- <i>csndh/sdh-tufB</i>
<i>G. oxydans</i> DSM 3504 mit pBBR1MCS2- <i>msndh-tufB</i>	DSM 3504- <i>msndh-tufB</i>
<i>G. oxydans</i> DSM 3504 mit pBBR1MCS2- <i>msndh/sdh-tufB</i>	DSM 3504- <i>msndh/sdh-tufB</i>
<i>G. oxydans</i> DSM 3504 mit pBBR1MCS2- <i>msndh/sdh-tufB-tracou</i>	DSM 3504- <i>msndh/sdh-tufB-tracou</i>
<i>G. oxydans</i> IFO 3293 mit pBBR1MCS2	IFO 3293-pBBR
<i>G. oxydans</i> IFO 3293 mit pBBR1MCS2- <i>csndh/sdh</i>	IFO 3293- <i>csndh/sdh</i>
<i>G. oxydans</i> IFO 3293 mit pBBR1MCS2- <i>csndh-tufB</i>	IFO 3293- <i>csndh-tufB</i>
<i>G. oxydans</i> IFO 3293 mit pBBR1MCS2- <i>sdh-tufB</i>	IFO 3293- <i>sdh-tufB</i>
<i>G. oxydans</i> IFO 3293 mit pBBR1MCS2- <i>csndh/sdh-tufB</i>	IFO 3293- <i>csndh/sdh-tufB</i>
<i>G. oxydans</i> IFO 3293 mit pBBR1MCS2- <i>msndh-tufB</i>	IFO 3293- <i>msndh-tufB</i>
<i>G. oxydans</i> IFO 3293 mit pBBR1MCS2- <i>msndh/sdh-tufB</i>	IFO 3293- <i>msndh/sdh-tufB</i>
<i>G. oxydans</i> IFO 3293 mit pBBR1MCS2- <i>msndh/sdh-tufB-tracou</i>	IFO 3293- <i>msndh/sdh-tufB-tracou</i>
<i>G. oxydans</i> IFO 3293 mit pBBR1MCS2- <i>pgi/tal-fw-tufB</i>	IFO 3293- <i>pgi/tal-fw</i>
<i>G. oxydans</i> IFO 3293 mit pBBR1MCS2- <i>pgi/tal-rev-tufB</i>	IFO 3293- <i>pgi/tal-rev</i>
<i>G. oxydans</i> IFO 3293 mit pBBR1MCS2- <i>mldh-fw-tufB</i>	IFO 3293- <i>mldh-fw</i>
<i>G. oxydans</i> IFO 3293 mit pBBR1MCS2- <i>mldh-rev-tufB</i>	IFO 3293- <i>mldh-rev</i>
<i>G. oxydans</i> N44-1 mit pBBR1MCS2	N44-1-pBBR
<i>G. oxydans</i> N44-1 mit pBBR1MCS2- <i>pgi/tal-fw-tufB</i>	N44-1- <i>pgi/tal-fw</i>
<i>G. oxydans</i> N44-1 mit pBBR1MCS2- <i>pgi/tal-rev-tufB</i>	N44-1- <i>pgi/tal-rev</i>
<i>G. oxydans</i> N44-1 mit pBBR1MCS2- <i>mldh-fw-tufB</i>	N44-1- <i>mldh-fw</i>
<i>G. oxydans</i> N44-1 mit pBBR1MCS2- <i>mldh-rev-tufB</i>	N44-1- <i>mldh-rev</i>

2. Plasmide und DNA-Fragmente

2.1 Plasmide

Tab. 3: Verwendete und konstruierte Plasmide

Plasmid	Beschreibung/ Eigenschaften	Quelle/Referenz
pBBR1MCS2	5144 bp, Kan ^R ; „broad-host-range-vector“, 15 Kopien/ Zelle, Expression in <i>G. oxydans</i>	(Kovach <i>et al.</i> , 1995)
pEXGOX	5731 bp, Gm ^R , Derivat von pBBR1MCS5, Expression in <i>G. oxydans</i>	
pVLT31	Kan ^R , „broad-host-range-vector“, RSF1010-Derivat	(De Lorenzo <i>et al.</i> , 1993)
pRK2013	Kan ^R , Konjugation-Helferplasmid (tra-Gene + mob-Region)	(Ditta <i>et al.</i> , 1980)
pBBR1MCS2- <i>csndh</i>	<i>csndh</i> -Gen aus <i>G. oxydans</i> DSM 3504 unter Kontrolle des nativen Promotors	diese Arbeit, Kap. IV/2.1
pBBR1MCS2- <i>sdh</i>	<i>sdh</i> -Gen aus <i>G. oxydans</i> DSM 3504 unter Kontrolle des nativen Promotors	diese Arbeit, Kap. IV/2.1
pBBR1MCS2- <i>csndh/sdh</i>	<i>csndh/sdh</i> -Cluster aus <i>G. oxydans</i> DSM 3504 unter Kontrolle des nativen Promotors	diese Arbeit, Kap. IV/2.1
pBBR1MCS2- <i>csndh-tufB</i>	<i>csndh</i> -Gen aus <i>G. oxydans</i> DSM 3504 unter Kontrolle des <i>tufB</i> -Promotors	diese Arbeit, Kap. IV/2.1
pBBR1MCS2- <i>sdh-tufB</i>	<i>sdh</i> -Gen aus <i>G. oxydans</i> DSM 3504 unter Kontrolle des <i>tufB</i> -Promotors	diese Arbeit, Kap. IV/2.1
pBBR1MCS2- <i>csndh/sdh-tufB</i>	<i>csndh/sdh</i> -Cluster aus <i>G. oxydans</i> DSM 3504 unter Kontrolle des <i>tufB</i> -Promotors	diese Arbeit, Kap. IV/2.1
pBBR1MCS2- <i>msndh-tufB</i>	<i>msndh</i> -Gen aus <i>A. liquefaciens</i> DSM 5603 unter Kontrolle des <i>tufB</i> -Promotors	diese Arbeit, Kap. IV/2.1
pBBR1MCS2- <i>msndh/sdh-tufB</i>	<i>msndh</i> -Gen aus <i>A. liquefaciens</i> DSM 5603 und <i>sdh</i> -Gen aus DSM 3504 unter Kontrolle des <i>tufB</i> -Promotors	diese Arbeit, Kap. IV/2.1
pBBR1MCS2- <i>msndh/sdh-tufB</i> -tracou	wie pBBR1MCS2- <i>msndh/sdh-tufB</i> , aber zwischen dem <i>msndh</i> -Gen und dem <i>sdh</i> -Gen ist Zustand, wie im <i>csndh/sdh</i> -Gencluster aus <i>G. oxydans</i> DSM 3504 („translational coupling“)	diese Arbeit, Kap. IV/2.1
pEXGOX- <i>pgi/tal-fw-tufB</i>	<i>pgi/tal</i> -Gen aus DSM 2343 richtig orientiert unter Kontrolle des <i>tufB</i> -Promotors	diese Arbeit, Kap. IV/4
pBBR1MCS2- <i>pgi/tal-fw-tufB</i>	<i>pgi/tal</i> -Gen aus DSM 2343 richtig orientiert unter Kontrolle des <i>tufB</i> -Promotors	diese Arbeit, Kap. IV/4
pEXGOX- <i>pgi/tal-rev-tufB</i>	<i>pgi/tal</i> -Gen aus <i>G. oxydans</i> DSM 2343 revers orientiert unter Kontrolle des <i>tufB</i> -Promotors (Transkriptionsabschwächung durch antisense-RNA)	diese Arbeit, Kap. IV/4
pBBR1MCS2- <i>pgi/tal-rev-tufB</i>	<i>pgi/tal</i> -Gen aus <i>G. oxydans</i> DSM 2343 revers orientiert unter Kontrolle des <i>tufB</i> -Promotors (Transkriptionsabschwächung durch antisense-RNA)	diese Arbeit, Kap. IV/4
pEXGOX- <i>mldh-fw-tufB</i>	<i>mldh</i> -Gen aus DSM 2343 richtig orientiert unter Kontrolle des <i>tufB</i> -Promotors	diese Arbeit, Kap. IV/3.2
pBBR1MCS2- <i>mldh-fw-tufB</i>	<i>mldh</i> -Gen aus DSM 2343 richtig orientiert unter Kontrolle des <i>tufB</i> -Promotors	diese Arbeit, Kap. IV/3.2
pEXGOX- <i>mldh-rev-tufB</i>	<i>mldh</i> -Gen aus <i>G. oxydans</i> DSM 2343 revers orientiert unter Kontrolle des <i>tufB</i> -Promotors (Transkriptionsabschwächung durch antisense-RNA)	diese Arbeit, Kap. IV/3.2
pBBR1MCS2- <i>mldh-rev-tufB</i>	<i>mldh</i> -Gen aus <i>G. oxydans</i> DSM 2343 revers orientiert unter Kontrolle des <i>tufB</i> -Promotors (Transkriptionsabschwächung durch antisense-RNA)	diese Arbeit, Kap. IV/3.2

2.2 Oligonukleotide

Für Nukleotidsequenzanalysen, PCR-Amplifikationen, Northern Blot-Analysen, ortsgerichtete Mutagenesen und Kassettenmutagenesen wurden Oligonukleotide der Reinigungsstufe „Salt-Free“ verwendet. Alle Oligonukleotid-Sequenzen sind in 5'-3'-Richtung angegeben. Die Synthese erfolgte bei MWG-Biotech (Ebersberg), Operon (Hilden) oder der BASF AG (Ludwigshafen).

Tab. 4: Verwendete Oligonukleotide. Abk.: Amplif. = PCR-Amplifikation; Seq. = Sequenzierung; RSS = Restriktionsschnittstelle; oM = ortsgerichtete Mutagenese; NB = Northern Blot

Bezeichnung (Verwendung)	bp	Sequenz
CB1 (Insertion einer <i>BlnI</i> -RSS vor <i>csndh</i> -Gen mittels oM)	42-mer	d(GGA AAA GGG ATG GCA GCA CCT AGG TCA GCA GGA ATA TTT CTC)
CB2 (Insertion einer <i>BlnI</i> -RSS vor <i>csndh</i> -Gen mittels oM)	42-mer	d(GAG AAA TAT TCC TGC TGA CCT AGG TGC TGC CAT CCC TTT TCC)
CB3 (<i>tufB</i> -Promotor-Kassette)	59-mer	d(CCG GTG CAA TTT TTT AGT TGC ATG AAC TCG CAT GTC TCC ATA GAA TGC GCG CTA CTT GC)
CB4 (<i>tufB</i> -Promotor-Kassette)	59-mer	d(CTA GGC AAG TAG CGC GCA TTC TAT GGA GAC ATG CGA GTT CAT GCA ACT AAA AAA TTG CA)
CB5 (Insertion einer <i>BlnI</i> -RSS vor <i>sdh</i> -Gen mittels oM)	42-mer	d(TGT CCA TAT CGA AAC TGG CCT AGG TTC GCA CTG GAT TTC GTA)
CB6 (Insertion einer <i>BlnI</i> -RSS vor <i>sdh</i> -Gen mittels oM)	42-mer	d(TAC GAA ATC CAG TGC GAA CCT AGG CCA GTT TCG ATA TGG ACA)
CB11 (Amplif. <i>msndh</i> -Gen; (<i>msndh</i> -Sonde/ NB)	30-mer	d(CAC GGA CCT AGG GAA TGC AAG GCC GCC CTC)
CB12 (Amplif. <i>msndh</i> -Gen; (<i>msndh</i> -Sonde/ NB)	28-mer	d(GGA ATA AAC GTT CGT GGT ACT GGG CCT G)
CB20 (Seq. <i>tal/pgi</i> -Gen)	19-mer	d(GCT GTT CTC GCT GGA CGC G)
CB21 (Seq. <i>tal/pgi</i> -Gen)	21-mer	d(CGA TCA CGG CAA GTC CCG TGC)
CB22 (Seq. <i>tal/pgi</i> -Gen)	19-mer	d(GCT GCA TGT GCT CGA CAG C)
CB23 (Seq. <i>tal/pgi</i> -Gen)	22-mer	d(GGT CTG GGC CTC ATC CCC ATC G)
CB24 (Seq. <i>tal/pgi</i> -Gen)	20-mer	d(CGC CTA TAT CAG GCG CGA CC)
D-LDH-3-blunt (Amplif. <i>ldh</i> -Gen)	26-mer	d(TCA GAC GCT CTC GGC AAC CCA GTT CC)
D-LDH-5-blunt (Amplif. <i>ldh</i> -Gen)	28-mer	d(ATG TCA GCG TCA CTA AAA GGC AGT TCC G)
G.ox-TAL/PGI-fw (Amplif. <i>tal/pgi</i> -Gen)	24-mer	d(GTG GCA GAC ACA ATC TCC AAC ACC)
G.ox-TAL/PGI-rev (Amplif. <i>tal/pgi</i> -Gen)	25-mer	d(TTA TGC TCC TGC CAG TGC TTT GTG G)
ldh-seq-1 (Seq. <i>ldh</i> -Gen)	24-mer	d(GCG GTC GCG GTA GTC ACA CAT GCG)
pBBR1MCSX-for (Seq. pBBR1MCS2-Derivate)	19-mer	d(ATA CGA CTC ACT ATA GGG C)
pBBRMCS2_fwd (Seq. pBBR1MCS2-Derivate)	19-mer	d(ATA CGA CTC ACT ATA GGG C)
pBBRMCS2_rev (Seq. pBBR1MCS2-Derivate)	19-mer	d(GCT ATG ACC ATG ATT ACG C)
pBBR-rep_forw (Seq. pBBR1MCS2-Derivate)	19-mer	d(CGT AAG TGC GCT GTT CCA G)
SD-Ali_Gox_SDH_1 (Insertion von zwei <i>BsWI</i> -RSS zwischen <i>msndh</i> - und <i>sdh</i> -Gen mittels oM)	67-mer	d(CAC GGA CCA GAA GCG TAC GTG ACG CGC CCT TTC AGG CCC AGT ACC ACG AAC GTA CGC ACT GGA TTT C)
SD-Ali_Gox_SDH_2 (Insertion von zwei <i>BsWI</i> -RSS zwischen <i>msndh</i> - und <i>sdh</i> -Gen mittels oM)	67-mer	d(GAA ATC CAG TGC GTA CGT TCG TGG TAC TGG GCC TGA AAG GGC GCG TCA CGT ACG CTT CTG GTC CGT G)
SDHgoF3ba-53 (Amplif. <i>sdh</i> -Gen)	27-mer	d(GCG TCT AGA GAC ACG GTT TAC GGC TTG)

III. Material und Methoden

Fortsetzung Tab. 4:

SDHgoFS3-51 (<i>sdh</i> -Sonde/ NB)	18-mer	d(GAC ACG GTT TAC GGC TTG)
SDHgoRS3-50 (<i>sdh</i> -Sonde/ NB)	17-mer	d(CTG TCC TGA CTT TCG TC)
SDHgoSPER3-31 (Amplif. <i>csndh/sdh</i> -cluster und <i>sdh</i> -Gen)	26-mer	d(CGC ACT AGT CTG TCC TGA CTT TCG TC)
Seq_sldh_p_01_f (Seq. <i>tal/pgi</i> -Gen)	20-mer	d(GGG TAA CGC CAG GGT TTT CC)
Seq-A.liq-sndh-3 (Seq. <i>msndh</i> -Gen)	20-mer	d(GGA CAA ATC CGG CGC CCT CC)
Sldh-Sonde-F (<i>sldh</i> -Sonde/ NB)	23-mer	d(CGG ATA TCG GGT CCA TGG ATC CG)
Sldh-Sonde-R (<i>sldh</i> -Sonde/ NB)	23-mer	d(GCT GAC CGT CGA GAA CTT CGT GG)
SNDHgoFS1-49 (<i>csndh</i> -Sonde/ NB)	20-mer	d(CCG TGA TTA AGA ATT GCA TG)
SNDHgoRS1-48 (<i>csndh</i> -Sonde/ NB)	19-mer	d(CGA TGA GAC AGA CAC GGA C)
SNDHgoF1ba-52 (Amplif. <i>csndh/sdh</i> -cluster und <i>csndh</i> -Gen)	29-mer	d(GCG TCT AGA CCG TGA TTA AGA ATT GCA TG)
SNDHgoR1sal-46 (Amplif. <i>csndh</i> -Gen)	28-mer	d(CGC GTC GAC CGA TGA GAC AGA CAC GGA C)
Sub137 (Seq. <i>csndh/sdh</i> -Cluster)	16-mer	d(AGG CCC AGC TTC TTC A)
Sub138 (Seq. <i>csndh/sdh</i> -Cluster)	16-mer	d(GTC GGC AAG TCC TGT A)
Sub139 (Seq. <i>csndh/sdh</i> -Cluster)	16-mer	d(CAC CCT GAA TAC CGC C)
Sub140 (Seq. <i>csndh/sdh</i> -Cluster)	16-mer	d(GCC CGA CAA CAT CAT C)
Sub141 (Seq. <i>csndh/sdh</i> -Cluster)	17-mer	d(GCT GTT CAG CGT AAT CC)
Sub142 (Seq. <i>csndh/sdh</i> -Cluster)	16-mer	d(GTA CGG CGT TGA GGA A)
Sub143 (Seq. <i>csndh/sdh</i> -Cluster)	17-mer	d(ACG AAA TCC AGT GCG AA)
tal/pgi-25R (Seq. <i>tal/pgi</i> -Gen)	20-mer	d(GGA ATC TTG ATC AGG TTC GG)
tal/pgi-26R (Seq. <i>tal/pgi</i> -Gen)	20-mer	d(CCA GAT AGT ACT GAT ACG CC)
tal/pgi-27R (Seq. <i>tal/pgi</i> -Gen)	20-mer	d(CCA CAT CGT CAC GCA GAT CC)
tal/pgi-28R (Seq. <i>tal/pgi</i> -Gen)	22-mer	d(GGA TCG GTG ATG GCG ATG AAG C)
tal/pgi-29R (Seq. <i>tal/pgi</i> -Gen)	19-mer	d(CGT GGC GAA CTC GAA TAG G)
tal/pgi-30R (Seq. <i>tal/pgi</i> -Gen)	20-mer	d(CCG TGA CCT GCA GGA ACA CG)

3. Chemikalien, Biochemikalien und Enzyme

Bis auf die in Tab. 5 aufgeführten Chemikalien wurden alle Chemikalien (Reinheitsgrad: zur Analyse) von Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Merck (Darmstadt), Fluka (Neu-Ulm) oder Roth (Karlsruhe) bezogen. Für Enzymaktivitätsmessungen wurden die Enzyme Glukose-6-Phosphat-DH (*L. mesenteroides*), Glycerin-3-Phosphat-DH (Kaninchenmuskel), Phosphoglukoseisomerase (Bäckerhefe) und Triosephosphatisomerase (Kaninchenmuskel) von Sigma-Aldrich (Taufkirchen) verwendet.

Tab. 5: Verwendete Chemikalien und Biochemikalien

Bezeichnung	Herstellerfirma
2-KGLA	Sigma Aldrich, Taufkirchen
CaCO ₃ (Kalziumkarbonat)	Fluka, Neu-Ulm
D-(-)-Fructose, reinst	Merck, Darmstadt
D-(+)-Glucose Monohydrat	Fluka, Neu-Ulm
D-Sorbitol, minimum 98 %	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Erythrose-4-Phosphat Natriumsalz	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Fructose-6-Phosphat Dinatriumsalz	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Glucose-6-Phosphat Dinatriumsalz	Sigma Aldrich, Taufkirchen
L-(-)-Sorbose	Sigma Aldrich, Taufkirchen Fluka, Neu-Ulm
L-Sorboson	DSM Nutritional Products, Kaiseraugst BASF AG, Ludwigshafen Prof. Pietruska, FZ Jülich GmbH, Jülich
Mannitol, ACS Reagent	Sigma Aldrich, Taufkirchen
NAD Dinatriumsalz	Sigma Aldrich, Taufkirchen
NADP Dinatriumsalz	Sigma Aldrich, Taufkirchen
NADPH	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
PCR-Nucleotid-Mix („10 mM each dNTP“)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

4. Antibiotika

Tab. 6: Verwendete Antibiotika und deren eingesetzte Konzentrationen

Antibiotika	Verwendete Endkonzentration	Herstellerfirma
Ampicillin	<i>E. coli</i> : 100 µg/ml	Roche, Mannheim
Cefoxitin	<i>G. oxydans</i> : 50µg/ml	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Gentamycin	<i>E. coli</i> : 10 µg/ml	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Kanamycin	<i>E. coli</i> : 25 µg/ml <i>G. oxydans</i> : 50µg/ml	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Streptomycin	<i>S. meliloti</i> : 500 µg/ml	Sigma Aldrich, Taufkirchen

Für die Zugabe in die autoklavierten und abgekühlten Medien wurden 1000fach konzentrierte Lösungen hergestellt. Dabei wurden Ampicillin, Cefoxitin, Gentamycin und Kanamycin in H₂O und Streptomycin in EtOH gelöst und bei -20 °C gelagert.

5. Nährmedien

Die Medienbestandteile „Bacto-Tryptone“, „Bacto-Yeast Extract“, „Bacto-Agar“ und „Difco-M9 Minimal Salts“ wurden von Becton Dickinson GmbH (Heidelberg) und Maisquellwasser (MQW) von der BASF AG (Ludwigshafen) bezogen. Zur Sterilisation wurden die Nährmedien 20 min bei 121 °C autoklaviert. Zum Abpuffern der Medien wurde teilweise CaCO₃ separat und trocken im Erlenmyerkolben autoklaviert und anschließend das sterile Medium zugegeben, um die Bildung von Ca-Salzen und CO₂ zu vermeiden. Bei der Herstellung von festen Nährmedien für Agarplatten wurde dem entsprechenden Flüssigmedium vor dem Autoklavieren 15 g/l „Bacto-Agar“ zugesetzt. Nach Abkühlen auf ca. 50 °C wurden dann bei

III. Material und Methoden

Selektivplatten die Antibiotikallösungen und bei der Herstellung von IPTG/X-Gal-Platten 40 µg/ml X-Gal (in Dimethylformamid gelöst und sterilfiltriert) und 0,5 mM IPTG (in 50 %igem EtOH gelöst und sterilfiltriert) zugegeben. Selektiv- und IPTG/X-Gal-Platten wurden lichtgeschützt bei 4 °C, je nach Antibiotikum, drei bis fünf Wochen aufbewahrt (Sambrook und Russel, 2000). Im Folgenden sind nur die *G. oxydans*-Medien aufgeführt. *E. coli* (37 °C) und *S. melloti* (28 °C) wurden in Luria Bertani-Medium (Sambrook und Russell, 2000) und *A. liquefaciens* in den gleichen Medien wie *G. oxydans* bei 30 °C kultiviert.

Vollmedium (VM)-Medium (Buchert und Viikari, 1988; Klasen *et al.*, 1995)

Hefeextrakt	5 g/l
Trypton	3 g/l
D-Mannitol oder D-Sorbitol	10 g/l
[Bacto-Agar	15 g/l]
(ad 1l mit VE-H ₂ O, pH 6 mit HCl)	

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

MQW-Konzentrat	7,5 g/l
Ca(CH ₃ COO) ₂	0,5 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,41 g/l
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,1 g/l
MgSO ₄	0,07 g/l
C-Quelle	10-100 g/l (Sorbitol, Mannitol, Glukose, Glyzerin)
Antifoam (Silikonöl)	1 Tropfen
(ad 1l mit VE-H ₂ O, pH 5 mit HCl, wegen Salzpräzipitation sterilfiltrieren)	

No. 5-Medium (Shinjoh *et al.*, 1995)

Hefeextrakt	15 g/l
Glyzerin	0,5 g/l
MgSO ₄	2,5 g/l
C-Quelle	100 g/l (Sorbitol, Mannitol, Fruktose)
CaCO ₃	15 g/l
(ad 1l mit VE-H ₂ O, C-Quelle und CaCO ₃ separat autoklavieren)	

Sorbitol/Sorbose (S/S)-Medium

Hefeextrakt	15 g/l
Glyzerin	0,5 g/l
MgSO ₄	2,5 g/l
D-Sorbitol	80 g/l (alternativ wurde 100 g/l Sorbitol eingesetzt)
L-Sorbose	20 g/l
CaCl ₂	1,5 g/l
(pH 6 mit HCl; Hefeextrakt, Glyzerin und MgSO ₄ bzw. C-Quelle und CaCl ₂ in jeweils 500 ml VE-H ₂ O autoklavieren und nach dem Abkühlen vereinigen)	

Elektroporations (EP)-Medium

Hefeextrakt	15 g/l
Glycerin	0,5 g/l
MgSO ₄	2,5 g/l
D-Mannitol	80 g/l (für SDH-Test: 80 g/l Sorbose eingesetzt)
CaCl ₂	1,5 g/l
(ad 1 l mit VE-H ₂ O, pH 6 mit HCl; sterilfiltrieren)	

Puffer für ruhende Zellen (PR-Puffer)

Difco M9 Minimal Salze	11,3 g/l
MgSO ₄	0,49 g/l
CaCl ₂	0,02 g/l
C-Quelle	20 g/l (Sorbitol, Sorbose oder Sorboson)
(ad 1l mit VE-H ₂ O; alles separat autoklavieren und nach Abkühlen vereinigen)	

6. Lösungen und Puffer

Tab. 7: Zusammensetzung der verwendeten Puffer

Puffer-Bezeichnung	Zusammensetzung/Herstellung/Lagerung
Probenpuffer für Agarosegele (6x) (SCB-Puffer)	0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylencyanol FF 30 % steriles Glycerin 69,5 % steriles NP-H ₂ O
TAE-Puffer, pH 8	40 mM Tris-Azetat 5 mM Na-Azetat 1 mM EDTA in NP-H ₂ O, pH 8 mit CH ₃ COOH
Trenngel-Puffer (SDS-Gel)	18,2 % Tris/HCl in NP-H ₂ O, pH 8,8 mit HCl
Sammelgel-Puffer (SDS-Gel)	6,0 % Tris/HCl in NP-H ₂ O, pH 6,8 mit HCl
SDS-Laufpuffer (10x)	0,25 M Tris 1,92 M Glyzin 1,00 % SDS in NP-H ₂ O
Harnstoffpuffer	8 M Harnstoff 0,1 M NaH ₂ PO ₄ 0,01 M Tris/HCl in NP-H ₂ O, pH 7 mit HCl
Laemmli-Probenpuffer (2x)	50 mM Tris/HCl pH 6,8 10 % Glycerin 2 % β-Mercaptoethanol 4 % SDS 0,03 % Bromphenolblau in NP-H ₂ O
RNA-Laufpuffer (10x)	0,5 M MOPS 10 mM Na ₂ EDTA in NP-H ₂ O, pH 7 mit H ₂ SO ₄
RNA-Probenpuffer (4x) [Lagerung -20 °C]	10 % RNA-Laufpuffer (10x) 50 % Formamid, 100 %ig 6,8 % Formaldehyd, 37 %ig 11,7 % Glycerin, 87 %ig 1 % Xylencyanol, konz. (gesättigte Lösung) 1 % Bromphenolblau, konz. (gesättigte Lösung) 5 % Ethidiumbromid (10 mg/ml Lösung) in NP-H ₂ O

7. Laborgeräte, Filter und Gefäße

Tab. 8: Verwendete Laborgeräte, Filter und Gefäße

Gerät	Bezeichnung (Typ)	Hersteller
Gel-Dokumentations-Anlage für Agarose- und SDS-Gele	Image Master [®] VDS	Pharmacia Biotech, Freiburg
UV-Transilluminator	Chroma 42	Vetter GmbH, Wiesloch
Photometer	Ultrospec 3000 pro	Amersham Bioscience, Freiburg
Ultrazentrifuge	L8-M ultracentrifuge	Beckman Coulter, Krefeld
250 ml-Becher-Zentrifuge	Avanti J-25 centrifuge	Beckman Coulter, Krefeld
Falcon-Zentrifuge	Avanti 30 centrifuge	Beckman Coulter, Krefeld
Tischzentrifugen	eppendorf centrifuge 5415C eppendorf centrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf-Kühlzentrifuge	Laborzentrifuge 2K15	Sigma, Taufkirchen
Falcon-Kühlzentrifuge	Allegra 6KR centrifuge	Beckman Coulter, Krefeld
pH-Meter	765 Calimatic	Knick GmbH, Berlin
PCR-Thermocycler	Mastercycler personal	Eppendorf, Hamburg
French-Press	French Pressure Cell Press	SLM-Aminco spectronic instruments, Rochester, USA
Ultraschall für Zellaufschluss	UP 200s	Hielscher GmbH, Stuttgart
Gelelektrophoresekammer groß (für Agarosegele)	Sub-cell GT Basic	Biorad Laboratories, München
Gelelektrophoresekammer klein (für Agarosegele)	Sub-cell GT Mini	Biorad Laboratories, München
Elektrophoresekammer für SDS-Gele	Mini Protean III	Biorad Laboratories, München
Schüttelblock	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Sterilfilter	0,1 µm Nitrozellulose-Membranfilter ME 24 Ø50 mm	Schleicher und Schuell, Dassel
Einmalsterilfiltriereinheit	Stericup 0,22 µm, GP Express	Millipore GmbH, Frankfurt
Küvetten	½ Mikro Einmalküvetten, 1 ml	Müller ratioLab, Dreieich
MALDI-TOF	Voyager-DE STR Bio Spectrometry Workstation	Applied Biosystems, Darmstadt

8. Kultivierung und Stammhaltung

Im Folgenden wird nur auf die Kultivierungsbedingungen von *G. oxydans* eingegangen. Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte analog mit LB-Medium und je nach Plasmiden mit Selektivantibiotika in entsprechender Konzentrationen (Tab. 6) bei 37 °C Inkubationstemperatur.

Kultivierung auf Agarplatten

Zur Kultivierung von *G. oxydans* auf Festmedium wurden ausschließlich VM-Sorbitol-Agarplatten (Kap. 5) mit der in Tab. 6 angegebenen Konzentration Selektivantibiotikum verwendet. Die Inkubation erfolgte lichtgeschützt bei 30 °C für mind. 24 h. Die *G. oxydans*-Wildtypen wurden unter Zugabe von Cefoxitin angezogen.

Kultivierung in Kulturröhrchen

Zur Anzucht von Vorkulturen oder Kulturen für die Mini-Plasmidpräparationen wurden 5 ml VM-, S/S- oder EP-Medium in sterilen Kulturröhrchen mit den zur selektiven Anzucht benötigten Antibiotika in entsprechender Konzentration (Tab. 6) mit einer stecknadelkopfgroßen Zellmenge einer frisch bewachsenen Agarplatte steril beimpft und je nach Stamm 12 bis 24 h bei 30 °C und 200 Upm in einem Schüttel-Brutschrank inkubiert. Bei den *G. oxydans*-Wildtypen wurde nur Cefoxitin verwendet.

Kultivierung in Schüttelkolben

Für Elektroporationen, Zellrohextrakttherstellung, Ganzzell-Biotransformationen, Wachstums-Experimente oder Fermentations-Vorkulturen wurden 50 ml Medium in 500 ml-Erlenmeyerkolben mit einer OD_{600nm} von ca. 0,2 steril aus einer Vorkultur beimpft. Dabei wurden zur selektiven Anzucht die in Tab. 6 angegebenen Antibiotika-Konzentrationen verwendet. Die Inkubation bis zur gewünschten Zelldichte erfolgte bei mind. 200 Upm und 30 °C im Schüttelinkubator.

Kultivierung in der „Fedbatch-pro“-Fermentationsanlage

Aufgrund des hohen Sauerstoffbedarfs und der pH-Abhängigkeit bei der Biotransformation von Sorbitol und Glukose mit *G. oxydans* wurde das „Fedbatch-Pro“-Parallelfementations-System der Firma DASGIP (Jülich) eingesetzt und den unterschiedlichen C-Quellen angepasste Fermentationsbedingungen etabliert. Das System (Abb. 4) bestand aus vier 250 ml Glasgefäßen mit jeweils einer Sauerstoff- und einer pH-Elektrode, dem Begasungssystem „MX 4/4“, dem Säure/Lauge-Dosiersystem „MP 8“, dem pH/pO₂-Monitoringsystem „pH4/pO4“ und der Abgasanalytik „GA4“. Somit konnte der pH-Wert, der Sauerstoffpartialdruck (pO₂), die Rührerdrehzahl (N), die Temperatur (T), die Zusammensetzung der Zuluft und die Begasungsrate reguliert bzw. gesteuert werden. Mittels der Abgasanalytik konnte die Zusammensetzung der Abluft bestimmt werden, so dass eine Kohlenstoff-Bilanzierung möglich war. Für die Ganzzell-Biotransformation mit *G. oxydans* stellten sich folgende Fermentationsparameter als optimal heraus: Fermentationsvolumen V = 200 ml; Begasungsrate = 10 bis 20 l/h; N = 500 bis 700 Upm; pO₂ = 10 bis 20 %; pH = 6 und T = 30°C. Besonders wichtig war ein konstanter CO₂-Anteil von 0,05 % in der Fermenterzuluft, da anderenfalls die anaplerotischen Reaktionen in der Zelle nicht ablaufen konnten. Als Medien wurden MQW-Medium, S/S-Medium oder davon leicht abgewandelte Medien verwendet, wobei pro Fermenter ein Tropfen separat

III. Material und Methoden

autoklavierter Antifoam (Silikonöl) und die Antibiotika vor Fermentationsstart zugegeben wurden. Der pH-Wert wurde durch Titration mit einer 2 N NaOH-Lösung reguliert. Vor jedem Versuch wurden die Pumpen, die pH-Elektroden und die O₂-Elektroden nach Herstellerangaben kalibriert bzw. polarisiert. Die Fermentationen wurden durch Inokulation aus einer exponentiell gewachsenen 50 ml-Vorkultur mit einer Animpf-OD_{600nm} von mind. 0,3 gestartet. Die Regelung und die Aufzeichnung aller Daten erfolgte durch die Software „Fedbatch-Pro“ (DASGIP, Jülich).

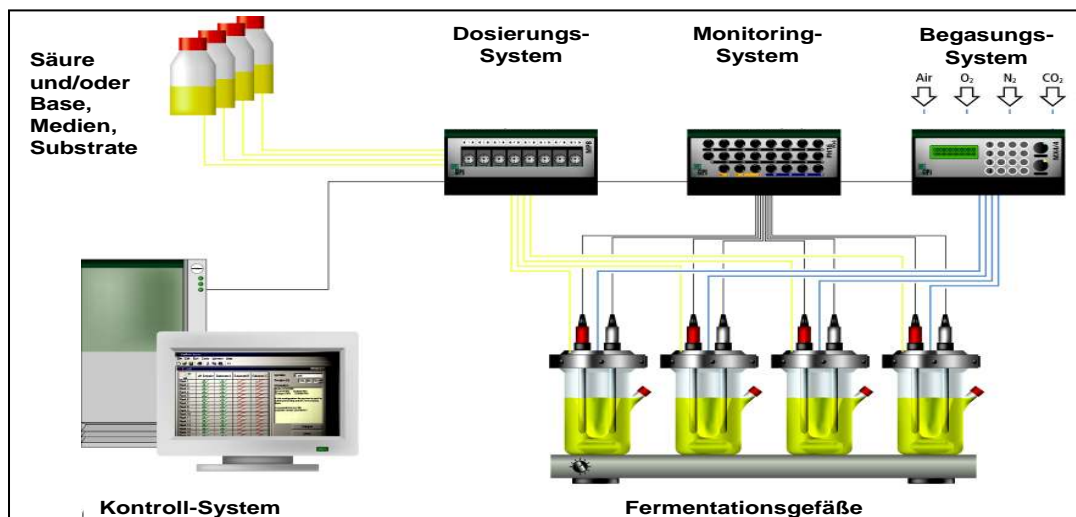


Abb. 4: Schematische Darstellung des „Fedbatch-pro“-Systems (DASGIP AG, Jülich)

Biotransformation mit ruhenden Zellen

Exponentiell und unter Selektionsdruck gewachsene Zellen aus einer 50 ml-Kultur (S/S-Medium) wurden zweimal mit 50 mM KPO₄-Puffer (pH 6) bei 4 °C gewaschen und in 15 ml PR-Puffer (Kap. III/ 5) mit Sorbitol, Sorbose oder Sorboson als C-Quelle resuspendiert. Dabei wurde eine definierte Zelldichte (OD_{600nm} ~ 1,3) eingestellt. Die Biotransformation erfolgte mit den entsprechenden Antibiotika in einem 250 ml Erlenmeyerkolben bei 30 °C und 170 Upm im Schüttelb rutschrank für ca. 200 h. In regelmäßigen Abständen wurden Proben für die HPLC-Analytik entnommen.

Lagerung und Stammhaltung

Rekombinante *E. coli*- und *G. oxydans*-Stämme wurden über längere Zeiträume in Form von Glycerinkulturen aufbewahrt. Hierzu wurden eine exponentiell und unter Selektionsdruck gewachsene Kultur und steriles Glycerin zu gleichen Teilen gemischt und anschließend bei -70 °C eingefroren. Die Dauerkulturen können so über mehrere Jahre gelagert werden (Sambrook und Russel, 2000). Stammkulturen auf Selektiv-Festmedien können bis zu 6 Wochen bei 4 °C aufbewahrt werden.

9. Molekularbiologische Methoden

9.1 Plasmid-Transformation von *E. coli* und *G. oxydans*

Transformation von *E. coli*

Transformationskompetente Zellen sind in der Lage, Plasmid-DNA aufzunehmen. Die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach der RbCl_2 -Methode (Cohen *et al.*, 1972). Die Zellen wurden entweder sofort für die Plasmid-Transformation (Hanahan, 1983) eingesetzt oder in 200 μl -Aliquots bei $-70\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert und bei Bedarf auf Eis aufgetaut. Transformiert wurden 15-30 μl Ligationsansätze (Kap. III/ 9.6) oder bis zu 1 μg Plasmid-DNA. Als Kontrolle wurde stets 1 μg pUC18-Plasmid-DNA zur Berechnung der Transformationseffizienz eingesetzt. Anschließend wurden die Zellen auf Selektionsmedium ausgestrichen.

Transformation von *G. oxydans*

Die Transformation von *G. oxydans* erfolgte entweder durch Elektroporation (Trevors und Stradoub, 1990) oder durch di- und triparentale Konjugation (Fischer-Fantuzzi und Di Girolamo, 1961; Condon *et al.*, 1991; Connell *et al.*, 1995). Die Herstellung elektrokompetenter Zellen und die Elektroporation erfolgte nach Modifikation des von Mostafa *et al.* (2002) beschriebenen Protokolls, wobei die Zellanzucht in EP-Medium (Kap. III/5) erfolgte und die Zellen viermal in sterilem 10 %igem Glycerin gewaschen wurden. Transformiert wurden 0,5 bis 2 μg Plasmid-DNA. Nach der Elektroporation folgte eine mind. dreistündige Kultivierung in 1 ml EP-Medium bei $30\text{ }^\circ\text{C}$ zur Ausbildung der Resistenz, bevor auf Selektivmedium ausplattiert wurde. Die Koloniebildung der Transformanden konnte bis zu 72 h dauern.

Als weitere Transformationsmethode für *G. oxydans* wurde die di- und triparentale Konjugation angewandt. Als Helferstamm wurde *E. coli* HB101, der die Gene für die Mobilisierung auf dem Plasmid pRK2013 trägt, eingesetzt (Figurski und Helinski, 1979; Lam *et al.*, 1985). Der *G. oxydans*-Empfänger-, *E. coli*-Helfer- und *E. coli*-Donorstamm wurden in jeweils 5 ml LB- bzw. Vollmedium bis zur mittleren exponentiellen Phase kultiviert. Zur Konjugation wurden dann jeweils 50 μl der drei Kulturen vermischt auf VM-Festagar aufgetropft und für 16 bis 30 h bei $30\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Die Zellen wurden mit VM-Medium abgeschwemmt, 1:10 bzw. 1:100 verdünnt und auf VM-Selektivagar mit zusätzlich 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Cefoxitin ausplattiert. Cefoxitin stellte sicher, dass keine *E. coli*-Stämme anwuchsen; das Selektivantibiotikum ließ nur Wachstum von *G. oxydans*-Stämmen zu, die aus dem Donorstamm das Plasmid mit dem Resistenzgen übernommen hatten.

9.2 Isolierung von DNA aus *E. coli* und *G. oxydans*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *G. oxydans* und *E. coli* erfolgte mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (Qiagen, Hilden) oder, für DNA-Mengen über 20 µg, mit dem „Qiagen Plasmid Midi Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben. Das Prinzip beruht auf einer modifizierten alkalischen Zell-Lyse (Birnboim und Doly, 1979). Eluiert wurde die Plasmid-DNA in 50 µl Elutions-Puffer oder NP-H₂O; die Lagerung erfolgte bei -20 °C. Genomische DNA aus *G. oxydans* wurde mit dem „Puregene DNA Purification Kit“ (Gentra, Minneapolis, USA) nach Herstellerangaben isoliert. Die Lagerung genomische DNA erfolgte bei 4°C.

9.3 Agarosegelelektrophorese von DNA

Die analytische und präparative Größenauftrennung von DNA wurde in Agarosegelen mit TAE-Laufpuffer (Tab. 7) durchgeführt (Sambrook und Russel, 2000). Je nach Größe der DNA-Fragmente enthielten die Gele 0,8 bis 2 % Agarose. Die DNA-Proben wurden nach Zugabe von 1/6 Volumen SCB-Puffer (Tab. 7) bei einer konstanten elektrischen Feldstärke von 5 bis 10 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Größenabschätzung der DNA-Banden wurden 6 µl Größenmarker („1 kb DNA Ladder“, Biomol GmbH, Hamburg) aufgetragen. Anschließend wurde die DNA in 2 %iger Ethidiumbromidlösung gefärbt, in VE-H₂O entfärbt, im UV-Durchlicht (302 nm) durch Fluoreszenzanregung sichtbar gemacht und fotografiert (Image Master, VDS-System, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg).

9.4 Reinigung und Aufkonzentration von DNA

Zur Reinigung und Präparation von DNA-Fragmenten wurde die DNA in einer präparativen Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und das gewünschte DNA-Fragment unter UV-Licht ausgeschnitten. Zur Isolierung der im Gelstück enthaltenen DNA wurde das „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben verwendet. Eluiert wurde dabei mit einer der erwarteten DNA-Ausbeute entsprechenden Menge NP-H₂O. Zum Umpuffern und Entfernen von Salzen, Nukleotiden, Oligonukleotiden und Enzymen aus DNA-Lösungen oder zur Erhöhung der DNA-Konzentration wurde eine DNA-Isopropanol-Fällung durchgeführt (Sambrook und Russel, 2000). Je nach erforderlicher Reinheit wurde der EtOH-Waschschritt mehrfach durchgeführt und das DNA-Sediment in einem angemessenen Volumen NP-H₂O resuspendiert. Zum Reinigen bzw. Umpuffern der DNA aus PCR-Reaktionsansätzen wurde das „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben verwendet.

9.5 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

Die Bestimmung der DNA-Konzentration in Lösungen erfolgte durch Verwendung des „NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometers“ (Nanodrop Technology, Wilmington, USA), das unter Verwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes die DNA-Konzentration durch Absorptionsmessung bei 260 nm ($\epsilon_{260} = 2,86 \times 10^{-2} \text{ cm}^2/\mu\text{g}$) berechnet. Als Maß für die Reinheit der DNA-Lösung wurde der Quotient von $OD_{260\text{nm}}$ und $OD_{280\text{nm}}$ herangezogen. Proteinfreie DNA-Lösungen weisen dabei einen Wert von ca. 1,8 auf (Sambrook und Russel, 2000). Bei sehr geringen DNA-Konzentrationen wurde eine Konzentrationsabschätzung durch Vergleich der Fluoreszenzintensität ethidiumbromidgefärbter DNA im Agarosegel durchgeführt. Dazu wurde die abzuschätzende Bande mit einer Marker-Bande entsprechender DNA-Fragmentgröße und bekannter Konzentration verglichen.

9.6 Enzymatische DNA-Reaktionen

DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Die DNA-Spaltung an spezifischen Sequenzen mit Restriktionsendonukleasen erfolgte unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen. Dazu wurden die Restriktionsendonukleasen von Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) verwendet. Das Volumen des Restriktionsansatzes wurde so gewählt, dass bis zu 3 U Enzym pro μg DNA eingesetzt wurden, der Gesamtanteil des Enzyms im Ansatz aber nicht höher als 10 % (v/v) betrug. Bei DNA-Restriktion mit zwei Enzymen wurde der Reaktionspuffer gewählt, in dem beide Enzyme die höchste Aktivität aufwiesen, oder es wurde zunächst mit dem Restriktionsenzym geschnitten, das bei der niedrigeren Salzkonzentration spaltet, dann die DNA umgepuffert und anschließend die Restriktion mit dem anderen Enzym fortgeführt. Bei unterschiedlichen Temperaturoptima von Enzymen wurde die Restriktion zunächst bei der niedrigeren Temperatur und anschließend bei der höheren Temperatur durchgeführt.

Dephosphorylierung von DNA-Enden

Um die Religation linearisierter Vektor-DNA zu verhindern und bei der Ligation die Insertion von DNA-Fragmenten mit intakter 5'-Phosphatgruppe zu fördern, wurde nach der Vektor-Restriktion eine Abspaltung der 5'-Phosphatgruppen durchgeführt (Sambrook und Russel, 2000). Zur Dephosphorylierung von DNA-Molekülen wurde SAP (shrimp alkaline phosphatase) von Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) nach Herstellerangaben verwendet.

5'-Phosphorylierung von DNA-Enden

Wenn DNA-Fragmente für nachfolgende Ligationsreaktionen mit dephosphoryliertem Vektor eingesetzt werden sollten und nicht aus einem Restriktionsverdau stammten, bei dem DNA-Fragmente mit intakten 5'-Phosphatgruppen entstehen, wurde die DNA phosphoryliert. Dabei wurde T₄-Polynukleotid-Kinase von Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) nach der von Gassen und Schimpf (1999) beschriebenen Methode eingesetzt. Phosphorylierte PCR-Fragmente oder Oligonukleotide wurden sofort weiter verwendet oder bei -20 °C gelagert.

Ligation von DNA-Enden

Um 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxy-Enden doppelsträngiger, linearer DNA über Phosphordiesterbindungen miteinander zu verknüpfen, wurde das „Rapid DNA Ligation Kit“ (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) nach Herstellerangaben verwendet. Die DNA-Fragmente wurden bei überhängenden Enden im molaren Verhältnis von 3:1 und bei glatten Enden im molaren Verhältnis von 5:1 (Insert-DNA:dephosphorylierte Vektor-DNA) eingesetzt, wobei eine Gesamt-DNA-Konzentration von 50 µg/ml Ligationsansatz nicht überschritten wurde. Es wurde stets eine Kontrolle (geschnittener Vektor mit NP-H₂O statt Insert-DNA) zur Abschätzung der Anzahl von Religanden mitgeführt. Nach anschließender Transformation und Kultivierung auf Selektiv-Festmedium wurden nur dann Kolonien auf Insertion der Ziel-DNA untersucht, wenn verglichen mit der Kontrolle eine signifikant höhere Anzahl an Kolonien gewachsen war.

9.7 Polymerase-Kettenreaktion

Die spezifische *in vitro*-Amplifikation doppelsträngiger DNA aus einem Plasmid oder genomischer DNA wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt (Mullis und Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1988). Als DNA-Polymerasen wurden wahlweise „Pwo“ und „Taq“ (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) oder „Herculase“ und „PfuTurbo“ (Stratagene, Heidelberg) nach Herstellerangaben verwendet. Die zur selektiven DNA-Amplifikation benötigten spezifischen Primer sind in Tab. 4 aufgelistet. Der Reaktionsansatz setzte sich wie bei Gassen und Schimpf (1999) beschrieben zusammen, wobei das molare Verhältnis der Nukleotide im dNTP-Mix aufgrund des hohen GC-Gehalts im *G. oxydans* Genom so gewählt wurde, dass ein 1,5-facher Überschuss an dCTP- und dGTP-Nukleotiden vorlag. Teilweise musste dem PCR-Ansatz wegen des hohen GC-Gehalts zusätzlich 5 % DMSO

zugegeben werden. Die zyklische Reaktion wurde im „Mastercycler personal“ (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt, wobei die 30 Sekunden lange Hybridisierung der Primer 5-7 °C unterhalb der niedrigsten Schmelztemperatur der beiden verwendeten Primer und die Elongationsreaktion bei der DNA-Polymerase-spezifischen Temperatur für die vom Hersteller angegebene Dauer stattfand. Es wurden jeweils 30-50 Zyklen durchgeführt. Anschließend wurde das Amplifikat mittels Agarosegelelektrophorese kontrolliert und die DNA für die nachfolgenden Arbeitsschritte gereinigt.

9.8 Ortsgerichtete Mutagenese

Zum Einfügen von Punktmutationen in doppelsträngige, zirkuläre DNA wurde eine *in vitro*-ortsgerichtete Mutagenese mit dem „QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene, Heidelberg) durchgeführt. Durch Einbau von zwei zu der Region um die zu mutierende Stelle komplementären Primern, die beide die gewünschte Mutation trugen, wurde das eingesetzte Template-Plasmid in einer PCR-ähnlichen Reaktion zielgerichtet mutagenisiert und amplifiziert (Papworth *et al.*, 1996). Mit einer nur für methylierte DNA spezifischen *DpnI*-Restriktion wurde das mutationsfreie Template-Plasmid gespalten, während die *in vitro* amplifizierte und daher unmethylierte, mutagenisierte DNA nicht als Substrat diente. Die mutagenisierte, lineare Plasmid-DNA wurde zur Transformation von *E. coli* verwendet. Dort lagerte sich die DNA zu doppelsträngigen Plasmiden mit versetzten Einzelstrangbrüchen zusammen, die durch das Reparatursystem der Zelle geschlossen wurden. Die genaue Durchführung sowie die notwendigen Eigenschaften der Mutageneseprimer wurden den Herstellerangaben entnommen.

9.9 Kassettenmutagenese

Das Prinzip einer Kassettenmutagenese beruht auf dem Austausch eines bestimmten DNA-Abschnitts aus doppelsträngiger Plasmid-DNA durch ein chemisch neu synthetisiertes DNA-Fragment (Gassen und Schimpf, 1999). Die zu ersetzende Region wurde zunächst durch Restriktion aus der Ziel-DNA ausgeschnitten und mittels präparativer Gelelektrophorese vom Vektor abgetrennt; der Restvektor wurde anschließend dephosphoryliert. In Form einer Kasette, die aus zwei komplementären, phosphorylierten Oligonukleotiden der gewünschten Sequenz bestand, wurde dann das neue DNA-Fragment eingesetzt. Durch die Wahl der Restriktionsenzyme und der Oligonukleotid-Sequenz wiesen sowohl der gespaltene

Vektor als auch die Mutagenesekassette überhängende und nicht kompatible Enden auf, wodurch die richtige Orientierung der Mutagenesekassette festgelegt wurde. Die Herstellung der Mutagenesekassette erfolgte nach dem von Gassen und Schrimpf (1999) beschriebenen Protokoll. Fertige Mutagenesekassetten wurden bei -20°C gelagert oder 1 µl davon direkt zur Ligation mit dem hydrolysierten Vektor eingesetzt. Dabei wurde das Protokoll von Gassen und Schrimpf (1999) so abgeändert, dass die Ligation mit dem „Rapid DNA Ligation Kit“ (Kap. III/9.6) durchgeführt werden konnte. Anschließend erfolgte die Transformation von *E. coli*.

9.10 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung neu konstruierter Plasmide nach der Kettenabbruch-Methode (Sanger *et al.*, 1977; Ansorge *et al.*, 1987) wurde entweder von der BASF AG (Ludwigshafen) bzw. SRD Biotech GmbH (Frankfurt) durchgeführt oder selbst vorgenommen. Dazu wurde das „BigDye Terminator Kit 3.1“ (Applied Biosystems, Darmstadt) nach Herstellerangaben verwendet. Nach der Sequenzierreaktion im „Mastercycler personal“ (Eppendorf, Hamburg) wurden die nicht eingebauten Nukleotide mit dem „DyeEX Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aus den Sequenzieransätzen entfernt und zur Denaturierung der DNA bei 95 °C für 10 min eine Volumeneinheit Formamid zugegeben. Die DNA-Sequenz wurde anschließend im Kapillarsequenziergerät „3100 Avant Genetic Analyzer“ (Applied Biosystems, Darmstadt) mit der Auswertesoftware „Sequencing Analysis Software, Version 5.1.1“ (Applied Biosystems, Darmstadt) ermittelt.

9.11 Northern Blot-Analyse

Zur Überprüfung der Transkription überexprimierter Gene wurde die Gesamt-RNA aus *G. oxydans* mit dem „RNeasy Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben isoliert und zusammen mit RNA-Probenpuffer für 10 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung der RNA (Sambrook und Russel, 2000) in RNA-Laufpuffer (Tab. 7). Die Verteilung der rRNA-Banden wurde mit dem „Image Master-VDS-System“ (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) dokumentiert bevor die RNA mittels Kapillartransfer auf eine Nylonmembran transferiert und mittels UV-Bestrahlung fixiert wurde (Löw und Rausch, 1994; Ming *et al.*, 1994). Die Hybridisierung der mRNA mit den jeweiligen spezifischen Digoxigenin-markierten DNA-Sonden erfolgte für 16 h bei 45 °C im

Hybridisierungssofen (Davies *et al.*, 1996). Danach wurde die an die mRNA gebundene Sonde mit dem „DIG Luminescence Detection Kit“ (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) nach Herstellerangaben detektiert (Davies *et al.*, 1996).

9.12 DNA-Mikroarray-Analyse

Die zur Transkriptom-Analyse von *G. oxydans* verwendeten DNA-Chips wurden von Dr. A. Ehrenreich (Institut für Mikrobiologie und Genetik, Georg August Universität, Göttingen) zur Verfügung gestellt. Die Gesamt-RNA aus *G. oxydans* wurde mit dem „RNeasy Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben isoliert. Anschließend erfolgten Reverse Transkription, Hybridisierung und Auswertung nach den von der Arbeitsgruppe „Funktionelle Genomforschung“ (IBT I, FZ Jülich) etablierten und veröffentlichten Protokollen (Wendisch, 2003; Lange *et al.*, 2003)

10. Biochemische Methoden

10.1 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentration unbekannter Proteinlösungen wurde nach der Methode von Bradford (1976) im UV/VIS-Photometer „Ultrospec 3000 pro“ (Amersham Bioscience, Freiburg) bei einer Wellenlänge von 595 nm ermittelt. Vor jeder Konzentrationsmessung wurde eine Kalibriergerade mit 0 - 100 µg BSA/ml erstellt, anhand derer die Proteinkonzentration in der unbekannt Probe nach Abzug des Leerwertes berechnet wurde. Es wurde jeweils aus sechs Konzentrationsbestimmungen der Mittelwert gebildet.

10.2 Zellaufschluss und Fraktionierung

Für die Bestimmung von Enzymaktivitäten in der löslichen oder der Membranfraktion und für die SDS-PAGE wurden kleinere Mengen (bis zu 80 mg BFM) *E. coli*- bzw. *G. oxydans*-Zellen mit einem Ultraschallprozessor „UP200s“ (Hielscher GmbH, Stuttgart) aufgeschlossen. Dazu wurden die Zellen aus exponentiell gewachsenen 50 ml-Zellkulturen geerntet (10 min, 3.000 x g, 4 °C) und mit 10 mM Na-Acetat gewaschen. Die Zellen wurden dann in 1,8 ml des für den jeweiligen Enzymtest verwendeten Aufschlusspuffers resuspendiert. Der Ultraschallaufschluss erfolgte dann zweimal 5 min in einem 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß im Eisbad (Zyklus: 0,5 Zyklen, Amplitude: 55 – 60). Zwischen den Beschallungen wurde die

Suspension 5 min auf Eis abgekühlt. Die nicht aufgeschlossenen Zellen und die Zelltrümmer wurden für 10 min bei 4 °C und 10.000 x g abzentrifugiert. Der Überstand enthielt als „zellfreier Rohextrakt“ sowohl die löslichen Proteine als auch die Zellmembranen mit den daran gebundenen Proteinen. Das Sediment bestand aus Zellen, Zellbruchstücken und Einschluss-Körpern. Um die in den Einschluss-Körpern enthaltenen Proteine zu analysieren, wurde das Pellet in Harnstoffpuffer gelöst (Tab. 7). Zur Isolierung der Membranproteine wurde der mit Aufschlusspuffer ohne Detergens hergestellte zellfreie Rohextrakt für 1 h bei 4 °C und 100.000 x g in der Ultrazentrifuge zentrifugiert und so die Membranfraktion abgetrennt. Die membrangebundenen Proteine wurden durch Rühren (1 h, 4 °C) in dem für die Analysemethode verwendeten Puffer mit Detergens (Triton-X100 oder n-Octylglycosid) homogenisiert. Die Isolierung der Membranproteine für die massenspektroskopische Untersuchung am Institut für Mikrobiologie an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität in Greifswald erfolgte nach der Methode von Eymann *et al.* (2004), wobei die Membranproteine durch einen Potter-Elvehjem-Homogenisator mit Pistill (5 ml) homogenisiert wurden. Größere Zellmengen wurden bei 108 MPa (*E. coli*) und 207 MPa (*G. oxydans*) in einer French-Press-Zelle (SLM Aminco Spectronic Instruments, Rochester, USA) oder durch Vortexen mit Glasperlen bei 4 °C aufgeschlossen.

10.3 Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen

Die Translation überexprimierter Gene in Proteine wurde mittels denaturierender SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) überprüft (Laemmli, 1970). Die in Sammel- und Trenngel unterteilten SDS-Gele wurden selbst hergestellt; die Zusammensetzung ist Tab. 9 zu entnehmen. Die Substanzen APS und TEMED wurden dabei unmittelbar vor dem Gießen des Gels zugegeben, da diese die Polymerisationsreaktion starten. Der zellfreie Rohextrakt oder die in Harnstoff gelösten Einschluss-Körper (Kap. III/10.2) wurden so weit verdünnt, dass pro Tasche höchstens 20 µg Gesamtprotein in einem Volumen von nicht mehr als 10 µl aufgetragen wurden. Die Proben wurden mit zweifach konzentriertem Laemmli-Probenpuffer (Tab. 7) versetzt, 10 min bei 95 °C denaturiert und auf einem 12 %igen Acrylamidgel bei 120 V und 50 – 100 mA in der mit SDS-Laufpuffer (Tab. 7) gefüllten Gelelektrophoresekammer „Mini Protean III“ (Biorad Laboratories, München) aufgetrennt. Zur Größenabschätzung der Proteinbanden wurden 6,5 µl „Low Range“-Proteinmarker (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) parallel aufgetrennt. Die

Anfärbung der Proteinbanden erfolgte durch Verwendung des „Gel Code Blue Stain Reagents“ (Pierce Perbio Science GmbH, Bonn) nach Herstellerangaben oder durch eine modifizierte Methode der Silberfärbung nach Blum (Nesterenko *et al.*, 1994).

Tab. 9: Zusammensetzung der verwendeten Polyacrylamidgele

Komponenten	Trenngel (12 %)	Sammelgel
30 %iges Acrylamid	4 ml	0,83 ml
Trenngel-Puffer (Tab 8)	2,5 ml	-
Sammelgel-Puffer (Tab 8)	-	1,25 ml
10 %iges SDS	0,1 ml	50 μ l
NP-H ₂ O	3,3 ml	2,82 ml
TEMED	5 μ l	5 μ l
10 %iges APS (w/v)	0,1 ml	50 μ l

10.4 Bestimmung von Enzymaktivitäten

Alle in der vorliegenden Arbeit gemessenen Enzymaktivitäten wurden durch Extinktionsänderung der Cofaktoren NAD(H), NADP(H) bzw. der artifiziellen Elektronenakzeptoren DPIP und MTT bei substratabhängiger Änderung des Redoxzustandes im Photometer „Ultrospec 3000 pro“ (Amersham Bioscience, Freiburg) bei 30 °C und entsprechender Wellenlänge bestimmt. Die membrangebundenen Enzyme wurden mit Detergenz (Triton-X100 oder n-Octylglycosid) in Lösung gebracht und mit jeweils frisch angesetztem PMS als Elektronenmediator und DPIP bzw. MTT als Elektronenakzeptor wurde die Aktivität bestimmt. Die Ansätze wurden mit den unten genannten Zusammensetzungen und Konzentrationen in eine 1 ml-Küvette pipettiert, 2 min auf 30 °C vorgewärmt und nach Starten der Reaktion mit der zu analysierenden Probe wurde die Extinktionsänderung ($\Delta E/\text{min}$) über einen Zeitraum von 2 min bestimmt. Dabei wurde die Extinktionsänderung von DPIP bei einer Wellenlänge von 600 nm, von MTT bei 570 nm und von NAD(P)H bei 340 nm bestimmt. Als millimolare Extinktionskoeffizienten [$\text{mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$] wurden folgende Werte verwendet: $\epsilon_{\text{NAD(P)H}}$ (pH 7, 340 nm) = 6,3; ϵ_{DPIP} (pH 5, 600 nm) = 8,4; ϵ_{DPIP} (pH 7, 600 nm) = 14,5 und ϵ_{MTT} (pH 8, 570 nm) = 17,0. Die Berechnung der spezifischen Enzymaktivität [U/mg Protein] erfolgte nach Abzug der unten angegebenen Leerwerte mit der in Abb. 5 dargestellten Formel, wobei ein Unit als 1 μ Mol gebildetes Substrat pro min definiert wurde. Die im Ergebnisteil angegebenen Enzymaktivitäten sind Mittelwerte aus mindestens sechs verschiedenen Messungen, bei denen zur Überprüfung der Linearität unterschiedliche Proteinkonzentrationen im Test eingesetzt wurden. Wenn

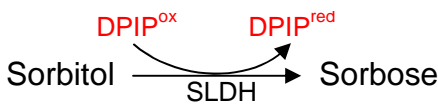
nicht anders angegeben, wurde aus einer exponentiell gewachsenen 50 ml-Kultur mit S/S-Medium zellfreier Rohextrakt oder die Membranfraktion mit dem unten genannten Zellaufschlusspuffer hergestellt und in diesem so verdünnt, dass man im Test eine lineare Extinktionsänderung erhielt.

$$U/mg = \frac{\Delta E}{[min]} (\text{im linearen Bereich}) \times \frac{TV [ml]}{PV [ml]} \times \frac{1}{\epsilon [1/mM \times cm]} \times \frac{1}{d [cm]} \times \frac{1}{PK [mg/ml]} \times VV$$

Abb. 5: Formel zur Berechnung der spezifischen Enzymaktivität. Abkürzungen: Testvolumen (TV); Probenvolumen (PV); Schichtdicke (d); Proteinkonzentration (PK); Vorverdünnung (VV).

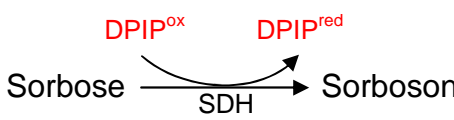
Sorbitol-DH-Aktivitätstest (SLDH)

(modifiziert nach Sugisawa *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 1995; Hoshino *et al.*, 2003)

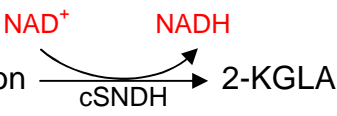
- Prinzip:** 
- Aufschlusspuffer:** 0,1 M Na-Acetat; 20 mM MgCl₂; 10 mM CaCl₂; pH 5
- Testansatz:** 400 µl Aufschlusspuffer mit 1,5 % n-Octylglycosid
200 µl NP-H₂O
100 µl PMS (2 mM)
100 µl DPIP (2 mM)
100 µl Sorbitol (2,5 M)
mit 100 µl Membranfraktion (gelöst in Testpuffer) gestartet
- Messung:** - Abnahme von DPIP^{ox} => Extinktionsabnahme (600 nm)
- Abzug der Leerwerte „- Sorbitol“ und „- Membranfraktion“

Sorbose-DH-Aktivitätstest (SDH)

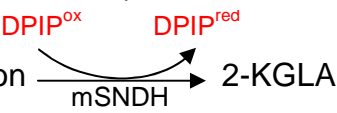
(modifiziert nach Sugisawa *et al.*, 1991; Shinjoh *et al.*, 1995; Lee und Pan, 1999; Saito *et al.*, 1997)

- Prinzip:** 
- Aufschlusspuffer:** 10 mM KPP; 0,3 % Triton-X100; 0,2 M Sorbose; pH 7
- Testansatz:** 300 µl Testpuffer (0,1 M KPP; 1,6 % Triton-X100; pH 7)
300 µl NP-H₂O
100 µl PMS (1,2 mM)
100 µl DPIP (1,5 mM)
100 µl Rohextrakt oder Membranfraktion (gelöst in Testpuffer)
mit 100 µl Sorbose (4 M) gestartet
- Messung:** - Abnahme von DPIP^{ox} => Extinktionsabnahme (600 nm)
- Abzug der Leerwerte „- Sorbose“ und „- Rohextrakt/ Membranfraktion“

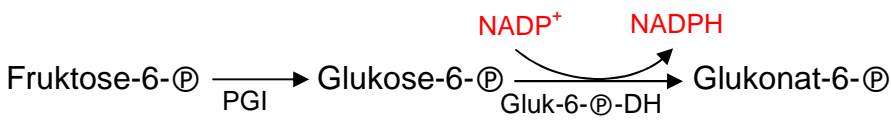
zytosolische Sorboson-DH-Aktivitätstest (cSNDH)(modifiziert nach Lee und Pan, 1999; Hoshino *et al.*, 1991)

- Prinzip:** 
- Aufschlusspuffer:** 10 mM KPP, „Complete“ (Roche Diagnostics, Mannheim), pH 7
- Testansatz:** 100 µl Testpuffer (0,5 M KPP; pH 7)
650 µl NP-H₂O
100 µl NAD (10 mM)
50 µl zellfreier Rohextrakt
mit 100 µl Sorboson (0,4 M) gestartet
- Messung:** - Zunahme von NADH => Extinktionszunahme (340 nm)
- Abzug des Leerwertes „- Rohextrakt“

membrangebundene Sorboson-DH-Aktivitätstest (mSNDH)(modifiziert nach Shinjoh *et al.*, 1995)

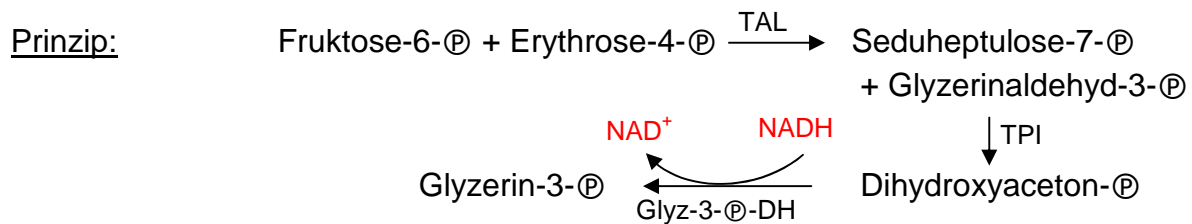
- Prinzip:** 
- Aufschlusspuffer:** 10 mM KPP; 0,3 % Triton-X100; pH 7
- Testansatz:** 300 µl Testpuffer (0,1 M KPP; 1,6 % Triton-X100; pH 7)
350 µl NP-H₂O
100 µl PMS (2,5 mM)
100 µl DPIP (1,1 mM)
100 µl Rohextrakt oder Membranfraktion (gelöst in Testpuffer)
mit 50 µl Sorboson (40 mM) gestartet
- Messung:** - Abnahme von DPIP^{ox} => Extinktionsabnahme (600 nm)
- Abzug der Leerwerte „- Sorboson“ und „- Rohextrakt/ Membranfraktion“

Phosphoglucoseisomerase-Aktivitätstest (PGI)(modifiziert nach Sugiyama *et al.*, 2003)

- Prinzip:** 
- Aufschlusspuffer:** 10 mM KPP, „Complete“ (Roche Diagnostics, Mannheim), pH 7
- Testansatz:** 100 µl Testpuffer (0,5 M KPP; pH 7)
675 µl NP-H₂O
100 µl NADP (10 mM)
25 µl Glukose-6-P-DH (200 U/ml)
50 µl zellfreier Rohextrakt
mit 50 µl Fruktose-6-P (0,1 M) gestartet
- Messung:** - Zunahme von NADPH => Extinktionszunahme (340 nm)
- Abzug der Leerwerte „- Rohextrakt“ und „- Fruktose-6-P“

Transaldolase-Aktivitätstest (TAL)

(modifiziert nach Sugiyama *et al.*, 2003)



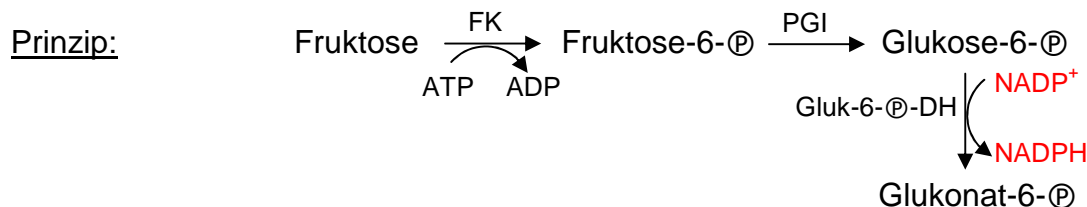
Aufschlusspuffer: 10 mM KPP, „Complete“ (Roche Diagnostics, Mannheim), pH 7

Testansatz: 100 µl Testpuffer (0,5 M KPP; pH 7)
 635 µl NP-H₂O
 75 µl NADH (5 mM)
 20 µl Glyzerin-3-Ⓟ-DH (100 U/ml)
 20 µl Triosephosphatisomerase (100 U/ml)
 50 µl Erythrose-4-Ⓟ (100 mM)
 50 µl zellfreier Rohextrakt
 mit 50 µl Fruktose-6-Ⓟ (0,1 M) gestartet

Messung: - Abnahme von NADH => Extinktionsabnahme (340 nm)
 - Abzug des Leerwertes „- Fruktose-6-Ⓟ“

Fruktokinase-Aktivitätstest (FK)

(modifiziert nach Bringer-Meyer *et al.*, 1985)



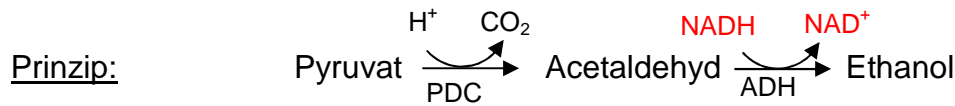
Aufschlusspuffer: 50 mM TEA, „Complete“ (Roche Diagnostics, Mannheim), pH 7

Testansatz: 100 µl Testpuffer (0,5 M TEA; 80 mM MgCl₂; pH 7)
 500 µl NP-H₂O
 100 µl ATP (10 mM)
 100 µl NADP (20 mM)
 25 µl Phosphoglukoseisomerase (200 U/ml)
 25 µl Glukose-6-Ⓟ-DH (200 U/ml)
 100 µl zellfreier Rohextrakt
 mit 50 µl Fruktose (0,6 M) gestartet

Messung: - Zunahme von NADPH => Extinktionszunahme (340 nm)
 - Abzug der Leerwerte „- Fruktose“ und „- Rohextrakt“

Pyruvatdecarboxylase-Aktivitätstest (PDC)

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



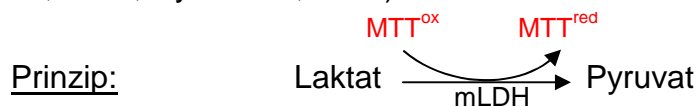
Aufschlusspuffer: 0,1 M Na-Zitrat; 20 mM MgSO₄, 1,5 mM Thiamin-PP, pH 6)

Testansatz: 100 µl Testpuffer (1 M Na-Zitrat; 0,2 M MgSO₄; 15 mM Thiamin-PP)
 230 µl NP-H₂O
 500 µl Na-Pyruvat (34 mM)
 100 µl NADH (2 mM)
 20 µl Alkoholdehydrogenase (175 U/ml)
 mit 50 µl zellfreiem Rohextrakt gestartet

Messung: - Abnahme von NADH => Extinktionsabnahme (340 nm)
 - Abzug der Leerwerte „- Pyruvat“ und „- Rohextrakt“

membrangebundene Laktat-DH-Aktivitätstest (mLDH)

(modifiziert nach Rule *et al.*, 1985; Pratt *et al.*, 1979; Barnes *et al.*, 1970; Barnes *et al.*, 1971; Dym *et al.*, 2000)



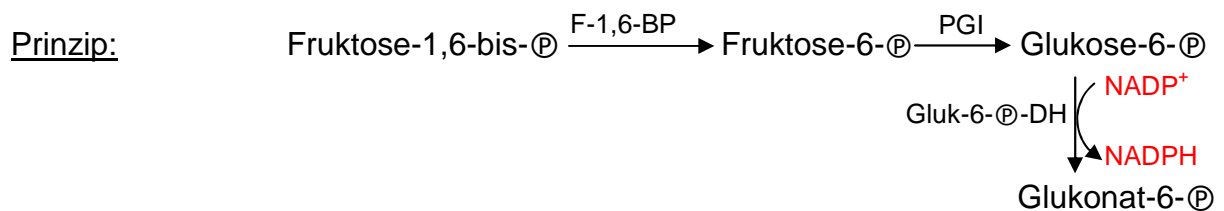
Aufschlusspuffer: 10 mM KPP; 0,3 % Triton-X100; pH 8

Testansatz: 100 µl Testpuffer (1M KPP, pH 8)
 500 µl Triton-X100 (1,2 %)
 100 µl MTT (0,6 mg/ml)
 100 µl PMS (1,2 mg/ml)
 100 µl D-Laktat (0,1 M)
 mit 100 µl zellfreiem Rohextrakt oder Membranfraktion gestartet

Messung: - Zunahme von MTT^{red} => Extinktionszunahme (570 nm)
 - Abzug des Leerwertes „- Laktat“

Fruktose-1,6-bis-Phosphatase-Aktivitätstest (F-1,6-BPase)

(modifiziert nach Rittmann *et al.*, 2003)



Aufschlusspuffer: 50 mM TEA; 50 mM KCl; „Complete“ (Roche Diagnostics, Mannheim), pH 7,7

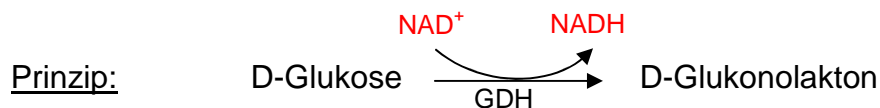
Testansatz: 100 µl Testpuffer (0,5M TEA; 80mM MgCl₂; 80mM MnCl₂; 1M KCL; pH7,7)
600 µl NP-H₂O
100 µl NADP (20 mM)
25 µl Phosphoglukose-Isomerase (200 U/ml)
25 µl Glukose-6-Ⓟ-DH (200 U/ml)
100 µl zellfreier Rohextrakt
mit 50 µl Fruktose-1,6-bis-Ⓟ (15 mM) gestartet

Messung: - Zunahme von NADPH => Extinktionszunahme (340 nm)
- Abzug der Leerwerte „- Fruktose-1,6-bis-Ⓟ“ und „- Rohextrakt“

11. Bioanalytische Methoden

11.1 Enzymatische Glukosebestimmung

Da sich mit der verwendeten HPLC-Analytik Glukose und Glukonat nicht trennen ließen, wurde die Glukosekonzentration enzymatisch bestimmt. Dazu wurde ein fertiger Glukosetest (DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Holzheim) nach Herstellerangaben verwendet, dessen Testzusammensetzung wie unten angegeben modifiziert wurde. In einer Halbmikroküvette (Schichtdicke: 1 cm) wurde die von der Glukose-DH (GDH) katalysierte glukoseabhängige Bildung von NADH im Photometer „Ultrospec 3000 pro“ (Amersham Bioscience, Freiburg) bei RT und 340 nm Wellenlänge gemessen. Die Ermittlung des Berechnungsfaktors erfolgte durch eine Eichgerade mit 10 Glukoselösungen im Konzentrationsbereich 0,01 – 0,10 mg/ml.



Testansatz: 100 µl Kulturüberstand (1:2000 vorverdünnt)
800 µl Reagenz 1 (vortemperiert auf RT)
200 µl Reagenz 2 (vortemperiert auf RT)

Messung: - mischen, 15 min Inkubation bei RT
- Zunahme von NADH => Extinktionszunahme (340 nm)
- Abzug des Reagenzienleerwerts

11.2 Bestimmung von Metaboliten mittels HPLC

Die Bestimmung der Konzentrationen von Biotransformations-Substraten und Produkten wurde mit hochauflösender Flüssigchromatographie (HPLC) durchgeführt. Dabei wurden die Konzentrationen von Glukose/Glukonat, 5-KGA und 2-KGA/2,5-dKGA mit der Methode 1 (Tab. 10) bestimmt, mit der jedoch keine Trennung von Glukose und Glukonat bzw. 2-KGA und 2,5-dKGA erreicht wurde. Zur Bestimmung der Konzentrationen von Sorbitol, Sorbose, Sorboson und 2-KGLA wurde die Methode 2 in dieser Arbeit entwickelt (Tab. 11). Die HPLC-Anlage bestand aus

folgenden Komponenten: Pumpe (L-7100, Hitachi Merck), UV-Detektor (L-7400, Hitachi Merck), Brechungsindex-Detektor (L-7490, Hitachi Merck) und Säulenofen (Jetstream plus, Hitachi Merck). Vor der chromatographischen Trennung wurden die Kulturüberstände durch eine 0,1 µm-Nitrozellulosemembran (Schleicher und Schuell, Dassel) sterilfiltriert und 1:10 im jeweiligen Laufmittel verdünnt (10 µl Injektionsvolumen). Die Berechnung der Metabolitkonzentrationen erfolgte anhand einer substanzspezifischen Kalibriergeraden für den UV- und RI-Detektor mit der Software „HSM D-7000, Multi HSM Manager, Version 4.1“ (Hitachi Merck).

Tab. 10: HPLC-Methode 1 zur Quantifizierung von Glukose/Glukonat, 5-KGA und 2-KGA/2,5-dKGA.

Metabolite [Retentionszeit RI]	Glukose/Glukonat [6,29 min], 5-KGA [6,93 min] und 2-KGA/2,5-di-KGA [5,53 min]
Chromatographie-Art	Umkehrphasenchromatographie
Säule	Shodex DE-613, 150 x 6,0 mm (Phenomenex, Aschaffenburg)
Laufmittel	2 mM HClO ₄
Temperatur	30 °C
Flussrate	0,5 ml/min
Laufzeit	25 min
Detektion	UV-Detektion bei 210 nm Wellenlänge, RI-Detektion

Tab. 11: HPLC-Methode 2 zur Quantifizierung von Sorbitol, Sorbose, Sorboson und 2-KGLA.

Metabolite [Retentionszeit RI]	Sorbitol [10,81 min], Sorbose [9,87 min], Sorboson [9,43 min], 2-KGLA [8,42 min], Acetat [16,61 min]
Chromatographie-Art	Kationenaustauschchromatographie
Säule	Aminex HPX-87 H, 300 x 7,8 mm (Biorad Laboratories, München)
Laufmittel	6 mM H ₂ SO ₄
Temperatur	60 °C
Flussrate	0,6 ml/min
Laufzeit	25 min
Detektion	UV-Detektion bei 190 nm Wellenlänge, RI-Detektion

11.3 Massenspektroskopie

Die Identifizierung von Proteinen erfolgte mittels Peptidmassen-„Fingerprint“-Analyse (Fountoulakis und Langen, 1997; Nouwens *et al.*, 2000; Schaffer *et al.*, 2001). Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Proteine wurden die interessierenden Proteinbanden aus dem SDS-Gel ausgeschnitten, zweimal 15 min mit 30 % Acetonitril (v/v) in 0,1 M NH₄HCO₃ gewaschen und für 20 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Zur Rehydrierung wurden die Gelstücke in 5 µl 3 mM Tris/HCl pH 8,8 mit 10 ng/µl Trypsin (Promega, Mannheim) inkubiert. Nach 30 min wurden 10 µl 3 mM Tris/HCl pH 8,8 hinzugefügt und die Proben ÜN bei Raumtemperatur inkubiert. Die Elution der tryptisch gespaltenen Peptide aus der Gelmatrix erfolgte durch Inkubation mit 8 µl NP-H₂O für 15 min, anschließender Zugabe von 10 µl 30 % Acetonitril (v/v) in 0,1 % Trifluoressigsäure (v/v) und weiteren 10 min Inkubation bei Raumtemperatur. Zur MALDI-TOF-MS-Analyse wurden 0,5 µl

Probe in 0,5 µl Matrix (α -Cyano-4-hydroxy-trans-zimtsäure in 50 % Acetonitril (v/v) und 0,25 % Trifluoressigsäure (w/v)) auf einer Probenplatte kokristallisiert (Vorm und Mann, 1994) und in einer „Voyager-DE STR Biospectrometry Workstation“ (Applied Biosystems, Darmstadt) vermessen. Zur Steuerung und Datenanalyse wurde die Software „Voyager Control Panel 5.0“ und „Voyager Data Explorer 3.5“ (Applied Biosystems, Darmstadt) verwendet und das Gerät zuvor mit dem „Sequazyme Peptide Mass Standard Kit“ (Applied Biosystems, Darmstadt) kalibriert. Monoisotopische Peptidmassen wurden mit den theoretischen Massen der durch das *G. oxydans*-Genomprojekt zugänglichen Datenbank tryptisch geschnittener Peptide mittels des Programms „MSFit“ (University of California, San Francisco, USA) verglichen und ausgewertet. Für eine sichere Identifizierung wurde vorausgesetzt, dass mindestens vier Peptidmassen mit den für ein bestimmtes Protein vorhergesagten Fragmentmassen übereinstimmten und die Unterschiede zwischen gemessener und theoretischer Masse maximal 100 ppm betragen.

Für den Membranproteinvergleich am Institut für Mikrobiologie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität (Greifswald) wurden 400 ml *G. oxydans*-Kulturen (S/S-Medium) in 2 l-Erlenmeyerkolben bis zur exponentiellen Phase kultiviert und die geernteten Zellen auf Trockeneis nach Greifswald transportiert. Die Herstellung der zellfreien Rohextrakte und der Membranfraktionen, das Reinigen der Membranen, die Solubilisierung der Membranproteine mit Dodecylmaltosid und das Abtrennen der Membranen erfolgte wie von Eymann *et al.* (2004) beschrieben. Mit den aus dem Membranverbund herausgelösten Proteinen wurde anschließend eine SDS-PAGE durchgeführt, wobei von jedem *G. oxydans*-Stamm exakt gleiche Gesamtproteinmengen aufgetrennt wurden. Jede Spur des SDS-Gels wurde in vierzehn Fragmente unterteilt, wobei darauf geachtet wurde, dass nicht durch Proteinbanden hindurch geschnitten wurde. Die auf diese Weise erhaltenen 56 Gelfragmente wurden zweimal mit 200 µl 200 mM NH_4HCO_3 in 50 % Acetonitril für 30 min bei 37 °C gewaschen, in der Vakuumzentrifuge getrocknet und für eine Stunde tryptisch verdaut. Nach Abnehmen des Überstandes und weiterer Inkubation für 18 h bei 37 °C wurden die Proteine für 30 min bei RT im Ultraschallbad eluiert. Der Überstand wurde in der bei Eymann *et al.* (2004) beschriebenen Weise mittels HPLC vorfraktioniert und massen-spektroskopisch analysiert (ESI-MS). Anhand der Anzahl von identifizierten Peptiden konnte aufgrund der normierten Vorgehensweise eine semiquantitative Aussage über die Konzentration des jeweiligen Proteins in der Probe getroffen werden.

IV. Ergebnisse

1. Wachstum und Produktbildung verschiedener *G. oxydans*-Stämme

Um einen geeigneten *G. oxydans*-Wildtypen für die Konstruktion von 2-KGLA bildenden Stämmen auszuwählen, wurden *G. oxydans* DSM 2343, DSM 3503, DSM 3504 und NCIMB 8084 (Tab. 1) bezüglich ihrer Wachstumsparameter ($Y_{X/S}$, μ_{max}), ihrer natürlichen Substrat- und Produktspektren, ihrer Produktausbeuten ($Y_{P/S}$) und ihrer Produktbildungsraten (q) charakterisiert. Da die membranständige Sorbitoldehydrogenase (mSLDH) auch die Oxidation von Mannitol zu Fruktose, von Glukonat zu 5-Keto-Glukonat und von Glycerin zu Dihydroxyaceton katalysiert (Matsushita *et al.*, 2003; Salusjärvi *et al.*, 2004), wurden neben Sorbitol auch die C-Quellen Mannitol, Glukose und Glycerin verwendet. Im Zuge einer Medienoptimierung stellte sich heraus, dass für das Wachstum von *G. oxydans* neben der C-Quelle entweder Hefeextrakt oder Maisquellwasser notwendig war. Dabei wurde für Hefeextrakt eine optimale Konzentration von 15 g/l und für Maisquellwasser eine optimale Konzentration von 7,5 g/l ermittelt. Durch die Zugabe von 0,5 % Glycerin konnte, unabhängig von der verwendeten C-Quelle, die Lag-Phase deutlich verkürzt werden und ein reproduzierbareres Anwachsen der Zellen erzielt werden. Während die Charakterisierung der Stämme für die C-Quellen Sorbitol, Mannitol und Glycerin im Schüttelkolben erfolgte, wurde für die Kultivierung mit Glukose eine Fermentations- bzw. Biotransformationsmethode in dem Parallelfertmentationssystem „Fedbatch-pro“ (DASGIP AG, Jülich) entwickelt (Kap. III/8.1). Durch Titration konnte so die Ansäuerung des Mediums während der Umsetzung von Glukose zu Glukonat verhindert werden. Die im Folgenden angegebenen Wachstums- und Produktions-Parameter sind Mittelwerte aus jeweils zwei voneinander unabhängigen Kultivierungen. Um bei der Berechnung der Parameter $Y_{P/X}$, $Y_{X/S}$ und $Y_{P/S}$ Fehler aufgrund von Messungenauigkeiten zu vermeiden, wurden diese nicht nur mit einem Messwert durch Quotientenbildung am Kultivierungsendpunkt bestimmt, sondern über den gesamten Fermentationsverlauf ermittelt (Anhang, Abb. 30).

1.1 Wachstum und Substratumsatz mit Sorbitol als C-Quelle

G. oxydans oxidiert Sorbitol mit Hilfe der mSLDH zu Sorbose und katalysiert somit den ersten Schritt des „L-Sorboson-Pathways“ zur Synthese von 2-KGLA (Hoshino *et al.*, 2003). Mit Sorbitol als C-Quelle wuchs *G. oxydans* DSM 3504 im Vergleich zu den anderen drei Stämmen mit der höchsten Wachstumsrate und dem

größten Biomasseausbeutekoeffizienten bis zu deutlich höheren optischen Dichten, während die anderen Stämme mit untereinander gleichen Wachstumsraten weniger Biomasse produzierten (Abb. 6, Tab. 12).

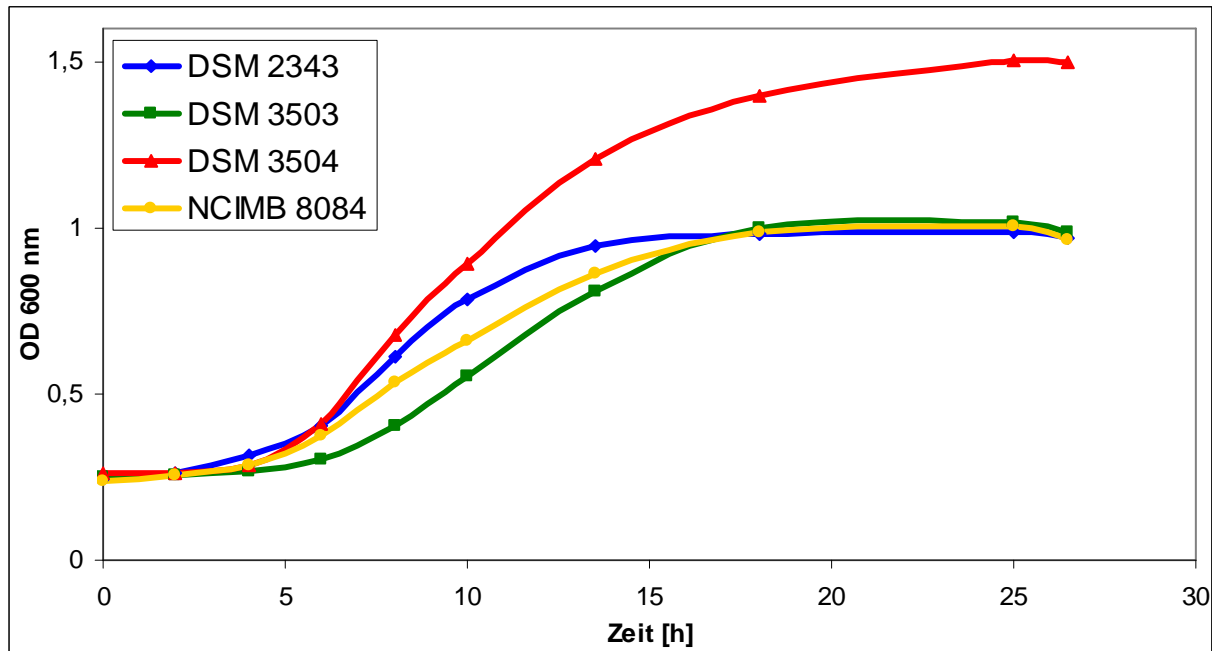


Abb. 6: Wachstum verschiedener *G. oxydans*-Stämme in MQW-Medium mit 25 g/l Sorbitol.

Zur Berechnung der Substratumsatz-Parameter (Tab. 12) wurde die bei Wachstum auf Sorbitol erfolgte Substratabnahme und Produktzunahme in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer mittels HPLC bestimmt (Abb. 7). Die Produkt/Substrat-Ausbeuten ($Y_{P/S}$), die bei allen vier Stämmen etwa 1,0 betragen, verdeutlichen, dass Sorbitol vollständig zu Sorbose umgesetzt wurde. Shinjoh *et al.* (1990) beschrieben ebenfalls einen stöchiometrischen Sorbitolumsatz durch die mSLDH.

Die in dieser Arbeit untersuchten Stämme unterschieden sich jedoch deutlich in der Geschwindigkeit, mit der sie Sorbitol oxidierten. So setzte *G. oxydans* DSM 2343 mit der geringsten Biomasse das Sorbitol am schnellsten zu Sorbose um, was sich in der höchsten spezifischen Sorbosebildungsrate ($q_{\text{Sorbose}}^{\text{max}} = 17,2 \text{ g Sorbose/ g BTM} \times \text{h}$) und der höchsten spezifischen Produktausbeute ($Y_{P/X} = 102,1 \text{ g Sorbose/ g BTM}$) niederschlug. Im Gegensatz dazu erfolgte die Umsetzung durch *G. oxydans* DSM 3504 langsamer ($q_{\text{Sorbose}}^{\text{max}} = 13,7 \text{ g Sorbose/ g BTM} \times \text{h}$) und mit 50 % mehr Biomasse ($Y_{P/X} = 59,7 \text{ g Sorbose/ g BTM}$). Die spezifischen Produktausbeuten von *G. oxydans* DSM 3503 und NCIMB 8084 lagen mit ca. 89 g Sorbose/ g BTM zwischen den Werten von *G. oxydans* DSM 2343 und DSM 3504.

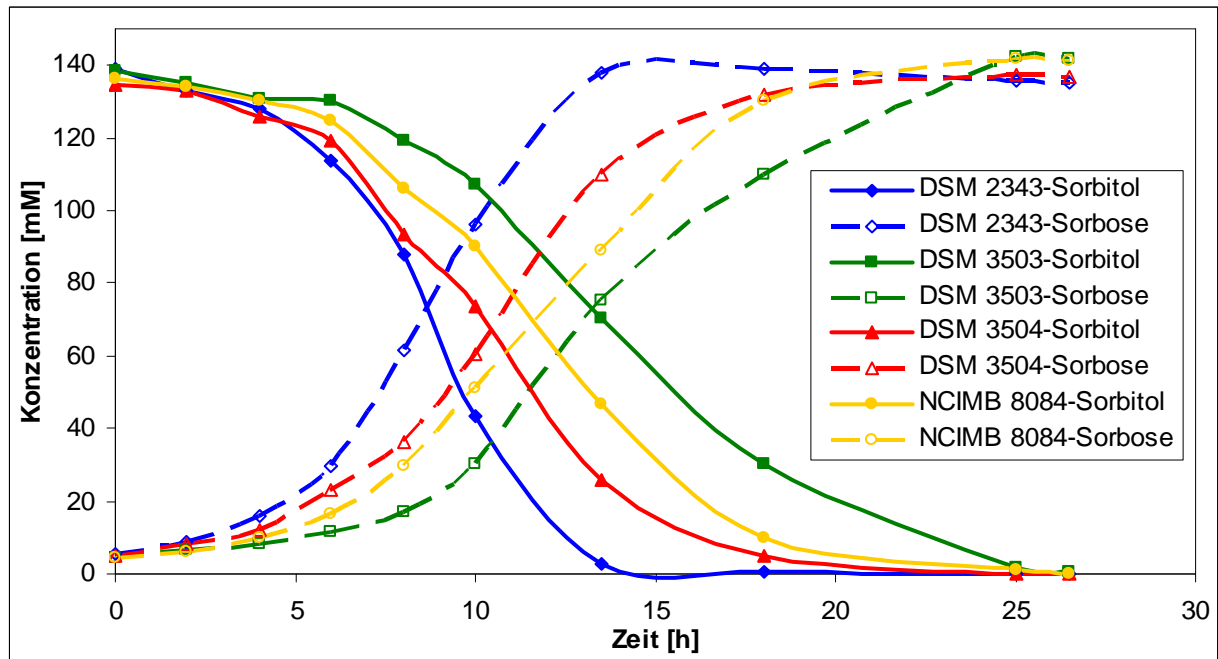


Abb. 7: Substratumsatz verschiedener *G. oxydans*-Stämme bei Wachstum in MQW-Medium mit 25 g/l (110 mM) Sorbitol.

Tab. 12: Wachstums- und Substratumsatz-Parameter verschiedener *G. oxydans*-Stämme bei Wachstum in MQW-Medium mit 25 g/l Sorbitol. BTM = um die zum Zeitpunkt $t = 0$ h korrigierte BTM, μ_{\max} = maximale Wachstumsrate, t_d = Verdopplungszeit; $Y_{X/S}$ = Biomasseausbeutekoeffizient; $q_{\text{Sorbose}}^{\max}$ = spezifische, maximale Produktbildungsrate, $Y_{P/S}$ = Produktausbeutekoeffizient, $Y_{P/X}$ = spezifischer Produktausbeutekoeffizient.

<i>G. oxydans</i> -Stamm	End-OD	BTM [g/l]	μ_{\max} [h^{-1}]	t_d [h]	$Y_{X/S}$ [g BTM/g Sorbitol]	$q_{\text{Sorbose}}^{\max}$ [g Sorbose/g BTM * h]	$Y_{P/S}$ [g Sorbose/g Sorbitol]	$Y_{P/X}$ [g Sorbose/g BTM]
DSM 2343	0,99	0,24	0,17	4,1	0,010	17,2	0,97	102,1
DSM 3503	1,02	0,24	0,15	4,7	0,012	13,2	1,03	88,9
DSM 3504	1,51	0,39	0,23	3,0	0,016	13,7	0,97	59,7
NCIMB 8084	1,01	0,24	0,16	4,3	0,011	14,5	0,99	89,2

1.2 Wachstum und Substratumsatz mit Glukose als C-Quelle

Glukose wird von *G. oxydans* mit der Glukose-DH, Glukonat-5-DH (identisch mit mSLDH) und Glukonat-2-DH über die Zwischenstufe Glukonat zu 5-Keto-Glukonat (5-KGA) und 2-Keto-Glukonat (2-KGA) oxidiert (Velizarov und Beschkov, 1998; Shinagawa und Ameyama, 1982; Shinagawa *et al.*, 1983, 1999). In einigen Stämmen kann 2-KGA durch eine 2-KGA-DH weiter zu 2,5-Di-keto-Glukonat (2,5-dKGA) umgesetzt werden (Weenk *et al.*, 1984; Shinagawa *et al.*, 1981).

Die Kultivierung der *G. oxydans*-Stämme mit Glukose als C-Quelle erfolgte in der „Fedbatch-pro“-Parallelerfermentationsanlage bei pH 5 und somit zwischen dem pH-Optimum des *G. oxydans*-Wachstums von pH 5,5 (Holt *et al.*, 1994) und dem pH-Optimum der Glukose-DH von pH 4,8 (Silberbach *et al.*, 2003). Erneut wuchs *G. oxydans* DSM 3504 mit der höchsten Wachstumsrate und dem größten

Biomasseausbeutekoeffizienten ($Y_{X/S} = 0,04$) bis zu der höchsten optischen Dichte. In der Reihenfolge *G. oxydans* NCIMB 8084, DSM 2343 und DSM 3503 nahm dann die Biomasseproduktion ab (Tab. 13). Verglichen zu den Biomasseausbeutekoeffizienten von z. B. *Corynebacterium glutamicum* ($Y_{X/S} \sim 0,4$; Wendisch *et al.*, 2000) und *E. coli* ($Y_{X/S} \sim 0,5$; Tempest und Neijssel, 1987) sind die Biomasseausbeuten von *G. oxydans* deutlich geringer, da die C-Quelle von *G. oxydans* im Gegensatz zu *E. coli* und *C. glutamicum* nicht im Zytosol verstoffwechselt wird, sondern nach nur wenigen Oxidationsschritten in Form von unvollständig oxidierten Produkten im Medium akkumuliert (Abb. 8).

Bei Wachstum auf Glukose ließen sich zwei unterschiedliche Oxidationsphasen mit erhöhtem Sauerstoffbedarf voneinander abgrenzen: In der ersten Phase erfolgte die stöchiometrische Umsetzung von Glukose zu Glukonat und in der zweiten Phase die Oxidation von Glukonat zu den Ketoglukonaten (Abb. 8). Aus der Glukoseabnahme und den Produktzunahmen in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer wurden die Substratumsatzparameter ermittelt (Tab. 13). Hierbei wurden die Konzentrationen von 2-KGA und 2,5-dKGA zusammen dargestellt, da sich diese beiden Produkte mittels HPLC nicht voneinander trennen ließen. Aufgrund einer im Genom von *G. oxydans* DSM 2343 fehlenden 2-KGA-DH konnte *G. oxydans* DSM 2343 jedoch nur 2-KGA und kein 2,5-dKGA bilden (Prust *et al.*, 2005). Von *G. oxydans* DSM 3504 und NCIMB 8084 hingegen wurden große Mengen 2,5-dKGA gebildet, was anhand der starken Rotfärbung des Mediums zu erkennen war; bei *G. oxydans* DSM 3503 fand keine Rotfärbung statt. Deshalb wurden die Produktausbeuten bei *G. oxydans* DSM 2343 und DSM 3503 nur für 2-KGA und bei *G. oxydans* DSM 3504 und NCIMB 8084 für 2-KGA und 2,5 dKGA gemeinsam berechnet. Diese beiden Stämme wuchsen im Vergleich zu *G. oxydans* DSM 2343 und DSM 3503 bis zu wesentlich höheren optischen Dichten heran (Tab. 13), da aufgrund des zusätzlichen Oxidationsschrittes von 2-KGA zu 2,5-dKGA mehr Energie gewonnen werden konnte. Diese Annahme wurde durch die Korrelation der Farbintensität des Fermentationsüberstands mit der Biomasseproduktion bestätigt.

Die Addition der einzelnen $Y_{P/S}$ -Werte (Tab. 13) verdeutlichte, dass auch bei Glukose als C-Quelle kaum Substrat für die Biomasseproduktion verwendet wurde, sondern die gesamte Glukose in die Produkte Glukonat, 2-KGA, 5-KGA oder 2,5-dKGA umgesetzt wurde. Die Summen der Produktausbeuten nahmen sogar Werte über eins an, was auf die Verwendung von Komplexmedium (MQW-Medium) zurückgeführt wurde. Hinsichtlich der Endproduktspektren und Produktausbeuten bei Wachstum auf Glukose wurden große Unterschiede zwischen den Stämmen deutlich: Während *G. oxydans* DSM 3503 Glukose zum größten Teil nur bis zu

Glukonat umsetzte (87 %), oxidierten *G. oxydans* DSM 3504 und NCIMB 8084 die Glukose zu 93 % bzw. 95 % zu 2-KGA bzw. 2,5-dKGA. Dabei wurde aufgrund der oben beschriebenen Rotfärbung des Mediums darauf geschlossen, dass den größten Produktanteil das 2,5-dKGA ausmachte. Somit eignen sich diese beiden Stämme besonders für die in der Arbeitsgruppe untersuchte Umsetzung von Glukose über 2,5-dKGA zu Vitamin C (Sonoyama *et al.*, 1982). *G. oxydans* DSM 2343 setzte Glukose jeweils zur Hälfte in 2-KGA ($Y_{2\text{-KGA}/\text{Glukose}} = 0,55$) und 5-KGA ($Y_{5\text{-KGA}/\text{Glukose}} = 0,55$) um. Da 5-KGA die direkte Vorstufe der L-(+)-Weinsäure ist, wurde mit Hilfe der verwendeten Biotransformationsmethode (Kap. III/8) und *G. oxydans* DSM 2343 ein neues Verfahren zur mikrobiellen L-(+)-Weinsäure-Produktion entwickelt (Merfort, 2006; Bremus *et al.*, 2004). Die hohe 5-KGA-Produktivität von *G. oxydans* DSM 2343 gab zusätzlich einen Hinweis darauf, dass sich dieser Stamm auch für die Konstruktion eines Vitamin C-Produktionsstamms eignet, da die mSLDH sowohl für die Umsetzung von Glukonat zu 5-KGA als auch für die Oxidation von Sorbitol zu Sorbose verantwortlich ist (Matsushita *et al.*, 2003).

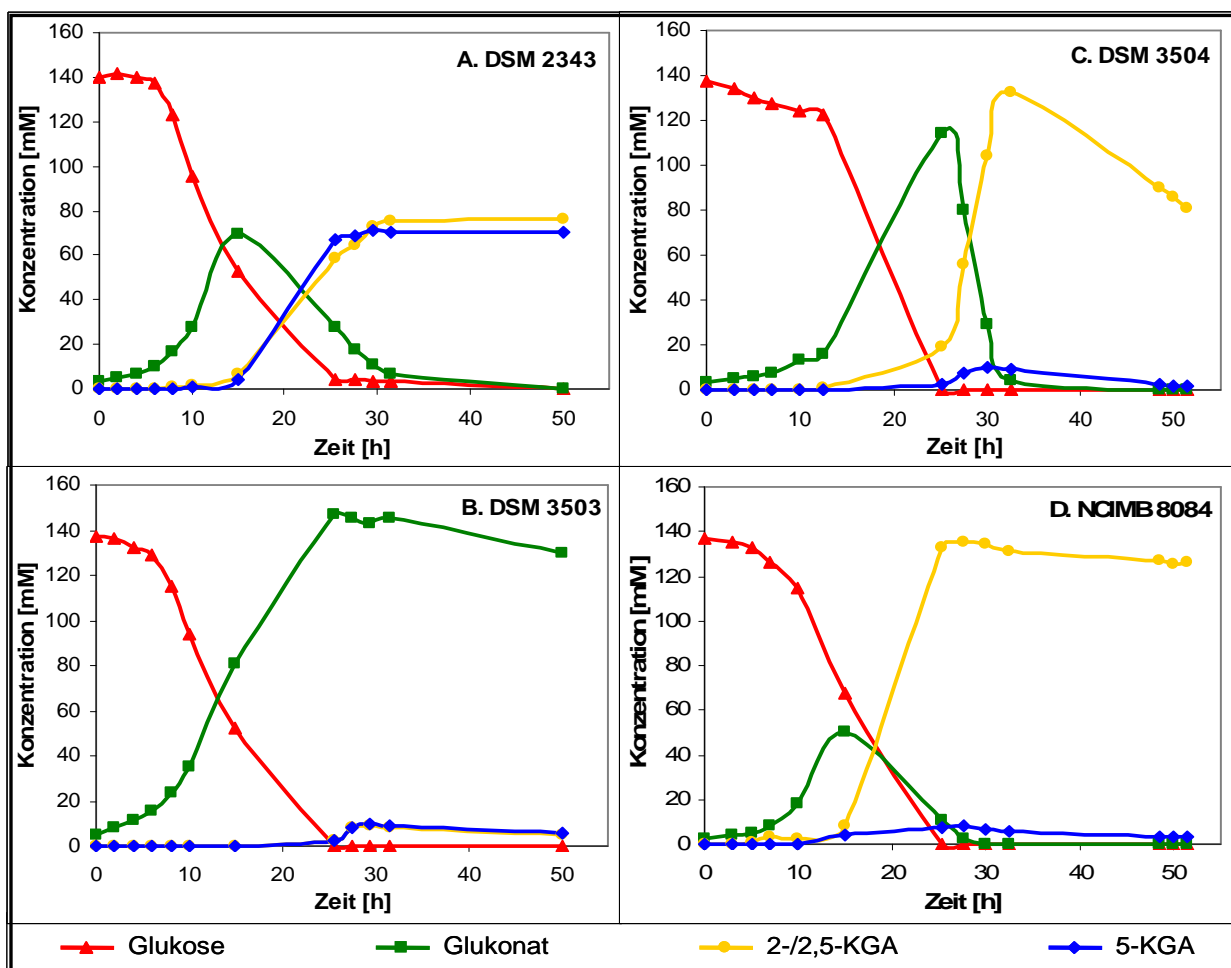


Abb. 8: Glukoseoxidation von *G. oxydans* DSM 2343 (A), DSM 3503 (B), DSM 3504 (C) und NCIMB 8084 (D) bei Fermentation in MQW-Medium mit 25 g/l Glukose (pH 5). Die in Tab. 13 aufgelisteten Substratumsatz-Parameter sind zum Zeitpunkt 32 h berechnet worden, da dort die Konzentrationen der jeweiligen Endprodukte ihr Maximum erreichten.

IV. Ergebnisse

Tab. 13: Wachstums- und Substratumsatz-Parameter verschiedener *G. oxydans*-Stämme bei Wachstum in MQW-Medium mit 25 g/l Glukose. Die Substratumsatz-Parameter wurden zum Zeitpunkt 32 h berechnet (Abb. 8). Abkürzungen siehe Tab. 12.

G. oxydans-Stamm	End-OD	BTM [g/l]	μ_{\max} [h⁻¹]	t_d [h]	$Y_{x/s}$ [g BTM/g Glukose]	$Y_{p/s}$ [g Produkt/g Glukose]	$Y_{p/x}$ [g Produkt/g BTM]
DSM 2343	1,14	0,33	0,13	5,4	0,014	5-KGA: 0,55 2-KGA: 0,55 Glukonat: 0,05 Summe: 1,15	5-KGA: 41,9 2-KGA: 41,1 Glukonat: 3,9 Summe: 86,9
DSM 3503	0,75	0,13	0,08	8,8	0,005	5-KGA: 0,08 2-KGA: 0,07 Glukonat: 1,11 Summe: 1,26	5-KGA: 15,95 2-KGA: 13,35 Glukonat: 214,1 Summe: 243,4
DSM 3504	3,36	1,00	0,14	5,3	0,040	5-KGA: 0,07 2-/2,5-dKGA: 1,03 Glukonat: 0,01 Summe: 1,11	5-KGA: 2,20 2-/2,5-dKGA: 33,8 Glukonat: 0,32 Summe: 36,32
NCIMB 8084	1,59	0,49	0,12	5,8	0,020	5-KGA: 0,06 2-/2,5-dKGA: 1,13 Glukonat: 0,00 Summe: 1,19	5-KGA: 4,19 2-/2,5-dKGA: 76,5 Glukonat: 0,00 Summe: 80,69

Bei der Umsetzung von Glukose zu 5-KGA mit *G. oxydans* DSM 2343 wurde zum einen deutlich, dass das Verhältnis von gebildetem 5-KGA zu 2-KGA von der Glukosekonzentration abhängt. Sowohl im Schüttelkolben als auch im Fermenter stellte sich eine Glukosekonzentration von 75 g/l für das Wachstum (nicht gezeigt) und die 5-KGA-Bildung als optimal heraus (Abb. 9). Zum anderen wurde eine starke Abhängigkeit der 5-KGA-Bildung vom pH-Wert beobachtet. Bei pH-Werten zwischen 2,5 und 3 (Abb. 9-A) wurde bei einer Glukosekonzentration von 75 g/l zweieinhalb mal mehr 5-KGA als 2-KGA gebildet, während bei pH 6 (Abb. 9-B) etwa zehnmal weniger 5-KGA als 2-KGA gebildet wurde. Berücksichtigt man, dass bei pH 5 (Abb. 8-A) zu gleichen Teilen 5-KGA und 2-KGA entstanden, kann gefolgert werden, dass die Glukonat-2-DH bei pH-Werten über pH 5 eine höhere Aktivität als die Glukonat-5-DH besitzt und bei pH-Werten unter pH 5 die Glukonat-5-DH aktiver ist als die Glukonat-2-DH. In Übereinstimmung damit wurde beschrieben, dass die Glukonat-2-DH bis zu pH 7 aktiv ist (Matsushita *et al.*, 2003), während die Glukonat-5-DH *in vitro* ein pH-Optimum von pH 4 und keine nachweisbare Aktivität über pH 6 besitzt (Salusjärvi *et al.*, 2004, Shinagawa *et al.*, 1999). *In vivo* beschreiben Shinagawa *et al.* (1983) einen für die 5-KGA-Produktion optimalen pH-Wert von pH 2,5 - 4,0.

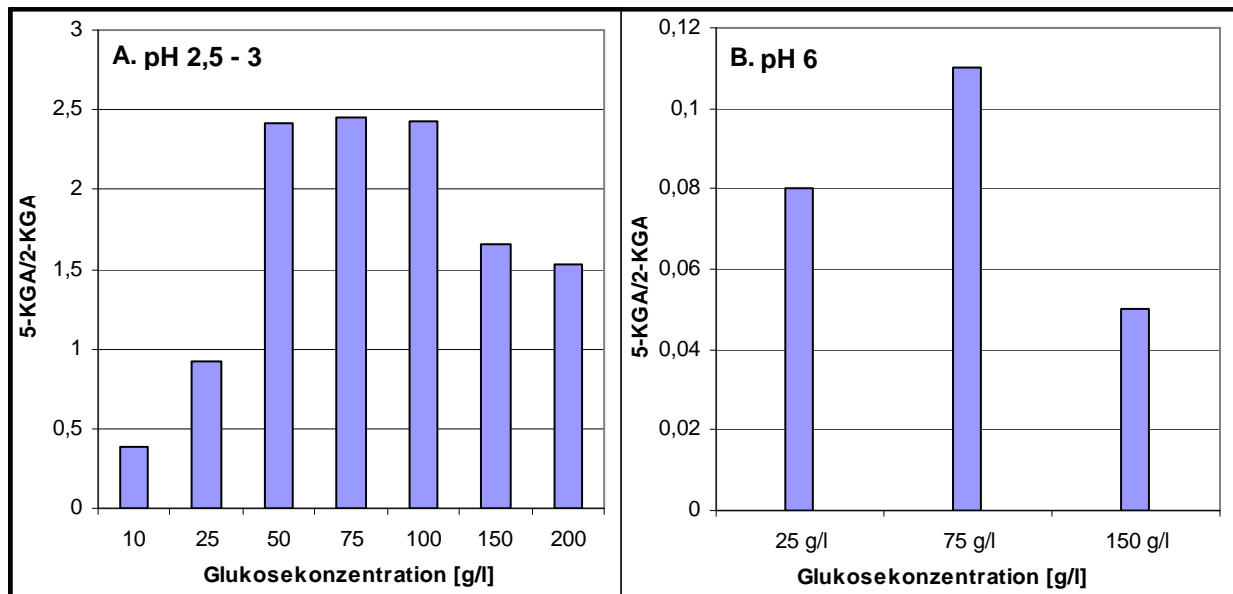


Abb. 9: Verhältnis von gebildetem 5-KGA zu 2-KGA bei Kultivierung von *G. oxydans* DSM 2343 mit verschiedenen Glukosekonzentrationen. (A) Im Schüttelkolben, wo sich bereits zu Beginn des exponentiellen Wachstums pH-Werte von pH 2,5 (200 g/l Glukose) bis pH 3 (10 g/l Glukose) einstellten; (B) Bei geregelterm pH-Wert (pH 6) in der „Fedbatch-pro“-Anlage.

1.3 Wachstum und Substratumsatz mit Mannitol als C-Quelle

Da *G. oxydans* mit Hilfe der mSLDH Mannitol zu Fruktose oxidiert (Matsushita *et al.*, 2003; Salusjärvi *et al.*, 2004), wurde ebenfalls die Verwendung von Mannitol als C-Quelle getestet. Auch dabei wuchs *G. oxydans* DSM 3504 im Vergleich zu den anderen drei *G. oxydans*-Stämmen mit einer zweifach höheren Wachstumsrate bis zu doppelt so hohen optischen Dichten (Tab. 14). Es wurde geringfügig mehr Biomasse gebildet als bei Wachstum auf Sorbitol, wodurch die Ergebnisse von Gosselé *et al.* (1980) bestätigt wurden. Eine mögliche Erklärung für die höhere Biomasseproduktion ist, dass Mannitol nur zu etwa 90 % zu Fruktose umgesetzt ($Y_{\text{Fruktose/Mannitol}} \sim 0,9$) und das restliche Substrat im Zytosol verstoffwechselt wurde, während im Gegensatz dazu Sorbitol vollständig zu Sorbose oxidiert und kein Substrat in die Zelle aufgenommen wurde. In Übereinstimmung damit korrelierte bei *G. oxydans* DSM 3504 auch die höchste Biomasseausbeute mit der niedrigsten Produktausbeute (Tab. 14). Da alle Stämme Mannitol in gleichem Umfang und gleich schnell zu Fruktose umsetzten, *G. oxydans* DSM 3504 dafür jedoch doppelt so viel Biomasse zur Verfügung stand als *G. oxydans* DSM 2343, wurden für *G. oxydans* DSM 3504 die niedrigsten und für *G. oxydans* DSM 2343 die höchsten spezifischen Produktbildungsrate und spezifischen Produktausbeuten berechnet. *G. oxydans* DSM 3503 und NCIMB 8084 wiesen geringfügig niedrigere spezifische Produktausbeuten als *G. oxydans* DSM 2343 auf, produzierten jedoch ebenfalls mit der Hälfte der Biomasse etwas mehr Fruktose als DSM 3504.

Tab. 14: Wachstums- und Substratumsatz-Parameter verschiedener *G. oxydans*-Stämme bei Kultivierung in MQW-Medium mit 25 g/l Mannitol. Abkürzungen wie Tab. 12, Fruk = Fruktose.

<i>G. oxydans</i> -Stamm	End-OD	BTM [g/l]	μ_{\max} [h ⁻¹]	t_d [h]	$Y_{x/s}$ [g BTM/g Mannitol]	q_{Fruk}^{\max} [g Fruk/g BTM * h]	$Y_{p/s}$ [g Fruk/g Mannitol]	$Y_{p/x}$ [g Fruk/g BTM]
DSM 2343	0,99	0,25	0,12	5,9	0,010	10,9	0,90	92,8
DSM 3503	1,04	0,26	0,10	6,7	0,012	9,5	0,92	91,3
DSM 3504	1,89	0,52	0,22	3,1	0,021	9,0	0,84	40,7
NCIB 8084	1,03	0,25	0,12	5,8	0,011	10,4	0,92	86,3

1.4 Wachstum mit Glycerin als C-Quelle

Glycerin wird von *G. oxydans* mit Hilfe der mSLDH zu Dihydroxyaceton umgesetzt (Matsushita *et al.*, 2003; Salusjärvi *et al.*, 2004; Bauer *et al.*, 2005). Bei Kultivierung mit Glycerin zeigten sich deutliche Wachstumsunterschiede zwischen allen vier *G. oxydans*-Stämmen (Tab. 15), so konnte auch in diesem Fall *G. oxydans* DSM 3504 die C-Quelle am besten verwerten und produzierte mit der höchsten Wachstumsrate die meiste Biomasse. In der Reihenfolge *G. oxydans* DSM 3504, NCIMB 8084, DSM 3503 und DSM 2343 wurde die Fähigkeit zur Verwertung von Glycerin immer geringer, was sich in den abnehmenden Wachstums-Parametern widerspiegelte. Im Vergleich zu den anderen C-Quellen stellte sich Glycerin als das schlechteste Wachstumssubstrat heraus.

Tab. 15: Wachstumsparameter verschiedener *G. oxydans*-Stämme bei Wachstum in MQW-Medium mit 25 g/l Glycerin. Abkürzungen: siehe Tab. 12.

<i>G. oxydans</i> -Stamm	End-OD	BTM [g/l]	μ_{\max} [h ⁻¹]	t_d [h]	$Y_{x/s}$ [g BTM/g Glycerin]
DSM 2343	0,31	0,11	0,02	30,1	0,005
DSM 3503	0,47	0,16	0,11	6,4	0,007
DSM 3504	1,10	0,33	0,14	4,9	0,014
NCIMB 8084	0,77	0,21	0,09	7,5	0,009

1.5 Auswahl von *G. oxydans* DSM 2343 zur Konstruktion von rekombinanten 2-KGLA-Produktionsstämmen

Während *G. oxydans* DSM 3504 auf allen getesteten Substraten mit den höchsten Wachstumsraten die meiste Biomasse produzierte (Abb. 10-A), setzte *G. oxydans* DSM 2343 die Substrate am effektivsten in die entsprechenden Produkte um. *G. oxydans* DSM 2343 produzierte daher mit den höchsten Produktbildungsraten genau so viel Sorbose aus Sorbitol und Fruktose aus Mannitol, jedoch viel mehr 5-KGA aus Glukose als die anderen Stämme (Abb. 10-B). Beim Glukoseumsatz wurde in Abb. 10 nur die Bildung von 5-KGA berücksichtigt, da diese genau wie die Fruktose- und Sorbosebildung durch die für die Vitamin C-Synthese notwendige mSLDH katalysiert wird. In Übereinstimmung mit den größten Sorbose-, Fruktose- und 5 KGA-Bildungsraten wurde für *G. oxydans* DSM 2343 auch die höchste

mSLDH-Aktivität bestimmt (*G. oxydans* DSM 2343: 0,3 U/mg Membranprotein; *G. oxydans* DSM 3503, DSM 3504 und NCIMB 8084: 0,2 U/mg Membranprotein). Ein weiterer Vorteil von *G. oxydans* DSM 2343 ist, dass die Produktbildung im Vergleich zu den anderen Stämmen mit deutlich weniger Biomasse erfolgte. Deshalb wurden die höchsten spezifischen Produktausbeuten mit *G. oxydans* DSM 2343 erzielt (Abb. 10-C). Die Korrelation von geringer Biomassebildung mit den höchsten Umsatzraten macht *G. oxydans* DSM 2343 besonders interessant für die Konstruktion eines 2-KGLA-Produktionsstamms und für die biotechnische Anwendung.

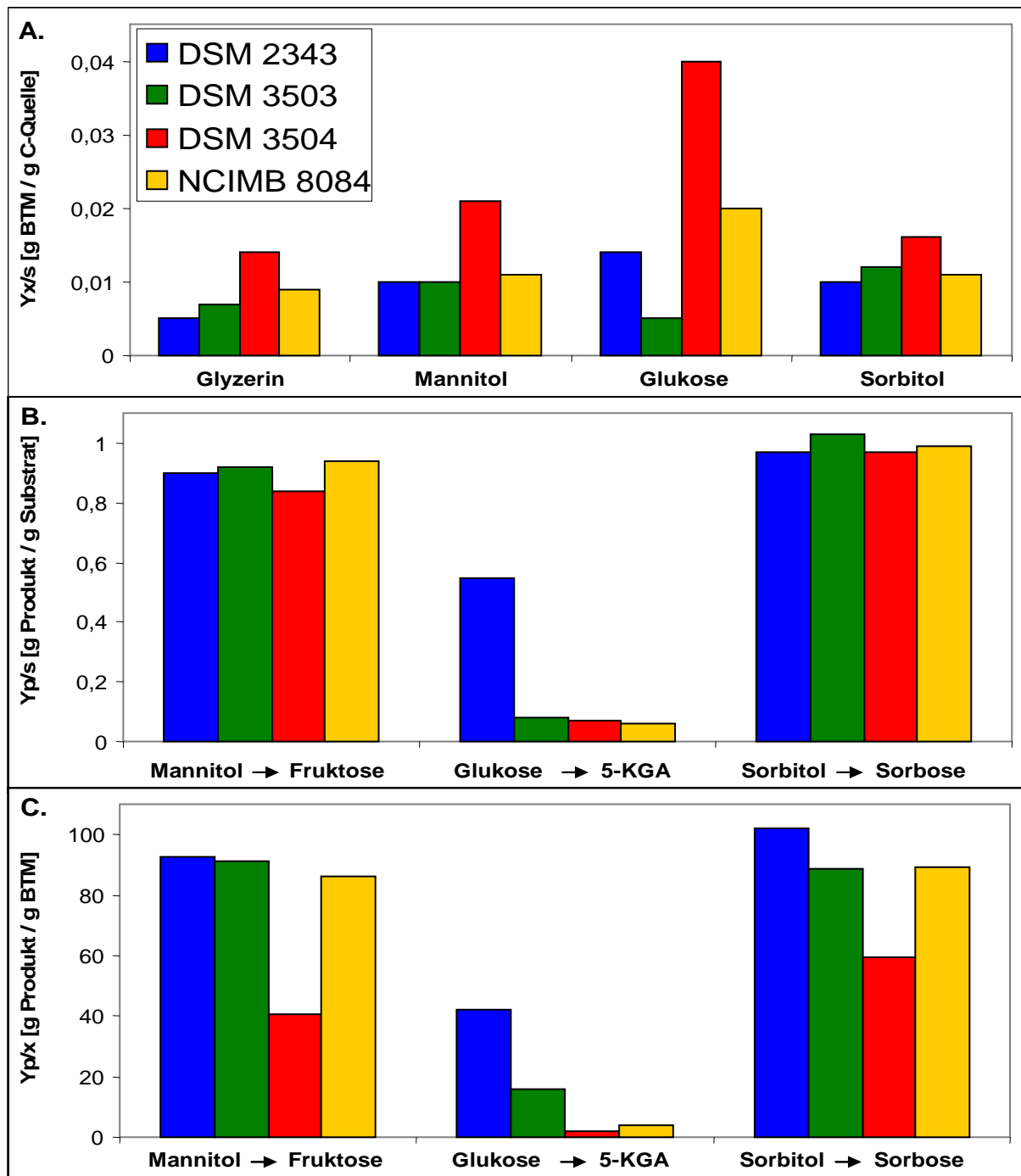


Abb. 10: Biomasseausbeuten (A), Produktausbeuten (B) und spezifische Produktausbeuten (C) der angegebenen *G. oxydans*-Stämme bei Wachstum auf verschiedenen Substraten.

Neben den höchsten Produktbildungsraten und spezifischen Produktausbeuten, die *G. oxydans* DSM 2343 für die Verwendung in einem rekombinanten 2-KGLA-Produktions-System auszeichnen, stand nur für diesen Stamm die komplette Genomsequenz als Werkzeug für molekularbiologische Arbeiten zur Verfügung. Anhand der Genomdaten (Prust *et al.*, 2005) konnte darüber hinaus das Vorhandensein einer 2-KGLA-Reduktase ausgeschlossen werden. Dieses Enzym führt z.B. in den *G. oxydans*-Stämmen G624 (Saito *et al.*, 1997, 1998), IFO 3293 und N44-1 (Sugisawa *et al.*, 1990) zu einer Verminderung der 2-KGLA-Ausbeute, da 2-KGLA zum Nebenprodukt L-Idonat reduziert wird. Des Weiteren besitzt *G. oxydans* DSM 2343 weder SDH- noch SNDH-Gene, so dass in diesem Stamm keine ungewünschten Rekombinationen auftraten und Enzymaktivitätsmessungen zur Analyse einer heterologen *sdh*- und *sndh*-Überexpression nicht durch Basalaktivitäten überdeckt wurden. Aus den genannten Gründen wurde *G. oxydans* DSM 2343 dazu verwendet, durch Überexpression der 2-KGLA-Synthesegene ein mikrobielles 2-KGLA-Produktionssystem zu konstruieren.

1.6 Bestimmung der optimalen Sorbitolkonzentration für *G. oxydans* DSM 2343

Nach Auswahl von *G. oxydans* DSM 2343 als Wildtyp zur Konstruktion eines 2-KGLA-Produktionsstamms wurde für diesen Stamm die optimale Substratkonzentration für das Wachstum auf Sorbitol, dem Ausgangsubstrat für die 2-KGLA-Synthese, bestimmt (Abb. 11-A). Durch Erhöhung der Sorbitolkonzentration auf bis zu 300 g/l ließ sich das Wachstum bis zu einer End-OD von 4,0 steigern. Dabei unterschieden sich jedoch die erreichten optischen Dichten zwischen 100 und 300 g/l Sorbitol nur noch kaum. Die Erhöhung der Sorbitolkonzentration auf 400 g/l führte zu einer Verringerung der Biomasseproduktion. Wie in Abb. 11-B zu erkennen ist, nahmen die Wachstumsraten bis zu einer Sorbitolkonzentration von 100 g/l zu und bei höheren Sorbitolkonzentrationen wieder ab. Bereits ab einer Sorbitolkonzentration von 200 g/l erfolgte das Wachstum langsamer und die stationäre Phase wurde später erreicht. Möglicherweise ist das verringerte Wachstum bei hohen Sorbitolkonzentrationen durch Osmostress, Substrat- oder Produkthemmung zu erklären. Die optimale Sorbitolkonzentration für das Wachstum von *G. oxydans* DSM 2343 lag somit bei etwa 100 g/l. Da *G. oxydans* DSM 2343 darüber hinaus die 100 g/l Sorbitol innerhalb von 24 h vollständig zu Sorbose umsetzte, wurde im Folgenden diese Substratkonzentration bei Sorbitol-Biotransformationen eingesetzt.

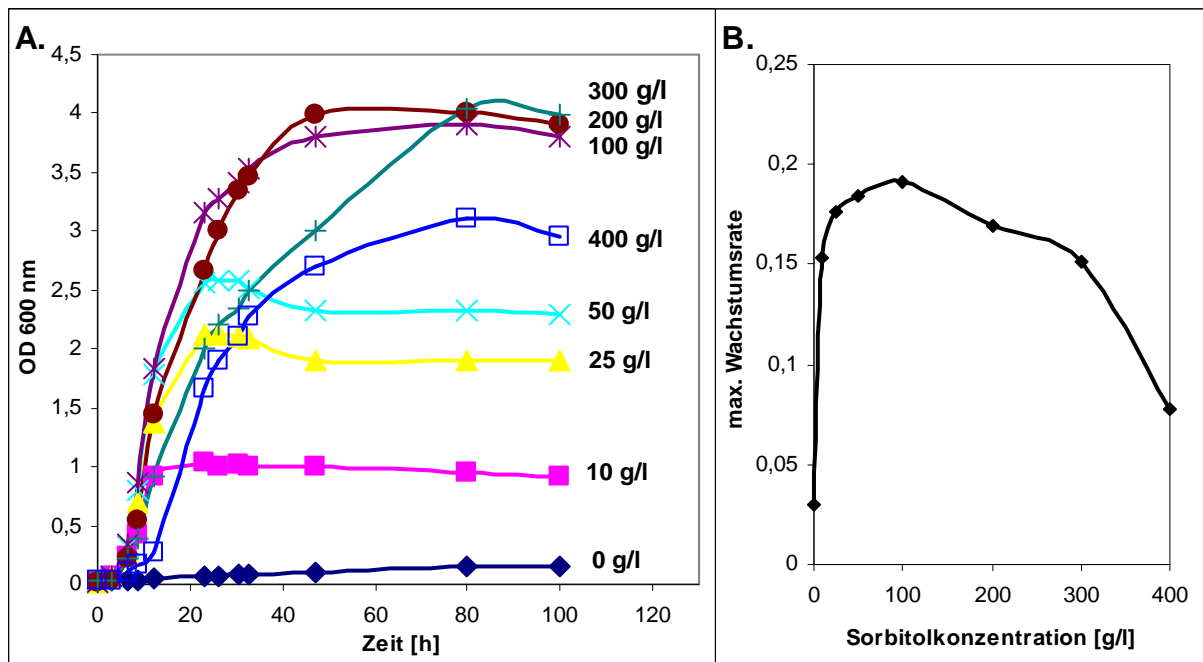


Abb. 11: Wachstum (A) und Abhängigkeit der Wachstumsrate von der Substratkonzentration (B) von *G. oxydans* DSM 2343 bei Kultivierung auf verschiedenen Sorbitolkonzentrationen.

2. Konstruktion von 2-KGLA-Produktions-Stämmen und Expressionsanalysen

2.1 Klonierung der Gene von SDH, cSNDH und mSNDH

Zur Konstruktion von rekombinanten 2-KGLA-Produktionsstämmen sollte *G. oxydans* DSM 2343 mit allen für die 2-KGLA-Synthese essentiellen Enzymen ausgestattet werden. Aufgrund der natürlichen Enzymausstattung war in *G. oxydans* DSM 2343 die mSLDH-Aktivität in ausreichendem Umfang vorhanden, so dass der erste 2-KGLA-Syntheseschritt von Sorbitol zu Sorbose vollständig stattfand. Um jedoch die Oxidation von Sorbitol zu 2-KGLA durchführen zu können, mussten die Gene für eine SDH und eine SNDH plasmidkodiert eingebracht und funktionell überexprimiert werden, da diese im Genom von *G. oxydans* DSM 2343 nicht vorhanden sind (Prust *et al.*, 2005).

Als Spenderorganismen für die Gene der SDH und der löslichen SNDH (cSNDH) wurden *G. oxydans* DSM 3504 und *S. meliloti* ausgewählt, bei denen das *csndh*- und *sdh*-Gen zusammen in einem Gencluster vorliegen (Lee und Pan, 1999; Saito *et al.*, 1997; Capela *et al.*, 2001). Mittels PCR und entsprechenden Primern wurde aus der genomischen DNA von *G. oxydans* DSM 3504 sowohl das komplette *csndh/sdh*-Gencluster als auch das *csndh*-Gen und das *sdh*-Gen separat amplifiziert. Dabei

wurden die zur Klonierung benötigten Restriktionsschnittstellen mit Hilfe der Primer eingefügt. Das *csndh*-Gen wurde über die Schnittstellen *Xba*I/ *Sa*II und das *sdh*-Gen sowie das *csndh/sdh*-Gencluster über die Schnittstellen *Xba*I/ *Spe*I in den Vektor pBBR1MCS2 (Kovach *et al.*, 1995) kloniert, in dem die Expression unter Kontrolle des nativen Promotors stattfinden sollte. Auf diese Weise entstanden die Vektoren pBBR1MCS2-*csndh*, pBBR1MCS2-*sdh* und pBBR1MCS2-*csndh/sdh*, die durch Sequenzanalyse überprüft wurden (Abb. 12). Analog dazu wurde das *csndh*-Gen, das *sdh*-Gen und das *csndh/sdh*-Gencluster aus *S. meliloti* in den Vektor pBBR1MCS2 kloniert. Nach Überführung der konstruierten Plasmide von *E. coli* nach *G. oxydans* DSM 2343 konnte nur eine sehr geringe Transkription der *csndh*- und *sdh*-Gene (Tab. 16), aber keine funktionelle Überproduktion der SDH und cSNDH mittels SDS-PAGE, Enzymaktivitäts-Tests oder eine über Sorbose hinausgehende Produktbildung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Da die Funktionalität des *csndh/sdh*-Genclusters aus *G. oxydans* T-100 durch Überexpression in *G. oxydans* G624 nachgewiesen war (Saito *et al.*, 1997), wurde das *csndh/sdh*-Gencluster von *G. oxydans* DSM 3504 sequenziert (Anhang, Abb. 31) und mit den Sequenzen von *S. meliloti* (Galibert *et al.*, 2001) und *G. oxydans* T-100 (Saito *et al.*, 1997) verglichen. Während die Sequenzidentität zwischen dem Gencluster von *G. oxydans* T-100 und *S. meliloti* nur etwa 70 % (auf Nukleotid- und Aminosäure-Sequenzebene) betrug, beschränkten sich die Unterschiede zwischen den Gencluster-Sequenzen von *G. oxydans* DSM 3504 und *G. oxydans* T-100 auf 83 stille Mutationen und sieben Basensubstitutionen, die einen Aminosäureaustausch zur Folge hatten (Anhang, Abb. 32). Durch Abgleich mit weiteren bekannten SNDH- und SDH-Sequenzen aus anderen Organismen konnte jedoch davon ausgegangen werden, dass Art und Position der einzelnen Aminosäuresubstitutionen keine Beeinträchtigung der Funktionalität des *csndh/sdh*-Genclusters von *G. oxydans* DSM 3504 zur Folge haben. Somit waren die fehlenden SDH- bzw. SNDH-Aktivitäten in den Stämmen mit den plasmidkodierten Genen aus *G. oxydans* DSM 3504 durch zu geringe Expression zu begründen (Tab. 16). Um die Expression der SDH- und cSNDH-Gene bzw. des Genclusters aus *G. oxydans* DSM 3504 zu steigern, wurden die nativen Promotoren gegen den starken konstitutiven *E. coli-tufB*-Promotor (An und Friesen, 1980; Saito *et al.*, 1997, 1998) ausgetauscht. In die Plasmide pBBR1MCS2-*csndh*, pBBR1MCS2-*sdh* und pBBR1MCS2-*csndh/sdh* wurde zu diesem Zweck mittels ortsgerichteter Mutagenese eine *Bln*I-Schnittstelle vor das Start-Codon der einzelnen Gene bzw. des Genclusters inseriert. Nach Herausschneiden der nativen Promotoren über die Restriktionsschnittstellen *P*inA I und *Bln*I erfolgte die Insertion der *tufB*-Promotorkassette mittels Kassetten-

mutagenese (Abb. 12), wobei die jeweils neun bp vor dem Start-Codon liegende putative RBS (Saito *et al.*, 1997) erhalten wurde. Die so entstandenen Plasmide pBBR1MCS2-*csndh-tufB*, pBBR1MCS2-*sdh-tufB* und pBBR1MCS2-*csndh/sdh-tufB* wurden sequenziert, bevor sie von *E. coli* mittels Elektroporation in *G. oxydans* DSM 2343 überführt wurden.

Die Verwendung einer membranständigen SNDH (mSNDH) anstelle einer zytosolischen bietet bei der Umsetzung von Sorbitol zu 2-KGLA eine interessante Alternative, da der Transport von Sorboson und 2-KGLA über die innere Zellmembran entfällt und alle Reaktionen im Periplasma stattfinden können. Außerdem benötigt die cSNDH ein zytosolisches NADP-Regenerierungssystem, während die mSNDH die Elektronen direkt über FAD in die Atmungskette einspeisen kann (Shinjoh *et al.*, 1995). Das *csndh*-Gen in den Plasmiden pBBR1MCS2-*csndh/sdh-tufB* und pBBR1MCS2-*csndh-tufB* wurde deshalb durch das aus *A. liquefaciens* DSM 5603 amplifizierte *msndh*-Gen ersetzt (Abb. 12). Dabei wurde die putative RBS des *msndh*-Gens erhalten und das 3'-Ende des *csndh*-Gens aus der Gencluster-Konfiguration im Konstrukt belassen, da Saito *et al.* (1997) dort eine RBS für das *sdh*-Gen beschrieben (Anhang, Abb. 35). Die so entstandenen Plasmide pBBR1MCS2-*msndh-tufB* und pBBR1MCS2-*msndh/sdh-tufB* wurden nach Sequenzierung von *E. coli* in *G. oxydans* DSM 2343 überführt. Ein Sequenzvergleich zwischen dem in dieser Arbeit verwendeten *msndh*-Gen aus *A. liquefaciens* DSM 5603 (Anhang, Abb. 34) und dem *msndh*-Gen aus *A. liquefaciens* IFO 12258 (Shinjoh *et al.*, 1995) ergab nur vier Basensubstitutionen, von denen drei einen Aminosäureaustausch zur Folge hatten (Anhang, Abb. 33). Aufgrund von Art und Position der einzelnen Aminosäuresubstitutionen konnte eine Beeinträchtigung der von Shinjoh *et al.* (1995) gezeigten Funktionalität des *msndh*-Gens in *G. oxydans* ausgeschlossen werden.

Bevor mit den Stämmen *G. oxydans* DSM 2343-*csndh*, DSM 2343-*sdh*, DSM 2343-*csndh/sdh*, DSM 2343-*csndh-tufB*, DSM 2343-*csndh/sdh-tufB*, DSM 2343-*msndh-tufB* und DSM 2343-*msndh/sdh-tufB* Expressionsanalysen erfolgten, wurde die Plasmidstabilität überprüft. Eine Kontrolle des Restriktionsmusters der Plasmide nach abwechselnder Kultivierung auf Fest- und Flüssigmedium (jeweils zweimal) ergab, dass in *G. oxydans* DSM 2343 alle Plasmide stabil repliziert wurden.

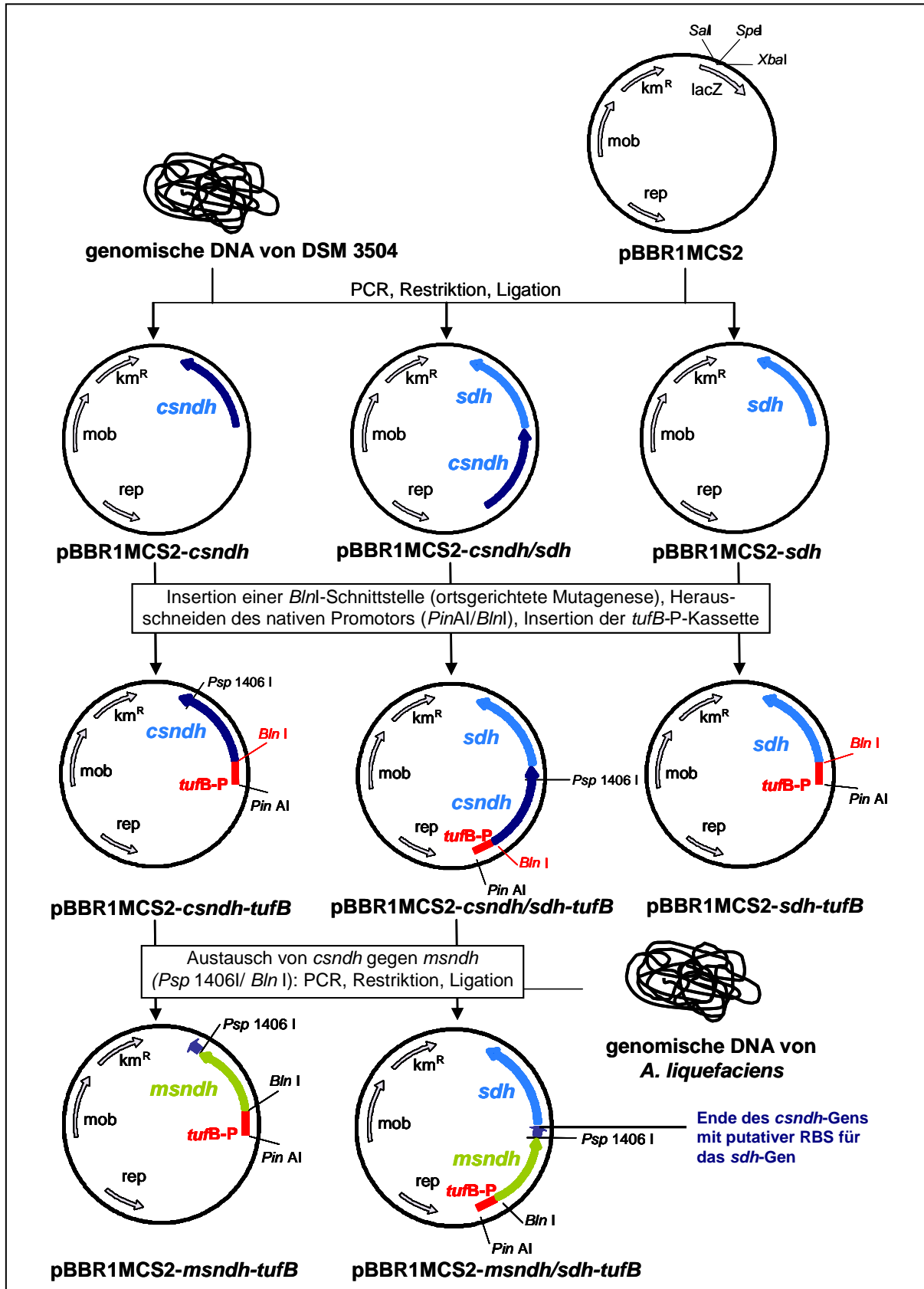


Abb. 12: Konstruierte Plasmide zur Überexpression der Gene für cSNDH, mSNDH und SDH.

2.2 Expression der heterolog eingebrachten Gene

Zur Kontrolle, ob in den konstruierten Stämmen die Transkription der drei klonierten Gene *sdh*, *csndh* und *msndh* erfolgte, wurde die Expression zunächst auf der Stufe der mRNA nachgewiesen. Dazu wurde aus den in Tab. 16 aufgelisteten Stämmen die Gesamt-RNA isoliert und mit spezifischen *sl dh*-, *sdh*-, *csndh*- und *msndh*-Sonden eine Northern Blot-Analyse durchgeführt. In *G. oxydans* DSM 2343 ließen sich auf Grund der im Genom fehlenden *sdh*-, *csndh*- und *msndh*-Gene (Prust *et al.*, 2005) keine entsprechenden Transkripte detektieren (Tab. 16). Auch in *G. oxydans* DSM 3504, dem Donor des *csndh/sdh*-Genclusters, ließen sich keine oder nur sehr geringe Mengen der *sdh*- bzw. *csndh*-mRNA nachweisen. Bei Expression des *csndh/sdh*-Genclusters unter Kontrolle des nativen Promotors konnten geringe Mengen von *csndh*- und *sdh*-Transkript detektiert werden, obwohl, wie bereits erwähnt, mittels SDS-PAGE und Aktivitätstests keine entsprechende Überproduktion nachweisbar war. Im Gegensatz dazu führte die Verwendung des *tufB*-Promotors in *G. oxydans* DSM 2343-*csndh/sdh-tufB* zu einem starken Anstieg der Transkriptmenge beider Gene, während in *G. oxydans* DSM 2343-*msndh/sdh-tufB* das *sdh*-Gen nur in geringem Maße transkribiert wurde. Die Transkriptmengen der Gene von löslicher und membrangebundener SNDH in *G. oxydans* DSM 2343-*csndh/sdh-tufB* und DSM 2343-*msndh/sdh-tufB* waren ähnlich. Verglichen mit der nachweisbaren Transkriptmenge des *sl dh*-Gens in *G. oxydans* DSM 2343 und DSM 3504, in denen die SLDH-Aktivität ausreichte um Sorbitol vollständig zu Sorbose umzusetzen (Tab. 12), sollte die Transkription aller heterologen Gene effizient genug sein, um Sorbitol zu 2-KGLA zu oxidieren.

Tab. 16: Transkriptionsnachweis mittels Northern Blot-Analyse. Die Anzahl der Pluszeichen steht für die Signalintensität der jeweiligen Banden („+“ = geringe Signalintensität; „++++“ = sehr starke Signalintensität; „-“ = kein nachweisbares Signal).

<i>G. oxydans</i> -Stamm	Signalintensität <i>sl dh</i> -Sonde	Signalintensität <i>sdh</i> -Sonde	Signalintensität <i>csndh</i> -Sonde	Signalintensität <i>msndh</i> -Sonde
DSM 3504	+	-	+	-
DSM 2343	+	-	-	-
DSM 2343- <i>csndh/sdh</i>	n.d	++	++	-
DSM 2343- <i>csndh/sdh-tufB</i>	n.d	++++	++++	-
DSM 2343- <i>msndh/sdh-tufB</i>	n.d	+	-	+++

Um zu überprüfen, ob nach der Transkription der heterolog eingebrachten Gene auch die Translation zum Protein stattfand, wurden in einem zweiten Schritt SDS-PAGE-Analysen durchgeführt. In den rekombinanten *G. oxydans* DSM 2343-Stämmen, bei denen die *sdh*-, *csndh*- und *msndh*-Expression unter Kontrolle des nativen Promotors stattfand, ließen sich bei Auftrennung von Membranfraktion (nicht

gezeigt), zellfreiem Rohextrakt mit solubilisierten Membranproteinen (Abb. 13-A) oder in Harnstoff gelösten Zelltrümmern (Abb. 13-B) keine Proteinbanden der Produktion von SDH, cSNDH oder mSNDH zuordnen. In Übereinstimmung mit einer erhöhten Transkriptmenge führte die Verwendung des *tufB*-Promotors in *G. oxydans* DSM 2343-*csndh-tufB* und DSM 2343-*csndh/sdh-tufB* zu einer deutlichen Überproduktion der cSNDH (Abb. 13-A). Das anhand der Aminosäuresequenz für die cSNDH berechnete Molekulargewicht von 53 kDa (Hoshino *et al.*, 1991) stimmte mit dem aus der SDS-PAGE bestimmten Molekulargewicht überein. Darüber hinaus konnten durch MALDI-TOF-Analyse die Banden mit einer Sequenzabdeckung von 48 % als cSNDH identifiziert werden. Die Überproduktion der SDH ließ sich im Rohextrakt von *G. oxydans* DSM 2343-*csndh/sdh-tufB* durch eine schwächere Bande nachweisen (Abb. 13-A). Auch dabei stimmte das für die SDH berechnete Molekulargewicht von 58 kDa (Sugisawa *et al.*, 1991) mit dem im SDS-Gel bestimmten Molekulargewicht überein und MALDI-TOF-Analysen bestätigten mit einer Sequenzabdeckung von 38 %, dass die Proteinbande der SDH zu zuordnen war. In Übereinstimmung mit einer sehr geringen *sdh*-Transkriptmenge in *G. oxydans* DSM 2343-*msndh/sdh-tufB* war in diesem Stamm die SDH jedoch nicht nachweisbar.

Hinweise für die Überproduktion der mSNDH konnten nur durch Auftrennung von Zelltrümmern erhalten werden (Abb. 13-B). Bei dem für die mSNDH zu erwartenden Molekulargewicht von 48 kDa (Shinjoh *et al.*, 1995) waren nur in den Spuren von *G. oxydans* DSM 2343-*msndh-tufB* und DSM 2343-*msndh/sdh-tufB* zwei zusätzliche schwache Banden zu erkennen. Die aus dem Gel isolierten Proteinmengen reichten jedoch nicht aus, um die Bande mittels MALDI-TOF-Analyse als mSNDH zu identifizieren. Die Tatsache, dass die mSNDH trotz vergleichbar hoher Transkriptmengen von *csndh* und *msndh* (Tab. 16) nur in den Zelltrümmern detektierbar war, wies auf die Bildung von Einschlusskörpern aufgrund von Problemen bei der Proteinfaltung hin. Diese Vermutung wurde durch die stark erhöhte Produktion des Chaperons GroEL untermauert. Die in *G. oxydans* DSM 2343-*msndh/sdh-tufB* hervortretende Bande bei ca. 60 kDa konnte mittels MALDI-TOF-Analyse mit einer Sequenzabdeckung von 52 % als GroEL identifiziert werden (Abb. 13-A).

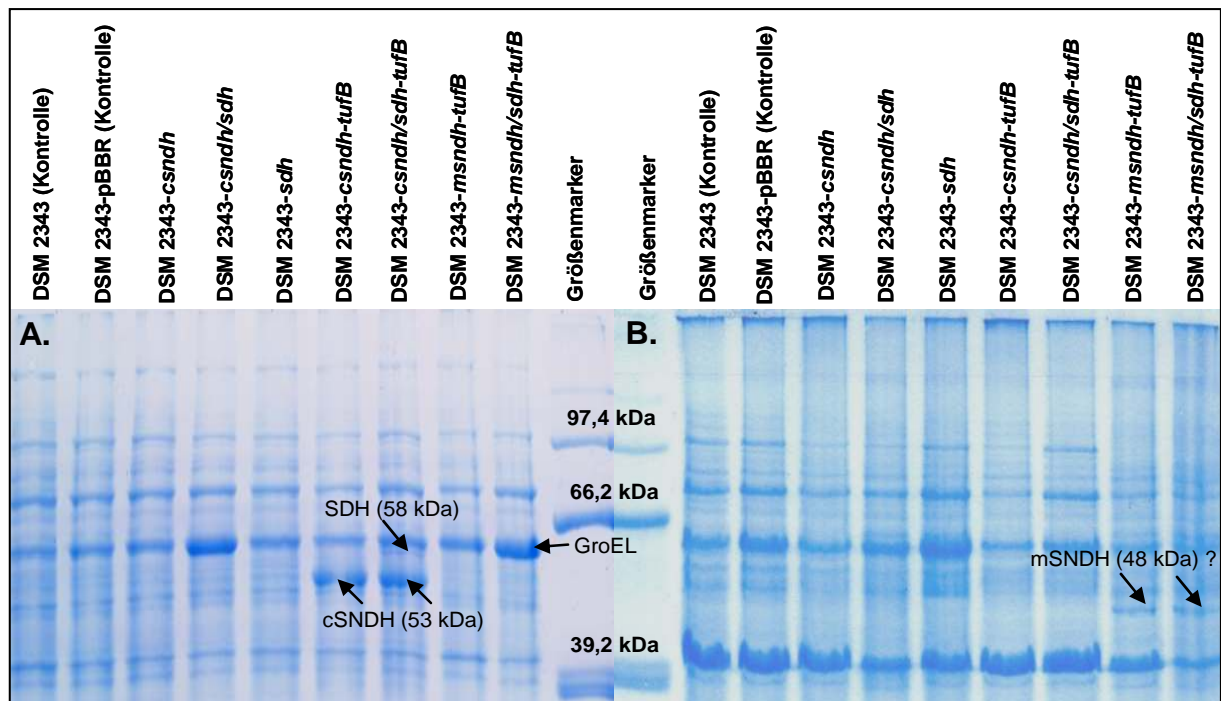


Abb. 13: Coomassiegefärbte SDS-PAGEs von Proben der angegebenen Stämme und mittels MALDI-TOF-Analyse identifizierte Proteine. (A) Pro Spur wurden 20 µg Gesamtprotein aus zellfreiem Rohextrakt mit solubilisierten Membranproteinen (0,3 % Triton X-100) aufgetragen; (B) Pro Spur wurden 10 µg Gesamtprotein der in 8 M Harnstoff gelösten Zelltrümmer aufgetragen.

Um zu überprüfen, ob die auf Transkriptions- und Translationsebene nachgewiesene Genexpression die Bildung aktiver Enzyme zur Folge hat, wurden die SDH-, cSNDH- und mSNDH-Enzymaktivitäten in den konstruierten *G. oxydans*-Stämmen bestimmt. Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurden zusätzlich die Aktivitäten in den Donorstämmen der jeweiligen Gene und in den zwei Industriestämmen *G. oxydans* UV-10 und N44-1 (Sugisawa *et al.*, 1990) sowie die SLDH-Aktivitäten gemessen (Tab. 17). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus Northern Blot- und SDS-PAGE-Analysen führte der Austausch der nativen Promotoren gegen den *tufB*-Promotor zu einer deutlichen Steigerung der SDH- und cSNDH-Aktivitäten in *G. oxydans* DSM 2343-*csndh/sdh-tufB*. Verglichen mit dem *csndh/sdh*-Donor *G. oxydans* DSM 3504 konnte in den rekombinanten Stämmen die SDH-Aktivität um das Fünffache und die SNDH-Aktivität um das Siebenfache gesteigert werden. Auch die mSNDH-Aktivität in *G. oxydans* DSM 2343-*msndh/sdh-tufB* wurde - verglichen zum *msndh*-Donor *A. liquefaciens* DSM 5603 - verdoppelt; jedoch waren bei Überproduktion der mSNDH nur ca. zehnfach geringere SNDH-Aktivitäten nachweisbar als bei der cSNDH-Überproduktion. Aufgrund von vergleichbar hohen mSNDH-Aktivitäten in mit Triton X-100 hergestellten Rohextrakten (Tab. 17) und in isolierten Membranen (0,025 bis 0,028 U/mg Membranprotein) konnte aber nachgewiesen werden, dass die mSNDH aus *A. liquefaciens* zumindest teilweise funktional in die Membran von *G. oxydans* integriert.

Die SDH-Aktivität in *G. oxydans* DSM 2343-*msndh/sdh-tufB* war in Übereinstimmung mit dem geringen *sdh*-Transkriptlevel (Tab. 16) und der nicht nachweisbaren Proteinbande (Abb. 13) mit 0,05 U/mg Protein nur leicht erhöht. Bei der Konstruktion von pBBR1MCS2-*msndh/sdh-tufB* wurden die letzten 21 bp vom 3'-Ende des *csndh*-Gens vor dem *sdh*-Gen belassen (s.o.), da Saito *et al.* (1997) dort die für die Translation des *sdh*-Gens verantwortliche RBS lokalisierten (Anhang, Abb. 35). Die putative *sdh*-RBS im 3'-Ende des *csndh*-Gens von *G. oxydans* DSM 3504 war jedoch nicht funktionell, denn das *sdh*-Gen wurde nur exprimiert, wenn die Klonierung als vollständiges *csndh/sdh*-Cluster erfolgte. Beim Konstrukt pBBR1MCS2-*sdh-tufB*, in dem das *sdh*-Gen mit den vorangestellten 21 bp des *csndh*-Gens separat hinter den *tufB*-Promotor kloniert wurde, konnte keine SDH-Aktivität bestimmt werden (Tab. 18). Folglich wurde nachgewiesen, dass im *csndh/sdh*-Gencluster von *G. oxydans* DSM 3504 eine translationale Kopplung (Yakhnin *et al.*, 2001; Rex *et al.*, 1994) vorliegt und die *csndh*-RBS für die Translation beider Gene verantwortlich ist (Abb. 14). Die geringe Translation des *sdh*-Gens im Konstrukt pBBR1MCS2-*msndh/sdh-tufB* erfolgte somit über die *msndh*-RBS, die jedoch nicht so effizient wie die *csndh*-RBS-vermittelte Translation in pBBR1MCS2-*csndh/sdh-tufB* funktioniert, da die *msndh*-RBS in ihrer nativen Konfiguration nicht für eine translationale Kopplung in einem Gencluster ausgelegt ist.

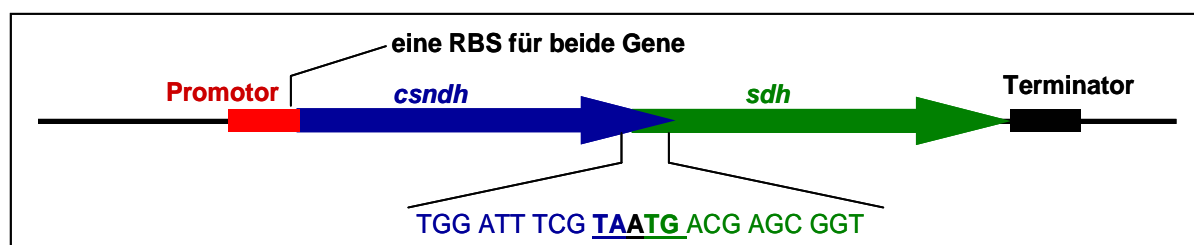


Abb. 14: Translationale Kopplung im *csndh/sdh*-Gencluster von *G. oxydans* DSM 3504. Es gibt nur eine RBS für beide Gene des Genclusters und das Stop-Codon des *csndh*-Gens überlappt mit dem Start-Codon des *sdh*-Gens um ein Basenpaar. Bei der Translation liest das Ribosom zunächst über den ersten polycistronischen mRNA-Abschnitt (*csndh*), stoppt bei dem Stop-Codon des ersten Gens, springt ein Basenpaar zurück und liest dann über den zweiten mRNA-Abschnitt (*sdh*).

Die translationale Kopplung kommt in bakteriellen Genclustern häufiger vor und stellt sicher, dass die für einen Syntheseweg benötigten Gene im richtigen Verhältnis exprimiert werden (Yakhnin *et al.*, 2001; Rex *et al.*, 1994). Sie ist darüber hinaus ein Hinweis darauf, dass die Genprodukte (SNDH und SDH) durch die Zytoplasmamembran hindurch miteinander assoziieren, da eine translationale Kopplung häufig bei Genpaaren auftritt, deren Proteine in einem Multienzymkomplex zusammengelagert vorliegen (Saito *et al.*, 1987, 1997, 1998; Yanofsky *et al.*, 1981). So wird z. B. in *G. oxydans* DSM 4025 das *sndh*- und *sdh*-Gen zusammen als ein membrangebundener Proteinkomplex mit zwei getrennten funktionalen Unterein-

heiten exprimiert (Asakura und Hoshino, 1999); eventuell ist das *csndh/sdh*-Gencluster aus *G. oxydans* DSM 3504, bei dem zwei unabhängige Enzyme entstehen, aus einem cSNDH/SDH-Fusionsprotein hervorgegangen, wobei die translationale Entkopplung noch nicht vollständig stattgefunden hat und immer noch nur eine RBS für beide Gene am Anfang des Clusters existiert.

Tab. 17: SLDH-, SDH-, cSNDH- und mSNDH-Enzymaktivitäten der Gendonoren, der konstruierten *G. oxydans* DSM 2343-Stämme und von zwei Industriestämmen. Zur Bestimmung der SDH- und mSNDH-Aktivität wurden die Membranproteine mit 0,3 % Triton X-100 solubilisiert und zellfreier Rohextrakt eingesetzt; die Bestimmung der SLDH-Aktivität erfolgte in der Membranfraktion.

<i>G. oxydans</i>-Stamm	SLDH-Aktivität [U/mg Protein]	SDH-Aktivität [U/mg Protein]	cSNDH-Aktivität [U/mg Protein]	mSNDH-Aktivität [U/mg Protein]
DSM 3504 (<i>csndh</i>-, <i>sdh</i>- Donor)	0,22	0,04	0,02	0,000
<i>A. liq</i> DSM 5603 (<i>msndh</i>-Donor)	0,02	0,03	0,05	0,006
DSM 2343	0,30	0,02	0,02	0,000
DSM 2343-pBBR	0,21	0,02	0,02	0,000
DSM 2343-<i>csndh</i>	n.d.	0,02	0,02	0,000
DSM 2343-<i>csndh/sdh</i>	n.d.	0,01	0,02	0,000
DSM 2343-<i>sdh</i>	n.d.	0,01	0,02	0,000
DSM 2343-<i>csndh-tufB</i>	0,19	0,02	0,19	0,000
DSM 2343-<i>csndh/sdh-tufB</i>	0,17	0,21	0,16	0,000
DSM 2343-<i>msndh-tufB</i>	0,16	0,02	0,02	0,012
DSM 2343-<i>msndh/sdh-tufB</i>	0,13	0,05	0,02	0,013
N44-1 (Industriestamm)	0,11	0,04	0,01	0,000
UV-10 (Industriestamm)	0,11	0,03	0,01	0,000

Um zu überprüfen, ob durch homologe Expression des *csndh/sdh*-Genclusters im Donorstamm *G. oxydans* DSM 3504 höhere Enzymaktivitäten erzielt werden konnten als durch heterologe Expression in *G. oxydans* DSM 2343, wurden alle o.g. Vektorkonstrukte in *G. oxydans* DSM 3504 überführt (Tab. 19). Die Verwendung von *G. oxydans* DSM 3504 zur Überexpression der *csndh*- und *sdh*-Gene führte jedoch zu keiner signifikanten Erhöhung der SDH- und cSNDH-Aktivitäten (Tab. 18). In *G. oxydans* DSM 3504-*csndh/sdh-tufB* war die cSNDH-Aktivität sogar drastisch verringert, was auf homologe Rekombination zwischen dem genomischen und dem plasmidkodierten *csndh/sdh*-Cluster und auf eine daraus resultierende Plasmidinstabilität zurückzuführen war. Bereits nach einer auf die Elektroporation folgenden Kultivierung von *G. oxydans* DSM 3504-*csndh/sdh-tufB* konnten trotz Kanamycinresistenz und erhöhter SDH-Aktivität entweder kein Plasmid oder Plasmide der falschen Größe mit variierendem Restriktionsmuster isoliert werden, da pBBR1MCS2-*csndh/sdh-tufB* ganz oder teilweise in das Genom integriert war.

Darüber hinaus wurde die Verwendung von *G. oxydans* IFO 3293 - dem Ausgangsorganismus des 2-KGLA-Produzenten *G. oxydans* N44-1 (Sugisawa *et al.*, 1990) - als Expressionsstamm getestet, da dieser von Natur aus schon geringe Mengen 2-KGLA akkumuliert (Hoshino *et al.*, 1990; Sugisawa *et al.*, 1990; Tsukada

IV. Ergebnisse

und Perlman, 1972) und es möglicherweise einfacher ist, die vorhandenen Enzymaktivitäten zu verstärken, als neue in *G. oxydans* DSM 2343 zu etablieren. Die Überexpression der *csndh*- und *sdh*-Gene in *G. oxydans* IFO 3293 führte jedoch zu keiner signifikanten Erhöhung der SDH- und cSNDH-Aktivitäten (Tab. 18). Nur bei der *msndh*-Überexpression in *G. oxydans* IFO 3293 konnte die mSNDH-Aktivität verglichen mit *G. oxydans* DSM 2343-*msndh/sdh-tufB* verdoppelt werden.

Tab. 18: SLDH-, SDH-, cSNDH- und mSNDH-Aktivitäten in *G. oxydans* DSM 3504 und IFO 3293.

<i>G. oxydans</i> -Stamm	SLDH-Aktivität [U/mg Protein]	SDH-Aktivität [U/mg Protein]	cSNDH-Aktivität [U/mg Protein]	mSNDH-Aktivität [U/mg Protein]
DSM 3504	0,22	0,04	0,02	0,000
DSM 3504-pBBR	0,21	0,04	0,02	0,000
DSM 3504- <i>csndh/sdh</i>	0,21	0,03	0,03	0,000
DSM 3504- <i>csndh-tufB</i>	0,21	0,04	0,17	0,000
DSM 3504- <i>csndh/sdh-tufB</i>	0,16	0,18	0,03	0,000
DSM 3504- <i>sdh-tufB</i>	0,19	0,02	n.d.	n.d.
DSM 3504- <i>msndh-tufB</i>	0,22	0,00	0,02	0,010
DSM 3504- <i>msndh/sdh-tufB</i>	0,19	0,04	0,02	0,013
IFO 3293	0,15	0,02	0,02	0,000
IFO 3293-pBBR	0,12	0,02	0,02	0,000
IFO 3293- <i>csndh/sdh</i>	0,13	0,02	0,02	0,000
IFO 3293- <i>csndh-tufB</i>	0,14	0,01	0,22	0,000
IFO 3293- <i>csndh/sdh-tufB</i>	0,12	0,22	0,19	0,000
IFO 3293- <i>sdh-tufB</i>	0,15	0,02	n.d.	n.d.
IFO 3293- <i>msndh-tufB</i>	0,14	0,01	0,02	0,018
IFO 3293- <i>msndh/sdh-tufB</i>	0,12	0,05	0,02	0,029

Die Bestimmung der Enzymaktivitäten ergab, dass alle drei rekombinanten Proteine (SDH, cSNDH und mSNDH) in *G. oxydans* DSM 2343, DSM 3504 und IFO 3293 als aktive Enzyme gebildet wurden. Zur Abschätzung der Effektivität der heterolog eingeführten Enzymaktivitäten wurden sie mit der homologen SLDH-Aktivität in *G. oxydans* DSM 3504 verglichen, da diese ausreicht, um Sorbitol innerhalb von 20 h vollständig zu Sorbose umzusetzen (Kap. IV/1.1, Abb. 7). Die SDH und cSNDH in z. B. *G. oxydans* DSM 2343-*csndh/sdh-tufB* waren vergleichbar aktiv wie die SLDH in *G. oxydans* DSM 3504 (Abb. 15); somit sollten die Enzymaktivitäten ausreichen, um Sorbitol effizient zu 2-KGLA zu oxidieren. Die mSNDH- und SDH-Aktivitäten in *G. oxydans* IFO 3293-*msndh/sdh-tufB* waren zwar geringer, aber im Vergleich zu den SDH- und cSNDH-Aktivitäten im Industriestamm *G. oxydans* N44-1, der Sorbitol zu 50 % in 2-KGLA umsetzt (Sugisawa *et al.*, 1990), um das 1,4- bzw. 2,9-fache erhöht. Neben sehr niedrigen SDH- und cSNDH-Aktivitäten war in *G. oxydans* N44-1 darüber hinaus nur eine viel geringere SLDH-Aktivität nachweisbar als in den in dieser Arbeit konstruierten *G. oxydans*-Stämmen (Tab. 17).

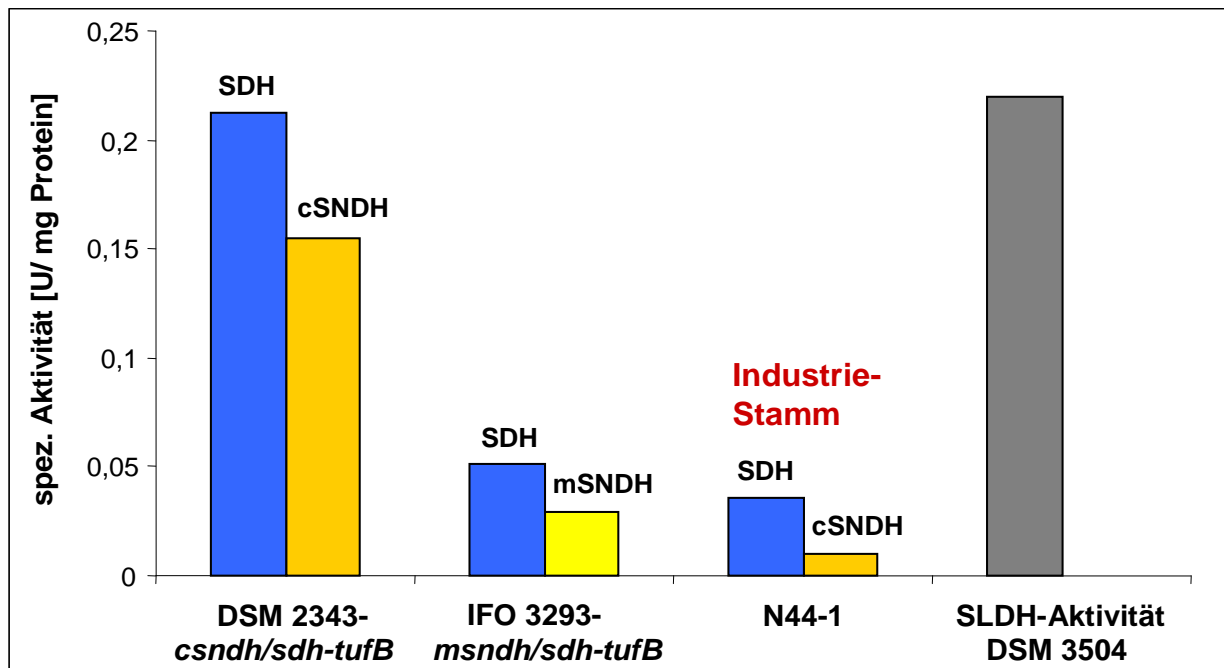


Abb. 15: Vergleich der neu eingeführten rekombinanten SDH-, cSNDH- und mSNDH-Aktivitäten mit der SLDH-Aktivität in *G. oxydans* DSM 3504 und den Enzymaktivitäten im Industriestamm *G. oxydans* N44-1

Nach Abschluss der Stammkonstruktionen und Expressionsanalysen standen somit verschiedene rekombinante Stämme zur Verfügung, in denen alle zur 2-KGLA-Synthese benötigten Enzymaktivitäten (SLDH, SDH, cSNDH und/oder mSNDH) in mehr als ausreichendem Umfang vorliegen sollten, um die Biotransformation von Sorbitol zu 2-KGLA durchzuführen.

3. Ganzzellbiotransformation von Sorbitol zu 2-Keto-L-Gulonsäure

3.1 Ganzzellbiotransformation mit ruhenden Zellen

Nachdem alle für die 2-KGLA-Bildung essentiellen Gene in verschiedenen *G. oxydans*-Stämmen funktionell überexprimiert wurden, erfolgte die Untersuchung zur Biotransformation von Sorbitol zu 2-KGLA zunächst mit ruhenden Zellen. Hierbei wurden 20 g/l Sorbitol von *G. oxydans* DSM 2343-*csndh/sdh-tufB* zu 1,2 % und von *G. oxydans* DSM 2343-*msndh/sdh-tufB* zu 4 % zu 2-KGLA umgesetzt (Tab. 19). Folglich konnte gezeigt werden, dass alle in *G. oxydans* eingebrachten Enzyme (SDH, cSNDH und mSNDH) *in vivo* aktiv waren und durch deren heterologe Überproduktion der Stamm *G. oxydans* DSM 2343 die Fähigkeit erlangte, 2-KGLA zu synthetisieren.

In Ganzzellbiotransformationen mit ruhenden Zellen konnten durch mSNDH-Überproduktion höhere 2-KGLA-Ausbeuten erzielt werden als durch Überproduktion der cSNDH, obwohl für die mSNDH eine zehnfach geringere *in vitro*-Aktivität bestimmt

wurde als für die cSNDH. Dabei verfärbte sich der Biotransformationsansatz von *G. oxydans* DSM 2343-*csndh/sdh-tufB* im Verlaufe des Versuchs gelb, während der Ansatz von *G. oxydans* DSM 2343-*msndh/sdh-tufB* farblos blieb. Massenspektroskopische Untersuchungen ergaben, dass die Gelbfärbung auf eine spontane Polymerisation des Intermediats Sorboson zurückzuführen war. Aus diesem Grund war Sorboson nicht mehr mittels HPLC quantifizierbar. Die Gelbfärbung wies jedoch darauf hin, dass bei Verwendung der cSNDH ein Teil des gebildeten Sorbosons akkumulierte und polymerisierte, bevor es in die Zelle transportiert wurde, während bei Verwendung der mSNDH Sorboson im Periplasma umgehend zu 2-KGLA oxidiert wurde, bevor die Polymerisation stattfinden konnte. Shinjoh *et al.* (1995) beschrieben ebenfalls eine Verringerung der 2-KGLA-Ausbeute aufgrund der physiologischen Instabilität von Sorboson und dass bei Verwendung der mSNDH periplasmatisch gebildetes Sorboson zu 2-KGLA umgesetzt wird, bevor ein nichtenzymatischer Sorbosonabbau erfolgt.

Tab. 19: Umsetzung von 20 g/l Sorbitol mit ruhenden Zellen.

<i>G. oxydans</i>-Stamm	Endkonzentration [g/l]	Ausbeute [%]
DSM 2343-pBBR (Kontrolle)	Sorbitol: 19,38 Sorbose: 0,50 2-KGLA: 0,00	Sorbitol: 96,9 Sorbose: 2,5 2-KGLA: 0,0
DSM 2343-<i>csndh/sdh-tufB</i>	Sorbitol: 19,26 Sorbose: 0,06 2-KGLA: 0,24	Sorbitol: 96,3 Sorbose: 0,3 2-KGLA: 1,2
DSM 2343-<i>msndh/sdh-tufB</i>	Sorbitol: 19,40 Sorbose: 0,50 2-KGLA: 0,80	Sorbitol: 97,0 Sorbose: 2,5 2-KGLA: 4,0

Bereits der erste Reaktionsschritt, die Oxidation von Sorbitol zu Sorbose, erfolgte mit ruhenden Zellen nur zu 2,5 % (Tab. 19) und stellte somit den limitierenden Schritt in der Oxidationskette dar. Dies konnte durch Verwendung der Intermediate Sorbose und Sorboson als Substrate für die Biotransformation gezeigt werden, wodurch die 2-KGLA-Ausbeuten auf bis zu 15 % (*G. oxydans* DSM 2343-*msndh/sdh-tufB*) gesteigert werden konnten. Shinjoh *et al.* (1995) erzielten durch Überproduktion einer mSNDH mit ruhenden *G. oxydans* IFO 3293-Zellen ebenfalls nur mit Sorbose und Sorboson, aber nicht mit Sorbitol als Substrat eine Steigerung der 2-KGLA-Ausbeute. Im Gegensatz dazu konnte mit *G. oxydans* DSM 2343-*msndh/sdh-tufB* zwar auch Sorbitol in geringem Umfang zu 2-KGLA umgesetzt werden (Tab. 19), jedoch scheint eine effiziente Oxidation von Sorbitol zu Sorbose nur mit wachsenden Zellen möglich zu sein. Vermutlich ist in ruhenden Zellen die Atmungskettenaktivität so weit eingeschränkt, dass aufgrund einer Limitierung beim Elektronentransport die bei der Sorbitoloxidation entstehenden Elektronen nicht von der SLDH auf den Ubichinonpool übertragen werden können (Anhang, Abb. 29).

3.2 Ganzzellbiotransformation mit wachsenden Zellen

Da bereits gezeigt werden konnte, dass wachsende Zellen, im Gegensatz zu ruhenden Zellen, 25 g/l Sorbitol vollständig zu Sorbose umsetzen (Abb. 7), wurden die weiteren Untersuchungen zur 2-KGLA-Produktion mit wachsenden Zellen durchgeführt. Dabei wurden 100 g/l Sorbitol eingesetzt, die im Verlauf der Biotransformation ebenfalls vollständig oxidiert wurden (Abb. 16). Die bereits postulierte Kopplung von Zellwachstum und Sorbitoloxidation bestätigte sich dadurch, dass die Umsetzung von Sorbitol zu Sorbose in der exponentiellen Wachstumsphase stattfand (wachstumsgekoppelte Produktbildung), während die Oxidationsschritte von Sorbose zu 2-KGLA in der stationären Phase erfolgten (wachstumsentkoppelte Produktbildung).

Zunächst wurde die Kultivierung in Schüttelkolben ohne pH-Kontrolle durchgeführt. Hierbei erfolgte die Sorbitoloxidation größtenteils nur bis zum Intermediat Sorbose. Eine Bildung von 2-KGLA fand nur dann statt, wenn sowohl eine SNDH als auch die SDH überproduziert wurde (Tab. 20). Die separate Überexpression der *msndh*-, *csndh*- und *sdh*-Gene führte zu keiner Bildung von 2-KGLA, obwohl die jeweils nicht überexprimierten Gene im Genom von *G. oxydans* DSM 3504 und IFO 3293 vorhanden sind und beide Wildtypen als Produzenten geringer 2-KGLA-Mengen beschrieben wurden (Sugisawa *et al.*, 1990; Tsukada und Perlman, 1972). Die cSNDH/SDH-Überproduzenten synthetisierten bis zu 4,5 % 2-KGLA aus 100 g/l Sorbitol (*G. oxydans* IFO 3293-*csndh/sdh-tufB*), während bei mSNDH/SDH-Überproduktion fast kein 2-KGLA gebildet wurde. Mit den Industriestämmen *G. oxydans* UV-10 und N44-1 wurde mit 3,1 % bzw. 5,5 % 2-KGLA-Ausbeute auch nur ein Zehntel der veröffentlichten 2-KGLA-Produktion erreicht (Tab. 20). Da die von Sugisawa *et al.* (1990) beschriebenen 2-KGLA-Ausbeuten von *G. oxydans* UV-10 (26 %) und N44-1 (30 - 50 %) bei auf pH 6 gepufferter Kultivierung erzielt wurden, war vermutlich bei Kultivierung ohne pH-Kontrolle der auf pH 4,8 absinkende pH-Wert der Grund für die geringe 2-KGLA-Produktion.

Um die 2-KGLA-Ausbeuten der konstruierten Stämme zu steigern und mit denen von *G. oxydans* UV-10 und N44-1 vergleichen zu können, wurden die von Sugisawa *et al.* (1990) veröffentlichten Kultivierungsbedingungen verwendet und die Stämme auf „No. 5-Medium“ mit 100 g/l Sorbitol im Schüttelkolben kultiviert, wobei der pH-Wert mit CaCO₃ auf pH 6 gepuffert wurde. Unter diesen Bedingungen wurde deutlich mehr 2-KGLA produziert und einige der rekombinanten Stämme setzten Sorbitol mit vergleichbar hohen Ausbeuten zu 2-KGLA um wie die Industriestämme *G. oxydans*

UV-10 und N44-1 (Abb. 16; Tab. 20); jedoch wurden auch bei CaCO₃-gepuffertem Kultivierung von *G. oxydans* UV-10 und N44-1 nur 25 % der publizierten Ausbeuten erreicht. Die rekombinanten Derivate von *G. oxydans* DSM 2343 und DSM 3504 setzten bei cSNDH/SDH-Überproduktion 100 g/l Sorbitol zu 8 % bzw. 10 % 2-KGLA um, während bei mSNDH/SDH-Überproduktion nur geringere Mengen 2-KGLA synthetisiert wurden. Mit *G. oxydans* IFO 3293-*msndh/sdh-tufB* hingegen wurde in Übereinstimmung mit der höchsten mSNDH-Aktivität 9 % 2-KGLA gebildet. Die 2-KGLA-Bildung durch Überproduktion einer mSNDH in *G. oxydans* IFO 3293 wurde auch von Shinjoh *et al.* (1995) demonstriert. Im Gegensatz dazu erfolgte die 2-KGLA-Bildung mit den hier beschriebenen *G. oxydans*-Stämmen jedoch nicht nur in ruhenden, sondern auch in wachsenden Zellen. Außerdem konnten bei Shinjoh *et al.* (1995) nur Sorbose und Sorbosen, nicht aber Sorbitol zu 2-KGLA umgesetzt werden.

Bei auf pH 6 gepuffertem Kultivierung akkumulierten bei cSNDH/SDH-Überproduktion mit allen drei *G. oxydans*-Stämmen erstmalig nachweisbare Mengen des Intermediats Sorbosen (Abb. 16); die SDH bildete somit mehr Sorbosen als durch die cSNDH zu 2-KGLA umgesetzt werden konnte. Bei mSNDH/SDH-Überproduktion hingegen erfolgte keine Anhäufung von Sorbosen, obwohl die mSNDH-Aktivität zehnfach geringer war als die cSNDH-Aktivität. Daher war die Sorbosenakkumulation bei cSNDH/SDH-Überproduktion nicht durch eine zu geringe cSNDH-Aktivität, sondern, wie schon bei der Verwendung von ruhenden Zellen, durch die Limitierung des Sorbosen-Transports zu begründen. Die geringere mSNDH-Aktivität bei mSNDH/SDH-Überproduktion wurde folglich dadurch kompensiert, dass kein Sorbosen-Transport ins Zellinnere notwendig war und im Periplasma entstandenes Sorbosen umgehend zu 2-KGLA oxidiert werden konnte. Da Sorbosen ein für die Zelle toxisches Aldehyd ist, wurde eine Limitierung der 2-KGLA-Ausbeute aufgrund des Sorbosen-Transports in der Literatur bereits mehrfach diskutiert (Sugisawa *et al.*, 1990; Shinjoh *et al.*, 1995; Hoshino *et al.*, 1990). So beobachteten Shinjoh *et al.* (1995) bei Überexpression des *msndh*-Gens keine Anhäufung von Sorbosen, während bei Verwendung der cSNDH stets eine Sorbosenakkumulation beschrieben wurde (Saito *et al.*, 1997, 1998, Sugisawa *et al.*, 1990).

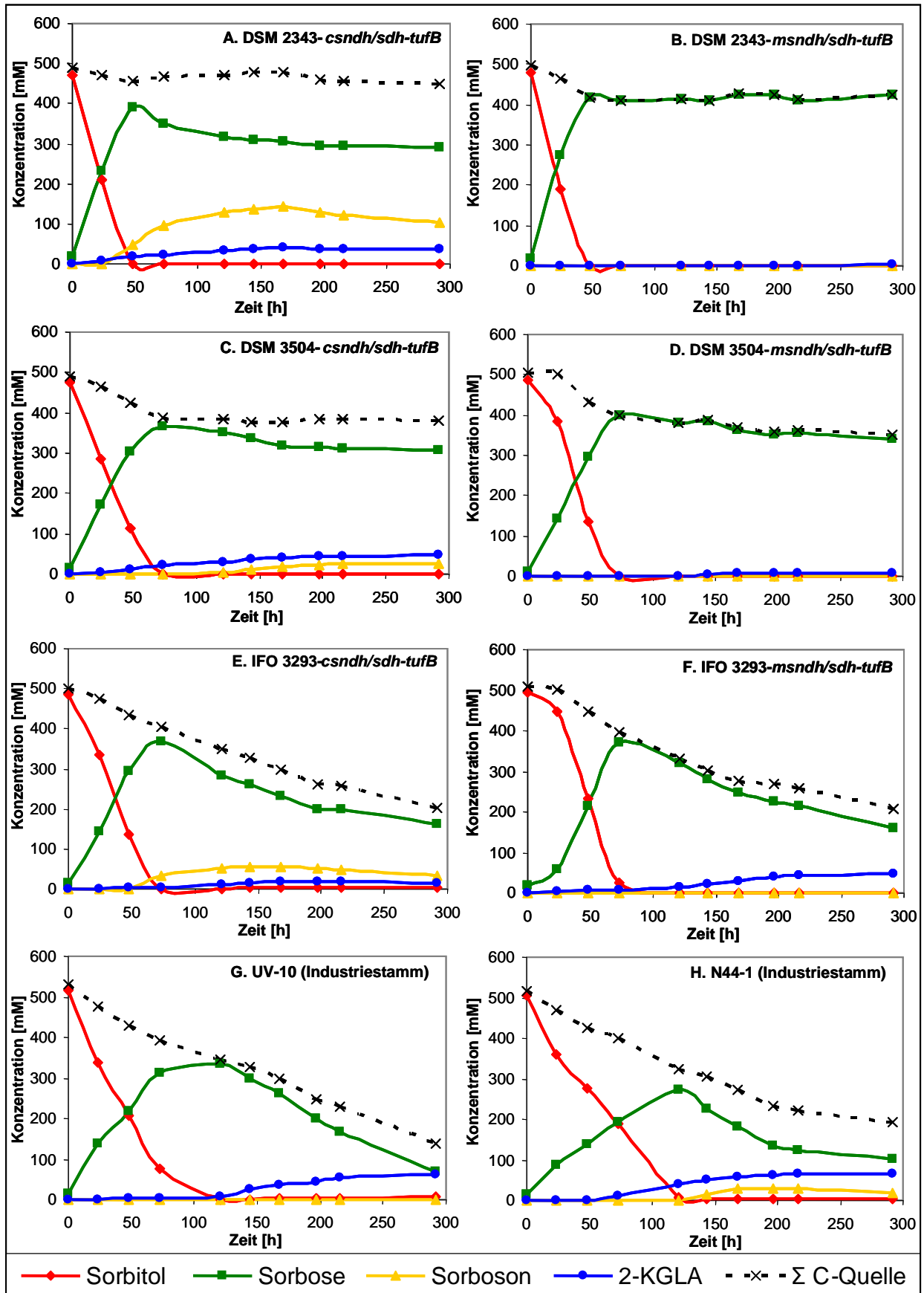


Abb. 16: Substratumsatz von *G. oxydans* DSM 2343-*csndh/sdh-tufB* (A), DSM 2343-*msndh/sdh-tufB* (B), DSM 3504-*csndh/sdh-tufB* (C), DSM 3504-*msndh/sdh-tufB* (D), IFO 3293-*csndh/sdh-tufB* (E), IFO 3293-*msndh/sdh-tufB* (F), UV-10 (G) und N44-1-Klon 1 (H) bei CaCO_3 -gepufferter Schüttelkolbenkultivierung mit 100 g/l (550 mM) Sorbitol. Σ C-Quelle = Summe der Konzentrationen von Sorbitol, Sorbose, Sorbosen und 2-KGLA.

Es wurde bereits mehrfach gezeigt, dass bei der Sorbitol-Biotransformation mit *G. oxydans* keine anderen Metabolite als Sorbose, Sorboson, 2-KGLA und geringe Mengen L-Idonat gebildet werden (Saito *et al.*, 1997, 1998; Shinjoh *et al.*, 1995; Sugisawa *et al.*, 1990; Hoshino *et al.*, 1990). In *G. oxydans* DSM 2343 kann eine L-Idonat-Bildung aufgrund der fehlenden 2-KGLA-Reduktase jedoch ausgeschlossen werden (Prust *et al.*, 2005) und in *G. oxydans* DSM 3504 und IFO 3293 wird L-Idonat von der membrangebundenen Idonat-DH wieder zu 2-KGLA reoxidiert (Hoshino *et al.*, 1990). Da in Übereinstimmung damit auch in dieser Arbeit keine anderen Nebenprodukte mittels HPLC detektiert werden konnten, wurde die Summe der Konzentrationen von Sorbitol, Sorbose, Sorboson und 2-KGLA als Gesamt-C-Quellenkonzentration bezeichnet. Diese nahm im Verlauf der Fermentation bei den verschiedenen Stämmen unterschiedlich stark ab (Abb. 16). Dabei korrelierte die Assimilation der C-Quelle mit der Biomasseproduktion (Abb. 17). Während die *G. oxydans* DSM 2343-Stämme mit unter 20 % die wenigste C-Quelle verbrauchten und bis zu optischen Dichten von 6 heranwuchsen, verstoffwechselten die *G. oxydans* DSM 3504-Stämme ca. 30 % C-Quelle bei vergleichbarem Wachstum. Hingegen wuchsen alle Stämme, die aus *G. oxydans* IFO 3293 hervorgegangen sind, bis zu doppelt so hohen optischen Dichten, assimilierten dabei jedoch auch bis zu 70 % der C-Quelle. In der Abbildung wurden *G. oxydans* N44-1 und UV-10 mit den IFO 3293-Derivaten zusammengefasst, da sie aus *G. oxydans* IFO 3293 durch Mutagenese hervorgegangen sind. Besonders hervorzuheben ist, dass *G. oxydans* DSM 2343-*csndh/sdh-tufB* und DSM 3504-*csndh/sdh-tufB* bei viel geringerer Biomasseproduktion nur geringfügig weniger 2-KGLA synthetisierten als die Industriestämme. Außerdem setzten die rekombinanten Stämme mit weniger Biomasse Sorbitol viel schneller zu Sorbose um und begannen viel früher mit der 2-KGLA-Produktion (Abb. 16), was sich auch in der höchsten 2-KGLA-Bildungsrate von *G. oxydans* DSM 2343-*csndh/sdh-tufB* niederschlug.

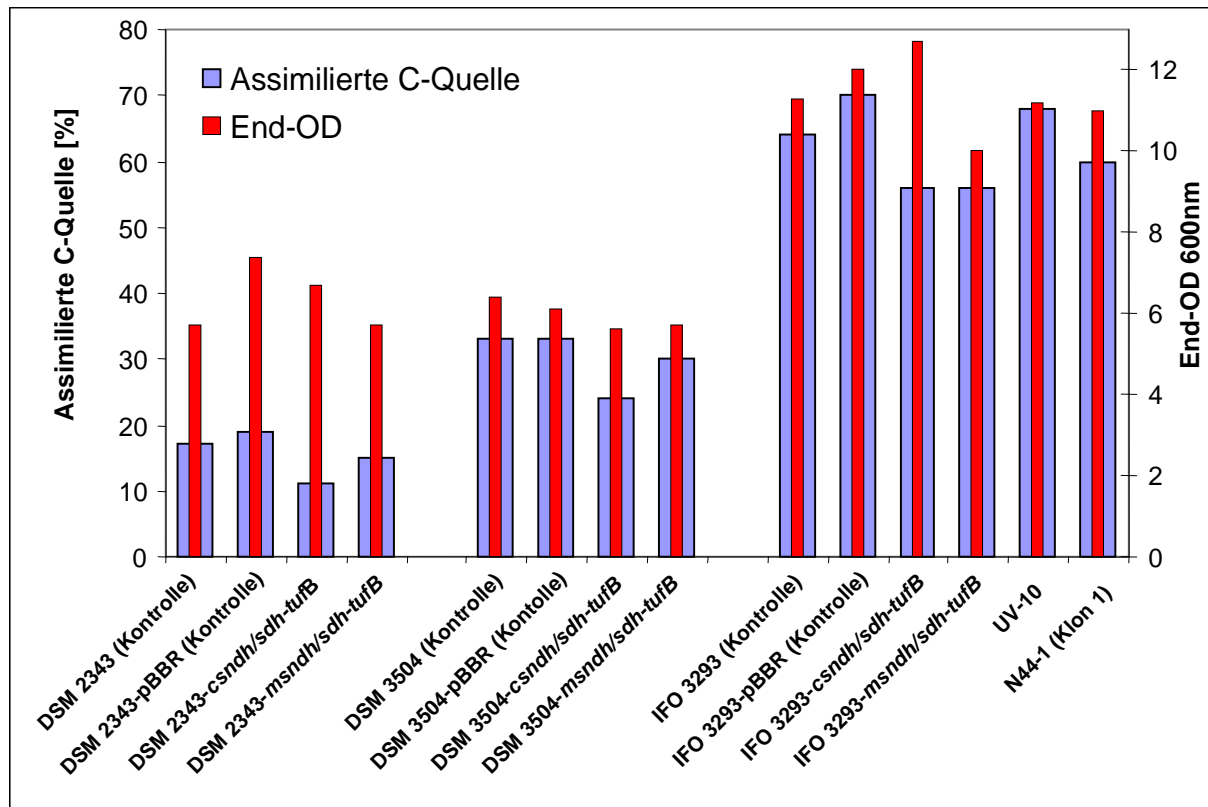


Abb. 17: Korrelation von C-Quellenassimilation und Biomasseproduktion bei verschiedenen *G. oxydans*-Stämmen. Die Kultivierung erfolgte im Schüttelkolben (pH 6) mit 100 g/l Sorbitol.

Durch den auf pH 6 gepufferten pH-Wert konnte die 2-KGLA-Bildung deutlich verstärkt werden. Da dies auf eine Abhängigkeit der 2-KGLA-Produktion vom pH-Wert hindeutete, sollte der pH-Wert auf pH 6 reguliert und durch Verbesserung der Sauerstoffversorgung im Fermenter die Oxidation von Sorbitol zu 2-KGLA weiter gesteigert werden. Dazu wurden die rekombinanten Stämme, die bei CaCO_3 -gepufferter Kultivierung die größten 2-KGLA-Mengen produzierten, zusammen mit *G. oxydans* N44-1 als Vergleichsstamm im „Fedbatch-Pro“-Parallelfertmentations-system kultiviert. Dabei stellte sich zunächst heraus, dass der durch zahlreiche Mutagenesen entstandene Stamm *G. oxydans* N44-1 bei der Stammhaltung auf Fest- und Flüssigmedium instabil war. Deshalb wurde neben dem bisher verwendeten *G. oxydans* N44-1-Klon 1 eine neue von der DSM Nutritional Products zur Verfügung gestellte Glyzerinkultur (*G. oxydans* N44-1-Klon 2) verwendet. Während *G. oxydans* N44-1-Klon 1 unter fermentativen Bedingungen nur 5 % 2-KGLA produzierte, konnten bei der Verwendung von *G. oxydans* N44-1-Klon 2 ähnliche 2-KGLA-Ausbeuten (36 %) erzielt werden, wie von Sugisawa *et al.* (1990) beschrieben (Tab. 20). In *G. oxydans* DSM 2343-*csndh/sdh-tufB* und IFO 3293-*msndh/sdh-tufB* führte die verbesserte Sauerstoffversorgung und der auf pH 6 regulierte pH-Wert zu einem deutlichen Anstieg der 2-KGLA-Ausbeuten auf 15 bzw. 12 g/l 2-KGLA. Die geringere 2-KGLA-Ausbeute bei homologer *csndh/sdh-*

Überexpression in *G. oxydans* DSM 3504-*csndh/sdh-tufB* war vermutlich durch die in Kap. IV/2.2 beschriebene Plasmidinstabilität auf Grund von homologer Rekombination zu begründen. Mit *G. oxydans* DSM 2343-*csndh/sdh-tufB* und IFO 3293-*msndh/sdh-tufB* konnten jedoch nicht so hohe 2-KGLA-Ausbeuten wie mit *G. oxydans* N44-1-Klon 2 erzielt werden und es blieb daher zu klären, warum *G. oxydans* N44-1 trotz der sehr viel niedrigeren *in vitro*-Enzymaktivitäten von SLDH, SDH und SNDH in der Lage war, *in vivo* mehr 2-KGLA zu produzieren, als die rekombinanten Stämme.

Tab. 20: 2-KGLA-Ausbeuten mit wachsenden Zellen bei verschiedenen Biotransformationsbedingungen. Die angegebenen %-Werte beziehen sich auf aus 100 g/l Sorbitol gebildetes 2-KGLA.

<i>G. oxydans</i> -Stamm	2-KGLA-Ausbeute [%] bzw. [g/l]		
	Schüttelkolben (ohne pH-Kontrolle)	Schüttelkolben ~ pH 6 (CaCO ₃ -gepuffert)	Fermenter (pO ₂ 10%, pH 6)
DSM 2343-pBBR (Kontrolle)	0,0	0,0	0,0
DSM 2343- <i>csndh/sdh-tufB</i>	1,0	8,0	15,0
DSM 2343- <i>msndh/sdh-tufB</i>	0,0	0,4	n.d.
DSM 3504-pBBR (Kontrolle)	0,0	0,0	0,0
DSM 3504- <i>csndh/sdh-tufB</i>	1,5	10,0	6,0
DSM 3504- <i>msndh/sdh-tufB</i>	0,0	1,5	n.d.
IFO 3293-pBBR (Kontrolle)	0,0	0,5	0,0
IFO 3293- <i>csndh/sdh-tufB</i>	4,5	3,8	n.d.
IFO 3293- <i>msndh/sdh-tufB</i>	0,1	9,0	12,0
UV-10 (Industriestamm)	3,1	9,0	n.d.
N44-1/Klon1 (Industriestamm)	5,5	13,0	5,0
N44-1/Klon2 (Industriestamm)	n.d.	n.d.	36,0

Um aufzuklären, warum in den in dieser Arbeit konstruierten Stämmen die Oxidationskette größtenteils bei der Umsetzung von Sorbose zu Sorbosen unterbrochen war, wurde ein Vergleich der Membranprotein-Zusammensetzung von *G. oxydans* DSM 2342, DSM 3504, IFO 3293 und N44-1 durchgeführt. Der Vergleich von *G. oxydans* IFO 3293 und N44-1 war hierbei besonders interessant, da die gesteigerte 2-KGLA-Bildung in *G. oxydans* N44-1 durch zahlreiche Mutagenesen des Parentalstammes *G. oxydans* IFO 3293 erzielt (Sugisawa *et al.*, 1990), die SLDH-, SDH- und cSNDH-Aktivitäten von *G. oxydans* N44-1 durch die Mutationen jedoch nicht erhöht wurden (Tab. 17 und 18). Da die für die 2-KGLA-Ausbeuten verantwortlichen Unterschiede deshalb beim Sorbosontransport, bei den zahlreichen Dehydrogenasen oder in der Atmungskette vermutet wurden, beschränkte sich der Proteinvergleich auf die Membranproteine. In Zusammenarbeit mit dem Institut für Mikrobiologie an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität (Greifswald) wurden die Membranproteine isoliert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt (Abb. 18). Dabei konnten schon anhand der Proteinbanden große Unterschiede zwischen der Membranprotein-Zusammensetzung von *G. oxydans* DSM 2343, DSM 3504 und IFO 3293 festgestellt werden. Wie erwartet ähnelten sich die Membranproteinmuster

von *G. oxydans* IFO 3293 und N44-1 hingegen sehr. Es waren jedoch bei *G. oxydans* N44-1 mindestens zwei Banden zu erkennen, die in *G. oxydans* IFO 3293 fehlten.

Um die Unterschiede zu identifizieren, wurde das Gel in 56 Fragmente zerteilt, aus denen anschließend die Proteine herausgelöst wurden, um sie mittels Massenspektroskopie zu analysieren. Dabei konnte anhand der Anzahl von identifizierten Peptiden aufgrund der normierten Vorgehensweise eine semi-quantitative Aussage über die Konzentration des entsprechenden Proteins in der Probe getroffen werden (pers. Mitteilung Dr. D. Becher, Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald). Es wurden 64 Proteine identifiziert, bei denen signifikante Konzentrationsunterschiede zwischen den einzelnen Stämmen bestanden (eine Auswahl davon ist in Tab. 26 im Anhang zu finden). Unter anderem ließ sich in *G. oxydans* N44-1 deutlich mehr membrangebundene D-Laktat-Dehydrogenase (mLDH) nachweisen als im Parentalstamm *G. oxydans* IFO 3293. In *G. oxydans* DSM 3504 ließen sich nur sehr geringe Mengen der mLDH detektieren, während in *G. oxydans* DSM 2343 keine mLDH nachweisbar war (Anhang, Tab. 26). Diese semiquantitativen Ergebnisse konnten durch Bestimmung der mLDH-Aktivitäten verifiziert werden, da in den genannten Stämmen die mLDH-Aktivitäten mit der detektierten mLDH-Menge korrelierten (Tab. 21). In *G. oxydans* N44-1 ließ sich eine dreifach höhere mLDH-Aktivität nachweisen als in *G. oxydans* IFO 3293. Möglicherweise ist die mLDH somit für die Steigerung der 2-KGLA-Ausbeute bei der Konstruktion von *G. oxydans* N44-1 aus *G. oxydans* IFO 3293 verantwortlich. Da in *E. coli* die selten vorkommende mLDH als ein Atmungsketten-assoziiertes Enzym beschrieben wurde, das am Elektronentransfer beteiligt ist und die Oxidation von Laktat zu Pyruvat an den Membrantransport von Zuckern und Aminosäuren koppelt (Pratt *et al.*, 1979; Barnes und Kaback, 1970, 1971), könnte die mLDH auch in *G. oxydans* am Elektronentransfer in der Atmungs-

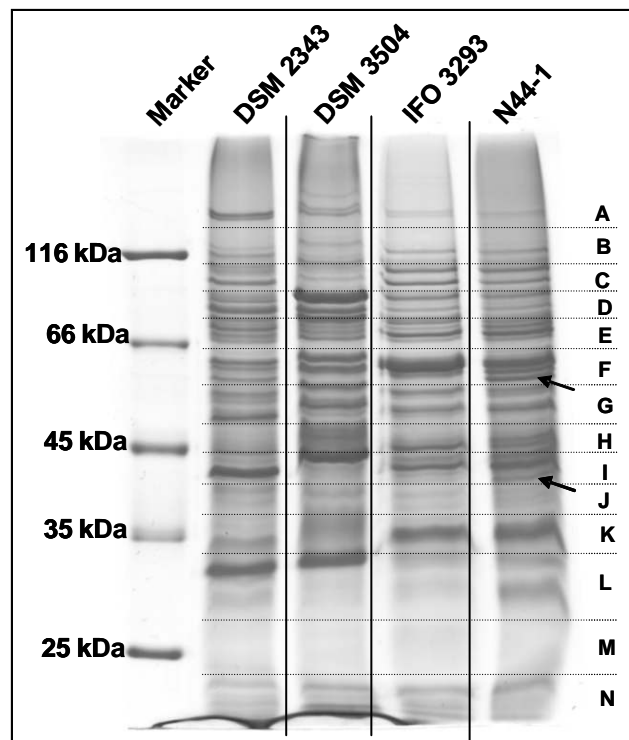


Abb. 18: SDS-PAGE der Membranproteine von verschiedenen *G. oxydans*-Stämmen (25 µg Protein pro Spur). Die Pfeile kennzeichnen Banden, die in *G. oxydans* N44-1 vorkommen, im Parentalstamm IFO 3293 jedoch fehlen. Das Raster deutet die Fragmentierung für die nachfolgenden massenspektroskopischen Analysen an.

kette oder beim Sorbosontransport eine Rolle spielen. In *G. oxydans* N44-1 könnte somit aufgrund der erhöhten mLDH-Aktivität mehr Sorboson aktiv in die Zelle transportiert werden, wodurch die Umsetzung von Sorboson zu 2-KGLA effektiver stattfinden kann als in *G. oxydans* IFO 3293 und den rekombinanten Stämmen. Ein Modell, wie das dafür benötigte intrazelluläre Laktat in *G. oxydans* bereitgestellt werden könnte, wird in Kap. V diskutiert.

Tab. 21: Enzymaktivitäten der membrangebundenen Laktat-DH

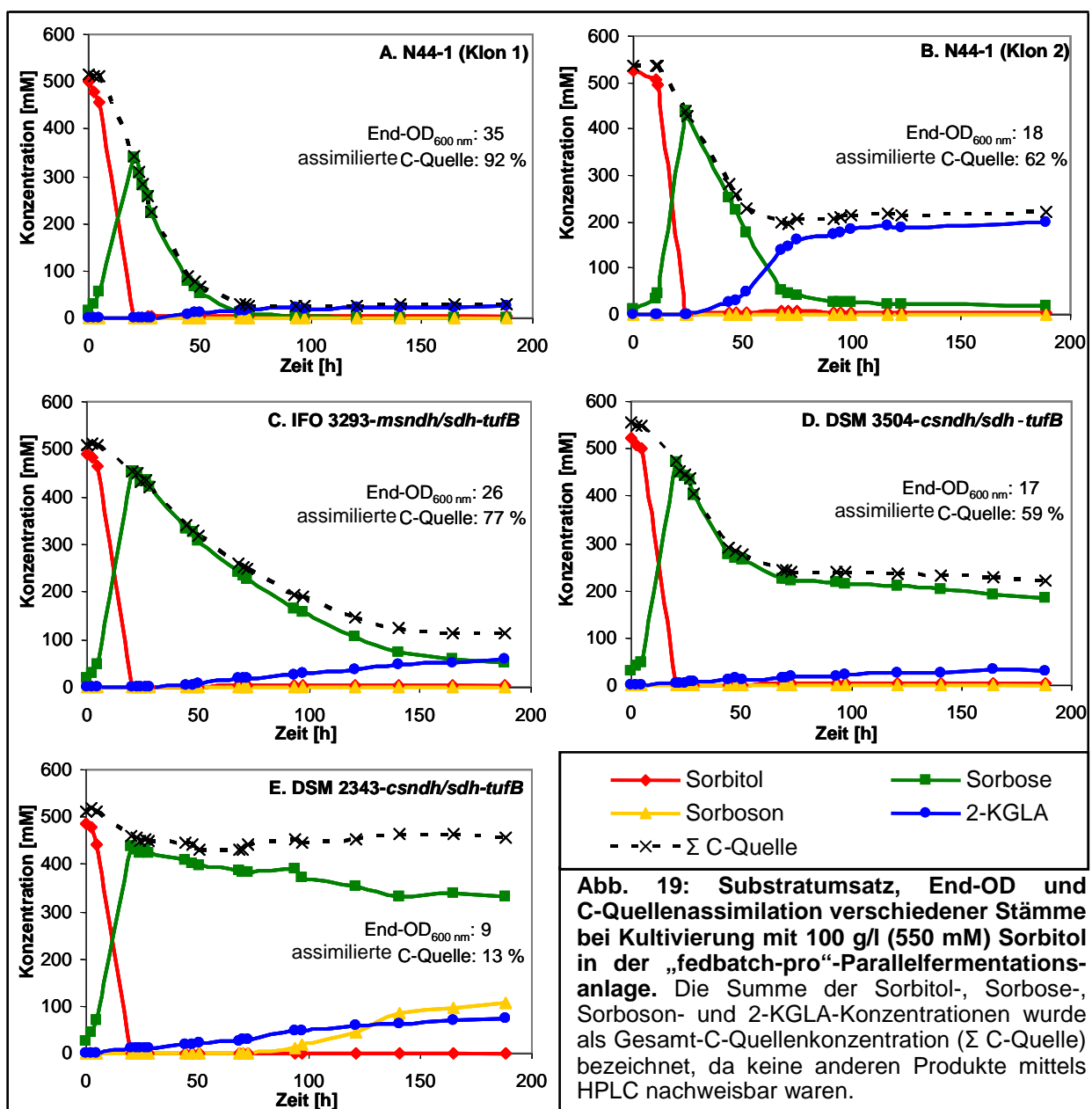
<i>G. oxydans</i> -Stamm	N44-1	IFO 3293	DSM 3504	DSM 2343
mLDH-Aktivität [U/mg Membranprotein]	0,62	0,21	0,12	0,10

Um die mLDH-Funktion aufzuklären und zu überprüfen, ob eine Modulation der mLDH-Konzentration eine Auswirkung auf die 2-KGLA-Bildung hat, wurde das *ml dh*-Gen in *G. oxydans* N44-1, IFO 3293 und DSM 2343 überexprimiert. Dabei konnte die mLDH-Aktivität auf bis zu 3,81 U/mg Protein gesteigert werden, jedoch wiesen die resultierenden Stämme eine stark variierende Koloniebildung mit beschleunigtem oder verlangsamtem Wachstum auf und waren so instabil, dass kein Einfluss auf die 2-KGLA-Produktion untersucht werden konnte.

4. Untersuchungen zur Sorboseassimilation

Für die biotechnische Anwendung spielen vor allem die spezifischen 2-KGLA-Ausbeuten und damit neben der Produktbildung auch die Biomasseproduktion eine wichtige Rolle (Schmid, 2002). Bei der Sorbitolbiotransformation erfolgte die 2-KGLA-Produktion von *G. oxydans* DSM 2343-*csndh/sdh-tufB* im Vergleich zu *G. oxydans* N44-1 mit deutlich weniger Biomasse (Abb. 19). Daher war trotz unterschiedlicher 2-KGLA-Endkonzentrationen die spezifische Produktausbeute von *G. oxydans* DSM 2343-*csndh/sdh-tufB* (7 g 2-KGLA/ g BTM) vergleichbar mit *G. oxydans* N44-1-Klon 2 (8 g 2-KGLA/ g BTM). Um die Zusammenhänge zwischen Biomasse- und 2-KGLA-Produktion aufzuklären, sollten der für den Sorboseabbau verantwortliche Stoffwechselweg sowie die Gründe für die unterschiedliche Sorboseassimilation und Biomasseproduktion identifiziert werden. Dabei fiel zunächst auf, dass nach der vollständigen Umsetzung von Sorbitol zu Sorbose - korrelierend zur End-OD - eine Verstoffwechslung der Sorbose stattfand (Abb. 19). *G. oxydans* N44-1-Klon 1 wuchs bis zu einer optischen Dichte von 35 und verbrauchte dafür 92 % der C-Quelle. Auch *G. oxydans* IFO 3293 assimilierte 77 % Sorbose, um bis zu einer ebenfalls sehr hohen optischen Dichte von 26 zu wachsen. *G. oxydans* N44-1-Klon 2 wuchs bis zu einer optischen Dichte von 18, aber auch dabei verschwand der Sorboseanteil, der nicht zu 2-KGLA umgesetzt wurde (62 %), nahezu vollständig aus

dem Fermentationsüberstand, wobei die 36 % 2-KGLA von *G. oxydans* nicht mehr verstoffwechselt werden können (Shinjo *et al.*, 1990, 1995). In Übereinstimmung damit wurde bereits postuliert, dass mit *G. oxydans* N44-1 keine weitere Steigerung der 2-KGLA-Ausbeute möglich ist, da bis zu 70 % der Sorbose für die Biomassebildung verwendet werden (Sugisawa *et al.*, 1990), und dass die periplasmatischen 2-KGLA-bildenden Reaktionen in direkter Konkurrenz zu den für die Biomasseproduktion verantwortlichen Zentralstoffwechselreaktionen stehen (Shinjo *et al.*, 1990, 1995). Im Gegensatz zu *G. oxydans* N44-1 und IFO 3293 wuchs *G. oxydans* DSM 2343-*csndh/sdh-tufB* nur bis zu einer deutlich geringeren optischen Dichte (OD ~ 9) und assimilierte dafür lediglich 13 % der zur Verfügung stehenden C-Quelle. Der Rest akkumulierte größtenteils als Sorbose im Medium (Abb. 19).



Somit konnte wie bei der CaCO₃-gepufferten Schüttelkolbenkultivierung (Abb. 17) eine starke Abhängigkeit der C-Quellenassimilation von der Biomasseproduktion nachgewiesen werden. Dabei reduzierten die Stämme, die viel C-Quelle assimilierten, nach zunächst erfolgter vollständiger Oxidation von Sorbitol zu Sorbose, im weiteren Verlauf der Fermentation Sorbose wieder zurück zu 4,3 - 5,6 mM Sorbitol. Im Fall von *G. oxydans* DSM 2343-*csndh/sdh-tufB* konnte dies - in Übereinstimmung mit einer geringen C-Quellenassimilation - nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu der periplasmatischen Oxidation von Sorbitol zu 2-KGLA findet die gegenläufige Reduktion der aufgenommenen Sorbose zu Sorbitol im Zytosol von *G. oxydans* statt und dient der Einschleusung von Sorbose in den Zentralstoffwechsel (Anhang, Abb. 36). Dabei wird Sorbitol von einer zytosolischen SLDH zu Fruktose umgesetzt, die dann im PPW oder KDPG-Weg verstoffwechselt werden kann (Sugiawa *et al.*, 1990, 1991b; Shinjoh *et al.*, 1990, 2002a; Hoshino *et al.*, 1990; Adachi *et al.*, 1999a).

4.1 Identifizierung des Pentosephosphatwegs als Hauptstoffwechselweg bei Wachstum auf Sorbitol

Zur Identifizierung des für die Sorboseassimilation verantwortlichen Stoffwechselwegs sollte zunächst herausgefunden werden, wie die aus der zytosolischen Sorbosereduktion entstandene Fruktose in den Zentralstoffwechsel gelangt. Dabei wurde in *G. oxydans* DSM 2343, DSM 3504, IFO 3293 und N44-1 sowohl eine Fruktokinase-Aktivität (0,02 bis 0,04 U/mg Protein) zur Phosphorylierung der Fruktose zu Fruktose-6-phosphat, als auch eine Phosphoglukoseisomerase-Aktivität (0,7 bis 2,5 U/mg Protein) zur Isomerisierung von Fruktose-6-phosphat zu Glukose-6-phosphat nachgewiesen. Glukose-6-phosphat kann direkt in den PPW oder KDPG-Weg eingeschleust werden. Da für den anderen möglichen Weg, bei dem Fruktose zunächst zu Glukose isomerisiert (Glukoseisomerase) und anschließend zu Glukose-6-phosphat phosphoryliert (Glukokinase) wird, die Glukoseisomerase-Aktivität in allen Stämmen fehlte, konnte davon ausgegangen werden, dass Fruktose und damit auch Sorbose von *G. oxydans* über den zuerst genannten Weg in den Zentralstoffwechsel eingeschleust wird (Anhang, Abb. 36).

Um herauszufinden, welcher der beiden möglichen Stoffwechselwege, PPW oder KDPG-Weg, in *G. oxydans* hauptsächlich für die C-Quellenassimilation verantwortlich ist, wurden DNA-Microarray-Analysen durchgeführt. Dabei wurde das Expressionsmuster von *G. oxydans* DSM 2343 bei Wachstum auf Sorbitol bzw. Glukose mit dem Expressionsmuster bei Wachstum auf Sorbose bzw. Glukonat verglichen, und es wurden erste Hinweise darauf erhalten, dass der PPW bei der Sorbose- und auch

Glukonatassimilation eine vorrangige Rolle spielt. Bei auf Sorbose und Glukonat kultivierten Zellen war die Expression der meisten PPW-Gene, die zum größten Teil zusammen in einem Gencluster vorliegen (Anhang, Abb. 37), deutlich erhöht (Tab. 22), während die KDPG-Weg-Gene nicht induziert wurden.

Tab. 22: Expression der Gene des Pentosephosphatwegs

Gen (ORF-Nr.)	Annotierte Funktion des Gens (Prust <i>et al.</i> , 2004)	Expressionsverhältnis	
		Sorbose/ Sorbitol	Glukonat/ Glukose
GOX1703	Transketolase	2,61	3,90
GOX1704	Transaldolase/Phosphoglukoseisomerase	3,38	3,66
GOX1705	6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase	2,12	n.d.
GOX1706	Hydrolase	n.d.	n.d.
GOX1707	6-Phosphoglukonolactonase	3,43	2,68
GOX1708	Ribose-5-phosphat-Isomerase	2,30	n.d.
GOX1709	Glukonokinase	2,56	2,97

Da in *G. oxydans* die Enzymsysteme für die Glykolyse und den TCC unvollständig sind (Prust *et al.*, 2005), stellen der PPW und der KDPG-Weg die einzige Möglichkeit für den Sorbosekatabolismus dar (Shinjoh *et al.*, 1990). Eine Differenzierung zwischen den beiden Stoffwechselwegen ist anhand der CO₂-Bildung möglich, da nur im PPW Sorbose zu CO₂ abgebaut werden kann (Shinjoh *et al.*, 1990). Um zu bestätigen, dass in *G. oxydans* der Sorboseabbau hauptsächlich über den PPW erfolgt, wurde die CO₂-Produktion der in Abb. 19 aufgeführten Stämme miteinander verglichen (Abb. 20). Dabei korrelierten die produzierten CO₂-Mengen mit der Sorboseassimilation und Biomasseproduktion. So produzierte *G. oxydans* N44-1-Klon 1, der 8,8 g BTM/l bildete und 92 % Sorbose assimilierte, über 2 Mol/l CO₂, was 61 % des eingesetzten Sorbitols entsprach. Entsprechend der erreichten optischen Dichten und assimilierten Sorbosemenge (Abb. 19) nahmen die produzierten CO₂-Mengen ab und *G. oxydans* DSM 2343-*csndh/sdh-tufB* setzte korrelierend zu der geringsten Biomassebildung (2,3 g BTM/l) und Sorboseassimilation (13 %) nur 7 % des Sorbitols zu CO₂ um (0,2 Mol CO₂/l). Eine C-Quellen-Bilanz (Anhang, Abb. 38) verdeutlichte dabei, dass der größte Anteil der assimilierten C-Quelle zu CO₂ abgebaut wurde. Somit konnte nachgewiesen werden, dass Sorbose von *G. oxydans* größtenteils über den PPW verstoffwechselt wird. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit den Daten von De Ley und Swings (1984), die beschrieben, dass *G. oxydans* die meisten Zucker vorwiegend über den PPW verstoffwechselt. Darüber hinaus wurde auch für *G. oxydans* UV-10 beschrieben, dass über 50 % Sorbose assimiliert werden; dabei wurden durch Flussanalysen mit radioaktiv markierten Sorboseisotopen ebenfalls Hinweise darauf erhalten, dass ein Großteil der assimilierten Sorbose im PPW zu ¹⁴CO₂ abgebaut wird (Shinjoh *et al.*, 1990, 1995). Bei der fermentativen Herstellung von 2-KGLA aus Sorbitol geht somit der Hauptanteil des eingesetzten Substrats in Form von CO₂ verloren.

IV. Ergebnisse

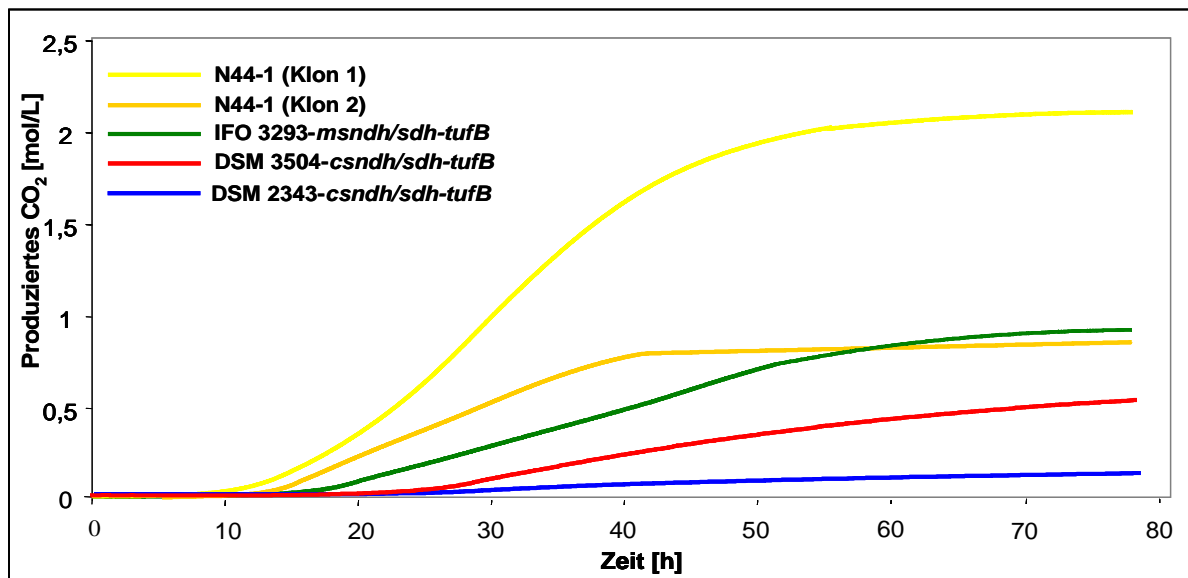


Abb. 20: Produziertes CO₂ verschiedener *G. oxydans*-Stämme bei Kultivierung mit 100 g/l (550 mM) Sorbitol in der „fedbatch-pro“-Parallel-Fermentationsanlage.

Nachdem der PPW als der hauptsächlich für den Sorbosekatabolismus verantwortliche Stoffwechselweg identifiziert wurde, sollte überprüft werden, ob die Unterschiede zwischen den untersuchten Stämmen auf einer unterschiedlichen Expression des gesamten PPW-Genclusters beruhen (Anhang, Abb. 37), oder ob sie sich auf einzelne Enzyme des PPWs eingrenzen lassen. Da bei Fermentation von z. B. *G. oxydans* N44-1-Klon 1 aus 550 mM Sorbose über 2000 mM CO₂ entstanden waren (Abb. 20), hat ein Molekül Sorbose den PPW mehrfach durchlaufen. Voraussetzung dafür war, dass im PPW entstehendes Glyzerinaldehyd-3-phosphat und Fruktose-6-phosphat über die Glukoneogenese wieder zu Glukose-6-phosphat umgesetzt wurden und somit erneut in den PPW eintreten konnten (Anhang, Abb. 36). Die dafür verantwortlichen Enzyme sind unter anderem die Fruktose-1,6-bisphosphatase (F-1,6-BPase) und die Phosphoglukoseisomerase (PGI). Ein möglicher Grund, warum *G. oxydans* DSM 2343 fast keine Sorbose assimilierte und entsprechend weniger CO₂ produzierte als z.B. *G. oxydans* N44-1, könnte eine geringere Aktivität in einem der beiden Enzyme sein. Besonderes Interesse galt dabei der PGI, da sie dafür verantwortlich ist, dass sowohl Glyzerinaldehyd-3-phosphat als auch Fruktose-6-phosphat wieder zu Glukose-6-phosphat umgesetzt werden, und bei der Einschleusung von Sorbose in den PPW eine Rolle spielt (Anhang, Abb. 36). Doch auch die irreversible Reaktion der F-1,6-BPase wurde untersucht, da sie den zentralen Schritt der Glukoneogenese katalysiert.

Deutliche Hinweise, dass sowohl die PGI als auch die F-1,6-BPase in den untersuchten Stämmen die für die unterschiedliche Sorboseassimilation verantwortlichen Enzyme darstellen, wurden dabei bereits beim Vergleich der Membranproteine (Abb. 18) erhalten. Die F-1,6-BPase und PGI wurden bei der massenspektroskopischen Membranprotein-Analyse detektiert, da sie bei der

Herstellung der Membranfraktion als zytosolische Kontamination kopräzipitiert wurden. Eine etwa 30 %ige Kontamination durch zytosolische Proteine ist bei der gewählten Fraktionierungsmethode die Regel (pers. Mitteilung, Dr. D. Becher). In Korrelation zu der höheren Sorboseassimilation, Biomasseproduktion und CO₂-Produktion ließ sich die F-1,6-BPase nur in *G. oxydans* N44-1 und die PGI nur in *G. oxydans* N44-1 und IFO 3293 nachweisen; in *G. oxydans* DSM 3504 und DSM 2343 war, in Korrelation zu der geringeren Biomassebildung, weder die F-1,6-BPase noch die PGI detektierbar (Anhang, Tab. 26). Zur Verifizierung dieser Ergebnisse wurden die F-1,6-BPase- und PGI-Aktivitäten in den verschiedenen Stämmen bestimmt (Tab. 23). Da die PGI in *G. oxydans* mit der Transaldolase (TAL), einem weiteren PPW-Enzym, zu einem bifunktionalen Enzym fusioniert ist (Prust, 2005; Sugiyama *et al.*, 2003), wurden auch die TAL-Enzymaktivitäten zur Bestätigung der massenspektroskopischen Ergebnisse herangezogen. In Korrelation zu der detektierten PGI/TAL-Menge ließ sich in *G. oxydans* N44-1 und IFO 3293 eine etwa dreifach höhere PGI-Aktivität nachweisen als in *G. oxydans* DSM 3504 und DSM 2343 (Tab. 23). Ein zur PGI-Aktivität analoger Unterschied zwischen *G. oxydans* N44-1 und IFO 3293 auf der einen und *G. oxydans* DSM 3504 und DSM 2343 auf der anderen Seite spiegelte sich auch in den TAL-Aktivitäten wider. Auch der beim Membranproteinvergleich erhaltene Hinweis auf eine verstärkte F-1,6-BPase-Bildung in *G. oxydans* N44-1 konnte durch die Enzymaktivitäten bestätigt werden. In *G. oxydans* N44-1 war die F-1,6-BPase etwa doppelt so aktiv wie in *G. oxydans* IFO 3293, DSM 3504 und DSM 2343 (Tab. 23, Abb. 21). Eine höhere PGI/TAL- und F-1,6-BPase-Aktivität konnte demnach für die gesteigerte CO₂- und Biomasseproduktion von *G. oxydans* N44-1 und IFO 3293 verantwortlich sein, da aufgrund des verstärkten Wiedereintritts von Glycerinaldehyd-3-phosphat und Fruktose-6-phosphat in den PPW die zyklischen PPW-Reaktionen schneller ablaufen konnten und deshalb mehr Sorbose verstoffwechselt wurde. Darüber hinaus war auch die Fruktokinase-Aktivität in *G. oxydans* N44-1 und IFO 3293 etwa doppelt so hoch wie in *G. oxydans* DSM 2343 und DSM 3504 (Tab. 23, Abb. 21), so dass die Einschleusung von Fruktose und damit auch Sorbose in den PPW von *G. oxydans* N44-1 und IFO 3293 ebenfalls effektiver stattfinden konnte (Anhang, Abb. 36).

Tab. 23: Enzymaktivitäten der Fruktokinase, Fruktose-1,6-bisphosphatase, Phosphoglucose-Isomerase und Transaldolase in den angegebenen *G. oxydans*-Stämmen.

Aktivität [U/mg Protein]	N44-1	IFO 3293	DSM 3504	DSM 2343
Fruktokinase	0,03	0,03	0,02	0,01
Fruktose-1,6-bisphosphatase	0,10	0,05	0,06	0,06
Phosphoglucose-Isomerase	2,34	2,50	0,70	0,71
Transaldolase	0,28	0,29	0,14	0,03

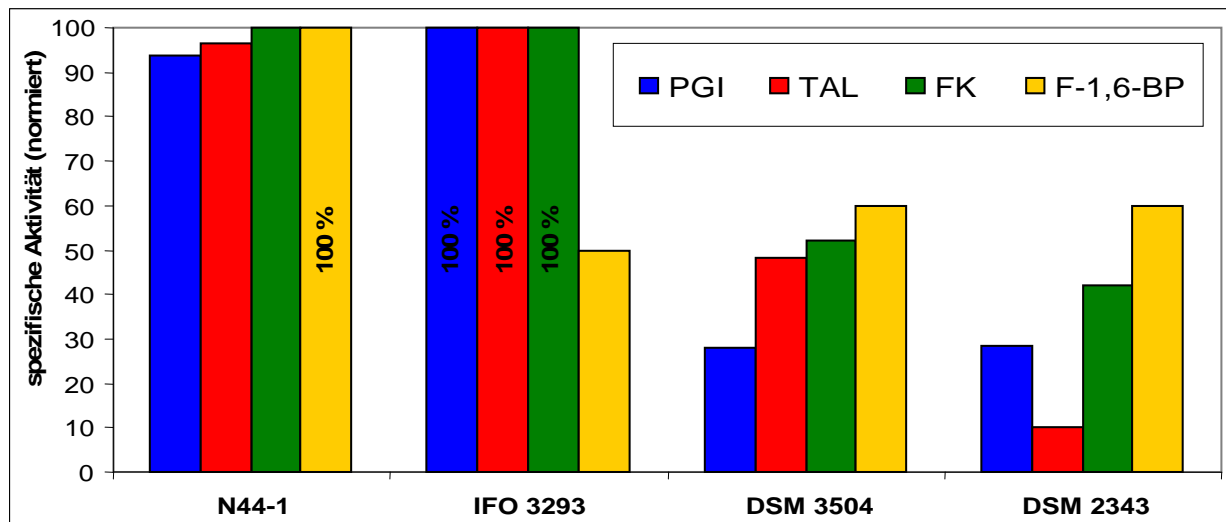


Abb. 21: Normierte Fruktokinase-, Fruktose-1,6-bisphosphatase-, Phosphoglucoseisomerase- und Transaldolase-Aktivitäten in verschiedenen *G. oxydans*-Stämmen. Angegeben sind die relativen Enzymaktivitäten, wobei die jeweils höchste Enzymaktivität gleich 100 % gesetzt wurde.

Es konnten somit große Unterschiede im PPW-Stoffwechsel der *G. oxydans*-Stämme und eine Korrelation der gemessenen Enzymaktivitäten zur Sorbose-assimilation festgestellt werden. Vermutlich ist eine geringere Aktivität der in Abb. 21 aufgeführten Enzyme der Grund dafür, dass *G. oxydans* DSM 2343 im Gegensatz zu *G. oxydans* N44-1 und IFO 3293 fast keine Sorbose für die Biomasseproduktion assimiliert und deshalb so effizient für die Oxidation von Sorbitol zu Sorbose im „Reichstein-Verfahren“ eingesetzt wird (Boudrant, 1990). Die normierte Darstellung der Enzymaktivitäten (Abb. 21) verdeutlichte, dass in *G. oxydans* DSM 2343 vor allem die TAL-Aktivität einen Engpass darstellen und für die geringere Sorbose-assimilation im PPW verantwortlich sein könnte.

4.2 Einfluss der Phosphoglucoseisomerase- und Transaldolase-Aktivitäten auf den Pentosephosphatweg

Da die TAL in *G. oxydans* zusammen mit der PGI als bifunktionales Protein produziert wird und die PGI, wie bereits erwähnt, mehrere Funktionen bei der Sorboseassimilation übernimmt (Anhang, Abb. 36), sollte der Einfluss der PGI/TAL-Aktivitäten auf den PPW-Stoffwechsel und die 2-KGLA-Produktion analysiert werden. Zu diesem Zweck erfolgte eine Erhöhung bzw. Verringerung der PGI/TAL-Aktivitäten in *G. oxydans* DSM 2343, IFO 3293 und N44-1 durch Überexpression des *pgi/tal*-Gens bzw. dessen Translationsabschwächung mittels Antisense-RNA. Das *pgi/tal*-Gen wurde aus dem Genom von *G. oxydans* DSM 2343 amplifiziert und über die Restriktionsschnittstelle *Swa* I in beiden Orientierungen (fw = vorwärts orientiert; rev = revers orientiert) hinter den *G. oxydans-tufB*-Promotor in den Vektor pEXGOX

kloniert. Aus den Vektoren pEXGOX-*pgi/tal-fw-tufB* und pEXGOX-*pgi/tal-rev-tufB* wurde anschließend das *pgi/tal*-Gen samt *tufB*-Promotor durch Restriktion mit *KpnI* und *SpeI* ausgeschnitten und jeweils in den Vektor pBBR1MCS2 kloniert. Die beiden resultierenden Vektoren pBBR1MCS2-*pgi/tal-fw-tufB* und pBBR1MCS2-*pgi/tal-rev-tufB* wurden sequenziert und in *G. oxydans* DSM 2343, IFO 3293 und N44-1 überführt. Die so konstruierten Stämme wurden auf Steigerung bzw. Verringerung der PGI- und TAL-Aktivitäten untersucht (Tab. 24). In jedem der drei *G. oxydans*-Wildtypen konnte durch Einbringen des Vektors pBBR1MCS2-*pgi/tal-fw* eine deutliche Überexpression des *pgi/tal*-Gens und durch Einbringen des Vektors pBBR1MCS2-*pgi/tal-rev* eine bis zu 50 %ige Verringerung der PGI- und TAL-Aktivitäten erzielt werden.

Tab. 24: PGI- und TAL-Aktivitäten nach *pgi/tal*-Überexpression (*pgi/tal-fw*) und dessen Translationsabschwächung (*pgi/tal-rev*) in verschiedenen *G. oxydans*-Stämmen.

<i>G. oxydans</i> -Stamm	PGI-Aktivität [U/mg Protein]	Zu-/ Abnahme [%]	TAL-Aktivität [U/mg Protein]	Zu-/ Abnahme [%]
DSM 2343-pBBR1MCS2 (Kontrolle)	0,77	-	0,03	-
DSM 2343- <i>pgi/tal-fw</i>	6,38	+ 729	0,87	+ 2900
DSM 2343- <i>pgi/tal-rev</i>	0,40	- 48	n.d.	n.d.
IFO 3293-pBBR1MCS2 (Kontrolle)	2,07	-	0,32	-
IFO 3293- <i>pgi/tal-fw</i>	5,85	+ 183	n.d.	n.d.
IFO 3293- <i>pgi/tal-rev</i>	1,63	- 21,26	0,22	- 30,31
N44-1-pBBR1MCS2 (Kontrolle)	1,91	-	0,24	-
N44-1- <i>pgi/tal-fw</i>	6,25	+ 227	n.d.	n.d.
N44-1- <i>pgi/tal-rev</i>	1,18	- 38,22	0,12	- 50,82

Um die Auswirkungen der veränderten PGI/TAL-Aktivitäten auf die Biomasseproduktion zu untersuchen, wurden die rekombinanten Stämme zunächst im Schüttelkolben kultiviert. Dabei konnten durch die PGI/TAL-Überproduktion mit *G. oxydans* N44-1-*pgi/tal-fw* (OD = 9,5) und *G. oxydans* IFO 3293-*pgi/tal-fw* (OD = 7,2) deutlich höhere optische Dichten erzielt werden als mit den Kontrollstämmen *G. oxydans* N44-1-pBBR1MCS2 (OD = 6,0) und *G. oxydans* IFO 3293-pBBR1MCS2 (OD = 5,1). Im Gegensatz dazu wuchsen *G. oxydans* DSM 2343-*pgi/tal-fw* und *G. oxydans* DSM 2343-pBBR1MCS2 bis zu vergleichbaren optischen Dichten, so dass die Überexpression des *pgi/tal*-Gens in *G. oxydans* DSM 2343 nicht ausreichte, um Sorbose effektiver über den PPW zu verstoffwechseln. Die Translationsabschwächung von 30 bis 50 % reichte in keinem der Stämme aus, um die PPW-Stoffwechselleistung so weit zu verringern, dass sie sich in einer niedrigeren Biomasseproduktion niederschlug.

Um sicher zu gehen, dass das verbesserte Wachstum bei *pgi/tal*-Überexpression auf eine erhöhte PPW-Stoffwechselleistung zurückzuführen ist, wurde die CO₂-Produktion von *G. oxydans* N44-1-*pgi/tal-fw* und N44-1-pBBR1MCS2 im „Fedbatch-pro“-Fermentationssystem verglichen. Dabei erfolgte die Biomasseproduktion von

G. oxydans N44-1-*pgi/tal-fw* verglichen zum Kontrollstamm *G. oxydans* N44-1-pBBR1MCS2, deutlich schneller und bis zu einer um ein Drittel erhöhten optischen Dichte (Abb. 22). Dass bei Überproduktion eines Enzyms des Hauptstoffwechselweges nicht nur das Wachstum beschleunigt, sondern auch mehr Biomasse produziert wurde, lässt sich dadurch erklären, dass die Konkurrenzreaktion - die Bildung von 2-KGLA - in *G. oxydans* N44-1-*pgi/tal-fw* nahezu vollständig unterbunden wurde (Abb. 23). Da keine Umsetzung des Substrats in das Endprodukt 2-KGLA erfolgte, stand die gesamte C-Quelle zur Energiegewinnung und Biomasseproduktion zur Verfügung. Hinweise darauf, dass die 2-KGLA-Synthese und die Biomasseproduktion in Konkurrenz zueinander stehen, wurden auch von Shinjoh *et al.* (1990) erhalten, wo in Stämmen mit einer verringerten 2-KGLA-Produktivität ein erhöhter Kohlenstofffluss in den PPW gemessen wurde. Darüber hinaus beschrieben Shinjoh *et al.* (1990), dass sowohl die Energie aus der periplasmatischen Umsetzung von Sorbitol zu Sorbose als auch die Reduktions-Äquivalente aus der sich anschließenden Sorboseassimilation im PPW für die Biomassebildung verantwortlich sind. Deshalb ist eine weitere Begründung für die erhöhte und nicht nur beschleunigte Biomasseproduktion von *G. oxydans* N44-1-*pgi/tal-fw*, dass der periplasmatische Energiegewinn und die Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten aus dem PPW in einem frühen Zeitfenster der Kultivierung stattfinden müssen, um sie für die Biomasseproduktion nutzen zu können. Nach 20 h, wenn Sorbitol vollständig zu Sorbose umgesetzt wurde und aus diesem Oxidationsschritt keine Energie mehr gewonnen werden konnte, sank bei beiden Stämmen die Wachstumsrate auf einen niedrigeren Wert ab und es folgte eine zweite Wachstumsphase aufgrund der Sorboseassimilation im PPW (Abb. 22). Dabei erfolgte bei *G. oxydans* N44-1-*pgi/tal-fw* der vollständige Sorboseabbau innerhalb der ersten 50 h (Abb. 23), und damit deutlich schneller als der Abbau in *G. oxydans* N44-1-pBBR1MCS2 (100 h). Die ersten 50 h waren jedoch bei beiden Stämmen der Zeitraum, in dem die zweistufige Biomasseproduktion stattfand. Vermutlich kann *G. oxydans* N44-1-pBBR1MCS2 die Reduktionsäquivalente aus der Assimilation der nach 50 h noch übrig gebliebenen 200 mM Sorbose nicht mehr für die Biomasseproduktion nutzen. Ein ähnliches Ergebnis erhielten Shinjoh *et al.* (2000a) durch Konstruktion eines *G. oxydans*-Stammes, der keine Sorbose im PPW assimilieren konnte. Bei diesem Stamm erfolgte nur ein einstufiges Wachstum und nach der periplasmatischen Sorbitoloxidation zu Sorbose fand keine weitere Biomasseproduktion statt. Im Gegensatz dazu schloss sich beim Wildtyp nach der Oxidation von Sorbitol zu Sorbose eine zweite Wachstumsphase an, in der die Sorboseassimilation im PPW erfolgte.

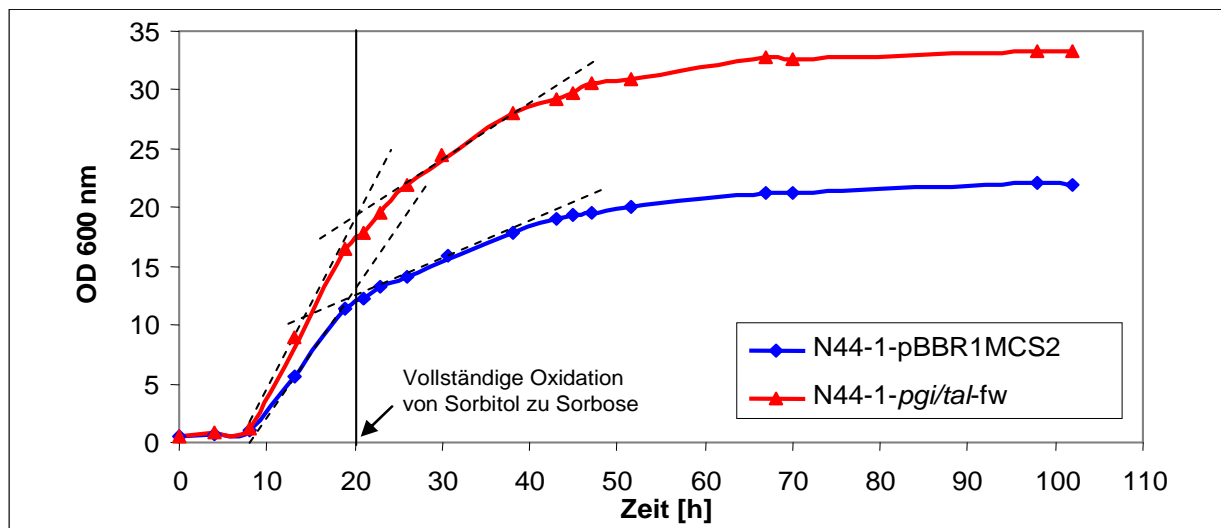


Abb. 22: Wachstum von *G. oxydans* N44-1-*pgi/tal-fw* und N44-1-pBBR1MCS2 in S/S-Medium mit 100 g/l Sorbitol in der „Fedbatch-Pro“-Fermentationsanlage. Die gestrichelten Linien deuten das im Text beschriebene zweistufige Wachstum an.

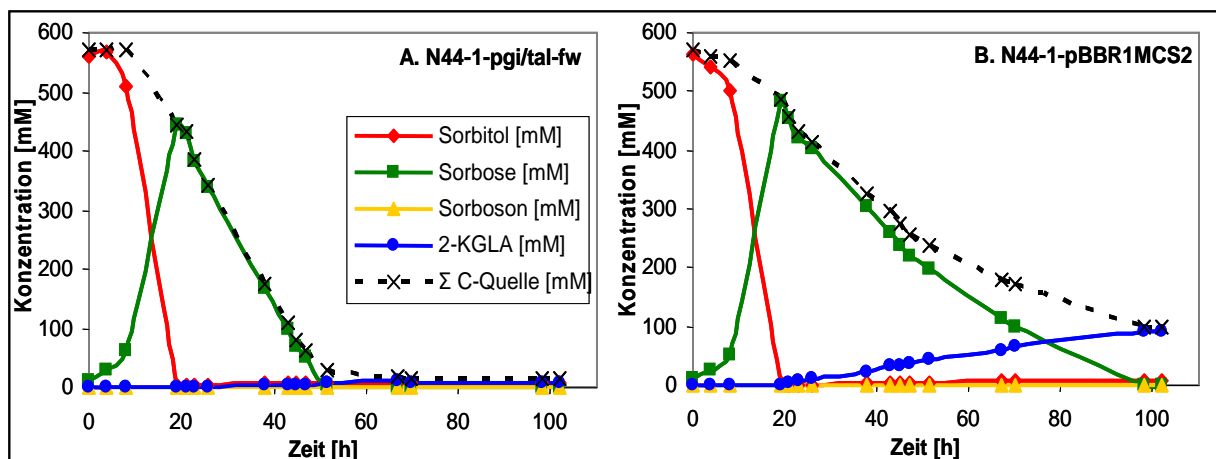


Abb. 23: Substratumsatz, Produktbildung und Sorboseassimilation im PGI/TAL-Überproduzenten *G. oxydans* N44-1-*pgi/tal-fw* (A) und Kontrollstamm N44-1-pBBR1MCS2 (B) bei Wachstum auf S/S-Medium mit 100 g/l Sorbitol in der „Fedbatch-Pro“-Fermentationsanlage. Durch *pgi/tal*-Überexpression erfolgte in Korrelation zum beschleunigten Wachstum (Abb. 22) der C-Quellenabbau vollständig und deutlich schneller als im Kontrollstamm.

Der Nachweis, dass bei *pgi/tal*-Überexpression die beschleunigte und erhöhte Biomasseproduktion bzw. Sorboseassimilation mit einer gesteigerten PPW-Stoffwechselleistung zu begründen war, konnte durch die damit korrelierende CO_2 -Bildung erbracht werden (Abb. 24-A). Ein ähnlichen Hinweis erhielten Sugiyama *et al.* (2003), wo durch die Zugabe der gereinigten bifunktionalen PGI/TAL zu einem zellfreien *G. oxydans*-System die Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten aus dem PPW gesteigert werden konnte. Korrelierend zum produzierten CO_2 wurde von den Stämmen O_2 verbraucht (Abb. 24-B). Ein Knick im Kurvenverlauf des O_2 -Verbrauchs bei etwa 12 h deutete an, dass der bis zu diesem Zeitpunkt verbrauchte Sauerstoff (0,5 mol/l) auf die periplasmatische Sorbitoloxidation zu Sorbose (ebenfalls 0,5 mol/l) zurückzuführen ist, während der darüber hinaus gehende Sauerstoffverbrauch aufgrund der Sorboseassimilation im PPW erfolgte.

IV. Ergebnisse

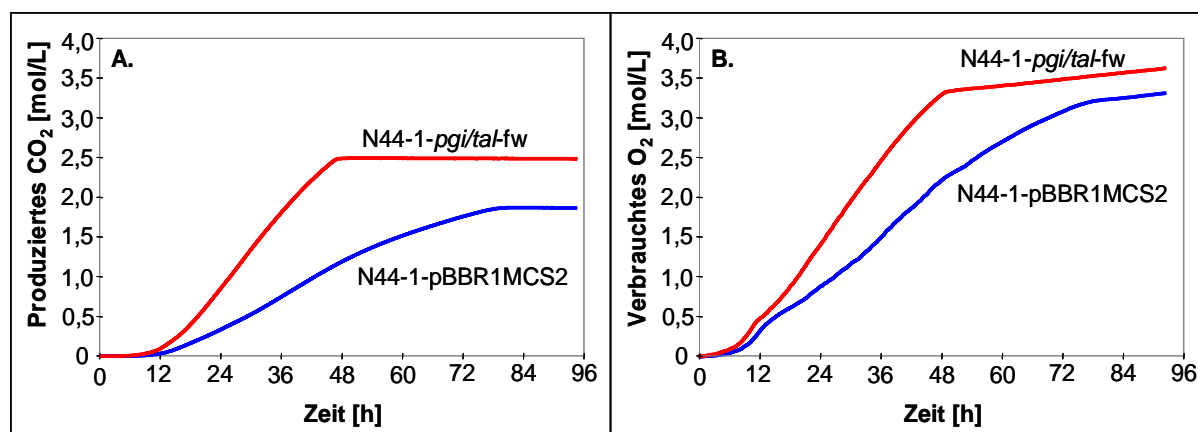


Abb. 24: Kohlendioxidproduktion (A) und Sauerstoffverbrauch (B) von *G. oxydans* N44-1-*pgi/tal-fw* und N44-1-*pBBR1MCS2* bei Wachstum auf S/S-Medium mit 100 g/l Sorbitol in der „Fedbatch-Pro“-Fermentationsanlage.

Somit konnte durch die *pgi/tal*-Überexpression nachgewiesen werden, dass die Stoffwechselleistung des PPWs und damit die Biomasseproduktion in *G. oxydans* maßgeblich von den PGI/TAL-Aktivitäten abhängt. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass *G. oxydans* bei Wachstum auf Komplexmedium Sorbitol nur in geringem Umfang als Biomassebaustein verwendet. Stattdessen wird Sorbitol größtenteils zur periplasmatischen Energiegewinnung bei der Oxidation von Sorbitol zu Sorbose und zur Bereitstellung von Reduktions-Äquivalenten aus der darauf folgenden Sorbose-assimilation im PPW genutzt. Bereits Shinjoh *et al.* (1990) postulierten, dass nur 1 % der Sorbose für den Aufbau von Zellmasse verwendet wird und 40 % Sorbose zu CO₂ umgesetzt werden. Dass *G. oxydans* Sorbitol nur in geringem Umfang als Biomassebaustein verwendet, erklärt, warum bislang kein synthetisches Medium beschrieben wurde, auf dem eine signifikante Biomasseproduktion erfolgt.

Durch *pgi/tal*-Überexpression in *G. oxydans* N44-1 verbesserte sich dessen Biomassebildung erheblich und die dazu in Konkurrenz stehende 2-KGLA-Produktion blieb nahezu aus (Abb. 23). Dies deutet an, dass durch eine Verringerung der PGI/TAL-Aktivität eine Steigerung der 2-KGLA-Ausbeute möglich ist, da weniger Substrat für die CO₂- und Biomasseproduktion verwendet wird. Die bereits erzielte Verringerung der PGI/TAL-Aktivität um 40 % im Konstrukt *G. oxydans* N44-1-*pgi/tal-rev* reichte jedoch dafür nicht aus. Da die Konkurrenz zwischen Biomassebildung und 2-KGLA-Produktion und damit der Einfluss des *pgi/tal*-Gens auf das Wachstum von großem industriellen Interesse ist, wurde das *pgi/tal*-Gen zum Patent angemeldet (Bremus *et al.*, 2006a, 2006b).

5. Einfluss der PGI/TAL-Überproduktion auf den Glukosestoffwechsel

Da die Biomasseproduktion von *G. oxydans* N44-1 aus Glukose ebenfalls von industriellem Interesse ist, wurde zusätzlich der Einfluss der *pgi/tal*-Überexpression auf den Glukosestoffwechsel untersucht. Auch bei Wachstum auf Glukose konnte verglichen zu *G. oxydans* N44-1-pBBR1MCS2 durch die *pgi/tal*-Überexpression eine geringfügig höhere optische Dichte mit einer deutlich höheren Wachstumsrate erzielt werden (25-A). Das zweistufige Wachstum war durch die in Kap. IV/1.2 beschriebene Energiegewinnung in zwei Oxidationsphasen zu begründen. Während in der ersten Phase die Oxidation von Glukose zu Glukonat erfolgte, oxidierte *G. oxydans* in der zweiten Phase Glukonat zu den Ketoglukonaten (Abb. 25-C und D) und gewann dadurch Energie für weiteres Wachstum.

Beim Substratumsatz fiel auf, dass *G. oxydans* N44-1-*pgi/tal*-fw das bis dahin gebildete 5-KGA nach 20 h sehr schnell abbaute, während der Abbau in *G. oxydans* N44-1-pBBR1MCS2 deutlich langsamer stattfand. Im selben Zeitraum erfolgte bei *G. oxydans* N44-1-*pgi/tal*-fw auch eine plötzliche Abnahme der Glukonatkonzentration. Der Gesamt-C-Quellenverbrauch erfolgte bei *pgi/tal*-Überexpression zwar zu Beginn geringfügig schneller, jedoch wurden im Gegensatz zum Wachstum auf Sorbitol von beiden Stämmen nur sehr geringe Mengen C-Quelle assimiliert (20 g/l). Etwa 80 % der eingesetzten Glukose waren während des gesamten Fermentationsverlaufs in Form der Produkte Glukonat, 2-/2,5-KGA und 5-KGA detektierbar. Entsprechend gering war die produzierte Menge CO₂ bei Wachstum auf Glukose (Abb. 25-B). In Übereinstimmung damit beschrieben Shinjoh *et al.* (1990), dass *G. oxydans*, bei vergleichbarer Biomasseproduktion auf den C-Quellen Glukose und Sorbitol, Glukose nur zu 7 % und Sorbose zu 40 % in CO₂ umsetzt. Möglicherweise wird Glukose durch das membrangebundene Enzymsystem zu schnell in die Produkte 2-KGA, 2,5-dKGA und 5-KGA umgesetzt, welche analog zu 2-KGLA (Shinjoh *et al.*, 1990) nicht über den PPW verstoffwechselt werden können.

Eine weitere Begründung dafür, dass Glukose und deren Oxidationsprodukte, im Gegensatz zu Sorbose, nicht über den PPW verstoffwechselt wurden, war die sehr schnelle Umsetzung von Glukose zu Glukonat durch die membrangebundene Glukose-DH (Abb. 8; Abb. 25). Als Ergebnis wird Glukonat im Medium akkumuliert, das dann in die Zelle transportiert und von einer zytosolischen Glukonatkinase zu Glukonat-6-phosphat phosphoryliert wird. Von Glukonat-6-Phosphat ist bekannt, dass es den PPW hemmt (Godjevargova *et al.*, 2004; Velizarov und Beschkov, 1998; Peekhaus *et al.*, 1998). Insbesondere werden die 6-Phosphoglukonat-DH (Moritz *et al.*, 2000) und die PGI (Takama und Nosoh, 1982) auf diese Weise reguliert. Darüber hinaus wurde von Olijve und Kok (1979a/b) beschrieben, dass aufgrund der

IV. Ergebnisse

Hemmung durch Glukonat-6-Phosphat die PPW-Enzyme oberhalb einer Glukosekonzentration von 15 mM inhibiert werden und keine Glukoseassimilation über den PPW erfolgt. Dadurch, dass Glukose, im Gegensatz zu Sorbose, nur zu einem sehr geringen Teil im PPW verstoffwechselt wurde, standen viel weniger Energie und Reduktionsäquivalente für die Biomassebildung zur Verfügung. Somit konnte auch das im Vergleich zur Biomasseproduktion mit Sorbitol (Abb. 22) verringerte Wachstum auf Glukose (Abb. 25-A) erklärt werden.

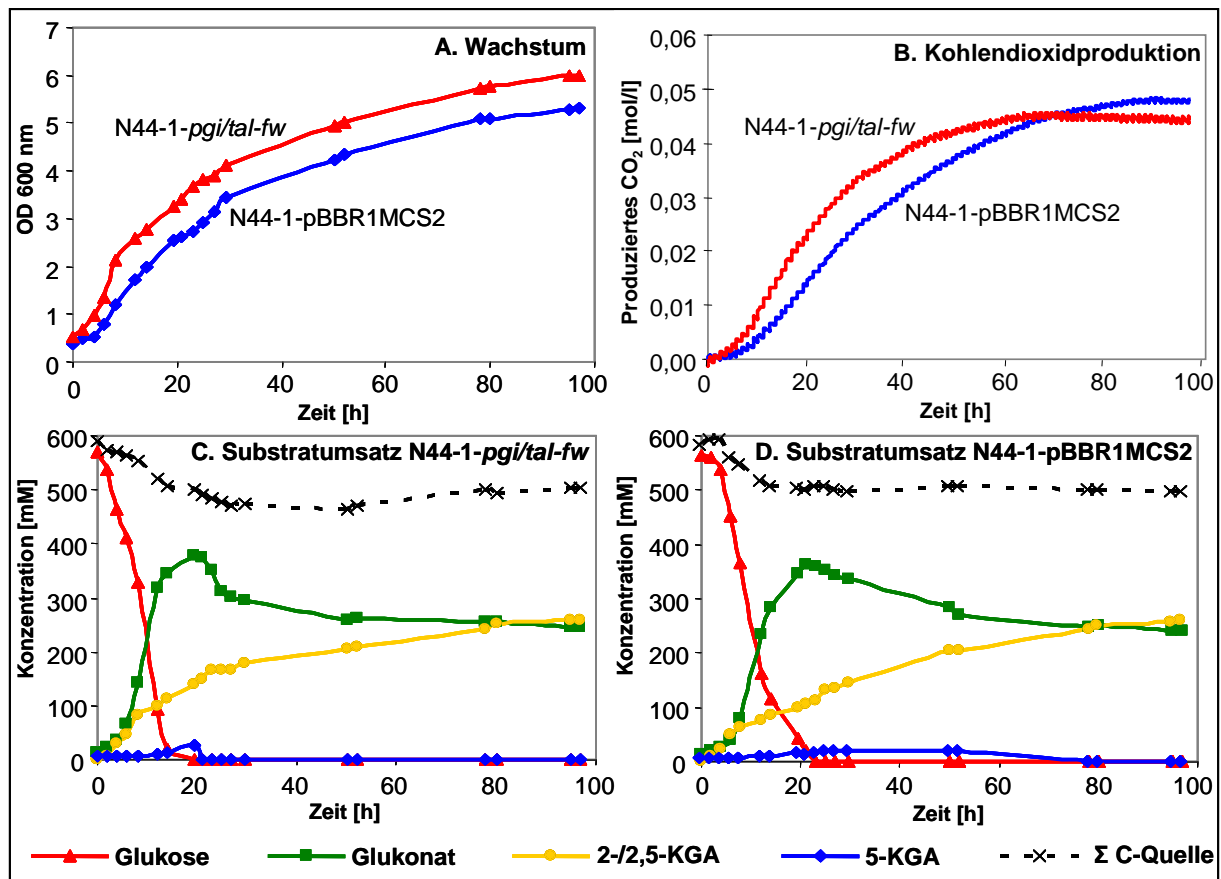


Abb. 25: Wachstum (A), CO₂-Produktion (B) und Substratumsatz (C und D) von *G. oxydans* N44-1-pgi/tal-fw und N44-1-pBBR1MCS2 bei Kultivierung in S/S-Medium mit 100 g/l Glukose in der „Fedbatch-Pro“-Fermentationsanlage.

V. Diskussion

Die Vitamin C-Vorstufe 2-KGLA kann mit *G. oxydans* durch Sorbitoloxidation über die Intermediate Sorbose und Sorboson synthetisiert werden (Abb. 26; Hoshino *et al.*, 1990; Shinjoh *et al.*, 1995). Da es bislang keinen *G. oxydans*-Stamm mit ausreichenden Aktivitäten aller dafür benötigten Enzyme gibt, wurde in den letzten Jahrzehnten versucht, mit Stammgemischen in mehrstufigen Fermentationen 2-KGLA zu produzieren (Sonoyama *et al.*, 1982; Yin *et al.*, 2001) oder die 2-KGLA-Bildung durch Mutagenese von Wildtypen zu erhöhen (Sugisawa *et al.*, 1990). Ziel dieser Arbeit war die Konstruktion eines mikrobiellen 2-KGLA-Produktionssystems in einer Ein-Stamm- und Ein-Stufen-Biotransformation. Dafür benötigte Stämme sollten nicht durch Mutagenese, sondern definiert konstruiert werden, um die der 2-KGLA-Synthese zugrunde liegenden Mechanismen und Verknüpfungen zum Zentralstoffwechsel aufzuklären.

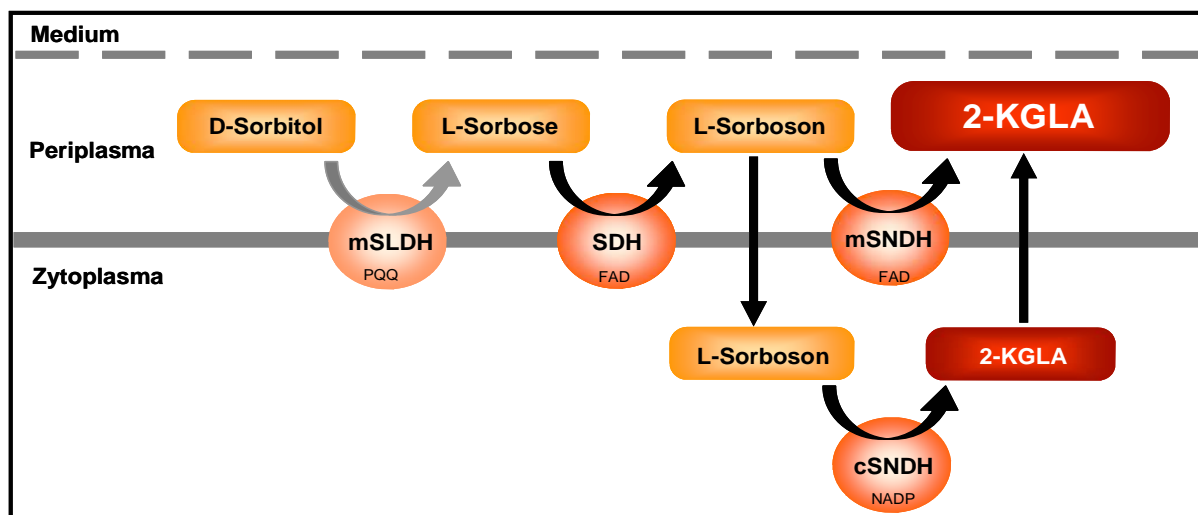


Abb. 26: Essentielle Enzyme für die 2-KGLA-Synthese aus Sorbitol mit *G. oxydans*. Die Sorbitol-DH (SLDH) existiert in *G. oxydans* mit ausreichender Aktivität; die Gene für die membrangebundene Sorbose-DH (SDH), die zytosolische Sorboson-DH (cSNDH) und die membrangebundene Sorboson-DH (mSNDH) wurden überexprimiert.

1. Stammauswahl zur Konstruktion eines mikrobiellen 2-KGLA-Produktionssystems

Um einen geeigneten Stamm zur Konstruktion von rekombinanten 2-KGLA-Produktionsstämmen auszuwählen, wurden verschiedene *G. oxydans*-Wildtypen bezüglich Wachstum und Produktbildung untersucht. Da die SLDH, die den ersten Schritt der 2-KGLA-Synthese katalysiert, auch die Oxidation von Mannitol zu Fruktose, von Glukonat zu 5-Keto-Glukonat und von Glycerin zu Dihydroxyaceton katalysiert (Matsushita *et al.*, 2003; Salusjärvi *et al.*, 2004), wurden neben Sorbitol auch die C-Quellen Mannitol, Glukose und Glycerin verwendet. Dabei stellte sich heraus, dass *G. oxydans* DSM 2343 die eingesetzten Substrate am effektivsten in

die entsprechenden Produkte umsetzt. Trotz der geringsten Biomasseproduktion mit allen getesteten Substraten akkumulierte *G. oxydans* DSM 2343 in Übereinstimmung mit der höchsten mSLDH-Aktivität in der kürzesten Zeit mindestens genau so viel Sorbose, Fruktose und 5-KGA wie die anderen untersuchten Stämme (Bremus *et al.*, 2004; Elfari *et al.* 2005). Die aus der Korrelation von geringster Biomassebildung mit den höchsten SLDH-Umsatzraten resultierenden hohen spezifischen Produktausbeuten sind dabei sehr vorteilhaft für die biotechnische Anwendung, weshalb *G. oxydans* DSM 2343 bereits seit längerem im industriellen Maßstab für die Oxidation von Sorbitol zu Sorbose im so genannten „Reichsteinschritt“ eingesetzt wird (pers. Mitteilung, C. Beck, BASF AG, Ludwigshafen; Boudrant, 1990). Darüber hinaus steht die direkte nicht phosphorylierende Sorbitoloxidation an der Membran und damit die Bildung von 2-KGLA in Konkurrenz zur phosphorylierenden Sorbitoloxidation im Zentralstoffwechsel, bei der Reduktionsäquivalente für die Biomassebildung generiert werden (Shinjoh *et al.*, 1990; Olijve und Kok, 1979a/b). Somit sollte der Stamm *G. oxydans* DSM 2343, der wenig Biomasse produziert und Sorbitol an der Membran schnell und vollständig zu Sorbose umsetzt ($Y_{\text{Sorbose/Sorbitol}} = 0,97$), nach SDH- und SNDH-Überproduktion die Bildung von 2-KGLA effizient durchführen können.

2. Konstruktion und Charakterisierung von 2-KGLA-Produktionsstämmen

Zur Konstruktion von definierten 2-KGLA-Produktionsstämmen wurden die SDH- und cSNDH-Gene aus *G. oxydans* DSM 3504 amplifiziert und in *G. oxydans* DSM 2343 eingebracht. Die beiden Gene liegen in allen bislang untersuchten *G. oxydans*-Stämmen zusammen in einem *csndh/sdh*-Gencluster vor (Saito *et al.*, 1997; Capela *et al.*, 2001). Bei der Klonierung stellte sich heraus, dass die von Saito *et al.* (1998) beschriebene putative *sdh*-RBS im 3'-Ende des *csndh*-Gens nicht funktionell ist, sondern eine translationale Kopplung zwischen dem *csndh*- und *sdh*-Gen besteht. Dabei wird die RBS des ersten Gens (*csndh*) für die Translation beider Gene des Genclusters verwendet. Die in Bakterien häufiger beschriebene translationale Kopplung stellt sicher, dass die für einen Syntheseweg benötigten Gene im richtigen Verhältnis exprimiert werden (Yakhnin *et al.*, 2001; Rex *et al.*, 1994). Sie weist darüber hinaus darauf hin, dass SNDH und SDH möglicherweise durch die Zytoplasmamembran hindurch miteinander assoziieren, da eine translationale Kopplung häufig bei Genpaaren auftritt, deren Proteine in einem Multienzymkomplex vorliegen (Saito *et al.*, 1987, 1997, 1998; Yanofsky *et al.*, 1981). So wird z. B. in *G. oxydans* DSM 4025 das *sndh*- und *sdh*-Gen zusammen als ein membrangebundener, bifunktionaler Proteinkomplex mit zwei getrennten

funktionellen Untereinheiten exprimiert (Asakura und Hoshino, 1999); eventuell ist das *csndh/sdh*-Gencluster aus *G. oxydans* DSM 3504, bei dem zwei unabhängige Enzyme entstehen, aus einem cSNDH/SDH-Fusionsprotein hervorgegangen, wobei die translationale Entkopplung noch nicht vollständig stattgefunden hat und bislang nur eine RBS für beide Gene am Anfang des Clusters existiert.

Neben der heterologen *csndh/sdh*-Überexpression in *G. oxydans* DSM 2343 wurde auch die Verwendung von *G. oxydans* IFO 3293 als Expressionsstamm sowie die homologe Überexpression im Gen-Donor *G. oxydans* DSM 3504 untersucht. Die homologe *csndh/sdh*-Überexpression war jedoch nur bedingt möglich, da die entsprechenden Stämme instabil waren, was vermutlich auf die zahlreichen im *G. oxydans*-Genom nachgewiesenen Transposasen und Insertionselemente (Prust *et al.*, 2005) und auf Rekombinationsereignisse zwischen den plasmidkodierten und genomischen Genabschnitten (Kondo und Horinouchi, 1997) zurück zu führen war. Zur Ergänzung des „L-Sorboson-Pathways“ (Hoshino *et al.*, 1990) wurde darüber hinaus das Gen für die mSNDH aus *A. liquefaciens* DSM 5603 amplifiziert und in den verschiedenen *G. oxydans*-Stämmen funktional überexprimiert. Nachdem die Gene für SDH, cSNDH und mSNDH, einzeln und in entsprechenden Kombinationen, in die *G. oxydans*-Stämme eingebracht worden waren, wurde deren Expression auf der Ebene von Transkription (Northern Blot-Analysen), Translation (SDS-PAGE/ MALDI-TOF-Analysen) und Enzymaktivität detailliert untersucht. Für die Aufklärung der bei der 2-KGLA-Synthese zugrunde liegenden Mechanismen und von Zusammenhängen zwischen 2-KGLA-Synthese und Zentralstoffwechsel standen mit den rekombinanten Stammkonstrukten somit erstmals Stämme zur Verfügung, deren Genexpression und Genotyp definiert war. Im Gegensatz dazu erfolgte die Konstruktion des durch Mutagenese entstandenen 2-KGLA-Produktionsstamms *G. oxydans* N44-1 ungerichtet, so dass die molekularen Gründe für die Steigerung der 2-KGLA-Produktion nicht bekannt sind (Sugisawa *et al.*, 1990; Hoshino *et al.*, 1990). Für die beiden einzigen in der Literatur beschriebenen Arbeiten, bei denen ebenfalls definiert und zielgerichtet *G. oxydans*-Stämme für die 2-KGLA-Produktion in einem Ein-Stammverfahren konstruiert worden sind, stehen keine vergleichbaren Expressionsdaten zur Verfügung. Die Enzymaktivitäten - falls angegeben – wurden nur in „U/ ml Zellrohextrakt“ ohne Angabe der Proteinkonzentration veröffentlicht (Saito *et al.*, 1997, 1998; Shinjoh *et al.*, 1995).

3. Sorbitol-Ganzzellbiotransformation/ 2-KGLA-Produktion

Durch *csndh/sdh*-Überexpression in *G. oxydans* DSM 2343 konnten bis zu 15 g/l 2-KGLA aus 100 g/l Sorbitol produziert werden; der Rest des eingesetzten Sorbitols akkumulierte größtenteils in Form von Sorbose. Saito *et al.* (1997, 1998) beschrieben mit ihren rekombinanten Stämmen hingegen 2-KGLA-Ausbeuten von 130 g/l aus 150 g/l Sorbitol. Diese Diskrepanz ist durch die Verwendung eines anderen Vektors, eines andern Donors für das *csndh/sdh*-Cluster und die Expression in einem anderen *G. oxydans*-Stamm, der als Wildtyp schon 2-KGLA produziert, zu erklären. Auch die 2-KGLA-Ausbeuten der aus *G. oxydans* IFO 3293 durch Mutagenese hervorgegangenen 2-KGLA-Produktionsstämme, wie z. B. *G. oxydans* N44-1 (Sugisawa *et al.*, 1990), liegen mit 30 - 50 g/l 2-KGLA aus 100 g/l Sorbitol deutlich über den 2-KGLA-Ausbeuten, die mit den in dieser Arbeit konstruierten Stämmen erzielt werden konnten. Gemessen an der mSLDH-Aktivität, mit der 100 g/l Sorbitol innerhalb von 24 h vollständig zu Sorbose oxidiert wurden, und an den SDH- und cSNDH-Aktivitäten von *G. oxydans* N44-1, weisen die in dieser Arbeit konstruierten Stämme jedoch SDH- und cSNDH-Aktivitäten auf, die ausreichen sollten, um deutlich höhere 2-KGLA-Ausbeuten zu erzielen. So konnten Hoshino *et al.* (1990) zeigen, dass korrelierend zu einer Erhöhung der SDH- und cSNDH-Aktivität in der Mutante *G. oxydans* E1 mehr 2-KGLA produziert wird; dabei lagen die in *G. oxydans* E1 gemessenen Aktivitäten deutlich unter den Aktivitäten der in dieser Arbeit konstruierten Stämme. Folglich ist die Sorboseakkumulation nicht durch zu geringe SDH-Aktivitäten zu begründen, sondern muss eine andere Ursache haben.

Im Verlauf von Sorbitol-Biotransformationen mit den konstruierten SDH/cSNDH-Überproduzenten erfolgte neben der Sorboseakkumulation auch stets eine geringe Anhäufung von Sorboson, die auf einen Engpass beim Sorbosontransport in die Zelle hindeutete. Auch in der Literatur wurde im Rahmen der 2-KGLA-Synthese unter Verwendung der zytosolischen SNDH bereits mehrfach die Limitierung der 2-KGLA-Ausbeute durch den Sorbosontransport diskutiert (Sugisawa *et al.*, 1990; Shinjoh *et al.*, 1995; Hoshino *et al.*, 1990). Ein möglicher Grund für die Unterbrechung der Oxidationskette bei Sorbose in den konstruierten *G. oxydans* DSM 2343-Stämmen ist daher eine Feedback-Hemmung der SDH durch sich im Periplasma anhäufendes Sorboson. Da Sorboson ein für die Zelle toxisches Aldehyd ist, stellt eine Feedback-Hemmung der SDH einen sinnvollen Schutzmechanismus dar (Shinjoh *et al.* 1995). Eine ähnliche Hemmung durch Glukonat wurde bereits in *G. oxydans* DSM 2343 bei der zur 2-KGLA-Produktion analogen Umsetzung von Glukose über Glukonat zu 5-Keto-Glukonat beschrieben (Merfort, 2006). Hier konnte die Hemmung durch kontinuierliche Glukosezugabe umgangen und auf diese Weise die 5-KGA-Ausbeute

gesteigert werden. Es ist davon auszugehen, dass durch kontinuierliche Sorbitolzugabe ebenfalls die Sorbosonakkumulation vermieden und die 2-KGLA-Ausbeute verbessert werden kann.

Als möglicher Grund für die höheren 2-KGLA-Ausbeuten von *G. oxydans* N44-1 wurden Hinweise auf einen verstärkten Sorbosontransport gefunden. In *G. oxydans* N44-1 konnte eine deutlich höhere Aktivität der membrangebundenen Laktat-DH (mLDH) nachgewiesen werden als in *G. oxydans* DSM 2343 und in *G. oxydans* IFO 3293, dem Parentalstamm von *G. oxydans* N44-1. Möglicherweise wurde bei den zahlreichen Mutageneseschritten zur Konstruktion von *G. oxydans* N44-1 der Promotor des *ml dh*-Gens verändert oder ein regulatorisches Element hat seine Funktion verloren und die höhere mLDH-Aktivität ist für die Steigerung der 2-KGLA-Ausbeute von *G. oxydans* N44-1 verantwortlich. Dabei könnte die mLDH bei der Atmungskette oder beim Sorbosontransport eine Rolle spielen, da die mLDH in der Literatur als Atmungskettenenzym beschrieben wurde, das am Elektronentransfer beteiligt ist und die Oxidation von Laktat zu Pyruvat an den Membrantransport von Zuckern und Aminosäuren koppelt (Pratt *et al.*, 1979; Barnes und Kaback, 1970, 1971). Somit könnte *G. oxydans* N44-1 aufgrund der erhöhten mLDH-Aktivität mehr Sorboson aktiv in die Zelle transportieren, wodurch die periplasmatische Sorbosonakkumulation verhindert würde und die Umsetzung von Sorboson zu 2-KGLA effektiver stattfinden könnte als in *G. oxydans* IFO 3293 und den konstruierten *G. oxydans* DSM 2343-Stämmen. Das für den mLDH-vermittelten aktiven Sorbosontransport benötigte intrazelluläre Laktat kann durch die Reduktion von Pyruvat zu Laktat mit Hilfe einer zytosolischen LDH (cLDH) bereitgestellt werden, da das Vorhandensein einer cLDH in *G. oxydans* durch Enzymaktivitätsmessung nachgewiesen werden konnte. Durch eine zyklische Oxidation von Laktat und Reduktion von Pyruvat kann somit die Limitierung der 2-KGLA-Ausbeute durch den verbesserten Sorbosontransport behoben werden (Abb. 27).

Neben dem Sorbosontransport kann auch der Folgeschritt, die zytosolische Sorbosonoxidation zu 2-KGLA, aufgrund einer zu langsamen NADP⁺-Kofaktorregeneration der cSNDH einen Engpass darstellen und für die Sorbosonakkumulation verantwortlich sein (Hoshino *et al.*, 1990). In diesem Zusammenhang wurden ebenfalls zyklische Mechanismen aus Oxidation und Reduktion für die NAD(P)⁺-Regeneration beschrieben. So wurden Hinweise darauf erhalten, dass das zytosolische Enzymsystem, bestehend aus Sorbitol-DH (cSLDH), Sorbosereduktase (SR) und Sorbosonreduktase (SNR), bei der NAD(P)⁺-Regeneration eine Rolle spielt (Abb. 27; Hoshino *et al.*, 1990; Shinjoh *et al.*, 1995). Das zytosolische Enzymsystem arbeitet dabei genau gegenläufig zum membrangebundenen Enzymsystem und

reduziert Sorboson wieder zurück zu Sorbitol. Dabei könnte NAD(P)^+ für die von der cSNDH katalysierten Umsetzung von Sorboson zu 2-KGLA entstehen (Hoshino *et al.*, 1990). Auch von der 2-KGLA-Reduktase (2-KR) wurde beschrieben, dass sie möglicherweise durch die zytosolische Reduktion von 2-KGLA zu L-Idonat zur NAD(P)^+ -Regeneration beiträgt (Abb. 27), wobei das entstehende L-Idonat von den *G. oxydans* IFO 3293-Derivaten aus der Zelle transportiert wird und an der Membran von einer membrangebundenen Idonat-DH (IDH) zu 2-KGLA reoxidiert wird (Hoshino *et al.*, 1990; Shinjoh *et al.*, 2002a). Das Fehlen der 2-KR und IDH in *G. oxydans* DSM 2343 (Prust *et al.* 2005) lässt eine zyklische Reduktion von 2-KGLA und Oxidation von L-Idonat zur NAD(P)^+ -Regenerierung, im Gegensatz zu *G. oxydans* N44-1, nicht zu. Darüber hinaus könnten geringere cSLDH-, SR- und SNR-Aktivitäten in *G. oxydans* DSM 2343 der Grund dafür sein, dass in den rekombinanten *G. oxydans* DSM 2343-Derivaten nicht genug NAD(P)^+ zur Verfügung steht, um Sorboson ohne dessen Anhäufung zu 2-KGLA zu oxidieren.

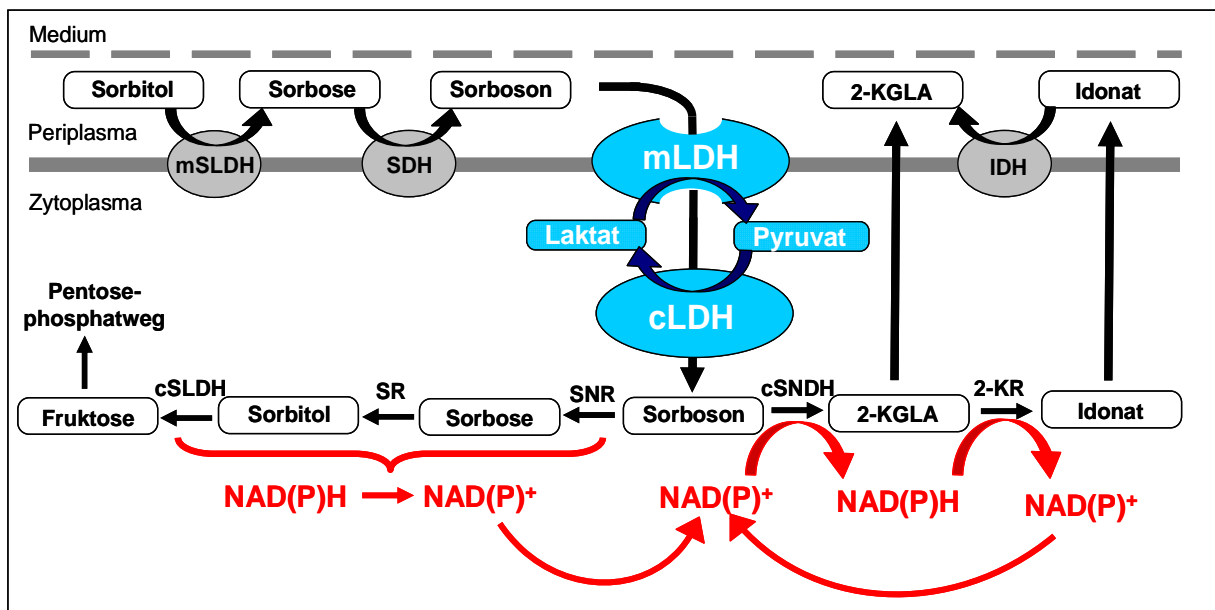


Abb. 27: Modell zum aktiven Sorbosontransport (blau dargestellt) und zur NAD(P)^+ -Kofaktorregeneration für die cSNDH (rot dargestellt) in *G. oxydans* N44-1. Durch eine zyklische Oxidation von Laktat und Reduktion von Pyruvat durch die mLDH und cLDH wird Sorboson aktiv in die Zelle transportiert. Abkürzungen: mSLDH, SDH und cSNDH: siehe Abb. 26; mLDH: membrangebundene Laktat-DH, cLDH: zytosolische Laktat-DH, IDH: Idonat-DH, cSLDH: zytosolische Sorbitol-DH, SR: Sorbos-Reduktase, SNR: Sorboson-Reduktase, 2-KR: 2-KGLA-Reduktase.

Die Limitierung durch den Sorbosontransport sollte durch die Verwendung der mSNDH anstelle der cSNDH umgangen werden. Zu diesem Zweck konnte in *G. oxydans* DSM 2343, DSM 3504 und IFO 3293 die funktionelle Membranintegration der mSNDH aus *A. liquefaciens* erzielt werden. Während bei Verwendung der cSNDH stets Sorboson im Medium akkumulierte, wurde bei Überproduktion der mSNDH das im Periplasma gebildete Sorboson direkt zu 2-KGLA weiteroxidiert,

ohne dass aufgrund eines zu geringen Sorbosontransportes eine Sorbosonakkumulation erfolgte. Neben der Tatsache, dass so alle 2-KGLA-Syntheseschritte periplasmatisch erfolgen konnten, war ein weiterer Vorteil der mSNDH die nicht notwendige NAD(P)⁺-Regenerierung, da dieses Enzym FAD als Kofaktor besitzt und deshalb die Elektronen direkt in den Ubichinonpool der Atmungskette einspeisen kann (Anhang, Abb. 29; Shinjoh *et al.*, 1995). Bei mSNDH/SDH-Überproduktion konnten mit *G. oxydans* IFO 3293 unter fermentativen Bedingungen bis zu 12 g/l 2-KGLA aus 100 g/l Sorbitol produziert werden. Im Gegensatz dazu konnten Shinjoh *et al.* (1995) durch Überproduktion einer mSNDH aus einem anderen *A. liquefaciens*-Donor in *G. oxydans* IFO 3293 die 2-KGLA-Synthese bislang nur mit ruhenden Zellen und nur unter Verwendung von Sorbose und Sorboson als Substrat erzielen; unter fermentativen Bedingungen und bei Verwendung von Sorbitol als C-Quelle fand keine 2-KGLA-Produktion statt (Shinjoh *et al.*, 1995). Dass bei mSNDH-Überproduktion nicht mehr 2-KGLA produziert wurde, lag an der verglichen zur in den rekombinanten Stämmen erzielten cSNDH-Aktivitätssteigerung deutlich geringeren mSNDH-Aktivität. Die auf Transkriptionsebene nachgewiesene starke *msndh*-Expression konnte nicht in gleichem Umfang in eine gesteigerte Enzymaktivität umgesetzt werden, was möglicherweise durch eine unkorrekte Proteinfaltung zu begründen war, da Hinweise auf die Bildung von Einschlusskörpern gefunden wurden.

Eine weitere Ursache für die geringen Funktionalitäten der mSNDH und SDH im Konstrukt pBBR1MCS2-*msndh/sdh-tufB* könnte eine fehlende Interaktion zwischen den beiden Proteinen sein. Das SDH-Gen liegt in allen bisher untersuchten *G. oxydans*-Stämmen zusammen mit dem cSNDH-Gen in einem Gencluster vor und die translationale Kopplung ist aus den in Kap. V/2 genannten Gründen ein starker Hinweis darauf, dass die zytosolische SNDH in räumlicher Nähe zur membrangebundenen SDH lokalisiert sein muss, um mit dieser kooperativ interagieren zu können (Saito *et al.*, 1987, 1997, 1998; Yanofsky *et al.*, 1981). So wiesen Asakura und Hoshino (1999) nach, dass das *sndh*- und *sdh*-Gen in *G. oxydans* DSM 4025 zusammen als ein membrangebundener Proteinkomplex mit zwei getrennten funktionellen Untereinheiten exprimiert wird. Diese Interaktion kann zwischen der mSNDH und der SDH nicht stattfinden, da sie normalerweise nicht in einem Organismus vorkommen. Folglich führte der Austausch des *csndh*-Gens durch das *msndh*-Gen im *csndh/sdh*-Gencluster nur zu geringen 2-KGLA-Ausbeuten.

4. Sorboseassimilation in verschiedenen *G. oxydans*-Stämmen

Um hohe 2-KGLA-Ausbeuten zu erzielen, ist es notwendig, den katabolen Abbauweg von Sorbose als Intermediat der 2-KGLA-Synthese zu kennen. Deshalb wurde die Sorboseassimilation in Stämmen mit besonders hoher (*G. oxydans* N44-1, *G. oxydans* IFO 3293) und besonders niedriger Biomasseproduktion (*G. oxydans* DSM 2343) untersucht. Dabei konnte in Übereinstimmung mit aus der Literatur bekannten Ergebnissen (Kitos *et al.*, 1958; Fluckinger und Ettliger, 1977; De Ley und Swings, 1984; Shinjoh *et al.*, 1990, 2002a) der PPW als der hauptsächlich für den Sorbosekatabolismus verantwortliche Stoffwechselweg identifiziert werden, da korrelierend zum Sorboseabbau von *G. oxydans* N44-1 bis zu 60 % Sorbose zu CO₂ umgesetzt wurde. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass *G. oxydans* bei Wachstum auf Komplexmedium Sorbitol bzw. Sorbose nur in sehr geringem Umfang als Biomassebaustein verwendet. Stattdessen wird Sorbitol zur periplasmatischen Energiegewinnung bei der Oxidation von Sorbitol zu Sorbose und zur Bereitstellung von Reduktions-Äquivalenten aus der darauf folgenden Sorboseassimilation im PPW genutzt. Dieses Ergebnis wird dadurch belegt, dass Shinjoh *et al.* (1990) bei Flussanalysen mit radioaktiv markierter Sorbose nur 1 % der Radioaktivität des eingesetzten Sorboseisotops in der Zellmasse wieder fanden, während etwa 40 % der umgesetzten Sorbose in Form von ¹⁴CO₂ detektiert werden konnten. Dass *G. oxydans* Sorbitol nicht als Biomassebaustein verwendet, erklärt, warum bislang kein synthetisches Medium beschrieben wurde, auf dem eine signifikante Biomasseproduktion erfolgt.

Die Gründe für den unterschiedlichen Sorbosefluss durch den PPW konnten auf die Enzyme Fruktokinase, Fruktose-1,6-Bisphosphatase, Phosphoglucoseisomerase (PGI) und vor allem Transaldolase (TAL) eingegrenzt werden, deren Aktivitäten mit der Biomasseproduktion, CO₂-Bildung und Sorboseassimilation korrelierten. Speziell für das bifunktionale PGI/TAL-Protein konnte durch Überproduktion nachgewiesen werden, dass die Höhe der Enzymaktivität von PGI und/oder TAL maßgeblich für die Sorboseverstoffwechslung im PPW und, aufgrund der daran gekoppelten Entstehung von Reduktionsäquivalenten für reduktive Biosynthesen (Sugiyama *et al.*, 2003), auch für die Biomasseproduktion verantwortlich ist (Bremus *et al.*, 2006a, 2006b). Die im Vergleich zu besser wachsenden Stämmen viel geringeren PGI/TAL-Aktivitäten von *G. oxydans* DSM 2343 sind somit der Hauptgrund dafür, dass von *G. oxydans* DSM 2343 nur ein sehr geringer Teil (6 %) der Sorbose zu CO₂ metabolisiert wurde. Der geringe Sorboseverlust aufgrund der niedrigen PGI/TAL-Aktivität ist vermutlich ebenfalls ein Grund dafür, warum *G. oxydans* DSM 2343 in der Industrie für die Oxidation von Sorbitol zu Sorbose, den so genannten „Reichsteinschritt“, eingesetzt wird (Boudrant, 1990).

Die aus der Untersuchung der Sorboseassimilation gewonnenen Erkenntnisse zeigen weitere Möglichkeiten auf, durch gezielte Veränderung des Sorbose-metabolismus die 2-KGLA-Ausbeuten zu steigern. Bereits Shinjoh *et al.* (1990) postulierten eine Steigerung der 2-KGLA-Ausbeute durch Verringerung der CO₂-Produktion. Dabei ist die Verstärkung der SDH- und SNDH-Aktivität ein möglicher Ansatz, damit Sorbitol ohne Sorbose- und Sorbosonakkumulation zu 2-KGLA umgesetzt werden kann, bevor Sorbose bzw. Sorboson ins Zellinnere gelangen und dort deren Verstoffwechslung zu CO₂ erfolgt. Sorbitol wird von *G. oxydans* nicht ins Zellinnere geschleust und einmal zu 2-KGLA umgesetztes Substrat kann nicht mehr verstoffwechselt werden (Shinjoh *et al.*, 1990, 1995). Der umgekehrte Weg ist die Herabsetzung des Sorbose- bzw. Sorbosonflusses in den PPW, damit mehr Sorbose für die 2-KGLA-Synthese zur Verfügung steht. Dafür konnten mit dem Nachweis des Einflusses der PGI/TAL-Aktivität auf die PPW-Stoffwechsellistung wichtige Hinweise auf einen möglichen Ansatzpunkt geliefert werden, da durch PGI/TAL-Überproduktion mehr CO₂ und weniger 2-KGLA produziert wurde. In diesem Zusammenhang beschrieben Sugisawa *et al.* (1990), dass mit *G. oxydans* N44-1 keine weitere Steigerung der 2-KGLA-Ausbeute möglich ist, da der Sorboseanteil, der nicht zu 2-KGLA umgesetzt wird, bei der CO₂- und Biomassebildung verloren geht. Eine Verringerung der PGI/TAL-Aktivität in *G. oxydans* N44-1 sollte zu mehr 2-KGLA und weniger Biomasse bzw. CO₂ führen. Die in dieser Arbeit erzielte 40 %ige Abschwächung der PGI/TAL-Aktivität durch Einbringen eines „Antisense“-Plasmidkonstruktes reichte dafür jedoch nicht aus. Möglicherweise kann durch einen Aminosäureaustausch im reaktiven Zentrum des Enzyms die PGI/TAL-Aktivität soweit gesenkt werden, dass höhere 2-KGLA-Ausbeuten erzielt werden können.

Weitere Untersuchungen zum bifunktionalen PGI/TAL-Enzym müssen zeigen, ob sich der steigernde Einfluss auf die 2-KGLA-Bildung und die Biomasseproduktion auf eine der beiden Enzymaktivitäten eingrenzen lässt oder ob sie nur in Kombination für die beschriebenen Effekte verantwortlich sind. Des Weiteren muss geklärt werden, ob die Effekte ausschließlich auf einen erhöhten Kohlenstofffluss durch den PPW oder zusätzlich auf ein dadurch verändertes Redoxpotential zurückzuführen sind. Sugiyama *et al.* (2003) erzielten durch Zugabe der gereinigten PGI/TAL zu einem zellfreien *G. oxydans*-System auch eine deutlich gesteigerte Bereitstellung von NADPH aus dem PPW. Darüber hinaus wurden in dieser Arbeit neben der PGI/TAL noch die Fruktokinase und Fruktose-1,6-Bisphosphatase als Enzyme identifiziert, die einen zusätzlichen Einfluss auf die Höhe der CO₂- und Biomassebildung haben könnten. Analog zu den PGI/TAL-Untersuchungen durchgeführte Experimente könnten deren Rolle aufklären und sie zu anderen möglichen Ansatzpunkten zur

Verringerung des Kohlenstoffflusses durch den PPW machen. Außerdem lassen sich in diesem Zusammenhang möglicherweise noch weitere interessante Enzyme finden, da ein Großteil der PPW-Gene zusammen in einem Gencluster vorliegt (Prust *et al.*, 2005), so dass die erhöhte *pgi/tal*-Expression in den besser wachsenden *G. oxydans*-Stämmen auf eine Heraufregulation des gesamten PPW-Genclusters hindeuten könnte. Erste Hinweise für eine gemeinsame Regulation der PPW-Gene wurden in dieser Arbeit durch DNA-Microarray-Analysen gefunden.

Als weiteres für die Sorboseassimilation im PPW verantwortliches Enzym wurde die NADPH-abhängige Sorbosereduktase (Abb. 27) beschrieben (Adachi *et al.*, 1999a; Sugisawa *et al.*, 1991b). Shinjoh *et al.* (2002a) konnten bereits nachweisen, dass nach deren Disruption kein intrazellulärer Sorboseabbau mehr erfolgt. Möglicherweise kann so ebenfalls eine Steigerung der 2-KGLA-Ausbeute erzielt werden. Auch die SNR (Hoshino *et al.*, 1990) und die cSLDH (Shibata *et al.*, 2000b) stellen in diesem Zusammenhang Ansatzpunkte für eine Verbesserung der 2-KGLA-Ausbeute dar (Anhang, Abb. 36). Da das reduktive Enzymsystem im Zytosol, wie oben beschrieben, jedoch für die NAD(P)⁺-Kofaktorregenerierung der cSNDH verantwortlich sein könnte (Abb. 27; Hoshino *et al.*, 1990), sollte in diesem Fall aber der 2-KGLA-Syntheseweg über die mSNDH genutzt werden. Darüber hinaus stellt die mSNDH vor dem hier diskutierten Hintergrund grundsätzlich die bessere Alternative dar, weil bei aufeinander abgestimmten SDH- und mSNDH-Aktivitäten verhindert wird, dass Intermediate der 2-KGLA-Synthese ins Zellinnere gelangen, wo sie verstoffwechselt werden können.

5. Vorteile von *G. oxydans* DSM 2343 gegenüber dem Industriestamm *G. oxydans* N44-1

Mit *G. oxydans* N44-1 kann 2-KGLA in industriell rentablem Umfang hergestellt werden und die 2-KGLA-Ausbeuten übertreffen die in dieser Arbeit mit rekombinanten *G. oxydans* DSM 2343-Derivaten erzielten 2-KGLA-Ausbeuten deutlich. Es wurden jedoch verschiedene Hinweise darauf erhalten, dass sich *G. oxydans* DSM 2343 grundsätzlich besser zur 2-KGLA-Produktion eignet und durch wenige gezielte Veränderungen des 2-KGLA-Metabolismus deutlich höhere 2-KGLA-Ausbeuten als mit *G. oxydans* N44-1 erreicht werden können. Zum Beispiel war mit *G. oxydans* DSM 2343 erstmalig eine 2-KGLA-Produktion bei mSNDH-Überproduktion auch unter fermentativen Bedingungen und ausgehend von Sorbitol möglich. Ein weiterer Vorteil von *G. oxydans* DSM 2343 ist, dass mit diesem Stamm theoretisch eine 2-KGLA-Ausbeute von 90 % erreicht werden kann, da nur 10 % des Sorbitols für die Biomasse- bzw. CO₂-Produktion verwendet werden. Im Gegensatz

dazu ist die 2-KGLA-Ausbeute in *G. oxydans* N44-1 dadurch begrenzt, dass bis zu 60 % des eingesetzten Sorbitols zur Erzeugung von Energie und Reduktionsäquivalenten für den Biomasseaufbau assimiliert werden (Abb. 19; Sugisawa *et al.*, 1990; Shinjoh *et al.*, 1990). Die verglichen zu *G. oxydans* N44-1 deutlich niedrigere Biomasseproduktion von *G. oxydans* DSM 2343 ist ebenfalls vorteilhaft für die biotechnische Anwendung (Schmid, 2002) und führte trotz geringerer 2-KGLA-Produktion zu vergleichbaren spezifischen 2-KGLA-Ausbeuten von 7 g 2-KGLA/g BTM mit *G. oxydans* DSM 2343-*csndh/sdh-tufB*. Dabei waren in dem rekombinanten *G. oxydans* DSM 2343-Stamm deutlich höhere Aktivitäten der an der 2-KGLA-Synthese beteiligten Enzyme (SLDH, SDH und SNDH) nachweisbar als in *G. oxydans* N44-1. In Korrelation dazu wiesen die rekombinanten *G. oxydans* DSM 2343-Stämme höhere Sorbose- und 2-KGLA-Bildungsraten auf als *G. oxydans* N44-1. Anhand der vollständigen Genomsequenz von *G. oxydans* DSM 2343 (Prust *et al.*, 2005) kann außerdem das Vorhandensein einer 2-KGLA-Reduktase ausgeschlossen werden, wodurch im Gegensatz zu den bisher beschriebenen 2-KGLA-Produktionsstämmen *G. oxydans* G624, IFO 3293 und N44-1 (Saito *et al.*, 1997, 1998; Sugisawa *et al.*, 1990) keine Reduktion der 2-KGLA-Ausbeute durch Bildung von L-Idonat erfolgt. Darüber hinaus stehen, im Gegensatz zu dem durch Mutagenese entstandenen *G. oxydans* N44-1, mit den rekombinanten *G. oxydans* DSM 2343-Derivaten definierte und bezüglich des Sorbosemetabolismus und aller an der 2-KGLA-Synthese beteiligten Enzymaktivitäten detailliert charakterisierte Stämme zur Verfügung, um die 2-KGLA-Produktion weiter zu verbessern.

VI. Zusammenfassung

Die mikrobielle Synthese der Vitamin C-Vorstufe 2-Keto-L-Gulonsäure (2-KGLA) kann mit *G. oxydans* durch Sorbitoloxidation über die Intermediate Sorbose und Sorboson erfolgen. Diese Reaktionen werden von einer membranassoziierten Sorbitol-DH (SLDH), einer membranassoziierten Sorbose-DH (SDH) und einer zytosolischen Sorboson-DH (cSNDH) katalysiert. Ziel dieser Arbeit war die Konstruktion und Charakterisierung von rekombinanten *G. oxydans*-Stämmen, die mit so hohen für die 2-KGLA-Synthese notwendigen Enzymaktivitäten ausgestattet sind, um Sorbitol effizient zu 2-KGLA zu oxidieren.

Zur Konstruktion der rekombinanten 2-KGLA-Produktionsstämme wurde *G. oxydans* DSM 2343 ausgewählt, da dieser Stamm bei geringer Biomasseproduktion die Oxidation von Sorbitol zu Sorbose vollständig und mit einer sehr hohen Produktbildungsrate durchführte. Für die weitere Umsetzung von Sorbose zu 2-KGLA wurde in *G. oxydans* DSM 2343 neben den Genen für die SDH und die zytosolische cSNDH auch das Gen einer membran gebundenen SNDH (mSNDH) aus *A. liquefaciens* funktionell überexprimiert, so dass die 2-KGLA-Synthese vollständig im Periplasma stattfinden konnte. Nachdem die Expression der heterologen Gene auf Transkriptions-, Translations- und Enzymaktivitätsebene überprüft wurde, standen definierte Stämme zur Verfügung, in denen alle zur 2-KGLA-Synthese benötigten Enzyme mit ausreichender Aktivität vorhanden waren. Die SDH/cSNDH-Überproduzenten setzen 100 g/l Sorbitol mit einer spezifischen 2-KGLA-Ausbeute von 7 g 2-KGLA/g Zell-Trockenmasse zu 15 g/l 2-KGLA um. Auch mit den SDH/mSNDH-Überproduzenten konnten bis zu 12 g/l 2-KGLA aus 100 g/l Sorbitol produziert werden.

Um die 2-KGLA-Ausbeuten zu steigern, wurde untersucht über welchen Stoffwechselweg Sorbose in *G. oxydans* abgebaut wird. Dabei konnte der Pentosephosphatweg (PPW) als Hauptstoffwechselweg identifiziert werden. Korrelierend zur Sorboseverwertung und Biomassebildung wurden in einigen *G. oxydans*-Stämmen bis zu 60 % der Sorbose im PPW zu CO₂ umgesetzt. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass die Aktivitäten von Transaldolase und Phosphoglukoseisomerase für die PPW-Stoffwechsellistung und damit für die Höhe der CO₂- und Biomasseproduktion verantwortlich sind. Da in *G. oxydans* DSM 2343 beide Aktivitäten sehr gering waren, wurden bei der Sorbitol-Biotransformation korrelierend zu der geringen Biomasseproduktion nur 10 % des Substrats zu CO₂ umgesetzt. Folglich stehen in *G. oxydans* DSM 2343 etwa 90 % des Substrats für die 2-KGLA-Bildung zur Verfügung, während die 2-KGLA-Ausbeute mit anderen untersuchten Stämmen dadurch begrenzt ist, dass ein Großteil des Substrats im PPW zur Energieerzeugung für den Biomasseaufbau assimiliert wird. Mit den konstruierten *G. oxydans* DSM 2343-Stämmen stehen somit bezüglich des Sorbosemetabolismus und aller an der 2-KGLA-Synthese beteiligten Enzyme detailliert charakterisierte Stämme zur Verfügung, um die 2-KGLA-Produktion durch gezielte Modifikationen im Sorbosestoffwechsel weiter zu verbessern.

VII. 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 melanogenus* IFO 3294. *Biosci Biotechnol Biochem* **63**: 2137-43.
- Adachi, O., Toyama, H., Matsushita, K. (1999b).** Crystalline NADP-dependent D-mannitol dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*. *Biosci Biotech Biochem* **63**: 402-7.
- Aiguo, J., Peiji, G. (1998).** Synthesis of 2-keto-L-gulonic acid from gluconic acid by co-immobilized *Gluconobacter oxydans* and *Corynebacterium* sp. *Biotechnol Lett* **20**: 939-42.
- Ameyama, M. (1982).** 2-Keto-D-gluconate reductase from acetic acid bacteria. *Methods Enzymol* **89**: 203-9.
- Ameyama, M., Shinagawa, E., Matsushita, K., Adachi, O. (1981).** D-Glucose dehydrogenase of *Gluconobacter suboxydans*: Solubilization, purification and characterization. *Agric Biol Chem* **45**: 851-61.
- Ameyama, M., Shinagawa, E., Matsushita, K., Adachi, O. (1985).** Solubilization, purification and properties of membrane-bound glycerol dehydrogenase from *Gluconobacter industrius*. *Agric Biol Chem* **49**: 1001-10.
- An, G., Friesen, J. D. (1980).** The nucleotide sequence of *tufB* and four nearby tRNA structural genes of *Escherichia coli*. *Gene* **12**: 33-9.
- Anderson, S., Marks, C. B., Lazarus, R., Miller, J., Stafford, K., Seymour, J., Light, D., Rastetter, W., Estell, D. (1985).** Production of 2-keto-L-gulonate, an intermediate in L-ascorbate synthesis, by a genetically modified *Erwinia herbicola*. *Science* **230**: 144-9.
- Ansorge, W., Sproat, B., Stegemann, J., Schwager, C., Zenke, M. (1987).** Automated DNA sequencing: ultrasensitive detection of fluorescent bands during electrophoresis. *Nucl Acid Res.* **15**: 4593-602.
- Asai, T. (1968).** Acetic acid bacteria. Classification and biochemical activities. University of Tokyo Press. ISBN: 68-24816.
- Asakura, A., Hoshino, T. (1999).** Isolation and characterization of a new quinoprotein dehydrogenase, L-Sorbose/L-Sorbose dehydrogenase. *Biosci Biotechnol Biochem* **63**: 46-53.
- Barnes, E. M., Kaback, H. R. (1970).** β -Galactoside transport in bacterial membrane preparations: energy coupling via membrane-bound D-Lactic Dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci* **66**: 1190-8.
- Barnes, E. M., Kaback, H. R. (1971).** Mechanisms of active transport in isolated membrane vesicles. *J Biol Chem* **246**: 5518-22.
- Batthey, A. S., Schaffner, D. W. (2001).** Modelling bacterial spoilage in cold-filled ready to drink beverages by *Acinetobacter calcoaceticus* and *Gluconobacter oxydans*. *J Appl Microbiol* **91**: 237-47.
- Bauer, R., Katsikis, N., Varga, S., Hekmat, D. (2005).** Study of the inhibitory effect of the product dihydroxyacetone on *Gluconobacter oxydans* in a semi-continuous two-stage repeated-fed-batch process. *Bioprocess Biosyst Eng* **28**: 37-43.
- Bauernfeind, J. C., Pinkert, D. M. (1970).** Food processing with added ascorbic acid. *Adv Food Res* **18**: 219-315.
- Berry, A., Lee, C., Mayer, A. F., Shinjoh, M. (2005).** Microbial production of L-ascorbic acid. World Intellectual Property Organisation Patent WO 2005/017172.

- Beschkov, V., Velizarov, S., Peeva, L. (1995).** Some kinetic aspects and modelling of biotransformation of D-glucose to keto-D-gluconates. *Bioprocess Eng* **13**: 301-5.
- Birnboim, H. C., Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Acid Res* **7**: 1513-23.
- Boudrant, J. (1990).** Microbial processes for ascorbic acid biosynthesis: a review. *Enzyme Microb Technol* **12**: 322-9.
- Boyer, H. W., Roulland-Dussoix, D. (1969).** A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **41**: 459-72.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-54.
- Bremus, C., Bringer-Meyer, S., Herrmann, U., Mouncey, N., Sahm, H. (2006a).** Novel biological process. Europäische Patentanmeldung, EP 06013092.9, PT 0.2522.
- Bremus, C., Bringer-Meyer, S., Herrmann, U., Mouncey, N., Sahm, H. (2006b).** Novel biological process. Europäische Patentanmeldung, EP 06013091.1, PT 0.2522.
- Bremus, C., Herrmann, U., Bringer-Meyer, S., Sahm, H. (2006).** The use of microorganisms in L-ascorbic acid production. *J Biotechnol.* **124**: 196-205.
- 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.
- Bringer-Meyer, S., Schimz, K.-L., Sahm, H. (1986).** Pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. Isolation and partial characterization. *Arch Microbiol* **146**: 105-10.
- Bringer-Meyer, S., Scollar, M., Sahm, H. (1985).** *Zymomonas mobilis* mutants blocked in fructose utilization. *Appl Microbiol Biotechnol* **23**: 134-9.
- Buchert, J., Viikari, L. (1988).** Oxidative D-xylose metabolism of *Gluconobacter oxydans*. *Appl Microbiol Biol* **29**: 375-9.
- Capela, D., Barloy-Hubler, F., Gouzy, J., Bothe, G., Ampe, F., et al. (2001).** Analysis of the chromosome sequence of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti* strain 1021. *Proc Natl Acad Sci* **98**: 9877-82.
- Chan, A. C. (1993).** Partners in defense, vitamin E and vitamin C. *Can J Physiol Pharmacol* **71**: 725-31.
- Chatterjee, I. B. (1973).** Evolution and the biosynthesis of ascorbic acid. *Science* **182**: 1271-2.
- Chauhan, A. S., Ramteke, R. S., Eipeson, W. E. (1998).** Properties of ascorbic acid and its applications in food processing: a critical appraisal. *J Food Sci Technol* **35**: 381-92.
- Chen, Q., Espey, M. G., Krishna, M. C., Mitchell, J. B., Corpe, C. P., Buettner, G. R., Shacter, E., Levine, M. (2005).** Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: Action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues. *Proc Natl Acad Sci* **102**: 13604-9.
- Cho, N. C., Kim, K., Jhon, D. Y. (1990).** Purification and characterization of polyol dehydrogenase from *Gluconobacter melanogenus*. *Han'guk Saenghwa Hakhaochi* **23**: 172-8.
- Choi, E. S., Lee, E.-H., Rhee, S. K. (1995).** Purification of a membrane-bound sorbitol dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*. *FEMS Microbiol Let* **125**: 45-50.
- Chotani, G., Dodge, T., Hsu, A., Kumar, M., LaDuca, R., Trimbur, D., Weyler, W., Sanford, K. (2000).** The commercial production of chemicals using pathway engineering. *Biochem Biophys Acta* **1543**: 434-55.

- Claret, C., Salmon, J. M., Romieu, C., Bories, A. (1994).** Physiology of *Gluconobacter oxydans* during dihydroxyacetone production from glycerol. *Appl Microbiol Biotechnol* **41**: 359-65.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., Hsu, L. (1972).** Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci* **69**: 2110-4.
- Condon, C., FitzGerald, R. J., O'Gara, F. (1991).** Conjugation and heterologous gene expression in *Gluconobacter oxydans* ssp. *suboxydans*. *FEMS Microbiol Let* **80**: 173-8.
- Connell, T. D., Martone, A. J., Holmes, R. K. (1995).** A new mobilizable cosmid vector for use in *Vibrio cholerae* and other Gram⁻ bacteria. *Gene* **153**: 85-7.
- Counts, D. F., Cardinale, G. J., Udenfriend, S. (1978).** Prolyl hydroxylase half reaction: Peptidyl prolyl-independent decarboxylation of α -ketoglutarate. *Proc Nat Acad Sci USA* **75**: 2145-9.
- Davies, E., Hodge, R., Isaac, P. G. (1996).** Hybridization and detection of digoxigenin probes on RNA blots. *Mol Biotechnol* **6**: 75-7.
- De Ley, J., Gillis, M., Swings, J. (1984).** Genus *Gluconobacter*. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 1. Hrsg.: Krieg, N. R., Holt, J. G.. Williams and Wilkins, Baltimore: 267-78.
- De Ley, J., Swings, J. (1981).** The genera *Gluconobacter* and *Acetobacter*. In: *The Prokaryotes. A handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria*. Hrsg.: Starr, M. P., Stolp, H., Tröper, H. G., Balows, A., Schlegel, H. G.. Springer Verlag, Berlin: 771-8.
- De Lorenzo, V., Eltis, L., Kessler, B., Timmis, K. N. (1993).** Analysis of *Pseudomonas* gene products using *lacIq/P_{trp}-lac* plasmids and transposons that confer conditional phenotypes. *Gene* **123**: 17-24.
- De Tullio, M. C., Arrigoni, O. (2004).** Hopes, disillusion and more hopes from vitamin C. *Cell Mol Life Sci* **61**: 209-19.
- Delic, V., Sunic, D., Vlastic, D. (1989).** Microbial reactions for the synthesis of vitamin C (L-ascorbic acid). In: *Biotechnology of vitamins, pigments and growth factors*. Hrsg.: Vandamme, E. J.. London: Elsevier. 229-334.
- Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D., Helinski, D. R. (1980).** Broad host range DNA cloning system for Gram-negative bacteria: Construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci* **77**: 7347-51.
- Dym, O., Pratt, E. A., Ho, C., Eisenberg, D. (2000).** The crystal structure of D-lactate dehydrogenase, a peripheral membrane respiratory enzyme. *Proc Natl Acad Sci* **97**: 9413-18.
- Elfari, M., Ha, S.-W., Bremus, C., Merfort, M., Khodaverdi, V., Herrmann, U., Sahn, H., Görisch, H. (2005).** A *Gluconobacter oxydans* mutant converting glucose almost quantitatively to 5-keto-D-gluconic acid. *Appl Microbiol Biotechnol* **66**: 668-74.
- Elias, M. D., 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**: 48356-61.
- Eymann, C., Dreisbach, A., Albrecht, D., Bernhardt, J., Becher, et al. (2004).** A comprehensive proteome map of growing *Bacillus subtilis* cells. *Proteomics* **4**: 2849-76.
- Feng, S., Zhang, Z., Zhang, C., Zhang, Z. (2000).** Effect of *Bacillus megaterium* on *Gluconobacter oxydans* in mixed culture. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao* **11**: 119-22.
- Figurski, D. H., Helinski, D. R. (1979).** Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in *trans*. *Proc Natl Acad Sci* **76**: 1648-52.
- Fischer-Fantuzzi, L., Di Girolamo, M. (1961).** Triparental matings in *Escherichia coli*. *Genetics* **46**: 1305-15.

- Florent, J. (1986).** Vitamins. In: Biotechnology: A comprehensive treatise. Hrsg.: Rehm, H. J., Reed. G.. Weinheim; Deerfield Beach, FL-VCH vol. 4, ISBN: 3-527-25764-0.
- Fluckiger, J., Ettlinger, L. (1977).** Glucose metabolism in *Acetobacter aceti*. Arch Microbiol **114**: 183-7.
- Fountoulakis, M., Langen, H. (1997).** Identification of proteins by matrix-assisted laser desorption ionization-mass spectrometry following in-gel digestion in low-salt, nonvolatile buffer and simplified peptide recovery. Anal Biochem **250**: 153-6.
- Fritsche, W. (1999).** Mikrobiologie. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg - Berlin.
- Galibert, F., Finan, T. M., Long, S. R., Pühler, A., Abola, P., et al., (2001).** The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. Science **293**: 668-72.
- Gassen, H. G., Schimpf, G. (1999).** Gentechnische Methoden (2. Auflage). Spektrum Akademischer Verlag Gustav Fischer. 352-56.
- Godjevargova, T., Dayal, R., Turmanova, S. (2004).** Gluconic acid production in bioreactor with immobilized glucose oxidase plus catalase on polymer membrane adjacent to anion-exchange membrane. Macromol Biosci **4**: 950-6.
- Gosselé, F., Swings, J., De Ley, J. (1980).** Growthfactor requirements of *Gluconobacter*. Zbl Bakt Hyg. **1**: 348-50.
- Gray, B. E. (1945a).** Preparation of 2-keto gulonic acid and its salts. US Patent 2.421.611.
- Gray, B. E. (1945b).** Preparation of 2-keto gulonic acid and its salts. US Patent 2.421.612.
- Grindley, J. F., Payton, M. A., van de Pol, H., Hardy, K. G. (1988).** Conversion of glucose to 2-keto-L-gulonate, an intermediate in L-ascorbate synthesis, by a recombinant strain of *Erwinia citreus*. Appl Environ Microbiol **54**: 1770-5.
- Gupta, A., Singh, V. K., Qazi, G. N., Kumar, A. (2001).** *Gluconobacter oxydans*: its biotechnological applications. J Mol Microbiol Biotechnol **3**: 445-56.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J Mol Biol **166**: 557-80.
- Hancock, R. D., Galpin, J. R., Viola, R. (2000).** Biosynthesis of L-ascorbic acid (vitamin C) by *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol Lett **186**: 245-50.
- Hancock, R. D., Viola, R. (2002).** Biotechnological approaches for L-ascorbic acid production. Trends Biotechnol **20**: 299-305.
- Hancock, R. D., Viola, R. (2005).** Improving the nutritional value of crops through enhancement of L-ascorbic acid (vitamin C) content: rationale and biotechnological opportunities. J Agric Food Chem **53**: 5248-57.
- Haworth, W. N., Hirst, E. L. (1933).** Synthesis of ascorbic acid. J Soc Chem Ind **52**: 645-7.
- Herbert, R. W., Hirst, E. L., Percival, E. G. V., Reynolds, R. J. W., Smith, F. (1933).** The constitution of ascorbic acid. J Chem Soc 1270-90.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., Williams, S. T. (1994).** The genus *Acetobacter* and *Gluconobacter*. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams and Wilkins, 9. Auflage, Vol. 1: 268-74.
- Hoshino, T., Sugisawa, T., Fujiwara, A. (1991).** Isolation and characterization of NAD(P)-dependent L-sorbose dehydrogenase from *Gluconobacter melanogenus* UV10. Agric Biol Chem **55**: 665-70.

- 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. *Biochim Biophys Acta*. **1647**: 278-88.
- Hoshino, T., Sugisawa, T., Tazoe, M., Shinjoh, M., Fujiwara, A. (1990).** Metabolic pathway for 2-keto-L-gulonic acid formation in *Gluconobacter melanogenus* IFO 3293. *Agric Biol Chem* **54**: 1211-8.
- Isono, M., Nakanishi, I., Sasajima, K. I., Motizuki, K., Kanzaki, I., Okazaki, H., Yoshino, H. (1968).** 2-keto-L-gulonic acid fermentation. Part I. Paper chromatography characterization of metabolic products from sorbitol and sorbose by various bacteria. *Agric Biol Chem* **32**: 424-31.
- Jacob, R. A., Sotoudeh, G. (2002).** Vitamin C function and status in chronic disease. *Nutr Clin Care* **5**: 66-74.
- 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**: 1635-40.
- Kerstens, K., De Ley, J. (1966).** Polyol dehydrogenases of *Gluconobacter*. *Methods Enz* **9**: 170-9.
- 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**: 1295-8.
- Klasen, R. (1995).** Dissertation: Molekularbiologische Untersuchungen zur 5-Ketogluconatbildung bei *Gluconobacter oxydans*. Berichte des Forschungszentrums Jülich **Jül-Bericht 3001**.
- Klasen, R., Bringer-Meyer, S., Sahm, H. (1992).** Incapability of *Gluconobacter oxydans* to produce tartaric acid. *Biotechnol Bioeng* **40**: 183-6.
- Klasen, R., Bringer-Meyer, S., Sahm, H. (1995).** Biochemical characterization and sequence analysis of the gluconate: NADP 5-oxidoreductase gene from *Gluconobacter oxydans*. *J Bacteriol* **177**: 2637-43.
- Klemm, P., Tong, S., Nielsen, H., Conway, T. (1996).** The *gntP* gene of *Escherichia coli* involved in gluconate uptake. *J Bacteriol* **178**: 61-7.
- Kojo, S. (2004).** Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. *Curr Med Chem* **11**: 1041-64.
- Kondo, K., Horinouchi, S. (1997).** Characterization of an insertion sequence, *IS12528*, from *Gluconobacter suboxydans*. *Appl Environ Microbiol* **63**: 1139-42.
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M., Peterson, K. M. (1995).** Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**: 175-6.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-5.
- Lam, S. T., Lam, B. S., Strobel, G. (1985).** A vehicle for the introduction of transposons into plant-associated *pseudomonads*. *Plasmid* **13**: 200-4.
- Lange, C., Rittmann, D., Wendisch, V. F., Bott, M., Sahm, H. (2003).** Global expression profiling and physiological characterization of *Corynebacterium glutamicum* grown in the presence of L-valin. *Appl Environ Microbiol* **69**: 2521-32.
- Lébecq, C. (Hrsg.). (1978).** Biochemical nomenclature and related documents, International Union for Biochemistry. The biochemical society, London.
- Lee, H. W., Pan, J. G. (1999).** Screening for L-sorbose and L-sorbosone dehydrogenase producing microbes for 2-keto-L-gulonic acid production. *J Ind Microbiol Biotechnol* **23**: 106-11.

- Lindley, M. G. (1998).** The impact of food processing on antioxidants in vegetable oils, fruits and vegetables. *Trends Food Sci Technol* **9**: 336-40.
- Linetsky, M., Ranson, N., Ortwerth, B. J. (1998).** The aggregation in human lens proteins blocks the scavenging of UVA-generated singlet oxygen by ascorbic acid and glutathione. *Arch Biochem Biophys* **351**: 180-8.
- Löw, R., Rausch, T. (1994).** Sensitive, nonradioactive northern blots using alkaline transfer of total RNA and PCR-amplified biotinylated probes. *Biotechniques* **17**: 1026-30.
- Lupo, M. P. (2001).** Antioxidants and vitamins in cosmetics. *Clin Dermatol* **19**: 467-73.
- Macauley, S., McNeil, B., Harvey, L. M. (2001).** The genus *Gluconobacter* and its applications in biotechnology. *Crit Rev Biotechnol* **21**: 1-25.
- Madej, E., Grzeda, M. (2000).** Properties, effects of insufficient supply and ranges of application of vitamin C in animal therapy. *Med Weter* **56**: 627-31.
- Mealand, A., Waagb, R. (1998).** Examination of the qualitative ability of some cold water marine teleosts to synthesise ascorbic acid. *Comp Biochem Physiol* **121 A**: 249-55.
- 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**: 1959-66.
- Matsushita, K., Shinagawa, E., Ameyama, M. (1982).** D-Gluconate dehydrogenase from bacteria, 2-keto-D-gluconate-yielding, membrane-bound. *Methods Enzymol* **89**: 187-93.
- 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 Biochem* **56**: 304-10.
- May, J. M., Qu, Z. C. (2005).** Transport and intracellular accumulation of vitamin C in endothelial cells: relevance to collagen synthesis. *Arch Biochem Biophys* **434**: 178-86.
- Meloche, H. P., Wood, W. A. (1964).** The mechanism of 6-phosphogluconic dehydrase. *J Biol Chem* **239**: 3505-10.
- Merfort, M. (2006).** Dissertation: Untersuchungen zur 5-Keto-D-Gluconat Bildung mit *Gluconobacter oxydans*. Berichte des Forschungszentrums Jülich. **Jül-Bericht 4222**.
- Merfort, M., Herrmann, U., Ha, S.-W., Elfari, M., Bringer-Meyer, S., Görisch, H., Sahm, H. (2006).** Modification of the membrane-bound glucose oxidation system in *Gluconobacter oxydans* significantly increases gluconate and 5-Keto-D-gluconic acid accumulation. *Biotechnol J* **1**: 556-63.
- Mihalev, K., Schieber, A., Mollov, P., Carle, R. (2004).** Effect of mash maceration on the polyphenolic content and visual quality attributes of cloudy apple juice. *J Agric Food Chem* **52**: 7306-10.
- 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**: 58-9.
- Miyazaki, T., Sugisawa, T., Hoshino, T. (2006).** Pyrroloquinoline quinone-dependent dehydrogenases from *Ketogulonicigenium vulgare* catalyze the direct conversion of L-Sorbosone to L-Ascorbic Acid. *Appl Environ Microbiol* **72**: 1487-95.
- Miyazaki, T., Tomiyama, N., Shinjoh, M., Hoshino, T. (2002).** Molecular cloning and functional expression of D-sorbitol dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans* IFO3255, which requires pyrroloquinoline quinone and hydrophobic protein SldB for the activity development in *E. coli*. *Biosci Biotechnol Biochem* **66**: 262-70.

- Moritz, B., Striegel, K., de Graaf, A. A., Sahn, H. (2000).** Kinetic properties of the glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases from *Corynebacterium glutamicum* and their application for predicting pentose phosphate pathway flux *in vivo*. *Eur J Biochem* **267**: 3442-52.
- Mostafa, H. E., Heller, K. J., Geis, A. (2002).** Cloning of *Escherichia coli lacZ* and *lacY* genes and their expression in *Gluconobacter oxydans* and *Acetobacter liquefaciens*. *Appl Environ Microbiol* **68**: 2619-23.
- Mullis, K. B., Faloona, F. A. (1987).** Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**: 335-50.
- Nesterenko, M. V., Tilley, M., Upton, S. J. (1994).** A simple modification of Blum's silver stain method allows 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *J Biochem Biophys Meth* **28**: 239-42.
- Neveling, U., Bringer-Meyer, S., Sahn H. (1999).** Exceptional characteristics of heterotetrameric ($\alpha_2\beta_2$) E1p of the pyruvate dehydrogenase complex from *Zymomonas mobilis*: expression from an own promoter and a lipoyl domain in E1 β . *FEMS Microbiol Lett* **177**: 117-21.
- Ning, W., Tao, Z., Wang, C., Wang, S., Yan, Z., Yin, G. (1988).** Fermentation process for producing 2-keto-L-gulonic acid. European Patent EP 278.447.
- Nogami, I., Shirafuji, H., Oka, M., Yamaguchi, T. (1987).** A method for producing 2-keto-L-gulonic acid. European Patent EP 221.707.
- Nouwens, A. S., Cordwell, S. J., Larsen, M. R., Molloy, M. P., Gillings, M., Willcox, M. D., Walsh, B. J. (2000).** Complementing genomics with proteomics: the membrane subproteome of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Electrophoresis* **21**: 3797-809.
- Olijve, W., Kok, J. J. (1979a).** Analysis of growth of *Gluconobacter oxydans* in glucose containing media. *Arch Microbiol* **121**: 283-90.
- Olijve, W., Kok, J. J. (1979b).** An Analysis of growth of *Gluconobacter oxydans* in chemostat cultures. *Arch Microbiol* **121**: 291-7.
- Papworth, C., Bauer, J. C., Braman, J., Wright, D. A. (1996).** Site-directed mutagenesis in one day with > 80 % efficiency. *Stratagene cloning systems, Strategies newsletter*. **9**: 3-4.
- Peekhaus, N., Conway, T. (1998).** What's for dinner? Entner-Doudoroff metabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **180**: 3495-502.
- Pilizota, V., Subaric, D. (1998).** Control of enzymatic browning of foods. *Food Technol Biotechnol* **36**: 219-27.
- Powers, H. J., Gibson, A. T., Bates, C. J., Primhak, R. A., Beresford, J. (1994).** Does vitamin C intake influence the rate of tyrosine catabolism in premature babies? *Ann Nutr Metab* **38**: 166-73.
- Pratt, E. A., Fung, L. W.-M., Flowers, J. A., Ho, C. (1979).** Membrane-bound D-Lactate dehydrogenase from *Escherichia coli*: Purification and properties. *Biochem* **18**: 312-16.
- 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**: 160-4.
- Prust, C. (2004).** Dissertation: Entschlüsselung des Genoms von *Gluconobacter oxydans* 621H – einem Bakterium von industriellem Interesse. 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**: 195-200.
- Rao, Y. M., Sureshkumar, G. K. (2000).** Direct biosynthesis of ascorbic acid from glucose by *Xanthomonas campestris* through induced free-radicals. *Biotechnol Lett* **22**: 407-11.

- Reichstein, T., Grüssner, A. (1934).** Eine ergiebige Synthese der L-Ascorbinsäure (C-Vitamin). *Helv Chim Acta* **17**: 311-28.
- Reichstein, T., Grüssner, A., Oppenauer, R. (1933).** Die Synthese der D-Ascorbinsäure (D-Form des C-Vitamins). *Helv Chim Acta* **16**: 561-5.
- Rex, G., Surin, B., Besse, G., Schneppe, B., McCarthy, J. E. G. (1994).** The mechanism of translational coupling in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **269**: 18118-27.
- Rittmann, D., Schaffer, S., Wendisch, V. F., Sahm, H. (2003).** Fructose-1,6-bisphosphatase from *Corynebacterium glutamicum*: expression and deletion of the *fbp* gene and biochemical characterization of the enzyme. *Arch Microbiol* **180**: 285-92.
- Robin, A., Kepes, A. (1975).** Inducible gluconate permease in a gluconate kinase-deficient mutant of *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **406**: 50-9.
- Roland, J. F., Cayle, T., Dinwoodie, R. C., Mehnert, D. W. (1990).** Bioconversion production of ascorbic acid with L-galactono-1,4-oxidase. US Patent 4.916.068.
- Rosenberg, H. R. (1942).** Chemistry and physiology of the vitamins. New York: Interscience.
- Ruiz, A., Poblet, M., Mas, A., Guillaumòn, J. (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**: 1981-7.
- Rule, G. S., Pratt, E. A., Chin, C. C. Q., Wold, F., Ho, C. (1985).** Overproduction and nucleotide sequence of the respiratory D-Lactate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **161**: 1059-68.
- Running, J. A. (1999).** Process for the production of ascorbic acid with *Prototheca*. US Patent 5.900.370.
- Running, J. A., Burlingame, R. P., Berry, A. (2003).** The pathway of L-ascorbic acid biosynthesis in the colourless microalga *Prototheca moriformis*. *J Exp Botany* **54**: 1841-9.
- Running, J. A., Huss, R. J., Olson, P. T. (1994).** Heterotrophic production of ascorbic acid by microalgae. *J Appl Phycol* **6**: 99-104.
- Running, J. A., Severson, D. K., Schneider, K. J. (2002).** Extracellular production of L-ascorbic acid by *Chlorella protothecoides*, *Prototheca* species, and mutants of *P. moriformis* during aerobic culturing at low pH. *J Ind Microbiol Biotechnol* **29**: 93-8.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Ehrlich, H. A. (1988).** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. **239**: 487-91.
- Saito, Y., Ishii, Y., Hayashi, H., Imao, Y., Akashi, T., et al. (1997).** Cloning of genes coding for L-sorbose and L-sorbose 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**: 454-60.
- Saito, Y., Ishii, Y., Hayashi, H., Yoshikawa, K., Noguchi, Y., Yoshida, S., Soeda, S., Yoshida, M. (1998).** Direct fermentation of 2-keto-L-gulonate in recombinant *Gluconobacter oxydans*. *Biotechnol Bioeng* **58**: 309-15.
- Saito, Y., Ishii, Y., Niwa, M., Ueda, I. (1987).** Direct expression of a synthetic somatomedin C gene in *Escherichia coli* by use of a two-cistron system. *J Biochem Tokyo* **101**: 1281-8.
- Salnikow, K., Donald, S. P., Bruick, R. K., Zhitkovich, A., Phang, J. M., Kasprzak, K. S. (2004).** Depletion of intracellular ascorbate by the carcinogenic metals nickel and cobalt results in the induction of hypoxic stress. *J Biol Chem* **279**: 40337-44.
- 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**: 306-14.

- Sambrook, J., Russel, D.W. (2000).** Molecular cloning: a laboratory manual (3. Auflage). Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci. **74**: 5463-7.
- Sauberlich, H. E. (1994).** Pharmacology of vitamin C. Annu Rev Nutr **14**: 371-91.
- Sauer, M., Branduardi, P., Valli, M., Porro, D. (2004).** Production of L-ascorbic acid by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii*. Appl Environ Microbiol **70**: 6086-91.
- Schaffer S., Weil, B., Nguyen, V. D., Dongmann, G., Günther, K., Nickolaus, M., Hermann, T., Bott, M. (2001).** A high-resolution reference map for cytoplasmic and membrane-associated proteins of *Corynebacterium glutamicum*. Electrophoresis **22**: 4404-22.
- Schedel, M. (2000).** Regioselective oxidation of aminosorbitol with *Gluconobacter oxydans*, a key reaction in the industrial synthesis of 1-deoxynojirimycin. In: Biotechnology, Biotransformations I. Hrsg.: Kelly, D. R.. Wiley-VCH, Weinheim, S. 296-308.
- Schmid, R. D. (2002).** Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik (1. Auflage). WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim.
- Shibata, T., Ichikawa, C., Matsuura, M., Takata, Y., Noguchi, Y., Saito, Y., Yamashita, M. (2000a).** Metabolic engineering study on the direct fermentation of 2-keto-L-gulonic acid, a key intermediate of L-ascorbic acid in *Pseudomonas putida* IFO3738. J Biosci Bioeng **90**: 223-5.
- Shibata, T., Ichikawa, C., Matsuura, M., Takata, Y., Noguchi, Y., Saito, Y., Yamashita, M. (2000b).** Cloning of a gene for D-sorbitol dehydrogenase from *Gluconobacter oxydans* G624 and expression of the gene in *Pseudomonas putida* IFO3738. J Biosci Bioeng **89**: 463-8.
- Shinagawa, E., Ameyama, M. (1982).** 2-keto-D-gluconate dehydrogenase from *Gluconobacter melanogenus*, membrane-bound. Method Enzymol **89**: 194-8.
- Shinagawa, E., Matsushita, K., Adachi, O., Ameyama, M. (1981).** Purification and characterization of 2-keto-D-gluconate dehydrogenase from *Gluconobacter melanogenus*. Agric Biol Chem **45**: 1079-85.
- Shinagawa, E., Matsushita, K., Adachi, O., Ameyama, M. (1982).** Purification and characterization of D-sorbitol dehydrogenase from membrane of *Gluconobacter suboxydans* var. α . Agric Biol Chem **46**: 135-41.
- Shinagawa, E., Matsushita, K., Adachi, O., Ameyama, M. (1983).** Selective production of 5-keto-D-gluconate by *Gluconobacter* strains. J Ferment Technol **61**: 359-63.
- Shinagawa, E., Matsushita, K., Toyama, H., Adachi, O. (1999).** Production of 5-keto-D-gluconate by acetic acid bacteria is catalyzed by pyrroloquinoline quinone (PQQ)-dependent, membrane-bound D-gluconate dehydrogenase. J Mol Catal B: Enzymatic **6**: 341-50.
- Shinjoh, M., Setoguchi, Y., Hoshino, T., Fujiwara, A. (1990).** L-Sorbose dissimilation in 2-keto-L-gulonic acid-producing mutant UV10 derived from *Gluconobacter melanogenus* IFO 3293. Agric Biol Chem **54**: 2257-63.
- Shinjoh, M., Sugisawa, T., Masuda, S., Hoshino, T. (1994).** Efficient conversion of L-sorbose to 2-keto-L-gulonic acid by *Acetobacter liquefaciens* strains. J Ferment Bioeng **78**: 476-8.
- Shinjoh, M., Tazoe, M., Hoshino, T. (2002a).** NADPH-dependent L-sorbose reductase is responsible for L-sorbose assimilation in *Gluconobacter suboxydans* IFO 3291. J Bacteriol **184**: 861-3.
- Shinjoh, M., Tomiyama, N., Asakura, A., Hoshino, T. (1995).** Cloning and nucleotide sequencing of the membrane-bound L-sorbose dehydrogenase gene of *Acetobacter liquefaciens* IFO 12258 and its expression in *Gluconobacter oxydans*. Appl Environ Microbiol **61**: 413-20.

- Shinjob, 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**: 2314-22.
- Sievers, M., Gaberthüel, C., Boesch, C., Ludwig, W., Teuber, M. (1995).** Phylogenetic position of *Gluconobacter* species as a coherent cluster separated from all *Acetobacter* species on the basis of 16S ribosomal RNA sequences. *FEMS Microbiol Lett* **126**: 123-6.
- 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**: 92-8.
- 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**: 784-91.
- Smirnoff, N. (2001).** L-Ascorbic acid biosynthesis. In: *Vitamins and hormones*. Hrsg.: Begley, T. San Diego, Academic Press **61**: 241-66.
- Sonoyama, T., Tani, H., Matsuda, K., Kageyama, B., Tanimoto, M., Kobayashi, K., Yagi, S., Kyotani, H., Mitsushima, K. (1982).** Production of 2-keto-L-gulonic acid from D-glucose by two-stage fermentation. *Appl Env Microbiol* **43**: 1064-9.
- Sugisawa, T., Hoshino, T. (2002).** Purification and properties of membrane-bound D-sorbitol dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans* IFO 3255. *Biosci Biotechnol Biochem* **66**: 57-64.
- Sugisawa, T., Hoshino, T., Fujiwara, A. (1991b).** Purification and properties of NADPH-linked L-sorbose reductase from *Gluconobacter melanogenus* N44-1. *Agric Biol Chem* **55**: 2043-9.
- Sugisawa, T., Hoshino, T., Masuda, S., Nomura, S., Setoguchi, Y., Tazoe, M., Shinjob, M., Someha, S., Fujiwara, A. (1990).** Microbial production of 2-keto-L-gulonic acid from L-sorbose and D-sorbitol by *Gluconobacter melanogenus*. *Agric Biol Chem* **54**: 1201-9.
- Sugisawa, T., Hoshino, T., Nomura, S., Fujiwara, A. (1991a).** Isolation and characterization of membrane-bound L-sorbose dehydrogenase from *Gluconobacter melanogenus* UV10. *Agric Biol Chem* **55**: 363-70.
- Sugisawa, T., Miyazaki, T., Hoshino, T. (2005).** Microbial production of L-ascorbic acid from D-sorbitol, L-sorbose, L-gulose, and L-sorbosone by *Ketogulonicigenium vulgare* DSM 4025. *Biosci Biotechnol Biochem* **69**: 659-62.
- Sugiyama, M., Suzuki, S., Tonouchi, N., Yokozeki, K. (2003).** Transaldolase/ glucose-6-phosphate isomerase bifunctional enzyme and ribulokinase as factors to increase xylitol production from D-arabitol in *Gluconobacter oxydans*. *Biosci Biotechnol Biochem* **67**: 2524-32.
- Svirbely, J. L., Szent-Györgyi, A. (1932).** The chemical nature of vitamin C. *Biochem J* **26**: 865-70.
- Svirbely, J. L., Szent-Györgyi, A. (1933).** The chemical nature of vitamin C. *Biochem J* **27**: 279-85.
- Szent-Györgyi, A. (1928).** Observations on the function of peroxidase systems and the chemistry of the adrenal cortex. Description of a new carbohydrate derivative. *Biochem J* **22**: 1387-409.
- Takama, M., Nosoh, Y. (1982).** Effect of ATP on glucose-6-phosphate isomerase from *Bacillus caldotenax*. *Biochim Biophys Acta* **705**: 127-30.
- Tempest, D. W., Neijssel, O. M. (1987).** Growth yield and energy distribution. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Hrsg.: Neidhardt, F. C. American Society for Microbiology. 1. Auflage. 797-806.
- Torrentegui, D., Diaz, R., Canovas, J. L. (1976).** The uptake of 2-ketogluconate by *Pseudomonas putida*. *Arch Microbiol* **110**: 43-8.

- Toyama, H., Mathews, F. S., Adachi, O., Matsushita, K. (2004).** Quinohemoprotein alcohol dehydrogenases: structure, function, and physiology. *Arch Biochem Biophys* **428**: 10-21.
- Trevors, J. T., Stradoub, M. E. (1990).** Electroporation of pKK1 silver-resistance plasmid from *Pseudomonas stutzeri* AG259 into *Pseudomonas putida* CYM318. *Curr Microbiol* **21**: 103-7.
- Tsukada, Y., Perlman, D. (1972).** The fermentation of L-Sorbose by *Gluconobacter oxydans*. I. General characteristics of the fermentation. *Biotechnol Bioeng* **14**: 799-810.
- Urbance, J. W., Bratina, B. J., Stoddard, S. F., Schmidt, T. M. (2001).** Taxonomic characterization of *Ketogulonigenium vulgare* gen. nov., sp. nov. and *Ketogulonigenium robustum* sp. nov., which oxidize L-sorbose to 2-keto-L-gulonic acid. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 1059-70.
- Velizarov, S., Beschkov, V. (1998).** Biotransformation of glucose to free gluconic acid by *Gluconobacter oxydans*: substrate and product inhibition situations. *Process Biochem* **33**: 527-34.
- Vorm, O., Mann, M. (1994).** Improved mass accuracy in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of peptides. *J Am Soc Mass Spectrom* **5**: 955-8.
- Waugh, W. A., King, C. G. (1932).** Isolation and identification of vitamin C. *J Biol Chem* **97**: 325-31.
- Weenk, G., Olijve, W., Harder, W. (1984).** Ketogluconate formation by *Gluconobacter* species. *Appl Microbiol Biotechnol* **20**: 400-5.
- Wendisch, V. F. (2003).** Genome-wide expression analysis in *Corynebacterium glutamicum* using DNA microarrays. *J Biotechnol* **104**: 273-85.
- Wendisch, V. F., de Graaf, A. A., Sahm, H., Eikmanns, B. J. (2000).** Quantitative determination of metabolic fluxes during cointilization of two carbon sources: comparative analyses with *Corynebacterium glutamicum* during growth on acetate and/or glucose. *J Bacteriol* **182**: 3088-96.
- Wenzel, U., Nickel, A., Kuntz, S., Daniel, H. (2004).** Ascorbic acid suppresses drug-induced apoptosis in human colon cancer cells by scavenging mitochondrial superoxide anions. *Carcinogenesis* **25**: 703-12.
- Xu, A., Yao, J., Yu, L., Lv, S., Wang, J., Yan, B., Yu, Z. (2004).** Mutation of *Gluconobacter oxydans* and *Bacillus megaterium* in a two-step process of L-ascorbic acid manufacture by ion beam. *J Appl Microbiol* **96**: 1317-23.
- Yakhnin, H., Babiarz, J. E., Yakhnin, A. V., Babitzke, P. (2001).** Expression of the *Bacillus subtilis* *trpEDCFBA* operon is influenced by translational coupling and Rho termination factor. *J Bacteriol* **183**: 5918-26.
- 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**: 103-19.
- Yanofsky, C., Platt, T., Crawford, I. P., Nicols, B. P., Christie, G. E., Horowitz, H., VanCleemput, M., Wu, A. M. (1981).** The complete nucleotide sequence of the tryptophan operon of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **9**: 6647-68.
- Yin, G., Lin, W., Qiao, C., Ye, Q. (2001).** Production of vitamin C precursor 2-keto-L-gulonic acid from D-sorbitol by mixed culture of microorganisms. *Wei Sheng Wu Xue Bao* **41**: 709-15.
- Zinsheng, Y., Zengxin, T., Longhua, Y., Guanghin, Y., Wenzhu, N., Changhui, W., Shuding, W., Huifeng, J., Jufen, Y., Mingshou, W., Xiuju, Y. (1981).** Studies on production of vitamin C precursor-2-keto-L-gulonic acid from L-sorbose by fermentation. II. Conditions for submerged fermentation of 2-keto-L-gulonic acid. *Acta Microbiol Sin* **21**: 185-91.

VIII. Anhang

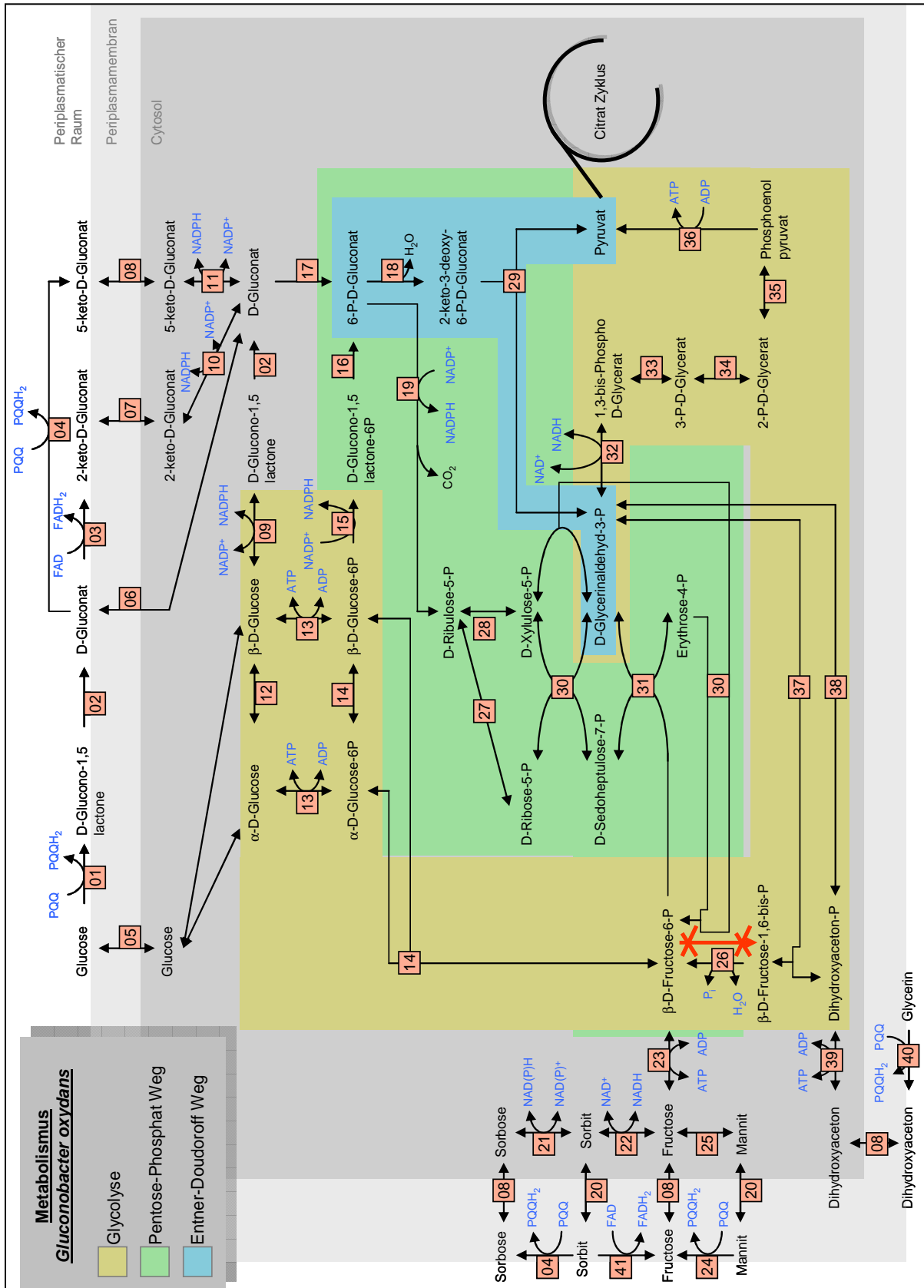


Abb. 28: Aus der Genomsequenz (Prust et al., 2005) abgeleiteter Zuckermetabolismus von *G. oxydans* DSM 2343 (Merfort, 2006). Legende zur Enzym-Nummerierung in Tab. 25.

Tab. 25: Enzyme des Zuckermetabolismus von *G. oxydans* DSM 2343 (Legende zu Abb. 28).

#	Name des Enzyms	EC.-Nr.	ORF	Referenzen
01	Glukose-DH, mGDH, PQQ	1.1.5.2	GOX0516	(Ameyama <i>et al.</i> , 1981; Elias <i>et al.</i> , 2001)
02	Glukonolaktase	3.1.1.17	GOX1375 GOX1381	
03	Glukonat-2-DH, mGA2DH, FAD	1.1.99.3	GOX1230- 1232	(Matsushita <i>et al.</i> , 1982)
04	Sorbitol-DH, 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	Glukonatpermease, <i>gntP</i>	-	GOX2188	(Klemm <i>et al.</i> , 1996)
07	2-KGA-Transporter	-		(Torrontegui <i>et al.</i> , 1976)
08	Zuckeraufnahme-Protein	-		-
09	Glukose-1-DH, cGDH, NADP ⁺	1.1.1.47	GOX2015	
10	Glukonat-2-Reduktase, 2-KGAR	1.1.1.215	GOX0417	(Ameyama, 1982)
11	Glukonat: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	Glukokinase	2.7.1.2	GOX2419	
14	Phosphoglukoseisomerase, PGI	5.3.1.9	GOX1704	(Sugiyama <i>et al.</i> , 2003)
15	Glukose-6-Phosphat-1-DH	1.1.1.49	GOX0145	
16	6-Phosphoglukonolaktase	3.1.1.31	GOX1707	
17	Glukonokinase, <i>gntK</i>	2.7.1.12	GOX1709	
18	6-Phosphoglukonat-Dehydratase	4.2.1.12	GOX0431	(Meloche und Wood, 1964)
19	6-Phosphoglukonat-DH	1.1.1.44	GOX1705	
20	Sorbit/Mannit-Transportprotein	-	GOX2183- 2185	
21	L-Sorbose-Reduktase, NADP ⁺	1.1.1.14	GOX2430	(Shinjoh <i>et al.</i> , 2002a)
22	Sorbitol-DH, NAD ⁺	1.1.1.14	GOX0313	(Adachi <i>et al.</i> , 1999a)
23	Fruktokinase	2.7.1.4	GOX0612	
24	(Sorbitol)/Mannitol-DH	1.1.2.2	GOX0854	(Cho <i>et al.</i> , 1990; Shinjoh <i>et al.</i> , 2002b)
25	Mannitol-2-DH, NAD(P) ⁺	1.1.1.67	GOX0849	Adachi <i>et al.</i> , 1999b)
26	Fruktose-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-Glukonat-Dehydratase	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	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat -DH	1.2.1.12	GOX0508	
33	3-Phosphoglyzerat-Kinase, PGK	2.7.2.3	GOX0507	
34	Phosphoglyzerat Mutase	5.4.2.1	GOX0330 GOX0965	
35	Enolase, ENO	4.2.1.11	GOX2279	
36	Pyruvatkinase, PYK	2.7.1.40	GOX2250	
37	Fruktose-bis-phosphat-Aldolase	4.1.2.13	GOX0780 GOX1540	
38	Triosephosphatisomerase	5.3.1.1	GOX2217 GOX2284	
39	Dihydroxyaceton-Kinase	2.7.1.29	GOX2222	
40	(Sorbit)/Glyzerin- DH	1.1.99.22	GOX0854	(Ameyama <i>et al.</i> , 1985b; Shinjoh <i>et al.</i> , 2002b)
41	Sorbitol-DH, FAD, Cyt c	1.1.99.21	GOX2094- 2097	(Choi <i>et al.</i> , 1995)

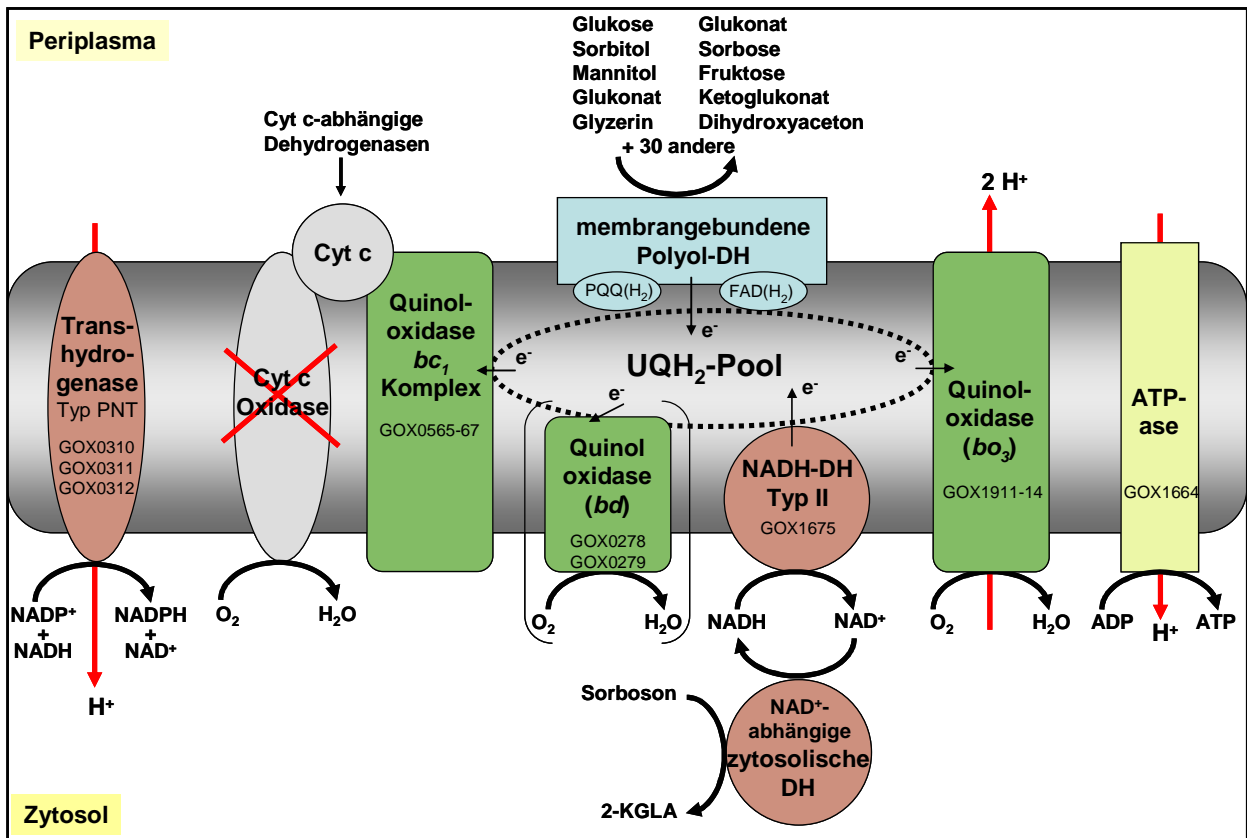


Abb. 29: Aus der Genomsequenz (Prust *et al.*, 2005) abgeleitetes Schema zur Atmungskette von *G. oxydans* DSM 2343. Abkürzungen: DH, Dehydrogenase; UQH₂, reduzierte Form des Ubichinons; Cyt c, Cytochrom c; GOX, Offene Leserahmen im Genom von *G. oxydans* DSM 2343.

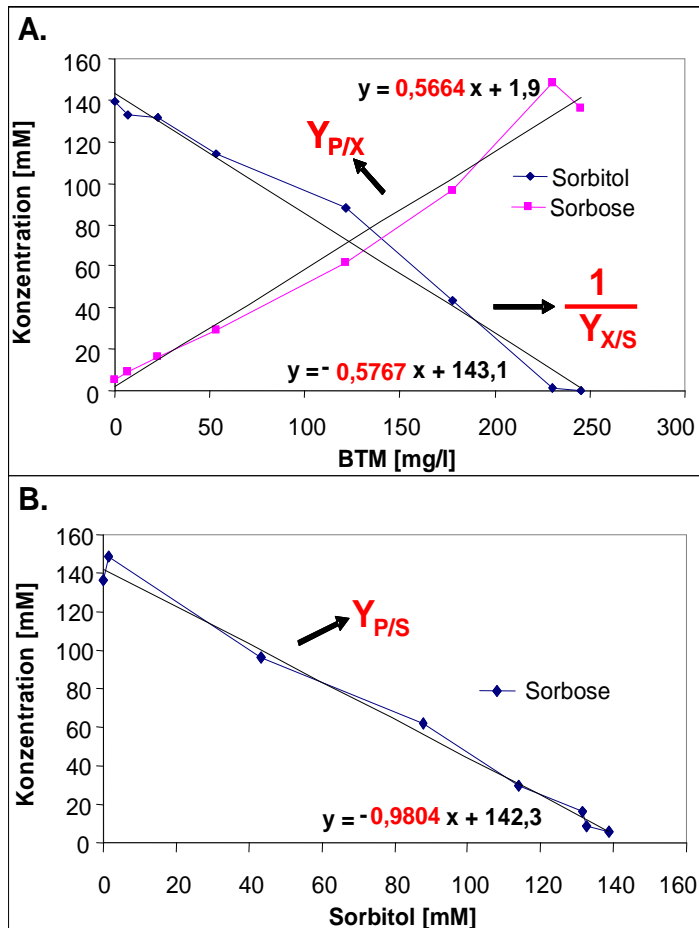


Abb. 30: Berechnung von $Y_{P/X}$, $Y_{X/S}$ und $Y_{P/S}$ am Beispiel des Umsatzes von Sorbitol zu Sorbose durch *G. oxydans* DSM 2343. Die Parameter $Y_{P/X}$ und $Y_{X/S}$ wurden nicht durch Quotientenbildung am Kultivierungsendpunkt, sondern aus der Steigung der Substrat- bzw. Produktkonzentrationen in Abhängigkeit der BTM über den gesamten Fermentationsverlauf ermittelt (A). $Y_{P/S}$ wurde aus der Geradensteigung bei Auftrag der Produktkonzentration in Abhängigkeit der Substratkonzentration über die gesamte Kultivierungsdauer berechnet (B). Somit bezieht sich die Berechnung nicht auf einen Messwert, sondern auf das Mittel aller gemessenen Werte, wodurch Fehler aufgrund von Messungenauigkeiten vermieden werden. Diese Art der Parameterberechnung ist nur anwendbar, wenn die Substratabnahme und die Produktzunahme in Abhängigkeit der BTM linear verlaufen, wenn also der Umsatz wachstumsgekoppelt erfolgt. Die Wachstumsrate μ_{\max} wurde mit der Formel $\mu = \text{OD}_2 / \text{OD}_1 * 1 / (t_2 - t_1)$ in der exponentiellen Wachstumsphase, die Verdopplungszeit mit der Formel $t_d = \ln 2 / \mu$ und die Produktbildungsrate mit der Formel $q^{\max} = Y_{P/X} * \mu_{\max}$ berechnet.

ATGAATGTTGTCTCAAAGACTATATCTTTACCGTTAAAGCCGCGTGAGTTCGGATTCTTTATTGATGGAGAATGG
 CGCGCAGGTAAGGATTTCTTCGATCGTTCCTCGCCGGCTCATGATGTTCCCGTCACCCGTATTCCACGCTGCACC
 CGTGAAGACCTTGATGAGGCAGTCGCTGCTGCACGTCGTGCTTTTCGAGAACGGAAGCTGGGCGGGTCTGGCAGCC
 GCGGATCGTGCGGCGGTTCTTCTGAAAGCCGCGGGCCTTCTGCGCGAGCGTCGTGATGACATCGCTTACTGGGAA
 GTTCTCGAAAACGGGAAGCCCATCAGCCAGGCGAAAGGTGAGATCGATCACTGTATCGCTGTTTCGAGATGGCG
 GCCGGCGCTGCGCGGATGCTGCATGGTGATACTTCAACAATCTGGGCGAGGGGCTGTTTCGGCATGGTCTCGCG
 GAGCCCATCGGGGTCGTGGTCTGATTACGCCGTGGAACCTTCCCGTTCATGATCCTGTGTGAGCGCGCCTTTC
 ATTCTCGCATCCGGCTGCACGCTGGTTCGTAAGCCTGCCGAAGTCACGAGTGCCACAACGCTTCTTCTGGCGGAA
 GTTCTTGGCGATGCCGGGCTGCCGAAGGGTGTCTTCAATGTGCGTACGGGCACGGGGCGCACGGTTGGTCAGGCC
 ATGACCGAGCACCAGGATATCGACATGCTGTCCTTACGGGCTCCACGGGCGTCGGCAAGTCTGTATCCACGCG
 GCGGCTGACAGCAACCTGAAGAAGCTGGGCCTCGAGCTTGGTGGCAAGAACCAGATCGTCGTGTTTCGCTGACAGC
 AACCTTGAGGATGCGGCCGATGCGGTAGCCTTCGGAATCAGCTTTAACACCGGGCAGTGTGTGTGTCGTCGAGC
 CGCCTGATCGTAGAGCGGTCCGTGGCCGAGAAGTTCGAACGTCTCGTCGTGGCAAAAAATGGAGAAGATCCGCGTT
 GGTGATCCGTTTGACCCGGAGACGCAGATTGGCGCCATCACGACGGAAGCGCAGAACAAAGACCATTTCTGGACTAC
 ATCGCCAAGGGCAAGGCCGAGGGCGCCAGGCTGCTCTGTGGTGGCGGGATCGTCGATTTTCGGCAAGGGGCAGTAT
 ATCCAGCCCACGCTTTTACGGATGTGAAGCCCTCGATGGGCATCGCGCGTGACGAGATTTTTGGGCCGGTCTCG
 GCGTCTTCCACTTCGATAACCGTCGATGAGGCGATCGCGATTGCCAATGACACGGTTTACGGCCTGGCCGCATCG
 GTCTGGAGCAAGGATATCGACAAGGCGCTTGCCGTAACCCGTCGTGTTTCGCGCCGGCCGCTTCTGGGTGAACACC
 ATCATGAGTGGTGGTCCCAGACGCCGCTGGGTGGTTTTCAAGCAGTCGGGCTGGGGCCGTGAGGCAGGTCTGTAC
 GCGTGTGAGGAATATACGCAGATCAAATCTGTCCATATCGAAACTGGCAAACGTTTCGCACTGGATTTTCGTAATGA
 CGAGCGTTTTTGATTACATCGTTGTGCGGTGGCGGTTTCGGCTGGCTGTGTTCTCGCAGCCCGCCTTTCGAAAAATC
 CTTCCGTCCGTGTCTGCCTCATCGAGGCGGGCCGGCGGGACACGCATCCCCTGATCCACATGCCGGTCCGGCTTCG
 CGAAGATGACCACGGGGCCGCATACCTGGGATCTTCTGACGGAGCCGCAGAAACATGCGAACAACCGCCAGATCC
 CCTATGTGCAGGGCCGGATTCTGGGCGGCGGATCGTCCATCAACCGGAAAGTCTTACGCGGGGACACCCCTCCG
 ATTTTCGACCGCTGGGCGGCGGAAGGTGCGGATGGCTGGAGCTTCCGGGATGTCCAGAAGTACTTCATCCGTTCCG
 AAGGCAATGCCGTGTTTTTCGGGCACCTGGCATGGCACGAACGGGCCGCTCGGGGTGTCCAACCTTGAGATCCAA
 ACCCAACCAGCCGTGCGTTTCGTGCAGAGCTGTGAGGAAATGGGGCTGCCCTACAACCCGGACTTCAATGGCGCAT
 CGCAGGAAGGCGCTGGCATCTACCAGATGACGATCCGGAACAACCGGCGTTGCTCGACGGCTGTGGGGTATCTGC
 GTCCGGCCCTGGGGCGGAAGAATCTGACGGTTGTGACGCGGGCGCTGGTCCTGAAGATCGTCTTCAACGGGACGC
 GGGCGACGGGTGTGAGTATATTGCCAACGGCACCCCTGAATACCGCCGAAGCGAGCCAGGAAATCGTTGTGACGG
 CCGGAGCAATCGGAACGCCGAAGCTGATGATGTTGTGCGGGCGTCGGCCCTGCTGCGCATCTTCGCGAAAAATGGTA
 TCCCGGTTCGTGCAGGATCTGCCGGGCGTGGGCGAGAACCCTGCAGGACCATTTCCGGTGTGGATAATCGTGGCTGAAC
 TCAAGACGGATGAGAGCTTCGACAAGTACCGGAAACTGCACTGGATGCTGTGGGCAGGTCTTGAATACACCATGT
 TCAGATCCGGTCCCCTCGCGTCCAACGTGGTTGAGGGCGGCGCGTTCCTGGTACTCGGATCCGTCATCGGGTGTTC
 CTGATCTCCAGTTCATTTTTCTTGGGGCGCAGGGGCTGAGGCAGGGGTGACGTCCGTTCCCAAGGGAGCGTCCG
 GGATTACGCTGAACAGCTATGTGCTACGGCCGAAGTCCCGCGGAACCGTCCGGCTGCGTTTCGGCGGATCCGAGGG
 TCAATCCGATGGTTCGATCCCAATTTCTTGGAGACCCGGCCGACCTTGAAACGTCTGCGGAAGGTGTGCGGCTGA
 GCTACGAGATGTTCTCCAGCCGTCTTGCAGAAGCACATCCGGAACAACCTGTTTCTTTAGCGGTAACAGCCGA
 CGATGCAGATGTATCGGGACTATGCGCGGGAACATGGCCGGACGTCTTATCATCCGACATGCACCTGCAAGATGG
 GTCGCGATGACATGTCCGTGTCGATCCGCGTCTGAAGGTTTCATGGGCTTGAGGGCATCAGGATCTGTGACAGTT
 CGGTCATGCCGTCTCTGCTCGGTTCCAACACCAATGCTGCGACGATCATGATCAGTGAGCGGGCAGCGGATTTCA
 TTCAGGGGAACGCCTGA

Abb. 31: DNA-Sequenz des *csndh/sdh*-Genclusters aus *G. oxydans* DSM 3504. Markiert ist der Übergang (überlappendes Stop- und Start-Codon) zwischen dem *sndh*- und dem *sdh*-Gen.

A. (cSNDH)

MNVVSKT**T**SLPLKPREFGFFIDGEWRAGKDFDRSSPAHDVPVTRI PRCTREDLDEAVAAARRAFENGSWAGL
 V
 AAADRAAVLLKAAGLLRERRDDIAYWEVLENGKPI SQAKGEIDHCIACFEMAAGAARMLHGDTFNNLGEGLFG
 MVLREPIGVVGLITPWNFPF MILCERAPFILASGCTLVVKPAEVT SATLLLLAE**V**LADAGLPKGVFNVVTGTG
 I
 RTVGQAMTEHQDIDMLSFTGSGTGVGKSCIHAAADSNLKKLGLLELGGKNPI VVFADSNLEDAADAVAFGISFNT
 GQCCVSSSRLIVERSVAEKFERLV**V**KMEKIRVGD PFD PETQIGAITTEAQNKTI LDYIAKGAEGAR**L**LLCGG
 P K
 GIVDFGKGQYIQPTLFTDVKPSMGIARDEIFGPVLASFHFDTVDEAIAIANDTVYGLAASVWSKDIDKALAVT
 RRVRAGRFWVNTIMSGGPETPLGGFKQSGWGREAGLYGVEEY TQIKSVHIETGKRSHWIS

B. (SDH)

MTSGFDYIVVGGGSAGCVLAARLSENPSVRVCLIEAGRDRTHPLIHMPVGFAMTTGPHTWDLLETPQKHANN
 RQIPYVQGRILGGSSINA EVFTRGHPSDFDRWAAEGADGWSFRDVQKYFIRSEGNVFSGTWHGTNGPLGVS
 NLAD**D**PNPTSRA FVQSCQEMGLPYNPDFNGASQEGAGIYQMTIRNNRRCSTAVGYLRPALGRKNLTVVTRALVL
 E
 KIVFNGTRATGVQYIANGTLN TAEASQEIVVTAGAI GTPKLMMLSGVGPAAHLRENGIPVVQDLPGVGENLQD
 HFGVDIVAE LKTDESFDKYRKLHWMLWAGLEYTMFRSGPVASNVVEGGAFWYSDPSSGVPDLQFHFLA**G**AGAE
 E
 AGVTSVPKGASGITLNSYVLRPKSRGTVRLRSADPRVNPMPD PNF LGDPADLETSAEGVRLSYEMFSQP**S**LQK
 E
 HIRKTCFFSGKQPTMQMYRDYAREHGRTSYHPTCTCKMGRDDMSVVDPR LKVHGLEGIRICDSSVMP SLLGSN
 TNAATIMISERAADFIQNA

Abb. 32: Unterschiede zwischen den AS-Sequenzen der cSNDH (A) und der SDH (B) aus *G. oxydans* DSM 3504 und T-100. Dargestellt sind die Sequenzen von *G. oxydans* DSM 3504, die von der *G. oxydans* T-100-Sequenz abweichenden AS sind rot markiert und die entsprechenden AS in der *G. oxydans* T-100-Sequenz sind in blau angegeben.

(mSNDH)

MTRSQIRLLVATTAVTALLVAAGYRAVVSPEEARQTVAAAGTGPHPVLPPPNTFMPTVNIATPVGWQGTQAPT
 PAAGLAVHAFATGLDHPRWLYKLPNGDILVAESES PGTDIKTVKNRIAGLVMGQVGAGGKSPDR I ILLRDTDG
 DGIADQRSVFLDHLYS PFGMALVGD TLYVANANALVRF PYHEGETHIDAPGEKAVDLPAGYNHHWTKNILASP
 DGSTLYVTVGSNSNVADNGMEVEEGRARIDRFDIATGKLT PYATGLRNP**N**GLAWEPKTGALWVAVNERDEIGS
 E
 DLVPDYITAVKEGAFYGWPYSYYGQHVDVRVKPQR PDLVASAIAPDYALGPHTA**S**LGIAFSQDSSLPAAWRNG
 WF
 LFVAQHGSWNRKPKSGYRV IYVPFTDGHPDGT PRDVL TGFLTQDEDAHGRPVGLALDKSGALLVADDVGNTV
 WRVTGTDQKTD

Abb. 33: Unterschiede zwischen der mSNDH-Sequenz aus *A. liquefaciens* DSM 5603 und IFO 12258. Dargestellt ist die Sequenz von *A. liquefaciens* DSM 5603, die von der *A. liquefaciens* IFO12258-Sequenz abweichenden AS sind rot markiert und die entsprechenden AS in der *A. liquefaciens* IFO 12258-Sequenz sind in blau angegeben.

```

ATGACCCGTTCCCAGATCAGGCTTCTCGTCGCGACCACCGCCGTCACCGCGCTGCTGGTGGCAGCCGGCTACC
GCGCGGTCTGTCGCCCCGAGGAAGCCCGGCAGACGGTTCGCGGCCGGAACCGGCCCCACCCCGTCTGCGGCC
GCCCAACCCACCTTTCATGCCACGGTCAACATCGCCACGCCCGTTCGGCTGGCAGGGCAGCAGGCCCCGACC
CCGGCGGGCGGGGCTGGCGGTGCATGCCTTCGCCACCGGCCTGGACCACCCCGCTGGCTGTACAAGCTGCCCA
ACGGCGATATCCTGGTGGCGGAATCCGAGTCCCCCGGCACCGACATCAAGACGGTGAAGAACCGCATCGCCGG
CCTGGTCATGGGCCAGGTTCGGCGGGGCGAAAAAGCCCGACCGCATCATCCTGCTGCGCGATAACCGACGGC
GACGGCATCGCCGACCAGCGCAGCGTGTTCCTCGACCACCTCTACTCGCCCTTCGGCATGGCGCTGGTTCGGCG
ACACGCTCTACGTGGCCAACGCCAACGCGCTGGTCCGCTTCCCCTATCACGAGGGCGAAACCCACATCGACGC
ACCGGGCGAGAAAGCCGTGCACCTCCCGGCCGGCTACAACCACCACTGGACCAAGAATCCTGGCCAGCCCG
GACGGCAGCACCCCTTACGTGACCGTTCGGCTCCAACAGCAACGTCGCCGACAACGGCATGGAGGTTCGAGGAAG
GCCGCGCCCGGATCGACCGGTTCGACATCGCCACCGCAAGCTCACCCCTACGCCACCGGCTGCGCAACCC
CAACGGGCTGGCGTGGGAGCCCAAGACCGGCGCCCTGTGGGTTCGAGTGAACGAACGCGACGAAATCGGCAGC
GACCTGGTGGCCGACTACATCACGGCGGTGAAGGAGGGCGCGTTCCTACGGCTGGCCCTACAGCTATTACGGCC
AGCATGTTCGATGTCCCGCTCAAGCCGACGCGCCCGACCTGGTGGCCAGCGCCATCGCCCCGACTACGCGCT
CGGCCCGCACACCGCCTCGCTCGGCATCGCCTTCTCGCAGGACAGCAGCCTGCCCGCGGCTGGCGCAATGGC
CTGTTTCGTCGCCCAGCACGGCTCATGGAACCGCAAGCCCAAGAGCGGCTACCGCGTCATCTACGTCCCCCTCA
CCGACGGCCACCCCGACGGCACCCCGCGACGTGCTGACCGGCTTCCTCACACAGGACGAAGACCACGCCCA
CGGCCCGCCGGTTCGGCTGGCGCTGGACAAATCCGGCGCCCTCCTGGTTCGCCGACGATGTCGGCAACACCGTG
TGGCGCGTCACCGGCACGGACCAGAAGACCGACTGA

```

Abb. 34: DNA-Sequenz des *msndh*-Gens aus *A. liquefaciens* DSM 5603.

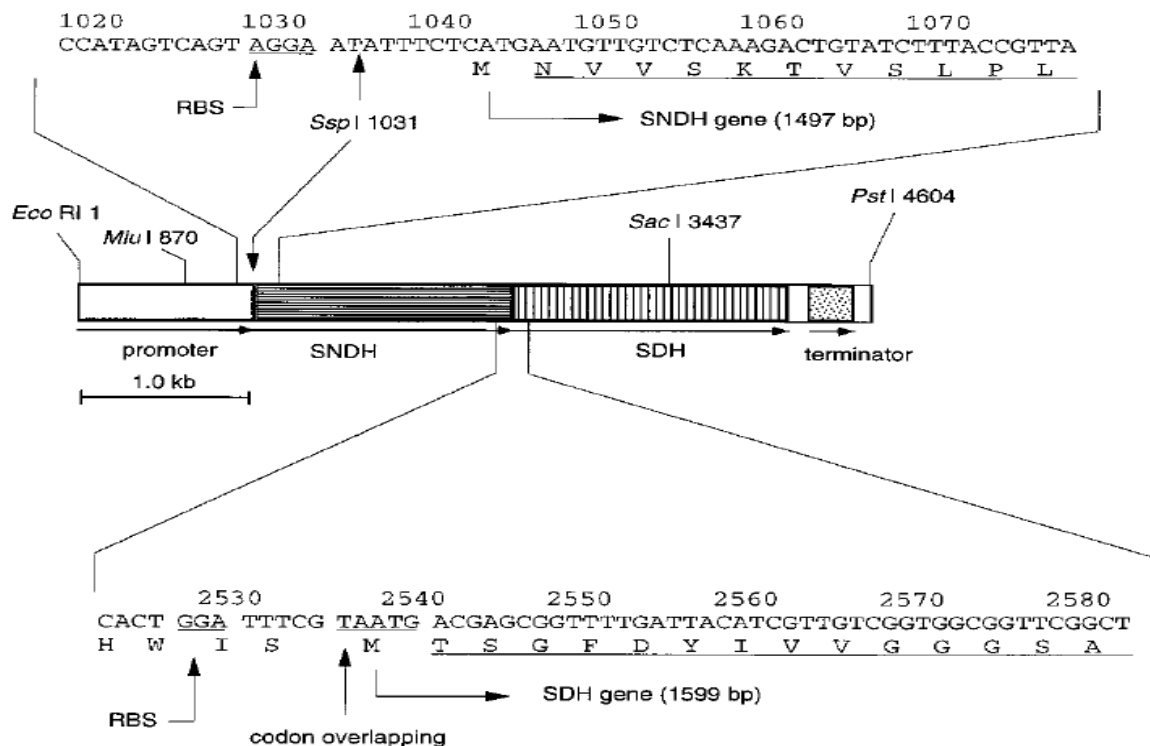


Abb. 35: Translationale Kopplung im *csndh/sdh*-Gencluster von *G. oxydans* T-100. Das *csndh*-Gen und das *sdh*-Gen besitzen jeweils eine RBS, wobei die *sdh*-RBS im 3'-Ende des *csndh*-Gens liegt (Saito *et al.*, 1997).

Tab. 26: Membranproteomics: ausgewählte Ergebnisse des massenspektroskopischen Membranprotein-Vergleichs verschiedener *G. oxydans*-Stämme. Angegeben ist die nachgewiesene Fragmentanzahl der jeweiligen Proteine aus der Membranfraktion, die aufgrund der normierten Vorgehensweise eine semiquantitative Aussage über die Proteinmenge erlaubt (pers. Mitteilung Dr. D. Becher, Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald). Fett gedruckt sind die in dieser Arbeit näher untersuchten Proteine.

Nachgewiesene Fragmente				Funktion annotiert nach Prust <i>et al.</i> (2005)	ORF- Nummer
DSM 2343	DSM 3504	IFO 3293	N44-1		
0	0	0	3	cobalt insertion protein CobS	GOX0050
0	0	0	3	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX	GOX0086
0	0	0	5	cell division protein FtsZ	GOX0164
0	0	0	2	LytB protein involved in terpenoid biosynthesis	GOX0179
0	0	0	10	dimethylallyltransferase (EC 2.5.1.1) /geranyltransferase (EC 2.5.1.10)	GOX0251
0	0	0	7	cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase (EC 2.1.1.79)	GOX0303
0	0	0	1	SSU ribosomal protein S6P	GOX0306
0	0	3	6	MoxR-like protein (transcriptional regulator)	GOX0338
0	0	0	2	dihydroorotate dehydrogenase (EC 1.6.99.7)	GOX0473
0	0	0	2	multidrug resistance protein A	GOX0784
0	0	3	5	chaperone protein DnaK	GOX0857
0	0	0	4	electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase/ putative oxidoreductase (EC 1.5.5.1)	GOX0868
0	0	0	3	putative oxidoreductase (EC 1.1.1.-)	GOX0946
0	0	0	2	TonB-dependent outer membrane receptor	GOX1017
0	0	13	7	chaperone protein HtpG	GOX1024
0	0	0	2	ketol-acid reductoisomerase (EC 1.1.1.86)	GOX1089
0	3	5	12	D-lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.28)	GOX1253
0	0	1	4	heat inducible transcription repressor HrcA	GOX1283
0	0	1	4	putative HlyD-family protein	GOX1411
0	0	0	6	fructose-1,6-bisphosphatase	GOX1516
0	0	1	9	RecA protein	GOX1522
0	1	1	5	gamma-glutamyltranspeptidase (EC 2.3.2.2)	GOX1532
0	0	0	6	hypothetical protein	GOX1617
0	0	0	6	NADH dehydrogenase type II (EC 1.6.99.3)	GOX1675
0	3	1	2	MotA/TolQ/ExbB proton channel family protein	GOX1684
0	0	0	2	TolB protein	GOX1687
0	0	1	8	transaldolase/ phosphoglucose isomerase (EC 2.2.1.2)	GOX1704
0	0	0	3	rod shape-determining protein MreB	GOX1737
0	0	0	4	membrane-bound lytic murein transglycosylase	GOX1887
14	7	20	23	chaperonin GroEL	GOX1902
0	1	1	3	cytochrome O ubiquinol oxidase subunit I (EC 1.10.3.-)	GOX1912
0	0	0	9	decaprenyl diphosphate synthase (EC 2.5.1.1)	GOX1996
0	0	5	15	putative oxidoreductase (NAD(P)-dependent)	GOX2036
0	7	3	7	glycerol-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.99.5)	GOX2088
0	0	0	7	NADH-dependent iron-containing alcohol dehydrogenase	GOX2108
0	0	7	10	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine S-methyltransferase (EC 2.1.1.14)	GOX2206
0	0	0	3	methylenetetrahydrofolate reductase (EC 1.5.1.20)	GOX2207
0	0	0	6	putative oxidoreductase (similar to HpnA)	GOX2253
0	0	1	5	delta-aminolevulinic acid dehydratase (EC 4.2.1.24)	GOX2308

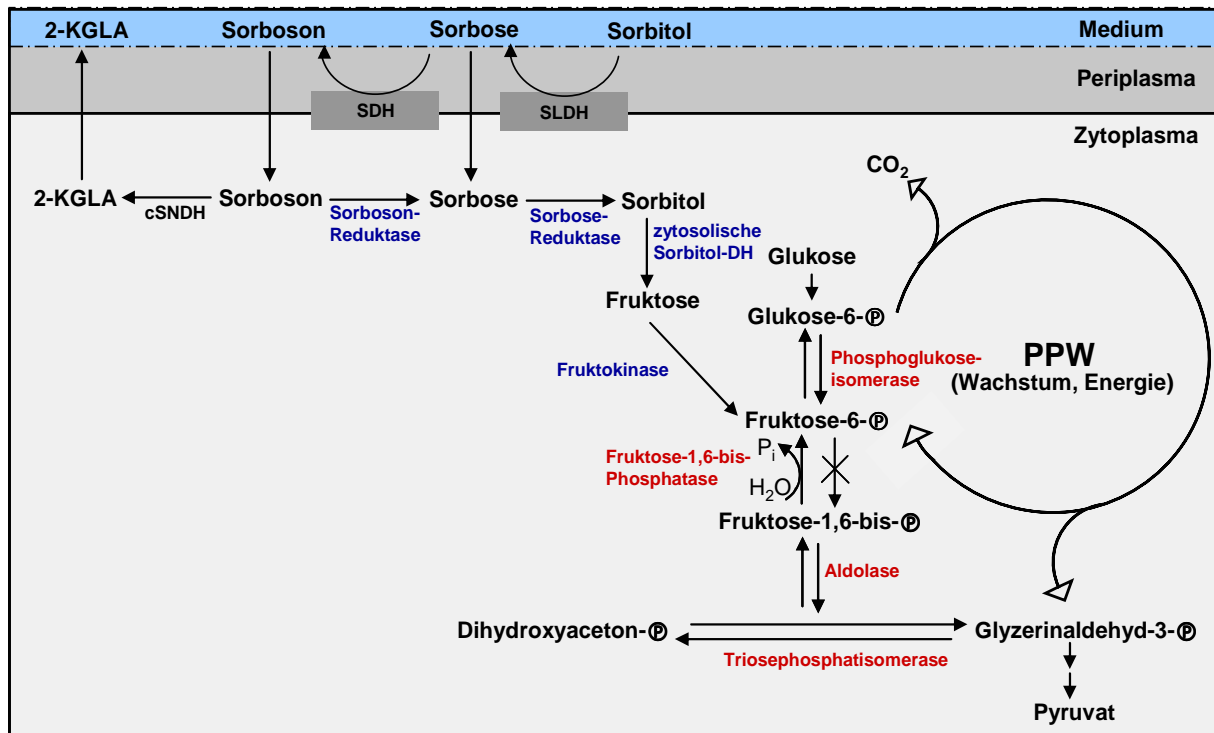


Abb. 36: Einschleusung von Intermediaten des Sorbitol-Metabolismus über Fructose in den Zentralstoffwechsel von *G. oxydans*. Sorbitol wird mit Hilfe eines membrangebundenen Enzymsystems im Periplasma zu Sorbose und Sorboson oxidiert. Im Zytosol existiert ein genau gegenläufiges Enzymsystem (blau dargestellt), das für die Reduktion von Sorboson zu Sorbose (NAD(P)H-abhängige Sorboson-Reduktase) und von Sorbose zu Sorbitol (NAD(P)H-abhängige Sorbose-Reduktase) verantwortlich ist (Shinjo *et al.*, 1990, 2002a; Hoshino *et al.*, 1990; Sugisawa *et al.*, 1990, 1991b; Adachi *et al.*, 1999a). Sorbitol wird dann von einer NADP-abhängigen Sorbitol-DH zu Fructose oxidiert (Shibata *et al.*, 2000b), die nach Phosphorylierung durch die Fruktokinase und Isomerisierung durch die Phosphoglukoseisomerase im PPW verstoffwechselt wird. Die rot dargestellten Enzyme (Triosephosphatisomerase, Aldolase, Fruktose-1,6-bisphosphatase und Phosphoglukoseisomerase) sind für den Wiedereintritt von Fruktose-6-Phosphat und Glyzerinaldehyd-3-Phosphat in den PPW verantwortlich und machen einen zyklischen Ablauf der PPW-Reaktionen möglich. *G. oxydans* besitzt keine Phosphofruktokinase (schwarzes Kreuz), so dass die Glykolyse nicht stattfinden kann.

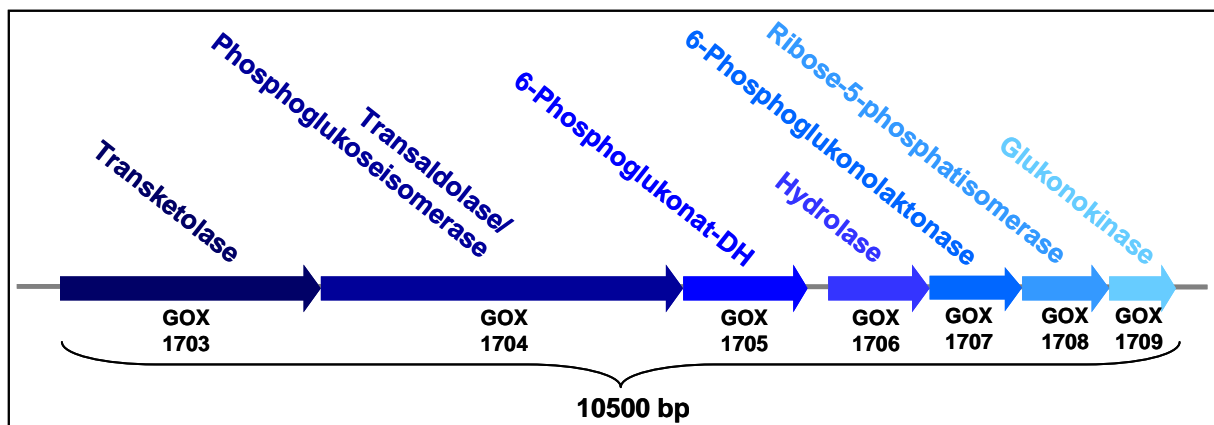


Abb. 37: Pentosephosphatweg-Gencluster. Abgesehen von den Genen für Glukokinase, Glukose-6-Phosphat-DH und Ribulose-Phosphat-Epimerase liegen die Gene der PPW-Enzyme im Genom von *G. oxydans* DSM 2343 (Prust *et al.*, 2005) sowie in den Genomen von *G. oxydans* IFO 3293 und N44-1 (pers. Mitteilung P. Simic, DSM Nutritional Products) zusammen in einem 10500 bp großen Gencluster vor. Die Gene von Transaldolase und die Phosphoglukoseisomerase sind dabei fusioniert (Sugiyama *et al.*, 2003).

A. N44-1/ Klon 1:		B. DSM 2343-<i>csndh/sdh-tufB</i>:	
100 g/l	Sorbitol eingesetzt	100 g/l	Sorbitol eingesetzt
- 1 g/l	Sorbitol	- 0 g/l	Sorbitol
- 1 g/l	Sorbose	- 56 g/l	Sorbose
- 1 g/l	Sorboson	- 16 g/l	Sorboson
- 5 g/l	2-KGLA	- 15 g/l	2-KGLA
- 61 g/l	CO ₂	- 7 g/l	CO ₂
69 g/l	gesamt	94 g/l	gesamt
=> 31 g/l für die Produktion von 8,8 g/l BTM => aus 1 g Sorbitol entstehen ca. 0,3 g BTM		=> 6 g/l für die Produktion von 2,3 g/l BTM => aus 1 g Sorbitol entstehen ca. 0,4 g BTM	

Abb. 38: C-Quellenbilanz bei Kultivierung von *G. oxydans* N44-1/ Klon 1 (A) und *G. oxydans* DSM 2343-*csndh/sdh-tufB* (B) mit 100 g/l (550 mM) Sorbitol in der „fedbatch-pro“-Parallel-Fermentationsanlage. Da die Zusammensetzung des im Komplexmedium enthaltenen MQW-Extrakts nicht bekannt ist, wurde dieser zusätzliche C-Quellenanteil bei der Bilanz nicht berücksichtigt.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 15.02.2003 bis zum 30.10.2006 unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. H. Sahm am Institut für Biotechnologie in der Forschungszentrum Jülich GmbH durchgeführt. Zunächst möchte ich mich bei ihm für die Bereitstellung des Themas, sein großes Interesse an der Entwicklung und dem Fortschritt der Ergebnisse und für seine Unterstützung bei Fragen und Problemen bedanken.

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

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. S. Bringer-Meyer und Frau Dr. U. Herrmann für die vielseitigen Hilfestellungen und Anregungen. Sie haben mich mit engagierter wissenschaftlicher Unterstützung durch diese Arbeit geführt, ließen mich dabei aber weitestgehend selbständig arbeiten.

All meinen Arbeitskollegen, insbesondere Marcel Merfort, Daniel Meißner, Verena Werner, Tobias Georgi, Vera Krajewski, Ursula Degner und Cornelia Gätgens möchte ich ebenfalls für viele gute Ratschläge, immer große Hilfsbereitschaft und für ständige motivierende Aufmunterungen herzlich danken.

Großer Dank gilt auch den Mitarbeitern Dr. Georg Kox, Dr. Christof Knocke und Malte Schneider der DASGIP AG, Jülich.

Bei Frau Dr. Dörte Becher und Annette Dreisbach möchte ich mich für den Forschungsaufenthalt am Institut für Mikrobiologie an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität in Greifswald sowie für die dort erhaltene Hilfe und Unterstützung bei meinen Arbeiten ganz besonders bedanken.

Herzlich danke ich ebenfalls meiner Freundin Jasna Popovic, die mir während der Promotion mit viel Verständnis, Geduld und Unterstützung zur Seite gestanden hat, und auch meinen Eltern, die mir nicht nur durch ihre finanzielle Unterstützung meine Ausbildung ermöglicht haben.

Abschließend danke ich nochmals allen Mitarbeitern des Instituts für Biotechnologie I für die freundliche Aufnahme und die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

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

Jülich, den 21.11.2006

(Christoph Bremus)