

Institut für Biotechnologie 1 (IBT-1)

***Reduktive Ganzzellbiotransformation
zur Gewinnung chiraler Alkohole
mit *Bacillus megaterium* und
*Corynebacterium glutamicum****

Carsten Bäumchen

***Reduktive Ganzzellbiotransformation
zur Gewinnung chiraler Alkohole
mit *Bacillus megaterium* und
*Corynebacterium glutamicum****

Carsten Bäumchen

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 4265

ISSN 0944-2952

Institut für Biotechnologie 1 (IBT-1) Jül-4265

D 61 (Diss., Düsseldorf, Univ., 2007)

Vollständig frei verfügbar im Internet auf dem Jülicher Open Access Server (JUWEL)
unter <http://www.fz-juelich.de/zb/juwel>

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek, Verlag

D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

☎ 02461 61-5220 · Telefax: 02461 61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Die vorliegende Arbeit wurde von Juni 2004 bis Juni 2007 unter Anleitung von Prof. H. Sahm am Institut für Biotechnologie 1 des Forschungszentrums Jülich GmbH angefertigt.

Teile der vorliegenden Dissertation erschienen in folgenden Publikationen:

- Expression of *glf_{Z.m.}* increases D-mannitol formation in whole cell biotransformation with resting cells of *Corynebacterium glutamicum*. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, DOI 10.1007/s00253-007-0987-8
- D-Mannitol production by resting whole cell biotransformation of D-fructose by heterologous mannitol and formate dehydrogenase genes expression in *Bacillus megaterium*, 2007, Biotechnol J, DOI 10.1002/biot.20700055
- The two *myo*-inositol facilitators IolT1 and IolT2 transport D-fructose in *Corynebacterium glutamicum* and increase productivity of D-fructose to D-mannitol conversion by whole-cell biotransformation (submitted)

Abstract

The present work studied whether the Gram-positive bacteria *Bacillus megaterium* and *Corynebacterium glutamicum* were suitable for reductive whole-cell biotransformations. The conversion of D-fructose to D-mannitol and methyl acetoacetate (MAA) to (*R*)-methyl-3-hydroxybutanoate (MHB) was investigated in order to characterize the recombinant strains. Formate dehydrogenase was used to regenerate the cofactor NADH. The investigation focused on the long-term stability of the biocatalysts, which was evaluated by a quantitative analysis of the intracellular NAD(H) concentration during the biotransformation. The good cofactor retention expected for the Gram-positive organisms was confirmed. Both of the species studied displayed stable productivity over a period of up to three days and thus differed significantly from the *E. coli* whole-cell biotransformation, which showed an 80-90 % drop in specific productivity within 8 hours.

Furthermore, the sugar transport in *C. glutamicum* was to be characterized in more detail for the conversion of D-fructose to D-mannitol, which had proved limiting for the biotransformation. By overexpressing the glucose/fructose facilitator gene from *Zymomonas mobilis* it was possible to increase the productivity of *C. glutamicum* 5.5-fold (final concentration 470 mM of D-mannitol after 24 hours). Genome-wide homology comparisons were used to identify two proteins (CGL0181 and CGL3058) of *C. glutamicum*, which had great structural similarity to GLF. Overexpression and deletion experiments showed that these transporters can transport D-fructose into the cytoplasm in a non-phosphorylated form, which had not previously been shown for *C. glutamicum*. The D-mannitol productivity of *C. glutamicum* was doubled with the aid of these transporters and, in addition to *B. megaterium*, *C. glutamicum* proved to be a stable microorganism for the biotransformation.

With *C. glutamicum* and *B. megaterium*, the conversion of MAA to MHB proceeded significantly more slowly and within 24 hours yielded low final concentrations (5-10 mM, 10 % conversion). A substrate turnover of 50-80 % was achieved by increasing the solvent fraction for biotransformations with substrate-coupled cofactor regeneration. Both species displayed a high solvent tolerance, which provides a starting point for more extensive work with solvent-dependent biotransformation systems.

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob sich die Gram-positiven Bakterien *Bacillus megaterium* und *Corynebacterium glutamicum* für die reduktive Ganzzellbiotransformation eignen. Zur Charakterisierung der rekombinanten Stämme wurde die Umsetzung von D-Fruktose zu D-Mannitol und Methylacetoacetat (MAA) zu (*R*)-Methyl-3-hydroxybutanoat (MHB) untersucht. Für die Regenerierung des Kofaktors NADH wurde die Formiatdehydrogenase genutzt. Im Mittelpunkt der Untersuchungen stand die Langzeitstabilität der Biokatalysatoren, die durch quantitative Analyse der intrazellulären NAD(H)-Konzentration während der Biotransformation beurteilt wurde. Die für die Gram-positiven Organismen erhoffte gute Kofaktorretention bestätigte sich. Beide untersuchten Spezies zeigten über einen Zeitraum von bis zu 3 Tagen stabile Produktivitäten und unterschieden sich damit signifikant von der *E. coli*-Ganzzellbiotransformation, die innerhalb von 8 Stunden einen 80-90%-igen Abfall der spezifischen Produktivität zeigte.

Für die Umsetzung von D-Fruktose zu D-Mannitol sollte zudem der Zuckertransport bei *C. glutamicum* näher charakterisiert werden. Dieser erwies sich als limitierend für die Biotransformation. Durch Überexpression des Glukose/Fruktose Facilitatorgens aus *Zymomonas mobilis* konnte die Produktivität von *C. glutamicum* um das 5,5-fache gesteigert werden (Endkonzentration 470 mM D-Mannitol nach 24 Stunden). Mit Hilfe von genomweiten Homologievergleichen konnten zwei Proteine (CGL0181 und CGL3058) von *C. glutamicum* identifiziert werden, die eine hohe Strukturähnlichkeit zu GLF besaßen. Überexpressions- und Deletionsexperimente zeigten, dass diese Transporter D-Fruktose in nicht phosphorylierter Form in das Zytoplasma transportieren können, was für *C. glutamicum* bisher noch nicht gezeigt wurde. Mit Hilfe dieser Transporter konnte die D-Mannitol Produktivität von *C. glutamicum* verdoppelt werden und *C. glutamicum* erwies sich neben *B. megaterium* als stabiler Mikroorganismus bei der Biotransformation.

Die Umsetzung von MAA zu MHB mit *C. glutamicum* und *B. megaterium* verlief deutlich langsamer und erzielte innerhalb von 24 Stunden niedrige Endkonzentrationen (5-10 mM, 10% Umsatz). Durch Erhöhung des Lösungsmittelanteils bei Biotransformationen mit substratgekoppelter Kofaktorregenerierung konnte eine Substratumsatz zwischen 50-80% erreicht werden. Beide Spezies zeigten eine hohe Lösungsmittel-Toleranz, was ein Ansatzpunkt für weiterführende Arbeiten mit Lösungsmittel-abhängigen Biotransformationssystemen ist.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
1.1	<i>Bacillus megaterium</i>	6
1.2	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	7
1.3	Ziel der Arbeit	7
2	Material und Methoden	9
2.1	Enzyme, Chemikalien und Medien	9
2.2	Überprüfung und Anpassung der Kodonnutzung der heterologen Gene .	9
2.3	Bakterien und Plasmide	9
2.4	Nährmedien und Medienzusätze	11
2.5	Kultivierung der Stämme und Geninduktion	12
2.6	Molekulargenetische Methoden	13
2.6.1	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	13
2.6.2	Bestimmung der DNA-Konzentration	13
2.6.3	Restriktion und Rekombination von DNA	14
2.6.4	Agarosegel-Elektrophorese	14
2.6.5	Polymerasekettenreaktion (PCR)	15
2.6.6	Bestimmung der Biotrockenmasse	15
2.7	Mikrobiologische Methoden	15
2.7.1	Gewinnung kompetenter Zellen von <i>C. glutamicum</i>	16
2.7.2	Elektroporation von <i>C. glutamicum</i>	16
2.7.3	Gewinnung kompetenter Zellen von <i>B. megaterium</i>	17
2.7.4	Transformation von <i>B. megaterium</i>	17
2.7.5	Transformation kompetenter Zellen von <i>E. coli</i>	17
2.8	Biochemische Methoden	18
2.8.1	Zellaufschluss	18
2.8.2	Bestimmung der Enzymaktivitäten	18
2.8.3	Bestimmung der intrazellulären NAD(H)-Konzentration	19
2.8.4	Bestimmung des NAD(H)-Gesamtpools mittels HPLC	20
2.8.5	Bestimmung von D-Fruktose und D-Mannitol mittels HPLC	21
2.8.6	Bestimmung chiraler Hydroxyverbindung durch GC	21
2.8.7	Bestimmung der intrazellulären D-Fruktosekonzentration	21
2.8.8	Bestimmung des zytoplasmatischen Volumens	22
2.8.9	Bestimmung des zytoplasmatischen pH-Gradienten	23
2.8.10	Durchführung von Ganzzell-Biotransformationen	24

3	Ergebnisse	25
3.1	Konstruktion der Ganzzellbiokatalysatoren <i>B. megaterium</i> und <i>C. glutamicum</i>	25
3.1.1	Formiatdehydrogenase aus <i>Mycobacterium vaccae</i> N10	25
3.1.2	Mannitol-2-Dehydrogenase aus <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	27
3.1.3	D-Glukose/D-Fruktose Facilitator aus <i>Zymomonas mobilis</i>	28
3.1.4	Alkoholdehydrogenase aus <i>Lactobacillus brevis</i>	29
3.1.5	Stamm <i>B. megaterium</i> pARBm-fdh-mdh	30
3.1.6	Stamm <i>B. megaterium</i> pARBm-fdh-mdh pHBIntE-glf	31
3.1.7	Stamm <i>B. megaterium</i> pCBBm-fdh-lbadh	32
3.1.8	Stamm <i>C. glutamicum</i> pEKEx2-fdh-mdh	32
3.1.9	Stamm <i>C. glutamicum</i> pEKEx2-fdh-mdh pVWEx2-glf	32
3.1.10	Stamm <i>C. glutamicum</i> pEKEx2-fdh-lbadh	33
3.2	D-Mannitolbildung mit <i>B. megaterium</i>	34
3.3	D-Mannitolbildung mit <i>C. glutamicum</i>	40
3.4	D-Fruktosetransport in <i>C. glutamicum</i>	48
3.4.1	D-Fruktoseaufnahme im Deletionsstamm <i>C. glutamicum</i> $\Delta ptsF$	49
3.4.2	Genloci <i>Cgl0181</i> und <i>Cgl3058</i> als mögliche D-Fruktosetransporter	49
3.5	MHB-Bildung mit <i>B. megaterium</i> und <i>C. glutamicum</i>	52
4	Diskussion	57
4.1	Gewinnung von D-Mannitol mittels Ganzzellbiotransformation	57
4.2	MHB-Bildung mit <i>B. megaterium</i> und <i>C. glutamicum</i>	64
A	Anhang	67
	Literaturverzeichnis	77

1 Einleitung

Die Synthese von natürlichen organischen Verbindungen ist für die Pharma- und Lebensmittelindustrie von großer Bedeutung. Die hohen Qualitätsansprüche erfordern hierbei sehr häufig hochreine regio- und enantioselektive Produkte (Patel, 2003; Wandrey, 2004). Die Herstellung solcher Verbindungen ist zu einem sehr interessanten Gebiet der 'weißen Biotechnologie' geworden, da bei der chemischen Synthese meist hohe Drücke, hohe Temperaturen, sowie sehr aufwendige Trenn- und Reinigungsverfahren erforderlich sind.

Enzymatisch katalysierte Reaktionen sind fast ausschließlich regio- und enantioselektiv, was einen großen Vorteil eines biotechnischen Prozesses im Vergleich zum chemischen Verfahren ausmacht. Unter den Stoffumwandlungen mit biologischen Katalysatoren können drei Formen unterschieden werden (Hartmeier, 1986):

1. isolierte Enzyme (frei, verkapselt, immobilisiert)
2. ganze Zellen mit geeigneten Stoffwechselwegen (frei oder immobilisiert)
3. ganze Zellen mit rekombinant exprimierten Genen (frei oder immobilisiert)

Die Fortschritte auf den Gebieten der Mikrobiologie und Molekularbiologie ermöglichen es, rekombinante Bakterienstämme zu erzeugen, die für biotechnische Prozesse, z.B. für die Biotransformation, genutzt werden können.

Mehr als die Hälfte der industriellen Biotransformationen werden mit hydrolytischen Enzymen (Proteasen, Esterasen, Lipasen) durchgeführt (Jaeger u. a., 2006). Diese Enzyme sind in organischen Lösungsmitteln stabil, können heterolog und homolog in großer Menge produziert werden und benötigen keine Kofaktoren. Oxygenasen und Dehydrogenasen benötigen hingegen für ihre katalytische Aktivität die Kofaktoren NAD(H) oder NADP(H) (Liu und Wang, 2007). Biotechnische Prozesse, bei denen die Enzyme *in vitro* eingesetzt werden, können erst durch Zugabe dieser Kofaktoren ablaufen. Das Supplementieren solcher Ansätze mit Kofaktoren ist sehr kostenintensiv und nur bei Produkten mit hoher Wertschöpfung wirtschaftlich (Wandrey, 2004). Eine Lösung dieses Problems liegt in dem Einsatz von ganzen Zellen, die über einen natürlichen NAD(P)(H)-Pool verfügen. Bei diesem Verfahren dient die Zytoplasmamembran der Zellen als Barriere, die die Enzyme und die Kofaktoren unter physiologischen Bedingungen hält und so vom Inkubationsmedium abtrennt. Dieser Einsatz von Zellen als Mikro-Membran-Reaktor wird als Ganzzell-Biotransformation bezeichnet.

Biotransformationen, bei denen das Primärprodukt durch die reduktive katalytische Aktivität eines Enzyms gebildet wird, werden als reduktive Biotransformationen bezeichnet. Vor allem Oxidoreduktasen (z.B. Dehydrogenasen) benötigen für ihre Aktivität die Reduktionsäquivalen NADH bzw. NADPH als Kofaktoren. Für eine effiziente Biotransformation, vor allem unter ruhenden Bedingungen, ist es erforderlich, dass die Reduktionsäquivalente regeneriert werden. Die Kofaktorregenerierung kann über ein Enzym/Substrat-System, chemisch, elektrochemisch oder photochemisch erfolgen (Chenault u. a., 1988; Chenault und Whitesides, 1987). Bei reduktiven Biotransformationen mit Mikroorganismen wird die Kofaktorregenerierung durch ein Enzym/Substrat-System realisiert. Eine gut untersuchte Möglichkeit zur Regeneration von NADH bietet die enzymatische Oxidation von Formiat zu Kohlendioxid durch die Aktivität einer Formiatdehydrogenase (Galkin u. a., 1995). In den vergangenen Jahren gab es mehrere erfolgreiche Ansätze, mit dem Mikroorganismus *Escherichia coli* reduktive Ganzzellbiotransformationen durchzuführen. Bei einigen Stämmen wurde zur Regenerierung des Kofaktors NADH ein Formiatdehydrogenasegen aus dem Bakterium *Mycobacterium vaccae* N10 oder aus der Hefe *Candida bodinii* koexprimiert (Müller u. a., 2005a). Bei den durch Ganzzellbiotransformation gebildeten Produkten handelte es sich um die Substanzen D-Mannitol (Kaup u. a., 2004), (*R*)-Methyl-3-hydroxybutanoat (Ernst u. a., 2005; Zhang u. a., 2006) und L-*tert*-Leucin (Menzel u. a., 2004), die mittels der enzymatischen Katalyse ohne Nebenproduktbildung umgesetzt wurden. Ein alternatives Beispiel zur effizienten Regenerierung von Kofaktoren während der Biotransformation war die Bildung von Ethyl-4-Chloroacetoacet mittels einer Carbonyl-Reduktase in *E. coli* (Kizaki u. a., 2001). Zur Kofaktorregenerierung wurde in diesem Fall das Glukosedehydrogenasegen aus *B. megaterium* koexprimiert (Xu u. a., 2007). Durch Oxidation von D-Glukose zu D-Glukonat konnte der Kofaktor NADH und NADPH regeneriert werden.

Neben rekombinanten Stämmen von *E. coli* wurden auch Stämme von Gram-positiven Bakterienarten für die Biotransformation verwendet. So konnten Stämme von *Leuconostoc spec.* zur Gewinnung von D-Mannitol eingesetzt werden (von Weymarn u. a., 2003). Die Kofaktorregenerierung erfolgte in diesen Ansätzen allerdings mittels eines bestehenden Stoffwechselweges durch Oxidation von D-Glukose unter Bildung der Nebenprodukte Laktat und Acetat. Ein weiteres Beispiel für die Kofaktorregenerierung unter Ausnutzung eines bestehenden Stoffwechselweges konnte bei der Synthese von (2,5)-Hexandiol mit *Lactobacillus kefir* erreicht werden (Haberland u. a., 2002). Der zur

Substratreduktion notwendige Kofaktor NADPH wurde hierbei ebenfalls durch Verstoffwechselung des Kosubstrats D-Glukose regeneriert, wodurch eine dem D-Glukose Verbrauch entsprechende Laktatmenge als Nebenprodukt gebildet wurde.

Einige Spezies der *Bacillus*-Gattung wurden mittels Biotransformation zur Detoxifikation schädlicher organischer Verbindungen eingesetzt. Diese Substanzen wurden dabei von den Zellen durch selektive Biotransformation in nicht-pathogene bzw. unschädliche Substanzen umgesetzt. So konnte der regioselektive Abbau von 2-Phenylendiamin mittels Biotransformation durch *Bacillus cereus* realisiert werden (Takenaka u. a., 2006) und Stämme von *Bacillus megaterium* konnten zur Biotransformation von Herbizidderivaten des Acetanilins in nicht-toxische Abbauprodukte eingesetzt werden (Wang u. a., 2007). Dabei zeigten die *Bacillus*-Spezies eine hohe Toleranz gegenüber diesen toxischen Verbindungen. Auch bei Bakterien der *Corynebacterium* - *Mycobacterium*-Gruppe konnten Spezies identifiziert werden, die den in PVC (Polyvinylchlorid) enthaltenden Ester Di-Butyl-phthalat mittels Biotransformation abbauen konnten (Chao u. a., 2006; Chao und Cheng, 2007). Die Toleranz der Vertreter aus der *Bacillus*- und *Corynebacterium*-Gruppe gegenüber toxischen Substanzen könnte somit ein nützlicher Vorteil für die Ganzzellbiotransformation sein, bei denen organische Lösungsmittel zum Einsatz kommen.

Die vorherrschenden Bedingungen während der Biotransformation können für die eingesetzten Mikroorganismen eine Stresssituation hervorrufen: organische Lösungsmittel, Formiat, hohe CO₂-Entwicklung durch Aktivität der Formiatdehydrogenase und hohe extrazelluläre Salzkonzentrationen können zu Instabilisierung der Zellen, vor allem der Zellmembranen, beitragen (Cherrington u. a., 1991; Dixon und Kell, 1989). Bakterien wie *Bacillus megaterium* und *Corynebacterium glutamicum* haben einen effizienten Schutzmechanismus, um sich gegen Zelllysis durch osmotischen Stress zu schützen. Bei Hypoosmotischem Stress öffnen sich in wenigen Millisekunden mechanosensitive Kanäle, die kompatible Solute wie Prolin, Ectoin, Sorbitol oder Mannitol in das Außenmedium sekretieren und so die treibende Kraft für einen Wassereinstrom vermindern (Arakawa und Timasheff, 1985). Bei *C. glutamicum* konnte dabei im Gegensatz zu *E. coli* (Ajouz u. a., 1998) festgestellt werden, dass durch das Öffnen dieser Kanäle keine Kofaktoren aus dem Zytoplasma auströmen (Ruffert u. a., 1997). Die Retention von Kofaktoren innerhalb der Zelle ist für die Biotransformation essentiell und deshalb könnte *C. glutamicum* gegenüber *E. coli* einen deutlichen Vorteil bei der Biotransformation haben. Für Arten der Gattung *Bacillus* konnten ebenfalls mechanosensitive Kanäle identi-

fiziert werden (Hecker u. a., 2006) und für *B. megaterium* konnte bei hypoosmotischem Stress dank der Stressantwort keinerlei strukturelle oder morphologische Veränderungen der Zellen festgestellt werden (Nekolny und Chaloupka, 2000). Vertreter beider Spezies verfügen über effiziente Mechanismen, um osmotischen Stress abzubauen. Vor allem im Hinblick auf die D-Mannitolproduktion kann dies ein erheblicher Vorteil sein, da während der Biotransformation hohe Gelöstkonzentrationen an Festsubstanzen zum Einsatz kommen.

In vorausgegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass rekombinante Stämme von *E. coli* während der Biotransformation NAD(H) verlieren (Kaup, 2004), möglicherweise durch Permeabilisierung der Membranen (Heuser u. a., 2007; Walton und Stewart, 2004). Da die reduktive Biotransformation auf einen stabilen Pool an NAD(H) angewiesen ist, sank bei den geschädigten Zellen die Produktbildungsrate erheblich ab (90-100% innerhalb von 12 Stunden). Bei einigen Ganzzellbiotransformationsystemen konnte durch Zugabe von Kofaktoren die Produktivität der Zellen stabilisiert oder gesteigert werden (Menzel, 2006). Eine ökonomisch nutzbare Biotransformation hängt somit nicht nur von der Anfangsaktivität der Biokatalysatoren, sondern sehr stark auch von deren Stabilität ab.

In dieser Arbeit werden die Bakterienspezies *Bacillus megaterium* und *Corynebacterium glutamicum* im Zusammenhang mit der Ganzzellbiotransformation näher untersucht und zum ersten mal als Ganzzellbiokatalysatoren unter ruhenden Bedingungen eingesetzt.

1.1 *Bacillus megaterium*

Der Sporenbildner *B. megaterium* ist ein Gram-positives, Sporenbildendes Bodenbakterium, das 1884 erstmals von DE BARY beschrieben wurde (De Bary, 1884). Biotechnisch spielen Stämme von *B. megaterium* bei der industriellen Produktion von Penicillinamidase und Steroidhydrolasen eine große Rolle und ist *B. megaterium* der einzige bekannte aerobe Produzent von Vitamin B₁₂ (Barg, 2003). Weiterhin wird dieser Organismus zur Produktion von Amylasen für die Lebensmittelindustrie (Vihinen und Mantala, 1989) und zur Produktion der Glukosedehydrogenase als Kofaktor-regenerierendes Enzym für biochemische Reaktionen eingesetzt (Schmidt und Kittsteiner-Eberle, 1986). *Bacillus megaterium* wurde bereits erfolgreich bei der Biotransformation von Insektizi-

den (Saxena u. a., 1987) und Herbiziden (Dick und Quinn, 1995) eingesetzt und konnte so zur Bodenentgiftung verwendet werden. Das Potenzial von *B. megaterium* zur heterologen Genexpression (Rygus und Hillen, 1991) in Verbindung mit der außergewöhnlichen Widerstandsfähigkeit der Zellen gegenüber toxischen Verbindungen und unphysiologischen Bedingungen (Vary u. a., 2007) macht *B. megaterium* zu einem interessanten Wirtsorganismus für die reduktive Biotransformation.

1.2 *Corynebacterium glutamicum*

C. glutamicum wurde 1957 von KINOSHITA aus Bodenproben isoliert (Kinoshita u. a., 1957) und ist heutzutage der weltweit am meisten genutzte Organismus zu industriellen Produktion von Aminosäuren (Sahm u. a., 2000). Das Gram-positive Bakterium bildet keine Sporen, ist unbeweglich, Biotin-bedürftig und zeichnet sich durch seine keulenförmige Morphologie aus (coryne = griech. Keule). Aufgrund seiner biotechnischen Bedeutung für die Aminosäureproduktion (z.B. Lysin und Glutamat) wurde die Genetik, Biochemie und Physiologie dieser Spezies umfangreich erforscht (Eggeling und Bott, 2005). Daher ist *C. glutamicum* heute auf dem Gebiet der Metabolomics (Oldiges u. a., 2007) und der System-Biologie (Takors u. a., 2007) einer der meist untersuchten Mikroorganismen. Wegen seiner zusätzlichen Fähigkeit zur heterologen Genexpression und seiner hohen Stresstoleranz (Nottebrock u. a., 2003) wurde *C. glutamicum* als Wirtsorganismus für die reduktive Biotransformation ausgewählt.

1.3 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Konstruktion und Charakterisierung von Gram-positiven Ganzzellbiokatalysatoren, die mit dem Fokus der Langzeitstabilität zur nebenproduktfreien Gewinnung chiraler Zuckeralkohole (D-Mannitol) und chiraler Hydroxyverbindungen (MHB) unter ruhenden Bedingungen untersucht werden sollten. Als Ganzzellbiokatalysatoren wurden dabei Zellen der Spezies *Bacillus megaterium* und *Corynebacterium glutamicum* eingesetzt. Bei diesen Bakterien handelt es sich nicht um natürliche D-Mannitolproduzenten bzw. MHB-Produzenten, so dass Gene für entsprechende Enzyme heterolog exprimiert werden sollten, die die Reduktion der Substrate zum gewünschten Produkt katalysieren. Zur Gewinnung von D-Mannitol sollte das *mdh* Gen für die Mannitol-2-Dehydrogenase aus dem heterofermentativen Milchsäurebakterium

Leuconostoc pseudomesenteroides exprimiert werden; im Falle der Gewinnung von MHB wurde das Gen *lbadh* für die Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* exprimiert. Um eine effiziente Regenerierung des Kofaktors NADH zu ermöglichen, sollte das Formiatdehydrogenasegen *fdh* aus *Mycobacterium vaccae* N10 koexprimiert werden.

Die Biokatalysatoren sollten während der Biotransformation auf ihre Produktivität, aber vor allem auch auf die Stabilität des NAD(H)-Pools, die *in vivo* Stabilität der Enzyme und den zytoplasmatischen pH-Wert hin untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Enzyme, Chemikalien und Medien

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien der Firmen Sigma Chemie (Deisenhofen, Deutschland) und Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) in p.A.-Qualität verwendet. Hefeextrakt, Hirn-Herz-Infusion sowie Trypton wurden von DIFCO Laboratories (Detroit, USA) geliefert. Restriktionsenzyme und Puffer stammten von New England Biolabs (Frankfurt a.M., Deutschland). Die T-4 DNA Ligase wurde von Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) geliefert. Zu Klonierungszwecken wurde der Bakterienstamm *E. coli* Dh5 α von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Zur Kontrolle von DNA Fragmenten und Plasmiden wurde der 1 kB DNA Größenmarker von Promega eingesetzt (Madison, USA).

2.2 Überprüfung und Anpassung der Kodonnutzung der heterologen Gene

Die heterolog zu exprimierenden Gene stammten aus vier verschiedenen Bakterienarten und sollten in zwei Wirtsorganismen eingebracht werden. Aus diesem Grund war es erforderlich, die Kodonnutzung der einzelnen Gene in Bezug auf den Wirtsorganismus zu überprüfen. So sollte ausgeschlossen werden, dass eine ungünstige Kodonnutzung die Translationseffizienz herabsetzt. Vor der Amplifikation der Gene *fdh*, *mdh*, *lbadh* und *glf* zur Expression in *B. megaterium* und *C. glutamicum* wurde mittels der Software *Codon Adaptation Tool* (<http://www.jcat.de>, TU Braunschweig) (Yang u. a., 2007) die Kodonnutzung überprüft. Um ein Maß für den Anpassungsgrad eines DNA-Abschnittes an die Kodonnutzung des Mikroorganismus definieren zu können, führte Sharp et al. (1987) den *Codon Adaptation Index* (CAI) ein (Sharp und Li, 1987). Diese statistisch erhobene Zahl liegt zwischen 0 und 1, wobei ein Wert von 1 eine optimale Anpassung bedeutet. Dieser Wert wurde für *fdh*, *mdh*, *lbadh* und *glf* anhand der Genomdatenbank von *C. glutamicum* und *B. megaterium* mittels o.g. Software ermittelt.

2.3 Bakterien und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und Plasmide sind in den Tabellen 2.1 bis 2.4 dargestellt. Der *Escherichia coli* Stamm BL21(DE3) Star stammte von

Novagen (EMD Bioscience, Inc., Novagen Brand, Madison, USA), der *E. coli* Stamm DH5 α von Invitrogen (Carlsbad, USA). Die verwendeten Stämme von *Bacillus megaterium* sind Deletionsmutanten, die vom Parentalstamm DSM 319 abgeleitet wurden (Wittchen und Meinhardt, 1995). Klonierungsarbeiten zur Erzeugung rekombinanter Stämme von *B. megaterium* wurde im Rahmen einer Diplomarbeit von Andreas Roth (TU Braunschweig) durchgeführt. Stämme von *C. glutamicum* wurden vom Parental-Wildtypstamm *C. glutamicum* ATCC13032 abgeleitet (Kinoshita u. a., 1957). Die für die Klonierung der Expressionsplasmide verwendeten Oligonukleotide (Primer) sind im Anhang aufgelistet.

Tabelle 2.1: Die in dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme

Mikroorganismus	Genotyp	Referenz
<i>Bacillus megaterium</i> MS941 WH320 WH323 WH418	$\Delta nprM$ $\Delta lacZ$ $\Delta xylA$ $\Delta ptsHI$	(Wittchen und Meinhardt, 1995) (Wagner u. a., 2000) (Schmiedel u. a., 1997) (Wagner u. a., 2000)
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATTC13032 $\Delta Cgl0181$ $\Delta Cgl3058$ $\Delta Cgl0181 \Delta Cgl3058$ $\Delta ptsF$	Wildtyp WT mit chromosomaler Deletion von <i>Cgl0181</i> WT mit chromosomaler Deletion von <i>Cgl3058</i> WT mit chromosomaler Deletion von <i>Cgl0181</i> und <i>Cgl3058</i> WT mit chromosomaler Deletion von <i>ptsF</i>	(Krings u. a., 2006) (Krings u. a., 2006) (Krings u. a., 2006) (Moon u. a., 2005)
<i>Escherichia coli</i> DH5 α BL21(DE3) Star	DH5 α <i>Fthi-1 endA1 hsdR17(r-,m-) pE44 $\Delta lacU169(\phi 80 lacZ.M15 recA1 rA96 relA1$</i> F-, V-, <i>ion</i> , <i>rif</i> S, λ -lysogen mit T7 Gen 1 (Polymerase)	(Hanahan, 1983) (Studier und Moffatt, 1986)

Tabelle 2.2: Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide für *C. glutamicum*

Plasmid	Marker/Eigenschaft	Referenz
pVWEx2	Tet ^R , P _{tac} , lac ^I	(Wendisch, 1997)
pVWEx2- <i>glf</i>	<i>glf</i> aus <i>Z. mobilis</i>	Diese Arbeit
pVWEx2- <i>Cgl0181</i>	<i>Cgl0181</i> aus <i>C. glutamicum</i>	Diese Arbeit
pVWEx2- <i>Cgl3058</i>	<i>Cgl3058</i> aus <i>C. glutamicum</i>	Diese Arbeit
pEKEx2	Kan ^R , P _{tac} , lac ^I	(Eikmanns u. a., 1991)
pEKEx2- <i>fdh-mdh</i>	<i>fdh</i> aus <i>M. vaccae</i> , <i>mdh</i> aus <i>L. pseudomesenteroides</i>	Diese Arbeit
pEKEx2- <i>fdh-lbadh</i>	<i>fdh</i> aus <i>M. vaccae</i> , <i>lbadh</i> aus <i>L. brevis</i>	Diese Arbeit
pEKEx2- <i>lbadh</i>	<i>lbadh</i> aus <i>L. brevis</i>	Diese Arbeit

Tabelle 2.3: Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide aus *E. coli*

Plasmid	Marker/Eigenschaft	Referenz
pET24a(+)- <i>fdh-mdh</i>	<i>fdh</i> aus <i>M. vaccae</i> , <i>mdh</i> aus <i>L. pseudomesenteroides</i>	(Kaup u. a., 2004)
pZY507- <i>glf</i>	<i>glf</i> aus <i>Z. mobilis</i>	(Weisser u. a., 1995)
pBtac- <i>lbadh</i>	<i>lbadh</i> aus <i>L. brevis</i>	X-Zyme, Düsseldorf

2.4 Nährmedien und Medienzusätze

Zur Gewinnung von Zellen wurden alle Stämme ausschließlich auf Komplexmedien kultiviert, denen die entsprechenden Antibiotika zur Selektionierung von rekombinanten Zellen zugegeben wurden.

Zur Stammhaltung, sowie für Vor- und Hauptkulturen wurde *C. glutamicum* in BHI-Komplexmedium (brain-heart-infusion) kultiviert (Tauch u. a., 2002). Dieses Medium wurde ebenfalls zur Regeneration der Zellen nach der Elektroporation eingesetzt, wobei zusätzlich 0,5 M Sorbitol zugegeben wurde (Tauch u. a., 2002). Zur Selektionierung rekombinanter Zellen wurde Kanamycin (50 µg/ml) und/oder Tetracyclin (10 µg/ml) zugegeben.

Stämme von *B. megaterium* und *E. coli* wurden in LB-Vollmedium (Miller, 1972) kul-

Tabelle 2.4: Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide für *B. megaterium*

Plasmid	Marker/Eigenschaft	Referenz
pWH1520	Amp ^R (<i>E. coli</i>), Tet ^R (<i>B. megaterium</i>)	(Rygus und Hillen, 1991)
pWH1520- <i>fdh-mdh</i>	<i>fdh</i> aus <i>M. vaccae</i> , <i>mdh</i> aus <i>L. pseudomesenteroides</i>	Diese Arbeit
pMM1622	Amp ^R (<i>E. coli</i>), Tet ^R (<i>B. megaterium</i>)	(Malten u. a., 2005)
pARBM- <i>fdh</i>	adaptierte <i>fdh</i>	(Roth, 2006)
pARBM- <i>fdh-mdh</i>	adaptierte <i>fdh</i> , <i>mdh</i> aus <i>L. pseudomesenteroides</i>	(Roth, 2006)
pHBIntE	Amp ^R (<i>E. coli</i>), Ery ^R (<i>B. megaterium</i>)	(Barg, 2003)
pHBIntE- <i>glf</i>	<i>glf</i> aus <i>Z. mobilis</i>	(Roth, 2006)
051308pPCR-script	Chemisch synthetisierte, kodon-Nutzung-adaptierte <i>fdh</i>	GENEART, Regensburg

tiviert. Zu Selektionierung wurde je nach rekombinantem Stamm für *B. megaterium* Tetracyclin (10 µg/ml), Erythromycin (5 µg/ml), für *E. coli* Streptomycin (25 µg/ml) zugegeben.

2.5 Kultivierung der Stämme und Geninduktion

Die heterolog zu exprimierenden Gene befanden sich auf Expressionsvektoren unter der Kontrolle der induzierbaren Promotoren P_{Xyl} oder P_{Tac} . Durch gezielte Geninduktion durch Zugabe von 0,5% Xylose bzw. 0,7 mM IPTG (jeweils Endkonzentrationen) konnte so die Transkription und Translation der Gene realisiert werden. Alle rekombinanten Stämme wurden bei 30°C in 500 ml Schikanenkolben mit einem Füllvolumen von 50 ml Komplexmedium kultiviert. Die Schüttelfrequenz des Orbitalschüttlers (Infors, Schweiz) betrug 120 rpm bei einem Schütteldurchmesser von 0,5 m. Vor der Biotransformation wurden die Bakterienzellen in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,5 gewaschen und erneut abzentrifugiert (4°C, 10000 g, 10 Minuten). Zur Stammhaltung wurden alle rekombinanten Stämme einmal wöchentlich auf je einer LB-Agarplatte neu ausplattiert und über Nacht bei 30°C inkubiert. Den LB-Agarplatten waren die entsprechenden Antibiotika (s.o.) zugesetzt und die bewachsenen Platten wurden bei 4°C gelagert.

Zur heterologen Genexpression in *C. glutamicum* wurden 50 ml des Hauptkulturmediums mittels einer stationären Übernachtskultur zu einer OD ($\lambda = 600$ nm) von 0,5 angeimpft. Nachdem die optische Dichte einen Wert von 1,5 erreicht hatte (ca. 2 Stunden), erfolgte durch Zugabe von 0,7 μ M IPTG (Endkonzentration) die Geninduktion (Eggeling und Bott, 2005). Nach 5 Stunden Induktionszeit ($OD \approx 8$) wurden die Zellen abzentrifugiert (4°C, 10000 g, 10 Minuten) und gewaschen.

Zur heterologen Genexpression in *B. megaterium* wurden 50 ml des Hauptkulturmediums mittels einer stationären Übernachtskultur zu einer OD ($\lambda = 550$ nm) von 0,1 angeimpft. Nachdem die optische Dichte einen Wert von 0,3 erreicht hatte (ca. 2 Stunden), erfolgte durch Zugabe von 0,5 % Xylose (Endkonzentration) die Geninduktion (Barg, 2003). Nach 6 Stunden Induktionszeit wurden die Zellen abzentrifugiert (4°C, 10000 g, 10 Minuten) und gewaschen.

2.6 Molekulargenetische Methoden

2.6.1 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Überprüfung korrekt ligierter Expressionsplasmide wurden diese aus *E. coli* isoliert. Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte mittels alkalischer Lyse der Zellen und anschließender Silikatadsorption der Plasmide (Birnboim und Doly, 1979). Hierfür wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Die Plasmid-DNA wurde mit sterilem Wasser von den Säulen eluiert und bei -20°C gelagert.

2.6.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde spektralphotometrisch (NanoDrop ND-1000, Pqlab, Erlangen) durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm durchgeführt. Der Reinheitsgrad der präparierten DNA wurde mittels des Quotienten E_{260} / E_{280} und E_{260} / E_{230} bestimmt (Proteinverunreinigung). Die Probe wurde als nicht verunreinigt angesehen, wenn beide Quotienten zwischen 1,8 und 2,0 betrugen (Gallagher, 2007).

2.6.3 Restriktion und Rekombination von DNA

Alle Methoden und Techniken zur Restriktion, Präzipitation und Ligation von DNA-Fragmenten wurden nach SAMBROOK und RUSSELL (2000) durchgeführt (Sambrook und Russell, 2000). Für analytische Restriktionsansätze wurde ein Ansatz von 10 μl gewählt. Prinzipiell enthielt jeder Ansatz steriles Wasser, einen geeigneten Puffer, die zu verdauende DNA und das bzw. die Restriktionsenzyme. Die eingesetzte Menge an DNA betrug zwischen 0,5 und 1,0 μg . Für präparative Ansätze wurde ein Ansatz von 50 μl eingesetzt. Die DNA-Menge für solche Ansätze betrug zwischen 2 und 5 μg DNA. Den Restriktionsansätzen wurde ca. 5-10 U Enzym, sowie BSA (bovine serum albumine) wenn erforderlich, zugegeben und der Verdau erfolgte bei 37°C über Nacht (außer für *Bam*HI, 2 Stunden) Sambrook und Russell (2000). Die Auftrennung von DNA-Fragmenten zwischen 250 und 12000 Basenpaaren erfolgte mittels Gelelektrophorese in 1%igen TAE (50 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,35% (v/v) Essigsäure, pH 8,0)-Agarosegelen. Wurden DNA-Fragmente für weitere Arbeiten benötigt, wurden die Gelstücke ausgeschnitten und mittels des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. PCR-Produkte wurden zur Abtrennung von Proteinen, Primern und Nukleotiden mittels des QIAquick PCR Purification Kit gereinigt. Ligationen wurden mittels der T4-Ligase (Roche Diagnostics, Mannheim) bei 4°C über Nacht durchgeführt. Das molare Verhältnis von Insertionsprodukt und Zielplasmid betrug 3:1. Ein typischer Ligationsansatz bestand aus PCR-Produkt, Plasmid, T4 DNA Ligase Puffer und T4 DNA Ligase (5 U) und wurde mit sterilem Wasser auf ein Reaktionsvolumen von 10 μl aufgefüllt.

2.6.4 Agarosegel-Elektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten (PCR-Produkte, Plasmide) zur Größenkontrolle erfolgte mittels der Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook u. a., 1989). Als Gele dienten 1%-ige Agarose-Gele in Tris-Acetate-EDTA-Puffer pH 7,6 (TAE) als Laufpuffer. Für die Elektrophorese wurde die DNA-Probe mit 6-fach konzentriertem Ladepuffer versetzt und in separate Geltaschen pipettiert. Als Längenmarker diente eine 1 kb-DNA Leiter (Promega). Das Gel wurde horizontal in der Gelapparatur Sub-Cell GT (Bio-Rad, Hercules, USA) platziert und eine Spannung von 100 Volt angelegt. Die Dauer der Auftrennung betrug 30 bis 40 Minuten. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit dem in die DNA interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid ($0,5 \text{ mg l}^{-1}$) gefärbt, in Wasser gewaschen (je 10 Minuten) und unter UV-Beleuchtung bei einer Wellenlänge von $\lambda =$

312 nm fotografiert.

2.6.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Um Expressionsvektoren für die heterologe Genexpression zu ligieren, mussten die zu exprimierenden Gene von einer entsprechenden Vorlagen-DNA amplifiziert werden. Die *in vitro* Amplifikation von doppelsträngigen DNA-Fragmenten erfolgte mittels PCR (Rabinow, 1996). Als Primer dienten je zwei synthetische Oligonukleotide (Operon, Hilden, Deutschland), die komplementär zum amplifizierenden DNA-Abschnitt waren (Tab. A.1 - A.2). Die Durchführung der PCR erfolgte mit einem T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen, Deutschland). Für Expressionkonstrukte wurde zur Amplifikation der Gene der Phusion High-Fidelity PCR Mastermix (Finnzymes, Espoo, Finnland) nach Angaben der Hersteller verwendet. Zur Denaturierung der DNA wurde eine Temperatur von 95°C eingestellt. Die *annealing*-Temperatur der Primer wurde mittels des *Oligo Calculators* (University of Pittsburgh) ermittelt. Die Polymerisation der DNA erfolgte je nach Fragmentgröße über einen Zeitraum zwischen 30-60 Sekunden bei 72°C und über insgesamt 30 Zyklen.

2.6.6 Bestimmung der Biotrockenmasse

Die Bestimmung der Bakterientrockenmasse erfolgte spektrophotometrisch (Beckman DU 640) anhand von Zellen, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Proben mit einer OD₅₇₈ von 10 und 40 (*B. megaterium*) bzw. einer OD₆₀₀ von 10 und 40 (*C. glutamicum*) wurden für 24 Stunden bei 110°C getrocknet und anschließend in einem Exsikator abgekühlt. Anschließend wurde das Nettogewicht der getrockneten Biomasse bestimmt. Für *B. megaterium* ergab sich folgende Korrelation: Gramm Zell Trockengewicht pro Liter = 0,32 · OD₅₇₈. Für *C. glutamicum* ergab sich folgende Korrelation: Gramm Zell Trockengewicht pro Liter = 0,166 · OD₆₀₀.

2.7 Mikrobiologische Methoden

Zur Gewinnung rekombinanter Stämme mussten die Zellen eine Kompetenz zur Aufnahme fremder DNA entwickeln. Da sich die Protokolle zur Gewinnung kompetenter Zellen stark unterschieden und auch erheblich von den standardisierten Protokollen für *E. coli* abwichen, werden beide Methoden detailliert dargestellt. In Abbildung A.3 sind

die vier unterschiedlichen Plasmide dargestellt, durch deren Expression der reduktive Zyklus in den Zellen etabliert wurde.

2.7.1 Gewinnung kompetenter Zellen von *C. glutamicum*

Die Gewinnung kompetenter Zellen von *C. glutamicum* erfolgte nach dem Protokoll beschrieben von EGGELING und BOTT (Tauch u. a., 2002). 50 ml BHIS-Medium (Brain-Heart-Infusion mit 100 mM Sorbitol) wurden mit einer Kolonie von *C. glutamicum* angeimpft und bei 30°C über Nacht inkubiert. Aus dieser Vorkultur wurden 5 ml in 250 ml BHIS Medium (2 Liter Kolben) überimpft und diese Hauptkultur bis zu einer OD₆₆₀ von 1,5 angezogen und anschließend abzentrifugiert (10 Minuten, 10000 g, 4°C). Anschließend wurden die Zellen dreimal in 20 ml eiskaltem TG-Puffer (1 mM Tris, 10% (v/v) Glycerin, pH 7,5) gewaschen. Hierauf folgten zwei weitere Waschschrte in jeweils 50 ml eiskaltem 10% Glycerin (v/v) ehe die Biomasse in 1 ml 10% Glycerin (v/v) resuspendiert und in Aliquots zu je 100 µl aufgeteilt wurde. Die Zellen wurden sofort zur Transformation eingesetzt oder bei -198 °C schockgefroren und bei -70°C gelagert.

2.7.2 Elektroporation von *C. glutamicum*

Die Vorschrift für die Elektroporation von *C. glutamicum* mit anschließendem Hitzeschock entsprach den Angaben von TAUCH (Tauch u. a., 2002). Die Transformation bei *C. glutamicum* erfolgte durch Elektroporation mittels des BIORAD GENE PULSERS (Bio-Rad, München, Deutschland). 100 µl Zellen wurden mit ca. 200 ng Plasmid-DNA 5 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt (Typ 16 S 2086, Bio-Rad, München, Deutschland). Anschließend wurde die Biomasse mit 800 µl 10% (v/v) Glycerin überschichtet. Die anschließende Elektroporation erfolgte bei einer Spannung von 2,5 kV, einem Parallelwiderstand von 200 Ω und einer Kondensatorkapazität von 2,5 µF. Sofort nach der Elektroporation wurden die Zellen in 6 ml auf 46°C temperiertes BHIS-Medium gegeben und für 6 Minuten bei 46°C inkubiert. Diese Hitzebehandlung inaktiviert sehr wahrscheinlich die Restriktionsenzyme von *C. glutamicum*, so dass beim Einsatz heterologer DNA eine höhere Transformationseffizienz erzielt werden kann (Schafer u. a., 1994). Nach dem Hitzeschock wurden die Zellen 60 Minuten bei 30°C regeneriert und anschließend auf BHIS-Agarplatten zusammen mit dem entsprechenden Antibiotikum bzw. den Antibiotika über Nacht bei 30°C inkubiert.

2.7.3 Gewinnung kompetenter Zellen von *B. megaterium*

Die Zusammensetzung der einzelnen Medienbestandteile ist im Anhang detailliert aufgelistet und das Protokoll zu Gewinnung kompetenter Zellen von *B. megaterium* ist von BARG ET AL. beschrieben (Barg, 2003). Eine Kolonie von *B. megaterium* wurde in 50 ml LB-Medium über Nacht bei 30°C inkubiert. 1 ml dieser Vorkultur wurde in 50 ml Hauptkulturmedium AB3 (DIFCO, Detroit, USA) gegeben und bis zu einer $OD_{578} = 1$ inkubiert. Nach Abzentrifugation der Zellen (10 Minuten, 10000 g, 4°C) wurde die Biomasse in 5 ml SMMP-Medium (s. Anhang) überführt. Anschließend wurde sterile Lysozymlösung zugegeben (Endkonzentration: 2 mg Lysozym/ml). Während der Inkubationszeit von maximal 60 Minuten wurde alle 10 Minuten der Protoplastierungsgrad der Zellen mikroskopisch verfolgt. Waren mehr als 60% der Zellen protoplastiert, wurden die Zellen vorsichtig abzentrifugiert (10 Minuten, 1300 g, 4°C). Es folgte ein weiterer Waschschrift und eine erneute Resuspension der Protoplasten in 5 ml SMMP-Medium. Diese wurden in Aliquots zu je 500 μ l aufgeteilt und sofort zur Transformation eingesetzt oder bei -198°C in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

2.7.4 Transformation von *B. megaterium*

In einem sterilen Zentrifugenröhrchen (15 ml) wurden 500 μ l Protoplasten mit 0,5-1 μ g Plasmid-DNA 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1,5 ml PEG-P Lösung (Polyethylenglycol) mit einer Einwirkzeit von 2 Minuten bei Raumtemperatur. Die Zugabe von PEG-P Lösung sorgt für eine Permeabilisierung der Protoplastenmembran und erhöht die Transformationseffizienz (Rubinstein u. a., 1988). Nach Zugabe von 5 ml SMMP-Medium wurde das Zentrifugenröhrchen verschlossen und dreimal vorsichtig geschwenkt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (10 Minuten, 1300 g, 4°C) und das kaum sichtbare Pellet in 500 μ l SMMP-Medium resuspendiert. Dieser Ansatz wurde 90 Minuten unter leichtem Schwenken inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 2 ml flüssigen (42°C) CR5-Topagar überführt und dieser in Aliquots zu je 200 μ l auf vorgewärmten (30°C) LB-Agarplatten ausplattiert (Barg, 2003). Die Inkubation dieser Platten erfolgte bis zu 48 Stunden bei 30°C.

2.7.5 Transformation kompetenter Zellen von *E. coli*

Zur Transformation von *E. coli* wurde eine modifizierte Methode von HANAHAN eingesetzt (Hanahan, 1985). Dabei wurden die nach HANAHAN (1985) erstellten kompetenten Zellen verwendet.

tenten Zellen durch einen Hitzeschock transformiert (Hanahan, 1985).

2.8 Biochemische Methoden

2.8.1 Zellaufschluss

Für die Bestimmung der Aktivität zytosolischer Enzyme wurden frische, induzierte Zellen verwendet, die für den *in vitro*-Test aufgeschlossen wurden. Dazu wurden Bdie Zellen (Nassgewicht 0,2 g) in 1 ml KPi-Puffer (100 mM, pH 6,5) resuspendiert und 6 Minuten unter Kühlung im Eisbad mittels Ultraschall (Beschallungszyklus 0,5 bei einer Amplitude von 55) aufgeschlossen (Kampen u. a., 2004). Die Abtrennung der Zelltrümmer erfolgte durch Zentrifugation bei 20000 g für 60 Minuten und 4°C. Der gewonnene Überstand diente als Rohextrakt zur Bestimmung der Enzymaktivitäten.

2.8.2 Bestimmung der Enzymaktivitäten

Die Bestimmung der Enzymaktivitäten erfolgte durch eine spektrophotometrische Aufnahme von Enzymkinetiken (Spektrophotometer DU 640, Beckman, USA). Ausgehend von der aufgezeichneten Kinetik wurde zur Berechnung der spezifischen Enzymaktivität [U/mg Protein] folgende Formel verwendet:

$$A = \frac{\frac{\Delta E}{t} \cdot V}{c \cdot d \cdot \epsilon} \quad [\text{U/ml}] \quad (2.1)$$

(ΔE , Extinktionsänderung; t , Zeit [min]; V , Gesamtvolumen [μl]; d Schichtdicke der Küvette [cm]; ϵ , molarer dekadischer Extinktionskoeffizient von NADH = $6,22 \left[\frac{1}{\text{mM} \cdot \text{cm}} \right]$). Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach BRADFORD (1976) (Bradford, 1976). Zur Quantifizierung wurde eine Eichgerade mit Rinderserumalbumin erstellt. Ein Unit (U) Enzymaktivität wurde definiert als diejenige Menge Enzym, die 1 μmol NADH in einer Minute bei 30°C zu NAD umsetzt.

Formiatdehydrogenase (FDH) Die Aktivität der Formiatdehydrogenase wurde spektrophotometrisch durch die Absorption von NADH bei $\lambda = 340 \text{ nm}$ gemessen. Die Änderung der Absorption über der Zeit ($\Delta E/\text{min}$) ist proportional zu Aktivität der Formiatdehydrogenase. Für jede Messung wurde ein Zeitraum von 2 Minuten festgelegt.



Der Reaktionsansatz enthielt 200 mM Formiat, 2 mM NAD und 100 mM KPi-Puffer bei pH 7 (Schütte u. a., 1976). Das Gesamtvolumen jeder Probe betrug 1 ml, wobei 100 μ l unverdünnter Rohextrakt eingesetzt wurden.

Mannitoldehydrogenase (MDH) Die Bestimmung der Mannitoldehydrogenase-Aktivität erfolgte analog zum Verfahren, das für die FDH verwendet wurde. In diesem Fall wurde die Abnahme der Absorption von NADH über der Zeit bestimmt (Schema 2.3). Das Gesamtvolumen jeder Probe betrug 1 ml, wobei 100 μ l 1:10 und 1:100 verdünnter Rohextrakt eingesetzt wurden.



Der Reaktionsansatz enthielt 200 mM D-Fruktose, 200 μ M NADH und 100 mM KPi-Puffer bei pH 6,5 (Hahn u. a., 2003). Das Gesamtvolumen jeder Probe betrug 1 ml, wobei 100 μ l 1:10 und 1:100 verdünnter Rohextrakt eingesetzt wurden.

Alkoholdehydrogenase (LBADH) Die Bestimmung der LB-ADH Aktivität erfolgte ebenfalls über die Bestimmung der Abnahme der NAD(P)H-Absorption über der Zeit. Als Substrat für die LB-ADH diente Methylacetoacetat (MAA) das zu (R)-Methyl-3-hydroxybutanoat (MHB reduziert wurde) (Schema 2.4).



Ein Reaktionsansatz enthielt 1 mM Magnesiumchlorid, 200 μ M NAD(P)H und 100 mM KPi-Puffer bei pH 6,0 (Müller u. a., 2005b).

2.8.3 Bestimmung der intrazellulären NAD(H)-Konzentration

Die Bestimmung der intrazellulären NAD⁺ und NADH Konzentration erfolgte mittels einer enzymatisch katalysierten Redoxreaktion nach BERNOFSKY und SWAN (Bernofsky und Swan, 1973) (verändert durch SAN ET AL., 2002 und MORITZ ET AL., 2002). Von der Aktivität einer Alkoholdehydrogenase (ADH III) wurden Elektronen von NADH über PES (Phenanzinethosulfat) auf MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, Thiazolyl Blau) übertragen, welches durch diese Reduktion einen bei $\lambda = 570$ nm messbaren Farbumschlag zeigte. Die Änderung der Absorption über der Zeit war hierbei von der Konzentration an NAD(H) linear abhängig. Die Eichung wurde mit definierten Standards von NAD⁺ und NADH mit einer Endkonzentration zwischen 5 bis 100

μM durchgeführt. Der Zellaufschluss zur Gewinnung von NAD^+ oder NADH erfolgte mit 0,2 M Perchlorsäure für NAD^+ oder 0,2 M KOH für NADH . Vor dem enzymatischen Test wurden die Zellaufschlüsse neutralisiert, damit der Reaktionsmix bei der Messung nicht durch extreme pH-Werte inaktiviert wurde.

Zur Vorbereitung der Proben wurde 1 ml Biotransformationsansatz in je 300 μl 0,2 M Perchlorsäure (NAD^+ -Bestimmung) bzw. 300 μl 0,2 M KOH (NADH -Bestimmung) gegeben und 10 Minuten bei 50°C inkubiert. Die Zelltrümmer wurden anschließend abzentrifugiert (10000 g, 10 Minuten, 4°C) und der Überstand in ein neues Probengefäß überführt. Nach Abkühlen der Probe auf Eis wurden die Ansätze mit 0,2 M KOH bzw. 0,2 M Perchlorsäure sorgfältig neutralisiert (pH 7,0). Ein 1 ml Testansatz enthielt 50 μl Probe 300 μl , Wasser 50 μl Hefe Alkoholdehydrogenase III (10 Units) in 0,2 M Bicin, pH 8,0 und 600 μl Reagenzienmix. Dieser enthielt: 16% Ethanol (v/v) 13,0 mM EDTA pH 8,0, 1,4 mM MTT und 5,5 mM PES Bernofsky und Swan (1973). Jede Probe wurde sowohl mit, als auch ohne internem Standard (20-50 μM) einer Dreifachbestimmung unterzogen (2 Minuten, 30°C, $\lambda = 570 \text{ nm}$).

2.8.4 Bestimmung des NAD(H) -Gesamtpools mittels HPLC

Die Bestimmung des NAD(H) -Gesamtpools der Zellen erfolgte mittels HPLC unter Verwendung einer Umkehrphasenchromatographie (*Reversed Phase*) Säule (5 μm , 25 cm x 4,6 mm, Supelcosil LC18-T, Belfonte, PA, USA) und einer Ionenpaar-Reagenz (Tetrabutylammoniumhydrogensulfat, TBAS) in der mobilen Phase (Agius u. a., 2001). Zur Auftrennung der Pyridinnukleotide wurde ein Gradientenpuffer verwendet, der während der Laufzeit aus zwei Einzelpuffern generiert wurde (Puffer A: 100 mM Kaliumphosphat, pH 6,0, 4 mM TBAS, Puffer B: 70% Puffer A, 30% Methanol, pH 7,5). Während der Laufzeit wurde folgende Gradienteneinstellung gewählt: 100% A für 9 Minuten, 0-25 % B für Minuten, 25-90 % B für 2,5 Minuten, 90-100 % B für 2 Minuten, 100% B für 6 Minuten, 100 % A für 6 Minuten. Die Durchflussrate betrug 1,5 ml/min. Die Quantifizierung der Substanzen erfolgte mittels UV-Detektor bei einer Wellenlänge von $\lambda = 254 \text{ nm}$. Alle Proben wurden sowohl mit, als auch ohne internem Standard (0,5 mM) vermessen.

2.8.5 Bestimmung von D-Fruktose und D-Mannitol mittels HPLC

Die Bestimmung der D-Fruktose und D-Mannitolkonzentrationen der Biotransformationslösung erfolgt mittels HPLC und einen Brechungsindexdetektor (L-2490, Hitachi, Japan). Zur Auftrennung der Substanzen diente die Säule Biorad HPX-87C 300 x 7,8 mm bei einer Betriebstemperatur von 70°C. Die Durchflussrate betrug 0,6 ml pro Minute, wobei Wasser (HPLC grade) als mobile Phase diente (Kaup u. a., 2004).

2.8.6 Bestimmung chiraler Hydroxyverbindung durch GC

Das prochirale Keton Methylacetoacetat (MAA) und der chirale Alkohol (*R*)-Methyl-3-hydroxybutanoat (MHB) wurde mittels Gaschromatographie quantifiziert. Die Auftrennung der Substanzen erfolgte mit der Säule vom Typ Permabond Carbowax 20 M (50 m x 0.32 mm ID, Machery-Nagel, Düren, Deutschland) im Gaschromatographen CP-3380 (Varian, USA) unter Verwendung eines Temperaturgradienten (Tan, 2006). Die Ofentemperatur wurde 6 Minuten bei 70°C eingestellt und anschließend über 8 Minuten bei einer Steigerungsrate von 25°C pro Minute auf 160°C hochgeheizt. Die Detektion der Substanzen erfolgte mit einem Flammen-Ionisierungs-Detektor (FID). 50 mM n-Butanol diente als interner Standard. Abbildung A.1 zeigt ein typisches Chromatogramm zur Quantifizierung von Methylacetoacetat und (*R*)-Methyl-3-hydroxybutanoat.

2.8.7 Bestimmung der intrazellulären D-Fruktosekonzentration

Zur Quantifizierung der intrazellulären D-Fruktosekonzentration wurden 200 μ l Zellsuspension zusammen mit 50 μ g Ribitol als internem Standard mittels Silikonölzentrifugation in 20 μ l Perchlorsäure (20% v/v) zentrifugiert (30 s) (Klingenberg und Pfaff, 1977). Die Phase mit Perchlorsäure wurde vor der Zentrifugation mit 70 μ l Silikonöl der Dichte 1,04 g ml⁻¹ (Wacker, Burghausen, Deutschland) überschichtet. Dieser Schritt war erforderlich, da eine zeitintensive Aufbereitung der Zellen sehr wahrscheinlich zum unerwünschten Umsatz von D-Fruktose zu D-Mannitol geführt hätte. Der wässrige Überstand der Perchlorsäurephase wurde in ein frisches Zentrifugengefäß überführt und mittels Vakuumzentrifugation getrocknet (Eppendorf, Hamburg). Die wasserfreie Proben wurden in einer Lösung von 24 mM O-Methoxyhydroxylamin in Pyridin resuspendiert und 90 Minuten bei 30°C inkubiert. Die Derivatisierung von D-Fruktose und D-Mannitol erfolgte durch Zugabe von 1,8 Volumen N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamid und anschließender Inkubation für eine Stunde bei 65°C. Die Analyse der Proben

erfolgte per Gaschromatographie mit einem TraceGC (ThermoFinnigan, Mailand, Italien). Als Säule diente der Typ FS-Supreme (30 m x 0,25 mm, Chromatographie Service, Langerwehe, Deutschland). Injektor- und Detektortemperatur wurden auf 300°C eingestellt und die Auftrennung der Substanzen wurde durch einen linearen Temperaturgradienten von 60°C bis 320°C mit einer Heizrate von 30°C pro Minute und isothermalen Plateaus bei 280°C und 320°C für 3 bzw. 5 Minuten erreicht (Marin u. a., 2006).

2.8.8 Bestimmung des zytoplasmatischen Volumens

Für die Berechnung der zytoplasmatischen Metabolitenkonzentration war es erforderlich, das intra- und extrazelluläre Wasservolumen zu bestimmen. Durch Bestimmung dieser beiden Werte konnte das zytoplasmatische Volumen der Zellen berechnet werden (Rottenberg, 1979).

Zwei ml Probe aus dem Biotransformationsansatz wurde mit H₂O bidest. auf eine OD zwischen 3-5 eingestellt und 700 µl dieser Probe in ein Eppendorfgefäß überführt. Dazu wurden 10 µl der Gebrauchslösung (s.u.) hinzugegeben und der Ansatz 30 Sekunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Gebrauchslösung enthielt 7,5 µl H³-H₂O Lösung (ca. 10⁶ dpm) und 2,5 µl [C¹⁴]-Inulin Lösung (ca. 2,5 · 10⁵ dpm). Das H³-H₂O ist frei permeabel, während das [C¹⁴]-Inulin die Zytoplasmamembran der Zellen nicht passieren kann. Somit ist die mitgerissene Menge an H³-H₂O ein Maß für den intra- und extrazellulären Raum, wohingegen das mitgeschleppte [C¹⁴]-Inulin den periplasmatischen Wasserraum repräsentiert. Aus der Differenz dieser beiden Werte ließen sich die intrazellulären Volumina berechnen. Aus dem 710 µl Ansatz wurden nach der Inkubationszeit je 200 µl in insgesamt 3 Silikonölröhrchen überführt und abzentrifugiert (RT, 2000 x g, 30 Sekunden). Die Silikonröhrchen enthielten 70 µl Silikonöl (Wacker, Deutschland) und 30 µl Perchlorsäure (70% v/v). Jeweils 100 µl des Überstandes wurden in ein Szintillationsgefäß überführt und mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit überschichtet. Das Zellpellet bzw. die Zelltrümmer wurden in 100 µl H₂O resuspendiert und ebenfalls in ein Szintillationsgefäß überführt und mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit überschichtet (Dreifachansatz). Die insgesamt 6 Ansätze wurden auf ihre Radioaktivität hin untersucht. Die Berechnung des cytoplasmatischen Volumens erfolgte folgendermaßen (V_U = Zählvolumen des Überstandes, dpm_{Sed} = dpm des Sediments):

$$\text{H}_2\text{O Raum} = V_U \cdot \frac{\text{dpm H}_2^3\text{O}_{\text{Sed}}}{\text{dpm H}_2^3\text{O}_U} \quad (2.5)$$

$$\text{Periplasma} = V_U \cdot \frac{\text{dpm } [C^{14}]_{\text{Sed}}}{\text{dpm } [C^{14}]_U} \quad (2.6)$$

$$\text{Zytoplasmavolumen} = H_2O \text{ Raum} - \text{Periplasma} \quad (2.7)$$

2.8.9 Bestimmung des zytoplasmatischen pH-Gradienten

Während der Biotransformation wurde der zytoplasmatische pH-Wert von Zellen bestimmt um zu überprüfen, ob bzw. wie sich der pH-Wert im Verlaufe der Biotransformation ändert. Dazu wurde der pH-Gradient zwischen Zelle und Reaktionspuffer ermittelt. Der pH-Gradient über die Membran der Zellen während der Biotransformation wurde durch die Verteilung einer schwachen Säure im intra- und extrazellulären Raum ermittelt bzw. berechnet (Tangney u. a., 1993). Als schwache Säure diente $[U-^{14}C]$ -Benzoat die nur in ihrer undissoziierten Form (AH) in die Zelle gelangen konnte. Das Gleichgewicht hierbei war dann erreicht wenn galt: $[AH]_{INT} = [AH]_{EXT}$. Da die Säure innerhalb und außerhalb der Zelle die gleiche Dissoziationskonstante aufwies und die ionisierte Form unter den Biotransformationsbedingungen ($pH > pK + 1$) den weitaus größten Anteil darstellt, kann man aus der Gesamtverteilung der Säure über die Zytoplasmamembran auf die Verteilung der freien Säure schließen und den pH-Gradienten gemäß Formel 2.8 berechnen:

$$pH_{EXT} - pH_{INT} = \Delta pH = \log \left(\frac{A_{INT}^-}{A_{EXT}^-} \right) \quad (2.8)$$

Zur Bestimmung des pH-Gradienten wurden 700 μ l Zellsuspension (OD_{600} 2,5-3) mit der schwachen Säure $[U-^{14}C]$ -Benzoat (120 000 dpm/nmol) für 30 Sekunden bei 30°C inkubiert (Kashket, 1985). Die Konzentration des Benzoats in den Testansätzen betrug ca. 2,5 μ M. Jeweils drei Ansätze jeder Probe wurden anschließend durch Silikonölzentrifugation (RT, 2000 x g, 30 Sekunden) vom Medium abgetrennt und 100 μ l der Überstände, sowie 200 μ l der Sedimente für die Bestimmung der internen und externen Benzoatkonzentration angesetzt (Szintillationszähler). Um den Anteil an Benzoat zu bestimmen, der durch den periplasmatischen Bereich der Zellen eingeschleppt wurde, wurden durch CCCP (Carbonylcyanid- 3-Chlorophenylhydrazon, Sigma) deenergierte Zellen ($\Delta pH = 0$) eingesetzt. CCCP ist ein Entkoppler, der dafür sorgt, dass Benzoat in- und außerhalb der Zelle in gleicher Konzentration vorliegt. Somit kann die Menge an Benzoat bestimmt werden, die bei der Durchführung des Versuchs unspezifisch eingeschleppt wird. Die hierbei detektierte Konzentration an unspezifisch gebundenen Benzoat wurde vor der Berechnung von den Probenwerten AH_{INT} subtrahiert.

2.8.10 Durchführung von Ganzzell-Biotransformationen

Zellen mit einer Dichte von 20 g l^{-1} aus einem Hauptkulturmedium wurden für jede Biotransformationen eingesetzt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (10000 g , 5 Minuten, 4°C) abgeerntet und in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,5 gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in Biotransformationsmedium (500 mM D-Fruktose bzw 50 mM Methylacetoacetat, 250 mM Natriumformiat, 100 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,5) resuspendiert und unter pH statischen Bedingungen bei 30°C inkubiert. Zur Titration diente eine Lösung aus 3 M Ameisensäure und 3 M D-Fruktose. Zur Bestimmung der gebildeten CO_2 -Menge wurde der Biotransformationsansatz mit reinem Stickstoff begast und der Gasstrom aus dem Reaktionsgefäß durch eine Abgasgerät (DASGIP, Jülich, Deutschland) geleitet. Die spezifische Begasungsrate wurde auf $0,5 \text{ vvm}$ ($100 \text{ ml pro Minute}$) eingestellt. Biotransformationen ohne Bilanzierung der CO_2 -Entwicklung wurden ebenfalls unter pH-statisch Bedingungen durchgeführt. Das Stellmittel wurde hierbei durch einen separaten Titrator (TIM 856 Titrationmanager, Radiometer, Villarbanne, Frankreich) zutitriert.

3 Ergebnisse

Im ersten Ergebnisteil werden die unterschiedlichen Expressionsvektoren und deren Konstruktion für die Ganzzellbiokatalysatoren beschrieben. Anschließend wird auf die Expression der einzelnen Gene eingegangen, bevor die Resultate der Biotransformation und die Charakterisierung der Stämme dargelegt und verglichen werden.

3.1 Konstruktion der Ganzzellbiokatalysatoren *B. megaterium* und *C. glutamicum*

3.1.1 Formiatdehydrogenase aus *Mycobacterium vaccae* N10

Zur Regenerierung des Kofaktors NADH sollte das Gen für die Formiatdehydrogenase (FDH) in den Wirtsorganismen *C. glutamicum* und *B. megaterium* exprimiert werden. Die FDH katalysiert die Oxidation von Formiat zu Kohlendioxid, wobei NAD^+ zu NADH reduziert wird. Die NAD^+ -abhängige FDH aus *M. vaccae* N10 wurde bereits von GALKIN als kofaktorregenerierendes Enzym beschrieben (Galkin u. a., 1995). Die Affinitätskonstanten der FDH betragen 6 mM für Formiat und 35 μM für NAD^+ .

Um möglichst hohe Expressionslevel zu erzielen, wurde die Kodonnutzung der FDH in Bezug auf die beiden Wirtsorganismen überprüft. Für das Genom von *B. megaterium* ergab die Analyse der Kodonnutzung eine gemittelte, relative Adaptivität (CAI) von 0,45 (Yang u. a., 2007). Die Adaptivität ist ein Maß für das Auftreten von Kodons einer DNA-Sequenz, für die die korrespondierenden t-RNAs in nur sehr geringer Konzentration vorliegen. Ein Wert von 1 bedeutet hierbei eine optimal angepasste DNA-Sequenz, wie sie bei stark exprimierten Genen vorliegt. Kleine Werte (0,1-0,15) zeigen das Vorhandensein zahlreicher ungünstiger Kodons an. Die Anpassung der DNA-Sequenz verläuft daher nach der Strategie, unter Beibehaltung der Aminosäuresequenz, ungünstige Kodons durch günstigere zu ersetzen. Eine Analyse der entsprechenden Kodonnutzung für die Wildtyp DNA des *fdh* Gens ergab eine relative Adaptivität von 0,14, die sich somit erheblich von der gemittelten Adaptivität von *B. megaterium* unterschied. Aus dieser Analyse war ersichtlich, dass das Gen *fdh* aller Vorraussicht nach kein, oder ein nur sehr geringes Expressionslevel erreichen würde. Aus diesem Grund wurde die DNA-Sequenz des *fdh* Gens an die Kodonnutzung von *B. megaterium* mittels eines Softwaremoduls (www.jcat.de) angepasst. Die chemische Synthese der angepassten DNA-Sequenz (051308pPCR-Script) wurde von der Firma Geneart (Regensburg,

Deutschland) durchgeführt. Die Ligation des amplifizierten *fdh* Gens erfolgte in den *B. megaterium* Expressionsvektor pMM1622. Der Expressionsvektor zur heterologen Genexpression von *fdh* in *B. megaterium* erhielt die Bezeichnung: pARBm-*fdh*. Das

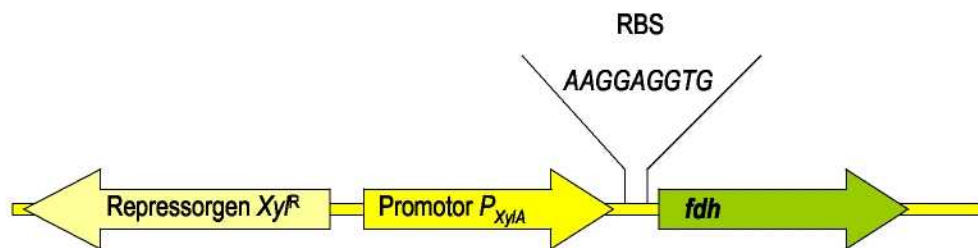


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des Operons zur Xylose-induzierbaren Expression des Gens *fdh* in *B. megaterium*

Gen *fdh* stand in diesem Operon unter Kontrolle des Xylose induzierbaren Promotors P_{XylA} , der in Abwesenheit von Xylose durch Bindung des Xylose-Repressors (Xyl_R) an den Operator reprimiert wird (Abbildung 3.1). Xyl_R ist autoreguliert und daher ist dieses regulatorische Protein immer in einer bestimmten Konzentration in der Zelle vorhanden (Lokman u. a., 1997).

Die Ermittlung der relativen Anpassung für die Kodonnutzung in *C. glutamicum* ergab einen Wert von 0,31. Für das Gen *fdh* lag die relative Adaptivität mit 0,36 etwas oberhalb der gemittelten Adaptivität von *C. glutamicum*, was eine gute Expression erwarten ließ. Eine Anpassung der Kodonnutzung zur erfolgreichen Expression des *fdh* Gens in *C. glutamicum* war somit nicht erforderlich. Das Gen *fdh* wurde mittels PCR aus dem Konstrukt pET24(+)-*fdh-mdh* (Kaup u. a., 2004) amplifiziert und mit eigener Ribosomenbindestelle in den Expressionsvektor pEKEx2 ligiert. Das Gen für die FDH stand in diesem Konstrukt unter Kontrolle des IPTG-induzierbaren P_{tac} Promotors. In Anwesenheit von D-Glukose wurde der Promotor durch Bindung des Repressors, kodiert durch das Gen *lacI^q*, reprimiert. (Abbildung 3.2).

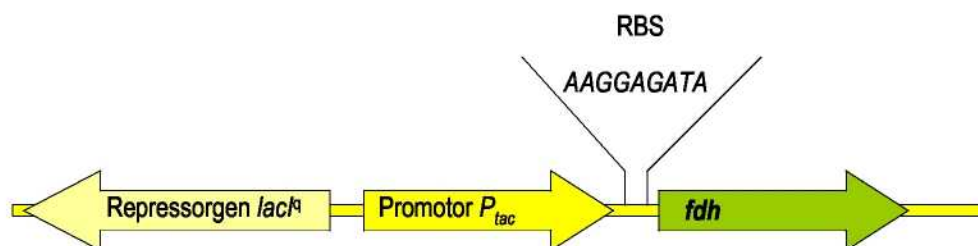


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des Operons zur IPTG-induzierbaren Expression des Gens *fdh* in *C. glutamicum*

3.1.2 Mannitol-2-Dehydrogenase aus *Leuconostoc pseudomesenteroides*

Als eines von zwei Produkt-bildenden Enzymen für die Biotransformation wurde die Mannitol-2-Dehydrogenase (MDH) aus *L. pseudomesenteroides* gewählt. Dieses Enzym katalysiert die Reduktion von D-Fruktose zu D-Mannitol, wobei der benötigte Kofaktor NADH unter ruhenden Wachstumsbedingungen der Zellen durch die Aktivität der FDH regeneriert wurde. Die K_M Werte der MDH liegen für D-Fruktose bei 44 mM (Kaup, 2004), für D-Mannitol bei 12 mM, für NAD^+ bei 201 μM und für NADH bei 93 μM . Die MDH erkennt ausschließlich D-Fruktose als Substrat (Hahn u. a., 2003). Die Ermittlung der relativen Anpassung der *mdh* DNA-Sequenz ergab für *B. megaterium* (0,45) einen Wert von 0,51 und für *C. glutamicum* (0,30) einen Wert von 0,22, so dass eine Anpassung der Kodonnutzung für das Gen *mdh* in beiden Fällen nicht erforderlich war.

Das Gen *mdh* wurde von dem Konstrukt pET24(+)-*fdh-mdh* amplifiziert und in den *Bacillus*-Expressionsvektor pARBm-*fdh* ligiert (Roth, 2006). Vor dem Startkodon des *mdh* Gens wurde eine optimierte Ribosomenbindestelle durch entsprechende Primerkonstruktion eingeführt. Innerhalb des Expressionsplasmids lag das Gen *mdh* in einem Operon direkt hinter dem *fdh* Gen (Abbildung 3.3). Dies ermöglichte die parallele Expression der beiden Gene zur Etablierung des Redoxzyklus. Der Expressionsvektor zur parallelen heterologen Genexpression von *fdh* und *mdh* in *B. megaterium* erhielt die Bezeichnung: pARBm-*fdh-mdh*.

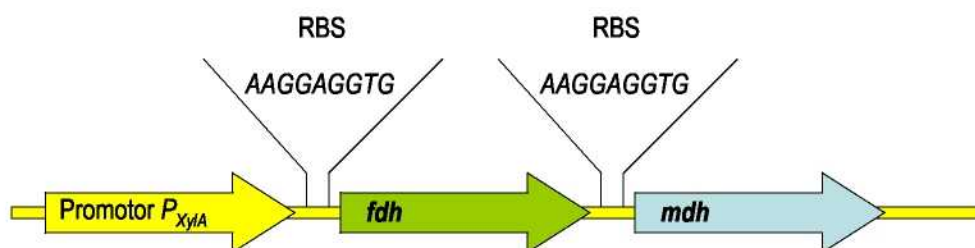


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung des Operons zur Xylose induzierbaren Expression der Gene *fdh* und *mdh* in *B. megaterium*

Für *C. glutamicum* wurde das Gen *fdh* zusammen mit dem Gen *mdh* als Tandemkonstrukt von pET24(+)-*fdh-mdh* amplifiziert und in den Expressionsvektor pEKEx2 (Eikmanns u. a., 1991) ligiert (Abbildung 3.4). Beide Gene verfügten über eine eigene Ribosomenbindestelle. Die Ribosomenbindestelle vor dem *mdh* Gen ist die Wildtyp-Bindestelle aus *L. pseudomesenteroides*. Der Expressionsvektor zur parallelen heterologen Genexpression von *fdh* und *mdh* in *C. glutamicum* erhielt die Bezeichnung:

pEKEx2-*fdh-mdh*.

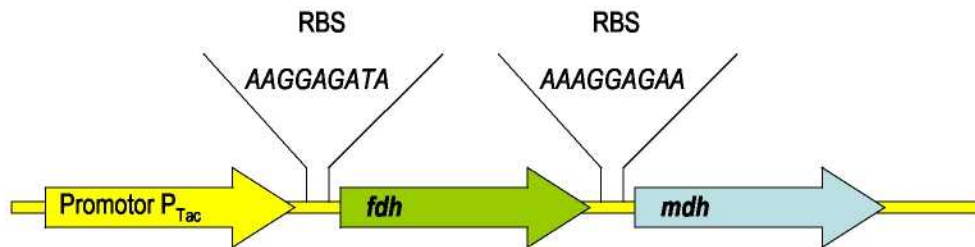


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung des Operons zur IPTG induzierbaren Expression der Gene *fdh* und *mdh* in *C. glutamicum*

3.1.3 D-Glukose/D-Fruktose Facilitator aus *Zymomonas mobilis*

B. megaterium und *C. glutamicum* nehmen Zucker, wie D-Fruktose und D-Glukose, über das hochspezifische Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferase System (PTS) auf (Deutscher u. a., 1995; Wagner u. a., 2000). Die Zucker werden bei dem Transportmechanismus phosphoryliert und stehen somit als Substrat dem Zentralstoffwechsel zur Verfügung.

Für eine effiziente Bildung von D-Mannitol aus D-Fruktose ist jedoch eine ausreichende Konzentration von unphosphorylierter D-Fruktose in der Zelle erforderlich, da nur freie D-Fruktose das Substrat für die MDH ist. Der Ethanol bildende Bakterienstamm *Z. mobilis* kann sowohl D-Fruktose als auch D-Glukose mittels erleichterter Diffusion aufnehmen ohne diese Zucker dabei zu phosphorylieren. Dies geschieht durch einen D-Glukose/D-Fruktose Facilitator (GLF), dessen Gen auch in *E. coli* funktionell exprimiert werden konnte (Parker u. a., 1995; Weisser u. a., 1995). Die Koexpression von *glf* neben dem *fdh* Gen und dem *mdh* Gen in *B. megaterium* und *C. glutamicum* sollte die intrazelluläre Konzentration unphosphorylierter D-Fruktose erhöhen und somit die D-Mannitolbildung steigern. Das Gen *glf* wurde aus dem *E. coli*-Expressionsvektor pZY507-*glf* (Weisser u. a., 1995) amplifiziert und in den *Bacillus*-Expressionsvektor pHBIntE (Barg, 2003), sowie in den *Corynebacterium*-Expressionsvektor pVWEx2 (Wendisch, 1997) ligiert. Dies war erforderlich, da der Replikationsursprung P15A von pZY507 in *B. megaterium* und *C. glutamicum* nicht erkannt wird und das Plasmid in diesen Organismen somit nicht repliziert werden kann. Dies haben Transformationsexperimente gezeigt, bei denen kein Zellwachstum auf einem Selektionsmedium gemessen werden konnte. Bei *B. megaterium* stand *glf* unter Kontrolle des Xylose-induzierbaren Promotors P_{Xyl} , bei *C. glutamicum* stand *glf* unter Kontrolle IPTG-induzierbaren Promotors

P_{tac} . Eine Anpassung der Kodonnutzung für das Gen *glf* war in beiden Fällen nicht erforderlich. Für *C. glutamicum* (0,3) lag der ermittelte Anpassungs-Wert der DNA-Sequenz für *glf* bei 0,26. Für *B. megaterium* (0,45) lag der ermittelte Anpassungs-Wert der DNA-Sequenz für *glf* bei 0,22. Dieser Wert wurde für eine erfolgreiche Expression des Gens als ausreichend angesehen.

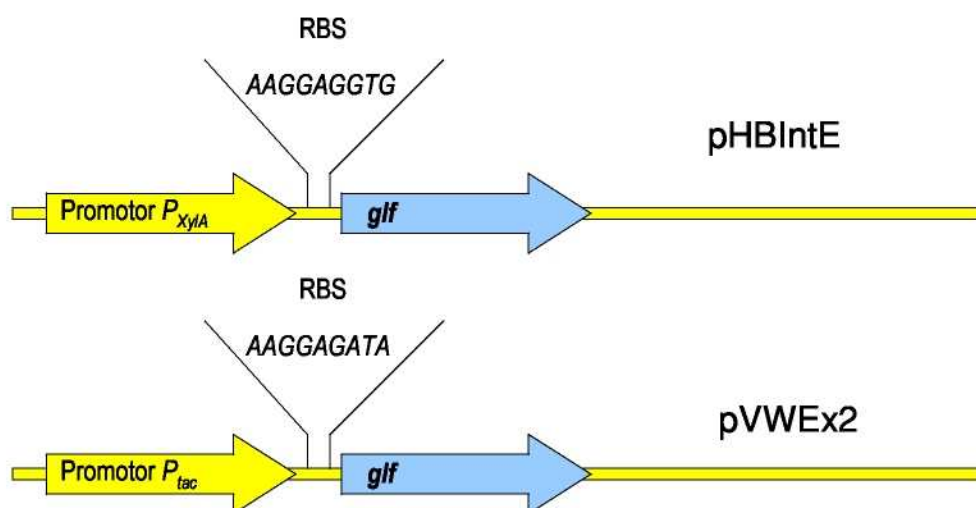


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung des Operons zur Expression des Gens *glf* in *B. megaterium* (oben) und *C. glutamicum* (unten)

3.1.4 Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis*

Zur Gewinnung chiraler Hydroxyverbindungen aus prochiralen Ketonen wurde das Gen für die (*R*)-spezifische Alkoholdehydrogenase LBADH aus *Lactobacillus brevis* exprimiert. Die Bestimmung der relativen Adaptivität der *lbadh* in Bezug auf die Kodonnutzung lieferte für *B. megaterium* (0,45) den Wert 0,4 und für *C. glutamicum* (0,3) den Wert 0,21. Eine Anpassung der DNA-Sequenz an die Kodonnutzung beider Wirtsorganismen war somit für das Gen *lbadh* nicht erforderlich. Dennoch handelt es sich bei der DNA-Sequenz nicht um die Wildtyp-Sequenz, da bei Basenpaar 730 Cytosin durch Thymin ersetzt wurde (patentrechtliche Gründe). Diese Punktmutation hatte allerdings keinen Einfluss auf die Aminosäuresequenz.

Das Gen *lbadh* wurde von dem Vektor pBtac-*lbadh* amplifiziert und in den *Bacillus* Expressionsvektor pARBm-*fdh* ligiert. Die Gene *fdh* und *lbadh* standen ebenfalls als Tandemkonstrukt unter der Kontrolle des Xylose induzierbaren Promotors P_{xyl} und verfügten je über eine eigene Ribosomenbindestelle. Der Expressionsvektor zur gleich-

zeitigen heterologen Genexpression von *fdh* und *lbadh* in *B. megaterium* erhielt die Bezeichnung: pCBBm-*fdh-lbadh* (Abbildung 3.6). Zur heterologen Expression des Gens

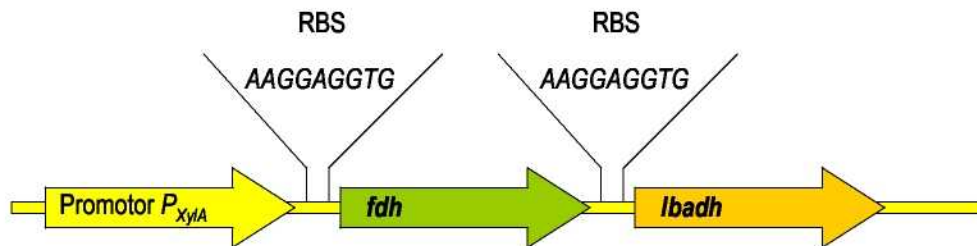


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung des Operons zur Xylose-induzierbaren Expression der Gene *fdh* und *lbadh* in *B. megaterium*

lbadh in *C. glutamicum* wurde die *lbadh* in das Expressionsplasmid pEKEx2 ligiert. Die Ligation des Gens *fdh* erfolgte danach. Ebenso wie bei *B. megaterium* lagen hier die Gene *fdh* und *lbadh* in einem Operon und verfügten je über eine eigene Ribosomenbindestelle. Der Expressionsvektor zur gleichzeitigen heterologen Genexpression von *fdh* und *lbadh* in *C. glutamicum* erhielt die Bezeichnung: pEKEx2-*fdh-lbadh* (Abbildung 3.7).

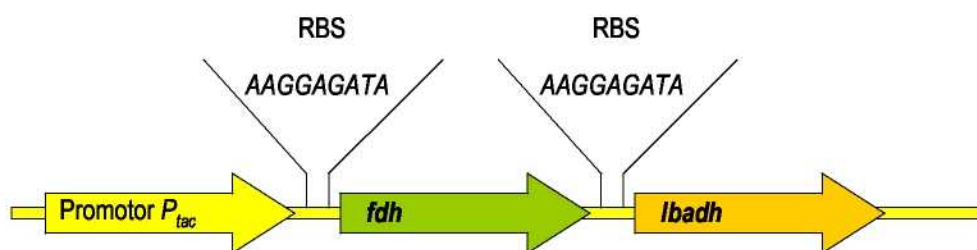


Abbildung 3.7: Schematische Darstellung des Operons zur IPTG-induzierbaren Expression der Gene *fdh* und *lbadh* in *C. glutamicum*.

3.1.5 Stamm *B. megaterium* pARBm-*fdh-mdh*

Nach Fertigstellung der rekombinanten Plasmide wurden vier verschiedene Stämme von *B. megaterium* transformiert und einer Expressionsanalyse unterzogen. Ziel dieser Untersuchung war die Ermittlung des Bakterienstammes mit den jeweils höchsten Enzymaktivitäten; dieser Stamm sollte danach für die Biotransformation eingesetzt werden. Es wurden folgende Stämme von *B. megaterium* untersucht: WH320 (Wagner u. a., 2000), WH323 (Schmiedel u. a., 1997), WH418 (Wagner u. a., 2000) und MS941 (Wittchen und Meinhardt, 1995). Die Expressionsanalyse erfolgte im Rahmen einer Diplomarbeit von Andreas Roth, TU Braunschweig, und lieferte das Ergebnis, dass *B.*

megaterium MS941 die höchsten Enzymaktivitäten für die FDH und MDH aufwies. Im folgenden Ergebnisteil sind die Resultate der Expressionsanalyse dargestellt, die in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden.

Nach einer Induktionszeit von 6 Stunden konnte für die FDH eine maximale, spezifische Aktivität von 0,9 U/mg Protein bestimmt werden. Diese Aktivität lag in einer Größenordnung, die bereits vorher für rekombinante Stämme von *E. coli* gemessen wurde (Ernst u. a., 2005; Kaup u. a., 2004). Für die MDH konnte nach 6 Stunden Induktionszeit eine spezifische Aktivität von 2,6 U/mg Protein gemessen werden. Die Aktivität der MDH war somit 2,9 fach höher als die Aktivität der FDH. Im Vergleich zu rekombinanten Stämmen von *E. coli* war die spezifische Aktivität der MDH bis ca. 5-fach geringer (Kaup u. a., 2004).

3.1.6 Stamm *B. megaterium* pARBm-*fdh-mdh* pHBIntE-*glf*

Die Koexpression des Gens *glf* diente dem Zweck, die D-Fruktoseaufnahme in das Zytoplasma zu erhöhen und somit die Produktivität der Zellen zu steigern. Für *B. megaterium* wurde bereits ein Genlocus beschrieben, der möglicherweise für eine PTS-unabhängige D-Fruktose-Permease kodiert. Die exakte Funktion dieses Proteins wurde von den Autoren allerdings nicht ermittelt (Chiou u. a., 2002). Die Fähigkeit von *B. megaterium* zur PTS-unabhängigen Aufnahme von D-Glukose und D-Fruktose konnte bereits gezeigt werden (Wagner u. a., 2000). Um die D-Fruktoseaufnahme der Zellen zu erhöhen, sollte der heterologe D-Glukose/D-Fruktose Facilitator aus *Z. mobilis* exprimiert werden. Um die Transportaktivität von GLF für D-Fruktose über die Zytoplasmamembran für *B. megaterium* nutzbar zu machen, wurde das Gen *glf* in den *Bacillus*-Expressionsvektor pHBIntE ligiert und konnte so exprimiert werden. Beide Plasmide wurden in *B. megaterium* MS941 transformiert und die *in vitro* Enzymaktivitäten der FDH und der MDH dieses Stammes bestimmt.

Durch die Koexpression des Gens *glf* sank die spezifische Aktivität der FDH von 0,9 U/mg Protein auf 0,7 U/mg Protein. Die Aktivität der MDH sank ebenfalls von 2,6 U/mg Protein auf 2,2 U/mg Protein. Offensichtlich führte die Koexpression von *glf* zur Reduktion der Expressionslevel für die Gene *fdh* und *mdh*. Für die Gewinnung von D-Mannitol aus D-Fruktose mittels reduktiver Ganzzellbiotransformation standen somit die beiden Biokatalysatoren *B. megaterium* pARBm-*fdh-mdh* und *B. megaterium* pARBm-*fdh-mdh* pHBIntE-*glf* zur Verfügung. Bei beiden Stämme wurde unter Biotransformationsbedin-

ungen die Produktivität und Stabilität der Enzyme, sowie die Stabilität der intrazellulären NAD(H)-Konzentration untersucht.

3.1.7 Stamm *B. megaterium* pCBBm-*fdh-lbadh*

Als zweite Produkt-bildende Dehydrogenase wurde die (*R*)-spezifische Alkoholdehydrogenase LBADH während der Biotransformation mit *B. megaterium* eingesetzt. Die LBADH erkennt sowohl NADPH, als auch NADH als Kofaktor und bevorzugt NADPH mit einem zehnfach kleineren K_M -Wert gegenüber NADH (Müller u. a., 2005c). Da die FDH strikt NAD^+ abhängig ist, steht über dieses Redoxsystem ausschließlich NADH zu Verfügung. Dennoch konnte bereits für rekombinante Stämme von *E. coli* gezeigt werden, dass der Redoxzyklus aus FDH und LBADH zu dieser effizienten Biotransformation eingesetzt werden kann (Ernst u. a., 2005). Bei *B. megaterium* lag die spezifische Aktivität der FDH bei 0,7 U/mg Protein. Die spezifische Aktivität der LBADH lag bei Nutzung des Kofaktors NADH bei 0,68 U/mg Protein und bei 6,9 U/mg Protein bei der Verwendung von NADPH als Reduktionsäquivalent. Im Gegensatz zum D-Mannitol produzierenden Stamm wurden im Fall von *B. megaterium* pCBBm-*fdh-lbadh* keine Maßnahmen zur Steigerung des Stofftransportes über die Membran unternommen. In der Literatur wird die Meinung vertreten, dass hydrophobe Agenzien wie Methylacetoacetat membrangängig sind (Walton und Stewart, 2004).

3.1.8 Stamm *C. glutamicum* pEKEx2-*fdh-mdh*

Die Expression des Gens *fdh* aus *M. vaccae* N10 in *C. glutamicum* erbrachte eine Enzymaktivität von 0,3 U/ mg Protein und lag damit deutlich unter dem Wert in *B. megaterium*. Für die MDH konnte eine spezifische Aktivität von 7,1 U/ mg Protein gemessen werden. Abbildung 3.8 im Anhang zeigt ein SDS-Gel mit den jeweiligen Banden der Proteine FDH und MDH. Somit stand auch von *C. glutamicum* ein Stamm zur Verfügung, der für die Biotransformation genutzt werden konnte.

3.1.9 Stamm *C. glutamicum* pEKEx2-*fdh-mdh* pVWEx2-*glf*

Zur Steigerung der D-Fruktoseaufnahmerate, wurde das Gen *glf* auch in *C. glutamicum* koexprimiert. Diese Koexpression hatte einen deutlichen Einfluss auf die Enzymaktivitäten der beiden Dehydrogenasen. Die spezifische Aktivität der FDH sank auf

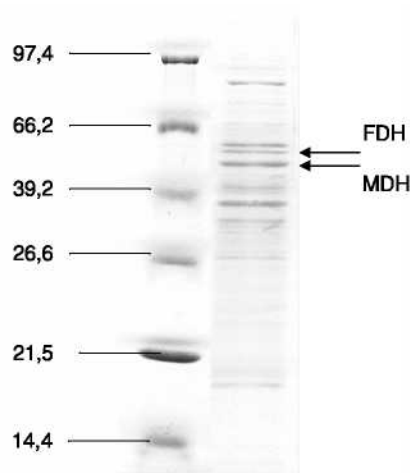


Abbildung 3.8: Abbildung eines SDS-Gels mit den Proteinbanden der FDH und MDH (Größenangaben in kD)

0,1 U/mg Protein und die spezifische Aktivität der MDH sank auf 2,8 U/mg Protein ab. Wie bei *B. megaterium* führte die Koexpression des Facilitatorgens zur Absenkung der Expressionslevel beider Dehydrogenasen.

3.1.10 Stamm *C. glutamicum* pEKEx2-*fdh-lbadh*

Für die Biotransformation von prochiralen Ketonen zu sekundären Alkoholen sollten auch rekombinante Zellen von *C. glutamicum* eingesetzt werden. Bevor der Stamm *C. glutamicum* pEKEx2-*fdh-lbadh* in der Biotransformation eingesetzt wurde, wurde eine Expressionsanalyse für die Gene *fdh* und *lbadh* durchgeführt. Für die FDH konnte nach einer Induktionszeit von 5 Stunden eine *in vitro* Enzymaktivität von 0,12 U/mg Protein gemessen werden; die Aktivität lag somit deutlich niedriger als bei *B. megaterium*. Für die LBADH konnte bei Nutzung des Kofaktors NADH eine Enzymaktivität von 0,4 U/mg Protein gemessen werden. Bei Nutzung des Kofaktors NADPH war eine 10-fach höhere Aktivität messbar; diese betrug 4 U/mg Protein und hatte ein vergleichbares Niveau wie bei *B. megaterium*. Somit stand auch von *C. glutamicum* ein rekombinanter Stamm zur Verfügung, der zur Gewinnung chiraler Alkohole eingesetzt werden konnte.

Zur Gewinnung von D-Mannitol und MHB standen von den Spezies *B. megaterium*

Tabelle 3.1: Übersicht über die Enzymaktivitäten der rekombinanten Stämme, die für die Biotransformation eingesetzt wurden. Die Enzymaktivitäten sind in U/mg Protein angegeben.

Stamm	FDH	MDH	LBADH (NADH)	LBADH (NADPH)
<i>B. megaterium</i> pARBm- <i>fdh-mdh</i>	0,9	2,6	-	-
<i>B. megaterium</i> pARBm- <i>fdh-mdh</i> pHBIntE- <i>glf</i>	0,7	2,2	-	-
<i>B. megaterium</i> pCBBm- <i>fdh-lbadh</i>	0,7	-	0,68	6,9
<i>C. glutamicum</i> pEKEx2- <i>fdh-mdh</i>	0,3	7,1	-	-
<i>C. glutamicum</i> pEKEx2- <i>fdh-mdh</i> pVWEx2- <i>glf</i>	0,1	2,8	-	-
<i>C. glutamicum</i> pEKEx2- <i>fdh-lbadh</i>	0,1	-	0,4	4,0

und *C. glutamicum* jeweils drei Stämme zur Verfügung. Während die spezifische Aktivität der FDH bei *B. megaterium* zwischen 0,7 bis 0,9 U/mg Protein lag, konnten für *C. glutamicum* lediglich spezifische Aktivitäten zwischen 0,1 bis 0,3 U/mg Protein erzielt werden (Tabelle 3.1). In allen 6 rekombinanten Stämmen war die spezifische Aktivität des Produkt-bildenden Enzyms höher als die Aktivität der FDH. Somit konnte erwartet werden, dass der Redoxzyklus nicht durch die spezifische Aktivität der Produkt-bildenden Dehydrogenase (MDH bzw. LBADH) limitiert sein würde.

3.2 D-Mannitolbildung mit *B. megaterium*

Der Stamm *B. megaterium* MS941 pARBm-*fdh-mdh* wurde nach der Analyse der Enzymaktivitäten auf seine Fähigkeit zur Bildung von D-Mannitol unter ruhenden Bedingungen untersucht. Ruhende Zellen von *B. megaterium* MS941 pARBm-*fdh-mdh* produzierten innerhalb von 24 Stunden Biotransformation 20-21 g l⁻¹ D-Mannitol (Abbildung 3.9). Dabei zeigten die Zellen eine konstante Produktbildungsrate von 1,6 mmol D-Mannitol pro Gramm Zelltrockengewicht und Stunde bei einer Ausbeute von $Y_{D\text{-Mannitol}/D\text{-Fruktose}} = 0,91$ mol%. Die Auswertung der CO₂ Entwicklung erbrachte eine nahezu equimolare CO₂-Bildungsrate von 1,54 mmol CO₂ pro Gramm Zelltrockengewicht und Stunde. Dieses Resultat zeigte, dass rekombinante Zellen von *B. megaterium* in der Lage wa-

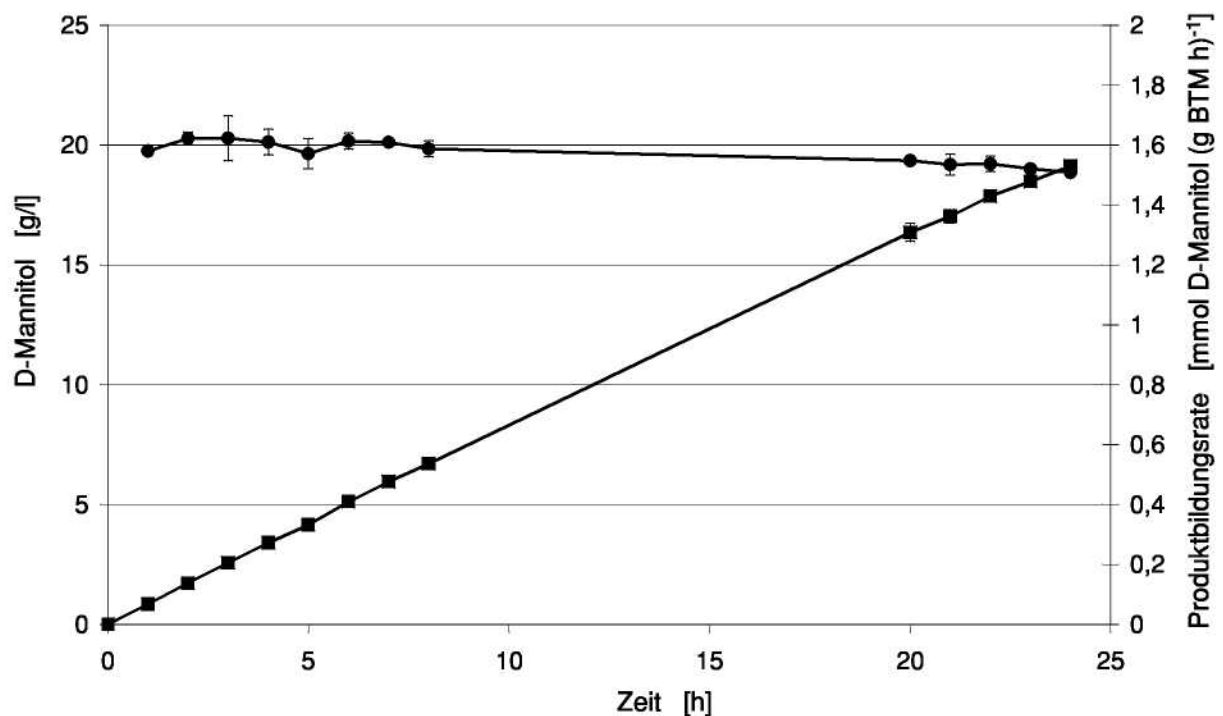


Abbildung 3.9: D-Mannitolkonzentration (■) und spezifische D-Mannitolbildungsrate (●) bei ruhenden Zellen des Stammes *B. megaterium* pARBm-*fdh-mdh* während der Biotransformation (500 mM D-Fruktose, 250 mM Formiat, 100 mM Kaliumphosphatpuffer, Titration mit 3 M D-Fruktose, 3 M Ameisensäure, 30°C, pH 6,5)

ren, die Substrate Formiat und D-Fruktose über die Zellmembran zu transportieren und ebenso D-Mannitol aus dem Zytoplasma in das Biotransformationsmedium zu sekretieren. Bei dem Aufnahmesystem für D-Fruktose muß es sich um einen Transporter oder eine Gruppe von Transportern handeln, die D-Fruktose ohne Phosphorylierung aufnehmen, da nur freie D-Fruktose im Zytoplasma ein Substrat für die MDH ist. *B. megaterium* wies gegenüber dem rekombinanten D-Mannitolproduzenten von *E. coli* (Kaup u. a., 2004) bereits zwei deutliche Unterschiede auf. 1. *B. megaterium* konnte D-Fruktose, ohne Koexpression eines heterologen Zuckertransporters, unphosphoryliert aufnehmen und 2. *B. megaterium* zeigte eine konstante Produktbildungsrate über mindestens 24 Stunden.

Durch die Koexpression des D-Glukosefacilitators *glf* aus *Z. mobilis* in *E. coli* konnte ein effizienter D-Mannitolproduzent mit hoher Anfangsaktivität erzielt werden. Um den Effekt von GLF auf die Produktivität von *B. megaterium* zu untersuchen, wurde der Stamm *B. megaterium* MS941 pARBm-*fdh-mdh* pHBIIntE-*glf* in der Biotransformation eingesetzt. Die Koexpression des Gens *glf* zeigte im Gegensatz zu *E. coli* einen nur ge-

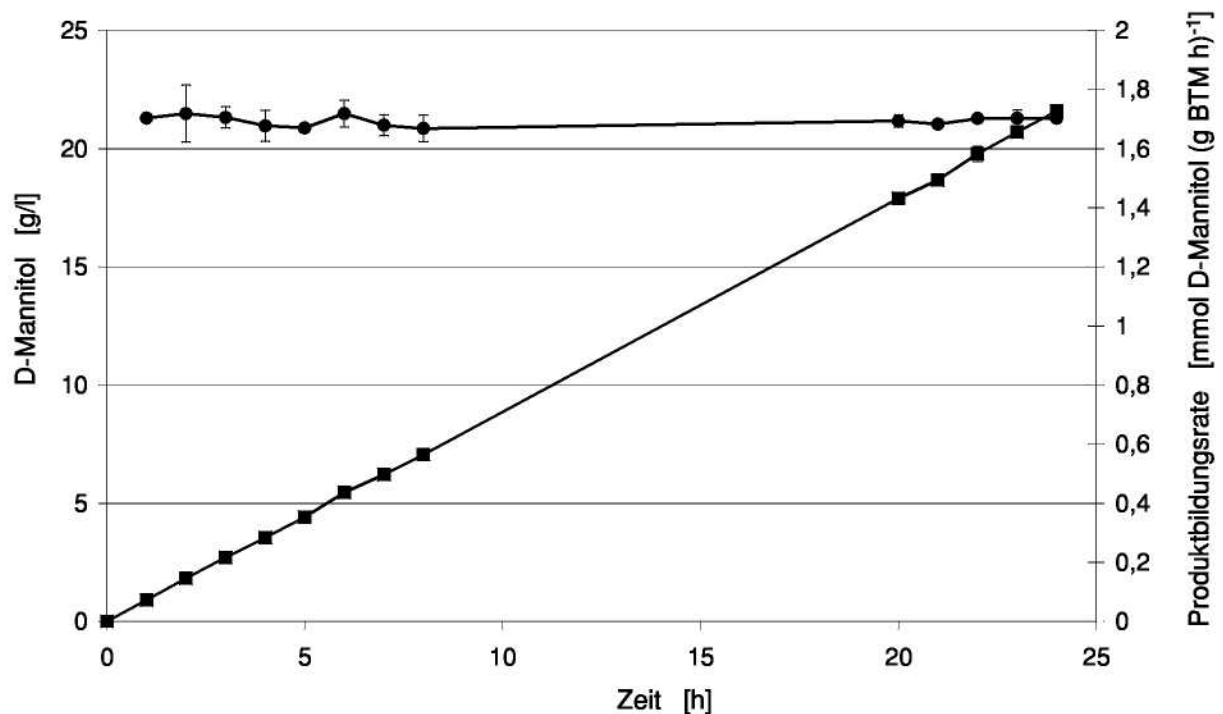


Abbildung 3.10: D-Mannitolkonzentration (■) und spezifische Mannitolbildungsrate (●) mit ruhenden Zellen des Stammes *B. megaterium* pARBm-*fdh-mdh* pHBIIntE-*glf* während der Biotransformation (500 mM D-Fruktose, 250 mM Formiat, 100 mM Kaliumphosphatpuffer, Titration mit 3 M D-Fruktose, 3 M Ameisensäure, 30°C, pH 6,5)

ringen Effekt auf die Produktbildungsrate (Abbildung 3.10). Nach 24 Stunden Biotransformation wurde eine D-Mannitolkonzentration von 22–24 g l⁻¹ D-Mannitol erzielt. Auch dieser Stamm zeigte eine konstante Produktbildungsrate von 1,9 mmol D-Mannitol pro Gramm Zelltrockengewicht und Stunde bei einer Ausbeute von $Y_{D-Mannitol/D-Fruktose} = 0,92$ mol%. Der Vergleich beider *B. megaterium*-Stämme zeigte, dass die Koexpression von *glf* eine Produktivitätssteigerung um den Faktor 1,6 erbrachte. Im Vergleich zum D-Mannitolproduzenten von *E. coli* ist diese Steigerung allerdings sehr gering. In *E. coli* führte die Koexpression von *glf* zu einer Steigerung der Produktivität um den Faktor 100 (10 mM Endkonzentration gegenüber 1 M Endkonzentration). Vermutlich wurde das Gen *glf* in *B. megaterium* nur schwach funktionell exprimiert.

Durch die Expression des Gens für die FDH und eines Gens für eine MDH konnte in *B. megaterium* ein reduktiver Zyklus zur Gewinnung von D-Mannitol etabliert werden. Die Ganzzellbiokatalysatoren zeigten dabei konstante und gut reproduzierbare Produktivitäten.

Bei Biotransformationen mit ruhenden Zellen von *E. coli* konnte eine Verringerung des NAD(H)-Pools der Zellen beobachtet werden (Kaup, 2004; Walton und Stewart, 2002). Dies war bei diesen Stämmen der limitierende Faktor für die Biotransformation. In diesem Zusammenhang sollte die Stabilität von *B. megaterium* während der Biotransformation bestimmt werden. Da die Verfügbarkeit von Kofaktoren für den Redoxzyklus essentiell ist, wurde der NAD(H)-Gesamtpool der Zellen sowohl enzymatische, als auch chromatografisch während der Biotransformation bestimmt (Abbildung 3.11). Zusätzlich wurde der zytoplasmatische pH-Wert während der Biotransformation bestimmt. Einige Autoren beschreiben den Effekt einer pH-Wert Erniedrigung des Zytoplasmas durch CO₂-Entwicklung bzw. Anwesenheit von Formiat (Kell u. a., 1981). Hierdurch kann es zur Inhibierung von Enzymaktivitäten kommen. Dieser Effekt wäre im Hinblick auf die Langzeitstabilität der Biokatalysatoren nicht erwünscht. Im Vordergrund der folgenden Untersuchungen stand daher die Bestimmung des NAD(H)-Pools und die Ermittlung des zytoplasmatischen pH-Wertes der Zellen während der Biotransformation. Mit diesen Bestimmungen sollte ermittelt werden, ob *B. megaterium* als Wirtsorganismus für Ganzzellbiotransformationen mit dem Anspruch der Langzeitstabilität geeignet ist. Wie

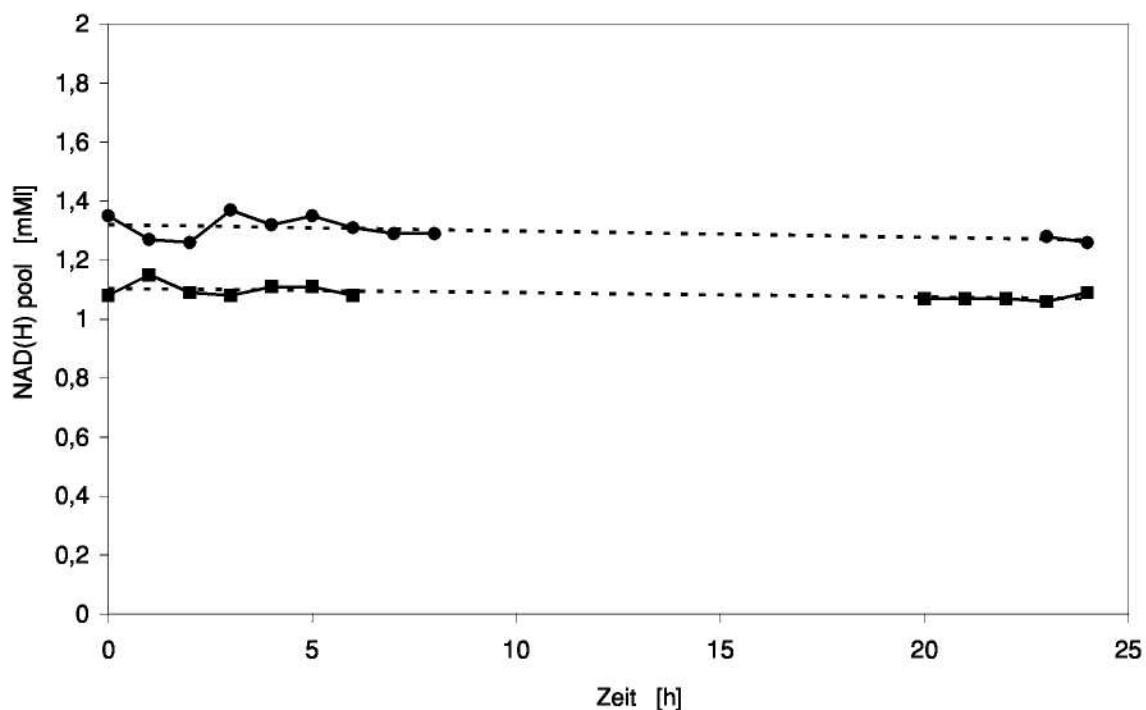


Abbildung 3.11: NAD(H)-Pool durch HPLC Bestimmung (■) und Cycling Assay (●) bei ruhenden Zellen des Stammes *B. megaterium* pARBm-*fdh-mdh* pHBIntE-*glf* während der Biotransformation (500 mM D-Fruktose, 250 mM Formiat, 100 mM Kaliumphosphatpuffer, Titration mit 3 M D-Fruktose, 3 M Ameisensäure, 30°C, pH 6,5)

in Abbildung 3.11 zu sehen ist, zeigten ruhende Zellen von *B. megaterium* während der ersten 24 Stunden der Biotransformation überprüfen einen konstanten NAD(H)-Pool zwischen 1,1 - 1,4 mM. Die Berechnung der intrazellulären Konzentration erfolgte mit Hilfe des zuvor bestimmten zytoplasmatischen Volumens von *B. megaterium* (2,6 μ l pro Gramm Zelltrockengewicht). Die gemessene NAD(H)-Pool Größe bewegte sich in der gleichen Größenordnung, die bereits zuvor für Zellen von *B. megaterium* bestimmt wurde (Setlow und Setlow, 1977). Ein Verlust von NAD(H) konnte für beide rekombinanten Stämme von *B. megaterium* nicht nachgewiesen werden. Während der Biotransformation stand somit eine gleichbleibende Konzentration an Kofaktoren zur Verfügung und trug neben stabilen Enzymaktivitäten zu einer konstanten Produktbildungsrate der Zellen bei (Abbildungen 3.9 und 3.10). Aus diesem Ergebnis konnte geschlossen werden, dass während der Biotransformation innerhalb des beobachteten Zeitraums keine Abnahme des intrazellulären NAD(H)-Pools auftraten. Auch in diesem Verhalten unterscheidet sich *B. megaterium* von dem rekombinanten D-Mannitolproduzenten von *E. coli*.

Das Verhältnis zwischen NADH und NAD⁺, läßt Rückschlüsse darauf zu, welche der beiden Dehydrogenasen den Redoxzyklus *in vivo* limitiert. Während der ersten 30 Minuten der Biotransformation mit *B. megaterium* pARBm-*fdh-mdh* pHBIntE-*glf* zeigte sich eine Verschiebung des Redoxverhältnisses zugunsten von NADH. Etwa 60-70% des NAD(H)-Pools lagen in der reduzierten Form vor (Abbildung 3.12). Das Ergebnis zeigte, dass der Redoxzyklus *in vivo* nicht durch die Aktivität der FDH limitiert war. Trotz der höheren *in vitro*-Aktivität der MDH, war der NADH-Pool signifikant höher als der NAD⁺-Pool. Dieser Befund konnte mit einer limitierenden Konzentration unphosphorylierter D-Fruktose erklärt werden. Die Ermittlung der intrazellulären D-Fruktosekonzentration lieferte Werte im Bereich von 30-50 mM und lag somit im Bereich des K_M-Wertes von D-Fruktose für die MDH (44 mM) (Kaup u. a., 2004). Eine gezielte Stammverbesserung sollte sich daher auf eine Erhöhung der Aufnahme rate für D-Fruktose fokussieren; eine Erhöhung spezifischer Enzymaktivitäten der beiden Dehydrogenasen führt vermutlich nicht zu einem effizienteren Biokatalysator. Durch Überexpression des D-Glukose/D-Fruktosefacilitators *glf* konnte in *B. megaterium* diese D-Fruktose-Limitierung allerdings nicht überwunden werden.

Zur Regenerierung von NADH *in vivo* wurde die katalytische Aktivität der FDH genutzt. Die Bildung von Kohlendioxid kann zum Absinken des zellinternen pH-Wertes und zur Inhibierung von Enzymen führen (Mitz, 1979). Niedrige pH-Werte (< 5) fördern zudem

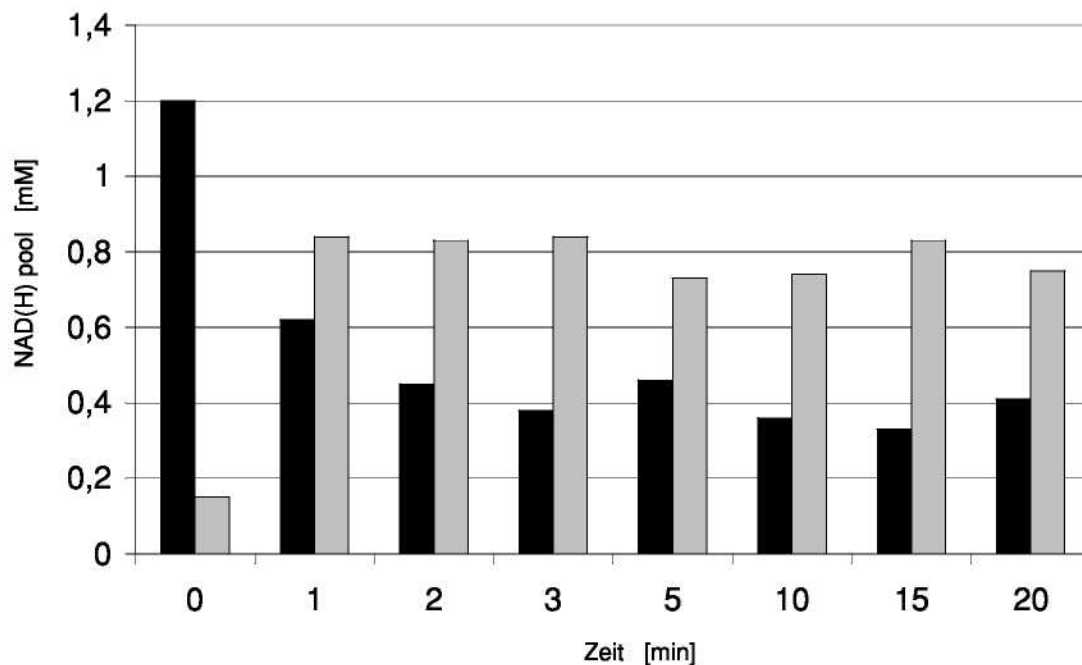


Abbildung 3.12: Verhältnis von NAD⁺ (schwarze Balken) und NADH (graue Balken) bei ruhenden Zellen des Stammes *B. megaterium* pARBm-*fdh-mdh* während der Biotransformation (500 mM D-Fruktose, 250 mM Formiat, 100 mM Kaliumphosphatpuffer, Titration mit 3 M D-Fruktose, 3 M Ameisensäure, 30°C, pH 6,5)

die chemische Degradierung von Reduktionsäquivalenten wie NADH (Schröder, 2003). Die Bestimmung des NAD(H)-Pools zeigte eine konstante Poolgröße über einen Zeitraum von mindestens 24 Stunden; ein Hinweis dafür, dass der intrazelluläre pH-Wert nicht unter pH 5 lag. Es wurde während der Biotransformation der pH-Wert des Zytoplasmas bestimmt (Abbildung 3.13). Zellen der rekombinanten Stämme *B. megaterium* pARBm-*fdh-mdh* und *B. megaterium* pARBm-*fdh-mdh* pHBIntE-*glf* wurden über einen Zeitraum von 120 Minuten einer Bestimmung des zytoplasmatischen pH-Wertes unterzogen. Zu Beginn der Biotransformation lag der zytoplasmatische pH-Wert bei 7,3. Innerhalb der ersten 30 Minuten während der Biotransformation sank der zytoplasmatische pH-Wert auf einen Wert von ca. 6,5 ($\pm 0,1$) und sank somit auf den pH-Wert des Biotransformationspuffers ab. Dieser pH-Wert lag im physiologischen Bereich (pH 5,5-8) und führte nicht zu einer Inhibierung der Enzymaktivitäten der FDH und MDH. Dieses Phänomen war damit erklärbar, dass nicht das Formiat, sondern die Ameisensäure die Membran frei passieren konnte und somit ein Proton in die Zelle eingetragen wurde. Die Ameisensäure wirkte dabei als Entkoppler, bis der intrazelluläre und extrazelluläre pH-Wert äquivalent war (Cherrington u. a., 1991).

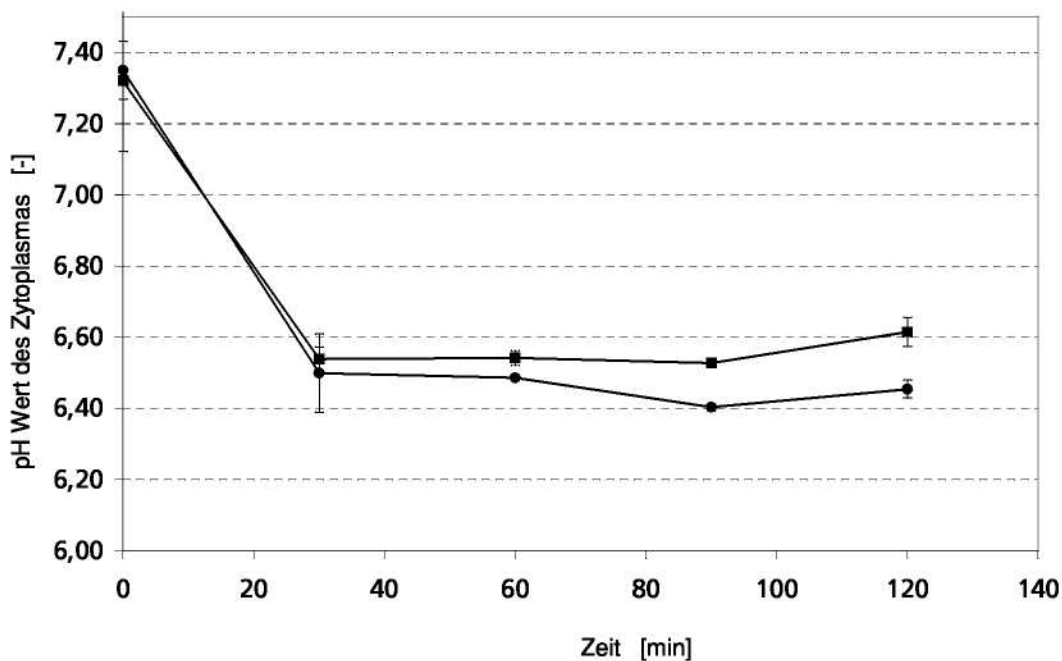


Abbildung 3.13: Zytoplasmatischer pH-Wert bei ruhenden Zellen des Stammes *B. megaterium* pARBm-*fdh-mdh* während der Biotransformation (500 mM D-Fruktose, 250 mM Formiat, 100 mM Kaliumphosphatpuffer, Titration mit 3 M D-Fruktose, 3 M Ameisensäure, 30°C, pH 6,5)

3.3 D-Mannitolbildung mit *C. glutamicum*

Zur Gewinnung von D-Mannitol mittels reduktiver Biotransformation wurden rekombinante Zellen von *C. glutamicum* ATCC 13032 eingesetzt (Kapitel 3.1.8). Zellen von *C. glutamicum* pEKEx2-*fdh-mdh* wurden unter identischen Bedingungen wie *B. megaterium* inkubiert und produzierten 16 g l⁻¹ D-Mannitol innerhalb von 24 Stunden. Der Stamm zeigte bei einer konstanten D-Mannitolbildungsrate von 1,2 mmol D-Mannitol pro Zellrockengewicht und Stunde eine Ausbeute von $Y_{D\text{-Mannitol}/D\text{-Fruktose}} = 0,88$ mol% (Abbildung 3.14). Die Resultate der Biotransformation mit *B. megaterium* haben gezeigt, dass die geringe D-Fruktoseaufnahme in die Zellen die Produktionsrate limitierte. Beide rekombinanten Spezies produzierten zwischen 16 und 20 g l⁻¹ D-Mannitol. Ebenso wie bei *B. megaterium* wurde der Effekt von GLF auf die Produktivität von *C. glutamicum* während der Biotransformation gemessen. Durch die Koexpression von *glf* konnte die Produktivität der Zellen um das 5,5 fache gesteigert werden und *C. glutamicum* pEKEx2-*fdh-mdh* pVWEx2-*glf* produzierte bei einer konstanten Produktbildungsrate von 6,86 mmol D-Mannitol pro Gramm Zellrockengewicht und Stunde 87 g l⁻¹ D-Mannitol. Die Ausbeute dieser Biotransformationen betrug $Y_{D\text{-Mannitol}/D\text{-Fruktose}} = 0,92$ mol%. Die Kohlendioxid-Bildungsrate lag mit 6,1 mmol CO₂ pro Gramm Zell-

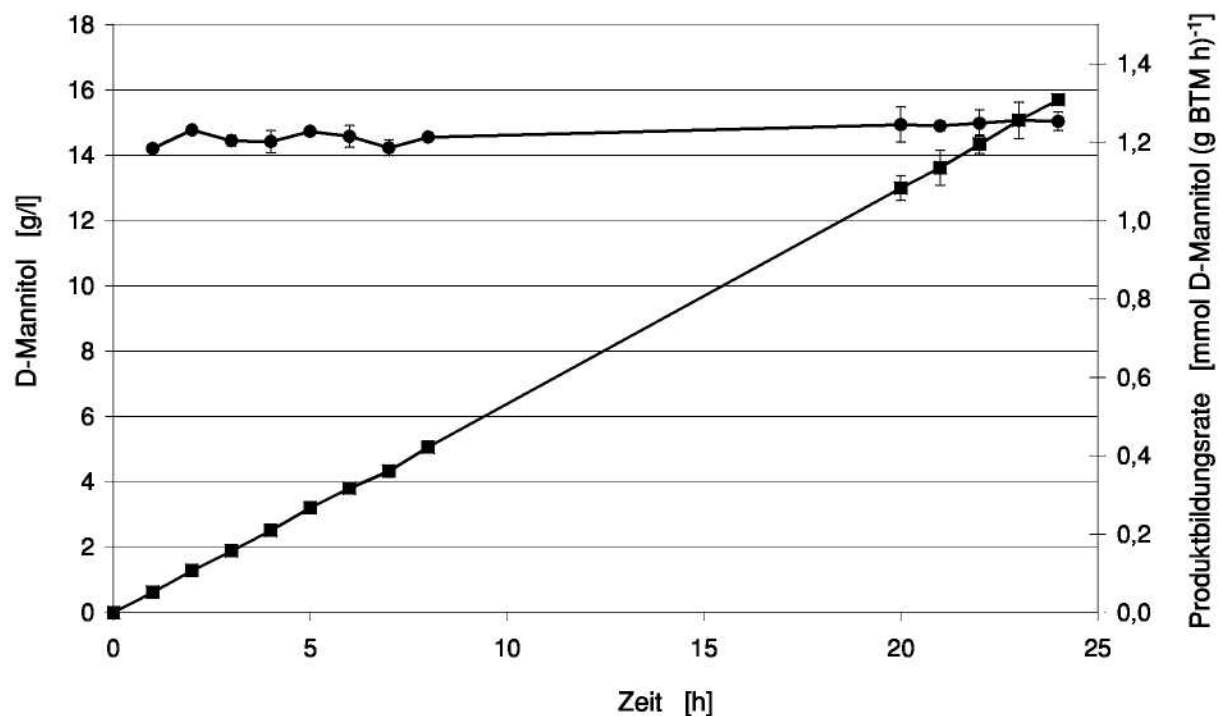


Abbildung 3.14: D-Mannitolkonzentration (■) und spezifische Mannitolbildungsrate (●) bei ruhenden Zellen des Stammes *C. glutamicum* pEKEx2-*fdh-mdh* während der Biotransformation (500 mM D-Fruktose, 250 mM Formiat, 100 mM Kaliumphosphatpuffer, Titration mit 3 M D-Fruktose, 3 M Ameisensäure, 30°C, pH 6,5)

trockengewicht und Stunde in der gleichen Größenordnung und untermauerte das fast equimolare Verhältnis zwischen Formiatverbrauch und D-Mannitolbildung (Abbildung 3.16). Die rekombinanten Stämme *C. glutamicum* pEKEx2-*fdh-mdh* und *C. glutamicum* pEKEx2-*fdh-mdh* pVWEx-*glf* zeigten eine konstante Produktbildungsrate, was darauf hindeutete, dass die Substrataufnahme in die Zelle mit konstanter Rate erfolgte.

Einige Autoren beschrieben, dass durch Supplementation von Kofaktoren in das Biotransformationsmedium die Produktivität der Zellen gesteigert bzw. nach einem Abfall wieder erhöht werden kann (Kaup, 2004). Versuche bei denen *C. glutamicum* pEKEx2-*fdh-mdh* pVWEx2-*glf* extrazellulär mit NAD⁺ supplementiert wurde (5-10 mM Endkonzentration) zeigten innerhalb von 24 Stunden keine Veränderung der spezifischen Produktivität der Zellen. Da die Zellen auch keine Kofaktoren verlieren (Abschnitt 3.3) kann der Schluss gezogen werden, dass die Zellen innerhalb der 24-stündigen Biotransformation vollständig intakt waren und keine Anzeichen von Permeabilisierung aufwiesen. Dies liefert auch die Erkenntnis, dass sowohl D-Fruktose, als auch D-Mannitol über die Zytoplasmamembran transportiert wird und *C. glutamicum* offensichtlich Transporter

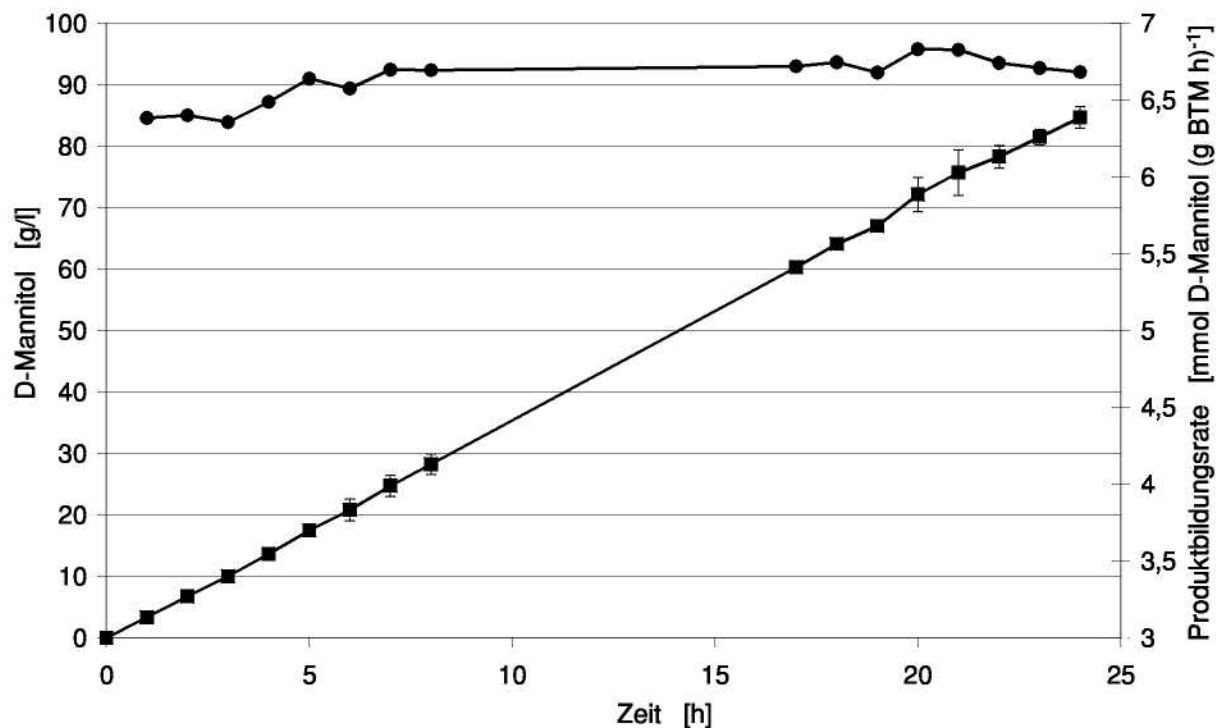


Abbildung 3.15: D-Mannitolkonzentration (■) und spezifische Mannitolbildungsrate (●) bei ruhenden Zellen des Stammes *C. glutamicum* pEKEx2-*fdh-mdh* pVWEx-*glf* während der Biotransformation (500 mM D-Fruktose, 250 mM Formiat, 100 mM Kaliumphosphatpuffer, Titration mit 3 M D-Fruktose, 3 M Ameisensäure, 30°C, pH 6,5)

dafür besitzt. Einige Autoren beschrieben eine Steigerung der Produktivität von Ganzzellbiokatalysatoren durch gezielte Permeabilisierung (Toluol, CTAB) mit dem Ziel des erleichterten Stofftransports über die Membran (Chen, 2007). Derartige Ansätze wurde in dieser Arbeit nicht verfolgt, da alle Untersuchungen mit intakten Zellen durchgeführt werden sollten.

Unter den getesteten rekombinanten Stämmen von *B. megaterium* und *C. glutamicum* zeigte der Stamm *C. glutamicum* pEKEx2-*fdh-mdh* pVWEx2-*glf* die höchste spezifische Produktbildungsrate. Daher wurden mit diesem Stamm repetitive Biotransformationen durchgeführt. Diese Untersuchungen sollten klären, wie sich die Stabilität der Zellen und somit der Produktivität über einen Zeitraum von mehreren Tagen verhielt. Die Biotransformation wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt. Nach 24 Stunden Biotransformation wurden die Zellen abzentrifugiert und erneut in frischem Reaktionspuffer resuspendiert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt, sodass die Zellen in einem insgesamt viermaligen Ansatz über einen Zeitraum von 4 Tagen (96 Stunden)

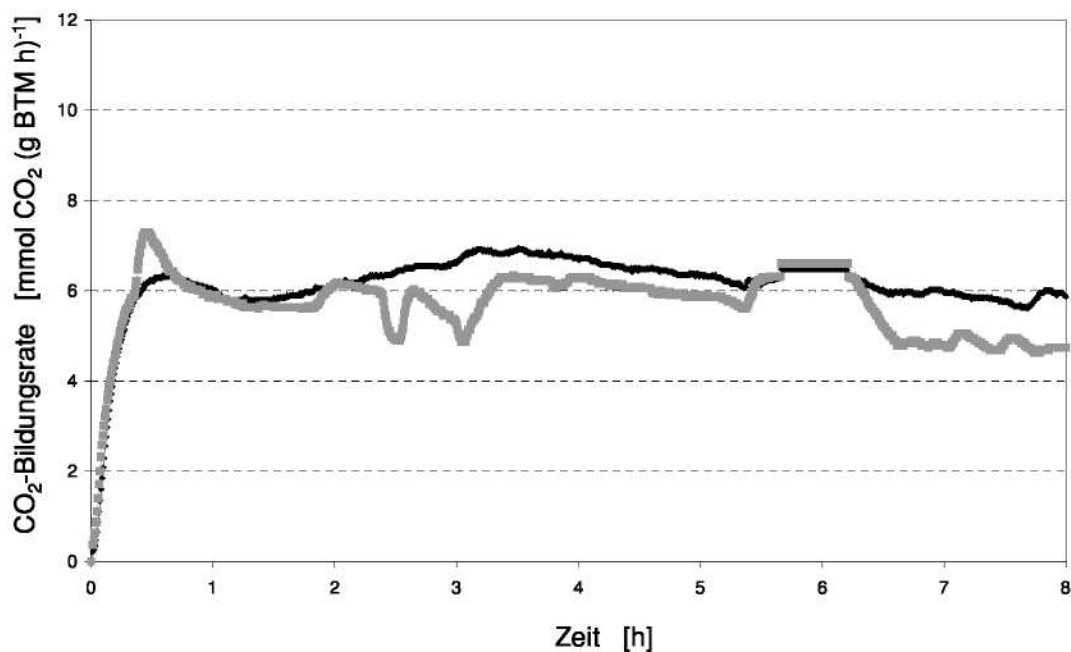


Abbildung 3.16: CO₂ Bildungsrate bei ruhenden Zellen des Stammes *C. glutamicum* pKEEx2-*fdh-mdh* pVWEx2-*glf* während der Biotransformation (500 mM D-Fruktose, 250 mM Formiat, 100 mM Kaliumphosphatpuffer, Titration mit 3 M D-Fruktose, 3 M Ameisensäure, 30°C, pH 6,5)

zur Biotransformation eingesetzt wurden. Für jeden 24-stündigen Abschnitt wurde die Produktivität der Zellen bestimmt. Im Verlaufe der repetitiven Ansätze zeigte sich über einen Zeitraum von 4 Tagen ein leichter, aber signifikanter Abfall der spezifischen Produktivität von 6,48 mmol D-Mannitol pro Gramm Zellrockengewicht und Stunde auf 4,78 (-27%) D-Mannitol pro Gramm Zellrockengewicht und Stunde (Abbildung 3.17). Dies entsprach einem Produktivitätsverlust von 0,02 mmol D-Mannitol pro Gramm Zellrockengewicht und Stunde. Im Gegensatz zu rekombinanten D-Mannitolproduzenten von *E. coli* kann *C. glutamicum* zur Langzeitproduktion bei nur moderaten Produktivitätsverlusten eingesetzt werden. Dieses Resultat zeigte deutlich, dass der Aminosäureproduzent *C. glutamicum* als Wirtsorganismus für Biotransformationen sehr gut eingesetzt werden kann. Der leichte Abfall an Produktivität kann mit natürlicher Zelllyse (Ngwenya, 2007) erklärt werden.

Die Bestimmung des NAD(H)-Gesamtpools sollte klären, ob die Zellen während der Biotransformation den Kofaktor verlieren und so der Redoxzyklus limitiert wird. Beide rekombinanten Stämme von *C. glutamicum* zeigten eine Gesamtpoolgröße von 2,6-2,8 mM, die sich über einen Zeitraum von 24 Stunden während der Biotransformation nicht veränderte (Abbildung 3.18). *C. glutamicum* zeigte bezüglich seines NAD(H)-

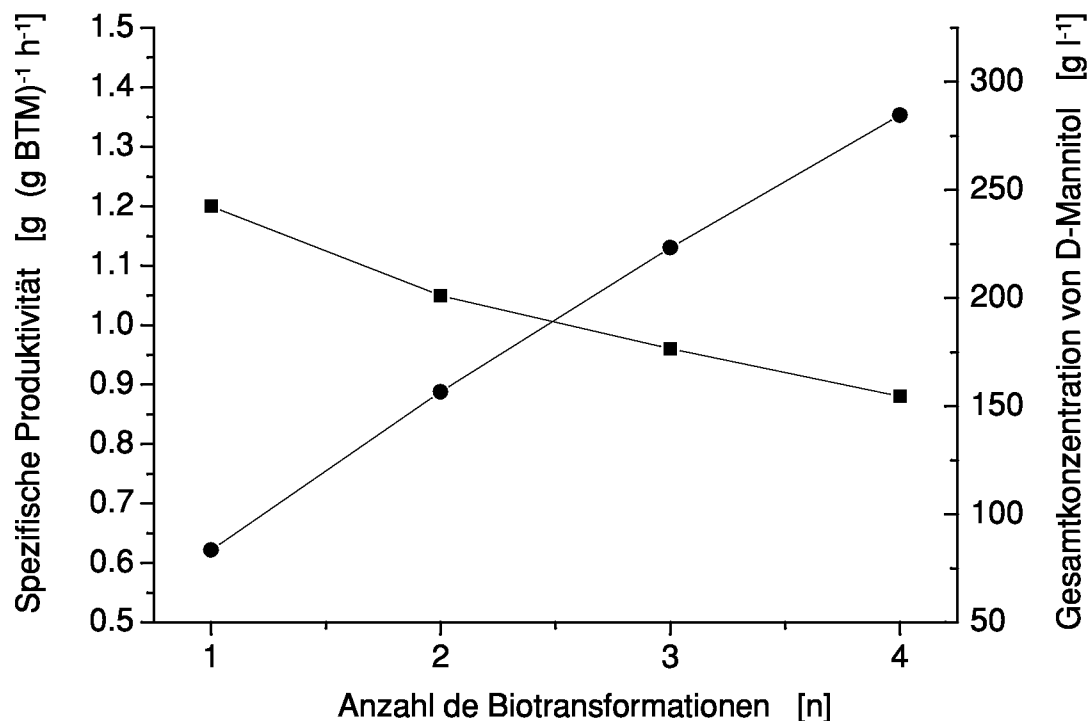


Abbildung 3.17: Repetitive Biotransformation mit ruhenden Zellen des Stammes *C. glutamicum* pEKEx2-*fdh-mdh* pVWEx2-*glf* während der Biotransformation (500 mM D-Fruktose, 250 mM Formiat, 100 mM Kaliumphosphatpuffer, Titration mit 3 M D-Fruktose, 3 M Ameisensäure, 30°C, pH 6,5)

Pools während der Biotransformation die gleiche Stabilität wie Zellen von *B. megaterium*. Die Messungen lieferten zudem das Resultat, dass der NAD(H)-Gesamtpool bei *C. glutamicum* um den Faktor zwei höher war als bei *B. megaterium*. Die gemessenen Poolgrößen bei beiden Spezies deckten sich sehr gut mit bereits publizierten Werten (Moritz u. a., 2002; Setlow und Setlow, 1977). Bei beiden Spezies konnte kein Verlust von Kofaktoren während der Biotransformation gemessen werden. Damit sind beide Spezies im Hinblick auf die Langzeitstabilität unter den getesteten Bedingungen geeignete Wirtsorganismen für die Biotransformation.

Die Bestimmung des NAD⁺/NADH- Verhältnisses in den Bakterien sollte Aufschlüsse darüber liefern, durch welche Dehydrogenase der Redoxzyklus in seiner Aktivität limitiert ist. Bei *B. megaterium* zeigte sich ein bis 70% reduzierter NAD(H)-Pool, da der Redoxzyklus durch geringe D-Fruktosekonzentrationen (30-50 mM) limitiert war. Bei rekombinanten Stämmen von *C. glutamicum* konnte ein vergleichbares Resultat ermittelt werden: innerhalb weniger Minuten nach Beginn der Biotransformation stellte sich

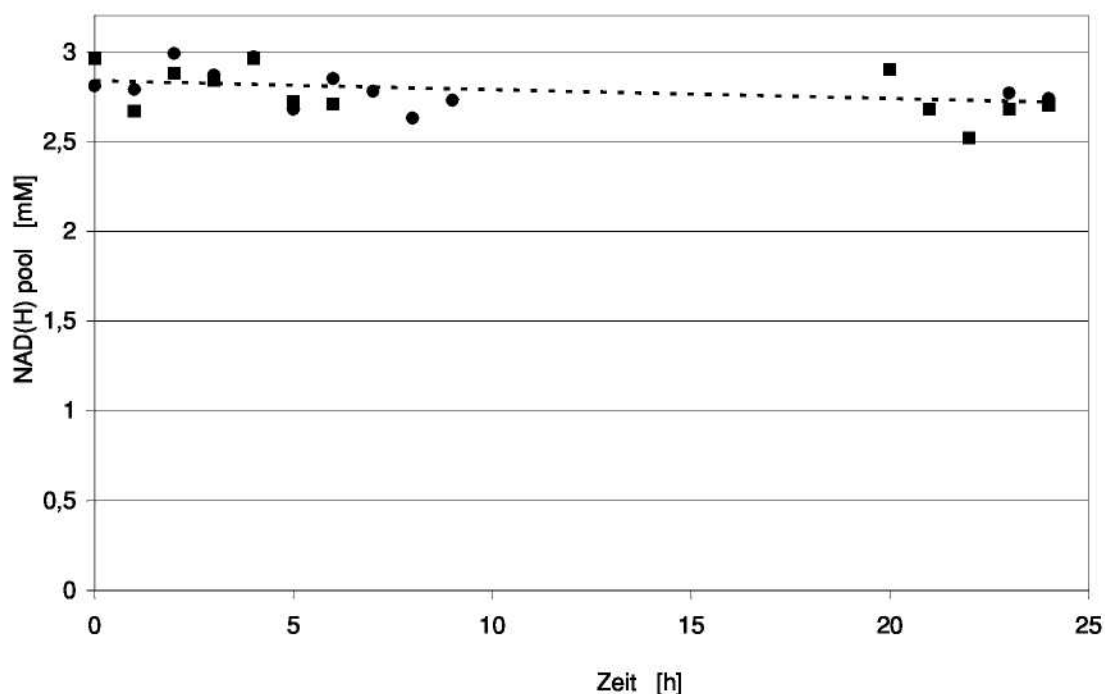


Abbildung 3.18: NAD(H)-Pool bei ruhenden Zellen des Stammes *C. glutamicum* pEKEx2-*fdh-mdh* pVWEx2-*glf* während der Biotransformation (500 mM D-Fruktose, 250 mM Formiat, 100 mM Kaliumphosphatpuffer, Titration mit 3 M D-Fruktose, 3 M Ameisensäure, 30°C, pH 6,5)
 . Die Bestimmung erfolgte durch HPLC (■) und Cycling Assay (●)

ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen NAD^+ und NADH ein, das im weiteren Verlauf der Biotransformation erhalten blieb (Abbildung 3.19). Der Redoxzyklus in *C. glutamicum* war trotz der deutlich geringeren *in vitro* Aktivität der FDH (9-fach geringer als bei *B. megaterium*) in der Lage ca. 50% des NAD(H)-Pools aufzureduzieren. Aus diesem Ergebnis konnte der Schluss gezogen werden, dass bei beiden Spezies der Redoxzyklus durch zu geringe *in vivo* D-Fruktosekonzentrationen limitiert war. Die Koexpression von *glf* erhöhte die Produktivität von *C. glutamicum* um das 5,5 fache; der 50% aufreduzierte NAD(H)-Pool zeigte allerdings, dass die D-Fruktose-Konzentration dennoch zu gering war, um den Redoxzyklus mit maximaler Umsatzrate ablaufen zu lassen. In diesem Falle läge nahezu der gesamte NAD(H)-Pool in der oxidierten Form NAD^+ vor, da bei Substratüberschuss die FDH im Gegensatz zur MDH die geringere Enzymaktivität aufweist und somit NADH schneller oxidiert, als NAD^+ reduziert wird.

Vergleichbar zu den rekombinanten Stämmen von *B. megaterium* sank in den ersten 30 Minuten der Biotransformation der zytosolische pH-Wert von *C. glutamicum* auf pH 6,5 ab und entsprach somit dem pH-Wert des Biotransformationsmediums. Dieser Effekt war auch für den D-Mannitolbildner *E. coli* pET24(+)-*fdh-mdh* pZY507-*glf* zu

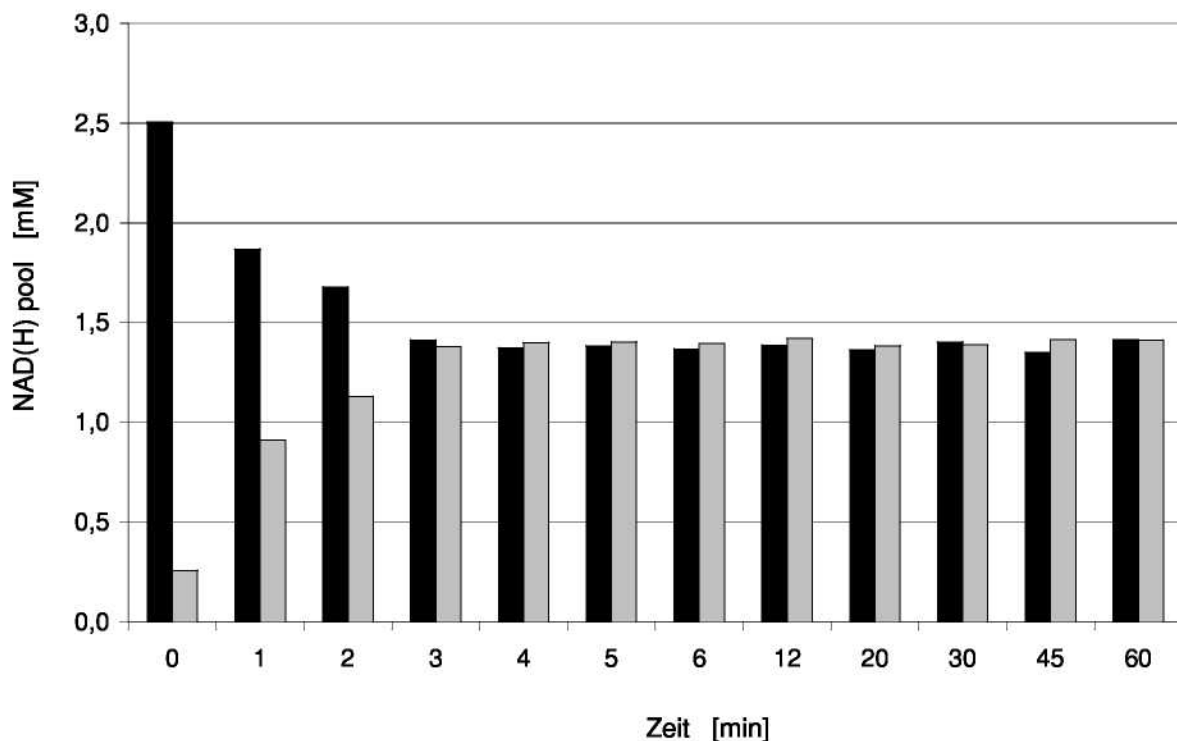


Abbildung 3.19: Verhältnis von NAD⁺ (schwarze Balken) und NADH (graue Balken) bei ruhenden Zellen des Stammes *C. glutamicum* pEKEx2-*fdh-mdh* pVWEx2-*glf* während der Biotransformation (500 mM D-Fruktose, 250 mM Formiat, 100 mM Kaliumphosphatpuffer, Titration mit 3 M D-Fruktose, 3 M Ameisensäure, 30°C, pH 6,5)

beobachten (Kaup u. a., 2004). Dieser nahezu vollständige Verlust der protonenmotorischen Kraft konnte bei allen rekombinanten Stämmen unter den getesteten Bedingungen festgestellt werden. Im Zusammenhang mit der Langzeitstabilität der Zellen herrschte während der Biotransformation ein physiologischer pH-Wert in den Zellen, der zu keiner Inhibierung oder Inaktivierung der Enzyme führte.

Rekombinante Stämme von *B. megaterium* und *C. glutamicum* wurden unter ruhenden Bedingungen als Ganzzellbiokatalysatoren zur Reduktion von D-Fruktose zu D-Mannitol eingesetzt. Alle untersuchten Stämme zeigten dabei unter den getesteten Bedingungen über einen Zeitraum von mindestens 24 Stunden konstante Produktbildungsraten und einen konstanten NAD(H)-Pool. Im Hinblick auf einen Langzeiteinsatz der Zellen waren mit diesen beiden Eigenschaften zwei grundlegende Voraussetzungen erfüllt und die rekombinanten Stämme zeigten hierin einen deutlichen Unterschied zu D-Mannitol produzierenden Stämmen von *E. coli* (Kaup, 2004). Trotz unterschiedlicher Enzymaktivitäten hatten die rekombinanten Stämme ohne heterologen

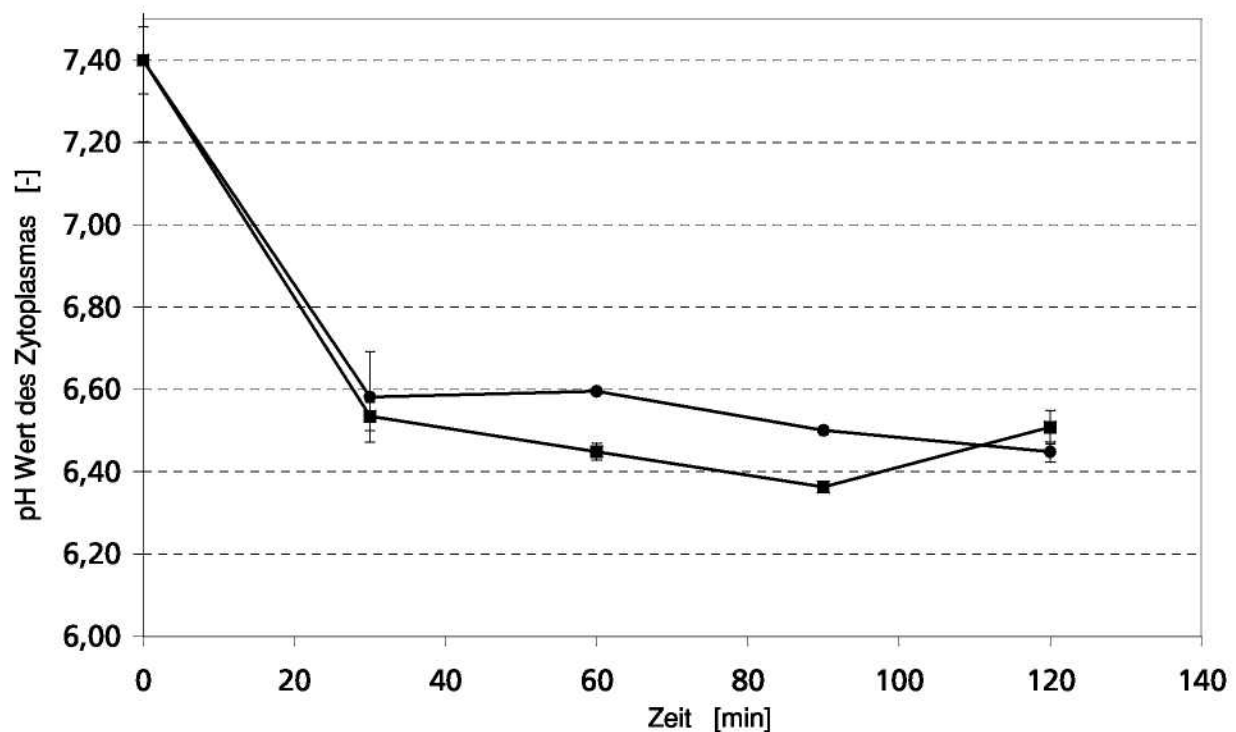


Abbildung 3.20: Zytoplasmatischer pH-Wert bei ruhenden Zellen des Stammes *C. glutamicum* pEKEx2-*fdh-mdh* pVWEx2-*glf* während der Biotransformation (500 mM D-Fruktose, 250 mM Formiat, 100 mM Kaliumphosphatpuffer, Titration mit 3 M D-Fruktose, 3 M Ameisensäure, 30°C, pH 6,5)

Zuckertransporter vergleichbare Produktivitäten. In allen getesteten Stämmen war in den ersten Minuten der Biotransformation eine Verschiebung des Redoxverhältnisses zugunsten von NADH festzustellen. Dies bedeutete, dass die FDH mit ihrer geringeren Aktivität NAD^+ schneller reduzieren konnte als NADH von der MDH oxidiert wurde. Diese Limitierung des Redoxzyklus ist auf eine limitierende intrazelluläre D-Fruktosekonzentration zurückzuführen. Messungen der zytoplasmatischen D-Fruktosekonzentrationen während der Biotransformation führten zu dem Resultat, dass die intrazelluläre D-Fruktosekonzentration in der Größenordnung des K_M -Wertes der MDH für D-Fruktose ist. Das D-Glukose/D-Fruktose Facilitatorgen *glf* aus *Z. mobilis* konnte in *C. glutamicum* funktionell exprimiert werden und steigerte durch eine Erhöhung der D-Fruktoseaufnahme die Produktivität der Zellen um das 5,5-fache.

Die Resultate der Biotransformation mit rekombinanten Stämmen beider Spezies ohne Koexpression eines heterologen D-Fruktosetransportergens ließen die Vermutung zu, dass die Zellen D-Fruktose ohne Phosphorylierung in das Zytoplasma aufneh-

Tabelle 3.2: Enzymaktivitäten von FDH und MDH (U/mg Protein), Produktbildungsraten (mmol D-Mannitol $\text{BTM}^{-1} \text{h}^{-1}$) und Ausbeute (mol%)

Stamm	FDH Aktivität	MDH Aktivität	Rate	Ausbeute
<i>B. megaterium</i> pARBm- <i>fdh-mdh</i>	0,9	2,6	1,6	0,91
<i>B. megaterium</i> pARBm- <i>fdh-mdh</i> pHBIntE- <i>glf</i>	0,7	2,2	2,0	0,92
<i>C. glutamicum</i> pEKEx2- <i>fdh-mdh</i>	0,3	7,1	1,3	0,88
<i>C. glutamicum</i> pEKEx2- <i>fdh-mdh</i> pVWEx2- <i>glf</i>	0,1	2,8	6,8	0,92

men konnten. Somit konnte erklärt werden, warum die Stämme ohne heterologen D-Fruktosetransporter in der Lage waren, mittels MDH, die nur unphosphorylierte D-Fruktose als Substrat verwerten kann, D-Mannitol zu bilden. Zucker wie D-Glukose oder D-Fruktose werden von Bakterien häufig über das hochaffine PTS-System aufgenommen. Bei diesem Aufnahmemechanismus wird das Kohlenhydrat bei gleichzeitiger Phosphorylierung über die Zytoplasmamembran transportiert und dem Zentralstoffwechsel zugeführt. Sowohl *B. megaterium* als auch *C. glutamicum* verfügten über keine Enzymaktivität zur Dephosphorylierung von D-Fruktose und somit kann ausgeschlossen werden, dass D-Fruktose, die über das PTS-System aufgenommen wurde, dem Redoxzyklus als Substrat zugeführt wurde. In beiden Spezies muss es daher für D-Fruktose einen PTS-unabhängigen Aufnahmemechanismus geben. Für *B. megaterium* konnte bereits ein Gen identifiziert werden, das für einen PTS-unabhängigen D-Fruktosetransporter kodiert (Chiou u. a., 2002). Für *C. glutamicum* ist ein Protein für einen PTS-unabhängigen D-Fruktosetransport unbekannt. Daher war es ein zusätzliches Ziel dieser Arbeit, einen solchen Transporter zu identifizieren.

3.4 D-Fruktosetransport in *C. glutamicum*

Biotransformationen mit *C. glutamicum* pEKEx2-*fdh-mdh* zeigten, dass die Zellen eine konstante Produktivität hatten und dass durch Überexpression von *glf* die Aufnahme-rate für D-Fruktose um den Faktor 5,5 gesteigert wurde. Aus diesem Resultat konnte der Schluß gezogen werden, dass im Zytoplasma der Zellen freie D-Fruktose in signifikanten Mengen vorlag und so durch die MDH zu D-Mannitol reduziert wurde. Für das

Vorliegen freier D-Fruktose im Zytoplasma gibt es zwei Möglichkeiten:

1. D-Fruktose wird über das PTS-System aufgenommen und im Zytoplasma dephosphoryliert
2. es existiert ein bisher unbekannter Transportmechanismus für die Aufnahme von D-Fruktose in das Zytoplasma ohne Phosphorylierung

Für *C. glutamicum* konnte bisher keine D-Fruktosephosphatase-Aktivität nachgewiesen werden (Ikeda und Nakagawa, 2003) und die Zellen verfügen zusätzlich über einen ungeklärten Mechanismus zur Ausschleusung freier D-Fruktose in das Zytoplasma (Dominguez und Lindley, 1996). Die konstante D-Mannitolbildungsrate von *C. glutamicum* pEKEx2-*fdh-mdh* zeigte, dass die Zellen über einen bisher unbekannten Mechanismus freie D-Fruktose aufnehmen konnten. Die Vorgehensweise der folgenden Arbeiten lag darin, einen Transporter in *C. glutamicum* zu identifizieren, der eine hohe Homologie zu GLF hatte und als homologer Transporter in *C. glutamicum* für die Biotransformation genutzt werden konnte.

3.4.1 D-Fruktoseaufnahme im Deletionsstamm *C. glutamicum* Δ *ptsF*

Um zu zeigen, dass das PTS-System keinen Einfluss auf die Produktivität von D-Mannitol hat, wurde der Stamm *C. glutamicum* Δ *ptsF* pEKEx-2-*fdh-mdh* in der Biotransformation eingesetzt. Bei diesem Stamm ist das Gen *ptsF* deletiert, so dass dieser Stamm keine D-Fruktose mehr über das D-Fruktose-PTS-System aufnehmen kann. Biotransformationen mit beiden rekombinanten Stämmen zeigten nahezu gleiche Produktivitäten (14-16 g l⁻¹ nach 24 Stunden). Aus diesem Resultat muß der Schluss gezogen werden, dass das D-Fruktose spezifische PTS keinen Einfluss auf die Konzentration freier D-Fruktose im Zytoplasma von *C. glutamicum* hat. *C. glutamicum* besitzt somit einen PTS-unabhängigen Aufnahmemechanismus für freie D-Fruktose.

3.4.2 Genloci *Cgl0181* und *Cgl3058* als mögliche D-Fruktosetransporter

Die Analyse der Gen-Datenbank von *C. glutamicum* ergab, dass die Genloci Cgl0181 (NCgl0178) und Cgl3058 (NCgl2953) für je ein Protein kodierten, das eine sehr hohe Homologie zu GLF besitzt. Das Gen Cgl0181 mit einer Größe von 1473 Basenpaaren und das Gen Cgl3058 mit einer Größe 1527 kodieren für membrangebundene Proteine deren Funktion bisher als *myo*-Inositoltransporter identifiziert wurde (Krings u. a.,

2006). In dieser Arbeit wurden beide Gene durch Datenbank gestützte Homologievergleiche als potentielle D-Fruktose-Transporter identifiziert. Zunächst wurde *Cgl0181* aus dem Genom von *C. glutamicum* ATCC13032 amplifiziert und in das Expressionsplasmid pVWEx2 ligiert. Ziel der Expression war es, die D-Fruktoseaufnahme während der Biotransformation zu steigern. Sollte das Membranprotein CGL0181 in der Lage sein, D-Fruktose über die Membran zu transportieren, so müsste dies zu einer höheren D-Mannitolbildungsrate der Zellen führen. Die homologe Überexpression von

Tabelle 3.3: Produktbildungsraten (mmol D-Mannitol $\text{BTM}^{-1} \text{h}^{-1}$) und Gesamtkonzentration von D-Mannitol bei verschiedenen Stämmen von *C. glutamicum* nach 24 Stunden Biotransformation

Stamm	Produktivität	D-Mannitol [mM]
<i>C. glutamicum</i> pEKEx2	0	0
<i>C. glutamicum</i> pEKEx2 pVWEx2	0	0
<i>C. glutamicum</i> pEKEx2- <i>fdh-mdh</i>	1,30	90
<i>C. glutamicum</i> Δ <i>Cgl0181</i> pEKEx2- <i>fdh-mdh</i>	0,58	40
<i>C. glutamicum</i> Δ <i>Cgl3058</i> pEKEx2- <i>fdh-mdh</i>	0,46	32
<i>C. glutamicum</i> Δ <i>Cgl0181</i> Δ <i>Cgl3058</i> pEKEx2- <i>fdh-mdh</i>	0	2
<i>C. glutamicum</i> pEKEx2- <i>fdh-mdh</i> pVWEx2- <i>Cgl0181</i>	2,73	190
<i>C. glutamicum</i> pEKEx2- <i>fdh-mdh</i> pVWEx2- <i>Cgl3058</i>	2,30	160

Cgl0181 in *C. glutamicum* bewirkte eine 2,3-fach höhere Produktivität der Zellen (Tabelle 3.3). Die Enzymaktivitäten des Stammes *C. glutamicum* pEKEx2-*fdh-mdh* pVWEx2-*Cgl0181* lagen für die FDH bei 0,12 U/mg Protein und für die MDH bei 1,9 U/mg Protein und waren damit gut vergleichbar zu den Enzymaktivitäten von *C. glutamicum* pEKEx2-*fdh-mdh* pVWEx2-*glf*. Durch die Überexpression von *Cgl0181* konnte in *C. glutamicum* die Aufnahme für D-Fruktose gesteigert und die Effizienz der Biokatalysatoren erhöht werden. Das zuvor beschriebene Membranprotein CGL0181 konnte als D-Fruktose Transporter identifiziert werden. DNA-Microarray-Analysen haben gezeigt, dass das Gen *Cgl0181* bei Wachstum auf Inositol bis zu 12-fach hochreguliert wurde (Krings u. a., 2006). Der Stamm *C. glutamicum* pEKEx2-*fdh-mdh* pVWEx2-*Cgl0181* hatte eine konstante Produktbildungsrate, obwohl die Zellen sehr wahrscheinlich über nahezu keine protonenmotorische Kraft mehr verfügten (Kapitel 3.3). Daher handelte es sich bei CGL0181 vermutlich um einen energieunabhängigen Transporter, der in diesem Fall die D-Fruktose wegen des hohen Konzentrationsgradienten transportierte. Die spezifische Transportrate betrug ca. 22,7 nmol D-Fruktose pro Milligramm Zelltrockengewicht und Minute und wurde anhand der Produktivität der Zellen abgeschätzt. Diese

Transportrate war 2,5-fach niedriger als die Transportrate für D-Fruktose bei GLF. Die markerfreie Deletionsmutante *C. glutamicum* $\Delta Cgl0181$ pEKEx2-*fdh-mdh* zeigte eine konstante, spezifische D-Mannitolbildungsrate von 0,58 mmol D-Mannitol pro Gramm Zelltrockengewicht und Stunde (40 mM nach 24 Stunden). Dies entsprach 45% der Produktivität des Stammes *C. glutamicum* pEKEx2-*fdh-mdh* und zeigte, dass CGL0181 für die D-Fruktose-Aufnahme nicht alleine verantwortlich ist.

Da der Stamm *C. glutamicum* $\Delta Cgl0181$ pEKEx2-*fdh-mdh* trotz der Deletion von *Cgl0181* D-Mannitol produzieren konnte, musste es einen weiteren Importer für D-Fruktose geben. Um zu überprüfen, ob das Protein CGL3058, das ebenfalls eine sehr hohe Homologie zu GLF besaß, ebenfalls D-Fruktose importieren kann, wurde zunächst der Stamm *C. glutamicum* pEKEx2-*fdh-mdh* pVWEx2-*Cgl3058* durch Transformation gewonnen und in der Biotransformation eingesetzt. Die Analyse der Enzymaktivitäten erbrachte für die FDH eine spezifische Aktivität von 0,11 U/mg Protein und für die MDH eine spezifische Aktivität von 2,5 U/mg Protein. Dieser Stamm hatte eine spezifische Produktbildungsrate von 2,3 mmol D-Mannitol pro Gramm Zelltrockengewicht und Stunde. Dies entsprach einer Endkonzentration von 160 mM nach 24 Stunden Biotransformation und somit einer 1,8 fachen Steigerung der Produktivität gegenüber dem Referenzstamm *C. glutamicum* pEKEx2-*fdh-mdh*. Die markerfreie Deletionsmutante *C. glutamicum* $\Delta Cgl3058$ pEKEx2-*fdh-mdh* hatte eine konstante, spezifische Produktbildungsrate von 0,46 mmol D-Mannitol pro Gramm Zelltrockengewicht und Stunde. Dies entsprach einer Endkonzentration von 32 mM D-Mannitol nach 24 Stunden Biotransformation und entsprach 36% der Produktivität des Referenzstammes *C. glutamicum* pEKEx2-*fdh-mdh*. Die spezifische D-Fruktoseaufnahme-rate betrug ca. 19,1 nmol D-Fruktose pro Milligramm Zelltrockengewicht und Minute. Dieser Wert wurde ebenfalls anhand der Produktivität der Zellen abgeschätzt. Dieses Resultat ließ den Schluss zu, dass neben CGL0181 auch CGL3058 eine Importaktivität für D-Fruktose aufweist. In einem weiteren Experiment wurde die Doppeldeletionsmutante *C. glutamicum* $\Delta Cgl0181 \Delta Cgl3058$ pEKEx2-*fdh-mdh* in der Biotransformation eingesetzt. Dieser Stamm zeigte nahezu keine D-Mannitolbildung, woraus geschlossen werden konnte, dass dieser Stamm durch die Deletion von *Cgl0181* und *Cgl3058* keine unphosphorylierte D-Fruktose (bzw. PTS-unabhängig) mehr aufnehmen konnte (Tabelle 3.3).

3.5 MHB-Bildung mit *B. megaterium* und *C. glutamicum*

Rekombinante Stämme von *B. megaterium* wurden auch zur Gewinnung des sekundären Alkohols MHB unter ruhenden Bedingungen eingesetzt. Das produktbildende Enzym war hierbei die NADPH-abhängige Alkoholdehydrogenase (LBADH) aus *Lactobacillus brevis*. Da dieses Enzym mit einer ca. 10-fach geringeren Spezifität auch NADH als Kofaktor akzeptiert (Schumacher u. a., 2006), wurde auch in diesen Stämmen die FDH zur Kofaktorregenerierung eingesetzt.

Biotransformationen mit dem Stamm *B. megaterium* pCBBm-*fdh-lbadh* erreichten trotz

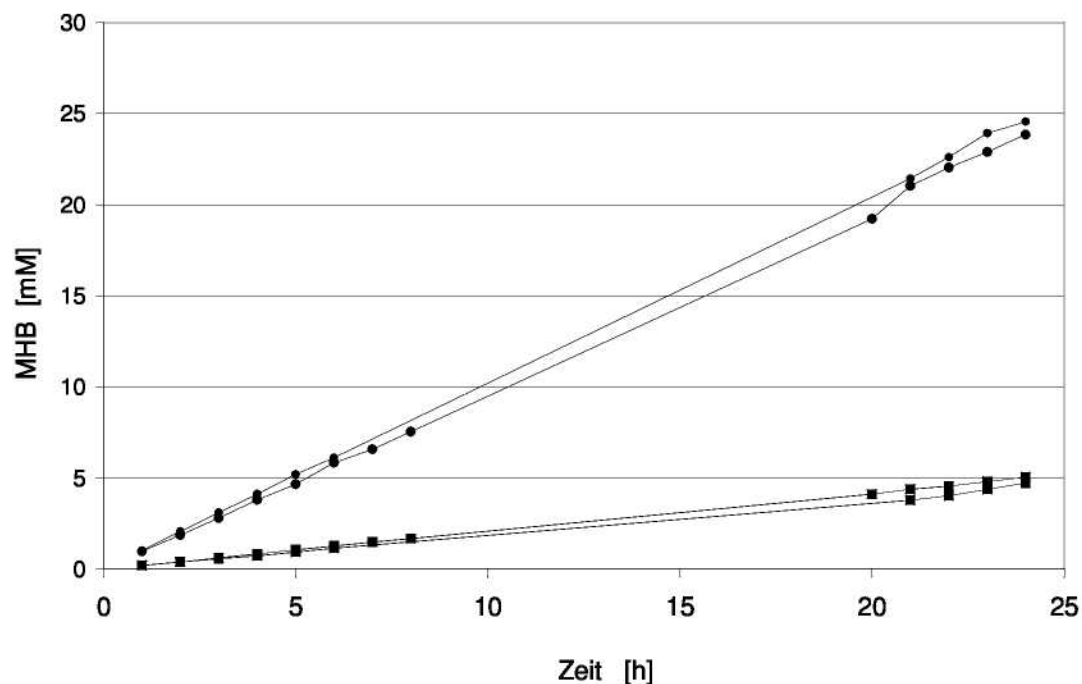


Abbildung 3.21: Gewinnung von MHB mit *B. megaterium* pCBBm-*fdh-lbadh* mit der FDH zur NADH Regenerierung (■) und der LBADH zur substratgekoppelten Kofaktorregenerierung mit 250 mM Isopropanol (●).

der guten Enzymaktivitäten von FDH und LBADH (Kapitel 3.1.7) innerhalb von 24 Stunden einen nur 10%igen Umsatz von MAA zu MHB. Dabei zeigten die Zellen eine konstante Produktivität von $72 \mu\text{mol}$ MHB pro Gramm Zelltrockengewicht und Stunde. Nach 24 Stunden Biotransformation konnte kein Abfall der Enzymaktivitäten der FDH und LBADH festgestellt werden. Die geringe Produktivität der Zellen war vermutlich auf eine sehr langsame Aufnahme von MAA in *B. megaterium* zurückzuführen. Lipophile Substanzen wie MAA oder Isopropanol werden von Bakterien meistens nicht über

einen spezifischen Transporter aufgenommen, sondern passieren die Membran durch Diffusion (Bustard u. a., 2002; Sikkema u. a., 1995). Viele Bakterienarten zeigen zudem eine sehr schnelle Stressantwort, indem sie organische Lösungsmittel unspezifisch aus dem Zytoplasma exportieren (Markham und Neyfakh, 2001; Neyfakh, 2002), organische Lösungsmittel abbauen (Guha u. a., 1999; Tien und Katayama, 2004) oder durch Änderungen der Membranzusammensetzung den Diffusionswiderstand für organische Lösungsmittel erhöhen (Ramos u. a., 2002). Im Fall von *B. megaterium* war die Aufnahme von MAA in das Zytoplasma vermutlich sehr ineffizient, was sich bereits mit der schon vorher beobachteten Toleranz von *B. megaterium* gegenüber Lösungsmitteln deckt (Vary, 1994). Diese Toleranz der Zellen ist für die Biotransformation wünschenswert, da im Hinblick auf eine Langzeitbiotransformation die Zellen als stabile Biokatalysatoren eingesetzt werden können.

Der Stamm *B. megaterium* pCBBm-*fdh-lbadh* wurde auch zur Biotransformation mit

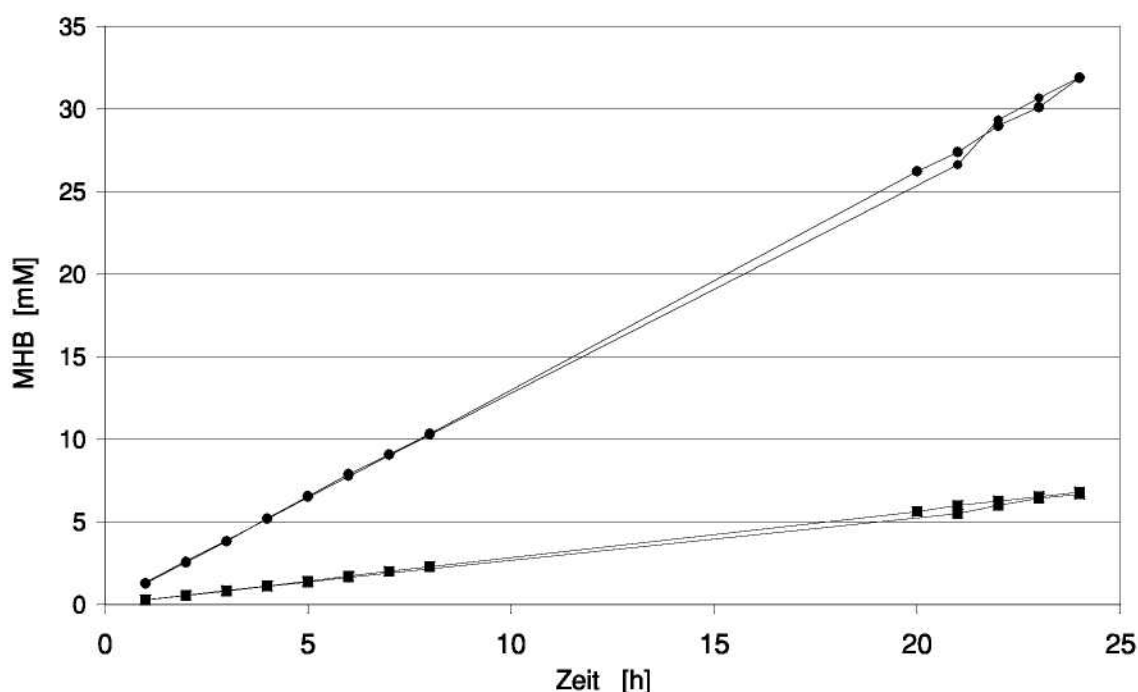


Abbildung 3.22: Gewinnung von MHB mit *C. glutamicum* pEKEx2-*fdh-lbadh* mit der FDH zur NADH Regenerierung (■) und der LBADH zur substratgekoppelten Kofaktorregenerierung mit 250 mM Isopropanol (●).

substratgekoppelter Kofaktorregenerierung eingesetzt werden. Dabei regeneriert die LBADH den Kofaktor durch Oxidation von Isopropanol (Goldberg u. a., 2007a). Zellen von *B. megaterium* pCBBm-*fdh-lbadh* zeigten während der Biotransformation mit 250

mM Isopropanol und 50 mM MAA eine 50%ige Substratumsetzung innerhalb von 24 Stunden (Abbildung 3.21). Die spezifische Produktivität der Zellen betrug 360 μmol MHB pro Gramm Zelltrockengewicht und Stunde. Auch bei diesen Ansätzen war kein Abfall der Enzymaktivität feststellbar und die Zellen waren auch unter diesen Bedingungen stabil. Offenbar führte die Erhöhung des Lösungsmittelanteils (Isopropanol) zu einer Steigerung der Produktivität.

Bei der Gewinnung von MHB mit rekombinanten Stämmen von *C. glutamicum* war ein ähnliches Verhalten wie bei *B. megaterium* festzustellen. Während eines Zeitraums von 24 Stunden hatten Zellen des Stammes *C. glutamicum* pEKEx2-*fdh-mdh* bei der Umsetzung von MAA zu MHB eine konstante Produktbildungsrate von 98 μmol MHB pro Gramm Zelltrockengewicht und Stunde. Auch hier wurde die Produktivität der Zellen vermutlich durch geringe Substratkonzentrationen im Zytoplasma limitiert. Durch eine Erhöhung des Lösungsmittelanteils sollte überprüft werden, ob die Produktivität der Zellen durch eine Verbesserung der Substrataufnahme erzielt werden kann. Bei

Tabelle 3.4: Enzymaktivitäten von FDH und LBADH (U/mg Protein), MHB-Bildungsraten (μmol MHB $\text{BTM}^{-1} \text{h}^{-1}$). Die Kofaktorregenerierung erfolgte entweder durch Oxidation von Formiat oder Isopropanol

Stamm	FDH	LBADH (NADH)	LBADH (NADPH)	Rate
<i>B. megaterium</i> pARBm- <i>fdh-lbadh</i> (Formiat)	0,70	0,68	6,90	72
<i>B. megaterium</i> pARBm- <i>fdh-lbadh</i> (Isopropanol)	0,70	0,68	6,90	360
<i>C. glutamicum</i> pEKEx2- <i>fdh-lbadh</i> (Formiat)	0,12	0,40	4,00	96
<i>C. glutamicum</i> pEKEx2- <i>fdh-lbadh</i> (Isopropanol)	0,12	0,40	4,00	460

der substratgekoppelten Kofaktorregenerierung mittels 250 mM Isopropanol konnte ein 80%iger Umsatz des Substrates innerhalb von 24 Stunden erzielt werden und die spezifische Produktbildungsrate betrug 460 μmol pro Gramm Zelltrockengewicht und Stunde. Trotz deutlich unterschiedlicher FDH-Aktivitäten zeigten beide rekombinanten Spezies vergleichbare Produktivitäten. Dies ist, ähnlich wie bei der D-Mannitolbildung ein Hinweis darauf, dass der Redoxzyklus Substrat-limitiert ist. Läge keine Substratlimitierung vor, so hätte der *B. megaterium*-Stamm aufgrund seiner höheren spezifischen Enzymaktivitäten eine deutlich höhere Produktivität als *C. glutamicum*. In beiden Fällen

könnte die Substratlimitierung mit einem langsamen Substrattransport über die Zytoplasmamembran erklärt werden.

Es zeigte sich, dass auch rekombinante Stämme von *C. glutamicum* dank ihrer Toleranz gegenüber Lösungsmitteln für zukünftige Biotransformationen auf dem Gebiet sekundären Hydroxyverbindungen als Wirtsorganismen gut geeignet sind.

4 Diskussion

4.1 Gewinnung von D-Mannitol mittels Ganzzellbiotransformation

Der chirale Zuckeralkohol D-Mannitol wird industriell zur Zeit durch chemische Reduktion von D-Glukose/D-Fruktose-Gemischen gewonnen (Makkee u. a., 1985). Erste mikrobielle Verfahren nutzten die Fähigkeit heterofermentativer Milchsäurebakterien, D-Fruktose zu D-Mannitol zu reduzieren (Soetaert u. a., 1999). In beiden Fällen entstehen unerwünschte Nebenprodukte (Sorbitol, Laktat, Acetat), die häufig eine teure Aufarbeitung zur Folge haben (von Weymarn u. a., 2003). In einem Ganzzellbiotransformationsansatz mit rekombinanten Zellen von *E. coli* konnte durch Expression eines MDH-Gens und eines Gens für die FDH ein Stamm gewonnen werden, der die Reduktion von D-Mannitol aus D-Fruktose ohne Bildung von Nebenprodukten katalysierte (Kaup u. a., 2004). Das Gen für die Mannitol-2-Dehydrogenase stammte hierbei aus dem heterofermentativen Milchsäurebakterium *L. pseudomesenteroides*.

Die MDH aus *L. pseudomesenteroides* wurde zur Reduktion von D-Fruktose sollte in Ganzzellbiotransformationen mit Zellen von *B. megaterium* und *C. glutamicum* zur Gewinnung von D-Mannitol genutzt. Die zur Reduktion benötigten Elektronen stammten von NADH, das durch die Aktivität der FDH aus *M. vaccae* N10 regeneriert wurde. Die Koexpression eines Kofaktor regenerierenden Enzyms wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben und die Gewinnung von D-Mannitol aus D-Fruktose mittels einer MDH und einer FDH konnte von SLATNER (1998) erfolgreich *in vitro* durchgeführt werden. Neben der FDH aus *M. vaccae* N10 konnten weitere FDHs aus Hefen und Bakterien isoliert werden, die auch für die Kofaktorregenerierung eingesetzt wurden. Bei der Herstellung von chiralen Aminosäuren mittels Ganzzellbiotransformation mit Zellen von *E. coli* konnte die FDH aus *Candida boidinii* trotz ihrer geringen spezifischen Aktivität erfolgreich genutzt werden (Slusarczyk u. a., 2000; Menzel u. a., 2004). Expressionsanalysen von MENZEL (2006) erbrachten in verschiedenen Stämmen von *E. coli* JM109 spezifische Enzymaktivitäten zwischen 0,03 bis 0,11 U/mg Protein (Ro-hextrakt) (Menzel, 2006). Diese Werte entsprachen den Enzymaktivitäten, die für die FDH aus *M. vaccae* N10 in *C. glutamicum* in dieser Arbeit gemessen werden konnte und waren für eine effiziente Biotransformation ausreichend. Überexpression des FDH-Gens aus *M. vaccae* N10 in *E. coli* BL21 (DE3) zeigte ein bis zu 10-fach höheres Expressionslevel von *fdh* und die FDH erreichte spezifische Enzymaktivitäten von 0,7 bis zu 1,2 (Kaup u. a., 2004; Ernst u. a., 2005). Vergleichbare Enzymaktivitäten

wurden mit rekombinanten Stämmen von *B. megaterium* in dieser Arbeit erreicht und zeigten, dass *B. megaterium* für die Expression heterologer Gene ein guter Alternativorganismus zu *E. coli* ist. Der Vergleich zwischen rekombinanten, D-Mannitol produzierenden Stämmen von *B. megaterium* und *C. glutamicum* zeigte in beiden Fällen, dass der Redoxzyklus Substrat-limitiert war. Dieser Schluss konnte gezogen werden, da sich während der Biotransformation das Redoxverhältnis zugunsten von NADH verschob. Dies wäre bei einem Substratüberschuss in den Zellen aufgrund der deutlich niedrigeren Aktivität der FDH (bis Faktor 24) nicht zu beobachten. Dies konnte auch für rekombinante Stämme von *E. coli* gezeigt werden und erscheint derzeit noch als ein generelles Problem der Ganzzellbiotransformation. ERNST (u.a. 2005) konnten bei der Biotransformation von MAA zu MHB mit rekombinanten Stämmen von *E. coli* eine Verschiebung des Redoxverhältnisses auf einen Wert von 1,45 messen. Auch in diesem Stamm lag trotz des effizienten Stoffumsatzes eine Substratlimitierung des Redoxzyklus vor (Ernst u. a., 2005). Das anscheinend generelle Problem der Substratlimitierung könnte einen Erklärungsansatz liefern, warum unterschiedliche rekombinante Stämme trotz teilweise signifikant unterschiedlicher *in vitro* Enzymaktivitäten der Produktionsenzyme vergleichbare Raumzeitausbeuten erreichen (Chen, 2007; Coward-Kelly und Chen, 2007).

KAUP (2004) konnte in seiner Arbeit die Bedeutung der Substratversorgung für die Effizienz der Zellen bei der D-Mannitolbildung mit *E. coli* zeigen. Rekombinante Stämme von *E. coli*, die die Gene für die Mannitol-2-Dehydrogenase und Formiatdehydrogenase exprimierten (Abbildung 4.1), produzierten zunächst fast kein D-Mannitol (Endkonzentrationen kleiner 15 mM nach 24 Stunden). Die Autoren erklärten dies mit einer PTS-abhängigen Aufnahme von D-Fruktose mit einhergehender Phosphorylierung zum D-Fruktose-6-phosphat, welches kein Substrat für die MDH aus *L. pseudomesenteroides* ist. Ein theoretischer Ansatz, um aus D-Fruktose-6-phosphat D-Mannitol zu gewinnen wäre die Expression eines Gens für eine D-Mannitol-1-phosphat-Dehydrogenase in Kombination mit einer D-Mannitol-1-phosphatase (Hugenholtz u. a., 2002). Allerdings kann im Wildtypen von *E. coli* keine D-Mannitolbildung durch die zelleigene D-Mannitol-1-phosphat-Dehydrogenase festgestellt werden, da die durchgeführte gemischte Säuregärung genügend NAD⁺ liefert und so D-Mannitol stattdessen als Kohlenstoffquelle verstoffwechselt wird (Teschner u. a., 1990). Daher wurde die Strategie verfolgt, die Konzentration von unphosphorylierter D-Fruktose im Zytoplasma von *E. coli* zu erhöhen und so durch die Aktivität der MDH D-Mannitol zu gewinnen. Dies konnte sehr effizient durch Koexpression des D-Glukose/D-Fruktose Facilitatorgens aus *Z.*

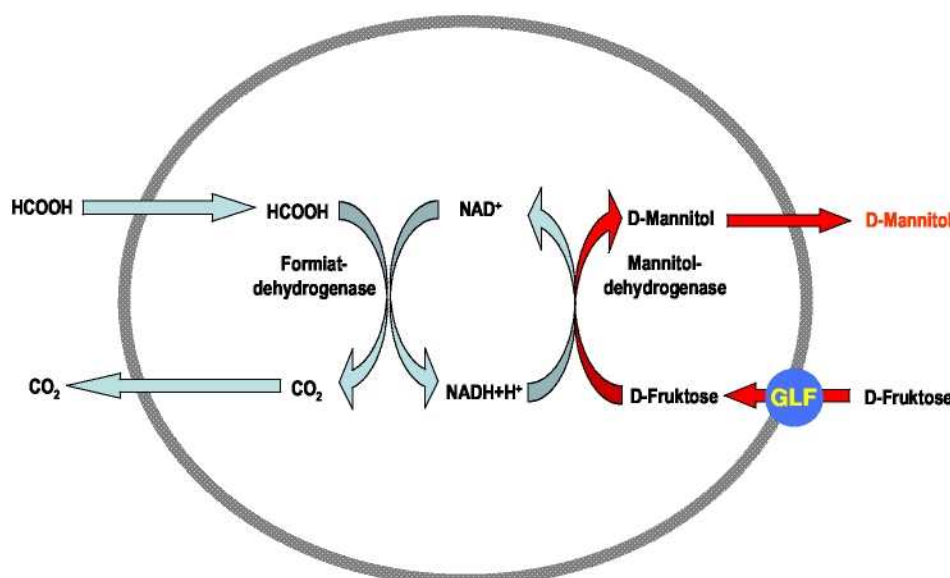


Abbildung 4.1: Rekombinanter Redoxzyklus in der Ganzzellbiotransformation

mobilis realisiert werden und daher wurde der Effekt von GLF auf die Produktivität von rekombinanten Stämmen von *B. megaterium* und *C. glutamicum* in dieser Arbeit untersucht. Der Stoffwechselweg zu Bildung von D-Mannitol ähnelt dabei zunächst dem in heterofermentativen Milchsäurebakterien wie *L. mesenteroides*. D-Fruktose wird ohne Phosphorylierung in das Zytoplasma der Zellen aufgenommen und durch die MDH zu D-Mannitol reduziert (Wisselink u. a., 2005). Während bei Milchsäurebakterien der Kofaktor NADH durch entsprechende Stoffwechselwege regeneriert wurde, geschah dies in *B. megaterium* und *C. glutamicum* durch die FDH, deren Gen in beiden Spezies heterolog exprimiert wurde.

Biotransformationen mit Stämmen von *B. megaterium* und *C. glutamicum*, die rekombinant für das Formiatdehydrogenasegen und das Mannitol-2-Dehydrogenasegen waren, zeigten ohne zusätzliche Expression eines D-Fruktosetransporters signifikante D-Mannitol-produktivitäten in Konzentrationen von 16-21 g l⁻¹. In dieser zunächst überraschenden Eigenschaft unterschieden sich beide rekombinanten Stämme von rekombinanten Zellen von *E. coli*. Die Fähigkeit zur Aufnahme freier D-Fruktose wurde für *B. megaterium* bereits von WAGNER (2000) beschrieben. Für ihre Untersuchungen klonierten die Autoren einen *B. megaterium*-Stamm der defizient für die Gene *ptsH* und *ptsI* ist und daher beide zum PTS-System gehörenden Proteine HPr und EI nicht mehr zu Verfügung hat. Dieser Stamm konnte Zucker wie D-Fruktose oder D-Glukose nicht über das PTS-System dem Stoffwechsel zuführen. Zellen dieses Stammes zeigten bei

Wachstum auf einem D-Fruktose-Minimalmedium ca. 30% der D-Fruktoseaufnahme rate im Vergleich zum Wildtyp und für D-Glukose eine unveränderte Aufnahme rate (Wagner u. a., 2000). CHIOU (2002) konnte durch Transkriptionsanalyse in *B. megaterium* einen Genlocus identifizieren, der für einen nicht-PTS abhängigen D-Fruktosetransporter kodiert; die Autoren stellten allerdings ebenso fest, dass dieses Gen bei Wachstum auf D-Fruktose nicht induziert bzw. dessen Transkription nicht hochreguliert wird. Die Fähigkeit von rekombinanten Stämmen von *B. megaterium* zur Bildung von D-Mannitol zeigte, dass die Zellen in der Lage waren, D-Fruktose ohne Phosphorylierung aufzunehmen. Die Anwesenheit eines PTS-unabhängigen Transporters kann diese Fähigkeit erklären. Bereits zuvor konnten für einige *Bacillus*-Arten PTS-unabhängige Aufnahmesysteme z.B. für D-Glukose und D-Fruktose identifiziert werden. So konnte in *B. subtilis* das Genprodukt GlcP als PTS-unabhängiger D-Glukose/Mannose:H⁺-Symporter identifiziert werden der zu der Klasse der Uniporter/Symporter/Antiporter-Familie gehört (Paulsen u. a., 1998). In *B. licheniformis* konnte eine PTS-unabhängige Transportaktivitäten für D-Glukose nachgewiesen werden (Tangney u. a., 1993). Diese Transportaktivität ist dabei vom pH-Wert des Mediums abhängig, sodass es sich vermutlich bei der D-Glukoseaufnahme nicht um erleichterte Diffusion handelt (Lorca u. a., 2007).

Für *C. glutamicum* konnten solche PTS-unabhängigen D-Glukose und/oder D-Fruktose Importer bisher nicht identifiziert werden, es gab aber Hinweise für deren Anwesenheit. DOMINGUEZ und LINDELY (1996) postulierten die Präsenz eines PTS unabhängigen D-Fruktose Exporters in *C. glutamicum*: während des Wachstums der Zellen auf Saccharose wird diese durch das PTS^{Suc} aufgenommen und dabei zu Saccharose-6-phosphat phosphoryliert und anschließend in der Zelle durch die Saccharose-6-phosphat Hydrolyase (Gen *scrB*) in freie D-Fruktose und D-Glukose-6-phosphat gespalten (Moon u. a., 2005). Das D-Glukose-6-phosphat kann durch die Aktivität der Glukose-6-phosphat Isomerase (Gen *pgi*), Fruktose-1,6-bisphosphatase (Gen *fbp*) und der Phosphofruktokinase (Gen *pfk*, Glukoneogenese) im Zentralstoffwechsel weiter metabolisiert werden (Abbildung 4.2). D-Fruktose im Zytoplasma von *C. glutamicum* kann durch das Fehlen einer Fruktokinase nicht weiter umgesetzt werden. Die natürlich vorhandene 1-Phosphofruktokinase (Gen *pfbB*) erkennt freie D-Fruktose nicht als Substrat. Stattdessen wird die D-Fruktose über einen unbekannten Exportmechanismus in das Nährmedium sekretiert, anschließend vom PTS^{Fru} aufgenommen und verstoffwechselt. Mutanten, bei denen das Gen für das PTS-gebundene Fruktoseaufnahme protein (*ptsF*) deletiert war, zeigten fast gleiches Wachstum wie der Wildtyp auf Saccharose und im Aussenmedium akkumulierte D-Fruktose (Dominguez und Lindley, 1996). Diese Resultate

tate zeigten, dass *C. glutamicum* einen PTS-unabhängigen Transporter für D-Fruktose haben muß und weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass die natürliche Expression eines Glukokinasegens in *C. glutamicum* auch auf die Anwesenheit von freier D-Glukose und somit möglicherweise auf einen PTS-unabhängigen D-Glukosetransporter hinweist (Park u. a., 2000).

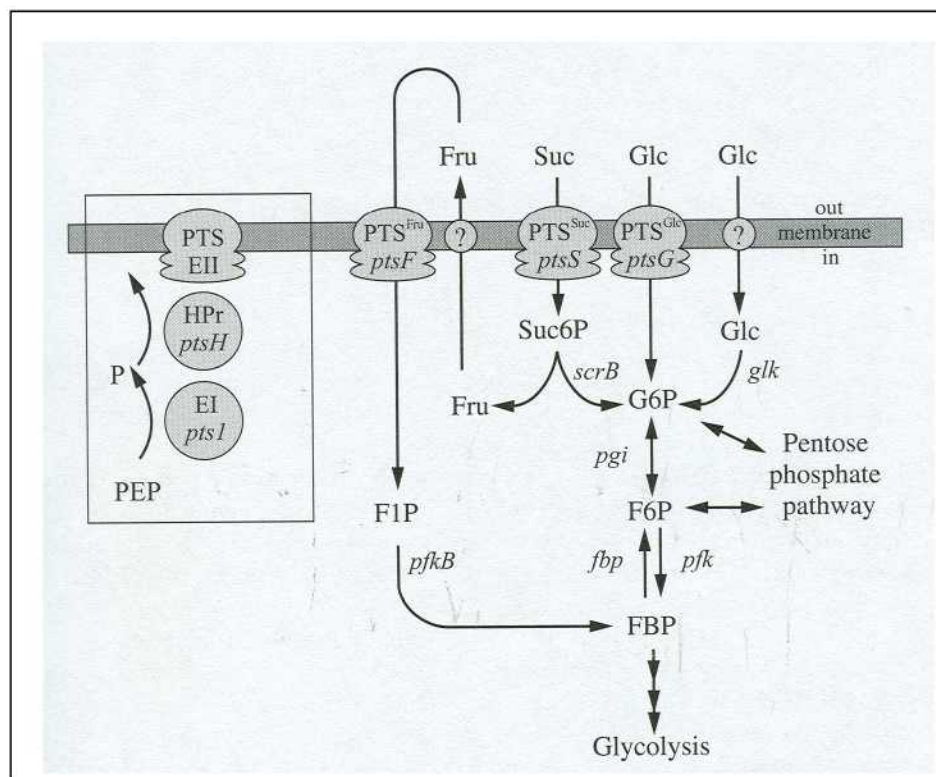


Abbildung 4.2: Zuckertransportsystem von *C. glutamicum*. PTS^{Glc}, D-Glukose PTS; PTS^{Fru}, D-Fruktose PTS; PTS^{Suc}, Saccharose PTS; ?, nicht identifiziertes Transportsystem; Glc, D-Glukose; Fru, D-Fruktose; Suc, Saccharose; G6P, Glukose-6-phosphat; F6P, Fruktose-6-phosphat; FBP, Fruktose-1,6-bis-phosphat; Suc6P, Saccharose-6-phosphat. Genabkürzungen werden im Text erklärt (Eggeling und Bott, 2005)

Rekombinante Stämme von *C. glutamicum*, die zusätzlich zu beiden Dehydrogenasegenen (*fdh* und *mdh*) auch das Gen für den D-Glukose/D-Fruktose Facilitator exprimierten zeigten eine 5,5-fach höhere Produktivität, als der Stamm ohne dieses heterologe Facilitatorgen (Bäumchen und Bringer-Meyer, 2007). Die Expression dieses Gens in *B. megaterium* hingegen zeigte keinen steigernden Einfluss auf die Produktivität, vermutlich, wegen nicht funktioneller Expression. Für beide rekombinanten Spezies konnten konstante Produktbildungsraten über mindestens 30 Stunden bei einem stabilen Kofak-

Tabelle 4.1: Vergleich der Biotransformationsparameter von ruhenden Zellen von *E. coli* BL21(DE3) (pET24(+)-*fdh-mdh* pZY507-*glf*), *C. glutamicum* (pEKEx2-*fdh-mdh* pVWEx2-*glf*) und *L. mesenteroides* ATCC 9135

Parameter	Rekombinanter <i>E. coli</i> BL21 (DE3) (Kaup u. a., 2004)	<i>L. mesenteroides</i> ATCC 9135 (von Weymarn u. a., 2002)	Rekombinanter <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032
D-Mannitol Ausbeute (mol mol ⁻¹)	0,96	0,91	0,92
Spez. D-Mannitol Produktivität (g g ⁻¹ h ⁻¹)	6,3	1,6	1,2
D-Mannitol Konzentration (g l ⁻¹)	178	92	87
Kofaktorregenerierung	Formiat/FDH	Stoffwechselweg	Formiat/FDH
Erfolgreiche Biotransformationen (Anzahl x Stunden)	2 x 4	14 x 6	4 x 24
Durchschnittliche D-Mannitol Produktivität (g g ⁻¹ h ⁻¹)	1,1	1,6	1,0
Nebenprodukte	keine	Laktat/Acetat	keine

torpool beobachtet werden. Dies ließ den Schluss zu, dass die Substrat-/Produktflüsse über die Zytoplasmamembran mit konstanter Rate erfolgten.

Durch 'metabolic engineering' des Milchsäurebakteriums *L. plantarum* konnte bereits ein effizienter Biotransformationsansatz zur Gewinnung von Sorbitol, dem Strukturisomer von D-Mannitol, mit konstanter Produktivität erzielt werden. Auch in diesem Ansatz konnten die Zellen unter ruhenden Bedingungen eingesetzt werden. Die Eigenschaft zur stabilen Produktivität konnte mit D-Mannitol produzierenden, rekombinanten Stämmen von *E. coli* nicht erzielt werden; dennoch zeigte dieser Stamm eine hohe Anfangsproduktivität mit einhergehendem Abfall des Kofaktortpools. Während der Biotransformation zeigte der rekombinante Stamm von *C. glutamicum* vergleichbare Produktivitäten bei nahezu gleichen Ausbeuten gegenüber dem natürlichen D-Mannitol Produzenten, dem Milchsäurebakterium *L. mesenteroides* (Tabelle A.3). Die Eigenschaft zum Langzeiteinsatz für die D-Mannitolproduktion konnte bei rekombinanten Stämmen von *E. coli* nicht erzielt werden. Hier liegt ein wesentlicher Unterschied zu *C. glutamicum* und *B. megaterium*, die über mindestens 30 Stunden eine konstante Produktivität zeigten.

Ein großer Vorteil der Kofaktorregenerierung in den rekombinanten Bakterienstämmen von *B. megaterium*, *C. glutamicum* und *E. coli* mittels der FDH war die Vermeidung der Bildung unerwünschter Nebenprodukte. Eine D-Mannitol Bildung ohne Nebenprodukte ist sonst nur bei der enzymatischen Synthese bekannt (Slatner u. a., 1998b, 1999). Der ebenfalls stabile D-Mannitolproduzent *L. mesenteroides* konnte in 14 sequenziellen Ansätzen zur Gewinnung von D-Mannitol eingesetzt werden. Da in diesem Fall die Kofaktorregenerierung über den D-Glukosemetabolismus erfolgte entstanden die Nebenprodukte Laktat und Acetat in Konzentrationen von 22 g l⁻¹ und 19 g l⁻¹ (von Weymarn u. a., 2002). Derart hohe Nebenproduktkonzentrationen erschweren die Aufbereitung von D-Mannitol und stellen trotz guter Produktivitäten einen klaren Nachteil gegenüber dem hier beschriebenen Ansatz dar.

Untersuchungen der intrazellulären D-Fruktosekonzentration bei den rekombinanten, Gram-positiven Bakterien während der Biotransformation haben gezeigt, dass diese in limitierenden Konzentrationen im Zytoplasma vorlag. Dies konnte auch für den hochaktiven rekombinanten Stamm von *E. coli* gezeigt werden (Heuser u. a., 2007). Die Produktivität wurde *in vivo* somit nicht durch die Aktivität der FDH limitiert, was ursprünglich postuliert wurde (Kaup, 2004). Es kann auch angenommen werden, dass der Transport von D-Mannitol aus den Zellen die Umsatzrate nicht beeinflusst. Sehr wahrscheinlich erfolgt bei *C. glutamicum* der Transport von D-Mannitol über mechanosensitive Kanäle, die der Osmoregulation dienen. Diese können kompatible Solute, wie Betain oder Prolin, mit einer Rate von bis zu 6000 µmol pro Minute und Gramm Zelltrockengewicht ausschleusen (Ruffert u. a., 1997; Weinand u. a., 2007). Derartige Kanäle konnte auch für Arten von *Bacillus* identifiziert werden (Wahome und Setlow, 2006). Die Steigerung der Produktivität beider Ganzzellbiotransformationsansätze kann in Zukunft durch eine Erhöhung der D-Fruktoseimportrate erzielt werden. Ein Resultat dieser Arbeit war die Feststellung, dass *C. glutamicum* D-Fruktose in das Zytoplasma importieren kann. Aus diesem Grund sollte der bisher unbekannte D-Fruktoseimport untersucht werden und geklärt werden, ob es einen D-Fruktosetransporter gibt, der eine höhere Transportrate als GLF aufweist.

Die Expression der beiden Gene *Cgl0181* und *Cgl3058*, sowie deren Deletion in *C. glutamicum* zeigte, dass diese Gene für Transporter kodieren, die eine Aufnahme von D-Fruktose in das Zytoplasma von *C. glutamicum* ermöglichten. Somit konnten zum ersten Mal zwei PTS-unabhängige D-Fruktoseimporte in *C. glutamicum* identifiziert

werden. *Cgl0181* und *Cgl3058* wurden zuvor als *myo*-Inositoltransporter beschrieben (Krings u. a., 2006). Die Resultate der Biotransformation mit rekombinanten Deletionsmutanten von *C. glutamicum* zeigten, dass beide Transporter eine nahezu gleiche Aufnahme rate für D-Fruktose hatten. Die Aminosäuresequenzen dieser Proteine zeigten eine hohe Homologie zu der Aminosäuresequenz von GLF und beide Transporter gehören zur Facilitatoren Großfamilie (Krings u. a., 2006). Durch die Überexpression dieser Transportergene konnte die Produktivität von *C. glutamicum* signifikant gesteigert werden. Dennoch zeigten beide Transporter nicht die D-Fruktoseaufnahme rate wie bei Koexpression von *glf*, vermutlich wegen der geringeren Spezifität der Transporter für D-Fruktose. Für eine Steigerung der Produktivität müssen somit in Zukunft Transporter identifiziert werden, die mit einer höheren Rate D-Fruktose aufnehmen als GLF. Für eukaryontische Mikroorganismen wurden bisher zahlreiche, spezifische Permeasen identifiziert, die Zucker ohne Phosphorylierung über die Membran transportieren können (Pao u. a., 1998). So konnte in der Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe* eine D-Glukose/D-Fruktose Permease identifiziert werden, die bei nahezu gleichen K_M -Wert wie bei GLF D-Fruktose mit einer 11-fach höheren Transportrate aufnehmen kann als der Facilitator GLF (Heiland u. a., 2000). Über eine funktionale Expression solcher eukaryontischen Membranproteine in Prokaryonten ist allerdings bisher nichts bekannt. Eine weitere Verbesserungsmöglichkeit der Langzeitproduktivität besteht in der Entfernung von D-Mannitol aus dem Medium während der Biotransformation. Die Aktivität der MDH wird nämlich durch D-Mannitol kompetitiv gehemmt. (Kaup, 2004). Diese Eigenschaft konnte auch bei Ganzzellbiotransformationen mit *L. mesenteroides* beobachtet werden. Die MDH dieses Stammes zeigt eine hohe Ähnlichkeit zu der MDH aus *L. pseudomesenteroides* (Aarnikunnas u. a., 2002). Eine *in situ* Produktabtrennung könnte vor allem in Hinblick auf eine Langzeitproduktbildung die D-Mannitolbildungsrate stabilisieren.

4.2 MHB-Bildung mit *B. megaterium* und *C. glutamicum*

Mittels der *R*-Alkoholdehydrogenase LBADH aus *L. brevis* wurde bei der Ganzzellbiotransformation mit *B. megaterium* und *C. glutamicum* der sekundäre Alkohol MHB durch Reduktion von MAA gewonnen. Die LBADH besitzt ein breites Substratspektrum und ist ein interessanter Katalysator für die Bereitstellung von Synthesebausteinen für die asymmetrische Synthese (Ernst u. a., 2005; Schlieben u. a., 2005). Bereits in einigen anderen Arbeiten wurde die LBADH zusammen mit der FDH als Redoxzyklus zur

Biotransformation sowohl *in vivo* (Ernst u. a., 2005), als auch *in vitro* (Ferloni u. a., 2004; Trivedi u. a., 2006) untersucht. Der Ganzzellansatz mit *E. coli* als Wirtsorganismus zeigte dabei nahezu 100%-ige Umsatzraten im Verlauf von 70 Minuten (40 mM Substrat, 20 g l⁻¹ Zellfeuchtgewicht) (Ernst u. a., 2005). Rekombinante Stämme von *C. glutamicum* und *B. megaterium* hingegen zeigten über einen Zeitraum von 24 Stunden eine konstante Produktbildungsrate, die allerdings deutlich geringer war als bei Stämmen von *E. coli* und zu einem ca. 10%-igen Substratumsatz führte (50 mM Substrat, 20 g l⁻¹ Zellfeuchtgewicht). Untersuchungen der *in vitro* Enzymaktivitäten der FDH und LBADH ergaben, dass kein Abfall der spezifischen Aktivitäten innerhalb von 24 Stunden gemessen werden konnte. Somit konnte die geringe Umsatzrate nicht mit einem raschen Abfall der Enzymaktivitäten erklärt werden. Die hohe Stabilität der LBADH unter Biotransformationsbedingungen konnte zuvor bereits sowohl für *in vitro* (Goldberg u. a., 2007a), als auch *in vivo* (Goldberg u. a., 2007b) Ansätze festgestellt werden und zeigte, dass dieses Enzym für Biotransformationen sehr gut geeignet ist.

Aufgrund der geringen Löslichkeit von MAA und MHB in wässrigen Lösungen wurden MAA Konzentrationen von 50 mM eingesetzt. Allgemein wird die Hypothese vertreten, dass kurzkettige, lipophile Verbindungen wie MAA und MHB, aber auch Ethanol oder Isopropanol zur Permeabilisierung der Zellmembran beitragen und so die Membran durch Diffusion passieren. So konnte LIU (1999) die Produktivität einer Ganzzellbiotransformation mit *S. cerevisiae* durch Zugabe von 40% Ethanol oder Isopropanol (v/v) um den Faktor 380 und 580 steigern (Liu u. a., 1999). Die Autoren erklären diesen Effekt mit einer durch Permeabilisierung hervorgerufenen erleichterten Diffusion der Substrate und Produkte über die Membran der Zellen. Auch bei der Gewinnung von Sorbitol mit ganzen Zellen von *Z. mobilis* konnte durch Permeabilisierung mit 10% Toluol (v/v) die Produktivität der Zellen signifikant gesteigert werden (Silveira und Jonas, 2002; Erzinger und Vitolo, 2006).

Die geringe Produktivität von *B. megaterium* und *C. glutamicum* kann vermutlich nicht damit erklärt werden, dass der Mureinsacculus der Gram-positiven Bakterien einen höheren Diffusionswiderstand als die Zellwand von *E. coli* aufweist (Nikaido, 1976); beide morphologischen Strukturen können Moleküle bis zu einer Größe von 55 kDa passieren lassen (Demchick und Koch, 1996) und somit sollte MAA diese Barriere überwinden können.

Eine Erklärungsmöglichkeit für die unterschiedliche Produktivität der Zellen könnte die

Anwesenheit von Hopanoiden in der Zellmembran von *B. megaterium* und *C. glutamicum* sein (Kannenbergh und Poralla, 1999), die in der Membran von *E. coli* nahezu fehlen (Flesch und Rohmer, 1987). Hopanoide sind pentazyklische Triterpenoide und sind bei Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien weit verbreitet (Sahm u. a., 1993). *In vitro* Studien mit Modellmembranen haben gezeigt, dass Hopanoide die Phospholipid-Doppelschicht stabilisieren und so Bakterienzellen gegen Stress wie hohe Temperaturen, hohe Sauerstoffpartialdrucke und organische Substanzen wie z.B. Alkohole schützen. Für den Mikroorganismus *Zymomonas mobilis* konnte eine Erhöhung der Hopanoidproduktion bei einer Erhöhung der Ethanolkonzentration im Wachstumsmedium gezeigt werden (Bringer u. a., 1985). So kann *Zymomonas mobilis* dank des ausgeprägten Hopanoidanteils der Membran Ethanolkonzentration bis 15% (v/v) tolerieren (Perzl u. a., 1998). Möglicherweise ist die Resistenz von *B. megaterium* gegen MAA bzw. MHB mit der Anwesenheit von Hopanoiden erklärbar. Bei *C. glutamicum* konnten bisher noch keine Hopanoide nachgewiesen werden und dieser Organismus verfügt möglicherweise über einen bisher unbekannten Schutzmechanismus (Eggeling, 2007). Für die Produktivität der Zellen stellt die fast Hopanoid-freie Membran von *E. coli* offenbar ein deutlich geringeres Diffusionshindernis für MAA und MHB dar. Ein Ansatz zur Verbesserung der Produktivität könnte somit im Einsatz von Mutanten bestehen, die sich im Hinblick auf ihre Membrankonfiguration vom Wildtyp unterscheiden.

Rekombinante Stämme von *B. megaterium* und *C. glutamicum* zeigten bei der Gewinnung von MHB eine hohe Resistenz und Toleranz gegenüber Lösungsmitteln und erwiesen sich als geeignete Wirtsorganismen für zukünftige Biotransformationen unter der Beteiligung von organischen Lösungsmitteln. Somit stellen beide Spezies möglicherweise eine gute Alternative zu *E. coli* dar, wenn Bedingungen vorherrschen, die Zellen von *E. coli* nicht mehr tolerieren können.

A Anhang

Medienzusammensetzung für *B. megaterium*

2x AB3 (Antibiotic Medium No. 3, DIFCO)

- 7 g Fertigmedium in 200 ml lösen und 15 Minuten autoklavieren.

2x SMM

- 1 M Saccharose
- 40 mM Maleinsäure
- 40 mM MgCl_2
- auf pH 6,5, sterilfiltrieren

SMMP

- gleiche Volumina von 2x SMM und 2x AB3 mixen

PEP-P

- 40 % (w/v) PEG8000 in 1x SMM
- für 12 Minuten autoklavieren (sollte nicht braun werden)

Ultraschall-Puffer

- 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
- 200 mM NaCl

8x CR5-Salzlösung

- 1,25 g K_2SO_4
- 50 g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$
- 0,25 g KH_2PO_4
- 11 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
- in 625 ml Wasser lösen

CR5-Top AGAR

Komponente A

- 51,5 g Saccharose
- 3,25 g MOPS

- 0,33 NaOH
- in 250 ml Wasser lösen, auf pH 7,3 einstellen, 12 Minuten autoklavieren

Komponente B

- 2 g AGAR
- 0,1 g Casaminosäuren
- 5 g Hefeextrakt
- 20 Minuten autoklavieren

Komponente C

- Komponente A und Komponente B vereinen
- 57,5 ml 8x CR5 Salzlösung
- 25 ml 12 % Prolin (w/v, sterilfiltriert)
- 25 ml 20 % Glukose (w/v, sterilfiltriert)
- Aliquots zu je 2 ml herstellen (Menge je nach Bedarf)

Tabelle A.1: Zur Genamplifikation verwendete Oligonukleotide (Konstrukte für *B. megaterium*)

Name	Sequenz (5' → 3')	Konstrukt
Bac_FDHD_Kpn1_f	TATA ^{Kpn1} GGTACC GAA GGA GAT ATA CAT ATG	pWH1520- <i>fdh-mdh</i>
Bac_FDHD_Sbf1_r	ATAT ^{Kpn1} CCTGCA GGT TAT GCC TCT TCG CCA CC	pWH1520- <i>fdh-mdh</i>
Bac_LBADH_Sac1_f	TATA ^{Sac1} GAGCTC AAG GAG GTG AAC AAA CAT GTC TAA CCG TTT GGA TGG TAA GGT AGC AAT CA	pCBBm- <i>fdh-lbadh</i>
Bac_LBADH_Sph1_r	ATAT ^{Sph1} TGCATG CCT ATT GAG CAG	pCBBm- <i>fdh-lbadh</i>

Tabelle A.2: Zur Genamplifikation verwendete Oligonukleotide (Konstrukte für *C. glutamicum*)

Name	Sequenz (5' → 3')	Konstrukt
C_Glf_Sbf1_f	TATA ^{Sbf1} CCTGCA GGA AGG AGA TAT AGA TAT GAG TTC TGA AAG TAG TCA GGG TCT AGT CAC GC	pVWEx2- <i>glf</i>
C_Glf_Xba1_r	ATAT ^{Xba1} TCTAGA CTA CTT CTG GGA GCG CCA CAT CTC CT	pVWEx2- <i>glf</i>
ECgl0181_Pst1_f	TATA ^{Pst1} CTGCAG ATG GCT AGT ACC TTC ATT CAG GCC	pVWEx2- <i>Cgl0181</i>
ECgl0181_Sal1_r	ATAT ^{Sal1} GTCGAC TTA GTG CAC CTT TCC TTT TCG GAT GTC	pVWEx2- <i>Cgl0181</i>
ECgl3058_Xba1_f	TATA ^{Xba1} TCTAGA ATG ACG GAC ATC AAG GCC ACA TCA AGT	pVWEx2- <i>Cgl3058</i>
ECgl3058_BamH1_r	ATAT ^{BamH1} GTCGAC TTA AGC CTT CTT GAA GAT CTG GCC GGG	pVWEx2- <i>Cgl3058</i>
C_LBADH_BamH1_f	TATA ^{BamH1} GGATCC AAG GAG ATA TAG ATA TGT CTA ACC GTT TGG ATG GTA AGG TAG CAA TCA TT	pEKEx2- <i>lbadh</i>
C_LBADH_Sac1_r	ATAT ^{Sac1} GAGCTC CTA TTG AGC AGT GTA GCC ACC GTC AAC	pEKEx2- <i>lbadh</i>
C_FDH_Sbf1_f	TATA ^{Sbf1} CCTGCA GGA AGG AGA TAT AGA TAT GGC AAA GGT CCT GTG C	pEKEx2- <i>fdh-lbadh</i>
C_FDH_BamH1_r	ATAT ^{BamH1} GGATCC TCA GAC CGC CTT CTT GAA CTT GGC	pEKEx2- <i>fdh-lbadh</i>
Co_FM_Sbf1_f	TATA ^{Sbf1} CCTGCA AGG GAA GGA GAT ATA CAT ATG	pEKEx2- <i>fdh-mdh</i>
Co_FM_Kpn1_r	ATAT ^{Kpn1} GGTACC TTA TGC CTC TTC GCC ACC	pEKEx2- <i>fdh-mdh</i>

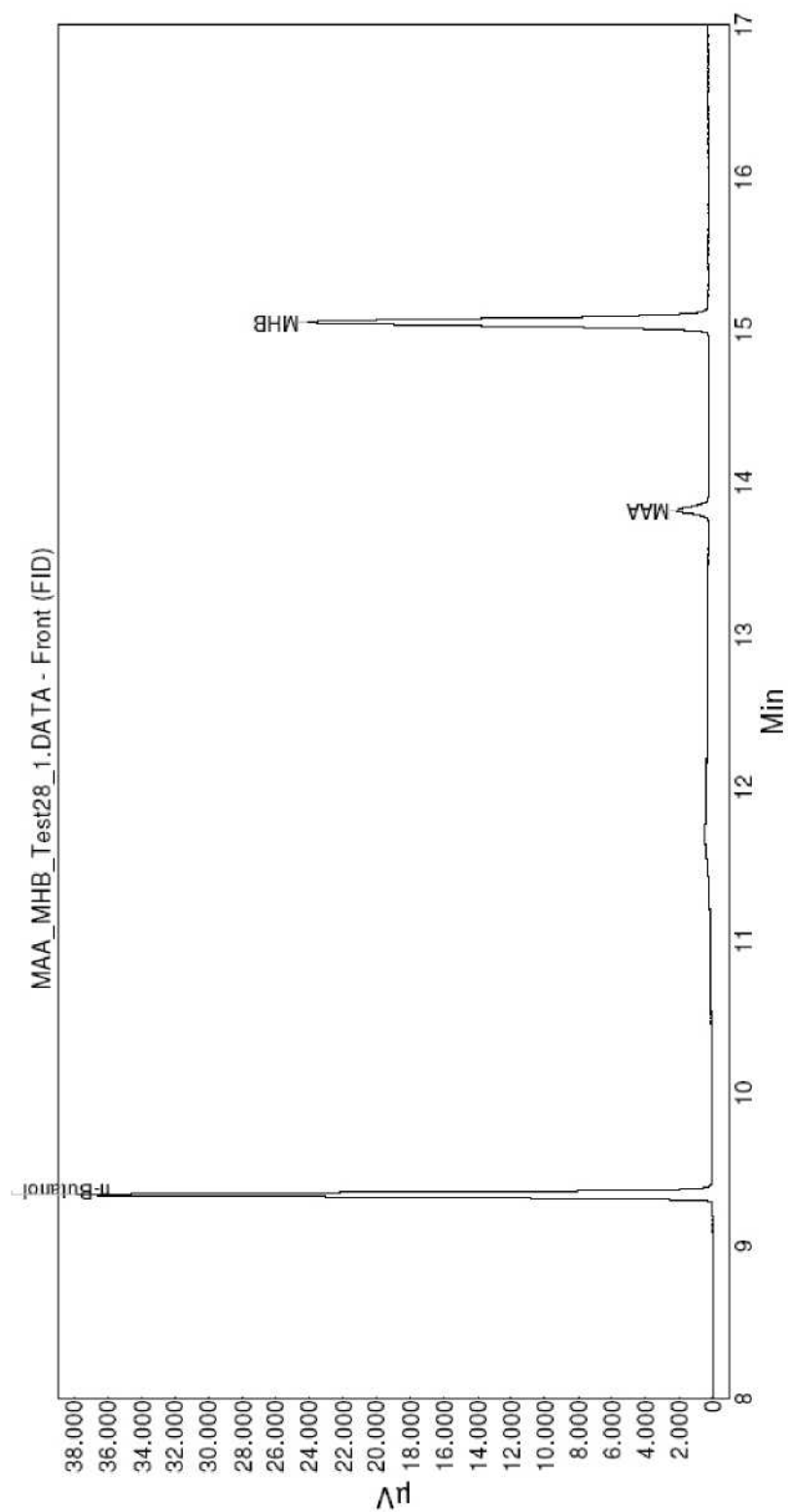


Abbildung A.1: GC-Chromatogramm einer Probe aus einem Biotransformationsansatz

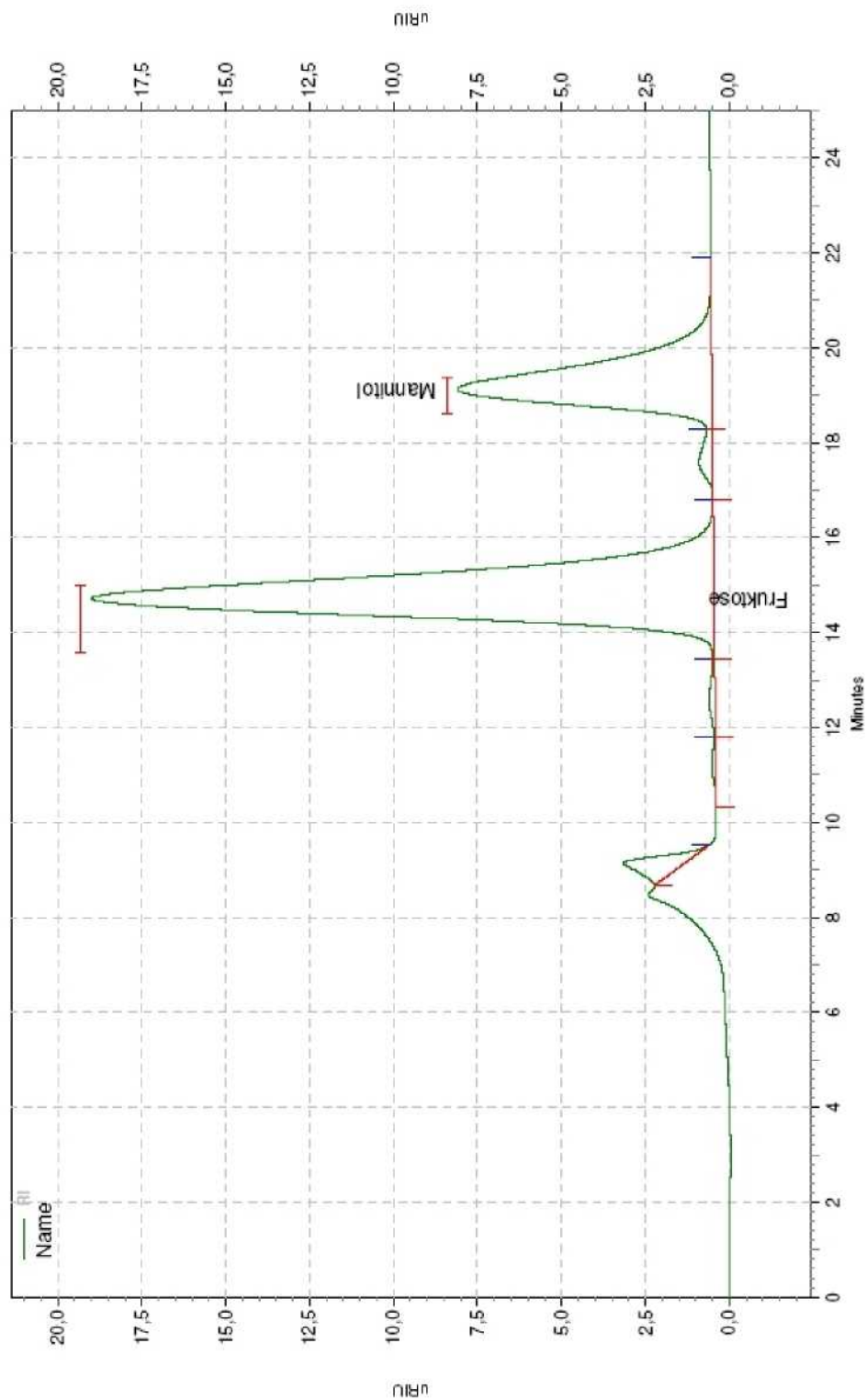


Abbildung A.2: HPLC-Chromatogramm einer Probe aus einem Biotransformationsansatz

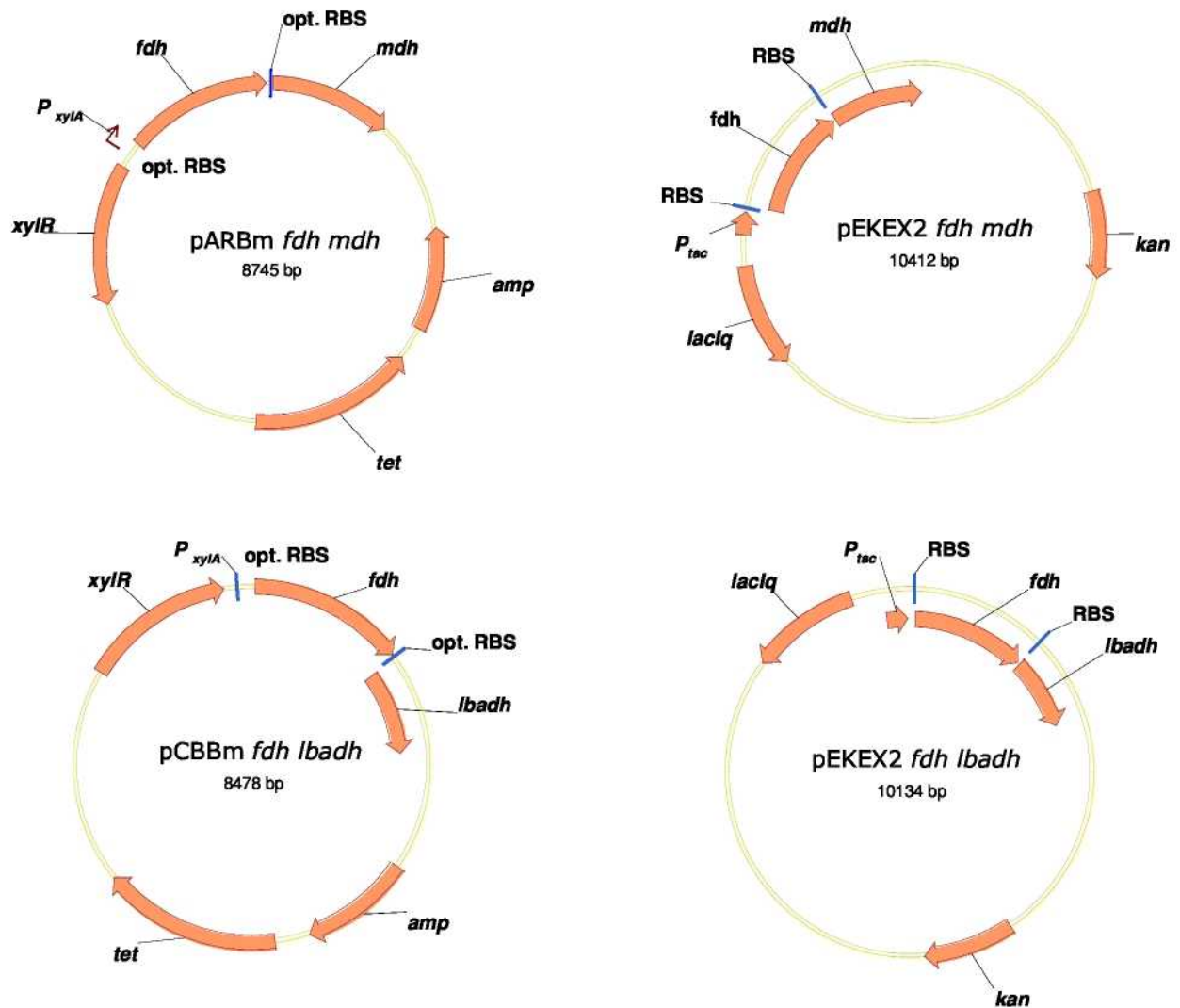


Abbildung A.3: Schematische Darstellung der Plasmide pEKEx-*fdh-mdh*, pEKEx-*fdh-lbadh*, pARBm-*fdh-mdh* und pCBBm-*fdh-lbadh* zur Etablierung heterologer Redoxzyklen in *C. glutamicum* und *B. megaterium*

M.vaccaae N10 adapted <i>fdh</i>	ATGGCAAAGGTCCTGTGCGTTCTTTACGATGATCCGGTCGACGGCTACCCGAAGACCTAT ATGGCTAAAGTATTATGTGATTATACGATGATCCAGTAGATGGTTACCCAAAAACATAC *****
M.vaccaae N10 adapted <i>fdh</i>	GCCCGCAGCATCTTCCGAAGATCGACCACATCCGGGCGGCAGATCTTGCCGACGCCG GCTCGTGATGATTTACCAAAATTTGATCACTACCCAGGTGGTCAAATTTTACCAACACCA *****
M.vaccaae N10 adapted <i>fdh</i>	AAGGCCATCGACTTCACGCCCGGCGAGTTGCTCGGCTCCGTCTCCGGCGAGCTCGGCCTG AAAGCTATTGATTTACACCAGGTCAATTATTAGGTTCAAGTATCAGGTGAATTAGGTTTA *****
M.vaccaae N10 adapted <i>fdh</i>	CGCGAATATCTCGAATCCAACGGCCACACCTTGGTCGTGACCTCCGACAAGGACGGCCCC CGTGAATACCTTAGAATCAACGGTCACACATTTAGTAGTAACATCAGATAAAGATTGGTCCA *****
M.vaccaae N10 adapted <i>fdh</i>	GACTCGGTGTTTCGAGCGCGAGCTGGTCGATGCGGATGTCGTATCTCCAGCCCTTCTGG GATTCAGTATTCGAACGTGAATTAGTAGATGCTGATGTAGTAATTTACAAACCATTTCTGG *****
M.vaccaae N10 adapted <i>fdh</i>	CCGGCTATCTGACGCGCGAGCGCATCGCCAAGGCCAAGAACCTGAAGCTCGCGCTCACC CCAGCTTACTTAACACCAGAACGTATCGCTAAAGCTAAAACTTAAATTAGCTTTAACA *****
M.vaccaae N10 adapted <i>fdh</i>	GCCGGCATCGGTTCCGACCACGTGATCTTCAGTCGGCTATCGACCGCAACGTACCGTG GCTGGTATTGGTTTACATCAGTATTTACAATCAGCTATTGATCGTAACGTAAACAGTA *****
M.vaccaae N10 adapted <i>fdh</i>	GCGGAAGTCACCTACTGCAACTCGATCAGCGTCGCCGAGCATGTGGTGATGATGATCCTG GCTGAAGTAACATACTGTAACCTCAATTTTCAAGTATGTAACACGTAGTAATGATGATTTTA *****
M.vaccaae N10 adapted <i>fdh</i>	TCGCTGGTGCCTAATCTGCCCTCGCACGAATGGGCGCGGAAGGGCGGCTGGAACATC TCATTAGTACGTAACTACTTACCATCACACGAATGGGCTCGTAAAGGTGGTTGGAACATT *****
M.vaccaae N10 adapted <i>fdh</i>	GCCGACTGCGTCTCCACGCCTACGACCTCGAGGCGATGCATGTCGGCACCGTGGCCGCC GCTGACTGTGTATCACACGCTTACGATTTAGAAGCTATGCACGTAGGTACAGTAGCTGCT *****
M.vaccaae N10 adapted <i>fdh</i>	GGCCGCATCGGTCTCGCGGTGCTGCGCGGTCTGGCGCCGTTCGACGTGCACCTGCACCTAC GGTCGTATTGGTTTAGCTGTATTACGTGCTTTAGTCCATTCGATGTTCACTTACACTAC *****
M.vaccaae N10 adapted <i>fdh</i>	ACCGACCGTCACCGCTGCCGGAATCGGTTCGAGAAGGAGCTCAACCTCACCTGGCACGCG ACAGATCGTCACCGTTTACCAGAATCAGTAGAAAAAGAAATTAAACCTTACATGGCACGCT *****
M.vaccaae N10 adapted <i>fdh</i>	ACCCGCGAGGACATGTATCCGGTTTGCGACGTGGTGACGTGAACGCCCCGTGCACCCC ACACGTGAAGATATGTACCCAGTATGTGATGTAGTAACATTAACCTGTCCATTACACCCA *****
M.vaccaae N10 adapted <i>fdh</i>	GAAACCGAGCACATGATCAATGACGAGACGCTGAAGCTGTTCAAGCGTGGCGCCTACATC GAAACAGAACACATGATTAACGATGAAACATTAATAATTATCAACCGTGGTGCCTTACATT *****
M.vaccaae N10 adapted <i>fdh</i>	GTCAACACCGCCCGCGCAAGCTGTGCGACCGCATGCCGTGGCACGTGCGCTCGAATCC GTAAACACAGCTCGTGGAAAATTATGTGATCGTGATGCTGTAGCTCGTGGCTTTAGAATCA *****
M.vaccaae N10 adapted <i>fdh</i>	GGCCGGCTGGCCGGCTATGCCGGCGACGTGTGGTTCCCGCAGCCGCGCCGAAGGACCAC GGTCGTATTAGCTGGTTACGCTGGTGATGATGTTTCCACAACCGCTCCAAAAGATCAC *****
M.vaccaae N10 adapted <i>fdh</i>	CCCTGGCGGACGATGCCCTATAACGGCATGACCCCGCACATCTCCGGCACACGCTGACC CCATGGCGTACAATGCCATACAACGGTATGACACCACATTTTCAAGTACAACATTAAACA *****
M.vaccaae N10 adapted <i>fdh</i>	GCGCAGCGCGCTTATGCGGCGGGCACCCGCGAGATCCTGGAGTGCTTCTTCGAGGGCCGT GCTCAAGCTCGTTATGCTGCTGGTACACGTGAAATTTTGAATGTTCTTCGAAGGTCGT *****
M.vaccaae N10 adapted <i>fdh</i>	CCGATCCGCGACGAATACCTCATCGTGACGGGCGGCGCTCTTGCCGGCACCGGCGCGCAT CCAATTCTGATGAATACCTTAATTGTTCAAGGTGGTGCCTTTAGCTGGTACAGGTGCTCAC *****
M.vaccaae N10 adapted <i>fdh</i>	TCCTACTCGAAGGGCAATGCCACCGGCGGTTCGGAAGAGGCGCCAAAGTTCAAGAAGGCG TCATACTCAAAAGGTAAAGCTACAGGTGGTTTCAAGAAGAGCTGCTAAATTCAAAAAGCT *****
M.vaccaae N10 adapted <i>fdh</i>	GTC GTA **

Abbildung A.4: Gensequenz der Kodonnutzung angepassten Formiatdehydrogenase aus *M. vaccae* N10

Tabelle A.3: In dieser Arbeit verwendete Abkürzungen und ihre Bedeutung

Abkürzung	Einheit	Bedeutung
λ	nm	Wellenlänge
ϵ	L (mol cm)^{-1}	molarer Extinktionskoeffizient
$\Delta E/\Delta t$	min^{-1}	Absorptionsänderung pro Zeiteinheit
μ		Mikro
bp		Basenpaare
BSA		bovine serum albumin
ca.		circa
$^{\circ}\text{C}$	$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
d	cm	Schichtdicke der Küvette
Da	Da	Dalton
DNA		Desoxyribonukleinsäure
dpm	n	Zerfall pro Minute
E		Extinktion
EDTA		Ethylendiamintetraacetat
FDH		Formiatdehydrogenase
g	m s^{-1}	Erdbeschleunigung
g	g	Gramm
h		Stunde
HPLC		high pressure liquid chromatography
IPTG		Isopropylthio- β -D-galaktosid
l		Liter
LBADH		Alkoholdehydrogenase
M	M	Molar, Mol pro Liter
MAA		Methylacetoacetat
MDH		Mannitoldehydrogenase
MHB		(R)-Methyl-3-hydroxybutanoat
min	min	Minute
$\text{NAD}^+(\text{H})$		Nikotinamid Adenin Dinukleotid
PCR		Polymerasekettenreaktion
pH		potentia hydrogenii ($-\lg a_{\text{H}^+}$)
RBS		Robosomenbindestelle
s	s	Sekunde
SDS		Sodiumdodecylsulfat
TAE		Tris-Acetat-EDTA
Tris		Tri-(hydroxymethyl)-aminomethan
U		Unit

Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. H. Sahm danke ich für die Überlassung des Themas, die großzügige Unterstützung und sein großes Interesse am Fortgang der Arbeit. Seine konstruktive Kritik in zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen hat diese Arbeit bereichert und Anstöße für neue Zielsetzungen geliefert.

Herrn Prof. M. Bott danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Frau Dr. S. Bringer-Meyer danke ich sehr herzlich für die Diskussions- und Hilfsbereitschaft, sowie die zahlreichen Ratschläge zur Lösung vieler experimenteller Fragestellungen.

Herrn Prof. R. Krämer, sowie seinen Mitarbeitern Herrn Dr. K. Marin und Herrn M. Follmann danke ich sehr herzlich für die Unterstützung bei der Durchführung radioaktiv belasteter Experimente.

Herrn Prof. D. Jahn und seinen Mitarbeitern Herrn A. Roth, Herrn Dr. M. Malten und Frau Dr. R. Biedendieck danke ich sehr für die Beiträge und die Betreuung des *Bacillus* Projektes.

Mein Dank gilt natürlich ebenso allen Mitarbeitern des Instituts für Biotechnologie für ihre stets kollegiale und spontane Hilfsbereitschaft, besonders Herrn F. Heuser, Frau M. Chmielus und Frau K. Krumbach.

In großer Dankbarkeit meinen Eltern gewidmet.

Jülich im Sommer 2007

Literaturverzeichnis

- [Aarnikunnas u. a. 2002] AARNIKUNNAS, J. ; RONNHOLM, K. ; PALVA, A.: The mannitol dehydrogenase gene (*mdh*) from *Leuconostoc mesenteroides* is distinct from other known bacterial *mdh* genes. In: *Appl Microbiol Biotechnol* 59 (2002), Nr. 6, S. 665–671
- [Agius u. a. 2001] AGIUS, C. A. ; G., Rasmusson A. ; MOLLER, I. M.: NAD(P) turnover in plant mitochondria. In: *Aust. J. Plant Physiol.* 28 (2001), Nr. 1, S. 461–470
- [Ajouz u. a. 1998] AJOUZ, B. ; BERRIER, C. ; GARRIGUES, A. ; BESNARD, M. ; GHAZI, A.: Release of thioredoxin via the mechanosensitive channel MscL during osmotic downshock of *Escherichia coli* cells. In: *J Biol Chem* 273 (1998), Nr. 41, S. 26670–26674
- [Arakawa und Timasheff 1985] ARAKAWA, T. ; TIMASHEFF, S. N.: The stabilization of proteins by osmolytes. In: *Biophys J* 47 (1985), Nr. 3, S. 411–414
- [Barg 2003] BARG, H.: *Gezielte gentechnische Optimierung von B. megaterium für die Vitamin B12 Produktion*, TU Braunschweig, Dissertation, 2003
- [Bernofsky und Swan 1973] BERNOFSKY, C. ; SWAN, M.: An improved cycling assay for nicotinamide adenine dinucleotide. In: *Anal Biochem* 53 (1973), Nr. 2, S. 452–458
- [Birnboim und Doly 1979] BIRNBOIM, H. C. ; DOLY, J.: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. In: *Nucleic Acids Res* 7 (1979), Nr. 6, S. 1513–1523
- [Bradford 1976] BRADFORD, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Anal Biochem* 72 (1976), S. 248–254
- [Bringer u. a. 1985] BRINGER, S. ; HÄRTNER, T. ; PORALLA, K. ; SAHM, H.: Influence of ethanol on the hopanoid content and the fatty acid pattern in batch and continuous cultures of *Zymomonas mobilis*. In: *Arch Microbiol* 140 (1985), S. 312–316
- [Bäumchen und Bringer-Meyer 2007] BÄUMCHEN, C. ; BRINGER-MEYER, S.: Expression of *glf*_(Z.m.) increases D-mannitol formation in whole cell biotransformation with resting cells of *Corynebacterium glutamicum*. In: *Appl Microbiol Biotechnol* 76 (2007), Nr. 3, S. 545–552

- [Bustard u. a. 2002] BUSTARD, M. T. ; WHITING, S. ; COWAN, D. A. ; WRIGHT, P. C.: Biodegradation of high-concentration isopropanol by a solvent-tolerant thermophile, *Bacillus pallidus*. In: *Extremophiles* 6 (2002), Nr. 4, S. 319–323
- [Chao und Cheng 2007] CHAO, W. L. ; CHENG, C. Y.: Effect of introduced phthalate-degrading bacteria on the diversity of indigenous bacterial communities during di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) degradation in a soil microcosm. In: *Chemosphere* 67 (2007), Nr. 3, S. 482–488
- [Chao u. a. 2006] CHAO, W. L. ; LIN, C. M. ; SHIUNG, II ; KUO, Y. L.: Degradation of di-butyl-phthalate by soil bacteria. In: *Chemosphere* 63 (2006), Nr. 8, S. 1377–1383
- [Chen 2007] CHEN, R. R.: Permeability issues in whole-cell bioprocesses and cellular membrane engineering. In: *Appl Microbiol Biotechnol* 74 (2007), Nr. 4, S. 730–738
- [Chenault u. a. 1988] CHENAULT, H. K. ; SIMON, E. S. ; WHITESIDES, G. M.: Cofactor regeneration for enzyme-catalysed synthesis. In: *Biotechnol Genet Eng Rev* 6 (1988), S. 221–270
- [Chenault und Whitesides 1987] CHENAULT, H. K. ; WHITESIDES, G. M.: Regeneration of nicotinamide cofactors for use in organic synthesis. In: *Appl Biochem Biotechnol* 14 (1987), Nr. 2, S. 147–197
- [Cherrington u. a. 1991] CHERRINGTON, C. A. ; HINTON, M. ; PEARSON, G. R. ; CHOPRA, I.: Inhibition of *Escherichia coli* K12 by short-chain organic acids: lack of evidence for induction of the SOS response. In: *J Appl Bacteriol* 70 (1991), Nr. 2, S. 156–160
- [Chiou u. a. 2002] CHIOU, C. Y. ; WANG, H. H. ; SHAW, G. C.: Identification and characterization of the non-PTS fru locus of *Bacillus megaterium* ATCC 14581. In: *Mol Genet Genomics* 268 (2002), Nr. 2, S. 240–248
- [Coward-Kelly und Chen 2007] COWARD-KELLY, G. ; CHEN, R. R.: A window into biocatalysis and biotransformations. In: *Biotechnol Prog* 23 (2007), Nr. 1, S. 52–54
- [De Bary 1884] DE BARY, A.: *Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze, Mycetozen und Bakterien*. Berlin ; Heidelberg [u.a.] : Springer, 1884
- [Demchick und Koch 1996] DEMCHICK, P. ; KOCH, A. L.: The permeability of the wall fabric of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. In: *J Bacteriol* 178 (1996), Nr. 3, S. 768–773

- [Deutscher u. a. 1995] DEUTSCHER, J. ; KUSTER, E. ; BERGSTEDT, U. ; CHARRIER, V. ; HILLEN, W.: Protein kinase-dependent HPr/CcpA interaction links glycolytic activity to carbon catabolite repression in gram-positive bacteria. In: *Mol Microbiol* 15 (1995), Nr. 6, S. 1049–1053
- [Dick und Quinn 1995] DICK, R. E. ; QUINN, J. P.: Glyphosate-degrading isolates from environmental samples: occurrence and pathways of degradation. In: *Appl Microbiol Biotechnol* 43 (1995), Nr. 3, S. 545–550
- [Dixon und Kell 1989] DIXON, N. M. ; KELL, D. B.: The inhibition by CO₂ of the growth and metabolism of micro-organisms. In: *J Appl Bacteriol* 67 (1989), Nr. 2, S. 109–136
- [Dominguez und Lindley 1996] DOMINGUEZ, H. ; LINDLEY, N. D.: Complete Sucrose Metabolism Requires Fructose Phosphotransferase Activity in *Corynebacterium glutamicum* To Ensure Phosphorylation of Liberated Fructose. In: *Appl Environ Microbiol* 62 (1996), Nr. 10, S. 3878–3880
- [Eggeling 2007] EGGELING, L.: Persönliche Mitteilung. In: *Forschungszentrum Jülich* (2007)
- [Eggeling und Bott 2005] EGGELING, L. ; BOTT, M.: *Handbook of Corynebacterium glutamicum*. CRC Press Taylor and Francis, 2005
- [Eikmanns u. a. 1991] EIKMANNS, B. J. ; KLEINERTZ, E. ; LIEBL, W. ; SAHM, H.: A family of *Corynebacterium glutamicum*/*Escherichia coli* shuttle vectors for cloning, controlled gene expression, and promoter probing. In: *Gene* 102 (1991), Nr. 1, S. 93–98
- [Ernst u. a. 2005] ERNST, M. ; KAUP, B. ; MÜLLER, M. ; BRINGER-MEYER, S. ; SAHM, H.: Enantioselective reduction of carbonyl compounds by whole-cell biotransformation, combining a formate dehydrogenase and a (R)-specific alcohol dehydrogenase. In: *Appl Microbiol Biotechnol* 66 (2005), Nr. 6, S. 629–634
- [Erzinger und Vitolo 2006] ERZINGER, G. S. ; VITOLO, M.: *Zymomonas mobilis* as catalyst for the biotechnological production of sorbitol and gluconic acid. In: *Appl Biochem Biotechnol* 129-132 (2006), S. 787–794
- [Ferloni u. a. 2004] FERLONI, C. ; HEINEMANN, M. ; HUMMEL, W. ; DAUSSMANN, T. ; BÜCHS, J.: Optimization of enzymatic gas-phase reactions by increasing the long-term stability of the catalyst. In: *Biotechnol Prog* 20 (2004), Nr. 3, S. 975–978

- [Flesch und Rohmer 1987] FLESCHE, G. ; ROHMER, M.: Growth inhibition of hopanoid synthesizing bacteria by squalene cyclase inhibitors. In: *Arch Microbiol* 147 (1987), S. 100–104
- [Galkin u. a. 1995] GALKIN, A. ; KULAKOVA, L. ; TISHKOV, V. ; ESAKI, N. ; SODA, K.: Cloning of formate dehydrogenase gene from a methanol-utilizing bacterium *Mycobacterium vaccae* N10. In: *Appl Microbiol Biotechnol* 44 (1995), Nr. 3-4, S. 479–483
- [Gallagher 2007] GALLAGHER, P. R.: *Quantitation of DNA and RNA with Absorption and Fluorescence Spectroscopy*. Current Protocols in Human Genetics, Appendix 3D, 2007
- [Goldberg u. a. 2007a] GOLDBERG, K. ; SCHROER, K. ; LUTZ, S. ; LIESE, A.: Biocatalytic ketone reduction-a powerful tool for the production of chiral alcohols-part I: processes with isolated enzymes. In: *Appl Microbiol Biotechnol* (2007)
- [Goldberg u. a. 2007b] GOLDBERG, K. ; SCHROER, K. ; LUTZ, S. ; LIESE, A.: Biocatalytic ketone reduction-a powerful tool for the production of chiral alcohols-part II: whole-cell reductions. In: *Appl Microbiol Biotechnol* (2007)
- [Guha u. a. 1999] GUHA, S. ; PETERS, C. A. ; JAFFE, P. R.: Multisubstrate biodegradation kinetics of naphthalene, phenanthrene, and pyrene mixtures. In: *Biotechnol Bioeng* 65 (1999), Nr. 5, S. 491–499
- [Haberland u. a. 2002] HABERLAND, J. ; KRIEGESMANN, A. ; WOLFRAM, E. ; HUMMEL, W. ; LIESE, A.: Diastereoselective synthesis of optically active (2 R,5 R)-hexanediol. In: *Appl Microbiol Biotechnol* 58 (2002), Nr. 5, S. 595–599
- [Hahn u. a. 2003] HAHN, G. ; KAUP, B. ; BRINGER-MEYER, S. ; SAHM, H.: A zinc-containing mannitol-2-dehydrogenase from *Leuconostoc pseudomesenteroides* ATCC 12291: purification of the enzyme and cloning of the gene. In: *Arch Microbiol* 179 (2003), Nr. 2, S. 101–107
- [Hanahan 1983] HANAHAN, D.: Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. In: *J Mol Biol* 166 (1983), Nr. 4, S. 557–580
- [Hanahan 1985] HANAHAN, D.: *Techniques for Transformation of E. coli*. G.D.M. Oxford/Washington DC:IRL-Press, 1985 (DNA cloning)
- [Hartmeier 1986] HARTMEIER, W.: *Immobilisierte Biokatalysatoren : eine Einführung*. Wilhelm Engelmann, Leipzig, Germany, 1986

- [Hecker u. a. 2006] HECKER, M. ; PANE-FARRE, J. ; VOLKER, U.: SigB-Dependent General Stress Response in *Bacillus subtilis* and Related Gram-Positive Bacteria. In: *Annu Rev Microbiol* (2006)
- [Heiland u. a. 2000] HEILAND, S. ; RADOVANOVIC, N. ; HOFER, M. ; WINDERICKX, J. ; LICHTENBERG, H.: Multiple hexose transporters of *Schizosaccharomyces pombe*. In: *J Bacteriol* 182 (2000), Nr. 8, S. 2153–2162
- [Heuser u. a. 2007] HEUSER, F. ; SCHROER, K. ; LÜTZ, S. ; BRINGER-MEYER, S. ; SAHM, H.: Enhancement of the NAD(P)(H) Pool in *Escherichia coli* for Biotransformation. In: *Eng. Life Sci.* 7 (2007), Nr. 4, S. 343–353
- [Hugenholtz u. a. 2002] HUGENHOLTZ, J. ; SYBESMA, W. ; GROOT, M. N. ; WISSELINK, W. ; LADERO, V. ; BURGESS, K. ; SINDEREN, D. van ; PIARD, J. C. ; EGGINK, G. ; SMID, E. J. ; SAVOY, G. ; SESMA, F. ; JANSEN, T. ; HOLS, P. ; KLEEREBEZEM, M.: Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of nutraceuticals. In: *Antonie Van Leeuwenhoek* 82 (2002), Nr. 1-4, S. 217–235
- [Ikeda und Nakagawa 2003] IKEDA, M. ; NAKAGAWA, S.: The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes. In: *Appl Microbiol Biotechnol* 62 (2003), Nr. 2-3, S. 99–109
- [Jaeger u. a. 2006] JAEGER, K. E. ; THIEMANN, V. ; ANTRANIKIAN, G.: Biokatalyse. In: *Angewandte Mikrobiologie* (2006), S. 135–160
- [Kampen u. a. 2004] KAMPEN, I. ; NOLTE, A. ; SCHWEDES, J.: Auswirkungen der Zellaufschlussmethode auf die Zelltrümmer von *Bacillus megaterium*. In: *Chemie Ingenieur Technik* 76 (2004), Nr. 4, S. 482–484
- [Kannenbergh und Poralla 1999] KANNENBERG, L. E. ; PORALLA, K.: Hopanoid Biosynthesis and Function in Bacteria. In: *Naturwissenschaften* 86 (1999), S. 168–176
- [Kashket 1985] KASHKET, E. R.: Effects K^+ and Na^+ on the proton motive force of respiring *Escherichia coli* at alkaline pH. In: *J Bacteriol* 2 (1985), S. 423–429
- [Kaup 2004] KAUP, B.: *Gewinnung von D-Mannitol mit rekombinanten Escherichia coli Stämmen*, Forschungszentrum Jülich, Dissertation, 2004
- [Kaup u. a. 2004] KAUP, B. ; BRINGER-MEYER, S. ; SAHM, H.: Metabolic engineering of *Escherichia coli*: construction of an efficient biocatalyst for D-mannitol formation in a whole-cell biotransformation. In: *Appl Microbiol Biotechnol* 64 (2004), Nr. 3, S. 333–339

- [Kell u. a. 1981] KELL, D. B. ; PECK, M. W. ; RODGER, G. ; MORRIS, J. G.: On the permeability to weak acids and bases of the cytoplasmic membrane of *Clostridium pasteurianum*. In: *Biochem Biophys Res Commun* 99 (1981), Nr. 1, S. 81–88
- [Kinoshita u. a. 1957] KINOSHITA, S. ; UDAKA, S. ; SHIMONO, M.: Studies on the amino acid fermentation. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. In: *J Gen Appl Microbiol* 3 (1957), S. 193–205
- [Kizaki u. a. 2001] KIZAKI, N. ; YASOHARA, Y. ; HASEGAWA, J. ; WADA, M. ; KATAOKA, M. ; SHIMIZU, S.: Synthesis of optically pure ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxybutanoate by *Escherichia coli* transformant cells coexpressing the carbonyl reductase and glucose dehydrogenase genes. In: *Appl Microbiol Biotechnol* 55 (2001), Nr. 5, S. 590–595
- [Klingenberg und Pfaff 1977] KLINGENBERG, M. ; PFAFF, E.: Means of terminating reactions. In: *Methods in Enzymology* 10 (1977), S. 680–684
- [Krings u. a. 2006] KRINGS, E. ; KRUMBACH, K. ; BATHE, B. ; KELLE, R. ; WENDISCH, V. F. ; SAHM, H. ; EGGELING, L.: Characterization of *myo*-inositol utilization by *Corynebacterium glutamicum*: the stimulon, identification of transporters, and influence on L-lysine formation. In: *J Bacteriol* 188 (2006), Nr. 23, S. 8054–8061
- [Liu und Wang 2007] LIU, W. ; WANG, P.: Cofactor regeneration for sustainable enzymatic biosynthesis. In: *Biotechnol Adv* 25 (2007), Nr. 4, S. 369–384
- [Liu u. a. 1999] LIU, Y. ; HAMA, H. ; FUJITA, Y. ; KONDO, A. ; INOUE, Y. ; KIMURA, A. ; FUKUDA, H.: Production of S-lactoylglutathione by high activity whole cell biocatalysts prepared by permeabilization of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* with alcohols. In: *Biotechnol Bioeng* 64 (1999), Nr. 1, S. 54–60
- [Lokman u. a. 1997] LOKMAN, B. C. ; HEERIKHUISEN, M. ; LEER, R. J. ; BROEK, A. van den ; BORSBOOM, Y. ; CHAILLOU, S. ; POSTMA, P. W. ; POWELS, P. H.: Regulation of expression of the *Lactobacillus pentosus* *xylAB* operon. In: *J Bacteriol* 179 (1997), Nr. 17, S. 5391–5397
- [Lorca u. a. 2007] LORCA, G. L. ; BARABOTE, R. D. ; ZLOTOPOLSKI, V. ; TRAN, C. ; WINNEN, B. ; HVORUP, R. N. ; STONESTROM, A. J. ; NGUYEN, E. ; HUANG, L. W. ; KIM, D. S. ; SAIER, Jr.: Transport capabilities of eleven gram-positive bacteria: comparative genomic analyses. In: *Biochim Biophys Acta* 1768 (2007), Nr. 6, S. 1342–1366
- [Makkee u. a. 1985] MAKKEE, M. ; KIEBOOM, A. P. G. ; BEKKUM, H. van: Production methods of D-mannitol. In: *Starch/Stärke* (1985), Nr. 37, S. 136–141

- [Malten u. a. 2005] MALTEN, M. ; HOLLMANN, R. ; DECKWER, W. D. ; JAHN, D.: Production and secretion of recombinant *Leuconostoc mesenteroides* dextransucrase DsrS in *Bacillus megaterium*. In: *Biotechnol Bioeng* 89 (2005), Nr. 2, S. 206–218
- [Marin u. a. 2006] MARIN, K. ; STIRNBERG, M. ; EISENHUT, M. ; KRAMER, R. ; HAGEMANN, M.: Osmotic stress in *Synechocystis* sp. PCC 6803: low tolerance towards nonionic osmotic stress results from lacking activation of glucosylglycerol accumulation. In: *Microbiology* 152 (2006), Nr. Pt 7, S. 2023–2030
- [Markham und Neyfakh 2001] MARKHAM, P. N. ; NEYFAKH, A. A.: Efflux-mediated drug resistance in Gram-positive bacteria. In: *Curr Opin Microbiol* 4 (2001), Nr. 5, S. 509–514
- [Menzel 2006] MENZEL, A.: *Gentechnisch veränderte Escherichia coli-Zellen zur biokatalytischen Herstellung enantiomerer Aminosäuren und sekundärer Alkohole*, Universität Stuttgart, Dissertation, 2006
- [Menzel u. a. 2004] MENZEL, A. ; WERNER, H. ; ALTENBUCHNER, J. ; GRÖGER, H.: From Enzyme to Designer Bugs in Reductive Amination: A New Process for the Synthesis of L-tert-Leucine using Whole Cell-Catalyst. In: *Eng. Life Sci.* 4 (2004), Nr. 6, S. 573–576
- [Miller 1972] MILLER, J.: *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1972. – 352–355 S
- [Mitz 1979] MITZ, M. A.: CO₂ biodynamics: a new concept of cellular control. In: *J Theor Biol* 80 (1979), Nr. 4, S. 537–551
- [Müller u. a. 2005a] MÜLLER, M. ; WOLBERG, M. ; SCHUBERT, T. ; HUMMEL, W.: Enzyme-catalyzed regio- and enantioselective ketone reductions. In: *Adv Biochem Eng Biotechnol* 92 (2005), S. 261–287
- [Müller u. a. 2005b] MÜLLER, M. ; WOLBERG, M. ; SCHUBERT, T. ; HUMMEL, W.: Enzyme-catalyzed regio- and enantioselective ketone reductions. In: *Adv Biochem Eng Biotechnol* 92 (2005), S. 261–287
- [Müller u. a. 2005c] MÜLLER, M. ; WOLBERG, M. ; SCHUBERT, T. ; HUMMEL, W.: *Regio- and Enantioselective Ketone Reductions in Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Bd. 92. Springer Berlin / Heidelberg, 2005
- [Moon u. a. 2005] MOON, M. W. ; KIM, H. J. ; OH, T. K. ; SHIN, C. S. ; LEE, J. S. ; KIM, S. J. ; LEE, J. K.: Analyses of enzyme II gene mutants for sugar transport and

- heterologous expression of fructokinase gene in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. In: *FEMS Microbiol Lett* 244 (2005), Nr. 2, S. 259–266
- [Moritz u. a. 2002] MORITZ, B. ; STRIEGEL, K. ; GRAAF, A. A. de ; SAHM, H.: Changes of pentose phosphate pathway flux *in vivo* in *Corynebacterium glutamicum* during leucine-limited batch cultivation as determined from intracellular metabolite concentration measurements. In: *Metab Eng* 4 (2002), Nr. 4, S. 295–305
- [Nekolny und Chaloupka 2000] NEKOLNY, D. ; CHALOUPKA, J.: Protein catabolism in growing *Bacillus megaterium* during adaptation to salt stress. In: *FEMS Microbiol Lett* 184 (2000), Nr. 2, S. 173–177
- [Neyfakh 2002] NEYFAKH, A. A.: Mystery of multidrug transporters: the answer can be simple. In: *Mol Microbiol* 44 (2002), Nr. 5, S. 1123–1130
- [Ngwenya 2007] NGWENYA, B. T.: Enhanced adsorption of zinc is associated with aging and lysis of bacterial cells in batch incubations. In: *Chemosphere* 67 (2007), Nr. 10, S. 1982–1992
- [Nikaido 1976] NIKAIDO, H.: Die Permeabilität der äußeren Bakterienmembran. In: *Ang. Chem.* 91 (1976), S. 394–407
- [Nottebrock u. a. 2003] NOTTEBROCK, D. ; MEYER, U. ; KRAMER, R. ; MORBACH, S.: Molecular and biochemical characterization of mechanosensitive channels in *Corynebacterium glutamicum*. In: *FEMS Microbiol Lett* 218 (2003), Nr. 2, S. 305–309
- [Oldiges u. a. 2007] OLDIGES, M. ; LUTZ, S. ; PFLUG, S. ; SCHROER, K. ; STEIN, N. ; WIENDAHL, C.: Metabolomics: current state and evolving methodologies and tools. In: *Appl Microbiol Biotechnol* (2007)
- [Pao u. a. 1998] PAO, S. S. ; PAULSEN, I. T. ; SAIER, Jr.: Major facilitator superfamily. In: *Microbiol Mol Biol Rev* 62 (1998), Nr. 1, S. 1–34
- [Park u. a. 2000] PARK, S. Y. ; KIM, H. K. ; YOO, S. K. ; OH, T. K. ; LEE, J. K.: Characterization of *glk*, a gene coding for glucose kinase of *Corynebacterium glutamicum*. In: *FEMS Microbiol Lett* 188 (2000), Nr. 2, S. 209–215
- [Parker u. a. 1995] PARKER, C. ; BARNELL, W. O. ; SNOEP, J. L. ; INGRAM, L. O. ; CONWAY, T.: Characterization of the *Zymomonas mobilis* glucose facilitator gene product (*glf*) in recombinant *Escherichia coli*: examination of transport mechanism, kinetics and the role of glucokinase in glucose transport. In: *Mol Microbiol* 15 (1995), Nr. 5, S. 795–802

- [Patel 2003] PATEL, R. N.: Microbial/enzymatic synthesis of chiral pharmaceutical intermediates. In: *Curr Opin Drug Discov Devel* 6 (2003), Nr. 6, S. 902–920
- [Paulsen u. a. 1998] PAULSEN, I. T. ; CHAUVAUX, S. ; CHOI, P. ; SAIER, Jr.: Characterization of glucose-specific catabolite repression-resistant mutants of *Bacillus subtilis*: identification of a novel hexose:H⁺ symporter. In: *J Bacteriol* 180 (1998), Nr. 3, S. 498–504
- [Perzl u. a. 1998] PERZL, M. ; REIPEN, I. G. ; SCHMITZ, S. ; PORALLA, K. ; SAHM, H. ; SPRENGER, G. A. ; KANNENBERG, E. L.: Cloning of conserved genes from *Zymomonas mobilis* and *Bradyrhizobium japonicum* that function in the biosynthesis of hopanoid lipids. In: *Biochim Biophys Acta* 1393 (1998), Nr. 1, S. 108–118
- [Rabinow 1996] RABINOW, P.: *Making PCR: A Story of Biotechnology*. University of Chicago Press, 1996
- [Ramos u. a. 2002] RAMOS, J. L. ; DUQUE, E. ; GALLEGOS, M. T. ; GODOY, P. ; RAMOS-GONZALEZ, M. I. ; ROJAS, A. ; TERAN, W. ; SEGURA, A.: Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. In: *Annu Rev Microbiol* 56 (2002), S. 743–768
- [Roth 2006] ROTH, A.: *Mannitolproduktion im rekombinanten Bacillus megaterium*, TU Braunschweig, Diplomarbeit, 2006
- [Rottenberg 1979] ROTTENBERG, H.: *Methods in Enzymology*. Bd. 55. Academic Press, Inc., 1979
- [Rubinstein u. a. 1988] RUBINSTEIN, C. P. ; MORATINOS, L. C. ; COSO, O. A. ; SANCHEZ-RIVAS, C.: Improvements in the transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts with plasmid DNA. In: *FEMS Microbiology Letters* 56 (1988), Nr. 1, S. 60–70
- [Ruffert u. a. 1997] RUFFERT, S. ; LAMBERT, C. ; PETER, H. ; WENDISCH, V. F. ; KRAMER, R.: Efflux of compatible solutes in *Corynebacterium glutamicum* mediated by osmoregulated channel activity. In: *Eur J Biochem* 247 (1997), Nr. 2, S. 572–580
- [Rygus und Hillen 1991] RYGUS, T. ; HILLEN, W.: Inducible high-level expression of heterologous genes in *Bacillus megaterium* using the regulatory elements of the xylose-utilization operon. In: *Appl Microbiol Biotechnol* 35 (1991), Nr. 5, S. 594–599
- [Sahm u. a. 2000] SAHM, H. ; EGGELING, L. ; GRAAF, A. A. de: Pathway analysis and metabolic engineering in *Corynebacterium glutamicum*. In: *Biol Chem* 381 (2000), Nr. 9-10, S. 899–910

- [Sahm u. a. 1993] SAHM, H. ; ROHMER, M. ; BRINGER-MEYER, S. ; SPRENGER, G. A. ; WELLE, R.: Biochemistry and physiology of hopanoids in bacteria. In: *Adv Microb Physiol* 35 (1993), S. 247–273
- [Sambrook u. a. 1989] SAMBROOK, J. ; FRITSCH, E. F. ; MANIATIS, T.: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989
- [Sambrook und Russell 2000] SAMBROOK, J. ; RUSSELL, D.W.: *Molecular cloning. A laboratory manual 3rd edn*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2000
- [Saxena u. a. 1987] SAXENA, A. ; ZHANG, R. W. ; BOLLAG, J. M.: Microorganisms capable of metabolizing the herbicide metolachlor. In: *Appl Environ Microbiol* 53 (1987), Nr. 2, S. 390–396
- [Schafer u. a. 1994] SCHAFER, A. ; TAUCH, A. ; JAGER, W. ; KALINOWSKI, J. ; THIERBACH, G. ; PUHLER, A.: Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. In: *Gene* 145 (1994), Nr. 1, S. 69–73
- [Schlieben u. a. 2005] SCHLIEBEN, N. H. ; NIEFIND, K. ; MÜLLER, J. ; RIEBEL, B. ; HUMMEL, W. ; SCHOMBURG, D.: Atomic resolution structures of R-specific alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis* provide the structural bases of its substrate and cosubstrate specificity. In: *J Mol Biol* 349 (2005), Nr. 4, S. 801–813
- [Schmidt und Kittsteiner-Eberle 1986] SCHMIDT, H. L. ; KITTSTEINER-EBERLE, R.: [Biosensors]. In: *Naturwissenschaften* 73 (1986), Nr. 6, S. 314–321
- [Schmiedel u. a. 1997] SCHMIEDEL, D. ; KINTRUP, M. ; KUSTER, E. ; HILLEN, W.: Regulation of expression, genetic organization and substrate specificity of xylose uptake in *Bacillus megaterium*. In: *Mol Microbiol* 23 (1997), Nr. 5, S. 1053–1062
- [Schröder 2003] SCHRÖDER, I.: *Elektrochemische Oxidation von Nukleotidfaktoren*, Forschungszentrum Jülich GmbH, Dissertation, 2003
- [Schütte u. a. 1976] SCHÜTTE, H. ; FLOSSDORF, J. ; SAHM, H. ; KULA, M. R.: Purification and properties of formaldehyde dehydrogenase and formate dehydrogenase from *Candida boidinii*. In: *Eur J Biochem* 62 (1976), Nr. 1, S. 151–160
- [Schumacher u. a. 2006] SCHUMACHER, J. ; ECKSTEIN, M. ; KRAGL, U.: Influence of water-miscible organic solvents on kinetics and enantioselectivity of the (R)-specific

- alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis*. In: *Biotechnol J* 1 (2006), Nr. 5, S. 574–581
- [Setlow und Setlow 1977] SETLOW, B. ; SETLOW, P.: Levels of oxidized and reduced pyridine nucleotides in dormant spores and during growth, sporulation, and spore germination of *Bacillus megaterium*. In: *J Bacteriol* 129 (1977), Nr. 2, S. 857–865
- [Sharp und Li 1987] SHARP, P. M. ; LI, W. H.: The codon Adaptation Index - a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. In: *Nucleic Acids Res* 15 (1987), Nr. 3, S. 1281–1295
- [Sikkema u. a. 1995] SIKKEMA, J. ; BONT, J. A. de ; POOLMAN, B.: Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. In: *Microbiol Rev* 59 (1995), Nr. 2, S. 201–222
- [Silveira und Jonas 2002] SILVEIRA, M. M. ; JONAS, R.: The biotechnological production of sorbitol. In: *Appl Microbiol Biotechnol* 59 (2002), Nr. 4-5, S. 400–408
- [Slatner u. a. 1998b] SLATNER, M. ; NAGL, G. ; HALTRICH, D. ; KULBE, K. D. ; NIDETZKY, B.: Enzymatic production of pure D-mannitol at high productivity. In: *Biocat Biotrans* 16 (1998b), S. 351–363
- [Slatner u. a. 1999] SLATNER, M. ; NIDETZKY, B. ; KULBE, K. D.: Kinetic study of the catalytic mechanism of mannitol dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens*. In: *Biochemistry* 38 (1999), Nr. 32, S. 10489–10498
- [Slusarczyk u. a. 2000] SLUSARCZYK, H. ; FELBER, S. ; KULA, M. R. ; POHL, M.: Stabilization of NAD-dependent formate dehydrogenase from *Candida boidinii* by site-directed mutagenesis of cysteine residues. In: *Eur J Biochem* 267 (2000), Nr. 5, S. 1280–1289
- [Soetaert u. a. 1999] SOETAERT, W. ; BUCHHOLZ, K. ; VANDAMME, E. J.: Production of D-mannitol and D-lactic acid by fermentation with *Leuconostoc mesenteroides*. In: *Agro-Food-Industry Hi-Tech* (1999), Nr. 6, S. 41–44
- [Studier und Moffatt 1986] STUDIER, F. W. ; MOFFATT, B. A.: Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. In: *J Mol Biol* 189 (1986), Nr. 1, S. 113–130
- [Takenaka u. a. 2006] TAKENAKA, S. ; MULYONO ; SASANO, Y. ; TAKAHASHI, Y. ; MURAKAMI, S. ; AOKI, K.: Microbial transformation of aniline derivatives: regioselective biotransformation and detoxification of 2-phenylenediamine by *Bacillus cereus* strain PDa-1. In: *J Biosci Bioeng* 102 (2006), Nr. 1, S. 21–27

- [Takors u. a. 2007] TAKORS, R. ; BATHE, B. ; RIEPING, M. ; HANS, S. ; KELLE, R. ; HUTHMACHER, K.: Systems biology for industrial strains and fermentation processes—example: amino acids. In: *J Biotechnol* 129 (2007), Nr. 2, S. 181–190
- [Tan 2006] TAN, A.W.: *Applications of Whole Cell Biotransformation for the Production of Chiral Alcohols*, Forschungszentrum Jülich, Dissertation, 2006
- [Tangney u. a. 1993] TANGNEY, M. ; PRIEST, F. G. ; MITCHELL, W. J.: Two glucose transport systems in *Bacillus licheniformis*. In: *J Bacteriol* 175 (1993), Nr. 7, S. 2137–2142
- [Tauch u. a. 2002] TAUCH, A. ; KIRCHNER, O. ; LOFFLER, B. ; GOTKER, S. ; PUHLER, A. ; KALINOWSKI, J.: Efficient electrotransformation of *Corynebacterium diphtheriae* with a mini-replicon derived from the *Corynebacterium glutamicum* plasmid pGA1. In: *Curr Microbiol* 45 (2002), Nr. 5, S. 362–367
- [Teschner u. a. 1990] TESCHNER, W. ; SERRE, M. C. ; GAREL, J. R.: Enzymatic properties, renaturation and metabolic role of mannitol-1-phosphate dehydrogenase from *Escherichia coli*. In: *Biochimie* 72 (1990), Nr. 1, S. 33–40
- [Tien und Katayama 2004] TIEN, T. H. ; KATAYAMA, A.: Biodegradation kinetics of volatile hydrophobic organic compounds in cultures with variable fractional volumes. In: *Biotechnol Bioeng* 85 (2004), Nr. 6, S. 580–588
- [Trivedi u. a. 2006] TRIVEDI, A. H. ; SPIESS, A. C. ; DAUSSMANN, T. ; BÜCHS, J.: Study on mesophilic and thermophilic alcohol dehydrogenases in gas-phase reaction. In: *Biotechnol Prog* 22 (2006), Nr. 2, S. 454–458
- [Vary 1994] VARY, P.: Prime time for *Bacillus megaterium*. In: *Microbiology* 140 (Pt 5) (1994), S. 1001–1013
- [Vary u. a. 2007] VARY, P. S. ; BIEDENDIECK, R. ; FUERCH, T. ; MEINHARDT, F. ; ROHDE, M. ; DECKWER, W. D. ; JAHN, D.: *Bacillus megaterium*-from simple soil bacterium to industrial protein production host. In: *Appl Microbiol Biotechnol* (2007)
- [Vihinen und Mantsala 1989] VIHINEN, M. ; MANTSALA, P.: Microbial amylolytic enzymes. In: *Crit Rev Biochem Mol Biol* 24 (1989), Nr. 4, S. 329–418
- [Wagner u. a. 2000] WAGNER, A. ; KUSTER-SCHOCK, E. ; HILLEN, W.: Sugar uptake and carbon catabolite repression in *Bacillus megaterium* strains with inactivated ptsHI. In: *J Mol Microbiol Biotechnol* 2 (2000), Nr. 4, S. 587–592

- [Wahome und Setlow 2006] WAHOME, P. G. ; SETLOW, P.: The synthesis and role of the mechanosensitive channel of large conductance in growth and differentiation of *Bacillus subtilis*. In: *Arch Microbiol* 186 (2006), Nr. 5, S. 377–383
- [Walton und Stewart 2002] WALTON, A. Z. ; STEWART, J. D.: An efficient enzymatic Baeyer-Villiger oxidation by engineered *Escherichia coli* cells under non-growing conditions. In: *Biotechnol Prog* 18 (2002), Nr. 2, S. 262–268
- [Walton und Stewart 2004] WALTON, A. Z. ; STEWART, J. D.: Understanding and improving NADPH-dependent reactions by nongrowing *Escherichia coli* cells. In: *Biotechnol Prog* 20 (2004), Nr. 2, S. 403–411
- [Wandrey 2004] WANDREY, C.: Biochemical reaction engineering for redox reactions. In: *Chem Rec* 4 (2004), Nr. 4, S. 254–265
- [Wang u. a. 2007] WANG, Y. S. ; LIU, J. C. ; CHEN, W. C. ; YEN, J. H.: Characterization of Acetanilide Herbicides Degrading Bacteria Isolated from Tea Garden Soil. In: *Microb Ecol* (2007)
- [Weinand u. a. 2007] WEINAND, M. ; KRAMER, R. ; MORBACH, S.: Characterization of compatible solute transporter multiplicity in *Corynebacterium glutamicum*. In: *Appl Microbiol Biotechnol* (2007)
- [Weisser u. a. 1995] WEISSER, P. ; KRAMER, R. ; SAHM, H. ; SPRENGER, G. A.: Functional expression of the glucose transporter of *Zymomonas mobilis* leads to restoration of glucose and fructose uptake in *Escherichia coli* mutants and provides evidence for its facilitator action. In: *J Bacteriol* 177 (1995), Nr. 11, S. 3351–3354
- [Wendisch 1997] WENDISCH, V. F.: *Physiologische und NMR-spektroskopische Untersuchungen zur in vivo-Aktivität zentraler Stoffwechselwege im Wildstamm und in rekombinanten Stämmen von Corynebacterium glutamicum*, Forschungszentrum Jülich, Dissertation, 1997
- [von Weymarn u. a. 2003] WEYMARN, F. N. von ; KIVIHARJU, K. J. ; JAASKELAINEN, S. T. ; LEISOLA, M. S.: Scale-up of a new bacterial mannitol production process. In: *Biotechnol Prog* 19 (2003), Nr. 3, S. 815–821
- [von Weymarn u. a. 2002] WEYMARN, N. von ; KIVIHARJU, K. ; LEISOLA, M.: High-level production of D-mannitol with membrane cell-recycle bioreactor. In: *J Ind Microbiol Biotechnol* 29 (2002), Nr. 1, S. 44–49

- [Wisselink u. a. 2005] WISSELINK, H. W. ; MOERS, A. P. ; MARS, A. E. ; HOEFNAGEL, M. H. ; VOS, W. M. de ; HUGENHOLTZ, J.: Overproduction of heterologous mannitol 1-phosphatase: a key factor for engineering mannitol production by *Lactococcus lactis*. In: *Appl Environ Microbiol* 71 (2005), Nr. 3, S. 1507–1514
- [Wittchen und Meinhardt 1995] WITTCHEN, K. D. ; MEINHARDT, F.: Inactivation of the major extracellular protease from *Bacillus megaterium* DSM319 by gene replacement. In: *Appl Microbiol Biotechnol* 42 (1995), Nr. 6, S. 871–877
- [Xu u. a. 2007] XU, Z. ; JING, K. ; LIU, Y. ; CEN, P.: High-level expression of recombinant glucose dehydrogenase and its application in NADPH regeneration. In: *J Ind Microbiol Biotechnol* 34 (2007), Nr. 1, S. 83–90
- [Yang u. a. 2007] YANG, Y. ; MALTEN, M. ; GROTE, A. ; JAHN, D. ; DECKWER, W. D.: Codon optimized *Thermobifida fusca* hydrolase secreted by *Bacillus megaterium*. In: *Biotechnol Bioeng* 96 (2007), Nr. 4, S. 780–794
- [Zhang u. a. 2006] ZHANG, J. ; WITHOLT, B. ; LI, Z.: Coupling of permeabilized microorganisms for efficient enantioselective reduction of ketone with cofactor recycling. In: *Chem Commun (Camb)* (2006), Nr. 4, S. 398–400

Erklärung

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

Jülich im August 2007

Jül-4265
März 2008
ISSN 0944-2952