



FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GmbH

Institut für Biotechnologie

**Alaninbildung in *Zymomonas mobilis* durch
Expression des Alanindehydrogenase-Gens
aus *Bacillus*-Stämmen**

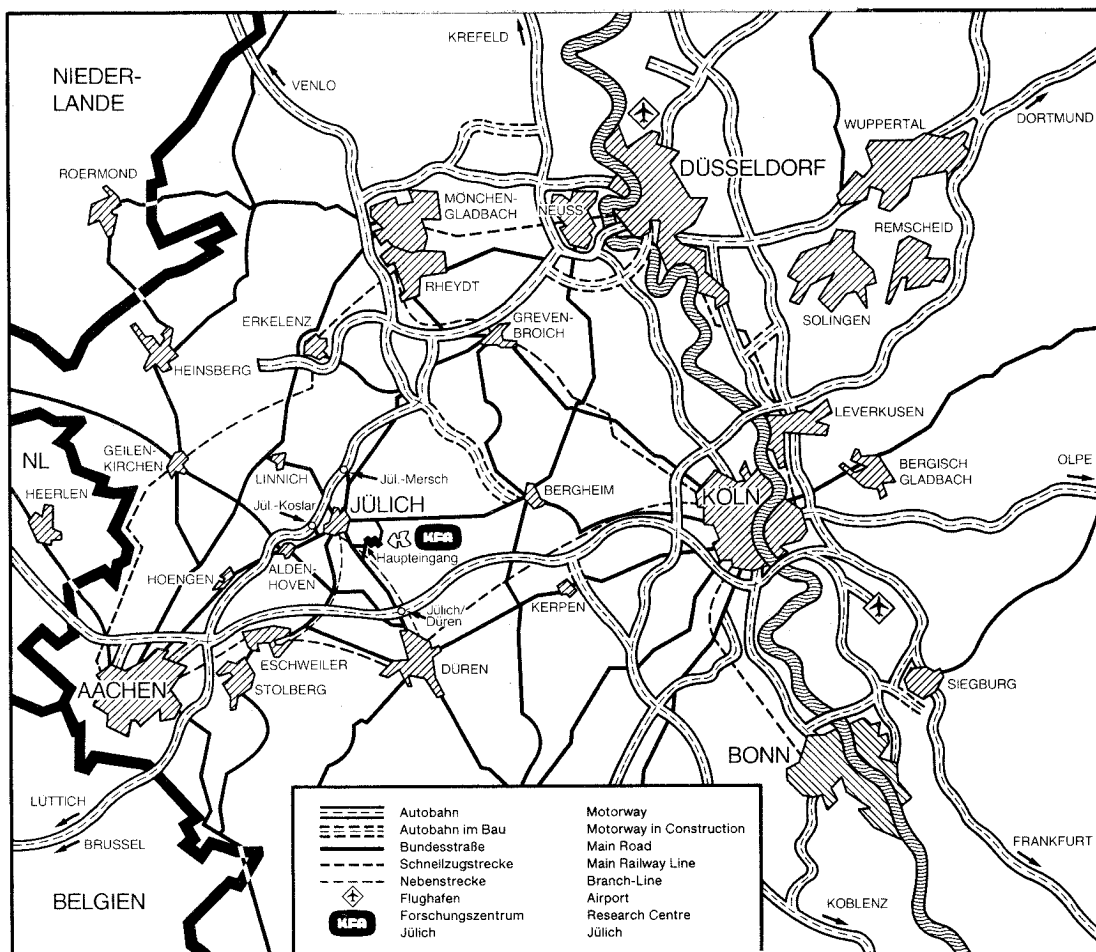
von

Ingrid Uhlenbusch

Jül - 2370
Juli 1990
ISSN 0366-0885



6133207115



J	u	e	L	-	2	3	7	0											
3	3	2	0	7	1	1	5		KFA-ZENTRALBIBLIOTHEK										
6	-	8	B	3	-												0	-	P

Forschungszentrum Jülich: Berichte Nr. 2370

Institut für Biotechnologie Jül-2370

D 61 (Diss. Uni. Düsseldorf)

Zu beziehen durch: ZENTRALBIBLIOTHEK · Forschungszentrum Jülich GmbH

Postfach 1913 · D-5170 Jülich (Bundesrepublik Deutschland)

Telefon: 024 61/61-0 · Telefax: 024 61/61-6103 · Telex: 833556-70 kfa d

Alaninbildung in *Zymomonas mobilis* durch Expression des Alanindehydrogenase-Gens aus *Bacillus*-Stämmen

von

Ingrid Uhlenbusch

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

I.	Einleitung	1
II.	Material und Methoden	10
1.	Chemikalien und Enzyme	10
2.	Bakterienstämme und Plasmide	11
3.	Nährmedien und Kultivierungsbedingungen	13
4.	Bestimmung der Bakterienkonzentration	16
5.	Techniken zur DNA-Isolierung aus Bakterien.....	17
5.1.	Isolierung chromosomaler DNA.....	17
5.2.	Plasmidisolierung in großem Maßstab.....	18
5.3.	Plasmidschnellisolierung.....	20
6.	Techniken zur Rekombination und Analyse von DNA....	21
6.1.	Spaltung von DNA mit Restriktions- endonukleasen.....	21
6.2.	Alkalische Phosphatasebehandlung.....	22
6.3.	Verkürzung restringierter DNA mit Exo- nuklease III.....	22
6.4.	Auffüllen 5'-überhängender Enden mit Klenow Polymerase.....	24
6.5.	Ligation enzymatisch gespaltener DNA-Moleküle	24
6.6.	DNA-Markierung mit Digoxigenin-dUTP.....	25
6.7.	DNA-DNA Hybridisierung.....	26
6.7.1.	DNA-DNA Hybridisierung nach Southern.	26
6.7.2.	DNA-DNA Hybridisierung mit Oligo- nukleotiden.....	26
6.7.3.	Koloniehybridisierung.....	27
6.8.	Agarose Gelelektrophorese.....	29

6.9.	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose Gelen.....	29
6.10.	Photometrische DNA-Bestimmung.....	31
7.	Plasmidstabilitätstest.....	31
8.	Transformationstechniken.....	32
8.1.	Transformation von <i>E.coli</i>	32
8.2.	Filterkreuzung.....	33
9.	Substrat- und Produktbestimmung.....	34
9.1.	Enzymatische Glukosebestimmung.....	34
9.2.	Enzymatische Laktatbestimmung.....	35
9.3.	Gaschromatographische Ethanol- und Acetatbestimmung.....	36
9.4.	Aminosäurebestimmung mittels HPLC.....	36
9.5.	L-Alaninbestimmung mit L-Alanindehydrogenase.	37
9.6.	D-Alaninbestimmung mit D-Aminosäureoxidase...	38
10.	Bestimmung von Enzymaktivitäten.....	39
10.1.	Herstellung von Rohextrakten mittels Ultraschall	39
10.2.	Herstellung von permeabilisierten Zellen.....	39
10.3.	Proteinbestimmung.....	40
10.4.	Bestimmung der L-Alanindehydrogenase-Aktivität.....	40
10.5.	Bestimmung der Pyruvatdecarboxylase-Aktivität	42
11.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen...	44
12.	Bestimmung interner Aminosäure- und Kaliumkonzentrationen mit Hilfe der Silikonölzentrifugation.....	45
12.1.	Silikonölzentrifugation.....	46
12.2.	Bestimmung des Cytoplasmavolumens.....	47
12.3.	Bestimmung interner Kaliumkonzentrationen....	48

III. Ergebnisse	49
1. Konstruktion von Vektoren für eine Expression des alaD-Gens in <i>Z.mobilis</i>	49
1.1. Restriktionskartierung des alaD-Gens aus <i>B.stearothermophilus</i> auf dem Plasmid pICR 3..	49
1.2. Expression des alaD-Gens aus <i>B.stearother-</i> <i>mophilus</i> in <i>Z.mobilis</i>	52
1.3. Expression des alaD-Gens aus <i>B.sphaericus</i> in <i>Z.mobilis</i>	62
2. Versuche zur Ausschaltung der Pyruvat- decarboxylase-Reaktion.....	75
2.1. Transposonmutagenese von CUI-Rif 2.....	75
2.2. Versuche mit einer thiaminauxotrophen Mutante des <i>Z.mobilis</i> -Stammes CP4.....	76
3. Alaninbildung der rekombinanten <i>Z.mobilis</i> -Stämme...	81
3.1. Optimierung der Alaninbildungsbedingungen....	81
3.2. Alaninbildung rekombinanter <i>Z.mobilis</i> - Stämme aus Glukose.....	86
4. Bestimmung interner Aminosäure- und Kaliumkonzentrationen.....	88
IV. Diskussion.....	95
V. Zusammenfassung.....	106
VI. Literatur.....	108

Abkürzungen

A	Adenin
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
alaD	Alanindehydrogenase-Gen
Ala-DH	Alanindehydrogenase
Aqua bidest.	Doppelt destilliertes Wasser
bla	β -Lactamase-Gen
bp	Basenpaare
Bq	Bequerel
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
cat	Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
G	Guanin
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
IAA	Isoamylalkohol
kat	Kanamycinresistenz-Gen
kB	Kilobasen
kD	Kilodalton
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
M	Molarität
max.	maximal
min.	Minute
mob	Mobilisationsfunktionen
NAD, NADH	β -Nicotinamid-adenin-dinukleotid (oxid., red.)
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
ori	Replikationsursprung
oriT	Transfer Replikationsursprung
oriV	Vegetativer Replikationsursprung
pdc	Pyruvatdecarboxylase-Gen
PDC	Pyruvatdecarboxylase
Ppdc	Promotor des <i>pdc</i> -Gens
pZM02	kryptisches Plasmid von <i>Z.mobilis</i> ATCC 10988
rep	in trans wirkender Replikationsursprung
RNA	Ribonukleinsäure
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
t	Zeit
T	Thymin
T1T2	Terminatoren des <i>rrnB</i> -Gens aus <i>E.coli</i>
tet	Tetracyclinresistenz-Gen
Tn	Transposon
TPP	Thiaminpyrophosphat
Tris	2-Amino-Hydroxymethylpropan-1,3-diol
TTP	Thymidin-5'-triphosphat
U	Unit = Enzymeinheit
UTP	Uridin-5'-triphosphat
Rif ^r	Rifamycinresistenz
rpm	rounds per minute = Umdrehungen pro Minute
(w/v)	weight per volume = Gewicht pro Volumen
UV	Ultraviolett

I. Einleitung

Das gram-negative Bakterium *Zymomonas mobilis* ist in den tropischen Teilen Amerikas, Asiens und Afrikas an der Erzeugung alkoholischer Getränke aus Pflanzensäften beteiligt (SWINGS UND DE LEY, 1977). Seit Anfang der 70-er Jahre findet das Bakterium zur Ethanolherstellung weltweit großes Interesse, da es im Vergleich zur Hefe *Saccharomyces cerevisiae* folgende Vorteile aufweist:

- die Wachstumsgeschwindigkeit ist etwa doppelt so hoch wie bei Hefe (BUCHHOLZ ET AL., 1987)
- die Ethanolproduktionsgeschwindigkeit ist aufgrund des schnelleren Stofftransports in dem kleineren Bakterium 6-7-fach höher (BUCHHOLZ ET AL., 1987)
- die Ethanolausbeute ist um 5 % höher, da weniger Glukose von dem Bakterium in Zellmaterial eingebaut wird (BUCHHOLZ ET AL., 1987)
- die Ethanolproduktion ist vom Wachstum entkoppelbar (EVELEIGH ET AL., 1983)
- die Prozeßführung ist einfacher, da kein Sauerstoff von dem Bakterium benötigt wird (EVELEIGH ET AL., 1983)

Physiologisch weist *Zymomonas* eine Besonderheit auf: Glukose wird von diesem anaeroben Bakterium über den Entner-Doudoroff-Weg (Abbildung I.1.) abgebaut (ENTNER UND DOUDOROFF, 1952; KERSTERS UND DE LEY, 1968), einem Stoffwechselweg, der hauptsächlich in strikt aeroben Organismen zu finden ist (GOTTSCHALK, 1986). Da der Entner-Doudoroff-Weg nur 1 mol ATP pro mol umgesetzte Glukose liefert (MONTECOURT, 1985), verglichen mit dem Embden-Meyerhoff-Parnas Weg in Hefe, der 2 mol ATP pro mol verbrauchte Glukose produziert (GOTTSCHALK, 1986), ist der Stoffwechsel des Bakteriums energielimitiert. Die geringe Biomasseproduktion bei hohen Glukoseumsatzraten ist auf diese Energielimitierung zurückzuführen.

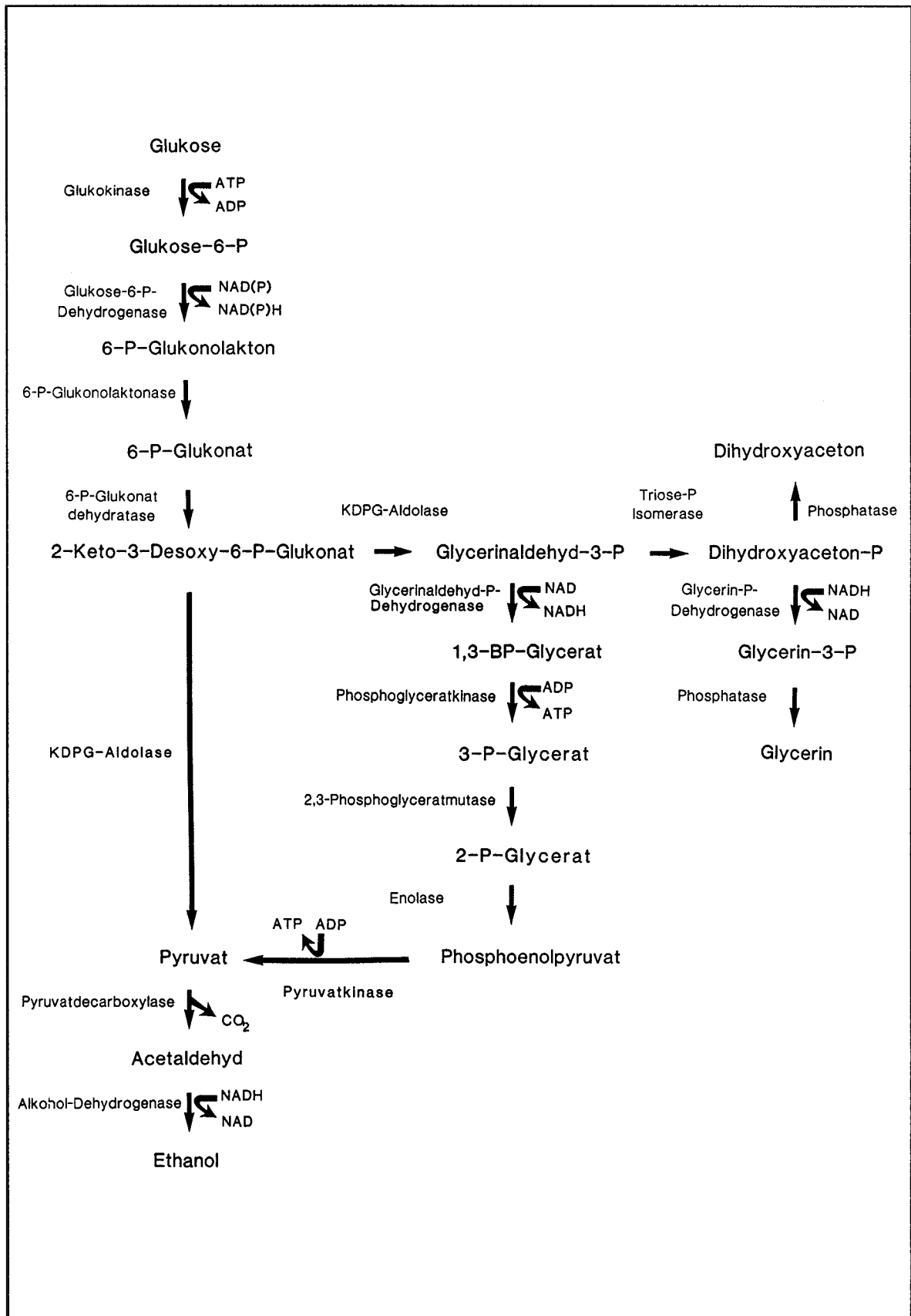


Abbildung I.1.: Abbau der Glukose über den Entner-Doudoroff-Weg zu Ethanol in *Zymomonas mobilis*

Die Umsetzung von Glukose zu Ethanol erfolgt über die Bildung von Pyruvat (Abbildung I.1), das durch die Pyruvat-decarboxylase (PDC) zu Acetaldehyd decarboxyliert wird. In einem weiteren Schritt wird dieser Aldehyd durch zwei Alkoholdehydrogenase-Isoenzyme zu Ethanol reduziert, wobei NADH zu NAD⁺ oxidiert wird.

Die Thiaminpyrophosphat-abhängige Pyruvatdecarboxylase (EC 4.1.1.1.) ist das Schlüsselenzym der Ethanolbildung bei *Zymomonas mobilis* (HOPPNER UND DOELLE, 1983). Das Enzym wurde aus *Zymomonas* gereinigt und bezüglich seiner molekularen und katalytischen Eigenschaften charakterisiert (BRINGER-MEYER ET AL., 1986). Die PDC ist aus 4 identischen Untereinheiten zusammengesetzt, die ein Holoenzym von 200.000 Dalton bilden (Tabelle I.1). Das pH-Optimum der Decarboxylierungsreaktion liegt bei pH 5,5, das Temperatur-optimum bei 30°C. Neben Thiaminpyrophosphat ist Magnesium für den Erhalt der vollen katalytischen Eigenschaften nötig (BRINGER-MEYER ET AL., 1986). Das Protein wird konstitutiv gebildet und macht 4-6 % des löslichen Zellproteins in *Zymomonas* aus (BRÄU UND SAHM, 1986).

Das Pyruvatdecarboxylase-Gen (*pdc*-Gen) wurde von mehreren Arbeitsgruppen kloniert und sequenziert und zwar aus *Z.mobilis* ATCC 29191 (BRÄU UND SAHM, 1986; NEALE ET AL., 1987a,b; REYNEN UND SAHM, 1988) sowie aus *Z.mobilis* ATCC 31821 (CONWAY ET AL., 1987a). REYNEN konstruierte mit Hilfe des *pdc*-Promotors einen Expressionsvektor (pPTZ) für *Z.mobilis*, durch den fremde Gene, die in *Z.mobilis* eingeführt werden sollen, unter die Kontrolle eines *Zymomonas*-eigenen Promotors gebracht und von diesem transkribiert werden (REYNEN ET AL., im Druck).

In den letzten Jahren wurde von einigen Forschungsgruppen versucht, mit Hilfe gentechnischer Methoden das auf Glukose, Saccharose und Fruktose begrenzte Substratspektrum von *Z.mobilis* zu erweitern. Durch Einführung des Laktose-Transposons *Tn* 951 auf dem mobilisierbaren Plasmid RP1 (RP1::*Tn* 951), das das gesamte *lac*-Operon enthielt, konnte

erstmals die Expression von heterologen, metabolischen Genen in *Z.mobilis* gezeigt werden (CAREY ET AL., 1983; GOODMAN ET AL., 1984). Obwohl das *lac*-Operon in *Z.mobilis* sogar durch seinen Induktor IPTG induzierbar war, waren die β -Galaktosidase- und Lactose-Permease-Aktivitäten so gering, daß Laktose nur minimal verwertet werden konnte und den rekombinanten Stämmen kein Wachstum auf Laktose als einziger C-Quelle ermöglichte (CAREY ET AL., 1983; GOODMAN ET AL., 1984). YANASE und Mitarbeiter brachten das *lac*-Operon unter die Kontrolle eines *Zymomonas*-eigenen Promotors, konnten so die Expression der *lac*-Gene erhöhen aber kein Wachstum rekombinanter *Z.mobilis*-Stämme auf Laktose erzielen (YANASE ET AL., 1988). Erst durch gleichzeitige Einbringung des *gal*-Operons (*gal* EKT) mit dem *lac*-Operon, das unter der Kontrolle eines undefinierten *Zymomonas*-eigenen Promotors stand, gelang in Verbindung mit einer chemischen Mutagenese minimales Wachstum von rekombinanten *Z.mobilis*-Stämmen auf Laktose (BUCHHOLZ ET AL., 1989). Um die Bildung von Ethanol aus Cellulose mit rekombinanten *Z.mobilis*-Stämmen zu erzielen, wurden Versuche mit dem Cellullase-Gen aus *Cellulomonas uda* CB4 (MISAWA ET AL., 1988), dem Cellulase-Gen aus *Erwinia chrysanthemi* (BRESTIC-GOACHET ET AL., 1989), dem Endoglukanase-Gen (*eglX*) aus *Pseudomonas fluorescens* var. *cellulosa* (LEJEUNE ET AL., 1988) und dem β -Glukosidase-Gen aus *Klebsiella oxytoca* (WALKER UND PEMBERTON, 1988) bzw. *Ruminococcus albus* (MISAWA UND NAKAMURA, 1989) unternommen. Die heterologen Gene wurden zwar in *Zymomonas mobilis* exprimiert, doch gelang in keinem Fall die Erweiterung des Substratspektrums. Auch die Bemühungen, ein Wachstum auf Xylose durch Einführung der Xylose-Gene aus *Xanthomonas spec.* (LIU ET AL., 1988) bzw. *Klebsiella pneumoniae* (FELDMANN ET AL. unveröffentlicht) zu erreichen, schlugen bisher fehl. Die Verwertung von Stärke als einziger Kohlenstoffquelle nach Einführung des α -Amylase-Gens aus *Klebsiella oxytoca* (WALKER UND PEMBERTON, 1988) bzw. aus *Bacillus licheniformis* (BRESTIC-GOACHET ET AL., 1990) gelang ebenfalls nicht.

In der Literatur bisher noch nicht beschrieben ist die Erweiterung des Produktspektrums von *Z.mobilis* mit gentechnischen Methoden. Denkbar wäre dabei z.B. die Bildung von L-Alanin ausgehend von dem Intermediat Pyruvat nach Einführung eines L-Alanindehydrogenasegens in *Z.mobilis*.

Die proteinogene Aminosäure L-Alanin wird hauptsächlich als süßer Geschmacksstoff in der Lebensmittelindustrie eingesetzt und als nichtessentielle Aminosäure Infusionslösungen zugesetzt (KLEEMANN ET AL., 1985). Die Weltjahresproduktion 1983 betrug 130 Tonnen (KLEEMANN ET AL., 1985). Im industriellen Maßstab wird L-Alanin durch asymmetrische Hydrolyse mittels mikrobieller Acylase aus Acetyl-DL-Alanin, das zuvor aus Acetaldehyd über Aminopropionitril synthetisiert wurde (Strecker-Bucherer Synthese), oder aus Proteinhydrolysaten gewonnen (KLEEMANN ET AL., 1985). SENUMA ET AL. beschreiben ein mikrobielles Verfahren, bei dem L-Alanin zusammen mit D-Aspartat aus DL-Aspartat gewonnen wird. Die Umsetzung erfolgt dabei durch die L-Aspartat β -Decarboxylase immobilisierter *Pseudomonas dacunhae* Zellen (SENUMA ET AL., 1989).

Die L-Alaninsynthese läuft in Mikroorganismen über verschiedene enzymatische Reaktionen ab, die bis heute nicht vollständig bekannt sind. So existiert bis jetzt keine wirklich L-Alanin-auxotrophe Mutante von einem Mikroorganismus (REITZER UND MAGASANIK, 1987). L-Alanin kann durch Transaminierung von L-Glutamat und Pyruvat zu L-Alanin und α -Ketoglutarat durch die L-Alanin-Glutamat-Transaminase synthetisiert werden, wobei Pyridoxalphosphat als Cofaktor fungiert (UMBARGER, 1978). Daneben ist die Umsetzung von Pyruvat und Valin zu L-Alanin und α -Ketoisovalerat mittels Alanin-Valin Aminotransferase (Transaminase C) bekannt (UMBARGER, 1978). In manchen Bakterien (siehe unten) kann L-Alanin auch durch L-Alanindehydrogenase aus Pyruvat gebildet werden, wobei die Rolle des Enzyms nicht nur auf die Synthese dieser Aminosäure beschränkt ist.

Die L-Alanindehydrogenase (L-Alanin: NAD Oxidoreduktase, deaminierend, EC 1.4.1.1.) katalysiert die in Abbildung I.2. gezeigte reversible Deaminierung von L-Alanin zu Pyruvat (GOLDMANN, 1959).

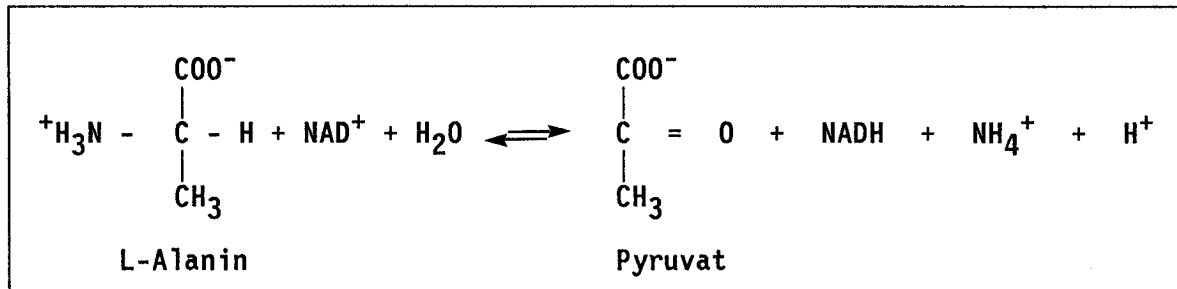


Abbildung I.2.: Reaktion der L-Alanindehydrogenase

Das NAD^+ -abhängige Enzym kommt in einigen Bakterienstämmen wie z.B. *Streptomyces*, *Bacilli*, *Rhodobacter*, *Rhizobien* und *Halobacterien* vor, wobei das Enzym sowohl eine Rolle bei der Assimilation von Ammonium spielen kann (AHARONOWITZ UND FRIEDRICH, 1980; JOHANSSON UND GEST, 1976; MÜLLER UND WERNER, 1982) als auch eine katabolische Funktion erfüllt (MEERS UND PEDERSEN, 1972; O'CONNOR UND HALVORSON, 1959): In *Streptomyces*, die keine Glutamatdehydrogenase-Aktivität besitzen, sowie in *Desulfovibrio desulfuricans* wird mittels L-Alanindehydrogenase Ammonium assimiliert (GRÄFE ET AL., 1974; AHARONOWITZ UND FRIEDRICH, 1980; GERMANO UND ANDERSON, 1968). In vegetativen Zellen (MCCORMICK UND HALVORSON, 1964) und Sporen (O'CONNOR UND HALVORSON, 1959) unterschiedlicher *Bacillus*-Stämme ist das Enzym Schlüsselenzym bei der Dissimilation von L-Alanin als Energiequelle während der Sporulation (MCCOWEN UND PHIBBS, 1974). Die Deaminierungs-Aktivität des Enzyms ermöglicht bei *Rhodospseudomonaden* ein Wachstum auf L-Alanin als einziger Kohlenstoff- und Stickstoffquelle (CARDENAS ET AL., 1987; HERBERT ET AL., 1978; JOHANSSON UND GEST, 1976; MORENO-VIVIAN ET AL., 1983).

GOLDMAN isolierte und charakterisierte als erster 1959 die L-Alanindehydrogenase aus *Mycobacterium tuberculosis* (GOLDMAN, 1959). Inzwischen sind Beschreibungen von L-Alanindehydrogenasen z.B. aus *Cyanobakterien* (BELLION UND TAN, 1987), *Propionibakterien* (CROWN, 1987), *Rhodobacter* (CABALLERO ET AL., 1989) und *Streptomyces* (VANCUROVA ET AL., 1989) publiziert.

SODA und Mitarbeiter beschäftigen sich mit der Reinigung und Charakterisierung von L-Alanindehydrogenasen aus mesophilen und thermophilen *Bacillus*-Stämmen (OHSHIMA UND SODA, 1979) und publizierten als erste die Klonierung (INAGAKI ET AL., 1986; NAGATA ET AL., 1989; OHSHIMA UND SODA, 1989) und Sequenzierung von *alaD*-Genen aus dem mesophilen Stamm *B.sphaericus* und dem thermophilen Stamm *B.stearothermophilus* (KURODA ET AL., 1990). Die biochemischen Eigenschaften der L-Alanindehydrogenasen aus *B.stearothermophilus* (Ala-DHst) und *B.sphaericus* (Ala-DHsp) sind in Tabelle I.1. zusammen mit denen der Pyruvat-decarboxylase aus *Zymomonas mobilis* aufgeführt: Beide Enzyme sind aus 6 identischen Untereinheiten zusammengesetzt, die bei der Ala-DH aus *B.stearothermophilus* ein Holoenzym von 240.000 Dalton und bei *B.sphaericus* eins von 230.000 Dalton bilden. Das Temperaturoptimum des Enzyms aus dem thermophilen *Bacillus*-Stamm ist entsprechend hoch bei 70°C, das des mesophilen Stammes bei 30°C. Das pH-Optimum für die reduktive Aminierung liegt bei beiden Enzymen bei pH 8,5, das der oxidativen Deaminierung bei pH 10,0-11,0. Die Affinitäten der Ala-DHsp für das Substrat Pyruvat und die reduzierte bzw. oxidierte Form des Coenzyms NADH/NAD⁺ sind jeweils größer (K_m Pyruvat=1,7 mM; K_m NADH=0,01 mM; K_m NAD⁺=0,23) als die der Ala-DHst (K_m Pyruvat=5,0 mM; K_m NADH=0,08 mM; K_m NAD⁺=1,7 mM). Ein Vergleich mit dem K_m -Wert der PDC für Pyruvat, der mit 0,4 mM sehr niedrig liegt, zeigt, daß bei Anwesenheit von PDC und Ala-DH in der Zelle bei sehr geringen internen Pyruvatkonzentrationen die Decarboxylierungsreaktion bevorzugt ablaufen würde.

Stämme und Enzyme	<i>B. stearo.</i> Ala-DH	<i>B. sphaericus</i> Ala-DH	<i>Z. mobilis</i> PDC
M_r	240.000	230.000	200.000
Untereinheiten	6 identische	6 identische	4 identische
M_r "	40.000	38.000	56.500
pH Optimum ^{*1}	8,5	8,5	5,5
pH-Optimum ^{*2}	10,0-10,5	10,0-11,0	-
Temp. Optimum	70°C	30°C	30°C
K_m Pyruvat	5,00 mM	1,70 mM	0,40 mM
K_m NADH	0,08 mM	0,01 mM	-
K_m NAD ⁺	1,70 mM	0,23 mM	-
K_m L-Alanin	13,30 mM	18,90 mM	-

Tabelle I.1: Eigenschaften der L-Alanindehydrogenasen aus *B. stearothermophilus* und *B. sphaericus* (KURODA, Diplomarbeit 1986) im Vergleich zur Pyruvatdecarboxylase aus *Z. mobilis* (BRINGER-MEYER ET AL., 1986)

*1 : bezüglich reduktiver Aminierung der Alanindehydrogenasen

*2 : bezüglich oxidativer Deaminierung der Alanindehydrogenasen

M_r : Molekulargewicht in Dalton

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch Einführung eines L-Alanindehydrogenasegens aus *Bacillus* in *Zymomonas mobilis* unter gleichzeitiger Ausschaltung der Pyruvatdecarboxylase-Reaktion den Stoffwechselfluß in Richtung L-Alaninbildung umzulenken ("metabolic design") und damit eine neue Gärungsform zu konzipieren (Abbildung I.3.).

Dazu war es zunächst nötig, einen geeigneten Expressionsvektor für *Z. mobilis* zu konstruieren, auf dem das L-Alanindehydrogenasegen gut in *Zymomonas mobilis* einzuführen und hoch zu exprimieren war. Anschließend war zu untersuchen, wie das "neue" Produkt L-Alanin aus der Zelle ausgeschleust wird. In einem zweiten Schritt sollte dann die Pyruvatdecarboxylase-Reaktion ausgeschaltet werden und damit der Stoffwechsel, wie in Abbildung I.3. dargestellt, umgelenkt werden. Schließlich waren die optimalen Kulturbedingungen für die L-Alaninbildung zu finden und limitierende Schritte der L-Alaninbildung aufzuklären.

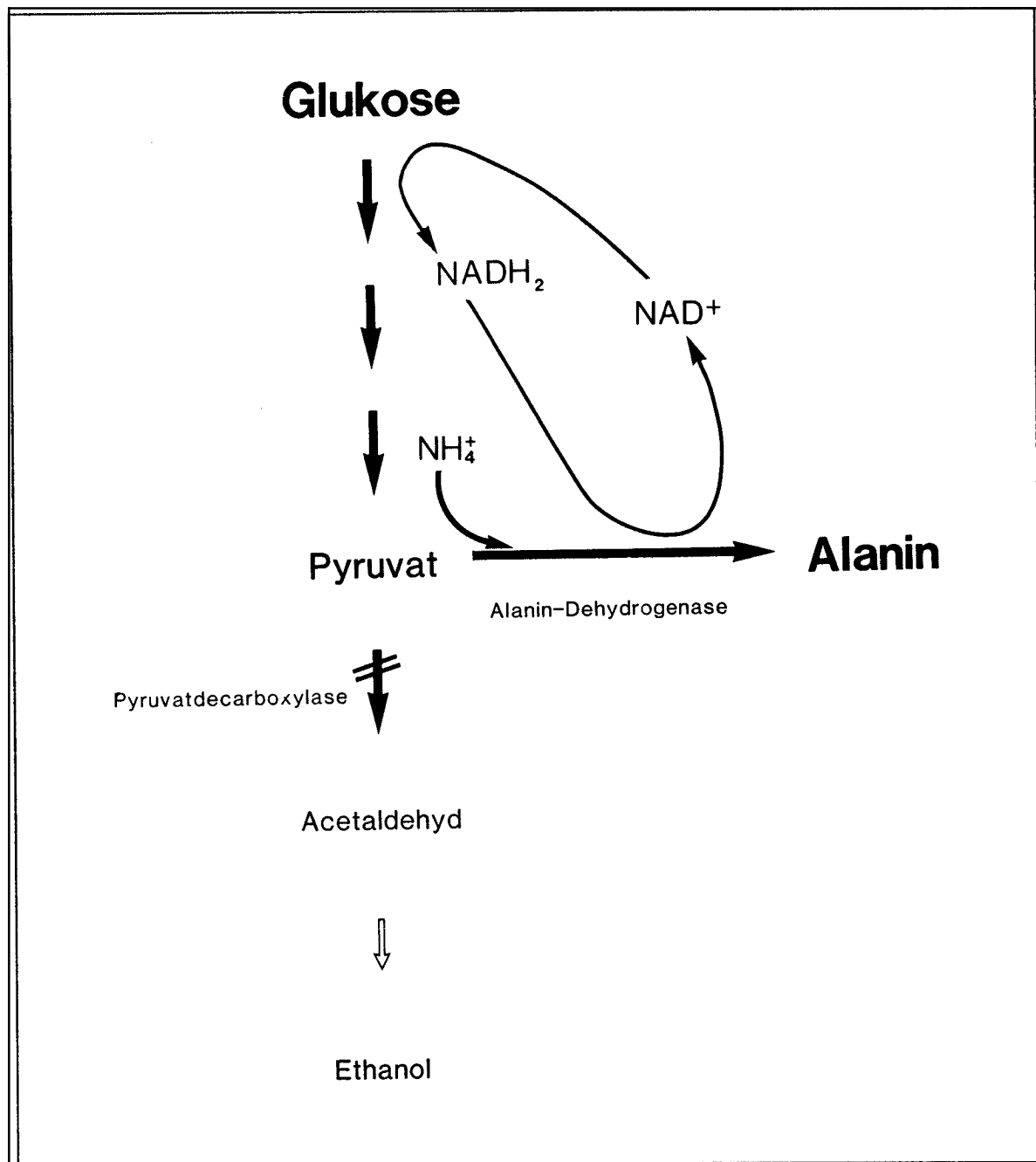


Abbildung I.3.: Schema der Alaninbildung aus Glukose in einem rekombinanten *Z.mobilis*-Stamm

II. Material und Methoden

1. Chemikalien und Enzyme

In der vorliegenden Arbeit wurden analysenreine Chemikalien der Firma MERCK AG, Darmstadt verwendet, Produkte anderer Hersteller sind in Tabelle II.1. aufgeführt.

Produkt:	Herstellerfirma:
Acrylamid (reinst, 2x krist., mind. 99%)	BOEHRINGER MANNHEIM, Mannheim
ATP	BOEHRINGER MANNHEIM, Mannheim
Agarose (Ultra Pure)	GIBCO BRL, Eggenstein
Ampicillin (Trihydrat)	BOEHRINGER MANNHEIM, Mannheim
Bacto-Agar	DIFCO LAB., Detroit, USA
Bacto-Trypton	DIFCO LAB., Detroit, USA
Bisacrylamid	SERVA, Heidelberg
Cäsiumchlorid (Ultra Pure)	GIBCO BRL, Eggenstein
Chloramphenicol	BOEHRINGER MANNHEIM, Mannheim
Dithiothreitol	SERVA, Heidelberg
EGTA	SERVA, Heidelberg
Ethidiumbromid	SIGMA, Deisenhofen
Hefeextrakt	DIFCO LAB., Detroit, USA
Kanamycin (Monosulfat)	SIGMA, Deisenhofen
Laurylsarkosinat (Na-Salz)	SIGMA, Deisenhofen
MacConkey Agar	GIBCO BRL, Eggenstein
MES	SIGMA, Deisenhofen
Morpholinopropansulfonsäure	SERVA, Heidelberg
Nalidixinsäure	SERVA, Heidelberg
Natriumdodecylsulfat	SERVA, Heidelberg
NAD (freie Säure)	BOEHRINGER MANNHEIM, Mannheim
NADH (Dinatriumsalz)	BOEHRINGER MANNHEIM, Mannheim
Pantothenat (Ca-Salz)	SIGMA, Deisenhofen
Phenol	GIBCO BRL, Eggenstein
Pyruvat (Na-Salz)	GIBCO BRL, Eggenstein
Radioisotope: [γ - ^{32}P]-ATP, $^3\text{H}_2\text{O}$, [^{14}C]-Taurin, ^{86}Rb	AMERSHAM-BUCHLER, Braunschweig
Rifamycin	SERVA, Heidelberg
Rinderserumalbumin	BOEHRINGER MANNHEIM, Mannheim
TEMED	SIGMA, Deisenhofen
Tetracyclin (Hydrochlorid)	BOEHRINGER MANNHEIM, Mannheim
Thiaminpyrophosphat	BOEHRINGER MANNHEIM, Mannheim
Triäthanolamin	SIGMA, Deisenhofen

Tabelle II.1.: Verwendete Chemikalien und Substanzen

Alle Enzyme wurden von der Firma BOEHRINGER MANNHEIM, Mannheim bezogen. Zur nicht radioaktiven Markierung von DNA sowie zur Bestimmung von Glukose und Laktat in Kulturüberständen wurden Tests der Firma BOEHRINGER MANNHEIM, Mannheim benutzt, die vorgefertigte Puffer und Enzymlösungen enthielten ("DNA Labeling and Detection Kit Nonradioaktiv", "Glukosetest", "Laktatetest").

2. Bakterienstämme und Plasmide

Eigenschaften und Herkunft der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und Plasmide sind in den folgenden Tabellen zusammengefaßt. Dabei erfolgte die Bezeichnung der genetischen Marker nach BACHMANN UND LOW (1980).

Stamm	Relevanter Genotyp	Referenz
ED 8767	<i>recA</i> , <i>supE</i> , <i>supF</i> , <i>hsdS</i> , <i>met</i>	MURRAY ET AL., 1977
HB 101	F^- , <i>hsdS</i> ($r_B^-m_B^-$), <i>recA</i> , <i>ara</i> , <i>proA</i> , <i>lacY</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (Sm^r), <i>xyl</i> , <i>mtl</i> , <i>supE44</i> , λ^-	BOYER UND ROULAND-DUSSOIX, 1969
ECG 18	F^- , <i>hsdS</i> ($r_B^-m_B^-$), <i>recA</i> , <i>ara</i> , <i>proA</i> , <i>lacY</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (Sm^r), <i>xyl</i> , <i>mtl</i> , <i>supE</i> , Δ <i>lamB</i>	LUDWIG, 1987
S17-1	<i>thi</i> , F^- , <i>endAR</i> , <i>hsdR</i> (r^-, m^+), <i>supE</i> , λ^- , <i>pro</i>	SIMON ET AL., 1983
MV 12 /PRTS:: Tn 1725	<i>trpE</i> , <i>recA</i> , <i>thr</i> , <i>leu</i> , <i>lacY</i>	ALTENBUCHNER ET AL., 1983

Tabelle II.2.: Verwendete *E.coli*-Stämme

Zur Klonierung des *alaD*-Gens wurde *Bacillus sphaericus* DSM 5019 (Deutsche Stammsammlung Göttingen, IFO 3525)

verwendet. Daneben wurde das *alaD*-Gen aus *Bacillus stearothermophilus* IFO 12550 (SODA, Kyoto) eingesetzt.

Stamm	Relevanter Genotyp	Referenz
ZM1 (ATCC 10988)	Wildtyp	SWINGS UND DELEY, 1977
CU1-Rif2 (ATCC 10988 Derivat)	Rif ^r	AFENDRA UND DRAINAS, 1987
CP4 (ATCC 31821)	Wildtyp	GONCALVES DE LIMA ET AL., 1970
CP4- <i>thi</i> (ATCC 31821 Derivat)	<i>thi</i>	TYPAS, persönl. Mitteilung

Tabelle II.3.: Verwendete *Z.mobilis* Stämme

Bezeichnung	Größe	Marker	Referenz
pICR 301	12,0 kB	<i>bla</i> , <i>alaD</i>	INAGAKI ET AL., 1986
pUC 19	2,7 kB	<i>bla</i> , <i>lacZ</i> α	VIEIRA UND MESSING, 1982
pRK 2013	48,0 kB	<i>kan</i> , <i>tra</i> ⁺	FIGURSKI UND HELINSKI, 1979 FRIEDMANN ET AL., 1982
pPTZ 1	6,9 kB	<i>bla</i> , <i>tet</i>	REYNEN, Diss. 1988
pPTZ 4	6,7 kB	<i>bla</i> , <i>tet</i>	REIPEN, Dipl. 1989
pSUP 104	9,5 kB	<i>cat</i> , <i>tet</i>	SIMON ET AL., 1983
pRTS 1	130,0 kB	<i>kan</i> , <i>cat</i> , <i>tra</i> , T ^S	ALTENBUCHNER ET AL., 1983

Tabelle II.4.: Verwendete Plasmide

3. Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

Für die Kultivierung von *Z.mobilis*-Stämmen wurden folgende Medien verwendet:

I. Komplettmedium (BRINGER ET AL., 1984)

Glukose	20,0	g/l
Hefeextrakt	10,0	g/l
KH_2PO_4	1,0	g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,0	g/l
MgSO_4	0,5	g/l

Die Glukose wurde dem Medium nach dem Autoklavieren zugesetzt. Für feste Nährböden wurden 18 g/l Agar ergänzt. Zur Selektion auf Antibiotikaresistenz enthielt das Medium zusätzlich noch die entsprechenden, sterilfiltrierten Antibiotika in folgenden Konzentrationen:

Tetracyclin in 96% Ethanol gelöst	30 µg/ml
Chloramphenicol in 50% Ethanol gelöst	100 µg/ml
Rifamycin in 50% Methanol gelöst	100 µg/ml
Nalidixinsäure in 0,1 N NaOH gelöst	25 µg/ml

Von den Antibiotika wurden jeweils 100-fach konzentrierte Stammlösungen angesetzt, die dem Medium nach dem Autoklavieren und Abkühlen zugegeben wurden.

II. Mineralsalzmedium (modifiziert nach FEIN ET AL., 1983)

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,98 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	1,00 g/l
KH_2PO_4	3,48 g/l
Tri-Na Citrat	0,21 g/l
MES Puffer	19,52 g/l

MES = 2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure

Die Komponenten wurden in bidestilliertem Wasser (Aqua bidest.) gelöst, der pH-Wert mit KOH auf pH 5,5-6,0 eingestellt und das Volumen anschließend mit Aqua bidest. auf 879 ml aufgefüllt. Für Medienplatten wurde entsprechend 18 g/l Agar zugefügt. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen

wurden noch folgende Substanzen aus sterilfiltrierten Stammlösungen zugesetzt:

FeSO ₄ • 7 H ₂ O (100 mg/ml)	10 ml
Biotin (10 mg/ml)	10 ml
Ca-Pantothenat (1 g/ml)	1 ml
Glukose (50 g/100 ml)	100 ml

III. Alaninbildungsmedium

Mineralsalzmedium für *Z.mobilis* wurde mit 10 M KOH auf pH 7,0 und die Ammoniumkonzentration mit 6,5 g/l NH₄Acetat auf 100 mM Endkonzentration eingestellt.

Wurden Mineralsalzmedien Antibiotika zugesetzt, so erfolgte dies mit der Hälfte der für Komplettn Medien beschriebenen Konzentrationen. Für Kultivierungen in Alaninbildungsmedium wurde Tetracyclin in Aqua bidest. statt in Ethanol gelöst, um die Ethanolanalyse nicht zu verfälschen.

Für die Kultivierung von *E.coli* und *B.sphaericus* wurde folgendes Komplettn Medium eingesetzt:

LB-Medium (LENNOX, 1955)

Bacto Trypton	10 g/l
Yeast Extrakt	5 g/l
NaCl	5 g/l

Der pH-Wert wurde mit 0,1 N NaOH auf pH 7,0 eingestellt. Zur Herstellung von festen Nährböden wurde dem Medium 18 g/l Agar zugesetzt. Enthielt das Medium Antibiotika, so wurden die entsprechenden sterilfiltrierten Antibiotikastammlösungen dem Medium nach Abkühlung auf 50°C bis zu folgenden Endkonzentrationen zugegeben:

Ampicillin	50 µg/ml
Chloramphenicol	25 µg/ml
Kanamycin	25 µg/ml
Tetracyclin	15 µg/ml

Zur Unterscheidung zwischen *E.coli*- und *Z.mobilis*-Zellen nach der Filterkreuzung wurden die Kolonien von den Kreuzungsplatten auf MacConkey Platten ausgestrichen. *Z.mobilis* wächst aufgrund der darin enthaltenen Gallensalze nicht auf diesem Medium, während *E.coli* je nach Kohlenstoffquelle rote bzw. weiße Kolonien bildet.

MacConkey Agar (MACCONKEY 1905)

MacConkey Agar-Mischung 40 g/l

Kultivierungsbedingungen

Die Kultivierung der *Z.mobilis*-Stämme erfolgte, falls nicht anders erwähnt, in Anaerobengefäßen der Firma BELLCO-GLASS-INC., New Jersey, USA oder in Zweihalskolben der Glasbläserei, KFA JÜLICH GmbH. Inkubiert wurde unter anaeroben Bedingungen, falls nicht anders angegeben, ohne Schütteln der Kulturen bei 30°C. Die Anaerobiose wurde nicht durch Begasen des Gefäßes erreicht, sondern stellte sich nach CO₂-Entwicklung und Entweichen des überschüssigen Gases durch einen Sterilfilter selbst in den Kulturen ein. Für die Vorkulturen wurden die Medien von einer Kompletmediumplatte mit einer Einzelkolonie beimpft und 16 h inkubiert. Für die Hauptkultur in Mineralsalzmedium wurden die Zellen abzentrifugiert und ohne Waschen überführt. Die Größe des Inokulums wurde so gewählt, daß die optische Dichte (OD) der Kultur etwa OD₆₀₀ = 0,15 betrug.

Alaninbildungssmedium wurde mit einer OD₆₀₀ = 2-3 beimpft. Kultivierungen in Alaninbildungsmedium wurden anaerob unter Schütteln bei 37°C durchgeführt.

Bei Kultivierungen von thiaminauxotrophen Stämmen in Alaninbildungsmedium wurde zwischen Vor- und Hauptkultur noch eine Hungerphase in Mineralsalzmedium pH 6,0 unter Thiaminmangel durchgeführt. Das Inokulum wurde hier vor jedem Überimpfen zweimal in Mineralsalzmedium pH 6,0 gewaschen.

Die Kultivierung von *Z.mobilis* auf festen Nährböden erfolgte bei 30°C in einem Anaerobentopf (OXOID Anaerobic), der mit einem H₂/CO₂-Gemisch (OXOID Gas Generating Kit) gefüllt war und einen Katalysator (OXOID, Wesel) enthielt.

Die Anzucht von *E.coli* erfolgte aerob, in Flüssigkultur unter Schütteln (Reagenzgläser im G24 Environmental Incubator Shaker der Firma NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC CO., INC. Edison, USA; Erlenmeyerkolben auf dem Pilot-Shake der Firma KÜHNER AG APPARATEBAU Basel, Schweiz) bei 37°C.

B.sphaericus wurde aerob in Flüssigkultur unter Schütteln bei 30°C gezogen.

Zur Stammhaltung wurden von allen verwendeten Bakterienstämmen Glycerindauerkulturen angelegt. Eine dichtbewachsene Komplettnährmediumplatte des entsprechenden Stammes wurde hierzu mit Komplettnährmedium abgeschwemmt, die Zellsuspension abzentrifugiert und in 1 ml Komplettnährmedium resuspendiert. 1 ml sterile Glycerinlösung (99 %) wurde zugefügt, das Ganze gemischt und in ein steriles 2,5 ml Glasgefäß überführt. Bei -20°C gelagert waren diese Kulturen mindestens ein halbes Jahr haltbar.

4. Bestimmung der Bakterienkonzentration

Das Zellwachstum in Flüssigkulturen wurde über Messungen der optischen Dichte bei 600 nm im Spektralphotometer der Firma SHIMADZU, Modell UV 160, verfolgt. Gemessen wurde in Küvetten mit 1 cm Lichtweg gegen 0.9 %-ige NaCl-Lösung, in der die Proben bei einer OD₆₀₀ ≥ 0.3 auch verdünnt wurden. Durch Ausplattieren verschiedener Verdünnungsstufen einer Kultur auf feste Nährböden und Auszählen der gebildeten Kolonien, sowie durch Zählungen von Bakterienzellen in einer Thomakammer unter dem Mikroskop, ergaben sich folgende Korrelationen zwischen OD₆₀₀ und Zellzahl einer Bakterienkultur: Eine OD₆₀₀ von 1 entsprach bei *E.coli*-Kulturen einer Zellzahl von 10⁹ pro ml und bei *Z.mobilis*

$2 \cdot 10^8$ Zellen pro ml Kultur.

In *Z.mobilis*-Kultivierungen in Alaninbildungsmedium wurde die Bakterienmasse über Trockengewichtsbestimmungen ermittelt. Hierzu wurden 10 ml-Reagenzgläser der Firma DURAN über Nacht bei 105°C getrocknet und anschließend 6 h in einem Exsikkator über Silikagel auf Raumtemperatur abgekühlt. Das Gewicht der Röhrchen wurde auf einer Feinwaage bestimmt. Je 10 ml Kultur wurden in die Röhrchen gefüllt und die darin enthaltenen Zellen durch Zentrifugation (10 min., 3.500 rpm BECKMAN Kühlzentrifuge) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment zweimal mit eiskaltem Aqua bidest. gewaschen. Nach dem Trocknen über Nacht bei 105°C und anschließendem Abkühlen im Exsikkator (6 h) wurde das Gewicht der Röhrchen samt Inhalt bestimmt. Das Trockengewicht ergab sich nun aus dem Mittelwert der Parallelbestimmungen abzüglich des Leerwertes der Röhrchen. Einer OD₆₀₀ von 1 entsprach ein Trockengewicht von 0,28 mg/ml.

5. Techniken zur DNA-Isolierung aus Bakterien

5.1. Isolierung chromosomaler DNA

Chromosomale DNA aus *B.sphaericus* wurde zur Erstellung einer Genbibliothek nach einer Vorschrift von BUYN ET AL. (1986) isoliert.

Die Zellen einer 100 ml Kultur wurden durch Zentrifugation geerntet (BECKMAN-Zentrifuge J2-21, Rotor JA 14, 6000 rpm, 10 min.), in 100 mM EDTA, 25 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 % (w/v) Glycerin gewaschen und anschließend in 10 ml 100 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 % (w/v) Glycerin aufgenommen. Nach Zugabe von 10 mg Lysozym wurde 8 h bei 37°C unter langsamem Schütteln inkubiert. Die Inkubation wurde mit 2 mg Proteinase K bei 50°C über Nacht zur Inaktivierung der Nukleasen fortgesetzt. Am nächsten Morgen wurde nach Zugabe von 1 ml 10 %-igem Na-Laurylsarkosinat solange bei 50°C weiter inkubiert, bis das vorher milchig trübe Lysat klar

erschien. Durch vorsichtiges Überschichten mit 20 ml -20°C kaltem, absoluten Ethanol fiel die DNA an der Phasengrenzfläche aus und konnte an einem Glasstab aufgespult werden. Die DNA wurde noch am Glasstab mit 70 %-igem Ethanol gewaschen, anschließend in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und in der Vakuumzentrifuge (Speed Vac Concentrator der Firma BACHHOFFER) getrocknet. Die DNA wurde in 300 μl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8,0) aufgenommen und je dreimal mit Phenol/Chloroform/ Isoamylalkohol (IAA) (Volumenverhältnis 25:24:1) und Chloroform/IAA (Volumenverhältnis 24:1) extrahiert. Die Präzipitation der so gereinigten DNA erfolgte durch Zugabe von 1/4 Volumen einer 2 M LiCl-Lösung und 2 Gesamtvolumen absoluten Ethanols (-20°C) bei 0°C für 30 min., mit anschließender 15-minütiger Zentrifugation in einer SIGMA-Zentrifuge (Typ 202 MK) bei 13.000 rpm und 0°C . Das Sediment wurde nach dem Trocknen in der Vakuumzentrifuge in 300 μl TE-Puffer aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

5.2. Plasmidisolierung im großen Maßstab

Für Klonierungen und Restriktionskartierungen war es nötig, große Mengen reiner Plasmide zur Verfügung zu haben. Bei der Präparation größerer Mengen superhelikaler Plasmid-DNA aus *E.coli* wurde die alkalische Lyse Methode modifiziert angewandt (MANIATIS ET AL., 1982).

1 l LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum wurde mit 2 ml einer selektiv gewachsenen Vorkultur beimpft und so lange bei 37°C unter Schütteln inkubiert, bis die OD_{600} 0.4-0.6 betrug. Bei dieser optischen Dichte wurde dem Medium zur Amplifikation der Plasmide Chloramphenicol bzw. Spektinomycin in einer Konzentration von 170 $\mu\text{g/ml}$ zugesetzt (CLEWELL, 1972). Die Bakterienkultur wurde weiter über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen durch Zentrifugation (BECKMAN-Zentrifuge J2-21, Rotor JA 10, 6.000 rpm, 4°C , 10 min.) geerntet und das Bakteriensediment in 10 ml einer 10 %-igen Saccharose / 50 mM

Tris-HCl Lösung pH 8,0 resuspendiert. Zur Protoplastierung der Zellen wurden 2 ml frische LysozymbLösung (10 mg/ml in 0,25 mM Tris-HCl pH 8,0) und zur weiteren Destabilisierung der Zellwand durch Komplexierung zweiwertiger Ionen 8 ml einer 0,25 mM EDTA Lösung zugefügt. Die Inkubation erfolgte für 10 min. auf Eis. Die Zellyse wurde durch Zugabe von 4 ml einer 10 %-igen SDS-Lösung erreicht. Zur Proteinfällung wurden dem Ansatz 6 ml einer 5 M NaCl-Lösung zugesetzt und 1 h auf Eis inkubiert. Zelltrümmer, gefällte Proteine und Teile der chromosomalen DNA wurden in einem anschließenden Zentrifugationsschritt (BECKMAN-Zentrifuge J2-21, Rotor JA 20, 20.000 rpm, 4°C, 30 min.) von dem plasmidhaltigen Überstand getrennt. Aus diesem Überstand wurde die DNA durch Zusatz von 2 Volumenanteilen absolutem Ethanol (-20°C) und 15-minütige Inkubation bei -20°C gefällt. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 4°C und 10.000 rpm, 30 min. im Rotor JA 14 wurde das Plasmidsediment in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Die weitere Reinigung erfolgte über einen CsCl-Gradientenlauf.

Zur Entfernung von Proteinen, RNA und chromosomaler DNA aus großen Plasmidpräparationen von *E.coli* wurden isopyknische Zentrifugationen im Cäsiumchlorid-Ethidiumbromid Dichtegradienten durchgeführt (modifiziert nach MANIATIS ET AL., 1982). Ethidiumbromid interkaliert stärker in die aufgrund der Präparationsbedingungen gescherte chromosomale DNA als in die intakte superhelikale Plasmid DNA, wodurch es zu unterschiedlichen Einlagerungen der DNA-Typen im Dichtegradienten kommt. Die superhelicale Plasmidbande ist stets unter der chromosomalen zu finden, während sich Proteine und RNA im Sediment des Gradienten anreichern.

Die präzipitierten Nukleinsäuren eines Plasmidgroßaufschlusses wurden in 16 ml TE-Puffer (II.5.1) resuspendiert und darin 16 g CsCl gelöst. Die Lösung wurde in verschweißbare Zentrifugenröhrchen (BECKMAN Quick-Seal Polyallomer Centrifuge Tubes 16x76 mm) überführt und mit je 0,8 ml Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) versetzt. Die Gradientenröhrchen wurden mit CsCl-Lösung (1 mg/ml)

aufgefüllt, austariert und verschweißt. Nach kräftigem Mischen aller Komponenten der Röhrchen wurde der Gradientenlauf in einer BECKMAN Ultrazentrifuge (Typ L8-70M) in dem Rotor TI 70 bei 25°C durchgeführt. Die Laufzeit betrug mindestens 36 h bei 45.000 rpm.

Die Plasmidbande wurde unter UV-Licht mit einer 2 ml Injektionsspritze abgezogen und das Volumen der Probe bestimmt. Zur Fällung der DNA wurden das 2,5-fache Volumen Aqua bidest. und 2 Gesamtvolumenanteile absoluter Ethanol (-20°C) zugesetzt und der Ansatz 2 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die DNA durch Zentrifugation (BECKMAN Zentrifuge J2-21, Rotor JA 20, 10.000 rpm, 30 min., 4°C) sedimentiert und in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Das getrocknete DNA-Sediment wurde in 500 µl TE-Puffer (II.5.1) gelöst und je dreimal mit einem Volumenanteil puffergesättigter Phenol/Chloroform/IAA-Lösung und Chloroform/IAA extrahiert. Eine Fällung mit 1/4 Volumen einer 2 M LiCl-Lösung und 2 Gesamtvolumenanteilen absoluten Ethanols (-20°C), 15 min. auf Eis schloß sich an. Nach dem Sedimentieren (SIGMA-Kühlzentrifuge 202 MK, 13000 rpm, 4°C, 30 min.) und Trocknen (Vakuumzentrifuge) wurde die Plasmid-DNA in 300 µl Aqua bidest. aufgenommen und die Konzentration in der Lösung photometrisch bestimmt.

5.3. Plasmidschnellisolierung

Zur schnellen Plasmidpräparation aus *E.coli* wurde eine nach BIRNBOIM und DOLY (1979) modifizierte Methode eingesetzt. 1,5 ml LB-Kulturen mit entsprechendem Antibiotikum wurden mit einer Einzelkolonie beimpft und mindestens 5 h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend in einer EPPENDORF-Zentrifuge bei 13.000 rpm sedimentiert und in 60 µl 50 mM Glukose, 10 mM EDTA und 25 mM Tris-HCl, pH 8,0 (Lösung I) resuspendiert. Durch Zugabe von 200 µl 1 % SDS/0,2 M NaOH und Inkubation für 5 min. auf Eis wurden die Zellen lysiert. Chromosomale DNA und Proteine wurden durch 150 µl 3 M K-Acetat/1,8 M Essigsäure pH 8,0

weitgehend gefällt und nach 10 min. auf Eis in der SIGMA Kälzentrifuge (202 MK) bei 13.000 rpm für 10 min. bei 4°C vom plasmidhaltigen Überstand getrennt. Der klare Überstand wurde je einmal mit Phenol/Chloroform/IAA und Chloroform/IAA extrahiert und die Plasmid-DNA mit zwei Volumenanteilen absoluten Ethanol (Raumtemperatur) gefällt. Nach Trocknen des DNA-Sediments in der Vakuumzentrifuge wurde es in 50 µl Aqua bidest aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Die Plasmidisolierung aus *Z.mobilis*-Zellen erfolgte wie bei *E.coli*-Zellen allerdings aus einem Kulturvolumen von 3 ml. Verändert wurde der erste Inkubationsschritt, um eine bessere Lyse der Zellen zu erreichen: statt in 60 µl Lösung I wurde in 100 µl Lösung I, der noch zusätzlich Lysozym in einer Endkonzentration von 10 mg/ml zugesetzt worden war, resuspendiert und eine 10-minütige Inkubation auf Eis abgeschlossen. Wichtig war eine dreimalige Extraktion mit Phenol/Chloroform/IAA und Chloroform/IAA, bei der die Zentrifugationszeiten zur Phasentrennung in der EPPENDORF-Zentrifuge (13.000 rpm, Raumtemperatur) auf 10 min. verlängert wurden.

6. Techniken zur Rekombination und Analyse von DNA

6.1. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgte nach Herstellerprotokoll in den mitgelieferten Puffern. Das Volumen der Reaktionsansätze betrug standardmäßig 10 µl, bei Klonierungen 20 µl. Für hochgereinigte DNA wurde Enzym in einer Konzentration von 1 U/µg DNA eingesetzt, bei schnell präparierter DNA wurde die doppelte Menge an Enzym verwendet. Schnell präparierte DNA enthielt oft noch RNA, daher wurde diesen Restriktionsansätzen RNase in einer Konzentration von 10 µg/ml zugesetzt. Die Inkubationsdauer betrug bei Spaltungen mit einem Enzym mindestens 1 h, Restriktionsansätze mit zwei Enzymen wurden 2 h inkubiert.

6.2. Alkalische Phosphatasebehandlung

Für Klonierungen war es nötig, die Religation eines Vektors durch Entfernung 5'-terminaler Phosphatgruppen zu verhindern. Die Dephosphorylierung wurde im Anschluß an die Restriktionsspaltung mit 0,5 U alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) für 20 min. bei 37°C durchgeführt (MANIATIS ET AL., 1982). Gestoppt wurde die Reaktion durch 10-minütiges Erhitzen des Reaktionsansatzes auf 65°C in Anwesenheit von 20 mM EGTA. Um die Phosphatase vollständig aus der DNA-Lösung zu entfernen, wurde eine Phenol/ Chloroform/IAA und eine Chloroform/IAA Extraktion mit anschließender LiCl/Ethanol-fällung durchgeführt. Die so gereinigte DNA konnte in dem gewünschten Volumen Aqua bidest. aufgenommen und zur Ligation eingesetzt werden.

6.3. Verkürzung restringierter DNA mit Exonuklease III

Mit einem käuflichen Satz an Puffern und Enzymen (Erase-a-Base System, PROMEGA, Madison USA) wurde die von HENIKOFF (1984) entwickelte Methode nach Anwenderprotokoll durchgeführt. In Abbildung II.1. sind alle Arbeitsschritte bis zur Transformation des verkürzten Konstruktes schematisch aufgeführt. Mit dem Enzym Exonuklease III (Exo III) wurde DNA, die zuvor mit einem Restriktionsenzym geschnitten wurde, das entweder 5'-überhängende oder glatte DNA-Enden erzeugt, von diesen Enden aus verkürzt. Die Verkürzung konnte unidirektional erfolgen, wenn am anderen Ende der linearen DNA mit einem Enzym restringiert wurde, das 3'-überhängende Enden erzeugt, denn diese Stellen waren der Exo III-Aktivität nicht zugänglich (HENIKOFF, 1984). Da der Abbau der Nukleotide durch Exo III mit konstanter Rate erfolgte, war es möglich zu bestimmten Zeiten Aliquots aus dem Reaktionsansatz zu entnehmen, in diesen die Reaktion abzustoppen und so eine Anzahl unterschiedlich verkürzter DNA-Moleküle zu erhalten. Nach Erzeugung glatter Enden mit SI-Nuklease und anschließender Polymerasereaktion mit Klenow Enzym und Nukleotiden (dNTPs) konnte die lineare DNA ligiert, und

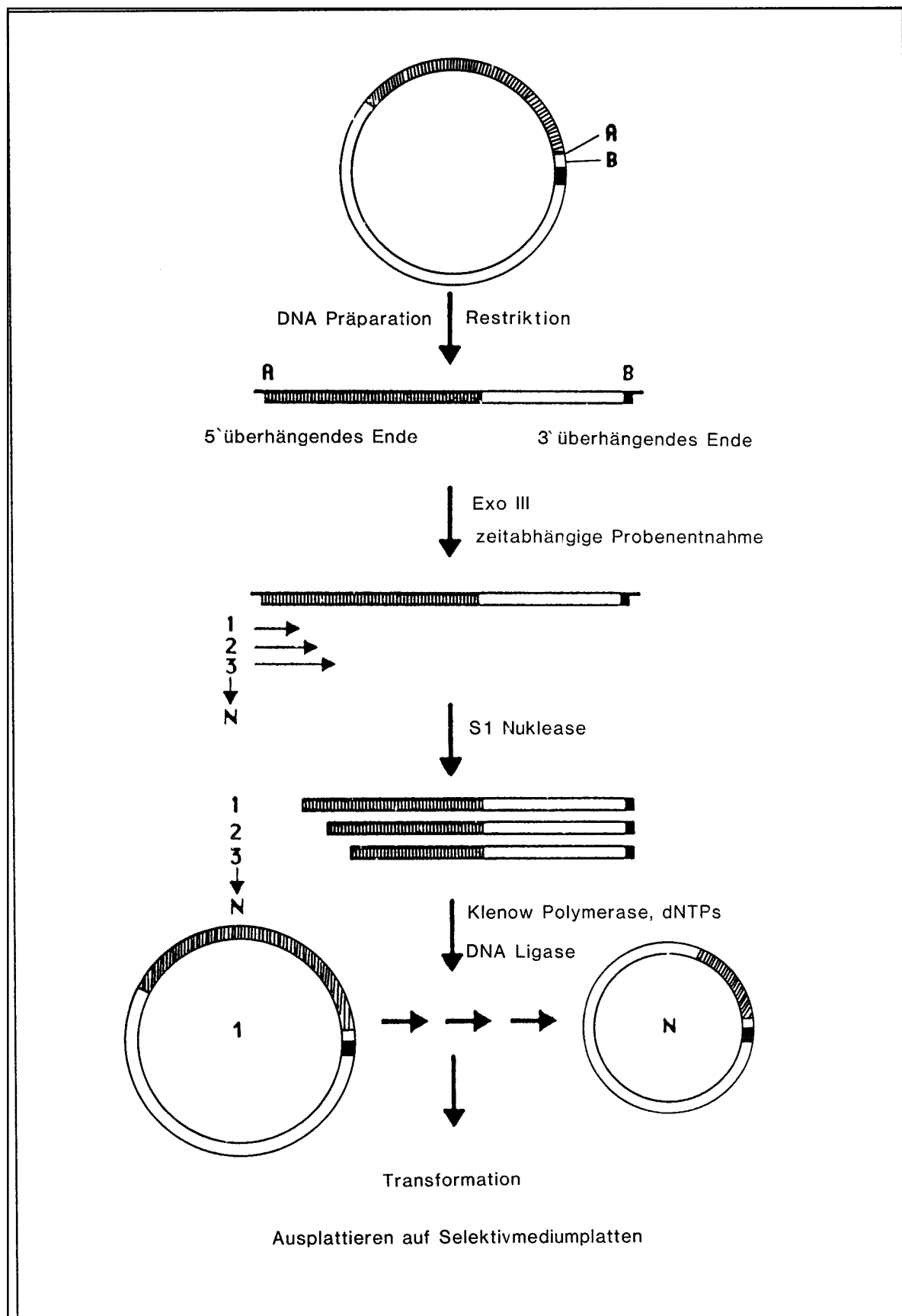


Abbildung II.1.: Schematische Darstellung der Verkürzung von Plasmiden mit Exonuklease III

E.coli-Zellen mit den circulären Plasmiden transformiert werden. Nach dem Ausplattieren auf Nährböden mit entsprechendem Antibiotikum konnte die Analyse der verkürzten Konstrukte über Restriktionsanalyse der Plasmide erfolgen.

6.4. Auffüllen 5'-überhängender DNA-Enden mit Klenow Polymerase

5'-überhängende Enden eines restringierten DNA-Doppelstranges wurden mit Klenow Polymerase (große Untereinheit der DNA-Polymerase I) in Anwesenheit von Nukleotidtriphosphaten aufgefüllt (MANIATIS ET AL., 1982). Der Reaktionsansatz enthielt dabei 1 µg DNA, 2,5 µl 10• Nick Puffer und 1 µl dNTP-Gemisch. Mit Aqua bidest. wurde bis zu einem Gesamtvolumen von 25 µl aufgefüllt. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Erhitzen des Ansatzes auf 65°C für 10 min. gestoppt. Es folgte eine Phenolextraktion sowie LiCl/Ethanol-fällung der DNA. Die präzipitierte DNA konnte nun in dem gewünschten Volumen Aqua bidest. aufgenommen und zur Ligation eingesetzt werden.

10• Nick-Puffer:	500 mM	Tris-HCl pH 7,2
	100 mM	MgSO ₄
	1 mM	Dithiothreitol
	500 µg/ml	BSA

dNTP-Gemisch : je 2mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP

6.5. Ligation enzymatisch gespaltener DNA-Moleküle

Zur Verknüpfung enzymatisch gespaltener DNA Moleküle wurde T₄-DNA Ligase eingesetzt (MANIATIS ET AL., 1982). Die Ligation überstehender Enden erfolgte in einem Reaktionsansatz von 15 µl in Ligationspuffer mit 0,1 U Ligase, 50-200 ng Vektor und einer Konzentration an Fragment, die einem mola- ren Verhältnis von Vektor zu Fragment von 1:3 entsprach. Der Ansatz wurde entweder 3 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 15°C inkubiert.

Glatte Enden wurden mit 1 U Ligase und einer Vektorkonzen-

tration von 500 ng pro Ansatz über Nacht bei 15°C ligiert. Alle anderen Parameter entsprachen denen der Ligation überstehender Enden. Linkeroligonukleotide wurden in 10 molarem Überschuß zum Vektor eingesetzt.

Ligationspuffer (10-fach):	660 mM	Tris-HCl pH 7,5
(MANIATIS ET AL., 1982)	50 mM	MgCl ₂
	50 mM	DTT
	10 mM	ATP

6.6. DNA Markierung mit Digoxigenin-dUTP

Zur nichtradioaktiven Markierung von DNA wurde eine von BOEHRINGER MANNHEIM entwickelte Methode angewandt: Linearisierte, denaturierte DNA wurde dabei nach Hybridisierung von Hexanukleotiden an verschiedene Stellen der DNA und anschließend Einbau von Nukleotiden (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, Dig-dUTP) durch Klenow Polymerase mit Digoxigenin markiertem dUTP markiert ("random primed"-Methode nach FEINBERG und VOGELSTEIN, 1983). Nach Hybridisierung an die Ziel-DNA folgte eine Behandlung mit Antikörper-konjugat (Anti-Digoxigenin-Alkalische Phosphatase-Konjugat <Dig>-AP), das an das Dig-dUTP band. Durch eine Enzym-katalysierte Farbreaktion mit 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat und Nitroblau-Tetrazoliumsalz konnte dieses Hybrid als blauer Komplex nachgewiesen werden. 1 µg linearisierte Phenol/Chloroform gereinigte DNA wurde durch 10-minütiges Erhitzen auf 95°C und schnelles Abkühlen in Trockeneis/Ethanol denaturiert. Zur Markierung wurden 2 µl Hexanukleotidgemisch (BOEHRINGER MANNHEIM, Mannheim), 2 µl dNTP-Gemisch (je 1 mM dATP, dCTP und dGTP, 0,65 mM dTTP, 0,35 mM Dig-dUTP pH 6,5) 1 µl Klenow Polymerase und Aqua bidest. bis zu einem Volumen von 20 µl zusammengegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 µl EDTA-Lösung (200 mM pH 8,0) gestoppt, die DNA gefällt und in 50 µl Aqua bidest. aufgenommen. So markierte DNA konnte bei -20°C gelagert mindestens ein Jahr lang in Hybridisierungen eingesetzt werden.

6.7. DNA-DNA Hybridisierung

6.7.1. DNA-DNA Hybridisierung nach Southern

Um spezifische DNA-Banden auf Agarosegelen nachzuweisen, wurde die DNA mit der von SOUTHERN (1965) entwickelten Blot Technik auf eine Trägermembran übertragen, denaturiert und mit einer geeigneten mit Dig-dUTP markierten denaturierten DNA-Sonde hybridisiert. Durch eine enzymkatalysierte Farb-reaktion (II.6.8) konnten die hybridisierenden Banden sichtbar gemacht werden.

DNA Proben wurden auf 0,8 %-igen Agarosegelen getrennt, durch Kapillartransfer auf Biodyne A Membran (PALL, Dreieich) übertragen und durch UV-Belichtung (3 min.) an die Membran fixiert. Hybridisierung und Waschen der Membran erfolgte wie in II.6.8. beschrieben.

6.7.2. DNA-DNA Hybridisierung mit Oligonukleotiden

Zur Detektion des *alaD*-Gens aus einer Genbibliothek von *B.sphaericus* wurden je 12 vereinigte, denaturierte Plasmidpräparationen aus Klonen der Genbank in einer "Dot blot" Apparatur auf eine Nylonmembran (Biodyne A) transferiert, und gegen ein 27 Nukleotide langes mit gamma-³²P markiertes Oligonukleotid hybridisiert (Methode nach ZEFF UND GELIEBTER, 1987). Das Oligonukleotid, das dem Anfangsbereich des *alaD*-Gens homolog war, wurde von der Firma PHARMACIA LKB, Freiburg synthetisiert:

5'- GCAGGAGTTGTATCCTTAACGCATGCT -3'

Die Schutzgruppen wurden nach der Synthese durch NH₃ abgespalten und das Oligonukleotid anschließend über eine NAP-10 Säule der Firma PHARMACIA LKB dem Herstellerprotokoll folgend, gereinigt.

Die Markierung des Oligonukleotids mit [gamma -³²P]ATP erfolgte nach ZEFF UND GELIEBTER (1987) mit T₄ Polynukleotidkinase. 20 µl (7,6•10⁶ Bq) [gamma -³²P]ATP

(>1,85·10¹⁴ Bq/mmol) wurden in der Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend in einem Volumen von 7 µl aufgenommen. Nach Zugabe von 1 µl 10-fach Kinasepuffer, 1 µl Oligonukleotid (100 ng) und 1 µl T₄ Polynukleotidkinase (9 U) wurde für 30 min. bei 37°C inkubiert und die Reaktion anschließend durch Hitzeinaktivierung des Enzyms (65°C, 5 min.) beendet.

Der Filter mit den denaturierten DNA Proben wurde für 2 h in 5-fach SSC, 20 mM Na-Phosphatpuffer pH 7,0, 10-fach Denhardt's Lösung, 7 % SDS und 100 µg hitzedenaturierter DNA aus Heringssperma bei 50°C prähybridisiert. Zu 7,5 ml Prähybridisierungslösung wurden anschließend 1 µl (10 ng) markiertes Oligonukleotid zugesetzt und der Filter darin über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Filter je einmal 1 h bei 55°C in 3-fach SSC, 10 mM Na-Phosphat pH 7,0, 10-fach Denhardts Lösung, 5 % SDS und in 1-fach SSC, 1 % SDS gewaschen. Nach dem Trocknen wurde ein Röntgenfilm auf den Filter gelegt (FUJI, X-Ray Film) und über Nacht bei -70°C exponiert.

Kinasepuffer (10-fach):	700 mM	Tris-HCl pH 7,6
	100 mM	MgCl ₂
	50 mM	Dithiothreitol

SSC (20-fach):	3,0 M	NaCl
	0,3 M	Na-Citrat, pH 7,0

Denhards Lösung (10-fach):	0,2 %	Ficoll
	0,2 %	Polyvinylpyrrolidon
	0,2 mg/ml	Rinderserumalbumin
	3-fach	SSC

6.7.3. Koloniehybridisierung

Die von GRUNSTEIN und HOGNESS (1975) entwickelte Methode der Koloniehybridisierung, dient der schnellen Identifizierung rekombinanter Bakterienklone auf festen Nährböden. Nach Transfer der Kolonien auf Nylonfilter und Denaturierung der DNA konnte gegen eine spezifische DNA-Sonde, die

wie im folgenden beschrieben mit Dig-dUTP markiert ist, hybridisiert werden und der zu detektierende Klon, der Art der Markierung entsprechend, erkannt werden. Jeweils 100 zu untersuchende Kolonien wurden neben einer positiven und negativen Kontrolle auf einer selektiven Agarplatte ausgestrichen. Nach Anwachsen der Klone über Nacht (*E.coli*) bzw. nach zwei Tagen (*Z.mobilis*) wurden die Kolonien auf sterile Nylonfilter (BIODYNE A, PALL, Dreieich) übertragen und durch jeweils 1-minütige Inkubation in 0,5 M NaOH aufgeschlossen und die DNA denaturiert. Nach Neutralisierung der Filter in 1 M Tris-HCl pH 7,5 wurden diese zunächst luftgetrocknet und die DNA anschließend durch 3-minütiges Bestrahlen mit UV-Licht an die Membran fixiert. Um unspezifische Bindungen der DNA-Sonde zu verhindern, wurden die Filter zunächst für 2 h bei 68°C in je 20 ml Hybridisierungslösung (0,5 % (w/v) Blocking Reagenz der Firma BOEHRINGER MANNHEIM, 0,1 % Na-Laurylsarkosin, 0,02 % (w/v) SDS in 5-fach SSC (II.6.7.2)) ohne Sonde inkubiert. Anschließend wurden sie, in Plastikfolie eingeschweißt, in je 2,5 ml Hybridisierungslösung, der 30-50 ng frisch denaturierte DNA-Sonde zugesetzt worden war, über Nacht bei 68°C inkubiert. Zur Entfernung überschüssiger Sonde und instabiler Hybrid-DNA erfolgten anschließend 2 Waschschriffe bei Raumtemperatur (in je 50 ml 2-fach SSC, 0,1 % (w/v) SDS, 5 min.) und 2 Waschschriffe bei 68°C (in je 50 ml 0,1-fach SSC, 0,1 % SDS, 15 min.). Für die Nachweisreaktion wurden die Filter dann in Puffer I (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl pH 7,5) gewaschen und anschließend zur Abdeckung unspezifischer Valenzen 30 min. in Puffer II (0,5 % (w/v) Blocking Reagenz in Puffer I) inkubiert. Nach kurzem Waschen in Puffer I erfolgte die Bindung des Antikörperkonjugats während einer 30-minütigen Inkubation in je 20 ml verdünnter (150 mU/ml) Anti Digoxigenin-Alkalische Phosphatase-Konjugat Lösung. Ungebundenes Konjugat wurde durch zweimal 15-minütiges Waschen der Membranen in Puffer I entfernt. Nach Äquilibrierung der Filter in Puffer III (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂ pH 9,5) erfolgte die Bildung des Farbstoffniederschlags durch Inkubation in 10 ml Farblösung (45 µl NBT 75 mg/ml in Dimethylformamid, 35 µl X-Phosphat

50 mg/ml in Dimethylformamid in 10 ml Puffer III). Die Farbreaktion wurde durch Waschen in TE-Puffer beendet, sobald die positiven Kontrollen gefärbt waren (nach 2 h).

6.8. Agarose Gelelektrophorese

Zur Größen- und Restriktionsanalyse der DNA wurde diese auf Agarosegelen nach Anlegen einer Spannung ihrer Größe entsprechend getrennt. Herstellung der Gele und Durchführung der submersen Agarosegelelektrophorese erfolgten nach MANIATIS ET AL. (1982). Verwendung fanden Horizontalgelkammern der Firma GIBCO BRL (Modell H6: maximale Trennstrecke 7 cm und Modell H5: maximale Trennstrecke 10,5 cm) und Spannungsquellen (Typ Macrodrive) der Firma PHARTMACIA LKB, Freiburg. Die Agarosekonzentration der Gele betrug, der Größe der zu trennenden Fragmente entsprechend, zwischen 0,7 und 2 %, als Puffersystem diente dabei TBE (89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA pH 8,0). Nach Anfärbung der Gele in Ethidiumbromid-Lösung (0,5 µg/ml) und anschließender Entfärbung in Wasser, wurden die DNA Banden bei Betrachtung auf einem Transilluminator (WETTER GMBH, Typ Chroma 42), unter UV-Licht der Wellenlänge 366 nm rotfluoreszierend sichtbar. Dieses Bild konnte mit einer Polaroidkamera (Modell MP4) unter Verwendung eines Rotfilters photographisch festgehalten werden. Mit Hilfe eines Molekulargewichtsmarkers (z.B. lambda-DNA) konnte so eine Eichkurve erstellt werden.

6.9. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur präparativen Agarosegelelektrophorese wurde TA (40 mM Tris, 20 mM Na-Acetat, 2 mM EDTA pH 8,0) statt TBE als Puffer eingesetzt, da Borat-Ionen die Ligation von isolierten Fragmenten behindern (MANIATIS ET AL., 1982). Die Isolierung von DNA erfolgte sowohl direkt aus präparativen Gelen (MANIATIS ET AL., 1982) als auch mittels Glasmilch.

Restringierte DNA wurde auf einem präparativen Agarosegel getrennt und die DNA-Banden durch Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht. Hinter die zu isolierende Bande wurde eine Tasche in Breite und Länge der Bande mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Diese Tasche wurde nach Einspannen des Gels in die Elektrophoreseapparatur mit TA aufgefüllt und nach Anlegen der Spannung, was zu einem Einwandern der DNA in die Tasche führte, alle 30 s durch Absaugen mit einer Gilsonpipette geleert und anschließend erneut mit Puffer gefüllt. Dieser Vorgang wurde ca. 8 mal wiederholt, bis die Bande im Gel unter UV-Licht nicht mehr sichtbar war, also vollständig eluiert worden war. Das Eluat wurde mit Phenol/Chloroform/IAA und Chloroform/IAA extrahiert und die DNA anschließend durch LiCl/Ethanol Fällung gewonnen. Die Elektrophorese erfolgte während des Eluierens im Brückengelfverfahren (MANIATIS ET AL., 1982), wobei das Gel nicht mit Puffer überschichtet ist.

Bei der Isolierung von DNA-Fragmenten aus Gelstücken wurde die durch Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemachte DNA-Bande aus dem Gel ausgeschnitten in 3-fachem Volumen 6 M Natriumjodid Lösung (Endkonzentration ca. 4 M) aufgenommen und durch Schmelzen der Agarose bei 50°C aus dieser freigesetzt (VOGELSTEIN UND GILLESPIE, 1979). Nach Zugabe von 5 µl Glas-Milch (GENECLEAN Kit, DIANOVA GmbH Hamburg) und Inkubation der Suspension für 5 min. auf Eis wurde die DNA an die Silikamatrix gebunden. Dieser Komplex wurde in der Eppendorf Zentrifuge in 10 Sekunden sedimentiert, der Überstand abgezogen und verworfen und die an die Silikamatrix gebundene DNA 3 mal mit je 800 µl eines NaCl-Tris-EDTA-Puffers pH 7,0-8,0 in 96 %-igem Ethanol gewaschen. Das so gereinigte Sediment wurde in 5 µl Aqua bidest. aufgenommen. Durch Inkubation bei 50°C für 2 min. konnte die DNA von den Glasteilchen, die anschließend durch Zentrifugation sedimentiert wurden, eluiert werden. Der Elutionsvorgang wurde noch einmal wiederholt und die vereinigten Überstände (10 µl), die die DNA gelöst enthielten, konnten zur Ligation eingesetzt werden.

6.10. Photometrische DNA-Bestimmung

Die Konzentration von DNA Lösungen wurde durch photometrische Messungen bei 260 und 280 nm bestimmt. Dabei wurde in 1 ml UV-Küvetten von 1 cm Schichtdicke im Spektralphotometer der Firma SHIMADZU (Modell UV-160) gemessen. Bei einem Verhältnis der Extinktionen von 260 : 280 nm von 2 : 1 entsprach eine optische Dichte $OD_{260} = 1$ einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml (MANIATIS ET AL., 1982).

7. Plasmid-Stabilitätstest

Zur Überprüfung der Stabilität konstruierter, rekombinanter Plasmide in den transkonjuganten *Z.mobilis* Stämmen wurden diese über mehrere Generationen unter nicht-selektiven Bedingungen gezogen (AFENDRA UND DRAINAS, 1987). Durch paralleles Ausstreichen von Einzelkolonien auf feste Nährböden mit und ohne selektives Antibiotikum konnte anschließend die Anzahl der plasmidkodierten Resistenzen und damit der plasmidtragenden Kolonien bestimmt werden. Die Stämme wurden hierzu täglich 1:1000 in 100 ml Komplettnährmediumkulturen überimpft und nach jeweils 10 Generationen (die Anzahl der Generationen wurde aus der Differenz der OD_{600} am Anfang und am Ende ermittelt) auf Komplettnährmediumplatten aufgebracht. Die Kolonien dieser Platten wurden parallel auf Komplettnährmediumplatten mit und ohne Antibiotikum ausgestrichen. Der Anteil der Kolonien, der die plasmidcodierte Antibiotikaresistenz verloren hatte, konnte so ermittelt werden. Diese Prozedur wurde für jedes Plasmid über mindestens 60 Generationen durchgeführt. Aus resistenten Kolonien der letzten untersuchten Generation wurde dabei zusätzlich noch die Plasmid DNA präpariert und nach Spaltung mit Restriktionsenzymen und Trennung der Banden auf einem Agarosegel das Fragmentmuster mit dem ursprünglichen verglichen.

8. Transformationstechniken

8.1. Transformation von *E.coli*

Die Transformation von *E.coli* Stämmen wurde mit kompetenten Zellen, die nach einer Methode von HANAHAN (1983) mit Rubidiumchlorid hergestellt wurden, durchgeführt:

Dazu wurde eine Einzelkolonie des betreffenden Stammes in 1 ml LB- Medium resuspendiert und anschließend 50 ml Kulturmedium damit beimpft. Diese Kultur wurde unter Schütteln bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 inkubiert. Danach wurden die Zellen 15 min. auf Eis inkubiert, anschließend durch Zentrifugation (BECKMAN Kühltentrifuge, 10 min., 3500 rpm, 4°C) geerntet und dann in 16 ml RF1 Lösung resuspendiert, in der sie für 1 h auf Eis verblieben. Nach erneutem Abzentrifugieren wurde das Bakteriensediment in 4 ml RF2 Lösung resuspendiert und 15 min. auf Eis inkubiert. Die so erhaltenen kompetenten Zellen wurden portioniert und in Trockeneis/Ethanol schockgefroren. Bei -70°C gelagert, blieben die Zellen so über Wochen kompetent.

RF1 Lösung:	100 mM	RbCl
	50 mM	MnCl ₂ •4 H ₂ O
	30 mM	K-Acetat
	10 mM	CaCl ₂ •2 H ₂ O
	15 %	Glycerin

Die Lösung wurde mit 0,2 M Essigsäure auf pH 5,8 eingestellt.

RF2 Lösung:	10 mM	Morpholinopropansulfonsäure
	10 mM	RbCl
	75 mM	CaCl ₂ •2 H ₂ O
	15 %	Glycerin

Die Lösung wurde mit 5 M NaOH auf pH 6,8 eingestellt.

Zur Transformation wurde DNA in einem Volumen von höchstens 20 µl zu 200 µl kompetenten Zellen gegeben. Die Transformationsansätze wurden 30 - 60 min. auf Eis inkubiert und anschließend die Aufnahme der DNA durch einen 2-minütigen Hitzeschock bei 42°C gefördert. Nach Abkühlen der Ansätze auf Eis wurden die Zellen zur Expression der plasmidcodier-

ten Resistenzgene für 30 min. in 800 µl LB-Medium bei 37°C inkubiert und anschließend auf feste Nährböden mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert.

8.2. Filterkreuzung

Da *Z.mobilis* mit den beschriebenen Methoden (BROWNE ET AL., 1984; YANASE ET AL., 1986; SU UND GOODMAN, 1987) nicht transformierbar war, wurden Plasmide über Konjugation in die Stämme mobilisiert (AFENDRA UND DRAINAS, 1987).

Die *Z.mobilis*-Rezipientenstämme wurden dazu über Nacht in Kompletmedium angezogen und am nächsten Morgen zur Konjugation eingesetzt. Übernachtskulturen (LB-Medium mit entsprechenden Antibiotikazusätzen) der *E.coli* Donorstämme wurden mit einer OD₆₀₀ = 0,1 in frisches LB-Medium (mit Antibiotikum) überimpft und nach dem Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 eingesetzt. Donor- sowie Rezipientenstämme wurden 2 mal in Kompletmedium gewaschen und anschließend in einem entsprechenden Volumen aufgenommen, so daß die Zellsuspension eine Zellzahl von 10⁹/ml enthielt. Zur Konjugation wurden 2•10⁸ Donorzellen zu 10⁸ Rezipientenzellen gegeben, die Ansätze gemischt und anschließend auf Membranfilter (NL17 ø25 mm, Porengröße 0,45 µm, SCHLEICHER & SCHÜLL, Dassel), die zuvor auf Kompletmediumplatten gelegt worden waren, in einem Volumen von ca. 100 µl aufgetropft. Nach einer Inkubation von 4 h bei 30°C, wurden die Filter in Eppendorfreaktionsgefäße überführt und mit je 1 ml Kompletmedium abgeschwemmt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (EPPENDORF Zentrifuge, 13.000 rpm, 1 min., Raumtemperatur) sedimentiert, in 200 µl Kompletmedium resuspendiert und auf Kompletmediumplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Die Konjugationsplatten wurden anaerob für 2-10 Tage inkubiert und die Kolonien anschließend zur Unterscheidung zwischen *Z.mobilis*- und *E.coli*-Stämmen auf Kompletmedium mit Antibiotikum und parallel dazu auf MacConkey-Nährböden, auf denen *Z.mobilis* aufgrund der enthaltenen Gallensalze nicht wachsen kann, ausgestrichen.

9. Substrat- und Produktbestimmung

9.1. Enzymatische Glukosebestimmung

D-Glukose wurde enzymatisch mit Hexokinase und Glukose-6-Phosphatdehydrogenase nach einer Methode von BERGMEYER ET AL.(1974) bestimmt. Glukose wird dabei durch das Enzym Hexokinase in Anwesenheit von ATP zu Glukose-6-Phosphat phosphoryliert, welches durch das Enzym Glukose-6-Phosphatdehydrogenase in Anwesenheit von NADP zu Glukonat-6-Phosphat oxidiert wird. Die dabei entstehende NADPH-Menge kann aufgrund seiner Absorption bei 340 nm bestimmt werden und ist der Glukose-Menge äquivalent.

Testpuffer:	750 mM	Triäthanolamin-Hydrochlorid
	10 mM	MgSO ₄ •7 H ₂ O

Der Puffer wurde mit 5 M NaOH auf pH 7,6 eingestellt

ATP Lösung:	81 mM	ATP
	4 mM	NaHCO ₃

NADP Lösung:	12 mM	NADP
---------------------	-------	------

Enzym Suspension:	320 U	Hexokinase
	160 U	Glukose-6-P-Dehydrogenase

Reaktionsansatz:

0,05 ml Probe (bis ca. 90 µmol/l Glukose) wurden mit 0,5 ml Testpuffer, 0,05 ml ATP- und 0,05 ml NADP-Lösung gemischt. Das Volumen des Testansatzes wurde mit Aqua bidest. auf 1,5 ml aufgefüllt. Nach 3 min. wurde die Extinktion (E_1) bei 340 nm gemessen. Durch Zugabe von 0,01 ml Enzymsuspension wurde die Reaktion gestartet, die nach 15 min. abgelaufen war, worauf E_2 bestimmt werden konnte. Die Berechnung der Konzentration c erfolgte nach folgender Formel:

$$c \text{ in mM} = \frac{V}{\epsilon \cdot v \cdot d} \cdot (E_2 - E_1)$$

V = Testvolumen 1,51 ml; v = Probevolumen 0,05 ml; d = Schichtdicke 1 cm ; ϵ = Extinktionskoeffizient von NADPH bei 340 nm = 6,22 (cm² • μ mol⁻¹)

9.2. Enzymatische Laktatbestimmung

Die D- und L-Laktat Bestimmung erfolgte enzymatisch mit einer Test-Kombination der Firma BOEHRINGER MANNHEIM, die alle Puffer und Enzymsuspensionen enthielt nach einer Methode von NOLL (1974). Das Testprinzip beruht auf der Reduktion von NAD zu NADH bei der Umsetzung von D- und L-Laktat durch D- bzw. L-Laktatdehydrogenase zu Pyruvat. Da das Gleichgewicht dieser Reaktionen auf Seiten des Laktats liegt, wurde das Pyruvat durch eine nachgeschaltete Reaktion mit Glutamat-Pyruvat-Transaminase in Gegenwart von L-Glutamat dem Reaktionsansatz entzogen. Die Menge des gebildeten NADH ist der D- und L-Laktat-Menge äquivalent und kann bei 340 nm photometrisch bestimmt werden.

Reaktionsansatz:

0,05 ml Probe (bis 500 μ mol/l D- und L-Laktat), 0,5 ml Testpuffer (100 mM Glycylglycin, 100 mM Glutaminsäure), 0,01 ml NAD-Lösung (50 mM NAD), 0,45 ml Aqua bidest. und 0,02 ml Glutamat-Pyruvat-Transaminase Suspension (ca. 1700 U/ml) wurden zusammengegeben, gemischt und nach 5 min. die Extinktion E_1 bei 340 nm bestimmt. Die Reaktion wurde anschließend mit 0,01 ml D-Laktatdehydrogenase Lösung (5400 U/ml) gestartet und nach 20 min. die Extinktion E_2 bestimmt. Für die L-Laktat Bestimmung wurden 0,01 ml L-Laktatdehydrogenase Lösung (5400 U/ml) zugefügt und die Extinktion E_3 nach 20 min. bestimmt. Setzte man $E_2 - E_1$ in die oben angegebene Formel ein (II.9.1), so ergab sich die D-Laktatkonzentration. Für die L-Laktatkonzentration galt entsprechendes für $E_3 - E_2$.

9.3. Gaschromatographische Ethanol- und Acetatbestimmung

Ethanol und Acetat wurden mit einem Gaschromatographen der Firma HEWLETT PACKARD, USA Typ 5790 A mit Flammenionisationsdetektor (FID), automatischem Probengeber, Typ 7671 und Integrator Typ 3390 A quantitativ bestimmt (FINN ET AL., 1984)

Trennbedingungen:

Säule	: Porapack QS, 80-100 mesh (Firma WATERS ASSOCIATES INC., Milford, USA)
Säulentemperatur	: 117°C (isotherm)
Injektionstemperatur	: 250°C
FID-Temperatur	: 250°C
Trägergas	: Stickstoff (Firma LINDE) Durchflußrate: 30 ml/min.
Probevolumen	: 1 µl
Analysezeit	: 10 min.

9.4. Aminosäurebestimmung mittels HPLC

Die quantitative Bestimmung der von *Z.mobilis* gebildeten Aminosäuren erfolgte durch reversed-phase HPLC (JONES UND GILLIGAN, 1983). Hierzu wurde eine HPLC-Anlage der Firma HEWLETT PACKARD, HP 1090 mit angeschlossenen Rechner und Integrator verwendet. Vor Analysenbeginn erfolgte eine automatische Derivatisierung der Aminosäuren mit o-Phtalaldehyd. Dabei reagieren die primären Aminogruppen mit einem o-Phtalaldehyd/2-Mercaptoethanolgemisch unter Bildung von fluoreszierenden thio-substituierten Isoindolen. Die entstandenen unpolaren Aminosäurederivate wurden dann auf der HPLC-Säule getrennt.

Trennbedingungen:

Vorsäule	: MERCK Lichrosorb RP 18
Säule	: MERCK Lichrospher RP 18
Laufmittel	: A: 0,1 M Na-Acetat pH 7,2 : B: Methanol
Durchflußrate	: 0,35 ml/min., nach 1 min. 0,5 ml/min.
Temperatur	: 40°C
Druck	: max. 400 bar
Injektionsvolumen	: 21 µl (1 µl Probe, 20 µl Reagenz)
Detektor	: Fluoreszenzdetektor, Anregungswellenlänge 230 nm Emissionswellenlänge 450 nm
Laufzeit	: 14,5 min.

Die Berechnungen der Aminosäurekonzentrationen erfolgte über externe und interne (Ornithin) Standards durch Integration der aufgezeichneten Kurven.

9.5. L-Alaninbestimmung mit L-Alanindehydrogenase

Um den Anteil des L-Isomers an dem von transkonjuganten *Z.mobilis* Stämmen ausgeschiedenen Alanin zu bestimmen, wurde zunächst eine quantitative Analyse über HPLC durchgeführt und anschließend mit L-Alanindehydrogenase und D-Aminosäureoxidase die Menge an L- und D-Alanin ermittelt. Das Prinzip der Methode der L-Alaninbestimmung besteht darin, daß bei der Umsetzung des L-Alanins zu Pyruvat durch die L-Alanindehydrogenase im stöchiometrischen Verhältnis NADH gebildet wird, das photometrisch bei 340 nm quantifiziert werden kann. Das entstehende Pyruvat wurde dabei durch Hydrazinpuffer als Hydrazon der Reaktion entzogen und die entstehenden H^+ -Ionen durch den alkalischen pH abgefangen, so daß eine quantitative Umsetzung des L-Alanins erfolgte (Methode nach WILLIAMSON, 1985).

Reaktionsansatz:

0,5 ml Testpuffer, 0,1 ml NAD Lösung, 0,01 ml L-Alanindehydrogenase (5 mg/ml) und 0,34 ml Aqua bidest. wurden zusammengegeben und nach 3 min. Äquilibrierung die Extinktion (E_1) bei 340 nm und 37°C bestimmt. Durch Zugabe von 0,05 ml Probe wurde die Reaktion gestartet und nach ca 15 min. deren Extinktionsendwert E_2 abgelesen. Die Berechnung der Konzentration erfolgte wie in II.9.1. beschrieben.

Testpuffer :	30 mM	Tris
	1 mM	EDTA
	12 ml	24 %-iges Hydrazin pH 10
		/100ml Puffer
NAD Lösung :	15 mM	NAD

9.6. D-Alaninbestimmung mit D-Aminosäureoxidase

Das D-Isomer von Alanin wurde in einem enzymatischen Test mit D-Aminosäureoxidase bestimmt (GROEGER, 1986). D-Alanin wurde dabei durch D-Aminosäureoxidase mit Sauerstoff oxidativ zu Pyruvat, Ammoniak und Wasserstoffperoxid umgesetzt. In einer nachgeschalteten Reaktion wurde durch Peroxidase das entstandene Wasserstoffperoxid unter Oxidation von o-Dianisidin zum entsprechenden Chinimin zu 2 Mol Wasser reduziert. Nach einer Inkubationszeit von 20 min. wurde das gebildete Chinimin photometrisch bei 480 nm und 37°C gegen einen Reaktionsansatz ohne D-Alanin gemessen. Die Berechnung der Konzentrationen an D-Alanin in den Proben erfolgte nach einer zuvor mit einem D-Alaninstandard aufgestellten Eichgeraden (0,1-1 mM D-Alanin).

Reaktionsansatz:

2,00 ml	einer Lösung von 20 mg o-Dianisidindichlorid in 100 ml 0,1 M Tris-HCl pH 7,5, die zuvor 10 min. mit O ₂ begast worden ist
0,01 ml	Peroxidase (2500 U/ml)
0,10 ml	Probe (max. 0,1 µmol D-Alanin)
0,05 ml	D-Aminooxidase (ca. 5 U/ml)

10. Bestimmung von Enzymaktivitäten

Die Bestimmung von Enzymaktivitäten erfolgte sowohl quantitativ in Rohextrakten und permeabilisierten Zellen, als auch in Form von Plattentests.

Die spezifische Aktivität wird in U/mg Protein angegeben, wobei eine Enzymeinheit (U) 1 μ mol Produkt entspricht, das in einer Minute unter den angegebenen Bedingungen gebildet wurde.

10.1. Herstellung von Rohextrakten mittels Ultraschall

Für die Herstellung von Rohextrakten wurden jeweils 20 ml spätexponentielle *E.coli*- und *B.sphaericus*-Kultur bzw. 50 ml *Z.mobilis*-Kultur eingesetzt. Die Zellen wurden nach dem Ernten (BECKMAN Kühlzentrifuge J-21 , Rotor JA-20, 6000 rpm, 6 min., 4°C) in Testpuffer gewaschen und anschließend in 0,4 ml Testpuffer augenommen. Der Aufschluß erfolgte mit einem Ultraschall-Desintegrator (Sonifier B15 der Firma BRANSON SONIC POWER CO. Danburg, USA) mit einer stufenförmigen Beschallungsspitze bei maximaler Leistung (60 Watt). Die Beschallzeit im Dauerbetrieb unter Kühlung der Zellen im Eiswasserbad betrug für *E.coli* und *Z.mobilis* 30 s und für *B.sphaericus* 5 min., wobei die Beschallungsspitze alle 30 s gekühlt wurde. Die Zelltrümmer wurden anschließend durch Zentrifugation (SIGMA Kühlzentrifuge, 20 min., 13.000 rpm, 4°C) abgetrennt. Der Überstand (=Rohextrakt) wurde entweder bei -20°C eingefroren, oder direkt für die Enzymmessungen eingesetzt, wobei sich die ermittelten Aktivitäten nicht voneinander unterschieden.

10.2. Herstellung von permeabilisierten Zellen

Die Permeabilisierung von *Z.mobilis*-Zellen erfolgte nach einer Methode wie sie von OSMAN ET AL. (1987) beschrieben wurde: 1-2 ml Zellen einer Kultur wurden abzentrifugiert (EPPENDORF Zentrifuge, 13.000 rpm, 1 min.) zunächst in ent-

sprechendem, eiskaltem Testpuffer gewaschen und anschließend in 0,2 ml aufgenommen. Zum Aufschluß der Zellen wurden 0,01 ml Chloroform zugegeben und der Ansatz 15 s auf dem Laborschüttler (Vortex) stark geschüttelt. 0,8 ml eiskalter Testpuffer wurden zugesetzt und ein entsprechendes Aliquot sofort in den Enzymtest eingesetzt. Es zeigte sich, daß die Enzymaktivitäten von Alanindehydrogenase und Pyruvatdecarboxylase auch nach Einfrieren bei -20°C noch voll erhalten blieben.

10.3. Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration im Rohextrakt wurde nach der Methode von BRADFORD (1976) bestimmt.

Hierzu wurde 0.05 ml Rohextrakt in entsprechender Verdünnung (10-40 μg Protein/Testansatz) mit 2,5 ml Bradford Reagenz gut gemischt und nach einer Minute die Extinktion bei 578 nm gegen einen Reagenzleerwert ohne Protein gemessen. Die Proteinkonzentration der Proben wurde aus einer Eichgeraden mit Rinderserumalbumin (10-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ermittelt.

Bradford Reagenz:	100 ml	85 %-ige o-Phosphorsäure
	40 mg	Serva Blau G in
	50 ml	95 %-igem Ethanol gelöst
	ad 1000 ml	mit Aqua bidest.

10.4. Bestimmung der L-Alanindehydrogenase-Aktivität

Die Bestimmung der L-Alanindehydrogenase-Aktivität erfolgte wie die L-Alanin Messung nach der Methode von WILLIAMSON (1985). Der Extinktionsverlauf wurde bei 37°C und 340 nm verfolgt.

Reaktionsansatz:

0,5	ml	Testpuffer (30 mM Tris/1 mM EDTA/ 3 % Hydrazin pH 10)
0,1	ml	NAD-Lösung (15 mM)
0,35 - x	ml	Aqua bidest.
x	ml	Rohextrakt bzw. permeab. Zellen

Nach dem Äquilibrieren wurde durch Zugabe von

0,05 ml L-Alanin (100 mM) die Reaktion gestartet.

Die Berechnung der spezifischen Aktivität erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{spez. Akt. (U/mg)} = \frac{\Delta E/\text{min.} \cdot V \text{ (Gesamtvoll. Test/ml)}}{\epsilon \cdot \text{Protein (mg/ml)} \cdot v \text{ (Probenvoll./ml)}}$$

$$\epsilon = 6,22 \text{ (cm}^2 \cdot \mu\text{mol}^{-1}\text{)}$$

Zur schnellen Identifizierung von Klonen, die das *alaD*-Gen enthielten und exprimierten, wurde ein L-Alanindehydrogenase Aktivitätstest auf Platten nach RAETZ (1972) durchgeführt (siehe auch Abb.II.2.). In diesem Test wurden die bei der Umsetzung des L-Alanins zu Pyruvat auf NAD übertragenen Protonen durch ein Redoxsystem (Phenanzinmethosulfat) auf einen Tetrazoliumfarbstoff (Nitroblau Tetrazolium) übertragen, der so zum blauen Formazankomplex reduziert wurde. Rekombinante *E.coli*- bzw. *Z.mobilis*-Kolonien wurden dazu auf Nylonfilter (Biodyne A, Firma PALL, Dreieich) übertragen und anschließend in situ aufgeschlossen (Inkubation bei 37°C in 1,5 ml 10 mg/ml Lysozym, 10 mM EDTA). Durch Eintauchen der Filter in flüssigen Stickstoff (Firma LINDE) und rasches Auftauen wurde der Aufschluß vervollständigt. Eine anschließende Hitzebehandlung (30 min., 60°C) diente der Inaktivierung von Enzymen, die den Enzymtest stören könnten. Nach dem Trocknen (10 min., 70°C) wurden die Filter in 1,5 ml Reaktionslösung gebracht, in der sie für 10 min. bei 37°C verblieben. Kolonien, die L-

Alanindehydrogenase enthielten, färbten sich im Vergleich zur Negativkontrolle auf den Filterpapieren intensiv blau.

Reaktionslösung:

50	mM	L-Alanin
50	mM	Glycin-KCl-KOH Puffer pH 10,5
0,625	mM	NAD
0,064	mM	Phenanzine Methosulfat (PMS)
0,240	mM	Nitroblau Tetrazolium (NBT)

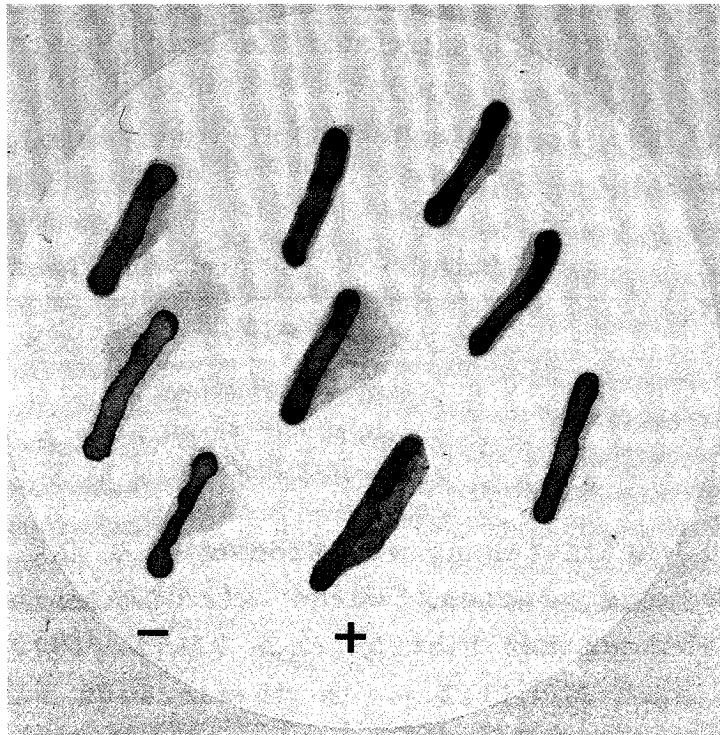


Abbildung II.2.: Ala-DH-Aktivitätsfärbung von Kolonien

+ : Kolonie mit *alaD*-Gen und Ala-DH-Aktivität
- : Kolonie ohne *alaD*-Gen und ohne Ala-DH-Aktivität

10.5. Bestimmung der Pyruvatdecarboxylase-Aktivität

Zur Bestimmung der Pyruvatdecarboxylase-Aktivität in Rohextrakten und permeabilisierten Zellen wurde ein gekoppelter optischer Test bei 30°C nach ULLRICH (1970) durchgeführt. Pyruvat wurde dabei durch die Pyruvatdecarboxylase zu Acetaldehyd und CO₂ umgesetzt. Nach Zugabe von Alkoholdehydrogenase (ADH) aus Hefe und NADH wurde Acetaldehyd unter Oxidation von NADH zu Ethanol umgesetzt. Die gebildete Menge

an NAD^+ ist Meßgröße und kann aufgrund der Absorption bei 340 nm gemessen werden. Die Pyruvatdecarboxylase-Aktivität kann aus dem Extinktionsverlauf nach der unter II.10.4 für die Messung der L-Alanindehydrogenase-Aktivität aufgeführten Formel berechnet werden.

Reaktionsansatz:

0,50 ml	Na-Pyruvat (34 mM in Testpuffer)
0,49 ml	NADH (0,36 mM in Testpuffer)
0,01 ml	ADH (ca. 90 U)

Nach Temperatur-Äquilibration wurde mit

0,025-0,10 ml Rohextrakt bzw. permeablen Zellen gestartet.

Testpuffer:	100 mM	Tri-Na-Citrat•2 H ₂ O
	20 mM	MgSO ₄ •7 H ₂ O
	1,5 mM	Thiaminpyrophosphat pH 5,5

Bei der Suche nach *pdc*-negativen Mutanten wurde ein Pyruvatdecarboxylase Plattentest nach CONWAY ET AL. (1987) durchgeführt. Durch die Pyruvatdecarboxylase gebildetes Acetaldehyd reagiert dabei in Anwesenheit von SO₂ mit basischem Fuchsin zur Schiffschen Base, einem intensiv hellrot gefärbten Produkt. Kolonien, die Pyruvatdecarboxylase bilden, färben sich hellrot, werden sie mit Agar überschichtet, der den entsprechenden Reaktionsansatz enthält, während *pdc*-negative Kolonien im Vergleich dazu ungefärbt bleiben (Abbildung II.3.).

Reaktionsansatz:

8 ml basisches Fuchsin in Aqua bidest. gelöst (2,5 mg/ml) wurden mit 100 mg Natriumbisulfit entfärbt. Diese Lösung wurde zu 400 ml Kompletmedium, das 0,8 % Agar gelöst enthielt, gegeben und durchmischt. Kompletmediumplatten mit mutagenisierten Kolonien, wurden mit diesem auf 40°C temperierten Agar überschichtet und über Nacht anaerob bei 30°C inkubiert. Am nächsten Morgen war die Färbung der Kolonien zu erkennen.

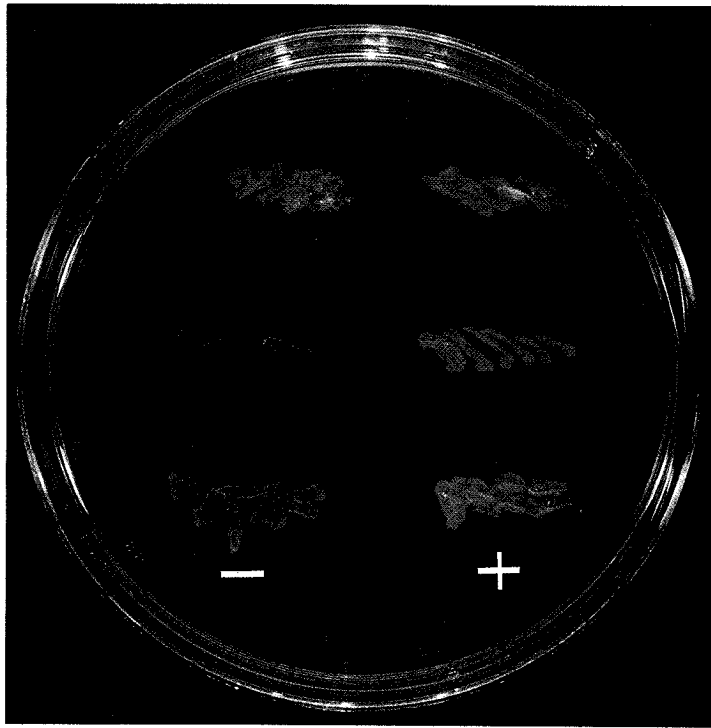


Abbildung II.3.: PDC-Aktivitätsfärbung von Kolonien

- + : *Z.mobilis* Kolonien mit PDC-Aktivität
- : *E.coli* Kolonien ohne PDC-Aktivität

11. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen

Um die von rekombinanten *Z.mobilis*-Stämmen gebildete L-Alanindehydrogenase mit der aus dem *Bacillus* Wildtyp bzw. der in rekombinanten *E.coli*-Stämmen gebildeten zu vergleichen und in Rohextrakten zu quantifizieren, wurden Proteine aus Rohextrakten verschiedener Stämme elektrophoretisch auf 7,5-12,5 %-igen Polyacrylamidgelen mit 0,1 % SDS (nach der Methode von LÄMMLI, 1970) getrennt und anschließend auf dem Gel eine Alanindehydrogenase Aktivitätsfärbung der Banden durchgeführt.

Für die Elektrophorese wurden 7,5-12,5 %-ige SDS-Polyacrylamid-Trenngele (0,1 % SDS) mit 5 %-igem Sammelgel der Größe 30 x 25 cm in 0,2 cm Dicke verwendet. Hitzebehandelte (30 min., 60°C) und unbehandelte Rohextrakte wurde in einer Proteinkonzentration von ca. 100 µg pro Spur und einer spe-

zifischen Alanindehydrogenase-Aktivität von 0,09-1,20 U pro Spur mit der Hälfte des Auftragsvolumens Probenpuffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8,0, 2,5 % SDS, 5 % β -Merkaptoethanol) gemischt und ohne Kochen auf das Gel aufgetragen. Als Laufpuffer diente Tris-Glycin (50 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS). Das Gel wurde mit 20 mA und 50 V gestartet und nach 17 h (20 mA, 250 V) der Lauf beendet.

Da die Alanindehydrogenase aus *B.sphaericus* im Gegensatz zu der aus *B.stearothermophilus* durch SDS in ihrer Aktivität um ca 50 % vermindert wurde, mußte das Gel vor dem Aktivitätstest zunächst in 50 mM Glycinpuffer pH 10,5 umäquili-briert werden. Anschließend wurde das Gel auf einer Glasplatte mit der Reaktionsmischung (50 mM Glycin Puffer pH 10,5, 50 mM L-Alanin, 1,5 mM NAD in 2 % gelöstem Agar) überschichtet. Unter UV-Licht waren nach 30 min. fluoreszierende Banden zu sehen, die mit der Polaroidkamera unter Verwendung eines Rotfilters fotografisch festgehalten wurden. Um die fluoreszierenden Banden später Proteinbanden zuordnen zu können, wurden diese mit einem Spatel durchstoßen und so markiert.

Zur Proteinfärbung wurde die inzwischen erhärtete Reaktionsmischung vorsichtig abgenommen und das Gel über Nacht in 0,1 % Coomassie Brilliant Blue, 7,5 % Essigsäure, 30 % Methanol unter leichtem Schütteln gefärbt. Zur Differenzierung der Proteinbanden wurde das Gel 24 h in 15 % Methanol, 7 % Essigsäure unter leichtem Schütteln entfärbt und nach Markierung der durchstoßenen Banden fotografiert.

12. Bestimmung interner Aminosäure- und Kaliumkonzentrationen mit Hilfe der Silikonölzentrifugation

Zur Bestimmung interner Aminosäurekonzentrationen wurden *Z.mobilis* Stämme in Alaninbildungsmedium kultiviert und zu bestimmten Zeitpunkten daraus Proben entnommen. Die schnelle Trennung der Zellen vom Kulturmedium erfolgte mittels Zentrifugation durch eine Silikonölschicht in 20 %-

ige Perchlorsäure, in der alle zellulären Prozesse sofort inaktiviert wurden (KLINGENBERG UND PFAFF, 1967).

12.1. Silikonölzentrifugation

In 400 µl BECKMAN-Reaktionsgefäße wurden 30 µl 20 %-ige Perchlorsäure und 65 µl Silikonöl (Dichte = 1,04 g/cm, Silikonöl PN 200 BAYER, Leverkusen) pipettiert und die beiden Phasen durch kurze Zentrifugation (EPPENDORF Microfuge E, max. Geschwindigkeit, 30 s) voneinander getrennt, so daß sich die Ölschicht über der Perchlorsäure befand. Auf drei dieser Röhrchen wurden zum jeweiligen Zeitpunkt der Probenentnahme je 200 µl Kultur gegeben. Durch 30 s Zentrifugation (siehe oben) wurden die Zellen durch die Ölschicht gerissen und in der Perchlorsäurephase sedimentiert. Zur Aufarbeitung der Zellen wurde die Perchlorsäurephase mit einem Skalpell von dem Rest des Reaktionsgefäßes abgetrennt und die Spitze des Röhrchens umgekehrt in ein 750 µl EPPENDORF Reaktionsgefäß überführt. Nach 2-minütiger Zentrifugation befanden sich Bakteriensediment und Perchlorsäure im Reaktionsgefäß, so daß die abgeschnittene Spitze entfernt werden konnte. Durch Zugabe von 10 µl Öl (Dichte = 1.07 g/cm³) wurde die Dichte des eventuell noch vorhandenen Öles und durch Zufügen von 45 µl Aqua bidest. das Volumen erhöht. Mit Hilfe eines Laborschüttlers (Vortex) wurde das Sediment zunächst resuspendiert und die Zellen anschließend durch 5-minütige Beschallung im Ultraschallbad homogenisiert. Zur Neutralisierung der Proben wurden diese mit 25 µl einer 5 M KOH/1 M Triäthanolamin-Lösung versetzt, was zum Ausfallen von Kaliumperchlorat in der Kälte (4°C) führte. Kaliumperchlorat, Zelltrümmer und Öl wurden anschließend durch Zentrifugation (EPPENDORF Zentrifuge, 13.000 rpm, 5 min.) vom Überstand getrennt. Um genügend Material für die Aminosäureanalyse zur Verfügung zu haben, wurden die Überstände dreier Röhrchen vereinigt (150 µl) und über reversed-phase HPLC (II.9.4.) die Aminosäurekonzentrationen bestimmt. Die internen Konzentrationen konnten durch Bezug der ermittelten Aminosäurekonzentrationen auf

das Cytoplasmavolumen errechnet werden.

12.2. Bestimmung des Cytoplasmavolumens

Das Volumen der Zellen wurde über die Verteilung der Isotope ^3H und ^{14}C in den Zellen und im Überstand bestimmt. Während $^3\text{H}_2\text{O}$ sofort in die Zellen eindringt, kann ^{14}C -Taurin die Cytoplasmamembran nicht passieren. Anhand der Differenz von Wasserraum und Taurinraum läßt sich so das Cytoplasmavolumen der Zellen errechnen (ROTTENBERG, 1979).

500 μl Kultursuspension wurden zu einer Mischung aus 5 μl $^3\text{H}_2\text{O}$ ($7,4 \cdot 10^4$ Bq), 5 μl ^{14}C -Taurin ($3,7 \cdot 10^4$ Bq) und 10 mM ^{12}C -Taurin gegeben, der ganze Ansatz gut durchmischt und 2 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Zur 5-fach Bestimmung wurden 5 mal je 100 μl entnommen und auf Silikonölröhrchen pipettiert. Nach Zentrifugation (BECKMAN Microfuge E, max. Geschwindigkeit, 30 s) wurden 20 μl des Überstandes für die Zählung der ^{14}C - und ^3H -Zerfälle entnommen, zunächst in 200 μl Aqua bidest. pipettiert und mit 4 ml Szintillationslösung (Instagel CANBERRA-PACKARD, Frankfurt) gemischt. Zur Aufarbeitung der Zellen wurden die Röhrchen wiederum in der Ölschicht durchschnitten und die Spizen in ein 1,5 ml Eppendorffreaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 750 μl Aqua bidest. wurde der Inhalt der Röhrchenspitze durch 2-minütige Zentrifugation in das Wasser entleert und das Zellsediment anschließend auf dem Laborschüttler resuspendiert. Nach 5 min. im Ultraschallbad waren die Zellen homogenisiert und die Zelltrümmer sowie Reste des Öls konnten durch 4-minütige Zentrifugation (BECKMAN Zentrifuge, 13.000 rpm, Raumtemperatur) abgetrennt werden. 650 μl des Überstandes wurden zur Bestimmung der radioaktiven Zerfälle im Sediment in 4 ml Szintillationslösung gegeben und in einem Flüssigkeits-Szintillations-Zähler (Rackbeta 1214, LKB) gezählt. Die Menge an ^{14}C -Taurin in den Sedimentproben ist ein Maß für den Anteil an Überstand, der durch die Ölschicht mithindurchgerissen wurde und mußte bei den Berechnungen berücksichtigt werden. Die Berechnung des Cytoplasmavolumens erfolgte folgendermaßen:

$$\text{Wasserraum : } \frac{\text{dpm } (^3\text{H}_2\text{O}_{\text{Sed}}) \cdot V_{\text{Sed}} \cdot ZV_{\text{Üst}}}{\text{dpm } (^3\text{H}_2\text{O}_{\text{Üst}}) \cdot ZV_{\text{Sed}}} \quad (\mu\text{l}/\text{Ansatz})$$

$$\text{Taurinraum : } \frac{\text{dpm } (^{14}\text{C}_{\text{Sed}}) \cdot V_{\text{Sed}} \cdot ZV_{\text{Üst}}}{\text{dpm } (^{14}\text{C}_{\text{Üst}}) \cdot ZV_{\text{Sed}}} \quad (\mu\text{l}/\text{Ansatz})$$

V_{Sed} : Volumen des aufgearbeiteten Sediments (750 μl)
 ZV_{Sed} : Zählvolumen des Sediments (650 μl)
 $V_{\text{Üst}}$: Volumen des eingesetzten Überstandes (100 μl)
 $ZV_{\text{Üst}}$: Zählvolumen des Überstandes (20 μl)
 dpm : radioaktive Zerfälle pro min

$\text{Cytoplasmavolumen} = \text{Wasserraum} - \text{Taurinraum} \quad (\mu\text{l}/\text{Ansatz})$
--

12.3. Bestimmung interner Kaliumkonzentrationen

Um eine Aussage treffen zu können, ob die Cytoplasmamembranen von *Z.mobilis*-Zellen in Alaninbildungsmedium noch intakt sind, wurde der Kaliumgradient der Zellen bestimmt. Die Messungen wurden mit radioaktivem $^{86}\text{Rubidium}$ durchgeführt, das die Zelle von Kalium nicht unterscheiden kann. *Z.mobilis*-Stämme wurden dazu in Alaninbildungsmedium und parallel dazu in Mineralsalzmedium pH 6,0 und Komplettnedium mit $1,5 \cdot 10^4$ Bq $^{86}\text{Rubidium}$ inkubiert. Zu entsprechenden Zeitpunkten wurden den Ansätzen Proben zur Silikonölzentrifugation und Cytoplasmavolumenbestimmung entnommen. Die Aufarbeitung der zur Ermittlung der internen Rubidiumkonzentrationen verwendeten Perchlorsäureextrakte erfolgte dabei wie die Aufarbeitung der Cytoplasmavolumenbestimmungen.

III. Ergebnisse

Zur Einführung des L-Alanindehydrogenasegens (*alaD*-Gen) in *Z.mobilis* war es zunächst nötig, einen geeigneten Expressionvektor, der das *alaD*-Gen stabil und in hohem Maße exprimiert, zu entwickeln.

1. Konstruktion von Vektoren für eine Expression des *alaD*-Gens in *Z.mobilis*

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war ein 12 kB großes Plasmid pICR 3, das das *alaD*-Gen aus *B.stearothermophilus* auf einem 8 kB großen chromosomalen Sal I-Fragment in der Sal I-Schnittstelle des Ampicillinresistenz-Gens von pBR 322 enthielt (INAGAKI ET AL., 1986). Zur Bestimmung der genauen Position des Gens auf diesem Plasmid und zur besseren Handhabung in weiteren Klonierungen wurde das *B.stearothermophilus*-Fragment durch Restriktionskartierung zunächst näher charakterisiert.

1.1. Restriktionskartierung des *alaD*-Gens aus *B.stearothermophilus* auf dem Plasmid pICR 3

Zur Bestimmung der Position des *alaD*-Gens auf dem Plasmid pICR 3 wurde Plasmid-DNA, die zuvor durch isopyknische Zentrifugation gereinigt worden war, mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen gespalten und die DNA-Fragmente anschließend zur Analyse auf Agarosegelen getrennt. In Abbildung III.1. ist exemplarisch ein solches Gel dargestellt. Die aus den Fragmentgrößen ermittelte Restriktionskarte von pICR 3 ist in Abbildung III.2. zusammengefaßt. Auf dem chromosomalen Fragment konnten keine Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen Bam HI, Bcl I, Kpn I und Sca I festgestellt werden.

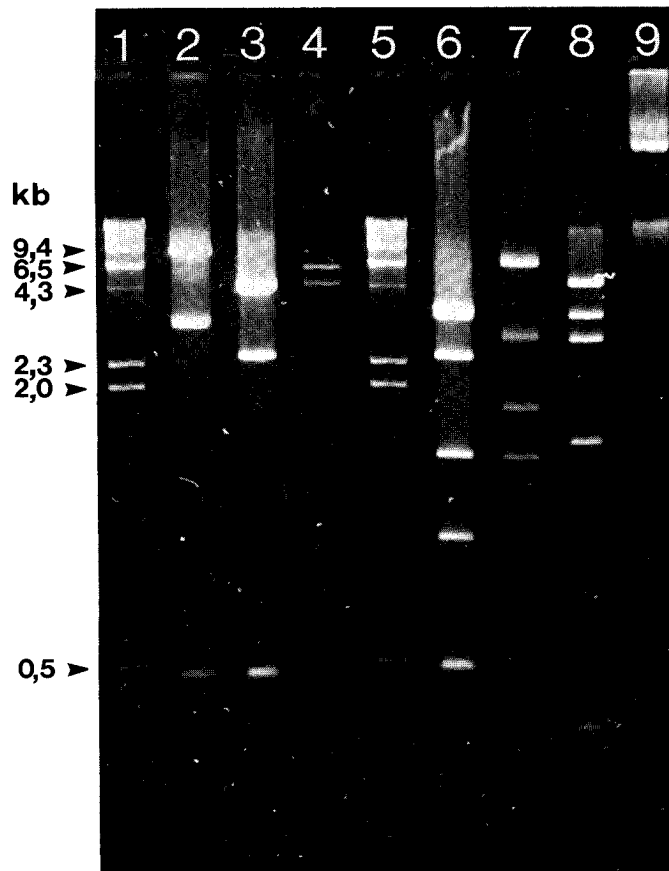


Abbildung III.1.: Agarosegel der Restriktionsanalyse von DNA des Plasmids pICR 3

Spur 1 und 5: Molekulargewichtsstandard λ -DNA Hind III gespalten; **Spur 2-8:** pICR 3 DNA gespalten mit den Restriktionsenzymen: **Spur 2:** Cla I; **Spur 3:** Cla I/Sph I; **Spur 4:** Hind III/Ssp I; **Spur 6:** Cla I/Nru I; **Spur 7:** Hind III/Eco RV; **Spur 8:** Pst I; **Spur 9:** pICR 3 unbehandelt

Durch Ala-DH-Aktivitätstests verschiedener *E. coli* Transformanden, die verkürzte Konstrukte von pICR 3 enthielten, wurde das Plasmid pICR 301 gewonnen, das durch Deletion des 4 kB Hind III-Fragmentes aus dem *B. stearothermophilus*-DNA Anteil hervorgegangen war (Abbildung III.3.). Nach weiteren Verkürzungen mit anschließendem Ala-DH Aktivitätstest konnte das *alaD*-Gen auf einem 1,4 kB Eco RV/Hind III Fragment lokalisiert werden.

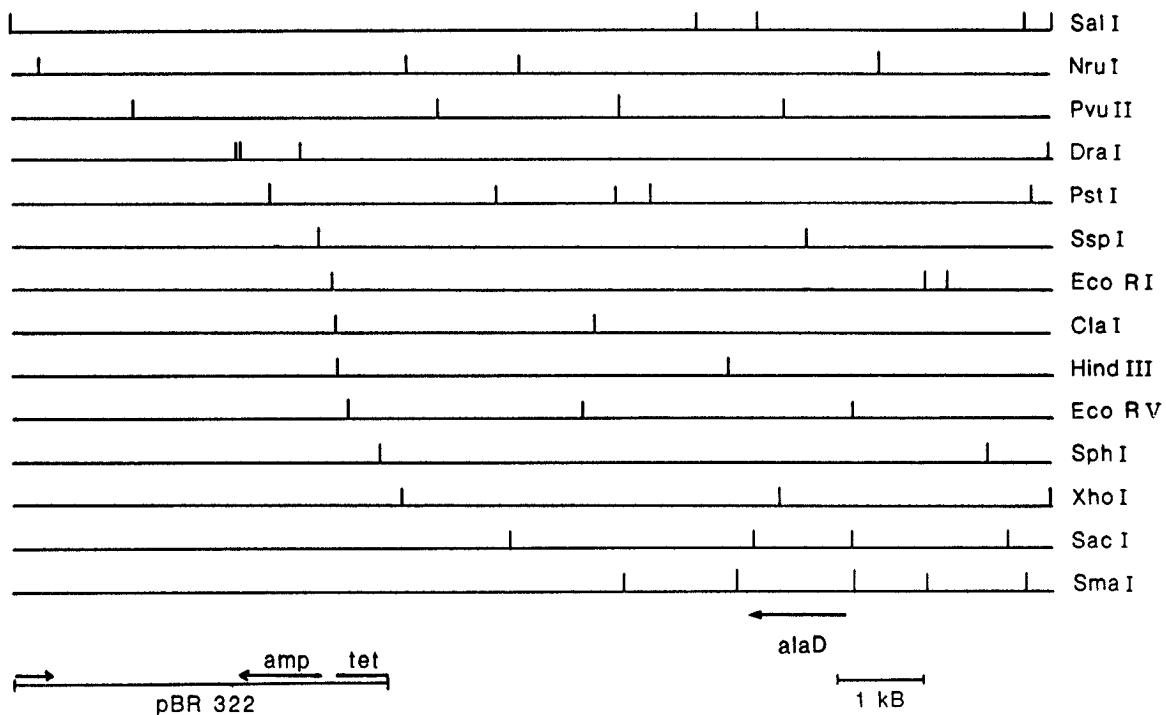


Abbildung III.2.: Restriktionskarte des Plasmids pICR 3

Neben den oben aufgeführten Restriktionsendonukleasen wurden die Enzyme Kpn I, Nco I, Bcl I, Bam HI und Sca I eingesetzt, die jedoch zu keiner Spaltung des *B.stearothermophilus* DNA-Fragmentes führten.

Da die Lage des *alaD*-Gens und geeignete Restriktions-schnittstellen zur Isolierung des Gens aus pICR 301 nun bekannt waren, konnte die Übertragung in einen geeigneten Vektor für *Z.mobilis* erfolgen, denn pICR 301 schied aus folgenden Gründen als Pendelvektor zur Einbringung des *alaD*-Gens in *Z.mobilis* aus: Der Vektor trägt nur noch ein Ampicillinresistenz-Gen, das in *Z.mobilis* nicht selektierbar ist, keine Mobilisationsfunktionen, ist aufgrund seines Replikationsursprungs *ori CoLE1* nicht stabil in *Z.mobilis* (CAREY ET AL, 1983) und besitzt keinen Promotor, der die Expression des *alaD*-Gens in *Z.mobilis* verstärken würde.

Im folgenden sind die Konstruktionen von geeigneten Vektoren für *Z.mobilis*, die die Expression des *alaD*-Gens bewirken, aufgeführt.

1.2. Expression des *alaD*-Gens aus *B.stearothermophilus* in *Z.mobilis*

Gene, die bislang in *Z.mobilis* eingebracht wurden, wurden häufig nur schwach bzw. überhaupt nicht durch den eigenen Promotor transkribiert (CAREY ET AL., 1983; GOODMAN ET AL., 1984; LEJEUNE ET AL., 1988; MISAWA ET AL., 1988). Um dies auszuschließen, wurde die Transkription des *alaD*-Gens unter die Kontrolle eines starken, *Zymomonas*-eigenen Promotors gebracht. Verwendet wurde dazu, der von REYNEN entwickelte Expressionspendelvektor pPTZ 1 (REYNEN, Dissertation 1988). Dieser Vektor enthält den konstitutiven Promotor des *pdc*-Gens vor einer Polyklonierstelle, der die starken Terminationssequenzen T1T2 des *rrnB* Gens aus *E.coli* (BROSIOUS UND HOLY, 1984) folgen. Die Selektion rekombinanter *Z.mobilis*-Klone erfolgt über eine Tetracyclinresistenz.

Da der Vektor pPTZ 1 in seiner Polyklonierstelle nur zwei singuläre Restriktionsschnittstellen besitzt, nämlich für Pst I und Kpn I bzw. für dessen Isoschizomer Asp 718, dessen 5'-überhängende Enden mit Klenow Polymerase und Nukleotiden aufgefüllt werden können, wurden die Pst I und die aufgefüllte Asp 718-Schnittstelle zur Klonierung verwendet. Das Plasmid pICR 301 wurde mit den Restriktionsendonukleasen Eco RV (Erzeugung glatter Enden) und Pst I gespalten und das 2,1 kB *alaD*-Fragment nach Trennung der DNA-Fragmente auf einem Agarosegel aus einer Geltasche isoliert. Die Ligation des Eco RV/Pst I-*alaD*-Fragmentes in pPTZ 1 erfolgte in Leserichtung des *pdc*-Promotors in die Asp 718/Pst I-Schnittstellen des Vektors (Abbildung III.3.). Die Asp 718-Schnittstelle war dabei zuvor zur Erzeugung glatter Enden mit Nukleotiden mittels Klenow Polymerase aufgefüllt worden.

Kompetente Zellen des *E.coli*-Stammes ED 8767 wurden mit dem Ligationsansatz transformiert und rekombinante Kolonien auf tetracyclinhaltigen Nährböden selektioniert. Aus 12 Transformanten wurde Plasmid-DNA präpariert und diese auf Vorhandensein des *alaD*-Fragmentes durch Restriktionsanalyse

untersucht. Ein Klon, der das gewünschte Plasmid pZY 53 enthielt, wurde dann als Donorstamm bei der Konjugation des Plasmids in den *Z.mobilis*-Stamm CUI-Rif2 eingesetzt. Da den pPTZ-Vektoren *tra*-Gene und damit die Informationen zur Ausbildung eines Konjugationsapparates fehlen, wurde als zusätzlicher Elternstamm noch der *E.coli*-Stamm ECG 18, der das sogenannte Helferplasmid pRK 2013 enthielt, eingesetzt. Während der Konjugation wurde dabei pRK 2013 zunächst nach ED 8767/pZY 53 übertragen und bewirkte in einem zweiten Schritt aufgrund seiner Tra-Funktionen die Mobilisierung von pZY 53 nach CUI-Rif2 (triparentale Kreuzung, nach SKOTNICKI ET AL., 1980). Transkonjuganden wurden auf tetracyclinhaltigen Komplett Nährböden, die zur Gegenselektion der *E.coli*-Elternstämme zusätzlich Rifamycin enthielten, selektioniert. Da nach 5-tägiger Inkubation die Anzahl spontanresistenter Kolonien auf Kontrollplatten, die nur den Rezipienten enthielten, annähernd so hoch war, wie auf den Kreuzungsplatten, konnten Transkonjuganden nur über Koloniehybridisierung, bei der linearisierter pZY 53 als Sonde eingesetzt wurde, nachgewiesen werden. Die Konjugationsfrequenz lag bei etwa $2 \cdot 10^{-8}$ Transkonjuganden pro Donorzelle. Es wurden unter ca. 500 Spontanresistenten 20 Transkonjuganden festgestellt.

Um zu überprüfen, ob das *alaD*-Gen in *Z.mobilis* exprimiert wird, wurde ein Ala-DH-Aktivitätstest mit den transkonjuganten Stämmen durchgeführt. Die Ala-DH-Aktivität in CUI-Rif2/pZY 53-Stämmen betrug 0,12-0,18 U/mg Protein und war damit höher als in dem *B.stearothermophilus* Wildstamm (siehe Tabelle III.1.). OHSHIMA ET AL. geben für *B.stearothermophilus* eine Aktivität von 0,04 U/mg Protein an (OHSHIMA ET AL., 1985), wobei beachtet werden muß, daß diese Messung bei 55°C erfolgte. Bei einem Vergleich der beiden Testbedingungen stellte sich heraus, daß die Messung bei 55°C zu 3-fach höheren Ala-DH Aktivitäten führten, als bei 37°C.

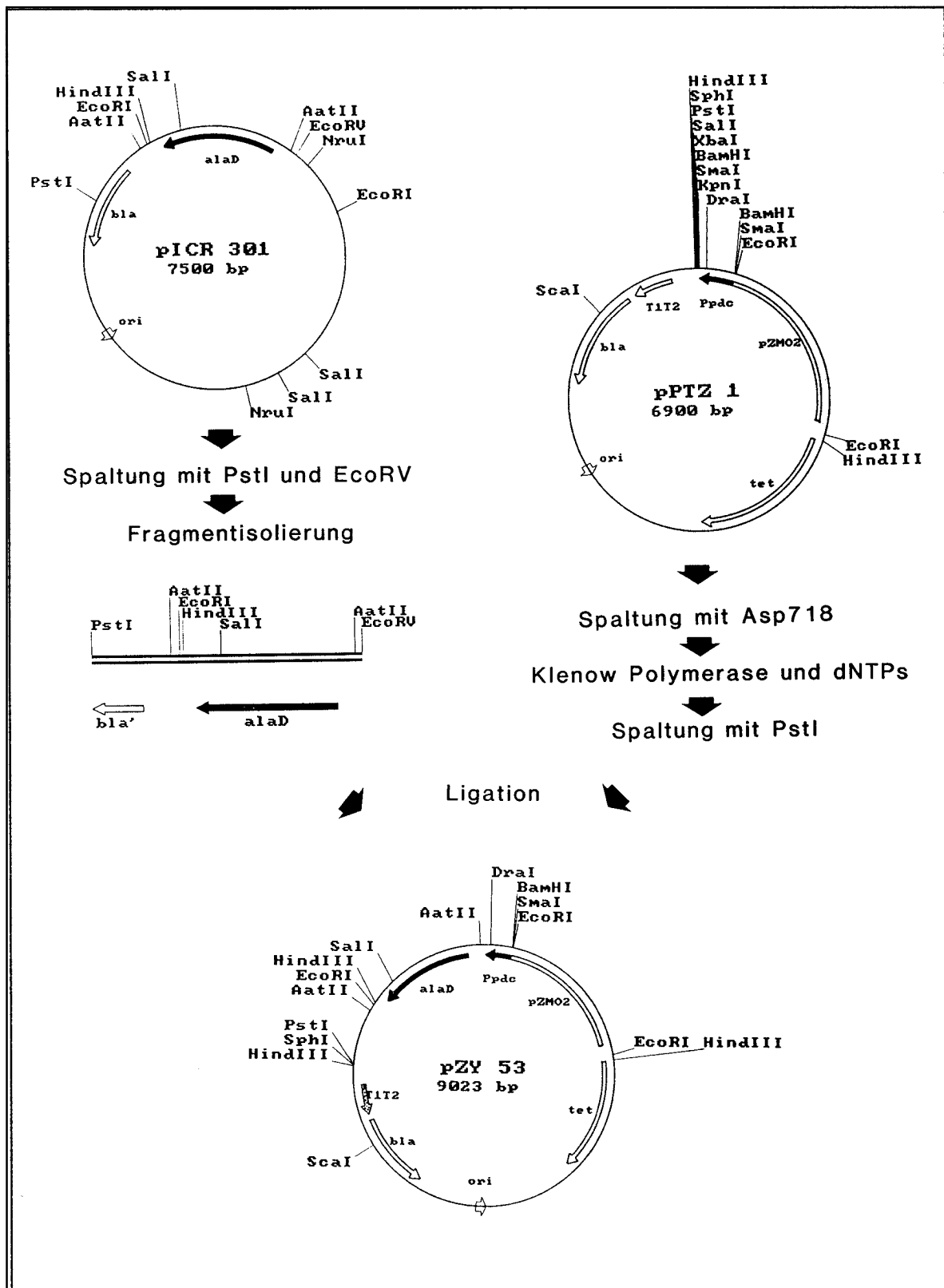


Abbildung III.3.: Konstruktion des Vektors PZY 53

In den Plasmiden sind nur die für weitere Klonierungen relevanten Restriktionsschnittstellen dargestellt. Abkürzungen sind dem Abkürzungsverzeichnis zu entnehmen

Um den Einfluß des *pdc*-Promotors auf die Expression des *alaD*-Gens und damit auf die Ala-DH-Aktivität in *Z.mobilis* nachzuweisen, wurde ein *alaD*-Fragment in einer entgegengesetzten Orientierung zur Leserichtung des *pdc*-Promotors in pPTZ 1 ligiert (pZY 54, Abbildung III.4.). Zur schnelleren Detektion von Transformanden, die das *alaD*-Gen in pPTZ 1 enthielten wurde das *alaD*-Gen zusammen mit einem Chloramphenicolresistenzgen *cat*-Gen auf einem Fragment in den Vektor ligiert. Transformanden konnten so direkt auf chloramphenicolhaltigen Nährböden erhalten werden. Aus Subklonierungen des *B.stearothermophilus*-Fragmentes aus pICR 301 existierte ein pBR 322-Derivat (pICR 301-E), das ein 2,3 kB Eco RI *alaD*-Fragment in seiner Eco RI-Schnittstelle enthielt. In die benachbarte Hind III-Schnittstelle wurde das *cat*-Gen aus pUC 18::Tn1725 (siehe III.2.1.) als 3,2 kB Hind III-Fragment ligiert (pICR 301-cat). Nach Spaltung mit dem Restriktionsenzym Nru I (Erzeugung glatter DNA-Enden) konnten das *alaD* und *cat*-Gen auf einem 5,6 kB Fragment zusammen isoliert und in die aufgefüllte Asp 718-Schnittstelle von pPTZ 1 ligiert werden. Die Konjugation nach CUI-Rif2 und die Selektion der Transkonjuganden erfolgte wie bei dem Vektor pZY 53.

Die Ala-DH Aktivität von CUI-Rif2/pZY 54-Stämmen betrug 0,015 U/mg Protein, also nur rund 10 % der Aktivität, die in CUI-Rif2/pZY 53-Zellen gemessen werden konnte. Damit konnte gezeigt werden, daß das *alaD*-Gen unter der Kontrolle des *Bacillus*-Promotors wesentlich schlechter in *Zymomonas* exprimiert wird.

Da die Sequenzen von *pdc*-Promotor (REYNEN UND SAHM, 1988) und *alaD*-Gen (KURODA ET AL., 1990) bekannt waren, wurde der in pZY 53 neu entstandene Übergangsbereich einer Computeranalyse im Hinblick auf die Bildung von Sekundärstrukturen unterzogen. Es zeigte sich dabei, daß der Promotorbereich in pZY 53 in zweierlei Hinsicht Mängel aufwies, die eine optimale Expression des *alaD*-Gens behinderten:

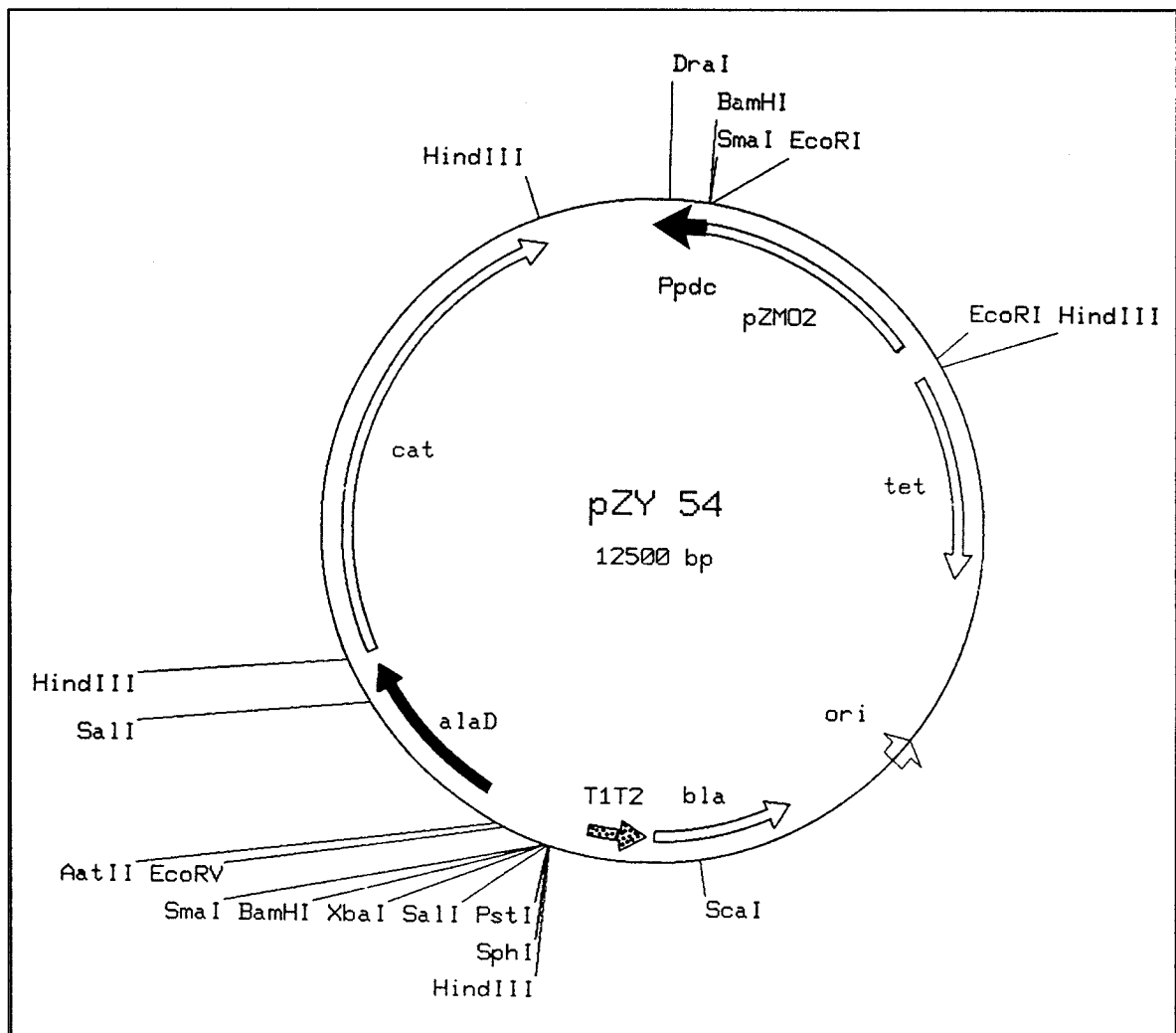


Abbildung III.4.: Vektor pZY 54
(Legende siehe Abbildung III.3)

- Erstens besitzt der Vektor pPTZ 1 sowohl das Startcodon ATG als auch noch 6 weitere Aminosäurecodons des *pdc*-Gens (REYNEN, Dissertation 1988). Da das *alaD*-Gen in pZY 53 in der multiplen Klonierstelle direkt hinter dem *pdc*-Promotor sitzt, kann es daher zusätzlich zur korrekten Ala-DH zur Bildung von Fusionsproteinen kommen, an deren Aminotermminus sich die erstens 6 Aminosäuren der PDC und 5 weitere Codons befinden (Abbildung III.5.). Solche Fusionsproteine können verstärkt dem Abbau von Proteinase in der Zelle unterliegen (HELLEBUST ET AL., 1989).

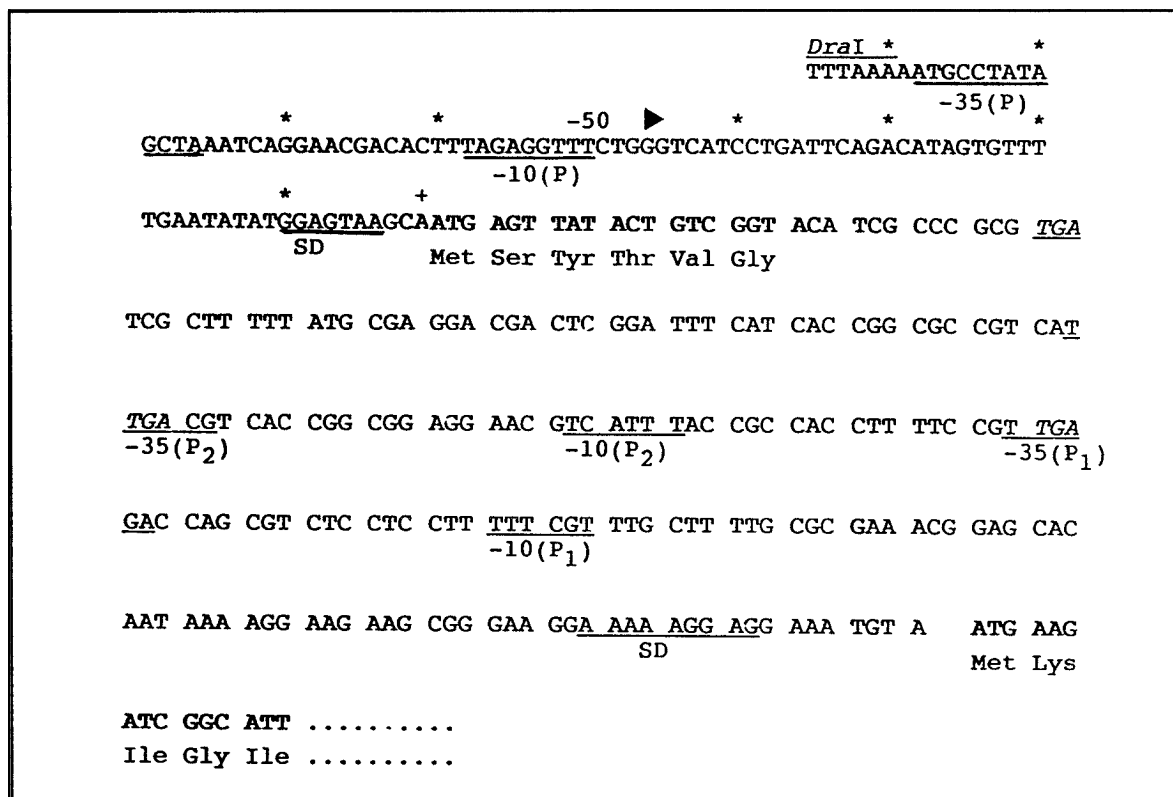


Abbildung III.5.: Ausschnitt aus der Nukleotidsequenz des Vektors pZY 53: Promotorbereich des *pdc*-Gens bis zum ATG des *alaD*-Gens

P1, P2 : mögliche Promotoren des *alaD*-Gens für *B.stearothermophilus*
 ▶ : Transkriptionsstart des *pdc*-Gens
 SD : Shine Dalgarno Sequenz des *alaD*-Gens

■ Zweitens befindet sich zwischen der Shine Dalgarno Sequenz des *pdc*-Promotors und dem ATG-Startcodon des *alaD*-Gens ein nicht codierender Bereich von 218 Basenpaaren, da die Konstruktion aufgrund des Fehlens geeigneter Schnittstellen nicht anders möglich war. Eine Computeranalyse der Sequenz (Auswertung nach TINOCO ET AL., 1973) dieses Bereichs ergab, daß sich zumindest an einer Stelle (Abbildung III.5.) eine haarnadelförmige Sekundärstruktur durch Basenpaarung komplementärer Nukleotide bilden kann (Abbildung III.6.). Solche Doppelstrangschleifen können als Terminatoren der Transkription wirken, dadurch daß sich die RNA-Polymerase an dieser Stelle von der DNA-Matrize löst (ROSENBERG UND COURT, 1979). Ein

Abbrechen der mRNA-Synthese noch vor dem Start des *alaD*-Gens führt natürlich dazu, daß das Gen von seinem eigenen *Bacillus*-Promotor abgelesen wird, der wie pZY 54 zeigt, nicht so gut wie der *pdc*-Promotor in *Z.mobilis* funktioniert.

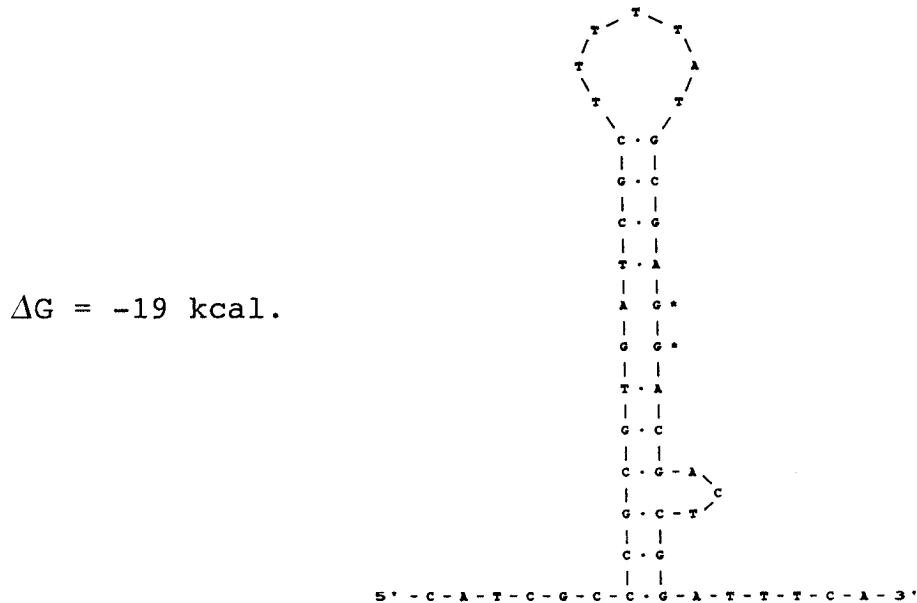


Abbildung III.6.: Mögliche Terminationsschleife im Promotorbereich von pZY 53

Zum Nachweis etwaiger PDC/Ala-DH Fusionsproteine wurden die Proteine zellfreier Extrakte von pZY 53-Stämmen über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) getrennt und die Ala-DH-Bande durch Aktivitätsfärbung über NADH-Fluoreszenz nachgewiesen. Sollten Fusionsproteine auftreten, so müßten entweder höhermolekulare Banden oberhalb der Ala-DH-Bande erscheinen oder, falls proteolytische Abbauprodukte existieren, Banden unterhalb der Ala-DH-Bande zu detektieren sein.

In Abbildung III.7. ist die Trennung von Proteinen aus pZY 53- und pZY 54-Rohextrakten dargestellt, wobei Banden, die nach Ala-DH-Aktivitätsfärbung unter UV-Licht fluoreszierten, durch Pfeile markiert sind. Transkonjugante Stämme des

Vektors pZY 54 dienten dabei als Kontrolle, da PDC-Ala-DH Fusionproteine aufgrund der Konstruktion in diesen Rohextrakten nicht auftreten. Das *alaD*-Gen wird auf diesem Plasmid nur von seinem eigenen Promotor abgelesen. Ein Größenvergleich mit Eichproteinen ergab eine Größe der aktiven Ala-DH Bande von ca. 240.000 Dalton, was dem aus 6 identischen Untereinheiten zusammengesetzten Ala-DH Holoenzym entspricht (KURODA, Diplomarbeit 1986). Die aktive Ala-DH Bande in CUI-Rif2/pZY 53-Zellextrakten war zudem stärker als in CUI-Rif2/pZY 54-Proben, was auf die 4-fach erhöhte *alaD*-Expression durch den *pdc*-Promotor zurückzuführen ist.

Neben der Hauptfluoreszenzbande in pZY 53-Extrakten trat noch ein schwächer fluoreszierender Bereich unterhalb dieser Bande auf, dessen Ende auf dem Foto ebenfalls durch einen Pfeil gekennzeichnet ist. Verantwortlich für diese breite Aktivitäts-Bande könnten proteolytische Abbauprodukte des Fusionsproteins PDC/Ala-DH sein, die noch Ala-DH-Aktivität zeigen, da in pZY 54-Extrakten diese Bandenverbreiterung nicht auftrat.

Die relativ geringe Ala-DH Aktivität sowohl in CUI-Rif2/pZY 53- wie auch in ED 8767/pZY 53-Stämmen ist direkt auf die Stärke der Expression des *alaD*-Gens und damit verbunden, der Bildung von Ala-DH zurückzuführen. Es werden somit nicht sehr hohe Mengen an inaktivem Protein gebildet, denn die Ala-DH Bande ist im Vergleich zu der anderer löslicher Proteine relativ schmal.

Aus diesen Ergebnissen wird ersichtlich, daß eine Steigerung der Ala-DH Aktivität durch Optimierung der *pdc-alaD*-Sequenz in Bezug auf die oben aufgeführten Mängel des Vektors pZY 53, zu erwarten ist. Daher wurde ein *alaD*-Expressionsvektor (pZY 62) konstruiert, bei dem die Bildung von Fusionsproteinen nicht mehr erfolgen konnte, und bei dem die mögliche Terminationssequenz zwischen *pdc*-Promotor und *alaD*-Translations-Initiations Codon ATG deletiert worden war.

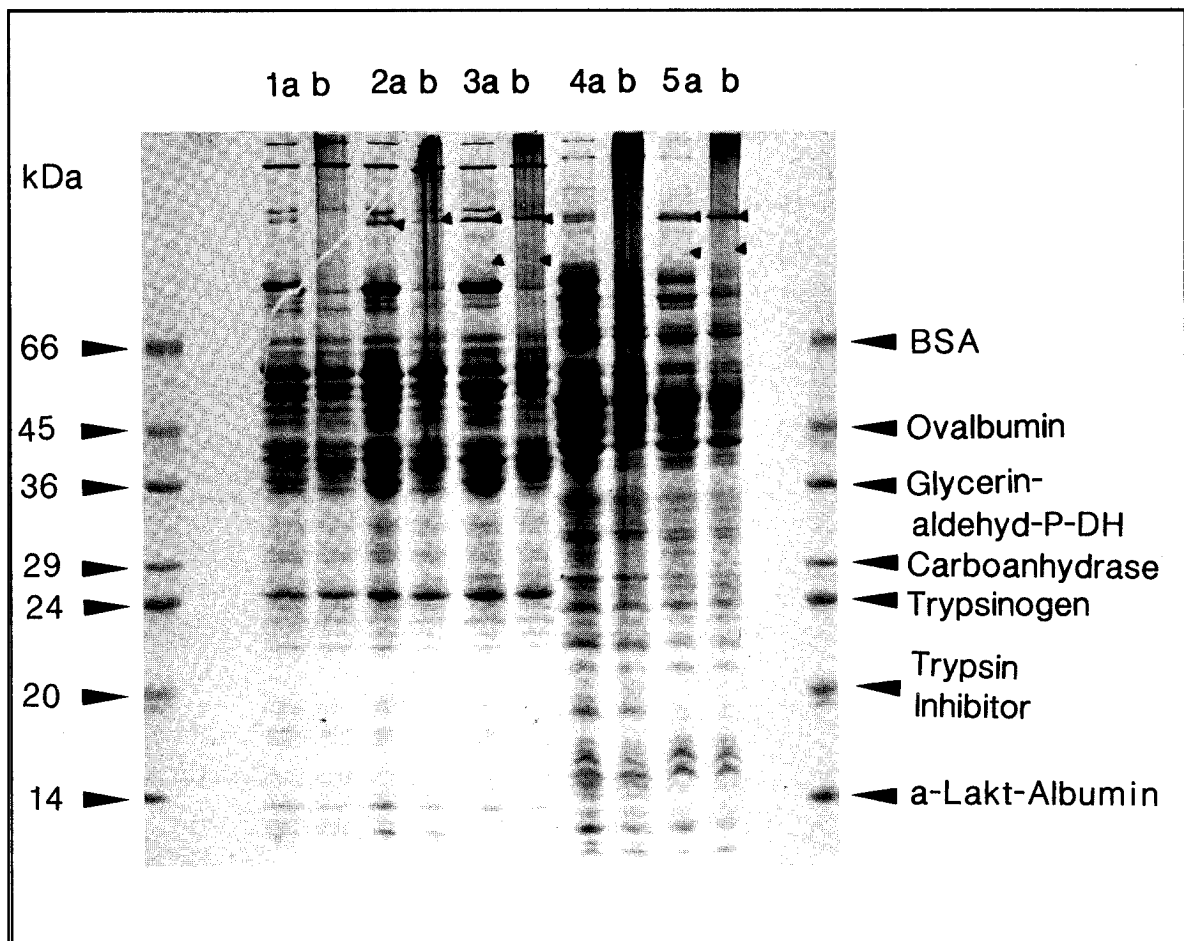


Abbildung III.7.: SDS-PAGE von Rohextrakten rekombinanter *E.coli* und *Z.mobilis* Stämme mit Ala-DH Aktivitätsfärbung

Spur 1: CU1-Rif2; Spur 2: CU1-Rif2/pZY 54; Spur 3: CU1-Rif2/pZY 53; Spur 4: ED 8767; Spur 5: ED 8767/pZY 53. a: unbehandelt; b: nach Hitzebehandlung 30 min. 60°C. Die Pfeile markieren fluoreszierende Banden im Ala-DH Aktivitätstest

Zur Verkleinerung des nichtcodierenden Bereichs zwischen *pdc*-Promotor und Translations-Initiations-Codon ATG des *B.stearothermophilus*-Gens wurde eine Exonuklease III (ExoIII)-Behandlung durchgeführt. Da in pZY 53 nicht die Möglichkeit bestand, die dafür nötigen Restriktionsspaltungen durchzuführen, mußte das *alaD*-Gen zunächst auf einen geeigneteren Vektor in eine multiple Klonierstelle gebracht werden. Dazu wurde das *alaD*-Gen zunächst als 3,4 kB großes Pst I/Hind III Fragment aus pICR 301 isoliert und in Pst I/Hind III linearisierten pUC 19 ligiert (pZY 60, Abbildung III.8.). Zur ExoIII-Reaktion wurde das Plasmid

mit Eco RV (Erzeugung glatter Enden) und Pst I (Erzeugung 3'-überhängender Enden) geöffnet und dann einer limitierten ExoIII- Nuklease Behandlung unterzogen. Die geeigneten Reaktionsbedingungen wie Enzymmenge und Inkubationszeiten waren dabei zuvor in Tests ermittelt worden. Ziel dieses Nukleaseabbaus war es, ca. 170 Nukleotide zu deletieren, d.h. gerade soviele, daß die Shine Dalgarno Sequenz und das Translations-Initiationscodon des *alaD*-Gens noch erhalten blieben (siehe Abbildung III.5.).

Nach der Verkürzung an der Eco RV-Schnittstelle wurden die verschiedenen Ansätze mit S1-Nuklease zur Erzeugung glatter Enden behandelt (Verlust der Pst I-Schnittstelle) und, um diese Reaktion noch zu vervollständigen, überstehende Enden mit Nukleotiden mittels Klenow Polymerase aufgefüllt. Die unterschiedlich verkürzten Plasmide konnten jetzt zur Ligation eingesetzt, anschließend in kompetente *E.coli*-Zellen des Stammes ED 8767 transformiert, und Transformanten auf ampicillinhaltigen LB-Nährböden selektioniert werden. Zur Detektion verkürzter Klone, wurden Plasmidpräparationen ampicillinresistenter Klone hergestellt und mit den Restriktionsenzymen Eco RI und Hind III behandelt. Die dabei entstehenden Fragmente wurden auf einem 1,2 %-igem Agarosegel getrennt und deren Größe bestimmt. Die optimale Fragmentgröße würde um die 1,3 kB betragen (*alaD*-Gen von der Shine Dalgarno Sequenz bis zur Hind III-Schnittstelle = 1,235 kB + 0,035 kB multiple Klonierstelle von pUC 19 bis zur Eco RI-Schnittstelle = 1,270 kB). Alle in Frage kommenden Klone wurden auf Alanindehydrogenase-Aktivität im Platten-test untersucht. Das kürzeste noch aktive Fragment (Vektor pZY 61, Abbildung III.8) war ca. 1,3 kB groß und wurde für weitere Klonierungen eingesetzt.

Um die Bildung von PDC-Fusionsproteinen zu verhindern, wurde der von REIPEN 1989 entwickelte Vektor pPTZ 4 (REIPEN, Diplomarbeit 1989) verwendet, bei dem das Translations-Initiations-Codon und die Shine Dalgarno Sequenz des *pdc*-Gens deletiert wurden. Dieses Plasmid wurde mit Kpn I/Bam HI linearisiert und die Bam HI-Schnittstelle mit

Nukleotiden mittels Klenow Polymerase aufgefüllt. Das *alaD*-Gen wurde als Kpn I/Hind III Fragment aus pZY 61 isoliert, die Hind III-Schnittstelle mit Nukleotiden mittels Klenow Polymerase aufgefüllt und das ganze Fragment in pPTZ 4 Kpn I/Bam HI aufgefüllt ligiert.

Das entstehende Konstrukt pZY 62 wurde durch triparentale Kreuzung nach *Z.mobilis* konjugiert (Konjugationsfrequenz = $5 \cdot 10^{-8}$ Transkonjuganden pro Donorzelle) und Transkonjuganden nach Koloniehybridisierung detektiert.

Die Enzymaktivität in CUI-Rif2/pZY 62 Stämmen betrug 0,27 U/mg Protein, konnte also durch Beseitigung des Transkriptionsterminators und durch Verhinderung der Bildung von Fusionsproteinen um 50 % gesteigert werden.

Mit der Konstruktion von pZY 62 waren praktisch alle Möglichkeiten zur Erhöhung der Ala-DH Aktivität mit dem *alaD*-Gen aus *B.stearothermophilus* ausgeschöpft, da auf genetischer Ebene an dem System mit dem zur Verfügung stehenden Vektor nichts mehr verbessert werden konnte. Es wurden daher Versuche mit dem *alaD*-Gen aus *B.sphaericus* unternommen.

1.3. Expression des *alaD*-Gens aus *B.sphaericus* in *Z.mobilis*

Die Klonierung und Sequenzierung des *alaD*-Gens aus *B.sphaericus* wurde von KURODA in seiner Diplomarbeit (KURODA, Diplomarbeit 1986) beschrieben. Da das Gen nicht zur Verfügung gestellt wurde, mußte es neu aus *B.sphaericus* kloniert werden. Zur Detektion des Gens aus einer Genbank wurde dabei eine Hybridisierung mit einem Oligonukleotid, das dem Anfangsbereich des *alaD*-Gens homolog war (Nukleotid 70-97 vom ATG aus , Sequenz siehe II.6.6.), durchgeführt.

Das Anlegen einer Genbank von *B.sphaericus* erfolgte zunächst durch Ligation großer chromosomaler Hind III-Fragmente in die Hind III-Schnittstelle des Cosmids pHG 79 (HOHN UND COLLINS, 1980). Zwar wurden genügend Klone

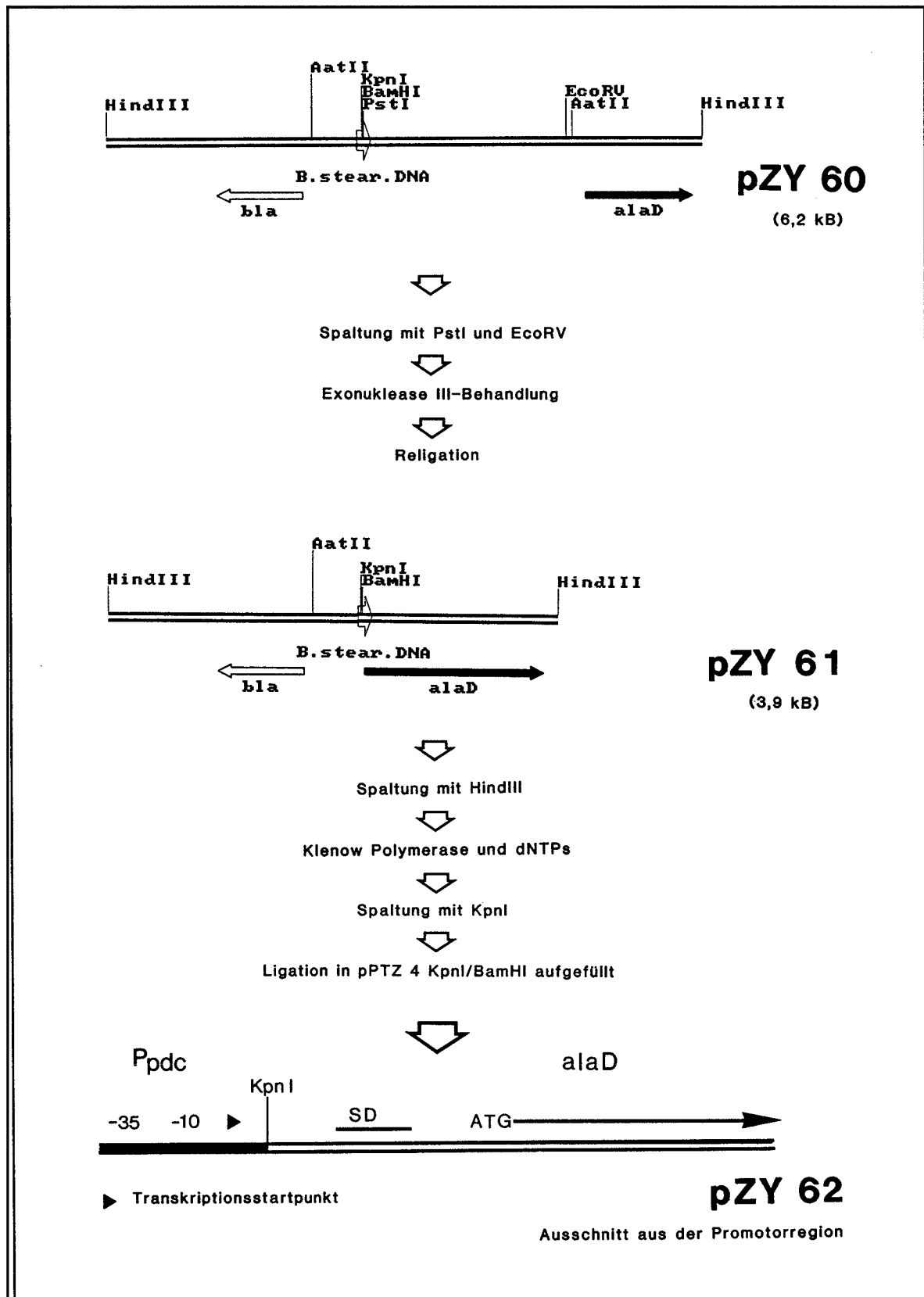


Abbildung III.8.: Konstruktion des Vektors pZY 62
(Legende siehe Abbildung III.3)

erhalten (ca. 2500), um das komplette Genom einmal abzudecken und die Größe der inserierten Fragmente betrug 30-35 kB, doch zeichneten sich die Klone durch hohe Instabilität aus. Nach einmaligem Übertragen der Kolonien auf frische LB-Nährböden betrug die Verlustrate 30 %. Verantwortlich für diese Instabilität ist unter Umständen der hohe AT-Gehalt der chromosomalen DNA von *B.sphaericus* (BRÄU, persönliche Mitteilung), der 73 mol % ausmacht (KURODA, Diplomarbeit 1986).

Im folgenden wurde daraufhin eine Plasmidgenbank in dem Vektor pUC 19 angelegt. Für die Hybridisierung mit Oligonukleotiden war es dabei entscheidend, daß dieses Plasmid in einer sehr hohen Kopienzahl in der *E.coli*-Zelle vorliegt (VIEIRA UND MESSING, 1982). Aus der Arbeit von KURODA (KURODA, Diplomarbeit 1986) war bekannt, daß sich das *alaD*-Gen im Chromosom auf einem 3,1 kB großen Eco RI/Hind III Fragment befindet. Zur Konstruktion der Genbank (siehe Abbildung III.9.) wurde chromosomale DNA aus dem mesophilen Stamm *B.sphaericus* isoliert, diese mit den Restriktionsenzymen Eco RI und Hind III vollständig gespalten und die DNA-Spaltprodukte anschließend auf einem 0,8 %-igen Agarosegel getrennt. Fragmente von 3,1 kB Größe wurden aus dem Gel aus einer Geltasche isoliert. Zur relativen Anreicherung der *alaD*-Fragmente wurde anschließend mit den Restriktionsenzymen Bam HI, Pst I und Sal I, von denen bekannt war, daß keines von ihnen im Bereich des *alaD*-Eco RI/Hind III Fragmentes schneidet (KURODA, Diplomarbeit 1986), nachbehandelt. Die Ligation erfolgte in Eco RI/Hind III linearisierten pUC 19 (pZY 70). Kompetente *E.coli* Zellen des Stammes ED 8767 wurden mit diesem Ansatz transformiert und Transformanten auf ampicillinhaltigen LB-Nährböden selektioniert (Abbildung III.9.). Durch die zuvor durchgeführte Anreicherungsprozedur reichten die so erhaltenen 900 Klone aus, um das *alaD*-Fragment zu isolieren. Zur Detektion des *alaD*-Gens wurde dabei die Methode des Hybridisierens mittels Oligonukleotid verwendet. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, daß das *alaD*-Gen aus *B.stearotherophilus* auch unter niedrigen Stringenzbedin-

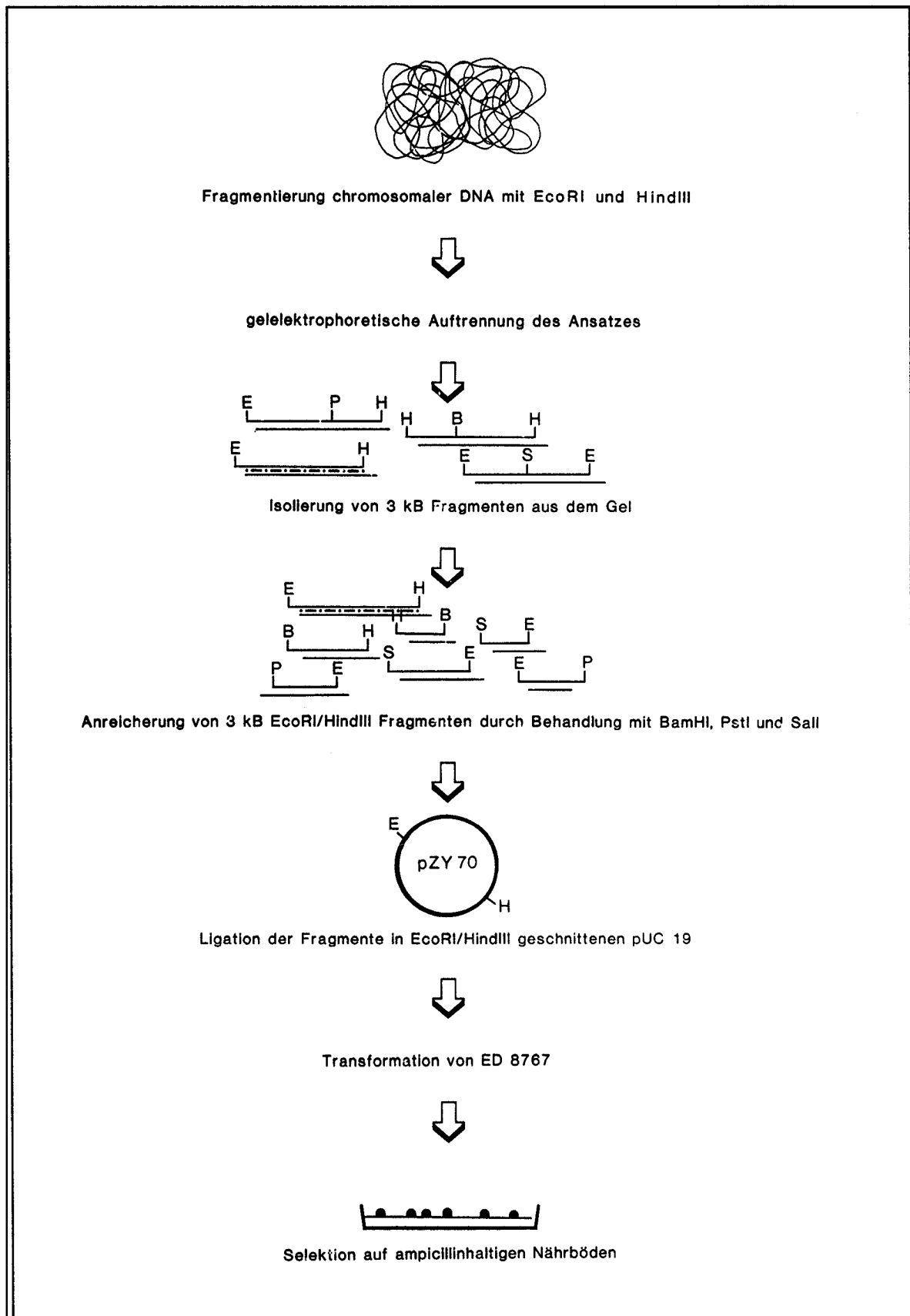


Abbildung III.9.: Schema der Klonierung des *a7aD*-Gens aus *B. sphaericus*

gungen nicht gegen chromosomale DNA von *B.sphaericus* hybridisierte, also nicht als Sonde eingesetzt werden konnte. Da die Sequenz des *B.sphaericus alaD*-Gens bekannt war (KURODA, Diplomarbeit 1986), wurde ein Oligonukleotid bestehend aus 27 Nukleotiden homolog zum Anfangsbereich des *alaD*-Gens synthetisiert (PHARMACIA LKB, Freiburg). Da der homologe Bereich zur Hybridisierung nur sehr klein war und die Sonde nur an einer Stelle zu markieren war, konnte die sonst angewandte Methode der nicht-radioaktiven Markierung hier nicht eingesetzt werden, sondern es mußte zur Erhöhung der Sensitivität mit radioaktiven gamma ATP endmarkiert werden. Eine Hybridisierung gegen ganze Kolonien konnte ebenfalls aus Sensitivitätsgründen nicht durchgeführt werden, da sich Zellmaterial störend auf die Anlagerung des Oligonukleotids an die Plasmid-DNA auswirkte (eigene Befunde).

Von den ca. 900 erhaltenen Klonen wurden daher 360 Kolonien zu 30 Gruppen à 12 Klone zusammengefaßt und die Plasmide dieser Gruppen präpariert. Diese 30 Plasmidpräparationen, die pro Ansatz ca. 500 ng DNA enthielten, wurden in einer "Dot blot"-Apparatur auf eine Nylonmembran übertragen und gegen das mit gamma ³²P-ATP markierte Oligonukleotid hybridisiert. Hybridisierungs- und Waschungsbedingungen wurden dabei zuvor durch Hybridisierung des Oligonukleotids gegen chromosomale DNA genau getestet. Die Exposition eines Röntgenfilms auf der Membran ergab nach einem Tag ein Signal. Die 12 Klone dieser positiven Gruppe wurden einzeln auf ihr Plasmidmuster hin überprüft und zwei Klone, die das richtige Fragmentmuster (Abbildung III.10) zeigten, im Ala-DH Enzymtest eingesetzt. Die spezifische Aktivität des ersten Klons betrug 0,91 U/mg Protein die des zweiten 0,70 U/mg Protein.

Damit stand fest, daß das *alaD*-Gen aus *B.sphaericus* kloniert worden war. Zur Expression in *Z.mobilis* und zum Vergleich mit dem Vektor pZY 62, der das *alaD*-Gen aus *B.stearothermophilus* enthält, wurde das Gen zunächst in den Expressionspendelvektor pPTZ 4 ligiert (pZY 72).

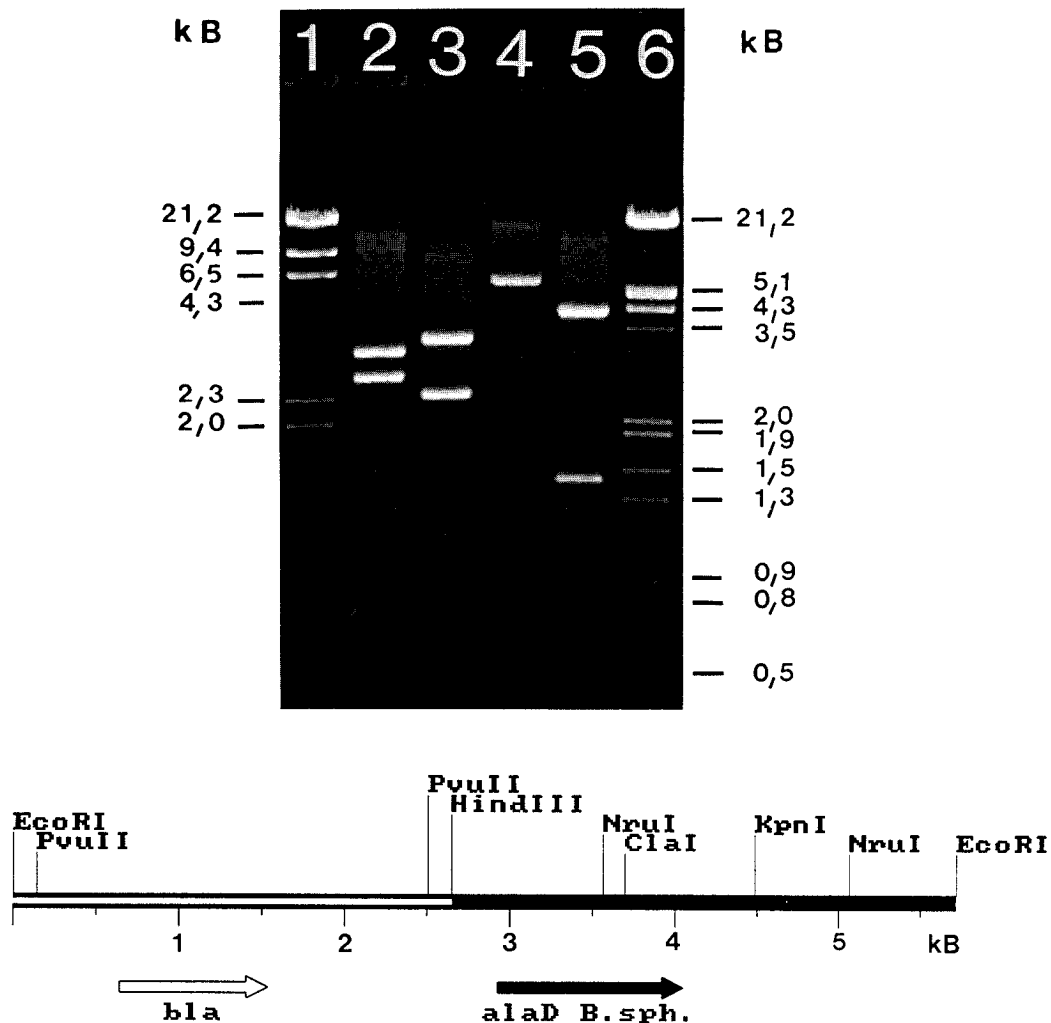


Abbildung III.10.: Restriktionskarte des Plasmids pZY 70

Spur 1: λ-Hind III; **Spur 6:** λ-EcoRI/Hind III; **Spur 2-5:** pZY 70 gespalten mit den Restriktionsenzymen: **Spur 2:** EcoRI/Hind III; **Spur 3:** PvuII; **Spur 4:** KpnI; **Spur 5:** NruI

Für weitere Klonierungen mit dem *alaD*-Gen mußten mehr Schnittstellen als auf dem Vektor pZY 70, in dem durch die EcoRI/HindIII Klonierung die Polyklonierstelle von pUC 19 deletiert worden war, zur Verfügung stehen. Das 3,1 kB *alaD*-EcoRI/HindIII Fragment wurde daher aus pZY 70 isoliert und zur Verringerung des Abstandes zum Translations-Initiations Codons des *alaD*-Gens, mit ExoIII an beiden Enden um ca. 0,1 kB verkürzt. Nach S1 Nuklease- und Klenow Polymerasebehandlung wurde das verkürzte Fragment nach geelektrophoretischer Trennung aus einem Agarosogel isoliert

und anschließend in die phosphatasebehandelte Sma I-Schnittstelle der multiplen Klonierstelle des Vektors pUC 19 ligiert (pZY 71). Geeignete Kpn I-Schnittstellen zur Ligation des *alaD*-Fragmentes hinter den *pdc*-Promotor in pPTZ 4 waren jetzt vorhanden. Nach Spaltung des Vektors pZY 71 mit Kpn I und gelelektrophoretischer Trennung der DNA-Fragmente wurde das 1,8 kB große Kpn I-*alaD*-Fragment daraufhin aus einem Agarosegel isoliert und in die Kpn I-Schnittstelle von pPTZ 4 ligiert (pZY 72, Abbildung III.11.). Kompetente Zellen des *E.coli* Stammes ED 8767 wurden mit dem Ligations-Ansatz transformiert und Transformanten auf LB-Nährböden mit Tetracyclin selektioniert. Nach Restriktionsanalyse der Plasmidpräparationen tetracyclinresistenter Kolonien wurde ein Klon, der das Plasmid pZY 72 enthielt ausgewählt und anschließend zur Konjugation mit CU1-Rif2 mittels Helferstamm ECG 18/pRK 2013 eingesetzt. Transkonjuganten wurden durch Filterhybridisierung detektiert und anschließend ihre Ala-DH-Aktivität bestimmt. Sie betrug in CU1-Rif2/pZY 72-Stämmen 0,32 U/mg Protein, war also um rund 20 % höher als die in CU1-Rif2/pZY 62-Stämmen gemessene (Tabelle III.1.).

Zur weiteren Optimierung der Alaninbildung durch *Zymomonas* wurde versucht, dieses durch Verwendung des Ethanolproduktionsstammes CP4 zu erreichen. Da pPTZ Vektoren nicht in diesen Stamm einzuführen sind, wurde ein Expressionvektor konstruiert, der den Promotor, die Polyklonierstelle und den Terminator aus pPTZ 4 enthielt, den Replikationsursprung und Mobilisationsfunktionen aber von dem Vektor mit weitem Wirtsbereich pSUP 104.

Die *Ppdc-alaD-T1T2* Sequenz aus pZY 72 wurde dazu als Eco RI/Sca I-Fragment aus einem Agarosegel isoliert. Dieses Fragment enthielt das *alaD*-Gen in der Polyklonierstelle von pPTZ 4 in Leserichtung des *pdc*-Promotors, gefolgt von den Terminatoren des *rrnB*-Gens. Zur Ligation in die Eco RI-Schnittstelle des Chloramphenicolgens von pSUP 104 wurden zunächst Eco RI-Linker an die glatten Enden der Sca I-Schnittstelle ligiert und diese anschließend zur Erzeugung

der Eco RI-Schnittstelle mit dem Restriktionsenzym Eco RI gespalten. Die gesamte *Ppdc-alaD-T1T2* Sequenz befand sich jetzt auf einem Eco RI-Fragment und konnte so in zwei Orientierungen in die Eco RI-Schnittstelle von pSUP 104 ligiert werden (pZY 73, Abbildung III.11., pZY 74 ohne Abbildung). Kompetente Zellen des *E.coli*-Mobilisationsstammes S17-1 wurden mit den resultierenden Konstrukten pZY 73 und pZY 74 transformiert und anschließend auf tetracyclinhaltigen LB-Nährböden ausplattiert. Transformanten wurden auf Chloramphenicolsensitivität getestet und das Plasmidmuster untersucht. Ein positiver Klon, der pZY 73 enthielt und eine besonders hohe Ala-DH-Aktivität zeigte, wurde als Donor in einer Konjugation mit CP4 als Rezipienten eingesetzt. Bereits nach zwei Tagen waren auf den Kreuzungsplatten Kolonien zu sehen (im Vergleich dazu wuchsen in Kreuzungen mit pPTZ Vektoren und CU1-Rif2 als Donor Kolonien erst nach fünf Tagen), von denen 12 exemplarisch auf Vorhandensein des richtigen Plasmids durch Retransformation der Plasmidpräparation nach *E.coli* und anschließender Restriktionsanalyse des Plasmids untersucht wurden. Alle CP4 Transkonjuganden enthielten pZY 73, es traten im Gegensatz zu Kreuzungen mit CU1-Rif2/pPTZ auch keine spontan resistenten Kolonien auf, sondern es konnte direkt auf Antibiotika-haltigen Nährböden selektiert werden. Die Konjugationsfrequenz betrug 10^{-5} Transformanten/Donor und war damit um den Faktor 1000 höher als in Kreuzungen mit CU1-Rif2/pPTZ.

Die Ala-DH-Aktivität in CP4/pZY 73-Stämmen betrug annähernd 1 U/mg Protein, die in S17-1/pZY 73 11 U/mg Protein (Tabelle III.1).

Die Transkonjuganden wurden anschließend einem Plasmidstabilitätstest unterzogen. Dabei konnte gezeigt werden, daß pZY 73 nach 60 Generationen Wachstum ohne Selektionsdruck noch in 100 % der Kolonien vorhanden war.

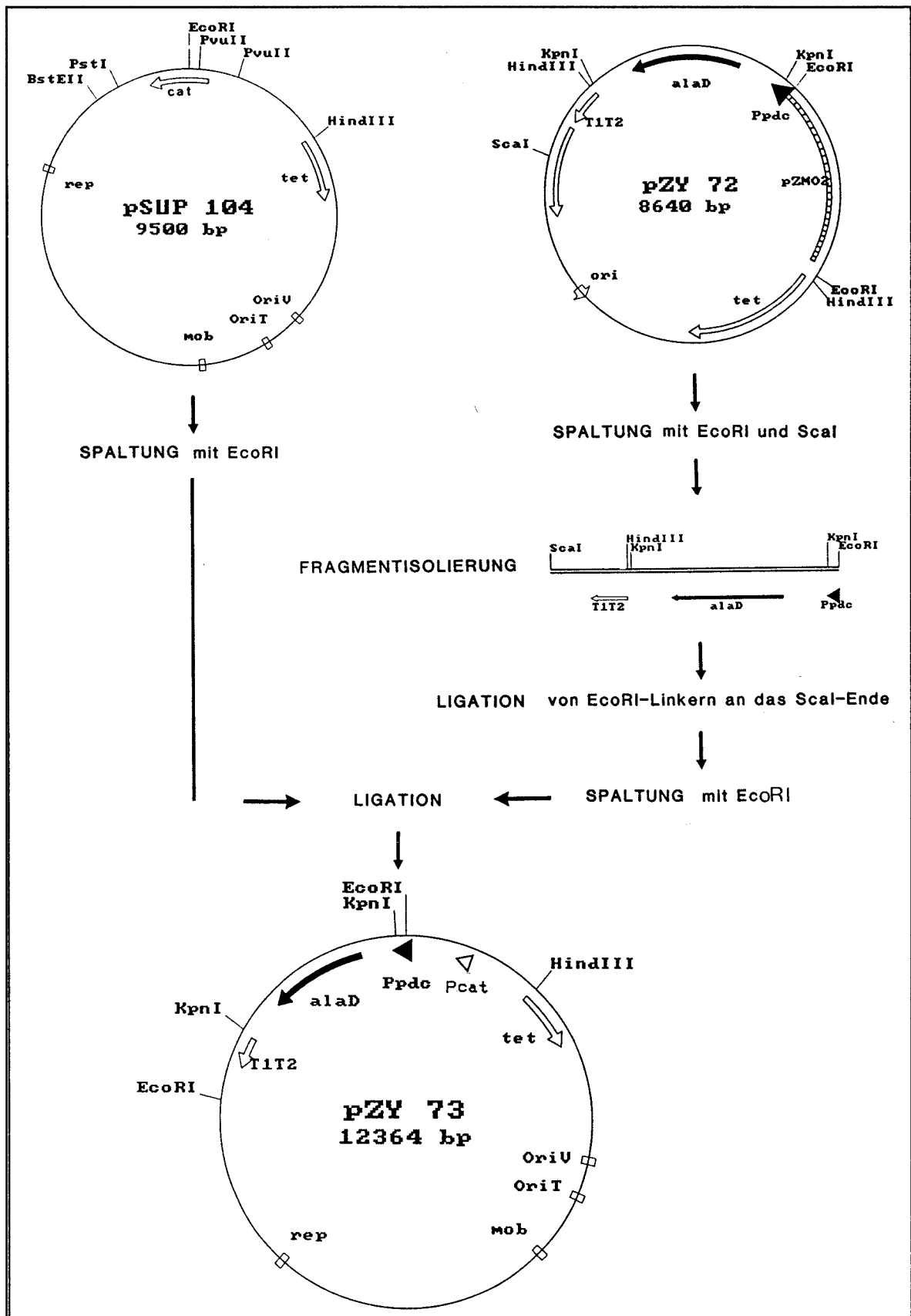


Abbildung III.11.: Konstruktion des Vektors pZY 73
(Legende siehe Abbildung III.3)

Eine Plasmidrestriktionsanalyse von pZY 73 aus retransformierten S17-1 Zellen ergab ferner, daß das Plasmid nach 60 Generationen nicht verändert war.

Aus diesen Experimenten geht hervor, daß der Vektor pZY 73 hervorragend als Expressionspendelvektor für *Z.mobilis* geeignet ist. Durch Isolierung des Kpn I-*alaD*-Fragmentes kann das *alaD*-Gen entfernt werden und jedes beliebige Gen in die Polyklonierstelle, die der aus pPTZ 4 entspricht, ligiert werden.

In Tabelle III.1. sind alle konstruierten Vektoren und die Ala-DH Aktivitäten in den entsprechenden Transkonjuganden bzw. Transformanden aufgeführt. Verglichen mit den Enzymaktivitäten in den jeweiligen Bakterienstämmen, aus denen die Gene isoliert wurden, wurden die *alaD*-Gene in *Zymomonas*, wenn sie der Transkriptionskontrolle des *pdc*-Promotors unterlagen, überexprimiert. Transformanden mit den Vektoren pZY 53, 54, 62 und 72 von *E.coli* zeigten durchweg eine niedrigere Ala-DH-Aktivität als die entsprechenden *Z.mobilis* Transkonjuganden, da der eigentliche *pdc*-Promotor in *E.coli* nicht erkannt wird (eigene Ergebnisse; INGRAM UND CONWAY, 1988; REYNEN, Dissertation 1988; REIPEN, Diplomarbeit 1989), sondern andere Sequenzen in diesem Bereich als Promotor fungieren.

Stamm	Plasmid	spez. Aktivität U/mg Prot.	Anmerkung zum Plasmid
<i>B. stearothermophilus</i> *	-	0,04	Wildtyp <i>alaD</i> st
<i>B. sphaericus</i>	-	0,83	Wildtyp <i>alaD</i> sp
<i>E. coli</i>			
ED 8767	-	≤0,01	
MK 5013	pICR 301	0,70	pBR 322 <i>alaD</i> st
ED 8767	pZY 53	0,09	pPTZ 1 <i>alaD</i> st *1
ED 8767	pZY 54	0,05	pPTZ 1 <i>alaD</i> st *2
ED 8767	pZY 62	0,02	pPTZ 4 <i>alaD</i> st
ED 8767	pZY 70	0,90	pUC 19 <i>alaD</i> sp
ED 8767	pZY 72	0,04	pPTZ 4 <i>alaD</i> sp
ED 8767	pZY 73	11,20	pSUP 104 <i>Ppdc-alaD</i> sp-T1T2 *3
ED 8767	pZY 74	0,11	pSUP 104 <i>Ppdc-alaD</i> sp-T1T2 *4
<i>Z. mobilis</i>			
CU1-Rif2	-	≤0,01	
CU1-Rif2	pZY 53	0,18	s.o. wie <i>E. coli</i>
CU1-Rif2	pZY 54	0,02	s.o. wie <i>E. coli</i>
CU1-Rif2	pZY 62	0,27	s.o. wie <i>E. coli</i>
CU1-Rif2	pZY 72	0,30	s.o. wie <i>E. coli</i>
CP4	-	≤0,01	
CP4	pZY 73	0,99	s.o. wie <i>E. coli</i>

Tabelle III.1.: Alanindehydrogenase-Aktivitäten in Rohextrakten verschiedener Bakterienstämme

- * : nach Ohshima et al., 1985 bei 50°C gemessen
 *1 : *alaD*-Gen in Leserichtung des *pdc*-Promotors
 *2 : *alaD*-Gen in entgegengesetzter Orientierung zur Leserichtung des *pdc*-Promotors
 *3 : in Leserichtung des *cat*-Promotors
 *4 : der Leserichtung des *cat*-Promotors entgegengesetzt
alaD st = *alaD*-Gen aus *B. stearothermophilus*
alaD sp = *alaD*-Gen aus *B. sphaericus*
Ppdc = Promotor des *pdc*-Gens

Um zu untersuchen, ob die hohe Ala-DH Aktivität in pZY 73-Stämmen in einer erhöhten Ala-DH Proteinmenge resultiert, wurden Proteine zellfreier Extrakte von transkonjuganten Kulturen im Vergleich zum *B.sphaericus* Wildtyp über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese getrennt.

Abbildung III.12a. zeigt die Proteinbanden von pZY 73-Rohextrakten nach Coomassie-Färbung des Gels. Die unteren Pfeile markieren dabei die Ala-DH Bande, die oberen eine unspezifische Aktivität, die auch bei Behandlung mit Reaktionsmischung ohne das Substrat Alanin (II.11.) auftrat. In Abbildung III.12b. ist dasselbe Gel vor der Coomassie-Färbung im Ala-DH Aktivitätstest zu sehen. Nach Überschichtung des Gels mit Alanin und NAD^+ fluoreszieren Banden, die aktive Ala-DH enthalten, durch die Bildung von NADH.

Auffällig ist, daß die Ala-DH aus *B.sphaericus* im Gegensatz zu der Ala-DH aus *B.stearothermophilus* (Abbildung III.7) in Anwesenheit von 0,1 % SDS bereits in ihre Untereinheiten von 38.000 Dalton dissoziiert, die im Gel allerdings noch zu einem aktiven Komplex aggregieren können.

Aus der Gesamtaktivität der gereinigten Ala-DH läßt sich nach Ermittlung der Ala-DH Aktivität in den Rohextrakten unter identischen Bedingungen der Anteil der Ala-DH am Zellextrakt berechnen. In S17-1/pZY 73-Zellen macht die Ala-DH 7 % des Zellextraktes aus, dementsprechend prominent ist die Ala-DH-Bande in den Rohextrakten. In CP4 liegt der Anteil nur bei 0,6 %, außerdem existiert ein ähnlich hitzestabiles 38.000 Dalton Protein, so daß die Ala-DH-Bande ohne Aktivitätsfärbung nicht zu erkennen wäre. In rekombinanten *E.coli*- und *Z.mobilis*-Stämmen scheint, zumindest was die Größe und Hitzestabilität des Proteins betrifft, eine Ala-DH produziert zu werden, die sich von derjenigen aus *B.sphaericus* nicht unterscheidet. Aus der Dicke der jeweiligen Ala-DH-Bande wird ferner ersichtlich, daß Quantität und Aktivität des Enzyms miteinander korrelieren.

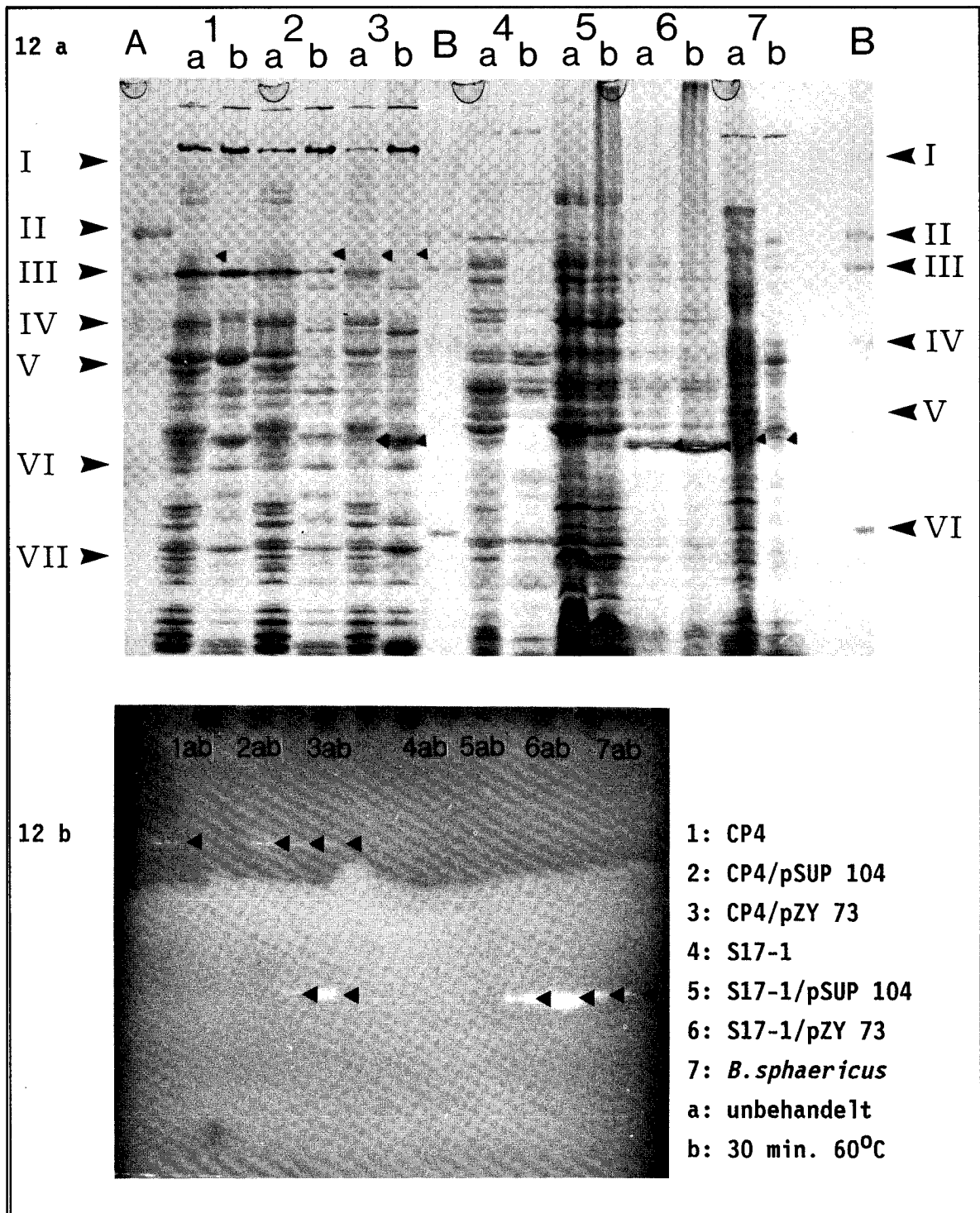


Abbildung III.12.a.b.: SDS-PAGE und Ala-DH-Aktivitätsfärbung verschiedener Bakterienstämme

Proteinstandard A (in kDa): I: α -Makroglobulin 180; II: β -Galaktosidase 116; III: Fruktose-6-P-Kinase 84; IV: Pyruvatkinase 58; V: Fumarase 48,5; VI: Laktatdehydrogenase 36; VII: Triose-P-Isomerase 26
 Proteinstandard B (in kDa): I: Myosin 205; II: β -Galaktosidase 116; III: Phosphorylase B 97,4; IV: BSA 66; V: Eialbumin 45; VI: Carboanhydrase 29

Stamm	Protein im Rohextrakt mg/ml	spez. Ala-DH-Aktivität U/mg Prot.	Anteil Ala-DH am Rohextrakt
CP4-thi/pZY 73			
unbehandelt	18,5	0,95	0,6 %
30 min 60°C	5,5	1,72	1,1 %
S17-1/pZY 73			
unbehandelt	11,5	11,20	7,0 %
30 min 60°C	6,3	14,80	9,4 %
<i>B. sphaericus</i>			
unbehandelt	7,6	0,45	0,3 %
30 min 60°C	2,5	2,80	1,7 %

Tabelle III.2.: Proteingehalt, spezifische Ala-DH-Aktivität und Anteil der Ala-DH am Rohextrakt in zellfreien Extrakten von CP4/pZY 73, S17-1/pZY 73 und *B. sphaericus*

Der Anteil der Ala-DH am Rohextrakt wurde über die spez. Aktivität gereinigter Ala-DH von 157 U/mg Protein berechnet (OHASHIMA UND SODA, 1979)

2. Versuche zur Ausschaltung der Pyruvatdecarboxylase-Reaktion

Die Alaninbildung mit *Zymomonas* sollte nun dadurch gesteigert werden, daß die Konkurrenzreaktion zur Aminierung des Pyruvats durch die Ala-DH, nämlich die Decarboxylierung des Pyruvats zu Acetaldehyd durch die PDC unterbunden wird. Die Ausschaltung der PDC wurde zunächst durch Inaktivierung des *pdc*-Gens versucht

2.1. Transposonmutagenese von CU1-Rif2

Zur Ausschaltung des *pdc*-Gens wurden klassische Mutationstechniken wie UV-Mutagenese und Mutagenese mit alkylierenden Substanzen wie NMG angewandt. Später wurden dann Versuche der homologen Rekombination mit einem *pdc*-Austauschvektor unternommen. Es konnte aber in keinem Fall

eine *pdc*⁻-Mutante gewonnen werden. Da mutagenisierende Phagen für *Z.mobilis* nicht zur Verfügung stehen wurde daraufhin versucht, durch Transposonmutagenese mit dem Transposon Tn 1725 (ALTENBUCHNER ET AL., 1983; UBBEN UND SCHMITT, 1986), in dessen nicht-funktionellen Bereich zuvor das *alaD*-Gen aus *B.stearothermophilus* ligiert worden war, Mutanten zu erhalten. Die Transposonmutagenese wurde mit einem sogenannten Suizidvektor durchgeführt, in diesem Falle pRK 2013 (Km^r), der das Transposon Tn 1725-*alaD* (Cm^r) trug. Dieser Vektor läßt sich zwar aufgrund seiner Transfer-Funktionen (*tra*-Gene) nach *Z.mobilis* übertragen, kann sich dort aber nicht replizieren, da ihm ein entsprechender Replikationsursprung fehlt. Die Selektion auf Transpositionsergebnisse kann dadurch leicht über Chloramphenicolresistenz mit anschließender Überprüfung der Kanamycinsensitivität erfolgen. In 7 unabhängig voneinander durchgeführten Kreuzungen, mit jeweils 9 Ansätzen, in denen der *E.coli*-Stamm CBK 760/pRK 2013::Tn 1725-*alaD* als Donor und CUI-Rif2 als Rezipient eingesetzt worden waren, wurden nur 51 Transkonjuganten erhalten, von denen alle auf PDC-Indikatorplatten PDC-Aktivität zeigten. Transpositionsergebnisse hatten wenn überhaupt, dann nur auf kryptischen Plasmiden von *Z.mobilis* stattgefunden, wie in einer Hybridisierung des markierten Transposons gegen Chromosomale- und Plasmid-DNA von transkonjuganten Stämmen festgestellt werden konnte.

Da die genetische Suppression des *pdc*-Gens nicht gelang, wurde versucht dieses phänotypisch, durch Verwendung einer thiaminauxotrophen Mutante zu erreichen.

2.2. Versuche mit einer thiaminauxotrophen Mutante des *Z.mobilis*-Stammes CP4

Eine thiaminauxotrophe Mutante, in der über die Konzentration von Thiamin im Medium Einfluß auf die PDC Aktivität genommen werden kann, stellt eine Alternative zur *pdc*-negativen Mutante dar.

Die thiaminauxotrophe Mutante CP4-thi wuchs in Mineralsalzmedium mit mindestens 0,5 µg/ml Thiamin wie der Wildtyp CP4. Befand sich kein Thiamin im Medium so wuchsen die Zellen, die mit einer OD₆₀₀ von 0,14 angeimpft worden waren, nicht weiter als bis OD₆₀₀ = 0,30. Es war zu untersuchen, wie sich in transkonjuganten Stämmen CP4-thi/pZY 73 Thiaminmangel auf die Aktivität der PDC und damit verbunden auf die Alaninbildung auswirkt. Zum Erlangen hoher Zelldichten wurde CP4-thi/pZY 73 zunächst in 100 ml Komplettmedium mit 2 % Glukose kultiviert. Nach Erreichen der stationären Phase (OD₆₀₀ = 1.94) wurden die Zellen abgeerntet, zweimal in Mineralsalzmedium gewaschen und anschließend wurden damit 1l Mineralsalzmedium pH 6,0, 5 % Glukose und 15 mM Ammonium mit einer OD₆₀₀ von 0,14 beimpft. Der Kultur wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen, und die PDC- und Ala-DH-Aktivität in permeabilisierten Zellen gemessen. Um zu sehen, ob der Cofaktor-Mangel eine niedrigere PDC-Aktivität verursachte, wurde der Enzymtest ohne den sonst üblichen Zusatz von Thiaminpyrophosphat durchgeführt. Der Überstand wurde zur Analyse der gebildeten Produkte eingesetzt.

Inkubationsdauer /h	Wachstumsertrag OD ₆₀₀	Glk. /mM	Eth. /mM	Ala. /mM	PDC Akt. U/mg	Ala-DH Akt. U/mg
0	0,14	255	>1	>1	3,20	0,60
16	0,61	210	87	1,6	0,81	0,61
24	0,65	195	121	3,3	0,71	0,64
40	0,77	136	207	5,8	0,60	0,69
48	0,78	68	230	6,8	0,33	0,64
64	0,82	47	286	8,3	0,28	0,66
71	0,89	24	311	8,7	0,24	0,65
88	0,88	>1	475	10,3	0,24	0,23

Tabelle III.3.: Wachstum, Produktbildung, PDC- und Ala-DH Aktivität von CP4-thi/pZY 73 in Mineralsalzmedium pH 6,0 ohne Thiamin

Die spez. Aktivitäten der Enzyme sind in U/mg Trockengewicht angegeben. Glk.: Glukose; Eth.: Ethanol; Ala.: Alanin

Um die Abhängigkeit zwischen Alaninbildung und Thiaminmangel zu erfassen, wurden außerdem zu jedem Zeitpunkt der Probenahme Zellen in 10 ml Alaninbildungsmedium bis zu einer OD_{600} von 2,5-3,0 überimpft und bis zum Verbrauch der Glukose bei 37°C inkubiert. Die gebildeten Produkte wurden anschließend analysiert. Abbildung III.13. zeigt den Zusammenhang zwischen PDC-Aktivität und Anteil des gebildeten Alanins an der C-Quelle. Dabei ist zu beachten, daß die PDC-Aktivitäten und das Zellwachstum in einem Kulturanatz über die Zeit bestimmt wurden, die einzelnen Meßpunkte sind daher verbunden. Der Anteil des gebildeten Alanins an der C-Quelle stellt dagegen jeweils den Endpunkt unabhängig voneinander durchgeführter Kultivierungen in Alaninbildungsmedium dar, deren Zellen der Mineralsalzkultur pH 6,0 zu dem jeweiligen Zeitpunkt der PDC-Aktivitätsmessung entnommen wurden. In der Hauptkultur (Mineralsalzmedium pH 6,0) war die C-Quelle nach 88 h verbraucht und es wurden aus den 255 mM Glukose von den Zellen 475 mM Ethanol, 23 mM Acetat und 10 mM Alanin gebildet (Tabelle III.4). Während die Ala-DH-Aktivität in den Zellen über die gesamte Kultivierungsdauer konstant blieb, verringerte sich die PDC-Aktivität mit jeder Zellteilung auf die Hälfte des Ausgangswertes. Nach zwei Verdopplungsperioden des Stammes innerhalb der ersten 16 h in Mineralsalzmedium unter Thiaminmangel war die PDC-Aktivität von 3,2 U/mg Trockengewicht auf 0,8 U/mg Trockengewicht gesunken (Tabelle III.3). In Zellen dieser Phase wurden in Alaninbildungsmedium bereits 13 % der C-Quelle zu Alanin umgesetzt. Bei Zellen, die direkt aus Kompletmedium in Produktionsmedium überimpft wurden, waren es nur 10 %. Die maximale Umsetzung von 23 % der C-Quelle zu Alanin wurde in Zellen, die 40 Stunden in Mineralsalzmedium ohne Thiamin vorinkubiert wurden, bei einer PDC-Aktivität von 0,6 U/mg Trockengewicht erreicht. Von Zellen dieser Phase wurden in Alaninbildungsmedium 90 mM Alanin ausgeschieden. Eine Verlängerung der Inkubation unter Thiaminmangelbedingungen führte zwar noch zum Absinken der PDC-Aktivität auf 0,24 U/mg Trockengewicht, doch konnte die Umsetzung der C-Quelle zu Alanin nicht mehr gesteigert werden. Die PDC Aktivität

konnte durch Zugabe von Thiaminpyrophosphat zum Testansatz zu jedem Zeitpunkt der Probenahme auf ihren ursprünglichen Wert zurückgebracht werden.

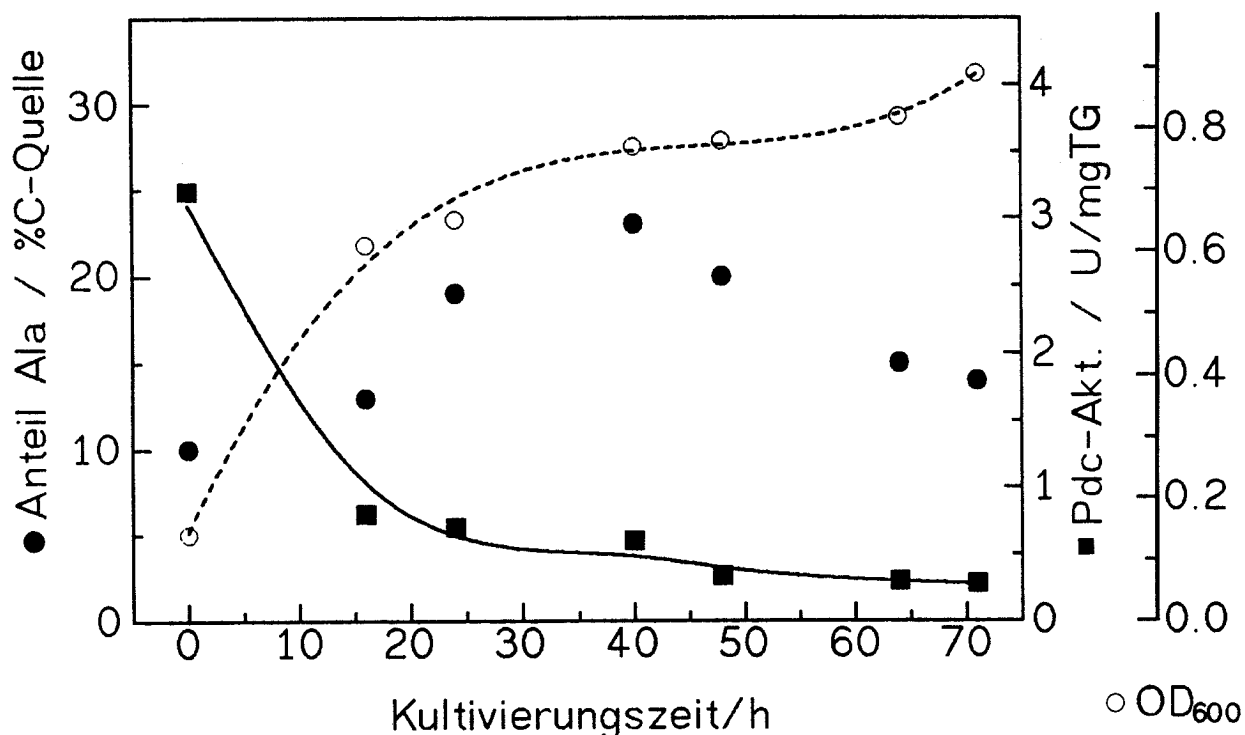


Abbildung III.13.: Zusammenhang zwischen Anteil des gebildeten Alanins an der C-Quelle und der PDC-Aktivität in CP4-thi/pZY 73-Zellen unter Thiaminmangel

Um die Wachstumsphase von CP4-thi/pZY 73 in Mineralsalzmedium unter Thiaminmangel zu verlängern, wurden dem Medium Produkte der ebenfalls Thiaminpyrophosphat-abhängigen Enzyme Transketolase und Acetolaktatsynthase zugegeben. CP4-thi/pZY 73-Zellen wurden in 100 ml Komplettmedium bis zum Erreichen der stationären Phase angezogen und anschließend geerntet. Nach zweimaligem Waschen in Mineralsalzmedium pH 6,0 wurden fünf parallele Ansätze von 50 ml Mineralsalzmedium pH 6,0 mit den Zellen bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,1 beimpft. Die Ansätze wurden mit folgenden Zusätzen versehen: Ansatz 1 mit je 0,02 mg/ml der Aminosäuren Histidin, Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan, Iso-

leucin und Valin; Ansatz 2 mit je 0,02 mg/ml Guanin und Adenin; Ansatz 3 mit 0,02 mg/ml Shikiminsäure; Ansatz 4 enthielt alle Zusätze der Ansätze 1-3 und Ansatz 5 blieb zur Kontrolle ohne Zusatz. Nach einem Verbleib von 40 h, der oben ermittelten optimalen Vorinkubationszeit unter Thiaminlimitierung, wurde die optische Dichte in den Kulturen bestimmt. In allen Kulturen betrug die OD₆₀₀ 0,55-0,59, d.h., der Zusatz von Produkten, die aus Vorstufen des Pentosephosphatweges oder durch Umsetzung der Acetolaktatsynthase gebildet werden, verlängerte nicht die Wachstumsphase unter Thiaminlimitierung. Zur Kontrolle wurden die Zellen der einzelnen Ansätze in Alaninbildungsmedium pH 7,0 mit 5 % Glukose und 100 mM Ammonium überimpft. Tabelle III.4. zeigt die nach 2 Tagen gebildeten Alaninmengen, die in allen Ansätzen vergleichbar hoch waren.

Ansatz 1 + AS	Ansatz 2 + Pu	Ansatz 3 + Sh	Ansatz 4 + As,Pu,Sh	Ansatz 5 -
Alanin:				
88,3 mM	87,0 mM	84,2 mM	90,4 mM	89,6 mM

Tabelle III.4.: Alaninausscheidung von CP4-thi/pZY 73-Zellen in Alaninbildungsmedium nach 40-stündiger Vorinkubation in Mineralsalzmedium pH 6,0 mit unterschiedlichen Zusätzen

AS: Aminosäuren; Pu: Purine Adenin und Guanin; Sh: Shikiminsäure. Weitere Erläuterungen siehe Text

3. Alaninbildung der rekombinanten *Z.mobilis*-Stämme

3.1. Optimierung der Alaninbildungsbedingungen

In der Literatur beschriebene Kultivierungsbedingungen für *Z.mobilis* zielen auf eine hohe Ethanolbildung ab (ROGERS ET AL., 1982; ROGERS ET AL., 1984). Um die Alaninausbeute in Kultivierungen mit den rekombinanten Stämmen zu erhöhen, war daher zunächst eine Anpassung von Mediumzusammensetzung, pH-Wert und Kultivierungstemperatur an die Aminierungsreaktion der Ala-DH notwendig.

Bei Untersuchungen des Einflusses der Ammoniumkonzentration auf die Alaninausscheidung war zu beobachten, daß die Zellen um so mehr Alanin produzierten, je höher die Ammoniumkonzentration im Medium war. In Tabelle III.4. sind der Wachstumsertrag ausgedrückt als OD₆₀₀, ausgeschiedenes Alanin und die im Medium verbliebene Glukose in den verschiedenen Ansätzen aufgeführt. Bei einer Ammoniumkonzentration von 15 mM im Medium wurden von den Zellen aus 5 % Glukose 0,23 mM Alanin gebildet; bei 200 mM Ammonium im Medium wurde Glukose in nicht meßbarer Konzentration verbraucht, es wurden aber 0,4 mM Alanin ausgeschieden.

Da sich bereits 30 mM NH₄⁺ im Medium wachstumshemmend auf die Kulturen auswirkten (AGRAWAL, 1989; eigene Befunde) wuchsen die Kulturen bei Ammoniumkonzentrationen von 100 mM-200 mM nicht mehr. Um zwischen einem "Wachstumseffekt" und dem Einfluß von Ammonium auf die Alaninbildung unterscheiden zu können, wurde der Versuch mit "ruhenden Zellen", bei denen eine Wachstumshemmung durch den pH-Wert des Mediums (pH 7,0) und der Inkubationstemperatur (37°C) erzielt wurden, durchgeführt. CUI-Rif2/pZY 53-Zellen schieden in Medium mit 15 mM Ammonium 3 mM Alanin aus, unter Wachstumsbedingungen dagegen nur 0,23 mM. Eine Wachstumshemmung der Kulturen, bzw. pH 7,0 und 37°C erhöhten die Alaninbildung um den Faktor 10. Durch Einsetzen von 200 mM Ammonium konnte die Alaninausscheidung noch auf das Doppelte, nämlich ca. 6 mM, gesteigert werden.

Stamm	Wachstums- ertrag OD ₆₀₀	Zugesetztes NH ₄ ⁺ /mM	gebildetes Alanin /mM	Rest- Glukose
CU1-Rif2 /pZY 53	2,52	15	0,23	0 %
"	0,19	100	0,28	5 %
"	0,14	150	0,31	5 %
"	0,10	200	0,40	5 %

Tabelle III.5.: Abhängigkeit der Alaninausscheidung von der Ammoniumkonzentration in Mineralsalzmedium pH 5,5

20 ml Mineralsalzmedium pH 5,5 mit 5 % Glukose in Anaerobengefäßen wurden jeweils mit einer OD₆₀₀ von 0,1 beimpft, bei 30°C inkubiert und der Kulturüberstand entweder bei Verbrauch der Glukose nach 2 Tagen, sonst nach 5 Tagen analysiert. Die Glukosekonzentration wurde dabei mit Glukoseteststäbchen der Firma Boehringer Mannheim bestimmt. Alle aufgeführten Werte sind Mittelwerte aus Parallelansätzen.

Da der Kontrollstamm CU1-Rif2 in allen folgenden Experimenten keine signifikante Menge an Alanin ausschied, wurde auf eine Darstellung der Daten verzichtet.

Stamm	Wachstums- ertrag OD ₆₀₀	Zugesetztes NH ₄ ⁺ /mM	gebildetes Alanin /mM	Rest- Glukose
CU1-Rif2/ pZY 53	0,70	15	3,00	0 %
"	0,70	30	3,28	0 %
"	0,64	50	3,77	0 %
"	0,61	100	4,28	0 %
"	0,59	200	5,65	0 %

Tabelle III.6.: Abhängigkeit der Alaninausscheidung von der Ammoniumkonzentration in Mineralsalzmedium pH 7,0

Die 20 ml Kulturen (5 % Glukose) wurden mit einer OD₆₀₀ von 0,8 angeimpft. Die Probenentnahme erfolgte nach 6 Tagen, nachdem in allen Kulturen die Glukose verbraucht worden war.

Zur Untersuchung des Einflusses des pH-Wertes auf die Alaninausscheidung transkonjuganter CU1- Rif2/pZY 53-Stämme wurde in Mineralsalzmedien (5 % Glukose, 15 mM NH_4SO_4 , Inkubationstemperatur 30°C) im pH-Bereich von 5,5–7,0 kultiviert. Eine Erhöhung des pH-Wertes von pH 5,5 auf pH 7,0 führte dabei zu einer Verdreifachung der Alaninausscheidung von 0,23 mM auf 0,73 mM. Bei pH 7,5 wurden die Kulturen im Wachstum gehemmt und die Alaninausscheidung betrug nur noch 25 % der bei pH 5,5 gebildeten Menge, da die Bereitstellung von Pyruvat durch Hemmung der Entner-Doudoroff-Enzyme eventuell nicht mehr erfolgen konnte.

Stamm	Wachstums- ertrag OD ₆₀₀	pH-Wert	gebildetes Alanin /mM	Rest- Glukose
CU1-Rif2/ pZY 53	1,98	5,5	0,23	0 %
"	1,23	6,0	0,52	0 %
"	1,74	6,5	0,74	0 %
"	1,62	7,0	0,73	0 %
"	1,04	7,5	0,06	0 %

Tabelle III.7.: Abhängigkeit der Alaninausscheidung in Mineralsalzmedium vom pH-Wert des Mediums

20 ml Mineralsalzmedium (5 % Glukose, 15 mM NH_4^+) wurden mit einer OD₆₀₀ von 0,1 beimpft und der Kulturüberstand nach 2 Tagen analysiert.

Nachdem in bezug auf die Ammoniumkonzentration und den pH-Wert des Mediums Bedingungen für die Alaninausscheidung ermittelt wurden, wurde dieses verbesserte Medium zur Untersuchung des Temperatureinflusses auf die Alaninbildung eingesetzt. Die thermophile Ala-DH zeigt bei der optimalen Wachstumstemperatur für *Z.mobilis* (30°C) nur noch 20 % ihrer Aktivität (Temperaturoptimum der ALA-DH aus *B.stearothermophilus*: 70°C). Die Aktivität der mesophilen

Ala-DH aus *B.sphaericus* war trotz unterschiedlicher Angaben von OHASHIMA UND SODA (1979) im Enzymtest maximal bei 37°C. Daher wurde im Temperaturbereich von 30-45°C kultiviert. Es zeigte sich, daß der Einfluß der Temperatur auf die Alaninbildung gering ist. Die Steigerung der Alaninausscheidung bei Erhöhung der Kultivierungstemperatur um 7°C betrug etwa 12 %. Bei Temperaturen über 37°C, bei denen die Zellen im Wachstum behindert wurden (Tabelle III.8) sank die Alaninbildung ab. In 45°C und 49°C-Kulturen war sogar ein Ausflocken der Zellen zu beobachten. Hier wurde Glukose in kaum messbaren Konzentrationen verstoffwechselt, die gebildete Alaninmenge von 3,78 mM bzw. 2,77 mM, die sich nicht allein durch Lyse der Bakterien erklären läßt, (siehe dazu III.4.) ist allerdings relativ hoch, ein Zeichen dafür, daß die thermophile Alanindehydrogenase in diesem Temperaturbereich sehr aktiv ist.

Stamm	Wachstums- ertrag OD ₆₀₀	Temperatur	gebildetes Alanin /mM	Rest- Glukose
CU1-Rif2/ pZY 53	1,37	30°C	6,42	0 %
"	1,32	37°C	7,86	0 %
"	0,95	42°C	5,27	0 %
"	1,03	45°C	3,78	5 %
"	0,98	49°C	2,77	5 %

Tabelle III.8.: Alaninbildung in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur

Kultiviert wurde in 20 ml Mineralsalzmedium (5 % Glukose, 100 mM NH₄⁺-Acetat, pH 7.0). Angeimpft wurde mit einer OD₆₀₀ von 1,9 und die gebildeten Produkte nach 5 Tagen bestimmt.

Durch Anpassung der Fermentationsbedingungen an die Aminierungsreaktion der Ala-DH konnte in CU1-Rif2/pZY 53 die Alaninausscheidung ca. auf das 25-fache gesteigert werden. Den

größten Effekt hatte dabei die pH-Wert Erhöhung von pH 5,5 auf pH 7,0. Der Einfluß der Temperatur auf die Alaninbildung ist dagegen selbst bei dem thermophilen *alaD*-Gen nicht so groß, da die *Zymomonas*-eigenen Entner-Duodoroff-Enzyme bei Temperaturen über 37°C schon stark in ihrer Aktivität eingeschränkt wurden, was sich darin äußerte, daß Glukose kaum noch verstoffwechselt wurde. Folgende Kultivierungsbedingungen haben sich als optimal herausgestellt: Mineralsalzmedium mit 100 mM NH_4^+ , pH 7,0 und eine Fermentationstemperatur von 37°C. Eine Anpassung an die optimalen Bedingungen der Ala-DH konnte nicht vollständig erfolgen, da die Funktionsfähigkeit der Entner-Doudoroff-Enzyme erhalten bleiben muß.

Zur Überprüfung der Stabilität der Ala-DH in CUI-Rif2/pZY 72-Zellen in Alaninbildungsmedium wurde die Ala-DH- und als Kontrolle parallel dazu die PDC-Aktivität in zellfreien Extrakten bestimmt. CUI-Rif2/pZY 72-Zellen der stationären Phase wurden dazu aus Kompletmedium in 500 ml Alaninproduktionsmedium pH 7,0 mit 5 % Glukose und 100 mM Ammonium überimpft. Die OD_{600} in diesem Medium betrug 2,5. Der Kultur wurden zu verschiedenen Zeiten Proben entnommen und die Überstände zur Analyse von Glukose, Ethanol und Alanin eingesetzt. Zellen aus 20 ml der Kultur wurden zum jeweiligen Zeitpunkt mit Ultraschall aufgeschlossen und die PDC- sowie die Ala-DH-Aktivität und die Proteinkonzentration im zellfreien Extrakt bestimmt. Abbildung III.14. zeigt den Verlauf der Aktivitätskurven von PDC und Ala-DH. Beide Enzyme zeigen einen drastischen Aktivitätsverlust während der Kultivierung in Alaninbildungsmedium. Die Aktivität der PDC sank von anfänglich 5 U/mg Protein bis zum Ende der Fermentation auf die Hälfte, d.h. 2,5 U/mg Protein. Die Ala-DH-Aktivität fiel von 0,28 U/mg Protein auf 0,06 U/mg Protein innerhalb von 26 h ab. Während dieser Zeit wurden von den Zellen aus 249 mM Glukose 455 mM Ethanol und 16 mM Alanin gebildet.

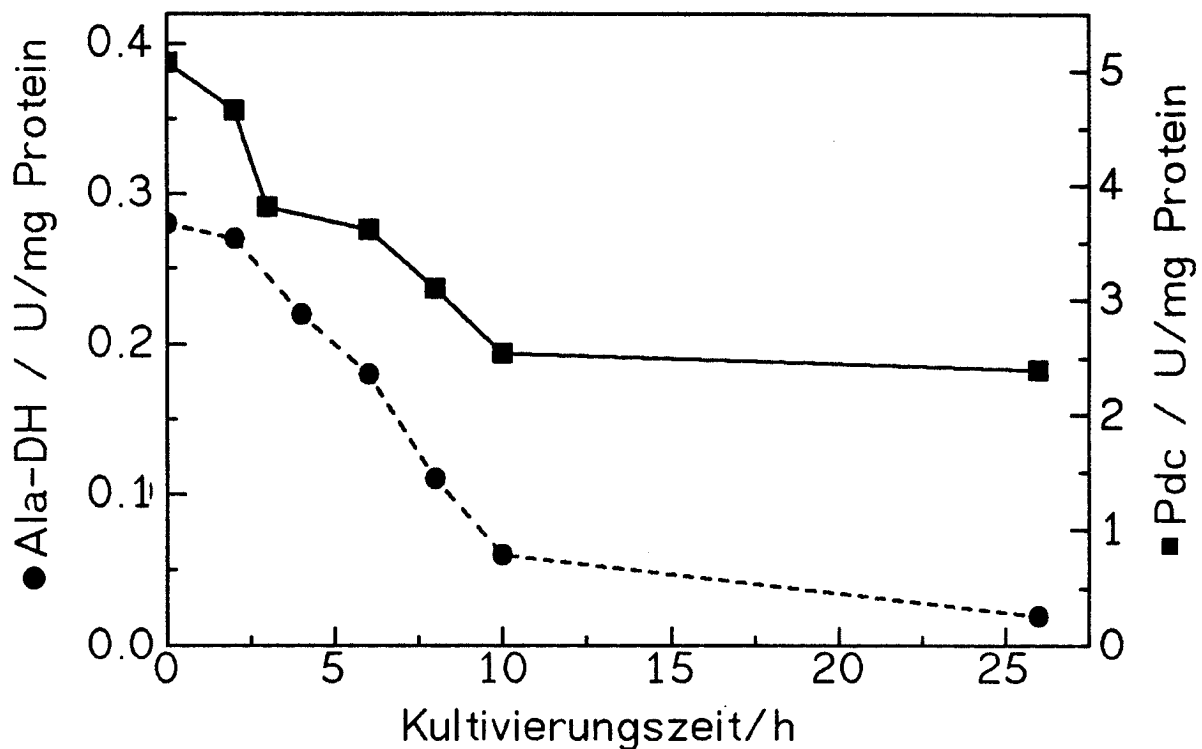


Abbildung III.14.: PDC- und Ala-DH-Aktivitätsverlust von CU1-Rif2/pZY 72 in Alaninbildungsmedium

3.2. Alaninbildung rekombinanter *Z.mobilis*-Stämme aus Glukose

Kultivierungen in Alaninbildungsmedium wurden mit allen transkonjuganten *Z.mobilis*-Stämmen durchgeführt. In Tabelle III.9. sind die dabei gebildeten Produkte aufgeführt. Daneben konnten noch 1-2 mM Laktat und 1-2 mM Acetat nachgewiesen werden. Deutlich wird, daß die Alaninbildung in den transkonjuganten Stämmen durch Erhöhung der Ala-DH Aktivität gesteigert werden konnte. In CU1-Rif2/pZY 53-Stämmen, in denen die Ala-DH-Aktivität 0,18 U/mg Protein betrug, wurden 1,7 % der C-Quelle in Alanin umgesetzt, bei einer Ala-DH-Aktivität von 1 U/mg Protein wie bei CP4/pZY 73 waren es bereits 8 %. Das gebildete Alanin bestand zu 97 % aus L-Alanin.

Stamm	OD ₆₀₀	Glk. /mM	Eth. /mM	Ala. /mM	Ala-DH Aktiv.	Ala % C-Quelle	Kultiv. Zeit/h
CU1-Rif2/ pZY 53	0,9	289	557	10	0,18	1,7	120
CU1-Rif2/ pZY 62	1,1	250	481	16	0,27	3,2	120
CU1-Rif2/ pZY 72	0,9	243	476	17	0,30	3,5	120
CP4/ pZY 73	1,8	245	459	41	0,99	8,3	24
CP4-thi/ pZY 73	2,5	262	410	84	0,97	16,0	26

Tabelle III.9.: Produktbildung rekombinanter *Z.mobilis*-Stämme in Kultivierungen in Alaninbildungsmedium

Die Meßfehler der einzelnen Bestimmungsmethoden liegen bei +/-5 %, so daß die C-Bilanz nicht immer zu 100 % ermittelt wurde.
Ala-DH Aktiv.: spez. Ala-DH Aktivität in U/mg Protein

In Abbildung III.15. ist der Verlauf einer Kultivierung von CP4-thi/pZY 73 in Alaninbildungsmedium dargestellt. Zellen aus Kompletmedium wurden dazu nach zweimaligem Waschen in Mineralsalzmedium pH 6,0 20 h unter Thiaminmangel inkubiert und anschließend in Alaninbildungsmedium überimpft. Die OD₆₀₀ in diesem Medium betrug 2,5. Innerhalb von 26 Stunden wurden von diesen Zellen 262 mM Glukose zu 410 mM Ethanol und 84 mM Alanin umgesetzt.

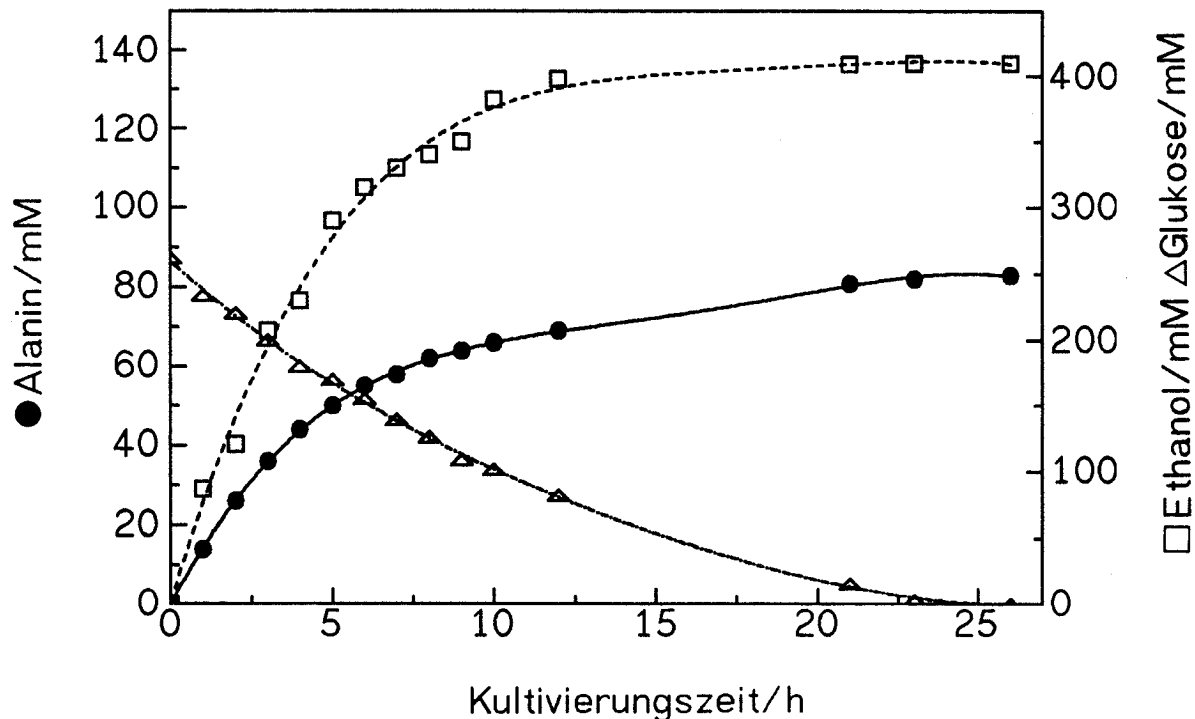


Abbildung III.15.: Alanin- und Ethanolbildung des Stammes CP4-thi/pZY 73 in Alaninbildungsmedium aus Glukose

OD₆₀₀ = 2,5; Aus 262 mM Glukose wurden in 26 h 410 mM Ethanol und 84 mM Alanin gebildet

4. Bestimmung interner Aminosäure- und Kaliumkonzentrationen

Um zu überprüfen, ob *Zymomonas*-Stämme in der Lage sind, gebildetes Alanin vollständig auszuschcheiden, und um Hinweise auf den zugrundeliegenden Mechanismus des Sekretionsvorganges zu erhalten, wurden interne Aminosäurekonzentrationen bestimmt. Wildtyp und rekombinante *Z.mobilis*-Stämme wurden dazu in Mineralsalzmedium bzw. Alaninproduktionsmedium mit 5 % Glukose kultiviert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden der Kultur Proben entnommen, die Zellen durch Silikonölzentrifugation vom Medium getrennt und, nach Aufarbeitung der Sedimente, die internen sowie die externen Aminosäurekonzentrationen durch reversed-phase HPLC ermittelt.

Hierbei zeigte sich, daß Alanin intern auch in Stämmen ohne *alaD*-Plasmid zusammen mit Glutamat die Aminosäure mit der höchsten cytoplasmatischen Konzentration ist. In CP4- wie CU1-Rif2-Stämmen ließen sich unabhängig vom Medium konstant über die gesamte Wachstumskurve interne Konzentrationen von ca. 4 mM Alanin messen. Im Vergleich dazu lag die interne Glutamatkonzentration bei ca. 3-5 mM. In wachsenden Zellen des transkonjuganten Stammes CU1-Rif2/pZY 72, die in Mineralsalzmedium bei pH 5,5 2,9 mM Alanin ausschieden, war die interne Alaninkonzentration bis zum Glukoseverbrauch konstant auf ca. 18-26 mM erhöht. Die maximale Alaninausscheidungsrate, die zu Beginn der Kultivierung erzielt wurde, betrug 10 nmol/min•mg TG.

Wurden Zellen des Stammes CU1-Rif2/pZY 72 in Alaninbildungsmedium angezogen, so vervierfachte sich die interne Alaninkonzentration auf 82 mM. Durch Verschiebung des pH-Wertes des Mediums in den neutralen Bereich (pH 7,0) und Erhöhung der Ammoniumkonzentration im Medium wurde die Aminierung des Pyruvats durch die Ala-DH offensichtlich begünstigt. Die interne Alaninkonzentration nahm von anfangs 82 mM auf zunächst 70 mM ab. Gegen Ende der Kultivierung nach 48 Stunden sank die Innenkonzentration auf 17 mM und entsprach damit der Außenkonzentration. Der Konzentrationsgradient von internem zu externem Alanin von anfänglich 33 mM wurde so zum Ende der Kultivierung hin ausgeglichen. Die zu Kultivierungsbeginn erreichte maximale Alaninausscheidungsrate betrug dabei 19 nmol/min•mg TG.

In Tabelle III.10. sind interne und externe Alaninkonzentrationen, Konzentrationsgradienten und maximale Alaninausscheidungsraten von CU1-Rif2- und CP4-Stämmen unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen aufgeführt. Der Vergleich zeigt, daß durch Erhöhung der internen Aminosäurekonzentration wie in CP4-thi/pZY 73 gegenüber CP4/pZY 73 geschehen, die Alaninausscheidung gesteigert werden konnte. Daß die Ausscheidungsrate dabei letztendlich limitierend war, zeigt ein Vergleich von CU1-Rif2/pZY 72 mit CP4/pZY 73. In CU1-Rif2/pZY 72 ist die interne Alaninkonzentration nämlich fast 3 mal so hoch wie in

CP4/pZY 73, die ausgeschiedene Alanin-Menge beträgt aber nur ein Drittel derjenigen, die von CP4/pZY 73 exkretiert wurde. Die maximale Ausscheidungsrate von CU1-Rif2/pZY 72 von 19 nmol/min•mg TG bestätigt diesen Befund. Sie beträgt nur ein zehntel derjenigen des Stammes CP4/pZY 73, indem 190 nmol/min•mg TG gemessen werden konnten. Daraus kann geschlossen werden, daß die Alaninbildung in CU1-Rif2-Stämmen durch die Kapazität des Sekretionsschrittes limitiert war.

Medium	Ala Ex		Ala In		In/Ex		max.Aus- scheid. /nmol/ min•mg TG
Stamm	/mM		/mM				
	A	E	A	E	A	E	
Mineralsalz- medium pH 5,5							
CU1-Rif2/pPTZ 1	0,02	0,03	7,7	6,4	39	21	< 0,01
CU1-Rif2/pZY 72	0,6	2,9	18,8	18,6	31	6	10
Alaninbil- dungsmedium							
CU1-Rif2/pPTZ 1	0,2	0,7	6,7	0	34	0	< 0,01
CU1-Rif2/pZY 72	2,4	15,7	82,0	16,7	34	1	19
CP4/pSUP 104	0,1	0,4	4,5	6,5	45	16	< 0,01
CP4/pZY 73	0,7	47,3	30,0	0,9	43	0	190
CP4-thi/pZY 73	3,7	64,8	266,0	84,0	72	1	238

Tabelle III.10.: Interne und externe Alaninkonzentrationen, Konzentrationsgradienten und maximale Alaninausscheidungsrate von CU1-Rif2- und CP4-Stämmen in Mineralsalzmedium pH 5,5 und Alaninbildungsmedium.

Ala Ex: Alaninkonzentration im Medium; Ala In: Cytoplasmatische Alaninkonzentration; In/Ex: Quotient aus interner und externer Alaninkonzentration; A: am Anfang der Kultivierung; E: am Ende der Kultivierung; Max.Ausscheid.: Maximale Ausscheidungsrate

In Tabelle III.11. sind interne und externe Alaninkonzentrationen und im Vergleich dazu Glutamatkonzentrationen von CP4-Stämmen in Alaninbildungsmedium bis zum

Verbrauch der Glukose aufgeführt. Auch in diesen Stämmen wird Alanin bis zum Konzentrationsausgleich zwischen internem und externem Alanin sezerniert, wobei dies mit einer maximalen Ausscheidungsrate von 190 nmol/min•mg TG bzw. 238 nmol/min•mg TG geschieht. Auffällig ist der deutlich erhöhte interne Alaninpool der thiaminauxotrophen Mutante gegenüber CP4/pZY 73, der aus der vermehrten Umsetzung des Pyruvats zu L-Alanin durch die Ala-DH, nach Einschränkung der PDC-Aktivität durch Thiaminmangel zu erklären ist. Die cytoplasmatischen Alaninkonzentrationen sind trotz hoher Ausscheidungsraten über 26 Stunden in CP4-thi/pZY 73 sehr hoch. Diese Akkumulation gibt einen Hinweis darauf, daß der Efflux von Alanin auch in CP4-thi/pZY 73 limitierend wirkt.

Stamm	Zeit /h	CV /μl/mgTG	Ala Ex /mM	Ala In /mM	<u>In</u> Ex	Glu Ex /mM	Glu In /mM	<u>In</u> Ex
CP4/ pSUP 104	0	2,2	0,1	4,5	45	0,1	3,2	32
	2	2,0	0,1	6,5	65	0,1	3,2	32
	4	2,0	0,3	6,7	22	0,1	2,0	20
	6	2,0	0,4	6,6	17	0,1	2,4	24
	8	1,6	0,4	6,6	17	0,2	2,1	11
	22	0,5	0,4	6,5	16	0,3	1,0	3
CP4/ pZY 73	0	2,5	0,7	30,1	43	0,1	3,0	30
	2	2,3	3,1	18,2	6	0,2	3,5	18
	4	2,3	8,9	30,0	3	0,3	5,5	18
	6	2,0	15,4	40,2	3	0,3	5,5	18
	8	1,4	25,8	42,8	2	0,3	4,5	15
	22	1,0	47,3	0,9	0	0,3	1,0	3
CP4-thi/ pZY 73	0	2,2	3,7	266,0	72	0,1	3,7	37
	2	2,2	22,4	255,0	11	0,4	3,3	8
	4	2,2	32,9	206,4	6	0,4	2,9	7
	6	2,2	35,5	228,0	7	0,5	2,5	5
	8	2,2	42,8	146,6	3	0,5	3,0	6
	22	2,2	60,4	137,5	2	0,5	3,8	8
	26	2,1	61,9	129,0	2	0,6	1,5	3
	30	2,1	64,4	88,2	1	0,6	1,0	2
	48	1,8	64,8	84,0	1	0,6	1,6	3

Tabelle III.11: Interne und externe Aminosäurekonzentrationen von CP4 und CP4-thi-Stämmen in Alaninbildungsmedium

CV : Cytoplasmavolumen ; sonstige Beschriftung wie Tabelle III.10.

Zwischen Sekretionsrate und dem Alaninkonzentrationsgradienten über die Membran besteht ein Zusammenhang, der in Tabelle III.12. gezeigt ist. Die Ausscheidungsrate war in allen Stämmen zu Beginn der Kultivierung bei dem höchsten Gradienten maximal und nahm mit diesem bis zum Ende der Kultivierung hin ständig ab. Ein linearer Zusammenhang existierte jedoch nur gegen Ende der Fermentation, bei hohen Gradienten war die Ausscheidungsrate nicht weiter zu steigern, sondern näherte sich einem maximalen Wert. Diese Sättigbarkeit dürfte bei einem Diffusionsprozeß jedoch nicht auftreten, so daß für den Alaninefflux ein Carrier-vermittelter Transport angenommen werden kann, der durch den Konzentrationsgradienten getrieben wird.

Zeit /h	Ala-Ausscheidungsrate /nmol/min•mg TG	Ala In/Ex
0	238	72
2	178	11
4	89	6
8	36	3
22	31	2
26	16	2
30	12	1
48	<1	1

Tabelle III.12.: Abhängigkeit der Alaninausscheidungsrate vom Alaninkonzentrationsgradienten in CP4-thi/pZY 73

Bei Betrachtung der Cytoplasmavolumina der transkonjuganten Stämme in Tabelle III.11. fällt auf, daß diese in der Hauptproduktionsphase (CP4/pZY 73 bis zu 6 h; CP4-thi/pZY 73 bis zu 30 h) konstant blieben, ein Beleg dafür, daß die Zellen über eine intakte Zellmembran verfügen. Während dieser Zeit wurden von den Organismen auch andere Aminosäuren als Alanin gegen einen Konzentrationsgradienten in der Zelle gehalten, was am Beispiel des Glutamats

gezeigt werden konnte (Tabelle III.11).

Ein weiterer Nachweis dafür, daß Alanin nicht etwa durch eine durchlässige Cytoplasmamembran in das Medium gelangt, deren Struktur durch unphysiologische Bedingungen des Mediums oder andere Faktoren verändert wurde, konnte durch Untersuchungen der Permeabilität der Membran gegenüber Kalium erbracht werden.

Dabei wurde die Tatsache ausgenutzt, daß sich Rubidiumionen in biologischen Systemen wie Kaliumionen verhalten und daher die experimentell zugängliche Verteilung von radioaktivem ^{86}Rb die Verteilung von K^+ über die Zellmembran exakt widerspiegelt (ROTTENBERG, 1979).

Zur Ermittlung des Kaliumgradienten in Zellen, die Alanin bilden, wurden CP4-thi/pZY 73-Zellen 12 h in Mineralsalzmedium pH 5,5 ohne Thiamin angezogen und anschließend in Alaninbildungsmedium überführt. Es wurden zwei parallele Ansätze erstellt, von denen der eine mit ^{86}Rb inkubiert und der andere unter identischen Bedingungen zur Bestimmung der Fermentationsprodukte herangezogen wurde. Den Kulturen wurden über einen Zeitraum von 10 Stunden Proben entnommen. In dem radioaktiven Ansatz wurden die Zellen vom Medium durch Silikonölzentrifugation getrennt und nach Aufarbeitung der Sedimente die Radioaktivität im Überstand und Sediment mit einem Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen. In dem Kontrollansatz ohne ^{86}Rb erfolgte die Analyse der gebildeten Produkte. In Tabelle III.13. sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen mit den dazugehörigen Kontrollen mit Zellen aus Kompletmedium und Mineralsalzmedium pH 5,5 dargestellt. Die interne Kaliumkonzentration von CP4-thi/pZY 73-Zellen in Kompletmedium, das 7 mM Kaliumhydrogenphosphat enthielt, betrug dabei 93 mM. In Alaninbildungsmedium, in dem 25 mM Kalium enthalten waren, konnten über 10 Stunden konstant 80 mM Kalium nachgewiesen werden. In dieser Zeit wurden von den Zellen 64 mM Alanin ausgeschieden. Diese K^+ -Konzentration enthielten auch Zellen aus Mineralsalzmedium pH 5,5, so daß davon ausgegangen werden kann, daß eine Kaliumkonzentration von

80-100 mM in CP4-thi/pZY 73 reguliert wird. Nach 24 Stunden konnten die Zellen allerdings keinen Kaliumgradienten mehr aufrecht erhalten, die Innenkonzentration entsprach der Außenkonzentration; die gemessene geringfügige Abweichung der Innenkonzentration von der Außenkonzentration lag dabei im Bereich des Meßfehlers.

Medium	Zeit /h	K ⁺ Ex /mM	K ⁺ In /mM	<u>In</u> <u>Ex</u>	Ala Ex /mM
Alanin- bildungs- medium	0	25	80	3,2	2
	2	25	78	3,1	26
	4	25	80	3,2	37
	6	25	80	3,2	55
	8	25	85	3,4	61
	10	25	80	3,2	64
	24	25	18	0,7	83
Mineralsalz- medium	2	25	80	3,2	n.b.
Komplett- medium	2	7	93	13	n.b.

Tabelle III.13.: Interne und externe Kaliumkonzentrationen in CP4-thi-Zellen in verschiedenen Medien

Zeit: Fermentationszeit nach Zugabe von ⁸⁶Rb; K⁺ Ex: Kaliumkonzentration des Mediums; K⁺ In: Interne Kaliumkonzentration; In / Ex: Verhältnis interne zu externe Kaliumkonzentration; n.b.: nicht bestimmt

Das Cytoplasmavolumen der Zellen betrug in allen Medien ca. 1,7 µl/mg Trockengewicht.

IV. Diskussion

Die Produktion von Aminosäuren durch Fermentation von Mikroorganismen stellt im Falle des L-Glutamats und L-Lysins eine wirtschaftliche Alternative zur chemischen Synthese, Extraktion oder enzymatisch katalysierten Herstellung dar (KLEEMANN ET AL., 1985). Mikrobiologische Produktionsverfahren existieren heute für alle Aminosäuren, wobei als Aminosäureproduzenten fast ausschließlich Mutanten der gram-positiven Organismen *Corynebacterium* und *Brevibacterium* eingesetzt werden (KLEEMANN ET AL., 1985). In der vorliegenden Arbeit wurden Versuche zur Alaninbildung mit einem rekombinanten *Z.mobilis*-Stamm durchgeführt.

Da *Zymomonas* über keine Alanindehydrogenase verfügt, bildete die Einbringung und stabile Expression eines *alaD*-Gens in den Organismus die Grundlage dieser Arbeit. Besonders wichtig für die Expression des *alaD*-Gens war dabei der Vektor, auf dem das Gen in *Z.mobilis* eingeführt wurde. Hier wurde im Laufe dieser Arbeit ein ganz neuer Expressionsvektor für *Z.mobilis* geschaffen, der den bisher zur Verfügung stehenden pPTZ-Vektoren (REYNEN ET AL., im Druck) in mehrerer Hinsicht überlegen ist. Mit diesem Vektor konnte die höchste Ala-DH Aktivität von 1 U/mg Protein in dem *Z.mobilis*-Stamm CP4/pZY 73 erzielt werden. Das Plasmid enthält das *alaD*-Gen aus *B.sphaericus* in einer Polyklonierstelle hinter dem *pdc*-Promotor, gefolgt von der Terminationssequenz T1T2 des *rrnB*-Gens aus *E.coli*. Die Selektion von Transkonjuganden erfolgte über eine Tetracyclinresistenz. Replikations- und Mobilisationsfunktionen entstammen dem RSF 1010-Derivat pSUP 104 (SIMON ET AL., 1983). Die Kopienzahl und Stabilität des Vektors pZY 73 waren gegenüber den pPTZ-Expressionsvektoren (REYNEN, Dissertation 1988) erhöht. Eine Retransformation von *E.coli*-Stämmen mit Plasmid-DNA aus transkonjuganten *Z.mobilis*-Stämmen ergab bei Vektoren, die einen pSUP 104-Anteil besitzen wie pZY 73 10 mal mehr Retransformanden als bei pPTZ-Vektoren (eigene

Ergebnisse; WILDEN, Diplomarbeit 1990). Die Anzahl der Retransformanden kann dabei als Maß für die Kopienzahl eines Plasmids in der Zelle gewertet werden. In Plasmidpräparationen von *Z.mobilis*/pSUP 104 bzw. pZY 73 Transkonjuganden war außerdem bei Trennung der Plasmid-DNA auf einem Agarosegel, die pSUP 104 bzw. pZY 73 Bande deutlich zu erkennen (eigene Ergebnisse; WILDEN, Diplomarbeit, 1990). Bei pPTZ-Vektoren war die Detektion auf einem Agarosegel dagegen nur mit Hilfe einer Sonde in einer Hybridisierung nach Southern möglich (REYNEN, Dissertation 1988). Die hohe Kopienzahl des Vektors pZY 73 in *Z.mobilis* ist auf die Replikationsfunktionen mit weitem Wirtsbereich (*oriV*) des Ursprungsplasmids RSF 1010 (GUERRY ET AL., 1974), das als Plasmid hoher Kopienzahl eingestuft wird (BAGDASARIN ET AL., 1981), zurückzuführen.

Auffällig war die hohe Ala-DH-Aktivität von 11,2 U/mg Protein in S17-1/pZY 73, obwohl das *alaD*-Gen sich auch in diesem Plasmid in Leserichtung des *pdc*-Promotors befand. Hierfür ist wahrscheinlich der *cat*-Promotor verantwortlich, der noch vor dem *pdc*-Promotor lokalisiert ist, denn befand sich das Eco RI-Fragment in der anderen Orientierung (pZY 74), so war die Aktivität 100-fach herabgesetzt. SHAW beschrieb die Erhöhung der CAT-Syntheserate bei konstitutiver Genexpression nach Erhöhung der Kopienzahl des Trägerplasmids des *cat*-Gens (SHAW, 1975). Der Vektor pZY 73 lag aufgrund seines pACYC 184-Anteils, eines Plasmids, das als "high copy vector" beschrieben wird (CHANG UND COHEN, 1978), in mittlerer Kopienzahl in der *E.coli*- und *Z.mobilis*-Zelle vor. Die Anzahl der Retransformanden nach einer Transformation kompetenter *E.coli*-Zellen mit Plasmidpräparationen aus S17-1/pZY 73 und CP4/pZY 73 war 10-20 mal so hoch wie mit Präparationen aus pPTZ-Transformanden bzw. Transkonjuganden. Dieser Kopienzahleffekt allein kann die hohe Aktivität in *E.coli* jedoch nicht erklären, denn die Ala-DH-Aktivität in ED 8767/pZY 70 Rohextrakten, in denen sich das *alaD*-Gen hinter dem *lac*-Promotor des Plasmids pUC 19 befand, betrug die Ala-DH-Aktivität unter nicht induzierenden Bedingungen nur etwa 0,9 U/mg Protein. Das 2,6 kB Plas-

mid pUC 19 aber gehört ebenfalls zu den Vektoren, die in sehr hohen Kopienzahlen in der Zelle vorkommen (VIEIRA UND MESSING, 1982).

Bemerkenswert war darüberhinaus die Stabilität des Vektors pZY 73 in *Z.mobilis*. 60 Generationen lang wurde das Plasmid ohne Selektionsdruck stabil weitergegeben. Während dieser Zeit fanden keine Rekombinationsereignisse mit kryptischen Plasmiden oder dem Chromosom in *Z.mobilis* statt. Diese Tatsache läßt eine Kultivierung ohne den Zusatz eines Antibiotikums zu, was neben der Kostenersparnis auch eine leichtere Reinigung des Alanins ermöglicht. In pPTZ-Transkonjuganden ging dagegen bei Wachstum ohne Antibiotikum pro Generationszeit in 10 % der Zellen das Plasmid verloren (REYNEN, Dissertation 1988; eigene Ergebnisse) und bereits nach wenigen Generationen hatte sich das Plasmidmuster infolge von Rekombination über den homologen Teil des Vektors zu dem kryptischen Plasmid pZMO2 stark verändert (REYNEN, Dissertation 1988; REIPEN, Diplomarbeit 1989; WILDEN, Diplomarbeit 1990; eigene Ergebnisse). In dem Plasmid pZY 53 (pPTZ 1-*alaD B.stearothermophilus*) kam es dabei zu Rekombinationsereignissen, die auch das *alaD*-Gen betrafen und in einer Verminderung der Ala-DH-Aktivität in CUL-Rif2/pZY 53 Kulturen resultierten.

Aufgrund seiner speziellen Mobilisationsfunktionen (*mob*, *oriT*) konnte pZY 73 mit einer Frequenz von 10^{-4} - 10^{-5} in CP4-Stämme eingeführt werden; pPTZ-Vektoren ließen sich dagegen nicht in diesen Stamm konjugieren. Die Verwendung von CP4 war aber wichtig für die Steigerung der Alaninbildung mit *Zymomonas*, da in internen Poolmessungen gezeigt werden konnte, daß in transkonjuganten CUL-Rif2-Stämmen die Alanausscheidung durch den Exkretionsvorgang limitiert wurde und sich dieser Stamm daher nicht zur Alaninproduktion eignete.

Das *alaD*-Gen konnte als Kpn I-Fragment aus dem Vektor pZY 73 entfernt werden, so daß das Plasmid für den Transfer weiterer Gene nach *Z.mobilis* verwendet werden kann. Im

Augenblick wird versucht, mit Hilfe dieses neuen Expressionsvektors die Expression der Xylose-Gene Xyloseisomerase und Xylulokinase aus *Klebsiella* in CP4 zu erhöhen und zu stabilisieren (FELDMANN, persönliche Mitteilung).

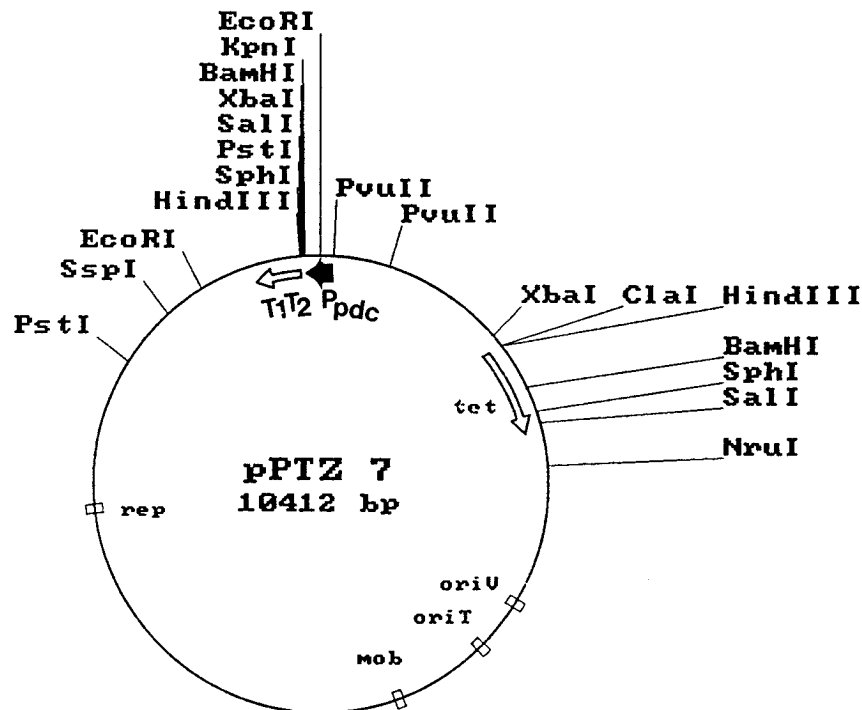


Abbildung IV.1.: Expressionsvektor pPTZ 7

Ppdc: Promotor des Pyruvatdecarboxylase-Gens; T1T2: Terminator des *rrnB*-Gens aus *E.coli*; oriV: vegetativer Replikationsursprung; oriT: Transfer Replikationsursprung; rep: Replikationsursprung; mob: Mobilisationsfunktionen; tet: Tetracyclinresistenz-Gen

In *E.coli*-Stämmen konnten mit dem Vektor pZY 73 Ala-DH-Aktivitäten von 11 U/mg Protein erzielt werden, was einem Anteil der Ala-DH am Zellextrakt von 7 % entsprach. Solche hohen Ausbeuten an Ala-DH konnten bisher weder mit einem *Bacillus*- noch mit einem rekombinanten *E.coli*-Stamm erzielt werden (NAGATA ET AL., 1989; KURODA ET AL., 1990), so daß sich diese Stämme hervorragend zur Produktion des Enzyms eignen.

Alanindehydrogenase und Pyruvatdecarboxylase konkurrieren in rekombinanten *Z.mobilis*-Zellen um das gemeinsame Substrat Pyruvat. Da die PDC-Aktivität 6-8 mal höher ist als die Ala-DH-Aktivität in CP4/pZY 73 (BRINGER-MEYER ET AL., 1986) und die Affinität der PDC zum Pyruvat darüberhinaus größer ist (K_m -Wert = 0,4 mM, BRINGER-MEYER ET AL., 1986) als die der Ala-DH (K_m -Wert = 1,7 mM, OHASHIMA UND SODA, 1979), wird der wesentliche Teil des Pyruvats in rekombinanten *Z.mobilis*-Stämmen über Acetaldehyd zu Ethanol umgesetzt.

Die Eliminierung der PDC durch Transposonmutagenese gelang nicht, da das verwendete Vektorsystem für eine Transposonmutagenese in *Z.mobilis* nicht geeignet war. Der Suizidvektor pRK 2013::Tn 1725-*alaD* konnte nur mit einer Frequenz von 10^{-8} Rezipienten pro Donorzelle in CUI-Rif2 eingeführt werden. Ausgehend von einer Transpositionsfrequenz von Tn 1725-*alaD* von 10^{-3} (dieser Wert wurde von UBBEN UND SCHMITT (1986) für ein *E.coli*-System mit Tn 1725 und dem Plasmid pUR 222 als Zielplasmid angegeben) müßten mindestens 1000 Transkonjuganden zur Verfügung stehen, um ein Transpositionseignis zu erhalten. Da pro Konjugationsansatz im Durchschnitt nur zwei Transkonjuganden detektiert werden konnten, müßten demnach 500 Kreuzungen durchgeführt werden, um ein Transpositionseignis wahrscheinlich zu machen. Erschwerend kommt ferner hinzu, daß der *Z.mobilis*-Stamm CUI-Rif2 5 kryptische Plasmide enthält (DRAINAS ET AL., 1983; SKORDAKI UND DRAINAS, 1987) auf die das Transposon präferentiell transponiert (UBBEN UND SCHMITT, 1986). Bevor eine Transposonmutagenese in *Z.mobilis* Aussicht auf Erfolg hat, muß deshalb ein Konjugationssystem entwickelt werden, durch das Konjugationsfrequenzen von mindestens 10^{-3} erreicht werden. Der Suizidvektor sollte darüberhinaus ein temperatursensitives Replikon besitzen, so daß der Verlust des Plasmids durch eine Erhöhung der Inkubationstemperatur der Kultur gesteuert werden kann. Der Vektor pRK 2013 ging nämlich erst nach zweiwöchiger Kultur unter nicht selektiven Bedingungen verloren.

IZUMI und Mitarbeiter und YAKOTA und TAKAO beschrieben die Pyruvatproduktion von thiaminauxotrophen *Acetobacter*- (IZUMI ET AL., 1982) bzw. *Enterobacter*-Stämmen (YOKOTA UND TAKAO, 1989). Die in dieser Arbeit zur Alaninbildung verwendete thiaminauxotrophe *Z.mobilis* Mutante ermöglicht eine direkte Einflußnahme auf die Pyruvatdecarboxylase Reaktion über die Thiaminkonzentration des Mediums und bietet daher gegenüber der unregelmäßigen Ausschaltung des Enzyms einige Vorteile. Die PDC nimmt eine zentrale Rolle im Stoffwechsel von *Z.mobilis* ein (BRINGER-MEYER ET AL., 1986), die wahrscheinlich nicht durch Einführung eines heterologen Proteins, das zudem unter anderen physiologischen Bedingungen arbeitet, zu ersetzen ist. ANDERSEN UND MEYENBURG entwarfen das Konzept des katabolischen Reduktions-"charges", definiert als das Verhältnis von $\text{NADH}/(\text{NADH}+\text{NAD})$, das einen regulatorischen Einfluß auf den zellulären Metabolismus ausübt (ANDERSEN UND MEYENBURG, 1977). Die NADH-abhängige Ala-DH würde dieses streng regulierte Gleichgewicht stören, falls sie den Stoffwechselfluß nicht in gleichem Maße aufrechterhalten kann wie die PDC. Da die Ala-DH-Aktivität jedoch mindestens um den Faktor 6-8 geringer ist als die PDC-Aktivität und die Affinität zu Pyruvat darüberhinaus geringer ist, ist dieses zu erwarten. Rekombinante, *pdc*-negative Stämme wären in ihrem Wachstum sicherlich stark eingeschränkt. Bei Verwendung der thiaminauxotrophen Mutante CP4-thi konnten in Kompletmedium dagegen hohe Zelldichten für die Alaninbildung problemlos angezogen werden.

Die PDC-Aktivität konnte durch Anzucht unter Thiaminmangel von 3,2 U/mg Trockengewicht auf 0,24 U/mg Trockengewicht gesenkt werden. Eine weitere Reduzierung war nicht möglich, da die Bindung zwischen Thiaminpyrophosphat (TPP) und der Pyruvatdecarboxylase sehr stark ist (BRINGER-MEYER ET AL., 1986) und daraus resultierend die Konzentration an TPP nur in Verbindung mit einer Zellteilung verringert werden kann. Das Coenzym ließ sich bei dem gereinigten Enzym nur nach langer Dialyse entfernen (BRINGER-MEYER ET AL., 1986). KRAMPITZ (1969) beschreibt eine extrem langsame Dissoziation des Thiaminpyrophosphates (TPP) von der PDC und gibt

an, daß die Wechselzahl des TPP praktisch Null sei. Das PDC-Apoenzym besitzt darüberhinaus eine hohe Affinität gegenüber seinem Coenzym, der K_m -Wert beträgt 24 μM (BRINGER-MEYER ET AL., 1986), so daß bereits geringe Konzentrationen an Thiaminpyrophosphat ausreichen, um das PDC-Holoenzym zu bilden. ULLRICH und Mitarbeiter beschreiben eine Induktion der Synthese der Pyruvatdecarboxylase in Hefe durch Thiamin (ULLRICH ET AL., 1968). In *Zymomonas* existiert dieser Mechanismus offensichtlich nicht, denn durch Zugabe von TPP zum Enzymtest konnte die PDC-Aktivität selbst in Ansätzen, die 10 Tage unter Thiaminmangel inkubiert wurden, voll wiederhergestellt werden, d.h. die Menge an Apoenzym war konstant geblieben. Der Proteinanteil funktioneller PDC unterlag also auch nicht dem proteolytischen Abbau, sondern war ohne Coenzym stabil.

Die direkte Korrelation zwischen Abnahme der PDC-Aktivität und Zellteilung zeigt die exakte Verteilung des TPPs auf die Zellen und damit die Abhängigkeit der Reduzierung des TPPs von einem Teilungsprozeß. Da TPP aber auch Coenzym weiterer wichtiger Enzyme wie der Transketolase und der Acetolaktatsynthase ist (STRYER, 1985; UMBARGER, 1978), stellte sich das Wachstum bedingt durch den Mangel an Produkten dieser Enzyme nach zwei Zellteilungen ein. Der Versuch, durch Zufüttern der entsprechenden Aminosäuren und der Nukleotide Adenin und Guanin die Wachstumsphase zu verlängern, scheiterte wahrscheinlich daran, daß die Substanzen von *Z.mobilis*-Zellen teilweise nicht aufgenommen werden konnten. Einer weiteren Reduzierung des TPPs in den Zellen ist durch die Abhängigkeit von der Zellteilung somit eine Grenze gesetzt.

Durch Anpassung von Medium-pH, Ammoniumkonzentration des Mediums und Inkubationstemperatur an die Reaktionsbedingungen der Ala-DH konnte die Alaninausscheidung transkonjuganter *Z.mobilis*-Stämme gegenüber Kultivierungen bei 30°C in Mineralsalzmedium pH 5,5 mit 15 mM Ammonium um den Faktor 6-8 gesteigert werden. In dem optimierten Medium

wurden von CP4-thi/pZY 73 bis zu 84 mM Alanin aus 5 % Glukose und 100 mM Ammonium gebildet, was einem Anteil von ca. 15 % an der C-Quelle entspricht. Ein Wachstum der Zellen fand in dem Alaninbildungsmedium aufgrund der hohen Ammonium- und Acetat-Konzentrationen nicht mehr statt, d.h. die Produktion war vom Wachstum entkoppelt. Bakterien besitzen ein spezielles Aufnahmesystem für NH_4^+ (KLEINER, 1981), doch bei hohen Ammoniumkonzentrationen permeiert NH_3 ungehindert in die Zelle (CASTORPH UND KLEINER, 1984). Bekannt ist, daß hohe Ammoniumkonzentrationen in *Zymomonas*-Kulturen zu einer Wachstumshemmung und einer Entkopplung des Wachstums von der Ethanolproduktion führen, dessen Mechanismus bisher allerdings ungeklärt ist (AGRAWAL, 1989). Auch Acetat, das als Gegenion des NH_4^+ in den Kultivierungen eingesetzt worden war, inhibiert das Wachstum von Bakterien (FREESE ET AL., 1973; FREESE, 1978; HERRERO ET AL., 1985) durch Entkopplung des elektrochemischen Potentialenpotentials über die Zellmembran, was eine Hemmung energieabhängiger Prozesse an der Membran bewirkt (RACKER, 1976; FINEAN ET AL., 1978).

Als limitierende Faktoren der Umsetzung von Pyruvat zu Alanin wirkten sich die gegen Ende der Kultivierung stetig abnehmende Ammoniumkonzentration und die sich verringernde Aktivität der Ala-DH in Alaninbildungsmedium aus. Messungen der Ala-DH-Aktivität im Verlauf einer Kultivierung in Alaninbildungsmedium zeigten, daß die Ala-DH-Aktivität zum Ende der Kultivierung deutlich absank, ein Effekt der in Mineralsalzmedium, in dem höchstens ein fünftel der Alaninmenge wie in Alaninbildungsmedium gebildet wurde, nicht zu beobachten war. Eine Regulation über Attenuation wie für das *trp*-Operon in *E.coli* beschrieben (YANOFSKY, 1981) scheidet schon aufgrund der biologischen Funktion der Ala-DH als kataboles Enzym in *Bacillus* aus. Keimenden Sporen von *Bacillus* ermöglicht die Ala-DH das Wachstum auf L-Alanin (O'CONNOR UND HALVORSON, 1959). Außerdem sind weder ein Stop-Codon noch die Möglichkeit der Bildung einer Terminationsschleife in den *alaD*-Genen vorhanden. YOSHIDA UND FREESE beschreiben eine kompetitive Hemmung der Ala-DH aus

B. subtilis (YOSHIDA UND FREESE, 1965) durch D-Aminosäuren, doch konnte dieser Befund für die Ala-DH aus *B. sphaericus* nicht bestätigt werden (OHASHIMA UND SODA, 1979). Produktinhibierung durch Alanin ist ebenfalls auszuschließen, da durch Bestimmung der internen Aminosäurekonzentrationen deutlich wurde, daß die Ala-DH-Aktivität bei den höchsten internen Alaninkonzentrationen von 266-240 mM ebenfalls am höchsten war. Das Gleichgewicht der Reaktion liegt darüberhinaus weit auf Seiten der Alaninbildung (YOSHIDA UND FREESE, 1965), so daß auch eine Umkehr der Reaktion in Richtung Pyruvat unwahrscheinlich ist.

In internen Poolmessungen konnte ferner gezeigt werden, daß es in CP4-thi/pZY 73 zu Beginn der Kultivierung zu einem Anstau von Alanin in den Zellen kam (bis zu 266 mM), der Alaninexport in dieser Phase der Kultivierung also der limitierende Faktor war. Bis zum Ende der Kultivierung nimmt die interne Alaninkonzentration kontinuierlich ab, das heißt, die abnehmende Ala-DH-Aktivität begrenzte jetzt die Menge an ausgeschiedenem Alanin. Diese Befunde implizieren, daß nicht unbedingt eine Steigerung der Ala-DH-Aktivität, sondern eine Stabilisierung der Aktivität des Enzyms zu einer erhöhten Alaninausscheidung transkonjuganter *Z. mobilis*-Zellen führen sollte. Da die Aktivitätskurven von Ala-DH und PDC in Alaninbildungsmedium parallel abnehmen, ist der Aktivitätsverlust durch einen Einfluß auf die Proteinbiosynthese denkbar. In Alaninbildungsmedium, in dem das Membranpotential durch die entkoppelnden Substanzen Acetat und Ammonium gestört wurde, muß die Zelle Energie aufwenden, um das Membranpotential aufrechtzuerhalten. Da *Zymomonas* ohnehin energielimitiert ist (SWINGS UND DELEY, 1977), fehlt diese zusätzlich aufzubringende Energie bei der Proteinbiosynthese. Diese Hypothese könnte in Einbauversuchen mit radioaktivem Methionin untersucht werden.

Eine Optimierung der Kultivierungsbedingungen sollte in Zukunft auf die Verwendung eines Ammoniostaten abzielen, bei dem der pH-Wert des Mediums durch Ammoniak eingestellt wird. Die Ammoniumkonzentration könnte so, ohne daß die

Zelle zusätzlich durch ein Gegenion gehemmt wird, reguliert werden.

Für die Alaninausscheidung von *Z.mobilis* mußte ein Transportmechanismus postuliert werden. Während Ethanol die Cytoplasmamembran ungehindert passieren kann, also über Diffusion in das Außenmedium gelangt (JONES, 1988), war dieser Mechanismus für die Ausschleusung von Alanin nicht zu erwarten, da es sonst zu einem Verlust von zuvor aufwendig synthetisierten Aminosäuren in der Zelle käme. Über den Alanintransport in Mikroorganismen gibt es zur Zeit nur wenige Untersuchungen, die sich auf Alanin-Aufnahmesysteme beschränken. In *Rhodobacter sphaeroides* existiert ein Binde-Protein-abhängiges Alanintransport-System, das durch den internen pH-Wert reguliert wird (ABEE ET AL., 1989). In *E.coli* wird Alanin durch einen Symport-Mechanismus mit einem Proton zusammen in die Zelle aufgenommen (COLLINS ET AL., 1976). Über spezifische Aminosäure-Effluxsysteme wurde erst in jüngster Zeit berichtet. So wurden für das grampositive Bakterium *Corynebacterium glutamicum* spezifische Efflux-Carrier Systeme für die Aminosäuren Isoleucin und Glutamat gefunden, die von den entsprechenden Aufnahmesystemen eindeutig abgegrenzt werden konnten (EBBIGHAUSEN ET AL., 1989; HOISCHEN UND KRÄMER, 1989).

In *Z.mobilis* konnte nach Bestimmung konstanter Cytoplasmavolumina und eines Glutamat- und Kaliumgradienten während der Hauptbildungsphase von Alanin gezeigt werden, daß der Alanin-Sekretionsvorgang über eine intakte Membran verlief, die Zellen in Alaninbildungsmedium also nicht artifiziell permeabilisiert wurden. Die Ausscheidung von Alanin konnte dabei aufgrund der Sättigbarkeit des Transportssystems nicht durch einen reinen Diffusionsprozeß erklärt werden, sondern nur durch einen Carrier-vermittelten Transport, der vom Alaninkonzentrationsgradienten getrieben wurde. Bei hohen internen Alaninkonzentrationen, wie sie zu Beginn einer Kultivierung mit CP4-thi/pZY 73 in Alaninbildungsmedium beobachtet werden konnten, war dieser Sekretionsvorgang limitierend für die Alaninbildung mit CP4. Alanin-

bildung mit intakten Zellen ist derjenigen mit permeabilisierten Zellen trotzdem vorzuziehen, da permeable Zellen einen kontinuierlichen Verlust an Cofaktoren (NAD^+/NADH) erleiden würden, die ständig ergänzt werden müßten. Da die Alaninausscheidung nur bis zum Ausgleich des Konzentrationsgradienten zwischen internem und externem Alanin erfolgte, konnte die ausgeschiedene Menge an Alanin nicht die höchste interne Alaninkonzentration überschreiten. Für die Alaninbildung mit CP4-thi/pZY 73 bedeutet das einen Grenzwert von ca. 270 mM Alanin, solange die interne Alaninkonzentration nicht erhöht wird. Die mit CP4-thi/pZY 73 erzielten maximalen Ausscheidungsraten von 238 nmol/min•mg Trockengewicht liegen dabei um den Faktor 10 höher als die maximalen Ausscheidungsraten von 21 nmol/min•mg Trockengewicht des klassischen Aminosäureproduzenten *Corynebacterium glutamicum*, die bei der Ausscheidung von Glutamat gemessen werden konnten (HOISCHEN UND KRÄMER, 1989).

Weiterführende Untersuchungen könnten jetzt die Abhängigkeiten und die Regulationsmechanismen des Alanintransportsystems aus *Z.mobilis* aufklären.

Zymomonas mobilis war bisher für seine guten Ethanolproduktioneigenschaften bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals gezeigt, daß sich ein neues, höherwertiges Produkt als Ethanol, nämlich die Aminosäure L-Alanin, mit rekombinanten *Z.mobilis*-Zellen herstellen läßt. Das entwickelte Verfahren eröffnet darüberhinaus Aussichten, die Alaninbildung mit diesem Organismus durch Optimierung der Kultivierungsbedingungen weiter zu verbessern.

V. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Stoffwechselfluß des ethanolproduzierenden Bakteriums *Z.mobilis* durch Einführung eines L-Alanindehydrogenasegens (*alaD*-Gen) in Richtung L-Alaninbildung umzulenken.

1. Es wurden verschiedene Vektoren für *Z.mobilis* konstruiert, durch die das *alaD*-Gen mit Hilfe des *Zymomonas*-eigenen Pyruvatdecarboxylase-Promotors (*pdc*-Promotor) transkribiert wurde. Als *alaD*-Gen wurde zunächst das Gen aus dem thermophilen *Bacillus*-Stamm *B.stearothermophilus* verwendet. Im Laufe der Arbeit wurde außerdem ein *alaD*-Gen aus dem mesophilen Stamm *B.sphaericus* kloniert (*alaDsp*), das besser zur Alaninbildung in *Z.mobilis* geeignet war. Dieses Gen führte auf dem Vektor pZY 73 zu einer Alanindehydrogenase-Aktivität (Ala-DH-Aktivität) von etwa 1 U/mg Protein in dem *Z.mobilis*-Stamm CP4. In *E.coli*/pZY 73 Transformanten betrug die Ala-DH-Aktivität etwa 11 U/mg Protein.

2. Die Aktivität der thiaminpyrophosphatabhängigen Pyruvatdecarboxylase (PDC), des Konkurrenzzyms der Ala-DH um das gemeinsame Substrat Pyruvat, wurde durch die Verwendung einer thiaminauxotrophen Mutante CP4-thi verringert. Die Mutante konnte ohne Thiaminzusatz im Medium kein Thiaminpyrophosphat mehr synthetisieren. Die PDC-Aktivität wurde durch 16 h Kultivierung unter Thiaminmangel von 3,2 U/mg Trockengewicht auf 0,8 U/mg Trockengewicht gesenkt. Von CP4-thi/pZY 73-Zellen wurden in 26 h nach einer 20-stündigen Inkubation unter Thiaminmangel 84 mM Alanin in Medium mit 5 % Glukose und 100 mM Ammonium ausgeschieden.

3. Durch Anpassung der Kultivierungsbedingungen an die Aminierungsreaktion der Ala-DH konnte die Alaninausscheidung der transkonjuganten *Z.mobilis*-Stämme gegenüber Kultivierungen in herkömmlichen Mineralsalzmedien auf das 6-20-fache gesteigert werden. So schied CP4/pZY 73 bei 30°C in Mineralsalzmedium pH 5,5 mit 5 % Glukose und 15 mM Ammo-

niumsulfat 10 mM Alanin aus, bei 37°C in Mineralsalzmedium pH 7,0 mit 5 % Glukose, 15 mM Ammoniumsulfat und 85 mM Ammoniumacetat waren es 64 mM, wobei der L-Alaninanteil 97 % betrug.

4. Durch Ermittlung interner und externer Kaliumkonzentrationen konnte gezeigt werden, daß die Cytoplasmamembran während der Alaninbildungsphase intakt war. Nach Bestimmung der internen und externen Aminosäurekonzentrationen und der Cytoplasmavolumina in transkonjuganten Stämmen zeigte sich weiterhin, daß Alanin über einen Carrier-vermittelten Transport, der vom Alaninkonzentrationsgradienten getrieben wird, sekretiert wird.

VI. Literaturverzeichnis

- ABEE, T., VAN DER WAL, F.-J., HELLINGWERF, K., KONINGS, W.N. (1989) Binding-protein-dependent alanine transport in *Rhodobacter sphaeroides* is regulated by the internal pH. J. Bacteriol. 171: 5148-5154
- AFENDRA, A.S. UND DRAINAS, C. (1987) Expression and stability of a recombinant plasmid in *Zymomonas mobilis* and *Escherichia coli*. J. Gen. Microbiol. 133: 127-134
- AGRAWAL, P. (1989) Growth inhibition of *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 by ammonium ions. Biotechn. Bioeng. 34: 278-281
- AHARONOWITZ, Y. UND FRIEDRICH, C.G. (1980) Alanine dehydrogenase of the β -lactam antibiotic producer *Streptomyces clavulgerus*. Arch. Microbiol. 125: 137-142
- ALTENBUCHNER, J., SCHMID, K., SCHMITT, R. (1983) Tn1721-encoded tetracycline resistance: mapping of structural and regulatory genes mediating resistance. J. Bac. 153: 116-123
- ANDERSEN, K.B. UND MEYENBURG, K. (1977) Charges of nicotinamide adenine nucleotides and adenylate energy charge as regulatory parameters of the metabolism in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 252: 4151-4156
- BACHMANN, B.J. UND LOW, K.B. (1980) Linkage map of *Escherichia coli* K-12, Edition 6. Microbiol. Rev. 44: 1-56
- BAGDASARIN, M., LURZ, R., RUCKERT, B., FRANKLIN, F.C.H., BAGDASARIN, M.M., FREY, J., TIMMIS, K.N. (1981) Specific-purpose plasmid cloning vectors II. Broad host range, high copy number RSF 1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. Gene 16: 237-247
- BELLION, E. UND TAN, F. (1987) An NAD⁺-dependent alanine dehydrogenase from a methylotrophic bacterium. Biochem. J. 244: 565-570
- BERGMEYER, H.U., BERNT, E., SCHMIDT, F., STORK, H. (1974) Glukosetest. In: Bergmeyer (ed) Methoden der enzymatischen Analyse II VCH Weinheim 1241-1246
- BIRNBOIM, H.C. UND DOLY, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7: 1513-1523

- BOYER, H.W. UND ROULLAND-DUSSOIX, D. (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 41: 459-472
- BRADFORD, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254
- BRÄU, B. UND SAHM, H. (1986) Cloning and expression of the structural gene for pyruvat decarboxylase of *Zymomonas mobilis* in *Escherichia coli*. Arch. Microbiol. 144: 296-301
- BRINGER, S., FINN, R.K., SAHM, H. (1984) Effect of oxygen on the metabolism of *Zymomonas mobilis*. Arch. Microbiol. 139: 376-381
- BRINGER-MEYER, S., SCHIMZ, K.-L., SAHM, H. (1986) Pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. Isolation and partial characterization. Arch. Microbiol. 146: 105-110
- BRESTIC-GOACHET, N., GUNASEKARAN, P., CAMI, B., BARATTI, J. (1989) Transfer and expression of an *Erwinia chrysanthemi* cellulase gene in *Zymomonas mobilis*. J. Gen. Microbiol. 135: 893-902
- BRESTIC-GOACHET, N., GUNASEKARAN, P., CAMI, B., BARATTI, J. (1990) Transfer and expression of a *Bacillus lichiniiformis* α -amylase gene in *Zymomonas mobilis*. Arch. Microbiol. 153: 219-225
- BROSIUS, J. UND HOLY, A. (1984) Regulation of ribosomal RNA promoters with a synthetic lac operator. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6929-6933
- BROWNE, G.M., SKOTNICKI, M.L., GOODMAN, A.E., ROGERS, P.L. (1984) Transformation of *Zymomonas mobilis* by a hybrid plasmid. Plasmid 12: 211-214
- BUCHHOLZ, S.E., DOOLEY, M.M., EVELEIGH, D.E. (1987) *Zymomonas*-an alcoholic enigma. TIBTECH 5: 199-203
- BUCHHOLZ, S.E., DOOLEY, M.M., EVELEIGH, D.E. (1989) Growth of *Zymomonas* on lactose: gene cloning in combination with mutagenesis. J. Ind. Microbiol. 4: 19-27
- BUYN, M.O.-K., KAPER, J.B., INGRAM, L.O. (1986) Construction of a vector for the expression of foreign genes in *Zymomonas mobilis*. J. Industr. Microbiol. 1: 9-15

- CABALLERO, F.J., CARDENAS, J. CASTILLO, F. (1989) Purification and properties of L-alanine dehydrogenase of the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus* ElF1. J. Bacteriol. 171: 3205-3210
- CARDENAS, J., CABALLERO, F.J., MORENO-VIVIAN, C., CASTILLO, F. (1987) Enzymology of ammonia assimilation in purpur nonsulfur bacteria. In: Ullrich, W., Aparicio, P.J., Syrett, P.J. Castillo, F. (eds.). Inorganic nitrogen metabolism. Springer Verlag, Berlin 148-153
- CAREY, V.C., WALIA, S.K., INGRAM, L.O. (1983) Expression of a lactose Transposon (*Tn951*) in *Zymomonas mobilis*. Appl. Env. Microbiol. 46: 1163-1168
- CASTORPH, H. UND KLEINER, D. (1984) Some properties of a *Klebsiella pneumoniae* ammonium transport negative mutant (Amt^-). Arch. Microbiol. 13: 245-247
- CHANG, A.C.Y. UND COHEN, S.N. (1978) Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid, J. Bacteriol. 134: 1141-1156
- CLEWELL, D.B. (1972) Nature of ColE1 plasmid replication in *Escherichia coli* in the presence of chloramphenicol. J. Bacteriol. 110: 667-676
- COLLINS, S.H., JARVIS, A.W., LINDSAY, R.J., HAMILTON, W.A. (1976) Proton movements coupled to lactate and alanine transport in *Escherichia coli*. Isolation of mutants with altered stoichiometry in alanine transport. J. Bacteriol. 126: 1232-1244
- O'CONNOR, R. UND HALVORSON, H. (1959) Intermediate metabolism of aerobic spores. IV. Alanine deamination during the germination of spores of *Bacillus cereus*. J. Bacteriol. 78: 844-851
- CONWAY, T., OSMAN, Y.A., KONNAN J.I., HOFFMANN, E.M., INGRAM, L.O. (1987a) Promotor and nucleotide sequences of the *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase. J. Bacteriol. 169: 949-954
- CONWAY, T., SEWELL, G.W., OSMAN, Y.A. INGRAM, L.O. (1987b) Cloning and sequencing of the alcohol dehydrogenase II gene from *Zymomonas mobilis*. J. Bacteriol. 169: 2591-2597
- CROWN, V.L. (1987) Properties of alanine dehydrogenase and aspartase from *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*. Appl. Environ. Microbiol. 53: 1885-1892
- DRAINAS, C., SLATER, A.A., COGGINS, L., MONTAGUE, P., COSTA, R.G., LEDINGHAM, W.M., KINGHORN, J.R. (1983) Electron microscopic analysis of *Zymomonas mobilis* strain ATCC 10988 plasmid DNA. Biotechnol. Letters 5: 405-408

- EBBIGHAUSEN, H., WEIL, B., KRÄMER, R. (1989) Isoleucine excretion in *Corynebacterium glutamicum*: evidence for a specific efflux carrier system. Appl. Microbiol. Biotechnol. 31: 184-190
- ENTNER, N UND DOUDOROFF, M. (1952) Glucose and gluconic acid oxidation of *Pseudomonas saccharophila*. J. Biol. Chem. 196: 853-862
- EVELEIGH, D.E., STOKES, H.W., DALLY, E.L. (1983) Recombinant DNA approaches for enhancing the ethanol productivity of *Zymomonas mobilis*. In: Wise, D.L. (ed) Organic chemicals from biomass. The Benjamin/Cummings Publishing Company, London 70-91
- FEIN, J.E., CHARLEY, R.C., HOPKINS, K.A., LAVERS, B., LAWFORD, H.G. (1983) Development of a simple defined medium for continuous ethanol production by *Zymomonas mobilis*. Biotechnol. Letters 5: 1-6
- FEINBERG, K. UND VOGELSTEIN, R. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal. Biochem. 132: 6-13
- FIGURSKI, D.H. UND HELINSKI, D.R. (1979) Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 1648-1652
- FINEAN, J.B., COLEMAN, R., MITCHELL, R.H. (1978) Membranes and their cellular functions. Halsted Press, John Wiley and Sons, New York
- FINN, R.K., BRINGER, S., SAHM, H. (1984) Fermentation of arabinose to ethanol by *Sarcina ventriculi*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 19: 161-166
- FINNEGAN, J. UND SHERRAT, D.J. (1982) Plasmid ColE1 conjugal mobility: the nature of *bom*, a region required in cis for transfer. Mol. Gen. Genet. 185: 344
- FREESE, E., SHEU, C.W., GALLIERSI, E. (1973) Function of lipophilic acids as microbial food additives. Nature 241: 321-325
- FREESE, E. (1978) Mechanism of growth inhibition by lipophilic acids. In: Kabara, J.J. (ed), Symposium on the pharmacological effect of lipids. American Oil Chemists' Society, Illinois
- FRIEDMAN, A.M., LONG, S.R., BROWN, S.E., BIIKEMA, W.J., AUSUBEL, F.M. (1982) Construction of a broad host range cosmid vector and its use in the genetic analysis of *Rhizobium* mutants. Gene 18: 289-296

- GERMANO, G.J. UND ANDERSON, K.E. (1968) Purification and properties of L-alanine dehydrogenase from *Desulfovibrio desulfuricans*. J. Bacteriol. 96: 55-60
- GOLDMANN, D.S. (1959) Enzyme systems in the *mycobacteria*. VII. Purification, properties and mechanism of action of alanine dehydrogenase. Biochim. Biophys. Acta 34: 527-539
- GOODMAN, A.E., STRZELECKI, A.T., ROGERS, P.L. (1984) Formation of ethanol from lactose by *Zymomonas mobilis*. J. Biotechnol. 1: 219-228
- GONCALVES DE LIMA, O., DE ARAUJO, J.M., SCHUMACHER, I.F., CAVALCANTI DA SILVA, E. (1970) Estudos de microorganismos antagonistas presentes nas bebidas fermentadas usadas pelo povo do Recife I Sobre uma variedade de *Zymomonas mobilis* (Lindner)(1928). Revista do Instituto de Antibioticos Universidade do Recife 10: 3-15
- GOTTSCHALK, G. (1986) Bacterial metabolism, Springer Verlag, New York, 210-280
- GRÄFE, U., BOCKER, H., REINHARDT, G., TKOCS, H., THRUM, H. (1974) Alanin Dehydrogenaseaktivität und Antibiotikumbildung in Kulturen des *Streptomyces hygroscopicus* JA 6599. Z. allg. Mikrobiol. 14: 181-192
- GRÖGER, U. (1986) Mikrobielle Gewinnung von L-Leucin aus α -Ketoisocapronsäure. Dissertation Universität Düsseldorf
- GRUNSTEIN, M. UND HOGNESS, D.S. (1975) Colony hybridisation: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 3961-3965
- GUERRY, P., VAN EMBDEN, J., FALKOW, S (1974) Molecular nature of two non-conjugative plasmids carrying drug resistance genes. J. Bacteriol. 177: 619-630
- HANAHAN, D. (1983) Studies on the transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166: 557-580
- HELLEBUST, H., UHLEN, M., ENFORS, S.-O. (1989) Effect of protein fusion on the stability of proteolytically sensitive sites in recombinant DNA proteins. J. Biotechnol. 12: 275-284
- HENIKOFF, S (1984) Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. Gene 28: 351-359
- HERBERT, R.A., SIEFERT, E., PFENNIG, N. (1978) Nitrogen assimilation in *Rhodopseudomonas acidophila*. Arch. Microbiol. 119: 1-5

- HERRERO, A., GOMEZ, R.F., SNEDECOR, B., TOLMAN, C.J., ROBERTS, M.F. (1985) Growth inhibition of *Clostridium thermocellum* by carboxylic acids: A mechanism based on uncoupling by weak acids. Appl. Microbiol. Biotechnol. 23: 53-62
- HOHN, B. UND COLLINS, J. (1980) A small cosmid for efficient cloning of large DNA fragments. Gene 11: 291-298
- HOISCHEN, C., KRÄMER, R. (1989) Evidence for an efflux carrier system involved in the secretion of glutamate by *Corynebacterium glutamicum*. Arch. Microbiol. 151: 342-347
- HOPPNER, T.C. UND DOELLE, H.W. (1983) Purification and kinetic characteristics of pyruvate decarboxylase and ethanol dehydrogenase from *Zymomonas mobilis* in relation to ethanol production. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 17: 152-157
- INAGAKI, K., TANISAWA, K., BADET, B., WALSH, C., TANAKA, H., SODA, K. (1986) Thermostable alanine racemase from *Bacillus stearothermophilus*. Molecular cloning of the gene, enzyme purification, and characterization. Biochemistry 25: 3268-3274
- INGRAM, L.O. UND CONWAY, T. (1988) Expression of different levels of ethanologenic enzymes from *Zymomonas mobilis* in recombinant strains of *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 54: 397-404
- IZUMI, Y., MATSUMARA, Y., TANI, Y., YAMADA, H. (1982) Pyruvic acid production from 1,2-Propanediol by thiamin-requiring *Acinetobacter* sp. 80-M. Agric. Biol. Chem. 46: 2673-2679
- JOHANSSON, B.C. UND GEST, H. (1976) Inorganic nitrogen assimilation by the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas capsulata*. J. Bacteriol. 128: 683-688
- JONES, B.N. UND GILLIGAN, J.P. (1983) o-Phtalaldehyde precolumn derivatization and reversed-phase high-performance liquid chromatography of polypeptide hydrolysates and physiological fluids. J. Chromatogr. 266: 471-482
- JONES, R.P. (1988) Intracellular ethanol-accumulation and exit from yeast and other cells. FEMS Microbiol. Rev. 54: 239-258
- KERSTERS, K. UND DE LEY, J. (1968) The occurrence of the Entner-Doudoroff pathway in bacteria. Antonie van Leeuwenhoek; J. Microbiol. Serol. 31: 393-406
- KLEEMANN, A., LEUCHTENBERGER, W., HOPPE, B., TANNER, H. (1985) Amino acids. Ullmanns Encyclopedia of Industrial Chemistry 2A: 57-97

- KLEINER, D. (1981) The transport of NH_3 and NH_4^+ across biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **639**: 41-52
- KLINGENBERG, M., UND PFAFF, E. (1967) Means of terminating reactions. In: "Methods of Enzymology", Estabrook, P.W. (ed.) Pullman, Academic Press, New York, London, **10**: 3-7
- KRAMPITZ, L.O. (1969) Catalytic functions of thiamindiphosphat. *Annu. Rev. Biochem.* **38**: 213-240
- KURODA, S. (1986) Studies on cloning and sequence of genes of alanine dehydrogenase and leucine dehydrogenase from *Bacillus sphaericus*. Diplomarbeit, Kyoto University
- KURODA, S., TANIZAWA, K., SAKAMOTO, Y., TANAKA, H., SODA, K. (1990) Alanine dehydrogenase from two *Bacillus* species with distinct thermostabilities: molecular cloning, DNA and protein sequence determination, and structural comparison with other NAD(P)^+ -dependent dehydrogenases. *Biochemistry* **29**: 1009-1015
- LÄMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- LEJEUNE, A., EVELEIGH, D.E., COLSON, C. (1988) Expression of an endoglucanase gene of *Pseudomonas fluorescenz* var. *cellulosa* in *Zymomonas mobilis*. *FEMS Microbiol. Letters* **49**: 363-366
- LENNOX, E.S. (1955) Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. *Virology* **1**: 190-206
- LIU, C.-Q., GOODMAN, A.E., DUNN, N.W. (1988) Expression of cloned *Xanthomonas* D-Xylose catabolic genes in *Zymomonas mobilis*. *J. Biotechnol.* **7**: 61-70
- LUDWIG, R.A. (1987) Gene tandem-mediated selection of coliphage-receptive *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, und *Rhizobium* strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 3334-3338
- MANIATIS, T., FRITSCH, E.F., SAMBROOK, J. (1982) Molecular cloning; a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York
- MACCONKEY, A. (1905) Lactose fermenting bacteria in feas. *J. Hyg.* **5**: 333-378
- MCCORMICK, N.G. UND HALVORSON, H.O. (1964) Purification and properties of L-alanine dehydrogenase from vegetative cells of *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.* **87**: 68-74

- MCCOWEN, S.M. UND PHIBBS, P.V. (1974) Regulation of alanine dehydrogenase in *Bacillus licheniformis*. J. Bacteriol. 118: 590-597
- MEERS, J.L. UND PEDERSEN, L.K. (1972) Nitrogen assimilation by *Bacillus licheniformis* organisms growing in chemostat cultures. J. Gen. Microbiol. 70: 277-286
- MISAWA, N., OKAMOTO, T., NAKAMURA, K. (1988) Expression of a cellulase gene in *Zymomonas mobilis*. J. Biotechnol. 7: 167-178
- MISAWA, N., NAKAMURA, K. (1989) Expression and stability of a β -glucosidase gene of *Ruminococcus albus* in *Zymomonas mobilis*. Agric. Biol. Chem. 53: 723-727
- MONTECOURT, B.S. (1985) *Zymomonas* a unique genus of bacteria. In: Demain, A.L. und Solomon, N.A. (ed.), Biology of industrial microorganisms. Benjamin-Cummings Publishing Co., Menlo Park, Calif. 261-289
- MORENO-VIVIAN, C., CEJUDO, F.J., CARDENAS, J., CASTILLO, F. (1983) Ammonia assimilation pathways in *Rhodopseudomonas capsulata* ElFl. Arch. Microbiol. 136: 147-151
- MÜLLER, P. UND WERNER, D. (1982) Alanine dehydrogenase from bacteroids and free living cells of *Rhizobium japonicum*. Z. Naturforsch. 37b: 927-936
- MURRAY, N.E., BRAMMAR, W.J. MURRAY K. (1977) Lambdoid phages that simplify the recovery of in vitro recombinants. Mol. Gen. Genet. 150: 53-61
- NAGATA, S., MISONO, H., NAGASAKI, S., ESAKI, N., TANAKA, H., SODA, K. (1989) Thermostable alanine dehydrogenase of *Bacillus* sp. DSM 730: gene cloning, purification, and characterisation. Biochimie 71: 559-563
- NEALE, A.D., SCOPES, R.K., WETTENHALL, R.E., HOOGENRAAD, N.J. (1987a) Pyruvate decarboxylase of *Zymomonas mobilis*: Isolation, properties, and genetic expression in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 169: 1024-1028
- NEALE, A.D., SCOPES, R.K., WETTENHALL, R.E., HOOGENRAAD, N.J. (1987b) Nucleotide sequence of the pyruvate decarboxylase gene from *Zymomonas mobilis*. Nucl. Acids Res. 15: 1753-1761
- NOLL, F. (1974) D-Laktat, L-Laktat Test. In: Bergmeyer, H.U. (ed) Methoden der enzymatischen Analyse II, VCH Weinheim, 1521-1525
- OHASHIMA, T. UND SODA, K. (1979) Purification and properties of alanine dehydrogenase from *Bacillus sphaericus*. Eur. J. Biochem. 100: 29-39

- OHSHIMA, T., WANDREY, C., SUGIURA, M., SODA, K. (1985) Screening of thermostable leucine and alanine dehydrogenases in thermophilic *Bacillus* strains. *Biotechnol. Letters* 7: 871-876
- OHSHIMA, T. UND SODA, K. (1989) Thermostable amino acid dehydrogenases: applications and gene cloning. *TIBTECH* 7: 210-214
- OSMAN, Y.A., CONWAY, T., BONETTI, S.J., INGRAM, L.O. (1987) Glycolytic flux in *Zymomonas mobilis*: Enzyme and metabolic levels during batch fermentation. *J. Bacteriol.* 169: 3726-3736
- RACKER, E. (1976) A new look at mechanisms in bioenergetics. Academic Press, Inc., New York
- RAETZ, C.R.H. (1975) Isolation of *Escherichia coli* mutants defective in enzymes of membrane lipid synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 2274-2278
- REIPEN, I. (1989) Entwicklung von Expressionsvektoren für das Gram-negative Bakterium *Zymomonas mobilis*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- REITZER, L.J. UND MAGASANIK, B. (1987) Ammonia assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, asparagine, L-alanine, and D-alanine. In: Neidhardt (ed.) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, cellular and molecular biology Vol. 1: 302-321
- REYNEN, M. (1988) Entwicklung eines Expressionsvektors für das gram-negative Bakterium *Zymomonas mobilis*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- REYNEN, M. UND SAHM, H. (1988) Comparison of the structural genes for pyruvate decarboxylase in different *Zymomonas mobilis* strains. *J. Bacteriol.* 170: 3310-3313
- REYNEN, M., REIPEN, I., SPRENGER, G.A., SAHM, H. Construction of expression vectors for the gram-negative bacterium *Zymomonas mobilis*. Im Druck
- ROGERS, P.L., LEE, K.J., SKOTNICKI, M.L., TRIBE, D.E. (1982) Ethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Adv. Biochem. Eng.* 23: 27-84
- ROGERS, P.L., GOODMAN, A.E., HEYES, R.H. (1984) *Zymomonas* ethanol fermentations. Microbiological Sciences. Blackwell Scientific Publications 1: 273-288
- ROSENBERG, M. UND COURT, D. (1979) Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. *Annu. Rev. Genet.* 13: 319-353

- ROTTENBERG, H. (1979) The measurement of membrane potential and pH in cells, organelles and vesicles. In "Methods in Enzymologie", Academic Press, Inc. 55: 547-569
- SENUMA, M., OTSUKI, O., SAKATA, N., FURUI, M., TOSA, T. (1989) Industrial production of D-aspartic acid and L-alanine from DL-aspartic acid using a pressurized column reactor containing immobilized *Pseudomonas dacunhae* cells. J. Ferm. Bioeng. 67: 233-237
- SHAW, W.V. (1975) Chloramphenicol acetyltransferase from chloramphenicol-resistant bacteria. Methods in Enzymology, 43: 737-755
- SIMON, R., PRIEFER, U., PÜHLER, A. (1983) Vector plasmids for in-vivo and in-vitro manipulations of Gram-negative bacteria. In: Pühler, A. (ed.) Molecular genetics of the bacteria-plant interaction. Springer Verlag, Berlin Heidelberg. 98-106
- SKORDAKI, A. UND DRAINAS, C. (1987) Analysis of natural plasmids of *Zymomonas mobilis* ATCC 10988. J. Gen. Microbiol. 133: 2547-2556
- SKOTNICKI, M.L., TRIBE, D.E., ROGERS, P.L. (1980) R-Plasmid transfer in *Zymomonas mobilis*. Appl. Env. Microbiol. 40: 7-12
- SOUTHERN, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98: 503-517
- STRYER, L. (1985) Biochemie . 3. Auflage, Vieweg Verlag Braunschweig
- SU, P. UND GOODMAN, A.E. (1987) High frequency transformation of *Zymomonas mobilis* by plasmid DNA. J. Biotechnol. 6: 247-258
- SWINGS, J. UND DELEY, J. (1977) The biology of *Zymomonas*. Bacteriological Rev. 41: 1-46
- TINOCO, I., BORER, P.N., DENGLER, B., LEVINE, M.D., UHLENBECK, C.O., CROTHERS, D.M., GRALLA, J. (1973) Improved estimation of secondary structure in Ribonucleic Acids. Nature 246: 40-41
- UBBEN, D. UND SCHMITT, R. (1986) Tn 1721 derivatives for transposon mutagenesis, restriction mapping and nucleotide sequence analysis. Gene 41: 145 152
- ULLRICH, J., DEUS, B., HOLZER, H. (1968) Reaktionsmechanismus von Thiaminpyrophosphat und Thiamin. Int. Z. Vit. Forschung 38: 273-286
- ULLRICH, J. (1970) Yeast pyruvate decarboxylase (2-oxoacid carboxylase, EC 4.1.1.1). Assay of thiamine pyrophosphate. Methods in Enzymologie 18: 109-115

- UMBARGER, H.E. (1978) Amino acid biosynthesis and its regulation. *Ann. Rev. Biochem.* 47: 533-606
- VANCUROVA, I., VANCURA, A., VOLC, J., NEUZIL, J., BEHAL, V. (1989) A further characterization of alanine dehydrogenase from *Streptomyces aureofaciens*. *J. Basic Microbiol.* 29: 185-189
- VIEIRA, J. UND MESSING, J. (1982) The pUC plasmids, and M13 mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 19: 259-268
- VOGELSTEIN, R. UND GILLESPIE, J. (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 615-619
- WALKER, M.J. UND PEMBERTON, J.M. (1988) Construction of Transposon encoding genes for β -glukosidase, amylase and polygalacturonate *trans*-Eliminase from *Klebsiella oxytoca* and their expression in a range of gram-negative bacteria. *Curr. Microbiol.* 17: 69-75
- WILDEN, H. (1990) Untersuchungen zur Einführung rekombinanter Plasmide in das Bakterium *Zymomonas mobilis*. Diplomarbeit Universität zu Köln
- WILLIAMSON, D.H. (1985) L-alanine. Determination with alanine dehydrogenase. In Bergmeyer, H.U. (ed): *Methods of Enzymatic analysis*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim 3. Auflage 8: 341-344
- YANASE, H., KOTANI, T., TONOMURA, K. (1986) Transformation of *Zymomonas mobilis* with plasmid DNA. *Agric. Biol. Chem.* 50: 3139-3144
- YANASE, H., KURI, J., TONOMURA, K. (1988) Fermentation of lactose by *Zymomonas mobilis* carrying a lac^+ recombinant plasmid. *J. Ferm. Technol.* 66: 409-415
- YANOFSKY, C. (1981) Attenuation in the control of expression of bacterial operons. *Nature* 289: 751-758
- YOKOTA, A., TAKAO, S. (1989) Pyruvic acid production by lipoic auxotrophs of *Enterobacter aerogenes*. *Agric. Biol. Chem.* 53: 705 711
- YOSHIDA, A., FREESE, E. (1965) Enzymatic properties of alanine dehydrogenase of *Bacillus subtilis*. *Biochim. Biophys. Acta* 48: 248-262
- ZEFF, R.A. UND GELIEBTER, J. (1987) Oligonukleotide probes for genomic DNA blots. *Focus* (published as a service to the molecular biologist by Bethesda Research Laboratories) 9: 1-2

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

Herrn Professor Dr. H. Sahm danke ich für die Überlassung des Themas, die großzügige Unterstützung und sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Bei Herrn Professor Dr. K.-D. Spindler bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Herrn Dr. G. A. Sprenger gilt mein Dank für seine ständige Diskussionsbereitschaft und Ratschläge, die diese Arbeit begleitet haben.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Biotechnologie I danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit. Hierbei möchte ich besonders Frau Dipl. Biologin Bärbel Schrumpf und Herrn Dipl. Biochemiker Stefan Bröer für ihre Unterstützung bei den Aminosäureanalysen und den Herren Dr. H. Ebbighausen, Dr. B. Eikmanns und Dr. C.-L. Schimz für wertvolle Diskussionen danken.

Diese Arbeit wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Forschung und Technologie finanziert.