



Institut für Biotechnologie

Untersuchungen zur Rolle der Pyruvat-carboxylase als neuer anaplerotischer Reaktion in *Escherichia coli*

Britta Anderlei

Untersuchungen zur Rolle der Pyruvat-carboxylase als neuer anaplerotischer Reaktion in *Escherichia coli*

Britta Anderlei

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 4016

ISSN 0944-2952

Institut für Biotechnologie Jül-4016

D 61 (Diss., Düsseldorf, Univ., 2002)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek

D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

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

Pyruvate carboxylase as novel anaplerotic reaction in *Escherichia coli*

The expression of pyruvate carboxylase (Pyc) from *Corynebacterium glutamicum* established a novel interconnection between glycolysis and tricarboxylic acid (TCA) cycle in the central metabolism of *E. coli*. The effects of this measure were investigated in the present work.

In order to investigate whether the heterologous Pyc was functionally active in *E. coli*, the *pyc* gene was introduced in an *E. coli* PEP carboxylase (*ppc*) deficient mutant, which is devoid of any anaplerotic reaction during growth with glucose as sole carbon source. The phenotype of the *ppc* mutant was suppressed by *pyc* in a IPTG- and biotin- dependent manner without impairment of cell growth. With a discontinuous, coupled assay system Pyc activity of 230 mU/mg protein was detected in recombinant *E. coli* cells. Pyc did not affect the exponential growth rate of the *E. coli* wild type during aerobic cultivation with glucose, but accelerated growth with lactate as sole carbon source.

To investigate the effects of Pyc on the availability of the intermediate phosphoenolpyruvate (PEP) in *E. coli*, the novel reaction was introduced into a mutant with an inactive 3-dehydroquinate synthase gene (*aroB*). This indicator strain accumulates the first intermediate of the aromatic amino acid biosynthesis pathway, 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate (DAH), the condensation product of PEP and erythrose-4-phosphate. DAH is excreted into the culture supernatant and was detected as dephosphorylated DAH. Hence, the DAH production of *aroB* mutants gives information about the carbon flux into the shikimate pathway and the availability of PEP. Pyc was expressed as second anaplerotic reaction besides Ppc and also in a *ppc aroB* double mutant. To generate comparable process conditions for every tested strain, all fermentations were performed aerobically in stirred bioreactors with pH control in a fed batch mode.

The expression of Pyc enhanced the substrate turnover of an *E. coli aroB* mutant by 30%, this indicates an increased PEP/pyruvate ratio. In a *ppc aroB* double mutant, Pyc improved the availability of PEP for the shikimate pathway by raising the DAH yield from 5 to 12% of the carbon consumed.

A *ppc aroB* double mutant with Pyc produced more than 80 mM glutamate, which corresponds to one third of the carbon consumed. Furthermore, the acetate formation of Pyc expressing *E. coli* strains was significantly reduced. These results indicate increased anaplerotic carbon fluxes to the TCA metabolism by Pyc.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	13
2.1	Chemikalien und Enzyme	13
2.2	Bakterienstämme und Plasmide	14
2.3	Nährmedien und Kultivierungsbedingungen	15
2.3.1	Medien	15
2.3.2	Medienzusätze	16
2.3.3	Kultivierungsbedingungen	17
2.3.4	Bestimmung des Bakterienwachstums	18
2.4	Molekulargenetische Methoden	19
2.4.1	Isolierung und Reinigung von DNA	19
2.4.2	Enzymatische Modifikation von DNA	19
2.4.3	Polymerase-Kettenreaktion	20
2.4.4	Transformation von <i>E. coli</i>	21
2.4.5	Selektion rekombinanter <i>E. coli</i> Zellen	23

2.4.6	Transduktion von <i>E. coli</i>	23
2.5	Proteinbiochemische Methoden	24
2.5.1	Proteinkonzentrationsbestimmung	24
2.5.2	Fällung von Proteinen	24
2.5.3	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	24
2.5.4	Western Blot Analyse	25
2.6	Gewinnung von zellfreien Extrakten	26
2.6.1	Aufschluss in der Kugelmühle	26
2.6.2	Ultraschallaufschluss	26
2.7	Permeabilisierung von Zellen	27
2.8	Bestimmung von Enzymaktivitäten	27
2.8.1	Bestimmung der PEP-Carboxylase-Aktivität	27
2.8.2	Bestimmung der Pyruvatcarboxylase-Aktivität	29
2.9	Untersuchungen im begasten Rührkessel	33
2.9.1	Anzucht der Vorkulturen	33
2.9.2	Fermentationsmedium	33
2.9.3	Apparativer Aufbau und „online“-Analytik	35
2.9.4	Bestimmung der Glukosekonzentration	37
2.9.5	Bestimmung der optischen Dichte	39
2.9.6	Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration	39
2.9.7	Bestimmung der Plasmidstabilität	40

2.9.8	Bestimmung organischer Säuren im Überstand	40
2.9.9	Bestimmung von Aminosäuren im Überstand	41
3	Ergebnisse	43
3.1	<i>In vivo</i> -Nachweis der Pyruvatcarboxylase-Aktivität in einer <i>E. coli</i> - Mutante mit defekter PEP-Carboxylase	43
3.1.1	Herstellung einer <i>E. coli</i> PEP-Carboxylase-Mutante	45
3.1.2	Succinatabhängigkeit der <i>E. coli</i> PEP-Carboxylase-Mutante	49
3.1.3	Suppression des <i>ppc</i> -Defekts durch Pyc	50
3.1.4	Abhängigkeit der Δppc -Suppression vom Induktor IPTG	52
3.1.5	Abschätzung der <i>in vivo</i> -Pyruvatcarboxylase-Aktivität in <i>E. coli</i>	54
3.1.6	Biotin-Abhängigkeit der Δppc -Suppression durch Pyc	55
3.2	Untersuchung von Effekten der Pyruvatcarboxylase im Zentralstoffwechsel von <i>E. coli</i>	56
3.2.1	Mögliche Effekte der Pyruvatcarboxylase auf verschiedenen Ebenen im Stoffwechsel von <i>E. coli</i>	57
3.2.2	Bestimmung der Kohlenstoffflüsse in den Aromatenbiosyntheseweg	59
3.2.3	Prozessführung zur Untersuchung der Pyruvatcarboxylase Effekte in <i>E. coli</i>	60
3.2.4	Analytische Möglichkeiten	63
3.3	Effekte der Pyruvatcarboxylase im Wildtyp	66
3.3.1	Einfluss der Pyc auf die Säurebildung	67
3.3.2	Einfluss der Pyruvatcarboxylase bei Kultivierung im begasten Rührkessel	68

3.3.3	Einfluss der Pyc bei Wachstum auf Lactat	74
3.4	Untersuchungen mit einer <i>E. coli aroB</i> -Mutante	76
3.4.1	Prozessführung für <i>aroB</i> -Mutanten	76
3.4.2	Effekte von Pyc in einer <i>E. coli aroB</i> -Mutante	79
3.5	Pyruvatcarboxylase in einer <i>aroB ppc</i> -Doppelmutante von <i>E. coli</i>	84
3.5.1	Co-Transduktion der <i>ppc</i> -Deletion	85
3.5.2	Fermentationsstrategie für die <i>aroB Δppc</i> -Doppelmutante	88
3.5.3	Effekte von Pyc in der <i>aroB Δppc</i> -Doppelmutante	90
3.6	Effekte der Pyruvatcarboxylase in einer <i>aroB Δppc</i> -Mutante mit deregulierter Eingangsreaktion der Aromatenbiosynthese	95
3.6.1	Konstruktion des Stamms F48	95
3.6.2	Fermentationsstrategie für den Stamm F48	97
3.6.3	Effekte der Pyc in einer <i>aroB Δppc</i> -Mutante mit dereguliertem AroF	99
3.7	<i>In vitro</i> Nachweis der Pyruvatcarboxylase-Aktivität	104
3.7.1	Entwicklung eines diskontinuierlichen Testsystems	104
3.7.2	Abhängigkeit der Pyruvatcarboxylase-Aktivität von den Testkomponenten	106
3.7.3	Aufnahme einer Pyruvatcarboxylase-Kinetik	107

4 Diskussion 110

4.1	Pyruvatcarboxylase aus <i>C. glutamicum</i> ist in <i>E. coli</i> funktionell aktiv . . .	112
4.2	Einfluss von Pyruvatcarboxylase auf das Wachstum von <i>E. coli</i>	116
4.3	Einfluss der Pyruvatcarboxylase auf den Glukoseverbrauch von <i>E. coli</i> . . .	119

4.4	Einfluss der Pyruvatcarboxylase auf die CO ₂ -Produktion von <i>E. coli</i>	122
4.5	Einfluss der Pyruvatcarboxylase auf die Glutamatproduktion von <i>E. coli</i> .	124
4.6	Einfluss von Pyruvatcarboxylase auf die Acetatbildung von <i>E. coli</i>	128
4.7	Effekte der Pyruvatcarboxylase auf Verfügbarkeit von PEP in <i>E. coli</i> . . .	132
4.8	Veränderung von Kohlenstoffflüssen durch Pyc	139
5	Zusammenfassung	143

Verzeichnis der Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
A	Adenin
Abb.	Abbildung
Acetyl CoA	Acetyl-Coenzym A
Ack	Acetatkinase
ADP	Adenosindiphosphat
Ala	L-Alanin
α KG	α -Keto-Glutarat
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	L-Arginin
AroB	3-Dehydroquinat-Synthase
AroF, G, H	DAHP-Synthase-Isoenzyme
Asp	L-Aspartat
ATP	Adenosintriphosphat
B	Basen
BCIP	5-Brom-4-Chlor-Indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
BTM	Biotrockenmasse
C	Cytosin
Cm	Chloramphenicol
Cm ^R	Chloramphenicol-Resistenz
CoA	Coenzym A

Abkürzung	Bedeutung
CS	Citratsynthase
Da	Dalton
DAD	Diodenarraydetektor
DAH	3-Desoxy-D-arabino-heptulosonat
DAHP	3-Desoxy-D-arabino-heptulosonat-7-Phosphat
DMF	N, N'- Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTNB	Dithionitrobenzoesäure
DTT	Dithiothreitol
<i>et al</i>	et alteri
EPSP	5-Enolpyruvoylshikimat-3-Phosphat
ϵ	Extinktionskoeffizient
E4P	Erythrose-4-Phosphat
FAD(H)	Flavin-Adenin-Dinukleotid (reduziert)
Fd	Farad
g	Gramm
G	Guanin
GalP	Galaktose-Permease
Glu	L-Glutamat
Glu-6-P	Glukose-6-Phosphat
h	Stunde
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
Ile	Isoleucin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
k	Kilo
Kan	Kanamycin
Kan ^R	Kanamycin-Resistenz
Kap.	Kapitel
L	Liter
LB	Luria-Bertani
LDH	Lactatdehydrogenase

Abkürzung	Bedeutung
Leu	L-Leucin
Lys	L-Lysin
m	Milli (10^{-3})
M	Molar
MDH	Malatdehydrogenase
min	Minute
μ	exponentielle Wachstumsrate, Mikro (10^{-6})
MM	Minimalmedium
n	Nano (10^{-9})
NAD(H)	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (reduziert)
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumsalz
OAA	Oxalacetat
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
Ω	Ohm
OPA	<i>ortho</i> -Phtaldialdehyd
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
Pck	PEP-Carboxykinase
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PEP	Phosphoenolpyruvat
Pgi	Phosphoglukoseisomerase
Phe	L-Phenylalanin
P _i	Phosphat
PID	proportional, integral, differential
Pox	Pyruvatoxidase
Ppc	PEP-Carboxylase
Pps	PEP-Synthetase
Pta	Phosphotransacetylase
PTS	Phosphotransferasesystem
Pyc	Pyruvatcarboxylase
Pyk	Pyruvatkinase

Abkürzung	Bedeutung
Pyr	Pyruvat
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
Shk	Shikimat
Succ	Succinat
t	Tonne, Zeitpunkt
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat
Tal	Transaldolase
TCA	Tricarbonsäurezyklus, Trichloressigsäure
t_d	Verdopplungszeit
TEMED	N, N, N', N'- Tetramethylethyldiamin
TG	Trockengewicht
Tkt	Transketolase
T_m	Schmelztemperatur
TNB	Thionitrobenzoat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	L-Tryptophan
Tyr	L-Tyrosin
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
V	Volt
w/v	Masse pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid
x_t	Biomassekonzentration zum Zeitpunkt t

Kapitel 1

Einleitung

Das Gram-negative Bakterium *Escherichia coli* gehört zur Gruppe der Enterobacteriaceae. *E. coli* ist fakultativ aerob, kann also sowohl durch Atmung als auch durch Gärung Energie gewinnen (Schlegel, 1992). *E. coli* ist anspruchslos, wächst auf einfachen synthetischen Nährlösungen und ist unter Laborbedingungen gut zu kultivieren. Auf Grund dieser Eigenschaften wurden apathogene Stämme von *E. coli* zum Hauptstudienobjekt der Genetiker und bestuntersuchten Einzeller (Dixon, 1994). Das Genom von *E. coli* K-12 ist vollständig sequenziert (Blattner *et al.*, 1997).

E. coli hat industrielle Bedeutung als Produzent von rekombinanten Proteinen [(Swartz, 1996), Ohta *et al.* (1993), Chen *et al.* (1994)]. Durch die zunehmende Verteuerung von Erdöl wird auch die fermentative Herstellung von Feinchemikalien aus erneuerbaren Rohstoffen mit *E. coli* wirtschaftlich wieder interessant (Chotani *et al.*, 2000). Prozesse zur Produktion organischen Säuren wie Pyruvat (Li *et al.*, 2001) und Succinat [Sanville Millard *et al.* (1996), Hong und Lee (2001)] mit *E. coli* wurden entwickelt, ebenso wie zur Produktion des Antioxidans Lycopon [Farmer und Liao (2000), Farmer und Liao (2001)].

Zur Überproduktion von Proteinen und Metaboliten werden spezielle *E. coli*-Produktionsstämme eingesetzt, in denen die normalen Kontrollmechanismen des Stoffwechsels außer Kraft gesetzt sind, um beispielsweise die Produktion von Zwischenprodukten des Stoffwechsels zu erreichen. Diese Stämme wurden früher meist durch ungerichtete Mutagenese und anschließendes „screening“ auf die gewünschte Eigenschaft erhalten. Fortschritte in der rekombinanten DNA-Technologie erlauben jedoch rationale Ansätze zur Verbesserung von Stämmen. Von Bailey war in diesem Zusammenhang der Begriff des „metabolic engineering“ als die Verbesserung zellulärer Aktivität durch Manipulation enzymatischer, regulatorischer und Transport-Funktionen der Zelle durch rekombinante DNA-Technologie geprägt worden, was beispielsweise den Einsatz heterologer Aktivitäten zur Verbesserung von Stämmen und die Umlenkung von Stoffflüssen beinhaltet (Bailey, 1991). Die Werkzeuge und Möglichkeiten auf dem Gebiet des „metabolic engineering“ sind beispielsweise von Nielsen (2001) beschrieben worden.

Die Gewinnung aromatischer Substanzen durch Biokatalyse mit *E. coli* hat einen besonderen Stellenwert, da auf den Einsatz toxischer Ausgangsmaterialien wie Benzol verzichtet werden kann, ebenso auf organische Lösungsmittel sowie hohe Drücke und Temperaturen, weiterhin ist D-Glukose aus Pflanzenstärke als Rohstoff praktisch unbegrenzt und kostengünstig verfügbar, entstehende Abfälle sind biologisch abbaubar (Frost und Lieveense, 1994). Intermediate der Aromatenbiosynthese von *E. coli*, die auch als Shikimisäureweg bezeichnet wird (Pittard, 1996), können beispielsweise als Vorläufer für die biotechnologische Produktion von p-Hydroxybenzoesäure (Barker und Frost, 2001) und Indigo (Murdock *et al.*, 1993) herangezogen werden. Mit von *E. coli* produziertem Shikimat (Draths *et al.*, 1999) war eine Methode zur benzolfreien Synthese von Phenol entwickelt worden (Gibson *et al.*, 2001). Dehydroshikimat-produzierende Stämme von *E. coli* können zur Produktion von Adipinsäure (Draths und Frost, 1994) und Catechol (Draths und Frost, 1995) eingesetzt werden. Auch die Endprodukte des Shikimisäureweges, die aromatischen Aminosäuren L-Phenylalanin, L-Tyrosin und L-Tryptophan, können mit *E. coli* hergestellt werden, das Marktvolumen dieser Verbindungen ist mit 150 bis 12000 t pro Jahr beträchtlich (Bongaerts *et al.*, 2001).

Der Aromatenbiosyntheseweg von *E. coli* ist auf Transkriptionsebene, Translationsebene und durch Endprodukthemmung der Schlüsselenzyme mehrfach reguliert (Pittard, 1996). Eine Überproduktion aromatischer Metabolite wurde durch gezieltes „pathway engineering“ erreicht (Bongaerts *et al.*, 2001). Anhand der Aromatenbiosynthese sollen im folgenden die Fortschritte in der Deregulation eines Stoffwechselweges aufgezeigt werden, ebenso wie die sich daraus ergebende Notwendigkeit, auch Kohlenstoffflüsse im Zentralstoffwechsel in Richtung der entsprechenden Vorläufermetabolite zu lenken.

Auf Transkriptionsebene war die Regulation durch Deletion der Gene für Regulatorproteine umgangen worden. Auch waren Gene der Schlüsselenzyme von Stoffwechselwegen hinter alternativen, nicht den zellulären Regulationsprozessen unterworfenen Promotoren positioniert worden, um die Regulation zu umgehen (Berry, 1996). Durch Verwendung allosterisch unempfindlicher („feedback“-resistenter) Proteine war die katalytische Aktivität der Schlüsselenzyme auch bei Akkumulation der Endprodukte aufrechterhalten worden (Frost und Draths, 1995). Einige Enzyme des Shikimisäurewegs waren nicht in der Lage, mit dem verstärkten Kohlenstofffluss durch diesen Stoffwechselweg Schritt zu halten, ihre Substrate akkumulierten und waren im Überstand detektiert worden (Frost und Draths, 1995). Auch diese Limitierungen können identifiziert und aufgehoben werden (Dell und Frost, 1993).

Neben der Deregulation des Aromatenbiosyntheseweges ist die Verfügbarkeit der Vorläufermetabolite aus dem Zentralstoffwechsel entscheidend für den Kohlenstofffluss in den Shikimisäureweg. In der Eingangsreaktion des Shikimisäurewegs werden Phosphoenolpyruvat (PEP) aus der Glykolyse und Erythrose-4-Phosphat (E4P) aus dem Pentosephosphatweg zu 3-Desoxy-D-arabino-heptulosonat-7-Phosphat (DAHP) kondensiert (Pittard, 1996). In Abbildung 1.1 sind die Reaktionen des Zentralstoffwechsels von *E. coli* dargestellt, die an der Umsetzung von Glukose zu DAHP beteiligt sind. Ein weiteres PEP-Molekül wird in einem späteren Stadium zur Bildung des Intermediats 5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat (EPSP) eingebaut (Pittard, 1996).

Die Erhöhung der Verfügbarkeit von E4P für die Aromatenbiosynthese durch Überexpression der Schlüsselenzyme des Pentosephosphatwegs, Transketolase (Tkt) [Draths *et al.* (1992), Patnaik *et al.* (1995), Li *et al.* (1999)] und Transaldolase (Tal) [Lu und Liao

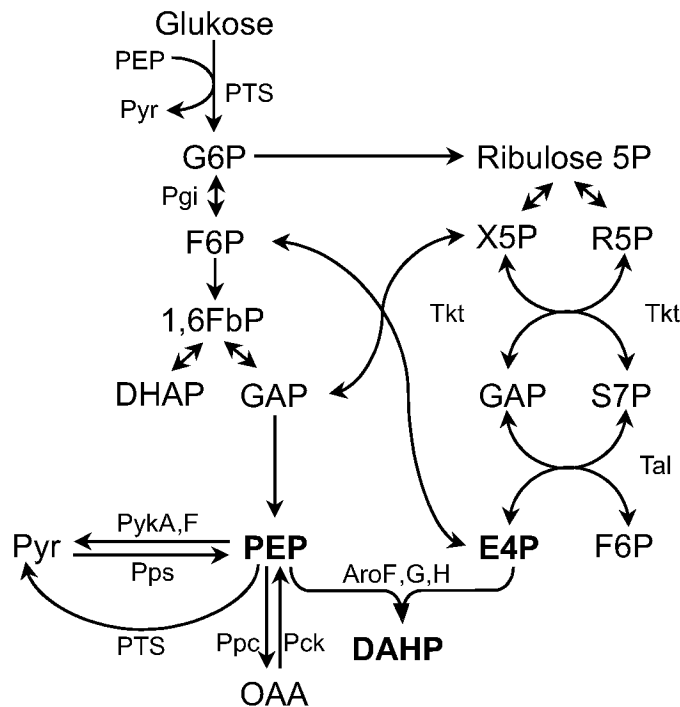


Abbildung 1.1: Überblick über den Zentralstoffwechsel von *E. coli*, welcher die Vorläufermetabolite PEP und E4P für die Eingangsreaktion in die Aromatenbiosynthese zur Verfügung stellt. PTS → Phosphotransferasesystem, G6P → Glukose-6-Phosphat, F6P → Fruktose-6-Phosphat, 1,6 FbP → Fruktose-1,6-Bisphosphat, DHAP → Dihydroxyacetonphosphat, GAP → Glycerinaldehyd-3-Phosphat, PEP → Phosphoenolpyruvat, Pyr → Pyruvat, X5P → Xylulose-5-Phosphat, R5P → Ribose-5-Phosphat, S7P → Sedoheptulose-7-Phosphat, E4P → Erythrose-4-Phosphat, DAHP → 3-Desoxy-D-arabino-heptulosonat-7-Phosphat, OAA → Oxalacetat, Pgi → Phosphoglukoseisomerase, Tkt → Transketolase, Tal → Transaldolase, PykA,F → Pyruvatkinasen, Pps → PEP-Synthetase, Ppc → PEP-Carboxylase, Pck → PEP-Carboxykinase, AroF,G,H → DAHP-Synthasen.

(1997), Sprenger *et al.* (1998a), Krämer (2000)] war gezeigt worden. Durch Deletion des *pgi*-Gens, welches für Phosphoglukoseisomerase kodiert, war der Kohlenstofffluss in den Pentosephosphatweg durch Blockierung der Glykolyse verstärkt und die Effizienz der Tryptophanproduktion aus Glukose verdoppelt worden (Mascarenhas *et al.*, 1991).

PEP ist das zentrale Intermediat für viele metabolische Prozesse und Vorläufer für viele Zellbestandteile (Valle *et al.*, 1996). In *E. coli* ist das Phosphotransferasesystem (PTS), welches Glukose phosphoryliert und über die Membran transloziert, der Hauptkonsument

von PEP (Postma *et al.*, 1996). Weitere PEP-verbrauchende Reaktionen sind beispielsweise PEP-Carboxylase (Ppc) und die beiden Pyruvatkinasen (PykA,F). PEP wird glukoneogen durch PEP-Synthetase (Pps) und PEP-Carboxykinase (Pck) aus Pyruvat oder Oxalacetat (OAA) gebildet. Von Holms (1986) waren die Flüsse durch den Zentralstoffwechsel quantifiziert worden, die daraus abgeleitete Verteilung von PEP am Knotenpunkt ist in Abbildung 1.2 dargestellt.

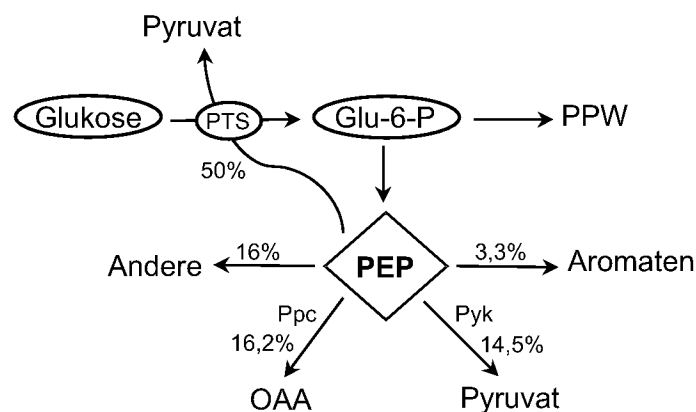


Abbildung 1.2: Verteilung von PEP im Zentralstoffwechsel von *E. coli* [nach Holms (1986)]. PTS → Phosphotransferasesystem, Glu-6-P → Glukose-6-Phosphat, PPW → Pentosephosphatweg, PEP → Phosphoenolpyruvat, Pyk → Pyruvatkinasen, Ppc → PEP-Carboxylase, OAA → Oxalacetat.

Im Hinblick auf die industrielle Produktion aromatischer Metabolite war die PEP-Verfügbarkeit für den Shikimisäureweg durch verschiedene Maßnahmen erhöht worden. Dabei wurden neben den PEP-verbrauchenden Reaktionen auch die PEP-bildenden Reaktionen beeinflusst. Ein „recycling“ von Pyruvat zu PEP war durch Überexpression der PEP-Synthase erreicht worden, in Kombination mit Transketolase war der Kohlenstofffluss in die Aromatenbiosynthese verdoppelt worden (Patnaik und Liao, 1994). Auch durch Inaktivierung beider Pyruvatkinasen war der Kohlenstofffluss in Richtung Aromatenbiosynthese (Gosset *et al.*, 1996) und L-Phenylalanin (Grinter, 1998) gesteigert worden. Durch Manipulation des globalen regulatorischen Netzwerks der Zelle, auch als „global metabolic engineering“ bezeichnet, waren durch Disruption des *csrA*-Gens („carbon storage regulator“) die glukoneogenen Flüsse auf Kosten der Glykolyse gesteigert worden (Sabnis *et al.*, 1995) und damit die L-Phenylalaninproduktion verdoppelt worden (Tatarko und Romeo, 2001).

Nicht-PTS-Zucker wie Xylose werden von PEP-unabhängigen Transportsystemen aufgenommen (Lin, 1996). Durch Kultivierung der Bakterien auf solchen Kohlenstoffquellen konnte der PEP-Verbrauch bei der Zuckeraufnahme unterbunden werden (Patnaik *et al.*, 1995). Durch Kultivierung eines 3-Dehydroshikimat-produzierenden *E. coli*-Stamms auf einem Substratmix aus Glukose, Arabinose und Xylose waren Konzentration und Ausbeute dieses Zwischenprodukts der Aromatenbiosynthese gesteigert worden (Li und Frost, 1999). In Mutanten mit inaktivem PT-System, welche Glukose über Galaktose-Permease (GalP) aufnahmen, war eine Steigerung des Kohlenstoffflusses in die Aromatenbiosynthese gezeigt worden [Flores *et al.* (1996), Gosset *et al.* (1996)]. Allerdings war keine Erhöhung des PEP-Pools in einem *E. coli*-Stamm mit inaktivem PTS und Zuckeraufnahme über GalP beobachtet worden (Chen *et al.*, 1997). Durch ein heterologes, PEP-unabhängiges Transportsystem aus Glukosefacilitator (Glf) und Glukokinase (Glk) aus *Zymomonas mobilis* war der Kohlenstofffluss in den Shikimisäureweg erhöht worden [Sprenger *et al.* (1998b), Krämer (2000)].

Ein kombinierter Ansatz beinhaltete die PEP-unabhängige Glukoseaufnahme über den Glukosefacilitator aus *Z. mobilis* und eine Steigerung des Kohlenstoffflusses in den Pentosephosphatweg, um die Verfügbarkeit von E4P zu erhöhen. Dieses wurde durch Expression des Glukosedehydrogenasegens *gdh* aus *Bacillus megaterium* und des Glukonatkinasegens *gntK* von *E. coli* erreicht, die Steigerung der Phenylalaninproduktion war gezeigt worden [Krämer *et al.* (1999), Krämer (2000)].

Nach Inaktivierung des PEP-Carboxylase-Gens (*ppc*) war in nicht-wachsenden Kulturen kein Effekt auf die DAHP-Produktion von *E. coli* gezeigt worden (Patnaik und Liao, 1994). Die L-Phenylalaninproduktion eines *ppc*⁻-Stamms war dagegen signifikant erhöht, allerdings war auch die Bildung der unerwünschten Nebenprodukte Acetat und Pyruvat gesteigert worden (Miller *et al.*, 1987). Weiterhin war festgestellt worden, dass die *ppc*-Mutante im Vergleich zum *ppc*⁺-Stamm eine verdoppelte Generationszeit aufwies, trotz Supplementierung mit C₄-Verbindungen aus dem Citratzyklus wie Succinat (Miller *et al.*, 1987).

Die Ergebnisse von Miller *et al.* (1987) können als Beispiel dafür herangezogen werden, wie die Kohlenstoffflüsse in Richtung des gewünschten Produkts durch gezieltes „metabolic

engineering“ zwar gesteigert werden können, allerdings auf Kosten einer effizienten Nutzung des eingesetzten Substrates sowie der Biomassebildung pro Zeit. Die Minimierung von Kohlenstoffflüssen in Richtung unerwünschter Nebenprodukte sowie ein möglichst optimales Wachstum der Zellen sind daher weitere wichtige Aspekte bei der rationalen Entwicklung von Produktionsstämmen.

Acetat ist das Haupt-Nebenprodukt von *E. coli* bei aerober Kultivierung auf Glukose (Andersen und von Meyenburg, 1980) und inhibiert sowohl das Wachstum (Luli und Strohl, 1990) als auch die Produktion rekombinanter Proteine [Shimizu *et al.* (1988), Bech Jensen und Carlsen (1990)]. Diese aerobe Acetatbildung bei *E. coli* war auch als bakterieller Crabtree-Effekt oder Glukose-Überflussmetabolismus bezeichnet worden und könnte eine Konsequenz aus dem Ungleichgewicht zwischen der Substrataufnahme und den Bedürfnissen der Zelle für Biosynthesen und Energieproduktion sein (Holms, 1986). Von Holms war angenommen worden, dass die Acetatbildung eine Art Sicherheitsventil darstellt, um das Gleichgewicht zwischen exzessiver Glukoseaufnahme und den Flüssen zu Vorläufermetaboliten wieder herzustellen (Holms, 1996). Im Chemostaten mit geringer Verfügbarkeit von Glukose war unterhalb einer kritischen Wachstumsrate von $0,35 \text{ h}^{-1}$ keine Acetatbildung festgestellt worden (El-Mansi und Holms, 1989). Die aerobe Acetatproduktion war auch als zusätzliche Möglichkeit der Zelle gesehen worden, ATP zu gewinnen, wenn die respiratorische Kapazität ausgeschöpft war, da die spezifische Sauerstoffaufnahme ihre Maximum bei Einsetzen der Acetatbildung erreichte (Andersen und von Meyenburg, 1980).

Acetat stammt aus dem Zentralstoffwechsel von *E. coli*. Zur aeroben Acetatbildung wird Pyruvat zunächst durch den Pyruvat-Dehydrogenase-Multienzymkomplex (PDH) zu Acetyl-Coenzym A (AcetylCoA) und Kohlendioxid oxidiert (Schlegel, 1992). AcetylCoA wird weiter durch Phosphotransacetylase (Pta) zu Acetyl-Phosphat umgesetzt, welches durch Acetatkinase (Ack) unter ATP-Gewinn zu Acetat dephosphoryliert wird (Kessler und Knappe, 1996). Pyruvat kann über Pyruvatoxidase (Pox) auch direkt zu Acetat decarboxyliert werden, diese wird jedoch vornehmlich in der stationären Wachstumsphase exprimiert (Chang *et al.*, 1994). Abbildung 1.3 zeigt die an der aeroben Acetatbildung von *E. coli* beteiligten Reaktionen und Intermediate.

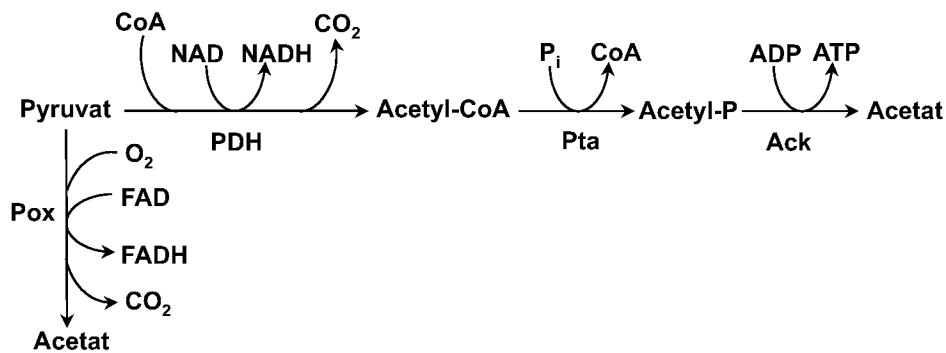


Abbildung 1.3: Aerobe Acetatbildung in *E. coli*. CoA → Coenzym A, PDH → Pyruvatdehydrogenasekomplex, Pta → Phosphotransacetylase, Ack → Acetatkinase, Pox → Pyruvatoxidase.

Um die aerobe Acetatbildung zu reduzieren, waren beispielsweise Prozessgrößen wie Glukosezufuhr und Gelöstsauerstoffkonzentration kontrolliert worden [Konstantinov *et al.* (1991), Konstantinov und Yoshida (1992), Akesson *et al.* (2001)]. Auch war die Synthese von Acetat durch Inaktivierung von *pta* unterbunden worden, dies führte jedoch zu Wachstumsverzögerungen und Ausscheidung von Lactat und Pyruvat (Chang *et al.*, 1999). Auch nach der Ausschaltung beider Gene (*pta* und *ack*) war eine Verlagerung des Überflussmetabolismus in Richtung Pyruvat und Lactat verzeichnet worden (Diaz-Ricci *et al.*, 1991). Ohne signifikante Einbußen bei der Wachstumsrate war die Acetatausscheidung von *E. coli* durch Inaktivierung der Pyruvatkinasen reduziert worden (Siguenza *et al.*, 1999), ohne dass dabei jedoch den PEP-Pool erhöht worden war (Zhu *et al.*, 2001). Nach Inaktivierung des PT-Systems war keine Acetatproduktion mehr beobachtet worden, allerdings war die Wachstumsrate um 50 % reduziert (Ponce, 1999). Die Produktion eines rekombinanten Proteins war in einem PTS⁻-Stamm signifikant erhöht worden (Chou *et al.*, 1994). Von Delgado und Liao (1997) war mit Hilfe von Flussanalysen eine Reduktion der aeroben Acetatbildung durch Erhöhung der anaplerotischen Flüsse prognostiziert worden. Dieses war in einem *E. coli*-Stamm mit dereguliertem Glyoxylat-Zyklus nach Überexpression der PEP-Carboxylase bestätigt worden (Farmer und Liao, 1997).

Anaplerotische Reaktionen [anapleroun (griech.) → auffüllen] stellen die kontinuierliche und effektive Regenerierung von Oxalacetat als Akzeptor von AcetylCoA sicher, da während des Wachstums laufend Intermediate aus dem Tricarbonsäurezyklus für Biosynthesen

abgezogen werden (Kornberg, 1966). Bei Wachstum auf Acetat oder Fettsäuren wird der Glyoxylatzyklus mit den Schlüsselenzymen Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase genutzt, um aus zwei Molekülen AcetylCoA ein Molekül Malat zu generieren (Kornberg, 1966). Bei Wachstum auf Glukose und C₃-Verbindungen wie Pyruvat oder Lactat wird der Citratzyklus in *E. coli* durch Carboxylierung von PEP aufgefüllt. Abbildung 1.4 zeigt den Zentralstoffwechsel von *E. coli* mit Citratzyklus, dem anaplerotischen Glyoxylatbypass sowie PEP-verbrauchenden und -generierenden Reaktionen.

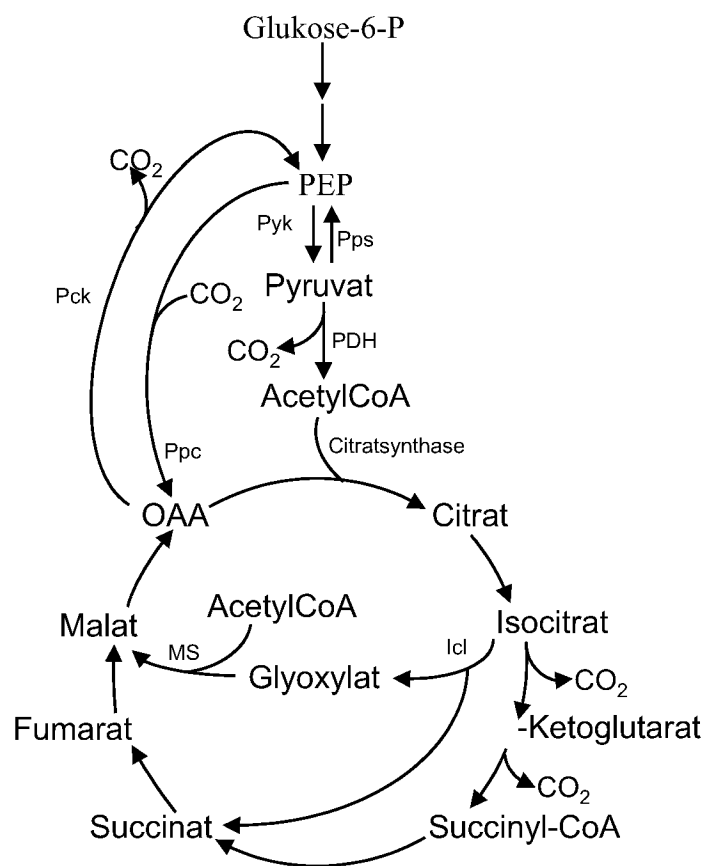


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des Zentralstoffwechsels von *E. coli* mit Reaktionen um PEP sowie Citrat- und Glyoxylatzyklus. Pyk → Pyruvatkinasen, Pps → PEP-Synthetase, Pck → PEP-Carboxykinase, Ppc → PEP-Carboxylase, PDH → Pyruvatdehydrogenase, Icl → Isocitratlyase, MS → Malatsynthase, PEP → Phosphoenolpyruvat, OAA → Oxalacetat

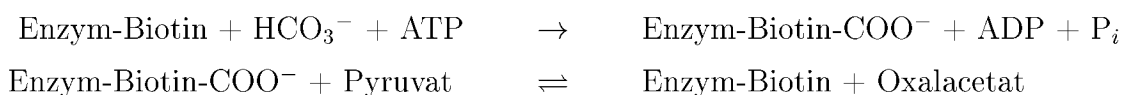
In *E. coli* stellt PEP-Carboxylase die einzige anaplerotische Funktion bei Wachstum auf Glukose dar (Gottschalk, 1985). *ppc*-Mutanten sind nicht in der Lage, ohne zusätzliche C₄-Verbindungen auf Glukose zu wachsen (Chao und Liao, 1993). Im Gegensatz

dazu verfügt beispielsweise *Corynebacterium glutamicum* sowohl über PEP- als auch Pyruvatcarboxylase (Pyc) (Peters-Wendisch *et al.*, 1997). Es war gezeigt worden, dass in *C. glutamicum* die Pyruvatcarboxylase zu über 90 % zur C₃-Carboxylierung beiträgt (Petersen *et al.*, 2000). Pyruvatcarboxylase trägt Biotin als prosthetische Gruppe und katalysiert die ATP-abhängige Carboxylierung von Pyruvat zu Oxalacetat [Scrutton und Young (1972); Attwood (1995); Jitrapakdee und Wallace (1999)] .



Pyruvatcarboxylase war auch in anderen Prokaryoten wie zum Beispiel *Rhodopseudomonas spheroides* (Payne und Morris, 1969), *Rhizobium etli* (Dunn *et al.*, 1996), *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Mukhopadhyay *et al.*, 1998), *Methanococcus jannaschii* (Mukhopadhyay *et al.*, 2000), *Mycobacterium smegmatis* (Mukhopadhyay und Purwantini, 2000) und *Sinorhizobium meliloti* (Dunn *et al.*, 2001) nachgewiesen worden. Pyruvatcarboxylase wurde auch in vielen höheren Organismen wie beispielsweise Pilzen, Invertebraten und Vertebraten gefunden (Wallace, 1985). In Säugetieren wird Pyc gewebespezifisch exprimiert, die höchste Aktivität wurde in glukoneogenen Geweben wie Leber und Niere sowie im Fettgewebe gefunden (Jitrapakdee und Wallace, 1999). Auch in Pflanzen wie beispielsweise *Zea mays*, *Helianthus annuus* und *Brassica napus* wurde Pyc-Aktivität gezeigt (Wurtele und Nikolau, 1990).

Die meisten Pyruvatcarboxylasen bestehen aus vier identischen Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 120-130 kDa, arrangiert zu einer Tetraeder-ähnlichen Struktur (Jitrapakdee und Wallace, 1999). Die biotinvermittelte Carboxylierung von Pyruvat erfolgt in zwei Schritten, zunächst wird das enzymgebundene Biotin ATP-abhängig carboxyliert, dann erfolgt die Übertragung der aktivierten Carboxylgruppe auf den Akzeptor Pyruvat (Attwood, 1995).



Durch die cytoplasmatische Expression von Pyc aus *Saccharomyces cerevisiae* in Säugerkzellen war das Substrat Glukose durch einen gesteigerten Fluss durch den TCA-Zyklus effizienter genutzt und die Lactatproduktion der Zellen signifikant verringert worden (Irani *et al.*, 1999). In *E. coli* war durch Expression der Pyc aus *R. etli* eine Steigerung der anaeroben Succinatproduktion beobachtet worden (Gokarn *et al.*, 1998), während die Lactatbildung ebenfalls geringer wurde. Durch Pyruvatcarboxylase erfolgte in *E. coli* offenbar eine Umlenkung von Kohlenstoffflüssen im Zentralstoffwechsel. Der Fluss von Pyruvat zu Oxalacetat (und weiter zum Succinat) war erhöht worden, während weniger Pyruvat für die Produktion von Lactat zur Verfügung stand. Über die Bildung von Acetat finden sich bei Gokarn *et al.* (1998) keine Angaben. Ein Einfluss der Pyc auf die aerobe Acetatbildung von *E. coli* ist denkbar, da Acetat ausgehend von Pyruvat gebildet wird (Abb. 1.3).

Ziel der vorliegenden Arbeit war, mit der Pyruvatcarboxylase aus *Corynebacterium glutamicum* in *E. coli* eine neue Verbindung zwischen Glykolyse und Tricarbonsäurezyklus herzustellen und die Auswirkungen dieser neuen Route auf die Kohlenstoffflüsse des Bakteriums zu untersuchen.

- Es sollte untersucht werden, ob das heterologe Protein aus *C. glutamicum* in *E. coli* posttranslational modifiziert wird und funktionell aktiv ist.
- Pyruvatcarboxylase sollte als zweite anaplerotische Reaktion neben der PEP-Carboxylase in *E. coli* eingebracht werden, um die Effekte auf Wachstum, Substratverbrauch und Produktbildung zu untersuchen.
- Es sollte untersucht werden, ob Pyruvatcarboxylase in einer *E. coli*-Mutante mit defektem PEP-Carboxylase-Gen die Auffüllung des TCA-Zyklus mit Oxalacetat sicherstellen kann und welche Auswirkungen diese Maßnahme auf das Zellwachstum und die Produktbildung hat.
- Da Pyruvatcarboxylase direkt in den Pyruvatstoffwechsel der Zelle eingreift, sollte der Einfluss der Pyc auf die aerobe Acetatbildung untersucht werden.
- Pyruvatcarboxylase ermöglicht die Synthese des benötigten Oxalacetats durch Carboxylierung von Pyruvat. Es sollte untersucht werden, ob so die Verfügbarkeit des

zentralen Intermediats PEP durch Pyc erhöht werden kann. Dafür sollte das *pyc*-Gen in geeignete *E. coli*-Indikatorstämme eingebracht werden.

- Es sollte untersucht werden, ob durch das Einbringen der heterologen Pyruvatcarboxylase in *E. coli* die anaplerotischen Flüsse gesteigert werden können. Auch war von Interesse, ob durch eine einzige Maßnahme, das Einbringen von Pyc aus *C. glutamicum*, eine Umlenkung von Kohlenstoffflüssen in *E. coli* erfolgt.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Merck KGaA (Darmstadt), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen) und Roth (Karlsruhe) bezogen. Hilfsenzyme für enzymatische Umsetzungen sowie Biochemikalien und Enzyme für molekulargenetische Arbeiten stammten von Roche Diagnostics (Mannheim). Produkte weiterer Hersteller sind nachstehend aufgeführt:

Biomol (Hamburg): IPTG, NADH, X-Gal, Antibiotika

Difco Laboratories (Detroit, USA): Bacto-Trypton, Bacto-Agar, Hefeextrakt

Gibco BRL GmbH (Eggenstein): Agarose

MBI Fermentas (St. Leon-Roth): DNA-Größenstandard (1 kb-Leiter)

New England Biolabs (Schwalbach): Protein-Molekulargewichts-Standard

Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden): APS, TEMED

Qiagen GmbH (Hilden): DNA-Präparations- und Reinigungskits

2.2 Bakterienstämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind mit Genotypen und Referenzen in Tabelle 2.1 aufgeführt, die verwendeten Plasmide finden sich in Tabelle 2.2.

Tabelle 2.1: Verwendete *Escherichia coli*-Stämme und ihre relevanten genetischen Marker

Stamm	Genotyp	Referenz
DH5 α	<i>supE44 ΔlacU169 (ϕ80lacZΔM15) <i>hsdR17</i> <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i></i>	Hanahan (1983)
JCL1242	F $^-$ λ^- Δ (<i>argF lac</i>)U169 <i>ppc::Kan</i>	Chao und Liao (1993)
DF657	<i>fhu22 LAM$^-$ ompF627(T2R)</i> <i>relA1 pit10 spoT1 Δfbp287</i>	Sedivy <i>et al.</i> (1984)
R6	<i>pps edd gnd ΔargH iclR15 gnt</i>	Pousseygur <i>et al.</i> (1974)
DF657	<i>ppc::Kan</i>	G. A. Sprenger
R6	<i>ppc::Kan</i>	G. A. Sprenger
F1	Wildtyp LJ110(W3110)	Zeppenfeld <i>et al.</i> (2000)
F2	F1 <i>ppc::Kan</i>	diese Arbeit
F5	F1 <i>aroB$^-$</i>	Krämer (2000)
F27	F1 Δ (<i>pheA tyrA aroF</i>)::(<i>P_{tac}-aroF pheA^{fbr} aroL</i>)	G. A. Sprenger
F28	F1 Δ (<i>pheA tyrA aroF</i>)::Kan	G. A. Sprenger
F39	F1 Δ <i>ppc</i>	diese Arbeit
F42	F5 <i>ppc::Kan ΔargH</i>	diese Arbeit
F43	F5 Δ <i>ppc</i>	diese Arbeit
F47	F43 Δ (<i>pheA tyrA aroF</i>)::Kan	G. A. Sprenger
F48	F47 Δ (<i>pheA tyrA aroF</i>)::(<i>P_{tac}-aroF pheA^{fbr} aroL</i>)	G. A. Sprenger

Tabelle 2.2: Verwendete Plasmide und ihre Eigenschaften

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pBluescript II KS(-)	$P_{T7}P_{T3}P_{lac} lacZ' Amp^R$ $ori colE1$	Stratagene, Heidelberg
pKO3	RepA(pSC101-ts) $Cm^R oriM13$ $sacB$ aus <i>B. subtilis</i>	Link <i>et al.</i> (1997)
pVWEx1 pyc	$Kan^R lacI^q P_{tac}$ pyc aus <i>C. glutamicum</i>	Peters-Wendisch <i>et al.</i> (2001)
pACYC tac	$Cm^R lacI^q P_{tac}$ /p15a	R. Siewe, unveröffentlicht
pF36	pyc aus pVWEx1 pyc in pACYC tac (<i>SphI HindIII</i>)	J. Bongaerts
pBlue Δppc	Δppc -crossover-PCR-Produkt in pBluescript (<i>EcoRV</i>)	diese Arbeit
pKO3 Δppc	Δppc -crossover-PCR-Produkt in pKO3 (<i>XmaCI</i>)	diese Arbeit

2.3 Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

2.3.1 Medien

Die Standardanzucht von *E. coli* erfolgte in Luria-Bertani-Medium (10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 5 g/L NaCl) nach Sambrook *et al.* (1989). Zur Herstellung von Agarplatten wurde 2% (w/v) Agar hinzugegeben.

Zur Untersuchung des Wachstums der *E. coli* Stämme wurde ein Minimalmedium (MM) nach Tanaka *et al.* (1967) verwendet (Tabelle 2.3). Zur Herstellung flüssiger Medien wurden entsprechende Aliquots der konzentrierten Stammlösungen A und B mit demineralisiertem Wasser auf das gewünschte Endvolumen aufgefüllt und autoklaviert, die jeweilige Kohlenstoffquelle sowie Supplemente wurden nach dem Autoklavieren als sterile Stammlösungen zugegeben. Zur Herstellung fester Medien wurde 2% (w/v) Agar mit

Lösung B und Wasser autoklaviert, Lösung A sowie Kohlenstoffquellen und Supplemente erst danach steril zugeben.

Tabelle 2.3: Stammlösungen für Tanaka-Minimalmedium

Lösung A 10x	$NaH_2PO_4 * H_2O$	46,9	$\frac{g}{L}$
	K_2HPO_4	115	$\frac{g}{L}$
	$(NH_4)_2SO_4$	26,4	$\frac{g}{L}$
Lösung B 100x	$MgSO_4 * 7H_2O$	7,4	$\frac{g}{L}$
	$CaCl_2 * 2H_2O$	147	$\frac{mg}{L}$
	$ZnCl_2 * 2H_2O$	13,5	$\frac{mg}{L}$
	$FeSO_4 * 7H_2O$	28	$\frac{mg}{L}$
	1NHCl	1	$\frac{mL}{L}$

Zur Regeneration nach der Elektroporation (Kap. 2.4.4) wurden die Zellen in sterilfiltriertem SOC-Medium aufgenommen (20 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 2 g/L NaCl, 3,6 g/L Glukose, 2,5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$).

2.3.2 Medienzusätze

Zur Selektion antibiotikaresistenter *E. coli*-Stämme wurden den Medien nach dem Autoklavieren Antibiotika zugegeben, die jeweiligen Stammlösungen und Endkonzentrationen sind in Tabelle 2.4 aufgeführt.

Tabelle 2.4: Zugesezte Antibiotika-Stammlösungen und die entsprechenden Endkonzentrationen im Medium

Antibiotikum	Stammlösung [$\frac{mg}{mL}$]	in	Endkonzentration [$\frac{mg}{L}$]
Ampicillin	100	H ₂ O	100
Kanamycin	50	H ₂ O	50
Chloramphenicol	25	70% Ethanol	25

Thiamin wurde den flüssigen und festen Minimalmedien in einer Konzentration von 10 mg/L zugesetzt.

Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) wurde in einer Konzentration von 100 μ M zur Expression von Genen unter Kontrolle des *tac*-Promotors eingesetzt.

Wenn nicht anders angegeben, wurden 200 μ g/L Biotin zugegeben, um die posttranslationale Biotinylierung der Pyruvatcarboxylase in *E. coli* sicherzustellen.

E. coli-Mutanten mit defekter 3-Dehydroquinat-Synthase (*aroB*) wurden mit den aromatischen Aminosäuren L-Phenylalanin, L-Tyrosin und L-Tryptophan sowie Shikimat in einer Konzentration von je 40 mg/L supplementiert.

Um Stämme mit ausgeschalteter PEP-Carboxylase zu kultivieren, wurde den Minimalmedien Succinat in Konzentrationen von 0,02 - 0,2 % zugefügt.

2.3.3 Kultivierungsbedingungen

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte aerob bei 37°C auf Agarplatten oder in Flüssigkultur unter Schütteln bei 200 Upm in Reagenzröhrchen mit 5 mL Flüssigkeit oder Erlenmeyerkolben (Schüttler AK82; Infors AG, Bottmingen, Schweiz). Die Schüttelkolben wurden für Wachstumsversuche bis maximal $\frac{1}{10}$ ihres Volumens mit Flüssigkeit gefüllt. Für Kultivierungen in Minimalmedium wurden die Einzelkolonien zunächst in 5 mL Vollmedium angezogen und anschließend 1 %ig in 5 mL Minimalmedium mit der entsprechenden Kohlenstoffquelle überimpft. Aus dieser Vorkultur wurde die Hauptkultur zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von 0,05 angeimpft (Kap. 2.3.4) .

Für Plasmidisolationen wurden je nach Kopienzahl der Vektoren 2 bis 4 mL einer über Nacht in 5 mL LB-Medium angezogenen Kultur verwendet.

Zur Stammhaltung wurden exponentiell wachsende *E. coli*-Kulturen mit 50 % (v/v) sterilem Glycerin versetzt und bei -70°C gelagert.

2.3.4 Bestimmung des Bakterienwachstums

Das Wachstum von *E. coli* in Flüssigkultur wurde anhand der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀) photometrisch bestimmt (Ultrospec 3000 pro; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg), als Referenz diente das jeweilige sterile Medium. Um das Wachstum der Kulturen zu beschreiben, wurde die Wachstumsrate μ als Maß für die Geschwindigkeit des Zellwachstums in der exponentiellen Phase bestimmt. Diese wurde aus den zu den Zeiten t_0 und t gemessenen Bakteriendichten x_0 und x_t nach Gleichung 2.1 ermittelt (Schlegel, 1992):

$$\mu = \frac{\ln x_t - \ln x_0}{(t - t_0)} \quad (2.1)$$

μ	exponentielle Wachstumsrate	$[\frac{1}{h}]$
x_t	Bakteriendichte zum Zeitpunkt t	$[-]$
x_0	Bakteriendichte zum Zeitpunkt t_0	$[-]$
t_0	Zeitpunkt 0	$[h]$
t	Zeitpunkt t	$[h]$

Die Verdopplungszeit t_d wurde nach Gleichung 2.2 bestimmt:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (2.2)$$

t_d	Verdopplungszeit	$[h]$
μ	exponentielle Wachstumsrate	$[\frac{1}{h}]$

2.4 Molekulargenetische Methoden

2.4.1 Isolierung und Reinigung von DNA

Die Gefäße und Lösungen für das Arbeiten mit Nukleinsäuren wurden zur Inaktivierung von Nukleasen autoklaviert.

Plasmid-Präparationen aus *E. coli* erfolgten mit dem „QIAprep Spin Mini Kit“ der Firma Qiagen (Hilden) aus 2 bis 4 mL einer Übernachtskultur (Kap. 2.3.3) nach Vorschrift des Herstellers. Zur Isolation von DNA aus Agarosegelen wurde das „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) verwendet, zum Umpuffern von DNA-Lösungen für Restriktionsansätze und zum Abtrennen von Restriktionsenzymen wurde das „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen) eingesetzt.

Die Auftrennung und Größenbestimmung von DNA-Fragmenten sowie die Abschätzung der DNA-Konzentration erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung in TAE-Agarosegelen nach Sambrook *et al.* (1989).

2.4.2 Enzymatische Modifikation von DNA

Die Restriktion von DNA erfolgte gemäß Herstellerhinweisen. Restriktionsansätze hatten ein Mindestvolumen von 10 μ L, dabei wurden für einen analytischen Ansatz bis zu 500 ng DNA verdaut, für einen präparativen Ansatz bis zu 5 μ g DNA. Die Menge an eingesetztem Enzym betrug 2 bis 5 Units pro μ g DNA (Sambrook *et al.*, 1989), die Ansätze wurden 1-2 Stunden bei der jeweiligen Temperatur inkubiert (i.d.R. 37°C).

Um eine Rezirkularisierung linearisierter Vektor-DNA zu verhindern, wurde die 5' Phosphatgruppe mit alkalischer Phosphatase aus arktischen Garnelen nach Anweisung des Herstellers abgespalten (Sambrook *et al.*, 1989).

Die Ligation von DNA-Fragmenten (Sambrook *et al.*, 1989) erfolgte entweder mit T4-DNA Ligase über Nacht bei 16°C oder mit dem „Rapid DNA Ligation Kit“ (Roche Diagnostics,

Mannheim) bei RT nach Anweisungen des Herstellers. Dabei wurde die molaren Verhältnisse von Vektor und Insert abhängig von den Fragmentgrößen variiert.

2.4.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Mullis und Faloona, 1987) wurde genutzt, um *in vitro* einen definierten DNA-Abschnitt von Plasmiden oder chromosomaler DNA zu amplifizieren. Der zu amplifizierende Bereich wird dabei von zwei Primern mit bekannter DNA-Sequenz begrenzt. Zur anschließenden Klonierung der amplifizierten Sequenzen in Expressionsvektoren wurden über die Primer Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen eingefügt. Das Volumen eines PCR-Ansatzes betrug 50 μ L und enthielt in 1x Polymerase-Puffer die in Tabelle 2.5 aufgeführten Komponenten.

Tabelle 2.5: Zusammensetzung des Standard-PCR-Ansatzes in 1x Polymerase-Puffer

10-30	ng	Matrizen-DNA
600	nM	Primer 1
600	nM	Primer 2
200	μ M	dATP
200	μ M	dCTP
200	μ M	dGTP
200	μ M	dTTP
5	U	Polymerase

Pwo-DNA-Polymerase generiert glatte Enden und wurde eingesetzt, um die anschließende Klonierung der PCR-Produkte in den mit *EcoRV* linearisierten Vektor pBluescript (Tab. 2.2) zu ermöglichen. *Taq*-DNA-Polymerase kam zum Einsatz, wenn die Korrekturleseaktivität der *Pwo*-DNA-Polymerase nicht erforderlich war (z.B. Kontrollen chromosomaler Veränderungen). Für alle PCR-Ansätze wurden parallele Kontrollen mit nur jeweils einem Primer und ohne Matrizen-DNA durchgeführt.

Um im Chromosom von *E. coli* genetische Marker per PCR zu überprüfen, wurden in den entsprechenden Ansätzen ganze Zellen durch Erhitzen aufgeschlossen. Die nach dem

ersten Denaturierungsschritt bei 94°C (s. u.) für die Polymerase zugängliche DNA wurde statt präparierter chromosomaler DNA als Matrize eingesetzt. Die zu untersuchenden Klone wurden gepickt und in 100 µL entmineralisiertem Wasser resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 5 µL im PCR-Ansatz eingesetzt.

Die DNA in den Reaktionsansätzen wurde in einem Peltier Thermal Cycler (PTC-200; MJ Research) zu Beginn für 2 Minuten bei 94°C denaturiert, das folgende Temperaturprofil sowie Dauer und Anzahl der Zyklen wurden den jeweiligen Gegebenheiten angepasst. Dabei richtete sich die Anlagerungstemperatur nach der Schmelztemperatur T_m der Primer (normalerweise $\sim 2^\circ\text{C}$ unter T_m), die Dauer der Polymerisierung nach der Länge des zu erwartenden Amplifikats (Standard-PCR: 45 Sekunden Elongation pro kb DNA). Die Schmelztemperatur der Primer wurde nach Gleichung 2.3 ermittelt (Chester und Mars-hak, 1993):

$$T_m = 69,3^\circ\text{C} + [0,41 * (GC) - \frac{650}{bp}] \quad (2.3)$$

T_m	Schmelztemperatur	[°C]
GC	GC-Gehalt des Primers	[%]
bp	Länge des Primers in Basenpaaren	

Die in der PCR verwendeten Oligonukleotide wurden von MWG Biotech (Ebersberg) bezogen und sind in Tabelle 2.6 aufgelistet.

2.4.4 Transformation von *E. coli*

Die Standard-Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli* erfolgte mittels Hitzeschockmethode, per Elektroporation wurde der Mutagenesevektor pKO3 (Kap. 3.1.1) in die Zelle eingebracht:

Bei der **Hitzeschocktransformation** wurden kompetente Zellen nach der Rubidiumchloridmethode (Hanahan, 1983) hergestellt. Zur Transformation wurden 10 - 200 ng

Tabelle 2.6: Bezeichnung und Sequenz der verwendeten Oligonukleotide zur Deletion des *ppc*-Gens. Die Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen sind fett gedruckt, die komplementäre Ersatzsequenz der inneren Primer in Großbuchstaben. Die Primer wurden auf Basis der publizierten *E. coli*-Genomsequenz (Blattner *et al.*, 1997) erstellt

Primer	Sequenz 5' → 3'	Schnittstelle
C_{out}	gagg cccggg tatccaacgttttctcaaacg	<i>Xma</i> CI
C_{in}	CACGCAATAACCTTCACACTCCAAATTTATAAC taatcttctcttctgcaaaccctcgtgc	
N_{out}	ttggg cccggg ctcaattaatcaggctcatc	<i>Xma</i> CI
N_{in}	GTTATAAATTTGGAGTGTGAAGGTTATTGCGTG catattaccccagacaccccatcttatcg	

Plasmid-DNA zu 200 μ L kompetenten Zellen gegeben und der Ansatz für eine Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock von 42°C für 2 Minuten, danach wurden die Zellen noch 5 Minuten auf Eis gelagert, bevor 800 μ L LB-Medium zugegeben wurde und die Zellen zur Regeneration für eine Stunde bei 37°C geschüttelt wurden. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation (15.300 Upm; 1 min; 4°C; Rotor 12148, Tischzentrifuge 2K15, Sigma, Osterode) geerntet, in 100 μ L LB-Medium resuspendiert und auf Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Ligationsansätze (Kap. 2.4.2) wurden komplett zur Transformation eingesetzt.

Für die **Elektroporation** nach Dower *et al.* (1988) wurden elektrokompetente Zellen in 40 μ L-Aliquots zur Elektroporation eingesetzt. Zur Transformation wurden 10 - 100 ng entsalzte DNA zu den Zellen gegeben, die Ansätze in gekühlte 0,2 cm-Elektroporationsküvetten (Biorad Laboratories, München) überführt und 5 min auf Eis gelagert, bevor die Elektroporation in einem Gene-Pulser (Biorad Laboratories, München) mit den folgenden Einstellungen durchgeführt wurde: Kapazität 25 μ Fd; Spannung 2,5 kV; Widerstand 200 Ω . Die sich ergebenden Zeitkonstanten lagen zwischen 3,2 und 4,9 ms. Direkt nach dem Puls wurden die Zellen in 2 mL SOC-Medium aufgenommen und für eine Stunde bei 30°C bzw. 37°C leicht schüttelnd inkubiert, bevor sie wie für die Hitzeschocktransformation beschrieben geerntet und auf entsprechenden Selektivnährböden ausplattiert wurden.

2.4.5 Selektion rekombinanter *E. coli* Zellen

Die Selektion rekombinanter *E. coli* Zellen erfolgte neben der Antibiotikaresistenz über den α -Komplementationstest (Blau-Weiß-Selektion) nach Ullman *et al.* (1967), welcher die Möglichkeit zur intragenen Komplementation nutzt. Das verwendete Wirtsbakterium DH5 α (Tab. 2.1) trägt eine Deletion (Δ M15) im β -Galactosidasegen und bildet daher enzymatisch inaktive Proteinfragmente. Der entsprechende Klonierungsvektor pBluescript (Tab. 2.2) enthält *lacZ'*, welches für das sogenannte α -Peptid codiert. Dieses besteht aus den ersten 146 Aminosäuren der β -Galactosidase und ist ebenfalls enzymatisch inaktiv. Die α -Komplementation beruht auf der nicht kovalenten Reassoziaton der beiden Peptidfragmente zur enzymatisch aktiven β -Galactosidase. In Gegenwart des chromogenen Substrates 5-Brom-4-Chlor-3-Indoyl- β -D-galaktopyranosid (X-Gal) entstehen so blau gefärbte Bakterienkolonien. Diese bleiben gefärbt, da nach Hydrolyse des X-Gal durch Luftoxidation schwer löslicher, blauer Indigofarbstoff entsteht, der nicht aus den Zellen diffundiert. Wird die für das α -Peptid codierende Region des Vektors durch Einbau von Fremd-DNA unterbrochen, geht in der Regel die Fähigkeit zur Komplementation und damit zur Bildung von enzymatisch aktiver β -Galactosidase verloren. Daher lassen sich die rekombinante Plasmide enthaltenden Kolonien an ihrer weißen Farbe erkennen (Ibelgauf, 1993).

Die verwendeten LB-Platten enthielten 0,3 mM IPTG sowie 0,03 % X-Gal [gelöst in DMF (*N, N'*-Dimethylformamid)] (Horwitz *et al.*, 1964).

2.4.6 Transduktion von *E. coli*

Zur Transduktion von *E. coli* wurde der generell transduzierende Phage P1_{kc} verwendet, er überträgt DNA-Fragmente von bis zu 90 kbp Länge. Die Herstellung der Phagenlysate und die Transduktion erfolgte nach Miller (1992).

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Proteinkonzentrationsbestimmung

Der Proteingehalt von Lösungen wurde nach der Methode von Bradford (1976) photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm ermittelt (Ultrospec 3000 pro; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg), wobei die mit Rinderserumalbumin (BSA) erstellte Kalibrierungsgerade im Bereich von 25 - 300 μg Protein pro mL linear war.

2.5.2 Fällung von Proteinen

Um Proteine aus Rohextrakten zu konzentrieren, wurden diese mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt. Hierfür wurde die erforderliche Menge Rohextrakt mit $\frac{1}{10}$ -Volumen 70 %iger TCA versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Die gefällten Proteine wurden abzentrifugiert (15300 Upm; 15 min; 4°C; Rotor 12148, Tischzentrifuge 2K15, Sigma, Osterode), der Überstand abgezogen und das Sediment mit 200 μL 80 %igem Aceton gewaschen. Das Sediment wurde bis zur Trockne im offenen Eppendorfgefäß bei RT inkubiert und dann in Probenpuffer (Kap. 2.5.3) resuspendiert.

2.5.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen in Rohextrakten von *E. coli* (Kap. 2.6.1) nach ihrer Molekülgröße erfolgte durch **Polyacrylamid-Gelelektrophorese** (PAGE) unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli (1970). Es wurden 8 %ige Trenngele, überschichtet von 5 %igen Sammelgelen, nach Sambrook *et al.* (1989) verwendet. Pro Geltasche wurden 10 - 50 μg Protein aufgetragen, die Proben wurden vor dem Auftragen mit Probenpuffer versetzt (60 mM Tris/HCl pH 6,8; 10 % (v/v) Glycerin; 3 % (w/v) SDS; 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol; 0,0025 % (w/v) Bromphenolblau) und zur Denaturierung 5 min auf 95°C erhitzt.

Das Molekulargewicht der Proteine wurde anhand eines vorgefärbten Protein-Molekulargewichts-Standards (New England Biolabs, Schwalbach) abgeschätzt. Der Gellauf erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100 V in der Mini-Gel Apparatur (Minigel Twin, Biometra, Göttingen), der verwendete Laufpuffer enthielt 25 mM Tris/HCl, 192 mM Glycin und 0,1 % (w/v) SDS.

2.5.4 Western Blot Analyse

Biotinylierte Proteine wurden per Western Blot detektiert, dabei wurden die Proteine nach der Auftrennung im SDS-PAGE (Kap. 2.5.3) in einer Transferapparatur (Mini Protean II, Biometra, Göttingen) auf Nitrocellulosemembranen (Protran, Schleicher & Schüll, Dassel) übertragen. Der Transfer erfolgte für eine Stunde bei 100 V in Übertragungspuffer (25 mM Tris/HCl pH 8,0; 190 mM Glycin).

Anschließend wurden die Membranen zur Absättigung mit Protein für eine Stunde in Blocklösung geschüttelt [50 mM Tris/HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 1,5 % (w/v) BSA]. Zur Entfernung von nicht gebundenem Protein wurden die Membranen 3x für 15 min in Waschpuffer [50 mM Tris/HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,3 % (w/v) BSA; 0,1 % (w/v) Tween 20] gewaschen.

Die spezifische Markierung biotinylierter Proteine erfolgte mit einem Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat (Roche Diagnostics, Mannheim). Durch die hohe Affinität von Streptavidin zu Biotin (Bindungskonstante $K_{diss}=10^{-15}$ M) bindet Streptavidin spezifisch an den Biotinyl-Rest der nachzuweisenden Proteine (Cronan Jr., 1990). Durch die Konjugation von Streptavidin mit alkalischer Phosphatase ließen sich die Biotin-Protein-Streptavidin-Komplexe durch eine Farbreaktion detektieren.

Die spezifische Markierung der biotinylierten Proteine erfolgte nach Anweisungen des Herstellers für 30 min in Waschpuffer. Vor der Detektion wurden die Membranen noch 3x für je 15 min in Waschpuffer geschüttelt und anschließend für 5 min in Alkalische-Phosphatase-Puffer äquilibriert (AP-Puffer: 100 mM Tris/HCl pH 9,5; 100 mM NaCl; 50 mM $MgCl_2$). Der Nachweis des Biotin-Protein-Streptavidin-Komplexes erfolgte durch Umsetzung der

zum AP-Puffer gegebenen Substrate Nitroblau-Tetrazoliumsalz (NBT; $337\mu\text{g/mL}$) und 5-Brom-4-Chlor-Indoylphosphat (BCIP; $175\mu\text{g/mL}$) durch die alkalische Phosphatase zum purpurfarbigen Diformazan und Indigo. Die Farbreaktion wurde bei ausreichender Intensität der Banden durch Überführen der Membranen in Trichloressigsäure (3 %ige Lösung) gestoppt.

Als Positivkontrolle diente die biotinylierte Untereinheit der Acyl-CoA Carboxylase von *Corynebacterium glutamicum*, die freundlicherweise von Y. Tilg (Tilg, 2002) zur Verfügung gestellt wurde.

2.6 Gewinnung von zellfreien Extrakten

2.6.1 Aufschluss in der Kugelmühle

Die zellfreien Extrakte zum Nachweis biotinylierter Proteine (Kap. 2.5.3 und 2.5.4) wurden durch Zellaufschluß in der Kugelmühle gewonnen. Hierfür wurden die Zellen nach der Ernte (8000 Upm; 4 min; 4°C ; Rotor 12149, Tischzentrifuge 2K15, Sigma, Osterode) zweimal mit Puffer TE (10 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA) gewaschen und anschließend in 1 mL TE resuspendiert. Nach Zugabe von Glasperlen (0,1 - 0,25 mm Durchmesser; Fa. Clauss, Nidderau) wurden die Zellen in einer Kugelmühle (MM2, Fa. Retsch, Haan) bei maximaler Leistung für 2 min aufgeschlossen. Um proteolytischen Abbau der Proteine zu verhindern, wurde dem Aufschlusspuffer ein Proteaseinhibitor-Mix (Complete, Roche Diagnostics) zugegeben. Glasperlen und Zelltrümmer wurden anschließend durch Zentrifugation abgetrennt (15300 Upm; 1 h; 4°C ; Rotor 12148, Tischzentrifuge 2K15, Sigma, Osterode) und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

2.6.2 Ultraschallaufschluss

Zur Bestimmung von Enzymaktivitäten (Kap. 2.8.1 und 2.8.2) wurden die Zellen nach der Ernte (8000 Upm; 4 min; 4°C ; Rotor 12149, Tischzentrifuge 2K15, Sigma, Osterode)

zweimal mit dem entsprechenden Aufschlusspuffer (abhängig vom nachfolgenden Enzymaktivitätstest) gewaschen und anschließend in 1 mL Aufschlusspuffer unter Zusatz von 1 mM Dithiothreitol (DTT) resuspendiert. Der Aufschluss erfolgte mittels Ultraschallprozessor (UP200S, Dr. Hielscher GmbH; Cycle 0,5, Amplitude 55) für 6x 30 sek mit je 30 sek Pause im gerührten Eisbad. Nach dem Aufschluß wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation entfernt (15300 Upm; 1 h; 4°C; Rotor 12148; Tischzentrifuge 2K15; Sigma; Osterode) und der zellfreie Extrakt in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

2.7 Permeabilisierung von Zellen

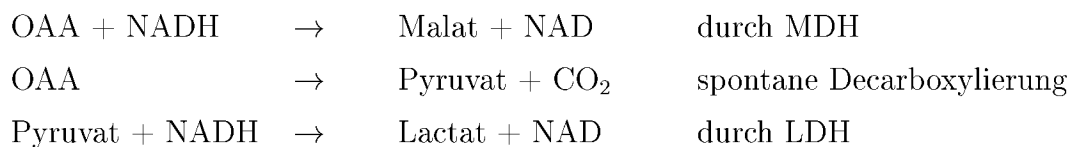
Um die Zellmembran permeabel für niedermolekulare Metabolite zu machen, wurden die Zellen einer Toluolbehandlung unterzogen (Kornberg und Reeves, 1972). Nach der Ernte (8000 Upm; 4 min; 4°C; Rotor 12149, Tischzentrifuge 2K15, Sigma, Osterode) wurden die Zellen hierfür zunächst 2x mit 100 mM Tris/HCl pH 7,4 gewaschen und zur gewünschten OD₆₀₀ in 1 mL Puffer resuspendiert. Pro mL Zellsuspension wurden 10 µL Toluol zugegeben, der Ansatz für 1 min intensiv gemischt (Vortex „Reax Control“, Fa. Heidolph) und für 10 min unter gelegentlichem Schütteln auf Eis inkubiert. Die so permeabilisierten Zellen wurden in 100 µL-Aliquots zur Bestimmung der Pyc-Aktivität (Kap. 2.8.2) eingesetzt.

2.8 Bestimmung von Enzymaktivitäten

2.8.1 Bestimmung der PEP-Carboxylase-Aktivität

Die PEP-Carboxylase (Ppc) katalysiert die Carboxylierung von Phosphoenolpyruvat (PEP) zu Oxalacetat (OAA). Die Aktivität der Ppc wurde in einem gekoppelten Enzymtest mit Lactatdehydrogenase (LDH) und Malatdehydrogenase (MDH) nach folgendem Prinzip ermittelt (Meyer *et al.*, 1988):





Das durch die Aktivität der Ppc gebildete Oxalacetat (OAA) wurde dabei von Malatdehydrogenase zu Malat umgesetzt, wobei reduziertes Nikotinamid-adenin-dinukleotid (NADH) oxidiert wird. Weiterhin wird das durch spontane Decarboxylierung von OAA entstehende Pyruvat durch Lactatdehydrogenase zu Lactat umgesetzt, ebenfalls unter NADH-Oxidation. Die Oxidation von NADH konnte photometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm (Ultrospec 3000 pro; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) verfolgt werden. NADH wird in diesem System äquimolar zum gebildeten OAA oxidiert, die Rate der NADH-Oxidation kann somit zur Berechnung der Ppc-Aktivität herangezogen werden. Die Zusammensetzung des Ppc-Testansatzes ist in Tabelle 2.7 aufgeführt.

Tabelle 2.7: Testansatz zur Bestimmung der Ppc-Aktivität *in vitro*. Testpuffer 100 mM Tris/HCl pH 8,0, Temperatur 25°C, Volumen 1 mL.

KHCO ₃	25	mM
MgCl ₂	10	mM
NADH ₂	0,3	mM
Acetyl-CoA	1	mM
PEP	10	mM
Malatdehydrogenase	2	U
Lactatdehydrogenase	2	U

Eine entsprechende Menge Rohextrakt (10 - 100 µL, je nach Ppc-Aktivität) wurde zum Testmix (KHCO₃, MgCl₂, NADH₂, Acetyl-CoA und Hilfsenzyme in Testpuffer) in Halbmikro-Küvetten (Plastibrand; Schichtdicke 1 cm) pipettiert. Die unspezifische NADH-Oxidation wurde über 1 min verfolgt (Vorlauf), bevor durch Zugabe des Substrats PEP die Reaktion gestartet wurde (Hauptlauf). Ergaben sich lineare Extinktionsabnahmen über mindestens eine Minute, wurden die Extinktionsänderungen pro Minute in Vor- und Hauptlauf ermittelt. Die Ppc-spezifische Extinktionsänderung pro Minute ergab sich

aus der Differenz der Steigung von Vorlauf und Hauptlauf, die absolute Ppc-Aktivität wurde damit nach Gleichung 2.4 berechnet.

$$EA = \frac{\Delta E_{340} * V}{\epsilon_{340,NADH} * d * v} \quad (2.4)$$

EA	absolute Enzymaktivität	$[\frac{U}{mL}]$
ΔE_{340}	Extinktionsänderung pro Minute	$[\frac{1}{min}]$
V	Gesamtvolumen des Ansatzes	[mL]
$\epsilon_{340,NADH}$	molarer Extinktionskoeffizient von NADH ($6,22 \cdot 10^3$)	$[\frac{1}{M \cdot cm}]$
d	Schichtdicke	[cm]
v	eingesetzte Menge Rohextrakt	[μ L]

Die spezifische Ppc-Aktivität [U/mg] wurde durch die Division der absoluten Enzymaktivität durch den Proteingehalt des Rohextraktes erhalten. Ein Unit Enzym setzt definitionsgemäß 1 μ mol Substrat pro Minute um.

2.8.2 Bestimmung der Pyruvatcarboxylase-Aktivität

Die Pyruvatcarboxylase katalysiert die Carboxylierung von Pyruvat zu Oxalacetat unter ATP-Verbrauch (Scrutton und Young, 1972).



In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Tests zur Bestimmung der Pyc-Aktivität eingesetzt, allen lag der Nachweis des gebildeten OAA zugrunde.

I. Kontinuierlicher, Malatdehydrogenase-gekoppelter Test

In diesem photometrischen Test nach Payne und Morris (1969) wird das gebildete OAA durch Malatdehydrogenase (MDH) unter äquimolarem NADH-Verbrauch zu Malat umgesetzt.



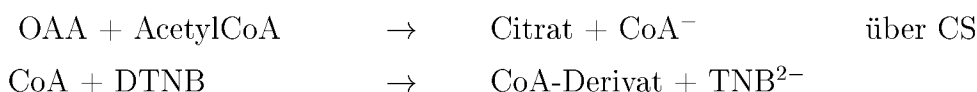
Die Zellen wurden wie unter Kapitel 2.6.2 beschrieben in 50 mM Tris/HCl pH 7,2 mit 1 mM DTT aufgeschlossen. Der Testansatz enthielt die in Tabelle 2.8 aufgeführten Komponenten. Eine entsprechende Menge Rohextrakt wurde zum Testmix (NaHCO_3 , MgCl_2 , NADH_2 , Pyruvat und Hilfsenzym in Testpuffer) pipettiert, nach einem Vorlauf von 1 min wurde die Reaktion durch Zugabe von ATP gestartet. Wie in Kapitel 2.8.1 für die Ppc beschrieben, wurde auch in diesem Ansatz die Abnahme von NADH photometrisch verfolgt und die Pyc-Aktivität berechnet (Gleichung 2.4).

Tabelle 2.8: Testansatz zur Bestimmung der Pyc-Aktivität *in vitro* in kontinuierlichen Malatdehydrogenase-Ansatz. Testpuffer 50 mM Tris/HCl pH 7,2, Temperatur 25°C, Volumen 1 mL.

NaHCO_3	15	mM
MgCl_2	10	mM
NADH_2	0,3	mM
Pyruvat	3	mM
Malatdehydrogenase	12	U
ATP	1,5	mM

II. Kontinuierlicher, Citratsynthase-gekoppelter Test

In diesem photometrischen Test nach Payne und Morris (1969) wird das gebildete OAA über Citrat-Synthase (CS) zu Citrat und Coenzym A umgesetzt. Der Aktivitätsnachweis beruht auf der Reaktion des freiwerdenden Coenzym A mit Dithionitrobenzoesäure (DTNB) zu einem gemischten Disulfid von Coenzym A und Thionitrobenzoesäure sowie einem molaren Äquivalent an gelbgefärbtem 5-Thio-2-Nitrobenzoat (TNB^{2-}). Dieses kann photometrisch nachgewiesen werden. Die Bildungsrate von TNB^{2-} ist direkt korreliert mit der Acetylierung von OAA und somit mit dem Umsatz von Pyruvat zu OAA durch Pyc.



Der Ansatz enthielt die in Tabelle 2.9 aufgeführten Komponenten, eine entsprechende Menge Rohextrakt (Aufschlußpuffer 50 mM Tris/HCl pH 7,2 mit 1 mM DTT; Kap. 2.6.2) wurde zum Testmix (NaHCO₃, MgCl₂, AcetylCoA, Pyruvat, DTNB und Hilfsenzym in Testpuffer) in Halbmikroküvetten (Plastibrand; Schichtdicke 1 cm) pipettiert, nach einem Vorlauf von 1 min wurde die Reaktion durch Zugabe von ATP gestartet. Die Bildung von TNB²⁻ konnte photometrisch bei 412 nm (Ultrospec 3000 pro; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) verfolgt werden, die Pyc-Aktivität wurde analog zu Berechnung der Ppc-Aktivität (Kap. 2.8.1) mit dem entsprechenden molaren Extinktionskoeffizienten des TNB-Dianions nach Gleichung 2.5 ermittelt.

Tabelle 2.9: Testansatz zur Bestimmung der Pyc-Aktivität *in vitro* im kontinuierlichen Citratsynthase-Ansatz. Testpuffer 50 mM Tris/HCl pH 7,2, Temperatur 25°C, Volumen 1 mL.

NaHCO ₃	10	mM
MgCl ₂	10	mM
AcetylCoA	0,2	mM
Pyruvat	3	mM
Citratsynthase	2	U
DTNB	0,2	mM
ATP	1,5	mM

$$EA = \frac{\Delta E_{412} * V}{\epsilon_{412,TNB} * d * v} \quad (2.5)$$

EA	absolute Enzymaktivität	$\left[\frac{U}{mL}\right]$
ΔE_{412}	Extinktionsänderung pro Minute	$\left[\frac{1}{min}\right]$
V	Gesamtvolumen des Ansatzes	[mL]
$\epsilon_{412,TNB}$	molarer Extinktionskoeffizient von TNB ²⁻ (1,36*10 ⁴)	$\left[\frac{1}{M*cm}\right]$
d	Schichtdicke	[cm]
v	eingesetzte Menge Rohextrakt	[μ L]

III. Diskontinuierlicher, Citratsynthase-gekoppelter Test

In diesem Test wurden statt zellfreier Extrakte permeabilisierte Zellen eingesetzt. Das Testprinzip wurde bereits für den kontinuierlichen, Citrat-Synthase gekoppelten Test unter Punkt II beschrieben, der Aktivitätsnachweis beruhte analog zu II. auf der photometrischen Detektion des entstehenden TNB-Dianions.

Die Zellen wurden wie beschrieben (Kap. 2.7) zu einer OD_{600} von 5 resuspendiert, permeabilisiert und in 100 μ L-Aliquots direkt im Test eingesetzt, die Zusammensetzung des Ansatzes ist in Tabelle 2.10 beschrieben.

Tabelle 2.10: Testansatz zur Bestimmung der Pyc-Aktivität *in vitro* im diskontinuierlichen, Citratsynthase-gekoppelten Ansatz. Testpuffer 50 mM Tris/HCl pH 7,3 Temperatur 25°C, Volumen 1 mL.

NaHCO ₃	25	mM
MgCl ₂	1	mM
AcetylCoA	0,2	mM
Pyruvat	5	mM
Citratsynthase	2	U
DTNB	0,2	mM
ATP	4	mM

Die Reaktion wurde in 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäßen durchgeführt, Testmix (NaHCO₃, MgCl₂, AcetylCoA, DTNB, ATP und Hilfsenzym in Testpuffer) und Zellen wurden zusammengegeben, für 2 min bei 25°C vorinkubiert und die Reaktion durch Zugabe von Pyruvat gestartet. Als Referenz dienten Ansätze ohne Pyruvat. Die Reaktion wurde zu den entsprechenden Zeitpunkten durch schnelles Abkühlen der Ansätze in flüssigem Stickstoff gestoppt, anschließend wurde während des Auftauprozesses die Biomasse durch Zentrifugation (15300 Upm; 30 min; 4°C; Rotor 12148, Tischzentrifuge 2K15, Sigma, Osterode) separiert. In den klaren Überständen wurde die Extinktion in Halbmikroküvetten (Plastibrand, Schichtdicke 1 cm) bei einer Wellenlänge von 412 nm bestimmt (Ultrospec 3000 pro; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Die Pyc-Aktivität wurde nach Gleichung 2.6 ermittelt.

$$EA = \frac{\Delta E_{412} * V}{\epsilon_{412,TNB} * d * v} \quad (2.6)$$

EA	absolute Enzymaktivität	$[\frac{U}{mL}]$
ΔE_{412}	Extinktionsänderung pro Minute	$[\frac{1}{min}]$
V	Gesamtvolumen des Ansatzes	$[mL]$
$\epsilon_{412,TNB}$	molarer Extinktionskoeffizient von TNB ²⁻ (1,36*10 ⁴)	$[\frac{1}{M*cm}]$
d	Schichtdicke	$[cm]$
v	eingesetzte Menge Zellsuspension (100)	$[\mu L]$

2.9 Untersuchungen im begasten Rührkessel

2.9.1 Anzucht der Vorkulturen

Zur Charakterisierung der Effekte von Pyc in den Stämmen F5, F43 und F48 (Tab. 2.1) im begasten Rührkessel (siehe Kap. 2.9.2) wurden die Zellen nach Anzucht in LB (Kap. 2.3.3) in 150 mL Vorkulturmedium (Tab. 2.11, Stammlösungen in Tab. 2.12) im 1L Erlenmeyerkolben mit Schikanen zu einer OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft und für 8 h bei 37°C schüttelnd (175 Upm; Schüttler AK82, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) inkubiert. Den Vorkulturen für *aroB*-Mutanten (Tab. 2.1) wurden die aromatischen Aminosäuren L-Tyrosin, L-Tryptophan und L-Phenylalanin sowie Shikimat mit je 40 mg/L zugegeben. Mutanten mit defekter Ppc wurden mit 0,05% Succinat supplementiert (Kap. 2.3.2).

2.9.2 Fermentationsmedium

Die Vorkulturen für Fermentationen im begasten Rührkessel (Kap. 2.9.1) wurden in der frühen stationären Phase (OD₆₀₀ ~3; noch Restglukose vorhanden) komplett in die

Tabelle 2.11: DSM-Vorkulturmedium nach Pan *et al.* (1987), modifiziert von DSM Biotech GmbH, Jülich. Stammlösungen siehe Tab. 2.12.

KH_2PO_4	3	$\frac{g}{L}$
K_2HPO_4	12	$\frac{g}{L}$
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5	$\frac{g}{L}$
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,3	$\frac{g}{L}$
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,015	$\frac{g}{L}$
NaCl	0,1	$\frac{g}{L}$
Glukose	5	$\frac{g}{L}$
FeSO_4 -Stammlösung	10	$\frac{mL}{L}$
Thiamin	10	$\frac{mg}{L}$
Spurenelement-Stammlösung	1,5	$\frac{mL}{L}$
Chloramphenicol	25	$\frac{mg}{L}$
Biotin	0,2	$\frac{mg}{L}$

Fermenter überführt. Das Fermentationsmedium ist in Tabelle 2.13 beschrieben, im Gegensatz zum Vorkulturmedium (Tab. 2.11) ist es ungepuffert, da während des Prozesses der pH-Wert geregelt wurde (Kap. 2.9.3).

Zur Kultivierung von *aroB*-Mutanten im Fermenter wurden die aromatischen Aminosäuren L-Tyrosin, L-Tryptophan und L-Phenylalanin in Konzentrationen von 1,4 mM zugegeben, Shikimat wurde 0,14 mM supplementiert. Mutanten mit defekter Ppc erhielten 0,23 % Succinat, um wachsen zu können, wenn Pyc nicht plasmidkodiert exprimiert wurde. Diese im Vergleich zur Vorkultur erhöhte Succinatkonzentration wurde gewählt, da im Fermenter mit $\text{OD}_{620} = 20$ wesentlich mehr Biomasse gebildet werden sollte (Kap. 3.5.2). Der Induktor IPTG (Kap. 2.3.2) wurde unmittelbar vor dem Animpfen des entsprechenden Fermenters zugegeben.

Tabelle 2.12: Stammlösungen für DSM-Vorkultur- und Fermentationsmedien

Spurenelemente	$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$	2	$\frac{\text{g}}{\text{L}}$
	$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,75	$\frac{\text{g}}{\text{L}}$
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2,5	$\frac{\text{g}}{\text{L}}$
	H_3BO_3	0,5	$\frac{\text{g}}{\text{L}}$
	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	24	$\frac{\text{g}}{\text{L}}$
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3	$\frac{\text{g}}{\text{L}}$
	$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2,5	$\frac{\text{g}}{\text{L}}$
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	15	$\frac{\text{g}}{\text{L}}$
FeSO_4 -Stlsg.	Citrat	100	$\frac{\text{g}}{\text{L}}$
	FeSO_4	7,5	$\frac{\text{g}}{\text{L}}$

2.9.3 Apparativer Aufbau und „online“-Analytik

Die Fermentationen wurden in sechsfach parallelen, begasten Rührkesseln (Sixfors Vario, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) mit 1,5 L Flüssigkeitsvolumen durchgeführt. Die Prozessdatenerfassung erfolgte mit Hilfe der Software „Lab View“ (National Instruments). Abbildung 2.1 zeigt das Fließbild eines Bioreaktors.

Die **Temperatur** betrug 37°C und wurde mittels eines Pt-100 Sensors erfasst, die Temperierung erfolgte über integrierte PID-Regler und elektrisch beheizte Thermomäntel bzw. in die Kulturbrühe eintauchende Kühlfinger.

Die **Begasung** erfolgte mit trockener Luft (Vordruck 1,0 bar) über einen Massenstromregler (Brooks), die Begasungsrate wurde dabei im Laufe des Prozesses den Erfordernissen angepasst (0,5 - 1,5 L/min).

Die **Gelöstsauerstoffkonzentration** wurde über eine amperometrische Sauerstoffelektrode (Mettler-Toledo, Giessen) erfasst, welche vor Beginn der Fermentation kalibriert wurde: 100% Sättigung wurden erreicht durch Begasung mit 1,5 L/min unter Prozessbedingungen (37°C; pH 6,5) bei einer Drehzahl von 1000 Upm; 0 % Sättigung wurden durch Begasung mit Stickstoff erzielt. Die Gelöstsauerstoffkonzentration wurde über die Rührerdrehzahl auf 30 % geregelt.

Tabelle 2.13: DSM-Fermentationsmedium nach Pan *et al.* (1987), modifiziert von DSM Biotech GmbH, Jülich. Stammlösungen siehe Tab. 2.12.

KH_2PO_4	3	$\frac{g}{L}$
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5	$\frac{g}{L}$
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3	$\frac{g}{L}$
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,015	$\frac{g}{L}$
NaCl	1	$\frac{g}{L}$
Glukose	14	$\frac{g}{L}$
FeSO_4 -Stammlösung	10	$\frac{mL}{L}$
Thiamin	10	$\frac{mg}{L}$
Spurenelement-Stammlösung	1,5	$\frac{mL}{L}$
Chloramphenicol	25	$\frac{mg}{L}$
Biotin	0,2	$\frac{mg}{L}$

Zur Erfassung des **pH-Wertes** wurden Gelelektroden (Mettler Toledo, Giessen) verwendet, es erfolgte eine Zwei-Punkt-Kalibrierung mit Pufferlösungen pH 4,01 und pH 7,0 (Merck KGaA, Darmstadt). Über einen integrierten PID-Regler wurden Peristaltikpumpen an der Basiseinheit angesteuert, so daß ein pH-Wert-Abfall durch Zugabe von 25%iger Ammoniaklösung kompensiert werden konnte und der Sollwert von pH 6,5 über die Prozesszeit eingehalten wurde. Eine Dosierung von Säure war unter den gewählten Prozessbedingungen nicht nötig.

Die prozentualen Anteile von **CO₂ und O₂ im Abgas** wurden in einem Teilstrom der Abluft mit Hilfe einer Abgasanalytik (Binos 100 2M; Fisher-Rosemount GmbH, Hasselroth) bestimmt. Die Konzentrationsbestimmung von CO₂ erfolgte durch Nahinfrarotabsorption, die Bestimmung des O₂-Anteils im Abgas durch paramagnetische Messung. Die Kalibrierung der Abgasanalytik erfolgte mit Stickstoff (Nullabgleich) und einem Prüfgas mit 15% O₂ und 10% CO₂ (Linde, Höllriegelskreuth).

Während des **Zulaufbetriebes** wurde Glukoselösung über eine Steuereinheit mit geschlossenem Dosiersystem (Fed-batch-Pro; DASGIP, Jülich) in die Fermenter gepumpt, und die Prozessdaten entsprechend erfasst. Alle Zuläufe für die sechs Fermenter wurden

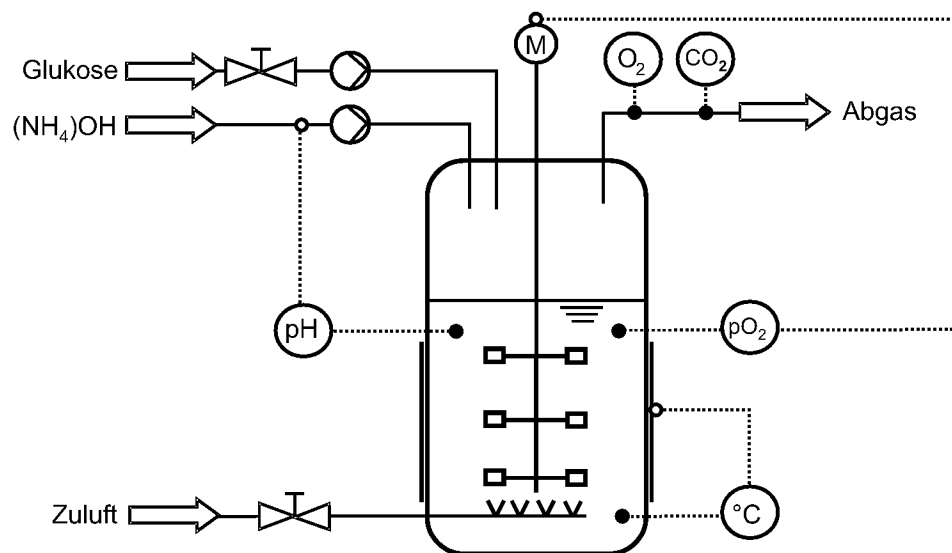


Abbildung 2.1: Schematischer Aufbau eines begasten Rührkessels mit Prozessdatenerfassung für pH-Wert(pH), Temperatur ($^{\circ}\text{C}$) und Gelöstsauerstoffkonzentration (pO_2) sowie der Abgasanalytik zur Bestimmung des Sauerstoff- (O_2) und Kohlendioxid- (CO_2) Gehalts der Abluft. Der pH-Wert wurde über die Zugabe von Ammoniaklösung ($(\text{NH}_4)\text{OH}$) geregelt, die Gelöstsauerstoffkonzentration über die Rührerdrehzahl (M), die Temperatur über einen Thermomantel. Begasungsrate und Glukosezufuhr wurden manuell gesteuert.

einer Vorlageflasche entnommen und über einen Verteiler zum jeweiligen Reaktor geführt. Die Glukosekonzentration im Zulauf betrug 454 g/L, der Zucker wurde mit Raten zwischen 0,05 und 0,5 mL/min zudosiert. Da keine „on line“-Messung der Glukosekonzentration in der Kulturbrühe möglich war, konnte auch keine Regelung der Glukosezufuhr erfolgen. Die Zuckerkonzentration in den Fermentern wurde daher über den Prozessverlauf regelmäßig amperometrisch ermittelt (Accutrend Sensor, Roche Diagnostics, Mannheim). Auf Basis dieser „off line“-Daten wurde die Dosierung manuell entsprechend dem Verbrauch der einzelnen Stämme angepasst, wobei eine Glukosekonzentration von 5 g/L in Regelfall nicht überschritten wurde.

2.9.4 Bestimmung der Glukosekonzentration

Die Glukosekonzentration in Überständen der Fermentationen wurde nach Bergmeyer und Gawehn (1974) mit einem gekoppelten Enzymtest bestimmt. Dabei wurde Glukose

von Hexokinase ATP-abhängig zu Glukose-6-Phosphat umgesetzt, welches von Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase unter äquimolarer NAD-Reduktion zu 6-Phospho-Glukonat oxidiert wurde.



Die Komponenten des Testsystems sind in Tabelle 2.14 aufgelistet, die Messung erfolgte in 96-well-Mikrotiterplatten, die nach dem Pipettierschema von Tabelle 2.15 bestückt wurden. Die Enzymlösungen wurden mit Tris-Maleatpuffer verdünnt im Test eingesetzt. Die Kalibration des Testsystems erfolgte mit geeigneten Glukose-Stammlösungen (0,05 - 0,5 g/L) nach einem standardisierten Schema für jeden Ansatz. Nach 45 min Inkubation bei RT (Titramax 100, Heidolph) wurde die gebildete NADH-Menge photometrisch (Thermomax, Molecular Devices) bei einer Wellenlänge von 340 nm quantifiziert. Aus der gebildeten Menge NADH konnte die Glukosekonzentration der Probe anhand der erstellten Kalibrierungsgeraden (s.o.) rechnerisch ermittelt werden.

Tabelle 2.14: Testsystem zur enzymatischen Bestimmung der Glukosekonzentration in Fermentationsüberständen

Tris-Maleat-Puffer	Tris Maleinsäure pH 6,8 H ₂ O bidest	12,1 g 11,6 g mit NaOH ad 1000 mL
MgCl ₂ -Lösung	MgCl ₂ *6H ₂ O Tris-Maleat-Puffer	1,07 g ad 50 mL
NAD/ATP-Mix	NAD ATP MgCl ₂ -Lösung Tris-Maleat-Puffer	0,0795 g 0,06125 g 4,17 mL ad 100 mL

Tabelle 2.15: Pipettierschema zur enzymatischen Bestimmung der Glukosekonzentration in Mikrotiterplatten. Stammlösungen siehe Tab. 2.14

NAD/ATP-Mix	220	μL
$\frac{1}{40}$ verdünnte Glu-6-P-Dehydrogenase	20	μL
$\frac{1}{40}$ verdünnte Hexokinase	20	μL
Probe	40	μL

2.9.5 Bestimmung der optischen Dichte

Die optische Dichte (OD_{620}) der Fermentationsbrühe wurde bei einer Wellenlänge von 620 nm nach geeigneter Verdünnung der Proben mit 0,9 %iger NaCl-Lösung in einem Zweistrahl-Spektralphotometer (UV 160; Shimadzu) gegen 0,9 %ige NaCl-Lösung als Referenz ermittelt.

2.9.6 Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration

Die Biotrockenmasse- (BTM) konzentration in der Fermentationsbrühe wurde gravimetrisch bestimmt. Nach Filtration von 2,5 mL Bakteriensuspension durch getrocknete, vorgewogene Sterilfilter mit 0,2 μm Porengröße (Supor Acrodisc 25; Pall Gelman) wurden die Filter mit dem entsprechenden Volumen H_2O gespült und bei 80°C getrocknet. Anschließend wurden sie bis zur Gewichtskonstanz im Exsikkator inkubiert und erneut gewogen. Der Gehalt an BTM ergab sich aus der Differenz beider Werte.

Aus der OD_{620} (siehe Kap. 2.9.5) konnte mit Gleichung 2.7 die Biotrockenmassekonzentration rechnerisch ermittelt werden (K. Schmidt, unveröffentlicht).

$$1OD_{620} = \frac{0,33gBTM}{L} \quad (2.7)$$

OD_{620}	optische Dichte der Kultur bei 620 nm	[-]
BTM	Biotrockenmasse	[g]

2.9.7 Bestimmung der Plasmidstabilität

Um die Stabilität der eingebrachten Plasmide über den Fermentationsverlauf zu überprüfen, wurde zu verschiedenen Zeitpunkten des Prozesses (frühe und späte exponentielle, frühe und späte stationäre Wachstumsphase) Zellsuspension aus den Fermentern entnommen, mit LB entsprechend verdünnt ($1 \cdot 10^{-7}$ bis $1 \cdot 10^{-8}$) und auf LB-Platten mit und ohne Antibiotikum (siehe Tab. 2.4) ausgestrichen. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurde der Prozentsatz plasmidtragender Zellen aus dem Verhältnis der Koloniezahlen mit und ohne Antibiotikum im Doppelansatz ermittelt.

2.9.8 Bestimmung organischer Säuren im Überstand

Die organischen Säuren im zellfreien Überstand wurden (nach geeigneter Verdünnung) mittels Ionenausschluß-HPLC (high pressure liquid chromatography) chromatographisch getrennt, durch einen Dioden-Array-Detektor (DAD, UVD 3405, Dionex; $\lambda = 215 \text{ nm}$) detektiert und mit Hilfe der Software „Chromeleon“ (Dionex) quantifiziert. Die HPLC-Geräteparameter sind in Tabelle 2.16 aufgeführt.

Tabelle 2.16: HPLC-Geräteparameter zur Bestimmung organischer Säuren im Fermentationsüberstand

Stationäre Phase	Aminex-HPX-87H, Biorad
Säule	300 x 7,8 mm
Säulentemperatur	40°C
isokratische Elution mit	0,2 N H_2SO_4
Fluss	$0,5 \frac{\text{mL}}{\text{min}}$
Probenvolumen	100 μL

Die Konzentration des Intermediats 3-Desoxy-D-arabino-heptulosonat (DAH) im Überstand wurde ebenfalls per Ionenausschluß-HPLC ermittelt, Detektion und Quantifizierung erfolgten über einen UV-Detektor mit angeschlossenen Integrator (Serie 1100, Hewlett Packard; $\lambda = 216 \text{ nm}$). Die HPLC-Geräteparameter sind in Tabelle 2.17 aufgelistet.

Tabelle 2.17: HPLC-Geräteparameter zur Bestimmung der DAH-Konzentration im Fermentationsüberstand

Stationäre Phase	Polyspher OAKC; Merck
Säule	RT 300 x 7,8 mm
Säulentemperatur	40°C
isokratische Elution mit	12 mM H ₂ SO ₄
Fluss	0,4 $\frac{mL}{min}$
Probenvolumen	20 μ L

2.9.9 Bestimmung von Aminosäuren im Überstand

Die Konzentration von Aminosäuren im Überstand wurde per HPLC bestimmt. Die Aminosäuren wurden dabei durch Zugabe von *ortho*-Phthaldialdehyd (OPA) derivatisiert (Vorsäulenderivatisierung) und anschließend mittels „reversed phase“-Chromatographie getrennt. Die hydrophoben Wechselwirkungen der Aminosäuren mit dem Trennmateriale der Säule wurden durch ein Elutionsprofil mit steigendem Anteil an organischem Lösemittel aufgehoben und die Aminosäuren so zu ihren jeweils charakteristischen Retentionszeiten eluiert.

Im Alkalischen reagieren primäre Amine (die NH₂-Gruppen der Aminosäuren) mit OPA und dem Thiol Mercaptoethanol zu stark fluoreszierenden Isoindolen. Mit Hilfe eines Fluoreszenzdetektors (RF-535, Shimadzu) wurden diese identifiziert und mit Hilfe der Software „Chromeleon“ (Dionex) quantifiziert. Die Geräteparameter der HPLC sind in Tabelle 2.18 aufgelistet.

Tabelle 2.18: HPLC-Geräteparameter zur Bestimmung von Aminosäuren im Fermentationsüberstand

Stationäre Phase	Lichrospher 100 RP 18-5 EC, Merck
Säule	125 x 4 mm
Vorsäulenderivatisierung	1,5 min
Säulentemperatur	40°C
Fluss	0,9 $\frac{mL}{min}$
Probenvolumen	10 μ L
Eluent A	10 mM Phosphatpuffer pH 7,2 0,5 % Tetrahydrofuran
Eluent B	50% Phosphatpuffer (10 mM pH 7,2) 35 % Methanol 15 % Acetonitril
Gradient	0 min 75% B 7 min 90% B 8,5 min 100% B 13,5 min 100% B 14,5 min 75% B
Wellenlänge Excitation	330 nm
Wellenlänge Emission	450 nm

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 *In vivo*-Nachweis der Pyruvatcarboxylase-Aktivität in einer *E. coli*-Mutante mit defekter PEP-Carboxylase

In dieser Arbeit wurden die Effekte der Pyruvatcarboxylase (Pyc) aus *C. glutamicum* als neuer anaplerotischer Reaktion in *E. coli* untersucht. Zunächst musste untersucht werden, ob das heterologe Protein in *E. coli* exprimiert wurde und funktionell aktiv war. Es wurde bereits von einer Reihe von Autoren erfolglos versucht, die Aktivität der Pyruvatcarboxylase in zellfreien Extrakten von *C. glutamicum* nachzuweisen [Gubler *et al.* (1994), Jetten *et al.* (1994)]. Erst von Peters-Wendisch (1996) und Uy *et al.* (1999) konnte die Aktivität der Pyc in permeabilisierten Zellen von *C. glutamicum* gezeigt werden. Auch im Verlauf dieser Arbeit konnte ein *in vitro*-Nachweis der Pyc-Aktivität in *E. coli* erbracht werden (Kap. 3.7), dieser stand jedoch zu Beginn noch nicht zur Verfügung. Daher wurde durch Verwendung einer geeigneten Mutante von *E. coli* die Aktivität der Pyruvatcarboxylase *in vivo* überprüft.

Um die Funktionalität der anaplerotischen Pyruvatcarboxylase in *E. coli* zu untersuchen, wurde das *pyc*-Gen in eine *E. coli*-Mutante mit defektem *ppc*-Gen eingebracht. Bei

Wachstum auf Glukose stellt die PEP-Carboxylase (Ppc) die einzige anaplerotische Reaktion von *E. coli* dar, die die Auffüllung des TCA-Zyklus mit Oxalacetat sicher stellt (Gottschalk, 1985). Nach Inaktivierung der PEP-Carboxylase sind die Zellen nicht mehr in der Lage, auf Glukose ohne Supplementierung mit TCA-Intermediaten wie Succinat zu wachsen (Chao und Liao, 1993). Sollte durch Pyc der Ppc-Defekt supprimiert werden und die *ppc*-Mutante durch Pyruvatcarboxylase wieder in der Lage sein, auf Glukose ohne C₄-Supplemente zu wachsen, wäre die Funktionalität der Pyruvatcarboxylase in *E. coli* nachgewiesen. In Abbildung 3.1 sind die Kohlenstoffflüsse im Zentralstoffwechsel einer *ppc*-Mutante mit Pyruvatcarboxylase als einziger anaplerotischer Reaktion gezeigt.

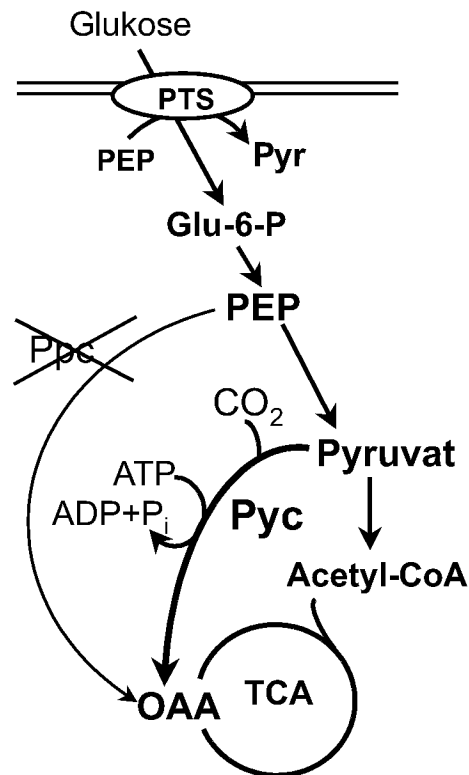


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der anaplerotischen Reaktionen einer *E. coli ppc*-Mutante mit heterologer Pyruvatcarboxylase. PTS → Phosphotransferasesystem, PEP → Phosphoenolpyruvat, Pyr → Pyruvat, Glu-6-P → Glukose-6-Phosphat, Pyc → Pyruvatcarboxylase, Ppc → PEP-Carboxylase, OAA → Oxalacetat, TCA → Tricarbonsäurezyklus.

3.1.1 Herstellung einer *E. coli* PEP-Carboxylase-Mutante

Im Stamm JCL1242 (Tab. 2.1) war das Gen der PEP-Carboxylase durch Insertion einer Kanamycin-Resistenzkassette ausgeschaltet worden (Chao und Liao, 1993). Durch P1-Transduktion (Kap. 2.4.6) war diese Mutation in den Stamm DF657 übertragen worden (G. Sprenger). Mit einem Phagenlysats aus dem resultierenden Stamm DF657 *ppc*::Kan konnte die inaktivierte Ppc in den *E. coli*-Wildtyp F1 übertragen werden, der resultierende Stamm F2 trägt das defekte *ppc*-Allel. Allerdings sollte die Verwendung von Antibiotikaresistenzkassetten im Hinblick auf spätere Stammkonstruktionen (Kap. 3.6.1) möglichst umgangen werden. Daher wurde das Gen der PEP-Carboxylase im Leserahmen chromosomal deletiert [nach Link *et al.* (1997)]. Obwohl Stamm F2 nicht eingesetzt wurde, um die Pyc als einzige anaplerotische Reaktion in *E. coli* zu exprimieren, bot sein Einsatz bei der Herstellung einer Δppc -Mutante von *E. coli* einen Vorteil gegenüber dem Wildtyp F1, wie im Folgenden beschrieben wird.

Die Methode von Link *et al.* (1997) nutzt durch Crossover-PCR generierte „in frame“ Deletionen, welche über den Mutagenesevektor pKO3 ins Genom integriert werden können. Der Vektor weist eine temperatursensitive Replikation auf ($30^{\circ}\text{C} \rightarrow$ permissiv, $43^{\circ}\text{C} \rightarrow$ nicht-permissiv) und ist mit positiven (Chloramphenicol-Resistenzgen *cat*) und negativen (Gen der Levansucrase *sacB* aus *Bacillus subtilis*) Selektionsmarkern ausgestattet. Abbildung 3.2 zeigt das Prinzip der Crossover-PCR.

Zunächst wurden in zwei unabhängigen PCR-Schritten je ca. 750 Basenpaare der flankierenden Bereiche von *ppc* amplifiziert (Abb. 3.2, B), welche jeweils die ersten (ATG $\rightarrow$ Startcodon der *ppc* auf mRNA-Ebene) und letzten (TAA $\rightarrow$ Stoppcodon der *ppc* auf mRNA-Ebene) drei Basenpaare der *ppc*-Sequenz enthielten. Zusätzlich wurde über die inneren Primer C_{in} und N_{in} (siehe Tab. 2.6) an jedes Fragment eine 33 Basenpaar lange, komplementäre Ersatzsequenz angehängt. Dadurch konnten im zweiten, Crossover-PCR-Schritt (Abb. 3.2, C) die flankierenden Bereiche mit den beiden äußeren Primern C_{out} und N_{out} zum *ppc*-Deletionskonstrukt fusioniert werden (Abb. 3.2- D).

Das Konstrukt zur Deletion der *ppc* wurde zunächst über *EcoRV* in den Vektor pBluescript kloniert. Klone, welche rekombinante Plasmide trugen, wurden per Blau-Weiß-Selektion

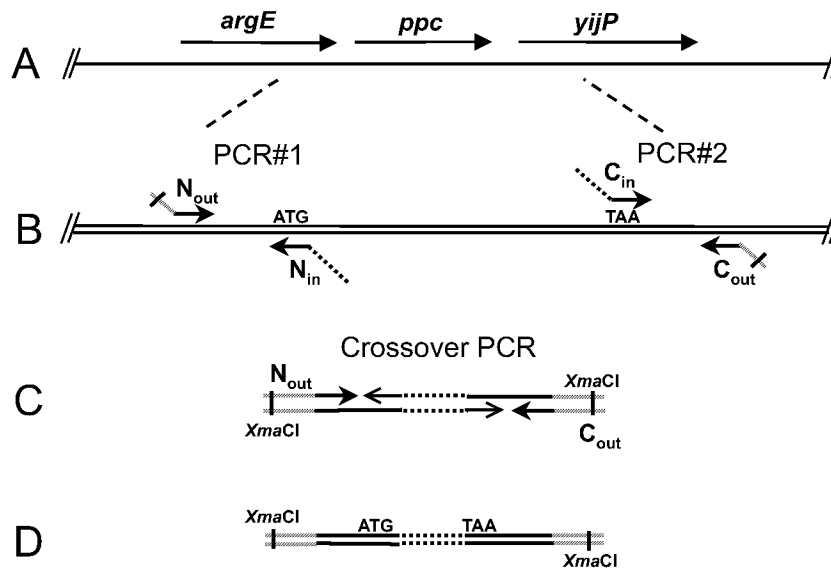


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Herstellung des *ppc*-Deletionskonstrukts. A: Lage der *ppc* im Chromosom von *E. coli*, B: Detailansicht des *ppc*-Gens mit Primern zur Amplifikation der flankierenden Bereiche von *ppc*, die komplementären Regionen der Primer *N_{in}* und *C_{in}* sind gestrichelt dargestellt, C: Crossover-PCR mit den äußeren Primern *N_{out}* und *C_{out}*, D: *ppc*-Deletionskonstrukt mit *XmaCI*-Schnittstelle

isoliert (Kap. 2.4.5), in *E. coli* DH5 α amplifiziert und per Restriktionsanalyse überprüft. Durch die über die Primer eingefügten Schnittstellen konnte es als *XmaCI*-Fragment isoliert und in pKO3 umklontiert werden. Nach Amplifikation von pKO3 Δppc in DH5 α und entsprechender Kontrolle durch Restriktionsanalyse wurde der Stamm F2 mit dem Mutagenesevektor transformiert (Kap. 2.4.4). Da in diesem Rezipienten das *ppc*-Gen durch eine Kanamycin-Resistenzkassette disruptiert war, sollte die Deletion des *ppc*-Gens mit einem Verlust der Kan^R korreliert sein und somit die Identifizierung der Mutanten erleichtern. In Abbildung 3.3 die Deletion des *ppc*-Gens schematisch dargestellt.

Zunächst erfolgte eine Selektion auf Integration des Plasmids über homologe Rekombination durch Plattieren auf LB mit Chloramphenicol (Cm) und Inkubation bei 43°C (Abb. 3.3, A und B). Die so erhaltenen Kolonien wurden gepickt, in LB resuspendiert und bei 30°C auf Platten mit 5 % Saccharose aber ohne Chloramphenicol inkubiert. Das *sacB*-Genprodukt Levansucrase ist in Anwesenheit von Saccharose letal für *E. coli* (Gay *et al.*, 1985), somit wurde auf Excision und Verlust von pKO3 selektiert (Abb. 3.3, C).

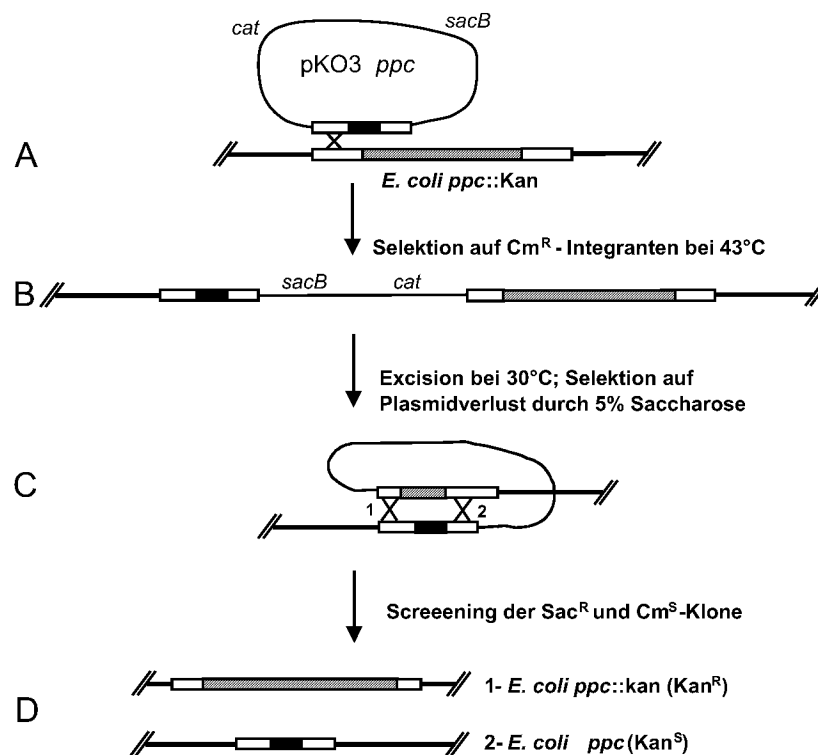


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der *ppc*-Deletion in *E. coli*. A: Chromosomale Integration des Mutagenesevektors über homologe Rekombination bei 43°C in F2 (*ppc::Kan*); B: Selektion der Integranten; C: Excision des Plasmids durch homologe Rekombination entweder an Punkt 1 oder 2; D: Situation im Chromosom nach Plasmidverlust in Gegenwart von Saccharose. Je nach Lage des zweiten Rekombinationsereignisses ergab sich nach Excision des Vektors die Ausgangssituation *ppc::Kan* (1) oder die *ppc*-Deletion (2). *Cm^R* → Chloramphenicol-Resistenz, *Cm^S* → Chloramphenicol-Sensitivität, *Kan^R* → Kanamycin-Resistenz, *Kan^S* → Kanamycin-Sensitivität, *Sac^R* → Saccharose-Resistenz

Je nach Lage des zweiten Rekombinationsereignisses wurde dabei *ppc::kan* gegen Δppc ausgetauscht (Abb. 3.3, D). Die erhaltenen Saccharose-resistenten Klone wurden auf Verlust der Chloramphenicol-Resistenz (*Cm^R*) überprüft, um sicherzustellen, dass nicht eine Mutation des *sacB*-Gens das Wachstum in Gegenwart von Saccharose möglich gemacht hatte. Um zwischen Wildtyp- und Δppc -Mutanten zu unterscheiden, wurden die *Cm^S*-Klone anschließend auf Verlust der Kanamycin-Resistenz (*Kan^R*) überprüft.

Die chromosomalen Veränderungen wurden per PCR überprüft. Nach erfolgreicher Deletion wurde mit den Primern *N_{out}* und *C_{out}* ein PCR-Produkt von 1,5 kB erwartet, während

bei einer Wildtypsituation ein wesentlich längerer Bereich von 4,1 kB amplifiziert werden würde (siehe Abb. 3.4, A und B).

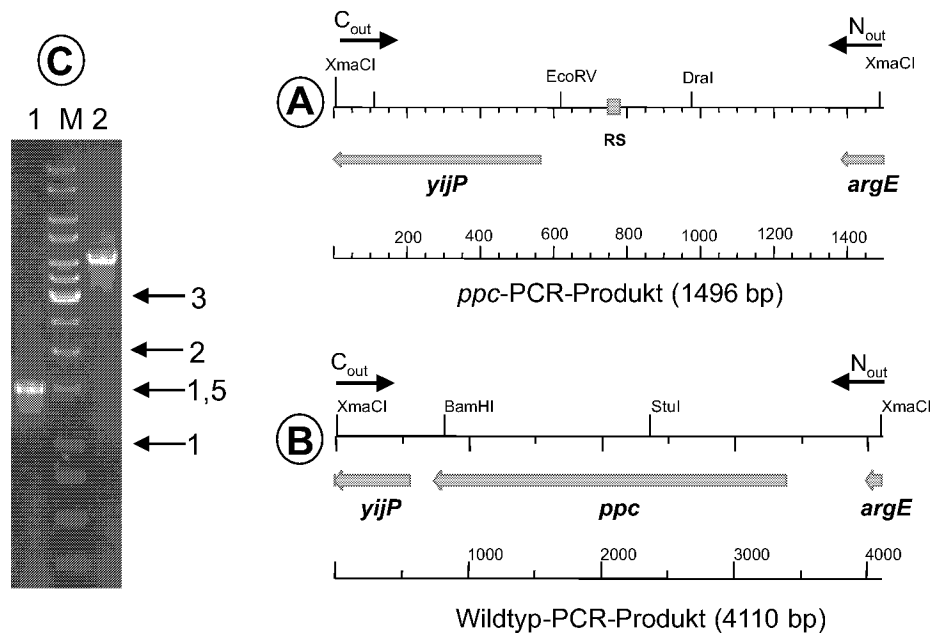


Abbildung 3.4: Überprüfung der *ppc*-Deletion per PCR. A: Zu erwartendes PCR-Produkt mit den Primern N_{out} und C_{out} im Δppc -Stamm (RS → Ersatzsequenz), B: Zu erwartendes PCR-Produkt mit den Primern N_{out} und C_{out} für den Wildtyp, C: Größenabschätzung von PCR-Produkten der Stämme F1 und F39 im 0,8 %igen Agarosegel, Primer → N_{out} und C_{out} , 1 → F39 (Δppc), M → DNA-Größenstandard mit Fragmentgrößen in kB, 2 → F1 (Wildtyp)

Die PCR wurde mit mehreren Cm^S - und Kan^S -Klonen durchgeführt, alle untersuchten Klone ergaben das erwartete Amplifikat von 1,5 kB für Δppc (siehe Abb. 3.4 C), der so erzeugte Stamm wird im Folgenden als F39 bezeichnet. Wurde chromosomale DNA von F2, dem Ausgangsstamm der Mutagenese, als Matrizen-DNA eingesetzt, wurde kein PCR-Produkt erhalten. Durch die im *ppc*-Gen inserierte Kanamycin-Resistenzkassette verlängert sich der zu amplifizierende Bereich bei F2 um 1,5 kB, so dass ein Produkt von über 5,6 kB zu erwarten war. Die Amplifikation eines so langen DNA-Bereichs war unter den gewählten Bedingungen nicht möglich.

Um zu überprüfen ob noch PEP-Carboxylase-Aktivität in der Δppc -Mutante detektierbar war, wurden Rohextrakte der Stämme F1 und F39 hergestellt (Kap. 2.6.2) und die Enzymaktivität wie in Kapitel 2.8.1 beschrieben bestimmt. Die erhaltenen Ppc-Aktivitäten beider Stämme sind in Tabelle 3.1 aufgelistet.

Tabelle 3.1: Ppc-Aktivität in den Rohextrakten der Stämme F1 (Wildtyp) und F39 (Δppc) nach Anzucht in LB. Gezeigt sind Mittelwerte aus je 6 unabhängigen Messungen.

Stamm	Ppc-Aktivität [mU/mg]
F1	40 ± 6
F39	$\leq 5 \pm 2$

Während im Wildtyp F1 eine Ppc-Aktivität von 40 mU/mg bestimmt werden konnte, lag die ppc-Aktivität in der Δppc -Mutante unterhalb der Nachweisgrenze von 7 mU/mg, somit wurde auch auf Enzymebene die Inaktivierung der Ppc gezeigt.

3.1.2 Succinatabhängigkeit der *E. coli* PEP-Carboxylase-Mutante

Nach Ausschaltung der Ppc war *E. coli* nicht mehr in der Lage, in Minimalmedium mit Glukose ohne supplementierte C₄-Verbindungen wie Succinat zu wachsen (Chao und Liao, 1993). Diese Abhängigkeit der Δppc -Mutante (Kap. 3.1.1) wurde in Plattentests überprüft, wie in Abbildung 3.5 gezeigt.

Durch Wachstumversuche in Minimalmedium sollte diese Succinatbedürftigkeit näher charakterisiert werden. Hierfür wurde F39 mit Glukose als Kohlenstoffquelle und verschiedenen Konzentrationen von Succinat im kleinen Maßstab kultiviert. Die Ergebnisse der Wachstumsversuche sind in Abbildung 3.6 dargestellt.

Ohne Succinat war F39 erwartungsgemäß nicht in der Lage, im angegebenen Medium zu wachsen. Ab einer Succinatkonzentration von 0,005 % erfolgte eine signifikante Biomassebildung, die optische Dichte der Kulturen erhöhte sich mit zunehmenden Succinatkonzentrationen im Medium. Die Zellen schienen die zur Verfügung stehenden C₄-Intermediate

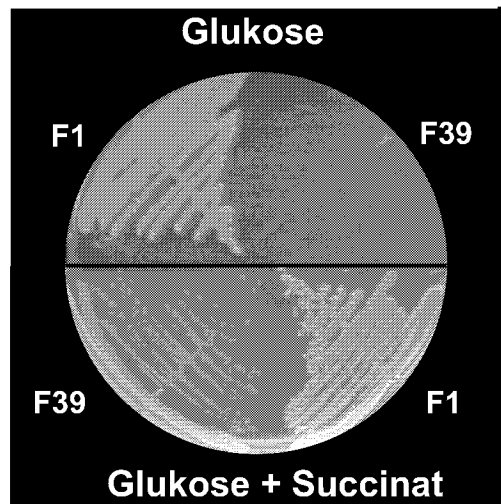


Abbildung 3.5: Wachstum der Stämme F1 (Wildtyp) und F39 (Δppc) auf Tanaka-Minimalmedium mit 0,5 % Glukose mit bzw. ohne 0,02 % Succinat nach 48 h Inkubation bei 37°C

vollständig zur Bildung von Biomasse genutzt zu haben, denn eine Verdopplung der Succinatmenge hatte auch eine Verdopplung der Biomassebildung zur Folge. Ab einer OD_{600} von 7 wurden das Wachstum offenbar durch die Verfügbarkeit anderer Medienbestandteile limitiert. Ein Succinatgrenzwert ließ sich somit nicht ermitteln.

3.1.3 Suppression des *ppc*-Defekts durch Pyc

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob der Phänotyp der Δppc -Mutante (Kap. 3.1.2) von *E. coli* durch Pyruvatcarboxylase aus *C. glutamicum* supprimiert werden konnte und somit ein *in vivo*-Nachweis der Pyc erbracht werden konnte. Das *pyc*-Gen befand sich unter Kontrolle des *tac*-Promotors auf dem Plasmid pF36, der entsprechende Leervektor war pACYC*tac* (Kap. 2.2, Tab. 2.2). Um die Suppression des *ppc*-Defekts durch *pyc* zu untersuchen, wurden das Pyc-Plasmid pF36 sowie der Kontrollvektor in den Stamm F39 transformiert (Kap. 2.4.4). Zunächst wurde das Wachstum der beiden Stämme auf Minimal-Platten mit Glukose mit bzw. ohne Induktion der heterologen Pyc untersucht, Abbildung 3.7 zeigt die Ergebnisse.

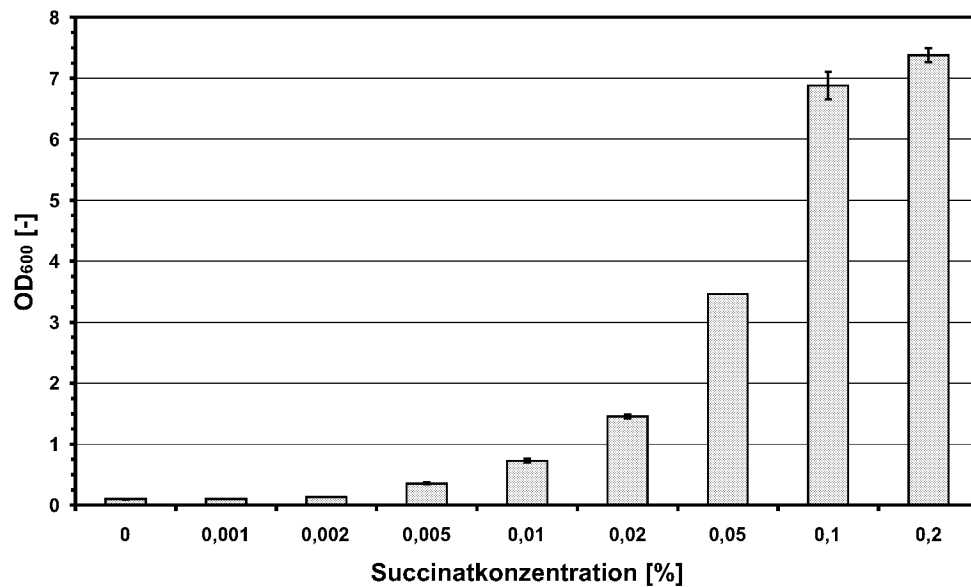


Abbildung 3.6: Biomassebildung anhand der optischen Dichte (OD_{600}) von F39 (Δppc) bei verschiedenen Succinatkonzentrationen zwischen 0 und 0,2 %. Die Zellen wurden 14 h in 5 mL DSM-Vorkulturmedium mit 0,5 % Glukose kultiviert. Gezeigt sind Mittelwerte aus je 2 unabhängigen Kultivierungen.

Der Plattentest zeigte, dass Pyc den Ppc-Defekt im Stamm F39 supprimieren konnte, denn mit Plasmid pF36 erfolgte Wachstum auf Minimalmedium mit Glukose, IPTG und Biotin, während der Kontrollstamm F39/pACYC*lac* nicht wachsen konnte. Ohne IPTG-Induktion der Pyc war jedoch F39/pF36 nicht in der Lage, auf dem angegebenen Medium zu wachsen. Als Positivkontrolle diente F1 mit beiden Plasmiden (Kap. 3.3), diese Stämme wuchsen erwartungsgemäß auf Minimalmedium mit Glukose sowohl mit als auch ohne IPTG.

Somit wurde mit Hilfe einer *ppc*-Mutante von *E. coli* gezeigt, dass die heterologe Pyruvatcarboxylase aus *C. glutamicum* in *E. coli* funktionell aktiv war und den Zellen als einzige anaplerotische Reaktion Wachstum auf Minimalmedium mit Glukose ermöglichte.

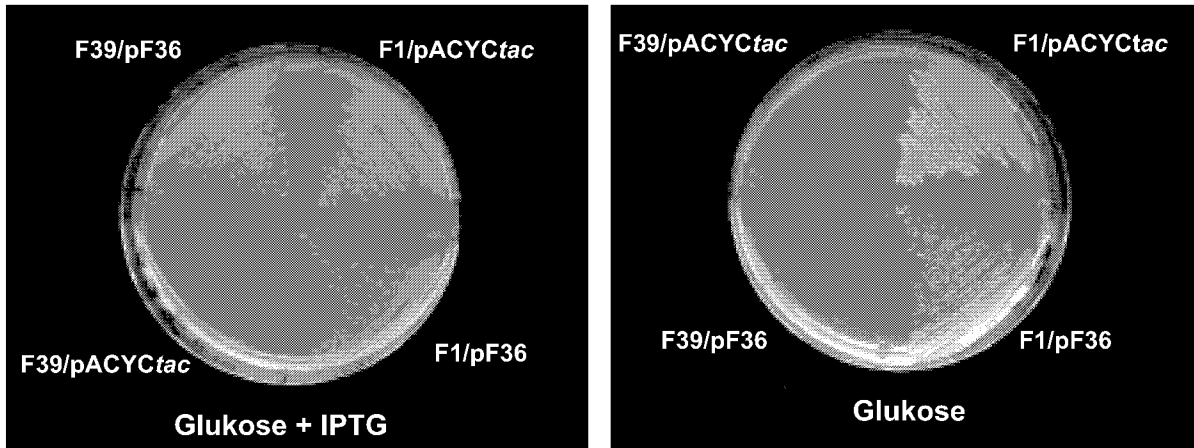


Abbildung 3.7: Wachstum der Stämme F1 (Wildtyp) und F39 (Δppc) mit Plasmid pF36 (Pyc) und Kontrollen mit Leerplasmid (pACYCtac) auf Tanaka-Minimalmedium mit 0,5 % Glukose, Cm, Biotin $\pm$ IPTG nach 48 h Inkubation bei 37°C.

3.1.4 Abhängigkeit der Δppc -Suppression vom Induktor IPTG

Dass Pyc den Δppc -Phänotyp supprimieren konnte, war auf Platte bereits gezeigt worden (Abb. 3.7). Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob diese Suppression auch bei submerser Kultivierung der Stämme erfolgte. Weiterhin sollte die Abhängigkeit der Δppc -Suppression durch Pyc vom Induktor IPTG eingehender charakterisiert werden. Die Stämme F39/pF36 und F39/pACYCtac wurden in Schüttelkolben mit Minimalmedium, Glukose, Biotin und unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen von 0 - 100 μM kultiviert. Die Positivkontrollen wurden außerdem mit Succinat supplementiert. Die Ergebnisse der Wachstumsexperimente sind in Abbildung 3.8 dargestellt.

Ohne IPTG erfolgte kein Wachstum des Δppc -Stamms mit plasmidkodierter Pyc (F39/pF36) in Minimalmedium mit Glukose. Auch die Zugabe von 1 oder 10 μM IPTG reichte nicht aus, um Wachstum zu ermöglichen. Erst mit einer IPTG-Konzentration von 100 μM wuchs der Stamm im angegebenen Medium mit einer Wachstumsrate von 0,59 h^{-1} . Wurde zusätzlich zur IPTG-Induktion Succinat supplementiert, wuchs der Stamm F39/pF36 mit leicht verringertem μ von 0,51 h^{-1} . Der Kontrollstamm mit Leerplasmid war erwartungsgemäß trotz IPTG-Zugabe nicht in der Lage, ohne Supplementierung mit Succinat zu wachsen, er erreichte mit der C₄-Verbindung im Medium eine Wachstumsrate von 0,55 h^{-1} . Somit wuchs er geringfügig langsamer als F39/pF36 mit 100 μM IPTG.

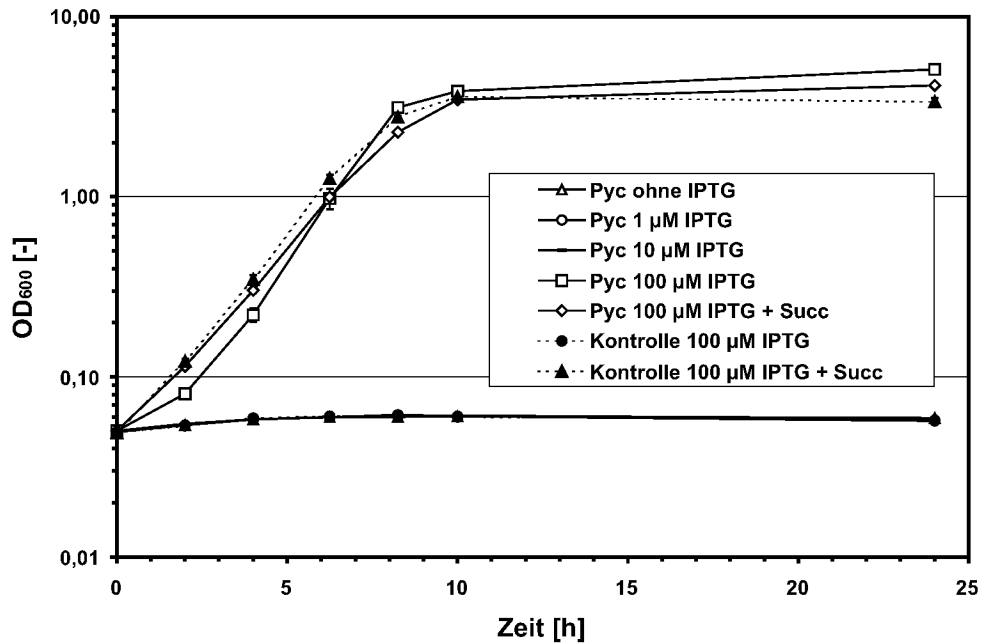


Abbildung 3.8: Wachstum von F39/pF36 (Pyc) und F39/pACYC*tac* (Kontrolle) in DSM-Vorkulturmedium mit 0,5 % Glukose, 200 $\mu\text{g/L}$ Biotin, Chloramphenicol und unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen. Wenn angegeben, wurden 0,05 % Succinat zugegeben (Succ). In den Ansätzen von F39/pF36 ohne und mit 1 und 10 μM IPTG sowie von F39/pACYC*tac* mit 100 μM IPTG ohne Succinat erfolgte kein Wachstum. Gezeigt sind Mittelwerte aus je 2 unabhängigen Kultivierungen, die Vorkulturen wurden in DSM-Vorkulturmedium mit Glukose und Succinat angezogen

Mit 100 μM IPTG konnte der Δppc -Stamm mit Pyc als einziger anaplerotischer Reaktion auf Minimalmedium mit Glukose annähernd die Wildtyp-Wachstumsrate von $0,60\text{ h}^{-1}$ erreichen (Kap. 3.3.2, Abb. 3.15), daher wurden keine weiteren Untersuchungen mit höheren Induktorkonzentration durchgeführt.

Es wurde auch in Flüssigkultur gezeigt, dass durch die heterologe Pyc der Δppc -Phänotyp IPTG-abhängig supprimiert werden konnte und die Pyc in *E. coli* funktionell aktiv war. Ein weiterer Nachweis des Pyc-Proteins in rekombinanten *E. coli*-Stämmen erfolgte in zellfreien Extrakten der Stämme nach Induktion des heterologen Gens. Nach SDS-PAGE war eine zusätzliche Bande mit einem Molekulargewicht von 120 kDa erkennbar. Nach spezifischer Markierung biotinylierter Proteine im Western-Blot konnte nachgewiesen werden, dass diese zusätzliche Bande mit einem Molekulargewicht von 120 kDa biotinyliert war (Kap. 3.3.2, Abb. 3.16). Es handelte sich offenbar um die Pyruvatcarboxylase aus *C. glutamicum* (Peters-Wendisch, 1996).

3.1.5 Abschätzung der *in vivo*-Pyruvatcarboxylase-Aktivität in *E. coli*

Es war bereits gezeigt worden, dass Pyruvatcarboxylase aus *C. glutamicum* den Phänotyp einer *E. coli*- Δppc -Mutante supprimieren konnte (Kap. 3.1.3 und 3.1.4). Der Δppc -Stamm F39/pF36 wuchs nach Induktion der Pyc mit einer Wachstumsrate von $0,59\ h^{-1}$ (Kap. 3.1.4, Abb. 3.8). Da in diesem Stamm Pyc die einzige anaplerotische Reaktion darstellte, erlaubte die erreichte Wachstumsrate von F39/pF36 Rückschlüsse auf die *in vivo*-Aktivität der Pyc.

Aus dem Tricarbonsäurezyklus dienen die Intermediate Oxalacetat und α -Ketoglutarat als Vorläufermetabolite für die Biosynthese von Zellbestandteilen. Nach Neidhardt *et al.* (1990) werden für die Synthese von 1 g *E. coli* B-Biotrockenmasse $2865\ \mu\text{mol}$ Oxalacetat und α -Ketoglutarat benötigt. Bei einer Wachstumsrate von $0,59\ h^{-1}$ betrug die Verdopplungszeit der Biomasse 1,17 h. Somit wurden bei einer Biomassezunahme von 1 g auf 2 g in 70,5 min $2865\ \mu\text{mol}$ Oxalacetat und α -Ketoglutarat aus dem TCA-Zyklus abgezogen. Dieser musste durch Pyruvatcarboxylase mit gleicher Rate wieder aufgefüllt werden. Somit ergab sich nach Gleichung 3.1 eine absolute Pyc-Aktivität von 40,6 U.

$$\frac{2865\mu\text{molOAA} + \alpha\text{KG}}{70,5\text{min}} = 40,6\text{U} \quad (3.1)$$

U	absolute Enzymaktivität [$\mu\text{mol Substratumsatz} \cdot \text{min}^{-1}$]
OAA	Oxalacetat
αKG	α -Ketoglutarat

Unter der Annahme, dass 50 % der Biotrockenmasse aus Protein besteht (Neidhardt *et al.*, 1990), wurde mit Gleichung 3.2 eine spezifische Aktivität der Pyruvatcarboxylase *in vivo* von über 80 mU/mg_{Protein} errechnet.

$$\frac{40,6\text{U}}{500\text{mg}} = 81,2\text{mU} \cdot \text{mg}^{-1} \quad (3.2)$$

Diese rechnerisch ermittelte Mindestaktivität der Pyruvatcarboxylase in *E. coli* wurde von der in dieser Arbeit quantifizierten *in vitro*-Aktivität sogar noch übertroffen (Kap. 3.7.3).

3.1.6 Biotin-Abhängigkeit der Δppc -Suppression durch Pyc

Im *E. coli*-Wildtyp trägt nur die Biotin-Carboxyl-Carrier-Protein-Untereinheit der AcetylCoA-Carboxylase Biotin als prosthetische Gruppe. Mit der heterologen Pyruvatcarboxylase wurde ein zweites biotinyliertes Protein in *E. coli* eingebracht. Um zu untersuchen, ob die Biotinbiosynthese-Kapazität von *E. coli* ausreicht, um die Pyc posttranslational zu modifizieren, wurden Wachstumsexperimente mit den Stämmen F39/pF36 und F39/pACYC*tac* in Minimalmedium mit Glukose, IPTG und unterschiedlichen Biotinkonzentrationen von 0 - 50 $\mu\text{g/L}$ durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.9 dargestellt.

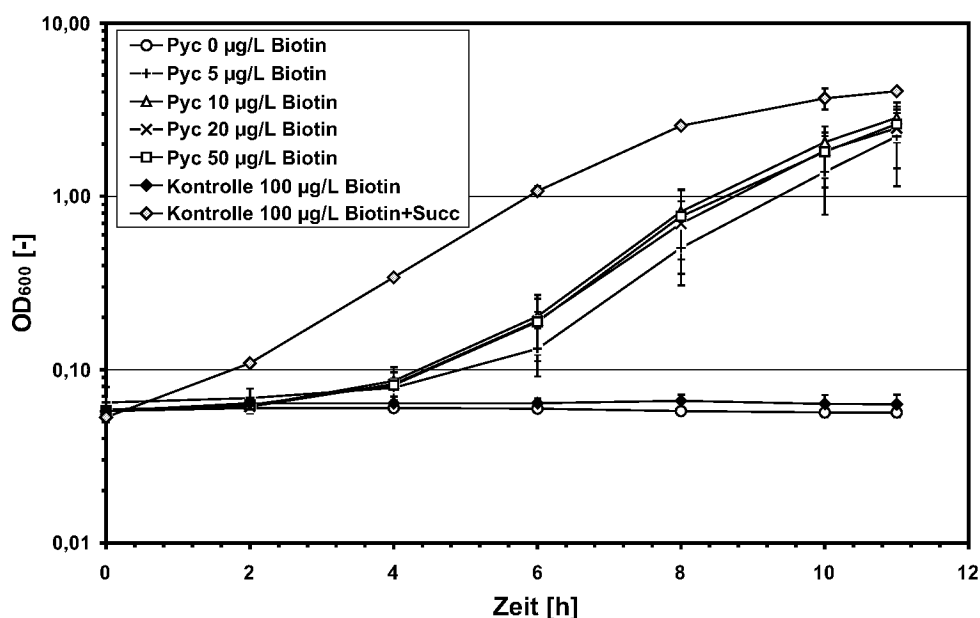


Abbildung 3.9: Wachstum von F39/pF36 (Pyc) und F39/pACYC*tac* (Kontrolle) in Tanaka-Minimalmedium mit 0,5 % Glukose, IPTG und unterschiedlichen Biotinkonzentrationen. Wenn angegeben (Succ) wurden 0,05 % Succinat supplementiert. Dargestellt sind Mittelwerte aus je 2 unabhängigen Kultivierungen, die Vorkulturen wurden auf Tanaka-MM mit Glukose und Succinat angezogen.

Ohne Zugabe von Biotin erfolgte kein Wachstum des Stamms F39/pF36 in Minimalmedium mit Glukose und IPTG. Ab einer Biotinkonzentration von $5 \mu\text{g/L}$ war der Stamm in der Lage, auf dem angegebenen Medium zu wachsen. Da die Vorkulturen zwar mit Succinat, aber ohne den Induktor IPTG angezogen wurden, wurde die Expression der Pyc erst nach dem Animpfen der Hauptkultur induziert, was möglicherweise beim Pyc-Stamm F39/pF36 die Wachstumsverzögerung in den ersten 4 h erklärt. Nach dieser Verzögerungsphase wurde von F39/pF36 eine exponentielle Wachstumsrate von $0,62 \text{ h}^{-1}$ erreicht. Eine Erhöhung der Biotinmenge im Medium hatte weder eine Verzögerung noch eine Beschleunigung des Wachstums zur Folge, weiterhin erreichten die Stämme mit 5 - $50 \mu\text{g/L}$ Biotin nach 11 h eine optische Dichte (OD_{600}) von 2,2 bis 2,8. Der Kontrollstamm mit Leerplasmid wuchs trotz einer Biotinkonzentration von $100 \mu\text{g/L}$ erwartungsgemäß nur nach Supplementierung mit Succinat. Dann allerdings wuchs er ohne die bei den Pyc-Stämmen beobachtete Verzögerung mit einer exponentiellen Wachstumsrate von $0,57 \text{ h}^{-1}$ und damit geringfügig langsamer als die Pyc-Stämme.

Die Biotinbiosynthese von *E. coli* war somit nicht ausreichend, um die posttranslationale Modifikation der Pyc sicherzustellen. Die Supplementierung von $5 \mu\text{g/L}$ Biotin ermöglichte jedoch unter den genannten Bedingungen der Δppc -Mutante F39 mit plasmidkodierter Pyc wieder Wachstum. Da jedoch höhere Biotinkonzentrationen im Medium keinen nachteiligen Effekt auf das Wachstum ausübten, wurden zur Anzucht von Pyc-Stämmen $200 \mu\text{g/L}$ Biotin supplementiert (Kap. 2.3.2), um auch bei höheren Zelldichten eine ausreichende Biotinylierung der Pyc sicherzustellen.

3.2 Untersuchung von Effekten der Pyruvatcarboxylase im Zentralstoffwechsel von *E. coli*

Der Zentralstoffwechsel von *E. coli* stellt die wichtigste Drehscheibe für die Verteilung von Kohlenstoffflüssen auf die verschiedenen metabolischen Routen dar. Mit der Einführung der heterologen Pyruvatcarboxylase aus *C. glutamicum* wurde im Zentralstoffwechsel von *E. coli* eine neue Verbindung zwischen Pyruvat und Oxalacetat hergestellt. In dieser

Arbeit wurde nun untersucht, ob die Expression der Pyruvatcarboxylase eine Umlenkung von Kohlenstoffflüssen in *E. coli* zur Folge hat und auf welchen Ebenen sich die Zelle an die neue anaplerotische Reaktion anpasst. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde ein Ansatz gewählt, mit dem möglichst viele durch Pyruvatcarboxylase verursachte Änderungen im Stoffwechsel der Zelle erfasst und beschrieben werden konnten.

3.2.1 Mögliche Effekte der Pyruvatcarboxylase auf verschiedenen Ebenen im Stoffwechsel von *E. coli*

Mit der Pyruvatcarboxylase wurde eine neue Reaktion in *E. coli* eingebracht, die einen direkten oder indirekten Einfluss auf die Stoffflüsse an den Verzweigungspunkten haben konnte. Daher wurden zunächst mögliche Ebenen der Pyc-Effekte im Stoffwechsel von *E. coli* ermittelt. In Abbildung 3.10 sind die entsprechenden Reaktionen im Zentralstoffwechsel sowie die daraus abgeleiteten Produkte schematisch dargestellt.

Es war bereits gezeigt worden, dass durch Pyc aus *R. etli* die anaerobe Succinatbildung von *E. coli* auf Kosten der Lactatproduktion gesteigert werden konnte (Gokarn *et al.*, 1998). In dieser Arbeit sollte untersucht werden, welchen Einfluss Pyc aus *C. glutamicum* bei aerober Kultivierung in *E. coli* hat.

Ein gesteigerter Kohlenstofffluss in Richtung TCA-Zyklus könnte einen Überschuss an Metaboliten des Citratzyklus in *E. coli* zur Folge haben. Dies könnte sich in einer verstärkten Bildung von aus dem TCA-Zyklus abgeleiteten Produkten äußern. In dieser Arbeit wurden daher die Konzentrationen von Succinat, Citrat, Malat und Fumarat im Überstand der Stämme untersucht. Auch die Konzentrationen der aus Intermediaten des TCA-Zyklus abgeleiteten Aminosäuren wie Glutamat, Aspartat, Lysin und Isoleucin von *E. coli* mit heterologer Pyruvatcarboxylase konnten bestimmt werden.

Sollte durch Pyc vermehrt Oxalacetat als Akzeptor für AcetylCoA zur Verfügung stehen, ließe sich die gesteigerte Effizienz des TCA-Zyklus möglicherweise an einer verstärkten CO₂-Bildung ablesen. Ein antagonistischer Effekt der Pyc auf die CO₂-Bildung kommt

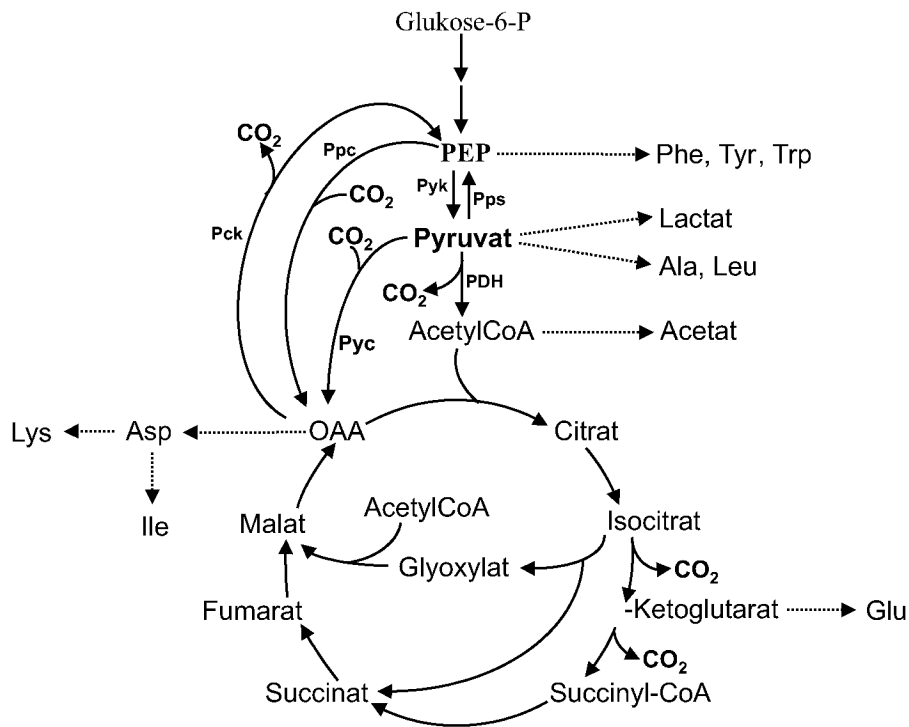


Abbildung 3.10: Schematische Darstellung des Zentralstoffwechsels von *E. coli* mit heterologer Pyc. Dargestellt sind auch die jeweils aus dem Zentralstoffwechsel abgeleiteten Produkte, deren Konzentrationen im Überstand Rückschlüsse auf die entsprechenden Stoffflüsse erlauben. Glu-6-Phosphat → Glukose-6-Phosphat, PEP → Phosphoenolpyruvat, Pyk → Pyruvatkinasen, Pps → PEP-Synthase, Pck → PEP-Carboxykinase, Ppc → PEP-Carboxylase, Pyc → Pyruvatcarboxylase, PDH → Pyruvatdehydrogenase, OAA → Oxalacetat, Phe → Phenylalanin, Tyr → Tyrosin, Trp → Tryptophan, Ala → Alanin, Leu → Leucin, Ile → Isoleucin, Glu → Glutamat, Asp → Aspartat, Lys → Lysin.

aber möglicherweise ebenfalls zum Tragen, da durch Pyruvatcarboxylase eine zweite, CO₂-fixierende Reaktion in den Zentralstoffwechsel von *E. coli* eingebracht wurde. Die CO₂-Produktion der Stämme wurde daher in dieser Arbeit ebenfalls erfasst.

Pyruvatcarboxylase konkurriert mit dem Pyruvatdehydrogenase-Multienzymkomplex (PDH) um das Substrat Pyruvat. Sollte Pyc vermehrt Pyruvat zu Oxalacetat umsetzen, wird in den entsprechenden Stämmen möglicherweise der Kohlenstofffluss in Richtung Lactat oder auch zum AcetylCoA und damit zum Acetat beeinflusst. Eine veränderte Pyruvatverfügbarkeit durch Pyc könnte sich anhand der Produktion von Acetat, Lactat, Alanin und Leucin im Überstand äußern.

Die Auffüllung des TCA-Zyklus mit Oxalacetat durch Carboxylierung von Pyruvat könnte weiterhin die Verfügbarkeit von PEP in *E. coli* beeinflussen. Pyruvat steht der Zelle bei Wachstum auf Glukose in hohem Maß zur Verfügung, denn das Phosphotransferasesystem, welches den Zucker über die Membran transloziert und gleichzeitig phosphoryliert, gewinnt die dafür benötigte Energie durch Übertragung der Phosphatgruppe vom Glykolyse-Intermediat PEP. Dabei wird pro mol transportierter Glukose ein mol PEP verbraucht und entsprechend Pyruvat gebildet (Postma *et al.*, 1996). Die Pyruvatbildung durch das PT-System bei Wachstum auf Glukose ist sogar ausreichend, um Mutanten mit Defekten in beiden Pyruvatkinasen Wachstum zu ermöglichen (Ponce *et al.*, 1995). Durch die neue anaplerotische Reaktion Pyc steht der Zelle möglicherweise mehr PEP zur Verfügung, wenn dieses nicht mehr für den Glukosetransport und zur Auffüllung des TCA-Zyklus durch PEP-Carboxylase aufgewendet werden muss. In dieser Arbeit diente der Kohlenstofffluss in die Biosynthese der aromatischen Aminosäuren als Indikator für die PEP-Verfügbarkeit in *E. coli*.

3.2.2 Bestimmung der Kohlenstoffflüsse in den Aromatenbiosyntheseweg

Als Maß für die Verfügbarkeit von PEP in der Zelle wurde in dieser Arbeit der Kohlenstofffluss in den Aromatenbiosyntheseweg herangezogen. Im ersten Schritt dieses Stoffwechselweges werden die Metabolite PEP und Erythrose-4-Phosphat (E4P) durch die drei DAHP-Synthase Isoenzyme AroF, G und H zu 3-Desoxy-D-Arabino-Heptulosonat-7-Phosphat (DAHP) kondensiert (Pittard, 1996). Nach Einbringen eines defekten Allels der 3-Dehydroquinat-Synthase (*aroB*⁻), dem zweiten Schritt des Aromatenbiosyntheseweges, wird das Intermediat DAHP von den Mutanten in den Überstand ausgeschieden (Frost und Knowles, 1984). Das von den Mutanten gebildete DAHP wird unspezifisch zu 3-Desoxy-D-arabino-heptulosonat (DAH) dephosphoryliert (Frost und Knowles, 1984), so dass sich sowohl DAHP als auch DAH im Überstand befinden. In Abbildung 3.11 ist die DAHP/DAH-Bildung in einer *aroB*-Mutante von *E. coli* aus den Vorläufermetaboliten PEP und E4P schematisch dargestellt.

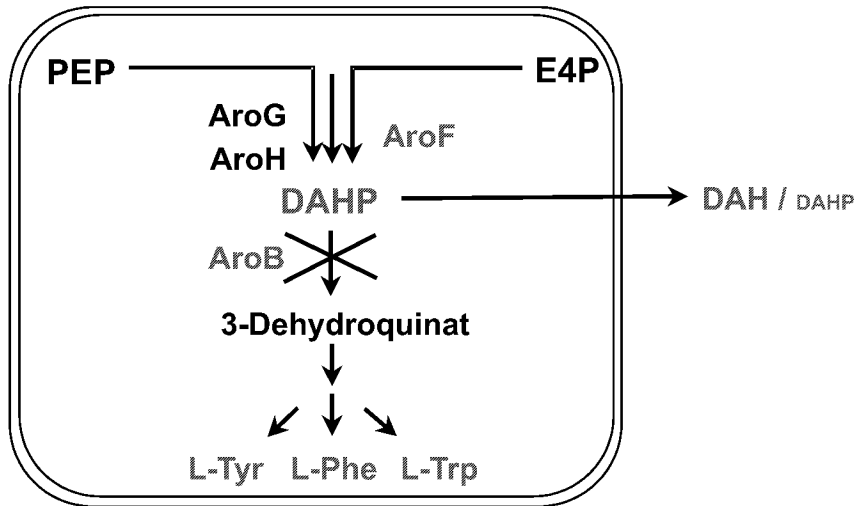


Abbildung 3.11: Prinzip der Bestimmung von Kohlenstoffflüssen in die Aromatenbiosynthese durch Quantifizierung des ausgeschiedenen DAH einer *aroB*⁻-Mutante. PEP → Phosphoenolpyruvat, E4P → Erythrose-4-Phosphat, AroF,G,H → DAHP-Synthasen, DAHP → 3-Desoxy-D-Arabino-Heptulosonat-7-Phosphat, DAH → 3-Desoxy-D-Arabino-Heptulosonat, AroB → 3-Dehydroquinat-Synthase, L-Phe → L-Phenylalanin, L-Tyr → L-Tyrosin, L-Trp → L-Tryptophan.

Da der Anteil der phosphorylierten Form am DAHP/DAH-Pool sehr gering ist (M. Schmitz, persönliche Mitteilung), wurde auf die Dephosphorylierung des DAHP-Anteils im Überstand mittels alkalischer Phosphatase [wie bei Krämer (2000) durchgeführt] verzichtet. Unter der Annahme eines konstanten Verhältnisses von phosphorylierter zu dephosphorylierter Form konnte aus der DAHP-Produktion der *aroB*⁻ „Indikatorstämme“ auf den Kohlenstofffluss in die Aromatenbiosynthese und auf die Verfügbarkeit der Vorläufermetabolite PEP und E4P geschlossen werden (Draths und Frost, 1990; Lu und Liao, 1997).

3.2.3 Prozessführung zur Untersuchung der Pyruvatcarboxylase Effekte in *E. coli*

Bisherige Untersuchungen zur DAHP-Produktion von *E. coli* wurden meistens in Schüttelkolben mit manueller pH-Steuerung durchgeführt [Draths *et al.* (1992), Flores *et al.* (1996), Gosset *et al.* (1996)]. Diese Art der Kultivierung hat einige Vorteile, so lassen sich

die Kolben bei geringem Zeit- und Kostenaufwand leicht handhaben und die Durchführung von vielfach parallelen Ansätzen ist problemlos möglich. Aus Schüttelkolbenexperimenten lassen sich Daten zum Wachstum der Biomasse gewinnen, auch Substrat- und Produktkonzentrationen können nach entsprechender Probennahme ermittelt werden.

Allerdings hat diese Form der Kultivierung auch gravierende Nachteile: Die Prozessbedingungen können beispielsweise im Verlauf der Kultivierung nicht erfasst und kontrolliert werden. So können sich in verschiedenen Ansätzen, bedingt durch unterschiedliche Säurebildung der Stämme, die pH-Werte stark unterscheiden. Eine manuelle pH-Steuerung durch Zugabe von Lauge gleicht zwar diese Unterschiede aus, führt aber zu starken Schwankungen der pH-Werte über die Kultivierungszeit. Weiterhin treten vor allem bei Kultivierungen über längere Zeiträume Flüssigkeitsverluste durch Verdunstung auf, die Ionenstärke steigt. Das Flüssigkeitsvolumen im Schüttelkolben wird durch die Probennahme zusätzlich verringert. Alle Substrate müssen vorgelegt werden, ein Zulaufbetrieb mit Substratzugabe ist im normalen Schüttelkolben nicht möglich. Bei höheren Biomassekonzentrationen können Sauerstofflimitierungen eintreten, die aber im Prozessverlauf nicht erkannt werden können. Die Quantifizierung gasförmiger Produkte wie Kohlendioxid ist im normalen Schüttelkolben nicht durchführbar.

Die Effekte der heterologen Pyruvatcarboxylase in *E. coli* sollten in dieser Arbeit möglichst umfassend ermittelt werden. Der Schüttelkolben stellte aber aus genannten Gründen nicht das ideale Handwerkszeug zur genaueren Untersuchung der Pyc-Effekte dar. Die Untersuchungen erfolgte daher in begasteten Rührkesseln, welche die sechsfach parallele Kultivierung der Stämme unter reproduzierbaren Bedingungen ermöglichte. Abbildung 3.12 zeigt die sechs Fermenter mit Peripherie, deren Aufbau in Kapitel 2.9.3 genauer beschrieben wurde.

Die „online“-Messdatenerfassung erfolgte computergestützt. Über den gesamten Fermentationsverlauf wurden pH-Wert, Temperatur, die Sauerstoffsättigung in der Flüssigkeit sowie die Anteile von O_2 und CO_2 im Abgas erfasst. Der pH-Wert wurde über die Zugabe von Ammoniaklösung geregelt und war somit über die gesamte Prozesszeit konstant, gleichzeitig diente das zugegebene $(NH_4)OH$ den Bakterien als Stickstoffquelle. Die Gelöstsauerstoffkonzentration wurde über die Rührerdrehzahl geregelt und betrug über den

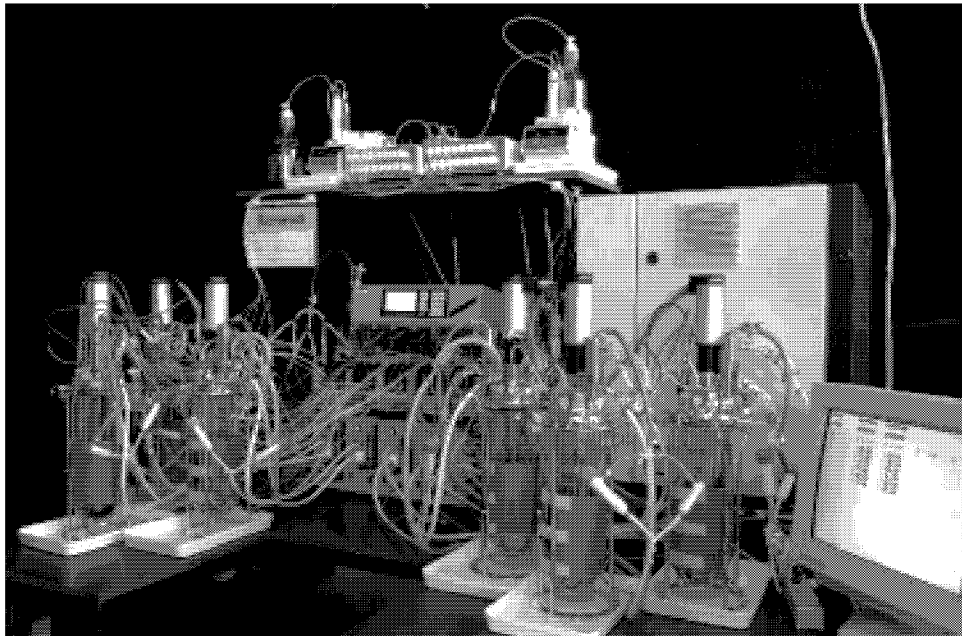


Abbildung 3.12: Zur Untersuchung der Pyc-Effekte in *E. coli* eingesetzte Fermenter (Sixfors Vario, Infors) mit Kulturgefäßen, Steuereinheit, Dosiersystem für Glukose im Zulaufbetrieb, Abgasanalytik und Prozessrechner.

gesamten Fermentationsverlauf mindestens 30 %, so dass Sauerstofflimitierungen der Mikroorganismen ausgeschlossen werden konnten.

Verdunstungsverluste wurden minimiert, da der in der Abluft enthaltene Wasserdampf im angeschlossenen Abgaskühler kondensierte. Über ein Dosiersystem konnte im Zulaufbetrieb für jeden Fermenter Substrat (Glukoselösung) zugeben werden, dabei wurde die Glukosezufuhr an den Substratverbrauch des jeweiligen Stamms angepasst.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen in begasten Rührkesseln waren technisch aufwendig und kostenintensiv. Aber nur durch diese Art der Kultivierung konnten im Hinblick auf pH-Wert, Temperatur und Sauerstoffsättigung für alle untersuchten Stämme die gleichen Prozessbedingungen gewährleistet werden. Da ein Effekt der Pyc auf die CO₂-Produktion von *E.coli* vermutet wurde (Kap. 3.2.1), war es wichtig die Anteile von Sauerstoff und Kohlendioxid im Abgas zu bestimmen. Dies erfolgte über die angeschlossene Abgasanalytik. Im folgenden wird der Begriff „CO₂-Produktion“ als Synonym für das in der Abluft quantifizierte Kohlendioxid verwendet. Nicht erfasst wurde damit die in

der Flüssigkeit in Form von HCO_3^- gelöste Menge Kohlendioxid. Auch das von den Zellen produzierte, aber direkt wieder fixierte CO_2 ist nicht in der „ CO_2 -Produktion“ enthalten.

3.2.4 Analytische Möglichkeiten

Neben der in Kapitel 3.2.3 beschriebenen „online“-Prozessdatenerfassung wurden über den gesamten Fermentationsverlauf von jeweils 30 h Proben der Kulturbrühe entnommen und „offline“ analysiert.

Die Biomassekonzentration wurde anhand der optischen Dichte und als Trockengewicht bestimmt (Kap. 2.9.5 und 2.9.6), auch die Stabilität der Plasmide wurden überprüft (Kap. 2.9.7). Es wurden nur Fermentationen ausgewertet, wenn mindestens 80 % der Zellen das jeweilige Plasmid enthielten. In Tabelle 3.2 sind exemplarisch die Daten zu Plasmidstabilitätsbestimmung für zwei Fermentationen von F48 gezeigt.

Tabelle 3.2: Bestimmung der Plasmidstabilität durch Ausbringen von Proben nach geeigneter Verdünnung auf Platten mit bzw. ohne Antibiotikum. Die Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten aus zwei Fermentern mit dem induzierten Stamm F48/pF36 entnommen. Gezeigt ist die Anzahl Klone, welche nach 14h Inkubation bei 37°C auf der entsprechenden Platte erhalten wurden, außerdem der Anteil plasmidtragender Zellen in %. Wurden auf den Platten mit Cm gleich viele oder mehr Klone erhalten als auf LB ohne Cm, trugen 100 % der untersuchten Zellen das Plasmid.

Zeit [h]	Verdünnung	Pyc +IPTG			Pyc +IPTG		
		LB	LB+Cm	%	LB	LB+Cm	[%]
3,75	$1 \cdot 10^{-7}$	37	44	100	64	57	100
	$1 \cdot 10^{-8}$	2	3	66	3	3	100
7,8	$1 \cdot 10^{-7}$	157	153	97	184	167	100
	$1 \cdot 10^{-8}$	13	12	92	14	11	89
11,8	$1 \cdot 10^{-7}$	802	796	99	833	813	97
	$1 \cdot 10^{-8}$	88	84	95	94	89	94
27	$1 \cdot 10^{-7}$	597	576	96	713	699	98
	$1 \cdot 10^{-8}$	53	49	93	83	78	94

Die Glukosekonzentration im Überstand wurde enzymatisch ermittelt (Kap 2.14), die Konzentration von organischen Säuren und Aminosäuren chromatographisch bestimmt (Kap. 2.9.8 und 2.9.9). Die Tabellen 3.3 und 3.4 geben einen Überblick über die Substanzen, die mit den verwendeten Methoden im Überstand identifiziert werden konnten.

Tabelle 3.3: Im Überstand mittels HPLC identifizierbare Substanzen mit der Konzentration des jeweils eingesetzten Standards. Die Konzentration des Standards lag im optimalen Messbereich, die jeweilige Nachweisgrenze für die Substanz etwa eine Zehnerpotenz darunter. Die HPLC-Methode wurde in Kap. 2.9.8 beschrieben.

Substanz	Standard [mM]	Substanz	Standard [mM]
DAH	1	Acetat	1
Citrat	0,2	Fumarat	0,01
α -Ketoglutarat	0,2	3-Dehydroshikimat	0,05
Pyruvat	0,5	Uracil	0,1
Succinat	1	Phenylpyruvat	0,1
Shikimat	0,01	Chorismat	0,05
Lactat	1	Gallussäure	0,01
Orotat	0,01	Quinat	1
Formiat	1	Malat	1

Tabelle 3.4: Im Überstand mittels HPLC identifizierbare Aminosäuren. Die Konzentration des jeweils eingesetzten Standards lag im optimalen Messbereich von 50 μ M, die Nachweisgrenze etwa bei 5 μ M. Die HPLC-Methode wurde in Kap. 2.9.9 beschrieben.

Phenylalanin	Tryptophan
Tyrosin	Glutamat
Alanin	Leucin
Aspartat	Lysin
Isoleucin	Glycin
Threonin	

Trotz dieser umfassenden Möglichkeiten zur Bestimmung von Substanzen im Überstand war es bei einigen Fermentationen nicht möglich, den gesamten eingesetzten Kohlenstoff in den jeweiligen Produkten wiederzufinden. Abbildung 3.13 zeigt die Verteilung des

verbrauchten Kohlenstoffs in den jeweiligen Produkten von F5 und F43. In alle Berechnungen wurde der gesamte über den Fermentationsverlauf verbrauchte Kohlenstoff einbezogen, darin enthalten war auch der über die jeweiligen Supplemente (aromatische Aminosäuren, Succinat) aufgenommene Kohlenstoff. Mit „Andere“ wurde die Lücke zwischen eingesetztem und in den Produkten wiedergefundenem Kohlenstoff bezeichnet. In dieser Rubrik sind aber auch Substanzen wie Uracil und Orotat enthalten, die im Überstand aller Fermentationen im Konzentrationen von maximal 2 mM detektiert wurden. Aufgrund ihrer geringen Anteile wurden diese nicht extra aufgeführt.

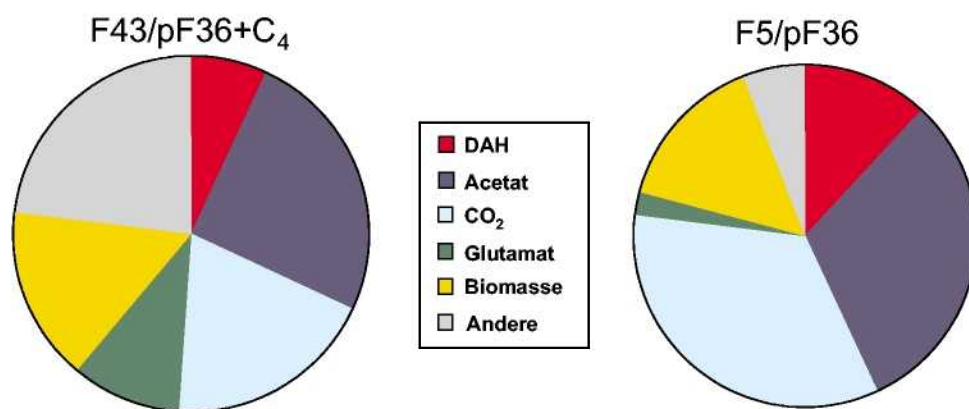


Abbildung 3.13: Prozentuale Anteile des Kohlenstoffgehalts der jeweiligen Produkte am verbrauchten Kohlenstoff. Die *aroB ppc*-Mutante F43 wurde mit Succinat (C₄) supplementiert, die Daten stammen aus Tab. 3.11, Kap. 3.4.2 sowie Tab. 3.16, Kap. 3.5.3.

In der gezeigten Bilanz von *E. coli* F5/pF36 wurden 94 % des eingesetzten Kohlenstoffs in den Produkten gefunden. Dies zeigt, dass mit den beschriebenen Möglichkeiten der größte Teil der von diesem Stamm der gebildeten Produkte erfasst werden konnte. Die Kohlenstoffbilanz im gezeigten Beispiel von Stamm F43 war jedoch nur zu knapp 80 % geschlossen. Die Bildung von weiteren, unbekannten Nebenprodukten war somit nicht ausgeschlossen, diese wurden möglicherweise trotz der umfassenden Analytik nicht detektiert.

3.3 Effekte der Pyruvatcarboxylase im Wildtyp

Es war bereits gezeigt worden, dass Pyruvatcarboxylase aus *C. glutamicum* in *E. coli* funktionell aktiv ist, da Pyc den Phänotyp einer *E. coli* Δppc -Mutante supprimieren konnte (Kap. 3.1.3). Im folgenden wurde untersucht, welche Effekte Pyc als zusätzliche anaplerotische Reaktion neben der PEP-Carboxylase in einem *E. coli*-Wildtyp hat. Dafür wurde das Gen der Pyruvatcarboxylase aus *C. glutamicum* auf dem Plasmid pF36 (Tab. 2.2) in den *E. coli*-Wildtyp F1 (Tab. 2.1) eingebracht (Kap. 2.4.4). Der entsprechende Kontrollstamm trug den Leervektor pACYC*tac* (Tab. 2.2).

Im Gegensatz zur Ppc-Reaktion wird durch Pyc die Synthese von Oxalacetat durch Carboxylierung von Pyruvat katalysiert. Abbildung 3.14 gibt einen Überblick über die anaplerotischen Reaktionen von *E. coli* nach Einbringen der Pyc.

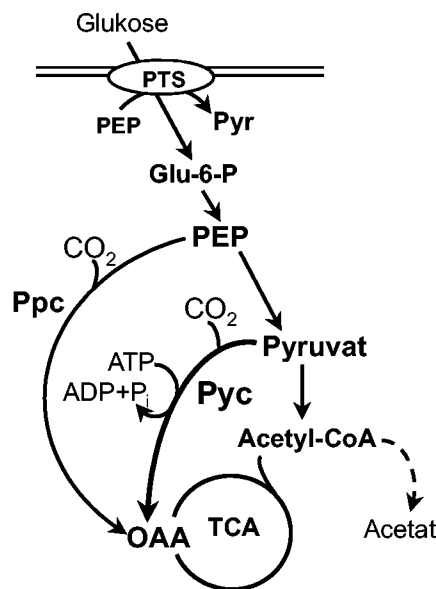


Abbildung 3.14: Schematische Darstellung der anaplerotischen Reaktionen von *E. coli* F1 mit heterologer Pyc. PTS → Phosphotransferasesystem, PEP → Phosphoenolpyruvat, Glu-6-Phosphat → Glukose-6-Phosphat, Ppc → PEP-Carboxylase, Pyc → Pyruvatcarboxylase, OAA → Oxalacetat, TCA → Tricarbonsäurezyklus.

3.3.1 Einfluss der Pyc auf die Säurebildung

Die aerobe Acetatbildung von *E. coli* war als Ungleichgewicht zwischen Glukoseaufnahme und den Bedürfnissen der Zelle für Biosynthese und Energieproduktion aufgefasst worden (El-Mansi und Holms, 1989). In Flussanalysen war festgestellt worden, dass durch die Erhöhung der Kohlenstoffflüsse durch die anaplerotischen Reaktionen die Acetatbildung gesenkt werden könnte (Delgado und Liao, 1997). Durch Überexpression der PEP-Carboxylase in *E. coli* war dies bestätigt worden (Farmer und Liao, 1997).

Um zu untersuchen, ob Pyc aus *C. glutamicum* als zusätzliche anaplerotische Reaktion einen Effekt auf die Säurebildung von *E. coli* ausübt, wurde zunächst ein Plattentest durchgeführt: Anhand der Koloniegröße bei Wachstum auf ungepuffertem Vollmedium mit einem Überangebot an Glukose sollte das Ausmaß der Säureproduktion abgeschätzt werden. Kolonien, die viel Säure produzieren, bleiben im Vergleich kleiner. Neben der Erniedrigung des pH-Wertes spielt dabei Acetat als Entkoppler des Protonengradienten über die Cytoplasmamembran eine maßgebliche Rolle. Undissoziierte Acetatmoleküle sind lipophil und können die Membran penetrieren. Im alkalischeren Milieu des Zellinneren dissoziiert das Proton ab, dieser Prozess setzt sich fort, bis der pH-Gradient über der Membran zusammenbricht und somit auch die chemoosmotische ATP-Synthese nicht mehr ablaufen kann (Gottschalk, 1985).

Die Stämme F1/pF36 und F1/pACYCtac wurden angezogen und nach geeigneter Verdünnung auf LB-Platten mit 1 % Glukose ausgebracht (Kap. 2.3.3). Chloramphenicol wurde zugesetzt, um die Stabilität der Plasmide zu garantieren, zusätzliches Biotin sollte die posttranslationale Biotinylierung der Pyc sicherstellen. Zur Induktion der Pyc wurden die Platten mit IPTG versetzt (Kap. 2.3.2). Die Durchmesser der erhaltenen Kolonien wurden ausgemessen, wobei nur Platten mit maximal 50 Kolonien ausgewertet wurden, um die Ergebnisse nicht durch sekundäre Effekte (zu hohe Koloniedichten) zu verfälschen. Die Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle 3.5 dargestellt.

Die Koloniegröße der Kontrollen, F1 mit Leerplasmid und ohne Induktion der Pyc, unterschied sich nicht vom Koloniedurchmesser des Pyc-exprimierenden Stamms. Somit

Tabelle 3.5: Koloniedurchmesser der Stämme auf LB-Platten mit 1 % Glukose, Biotin und Cm nach 24 h Inkubation bei 37°C. Anzucht in 5 mL LB mit Cm; Mittelwerte aus je 20 Messungen.

Stamm	Induktion	Koloniedurchmesser [mm]
F1/pF36	IPTG	$1,9 \pm 0,2$
F1/pACYC <i>tac</i>	IPTG	$1,2 \pm 0,3$
F1/pF36		$1,9 \pm 0,2$
F1/pACYC <i>tac</i>		$1,8 \pm 0,3$

liess sich kein Effekt der Pyruvatcarboxylase auf die Koloniegrösse von *E. coli* F1 feststellen. Allerdings schien der Induktor IPTG einen Effekt auf das Wachstum der Zellen auszuüben, denn ohne Induktor wurden die Kolonien von F1/pACYC*tac* größer als mit IPTG.

3.3.2 Einfluss der Pyruvatcarboxylase bei Kultivierung im begasten Rührkessel

Die Einflüsse der Pyc aus *C. glutamicum* in *E. coli* bei Wachstum auf Glukose auf die Produktbildung und Biomasseausbeute sollten unter definierten Kulturbedingungen in Minimalmedium eingehender untersucht werden, nachdem Voruntersuchungen nur Hinweise auf einen Einfluss der Pyc auf die Säureproduktion ergeben hatten (Kap. 3.3.1). Der Pyc-Stamm F1/pF36 sowie die entsprechende Kontrolle mit Leerplasmid wurden hierzu im begasten Rührkessel (Kap. 2.9) kultiviert.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Fermentationen zur Untersuchung der Pyc-Effekte in *E. coli* (Kap. 3.4, 3.5 und 3.6) wurden im Zulaufverfahren durchgeführt, um nach Abschluss des Zellwachstums noch Substrat zugeben zu können. Die Fermentation des *E. coli*-Wildtyps F1 mit Pyc wurde jedoch nicht in diesem Modus betrieben, da eine Limitierung der Biomassebildung über die Supplementkonzentration wie für die *aroB*-Mutanten beschrieben (Kap. 3.4.1) beim Wildtyp nicht möglich war. Eine Limitierung des Wachstums über Stickstoff- oder Phosphat-Verfügbarkeit erfolgte nicht, da auch nach

vollständigem Umsatz der N- oder P-Quelle im Medium aufgrund endogener Reserven noch Biomassebildung erfolgen kann und keine distinkte stationäre Phase beobachtet wird (Kjelleberg, 1993). Weiterhin könnte bei dieser Art der Limitierung des Wachstums eine Überlagerung möglicher Effekte von Stickstoff- oder Phosphatstress mit denen der Pyc auftreten. Daher wurde der Wildtyp F1 im Satzverfahren ohne Zudosierung von Glukose kultiviert. Das Wachstum der Stämme wurde anhand der OD_{620} verfolgt und ist in Abbildung 3.15 dargestellt.

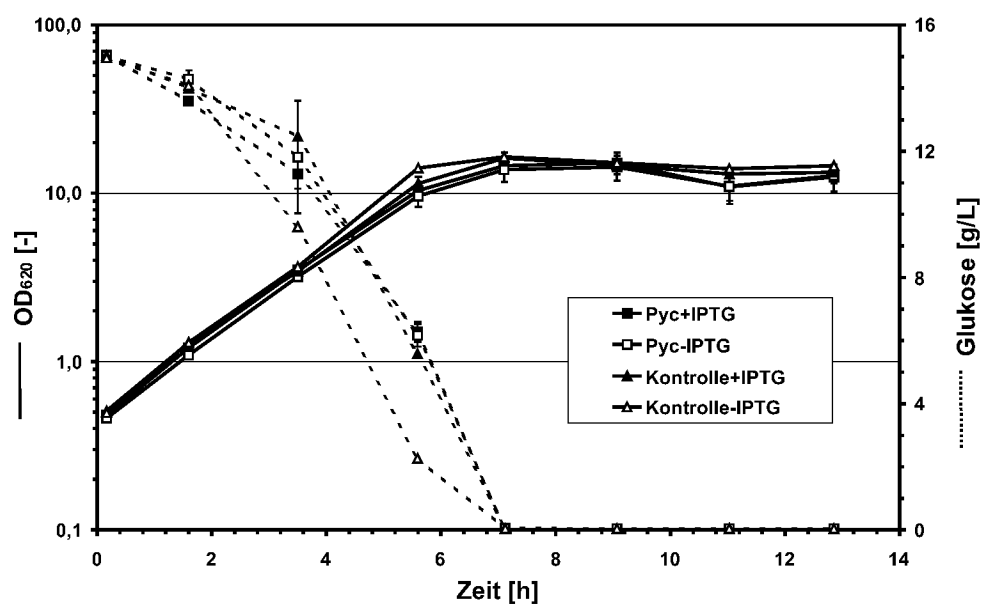


Abbildung 3.15: Wachstum und Glukoseverbrauch der Stämme F1/pF36 und F1/pACYCtac im begasten Rührkessel mit und ohne IPTG. Das Medium ist in Tab. 2.13 aufgeführt, die Glukosekonzentration zu Beginn betrug 15 g/L. Pyc → F1/pF36 (Mittelwerte aus je 2 unabhängigen Kultivierungen), Kontrolle → F1/pACYCtac.

Die exponentiellen Wachstumsraten (Kap. 2.3.4; Gl. 2.1) von Pyc-Stamm und die Kontrolle mit Leerplasmid unterschieden sich nicht signifikant, beide Stämme wuchsen mit Raten zwischen $0,58$ und $0,60 \text{ h}^{-1}$. Auch bildeten beide Stämme mit $4,8 - 6,4 \text{ g/L}$ vergleichbar viel Biotrockenmasse (Kap. 2.9.6). Die Glukosekonzentration im Überstand wurde enzymatisch ermittelt (Kap. 2.14).

Um festzustellen, ob die Expression von Pyc die Glukoseverbrauchsrate von *E. coli* beeinflusste, wurden ein Polynom 5. Grades an die Messwerte der Glukosekonzentration in der exponentiellen Wachstumsphase angepasst. Die erste Ableitung der sich ergebenden

Funktionen nach der Zeit ergab die entsprechende Glukoseverbrauchsrate [nach Gokarn *et al.* (1998)]. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Verbrauchsdaten auch auf die Biotrockenmassekonzentration zum entsprechenden Zeitpunkt bezogen [nach Gokarn *et al.* (2000)]. In Tabelle 3.6 sind die absoluten und spezifischen Glukoseverbrauchsdaten von F1 mit bzw. ohne Pyc aufgeföhrt.

Tabelle 3.6: Absolute und spezifische Glukoseverbrauchsrate q_{Glu} von F1/pF36 und F1/pACYC*tac* mit bzw. ohne IPTG. Die Bestimmung erfolgte rechnerisch anhand der enzymatisch ermittelten Glukosekonzentrationen in der exponentiellen Wachstumsphase (1-5 h Fermentationszeit) nach Gokarn *et al.* (1998). Die spezifische Glukoseverbrauchsrate wurde auf die entsprechende Biotrockenmassekonzentration im Fermenter bezogen.

Stamm	Induktion	abs. q_{Glu} [$\frac{g}{L \cdot h}$]	spez. q_{Glu} [$\frac{mmol}{g \cdot h}$]
F1/pF36	IPTG	1,92	9,35
F1/pACYC <i>tac</i>	IPTG	2,06	9,96
F1/pF36		1,86	9,85
F1/pACYC <i>tac</i>		4,53	19,23

Sowohl die absolute als auch die spezifische Glukoseverbrauchsrate von *E. coli* F1 wurde durch die Expression der Pyc nicht signifikant beeinflusst. Die Glukose wurde von F1/pF36 in der exponentiellen Wachstumsphase mit gleicher Rate verbraucht, unabhängig davon ob die Expression der heterologen Pyc durch IPTG-Zugabe induziert wurde. Der Glukoseverbrauch des Kontrollstamms mit Leerplasmid dagegen wurde durch IPTG aus noch unbekannter Ursache signifikant beeinflusst. Ohne den Induktor wurde der Zucker von F1/pACYC*tac* doppelt so schnell verbraucht wie bei Anwesenheit von IPTG im Medium.

Da über 80 % der Zellen am Ende der Fermentation das jeweilige Plasmid trugen (Kap. 2.9.7, Daten nicht gezeigt), war das *pyc*-Gen für *E. coli* verfügbar. Das biotinylierte Pyc-Protein wurde in zellfreien Extrakten (Kap. 2.6.1) von F1/pF36 per Western Blot (Kap. 2.5.4) als 120 kDa Bande (Peters-Wendisch *et al.*, 1997) detektiert, wie in Abbildung 3.16 dargestellt. Die zusätzlichen Banden weisen auf die Instabilität der Pyc hin, denn unspezifische Reaktionen des Streptavidin-AP-Konjugats mit dem Rohextrakt müssten

sich auch beim Kontrollstamm finden. Ohne IPTG-Induktion erfolgte eine geringe basale Expression der Pyc, im Kontrollstamm mit Leerplasmid fand sich erwartungsgemäß keine Pyc. Die ebenfalls biotinylierte Biotin-Carboxyl-Carrier-Protein-Untereinheit der Acetyl-CoA Carboxylase von *E.coli* hat ein Molekulargewicht von unter 20 kDa und wurde unter den gewählten Bedingungen nicht sichtbar.

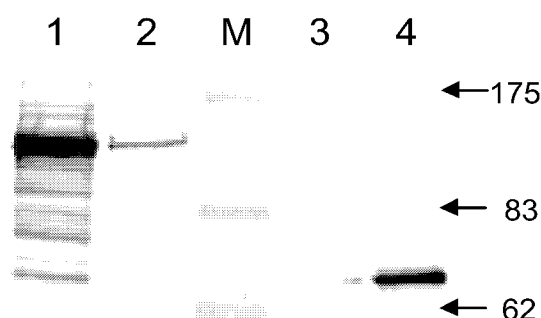


Abbildung 3.16: Nachweis der Pyc per Western Blot in zellfreien Extrakten als biotinylierte Bande mit einem Molekulargewicht von 120 kDa. Es wurden 25 μg Protein aufgetragen, die Zellernte erfolgte nach 9 h Fermentation. 1 $\rightarrow$ F1/pF36+IPTG, 2 $\rightarrow$ F1/pF36-IPTG, 3 $\rightarrow$ F1/pACYC*tac*+IPTG, 4 $\rightarrow$ AcylCoA-Carboxylase von *C. glutamicum* (Positivkontrolle, durch Überladen der Geltasche auch in Spur 3), M $\rightarrow$ Protein-Molekulargewichts-Standard mit Fragmentgrößen in kDa.

Zum Zeitpunkt der Untersuchungen von Pyc-Effekten im *E. coli*-Wildtyp war das Testsystem zur Bestimmung der Pyc-Aktivität *in vitro* (Kap. 3.7.3) noch nicht so weit etabliert, dass kinetische Untersuchungen durchgeführt werden konnten. Daher wurde die Aktivität der Pyc in F1 anhand der Thionitrobenzoat-Bildung nachgewiesen (Kap. 2.8.2, III). Nachweisprinzip war die Umsetzung des durch Pyruvatcarboxylase aus Pyruvat gebildeten Oxalacetats durch Citratsynthase zu Citrat und CoenzymA. Das freie CoA reagierte mit Dithionitrobenzoesäure, wobei ein molares Äquivalent an gelbgefärbtem Thionitrobenzoat (TNB^{2-}) entstand und photometrisch nachgewiesen wurde. Die Ergebnisse des Pyc-Nachweises anhand der TNB^{2-} -Bildung in F1 sind in Tabelle 3.7 dargestellt. Aufgrund der signifikant höheren TNB^{2-} -Bildung des Pyc-Stamms sollte die Pyc auch nach 11 Stunden Fermentationszeit noch aktiv gewesen sein.

Die CO_2 -Produktion von *E. coli* mit bzw. ohne Pyc wurde untersucht, da auf der einen Seite bei der Carboxylierung von Pyruvat zu Oxalacetat durch Pyc CO_2 fixiert wird, was sich möglicherweise in einer verringerten Kohlendioxidproduktion äußert. Auf der

Tabelle 3.7: Nachweis der Pyc-Aktivität in permeabilisierten Zellen von F1/pF36 und F1/pACYC*tac* anhand der TNB^{2-} -Konzentration im diskontinuierlichen Citratsynthesansatz (Kap. 2.8.2, III). Die Zellernte erfolgte nach 11 h Fermentation im begasten Rührkessel, gezeigt sind Mittelwerte aus je 2 unabhängigen Messungen. 100 % entsprechen einer TNB^{2-} -Konzentration von 0,14 mM.

Stamm	TNB^{2-} [μM]	%
F1/pF36	$136,76 \pm 6,62$	$100 \pm 4,83$
F1/pACYC <i>tac</i>	$48,53 \pm 5,88$	$35,48 \pm 4,30$

anderen Seite könnte durch eine erhöhte Verfügbarkeit von Oxalacetat der TCA-Zyklus und somit die terminale Oxidation des Kohlenstoffs zu CO_2 effizienter ablaufen und die CO_2 -Bildung erhöhen.

Der Quotient aus den während der Fermentation gebildeten mol CO_2 und dem verbrauchten Kohlenstoff [in mol C] ergab den integralen, substratbezogenen Ausbeutekoeffizienten für CO_2 ($Y_{\text{CO}_2/S}$) in C mol/C mol. Analog wurde die gebildete Biotrockenmasse auf die umgesetzte Glukose bezogen und ergab den substratbezogenen Ausbeutekoeffizienten für Biomasse ($Y_{X/S}$ in g/g). In Abbildung 3.17 sind die berechneten Ausbeutekoeffizienten für *E. coli* F1 mit bzw. ohne Pyc grafisch dargestellt.

Durch Expression der Pyc wurde die CO_2 -Ausbeute des *E. coli*-Wildtyps nicht signifikant beeinflusst, sie betrug beim Pyc-Stamm mit IPTG-Zugabe $0,21 \pm 0,04$ C mol/C mol, während die Kontrollen (F1/pACYC*tac* mit bzw. ohne IPTG; F1/pF36 ohne IPTG) CO_2 -Ausbeutekoeffizienten von 0,17 C mol/C mol erzielten. Damit lag die bei F1/pF36 beobachtete Steigerung von $Y_{\text{CO}_2/S}$ im Bereich der Abweichung vom Mittelwert.

Die Ausbeutekoeffizient für Biomasse wurde durch Pyc ebenfalls nicht signifikant beeinflusst, er lag für die Pyc-Stämme mit bzw. ohne IPTG bei $0,28 \pm 0,02$ g/g und bei den Kontrollen mit $0,33 \pm 0,01$ g/g geringfügig höher.

Die Acetatausbeuten der Stämme (bezogen auf den verbrauchten Kohlenstoff) sowie die Acetatkonzentrationen im Überstand sind in Tabelle 3.8 aufgeführt. Ein Vergleich der Acetatproduktion von F1/pF36 mit bzw. ohne IPTG ergab keine signifikanten Unterschiede und somit auch keinen Effekt der Pyc-Expression auf die Acetatbildung dieses

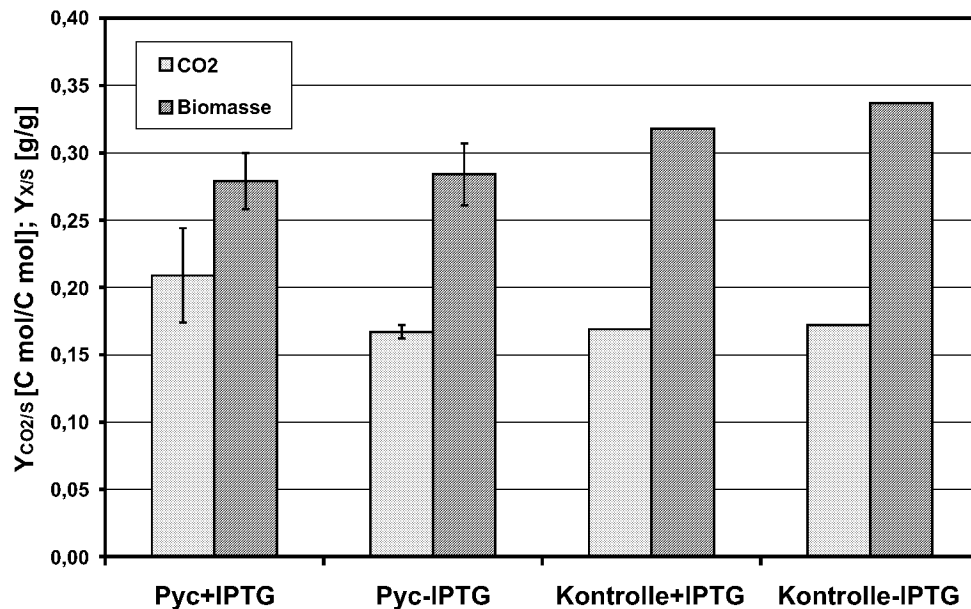


Abbildung 3.17: Integrale, substratbezogene Ausbeutekoeffizienten $Y_{X/S}$ (g Bio-trockenmasse pro g Glukose) und $Y_{CO_2/S}$ (mol CO₂ pro mol Kohlenstoff_{verbraucht}) von F1/pF36 und F1/pACYCtac nach satzweiser Kultivierung im begasten Rührkessel. Fermentationsbedingungen siehe Abb. 3.15. Pyc → F1/pF36 [Mittelwerte aus je 2 unabhängigen Fermentationen], Kontrolle → F1/pACYCtac.

Stamms. Beim Kontrollstamm mit Leerplasmid war die Acetatbildung im Ansatz mit Induktor aus bisher ungeklärter Ursache um 30 % erhöht.

Allerdings konnte die Expression der Pyc den Anteil Kohlenstoff, welcher zu Acetat umgewandelt wird, in *E. coli* F1 im Vergleich zum induzierten Kontrollstamm F1/pACYCtac um fast 40 % reduzieren. Ohne IPTG-Zugabe wurden vom Pyc-Stamm und der entsprechenden Kontrolle fast gleiche Mengen Acetat produziert.

Mit den beschriebenen Methoden zur Bestimmung von Aminosäuren und organischen Säuren im Überstand (Kap. 2.9.9 und 2.9.8) wurden als weitere Produkte Uracil und Orotat in Konzentrationen von maximal 2 mM in der Kulturbrühe identifiziert. Glutamat wurde im Überstand der Stämme in sehr geringen Konzentrationen von maximal 1 mM detektiert.

Pyc als zusätzliche anaplerotischen Reaktion im *E. coli*-Wildtyp hatte unter den genannten Bedingungen keinen Einfluss auf Wachstumsrate und Biomasseausbeute von F1. Auch

Tabelle 3.8: Integrale, auf den verbrauchten Kohlenstoff bezogene Ausbeutekoeffizienten $Y_{Acetat/S}$ (mol $C_{Produkt}$ pro mol $C_{verbraucht}$) in [%] und Acetatkonzentration in [mM] im Überstand nach 12,9 h Fermentation von F1/pF36 (Pyc) und F1/pACYC*tac* (Kontrolle) mit bzw. ohne IPTG. Prozessbedingungen siehe Abb. 3.15.

Stamm	Induktion	$Y_{Acetat/S}$ [%]	Acetat [mM]
F1/pF36	IPTG	2,2	7,05
F1/pACYC <i>tac</i>	IPTG	4,1	11,42
F1/pF36		2,7	7,82
F1/pACYC <i>tac</i>		2,7	7,93

die Glukoseverbrauchsrate in der exponentiellen Phase sowie die CO_2 -Produktion wurden nicht verändert.

3.3.3 Einfluss der Pyc bei Wachstum auf Lactat

Pyc katalysiert die Synthese von Oxalacetat durch Carboxylierung von Pyruvat (Kap. 2.8.2). Um die Pyruvatverfügbarkeit in der Zelle zu erhöhen, wurden die Stämme F1/pF36 (Pyc) und F1/pACYC*tac* (Kontrolle) in Minimalmedium mit Lactat als Kohlenstoffquelle in Schüttelkolben angezogen, denn Lactat wird auf der Stufe von Pyruvat in den Zentralstoffwechsel eingeschleust.

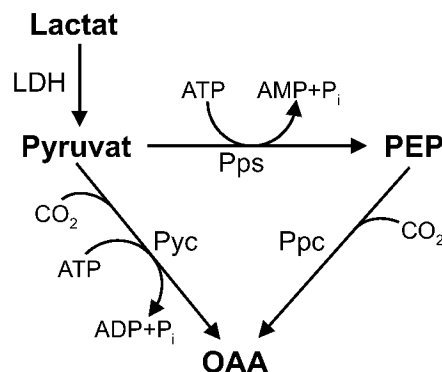


Abbildung 3.18: Schematische Darstellung der Synthese von PEP und Oxalacetat aus Pyruvat in *E. coli* mit heterologer Pyruvatcarboxylase. LDH → Lactatdehydrogenase, Pps → PEP-Synthetase, PEP → Phosphoenolpyruvat, Ppc → PEP-Carboxylase, OAA → Oxalacetat, Pyc → Pyruvatcarboxylase.

Pyruvatcarboxylase könnte unter diesen Bedingungen Einfluss auf den Energieladungszustand der Zelle haben, wie in Abbildung 3.18 gezeigt ist. Bei Wachstum auf C₃-Kohlenstoffquellen wie Lactat muss *E. coli* nicht nur den Tricarbonsäurezyklus auffüllen, sondern auch Glukose und deren Derivate synthetisieren (Schlegel, 1992). Die Synthese von PEP erfolgt in *E. coli* durch direkte Phosphorylierung von Pyruvat durch PEP-Synthetase (Pps). Dabei werden zwei energiereiche Phosphatbindungen beansprucht (Schlegel, 1992). Die Synthese von Oxalacetat zur Auffüllung des TCA-Zyklus erfolgt dann über PEP-Carboxylase. Das Einbringen der heterologen Pyruvatcarboxylase ermöglicht die direkte Synthese von Oxalacetat aus Pyruvat in *E. coli*, wobei statt zwei energiereicher Phosphatbindungen nur noch eine beansprucht wird. Die Wachstumskurve von *E. coli* F1 mit bzw. ohne Pyc mit Lactat als Kohlenstoffquelle ist in Abbildung 3.19 dargestellt.

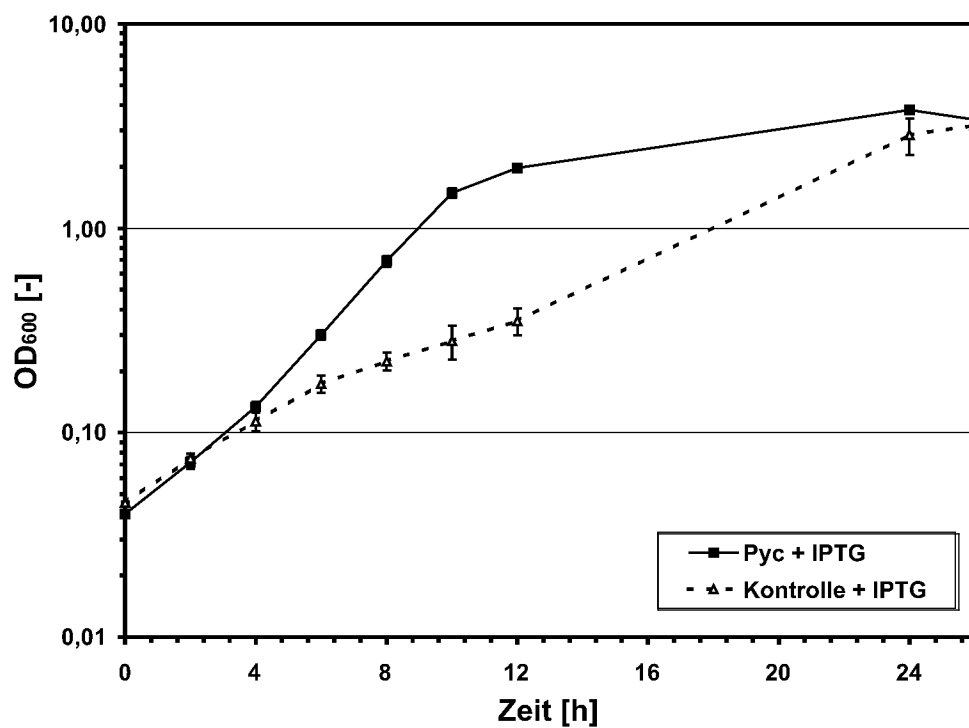


Abbildung 3.19: Wachstum der Stämme F1/pF36 (Pyc) und F1/pACYC*tac* (Kontrolle) in Schüttelkolben. Das Minimalmedium (Tab. 2.11) enthielt 0,6 % D,L-Lactat (statt Glukose), Biotin, Cm und IPTG. Gezeigt sind Mittelwerte aus je zwei unabhängigen Kultivierungen.

Während der Pyc-Stamm eine Wachstumsrate von $0,4 \text{ h}^{-1}$ erreichte, wuchs der Kontrollstamm mit Leerplasmid mit $\mu=0,15 \text{ h}^{-1}$ wesentlich langsamer. Die Wachstumsraten

wurden im Zeitraum zwischen 4 h und 10 h Kultivierung bestimmt. Beide Stämme wiesen nach 26 h Kultivierung eine optische Dichte (OD_{600}) von 3,4 auf. Die Expression von Pyc verschaffte dem *E. coli*-Wildtyp gegenüber dem Kontrollstamm somit einen eindeutigen Wachstumsvorteil auf der Kohlenstoffquelle Lactat.

3.4 Untersuchungen mit einer *E. coli aroB*-Mutante

Um zu untersuchen, ob die heterologe Pyruvatcarboxylase Einfluss auf die Verfügbarkeit von PEP in *E. coli* hat (Kap. 3.2.1), wurde das Pyc-Gen in einen „Indikatorstamm“ mit defekter 3-Dehydroquinat-Synthase eingebracht (*aroB*⁻, Kap. 3.2.2). Durch den Defekt des *aroB*-Gens scheidet der *E. coli*-Stamm F5 (Tab. 2.1) das erste Intermediat der Aromatenbiosynthese, 3-Desoxy-D-Arabino-Heptulosonat-7-Phosphat (DAHP), in den Überstand aus, wie in Abbildung 3.20 dargestellt. Die Konzentration der dephosphorylierten Form (DAH) im Überstand wurde bestimmt und diente als Maß für den Kohlenstofffluss in die Aromatenbiosynthese und damit der Verfügbarkeit von PEP.

Im Gegensatz zur Fermentation des Wildtyps mit bzw. ohne Pyc (Kap. 3.3.2) konnte bei der Kultivierung des Indikatorstamms F5 nach Abschluss des Zellwachstums noch Substrat im Zulaufverfahren zugegeben werden (Kap. 3.4.1). Durch den Einsatz wesentlich höherer Glukosemengen sollten mögliche Effekte der Pyc auf die Kohlenstoffflüsse deutlicher werden und Konzentrationsunterschiede bei einzelnen Produkten stärker zu Tage treten.

Das *pyc*-Gen wurde auf dem Vektor pF36 in den Stamm F5 eingebracht (Kap. 2.4.4), der Kontrollstamm enthielt das Leerplasmid pACYC*tac* (Tab. 2.2).

3.4.1 Prozessführung für *aroB*-Mutanten

Ein Stamm mit defekter 3-Dehydroquinat-Synthase (*aroB*) ist auxotroph für die aromatischen Aminosäuren L-Phenylalanin (Phe), L-Tryptophan (Trp) und L-Tyrosin (Tyr), diese müssen in millimolaren Konzentrationen supplementiert werden, um den Mutanten

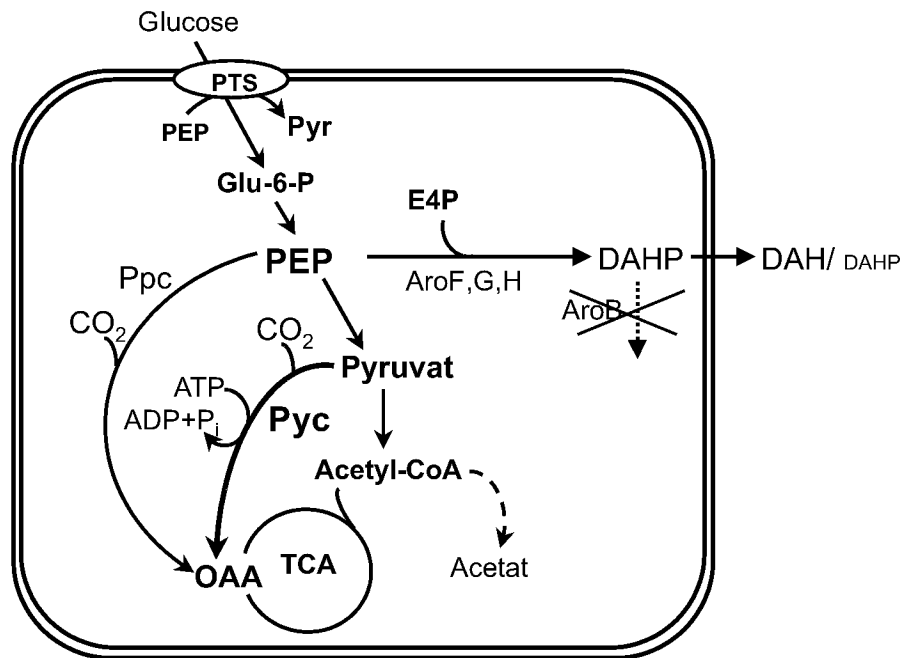


Abbildung 3.20: Schematische Darstellung der Kohlenstoffflüsse im Zentralstoffwechsel von *E. coli aroB⁻* mit heterologer Pyc. PTS → Phosphotransferasesystem, PEP → Phosphoenolpyruvat, Glu-6-Phosphat → Glukose-6-Phosphat, Pyc → Pyruvatcarboxylase, Ppc → PEP-Carboxylase, OAA → Oxalacetat, TCA → Tri-carbonsäurezyklus, AroF,G,H → DAHP-Synthasen, DAHP → 3-Desoxy-D-Arabino-Heptulose-7-Phosphat, AroB → 3-Dehydroquinate-Synthase, DAH → 3-Desoxy-D-Arabino-Heptulose-7-Phosphat, E4P → Erythrose-4-Phosphat.

Wachstum in Minimalmedium zu ermöglichen (Pittard und Wallace, 1966). Weiterhin muss er mit Shikimat supplementiert werden, da auch Intermediate aus der Aromatenbiosynthese wichtige Vorläufer für Biosynthesen von beispielsweise Folat, Ubichinon und Menachinon sind (Pittard, 1996), die durch die Mutation der 3-Dehydroquinate-Synthase nicht mehr zur Verfügung gestellt werden können.

Die Eingangsreaktion der Aromatenbiosynthese, die Kondensation von PEP und E4P zu DAHP, wird von drei DAHP-Synthase-Isoenzymen (*aroF,G,H*) katalysiert, wobei jedes Isoenzym durch eine oder mehrere der genannten aromatischen Aminosäuren gehemmt wird (Brown, 1971). Die Phe-inhibierte DAHP-Synthase (*aroG*) trägt mit 80 % den Hauptanteil an der gesamten DAHP-Synthase-Aktivität (Pittard, 1996). Durch diese Endprodukt-Hemmung ist die Zelle in der Lage, die Syntheserate abhängig von der Verfügbarkeit einzelner aromatischer Aminosäuren zu modulieren.

Um den Kohlenstofffluss in die Aromatenbiosynthese anhand der DAHP-Bildung des Indikatorstamms F5 (*aroB*[−]) quantifizieren zu können, musste aufgrund der Abhängigkeit der *aroB*[−]-Mutanten von supplementierten aromatischen Aminosäuren und der Hemmung der DAHP-Synthasen durch eben diese Aminosäuren eine Fermentationsstrategie entwickelt werden, welche sowohl Wachstum der Stämme als auch die Produktion von DAHP gewährleistete. Abbildung 3.21 skizziert den angestrebten Fermentationsverlauf.

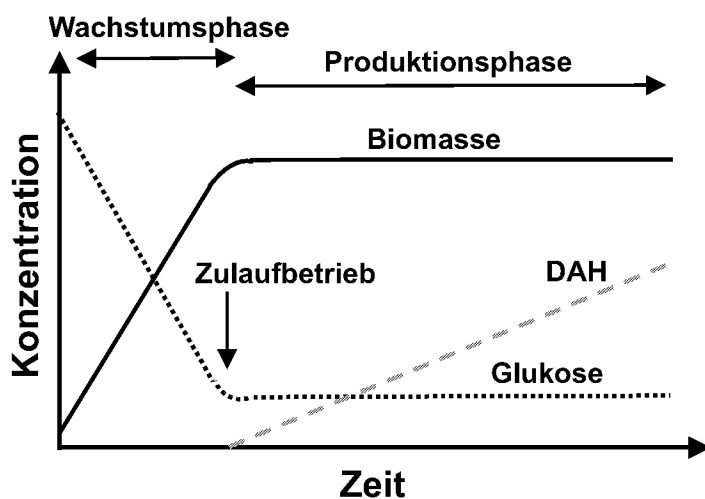


Abbildung 3.21: Schematischer Prozessverlauf der DAH-Produktion mit einer *aroB*[−]-Mutante von *E. coli*, der Start des Zulaufbetriebs wurde durch einen Pfeil markiert.

Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan wurden in einer Konzentration von 1,4 mM im Fermentationsmedium vorgelegt. In 1 g Biotrockenmasse von *E. coli* B sind nach Neidhardt *et al.* (1990) 176 μmol Phe, 131 μmol Tyr und 54 μmol Trp enthalten, die Supplemente sollten daher eine Biomassebildung von mindestens 6 g/L Trockengewicht ermöglichen. Das Wachstum der Stämme sollte durch die Verfügbarkeit der aromatischen Aminosäuren limitiert werden, während das Substrat Glukose im „fed batch“-Modus auch nach Abschluss des Wachstums zugegeben werden konnte. Durch diese Prozessführung sollten die aromatischen Aminosäuren in der Wachstumsphase vollständig in Biomasse umgesetzt werden, so dass in der Produktionsphase unter kontinuierlicher Zugabe von Glukose die Endprodukthemmung der DAHP-Synthasen aufgehoben sein sollte. Die Konzentration der dephosphorylierten Form des gebildeten Intermediats, DAH, wurde per HPLC im Überstand bestimmt (Kap. 2.9.8).

3.4.2 Effekte von Pyc in einer *E. coli aroB*-Mutante

Der Stamm F5/pF36 (Pyc) besitzt neben der PEP-Carboxylase die Pyruvatcarboxylase als zweite anaplerotische Reaktion. Um zu untersuchen, ob durch Pyc das zentrale Intermediat PEP vermehrt zur Verfügung steht und ob weitere Veränderungen im Produktspektrum durch Pyc auftreten, wurde F5/pF36 sowie der Kontrollstamm mit Leerplasmid pACYC*tac* in begasten Rührkesseln im Zulaufbetrieb kultiviert (Kap. 2.9). Dabei wurde die in Kapitel 3.4.1 vorgestellten Strategie verfolgt, durchgeführt wurden jeweils mindestens zwei unabhängige Kultivierungen.

Neben der DAH- war dabei auch die Acetat- und CO₂-Produktion der Stämme unter den genannten Bedingungen von Interesse. Beim *E. coli*-Wildtyp war keine signifikante Reduktion der Säurebildung durch Pyc beobachtet worden (Kap. 3.3.2), allerdings im satzweisen Betrieb, in dem das Wachstum der Stämme durch die Verfügbarkeit der Glukose limitiert war. Bei dieser Prozessführung wurde in allen Ansätzen sehr wenig Acetat produziert, die Konzentrationen im Überstand lagen unter 15 mM (Kap. 3.3.2). Im Zulaufverfahren steht den Zellen dagegen auch nach Abschluss des Wachstums unbegrenzt Glukose zur Verfügung, entsprechend sollte auch eine verstärkte Säurebildung der Stämme erfolgen. Wenn durch die unter Kontrolle des *tac*-Promotors exprimierte Pyc vermehrt Oxalacetat zur Verfügung steht, könnte Acetyl Coenzym A in höherem Maß an Oxalacetat gebunden werden, statt über Phosphotransacetylase und Acetatkinase zum Acetat umgesetzt zu werden. Dies könnte sich in einer verringerten Acetatbildung und möglicherweise gesteigerten CO₂-Produktion äußern.

Die Pyruvatcarboxylase konnte im Western Blot (Kap. 2.5.4) als biotinylierte Bande mit einer molekularen Masse von 120 kDa im Rohextrakt (Kap. 2.6.1) der induzierten Pyc-Stämme nachgewiesen werden. Auch ohne IPTG-Zugabe wurde Pyc detektiert, allerdings in sehr geringen Mengen. Der Kontrollstamm wies erwartungsgemäß keine biotinylierte Bande mit der angegebenen Größe auf (Daten nicht gezeigt, vgl. Abb. 3.16).

Abbildung 3.22 zeigt Wachstum und DAH-Konzentration im Überstand der Stämme. Der Pyc-Stamm F5/pF36 wuchs mit exponentiellen Wachstumsraten von $0,59 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$ unter IPTG-Zugabe. Wurde keine Induktor zugeben, erreichte der Stamm ein μ von $0,57 \pm$

$0,06 \text{ h}^{-1}$. Der Kontrollstamm F5/pACYC*tac* mit IPTG erreichte eine Wachstumsrate von $0,55 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$, ohne IPTG wuchs er mit $\mu = 0,53 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$. Beide Stämme erreichten Biomassekonzentrationen zwischen 6,3 g/L (Kontrollstamm mit IPTG) und 9,3 g/L (Pyc-Stamm mit IPTG) [Kap.2.9.6]. Somit bewährte sich die unter 3.4.1 vorgestellte Strategie im Bezug auf das Wachstum der *aroB*⁻-Stämme. Die Expression der Pyc hatte auch im *aroB*⁻-Stamm keine signifikanten Auswirkungen auf die Wachstumsrate, wie schon für den Wildtyp F1 festgestellt worden war (Kap. 3.3.2).

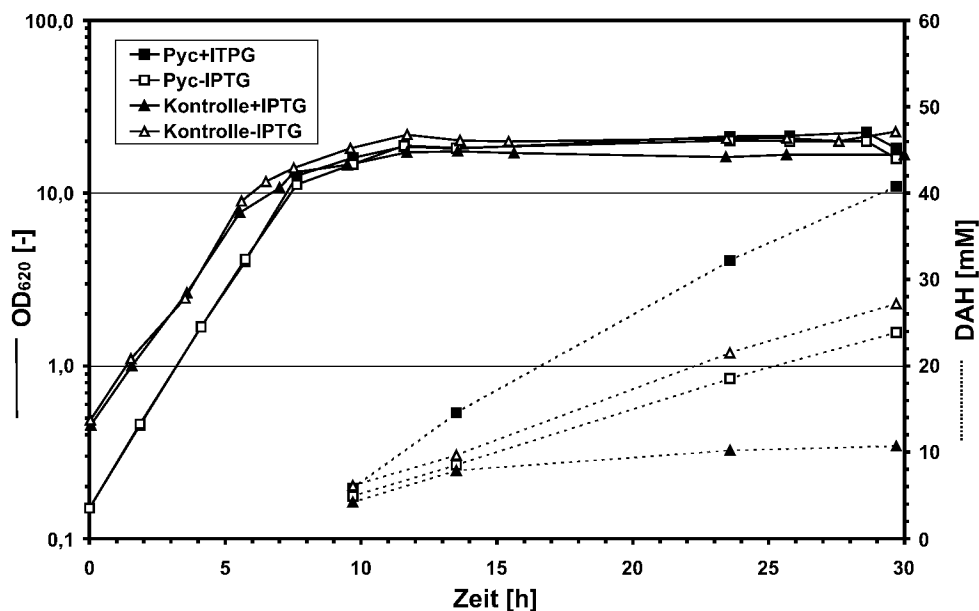


Abbildung 3.22: Wachstum und DAH-Konzentration im Überstand der Stämme F5/pF36 (Pyc) und F5/pACYC*tac* (Kontrolle) im begasten Rührkessel. Medium siehe Kap. 2.9.2, Prozessbedingungen siehe Kap.2.9.3, Zulaufbetrieb ab 8 h Fermentationszeit.

Die Glukoseverbrauchsrate der Stämme in der exponentiellen Phase sowie der über die gesamte Fermentationszeit umgesetzte Kohlenstoff sind in Tabelle 3.9 aufgeführt. Die absoluten Glukoseverbrauchsrate von F5/pF36 und F5/pACYC*tac* in den einzelnen Ansätzen unterschieden sich nicht signifikant. Die erhöhte spezifische Glukoseverbrauchsrate des Pyc-Stamms F5/pF36 nach Induktion wies eine so hohe Abweichung vom Mittelwert auf, dass keine signifikante Aussage über einen Einfluss der Pyc möglich waren. Ein signifikanter Einfluss von IPTG auf den Glukoseverbrauch des Kontrollstamms F5/pACYC*tac* wurde in dieser Fermentation nicht beobachtet (vergl. Kap. 3.3.2, Tab. 3.6).

Tabelle 3.9: Absolute und spezifische Glukoseverbrauchsrate q_{Glu} von F5/pF36 und F5/pACYC*tac* mit bzw. ohne IPTG sowie der über die gesamte Fermentationszeit verbrauchte Kohlenstoff. Die Bestimmung von q_{Glu} erfolgte rechnerisch anhand der enzymatisch ermittelten Glukosekonzentrationen in der exponentiellen Wachstumsphase (1-5 h Fermentationszeit) nach Gokarn *et al.* (1998). Die spezifische Glukoseverbrauchsrate wurde auf die entsprechende Biotrockenmassekonzentration im Fermenter bezogen. Mittelwerte aus zwei unabhängigen Fermentationen.

Stamm	Induktion	abs. q_{Glu} [$\frac{g}{L \cdot h}$]	spez. q_{Glu} [$\frac{mmol}{g \cdot h}$]	C-Gesamtverbrauch [mol]
F5/pF36	IPTG	1,87±0,48	19,59±7,83	4,39±0,05
F5/pACYC <i>tac</i>	IPTG	1,83±0,42	9,48±0,11	3,14±0,46
F5/pF36		1,21±0,33	12,08±1,90	2,85±0,34
F5/pACYC <i>tac</i>		2,30±0,61	10,70±1,46	2,65±0,0

Die Glukose wurde nicht in allen Fermentern mit gleichen Raten dosiert. Das Fütterungsprofil wurde so angepasst, dass die Glukosekonzentration im Medium während des Zulaufbetriebs möglichst immer zwischen 1 und 5 g/L lag. Je nach Glukoseverbrauch haben die Stämme daher unterschiedliche Mengen Glukose erhalten und somit auch im Verlauf der Fermentation unterschiedliche Mengen an Kohlenstoff umgesetzt. In Tabelle 3.9 sind die jeweils verbrauchten Kohlenstoffmengen aufgeführt, ermittelt aus der Differenz zwischen dem eingesetzten Zucker und der Rest-Glukose, welche nach Ende der Fermentation noch im Überstand quantifiziert wurde (Kap. 2.14). Dabei wurden auch die verbrauchten aromatischen Supplemente in die Kohlenstoffbilanz einbezogen (Kap. 2.9.2). Obwohl Pyruvatcarboxylase keinen Einfluss auf die Glukoseverbrauchsrate in den ersten 5 h hatte, zeigte sich ein deutlicher Effekt der Pyc am Gesamt-Kohlenstoffverbrauch der Stämme: Der induzierte Pyc-Stamm hat ca. ein Drittel mehr Kohlenstoff verbraucht als die Kontrollen.

Die DAH-Bildung der Stämme setzte nach 9 Stunden Fermentation beim Übergang in die stationäre Phase ein. Die DAH- sowie die Acetatkonzentrationen im Überstand der Stämme nach 30 h Fermentation sind in Tabelle 3.10 aufgelistet. Der nicht-induzierte Stamm F5 hat unter den genannten Bedingungen unabhängig vom eingebrachten Plasmid (pF36 oder pACYC*tac*) um die 30 mM DAH produziert. Somit konnte gezeigt werden,

dass sich die in Kap. 3.4.1 vorgestellte Fermentationsstrategie auch im Bezug auf die DAH-Bildung bewähren konnte und die DAHP-Synthasen nach Abschluss des Wachstums nicht mehr durch aromatische Aminosäuren allosterisch inhibiert wurden. Durch Induktion der Pyc wurde die DAH-Produktion bei F5/pF36 um über 25 % erhöht. Beim Kontrollstamm mit Leerplasmid dagegen war die DAH-Bildung im Ansatz mit IPTG aus noch ungeklärter Ursache um die Hälfte reduziert.

Tabelle 3.10: DAH- und Acetat-Konzentration im Überstand der Stämme nach 30 h Fermentation im Zulaufverfahren. Prozessbedingungen siehe Abb. 3.22, Mittelwerte aus zwei unabhängigen Fermentationen.

Stamm	Induktion	DAH [mM]	Acetat [mM]
F5/pF36	IPTG	40,79 $\pm$ 2,55	11,44 $\pm$ 6,45
F5/pACYC <i>tac</i>	IPTG	12,72 $\pm$ 2,82	195,17 $\pm$ 21,36
F5/pF36		28,87 $\pm$ 2,04	240,24 $\pm$ 28,18
F5/pACYC <i>tac</i>		29,22 $\pm$ 2,85	264,78 $\pm$ 70,65

Der Effekt der Pyc auf die Acetatproduktion von *E. coli* war signifikant. Die Acetatkonzentration im Überstand des Stammes F5 betrug am Ende der Fermentation im Zulaufverfahren über 200 mM. Die Expression der heterologen Pyc reduzierte die Acetatkonzentration um 95 %.

Als weiteres Nebenprodukt in signifikanten Konzentrationen über 1 mM wurde nur Glutamat detektiert. Im Überstand der induzierten Pyc-Stämme befanden sich 23 mM, während die Kontrollen mit maximal 8,5 mM wesentlich weniger Glutamat gebildet haben (Ausbeuten siehe Tab. 3.11).

Um dem unterschiedlichen Glukose-Gesamtverbrauch der Stämme Rechnung zu tragen, wurden neben den Konzentrationen der Produkte im Überstand auch die integralen, substratbezogenen Ausbeutekoeffizienten berücksichtigt (Kap. 3.3.2). Sie geben den Anteil des jeweils umgesetzten Kohlenstoffs wieder, welcher in den Kohlenstoffanteil des entsprechenden Produktes geflossen ist und liefern somit vergleichbare Daten für die unterschiedlichen Stämme. In Tabelle 3.11 sind die ermittelten Ausbeutekoeffizienten aufgeführt. Die

gebildete Biotrockenmasse wurde dabei auf die verbrauchte Glukose bezogen (g Biomasse pro g Glukose).

Tabelle 3.11: Integrale, auf den verbrauchten Kohlenstoff bezogene Ausbeutekoeffizienten ($\text{mol } C_{\text{Produkt}} \text{ pro mol } C_{\text{verbraucht}}$) in [%] sowie Biomasseausbeute (g Biomasse pro g Glukose) in [%] von F5/pF36 (Pyc) und F5/pACYC*tac* (Kontrolle) mit bzw. ohne IPTG. Fermentationsbedingungen siehe Abb. 3.22, Mittelwerte aus zwei unabhängigen Fermentationen.

Stamm	Induktor	DAH	Acetat	CO ₂	Glutamat	Biomasse
F5/pF36	IPTG	11,3±0,6	2,9±0,1	34,1±1,8	4,5±0,1	12,5±0,1
F5/pACYC <i>tac</i>	IPTG	4,3±0,4	26,0±2,9	25,0±13,6	1,3±1,2	11,2±4
F5/pF36		10,0±2,0	30,0±0,7	33,0±3,5	1,4±0,9	14,4±1,3
F5/pACYC <i>tac</i>		11,1±1,6	39,3±14,4	27,5±6,6	2,8±0,1	15,2±1,6

Der Kohlenstoffanteil, welcher in Richtung Aromatenbiosynthese geschleust wurde, betrug im nicht-induzierten *E. coli*-Stamm F5 ein Zehntel der aufgenommenen Menge, unabhängig von eingeführten Plasmid. Zwar steigerte die Expression der Pyc die Konzentration von DAH im Überstand (Tab. 3.10), hatte aber auch einen erhöhten Kohlenstoffverbrauch zur Folge (Tab. 3.9). Der entsprechende Ausbeutekoeffizient zeigte, dass der Anteil Kohlenstoff für die DAH-Produktion durch Pyc nicht gesteigert werden konnte.

Die Pyc hatte signifikante Auswirkungen auf die Acetatausbeute der Stämme. Ein Drittel des aufgenommenen Kohlenstoffs schleuste *E. coli* F5 in Richtung Acetat. Durch Expression der Pyruvatcarboxylase dagegen reduzierte sich dieser Anteil auf unter 3 %.

Die Kohlendioxidproduktion von F5 wurde durch Pyc nicht wesentlich beeinflusst, in allen Ansätzen wurde ca. ein Drittel des aufgenommenen Kohlenstoffs im Form von CO₂ ausgeschieden. Somit ließ sich trotz des beschriebenen Effekts der Pyc auf die Acetatbildung eine gesteigerte Effizienz des Tricarbonsäurezyklus anhand der CO₂-Produktion nicht feststellen. Zwar wurde im Vergleich zum Kontrollstamm mit IPTG die CO₂-Ausbeute von F5/pF36 + IPTG um 20 % gesteigert, doch die Standardabweichung war zu groß, um gesicherte Aussagen treffen zu können.

Nach Induktion der Pyc wurde signifikant mehr Glutamat im Überstand von F5 detektiert, die Glutamat-Ausbeute war im Vergleich zu den Kontrollen um 30 % erhöht.

Die Biomasseausbeute aller Stämme unterschied sich nicht signifikant. Allerdings war das Wachstum der Zellen durch die Verfügbarkeit der aromatischen Supplemente limitiert, so dass unter den genannten Bedingungen keine Aussagen zu eventuellen Effekten der Pyruvatcarboxylase auf die Biomasseausbeute von F5 gemacht werden können.

Pyruvatcarboxylase aus *C. glutamicum* steigerte in einer *E. coli aroB*⁻-Mutante zwar die DAH-Menge im Überstand, nicht aber den Kohlenstofffluss in die Aromatenbiosynthese. Die aerobe Acetatproduktion von F5 wurde dagegen signifikant reduziert, obwohl der Gesamt-Glukoseverbrauch des Stamms durch Pyc um ein Drittel erhöht wurde. Die Expression der Pyc blieb ohne signifikante Auswirkungen auf Biomasseausbeute und CO₂-Produktion von *E. coli* F5.

3.5 Pyruvatcarboxylase in einer *aroB ppc*-Doppelmutante von *E. coli*

Die Effekte von Pyc als zweiter anaplerotischer Reaktion neben der PEP-Carboxylase in einer *aroB*-Mutante von *E. coli* waren bereits beschrieben worden (Kap. 3.4). Im nächsten Schritt wurde untersucht, wie eine *E. coli aroB*-Mutante mit deletiertem PEP-Carboxylase-Gen (*ppc*) auf Pyc als einzige anaplerotische Reaktion reagiert, wie in Abbildung 3.23 skizziert.

Ein *aroB*⁻-„Indikatorstamm“ wurde herangezogen, um neben den Effekten der Pyc auf Wachstum und Produktspektrum von *E. coli* auch Auswirkungen auf den Kohlenstofffluss in die Aromatenbiosynthese (und somit die Verfügbarkeit von PEP) feststellen zu können (Kap. 3.4). Dies war von besonderem Interesse, da in einer *ppc*-Mutante keine Konkurrenz von Pyc und DAHP-Synthasen um den Baustein PEP auftritt.

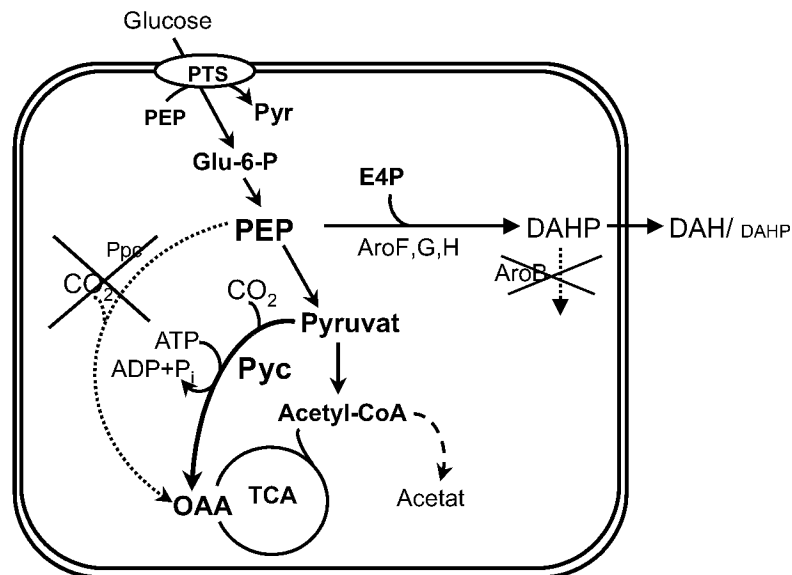


Abbildung 3.23: Schematische Darstellung der Kohlenstoffflüsse im Zentralstoffwechsel von *E. coli aroB⁻ ppc⁻* mit heterologer Pyc. PTS → Phosphotransferasesystem, PEP → Phosphoenolpyruvat, Glu-6-P → Glukose-6-Phosphat, Pyc → Pyruvatcarboxylase, Ppc → PEP-Carboxylase, OAA → Oxalacetat, TCA → Tri-carbonsäurezyklus, AroF,G,H → DAHP-Synthasen, DAHP → 3-Desoxy-D-Arabino-Heptulose-7-Phosphat, AroB → 3-Dehydroquinate-Synthase, DAH → 3-Desoxy-D-Arabino-Heptulose-7-Phosphat, E4P → Erythrose-4-Phosphat.

3.5.1 Co-Transduktion der *ppc*-Deletion

Um den Einfluss der Pyc als einziger anaplerotischer Reaktion in *E. coli* auf die DAH-Produktion untersuchen zu können, musste zunächst das PEP-Carboxylase-Gen inaktiviert werden. Die Methode von Link *et al.* (1997) war genutzt worden, um das *ppc*-Gen in *E. coli* chromosomal zu deletieren (Kap. 3.1.1), wurde jedoch hier nicht angewandt, da sie mit hohem experimentellen Aufwand verbunden war. Die markerlose *ppc*-Deletion aus Stamm F39 wurde statt dessen unter Nutzung des Prinzips der Cotransduktion eines rezessiven Gens in den Indikatorstamm mit defekter 3-Dehydroquinate-Synthase (*aroB*; F5, Tab. 2.1) eingebracht. In Abbildung 3.24 ist die Reihe der P1-Transduktionen schematisch dargestellt.

Zunächst wurde das durch eine Kanamycin-Kassette disruptierte *ppc*-Gen (*ppc::Kan* aus JCL1242) mittels P1-Transduktion (Kap. 2.4.6) in den *E. coli*-Stamm R6 ($\Delta argH$, Tab. 2.1) übertragen (G. Sprenger), wobei transduzierte Zellen über ihre Kanamycin-Resistenz

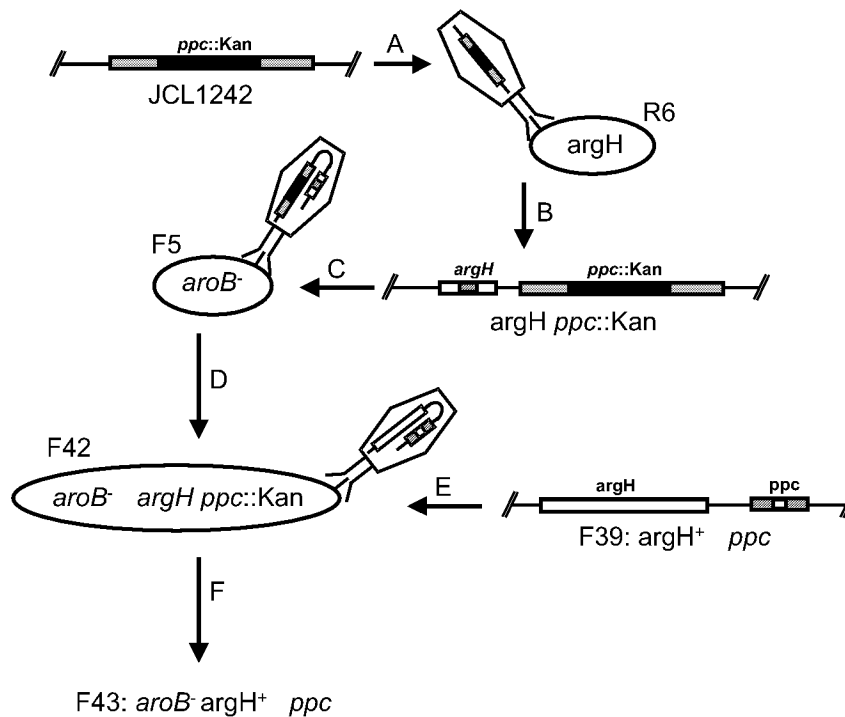


Abbildung 3.24: Schematische Darstellung der Übertragung der markerlosen *ppc*-Deletion in eine *E. coli* *aroB*-Mutante durch Cotransduktion. A: Durch Infektion mit einem P1-Lysat aus JCL1242 wurde das disruptierte *ppc*-Gen in den Stamm R6 übertragen, im resultierenden Stamm (B) lagen *ppc::Kan* und $\Delta argH$ dicht nebeneinander, C: Durch ein P1-Lysat aus R6 *ppc::Kan* wurden die Allele *ppc::Kan* und $\Delta argH$ in F5 (*aroB*⁻) cotransduziert, der resultierende Stamm (D) wurde mit F42 bezeichnet, E: Durch Infektion mit einem P1-Lysat aus F39 wurden die Allele *ppc::Kan* und $\Delta argH$ in F42 durch Δppc und *argH*⁺ ausgetauscht, der resultierende Stamm (F) wurde mit F43 bezeichnet.

selektiert wurden. Mit dem resultierenden Stamm R6*ppc::Kan* konnten die Allele $\Delta argH$ und *ppc::Kan* aufgrund ihrer engen Nachbarschaft anschließend cotransduziert werden. Der Stamm F5 (*aroB*⁻) wurde mit einem Phagenlysat aus R6*ppc::Kan* infiziert und transduzierte Klone zunächst über ihre Kan^R selektioniert. Um zu überprüfen, ob auch die Deletion des Gens der Argininosuccinat-Lyase ($\Delta argH$) übertragen worden war, wurden die Kan^R-Klone anschließend auf Argininauxotrophie untersucht, die Disruption des *ppc*-Gens wurde außerdem durch die Succinatbedürftigkeit der Klone nachgewiesen (Kap. 3.1.2). Von 3 untersuchten Klonen waren 2 argininauxotroph und succinatbedürftig, einer dagegen argininprototroph und succinatbedürftig. In zwei Dritteln der untersuchten

Klone wurden somit $\Delta argH$ und $ppc::Kan$ cotransduziert. Tabelle 3.12 zeigt das Wachstum des resultierenden Stamms F42 ($aroB^- \Delta argH ppc::Kan$) und der Kontrollen im Plattentest.

Tabelle 3.12: Überprüfung der Cotransduktion von $\Delta argH$ und $ppc::Kan$ aus R6 $ppc::Kan$ in F5 zum resultierenden Stamm F42 im Plattentest. Die Bakterien wurden 48 h bei 37°C auf Tanaka-MM mit 0,5 % Glukose, Thiamin und den angegebenen Supplementen inkubiert. F1 und F39 wurden zur Kontrolle mit auf die Platten gebracht. Succ $\rightarrow$ 0,05 % Succinat, Arg $\rightarrow$ Arginin, Phe $\rightarrow$ L-Phenylalanin, Tyr $\rightarrow$ L-Tyrosin, Trp $\rightarrow$ L-Tryptophan, Shk $\rightarrow$ Shikimat (je 40 mg/L), + $\rightarrow$ Wachstum, - $\rightarrow$ kein Wachstum.

Stamm	Genotyp	Succ, Arg	Phe, Tyr, Trp, Shk, Arg	Phe, Tyr, Trp, Shk, Succ	Phe, Tyr, Trp, Shk, Succ, Arg
F1		+	+	+	+
F39	Δppc	+	-	+	+
R6 $ppc::Kan$	$\Delta argH ppc::Kan$	+	-	-	+
F42	$aroB^- \Delta argH$ $ppc::Kan$	-	-	-	+

Der Stamm F42 wurde im nächsten Schritt mit einem P1_{kc}-Lysat aus F39 transduziert, um die Allele $ppc::Kan$ und $\Delta argH$ gegen Δppc und $argH^+$ auszutauschen. Transduzierte Klone wurden durch Selektion auf Argininprototrophie erhalten, indem die Zellen nach der Infektion mit dem Phagenlysate auf Minimalmedium mit Glukose, aromatischen Aminosäuren und Succinat aber ohne Arginin ausplattiert wurden. Die so erhaltenen $argH^+$ -Klone wurden auf Kanamycin-Sensitivität getestet. Von 15 untersuchten, argininprototrophen Klonen waren 3 Kanamycin-resistent. In 80 % der Klone wurden somit Δppc und $argH^+$ cotransduziert. Der Phänotyp des resultierenden Stamms F43 ($aroB^- \Delta ppc$) wurde im Plattentest überprüft, wie in Tabelle 3.13 dargestellt.

Durch eine Reihe von P1_{kc}-Transduktionen war also die markerlose Deletion des ppc -Gens in die *E. coli aroB*-Mutante übertragen worden.

Tabelle 3.13: Überprüfung der Cotransduktion von Δppc und $argH^+$ aus F39 in F42 zum resultierenden Stamm F43 im Plattentest. Die Bakterien wurden 48 h bei 37°C auf Tanaka-MM mit 0,5 % Glukose, Thiamin und den angegebenen Supplementen inkubiert, die LB-Platten nur 14 h. F1, F2 und F5 wurden zur Kontrolle mit auf die Platten gebracht. Succ $\rightarrow$ 0,05 % Succinat, Phe $\rightarrow$ L-Phenylalanin, Tyr $\rightarrow$ L-Tyrosin, Trp $\rightarrow$ L-Tryptophan, Shk $\rightarrow$ Shikimat (je 40 mg/L), Kan $\rightarrow$ Kanamycin, + $\rightarrow$ Wachstum, - $\rightarrow$ kein Wachstum.

Stamm	Genotyp	Phe, Tyr, Trp, Shk	Succ	Phe, Tyr, Trp Shk, Succ	LB	LB+Kan
F1		+	+	+	+	-
F2	<i>ppc::Kan</i>	-	+	+	+	+
F5	<i>aroB⁻</i>	+	-	+	+	-
F39	Δppc	-	+	+	+	-
F43	<i>aroB⁻ Δppc</i>	-	-	+	+	-

3.5.2 Fermentationsstrategie für die *aroB* Δppc -Doppelmutante

Mit dem so erhaltenen *E. coli*-Stamm F43 (*aroB⁻ Δppc* ; Kap. 3.5.1, Tab. 2.1) sollte nun der Einfluss der Pyc als einziger anaplerotischer Reaktion auf den Kohlenstofffluss in die Aromatenbiosynthese untersucht werden (Abb. 3.23). Der Vektor pF36 wurde in den Stamm F43 eingebracht (Kap. 2.4.4), der entsprechende Kontrollstamm erhielt den Leervektor pACYC*tac*.

Zunächst wurde durch Wachstumsexperimente in Minimalmedium mit Glukose untersucht, ob Pyc auch in F43 den Ppc-Defekt supprimieren konnte (Kap. 3.1.3). Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.25 gezeigt. F43 war nach Induktion der Pyc in der Lage, auf Glukose als einziger Kohlenstoffquelle mit einer exponentiellen Wachstumsrate von $0,43 \pm 0,06 \text{ h}^{-1}$ zu wachsen. Ohne IPTG erfolgte erwartungsgemäß kein Wachstum (Kap. 3.1.4), auch die Kontrollen wuchsen aufgrund der Abhängigkeit von *ppc*-Mutanten von C₄-Intermediaten nicht auf Glukose ohne entsprechende Supplemente (Kap. 3.1.2).

Somit ergab sich das Problem, adäquate Kontrollen für die Untersuchung der Pyc-Effekte in F43 zu finden, da sowohl der nicht-induzierte F43/pF36-Stamm als auch F43 mit Leerplasmid ohne anaplerotische Reaktionen nicht in Minimalmedium mit Glukose wachsen

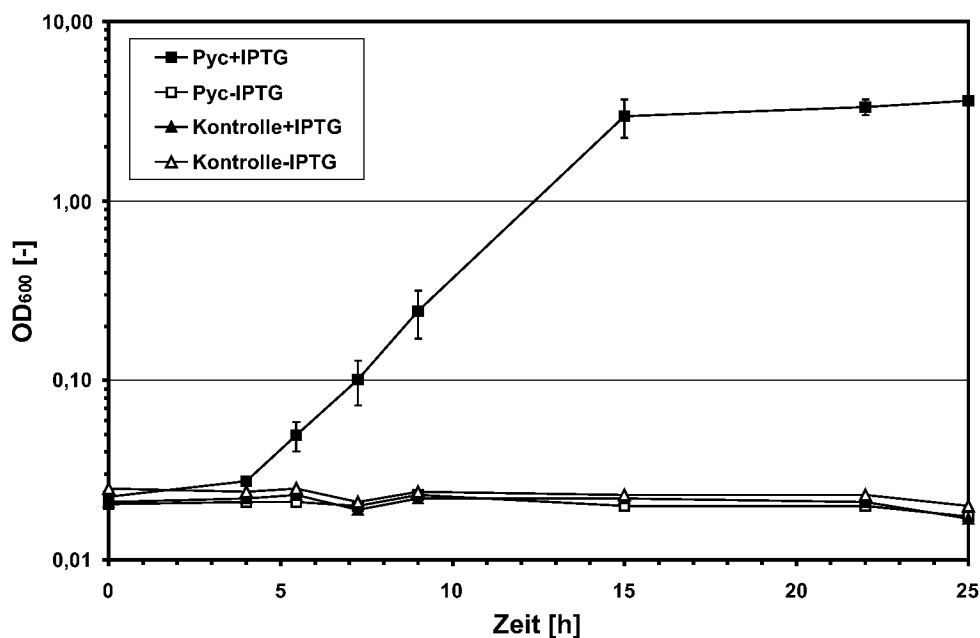


Abbildung 3.25: Wachstum von F43/pF36 (Pyc) und F43/pACYC*lac* (Kontrolle) in Schüttelkolben. DSM-Vorkulturmedium (Tab. 2.11) mit 0,5 % Glukose und Biotin mit bzw. ohne IPTG. Gezeigt sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Kultivierungen, die Vorkulturen wurden auf DSM-Vorkulturmedium mit Glukose und Succinat angezogen.

konnten. Um auch diesen Stämmen Biomassebildung zu ermöglichen, wurden sie mit Succinat supplementiert. Die DAH-Bildung von F43 mit bzw. ohne Pyc sollte analog zur Fermentationsstrategie für F5 (Kap. 3.4.1) erfolgen, mit der beschriebenen Limitierung der Biomassebildung der *aroB*⁻-Mutanten über die aromatischen Supplemente und einer Unterteilung des Prozesses in Wachstums- und Produktionsphase. Daher musste ausreichend Succinat vorgelegt werden, um die angestrebte Biomassekonzentration von mindestens 6 g/L im Fermenter (Kap. 3.4.1) sicherzustellen. Nach Neidhardt *et al.* (1990) enthalten 10 g Biotrockenmasse 29 mmol Tricarbonsäurezyklus-Intermediate, somit wurden 2,3 g/L (~ 30 mmol, 0,23 %) Succinat pro Fermenter zugegeben.

3.5.3 Effekte von Pyc in der *aroB* Δppc -Doppelmutante

Mit der in Kapitel 3.5.2 vorgestellten Fermentationsstrategie wurde Wachstum und Produktbildung von F43/pF36 und dem entsprechenden Kontrollstamm mit Leerplasmid (F43/pACYC*tac*) im begasten Rührkessel im Zulaufbetrieb untersucht (Kap. 2.9). Durchgeführt wurden jeweils mindestens zwei unabhängige Kultivierungen.

In zellfreien Extrakten (Kap. 2.6.1) von F43/pF36 + IPTG wurde ein biotinyliertes Protein mit einer molekularen Masse von 120 kDa mittels Western Blot detektiert (Kap. 2.5.4), bei der es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um Pyc handelt (Peters-Wendisch, 1996). Auch ohne Induktor war dieses Protein nachweisbar, allerdings in sehr geringen Mengen. Der Kontrollstamm wies erwartungsgemäß kein biotinyliertes Protein mit der angegebenen Größe auf (Daten nicht gezeigt, vgl. Abb. 3.16). Weiterhin wurde die Aktivität der Pyc im Stamm F43 mit dem diskontinuierlichen, Citratsynthase-gekoppelten Test *in vitro* nachgewiesen (Kap. 3.7.2; Abb. 3.31).

Abbildung 3.26 zeigt Wachstum und DAH-Produktion von F43 mit bzw. ohne Pyc. Der Kontrollstamm sowie der nicht induzierte Pyc-Stamm mussten mit Succinat supplementiert werden (Kap. 3.5.2), daher wurde auch dem induzierten Pyc-Stamm in einem Ansatz Succinat zugegeben. F43/pF36 wuchs unter IPTG-Zugabe mit exponentiellen Wachstumsraten von $0,41 \pm 0,04 \text{ h}^{-1}$. Mit IPTG und Succinat wuchs er mit $\mu = 0,44 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$ geringfügig schneller, ebenso im Ansatz, in dem nur C₄-Intermediate supplementiert wurden ($\mu = 0,49 \pm 0,05 \text{ h}^{-1}$). Der Kontrollstamm mit Leerplasmid wuchs unter IPTG-Zugabe mit einer exponentiellen Wachstumsrate von $0,53 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$, ohne Induktor mit $\mu = 0,51 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$. Somit haben die *ppc*-Mutanten mit Pyc als einziger anaplerotischer Reaktion im Vergleich ca. 20 min längere Generationszeiten als solche, die C₄-Intermediate aus dem Medium zur Auffüllung des Citratzyklus nutzen konnten. Alle Stämme erreichten Biomassekonzentrationen zwischen 9,45 g/L (F43/pACYC*tac*+IPTG+Succ) und 11,7 g/L (F43/pF36+IPTG) und erfüllten damit die gestellten Anforderungen an die Biomassebildung (Kap. 3.5.2).

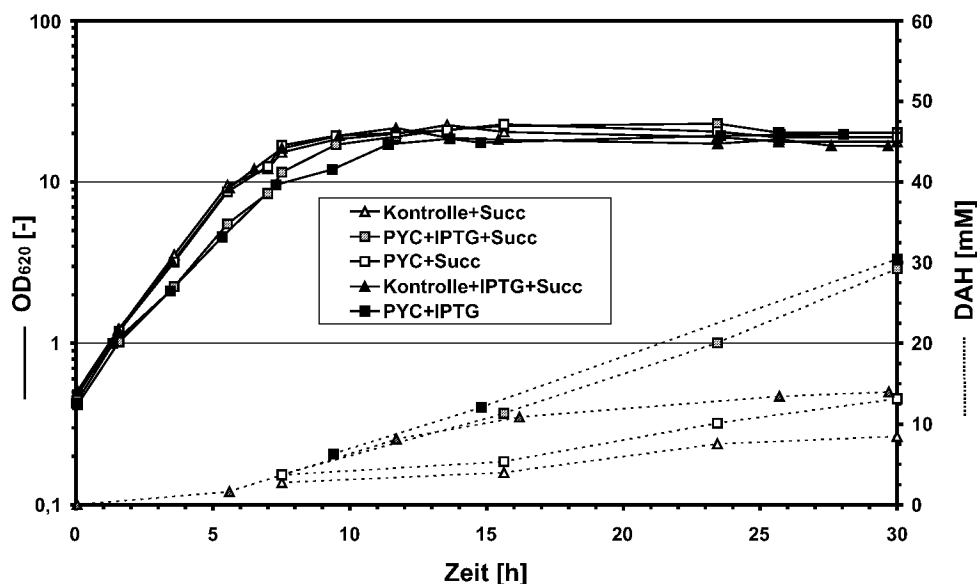


Abbildung 3.26: Wachstum und DAH-Konzentration im Überstand der Stämme F43/pF36 (Pyc) und F43/pACYCtac (Kontrolle) im begasten Rührkessel. Medium siehe Kap. 2.9.2, Prozessbedingungen siehe Kap. 2.9.3, Zulaufbetrieb ab 7 h Fermentationszeit, Zugabe von 0,23 % Succinat wenn angegeben (Succ).

Die DAH-Produktion setzte, wie schon beim Stamm F5 beobachtet (Kap. 3.4.2, Abb. 3.22) beim Übergang in die stationäre Wachstumsphase ein, als die aromatischen Supplemente fast vollständig verbraucht waren und die Endprodukthemmung der DAHP-Synthasen aufgehoben sein sollte (Kap. 3.4.1). Somit konnte sich die zweiphasige Fermentationsstrategie auch beim Stamm F43 bewähren. Neben DAH wurden nur Acetat und Glutamat in signifikanten Mengen ($\leq 1\text{mM}$) in den Überständen der Stämme detektiert, die jeweiligen Konzentrationen sind in Tabelle 3.14 aufgelistet. Die basale DAH-Produktion von F43 mit Leerplasmid ergab eine Konzentration von maximal 15 mM DAH im Überstand. Der Induktor IPTG übte im Gegensatz zu F5 (Kap. 3.4.2, Tab. 3.10) keinen signifikanten Einfluss auf die DAH-Produktion des Kontrollstamms aus. Die Induktion der heterologen Pyc verdoppelte die DAH-Konzentration im Überstand von F43.

Die Expression der Pyruvatcarboxylase reduzierte die Acetatproduktion von F43 signifikant. Der Kontrollstamm mit Leerplasmid bildete in allen Ansätzen mehr als zehn Mal mehr Acetat als F43 mit induzierter Pyc. Wurde der nicht induzierte Pyc-Stamm mit Succinat supplementiert, produzierte dieser trotzdem über 200 mM Acetat. Das zugegebene Succinat wurde in allen Ansätzen im Verlauf der Fermentation vollständig umgesetzt

Tabelle 3.14: Produkt-Konzentration im Überstand der Stämme nach 30 h Fermentation im Zulaufverfahren. Prozessbedingungen siehe Abb. 3.26, $C_4 \rightarrow$ Ansatz mit Succinat. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen. * $\rightarrow$ nur ein Messwert vorhanden.

Stamm	Ansatz	DAH [mM]	Acetat [mM]	Glutamat [mM]
F43/pF36	IPTG	$30,45 \pm 4,15$	$14,95 \pm 12,33$	$148,55 \pm 31,94$
F43/pF36	C_4	$17,05 \pm 5,52$	$228,73 \pm 47,22$	31,28
F43/pF36	IPTG+ C_4	$28,7 \pm 0,76$	$6,97 \pm 0,23$	$87,79 \pm 23,99$
F43/pACYC <i>tac</i>	C_4	$6,9 \pm 1,65$	$322,21 \pm 15,04$	0,11*
F43/pACYC <i>tac</i>	IPTG+ C_4	$10,99 \pm 4,21$	$279,24 \pm 39,88$	0,38*

(Daten nicht gezeigt). Die hohe Acetatproduktion der Stämme trotz Succinatsupplementierung deutete darauf hin, dass der Pyc-Effekt auf die Acetatbildung nicht allein auf einer erhöhten Verfügbarkeit von Oxalacetat als Akzeptor für Acetyl-Coenzym A aus der Glykolyse basieren konnte. Durch Supplementierung mit dem C_4 -Intermediat sollte die Auffüllung des Tricarbonsäurezyklus sichergestellt sein, denn sonst hätten die *ppc*-Mutanten nicht wachsen können (Abb. 3.25; Kap. 3.5.2). Die Supplementierung mit Succinat konnte nach den vorliegenden Ergebnissen nicht als „Acetatfalle“ dienen.

Nach Induktion der Pyc bildete F43 signifikant mehr Glutamat als die Kontrollen. Allerdings konnte Glutamat in jeweils nur einer von zwei Fermentationen von F43/pACYC*tac* in sehr geringen Konzentrationen ($\leq 0,5$ mM) nachgewiesen werden. Auch bei F43/pF36 war nur in einem von zwei Ansätzen ohne IPTG Glutamat detektierbar (Tab. 3.14). Weitere Nebenprodukte konnte mit den verwendeten Methoden nicht identifiziert werden (Kap. 2.9.8 und 2.9.9).

Die Glukoseverbrauchsrate der Stämme in der exponentiellen Phase sowie der Gesamtverbrauch an Kohlenstoff nach 30 h Fermentation sind in Tabelle 3.15 dargestellt. In den Kohlenstoffverbrauch wurde dabei auch der über die Supplemente aufgenommene Kohlenstoff mit einbezogen. Unter Berücksichtigung der jeweiligen Abweichungen vom Mittelwert unterschieden sich die Glukoseverbrauchsrate in den ersten 5 h von F43 mit bzw. ohne Pyc nicht signifikant. Wie schon für Stamm F5 beschrieben (Kap. 3.4.2, Tab. 3.9) beeinflusste Pyc den Gesamt-Kohlenstoffverbrauch von F43. Durch die Expression

der Pyc verbrauchte F43 im Vergleich zu den Kontrollen mit Leerplasmid ein Drittel mehr Kohlenstoff.

Tabelle 3.15: Absolute und spezifische Glukoseverbrauchsrate q_{Glu} von F43/pF36 und F43/pACYC*tac* sowie der über die gesamte Fermentationszeit verbrauchte Kohlenstoff in den entsprechenden Ansätzen. Die Bestimmung von q_{Glu} erfolgte rechnerisch anhand der enzymatisch ermittelten Glukosekonzentrationen in der exponentiellen Wachstumsphase (1-5 h Fermentationszeit) nach Gokarn *et al.* (1998). Die spezifische Glukoseverbrauchsrate wurde auf die entsprechende Biotrockenmassekonzentration im Fermenter bezogen. Mittelwerte aus zwei unabhängigen Fermentationen.

Stamm	Ansatz	abs. q_{Glu} [$\frac{g}{L \cdot h}$]	spez. q_{Glu} [$\frac{mmol}{g \cdot h}$]	C-Gesamtverbrauch [mol]
F43/pF36	IPTG	1,12±0,17	8,82±0,57	3,75±0,05
F43/pF36	IPTG, Succinat	1,11±0,49	8,69±4,01	2,68±0,77
F43/pACYC <i>tac</i>	IPTG, Succinat	1,57±0,36	10,34±0,03	2,11±0,04
F43/pF36	Succinat	1,11±0,08	6,93±1,81	2,92±0,47
F43/pACYC <i>tac</i>	Succinat	1,78±0,04	7,85±0,78	2,22±0,21

Da die Stämme unterschiedlich viel Kohlenstoff verbrauchten, wurde neben den Konzentrationen der Produkte im Überstand auch die integralen, substratbezogenen Ausbeutekoeffizienten betrachtet. In Tabelle 3.16 sind die ermittelten Ausbeutekoeffizienten aufgeführt. Der Kontrollstamm mit Leerplasmid schleuste im Mittel weniger als 5 % des verbrauchten Kohlenstoffs in Richtung Aromatenbiosynthese. Die Induktion der heterologen Pyruvatcarboxylase verdoppelte den Stofffluss in die Aromatenbiosynthese in F43 auf 10 % des verbrauchten Kohlenstoffs. Wurde zusätzlich Succinat supplementiert, erhöhte sich der Kohlenstofffluss in den Shikimisäureweg auf 12 %.

Der neue anaplerotische Stoffwechselweg Pyc konnte, wie schon bei *E. coli* F5 (Kap. 3.4.2, Tab. 3.11), den Stofffluss in Richtung Acetat signifikant senken. Statt wie die Kontrollen über ein Drittel des Kohlenstoffs in Form von Acetat ins Medium abzugeben, fanden sich nach Induktion der Pyc in F43 höchstens 2,5 % des Substratkohlenstoffs im Acetat wieder.

Unter Berücksichtigung der Abweichungen vom Mittelwert in den einzelnen Ansätzen ließ sich kein signifikanter Effekt der Pyc auf den Kohlendioxid-Ausbeutekoeffizient von *E. coli* F43 feststellen.

Tabelle 3.16: Integrale, auf den verbrauchten Kohlenstoff bezogene Ausbeutekoeffizienten (mol $C_{Produkt}$ pro mol $C_{verbraucht}$) in [%] sowie Biomasseausbeute (g Biomasse pro g Glukose) in [%] von F43/pF36 (Pyc) und F43/pACYC*tac* (Kontrolle) in den jeweiligen Ansätzen. Fermentationsbedingungen siehe Abb. 3.26, Mittelwerte aus zwei unabhängigen Fermentationen, $C_4 \rightarrow$ Ansatz mit Succinat.

Stamm	Ansatz	DAH	Acetat	CO ₂	Glutamat	Biomasse
F43/pF36	IPTG	9,7±1,4	1,4±1,1	19,0±2,1	33,7±6,8	11,1±1,7
F43/pF36	IPTG+C ₄	11,8±2,3	0,7±0,1	28,6±9,6	26,3±11,4	16,6±1,5
F43/pACYC <i>tac</i>	IPTG+C ₄	4,5±1,9	32,4±6,2	13,8±4,4	0,1	12,8±5
F43/pF36	C ₄	6,6±3,6	23,9±0,8	16,6±2,2	9,8	13,1±2,7
F43/pACYC <i>tac</i>	C ₄	2,8±0,6	38,5±1,3	14,4±1,1	≤0,1	12,4±2,3

Mehr als ein Viertel des aufgenommenen Kohlenstoffs wurde von F43 mit induzierter Pyc im Form von Glutamat ausgeschieden. Der Ausbeutekoeffizient für Glutamat der Kontrollen war im Vergleich dazu signifikant geringer.

Die Biomasseausbeute von F43 wurde durch die Expression der Pyc nicht signifikant beeinflusst. Wie für Stamm F5 beschrieben (Kap. 3.4.2) war das Wachstum der Biomasse durch die Verfügbarkeit der aromatischen Supplemente limitiert, so dass mögliche Effekte der Pyc auf die Biomasseausbeute unter den beschriebenen Bedingungen nicht zum Tragen kommen konnten.

Durch Pyc als einzige anaplerotische Reaktion in *E. coli* F43 wurde der Kohlenstofffluss in die Aromatenbiosynthese im Vergleich zu den Kontrollen verdoppelt. Die Expression der Pyc bewirkte in F43 eine Umlenkung der Kohlenstoffflüsse von der aeroben Acetatbildung in Richtung Glutamatproduktion. Durch Pyc stieg der Kohlenstoffverbrauch des Stamms, die Kohlendioxidausbeute wurden dagegen von der Pyc nicht signifikant beeinflusst.

3.6 Effekte der Pyruvatcarboxylase in einer *aroB* Δppc -Mutante mit deregulierter Eingangsreaktion der Aromatenbiosynthese

Die bisherigen Untersuchungen zum Einfluss der Pyc auf den Kohlenstofffluss in die Aromatenbiosynthese waren in *E. coli*-Stämmen durchgeführt worden, die durch eine Mutation im zweiten Schritt der Aromatenbiosynthese (*aroB*) das Intermediat DAHP ins Medium ausschieden (Kap. 3.2.2). Untersucht wurden die Effekte von Pyc als zweiter anaplerotischer Reaktion neben der PEP-Carboxylase (Kap. 3.4) und auch die Auswirkungen der Pyc als einziger anaplerotischer Reaktion in einer DAH-produzierenden *ppc*-Mutante (Kap. 3.5). Die Fermentationsstrategie wurde so gewählt, dass sowohl Biomassebildung als auch DAH-Produktion in einem Ansatz möglich waren und die Endprodukthemmung der DAHP-Synthasen durch die notwendigen aromatischen Supplemente nach Abschluss der Biomassebildung nicht mehr auftrat (Kap. 3.4.1).

Im Folgenden soll untersucht werden, ob der Kohlenstofffluss in den Shikimisäureweg gesteigert werden kann, wenn neben Pyc als einziger anaplerotischer Reaktion ein DAHP-Synthase Isoenzym (*aroF*) anstelle des Wildtypallels unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors im *aroB*-Stamm exprimiert wird. In Abbildung 3.27 sind die Kohlenstoffflüsse im *E. coli*-Stamm F48 schematisch dargestellt.

3.6.1 Konstruktion des Stamms F48

Der Stamm F48 [Δppc *aroB*⁻ $\Delta(pheA\ tyrA\ aroF)::(P_{tac}\text{-}aroF\ pheA^{fbr}\ aroL)$; Tab.2.1] wurde von G. Sprenger durch eine Reihe von P1_{kc}-Transduktionen erzeugt (Kap. 2.4.6), wie in Abbildung 3.28 gezeigt.

Zunächst wurde die an eine Kanamycin-Resistenzkassette gekoppelte Deletion des Genclusters *pheA tyrA aroF* per P1_{kc}-Transduktionen aus dem Stamm F28 in F43 (*aroB*⁻

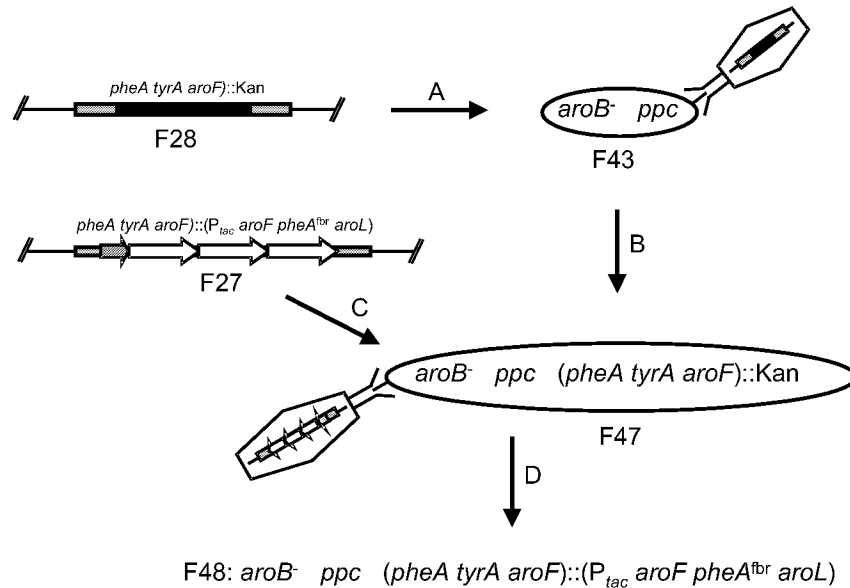


Abbildung 3.28: Schematische Darstellung der Konstruktion von Stamm F48 durch eine Reihe von P1-Transduktionen. A: Die an eine Kanamycin-Resistenzkassette gekoppelte Deletion der Gene *pheA tyrA aroF* aus F28 wurde per P1-Transduktion in F43 übertragen und ergab den Stamm F47 (B); C: Durch Infektion von F47 mit einem Phagenlysats aus F27 wurde die Deletion $\Delta(pheA\ tyrA\ aroF)::Kan$ gegen das Operon $\Delta(pheA\ tyrA\ aroF)::(P_{tac}\ aroF\ pheA^{fbr}\ aroL)$ ausgetauscht, der resultierende Stamm (D) wurde mit F48 bezeichnet

1996). Die Gene *pheA^{fbr}* und *aroL* waren für die weiteren Untersuchungen mit F48 nicht essentiell.

3.6.2 Fermentationsstrategie für den Stamm F48

Das *pyc*-Gen wurde auf dem Vektor pF36 in F48 eingebracht, der entsprechende Kontrollstamm erhielt den Leervektor pACYC*tac*. Zunächst wurde im kleinen Maßstab anhand des Wachstums überprüft, dass Pyc auch in F48 den *ppc*-Defekt supprimieren konnte. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.17 aufgeführt.

Pyruvatcarboxylase supprimierte auch in F48 den *ppc*-Defekt (Kap. 3.1.3), F48 wuchs nach Induktion der Pyc ohne Succinat mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle. Auch

Tabelle 3.17: Wachstum der Stämme F48/pF36 und F48/pACYC*tac* in 5 mL DSM-Vorkulturmedium (Tab. 2.11) mit den angegebenen Supplementen. Die Kulturen wurden 20 h bei 37°C geschüttelt, das Wachstum wurde qualitativ anhand der Trübung des Mediums ermittelt. Succ → Succinat (0,05 %), Phe → L-Phenylalanin, Tyr → L-Tyrosin, Trp → L-Tryptophan, Shk → Shikimat [je 40 mg/L], + → Wachstum, - → kein Wachstum.

Supplemente		Shk, Tyr	Shk, Tyr, Trp, Phe	Succ, Shk,Tyr
Induktion	IPTG	IPTG	IPTG	
F48/pF36	-	+	+	+
F48/pACYC <i>tac</i>	-	-	-	+

die Phenylalaninprototrophie (in Gegenwart von Shikimat) des Stamms F48 konnte bestätigt werden. Der Kontrollstamm mit Leerplasmid wuchs erwartungsgemäß nur nach Supplementierung mit Shikimat, Tyrosin und Succinat.

Das Wachstum von F48 mit bzw. ohne Pyc wurde im Schüttelkolben eingehender untersucht, um die optimale Kombination von Supplementen für die Fermentation zu erhalten. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.29 dargestellt.

Wurden nur Tyrosin und Shikimat supplementiert, war die exponentielle Wachstumsrate von F48/Pyc mit $0,22 \text{ h}^{-1}$ wesentlich geringer als unter Zusatz von allen drei aromatischen Aminosäuren und Shikimat ($\mu = 0,43 \text{ h}^{-1}$). Das langsame Wachstum ohne Phe könnte darauf hindeuten, dass die Aktivität der als zweites Gen (*pheA^{fbr}*) hinter den *tac*-Promotor eingebrachten Chorismat-Mutase/Prephenat-Dehydratase nicht ausreichend war. Eine Limitierung des Wachstums über die Verfügbarkeit von Shikimat wäre eine weitere Erklärung für das verlangsamte Wachstum von F48/pF36. Bei Kultivierung ohne Phenylalanin und Tryptophan mussten diese beiden Aminosäuren ausgehend von Shikimat synthetisiert werden, wofür die Shikimatmenge in diesem Ansatz möglicherweise nicht ausreichend war. Der Kontrollstamm mit Leerplasmid wuchs mit der gleichen exponentiellen Wachstumsrate wie der induzierte Pyc-Stamm, bildete allerdings nur halb so viel Biomasse wie der Pyc-Stamm.

Aufgrund der im Schüttelkolben erhaltenen Daten wurden dem Fermentationsmedium für F48 alle drei aromatischen Aminosäuren sowie Shikimat zugegeben, um ein mit dem

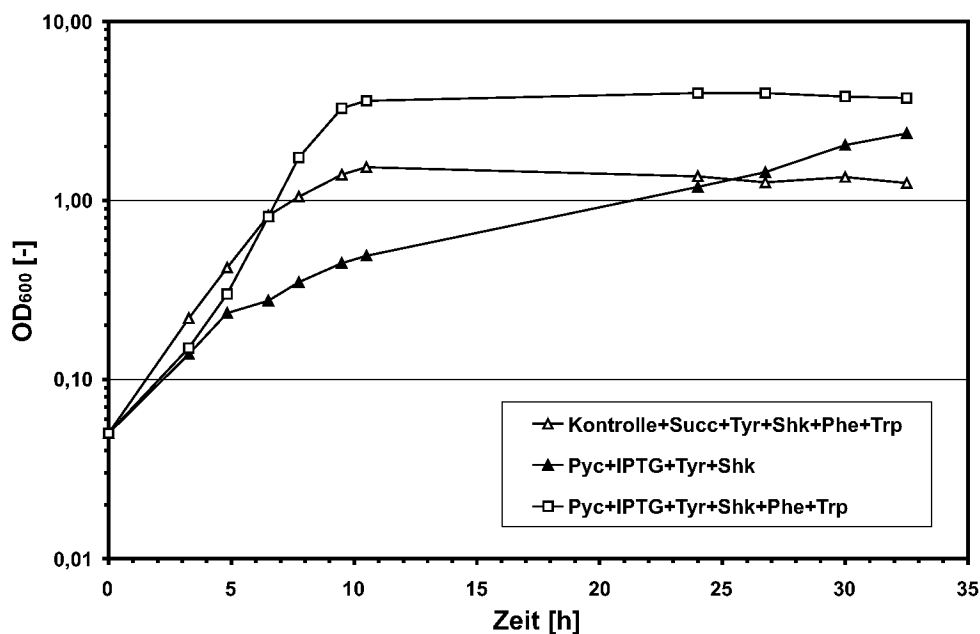


Abbildung 3.29: Wachstum der Stämme F48/pF36 (Pyc) und F48/pACYC*tac* (Kontrolle) im Schüttelkolben mit DSM-Vorkulturmedium (Tab. 2.11) unter Zusatz von IPTG [100 μ M], Succinat (Succ; 0,05 %), Phenylalanin (Phe), Tyrosin (Tyr), Tryptophan (Trp) und Shikimat (Shk) [je 40mg/L] (wenn angegeben). Vorkultur auf DSM-Vorkulturmedium mit Succ, Phe, Tyr, Trp, Shk.

von F5 (3.4.2) und F43 (3.5.3) vergleichbares Wachstum dieses Stamms im Fermenter zu erreichen. Wie für den Stamm F43 beschrieben (Kap. 3.5.2), musste auch F48 mit Succinat supplementiert werden, wenn Pyc nicht exprimiert wurde (Tab. 3.17).

3.6.3 Effekte der Pyc in einer *aroB* Δ *ppc*-Mutante mit dereguliertem AroF

Mit der in Kapitel 3.6.2 vorgestellten Fermentationsstrategie wurden Wachstum und Produktbildung von F48/pF36 und dem entsprechenden Kontrollstamm mit Leerplasmid (F48/pACYC*tac*) im begasten Rührkessel im Zulaufverfahren untersucht (Kap. 2.9). Durchgeführt wurden jeweils mindestens zwei unabhängige Kultivierungen.

Die Pyruvatcarboxylase konnte im Western Blot (Kap. 2.5.4) als biotinyliertes Protein mit einer molekularen Masse von 120 kDa im Rohextrakt (Kap. 2.6.1) von F48/pF36 mit

IPTG nachgewiesen werden. Ohne IPTG-Zugabe wurden nur sehr geringe Mengen Pyc detektiert. Der Kontrollstamm wies erwartungsgemäß kein biotinyliertes Protein mit der angegebenen Größe auf (Daten nicht gezeigt, vgl. Abb. 3.16).

Die Aktivität der Pyc im Stamm F48 anhand der TNB-Dianion-Bildung nachgewiesen, die Ergebnisse sind in Tabelle 3.18 aufgeführt. Aufgrund der signifikant höheren TNB^{2-} -Bildung (Kap. 2.8.2, III.) der permeabilisierten Zellen von F48 mit induzierter Pyc konnte auf die Aktivität des Enzyms auch nach 30 h Fermentation geschlossen werden. Ohne Induktor erfolgte unspezifische TNB^{2-} -Bildung im selben Maß wie durch den Kontrollstamm.

Tabelle 3.18: Nachweis der Pyc-Aktivität in permeabilisierten Zellen von F48/pF36 (Pyc) und F48/pACYC*tac* (Kontrolle) anhand der TNB^{2-} -Bildung im diskontinuierlichen Citratsynthase-gekoppelten Ansatz. Die Zellernte erfolgte nach 30 h Kultivierung im begasten Rührkessel mit den angegebenen Supplementen, gezeigt sind Mittelwerte aus je 2 unabhängigen Messungen. 100 % entsprachen einer TNB^{2-} -Konzentration von 0,07 mM.

Stamm	TNB^{2-} [μM]	[%]
Pyc + IPTG	$69,2 \pm 3,1$	$100 \pm 4,51$
Pyc + Succ	$14,9 \pm 1,0$	$21,57 \pm 1,50$
Pyc + IPTG + Succ	$50,9 \pm 6,3$	$73,54 \pm 9,17$
Kontrolle + Succ	$11,8 \pm 0,4$	$17,06 \pm 0,53$
Kontrolle + IPTG + Succ	$5,2 \pm 0,7$	$7,55 \pm 1,05$

Abbildung 3.30 zeigt Wachstum und DAH-Produktion von F48 mit bzw. ohne Pyc. Analog zur Fermentation von F43 (Kap. 3.5.3) wurden auch hier der Kontrollstamm sowie der nicht induzierte Pyc-Stamm mit Succinat supplementiert (Kap. 3.6.2), daher wurde auch dem induzierten Pyc-Stamm in einem Ansatz Succinat zugegeben. Die exponentiellen Wachstumsraten der Stämme sind in Tabelle 3.19 aufgeführt. Die Generationszeiten von F48 wurden durch die Expression von Pyc leicht verlängert, die Verdopplungszeiten der Stämme lagen zwischen 79 min (Kontrolle + Succ) und 90 min (Pyc + Succ). Die Biomassekonzentrationen nach 30 h lagen zwischen 6,3 g/L (Pyc + IPTG) und 7,5 g/L (Kontrolle + Succ), damit wurden die Anforderungen an ausreichende Biomassebildung erfüllt.

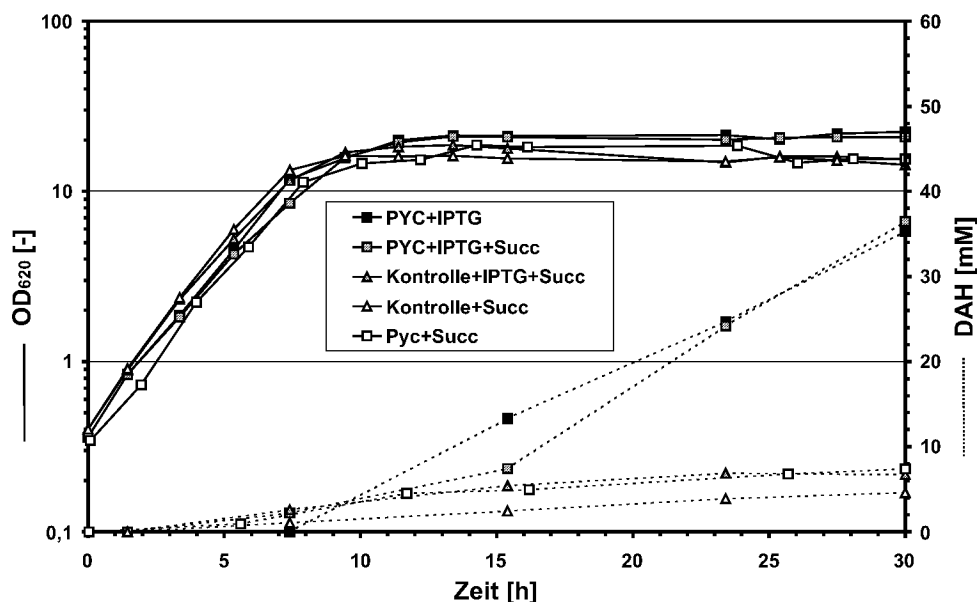


Abbildung 3.30: Wachstum und DAH-Konzentration im Überstand der Stämme F48/pF36 (Pyc) und F48/pACYCtac (Kontrolle) im begasten Rührkessel (Kap. 2.9). Zulaufbetrieb ab 8 h Fermentationszeit, Zugabe von 0,23 % Succinat wenn angegeben (Succ).

Die DAH-Produktion setzte gegen Ende der Wachstumsphase ein (Kap. 3.4.1). Alle Stämme bildeten DAH, somit waren die DAHP-Synthase-Isoenzyme nach Abschluss des Wachstums nicht mehr allosterisch inhibiert. Die Konzentrationen von DAH und Acetat im Überstand nach 30 h Fermentation sind in Tabelle 3.19 aufgelistet. Glutamat war das einzige weitere Produkt, das in den Überständen der Stämme mit den beschriebenen Methoden (Kap. 2.9.8 und 2.9.9) detektiert werden konnte. Aber nur F48/pF36 bildete nach Induktion mehr als 0,3 mM Glutamat. In den einzelnen Ansätzen des induzierten Pyc-Stamms wurden jedoch sehr unterschiedliche Glutamat-Konzentrationen zwischen 16 und 144 mM quantifiziert, daher kann für diesen Stamm ohne weitere Experimente keine weitere Aussage über den Einfluss der Pyc auf die Glutamatproduktion gemacht werden.

Die basale DAH-Produktion von F48 lag unter 10 mM. Die Induktion der heterologen Pyc steigerte die DAH-Bildung auf mehr als das Dreifache. Dagegen wurden nach Induktion des neuen anaplerotischen Stoffwechselweges weniger als 10 mM Acetat im Überstand von F48 gefunden, während die Kontrollen fast 30 Mal so viel Acetat gebildet haben. Wie schon beim Stamm F43 (Kap. 3.14) erfolgte die aerobe Acetatbildung auch in

Tabelle 3.19: Exponentielle Wachstumsraten und Produkt-Konzentration im Überstand der Stämme nach 30 h Fermentation im Zulaufverfahren, Prozessbedingungen siehe Abb. 3.30. Mittelwerte aus zwei unabhängigen Fermentationen.

Stamm	Ansatz	$\mu \left[\frac{1}{h}\right]$	DAH [mM]	Acetat [mM]
F48/pF36	IPTG	$0,47 \pm 0,03$	$30,86 \pm 6,28$	$8,44 \pm 0,41$
F48/pF36	Succinat	$0,46 \pm 0,01$	$7,81 \pm 0,81$	$319,39 \pm 5,06$
F48/pF36	IPTG, Succinat	$0,49 \pm 0,08$	$32,07 \pm 6,19$	$5,28 \pm 4,75$
F48/pACYC <i>tac</i>	Succinat	$0,53 \pm 0,09$	$6,73 \pm 3,04$	$286,73 \pm 67,31$
F48/pACYC <i>tac</i>	IPTG, Succinat	$0,48 \pm 0,09$	$7,94 \pm 1,71$	$269,88 \pm 80,09$

den mit Succinat supplementierten Ansätzen von F48. Die hohe Acetatkonzentration im Überstand trotz ausreichender Auffüllung des Citratzyklus mit C₄-Intermediaten ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die Reduktion der Acetatbildung durch Pyc nicht allein auf einer Verbesserung der Anaplerosis von *E. coli* beruhen konnte.

Der Kohlenstoffverbrauch von F48 mit bzw. ohne Pyc ist in Tabelle 3.20 aufgelistet, wobei das einigen Ansätzen zugesetzte und im Verlauf der Fermentation vollständig umgesetzte Succinat in die Kohlenstoffbilanz aufgenommen wurde. Durch die Induktion der Pyc verbrauchten die Stämme ein Drittel mehr Kohlenstoff als die Kontrollen.

Tabelle 3.20: Kohlenstoffverbrauch [mol] der Stämme in den jeweiligen Ansätzen in 30 h Fermentation. Prozessbedingungen siehe Abb. 3.30, Mittelwerte aus zwei unabhängigen Fermentationen, C₄ → Ansatz mit Succinat.

Stamm	Ansatz	Kohlenstoffverbrauch [mol]
F48/pF36	IPTG	$3,73 \pm 0,5$
F48/pF36	C ₄	$2,19 \pm 0,14$
F48/pF36	IPTG+C ₄	$3,12 \pm 0,86$
F48/pACYC <i>tac</i>	C ₄	$2,12 \pm 0,33$
F48/pACYC <i>tac</i>	IPTG+C ₄	$2,37 \pm 0,46$

Aufgrund des unterschiedlichen Kohlenstoffverbrauchs von F48 mit bzw. ohne Pyc wurde neben den Konzentrationen der Produkte im Überstand der Anteil am umgesetzten Kohlenstoff betrachtet, der sich im Kohlenstoffskelett des jeweiligen Produktes wiederfand.

Dieser wird durch die integralen, substratbezogenen Ausbeutekoeffizienten wiedergegeben (Kap. 3.3.2). In Tabelle 3.21 sind die ermittelten Ausbeutekoeffizienten aufgeführt.

Tabelle 3.21: Integrale, auf den verbrauchten Kohlenstoff bezogene Ausbeutekoeffizienten (mol $C_{Produkt}$ pro mol $C_{verbraucht}$) in [%] sowie Biomasseausbeute (g Biomasse pro g Glukose) in [%] von F48/pF36 (Pyc) und F48/pACYC*tac* (Kontrolle) in den jeweiligen Ansätzen. Fermentationsbedingungen siehe Abb. 3.30, Mittelwerte aus zwei unabhängigen Fermentationen, $C_4 \rightarrow$ Ansatz mit Succinat.

Stamm	Ansatz	DAH	Acetat	CO ₂	Biomasse
F48/pF36	IPTG	7,8±0,9	0,6±0	21,9±6	10,3±2,4
F48/pF36	IPTG+C ₄	10,0±0,6	0,4±0,3	21,11±1,7	13,8±3,5
F48/pACYC <i>tac</i>	IPTG+C ₄	3,5±1,5	31,5±1,9	15,1±1,3	12,3±4,8
F48/pF36	C ₄	3,2±0,2	38,1±3,1	15,9±1,5	15,5±8,2
F48/pACYC <i>tac</i>	C ₄	3,2±1,8	36,1±5,3	14,2±0,6	14,3±7,8

Während F5 etwa 10 % des verbrauchten Kohlenstoffs in Richtung Aromatenbiosynthese schleuste (Kap. 3.4.2, Tab.3.11), waren es bei F43 im Mittel 5 % (Kap. 3.5.3, Tab. 3.16). Im Stamm F48 gelangten 3,5 % des verbrauchten Kohlenstoffs in den Shikimisäureweg. Obwohl in F48 an Stelle des Wildtypallels eine Kopie der DAHP-Synthase (*aroF*) unter Kontrolle des IPTG-induzierbaren *tac*-Promotors (Kap. 3.6) chromosomal integriert wurde, wurde die basale DAH-Ausbeute von F48 im Vergleich mit F5 und F43 durch diese Maßnahme sogar reduziert. Wie bereits für F43 festgestellt, verdoppelte die Expression der heterologen Pyruvatcarboxylase den Kohlenstofffluss in die Aromatenbiosynthese von F48.

Im Mittel schieden die Kontrollen 15 % des verbrauchten Kohlenstoffs im Form von gasförmigem CO₂ aus. Durch Induktion der Pyc erhöhte sich dieser Wert auf über 20 %.

Effekte der Pyc auf die Biomasseausbeute von F48 ließen sich nicht feststellen. Dies könnte aber in der Limitierung der Biomassebildung über die aromatischen Supplemente begründet sein. Ausbeutekoeffizienten für Glutamat wurden aufgrund der unterschiedlichen Konzentrationen im Überstand von F48/pF36 mit IPTG (siehe oben) nicht berechnet.

Wurde Pyc in F48 exprimiert, konnte der Kohlenstofffluss in die Aromatenbiosynthese im Vergleich zur Kontrolle verdoppelt werden, auch die Kohlendioxidausbeute wurde um über 20 % erhöht. Der Kohlenstoffanteil, der in Form von Acetat ausgeschieden wurde, wurde dagegen durch Pyc signifikant verringert, obwohl durch den Einfluss der Pyc ein Drittel mehr Kohlenstoff umgesetzt wurde.

3.7 *In vitro* Nachweis der Pyruvatcarboxylase-Aktivität

Pyruvatcarboxylase (Pyc) katalysiert die ATP-abhängige Carboxylierung von Pyruvat zu Oxalacetat (OAA) (Scrutton und Young, 1972).



Pyc wurde als neue anaplerotische Reaktion in *E. coli* eingebracht. Neben dem Nachweis der Pyc-Aktivität *in vivo* durch Suppression eines PEP-Carboxylase-Defekts (Kap. 3.1.3) sollte die Pyc-Aktivität in *E. coli* auch *in vitro* gezeigt werden.

3.7.1 Entwicklung eines diskontinuierlichen Testsystems

Zum Nachweis der Aktivität von Pyc aus *C. glutamicum* in *E. coli* wurden zellfreie Extrakte (wie unter Kap. 2.6.2 beschrieben; Aufschlusspuffer 50 mM Tris/HCl pH 7,2 mit 1 mM DTT) von F43/pF36 (mit Pyc) sowie dem Kontrollstamm mit Leerplasmid (F43/pACYC*tac*) hergestellt (Kap. 3.5).

Da Peters-Wendisch (1996) eine Hemmung der Pyc durch Acetyl-CoA, einem Reaktanden des Citratsynthaseansatzes (Kap. 2.8.2, II.) beschrieben hat, wurde zunächst der kontinuierliche, Malatdehydrogenase (MDH) gekoppelte Test eingesetzt (Kap. 2.8.2, I.): Der Aktivitätsnachweis beruhte auf dem Umsatz des durch Pyc gebildeten Oxalacetats

zu Malat durch MDH, unter stöchiometrischer NADH-Oxidation. Mit diesem Test konnte jedoch lediglich unspezifischer NADH-Verbrauch mit einer Aktivität von bis zu 50 mU/mg Protein festgestellt werden. Dieser war zwar Pyruvat- jedoch nicht HCO_3^- - und MDH abhängig und trat außerdem sowohl beim Teststamm mit Pyc als auch beim Kontrollstamm mit Leerplasmid in Erscheinung. Da möglicherweise ein großer Teil des durch Pyc gebildeten Oxalacetats in Anwesenheit von 10 mM MgCl_2 spontan zu Pyruvat decarboxylierte (Meyer *et al.*, 1988), wurde die MgCl_2 -Konzentration im Ansatz auf 1 mM verringert. Allerdings konnte auch mit nur 1 mM MgCl_2 im Test keine Pyc-Aktivität in den Rohextrakten von F43/pF36 festgestellt werden.

Die Inhibierung der Pyc durch Acetyl-CoA wurde durch aktuelle Ergebnisse (P. Peters-Wendisch, persönliche Mitteilung) in Frage gestellt, weiterhin lagen keine gesicherten Erkenntnisse darüber vor, ob die *C. glutamicum*-Pyc Aktivität möglicherweise doch Acetyl-CoA abhängig ist, wie für viele Pyruvatcarboxylasen beschrieben (Scrutton und Young, 1972). Im nächsten Schritt wurde daher der kontinuierliche Ansatz mit Citratsynthase gewählt (Kap. 2.8.2, II.), in dem Acetyl-CoA enthalten ist. Das Nachweisprinzip ist die Umsetzung des in der Pyc-Reaktion gebildeten Oxalacetats mit Acetyl-CoA zu Citrat durch Citratsynthase. Das dabei freiwerdende Coenzym A reagiert mit DTNB und bildet ein molares Äquivalent des gelbgefärbten TNB-Dianions. Aber auch mit dem Citratsynthaseansatz konnte kein Nachweis der Pyc-Aktivität *in vitro* erbracht werden, es erfolgte lediglich unspezifische TNB^{2-} -Bildung von bis zu 30 mU/mg in Pyc-Stamm und Kontrolle. Möglicherweise wurde das Substrat Pyruvat zu Diacetyl umgesetzt, wobei ebenfalls Acetyl-CoA zu freiem Coenzym A umgesetzt wird. Diacetyl ist, wenn auch nur in geringen Mengen, ein Fermentationsprodukt von *E. coli* (Böck und Sawers, 1996).

Wie von Peters-Wendisch (1996) bereits beschrieben, schien die Pyc aus *C. glutamicum* in stark verdünnten Rohextrakten kaum nachweisbar zu sein. Möglicherweise war das Protein instabil, es könnten auch cytoplasmatische Effektoren gefehlt haben. Daher wurde der beschriebene, Citratsynthase-gekoppelte Test modifiziert und diskontinuierlich mit permeabilisierten Zellen durchgeführt (Kap. 2.7 und 2.8.2, III.). Das Prinzip wurde bereits beschrieben, der Aktivitätsnachweis erfolgte ebenfalls anhand der TNB^{2-} -Bildung, doch

aufgrund der durch die Zellsuspension hervorgerufenen starken Trübung konnte die photometrische Bestimmung des gebildeten TNB^{2-} erst nach dem Abtrennen der Biomasse erfolgen.

3.7.2 Abhängigkeit der Pyruvatcarboxylase-Aktivität von den Testkomponenten

Um nachzuweisen, dass die festgestellte TNB^{2-} -Bildung in den Ansätzen nicht unspezifisch, sondern durch die Aktivität der Pyc erfolgte, wurden die Stämme F43/pF36 (Pyc-Stamm) und F43/pACYC*tac* (Kontrolle) in Minimalmedium mit IPTG (Kap. 2.9.2) angezogen und nach der Ernte permeabilisiert (Kap. 2.7). Mit diesen Zellsuspensionen wurde der diskontinuierliche, Citratsynthase-gekoppelte Test (Kap. 2.8.2, III.) unter Auslassung einzelner Komponenten durchgeführt. Die Pyc-Aktivität wurde qualitativ nachgewiesen, die Reaktionsansätze wurden für 5 min bei 25°C inkubiert und die gebildete Menge TNB^{2-} anschließend photometrisch bestimmt, als Referenz diente dabei ein Ansatz ohne Zellen. In Abbildung 3.31 sind die Ergebnisse dargestellt.

Die bei permeabilisierten Zellen des Pyc-Stamms (F43/pF36) festgestellte TNB^{2-} -Bildung im diskontinuierlichen, Citratsynthase-gekoppelten Ansatz war offensichtlich auf die Aktivität der Pyc zurückzuführen. Fehlten einzelne Komponenten im Ansatz, wurden beim Pyc-Stamm nur maximal 54 % der TNB^{2-} -Bildung des „normalen“ Tests erreicht. Die Abhängigkeit der Reaktion von den Testkomponenten konnte somit gezeigt werden. Die TNB^{2-} -Produktion des Kontrollstamms repräsentierte den unspezifischen Umsatz im Test, im „normalen“ Ansatz mit allen Komponenten bildete dieser mit 41 % signifikant weniger TNB^{2-} als der Pyc-Stamm. Wurde der Test mit dem Kontrollstamm ohne einzelne Reaktanden durchgeführt, verringerte sich die TNB^{2-} -Bildung sogar noch. Der Pyc-Stamm setzte allerdings auch nach Weglassen einzelner Reaktanden mehr Substrat um als die entsprechenden Kontrollen. Möglicherweise waren in der dichten Zellsuspension noch endogenes Pyruvat, ATP oder HCO_3^- sowie Citratsynthase-Aktivität enthalten, welche in Kombination mit Pyc die TNB^{2-} -Bildung zur Folge hatten.

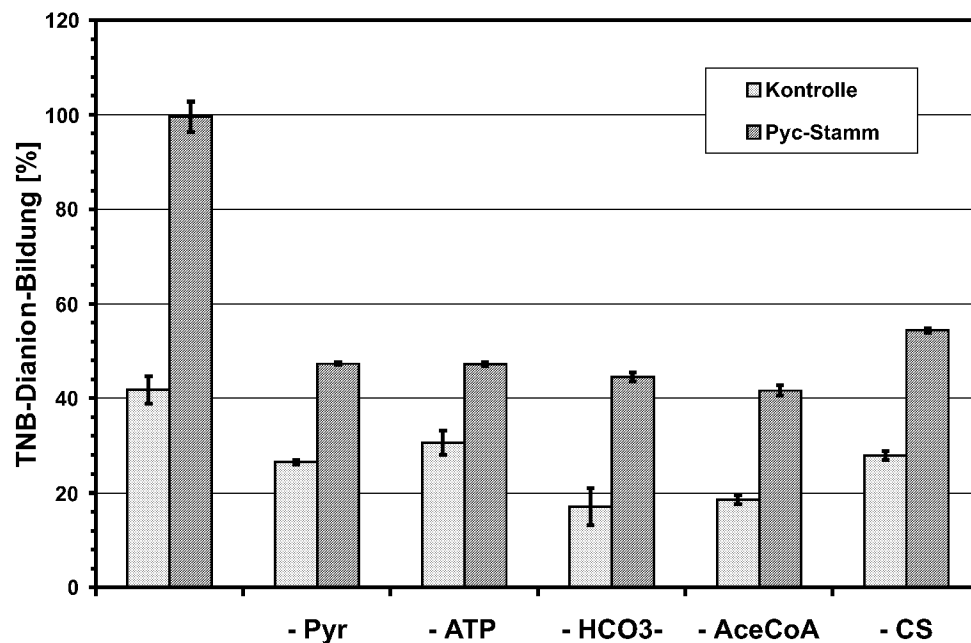


Abbildung 3.31: TNB²⁻-Bildung mit permeabilisierten Zellen von F43/pF36 (Pyc) und F43/pACYC*tac* (Kontrolle) im diskontinuierlichen, Citratsynthase-gekoppelten Test in Abhängigkeit von den Testkomponenten (in %), die genannte Komponente ist jeweils nicht im Ansatz enthalten. OD₆₀₀-Einheiten im Test = 10, gezeigt sind Mittelwerte aus je 3 unabhängigen Messungen. 100 % entsprachen einer TNB²⁻-Konzentration von 35 μ M. Pyr → Pyruvat, AceCoA → Acetyl Coenzym A, CS → Citratsynthase.

Mit dem modifizierten Citratsynthaseansatz und permeabilisierten Zellen konnte die Aktivität der Pyc aus *C. glutamicum* nach Expression in *E. coli* erstmals *in vitro* gezeigt werden, durch entsprechende Kontrollen konnte der Substratumsatz im Test eindeutig auf die Pyc zurückgeführt werden.

3.7.3 Aufnahme einer Pyruvatcarboxylase-Kinetik

Nachdem die TNB²⁻-Bildung im diskontinuierlichen, Citratsynthase-gekoppelten Ansatz (Kap. 2.8.2) auf die Aktivität der Pyc zurückgeführt werden konnte (Kap. 3.7.2), sollte die Aktivität des Enzyms in *E. coli* nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ bestimmt werden. Zur Aufnahme einer Pyc-Kinetik musste zunächst eine Möglichkeit zum schnellen und effizienten Abstoppen der Reaktion gefunden werden:

Durch Ansäuern (Zugabe von Trichloressigsäure, Endkonzentration im Ansatz 5 %) oder Alkalisieren (mit Natronlauge) wurden keine akzeptablen Resultate erzielt, ebenso wenig durch Hitzeinaktivierung der Enzyme (5 min, 95°C). Auch alternative Ansätze zur Abtrennung der Biomasse (Sterilfiltration, 0,2 μm Porengröße; Supor Acrodisc 25, Pall Gelman) führten nicht zum Erfolg. Die schnelle Abkühlung der Ansätze in flüssigem Stickstoff mit anschließender Separation der Biomasse bei 4°C stellte sich schließlich als beste Möglichkeit zum Stoppen der Reaktion heraus (Daten nicht gezeigt).

Weiterhin wurde untersucht, ob sich die Extinktion bei 412 nm (E_{412}) nach Abtrennen der Biomasse verändert. Hierfür wurde E_{412} in Proben direkt nach der Zentrifugation sowie nach 10 min Inkubation der zellfreien Überstände bei RT (20°C) bestimmt: Es zeigte sich kein Unterschied der E_{412} in den Proben, somit ist nach Abtrennen der Biomasse die TNB^{2-} -Bildung unterbunden (Daten nicht gezeigt).

Die Zellmenge im Test musste im Hinblick auf die Aufnahme kinetischer Daten modifiziert werden, da die bisher zur qualitativen Bestimmung der Pyc-Aktivität eingesetzten 10 OD_{600} -Einheiten (Abb. 3.31) einen vollständigen Substratumsatz innerhalb von weniger als 1 min zur Folge hatten. Auch eine Reduktion der Zellmenge auf 2 und auch 1 OD_{600} -Einheit im Test lieferte keinen zufriedenstellenden Resultate, da der Substratumsatz immer noch in weniger als 30 sek erfolgte. Eine Zellmenge von 0,5 OD_{600} -Einheiten stellte sich als optimal für eine Pyc-Kinetik heraus, da eine lineare Zunahme der E_{412} über mehr als eine Minute festgestellt wurde. Wie in Kap. 2.8.2 beschrieben, wurden die permeabilisierten Zellen zum Testmix gegeben, bei 25°C für 2 min vorinkubiert und die Reaktion durch Zugabe von Pyruvat gestartet. Als Referenz dienten, anders als bei der qualitativen Aktivitätsbestimmung beschrieben (Kap. 3.7.2), Ansätze ohne Pyruvat. Die resultierende Pyc-Kinetik ist in Abbildung 3.32 aufgezeichnet.

Mit Hilfe der erstellten linearen Regressionsgeraden konnte die Extinktionszunahme (ΔE_{412}) pro Minute in den Pyc-Ansätzen berechnet werden, während in den Kontrollen keine signifikante Zunahme der E_{412} erfolgte. Über ΔE_{412} pro Minute wurde die Aktivität der Pyc in permeabilisierten Zellen von *E. coli* F39 nach Gleichung 2.6 (Kap. 2.8.2) berechnet: Es ergab sich eine absolute Pyc-Aktivität von 21 mU/mL Bezogen auf die eingesetzten OD_{600} -Einheiten von 0,5 ergab sich eine Pyc-Aktivität von 42 mU/OD.

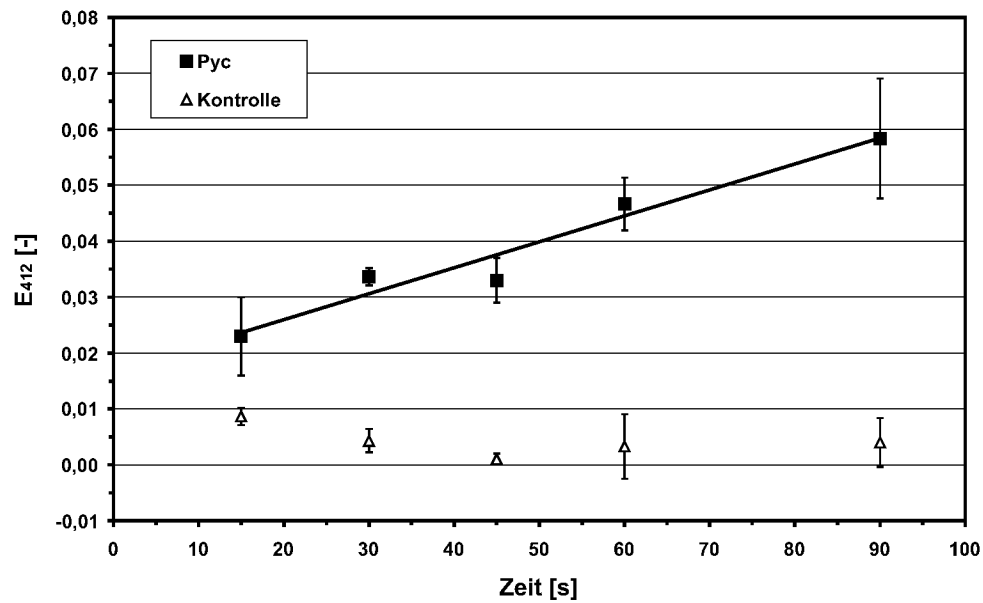


Abbildung 3.32: Zeitabhängige Extinktionszunahme (E_{412}) im diskontinuierlichen, Citratsynthase-gekoppelten Ansatz (Kap. 2.8.2) mit permeabilisierten Zellen von F39/pF36 (Pyc) sowie F39/pACYC*tac* (Kontrolle) nach Anzucht in Minimalmedium (Tab. 2.11) mit IPTG. OD_{600} -Einheiten im Test = 0,5, gezeigt sind Mittelwerte aus je 3 unabhängigen Messungen.

Bezogen auf das eingesetzte Trockengewicht (TG) der Zellen (0,165 mg; nach Gleichung 2.7 in Kap.2.9.6) wurde eine spezifische Aktivität von 127 mU/mg TG ermittelt. Unter der Annahme, dass etwa 55 % des Trockengewichts von *E. coli* aus Protein besteht (Neidhardt *et al.*, 1990), wurde eine spezifische Aktivität von 231 mU/mg berechnet. Damit war die Aktivität der unter Kontrolle des *tac*-Promotors in *E. coli* exprimierten Pyc ungefähr doppelt so hoch wie in *C. glutamicum* (Peters-Wendisch, 1996).

Kapitel 4

Diskussion

Der Stoffwechsel der Zelle erfüllt mehrere Funktionen wie beispielsweise die Bereitstellung von Vorläufermetaboliten für Zellbestandteile und die Gewinnung von Energie für Biosynthesen. In katabolischen Prozessen wird die Kohlenstoffquelle zu einer limitierten Zahl von niedermolekularen Vorläufermetaboliten abgebaut, die in den anabolischen Reaktionen zu den benötigten Polymeren zusammengesetzt werden. Katabolische Stoffwechselwege führen in den Zentralstoffwechsel, anabolische Reaktionen entstehen hieraus. Der Zentralstoffwechsel von *E. coli* stellt damit die wichtigste Drehscheibe für die Verteilung von Kohlenstoffflüssen auf die verschiedenen metabolischen Routen dar. Anaplerotische Reaktionen haben ebenfalls eine essentielle Bedeutung für den Zentralstoffwechsel, durch sie wird der Tricarbonsäurezyklus wieder mit Intermediaten aufgefüllt, welche für Biosynthesen von Zellbausteinen abgezogen wurden (Kornberg, 1966). Die zentralen Metabolite am Knotenpunkt zwischen Biosynthesen und Katabolismus sind Phosphoenolpyruvat (PEP) aus der Glykolyse und Oxalacetat (OAA) im Zitronensäurezyklus. Bei Wachstum auf Glukose erfolgt in *E. coli* die Auffüllung des Tricarbonsäurezyklus allein durch Carboxylierung von PEP zu Oxalacetat über die PEP-Carboxylase (Ppc) (Gottschalk, 1985).

In der vorliegenden Arbeit wurde mit der heterologen Pyruvatcarboxylase (Pyc) aus *Corynebacterium glutamicum* eine neue anaplerotische Reaktion in *E. coli* eingebracht. Pyc katalysiert die Synthese von Oxalacetat durch ATP-abhängige Carboxylierung von Pyruvat (Scrutton und Young, 1972). Durch Einbringen von Pyruvatcarboxylase wurde in

E. coli eine neue Verbindung zwischen den Metaboliten Pyruvat und Oxalacetat und somit zwischen Glykolyse und Tricarbonsäurezyklus hergestellt. Die heterologe Pyruvatcarboxylase in *E. coli* kann direkt (Pyr, OAA) oder indirekt (PEP, AcetylCoA) die Verfügbarkeit von vier der zwölf Vorläufermetabolite beeinflussen (siehe Abb. 3.10, Kap. 3.2.1), aus denen nach Neidhardt *et al.* (1990) alle Bausteine, Coenzyme und prosthetischen Gruppen in einer Zelle synthetisiert werden (Tab. 4.1). Die Expression der Pyc bedeutet daher einen nicht unerheblichen Eingriff in den Stoffwechsel von *E. coli* mit möglichen Konsequenzen auf verschiedenen Ebenen.

Tabelle 4.1: Vorläufermetabolite in *E. coli* nach Neidhardt *et al.* (1990). Die Metabolite, deren Verfügbarkeit durch die Expression der Pyruvatcarboxylase beeinflusst werden könnte, sind mit einem * markiert.

Glukose-6-Phosphat	Fruktose-6-Phosphat
Ribose-5-Phosphat	Erythrose-4-Phosphat
Triosephosphat	3-Phosphoglycerat
Phosphoenolpyruvat*	Pyruvat*
AcetylCoA*	α -Ketoglutarat
SuccinylCoA	Oxalacetat*

Nachdem die Aktivität der Pyc in *E. coli* gezeigt worden war, konnten die Auswirkungen des neuen anaplerotischen Stoffwechselweges in *E. coli* untersucht werden. Dazu wurde Pyc sowohl als zweite anaplerotische Reaktion in den *E. coli*-Wildtyp eingebracht als auch in *ppc*-Mutanten exprimiert. Um die Effekte der Pyc auf verschiedenen Ebenen im Stoffwechsel zu erfassen, wurden Wachstum und Produktbildung von rekombinanten Pyc-Stämmen unter reproduzierbaren Prozessbedingungen untersucht. Die Auswirkungen der neuen anaplerotischen Reaktion auf das Wachstum der Zellen, die Kohlenstoffflüsse und die Verfügbarkeit von PEP werden im folgenden diskutiert.

4.1 Pyruvatcarboxylase aus *C. glutamicum* ist in *E. coli* funktionell aktiv

Von einer Reihe von Autoren war bereits versucht worden, die Aktivität der Pyruvatcarboxylase in zellfreien Extrakten von *C. glutamicum* nachzuweisen [Gubler *et al.* (1994), Jetten *et al.* (1994), Peters-Wendisch (1996)]. Die Herstellung zellfreier Extrakte des Gram-positiven Bakteriums *C. glutamicum* erfordert stärkere mechanische Kräfte als sie zum Aufschluss von *E. coli* nötig sind. Es war vermutet worden, dass Pyc aus *C. glutamicum* durch die mechanische Belastung beim Zellaufschluss inaktiviert wurde oder dem Enzym im stark verdünnten Rohextrakt cytoplasmatische Effektoren fehlten (Peters-Wendisch, 1996). Im Rahmen dieser Arbeit wurden Rohextrakte von *E. coli* mit rekombinanter Pyc hergestellt. Nach dem Zellaufschluss per Ultraschall gelang der Nachweis der Aktivität von Pyc aus *C. glutamicum* auch in zellfreien Extrakten von *E. coli* nicht (Kap. 3.7.1).

Diese vermutete Instabilität des Pyc-Proteins zeigte sich auch im Western-Blot (Kap. 3.3.2, Abb. 3.16). Möglicherweise fehlen in *E. coli* spezifische Chaperone zur Stabilisierung des heterologen Proteins. Allerdings waren auch in Western-Blots von zellfreien Extrakten aus *C. glutamicum* charakteristische zusätzliche Banden zu erkennen, die auf die Instabilität der Pyc selbst in diesem Stamm hinweisen (P. Peters-Wendisch, persönliche Mitteilung).

Da es aber essentiell für die weiteren Untersuchungen war, die Funktionalität des heterologen Proteins in *E. coli* nachzuweisen, wurde ein System zur Bestimmung der Pyc-Aktivität *in vivo* entwickelt. Dazu wurde das *pyc*-Gen in eine *E. coli*-Mutante mit defektem PEP-Carboxylase-Gen eingebracht. PEP-Carboxylase stellt die einzige anaplerotische Reaktion von *E. coli* bei Wachstum auf Glukose dar (Gottschalk, 1985). Nach Deletion des PEP-Carboxylase-Gens war die *E. coli*- Δppc -Mutante bei Wachstum mit Glukose auf eine Supplementierung mit C₄-Intermediaten angewiesen (Kap. 3.1.2, Abb. 3.5 und 3.6), wie von Chao und Liao (1993) bereits beschrieben worden war. Diese Abhängigkeit der *ppc*-Mutanten von Succinat zeigte, dass bei Wachstum auf Glukose der Glyoxylatzyklus

nicht aktiv war und auch durch PEP-Carboxykinase keine Auffüllung des TCA-Zyklus erfolgen konnte.

Es war bereits gezeigt worden, dass der Phänotyp einer Hefe mit defekter Pyruvatcarboxylase durch PEP-Carboxylase aus *E. coli* komplementiert werden konnte (Flores und Gancedo, 1997). In der vorliegenden Arbeit wurde der umgekehrte Fall untersucht: Die Suppression des Phänotyps einer PEP-Carboxylase-Mutante von *E. coli* durch Pyruvatcarboxylase aus *C. glutamicum*, um die Aktivität der Pyc nachzuweisen. Es wurde gezeigt, dass der Δppc -Stamm F39 durch Pyc wieder in der Lage war, auf Minimalmedium mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen (Kap. 3.1.3, Abb. 3.7). Diese Suppression des Ppc-Defektes durch Pyc war IPTG-abhängig, erst ab einer Induktorkonzentration von 100 μ M erfolgte Wachstum in Flüssigkultur (Kap. 3.1.4, Abb. 3.8). Der verwendete Vektor wies zwar einen basalen Expressionslevel auf, da das biotinylierte Pyc-Protein auch in Rohextrakten von nicht-induzierten Stämmen per Western-Blot in geringen Mengen nachgewiesen werden konnte (Kap. 3.3.2, Abb. 3.16), offensichtlich reichte aber die gebildete Proteinmenge nicht aus, um einer Δppc -Mutante Wachstum zu ermöglichen.

Die Aktivität der Pyruvatcarboxylase aus *C. glutamicum* in *E. coli* konnte somit nachgewiesen werden, da Pyc die PEP-Carboxylase als anaplerotische Reaktion in *E. coli* ersetzen konnte. Dabei erfolgte keine Beeinträchtigung des Wachstums der Bakterien, die Δppc -Mutante mit induzierter Pyc wuchs in Minimalmedium mit Glukose genau so schnell wie der Wildtyp (siehe Tabelle 4.2). Die parallel zu dieser Arbeit veröffentlichten Ergebnisse von Gokarn *et al.* (2001) bestätigen die vorliegenden Untersuchungen: Es war gezeigt worden dass auch das *pyc*-Gen aus *R. etli* einen *ppc*-Defekt in *E. coli* supprimieren konnte, allerdings wurden keine Angaben zu den Wachstumsraten dieser Stämme gemacht (Gokarn *et al.*, 2001) (siehe Tabelle 4.2).

Pyruvatcarboxylase ist eine Biotin-abhängige Carboxylase, sie trägt Biotin als prosthetische Gruppe (Attwood, 1995). Die meisten Pyruvatcarboxylasen bestehen aus vier Untereinheiten, von denen jede über eine Amidbindung an einem Lysinrest mit einem Biotinmolekül verbunden ist, so dass pro mol Pyc vier mol Biotin benötigt werden (Scrutton und Young, 1972). Im *E. coli*-Wildtyp trägt nur die Biotin-Carboxyl-Carrier-Protein (BCCP)-Untereinheit der AcetylCoA Carboxylase Biotin als prosthetische Gruppe (Li

Tabelle 4.2: Exponentielle Wachstumsraten von *E. coli*-Wildtyp und *ppc*-Mutanten mit heterologem *pyc*-Gen bei aerober Kultivierung in Schüttelkolben mit MM, Glukose und IPTG. k.A. → keine Angaben, *C.g.* → *Corynebacterium glutamicum*

Referenz	Gokarn <i>et al.</i> (2001)	Gokarn <i>et al.</i> (2001)	diese Arbeit	diese Arbeit
Stamm	MG1655	JCL1242 (<i>ppc</i> ⁻)	LJ110	LJ110 Δ <i>ppc</i>
<i>pyc</i> aus	<i>R. etli</i>	<i>R. etli</i>	<i>C. g.</i>	<i>C. g.</i>
μ [h ⁻¹]	0,48	k.A.	0,60	0,60

und Cronan, 1992). Für die zusätzliche posttranslationale Modifikation der heterologen Pyruvatcarboxylase musste *E. coli* daher wesentlich mehr Biotin zur Verfügung stellen. *E. coli* ist Biotin-prototroph, die Synthese der prosthetischen Gruppe ist jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt. Die meisten Gene für die Biotinbiosynthese sind im Biotin-Operon lokalisiert, die Synthese erfolgt über das Zwischenprodukt Pimeloyl-Coenzym A (Demoll, 1996). Das *birA*-Genprodukt aus dem Biotin-Operon hat dabei in *E. coli* eine Doppelfunktion, es fungiert als Biotin-Holoenzym-Synthetase und als Repressor des Biotinoperons. Biotinoyl-5'-AMP dient als Co-Repressor, der die Bindung von BirA an die DNA auslöst (Chapman-Smith und Cronan Jr., 1999).

Die Suppression des Phänotyps der Δ *ppc*-Mutante von *E. coli* durch Pyruvatcarboxylase wurde bereits bei der geringsten untersuchten Biotinkonzentration erreicht, einer Supplementierung mit 5 μ g/L Biotin (Kap. 3.1.6, Abb. 3.9). Dies zeigt, dass die Biotin-Protein-Ligase BirA von *E. coli* in der Lage war, auch die heterologe Pyruvatcarboxylase aus *C. glutamicum* zu biotinylieren. Allerdings wurde die Kapazität der Biotinbiosynthese von *E. coli* durch die Biotinylierung der vier Untereinheiten der Pyruvatcarboxylase zusätzlich zur BCCP-Untereinheit der AcetylCoA Carboxylase offenbar überschritten.

Diese Ergebnisse wurden durch Untersuchungen von Gokarn *et al.* (2001) bestätigt, in denen gezeigt worden war, dass auch Pyc aus *R. etli* in *E. coli* bei einem Überangebot von Biotin im Vollmedium biotinyliert wurde. Dabei war die chromosomale Kopie des *birA*-Gens ausreichend, durch Überexpression von *birA* war die Menge an biotinylierter Pyc nicht erhöht worden (Gokarn *et al.*, 2001). Die Expression eines mit Biotin fusionierten Ratten-Neurotensin-Rezeptors in *E. coli* war dagegen nur durch Co-Expression von

BirA und Biotinkonzentrationen von über 2 mg/L möglich (Tucker und Grisshammer, 1996). Von Smith *et al.* (1998) war ein Expressionssystem zur *in vivo*-Biotinylierung von Thioredoxin-Biotin-Fusionsproteinen in *E. coli* entwickelt worden, in welchem der verwendete Vektor das *birA*-Gen enthielt und zusätzlich 10 mg/L Biotin supplementiert werden mussten.

Anhand der exponentiellen Wachstumsrate der *E. coli ppc*-Mutante mit Pyruvatcarboxylase als einziger anaplerotischer Reaktion konnte auf eine Mindestaktivität der Pyc von über 80 mU/mg geschlossen werden (Kap. 3.1.5). Mit Hilfe des in dieser Arbeit entwickelten diskontinuierlichen Tests konnte die *in vivo*-Aktivität der Pyc in permeabilisierten Zellen von *E. coli* bestimmt werden. In Tabelle 4.3 sind Pyruvatcarboxylase-Aktivitäten in verschiedenen Stämmen aufgelistet.

Tabelle 4.3: Spezifische Aktivität der Pyruvatcarboxylase in verschiedenen Stämmen. Die gezeigten Aktivitäten wurden jeweils in induzierten Kulturen ermittelt. *C.g.* → *Corynebacterium glutamicum*

Mikroorganismus	<i>pyc</i> aus	Plasmid	mU/mg	Referenz
<i>C. glutamicum</i>	<i>C.g.</i>	-	20	Peters-Wendisch <i>et al.</i> (2001)
<i>C. glutamicum</i>	<i>C.g.</i>	pVWEx1- <i>pyc</i>	202	Peters-Wendisch <i>et al.</i> (2001)
<i>E. coli</i>	<i>R. etli</i>	pUC18- <i>pyc</i>	60	Gokarn <i>et al.</i> (1998)
<i>E. coli</i>	<i>R. etli</i>	pTrc99A- <i>pyc</i>	220	Gokarn <i>et al.</i> (2001)
<i>E. coli</i>	<i>C.g.</i>	pACYC <i>tac-pyc</i>	231	diese Arbeit

In dieser Arbeit konnte sowohl *in vivo* als auch *in vitro* gezeigt werden, dass Pyc aus *C. glutamicum* unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors in *E. coli* funktionell aktiv ist. Diese Aktivität der Pyc in *E. coli* ist abhängig vom Induktor IPTG, die posttranslationale Modifikation von einer Supplementierung mit Biotin. Die in dieser Arbeit ermittelten Aktivitäten der heterologen Pyc in *E. coli* liegen im Bereich der bereits veröffentlichten Daten für die Aktivität von Pyc bei Expression unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors.

4.2 Einfluss von Pyruvatcarboxylase auf das Wachstum von *E. coli*

Von Gokarn *et al.* (1998) war für *E. coli* mit Pyruvatcarboxylase aus *Rhizobium etli* eine im Vergleich zur Kontrolle mit Leerplasmid um 15 % erhöhte Biomasseproduktionsrate bei anaerober Kultivierung gezeigt worden. Bei späteren Untersuchungen war jedoch kein Einfluss von verschiedenen Induktorkonzentrationen auf die Wachstumsrate eines *E. coli*-Wildtyps mit plasmidkodierter Pyc aus *R. etli* festgestellt worden, allerdings wurden keine Daten für einen entsprechenden Kontrollstamm mit Leerplasmid gezeigt (Gokarn *et al.*, 2001). Die Wachstumsrate von *Salmonella typhimurium* war durch Pyc aus *R. etli* unter anaeroben Bedingungen sogar im Vergleich zum Wildtyp um 18 % verringert worden, diskutiert wurde als Ursache die metabolische Belastung der Zellen durch das verwendete Expressionssystem (Xie *et al.*, 2001). In Untersuchungen mit einer Mutante von *E. coli* mit Defekten in den Genen der Pyruvat-Formiat-Lyase (*pfl*) und Lactatdehydrogenase (*ldh*), in welche Pyc aus *R. etli* eingebracht worden war, war beschleunigtes Wachstum durch die zusätzliche anaplerotische Reaktion sowohl bei aerober als auch anaerober Kultivierung gezeigt worden (Vemuri *et al.*, 2002). Durch die genannten Mutationen war jedoch Pyruvat im genannten Stamm angehäuft worden, welches durch die Expression von Pyc abgebaut worden war (Vemuri *et al.*, 2002). Daher lassen sich die Ergebnisse von Vemuri *et al.* (2002) nicht ohne weiteres auf einen *E. coli*-Wildtyp übertragen.

In Tabelle 4.4 sind die exponentiellen Wachstumsraten und Biomasseausbeutekoeffizienten der in dieser Arbeit im Fermenter untersuchten Pyc-Stämme und der entsprechenden Kontrollen mit Leerplasmid aufgelistet.

Die exponentielle Wachstumsrate des *E. coli*-Wildtyps F1 wurde durch die Expression der Pyruvatcarboxylase nicht verändert, Pyc-Stamm und Kontrollen wuchsen mit annähernd gleichen Raten. Die exponentielle Wachstumsrate von *E. coli* F1 wurde möglicherweise durch andere Faktoren als die Effizienz der Anaplerosis limitiert, zum Beispiel durch die Atmungsrate (Andersen und von Meyenburg, 1980) oder die Geschwindigkeit der Bausteinsynthese (Holms, 1996). Dass eine Steigerung der anaplerotischen Flüsse das Wachstum nicht beschleunigt, war auch von Chao und Liao (1993) und Farmer und Liao

Tabelle 4.4: Exponentielle Wachstumsrate μ und Biomasseausbeutekoeffizient $Y_{X/S}$ der Pyc-Stämme (mit Plasmid pF36) und Kontrollen mit Leerplasmid (pACYCtac) bei aerober Kultivierung im begasten Rührkessel. WT $\rightarrow$ Wildtyp, C₄ $\rightarrow$ Zusatz von Succinat.

Stamm	Genotyp	μ [h ⁻¹]	$Y_{X/S}$ [g/g]	Ansatz
F1/pF36	WT	0,60±0,01	0,28±0,02	IPTG
F1/pACYCtac	WT	0,58±0,01	0,30±0,02	IPTG
F5/pF36	<i>aroB</i> ⁻	0,59±0,03	0,13±0,01	IPTG
F5/pACYCtac	<i>aroB</i> ⁻	0,55±0,03	0,13±0,04	IPTG
F43/pF36	<i>aroB</i> ⁻ Δppc	0,44±0,04	0,17±0,02	IPTG, C ₄
F43/pACYCtac	<i>aroB</i> ⁻ Δppc	0,53±0,01	0,13±0,05	IPTG, C ₄
F48/pF36	<i>aroB</i> ⁻ Δppc P _{tac} - <i>aroF</i>	0,49±0,08	0,14±0,04	IPTG, C ₄
F48/pACYCtac	<i>aroB</i> ⁻ Δppc P _{tac} - <i>aroF</i>	0,48±0,09	0,12±0,05	IPTG, C ₄

(1997) gezeigt worden: Das Wachstum der untersuchten *E. coli*-Stämme war durch die Überexpression der PEP-Carboxylase nicht beeinflusst worden.

Eine Steigerung der Biomasseausbeute des *E. coli*-Wildtyps F1 durch Pyc aus *C. glutamicum* wurde in der vorliegenden Arbeit nicht verzeichnet. Für *E. coli* MG1655 war dagegen gezeigt worden, dass durch Expression der Pyc aus *R. etli* der Biomasseausbeutekoeffizient im Schüttelkolben von 0,18 g/g auf 0,28 g/g gesteigert werden konnte (Gokarn *et al.*, 2001). Die in dieser Arbeit mit dem Kontrollstamm F1/pACYCtac erreichten Biomasseausbeuten lagen durch die optimalen Kultivierungsbedingungen im Fermenter bereits bei 0,28 g/g und wurden auch durch eine mögliche Steigerung der anaplerotischen Flüsse durch Pyc nicht weiter erhöht.

Bei Wachstum auf der Kohlenstoffquelle Lactat wuchs der *E. coli*-Wildtyp mit Pyruvatcarboxylase aus *C. glutamicum* 2,5 mal schneller als der Kontrollstamm (Kap. 3.3.3, Abb. 3.19). Es ist bekannt, dass *E. coli* auf Lactat mit wesentlich geringeren Wachstumsraten als auf Glukose wächst (Andersen und von Meyenburg, 1980). Bei Wachstum auf C₃-Kohlenstoffquellen muss *E. coli* neben der Auffüllung des TCA-Zyklus auch die Synthese von Glukose und deren Derivaten sicherstellen, dabei scheint die Aktivität der benötigten glukoneogenen Enzyme suboptimal zu sein. Es war gezeigt worden, dass durch moderate

Überexpression der PEP-Synthase (Pps) in *E. coli* die Wachstumsrate auf Pyruvat gesteigert werden konnte (Chao *et al.*, 1993). Der Wachstumsvorteil des *E. coli*-Wildtyps durch Pyruvatcarboxylase könnte darin begründet gewesen sein, dass Pyruvatcarboxylase die Synthese des benötigten Oxalacetats direkt ausgehend vom Pyruvat ermöglichte, ohne dass die im Kontrollstamm nötigen Zwischenschritte über PEP-Synthase und PEP-Carboxylase erforderlich waren. Dieser Schritt war auch energetisch günstiger, denn durch die Carboxylierung von Pyruvat wurde nur eine energiereiche Phosphatbindung benötigt, während die glukoneogene Umwandlung von Pyruvat zu PEP zwei Phosphatbindungen beansprucht (Gottschalk, 1985).

Die exponentielle Wachstumsrate der *E. coli aroB*-Mutante F5 entsprach der Wachstumsrate des Wildtyps F1 und wurde durch die Expression von Pyruvatcarboxylase nicht signifikant beeinflusst. Wie bereits für den Wildtyp F1 diskutiert war die Wachstumsrate der Zellen möglicherweise durch andere Faktoren limitiert.

Im Stamm F43 war zusätzlich zur Inaktivierung des Gens der 3-Dehydroquinat-Synthase (*aroB*) das Gen der PEP-Carboxylase (*ppc*) deletiert worden. F43 war auf eine Supplementierung mit Succinat angewiesen, wenn nicht Pyruvatcarboxylase als neue anaplerotische Reaktion exprimiert wurde. Dieser Stamm wuchs trotz Succinatsupplementierung geringfügig langsamer als F5. Die Ursache für das verlangsamte Wachstum von F43 könnte in der Kombination von *aroB*-Defekt und Pyruvatcarboxylase-Expression liegen. Im Stamm F48 wurde zusätzlich zu den Defekten von *aroB* und *ppc* das Gen einer DAHP-Synthase (*aroF*) unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors exprimiert und somit die Eingangsreaktion der Aromatenbiosynthese dereguliert (Kap. 3.6.1). F48 wuchs trotz der möglichen metabolischen Belastung durch die zusätzlichen Expression von AroF nicht langsamer als F43.

Die Biomasseausbeutekoeffizienten von F5, F43 und F48 wurden durch die Expression der Pyruvatcarboxylase nicht signifikant beeinflusst. Im Gegensatz zum Wachstum des Wildtyps F1 war die Biomassebildung der Stämme F5, F43 und F48 durch die Verfügbarkeit der aromatischen Supplemente begrenzt (Kap. 3.4.1). Durch diese Limitierung kamen eventuelle Effekte der Pyruvatcarboxylase möglicherweise gar nicht zum Tragen, weil das Wachstum der Zellen nach dem vollständigen Umsatz der Supplemente stagnieren musste.

Allerdings waren die Biomasseausbeutekoeffizienten von F5, F43 und F48 geringer als die des Wildtyps F1 bei Wachstum auf Glukose. Dies könnte darin begründet sein, dass der Wildtyp aus der verbrauchten Glukose lediglich Biomasse und wenig Acetat bildete. Die *aroB*-Mutanten F5, F43 und F48 dagegen setzten die Glukose neben Biomasse auch zu den jeweiligen Produkten (DAH, Acetat, Glutamat) um.

In dieser Arbeit wurde festgestellt, dass Pyruvatcarboxylase in *E. coli* bei aerober Kultivierung in Minimalmedium mit Glukose keine Auswirkungen auf Wachstumsrate und Biomassebildung hat, weder als zweite anaplerotische Reaktion noch in *ppc*-Mutanten. Bei Wachstum auf der glukoneogenen Kohlenstoffquelle Lactat wird das Wachstum eines *E. coli*-Wildtyps dagegen durch Pyc beschleunigt.

4.3 Einfluss der Pyruvatcarboxylase auf den Glukoseverbrauch von *E. coli*

Durch die Aktivität der Pyruvatcarboxylase als zusätzlicher anaplerotischer Reaktion in *E. coli* wird Oxalacetat ausgehend von Pyruvat synthetisiert. Daher wird möglicherweise weniger PEP benötigt, um über PEP-Carboxylase den TCA-Zyklus aufzufüllen. Die PEP-Verfügbarkeit könnte in *ppc*-Mutanten mit Pyruvatcarboxylase als einziger anaplerotischer Reaktion sogar noch gesteigert sein, wenn nur noch Pyruvat als Vorläufer von Oxalacetat bereit steht (Kap. 4.7). Neben der PEP-Verfügbarkeit könnte auch das PEP/Pyruvat-Verhältnis in *E. coli* durch Expression der Pyc erhöht werden. Von Saier und Chin (1990) war postuliert worden, dass dieses Verhältnis von PEP zu Pyruvat einer der Faktoren ist, welche die Glukoseaufnahmerate durch das Phosphotransferasesystem determiniert. Es war bereits gezeigt worden, dass eine Überexpression der PEP-Carboxylase die Glukoseaufnahmerate verringerte, indem sie möglicherweise das PEP/Pyruvat-Verhältnis verminderte (Chao und Liao, 1993). Die Überexpression der PEP-Synthetase in *E. coli* dagegen hatte eine vermehrte Glukoseaufnahme durch Erhöhung des PEP/Pyruvat-Verhältnisses zur Folge (Patnaik *et al.*, 1992).

Ein Einfluss von Pyc aus *R. etli* auf die Glukoseaufnahme von *E. coli* war von Gokarn *et al.* (1998) gezeigt worden, im Vergleich zum Wildtyp wurde die Glukoseaufnahmerate im Stamm mit plasmidkodierter Pyc um 14 % gesteigert. Allerdings war die Zuckeraufnahme schon allein durch das eingebrachte Leerplasmid um 10 % erhöht worden (Gokarn *et al.*, 1998). In einer späteren Untersuchung waren bei einem *E. coli*-Wildtyp mit eingebrachtem *pyc*-Gen aus *R. etli* bei verschiedenen IPTG-Konzentrationen keine Effekte auf den Glukoseverbrauchsrate festgestellt worden, allerdings ohne Daten für einen Kontrollstamm mit Leerplasmid zu nennen (Gokarn *et al.*, 2001). Wurde Pyc aus *R. etli* dagegen in *S. typhimurium* exprimiert, war die Glukoseaufnahmerate um 40 % vermindert worden (Xie *et al.*, 2001).

Die absolute Glukoseverbrauchsrate in der exponentiellen Wachstumsphase des in dieser Arbeit untersuchten *E. coli*-Wildtyps F1 wurde durch Induktion der Pyc nicht verändert, sie betrug knapp 2 g/L*h sowohl im Pyc-Stamm als auch in der Kontrolle mit Leerplasmid (Kap. 3.3.2, Tab. 3.6). Damit lag der Glukoseverbrauch von F1 in der exponentiellen Phase etwas unter den von Gokarn *et al.* (1998) ermittelten Werten von 2,2 g/L*h, die allerdings unter anaeroben Bedingungen und gegen Ende einer satzweisen Fermentation ermittelt worden waren. Der spezifische Glukoseumsatz von etwas weniger als 10 mmol_{Glukose}/g_{Biomasse}*h von Pyc-Stamm und Kontrolle stimmten mit den von Gokarn *et al.* (2001) im Schüttelkolben ermittelten Daten überein.

Die absoluten und spezifischen Glukoseverbrauchsrate in der exponentiellen Wachstumsphase der *E. coli aroB*-Mutante F5 sowie der *aroB Δppc*-Doppelmutante F43 wurden durch die Expression der heterologen Pyruvatcarboxylase ebenfalls nicht beeinflusst (Kap. 3.4.2, Tab. 3.9; Kap. 3.5.3, Tab. 3.15). Allerdings wurde durch Pyc der Gesamtkohlenstoffverbrauch aller untersuchten *aroB*-Mutanten erhöht, wie in Abbildung 4.1 dargestellt. Pyruvatcarboxylase steigerte somit den Substratverbrauch der Stämme in der stationären Phase, was möglicherweise auf ein erhöhtes PEP/Pyruvat-Verhältnis zurückzuführen war. Mögliche Ursachen für eine erhöhte PEP-Verfügbarkeit in *E. coli* durch Pyc werden in Kap. 4.7 diskutiert.

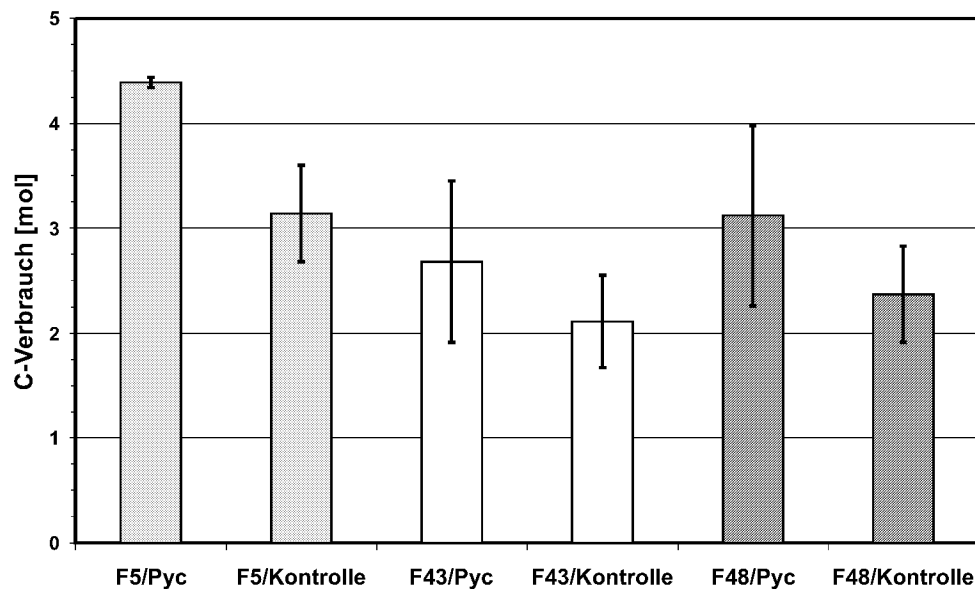


Abbildung 4.1: Gesamt-Kohlenstoffverbrauch der untersuchten *E. coli aroB*-Mutanten mit bzw. ohne heterologe Pyruvatcarboxylase nach 30 h Fermentation im begasteten Rührkessel (Zulaufverfahren). Ansätze: F5 mit IPTG, F43 und F48 mit IPTG und Succinat. Pyc → pF36, Kontrolle → pACYC*tac*

Der verstärkte Substratumsatz in *E. coli* im Zuge der Pyc-Expression diene vermutlich nicht zur Deckung des gesteigerten ATP-Bedarfs der Zelle durch die ATP-abhängige Carboxylierung von Pyruvat zu Oxalacetat durch Pyc (Scrutton und Young, 1972). Es war festgestellt worden, dass sich die ATP-Ausbeute einer *E. coli ppc*-Mutante nach Expression von Pyc aus *R. etli* nicht von der ATP-Ausbeute des *E. coli*-Wildtyps unterschied (Gokarn *et al.*, 2000).

In bisherigen Untersuchungen zu den Effekten von Pyruvatcarboxylase in *E. coli* waren die Kultivierungen in Schüttelkolben durchgeführt worden, in denen allen Stämmen gleich viel Glukose zur Verfügung stand und nur Unterschiede in den Glukoseverbrauchsraten feststellbar waren [Gokarn *et al.* (1998), Gokarn *et al.* (2000), Gokarn *et al.* (2001)]. Der Einfluss der Pyruvatcarboxylase auf den Gesamt-Glukoseverbrauch von *E. coli* wurde bisher noch nicht untersucht. Erst durch die dem Schüttelkolben überlegene Fermentationstechnik in dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass die Expression der heterologen Pyruvatcarboxylase den Substratumsatz von *E. coli aroB*-Mutanten im Mittel um 30 % erhöht.

4.4 Einfluss der Pyruvatcarboxylase auf die CO₂-Produktion von *E. coli*

Mit der Expression der Pyruvatcarboxylase verfügte *E. coli* über zwei anaplerotische Reaktionen, über die Kohlendioxid fixiert werden konnte. Ein gegenläufiger Effekt war die möglicherweise gesteigerte Effizienz des Citratzyklus, die mit einer vermehrten Produktion von CO₂ gekoppelt sein könnte.

In Abbildung 4.2 sind die CO₂-Ausbeutekoeffizienten der in dieser Arbeit in begasten Rührkesseln untersuchten *E. coli*-Stämme dargestellt. Wurde Pyruvatcarboxylase im Wildtyp F1 exprimiert, wurde die CO₂-Produktion des Stamms durch die zusätzliche anaplerotische Reaktion nicht signifikant beeinflusst. Der CO₂-Ausbeutekoeffizient des *aroB*-negativen DAH-Produzenten F5 ohne Pyc wies sehr große Abweichungen vom Mittelwert auf. Somit ließen sich aus den vorhandenen Daten keine Aussagen über eventuelle Effekte der Pyc auf die CO₂-Produktion ableiten. F5 oxidierte ungefähr ein Drittel des aufgenommenen Kohlenstoffs zu CO₂, damit war die CO₂-Bildung dieses Stamms höher als die des Wildtyps F1, welcher knapp 20 % des Substrates zu CO₂ umsetzte. Dies könnte möglicherweise an den unterschiedlichen Fermentationsbedingungen von F1 und F5 gelegen haben. Während F1 im Satzverfahren aus dem Substrat nur Biomasse bildete, hatte F5 auch nach Abschluss des Wachstums noch Glukose zur Verfügung.

Dass die CO₂-Produktion durch Pyruvatcarboxylase als zusätzlicher anaplerotischer Reaktion in *E. coli* nicht beeinflusst worden war, wurde möglicherweise durch eine geringere PEP-Carboxylase-Aktivität in Gegenwart von Pyruvatcarboxylase verursacht. Es war bereits gezeigt worden, dass bei Expression von Pyc aus *R. etli* die PEP-Carboxylase-Aktivität in *E. coli* signifikant abnahm [Gokarn *et al.* (1998), Gokarn *et al.* (2001)]. Die Abnahme der Ppc-Aktivität durch Pyc könnte möglicherweise durch die verringerte Verfügbarkeit des allosterischen Aktivators der Ppc, AcetylCoA [Canovas und Kornberg (1965), Morikawa *et al.* (1980)], begründet sein. Ohne den Effektor AcetylCoA sinkt die Affinität der PEP-Carboxylase zum Substrat PEP signifikant (Izui *et al.*, 1981). Die Expression der Pyc in *E. coli* hat möglicherweise einen verringerten Kohlenstofffluss über

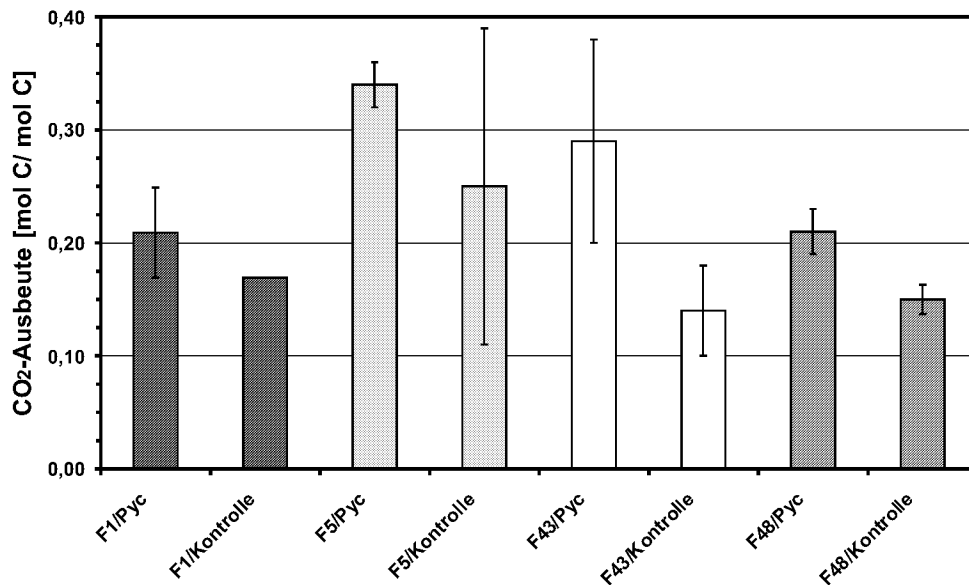


Abbildung 4.2: CO₂-Ausbeutekoeffizient der untersuchten *E. coli*-Stämme mit bzw. ohne heterologe Pyruvatcarboxylase nach Fermentation im begasten Rührkessel. Die Stämme F5-F48 wurden im Zulaufverfahren kultiviert. Ansätze: F1 und F5 mit IPTG, F43 und F48 mit IPTG und Succinat. Pyc → pF36, Kontrolle → pACYC_{tac}

Phosphotransacetylase und Acetatkinase zur Folge, so dass AcetylCoA vermehrt an Oxalacetat gebunden wurde, erkennbar an der Reduktion der Acetatbildung durch Pyc (Kap. 4.6). Somit wurde eventuell durch die Aktivität der Pyc neben der Ppc nicht mehr CO₂ fixiert als im Wildtyp mit nur einer anaplerotischen Funktion.

Da bei Expression der Pyc von F5 auch signifikant mehr Glutamat produziert wurde (Kap. 4.5), wäre es weiterhin denkbar, dass der TCA-Zyklus durch Pyc den Kohlenstoff nicht effizienter oxidierte, sondern überschüssige Metabolite in Richtung Glutamat schleuste. Wie aus Abbildung 4.5 hervorgeht, entsteht bei der Bildung von Glutamat stöchiometrisch CO₂. Anhand der CO₂-Produktion ließen sich somit keine Effekte der Pyc auf die anaplerotischen Flüsse oder die Effizienz des TCA-Stoffwechsels machen. Um festzustellen, wie hoch die Anteile der beiden anaplerotischen Reaktionen in *E. coli* sind, müssten beispielsweise die Stoffflüsse in ¹³C-Markierungsexperimenten quantifiziert werden. Die Bestimmung anaplerotischer Flüsse in *C. glutamicum* mittels ¹³C-Isotopomerenanalyse ist beschrieben worden [Marx (1997), Petersen (2001)].

In F43, der *aroB ppc*-Doppelmutante von LJ110, stand Pyruvatcarboxylase als einzige anaplerotische Funktion zur Verfügung. Auch für diesen Stamm ließen sich aufgrund der großen Abweichungen vom Mittelwert keine gesicherten Aussagen über Pyc-Effekte auf die CO₂-Bildung machen, wenn auch eine tendenzielle Erhöhung des CO₂-Ausbeutekoeffizienten durch Pyc erkennbar war. Diese Steigerung der CO₂-Ausbeute durch Pyc wurde beim Stamm F48 bestätigt, der CO₂-Ausbeutekoeffizient wurde in diesem Stamm durch Expression der Pyruvatcarboxylase um über 20 % erhöht. Möglicherweise wurde der Fluss in Richtung TCA-Stoffwechsel und damit die CO₂-Bildung durch die vermehrte Bereitstellung von Oxalacetat durch Pyc erhöht.

Während für die Stämme F5 und F43 die Abweichungen vom Mittelwert keine Aussagen über die Effekte von Pyc auf die CO₂-Produktion erlauben, konnte gezeigt werden, dass Pyc die CO₂-Produktion einer *aroB ppc*-Doppelmutante mit deregulierter Eingangsreaktion in die Aromatenbiosynthese um 20 % erhöht. Ob diese Steigerung der CO₂-Bildung an die ebenfalls signifikant erhöhte Glutamatproduktion gekoppelt ist, muss noch untersucht werden.

4.5 Einfluss der Pyruvatcarboxylase auf die Glutamatproduktion von *E. coli*

Die Aminosäure Glutamat wird aus α -Ketoglutarat gebildet, einem Intermediat des TCA-Zyklus (Gottschalk, 1985) (Kap. 3.2.1, Abb. 3.10). *Corynebacterium glutamicum* ist als Produzent von Aminosäuren wie L-Glutamat und L-Lysin bekannt (Leuchtenberger, 1996). Es war bereits gezeigt worden, dass die Überexpression der Pyruvatcarboxylase in *C. glutamicum* die Glutamatproduktion um mehr als das siebenfache steigern konnte (Peters-Wendisch *et al.*, 2001). Pyruvatcarboxylase spielt somit eine entscheidende Rolle bei der Glutamatproduktion von *C. glutamicum*.

Nach Expression der Pyruvatcarboxylase aus *C. glutamicum* in *E. coli* produzierten die rekombinanten Bakterien signifikante Mengen Glutamat. In Abbildung 4.3 sind die

Glutamatkonzentrationen im Überstand der untersuchten *aroB*-Mutanten von *E. coli* dargestellt.

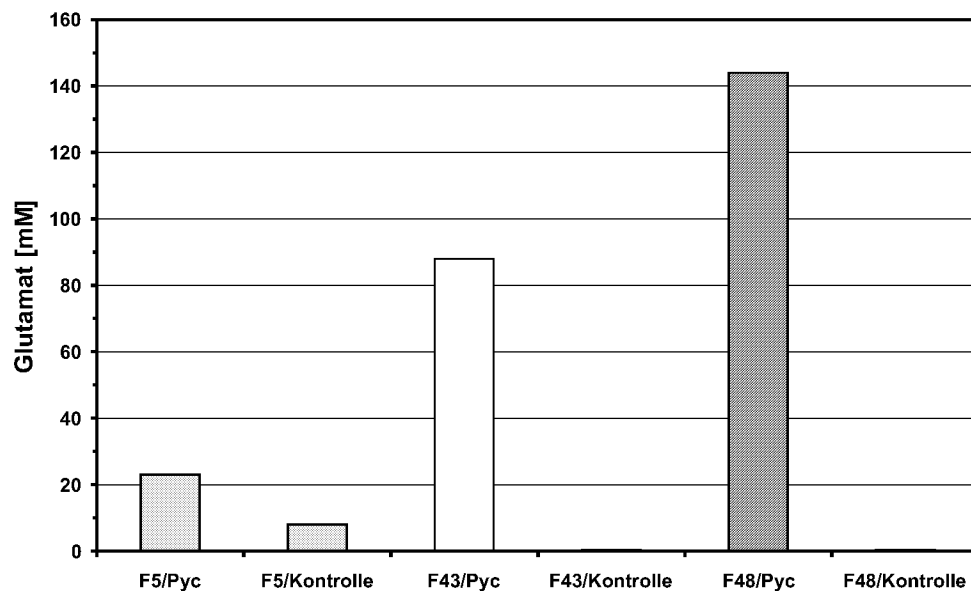


Abbildung 4.3: Glutamatkonzentrationen im Überstand der untersuchten *E. coli aroB*-Mutanten mit bzw. ohne heterologe Pyruvatcarboxylase nach 30 h Fermentation im begasten Rührkessel im Zulaufverfahren. Ansätze: F5 mit IPTG, F43 und F48 mit IPTG und Succinat. Pyc → pF36, Kontrolle → pACYC*tac*

Die *aroB*-Mutante F5 bildete nach Induktion der Pyc mehr als doppelt so viel Glutamat wie der Kontrollstamm. In der *aroB ppc*-Doppelmutante F43 war Pyc die einzige anaplerotische Reaktion, die Induktion der Pyc in diesem Stamm hatte eine signifikante Steigerung der Glutamatproduktion zur Folge. Die Supplementierung mit Succinat bewirkte dagegen keine Steigerung der Glutamatproduktion, beim Kontrollstamm fand sich weniger als 1 mM Glutamat im Überstand. Der Kohlenstoffanteil, welcher von F43 ohne Pyc zu Acetat umgewandelt wurde, wurde durch Expression der Pyc in Richtung Glutamat geschleust. Auch im Stamm F48 bewirkte die Expression der Pyruvatcarboxylase eine signifikante Steigerung der Glutamatproduktion.

Die Bildung von Glutamat nach Expression der anaplerotischen Pyruvatcarboxylase deutet auf einen gesteigerten Fluss in Richtung TCA-Zyklus hin. Bei aerobem Wachstum auf Glukose wird der Hauptteil der benötigten Energie durch die Glykolyse unter Beteiligung des TCA-Zyklus gewonnen, unter diesen Bedingungen konnte keine α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Aktivität nachgewiesen werden (Park *et al.*, 1997). Möglicherweise ist

somit der Anteil des Kohlenstoffs, der durch den zyklisch geschlossenen TCA-Stoffwechsel geschleust wird, stark reduziert. Denkbar wäre auch eine Kombination aus einem hauptsächlich zweischenkligen TCA-Stoffwechsel, wie er in Abbildung 4.4 gezeigt ist (Cronan Jr. und LaPorte, 1996), mit Kohlenstoffflüssen in noch unbekannter Höhe über die zyklisch geschlossene Form.

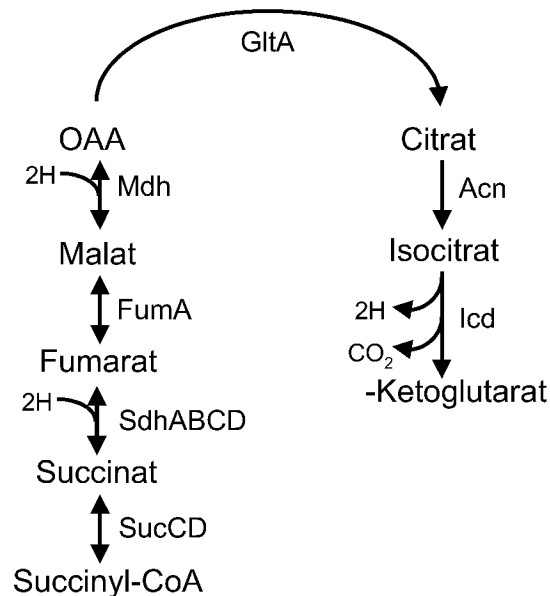


Abbildung 4.4: Aufspaltung des Tricarbonsäurezyklus in einen reduktiven und oxidativen Zweig bei aerobem Wachstum auf Glukose nach Cronan Jr. und LaPorte (1996). GltA → Citratsynthase, Acn → Aconitase, Icd → Isocitratdehydrogenase, Mdh → Malatdehydrogenase, FumA → Fumarase, SdhABCD → Succinatdehydrogenase, SucCD → Succinatthiokinase.

Da der durch Pyc vermehrt in Richtung TCA-Stoffwechsel fließende Kohlenstoff aus genannten Gründen nicht vollständig zu CO_2 oxidiert werden konnte, wurde er in Form von Glutamat ausgeschieden. Allerdings entsteht bei der Bildung von Glutamat netto ein Molekül CO_2 , wie aus Abbildung 4.5 hervorgeht. Beim *E. coli*-Stamm F48 war der CO_2 -Ausbeutekoeffizient aus noch unbekannter Ursache parallel zur Steigerung der Glutamatproduktion durch Pyc erhöht (Abb. 4.2).

Die Produktion von Glutamat war auch bei einer *E. coli pta*-Mutante beobachtet worden (Chang *et al.*, 1999). Durch die Inaktivierung der Phosphotransacetylase wurde AcetylCoA nicht mehr zu Acetat umgesetzt (Kap. 1, Abb. 1.3), sondern war über den TCA-Stoffwechsel abgebaut worden, wo der zusätzliche Kohlenstoff in Form von Glutamat

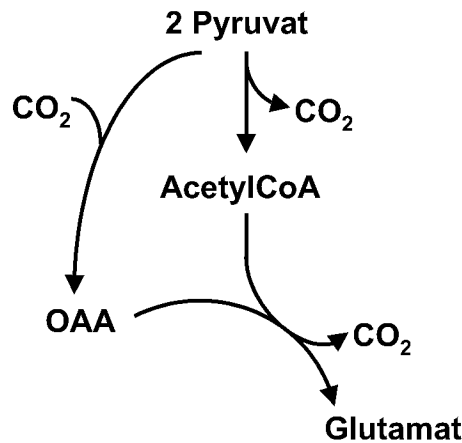


Abbildung 4.5: Netto-Produktion von 1 mol CO₂ pro mol gebildetem Glutamat in *E. coli ppc*-Mutanten mit Pyc als einziger anaplerotischer Reaktion.

ausgeschieden worden war (Chang *et al.*, 1999). Die Bildung von anderen, aus dem TCA-Stoffwechsel abgeleiteten Amino- oder organischen Säuren (Kap. 3.2.1, Abb. 3.10) war von Chang *et al.* (1999) nicht festgestellt worden.

Auch bei den in dieser Arbeit untersuchten Stämmen wurde nur Glutamat im Überstand detektiert. Aspartat, Lysin oder Isoleucin waren nicht nachweisbar, auch Malat, Fumarat oder Succinat nicht. Die Aktivität der Citratsynthase ist bei Wachstum auf Glukose nicht limitierend (Cronan Jr. und LaPorte, 1996). Daher wurde das durch Pyruvatcarboxylase generierte Oxalacetat über Citratsynthase möglicherweise direkt in den oxidativen Zweig des TCA-Stoffwechsels geschleust, so dass abgeleitete Produkte aus dem reduktiven Zweig nicht akkumulierten. Der Kohlenstofffluss über die zyklisch geschlossene Form des TCA-Stoffwechsels war möglicherweise zu gering, um eine Akkumulation der genannten Produkte zur Folge zu haben.

Die Expression der Pyruvatcarboxylase als zweiter anaplerotischer Reaktion neben der PEP-Carboxylase verdoppelte die Glutamatproduktion von einer *E. coli aroB*-Mutante, was auf einen verstärkten Kohlenstofffluss in Richtung TCA-Stoffwechsel hindeutet. Pyc als einzige anaplerotische Reaktion in den *ppc*-Mutanten F43 und F48 bewirkte eine Steigerung der Glutamatproduktion um das 80 bis 100fache, ein Drittel des aufgenommenen Kohlenstoffs wurde in Richtung Glutamat geschleust. Ob in diesen Stämmen der Fluss in

Richtung TCA-Stoffwechsel höher ist als mit PEP-Carboxylase und Pyruvatcarboxylase zusammen, bleibt noch zu untersuchen.

4.6 Einfluss von Pyruvatcarboxylase auf die Acetatbildung von *E. coli*

Die aerobe Acetatbildung wird als Ungleichgewicht zwischen Substrataufnahme und Bedürfnissen der Zelle für Biosynthesen und Energieproduktion aufgefasst (El-Mansi und Holms, 1989) und erfolgt ausgehend von Pyruvat über AcetylCoA und Acetylphosphat (Kap. 1, Abb. 1.3). Es war bereits bekannt, dass ein gesteigerter Kohlenstofffluss in Richtung Tricarbonsäurezyklus durch Überexpression der PEP-Carboxylase die aerobe Acetatbildung von *E. coli* signifikant reduzieren konnte [Chao und Liao (1993), Farmer und Liao (1997)]. In dieser Arbeit wurde durch Expression der Pyruvatcarboxylase aus *C. glutamicum* eine neue anaplerotische Reaktion in *E. coli* eingebracht, die direkt in den Pyruvatstoffwechsel der Zelle eingriff und sich ebenfalls auf die Acetatproduktion von *E. coli* auswirkte.

Von Gokarn *et al.* (2001) waren parallel zu dieser Arbeit Untersuchungen mit Pyruvatcarboxylase aus *R. etli* in *E. coli* durchgeführt worden. Dabei war gezeigt worden, dass die aerobe Acetatproduktion von *E. coli* in Schüttelkolben durch Pyc aus *R. etli* um 43 % vermindert werden konnte (Gokarn *et al.*, 2001). Bei diesen Untersuchungen war von 0,6 g/L Biomasse des Kontrollstamms *E. coli* MG1655 ohne Pyc eine Acetatbildung von 0,8 g/L erzielt worden (Gokarn *et al.*, 2001).

Auf die Acetatproduktion des *E. coli*-Wildtyps F1 hatte die Expression der Pyruvatcarboxylase aus *C. glutamicum* keinen Einfluss (Kap. 3.3.2, Tab. 3.8). Die Bakterien wurden in begasten Rührkesseln kultiviert, dadurch konnte auch bei höheren Biomassekonzentrationen eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Zellen gewährleistet werden (Kap. 3.2.3). Während der Fermentation wurden über 5 g/L Biomasse gebildet, die Acetatkonzentration im Überstand der Stämme betrug nach 13 h Kultivierung 0,45 g/L.

Diese geringe Acetatbildung des *E. coli*-Wildtyps war vermutlich auf die optimale Sauerstoffversorgung der Bakterien zurückzuführen. Die Zellen konnten ihre respiratorischen Kapazitäten voll ausschöpfen und waren nicht auf die Acetatproduktion zur zusätzlichen ATP-Generierung angewiesen (Andersen und von Meyenburg, 1980). In der vorliegenden Arbeit wurden somit allein durch die veränderten Kultivierungsbedingungen pro g Biomasse wesentlich weniger Acetat gebildet als bei Gokarn *et al.* (2001) beschrieben. Ein eventueller Einfluss der Pyc kam somit unter den genannten Bedingungen gar nicht erst zum Tragen.

Die *E. coli aroB*-Mutanten F5, F43 und F48 wurden ebenfalls im begasten Rührkessel kultiviert, allerdings im Gegensatz zum Wildtyp F1 nicht im Satz- sondern im Zulaufverfahren. Dabei wurde nach Abschluss des Wachstums noch Substrat zugegeben, die Prozesszeit war mit 30 h wesentlich länger als beim Wildtyp. Die Acetatausbeutekoeffizienten der in dieser Arbeit untersuchten *E. coli aroB*-Mutanten sind in Abbildung 4.6 dargestellt. Bei allen untersuchten *aroB*-Mutanten erfolgte eine signifikante Reduktion der aeroben Acetatbildung durch Pyc.

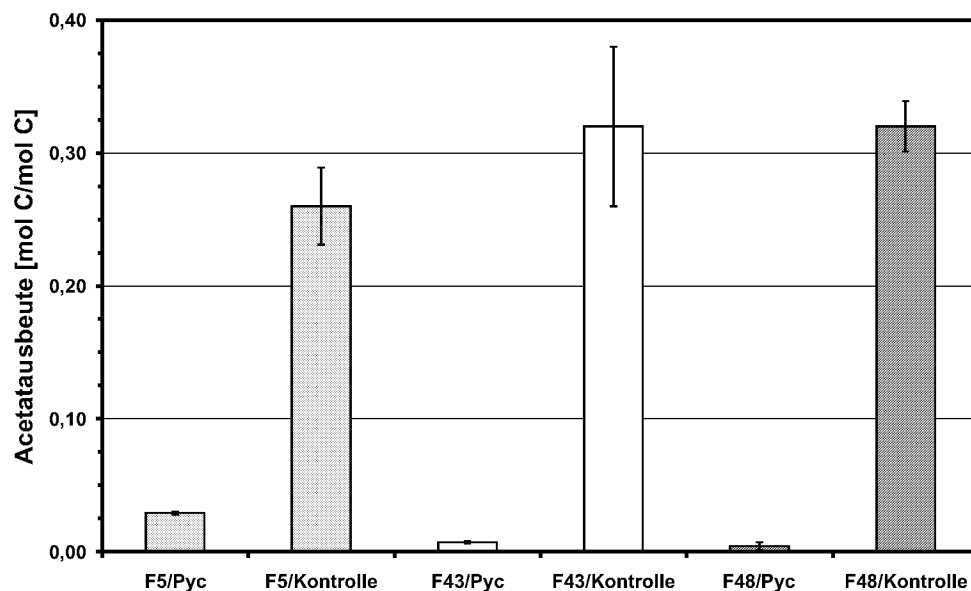


Abbildung 4.6: Acetatausbeutekoeffizienten der untersuchten *E. coli aroB*-Mutanten mit bzw. ohne heterologe Pyruvatcarboxylase nach 30 h Fermentation im begasten Rührkessel im Zulaufverfahren. Ansätze: F5 mit IPTG, F43 und F48 mit IPTG und Succinat. Pyc → pF36, Kontrolle → pACYC*tac*

Da Pyruvatcarboxylase in den Stämmen F43 und F48 die einzige anaplerotische Reaktion darstellte, waren die entsprechenden Kontrollstämmen nicht in der Lage, auf Glukose ohne zusätzliches Succinat zu wachsen (Kap. 3.5.2, Abb. 3.25; Kap. 3.6.2). Trotz Supplementierung mit Succinat, welches die Auffüllung des TCA-Zyklus mit Oxalacetat sicherstellte, produzierten diese Stämme sehr viel Acetat. Diese hohe Acetatbildung trotz ausreichend verfügbarem Oxalacetat deutete darauf hin, dass die Reduktion der aeroben Acetatbildung durch Pyc in *E. coli* nicht allein auf der erhöhten Verfügbarkeit des Akzeptors für AcetylCoA aus der Glykolyse beruhen konnte. Für *Bacillus subtilis* konnte dagegen gezeigt werden, dass durch Citrat als Cosubstrat die Acetatbildung bei Wachstum auf Glukose verhindert werden konnte, möglicherweise in Folge einer Reduktion der Flüsse durch die Pyruvatkinasen [Goel *et al.* (1995), Lee *et al.* (1997)].

Die Ursachen für die Reduktion der aeroben Acetatbildung von *E. coli* durch Pyruvatcarboxylase liegen möglicherweise in der Konkurrenz von Pyruvatcarboxylase und Pyruvatdehydrogenasekomplex (PDH) um das Substrat Pyruvat. Es war bereits gezeigt worden, dass das Einbringen einer heterologen Konkurrenzreaktion für PDH die Acetatbildung verringern konnte: Durch die Expression von Pyruvatdecarboxylase (PDC) und Alkoholdehydrogenase (ADH) aus *Zymomonas mobilis* in *E. coli* wurde das Pyruvat statt über PDH zu Acetyl-Coenzym A und weiter zum Acetat umgesetzt zu werden, durch PDC und ADH vermehrt zu Acetaldehyd und Ethanol geschleust [Ingram und Conway (1988), Ohta *et al.* (1991)]. Allerdings konnte die Verringerung der AcetylCoA-Bildung aus Pyruvat nicht in allen Fällen die aerobe Acetatbildung reduzieren. Der Speicherstoff Poly- β -Hydroxybuttersäure (PHB) wird ebenfalls ausgehend vom AcetylCoA synthetisiert (Gottschalk, 1985). Durch Einbringen des Operons für die Biosynthese von PHB, *phbCAB* aus *Alcaligenes eutrophus*, war kein signifikanter Einfluss auf die Acetatproduktion eines *E. coli*-Wildtyps ausgeübt worden (Chang *et al.*, 1999).

Abbildung 4.7 gibt einen Überblick über die Modellvorstellung zur Reduktion der aeroben Acetatproduktion durch Pyc.

Der K_m -Wert der Pyruvatcarboxylase aus *C. glutamicum* für das Substrat Pyruvat liegt bei 1,3 mM (Peters-Wendisch, 1996). Für den Pyruvatdehydrogenasekomplex von *E. coli* war dagegen ein K_m -Wert für Pyruvat von 0,4 mM festgestellt worden (Akiyama und

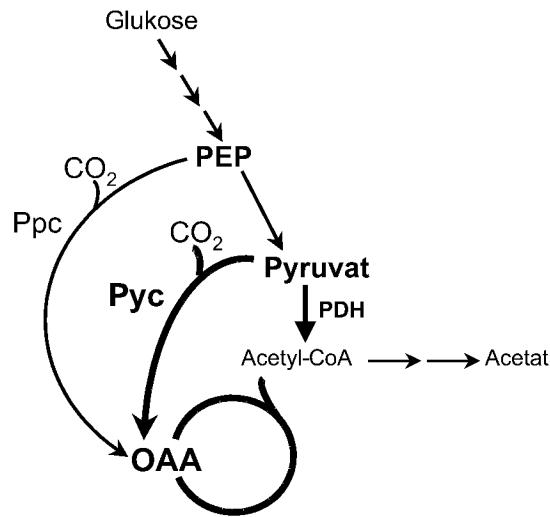


Abbildung 4.7: Modell zur Reduktion der aeroben Acetatbildung in *E. coli* durch die heterologe Pyruvatcarboxylase. Durch Pyc könnte der Kohlenstofffluss in Richtung OAA verstärkt und dadurch die Verfügbarkeit von Pyruvat für den PDH-Multienzymkomplex verringert sein. Dies könnte in einer Verminderung der Aktivität von PDH und dementsprechend geringeren Flüssen zum AcetylCoA resultieren. Das gebildete AcetylCoA wird möglicherweise fast vollständig in den TCA-Zyklus eingeschleust und kaum noch zum Acetat umgesetzt. PEP → Phosphoenolpyruvat, Ppc → PEP-Carboxylase, Pyc → Pyruvatcarboxylase, PDH → Pyruvatdehydrogenase-Komplex, OAA → Oxalacetat.

Hammes, 1980). Damit war die Substrataffinität der Pyruvatcarboxylase aus *C. glutamicum* geringer als die der *E. coli*-PDH. Trotz der ungünstigeren kinetischen Eigenschaften der Pyc aus *C. glutamicum* im Vergleich zu PDH konnte das Enzym mit dem PDH-Enzymkomplex konkurrieren und die aerobe Acetatbildung von *E. coli* verringern. Eine mögliche Ursache hierfür könnte die im Vergleich zu PDH erhöhte Pyc-Proteinmenge sein, bedingt durch die Expression von Pyc unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors. Es wird diskutiert, dass die Aktivität des Pyruvatdehydrogenasekomplexes von *E. coli* durch das Substrat Pyruvat bestimmt wird (Hennig *et al.*, 1997). Da durch die parallele Aktivität der Pyc die Verfügbarkeit von Pyruvat für den PDH-Enzymkomplex möglicherweise verringert wurde, wurde der Kohlenstofffluss durch PDH in *E. coli* eventuell vermindert. So wurde möglicherweise nur so viel AcetylCoA gebildet, wie über Citratsynthase an OAA gebunden und in den TCA-Stoffwechsel eingeschleust werden konnte. Pyruvat ist

als positiver Effektor der Phosphotransacetylase beschrieben worden (Kessler und Knappe, 1996), so dass die durch Pyc verringerte Pyruvatverfügbarkeit zusätzlich den Umsatz von AcetylCoA zu Acetylphosphat inhibiert haben könnte.

Mit Pyc aus *R. etli* war ebenfalls die Reduktion der aeroben Acetatbildung von *E. coli* beschrieben worden (Gokarn *et al.*, 2001), für dieses Enzym wurde allerdings bis dato kein K_m -Wert für Pyruvat beschrieben. Da die K_m -Werte für Pyruvat von Pyruvatcarboxylasen aus anderen Mikroorganismen bekannt sind, liegt vermutlich auch die Substrataffinität für Pyc aus *R. etli* innerhalb dieses Bereichs. So war beispielsweise für Pyc aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* ein K_m -Wert von 1,75 mM gefunden worden (Mukhopadhyay *et al.*, 1998). Für Pyc aus *Methanococcus jannaschii* war mit einem K_m -Wert von 0,53 mM eine höhere Affinität zu Pyruvat gefunden worden (Mukhopadhyay *et al.*, 2000), für Pyc aus *Mycobacterium smegmatis* war sogar ein K_m -Wert von nur 0,3 mM gezeigt worden (Mukhopadhyay und Purwantini, 2000).

Durch Expression der Pyruvatcarboxylase in *E. coli* wird die aerobe Acetatproduktion der im Zulaufverfahren untersuchten Stämme signifikant verringert, sowohl mit Pyc als zweiter anaplerotischer Reaktion neben der Ppc als auch in *ppc*-Mutanten. Ob allerdings durch Pyc der Kohlenstofffluss über den PDH-Komplex so weit vermindert wird, dass das gesamte AcetylCoA über den TCA-Stoffwechsel abgebaut werden kann, bleibt noch zu untersuchen.

4.7 Effekte der Pyruvatcarboxylase auf Verfügbarkeit von PEP in *E. coli*

Es war bereits gezeigt worden, dass durch Pyc aus *R. etli* eine Umlenkung von Kohlenstoffflüssen in *E. coli* erzielt werden konnte, so wurde die anaerobe Succinatproduktion durch Pyc signifikant auf Kosten der Lactatbildung gesteigert [Gokarn *et al.* (1998), Gokarn *et al.* (2001)]. Der Einfluss von Pyc auf die Verfügbarkeit von PEP in *E. coli* wurde bisher noch nicht untersucht. Wird Pyruvatcarboxylase aus *C. glutamicum* als zweite anaplerotische Reaktion in *E. coli* eingebracht, trägt diese mit der PEP-Carboxylase zur

Auffüllung des TCA-Zyklus bei. Dies könnte eine erhöhte Verfügbarkeit von PEP in entsprechenden *E. coli*-Stämmen zur Folge haben, wenn durch Pyc weniger PEP für die Synthese von Oxalacetat aufgewendet werden muss. Das Substrat der Pyc, Pyruvat, steht in *E. coli* bei Wachstum auf Glukose durch die Aktivität des Phosphotransferasesystems in hohem Maß zur Verfügung, denn das PT-System verbraucht pro mol translozierter Glukose ein mol PEP und bildet entsprechend Pyruvat (Postma *et al.*, 1996).

Die Verfügbarkeit von PEP in der Zelle kann durch Quantifizierung des PEP-Pools erfasst werden. Allerdings unterliegen Metabolite in der Zelle einem schnellen Umsatz, die Konzentrationen liegen oft knapp unter der Nachweisgrenze. Von Zhu *et al.* (2001) war gezeigt worden, dass PEP in *E. coli* nicht signifikant akkumulierte, sondern eher zu Oxalacetat oder Pyruvat umgesetzt wurde. Auch erfordert die Bestimmung intrazellulärer Metabolitkonzentrationen die schnelle Inaktivierung des bakteriellen Stoffwechsels sowie aufwendige Extraktions- und Analysemethoden (Buchholz, 2001). Daher wurde in dieser Arbeit die Verfügbarkeit von PEP indirekt anhand des Kohlenstoffflusses in die Aromatenbiosynthese erfasst. Im verwendeten Indikatorstamm mit defekter 3-Dehydroquinat-Synthase (*aroB*) wurden die Vorläufermetabolite aus dem Zentralstoffwechsel, PEP und Erythrose-4-Phosphat, zu 3-Desoxy-D-arabino-heptulosonat-7-Phosphat kondensiert. Dieses Intermediat wurde jedoch durch den *aroB*-Defekt nicht weiter umgesetzt und konnte in seiner dephosphorylierten Form als DAH mittels HPLC im Überstand quantifiziert werden (Frost und Knowles, 1984) (Kap. 3.4, Abb. 3.11). Ein colorimetrischer Nachweis von DAHP war zwar beschrieben worden (Srinivasan und Sprinson, 1959), dieser ist aber (bei hohem experimentellen Aufwand) mit einer Fehlerquote von 30 % relativ ungenau (Patnaik und Liao, 1994). Die Identität der Phosphatasen sowie die Lokalisation des Dephosphorylierungsprozesses in der Zelle sind noch nicht bekannt (Frost und Draths, 1995).

Durch den Defekt in der Dehydroquinat-Synthase sind *aroB*-Mutanten von *E. coli* auxotroph für die drei aromatischen Aminosäuren sowie Shikimat, diese Supplemente müssen in mM Konzentrationen zugegeben werden, um den DAHP-Produzenten Wachstum zu ermöglichen. Die drei DAHP-Synthase-Isoenzyme, AroF, G und H, werden durch die aromatischen Aminosäuren allosterisch inhibiert (Brown, 1971). Daher waren in vielen Untersuchungen zur DAHP-Bildung von *aroB*-Mutanten allosterisch unempfindliche

(„feedback“-resistente) DAHP-Synthasen eingesetzt worden [Mascarenhas *et al.* (1991), Draths *et al.* (1992), Flores *et al.* (1996), Gosset *et al.* (1996), Krämer (2000)]. Aber diese Muteine haben gegenüber den Wildtyp-Proteinen Nachteile, so war gezeigt worden, dass eine „feedback“-resistente Variante von AroF wesentlich temperaturlabiler war als das Wildtyp-Protein (Jossek *et al.*, 2001). In dieser Arbeit wurde keine Maximierung der DAH-Produktion angestrebt, sondern der Effekt von Pyc auf die Verfügbarkeit von PEP untersucht. Aus diesem Grund wurde keine allosterisch unempfindliche DAHP-Synthase eingesetzt, statt dessen wurde die Fermentationsstrategie so gewählt, dass in einem Ansatz sowohl Wachstum der Zellen als auch eine basale DAH-Produktion erreicht werden konnte. Dazu wurden Fermentationen in zwei Phasen aufgeteilt (Kap. 3.4.1, Abb. 3.21): In der Wachstumsphase wurden die aromatischen Supplemente vollständig umgesetzt, so dass in der nachfolgenden Produktionsphase die DAH-Bildung einsetzen konnte.

In Abbildung 4.8 sind die DAH-Ausbeutekoeffizienten der in dieser Arbeit untersuchten *aroB*-Mutanten mit mit heterologer Pyc und der entsprechenden Kontrollstämmen dargestellt. In *E. coli* F5 wurden die Effekte von Pyc als zweiter anaplerotischer Reaktion neben PEP-Carboxylase untersucht. Die Expression der Pyc aus *C. glutamicum* konnte in F5 zwar die DAH-Konzentration im Überstand von 30 auf 40 mM erhöhen, der Anteil am umgesetzten Kohlenstoff, welcher in die Aromatenbiosynthese geschleust wurde, wurde durch Pyc in diesem Stamm jedoch nicht signifikant beeinflusst. Dass in F5 die PEP-Verfügbarkeit durch Pyc nicht erhöht wurde, könnte in der parallelen Aktivität der PEP-Carboxylase begründet sein. Es wurde bereits diskutiert (Kap.4.4), dass die PEP-Carboxylase-Aktivität möglicherweise durch Pyc verringert wurde. Trotzdem wurde durch die Pyc offenbar immer noch so viel PEP zu Oxalacetat carboxyliert, dass sich eine erhöhte Verfügbarkeit von PEP in *E. coli* F5 durch Pyruvatcarboxylase anhand der DAH-Ausbeute nicht feststellen ließ.

Im Vergleich zur DAH-Ausbeute von F5 schleuste die *aroB ppc*-Mutante F43 ohne Pyc nur halb so viel Kohlenstoff in die Aromatenbiosynthese. Somit war nach Inaktivierung der PEP-Carboxylase die PEP-Verfügbarkeit für die Aromatenbiosynthese nicht erhöht. Diese Ergebnisse stimmen überein mit den von Patnaik und Liao (1994) veröffentlichten Daten: Die Autoren zeigten, dass die Inaktivierung des PEP-Carboxylase-Gens die

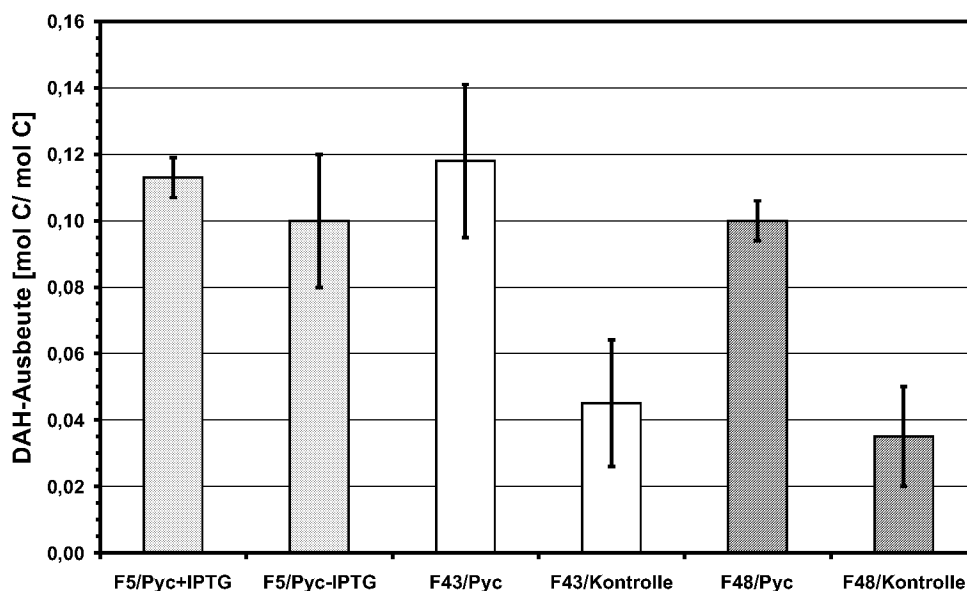


Abbildung 4.8: DAH-Ausbeutekoeffizienten der untersuchten *E. coli aroB*-Mutanten mit bzw. ohne heterologe Pyruvatcarboxylase nach 30 h Fermentation im begasten Rührkessel im Zulaufverfahren. Ansätze: F5 mit bzw. ohne IPTG, F43 und F48 mit IPTG und Succinat. Pyc → pF36, Kontrolle → pACYC*tac*

DAHP-Produktion von *E. coli* nicht steigern konnte (Patnaik und Liao, 1994). Im Gegensatz dazu war von Miller *et al.* (1987) eine gesteigerte Phenylalaninproduktion mit *ppc*-Mutanten erreicht worden. Die Supplementierung mit Succinat beeinflusste die DAH-Bildung ebenfalls nicht, wie bereits von Patnaik und Liao (1994) beschrieben worden war.

Durch die neue anaplerotische Reaktion Pyc wurde der Anteil Kohlenstoff, welcher in die Aromatenbiosynthese geschleust wurde, in F43 verdoppelt. Die möglicherweise erhöhte PEP-Verfügbarkeit in einer *ppc*-Mutante wie F43 konnte nicht darauf beruhen, dass durch die Verbindung zwischen Pyruvat und Oxalacetat weniger PEP für die Auffüllung des TCA-Zyklus benötigt wurde, da in diesem Stamm kein PEP für anaplerotische Reaktionen aufgewendet werden konnte. Somit musste die erhöhte Bereitstellung von PEP andere Ursachen gehabt haben, möglicherweise erfolgte ein „recycling“ von PEP aus Oxalacetat durch PEP-Carboxykinase (Pck). Pck ist ein glukoneogenes Enzym, das Oxalacetat ATP-abhängig zu PEP decarboxyliert (Fraenkel, 1996). Das *pck*-Gen steht unter positiver Kontrolle des Transkriptionsregulators FruR, dem Repressor des Fruktose-Regulons von *E. coli* und unterliegt damit einer cAMP-unabhängigen Katabolitrepression [Ramseier *et al.* (1995), Saier *et al.* (1996), Saier (1998)].

Ein Modell für das „recycling“ von PEP über Pck und den Glyoxylatweg in einem Stamm mit unterbrochenem TCA-Zyklus war bereits entwickelt worden, stellte sich allerdings *in vivo* als nicht funktionell heraus (Liao *et al.*, 1996). Von Sauer *et al.* (1999) war gezeigt worden, dass in *E. coli* auch bei Wachstum auf Glukose ein Rückfluss vom TCA-Zyklus in Richtung Glykolyse über PEP-Carboxykinase erfolgt. Ein solcher „futile cycle“ zwischen PEP-Carboxylase und PEP-Carboxykinase war nach Ausschaltung beider Pyruvatkinasen von *E. coli* verstärkt worden (Emmerling *et al.*, 2002). Für *C. glutamicum* war festgestellt worden, dass bei Wachstum auf Glukose und Lactat zwei Drittel des Oxalacetats über Pck zu PEP umgewandelt wurden (Petersen *et al.*, 2000). In einer späteren Untersuchung wurde gezeigt, dass die *in vivo*-Aktivität der PEP-Carboxykinase in *C. glutamicum* sich umgekehrt proportional zur Konzentration von Oxalacetat in der Zelle verhielt (Petersen *et al.*, 2001).

Dass die Expression von Pyruvatcarboxylase in *E. coli* einen verstärkten Kohlenstofffluss in Richtung Oxalacetat und TCA-Stoffwechsel zur Folge hatte, war anhand der Acetat- und Glutamatproduktion der rekombinanten Stämme bereits vermutet worden (Kap. 4.6, 4.5). Möglicherweise führte die vermehrte Produktion von Oxalacetat durch Pyc in der *ppc*-Mutante F43 zu einem PEP-„recycling“ über PEP-Carboxykinase. Dieses vermehrt bereitstehende PEP führte zu einem Anstieg des PEP/Pyruvat-Verhältnisses und somit zu einer Steigerung der Glukoseaufnahme durch das PT-System (Kap. 4.3). Auch wurde von den DAHP-Synthasen vermehrt PEP in die Aromatenbiosynthese geschleust. Abbildung 4.9 gibt einen Überblick über das beschriebene Modell zur erhöhten PEP-Verfügbarkeit durch Pyc in *E. coli ppc*-Mutanten.

Für die DAHP-Synthase AroF beträgt der K_m -Wert für PEP war $5,8 \mu\text{M}$ (Schoner und Hermann, 1976), für AroG sind K_m -Werte von $80 \pm 40 \mu\text{M}$ beschrieben worden (Pittard, 1996). Das cytoplasmatische PTS-Protein EI wird durch PEP autophosphoryliert, der K_m -Wert für PEP von *S. typhimurium* und *E. coli* liegt im Bereich von $0,2\text{-}0,4 \text{ mM}$ (Postma *et al.*, 1996). Für die Pyruvatkinase-Isoenzyme von *E. coli* waren in Anwesenheit ihrer jeweiligen allosterischen Effektoren Fructose-1,6-Bisphosphat und AMP K_m -Werte für PEP von $0,1\text{-}0,15 \text{ mM}$ gefunden worden (Kotlarz *et al.*, 1975). Somit war die Affinität

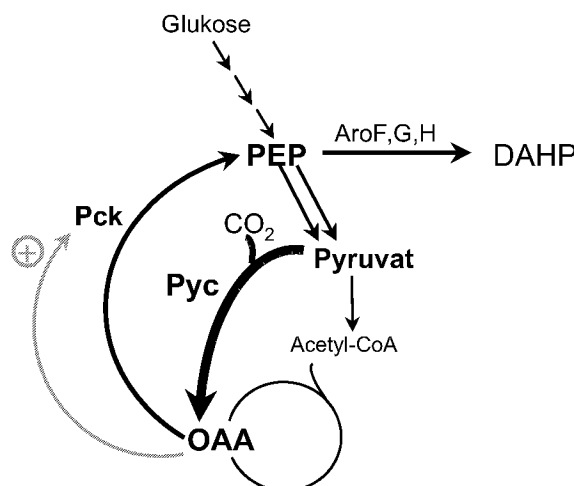


Abbildung 4.9: Modellvorstellung zur erhöhten Verfügbarkeit von PEP in einer *E. coli ppc*-Mutante mit heterologer Pyruvatcarboxylase. Durch die Aktivität der Pyc wird vermehrt OAA gebildet, dieses aktiviert die PEP-Carboxykinase und führt zu einem „recycling“ von PEP. PEP → Phosphoenolpyruvat, AroF,G,H → DAHP-Synthasen, Pyc → Pyruvatcarboxylase, Pck → PEP-Carboxykinase, OAA → Oxalacetat.

der DAHP-Synthasen zum Substrat PEP wesentlich höher als die der Konkurrenzreaktionen von PT-System und Pyruvatkinasen. Die Bildung von DAH aus dem vermehrt verfügbaren PEP war somit auch kinetisch begünstigt, wobei aber auch die jeweilige Reaktionsgeschwindigkeit eine Rolle gespielt haben kann.

Im Stamm F48 wurde zusätzlich zu den Mutationen der Gene *aroB* und *ppc* das Gen eines DAHP-Synthase-Isoenzyms (*aroF*) unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors exprimiert. Diese Deregulation der Eingangsreaktion in die Aromatenbiosynthese erhöhte jedoch die DAH-Produktion von F48 nicht. Die Expression von AroF wurde durch IPTG-Zugabe zu Beginn der Fermentation induziert, es zeigte sich jedoch kein Unterschied in der DAH-Bildung von induzierten und nicht-induzierten Stämmen. Auch im Vergleich mit F43 wurde nicht mehr DAH gebildet. Der Anteil am verbrauchten Kohlenstoff, welcher in die Aromatenbiosynthese geschleust wurde, war bei F48 sogar geringfügig kleiner als bei F43. Durch Expression der Pyc erfolgte wie beim Stamm F43 eine Verdopplung der DAH-Ausbeute. Auch in F48 wurde, wie bereits diskutiert, durch die neue anaplerotische Reaktion vermehrt PEP für die Aromatenbiosynthese bereitgestellt.

Dass die Deregulation der Eingangsreaktion die DAH-Produktion nicht steigern konnte, war möglicherweise auf mehrere Ursachen zurückzuführen. Es wurde nur eine chromosomale Kopie des *aroF*-Gens unter Kontrolle des *tac*-Promotors exprimiert, das Genprodukt AroF unterlag der Endprodukthemmung durch Tyrosin. F48 produzierte wie F5 und F43 erst nach Abschluss des Wachstums signifikante Mengen von DAH, als die Endprodukt-Hemmung der drei DAHP-Synthasen aufgehoben war. Da aber die Kopienzahl des *aroF*-Gens im Vergleich zu F43 nicht erhöht war, war möglicherweise auch die Aktivität von AroF nicht höher als im Vergleichsstamm. Eine Limitierung der DAH-Produktion durch die Verfügbarkeit von Erythrose-4-Phosphat (E4P), dem zweiten Baustein aus dem Zentralstoffwechsel, ist ebenfalls denkbar. Allerdings wurden von F5 mit Pyc mehr als 40 mM DAH gebildet, so dass eine Limitierung der DAH-Bildung durch E4P in F48 unwahrscheinlich scheint.

Nach Patnaik und Liao (1994) können in PTS⁺-Stämmen aus 7 mol Glukose maximal 3 mol DAHP gebildet werden, dies entspricht einer molaren Ausbeute von 43 %. Diese Berechnung war unter der Annahme durchgeführt worden, dass keine Metabolite für die Biomassebildung abgezweigt wurden und dass weiterhin der Kohlenstofffluss direkt in die Aromatenbiosynthese gelenkt wurde, ohne dass konkurrierende Stoffwechselwege aktiv waren (Patnaik und Liao, 1994). In Untersuchungen mit nicht-wachsenden Resuspensionskulturen waren mit einer *aroB*-Mutante von *E. coli* molare DAHP-Ausbeuten von 10% erzielt worden (Liao *et al.*, 1996). In dieser Arbeit wurden keine Resuspensionskulturen verwendet, die untersuchten Stämme bildeten aus der eingesetzten Glukose vor allem Biomasse, Kohlendioxid, die jeweils erwähnten Nebenprodukte wie Acetat und Glutamat sowie DAH. Daher wurden in eigenen Untersuchungen auch wesentlich geringere molare Ausbeuten festgestellt. Die *ppc*-Mutante F43 wies eine molare DAH-Ausbeute von 3,2 % auf, durch Einbringen der Pyruvatcarboxylase erhöhte sich dieser Wert auf über 5 %.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Pyruvatcarboxylase als einzige anaplerotische Reaktion in einer *E. coli aroB ppc*- Doppelmutante die Verfügbarkeit von PEP für die Aromatenbiosynthese verdoppeln kann. Die Ursache dieser erhöhten PEP-Verfügbarkeit müssen noch untersucht werden, um festzustellen ob beispielsweise durch Pyc ein „recycling“ von PEP über PEP-Carboxykinase erfolgt. Um das gesamte Potential der erhöhten

PEP-Verfügbarkeit durch Pyc auszuloten, müsste neben einer ausreichenden Bereitstellung von E4P auch eine deutliche Steigerung der DAHP-Synthaseaktivität in *E. coli* erreicht werden. Dieses könnte beispielsweise durch Expression von *aroF* oder *aroG* unter Kontrolle eines stärkeren Promotors in höherer Kopienzahl erreicht werden.

4.8 Veränderung von Kohlenstoffflüssen durch Pyc

Durch die Expression der Pyruvatcarboxylase aus *C. glutamicum* wurden in *E. coli* signifikante Veränderungen der Kohlenstoffflüsse verursacht. Die Abbildungen 4.10 und 4.11 geben für die *aroB*-Mutante F5 sowie die *aroB ppc*-Doppelmutante F43 mit bzw. ohne Pyruvatcarboxylase eine Übersicht über die Anteile des verbrauchten Kohlenstoffs, die nach IPTG-Induktion in die Bildung des jeweiligen Produktes geflossen sind.

Abbildung 4.10 macht noch einmal deutlich, wie stark die Kohlenstoffflüsse in *E. coli* F5 durch eine einzige Maßnahme im Zentralstoffwechsel beeinflusst wurden. Durch die Expression der heterologen Pyruvatcarboxylase konnte die Verfügbarkeit von PEP für die Biosynthese aromatischer Aminosäuren zwar nicht beeinflusst werden, allerdings wurde die Bildung des unerwünschten Nebenproduktes Acetat fast vollständig unterbunden. Weiterhin wurde die Glutamatproduktion erhöht.

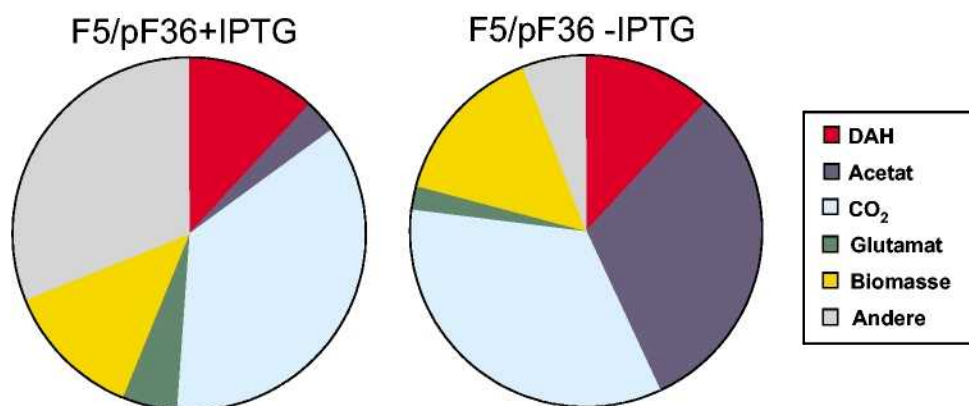


Abbildung 4.10: Prozentuale Anteile des Kohlenstoffgehalts der jeweiligen Produkte am verbrauchten Kohlenstoff der *aroB*-Mutante F5 mit heterologer Pyruvatcarboxylase (pF36) mit bzw. ohne IPTG-Induktion. Die Daten stammen aus Tab. 3.11, Kap. 3.4.2.

In F43 hatte die Inaktivierung des PEP-Carboxylase-Gens *ppc* eine Steigerung der Acetatproduktion im Vergleich zu F5 zur Folge, während weniger CO₂ gebildet wurde und die Biomasseausbeute sich geringfügig erhöhte. Die Expression der Pyruvatcarboxylase als neuer anaplerotischer Reaktion in F43 verdoppelte die Verfügbarkeit von PEP für den Shikimisäureweg und bewirkte eine Umlenkung des Kohlenstoffflusses von der aeroben Acetatbildung zur Produktion von Glutamat.

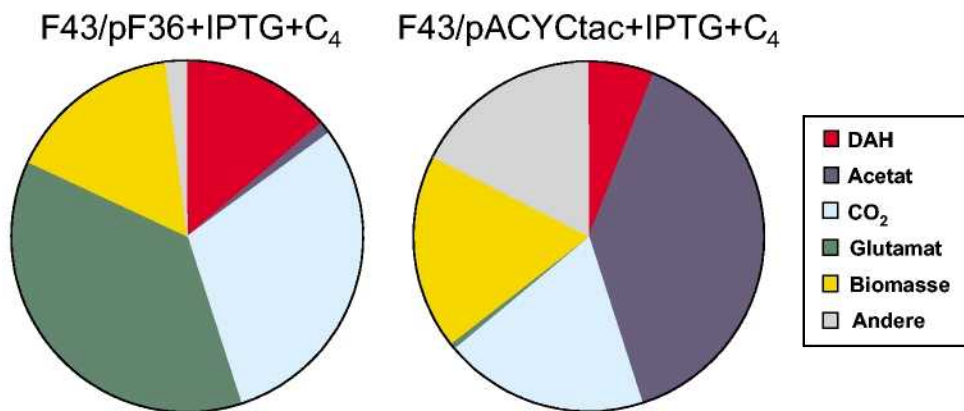


Abbildung 4.11: Prozentuale Anteile des Kohlenstoffgehalts der jeweiligen Produkte am verbrauchten Kohlenstoff der *aroB ppc*-Mutante F43 mit (pF36) bzw. ohne (pACYCtac) heterologe Pyruvatcarboxylase nach IPTG-Induktion. Die Daten stammen aus Tab. 3.16, Kap. 3.5.3, die Stämme wurden mit Succinat (C₄) supplementiert.

Da sich die Verteilung des aufgenommenen Kohlenstoffs auf die verschiedenen Produkte in F43 und F48, der *aroB ppc*-Doppelmutante mit deregulierter Eingangsreaktion in die Aromatenbiosynthese, kaum unterschieden (Kap. 3.6.3, Tab. 3.21), wurde auf eine graphische Darstellung der Kohlenstoffverteilung von F48 an dieser Stelle verzichtet.

In den Übersichten zur Kohlenstoffverteilung fällt auf, dass die Bilanzen teilweise Lücken aufweisen. Während für F43 fast der gesamte eingesetzte Kohlenstoff in den Produkten wiedergefunden werden konnte, betrug diese Quote für den Kontrollstamm mit Leerplasmid nur noch 82 %. Beim Stamm F5 mit Pyc wurde fast ein Drittel des eingesetzten Kohlenstoffs nicht wiedergefunden.

Diese Bilanzlücken können durch mehrere Faktoren zustande kommen. Möglicherweise wurde nicht das gesamte von den Stämmen gebildete Kohlendioxid durch die Abgasanalytik erfasst. Vor allem zu Beginn der Fermentation wurde durch die geringen Biomassekonzentrationen wenig CO₂ gebildet, so dass die Konzentrationen im Abgas sich teilweise unterhalb der Empfindlichkeit des verwendeten Sensors bewegten. Während der Fermentation wurden ca. 15 Proben von je 10 mL aus den Fermentern entnommen. Diese hohen Probenvolumina waren notwendig, um alle „offline“-Bestimmungen durchführen zu können (pH, Glukosegehalt, Biotrockenmasse, OD₆₀₀, Plasmidstabilität, HPLC-Analytik für Amino- und organische Säuren). Das fehlende Volumen wurde zwar je nach Glukoseverbrauch im Zulaufbetrieb fast vollständig ausgeglichen, in der integralen Bilanz fehlten jedoch die entsprechenden Anteile an Biomasse und Produkten.

Alle Methoden zur Bestimmung von Substanzen im Überstand wiesen gewisse Messungenauigkeiten auf, eine weitere Fehlerquelle war das Verdünnen der Proben. Die gravimetrische Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration war ebenfalls fehlerträchtig, wobei die für alle Proben ermittelte optische Dichte der Kulturbrühe im Vergleich herangezogen wurde. Der Kohlenstoffgehalt der Biotrockenmasse wurde dagegen rechnerisch bestimmt, wobei ein prozentualer Anteil von 40 % Kohlenstoff am Trockengewicht angenommen wurde. Dieser Wert ist ein Mittelwert aus den von Neidhardt *et al.* (1990) und Nielsen und Villadsen (1994) veröffentlichten Daten für die Elementarzusammensetzung von *E. coli*. Somit barg auch dieser Teil der Kohlenstoffbilanz die Möglichkeit von Fehlern, da die Zusammensetzung der Biotrockenmasse möglicherweise im Verlauf der Fermentation Schwankungen unterlag und auch die verschiedenen Stämme eventuell unterschiedliche Elementarzusammensetzungen aufwiesen.

Auch wenn sich die einzelnen Fehler zu einem relativ grossen Gesamtfehler addieren können, verbleibt eine Bilanzlücke von mehr 20 %. Möglicherweise wurden von den Stämmen weitere Nebenprodukte gebildet, die mit den beschriebenen Methoden nicht identifiziert und quantifiziert werden konnten. Hier kämen vor allem flüchtige Substanzen in Frage, diese würden durch die intensive Begasung aus der Flüssigkeit ausgetrieben, könnten aber im Abgas nicht erfasst werden und daher nicht in der Bilanz auftauchen.

Der Einfluss der Pyruvatcarboxylase auf die Kohlenstoffflüsse in *E. coli* kann durch ^{13}C -Isotopenanalysen weiter aufgeklärt werden. So könnte beispielsweise untersucht werden, wie hoch die Anteile von Ppc und Pyc an der Auffüllung des TCA-Stoffwechsels mit OAA sind und ob durch Pyc der Kohlenstofffluss über Ppc reduziert wird. Weiterhin wäre von Interesse, ob ein erhöhter Kohlenstofffluss in Richtung TCA-Stoffwechsel durch Pyc die Ursache für die beobachteten Effekte der neuen anaplerotischen Reaktion auf Acetat- und Glutamatbildung sowie CO_2 -Produktion der untersuchten Stämme war. Auch könnte durch geeignete Markierungsexperimente festgestellt werden, ob nach Expression der Pyc die PEP-Verfügbarkeit durch ein PEP-„recycling“ über Pck erhöht wurde.

Zusätzlich könnte untersucht werden, ob Pyc in entsprechenden *E. coli*-Stämmen nicht nur die Verfügbarkeit von PEP, sondern auch die Bildung von Produkten aus dem Aromatenbiosyntheseweg wie Shikimat oder Phenylalanin steigern kann.

Kapitel 5

Zusammenfassung

Der Zentralstoffwechsel von *E. coli* ist eine wichtige Drehscheibe für die Verteilung des Substratkohlenstoffs auf die verschiedenen Stoffwechselwege. Ziel dieser Arbeit war es, durch Einbringen der heterologen Pyruvatcarboxylase aus *C. glutamicum* eine neue Verbindung zwischen Glykolyse und Tricarbonsäurestoffwechsel in *E. coli* herzustellen und die Auswirkungen dieser neuen Reaktion auf die Kohlenstoffflüsse zu untersuchen.

Durch Einbringen des *pyc*-Gens in *ppc*-Mutanten wurde untersucht, ob Pyc als einzige anaplerotische Reaktion in *E. coli* die Auffüllung des TCA-Stoffwechsels mit OAA sicherstellen kann. Das *pyc*-Gen wurde auch als zweite anaplerotische Reaktion in *E. coli*-Stämme mit intakter PEP-Carboxylase eingebracht.

Zur Untersuchung der Einflüsse von Pyc auf die Verfügbarkeit von PEP in *E. coli* wurde die neue Reaktion in *E. coli*-Stämme mit defektem 3-Dehydroquinate-Synthasegen (*aroB*) eingeführt. Von diesen „Indikatorstämmen“ wird das erste Intermediat des Biosyntheseweges aromatischer Aminosäuren, DAHP (das Produkt einer Kondensation von PEP und Erythrose-4-Phosphat) aufgrund des *aroB*-Defekts nicht weiter umgesetzt, sondern in den Überstand ausgeschieden und kann als dephosphoryliertes DAH nachgewiesen werden. Die Kohlenstoffflüsse in die Aromatenbiosynthese und somit auch die Verfügbarkeit von PEP konnten anhand der DAH-Produktion solcher Stämme quantifiziert werden.

Um die Effekte der Pyc in allen Stämmen unter möglichst gleichen Prozessbedingungen zu untersuchen, wurden die Kultivierungen in begasten Rührkesseln unter pH-statischen Bedingungen im Zulaufverfahren durchgeführt. So wurde auch das von den Stämmen gebildete CO₂ erfasst und eine annähernd geschlossene Kohlenstoffbilanz erstellt.

- Durch die IPTG- und Biotin-abhängige Suppression des Phänotyps einer *ppc*-Mutante von *E. coli* durch die heterologe Pyc konnte gezeigt werden, dass das biotinylierte Protein in *E. coli* posttranslational modifiziert wird und funktionell aktiv ist. Mit dem in dieser Arbeit entwickelten diskontinuierlichen Testsystem wurde in rekombinanten *E. coli*-Zellen eine spezifische Pyc-Aktivität von ca. 230 mU/mg Protein nachgewiesen.
- Der neue anaplerotische Stoffwechselweg beeinflusste die exponentielle Wachstumsrate des *E. coli*-Wildtyps bei aerober Kultivierung auf Glukose nicht. Bei Wachstum auf der glukoneogenen Kohlenstoffquelle Lactat wurde die Wachstumsrate durch Pyc um das 2,5 fache gesteigert. Eine *ppc*-Mutante mit Pyc als einziger anaplerotischer Reaktion wuchs in Minimalmedium mit Glukose genau so schnell wie der Wildtyp.
- Durch Pyc wurde die Glukoseverbrauchsrate von *E. coli aroB*-Mutanten in der exponentiellen Wachstumsphase nicht beeinflusst, wohl aber der Substratumsatz über den gesamten Fermentationsverlauf um 30 % gesteigert. Dieser verstärkte Glukoseverbrauch ist möglicherweise auf eine Erhöhung des PEP/Pyruvat-Verhältnisses durch Pyc zurückzuführen. Eine erhöhte Verfügbarkeit von PEP durch Expression der Pyc in einer *aroB ppc*-Doppelmutante konnte anhand der DAH-Ausbeute nachgewiesen werden. Durch Pyc wurde bei inaktiver Pyc der Anteil des Kohlenstoffflusses in die Aromatenbiosynthese von 5 auf 12 % erhöht.
- Pyc steigerte die Glutamatausbeute einer *E. coli aroB*-Mutante von 1,5 auf über 4,5 % des verbrauchten Kohlenstoffs. Mit Pyc als einziger anaplerotischer Reaktion schleuste eine *aroB ppc*-Doppelmutante ein Drittel des umgesetzten Kohlenstoffs in Richtung Glutamat. Diese Ergebnisse deuten auf eine Erhöhung des

Kohlenstoffflusses in Richtung TCA-Stoffwechsel durch Pyc hin. Dass der CO_2 -Ausbeutekoeffizient einer *aroB ppc*-Doppelmutante mit deregulierter Eingangsreaktion in die Aromatenbiosynthese durch Pyc um 20 % erhöht wurde, könnte ebenfalls auf einen durch Pyc gesteigerten Fluss zum TCA-Stoffwechsel hindeuten. Für eine Erhöhung der anaplerotischen Flüsse durch Pyc spricht weiterhin, dass der Kohlenstofffluss in Richtung Acetat durch Expression der Pyc in *E. coli aroB*-Mutanten um mehr als 90% reduziert wurde, während die entsprechenden Kontrollstämme ein Drittel des aufgenommenen Kohlenstoffs in Form von Acetat ausgeschieden haben.

Literaturverzeichnis

- M. Akesson, P. Hagander und J. P. Axelsson. (2001).** Avoiding acetate accumulation in *Escherichia coli* cultures using feedback control of glucose feeding. *Biotechnol. Bioeng.* 73: 223–230.
- S. K. Akiyama und G. G. Hammes. (1980).** Elementary steps in the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex from *Escherichia coli*: Kinetics of acetylation and deacetylation. *Biochemistry.* 19: 4208–4213.
- K. B. Andersen und K. von Meyenburg. (1980).** Are growth rates of *Escherichia coli* in batch cultures limited by respiration? *J. Bacteriol.* 144(1): 114–123.
- P. Attwood. (1995).** The structure and mechanism of action of pyruvate carboxylase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 27(3): 231–249.
- K. C. Backman und R. Balakrishnan. (1988).** Enzyme deregulation. *Application No. 860.541; Patent No. 4.753.883.*
- J. E. Bailey. (1991).** Toward a science of metabolic engineering. *Science.* 252: 1668–1675.
- J. L. Barker und J. W. Frost. (2001).** Microbial synthesis of *p*-hydroxybenzoic acid from glucose. *Biotechnol. Bioeng.* 76: 376–390.
- E. Bech Jensen und S. Carlsen. (1990).** Production of recombinant human growth hormone in *Escherichia coli*: expression of different precursors and physiological effects of glucose, acetate and salts. *Biotechnol. Bioeng.* 36: 1–11.

- H. U. Bergmeyer und K. Gawehn. (1974).** Methods of enzymatic analysis. volume 2. Verlag Chemie Weinheim. 3rd edition.
- A. Berry. (1996).** Improving production of aromatic compounds in *Escherichia coli* by metabolic engineering. *Trends in Biotechnology*. 14: 250–256.
- F. R. Blattner, G. Plunkett, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau und Y. Shao. (1997).** The complete genome sequence of *Escherichia coli* k-12. *Science*. 277: 1453–1474.
- A. Böck und G. Sawers. (1996).** Fermentation. IN: F.C. Neidhardt. *Escherichia coli* and *Salmonella* - Cellular and Molecular Biology. ASM Press, Washington D.C. volume 1. 2nd edition. chapter 18: pages 262–282.
- J. Bongaerts, M. Krämer, U. Müller, L. Raeven und M. Wubbolts. (2001).** Metabolic engineering for microbial production of aromatic amino acids and derived compounds. *Metabolic Engineering*. 3: 289–300.
- M. M. Bradford. (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.
- R. L. Brown, K. D. Somerville. (1971).** Repression of aromatic amino acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 108: 386–399.
- A. K. Buchholz. (2001).** Quantifizierung intrazellulärer Metabolitdynamiken zur Untersuchung mikrobieller Stoffwechselnetzwerke. Dissertation, Universität Bonn.
- J. L. Canovas und H. L. Kornberg. (1965).** Fine control of phosphopyruvate carboxylase activity in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*. 96: 169–172.
- D.-E. Chang, S. Shin, J.-S. Rhee und J.-G. Pan. (1999).** Acetate metabolism in a *pta* mutant of *Escherichia coli* W3110: Importance of maintaining acetyl coenzyme a flux for growth and survival. *J. Bacteriol.* 181(21): 6656–6663.

- Y.-Y. Chang, A.-Y. Wang und J. E. Cronan Jr. (1994).** Expression of *Escherichia coli* pyruvate oxidase (Poxb) depends on the sigma factor encoded by the *rpoS* (*katF*) gene. *Mol. Microbiol.* 11: 1019–1028.
- Y.-P. Chao und J. C. Liao. (1993).** Alteration of growth yield by overexpression of phosphoenolpyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in *Escherichia coli*. *Appl. Env. Microbiol.* 59(12): 4261–4265.
- Y.-P. Chao, R. Patnaik, W. D. Roof, R. F. Young und J. C. Liao. (1993).** Control of gluconeogenic growth by *pps* and *pck* in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175 (21): 6939–6944.
- A. Chapman-Smith und J. E. Cronan Jr. (1999).** The enzymatic biotinylation of proteins: a post-translational modification of exceptional specificity. *TIBS.* 24: 359–363.
- H.-C. Chen, C.-F. Hwang und D.-G. Mou. (1994).** High-density *Escherichia coli* cultivation process for hyperexpression of recombinant porcine growth hormone. *Enzyme Microb. Technol.* 14: 321–326.
- R. Chen, V. Hatzimanikatis, W. M. G. J. Yap, P. W. Postma und J. E. Bailey. (1997).** Metabolic consequences of phosphotransferase (PTS) mutation in a phenylalanine producing recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* 13: 768–775.
- N. Chester und D. R. Marshak. (1993).** Dimethyl sulfoxid-mediated primer t_m reduction: a method for analyzing the role of renaturation temperature in polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 209: 284–290.
- G. Chotani, T. Dodge, A. Hsu, M. Kumar, R. LaDuca, D. Trimbur, W. Weyler und K. Sanford. (2000).** The commercial production of chemicals using pathway engineering. *Biochim. Biophys. Acta.* 1543: 434–455.
- C.-H. Chou, G. N. Bennett und K.-Y. San. (1994).** Effect of modified glucose uptake using genetic engineering techniques on high-level recombinant protein production in *Escherichia coli* dense cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 44: 952–960.

- J. E. Cronan Jr.** (1990). Biotination of proteins *in vivo*. A post-translational modification to label, purify and study proteins. *J. Biol. Chem.* 165: 10327–10333.
- J. E. Cronan Jr. und D. LaPorte.** (1996). Tricarboxylic acid cycle and glyoxylate bypass. IN: F.C. Neidhardt. *Escherichia coli* and *Salmonella* - Cellular and Molecular Biology. ASM Press, Washington D.C. volume 1. 2nd edition. chapter 16: pages 206–217.
- J. Delgado und J. C. Liao.** (1997). Inverse flux analysis for reduction of acetate excretion in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* 13: 361–367.
- K. A. Dell und J. W. Frost.** (1993). Identification and removal of impediments to biocatalytic synthesis of aromatics from D-glucose: Rate-limiting enzymes in the common pathway of aromatic amino acid biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 115: 11581–11589.
- E. Demoll.** (1996). Biosynthesis of biotin and lipoic acid. IN: F.C. Neidhardt. *Escherichia coli* and *Salmonella* - Cellular and Molecular Biology. ASM Press, Washington D.C. volume 1. 2nd edition. chapter 46: pages 704–709.
- J. C. Diaz-Ricci, L. Regan und J. E. Bailey.** (1991). Effect of alteration of the acetic acid synthesis pathway on the fermentation pattern of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 38: 1318–1324.
- B. Dixon.** (1994). Power unseen: How microbes rule the world. W. H. Freeman; Spektrum, Oxford, New York.
- W. J. Dower, J. F. Miller und C. W. Ragsdale.** (1988). High efficiency transformation of *Escherichia coli* by high voltage electroporation. *Nucl. Acids Res.* 16: 6127–6145.
- K. M. Draths und J. W. Frost.** (1990). Synthesis using plasmid-based biocatalysis: Plasmid assembly and 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate production. *J. Am. Chem. Soc.* 112: 1657–1659.
- K. M. Draths und J. W. Frost.** (1994). Environmentally compatible synthesis of adipic acid. *J. Am. Chem. Soc.* 116: 399–400.

- K. M. Draths und J. W. Frost. (1995).** Environmentally compatible synthesis of catechol from D-glucose. *J. Am. Chem. Soc.* 117: 2395–2400.
- K. M. Draths, D. R. Knop und J. W. Frost. (1999).** Shikimic acid and quinic acid: Replacing isolation from plant sources with recombinant microbial biocatalysis. *J. Am. Chem. Soc.* 121: 1603–1604.
- K. M. Draths, D. L. Pompliano, D. L. Conley, J. W. Frost, A. Berry, G. L. Disbrow, R. J. Staversky und J. C. Lievense. (1992).** Biocatalytic synthesis of aromatics from D-glucose: The role of transketolase. *J. Am. Chem. Soc.* 114: 3956–3962.
- M. F. Dunn, G. Araiza und T. M. Finan. (2001).** Cloning and characterization of the pyruvate carboxylase from *Sinorhizobium meliloti* Rm1021. *Arch. Microbiol.* 176: 355–363.
- M. F. Dunn, S. Encarnacion, G. Araiza, M. C. Vargas, A. Davalos, H. Peralta, Y. Mora und J. Mora. (1996).** Pyruvate carboxylase from *Rhizobium etli*: Mutant characterization, nucleotide sequence, and physiological role. *J. Bacteriol.* 178(20): 5960–5970.
- E. M. T. El-Mansi und W. H. Holms. (1989).** Control of carbon flux to acetate excretion during growth of *E. coli* in batch and continuous culture. *J. Gen. Microbiol.* 135: 2875–2883.
- M. Emmerling, M. Dauner, A. Ponti, J. Fiaux, M. Hochuli, T. Szyperski, K. Wüthrich, J. E. Bailey und U. Sauer. (2002).** Metabolic flux responses to pyruvate kinase knockout in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 184(1): 152–164.
- W. R. Farmer und J. C. Liao. (1997).** Reduction of aerobic acetate production by *Escherichia coli*. *Appl. Env. Microbiol.* 63(8): 3205–3210.
- W. R. Farmer und J. C. Liao. (2000).** Improving lycopene production in *Escherichia coli* by engineering metabolic control. *Nat. Biotechnol.* 18: 533–537.
- W. R. Farmer und J. C. Liao. (2001).** Precursor balancing for metabolic engineering of lycopene production in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* 17: 57–61.

- C.-L. Flores und C. Gancedo. (1997).** Expression of PEP carboxylase from *Escherichia coli* complements the phenotypic effects of pyruvate carboxylase mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*. 412: 531–534.
- N. Flores, J. Xiao, A. Berry, F. Bolivar und F. Valle. (1996).** Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* 14: 620–623.
- D. G. Fraenkel. (1996).** Glycolysis. IN: F.C. Neidhardt. *Escherichia coli* and *Salmonella* - Cellular and Molecular Biology. ASM Press, Washington D.C. volume 1. 2nd edition. chapter 14: pages 189–198.
- J. W. Frost und K. M. Draths. (1995).** Biocatalytic synthesis of aromatics from D-glucose: Renewable microbial sources of aromatic compounds. *Annu. Rev. Microbiol.* 49: 557–559.
- J. W. Frost und J. R. Knowles. (1984).** 3-deoxy-D-arabino-heptulosonic acid 7-phosphate: Chemical synthesis and isolation from *Escherichia coli* auxotrophs. *Biochemistry*. 23: 4465–4469.
- J. W. Frost und J. Lievense. (1994).** Prospects for biocatalytic synthesis of aromatics in the 21st century. *New J. Chem.* 18: 341–348.
- P. Gay, D. Le Coq, M. Steinmetz, T. Berkelmann und C. I. Kado. (1985).** Positive selection procedure for entrapment of insertion sequence elements in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 164: 918–921.
- J. M. Gibson, P. S. Thomas, J. D. Thomas, J. L. Barker, S. S. Chandran, M. K. Harrup, K. M. Draths und J. W. Frost. (2001).** Benzene-free synthesis of phenol. *Angew. Chemie*. 113(10): 1999–2002.
- A. Goel, J.-W. Lee, M. M. Domach und M. M. Ataai. (1995).** Suppressed acid formation by cofeeding glucose and citrate in bacillus cultures: Emerge of pyruvate kinase as a potential metabolic engineering site. *Biotechnol. Prog.* 11: 380–386.

- R. R. Gokarn, M. A. Eiteman und E. Altman. (1998).** Expression of pyruvate carboxylase enhances succinate production in *Escherichia coli* without affecting glucose uptake. *Biotechnology Letters*. 20(8): 795–798.
- R. R. Gokarn, M. A. Eiteman und E. Altman. (2000).** Metabolic analysis of *Escherichia coli* in the presence and absence of the carboxylating enzymes phosphoenolpyruvate carboxylase and pyruvate carboxylase. *Appl. Env. Microbiol.* 66(5): 1844–1850.
- R. R. Gokarn, J. D. Evans, J. R. Walker, S. A. Martin, M. A. Eiteman und E. Altman. (2001).** The physiological effects and metabolic alterations caused by the expression of *Rhizobium etli* pyruvate carboxylase in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 188–195.
- G. Gosset, J. Yong-Xiao und A. Berry. (1996).** A direct comparison of approaches for increasing carbon flow to aromatic biosynthesis in *Escherichia coli*. *J. Ind. Microbiol.* 17: 47–52.
- G. Gottschalk. (1985).** Bacterial metabolism. Springer, New York. 2nd edition.
- N. J. Grinter. (1998).** Developing an l-phenylalanine process. *ChemTech*. July: 33–37.
- M. Gubler, M. Jetten, S. H. Lee und A. J. Sinskey. (1994).** Effects of phosphoenolpyruvate carboxylase deficiency on metabolism and lysine production in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40: 857–863.
- D. Hanahan. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557–580.
- J. Hennig, G. Kern, H. Neef, M. Spinka, H. Bisswanger und G. Hübner. (1997).** Molecular mechanism of the pyruvate dehydrogenase complex from *E. coli*. *Biochemistry*. 36 (50): 15772–15779.
- H. Holms. (1996).** Flux analysis and control of the central metabolic pathways in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* 19: 85–116.

- W. H. Holms. (1986).** The central metabolic pathways of *Escherichia coli*: Relationship between flux and control at a branch point, efficiency of conversion to biomass, and excretion of acetate. IN: Horecker, B. L. and Stadtman, E. R. Current Topics in Cellular Regulation, Academic Press. volume 28. pages 69–105.
- S. H. Hong und S. Y. Lee. (2001).** Metabolic flux analysis for succinic acid production by recombinant *Escherichia coli* with amplified malic enzyme activity. *Biotechnol. Bioeng.* 74: 89–95.
- J. P. Horwitz, J. Chua, R. J. Curby, A. J. Tomson, M. A. DaRooge, B. E. Fisher, J. Mauricio und I. Klundt. (1964).** Substrates for cytochemical demonstration of enzyme activity. I. Some substituted 3-indoyl- β -d-glycopyranosides. *J. Med. Chem.* 7: 574.
- H. Ibelgauf. (1993).** Gentechnologie von A bis Z. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim. 1st edition.
- L. O. Ingram und T. Conway. (1988).** Expression of different levels of ethanologenic enzymes from *Zymomonas mobilis* in recombinant strains of *Escherichia coli*. *Appl. Env. Microbiol.* 5(2): 397–404.
- N. Irani, M. Wirth, J. van den Heuvel und R. Wagner. (1999).** Improvement of the primary metabolism of cell cultures by introducing a new cytoplasmic pyruvate carboxylase reaction. *Biotechnol. Bioeng.* 66: 238–246.
- K. Izui, M. Taguchi, M. Morikawa und H. Katsuki. (1981).** Regulation of *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate carboxylase by multiple effectors *in vivo*. Kinetic studies with a reaction system containing physiological concentrations of ligands. *J. Biochem.* 90: 1321–1331.
- M. S. M. Jetten, M. A. Pitoc, M. T. Follettie und A. J. Sinskey. (1994).** Regulation of phosphoenolpyruvate and oxaloacetate-converting enzymes in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41: 47–52.
- S. Jitrapakdee und J. C. Wallace. (1999).** Structure, function and regulation of pyruvate carboxylase. *Biochem. J.* 340: 1–16.

- R. Jossek, J. Bongaerts und G. A. Sprenger. (2001).** Characterization of a new feedback-resistant 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase AroF of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*. 202: 145–148.
- D. Kessler und J. Knappe. (1996).** Anaerobic dissimilation of pyruvate. IN: F.C. Neidhardt. *Escherichia coli* and *Salmonella* - Cellular and Molecular Biology. ASM Press, Washington D.C. volume 1. 2nd edition. chapter 15: pages 199–205.
- S. Kjelleberg. (1993).** Starvation in bacteria. Plenum Press, New York und London.
- K. B. Konstantinov, N. Nishio, T. Seki und T. Yoshida. (1991).** Physiologically motivated strategies for control of the fed-batch cultivation of recombinant *Escherichia coli* for phenylalanine production. *J. Ferm. Bioeng.* 71(5): 350–355.
- K. B. Konstantinov und T. Yoshida. (1992).** The way to adequate control of microbial processes passes via real-time knowledge-based supervision. *J. Biotechnol.* 24: 33–51.
- H. L. Kornberg. (1966).** Anaplerotic sequences and their role in metabolism. IN: Campbell, P. N. and Greville, G. D. (eds). *Essays in Biochemistry*. Academic Press, N. Y., volume 2. chapter 1: pages 1–31.
- H. L. Kornberg und R. E. Reeves. (1972).** Inducible phosphoenolpyruvate-dependent hexose phosphotransferase activities in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 128: 1339–1344.
- D. Kotlarz, H. Garreau und H. Buc. (1975).** Regulation of the amount and of the activity of phosphofructokinases and pyruvate kinases in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* 381: 257–268.
- M. Krämer. (2000).** Untersuchungen zum Einfluß erhöhter Bereitstellung von Erythrose-4-Phosphat und Phosphoenolpyruvat auf den Kohlenstofffluss in den Aromatenbiosyntheseweg von *Escherichia coli*. Berichte des Forschungszentrums Jülich.
- M. Krämer, M. Karutz, G. Sprenger und H. Sahm. (1999).** Microbial preparation of substances from aromatic metabolism. *III. WO 99/55877.*

- U. K. Laemmli. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680–685.
- J. Lee, A. Goel, M. M. Ataii und M. M. Domach. (1997).** Supply-side analysis of growth of *Bacillus subtilis* on glucose-citrate medium: Feasible network alternatives and yield optimality. *Appl. Env. Microbiol.* 63: 710–718.
- W. Leuchtenberger. (1996).** Amino acids- Technical production and use. IN: H. J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. Stadler, M. Roehr (eds). *Biotechnology*. VCH, Weinheim. volume 6. pages 465–502.
- K. Li und J. W. Frost. (1999).** Microbial synthesis of 3-dehydroshikimic acid: A comparative analysis of D-xylose, L-arabinose and D-glucose carbon sources. *Biotechnol. Prog.* 15: 876–883.
- K. Li, M. R. Mikola, K. M. Draths, R. M. Worden und J. W. Frost. (1999).** Fed-batch fermentor synthesis of 3-dehydroshikimic acid using recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 64(1): 61–73.
- S.-J. Li und E. Jr. Cronan. (1992).** The gene encoding the biotin carboxylase subunit of *Escherichia coli* acetyl-CoA carboxylase. *J. Biol. Chem.* 267(2): 855–863.
- Y. Li, J. Chen und S.-Y. Lun. (2001).** Biotechnological production of pyruvic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57: 451–459.
- J. C. Liao, S.-Y. Hou und Y.-P. Chao. (1996).** Pathway analysis, engineering, and physiological considerations for redirecting central metabolism. *Biotechnol. Bioeng.* 52: 129–140.
- E. C. C. Lin. (1996).** Dissimilatory pathways for sugars, polyols and carboxylates. IN: F.C. Neidhardt. *Escherichia coli* and *Salmonella* - Cellular and Molecular Biology. ASM Press, Washington D.C. volume 1. 2nd edition. chapter 20: pages 307–342.
- A. J. Link, D. Phillips und G. M. Church. (1997).** Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: Application to open reading frame characterization. *J. Bacteriol.* 179(20): 6228–6237.

- J. Lu und J. C. Liao. (1997).** Metabolic engineering and control analysis for production of aromatics: Role of transaldolase. *Biotechnol. Bioeng.* 53: 132–138.
- G. W. Luli und W. R. Strohl. (1990).** Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. *Appl. Env. Microbiol.* 56(4): 1004–1011.
- A. Marx. (1997).** Bestimmung des Kohlenstoffflusses im Zentralstoffwechsel von *Corynebacterium glutamicum* mittels ^{13}C -Isotopenanalyse. Berichte des Forschungszentrums Jülich.
- D. Mascarenhas, D. J. Ashworth und C. S. Chen. (1991).** Deletion of *pgi* alters tryptophan biosynthesis in a genetically engineered strain of *Escherichia coli*. *Appl. Env. Microbiol.* 57(10): 2995–2999.
- C. R. Meyer, P. Rustin und R. T. Wedding. (1988).** A simple and accurate spectrophotometric assay for phosphoenolpyruvate carboxylase activity. *Plant Physiol.* 86: 325–328.
- J. E. Miller, K. C. Backmann, M. J. O'Connor und R. T. Hatch. (1987).** Production of phenylalanine and organic acids by phosphoenolpyruvate carboxylase-deficient mutants of *Escherichia coli*. *J. Ind. Microbiol.* 2: 143–149.
- J. H. Miller. (1992).** A short course in bacterial genetics. A laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- M. Morikawa, K. Izui, M. Taguchi und H. Katsuki. (1980).** Regulation of *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate carboxylase by multiple effectors *in vivo*. *J. Biochem.* 87: 441–449.
- B. Mukhopadhyay, V. Patel und R. S. Wolfe. (2000).** A stable archaeal pyruvate carboxylase from the hyperthermophile *Methanococcus jannaschii*. *Arch. Microbiol.* 174: 406–414.

- B. Mukhopadhyay und E. Purwantini. (2000).** Pyruvate carboxylase from *Mycobacterium smegmatis*: stabilization, rapid purification, molecular and biochemical characterization and regulation of the cellular level. *Biochim. Biophys. Acta.* 1475: 191–206.
- B. Mukhopadhyay, S. F. Stoddard und R. S. Wolfe. (1998).** Purification, regulation, and molecular and biochemical characterization of pyruvate carboxylase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* strain ΔH^* . *J. Biol. Chem.* 273(9): 5155–5166.
- K. B. Mullis und F. A. Faloona. (1987).** Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology.* 155: 335–350.
- D. Murdock, B. D. Ensley, C. Serdar und M. Thalen. (1993).** Construction of metabolic operons catalyzing the *de novo* biosynthesis of indigo in *Escherichia coli*. *Biotechnology.* 11: 381–386.
- F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham und M. Schaechter. (1990).** Physiology of the bacterial cell. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- J. Nielsen. (2001).** Metabolic engineering. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55: 263–283.
- J. Nielsen und J. Villadsen. (1994).** Bioreaction engineering principles. Plenum Press, New York and London.
- K. Ohta, D. S. Beall, J. T. Mejia, K. T. Shanmugam und L. O. Ingram. (1991).** Genetic improvement of *Escherichia coli* for ethanol production: Chromosomal integration of *Zymomonas mobilis* genes encoding pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase II. *Appl. Env. Microbiol.* 57(4): 893–900.
- K. Ohta, T. Shibui, Y. Morimoto, S. Iijima und T. Kobayashi. (1993).** High level production of human proapo A-J by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *J. Ferment. Bioeng.* 75: 155–157.
- G. P. Pan, J. S. Rhee und J. M. Lebeault. (1987).** Physiological constraints in increasing biomass concentration of *Escherichia coli* B in fed-batch culture. *Biotechnol. Letters.* 9: 89–94.

- S. J. Park, G. Chao und R. P. Gunsalus. (1997).** Aerobic regulation of the *sucABCD* genes of *Escherichia coli*, which encode alpha-ketoglutarate dehydrogenase and succinyl coenzyme A synthetase: roles of ArcA, Fnr, and the upstream *sdhCDAB* promoter. *J. Bacteriol.* 179: 4138–4112.
- R. Patnaik und J. C. Liao. (1994).** Engineering of *Escherichia coli* central metabolism for aromatic metabolite production with near theoretical yield. *Appl. Env. Microbiol.* 60: 3903–3908.
- R. Patnaik, W. D. Roof, R. F. Young und J. C. Laio. (1992).** Stimulation of glucose catabolism in *Escherichia coli* by a potential futile cycle. *J. Bacteriol.* 174: 7527–7532.
- R. Patnaik, R. G. Spitzer und J. C. Liao. (1995).** Pathway engineering for production of aromatics in *Escherichia coli*: Confirmation of stoichiometric analysis by independent modulation of AroG, TktA, and Pps activities. *Biotechnol. Bioeng.* 46(4): 361–370.
- J. Payne und J. G. Morris. (1969).** Pyruvate carboxylase in *Rhodopseudomonas spheroides*. *J. Gen. Microbiol.* 59: 97–101.
- P. Peters-Wendisch. (1996).** Anaplerotische Reaktionen in *Corynebacterium glutamicum*: Untersuchungen zur Bedeutung der PEP-Carboxylase und der Pyruvat-carboxylase im Zentralstoffwechsel und bei der Aminosäureproduktion. Berichte des Forschungszentrums Jülich.
- P. G. Peters-Wendisch, B. Schiel, V. F. Wendisch, E. Katsoulidis, B. Möckel, H. Sahm und B. J. Eikmanns. (2001).** Pyruvate carboxylase is a major bottleneck for glutamate and lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3(2): 295–300.
- P. G. Peters-Wendisch, V. F. Wendisch, S. Paul, B. J. Eikmanns und H. Sahm. (1997).** Pyruvate carboxylase as an anaplerotic enzyme in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology.* 143: 1095–1103.

- S. Petersen.** (2001). Untersuchungen zur *in vivo* Aktivität anaplerotischer Stoffwechselwege in *Corynebacterium glutamicum* mittels ^{13}C -Markierungstechnik. Berichte des Forschungszentrums Jülich.
- S. Petersen, A. A. de Graaf, L. Eggeling, M. Möllney, W. Wiechert und H. Sahm.** (2000). *In Vivo* quantification of parallel and bidirectional fluxes in the anaplerosis of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biol. Chem.* 275: 35932–35941.
- S. Petersen, C. Mack, A. A. de Graaf, C. Riedel, B. J. Eikmanns und H. Sahm.** (2001). Metabolic consequences of altered phosphoenolpyruvate carboxykinase activity in *Corynebacterium glutamicum* reveal anaplerotic regulation mechanisms *in vivo*. *Metabolic Engineering*. 3: 344–361.
- A. J. Pittard.** (1996). Biosynthesis of the aromatic amino acids. IN: F.C. Neidhardt. *Escherichia coli* and *Salmonella* - Cellular and Molecular Biology. ASM Press, Washington D.C. volume 1. 2nd edition. chapter 28: pages 458–481.
- J. Pittard und B. J. Wallace.** (1966). Distribution and function of genes concerned with aromatic biosynthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 91: 1494–1508.
- E. Ponce.** (1999). Effect of growth rate reduction and genetic modifications on acetate accumulation and biomass yields in *Escherichia coli*. *J. Biosci. Bioeng.* 87: 775–780.
- E. Ponce, N. Flores, A. Martinez, F. Valle und F. Bolivar.** (1995). Cloning of the two pyruvate kinase isoenzyme structural genes from *Escherichia coli*: the relative roles of these isoenzymes in pyruvate biosynthesis. *J. Bacteriol.* 177(19): 5719–5722.
- P. W. Postma, J. W. Lengeler und G. R. Jacobson.** (1996). Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems. IN: F.C. Neidhardt. *Escherichia coli* and *Salmonella* - Cellular and Molecular Biology. ASM Press, Washington D.C. volume 1. 2nd edition. chapter 75: pages 1149–1174.
- J. M. Pousseygur, P. Faik und H. L. Kornberg.** (1974). Utilization of gluconate by *Escherichia coli*. Uptake of D-gluconate by a mutant impaired in gluconate kinase activity and by membrane vesicles derived therefrom. *Biochem. J.* 140(2): 193–203.

- T. M. Ramseier, S. Bledig, V. Michotey, R. Feghali und M. H. Saier Jr. (1995).** The global regulatory protein FruR modulates the direction of carbon flow in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 16(6): 1157–1169.
- N. A. Sabnis, H. Yang und T. Romeo. (1995).** Pleiotropic regulation of the central carbohydrate metabolism in *Escherichia coli* via the gene *csrA*. *J. Biol. Chem.* 270 (49): 29096–29104.
- M. H. Jr. Saier. (1998).** Multiple mechanisms controlling carbon metabolism in bacteria. *Biotechnol. Bioeng.* 58(2,3): 170–174.
- M. H. Jr. Saier und A. M. Chin. (1990).** Energetics of the bacterial phosphotransferasesystem in sugar transport and regulation of carbon metabolism. IN: Krulwich, T. A. The Bacteria. Academic Press, New York. volume 12, Bacterial Energetics.
- M. H. Jr. Saier, T. M. Ramseier und J. Reizer. (1996).** Regulation of carbon utilization. IN: F.C. Neidhardt. *Escherichia coli* and *Salmonella* - Cellular and Molecular Biology. ASM Press, Washington D.C. volume 1. 2nd edition. chapter 85: pages 1325–1343.
- J. Sambrook, E. F. Fritsch und T. Maniatis. (1989).** Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2nd edition.
- C. Sanville Millard, Y.-P. Chao, J. C. Liao und M. I. Donnelly. (1996).** Enhanced production of succinic acid by overexpression of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Escherichia coli*. *Appl. Env. Microbiol.* 62(5): 1808–1810.
- U. Sauer, D. R. Lasko, J. Fiaux, M. Hochuli, R. Glaser, T. Szyperski, K. Wüthrich und J. E. Bailey. (1999).** Metabolic flux ratio analysis of genetic and environmental modulations of *Escherichia coli* central carbon metabolism. *J. Bacteriol.* 181(21): 6679–6688.
- H. G. Schlegel. (1992).** Allgemeine Mikrobiologie. Thieme Verlag Stuttgart. 7nd edition.
- R. Schoner und K. M. Hermann. (1976).** 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase. *J. Biol. Chem.* 251(18): 5440–5447.

- M. C. Scrutton und M. R. Young. (1972).** Pyruvate carboxylase. IN: Boyer, P. D. The Enzymes . Academic Press, New York , London. volume VI. 3rd edition. chapter 1: pages 1–35.
- J. M. Sedivy, F. Daldal und D. G. Fraenkel. (1984).** Fructose biphosphatase of *Escherichia coli*: Cloning of the structural gene and preparation of a chromosomal deletion. *J. Bacteriol.* 158: 1048–1053.
- N. Shimizu, S. Fukuzono, K. Fujimori, N. Nishimura und Y. Odawara. (1988).** Fed-batch cultures of recombinant *Escherichia coli* with inhibitory substance monitoring. *J. Ferment. Technol.* 66: 187–191.
- R. Siguenza, N. Flores, G. Hernandez, A. Martinez, F. Bolivar und F. Valle. (1999).** Kinetic characterization in batch and continuous culture of *Escherichia coli* mutants affected in phosphoenolpyruvate metabolism: differences in acetic acid production. *W. J. Microbiol. Biotechnol.* 15: 587–592.
- P. A. Smith, B. A. Tripp, E. A. DiBlasio-Smith, Z. Lu, E. R. LaVallie und J. M. McCoy. (1998).** A plasmid expression system for quantitative *in vivo* biotinylation of thioredoxin fusion proteins in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research.* 26: 1414–1420.
- G. Sprenger, R. Siewe, M. Karutz und T. Sonke. (1998a).** Microbial preparation of substances from aromatic metabolism. *I. WO 98/18936.*
- G. Sprenger, R. Siewe, H. Sahm, M. Karutz und T. Sonke. (1998b).** Microbial preparation of substances from aromatic metabolism. *II. WO 98/18937.*
- P. R. Srinivasan und D. B. Sprinson. (April 1959).** 2-keto-3-deoxy-D-arabo-heptonic acid 7-phosphate synthetase. *J. Biol. Chem.* 234(4): 716–722.
- J. R. Swartz. (1996).** *Escherichia coli* recombinant DNA technology. IN: F.C. Neidhardt. *Escherichia coli* and *Salmonella* - Cellular and Molecular Biology. ASM Press, Washington D.C. volume 2. 2nd edition. chapter 108: pages 1693–1712.
- S. Tanaka, S. A. Lerner und E. C. C. Lin. (1967).** Replacement of a phosphoenolpyruvate dependent phosphotransferase by a nicotinamide adenine dinucleotide-linked dehydrogenase for the utilization of mannitol. *J. Bacteriol.* 93: 642–648.

- M. Tatarko und T. Romeo. (2001).** Disruption of a global regulatory gene to enhance central carbon flux into phenylalanine biosynthesis in *Escherichia coli*. *Current Microbiology*. 43: 26–32.
- Y. Tilg. (2002).** Lipidsynthese in *Corynebacterium glutamicum*: Genetische und biochemische untersuchungen zu Acyl-CoA Carboxylasen. Berichte des Forschungszentrums Jülich.
- J. Tucker und R. Grisshammer. (1996).** Purification of a rat neurotensin receptor expressed in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 317: 891–899.
- A. Ullman, F. Jacob und J. Monod. (1967).** Characterization by *in vitro* complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the β -galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 24: 339.
- D. Uy, S. Delaunay, J.-M. Engasser und J.-L. Goergen. (1999).** A method for the determination of pyruvate carboxylase activity during the glutamic acid fermentation with *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Microbiological Methods*. 39: 91–96.
- F. Valle, E. Munoz, E. Ponce, N. Flores und F. Bolivar. (1996).** Basic and applied aspects of metabolic diversity: the phosphoenolpyruvate node. *J. Ind. Microbiol.* 17: 458–462.
- G. N. Vemuri, M. A. Eiteman und E. Altman. (2002).** Effects of growth mode and pyruvate carboxylase on succinic acid production by metabolically engineered strains of *Escherichia coli*. *Appl. Env. Microbiol.* 68(4): 1715–1727.
- J. C. Wallace. (1985).** Distribution and biological functions of pyruvate carboxylase in nature. IN: Pyruvate Carboxylase. Keech, D. B. und Wallace, J. C. (eds). CRC Press, Boca Raton USA. pages 5–63.
- E. S. Wurtele und B. J. Nikolau. (1990).** Plants contain multiple biotin enzymes: discovery of 3-methylcrotonyl CoA carboxylase, propionyl CoA carboxylase and pyruvate carboxylase in the plant kingdom. *Arch. Biochem. Biophys.* 278: 179–186.

- L. Xie, S. A. Lee, B. M. Hanel, M. A. Eiteman und E. Altman. (2001).** Anaerobic fermentation of *Salmonella typhimurium* with and without pyruvate carboxylase. *Biotechnology Letters*. 23: 111–117.
- T. Zeppenfeld, C. Larisch, J. W. Lengeler und K. Jahreis. (2000).** Glucose transporter mutants of *Escherichia coli* K-12 with changes in substrate recognition of IICB^{Glc} and induction behaviour of the *ptsG* gene. *J. Bacteriol.* 182(16): 4443–4452.
- T. Zhu, C. Phalakornkule, R. R. Koepsel, M. M. Domach und M. M. Ataai. (2001).** Cell growth and by-product formation in a pyruvate kinase mutant of *E. coli*. *Biotechnol. Prog.* 17: 624–628.

Danksagung

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

Herrn Prof. Dr. G. A. Sprenger danke ich für die Überlassung des Themas, seine stete Diskussionsbereitschaft sowie seine Ratschläge und Anmerkungen, die massgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. P. Westhoff danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Herrn Prof. Dr. H. Sahm danke ich für die guten Arbeitsbedingungen und sein Interesse am Fortgang der Arbeit.

Frau Dr. Petra Peters-Wendisch sowie Herrn Prof. Dr. B. Eikmanns danke ich für die Überlassung des Pyruvatcarboxylasegens von *C. glutamicum*. Frau Dr. Peters-Wendisch danke ich ausserdem für viele aufschlussreiche Gespräche und Anregungen für den Umgang mit Pyc.

Dr. Ulrike Müller und Dr. Johannes Bongaerts danke ich für die kritische Durchsicht dieses Manuskripts und die vielen hilfreichen Diskussionen.

Ein grosses Dankeschön geht an das „Sixfors-Dreamteam“ Dipl. Ing. Andrea Kreutzer, Dipl. Ing. Melanie Rüping und Marcel Zimmermann für die gute Zusammenarbeit bei allen 54 Fermentationen.

Heidi Haase-Reiff und Dipl. Ing. Susanne Kremer gilt mein besonderer Dank für die Durchführung der HPLC-Analytik.

Meinen Labornachbarinnen Natascha Blaudeck und Melanie Schürmann danke ich für die vielen wertvollen Tipps, ohne die ich bei meinen ersten Schritten in der Molekularbiologie vermutlich nicht weit gekommen wäre... Und auch bei den weiteren (auch ehemaligen) Mitgliedern der AG Sprenger, Peter Kreutzenbeck, Sandra Johnen, Ulli Degner, Sonja Hartmann, Martin Schürmann, Ralf Jossek, Regine Halbach und Marco Krämer möchte ich mich für das tolle Arbeitsklima herzlich bedanken.

Allen Mitarbeitern der Institute für Biotechnologie 1 und 2 danke ich für Ihre ständige Hilfsbereitschaft und die nette Atmosphäre.

Bei allen (auch ehemaligen) Mitgliedern des „FAME-Teams“ von IBT und DSM-Biotech bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Mann Dr.-Ing. Tibor Anderlei für sein Verständnis, seine Geduld und seine Unterstützung.

Diese Arbeit wurde durch Mittel des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) im Rahmen des BioRegio Programms Rheinland gefördert (Projekt Nr. 0311644).

Forschungszentrum Jülich
in der Helmholtz-Gemeinschaft



Jül-4016
Dezember 2002
ISSN 0944-2952