



Institut für Biotechnologie

***Untersuchungen zum Einfluß erhöhter
Bereitstellung von Erythrose-4-Phosphat
und Phosphoenolpyruvat auf den
Kohlenstofffluß in den Aromatenbio-
syntheseweg von Escherichia coli***

Marco Krämer

***Untersuchungen zum Einfluß erhöhter
Bereitstellung von Erythrose-4-Phosphat
und Phosphoenolpyruvat auf den
Kohlenstofffluß in den Aromatenbio-
syntheseweg von Escherichia coli***

Marco Krämer

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3824
ISSN 0944-2952
Institut für Biotechnologie Jül-3824
D 61 (Diss., Düsseldorf, Univ. 2000)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek
D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland
☎ 02461/61-6102 · Telefax: 02461/61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Investigations on the influence of increased availability of erythrose-4-phosphate and phosphoenolpyruvate on the carbon flux into the aromatic amino acid pathway of *Escherichia coli*

In *Escherichia coli* wild-type strains carbon flux into the aromatic amino acid pathway is limited by the intermediates of central metabolism, erythrose-4-phosphate (E4P) and phosphoenolpyruvate (PEP). The effects of increased supply of E4P and PEP on the carbon flux into the aromatic amino acid pathway were investigated in *aroB* strains which were deregulated in the aromatic amino acid pathway by introduction and expression of a gene of a feedback-resistant 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate (DAHP)-synthase (*aroF^{fbr}*). Carbon flux was quantified by measuring excreted DAHP.

For increasing availability of E4P expression of the plasmid encoded genes transaldolase (*talB*), transketolase (*tktA*), and the combination of transaldolase and transketolase were increased in combination with increased expression of *aroF^{fbr}*. Increased expression of *talB* increased carbon flux into the aromatic amino acid pathway in correlation with higher specific activities of DAHP-synthases.

For increasing availability of PEP the phosphoenolpyruvate-phosphotransferase-system (PTS) was disrupted. Increased expression of the plasmid encoded genes of *aroF^{fbr}*, glucose facilitator (*glf*) and glucokinase (*glk*), both of *Zymomonas mobilis* increased carbon flux into the aromatic amino acid pathway. For increasing availability of both PEP and E4P, the genes *tktA*, *talB* and the operon of *tktA* and *talB* were combined with the previous genetic system. Overexpression of *talB* led to a further increase of carbon flux into the aromatic amino acid pathway. Increased expression of *talB* correlated with even more higher increased specific activities of DAHP-synthases.

A new glucose uptake and phosphorylation system was established in *E. coli* cells in order to increase availability of E4P and PEP by circumventing carbon flux from glycolysis into the pentose phosphate pathway. After introducing the genes of the glucose facilitator (*glf*), the glucose dehydrogenase of *Bacillus megaterium* (*gdhIV*) and a homologous gluconate kinase (*gntK*) growth of an *Escherichia coli* mutant without glucose uptake and phosphorylation system occurred. However expression of *glf*, *gdhIV*, *gntK* and *aroF^{fbr}* in a PTS⁻ strain led to a low carbon flux into the aromatic amino acid pathway.

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	1
II.	Material und Methoden	8
1.	Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide	8
2.	Chemikalien und Enzyme	12
3.	Nährmedien und Kultivierungsbedingungen	12
4.	Bestimmung von Biomasse	18
5.	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	18
6.	Bestimmung von Enzymaktivitäten	19
6.1	Herstellung zellfreier Rohextrakte	19
6.2	Bestimmung der Aktivität der Gluconatkinase	19
6.3	Bestimmung der Aktivität der Glucokinase	21
6.4	Bestimmung der Aktivität der Glucosedehydrogenase	21
6.5	Bestimmung der Aktivität der Transaldolase	22
6.6	Bestimmung der Aktivität der Transketolase	23
6.7	Bestimmung von Aktivitäten von 3-Desoxy-D-Arabino-Heptulosonat-7-Phosphat Synthasen	24
7.	Bakteriengenetische Techniken	25
7.1	Transformation von <i>E. coli</i>	25
7.2	Transduktion von <i>E. coli</i>	25
8.	Molekulargenetische Methoden	25
8.1	Isolierung von DNA	25
8.2	Restriktion von DNA	25
8.3	Oligonukleotide	26
8.4	Polymerase-Kettenreaktion	26

9.	Quantitative Bestimmung von Substraten und Produkten	26
9.1	Bestimmung von 3-Desoxy-Arabino-Heptulosonat-7-Phosphat (DAHP) oder 3-Desoxy-Arabino-Heptulosonat (DAH)	26
9.2	Fumarat, Acetat, Lactat, Pyruvat, Malat	28
9.3	Glucose	28
9.4	Gluconat	29
9.5	Methylglyoxal	29
III.	Ergebnisse	30
1.	Untersuchungen zur Erhöhung der Bereitstellung von Erythrose-4-Phosphat auf den Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg	30
1.1	Etablierung eines Systems zur Bestimmung des Kohlenstoffflusses in den Aromatenbiosyntheseweg	32
1.2	Erhöhung der Aktivität der Eingangsreaktion in der Aromatenbiosyntheseweg	35
1.3	Bestimmung des Kohlenstoffflusses in den Aromatenbiosyntheseweg nach Überexpression von <i>aroF^{br}</i>	36
1.4	Erhöhung der Verfügbarkeit von Erythrose-4-Phosphat	42
2.	Untersuchungen zur Erhöhung der Bereitstellung von Phosphoenolpyruvat auf den Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg	51
2.1	Untersuchungen in PTS ⁺ - Stämmen	51
2.2	Untersuchungen in PTS ⁻ - Stämmen	55
3.	Untersuchungen zur Erhöhung der Bereitstellung von Phosphoenolpyruvat und Erythrose-4-Phosphat auf den Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg	68
3.1	Untersuchungen in PTS ⁻ - Stämmen	68
3.2	Untersuchungen in PTS ⁺ - Stämmen	81
4.	Untersuchungen zur Erhöhung der Bereitstellung von Phosphoenolpyruvat und Erythrose-4-Phosphat auf den Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg durch Umleitung des Kohlenstoffflusses in den Pentose-Phosphat-Weg	85
4.1	Etablierung eines heterologen Glucosetransport- und Phosphorylierungssystems aus Glucosefacilitator, Glucosedehydrogenase und Gluconatkinase	86

4.2	Untersuchungen zum Einfluß des Stoffwechselweges über den Glucosefacilitator, der Glucosedehydrogenase und der Gluconatkinase auf den Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg	89
IV.	Diskussion	98
1.	Bestimmung des Kohlenstoffflusses in den Aromatenbiosyntheseweg	99
2.	Einfluß der Erhöhung der Bereitstellung von Erythrose-4-Phosphat auf den Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg	101
3.	Einfluß der Erhöhung der Bereitstellung von Phosphoenolpyruvat auf den Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg	106
4.	Einfluß der gleichzeitig erhöhten Bereitstellung von Phosphoenolpyruvat und Erythrose-4-Phosphat auf den Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg	113
5.	Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg durch Umlenkung des Kohlenstoffflusses über Glf, Gdh und GntK.	116
6.	Bedeutung der Eingangsreaktion für den Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg	120
V.	Zusammenfassung	124
VI.	Literaturverzeichnis	126

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
amp	Ampicillin
Aqua bidest	doppelt destilliertes Wasser
AroF	3-Desoxy-D-Arabino-Heptulose-7-Phosphat-Synthase durch Tyrosin inhibiert
<i>aroF^{fb}</i>	Gen einer feedback deregulierten 3-Desoxy-D-Arabino-Heptulose-7-Phosphat-Synthase (ursprünglich durch Tyrosin inhibiert)
<i>aroG</i>	Gen einer 3-Desoxy-D-Arabino-Heptulose-7-Phosphat-Synthase durch Phenylalanin inhibiert
AroG	3-Desoxy-D-Arabino-Heptulose-7-Phosphat-Synthase durch Phenylalanin inhibiert
<i>aroG^{fb}</i>	Gen einer feedback deregulierten 3-Desoxy-D-Arabino-Heptulose-7-Phosphat-Synthase (ursprünglich durch Phenylalanin inhibiert)
AS	Aminosäure(n)
ATCC	American type culture collection
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Bis-Tris-Propan	1,3-bis[tris(Hydroxymethyl)methylamino]propan
<i>bla</i>	Gen der β -Laktamase
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
c	Konzentration
<i>cat</i>	Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen
DAH / DAHP	3-Desoxy-D-Arabino-Heptulose / 3-Desoxy-D-Arabino-Heptulose-7-Phosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat (N steht für eines der Nukleoside A: Adenosin, C: Cytidin, G: Guanosin, T: Thymidin)
DTE	1,4-Dithioerythritol
DTT	1,4-Dithiothreitol
dw	Trockengewicht
E	Extinktion
E4P	Erythrose-4-Phosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ex	extern
g	Erdbeschleunigung
<i>gdh</i>	Gen der Glucosedehydrogenase IV von <i>Bacillus megaterium</i>
Gdh	Glucosedehydrogenase IV von <i>Bacillus megaterium</i>
<i>glf</i>	Gen des Glucosefacilitators von <i>Zymomonas mobilis</i>
GlF	Glucosefacilitator von <i>Zymomonas mobilis</i>
<i>glk_{zm}</i>	Gen der Glucokinase von <i>Zymomonas mobilis</i>
Glk _{zm}	Glucokinase von <i>Zymomonas mobilis</i>
<i>gntK</i>	Gen der Gluconatkinase von <i>E. coli</i>
GntK	Gluconatkinase von <i>E. coli</i>
h	Stunde
in	Intern
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasen

<i>lacZ</i>	β-Galaktosidase-Gen
L-Phe	L-Phenylalanin
L-Trp	L-Tryptophan
L-Tyr	L-Tyrosin
min	Minuten
NAD / NADH	Nikotinamidadenindinukleotid / reduziert
NADP / NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat / reduziert
nm	Wellenlänge
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEP	Phospho <i>enol</i> pyruvat
P _i	Anorganisches Phosphat
PQQ	Pyrrolochinidinchinon
PTS	Phospho <i>enol</i> pyruvat-Phosphotransferase-System
rpm	Umdrehung pro Minute
spez.	spezifisch
t	Zeit
Tab.	Tabelle
<i>tal</i>	Gen der Transaldolase B von <i>E. coli</i>
Tal	Transaldolase B von <i>E. coli</i>
<i>tet</i>	Tetrazyklinresistenzgen
TG	Trockengewicht
<i>tkl</i>	Gen der Transketolase A von <i>E. coli</i>
Tkt	Transketolase A von <i>E. coli</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit, Enzymeinheit
ÜNK	über Nacht Kultivierung

I. Einleitung

Escherichia coli gilt als einer der am besten untersuchten prokaryotischen Mikroorganismen und wird als Modellorganismus angesehen (Neidhardt *et al.*, 1996). *E. coli* wird auch biotechnologisch zur Produktion der aromatischen Aminosäuren L-Phenylalanin, L-Tyrosin und L-Tryptophan genutzt (Leuchtenberger, 1996). Die für Vertebraten essentiellen Aminosäuren L-Phenylalanin und L-Tryptophan werden als Futteradditive verwendet, wobei L-Tyrosin in Vertebraten enzymatisch durch Hydroxylierung von Phenylalanin entsteht (Herrmann, 1983).

Aromatische Aminosäuren bilden außerdem Ausgangsstoffe für weitere enzymatische oder chemische Synthesen. So kann L-Tryptophan für die Synthese von Indigo (Ensley *et al.*, 1983, Murdock *et al.*, 1993), L-Tyrosin für die Melaninproduktion verwendet werden (Della-Cioppa *et al.*, 1990). Der mengenmäßig größte Anteil der aromatischen Aminosäuren bildet jedoch das Phenylalanin, das überwiegend in der Produktion des künstlichen Süßstoffes Aspartam (L-Aspartyl-L-Phenylalaninmethylester) eingesetzt wird (Grinter, 1998). Die Weltmarktproduktion von Aspartam beträgt jährlich etwa 12000t.

Bisher stammen viele Produktionsstämme von Aminosäuren aus Selektionen nach ungerichteter Mutagenese und Verwendung von Antimetaboliten (Leuchtenberger, 1996). Für eine rationale Konstruktion von definierten Produktionsstämmen über „metabolic engineering“ ist eine exakte Kenntnis der beteiligten Stoffwechselwege, insbesondere des Aromatenbiosyntheseweges, des Zentralstoffwechselweges und ihrer Regulation wichtig (Bailey, 1991).

Aromatische Stoffwechselintermediate, die als Ausgangsprodukte von Biosynthesen zur Produktion der aromatischen Aminosäuren L-Phenylalanin, L-Tyrosin und L-Tryptophan führen, werden in *Escherichia coli* über den Shikimisäureweg (s. **Abbildung 1**) gebildet (Pittard, 1996). Aus der Glykolyse und dem Pentose-Phosphat-Weg stammen die Bausteine Phosphoenolpyruvat (PEP) und Erythrose-4-Phosphat (E4P), die in der Eingangsreaktion durch DAHP-Synthasen zu 3-Desoxy-D-Arabino-Heptulosonat-7-Phosphat (DAHP) kondensiert werden. Der weitere Weg verläuft über 7 Schritte vom DAHP über Shikimat bis zum Chorismat. Chorismat kann über 5 weitere Schritte weiter zu L-Tryptophan umgesetzt werden. Chorismat reagiert unter Katalyse von Chorismat-Mutase / Prephenat-Dehydrogenase

bzw. - Dehydratase zum Prephenat und auf dieser Stufe trennen sich die Wege zum L-Tyrosin bzw. L-Phenylalanin. In *Escherichia coli* werden neben den aromatischen Verbindungen L-Phenylalanin, L-Tyrosin und L-Tryptophan auch Ausgangsmetabolite für die Synthese von para-Aminobenzoesäure, Folsäure, Ubichinon, Menachinon und Enterochelin gebildet (Pittard *et al.*, 1996).

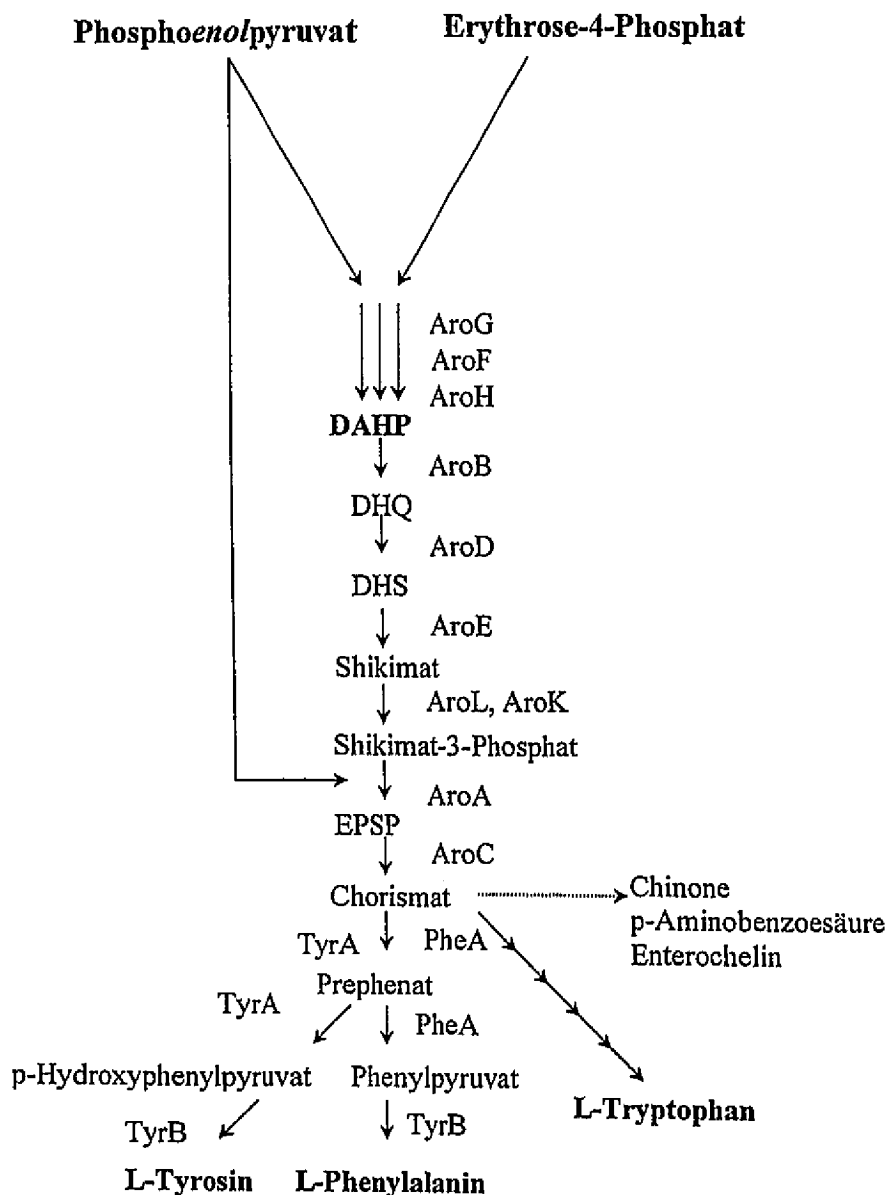


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Aromatenbiosyntheseweges (Shikimisäureweg) von *E. coli*.

DAHP: 3-Desoxy-D-Arabino-Heptulosonat-7-Phosphat; DHQ: 3-Dehydroquinat; DHS: 3-Dehydroshikimat; EPSP: 3-Enolpyruvoylshikimat-5-Phosphat. AroG, AroF, AroH: DAHP-Synthasen; AroB: 3-Dehydroquinat-Synthase; AroD: 3-Dehydroquinat-Dehydratase; AroE: Shikimat-Dehydrogenase; AroL: Shikimat-Kinase; AroA: 5-Enolpyruvoylshikimat-3-Phosphat-Synthase; AroC: Chorismat-Synthase; PheA: Chorismat-Mutase / Prephenat Dehydratase; TyrA: Chorismat-Mutase / Prephenat Dehydrogenase; TyrB: Transaminase.

Die Aromatenbiosynthese in *E. coli* ist wegen des großen energetischen Aufwandes der Synthesen, so wird bei der Produktion von 1 Mol L-Trp 5 Mol ATP verbraucht, stark und auf mehreren Ebenen reguliert (Neidhardt *et al.*, 1990). Neben der genetischen Regulation über Attenuation und Repression ist die Endprodukthemmung von Enzymen der wichtigste Mechanismus (Frost und Draths, 1995, Pittard, 1996). Diese Inhibierung betrifft vor allem die Synthese der Eingangsreaktion, die Bildung von DAHP. Inhibiert werden außerdem die Enzyme nach den Verzweigungspunkten bei Chorismat (Anthranilat Synthase) und Prephenat (Chorismat-Mutase, Prephenat- Dehydrogenase bzw. -Dehydratase).

In *E. coli* kodieren drei verschiedene Gene (*aroF*, *aroG* und *aroH*) Isoenzyme der DAHP-Synthase, wobei das AroG-Genprodukt in *E. coli* – Wildtyp 80% der Gesamtaktivität ausmacht (Tribe *et al.*, 1976, Pittard, 1996). AroG oder AroF werden bis zu 95 % durch L-Phenylalanin bzw. L-Tyrosin inhibiert, AroH bis zu 60% von Tryptophan. Für den Stofffluß in der Phenylalaninbiosynthese von *E. coli* wurden die Aktivitäten der Enzyme 3-Dehydroquinat-Synthase (AroB), Shikimatkinase II (AroL), 5-Enol-pyruvoyl-Shikimat-3-Phosphat-Synthase (AroA) und Chorismatsynthase (AroC) als weitere limitierende Schritte identifiziert (Dell und Frost, 1993).

Unterschiedliche Ansätze wurden durchgeführt, um die vielfältigen Kontrollmechanismen des Aromatenbiosyntheseweges aufzuheben und so die mikrobielle Produktion der aromatischen Aminosäuren zu verbessern. Dabei wurden durch chemische- oder UV-Mutagenese undefinierte Mutanten erzeugt und über den Einsatz von Antimetaboliten gescreent und selektioniert. Die präzisen genetischen Veränderungen waren im Einzelfall nicht immer erfaßbar. In Ergebnissen mit so erzeugten Phenylalaninproduktionsstämmen wurde gezeigt, daß die Feedbackresistenz der DAHP-Synthase und Prephenatdehydratase aufgehoben worden war (Backman *et al.*, 1990; Leuchtenberger, 1996).

Bisher wurden die spezifischen Schritte des Aromatenbiosyntheseweges bevorzugt untersucht und zur Produktion von aromatischen Aminosäuren optimiert (Liao *et al.*, 1996). Nachdem die Limitierungen im Aromatenstoffwechsel erkannt und aufgehoben worden sind, kann die Versorgung mit den Primärmetaboliten der Glykolyse und des Pentose-Phosphat-Weg (s. **Abbildung 2**), Erythrose-4-Phosphat und Phosphoenolpyruvat, begrenzend sein (Frost und Draths, 1995).

Es wurde gezeigt, daß die vermehrte Bereitstellung von E4P vorteilhaft für die Bildung des Eingangsmetaboliten DAHP und der aromatischen Aminosäuren ist (Draths und Frost, 1990;

Draths und Frost 1992). In einem *E. coli* - Stamm mit einem Defekt im Gen, das für die Phosphoglucoisomerase kodiert (*pgi*), wurde Tryptophan verstärkt gebildet, weil offenbar eine erhöhte Bildung von E4P über den oxidativen Pentose-Phosphat-Weg erzielt worden war (Mascarenhas *et al.*, 1991).

Zur Bestimmung des Kohlenstoffflusses aus dem Zentralstoffwechselweg (**Abbildung 2**) in den Aromatenbiosyntheseweg wurde letzterer nach der Eingangsreaktion unterbrochen und anhand der exkretierten Eingangsmetabolite DAH bzw. DAHP analysiert (Draths und Frost, 1990). Die Erhöhung der Aktivität der Transketolase durch Klonierung und Überexpression von *tktA* aus *E. coli* in Kombination mit einer Wildtyp DAHP-Synthase (AroF) oder einer deregulierten DAHP-Synthase führte zu einer erhöhten Produktion von DAHP (Draths und Frost, 1990, Dell und Frost, 1993, Draths und Frost, 1992), weil offensichtlich E4P für den Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg zuvor limitierend war (Patnaik *et al.* 1995).

Um Limitierungen von E4P zu überwinden, wurde auch die Expression des Gens der Transaldolase (*talB*) erhöht (Liao *et al.*, 1996, Lu *et al.*, 1997). In Kombination mit einer feedback-deregulierten DAHP-Synthase führte die erhöhte Expression der Transaldolase zu einer Steigerung der DAHP-Konzentration im Überstand, hatte jedoch keinen Einfluß auf die spezifische Ausbeute. Offensichtlich führte die erhöhte Expression der Transaldolase zu keiner Veränderung des Kohlenstoffflusses in den Aromatenbiosyntheseweg (Liao *et al.*, 1996). Dagegen wurde in einer anderen Arbeit nachgewiesen, daß sich nach Erhöhung der Expression der Transaldolase in Kombination mit einer feedback-deregulierten DAHP-Synthase die DAHP-Konzentration im Medium erhöhte, weil E4P für den Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg zuvor limitierend war (Lu *et al.*, 1996).

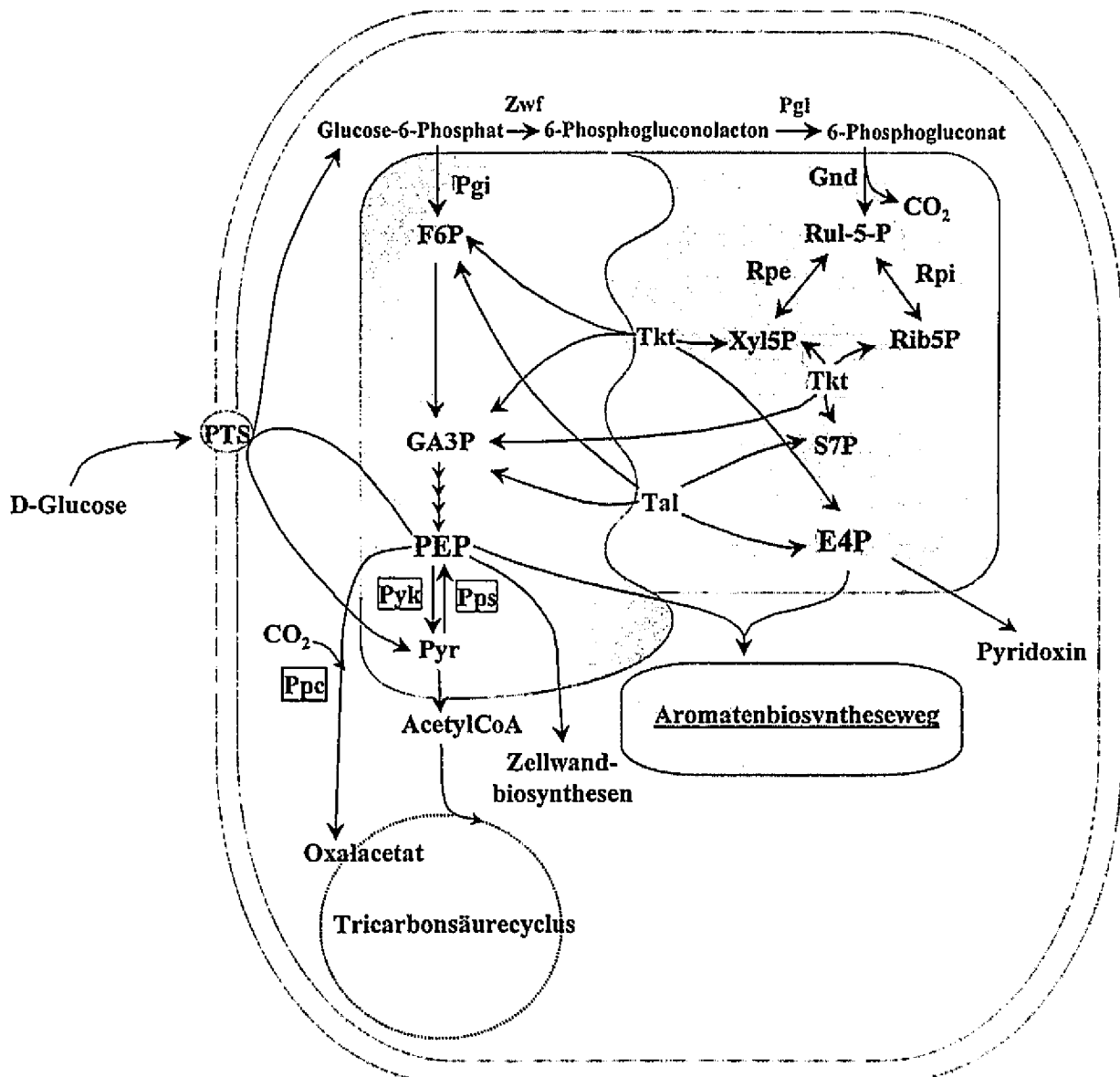


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Zentralstoffwechsels von *E. coli*.

PTS: Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferase-System, Zwf: Glucose-6-Phosphatdehydrogenase, Pgl: Phosphogluconolactonase, Gnd: 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Rpe: Ribulose-5-Phosphat-Epimerase, Rpi: Ribose-5-Phosphat-Isomerase, Tkt: Transketolase, Tal: Transaldolase, Pgi: Phosphoglucoisomerase, Ppc: PEP-Carboxylase, Pyk: Pyruvatkinase, Pps: PEP-Synthetase. PEP: Phosphoenolpyruvat, GA3P: Glycerinaldehyd-3-Phosphat, Ru5P: Ribulose-5-Phosphat, Rib5P: Ribose-5-Phosphat, Xu5P: Xylulose-5-Phosphat, F6P: Fructose-6-Phosphat, E4P: Erythrose-4-Phosphat, S7P: Sedoheptulose-7-Phosphat.

Neben der erhöhten Bereitstellung von E4P ist auch die erhöhte Bereitstellung von PEP von Vorteil für die Bildung des Eingangsmetaboliten und der aromatischen Aminosäuren (Patnaik *et al.*, 1995). Eine Steigerung der Verfügbarkeit von PEP wurde durch Ausschalten der beiden Pyruvatkinasen (Gosset *et al.*, 1996) oder durch Steigerung der Aktivität der PEP-Synthetase (Patnaik und Liao, 1994, Patnaik *et al.*, 1995) erreicht. Durch Ausschalten der PEP-

Carboxylase konnte der Fluß von PEP in den Tricarbonsäurecyclus unterbunden werden und führte so in Verbindung mit einer Überexpression der DAHP-Synthase (*aroF*) und einer feedback-resistenten Chorismat Mutase / Prephenat Dehydratase (*pheA*) zur Erhöhung der Produktion von Phenylalanin (Miller *et al.*, 1987).

In *Escherichia coli* wird beim Transport von Zuckern über das PEP-abhängige Zucker-Phosphotransferase-System (PTS) stöchiometrisch ein Mol PEP für die Aufnahme und zur Phosphorylierung von Glucose verbraucht (s. **Abbildung 2**) (Fraenkel, 1997; Chen *et al.*, 1997; Postma *et al.*, 1996). Diese PEP-Moleküle stehen somit nicht mehr für die Biosynthese von Aromaten zur Verfügung (Dell und Frost, 1993; Patnaik *et al.*, 1995).

Würde ein Transportsystem ausgeprägt werden, bei dem Glucose statt über das PEP-verbrauchende PTS-System über eine ATP-abhängige Kinase phosphoryliert wird, so könnte pro aufgenommenes Glucosemolekül ein PEP-Molekül gespart werden. Dies könnte die Verfügbarkeit von PEP erhöhen und ermöglichen, daß ein höherer Anteil des PEP für Biosynthesen in den Aromatenbiosyntheseweg gelenkt würde.

Glucose kann über PEP-unabhängige Glucoseaufnahme- und Phosphorylierungssysteme aufgenommen werden. So wurde durch Einbringen der Gene des heterologen Glucosefacilitators und der Glucokinase von *Zymomonas mobilis* eine Mutante von *E. coli*, die ein defektes Glucoseaufnahme und Phosphorylierungssystem aufwies, komplementiert (Snoep *et al.*, 1994, Weisser *et al.*, 1995): Die Mutanten konnten wieder Glucose verwerten.

Auch ist es möglich, daß Glucose über eine im Periplasma lokalisierte PQQ-abhängige Glucosedehydrogenase (Gdc) zu Gluconat oxidiert (Bouvet and Grimont, 1988) und über eine Gluconatkinase über 6-Phosphogluconat in den Entner-Doudoroff-Weg gelenkt werden kann (Fliege *et al.*, 1992). Zwar besitzt *E. coli* diese Glucosedehydrogenase, da jedoch PQQ von *E. coli* K-12 nicht gebildet wird, ist Glucosedehydrogenase in Wildtypzellen funktionell nicht aktiv (Adamowicz *et al.*, 1991).

Ein Nachteil bisheriger Untersuchungen war, daß vielfach mit nicht definierten Stämmen gearbeitet wurde, die durch ungerichtete Mutagenese gewonnen wurden und deren genauer genetischer Hintergrund nicht immer bekannt waren (Draths und Frost, 1990, Gosset *et al.*, 1996, Konstantinov *et al.*, 1991). So waren bisher die Auswirkungen von genetischen Veränderungen im Zentralstoffwechselweg eines definierten Stammes, eines *Escherichia coli* K-12 Wildtypstammes, noch nicht untersucht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Auswirkungen der Erhöhung der Bereitstellung von E4P und PEP auf den Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg, ausgehend von einem definierten *Escherichia coli* K-12 Wildtypstamm, zu untersuchen.

- Ausgehend vom Wildtypstamm von *E. coli* sollten definierte Veränderungen im Zentralstoffwechsel durchgeführt werden, um die Expression der Gene der Transketolase und der Transaldolase zu erhöhen, die an der Produktion von E4P beteiligt sind, mit dem Ziel, den Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg zu erhöhen.
- Um den Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg zu verstärken, sollte die Verfügbarkeit von PEP erhöht werden. Dazu sollte das PEP verbrauchende PTS-System in *E. coli* ausgeschaltet werden.
Damit Glucoseaufnahme und Phosphorylierung zu Glucose-6-Phosphat erreicht werden konnte, sollten die Gene des heterologen ATP-verbrauchenden Glucoseaufnahme- und Phosphorylierungssystems bestehend aus dem Glucosefacilitator (*glf*) und der Glucokinase (*glk*) aus *Zymomonas mobilis* in *E. coli* eingebracht und exprimiert werden.
- Durch Einbringen geeigneter Genkombinationen aus Glucosefacilitator (*glf*), Glucokinase (*glk*), jeweils aus *Zymomonas mobilis*, Transketolase (*tkt*) sowie Transaldolase (*tal*), jeweils aus *Escherichia coli*, sollte die Erhöhung der Bereitstellung von E4P und PEP auf den Aromatenbiosyntheseweg untersucht werden.
- Um den Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg zu erhöhen, sollte ein neues, zum PTS-System alternatives Glucoseaufnahmesystem in *E. coli* - Zellen etabliert und untersucht werden: Glucosetransport und Oxidation zu Gluconat sollten durch Einbringen der Gene des Glucosefacilitators aus *Zymomonas mobilis* und einer cytoplasmatischen Glucosedehydrogenase aus *Bacillus megaterium* erfolgen. Über eine Phosphorylierung des Gluconats zu 6-Phosphogluconat sollte der Kohlenstofffluß in den Pentose-Phosphat-Weg gelenkt werden, um die Verfügbarkeit von E4P erhöhen. Die Auswirkungen dieses Systems auf den Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg sollte untersucht werden.

II. Material und Methoden

1. Bakterienstämme und Plasmide

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende *Escherichia coli* und *Bacillus megaterium* Stämme (Tabelle 1), Plasmide (Tabelle 2) sowie Oligonukleotide (Tabelle 3) verwendet.

Tabelle 1: Verwendete Bakterienstämme und ihre genetischen Marker.

Stamm	relevante Marker	Referenz
<i>Escherichia coli</i> K-12		
LJ110 (= W3110)	Wildtyp W3110, prototroph	Bachmann <i>et al.</i> , 1972
LJ 110 <i>aroB</i>	<i>aroB</i>	diese Arbeit, s.S. 34
LJ110 <i>ptsI::glf aroB</i>	<i>ptsI::glf aroB</i>	diese Arbeit, s.S. 55
AT2471::pGP704 <i>pts::glf</i>	<i>bla ptsI::glf mobRP4</i>	Siewe, unveröffentlicht
DH5 α	<i>supE lacU Δ(lacZ)M</i>	Bachmann <i>et al.</i> , 1972
	<i>hsdR recA endA gyrA thi relA</i>	
JM109	<i>recA supE endA hsdR gyrA relA</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
	<i>thi (Δlac-proAB) F' traD</i>	
	<i>proAB⁺ lacI^q Δ(lacZ)M</i>	
AB 2847 GS	<i>aroB rpe::kan</i>	Sprenger, unveröffentlicht
AB 2847	<i>aroB</i>	<i>E. coli</i> Genetic Stock Center
ANL7	<i>rpe::kan</i>	Lyngstadaas <i>et al.</i> , 1995
ZSC112L Δ pts	<i>ptsG ptsM glk thi zfc::Tn10</i>	Mao <i>et al.</i> , 1995
	<i>ΔptsHlerr</i>	
Stamm	relevante Eigenschaften	Referenz
<i>Bacillus megaterium</i>		
DSM 319	Wildtyp	Stahl und Esser, 1983

Tabelle 2: Plasmide und ihre Eigenschaften.

Plasmid	Größe	Eigenschaften / Replikationsorigin	Referenz
pZY507 <i>glf</i>	4,2 kb	<i>cat lacI^q Ptac glf</i> / p15a	Weisser <i>et al.</i> , 1995
pGEM 7	3,0 kb	<i>bla lacZα</i> / pMB1	Promega, Mannheim
pGEM 7 <i>gntK</i>	3,6 kb	<i>bla lacZα gntK</i> / pMB1	diese Arbeit, s. S. 87
pGEM 7 <i>gdh</i>	3,8 kb	<i>bla lacZα gdh</i> / pMB1	diese Arbeit, s. S. 87
pGEM 7 <i>gntK gdh</i>	4,4 kb	<i>bla lacZα gntK gdh</i> / pMB1	diese Arbeit, s. S. 87
pBM20	2,7 kb	<i>bla lacZα</i> / colE1	Boehringer, Mannheim
pBM20 <i>gntK</i>	3,3 kb	<i>bla lacZα gntK</i> / colE1	diese Arbeit
pGP704	3,7 kb	<i>bla</i> / R6K	Miller <i>et al.</i> , 1988
pGP704 <i>ptsHptsIcrr</i>	7,0 kb	<i>bla ptsH ptsI crr</i> / R6K	Jahreis, unveröffentlicht
pGP704 <i>ptsHptsI::glf crr</i>	8,4 kb	<i>bla ptsH ptsI::glf crr</i> / R6K	R. Siewe, unveröffentlicht
pACYC184	4,2 kb	<i>cat tet</i> / p15a	Chang und Cohen, 1978
pACYC <i>tac</i> = pMK	5,2 kb	<i>cat lacI^q Ptac</i> / p15a	R. Siewe, unveröffentlicht
pMK <i>tkl</i>	7,2 kb	<i>cat lacI^q Ptac tkl</i> / p15a	diese Arbeit, s. S. 31
pMK <i>tal</i>	6,2 kb	<i>cat lacI^q Ptac tal</i> / p15a	R. Siewe, unveröffentlicht
pMK <i>tkl tal</i>	8,2 kb	<i>cat lacI^q Ptac tkl tal</i> / p15a	diese Arbeit, s. S. 31
pMK <i>glk</i>	6,1 kb	<i>cat lacI^q Ptac glk</i> / p15a	diese Arbeit, s. S. 53
pMK <i>tkl glk</i>	8,7 kb	<i>cat lacI^q Ptac glk tkl</i> / p15a	diese Arbeit, s. S. 71
pMK <i>tal glk</i>	6,9 kb	<i>cat lacI^q Ptac glk tal</i> / p15a	R. Siewe, unveröffentlicht
pMK <i>tkl tal glk</i>	8,9 kb	<i>cat lacI^q Ptac glk tkl tal</i> / p15a	diese Arbeit, s. S. 71
pMK <i>gdh</i>	6,0 kb	<i>cat lacI^q Ptac gdh</i> / p15a	diese Arbeit, s. S. 92
BluescriptII KS ⁺	3,0 kb	<i>bla lacZα</i> / colE1	Stratagene
BluescriptII KS ⁺ <i>gntK</i>	3,6 kb	<i>bla lacZα gntK</i> / colE1	diese Arbeit
pMK <i>gntK gdh</i>	6,6 kb	<i>cat lacI^q PtacgntK gdh</i> / p15a	diese Arbeit, s. S. 92
pJF 119 EH = pJF	5,5 kb	<i>bla lacI^q Ptac</i> / colE1	Fürste <i>et al.</i> , 1986
pJF <i>aroF^{br}</i>	6,6 kb	<i>bla lacI^q Ptac</i> / colE1	J. Bongaerts unveröffentlicht
pJF <i>aroF^{br} glf</i>	8,1 kb	<i>bla lacI^q Ptac rrnB aroF^{br} glf</i> / colE1	diese Arbeit, s. S. 54

Die in dieser Arbeit konstruierten bzw. nicht veröffentlichten Plasmide werden kurz charakterisiert:

pGEM7 *gntK*: *gntK* als PCR-*EcoRI/BamHI*-Fragment (0,6 kb) in Vektor pGEM7 (Promega, Mannheim) ligiert.

pGEM7 *gdh*¹: *gdh* als PCR-*BamHI/SacI*-Fragment (0,8 kb) in pGEM7 (Promega, Mannheim) ligiert.

pGEM7 *gntK gdh*: *BamHI/SacI-gdh*-Fragment (0,8 kb) aus pGEM7 *gdh* in pGEM 7 *gntK* ligiert.

pUCBM20 *gntK*: *EcoRI/BamHI-gntK*-Fragment (0,6 kb) aus pGEM7 *gntK* in pUCBM20 (Boehringer, Mannheim) ligiert.

pACYC*tac* = pMK: Das 1,1 kb *HindIII-NruI*-Fragment des Vektors pACYC184 (Chang und Cohen, 1978) wurde durch ein 1,6 kb *HindIII-NruI* Fragment des Vektors pZY507 (Schilz, 1993) ersetzt.

pMK *tkl*: *SacI-tkl*-Fragment (2 kb) aus pMK *tkl tal glk* wurde in Vektor pACYC*tac* ligiert.

pMK *tal*: *SphI-tal*-Fragment (1 kb) aus pBM20*tal* (Sprenger *et al.*, 1995b) in Vektor pACYC*tac* ligiert.

pMK *tkl tal*: *SphI-tal* Fragment (1 kb) aus pMK *tal* in pMK *tkl* ligiert.

pMK *glk*²: *KpnI/HindIII-glkl*-Fragment (1kb) aus pBM20*glk* (Weisser, 1996) in pACYC*tac* ligiert.

pMK *tal glk*: *KpnI-tal*-Fragment (1 kb) aus pBM20*tal* (Sprenger *et al.*, 1995b) und *KpnI/HindIII-glkl*-Fragment (1 kb) aus pBM20*glk* (Weisser, 1996) in pACYC*tac* ligiert.

pMK *tkl tal glk*: *tkl* als PCR *SacI*-Fragment (2 kb) in pMK *glk tal* ligiert.

pMK *tkl glk*: *tal* durch *PvuI*-Verdau aus pMK *glk tkl tal* deletiert (0,2 kb). Nach elektrophoretischer Trennung wurde das 8,7 kb Fragment mit sich selbst ligiert.

pMK *gdh*: *gdh* als PCR-*BamHI/SphI*-Fragment (0,8 kb) in Vektor pACYC*tac* ligiert.

BluescriptII KS⁺ *gntK*: *EcoRI/BamHI-gntK*-Fragment (0,6 kb) aus pUCBM 20 *gntK* in BluescriptII KS⁺ ligiert.

pMK *gntK*: *Asp718/BamHI-gntK*-Fragment (0,6 kb) aus BluescriptII KS⁺ *gntK* in pACYC*tac* ligiert.

pMK *gntK gdh*: *Asp718/BamHI-gntK*-Fragment (0,6 kb) aus pACYC*tac gntK* in pACYC*tac gdh* ligiert.

pJF *aroF*^{thr}: *aroF*^{thr} als PCR-Fragment in pJF119EH (Fürste *et al.*, 1986) ligiert.

pJF *aroF*^{thr} *glf*³: *BamHI/HindIII-glf*-Fragment (1,5 kb) aus pBM20*glf* (Weisser, 1996) in pJF *aroF*^{thr} ligiert.

¹ *gdh* (=gdhIV) stammt aus *Bacillus megaterium*

² *glk* stammt aus *Zymomonas mobilis*

³ *glf* stammt aus *Zymomonas mobilis*

Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide.

Name	Sequenz (in 5' - 3' - Richtung)	Verwendung
Tkt SacI 5'	TGG <u>AGC</u> <u>TCA</u> TCA TCC GAT CTG CAG TCA AAA TGT CCT	Klonierung Transketolase mit 5' <i>SacI</i> -Schnittstelle
Tkt SacI 3'	ACG <u>AGC</u> <u>TCT</u> GCT AAT TAC AGC AGT TCT TTT GCT TTC	Klonierung Transketolase mit 3' <i>SacI</i> -Schnittstelle
GntK EcoRI 5'	CCG <u>AAT</u> <u>TCT</u> TGT ATT GTG GGG GCA C	Klonierung Glukonatkinase mit 5' <i>EcoRI</i> -Schnittstelle
GntK BamHI 3'	CCG <u>GAT</u> <u>CCG</u> TTA ATG TAG TCA CTA CTT A	Klonierung Glukonatkinase mit 3' <i>BamHI</i> -Schnittstelle
GdhIV BamHI 5'	ATG <u>GAT</u> <u>CCA</u> TGA AAA CAC TAG GAG GAT TTT	Klonierung Glucosedehydrogenase mit 5' <i>BamHI</i> -Schnittstelle
GdhIV SacI 3'	GCC <u>AGA</u> <u>GCT</u> <u>CTT</u> TTT TCC ACA TCG ATT AAA AAC TAT	Klonierung Glucosedehydrogenase mit 3' <i>SacI</i> -Schnittstelle
GdhIV SphI 3'	TTG GGG <u>ATG</u> <u>CTT</u> TTT TCC ACA TCG ATT AAA AAC TAT	Klonierung Glucosedehydrogenase mit 3' <i>SphI</i> -Schnittstelle
PtsH 5'	CAG AAA GCG GTT GAA CAT CTG GTT AAA CTG	Nachweis der Größe des Genclusters aus <i>ptsH</i> und <i>crr</i>
Crr 3'	TGT TGG AGA TAA CAA CCG GAG TCA GGG TAG	Nachweis der Größe des Genclusters aus <i>ptsH</i> und <i>crr</i>

2. Chemikalien und Enzyme

In der vorliegenden Arbeit wurden analysenreine Chemikalien der Firmen Merck KGaA (Darmstadt), Sigma Chemie (Deisenhofen) und Serva (Heidelberg) verwendet. Chemikalien und Enzyme stammen von der Firma Boehringer Mannheim. Produkte anderer Hersteller sind nachfolgend aufgelistet:

Biomol, Hamburg	IPTG (kristallin)
	X-Gal (kristallin)
Difco Laboratories, Detroit, USA	Bacto Trypton
	Hefe-Extrakt
	Bacto-Agar
	Mac Conkey Agar Base
Gibco BRL, Eggenstein	Agarose (Ultra Pure)

3-Desoxy-D-Arabino-Heptulose-7-Phosphat wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Floss (Seattle, U.S.A) zur Verfügung gestellt.

3. Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

Für die Anzucht der *E. coli* Stämme wurden folgende Nährmedien verwendet:

LB-Medium (nach Miller, 1972)

10 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, Aqua bidest. ad 1 l. Zur Herstellung eines festen Nährbodens wurde dem Medium zusätzlich 18 g / l Agar zugesetzt. Dieses Medium diente standardmäßig zur Anzucht von *E. coli*- Zellen.

Mac Conkey-Agar (nach Miller, 1972)

40 g Mac Conkey-Agar Base der Fa. Difco, Aqua bidest. ad 1 l. Die Kohlenstoffquelle wurde getrennt autoklaviert und dem Medium nach dem Autoklavieren mit einer Endkonzentration von 10 g /l zugegeben.

Mineralsalzmedium nach Tanaka (Tanaka *et al.*, 1967)

Für die Wachstumsversuche in Schüttelkolben wurde Minimalmedium nach Tanaka (Tanaka *et al.*, 1967) mit 34 mM NaH₂PO₄, 66 mM K₂HPO₄, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,3 mM MgSO₄, 10 µM CaCl₂, 10 µM ZnCl₂, 1 µM FeSO₄ verwendet.

Kohlenstoffquellen, Biotin (200 µg / l), ggf. Supplemente und Antibiotika (Ampicillin 100 µg / ml, Chloramphenicol 25 µg / ml, Kanamycin 50 µg / ml) wurden nach dem Autoklavieren steril hinzugegeben. Zur Herstellung von festen Medien wurde Bacto-Agar (Difco Laboratories, Detroit, MA, USA) ad 18 g/l zugesetzt.

Fed-Batch Produktionsmedium (verändert nach Pan *et al.*, 1987)

Zur Fed-Batch Kultivierung der *Escherichia coli aroB*⁻ - Stämme wurde wegen der Übertragbarkeit auf größere Fermentationsprozesse ein verändertes Fed-Batch Produktionsmedium nach Pan *et al.*, 1987 verwendet.

Spurenelementlösung für das Fed-Batch Medium (verändert nach Pan *et al.*, 1987):

Substanz	Konzentration [g/l]
AlCl ₃	2
CoSO ₄ 7 H ₂ O	0,7
CuSO ₄ 5 H ₂ O	2,5
H ₃ BO ₃	0,5
MnCl ₂ 4 H ₂ O	20
Na ₂ MoO ₄ 2 H ₂ O	3
NiSO ₄ 6 H ₂ O	2
ZnSO ₄	15

Vitaminlösung für Fed-Batch Medien (nach Gerhardt *et al.*, 1994).

Substanz	Menge [mg / l]
p-Aminobenzoesäure	50
Folsäure	20
Biotin	20
Nicotinsäure	50
Calcium Pantothenat	50
Riboflavin	50
Thiamin	50
Pyridoxin (B6)	100
Cyanocobalamin (B12)	5
Liponsäure	5

Die Vitamine wurden jeweils in 1000 ml bidest gelöst. Nach jeder Zugabe wurde mit NaOH der pH-Wert auf 7,0 eingestellt. Die Vitaminstammlösung ist 1000 fach konzentriert.

Vorkulturmedium für Fed-Batch Kultivierungen (verändert nach Pan *et al.*, 1987):

Substanz	Endkonzentration [g/l]
KH ₂ PO ₄	3
K ₂ HPO ₄	12
(NH ₄) ₂ SO ₄	5
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,3
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,015
NaCl	0,1
Glucose H ₂ O	5
FeSO ₄ 7H ₂ O / NaCitrat	0,1125
Thiamin	0,0075
Spurenelemente	1,5 ml / l
Vitaminlösung	1 ml / l
Ampicillin	0,1
Chloramphenicol	0,025
L-Tyrosin	0,040
L-Phenylalanin	0,040
L-Tryptophan	0,040
Shikimat	0,040

Die Substanzen wurden nacheinander in 1 l vollentsalztem Wasser gelöst und der pH-Wert mit 5N KOH auf 7,2 eingestellt. Das Medium wurde anschließend steril filtriert.

Hauptkulturmedium für Fed-Batch Kultivierungen verändert nach Pan *et al.*, 1987

Für Fed-Batch Kultivierungen wurde das Vorkulturmedium verändert: Im Hauptkulturmedium wurde kein K₂HPO₄ verwendet. Außerdem wurde die Konzentration von MgSO₄ 7H₂O auf 3 g / l und Glucosemonohydrat auf 15 g / l erhöht. Die Konzentration der aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan wurde auf 0,25 g / l gesteigert. Der pH-Wert des Mediums betrug 6,9.

Kultivierungsbedingungen

Batch-Kultivierungen

Escherichia coli-Stämme wurden in Flüssigkulturen unter Schütteln (150 rpm) in Reagenzgläsern mit 2 ml Medium bzw. in 250 ml-Glaskolben mit 50 ml Medium (200 rpm) angezogen. Die Kultivierung der Zellen wurde bei 37°C durchgeführt. Die Inkubation erfolgte für 14 - 16 Stunden.

Für Wachstumskurven wurden Kolben (50 ml) mit 5 ml Flüssigmedium mit einer Kolonie, die auf einer Minimalmedienplatte (nach Tanaka) kultiviert worden war, angeimpft. Nach 16 h Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert, mit Minimalmedium (Tanaka, *et al.*, 1967) ohne Kohlenstoffquelle gewaschen. 50 ml Minimalmedium pro 250 ml Erlenmeyerkolben wurden so inokuliert, daß die optische Dichte bei 600 nm 0,05 betrug. Nach 2 - 3 Teilungen der Zellen wurde IPTG (100 µM) zugegeben, um die Expression der Zielproteine zu induzieren.

Fed-Batch Kultivierung

Herstellung der Vorkulturen:

Kolben (50 ml) mit 5 ml Vorkulturmedium wurden mit einer Kolonie, die auf einer Minimalplatte nach Tanaka kultiviert wurde, angeimpft. Nach 14 - 16 Stunden wurden Zellen in 50 ml des Vorkulturmediums (im 250 ml Erlenmeyerkolben) überführt und bei 37°C kultiviert. Die Inkubationszeit lag bei den *E. coli* PTS⁺ - Stämmen zwischen 14 und 16 Stunden, bei *E. coli* PTS⁻ - Stämmen wegen des langsameren Wachstums zwischen 38 und 40 Stunden. Die Kolben wurden jeweils bei 175 rpm inkubiert.

In 1 l Erlenmeyerkolben wurde 90 ml Hauptkulturmedium 10%ig (10 ml) mit der Vorkultur angeimpft. Bis zu 12 Parallelkolben konnten so kultiviert werden (System Fed-Batch-pro der Firma DAS GIP.). Die Kolben wurden jeweils bei 37°C und 175 rpm inkubiert.

Der pH-Wert jeder Kultur wurde jeweils über eine pH-Elektrode ermittelt und über einen pH-Regler (DAS GIP) durch Zugabe von 5N KOH auf pH 6,9 eingestellt (s. **Abbildung 3**).

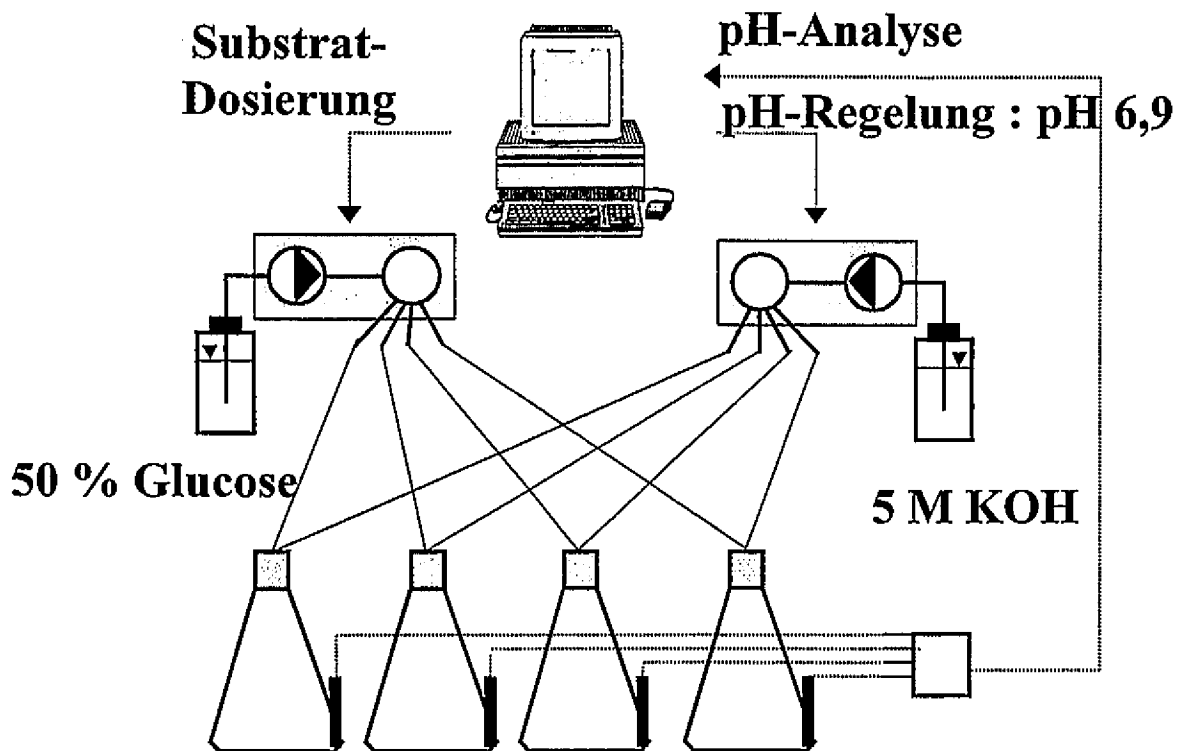


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Fed-Batch Fermentation. Wegen der Übersichtlichkeit wurden nur 4 (von 12) möglichen Kolben dargestellt.

Glucosedosierung erfolgte durch eine zweite Dosierstrecke mit einer Konzentration von 500 g Glucose-Monohydrat / l mit einem Volumenstrom von 0,013 ml/min. Dazu wurde die Glucosekonzentration alle 2 - 3 Stunden ermittelt (Glucoseteststäbchen (Diabur) der Fa. Boehringer, bzw. amperometrisch über Glucosedehydrogenase durch Accutrend® der Fa. Roche) und durch manuelles Ein- bzw. Ausschalten der Glucosedosierung wurde alle 2 - 3 Stunden eine Glucosekonzentration zwischen 5 und 10 g / l in den Kolben eingestellt. Am Ende der Kultivierung wurde das Volumen des Mediums der Kolben bestimmt und zur Abschätzung der Güte der Kultivierung das bestimmte Volumen mit dem über die Steuerungsanlage ermittelten Volumen verglichen. Zur Bestimmung der Enzymaktivitäten in Rohextrakten wurden 20 ml Zellen abzentrifugiert und bis zum Aufschluß bei -20°C gelagert. Die Durchführung der Enzymtests ist unter **Abschnitt 7** beschrieben.

4. Bestimmung von Biomasse

Die Dichte von Bakterienkulturen wurde bei einer Wellenlänge von 600nm bzw. 620nm (Fed-Batch Kultivierung) in einem Photometer (Shimadzu UV 160) gegen einen Leerwert (unbeimpftes Medium) bestimmt. Proben mit Extinktionswerten über 0,5 wurden mit Medium (bzw. 0,9% NaCl-Lsg. in Fed-Batch Kultivierungen) verdünnt, da in diesem Bereich keine Proportionalität mehr zwischen Biomassekonzentration und optischer Dichte besteht.

Für die Ermittlung des Trockengewichts aus der optischen Dichte wurde angenommen, daß 1 OD₆₂₀ 0,33g Trockengewicht (dw) / l Medium entspricht (Schmidt K., unveröffentlichte Ergebnisse).

5. Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte mittels einer modifizierten Methode nach Bradford, 1976. Das Prinzip des Testes beruht auf der Reaktion der SO₃-Gruppe des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 mit basischen Aminogruppen der Proteine (z.B. Arginin). Der Komplex wurde bei einer Wellenlänge von 578 nm im Photometer (Pharmacia LKB Ultraspec Plus Spectrophotometer) gemessen.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mittels einer Proteineichreihe mit Rinderserumalbumin (1mg / ml) durchgeführt. Die Eichreihe wurde in einem Bereich von 0 - 1 mg / ml (Proteinkonzentration der Probelösung) erstellt. Der Reaktionsansatz erfolgte in Halbmikroküvetten (Einmalküvetten).

40 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 wurden in 50 ml reinem Ethanol gelöst und über Nacht gerührt. Am nächsten Tag wurden 100 ml 85%ige H₃PO₄ hinzupipettiert und mit A. bidest auf 1000 ml aufgefüllt.

Testansatz:

- 25µl Probelösung
- 1250 µl Bradford-Reagenz
- Bestimmung der Extinktion bei 578 nm nach 60 Sekunden

6. Bestimmung von Enzymaktivitäten in zellfreien Rohextrakten

6.1 Herstellung zellfreier Rohextrakte

Die Zellen wurden abhängig vom zum messenden Enzym zweifach im jeweiligen Testansatzpuffer gewaschen. Die Zellen aus den Fed-Batch Kultivierungen wurden in Aufschlußpuffer für die Transketolase (50 mM Glycylglycinpuffer / KOH pH 8,5, 1 mM DTE, 10 mM MgCl₂ sowie 0,5 mM Thiamindiphosphat) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml Puffer resuspendiert.

Der Aufschluß erfolgte durch Ultraschall (Branson Sonifier 250 mit Mikrospritze, Beschallungszyklus 40%, Intensität 2,5) für 6 x 30 Minuten im Eppendorfgefäß (Eisbad).

Zum Abtrennen von Zelltrümmern wurden die Rohextrakte 30 Minuten bei 15300rpm und 4°C abzentrifugiert (Sigma 2K15). Vom Überstand wurde eine Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (1976) durchgeführt. Für die Enzymtests wurden die Rohextrakte auf eine Proteinkonzentration von 1mg/ml mit den jeweiligen Aufschlußpuffern eingestellt, um gleiche Volumina von Rohextrakten mit gleicher Proteinmenge einsetzen zu können.

6.2 Bestimmung der Aktivität der Glukonatkinase (verändert nach Izu *et al.* 1996)

Gluconatkinase katalysiert ATP-abhängig die Phosphorylierung von Gluconat zu 6-Phosphogluconat. Das gebildete 6-Phosphogluconat wurde über das Hilfsenzym 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase über die Zunahme der NADPH-Konzentration photometrisch bestimmt ($\lambda=340$ nm, Shimadzu UV160A, 30°C).

Der Rohextrakt wurde in einem Gesamtvolumen von 950 μ l in einem Puffer mit 50 mM Tris / HCl pH 8,0, 0,25 mM NADP, 1 mM ATP bzw. 1,2 U 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase 5 Minuten bei 30°C vorinkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 50 μ l einer 200 mmolaren Gluconsäure (pH 6,8) gestartet. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Gluconsäure.

Reaktionsansatz:

- 870 µl 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 3,0 mM MgCl₂
- 10 µl 25 mM NADP
- 10 µl 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase 1,2 U
- 10 µl ATP (100 mM)
- 50 µl Rohextrakt

Die Extinktion bei 340 nm wurde über einen Zeitraum von 5 Minuten alle 15 Sekunden bestimmt (Shimadzu UV160A). Für die Berechnung der Enzymaktivität wurde die Anfangsgeschwindigkeit ermittelt.

Berechnung der Aktivität:

Die Aktivität U: des Enzyms in der Küvette ist die Konzentrationsänderung (Δc) des Produktes pro Zeiteinheit (Δt):

$$U = \frac{\Delta c}{\Delta t} = \frac{\Delta E}{\Delta t \cdot \epsilon \cdot d}$$

ϵ : molarer Extinktionskoeffizient von NADPH+H⁺ [6,22 ml/ (µmol*cm) bei 340nm]

Δt : Zeitintervall

d : die Schichtdicke der Küvette [1cm]

Definition der Aktivität:

Die Aktivität eines Enzyms wird durch die Menge an Substrat definiert, die es pro Zeiteinheit umsetzt.

Die Einheit der Enzymaktivität ist das Katal, sie entspricht einer Umsetzung von einem Mol eines Substrates in einer Sekunde.

Eine für Enzymmessungen gebräuchlichere Größe ist die Einheit „Unit“ (U). Sie ist definiert als Enzymaktivität, die 1 µmol eines Substrates in einer Minute umsetzen kann.

Die spezifische Aktivität wird auf die Menge des eingesetzten Proteins bezogen. Dazu wird vorausgesetzt, daß die eingesetzte Proteinmenge proportional zur Aktivität ist.

$$\text{spezifische Aktivität} = \frac{\text{Aktivität in der Küvette}}{\text{eingesetzte Proteinmenge}}$$

6.3 Bestimmung der Aktivität der Glucokinase (verändert nach Doelle, 1982)

Glucokinase katalysiert die Phosphorylierung von Glucose unter ATP Verbrauch zu Glucose-6-Phosphat. Das gebildete Glucose-6-Phosphat wurde über das Hilfsenzym Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase über die Zunahme der NADPH-Konzentration photometrisch bestimmt ($\lambda=340$ nm, Shimadzu UV160A, 30°C). Der Rohextrakt wurde in einem Gesamtvolumen von 900 μ l mit 100 mM Tris-HCl pH 7,8 und 1mM NADP 5 Minuten bei 30°C vorinkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 100 μ l einer 1 molaren Glucoselösung gestartet. Als Kontrollreaktion diente ein Ansatz ohne Glucose.

Reaktionsansatz:

- 100 μ l 1 M Tris-HCl 7,8
- 10 μ l 100 mM NADP
- 740 μ l bidest
- 50 μ l Rohextrakt

Die Extinktion wurde bei 340 nm über einen Zeitraum von 5 Minuten alle 15 Sekunden gemessen. Zur Berechnung der Aktivität wurde die Anfangsgeschwindigkeit ermittelt (s.o.).

6.4 Bestimmung der Aktivität der Glucosedehydrogenase (nach Ramaley *et al.*, 1983)

Glucosedehydrogenase katalysiert die Oxidation von Glucose über Gluconolacton zu Gluconat. Die Aktivität wurde über die Zunahme der dabei gebildeten NADH+H⁺ - Konzentration photometrisch bestimmt ($\lambda=340$ nm, Shimadzu UV 160, 30°C).

Der Rohextrakt wurde in einem Gesamtvolumen von 900 μ l mit 100 mM Tris-HCl pH 7,8 und 1 mM NAD 5 Minuten bei 30°C vorinkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 100 μ l einer 1 molaren Glucoselösung gestartet. Als Kontrollreaktion diente ein Ansatz ohne Glucose.

Reaktionsansatz:

- 100 µl 1 M Tris-HCl 7,8
- 10 µl 100 mM NAD
- 740 µl bidest
- 50 µl Rohextrakt

Die Extinktion wurde bei 340 nm über einen Zeitraum von 5 Minuten alle 15 Sekunden gemessen. Die Berechnung der Aktivität erfolgte wie oben beschrieben.

6.5 Bestimmung der Aktivität der Transaldolase (nach Sprenger *et al.*, 1995b)

Die Transaldolase katalysiert die Bildung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GA3P) und Sedoheptulose-7-Phosphat aus Erythrose-4-Phosphat und Fructose-6-Phosphat.

Das gebildete GA3P wurde in Gegenwart der Hilfsenzyme Triosephosphatisomerase (TPI) und Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase (G3P-DH) über eine Abnahme der NADH Konzentration photometrisch bestimmt ($\lambda=340\text{nm}$, Shimadzu UV 160, 30°C).

Der Rohextrakt wurde in einem Gesamtvolumen von 1ml in Puffer (50 mM Glycylglycin , pH 8,5, 1mM DTE, 0,3 mM NADH) bzw. 3U TPI und 1U G3P-DH 5 Minuten bei 30°C vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 8 µl 100mM Erythrose-4-Phosphat (E4P) und 8µl einer 500 mmolaren Lösung von Fructose-6-Phosphat (F6P) gestartet (Ansatz A). Als Kontrollen dienten Ansätze ohne E4P (Ansatz B) bzw. ohne F6P (Ansatz C).

Reaktionsansatz:

- 914 µl Glycylglycin pH 8,5 , 1mM DTE
- 10 µl 25 mM NADH
- 10 µl ATP (100 mM)
- 3 U Triosephosphatisomerase / 1 U Glycerinphosphatdehydrogenase (1µl)
- 50 µl Rohextrakt

Die Extinktion wurde bei 340 nm über einen Zeitraum von 2 Minuten alle 15 Sekunden gemessen.

Zur Berechnung der Aktivität der Transaldolase wurden die Hintergrundaktivitäten (B und C) von der Gesamtaktivität (A) subtrahiert. Die Berechnung der Anfangsaktivitäten erfolgte wie oben beschrieben.

6.6 Bestimmung der Aktivität der Transketolase (verändert nach Sprenger *et al.*, 1995a)

Die Aktivität der Transketolase wurde über die Zunahme der GA3P-Konzentration bestimmt. Als Substrate dienten Xylulose-5-Phosphat (0,8 mM) als C2-Donor sowie Glycolaldehyd (100 mM (Endkonzentration)) als C2 Akzeptor. Das gebildete GA3P wurde durch die Hilfsenzyme TPI (3U) / Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase (1U) analog zur Transaldolasebestimmung über die Abnahme der NADH-Konzentration photometrisch bestimmt ($\lambda=340\text{nm}$, Shimadzu UV 160, 30°C).

In einem Gesamtvolumen von 1ml wurde der Rohextrakt in Puffer (50 mM Glycylglycin , pH 8,5. 1mM DTE, 0,3 mM NADH, sowie 3U TPI und 1U Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase) 5 Minuten bei 30°C vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 8µl einer 100 mmolaren Xylulose-5-Phosphat-Lösung und einer 5 molaren Glycolaldehydlösung gestartet (Ansatz A). Als Kontrollen dienten Ansätze ohne Xylulose-5-Phosphat (Ansatz B) bzw. ohne Glycolaldehyd (Ansatz C).

Reaktionsansatz:

- 900 µl 50 mM Glycylglycin pH 8,5 , 1mM DTE, 10 mM MgCl_2 , 0,5 mM Thiamindiphosphat
- 20 µl 15 mM NADH
- 3U Triosephosphatisomerase / 1 U Glycerinphosphatdehydrogenase (1µl)
- 50 µl Rohextrakt

Die Extinktion wurde bei 340 nm über einen Zeitraum von 2 Minuten alle 15 Sekunden gemessen. Zur Berechnung der Aktivität der Transketolase werden die Hintergrundaktivitäten

(B und C) von der Gesamtreaktion (A) subtrahiert. Die Berechnung der Anfangsaktivität erfolgte wie oben beschrieben.

6.7 Bestimmung von Aktivitäten von 3-Desoxy-D-Arabino-Heptulosonat-7-Phosphat Synthasen (verändert nach Gollub *et al.*, 1970)

Die Aktivität von DAHP-Synthasen wurde über die Zunahme von DAHP bestimmt, das aus E4P und PEP kondensiert wird.

In einem Gesamtvolumen von 600 µl wurde der Rohextrakt in Puffer (20 mM Bis-Tris-Propan, pH 7,0, 2 mM DTT, 2,7 mM PEP, sowie 10 µM FeSO₄) 10 Minuten bei 37°C vorinkubiert. Für Aktivitätsbestimmungen wurde jeweils 50 µg Protein verwendet. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µl 83 mM Erythrose-4-Phosphat gestartet. Nach genau 10 Minuten wurde die Reaktion mit 200 µl 10%iger TCA gestoppt (10 Minuten Wert). Als Kontrollen dienten Ansätze, die ohne Inkubation direkt gestoppt wurden (Nullwerte). Die Reaktionsansätze wurden 5 Minuten bei 15300 rpm (Sigma 2K 15) abzentrifugiert, 100 µl des Überstandes abgenommen und colorimetrisch die DAHP-Konzentration bestimmt.

Reaktionsansatz:

- 530 µl 20 mM Bis-Tris-Propan pH 7,0, 2 mM DTT, 10 µM FeSO₄
- 10 µl 166 mM PEP
- 50 µl Rohextrakt (1 mg / ml)

Die DAHP-Konzentrationen der Proben nach 10 Minuten wurden vom Nullwert abgezogen. Zur Berechnung der Enzymaktivität jedoch wurde der molare Extinktionswert von DAHP, $\epsilon = 0,9871 \text{ ml} / (\mu\text{mol} \cdot \text{cm})$, verwendet.

7. Bakteriengenetische Techniken

7.1 Transformation von *Escherichia coli*

Für die Transformation von *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA wurden kompetente Zellen nach der Rubidiumchlorid-Methode hergestellt (Hanahan, 1985). Die Zellen wurden in 200 µl Aliquots aufgeteilt und bei -70°C eingefroren. Zur Transformation von 200 µl kompetenten Zellen wurden ca. 100 - 1000 ng DNA eingesetzt.

7.2 Transduktion von *Escherichia coli*

Für die Transduktion von *E. coli*-Zellen wurde der unspezifisch transduzierende Phage P1_{kc} verwendet. Dieser überträgt DNA-Fragmente bis zu 90 kbp Länge. Für die Herstellung der P1_{kc}-Phagen sowie für die Transduktion wurde die Methode nach Miller, 1992 verwendet.

8. Molekulargenetische Methoden

8.1 Isolierung von DNA

Die Präparation von Plasmid DNA aus 2 - 5 ml bzw. 50 ml Übernachtskulturen wurde mittels eines Qiagen Miniprep Kits Nr.: 27106 bzw. Qiagen Plasmid Kit Nr.: 12145 durchgeführt. Chromosomale DNA wurde aus *E. coli* und *Bacillus megaterium* mit dem Genomic Isolation Kit (QIAGEN, Hilden) durchgeführt.

8.2 Restriktion von DNA

Restriktion, Präzipitation und alkalische Phosphatasebehandlung wurden nach Sambrook *et al.*, 1989 durchgeführt. Ligationen wurden mit dem rapid ligation kit (Boehringer, Mannheim) in 5 min bei Raumtemperatur oder mit der DNA T4-Ligase verwendet (Inkubation über Nacht bei 13°C). Die elektrophoretische Auftrennung von Fragmenten, die mittels Restriktionsenzymen gewonnen wurden, erfolgte in 0,8 %-igen oder 1,5%-igen TAE-Agarosegelen. Wurden die im Agarosegel aufgetrennten DNA-Fragmente für weitere Klonierungen benötigt, so wurde die DNA nach Isolierung aus dem Gel mit QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden) aufgereinigt.

8.3 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide von gewünschten DNA-Sequenzen wurden von MWG Biotech (Ebersberg) im 0,05 μmol Maßstab erworben.

8.4 Polymerase-Kettenreaktion

Zur Amplifizierung von DNA wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Mullis und Faloona, 1987) eingesetzt. Bei einem Gesamtvolumen von 100 μl wurden zwischen 2 - 40 ng Matrizen-DNA, 10 - 100 pmol Oligonukleotid-Primer, 100 μMol dNTP's, 10 μl Reaktionspuffer (Boehringer, Mannheim) und 1 U Taq-DNA-Polymerase eingesetzt. Die Reaktionsansätze wurden mit 50 μl Paraffinöl (Sigma, Deisenhofen) überschichtet. Inkubiert wurden die Ansätze in einem PCR-Thermal-Cycler (Perkin-Elmer/Cetus, USA). Es wurden 34 Reaktionszyklen unter folgenden Bedingungen durchgeführt.

Denaturierung der Matrizen-DNA	4 min	94°C
Anlagerung der Startermoleküle	2 min	58°C
Nukleotideinbau und Kettenverlängerung	3 min	75°C

9. Quantitative Bestimmung von Substraten und Produkten

Zur Bestimmung der Produkte im Kulturmedium wurden Proben entnommen, zentrifugiert (4000g, 10 min) und Aliquots in den jeweiligen Bestimmungssystemen eingesetzt.

9.1 3-Desoxy-D-Arabino-Heptulosonat-7-Phosphat (DAHP) oder 3-Desoxy-D-Arabino-Heptulosonat (DAH)

Die Bestimmungen von Konzentrationen von 3-Desoxy-D-Arabino-Heptulosonat-7-Phosphat (DAHP) bzw. von 3-Desoxy-D-Arabino-Heptulosonat (DAH) wurde mit zwei unterschiedlichen Methoden durchgeführt: Die Bestimmung von Medienüberständen erfolgte mit der HPLC-Analytik. Wegen der höheren Empfindlichkeit wurde die Bestimmung der DAHP oder DAH - Konzentration in Rohextrakten colorimetrisch durchgeführt.

a) HPLC-Analytik

Zur Bestimmung von DAHP-Konzentrationen wurde 3-Desoxy-D-Arabino-Heptulose-7-Phosphat (DAHP) zu 3-Desoxy-D-Arabino-Heptulose dephosphoryliert, damit eine Bindung der Substanz mit der verwendeten Säule möglich ist:

Reaktionsansatz:	20 µl	Probe
	159 µl	<i>aqua bidest.</i>
	20 µl	Dephosphorylierungspuffer (500 mM Tris, pH 9,5)
	1 µl (=1U)	alkalische Phosphatase (aus Kälberdarm)

50 µl des Reaktionsansatzes wurde auf eine Normalphasensäule (Aminex HPX87 H, der Fa. Biorad) aufgetragen. Es wurde eine HPLC-Anlage der Firma Merck-Hitachi mit einem beheizbaren Säulenofen bei 65°C (Merck L-7350) und einem Autosampler (Merck-Hitachi 7200) verwendet. Als Laufmittel diente 6 mM Schwefelsäure. Die Detektion des Produkts erfolgte durch einen RI-Detektor (La-Chrom RI-Detektor L-7490). Die Steuerung der Anlage sowie die Integration der Peakflächen wurden mit dem Programm Multi HSM Manager der Fa. Merck ausgeführt. Produkte wurden anhand von Eichmessungen einer Referenzsubstanz bestimmt. Die untere Nachweisgrenze für DAH liegt bei etwa 0,25 mM.

b) colorimetrischer Nachweis

Der Nachweis der DAHP oder DAH-Konzentration erfolgte colorimetrisch über eine Spaltung von DAHP oder DAH mit Periodat zu β -Formylpyruvat. Dieses wurde anschließend mit Thiobarbitursäure derivatisiert. Die Extinktion der entstehenden violetten Verbindung ist proportional zur DAHP- oder DAH-Konzentration. Mit dem Nachweistest kann zwischen DAH und DAHP nicht unterschieden werden. Die untere Nachweisgrenze liegt bei etwa 0,05 mM.

100 µl einer Probe wurde mit 50 µl einer in 9 M H_3PO_4 gelösten 200 mM Natriummetaperiodat-Lösung versetzt. Nach genau 5 minütiger Inkubation bei 37°C wurde

der Ansatz mit 250 μl einer 0,8 M Natriummetarsenit - Lösung in 0,5 M Na_2SO_4 und 0,1 N H_2SO_4 versetzt. Nach 5 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ansatz gemischt und mit 1,5 ml einer 0,6 % Thiobarbitursäure, das in 0,5 M Natriumsulfat gelöst wurde, versetzt. Nach 15 minütigem Kochen wurde der Ansatz 5 Minuten zunächst gekühlt, dann mit 2 ml Cyclohexanon versetzt und nach 10 minütiger Zentrifugation die Extinktion der farbigen organischen Phase bei einer Extinktion von 549 nm bestimmt.

Die Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizient von DAH(P) erfolgte mittels einer Eichreihe: 0,9871 ml / ($\mu\text{mol} \cdot \text{cm}$).

9.2 Fumarat, Acetat, Lactat, Pyruvat, Malat

100 μl des Überstandes wurden auf eine Normalphasensäule (Aminex HPX 87 H, der Fa. Biorad) aufgetragen. Es wurde eine HPLC-Anlage der Firma Sykan mit einem beheizbaren Säulenofen bei 40°C und einem Autosampler (Sykan LR31) verwendet. Als Laufmittel diente 0,2 N Schwefelsäure. Die Detektion des Produkts erfolgte durch einen UV-Detektor (Sykan 3300) bei 215 nm. Die Steuerung der Anlage sowie die Integration der Peakflächen wurden mit dem Integrator (Sykan C-R 31) durchgeführt. Produkte wurden anhand von Eichmessungen der jeweiligen Referenzsubstanz bestimmt.

9.3 Glucose

Aliquots aus Überständen wurden in ein D-Glucose-Bestimmungssystem (Akkutrend® von Boehringer Mannheim) eingesetzt. Dieses setzt Glucose mittels Glucosedehydrogenase unter Reduktion von NAD zu $\text{NADH} + \text{H}^+$ und Gluconolacton um. Das gebildete $\text{NADH} + \text{H}^+$ - Konzentration wurde amperometrisch bestimmt.

Zur genaueren Bestimmung von Glucose wurden aus Überständen Aliquots entnommen und abzentrifugiert (6000 g, 10 min) und in ein D-Glucose-Bestimmungssystem (nach Bergmeyer *et al.*, 1981) eingesetzt. Hexokinase setzt Glucose ATP-abhängig zu Glucose-6-Phosphat um und dieses wird von Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase NADP^+ -abhängig zu 6-Phosphogluconat oxidiert. Die gebildete NADPH-Menge ist zur Glucosemenge proportional und wurde photometrisch bei 340 nm bestimmt.

9.4 Gluconat

Aliquots des Überstands wurden in ein D-Gluconat-Bestimmungssystem (nach Bergmeyer *et al.*, 1981) eingesetzt. Gluconatkinase setzt Glucose ATP-abhängig zu 6-Phosphogluconat um und dieses wird von 6-Phosphogluconat-dehydrogenase NADP⁺-abhängig zu Ribulose-5-Phosphat oxidiert. Die gebildete NADPH-Menge ist zur Gluconatmenge proportional und wurde photometrisch bei 340 nm bestimmt.

9.5 Methylglyoxal

Aliquots des Überstands wurden in ein Methylglyoxal-Bestimmungssystem (nach Bergmeyer *et al.*, 1981) eingesetzt. Glyoxalase I setzt Methylglyoxal zu S-lactoylglutathion um, das photometrisch bei 240 nm bestimmt werden kann. Die untere Nachweisgrenze für Methylglyoxal liegt bei ca. 0,3 mM.

III. Ergebnisse

Erythrose-4-Phosphat und Phosphoenolpyruvat sind Vorläufermetabolite des Aromatenbiosyntheseweges. Beide Metabolite stammen aus dem Zentralstoffwechselweg.

Im Pentose-Phosphat-Weg katalysieren die Enzyme Transaldolase und Transketolase Reaktionen, die zur Synthese von Erythrose-4-Phosphat führen. In der Glykolyse entsteht Phosphoenolpyruvat aus einer Wasserabspaltung von 2-Phosphoglycerat, die durch das Enzym Enolase katalysiert wird.

Ziel der Arbeit war es, den Einfluß einer erhöhten Verfügbarkeit der Metabolite des Zentralstoffwechselweges, Erythrose-4-Phosphat und Phosphoenolpyruvat, auf den Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg zu untersuchen.

1. Untersuchungen zur Erhöhung der Bereitstellung von Erythrose-4-Phosphat auf den Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg

Erythrose-4-Phosphat wird im Pentose-Phosphat-Weg bereitgestellt. Transaldolase sowie Transketolase katalysieren Reaktionen, die zur Produktion von Erythrose-4-Phosphat führen:



S7P: Sedoheptulose-7-Phosphat; GA3P: Glycerinaldehyd-3-Phosphat; F6P: Fructose-6-Phosphat; E4P: Erythrose-4-Phosphat; X5P: Xylulose-5-Phosphat

Ziel war es, die Aktivitäten von Enzymen zu erhöhen, welche die Produktion von E4P katalysieren, um so die Verfügbarkeit von E4P zu steigern und so den Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg zu erhöhen. Die Erhöhung der Aktivitäten der beteiligten Enzyme sollte durch Erhöhung der Expression der kodierenden Gene erreicht werden. Die Sequenzen der Gene *talB*, welche eine Transaldolase, sowie *tktA*, welche eine Transketolase kodieren, waren bekannt und lagen bereits kloniert vor (Sprenger *et al.*, 1995a; Sprenger *et al.*, 1995b).

Deshalb wurden die Gene der Transketolase *tkt* und Transaldolase *tal* aus *Escherichia coli* allein oder als Operon in den Vektor pMK kloniert. Dazu wurden die Gene ohne eigenen Promotor hinter dem Promotor *Ptac* kloniert. Die Gene stehen somit unter der Kontrolle des *Ptac* Promotors und können in Anwesenheit des Induktors (IPTG) induziert werden (Keasling, 1999). Dies sollte überprüft werden, wozu die konstruierten Plasmide pMK *tkt*, pMK *tal* sowie pMK *tkt tal* in den Stamm LJ 110 eingebracht wurden. Die Zellen wurden im Vollmedium (LB) in Gegenwart bzw. in Abwesenheit von IPTG (100 μ M) über Nacht (12 Stunden) kultiviert. Nach Kultivierung wurden die Aktivitäten der Transketolase und der Transaldolase in zellfreien Rohextrakten bestimmt. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 4** dargestellt.

Tabelle 4: Spezifische Enzymaktivitäten (in U / mg Protein) von Transketolase und Transaldolase in Abhängigkeit von den eingebrachten Genen. Die Plasmide pMK, pMK *tkt*, pMK *tal* und pMK *tkt tal* wurden in den Stamm LJ 110 eingebracht und in (+) bzw. ohne (-) Gegenwart von IPTG (100 μ M) in LB-Medium kultiviert (n.b.: nicht bestimmt).

Eingebrachte Gene	Transketolase (- / + IPTG)	Transaldolase (- / + IPTG)
-.-	0,16 / 0,18	0,18 / 0,18
<i>tkt tal</i>	0,3 / 3,5	0,3 / 1,5
<i>tkt</i>	0,3 / 9,3	n.b.
<i>tal</i>	n.b.	0,4 / 1,8

Durch Induktion stieg die spezifische Enzymaktivität der Transaldolase um ca. das 10-fache, die der Transketolase um etwa das 20 - 50-fache gegenüber dem Wildtypstamm mit dem Leerplasmid pMK. Ohne IPTG-Zugabe waren in Rohextrakten die Aktivitäten der Transketolase und der Transaldolase etwa doppelt so hoch wie in Rohextrakten des Wildtypstammes mit dem Leerplasmid, d.h. der *tac*-Promotor war nicht dicht. Nach Überprüfung der Funktion konnten die konstruierten Plasmide in geeignete Stämme eingesetzt werden.

1.1 Etablierung eines Systems zur Bestimmung des Kohlenstoffflusses in den Aromatenbiosyntheseweg

Um den Einfluß der Erhöhung der Metabolite PEP und E4P auf den Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg zu untersuchen, ist es notwendig, den Stofffluß zu quantifizieren. Prinzipiell ist es möglich, den Kohlenstofffluß mit unterschiedlichen Methoden zu analysieren. So können *in vivo* Kohlenstoffflüsse im Zentralstoffwechsel bei Wachstum auf Glucose durch ^{13}C -Markierungsexperimente und anschließender NMR-spektroskopischer Analyse zellulärer Aminosäuren in Kombination mit der Metabolitbilanzierung quantifiziert werden (Wendisch *et al.*, 1997). Außerdem stehen seit langem Methoden mit radioaktiven Isotopen zur Verfügung.

Diese Methoden sind, da mit hohem experimentellem Aufwand verbunden, für die Charakterisierung der Stoffflüsse nicht geeignet, wenn viele Klone analysiert werden sollen. Für die Bestimmung des Kohlenstoffflusses in den Aromatenbiosyntheseweg wurde ein anderer Ansatz gewählt: Um den Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg als Maß der Verfügbarkeit von PEP und E4P zu bestimmen, wurde der Aromatenbiosyntheseweg nach Synthese des Eingangsproduktes DAHP (3-Desoxy-D-Arabino-Heptulosonat-7-Phosphat) durch Einbringen eines defekten Allels der 3-Dehydroquinat-Synthase (*aroB*⁻) unterbrochen (s. **Abbildung 4**). *Escherichia coli* - *aroB*⁻ - Stämme exkretieren die Metabolite DAH oder DAHP ins Medium (Draths und Frost, 1990; Lu und Liao, 1997). Anhand der externen Konzentration von DAH oder DAHP kann der Eintrag des Kohlenstoffflusses des Zentralstoffwechsels in den Aromatenbiosyntheseweg als spezifische Ausbeute ($\text{C DAH(P)} [\text{mol}] / \text{C Glucose} [\text{mol}]$ in %) berechnet werden. Diese Methodik wurde bereits vielfach angewandt (Draths und Frost, 1990; Lu und Liao, 1997).

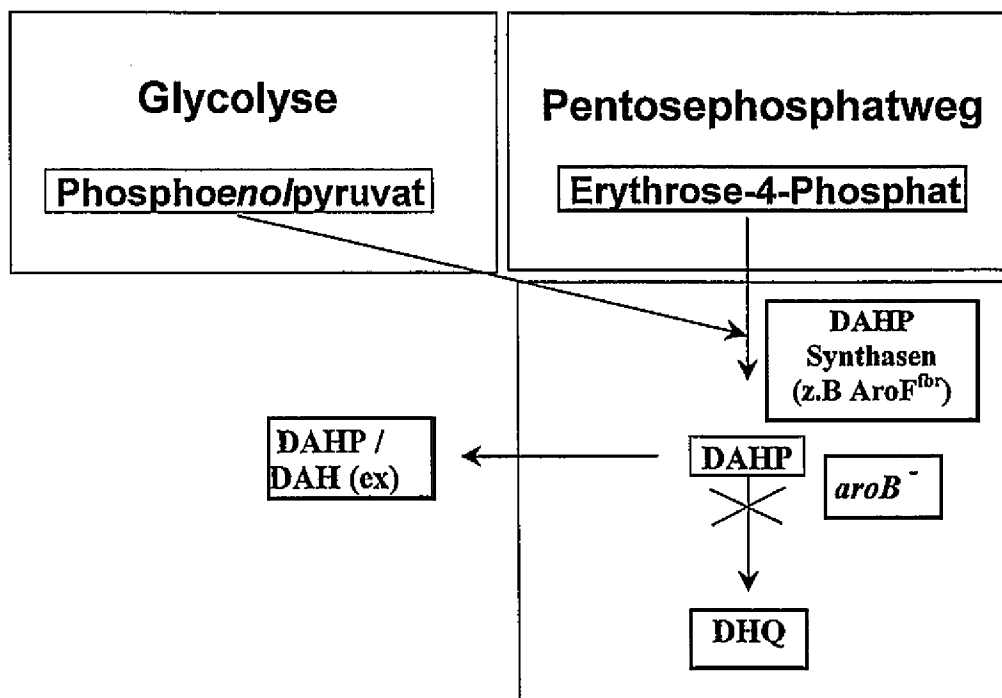


Abbildung 4: Prinzip der Bestimmung von Kohlenstoffflüssen in den Aromatenbiosyntheseweg. In der Eingangsreaktion katalysieren DAHP-Synthasen (z.B. eine feedback-inhibitionsresistente DAHP-Synthase (AroF^{fb})) die Primärmetabolite Phosphoenolpyruvat aus der Glycolyse und Erythrose-4-Phosphat aus dem Pentose-Phosphat-Weg zu 3-Desoxy-D-Arabino-Heptulose-7-Phosphat (DAHP). Der Aromatenbiosyntheseweg wurde durch Einbringen eines defekten Allels der 3-Dehydroquinate-Synthase (*aroB⁻*) unterbrochen. DAHP kann nicht zum 3-Dehydroquinate (DHQ) umgesetzt werden. Anhand der externen DAH(P)-Konzentrationen kann der Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg berechnet werden.

Um Limitierungen in der Eingangsreaktion auszuschließen, muß die Eingangsreaktion des Aromatenbiosyntheseweges stark auf der Seite der Produktes, DAHP, liegen. Deshalb mußte die Aktivität einer DAHP-Synthase durch Erhöhung der Expression des kodierenden Gens gesteigert werden.

Ein Stamm mit einem defekten Gen der 3-Dehydroquinate-Synthase (*aroB⁻*) ist für die aromatischen Aminosäuren L-Phenylalanin, L-Tyrosin und L-Tryptophan auxotroph. Diese Aminosäuren müssen bei der Kultivierung in mmolarer Konzentration zugegeben werden, um ein Wachstum der *aroB⁻*-Stämme zu ermöglichen (Pittard und Wallace, 1966). Jedoch führen diese Phenylalanin- bzw. Tyrosinkonzentrationen zu einer 80% - 90%iger Inhibierung der AroG oder AroF-Genprodukte (Kikuchi *et al.*, 1997; Weaver und Herrmann, 1990). Deshalb wurde eine feedback-resistente DAHP Synthase (AroF^{fb}) verwendet. Diese wurde in

einer Tyrosin-Konzentration von 1 mM nicht inhibiert (R. Jossek, unveröffentlichte Ergebnisse). Damit wurde die feedback-Deregulierung des *aroP^{br}*-Genprodukts gezeigt. Ausgangsstamm für die Untersuchungen war der Wildtypstamm *Escherichia coli* LJ 110. Mit diesem Stamm sollten definierte Veränderungen durchgeführt werden, um isogene Wildtypderivate zu erhalten, mit denen die Effekte dieser Veränderungen untersucht werden können. Um den Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg zu quantifizieren, mußte der Stamm LJ 110 *aroB*⁻ konstruiert werden.

Konstruktion von *Escherichia coli* LJ 110 *aroB*⁻

Das Allel *rpe::kan* des Stammes ANL7 wurde in den Stamm AB2847 (*aroB*) transduziert. Mit dem konstruierten Stamm AB 2847 GS (*rpe::kan aroB*⁻) (Sprenger, unveröffentlichte Ergebnisse) kann das defekte Allel der 3-Dehydroquinate Synthase (*aroB*⁻) zusammen mit dem Marker (*rpe::kan*), das sich in der Nähe zum *aroB*-Gen befindet, cotransduziert werden. Zur Unterbrechung des Aromatenbiosyntheseweges wurde in den Wildtypstamm von *Escherichia coli* (LJ 110) ein defektes Allel der 3-Dehydroquinate Synthase (*aroB*⁻) über P1-Transduktion (P1_{kc}-Phagenlysaten des Stammes AB2847 GS (*aroB*⁻ *rpe::kan*)) eingebracht. Transduzierte Zellen wurden auf Kanamycinresistenz selektioniert. Zur Entfernung der Kanamycinresistenz wurde der Stamm LJ 110 *aroB*⁻ *rpe::kan* mit P1-Phagenlysaten (Donorstamm LJ 110 *aroB*⁺ *rpe*⁺) infiziert. Transduzierte Klone, LJ 110 *aroB*⁺ *rpe*⁺ bzw. LJ 110 *aroB*⁻ *rpe*⁺, durch Kreuzung in *aroB* entstanden, wurden durch Xyloseverwertung auf Minimalplatten mit aromatischen Aminosäuren selektiert. LJ110 *aroB*⁻ *rpe*⁺ konnte von LJ 110 *aroB*⁺ *rpe*⁺ durch Ergebnisse von Auxotrophietests auf Agarplatten (Wachstum auf Minimalmedium mit aromatischen Aminosäuren und Shikimat, jedoch kein Wachstum auf Minimalmedium ohne Supplemente) identifiziert werden. Der Stamm LJ 110 *aroB*⁻ kann, da er auxotroph für aromatische Aminosäuren ist, nur in Gegenwart von aromatischen Aminosäuren und Shikimat in Minimalmedium wachsen.

Um zu zeigen, daß der Stamm LJ 110 *aroB*⁻ ein defektes Gen der 3-Dehydroquinate Synthase (*aroB*⁻) trägt, wurde *aroB* in das Plasmid pUCBM20 kloniert und in den Stamm LJ 110 *aroB*⁻ transformiert. Das Einbringen von *aroB*⁺ in den Stamm LJ 110 *aroB*⁻ / pUCBM20 *aroB* führte zur Komplementierung des Wachstums auf Minimalmedium, d.h. der Stamm LJ 110 *aroB*⁻ mit *aroB*⁺ konnte ohne Supplemente auf Agarplatten mit Minimalmedium wachsen. Somit war gezeigt, daß der konstruierte Stamm *aroB*⁻ war.

1.2 Erhöhung der Aktivität der Eingangsreaktion in den Aromatenbiosyntheseweg

Um die Aktivität der Eingangsreaktion zu erhöhen, wurde das Gen einer feedback-resistenten DAHP-Synthase, *aroF*^{fb}, hinter dem Promotor *P_{tac}* in den Vektor pJF119EH (=pJF) kloniert (J. Bongaerts, unveröffentlichte Ergebnisse). Dieses Plasmid wurde in den Stamm LJ 110 eingebracht und in Minimalmedium kultiviert. Durch Induktion des Gens mit IPTG konnte die Aktivität des AroF^{fb}-Genproduktes um das 6-fache erhöht werden (J. Bongaerts, unveröffentlichte Ergebnisse). Die Funktionsfähigkeit des Plasmides war somit gewährleistet. Das Plasmid pJF *aroF*^{fb} wurde in den Stamm LJ110 *aroB*⁻ eingebracht. Um für weitere Genkombinationen gleiche Anitibiotikaresistenzen zu erhalten, wurde das Leerplasmid pMK in den Stamm LJ 110 *aroB*⁻ / pJF *aroF*^{fb} eingebracht. Zur Konstruktion des Referenzstammes wurden die Leerplasmide pJF119 EH sowie pMK in den Stamm LJ 110 *aroB*⁻ transformiert. **Abbildung 5** stellt die Genkombinationen auf den jeweiligen Plasmiden in den Stamm LJ 110 *aroB*⁻ dar.

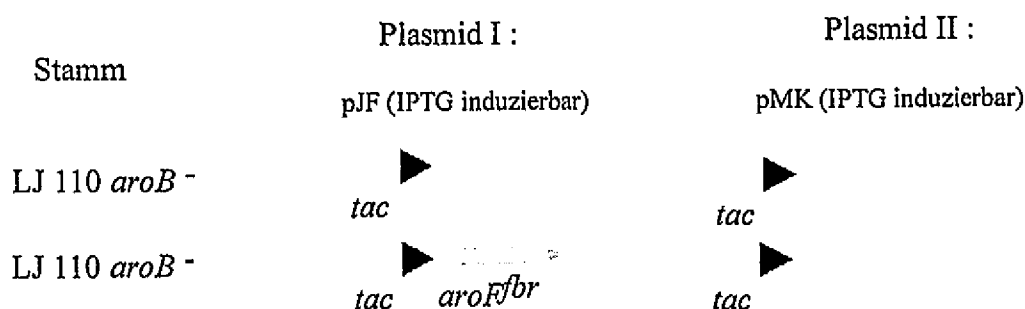


Abbildung 5: Schematische Darstellung von *Escherichia coli* – Stämmen zur Untersuchung des Einflusses erhöhter Expression von *aroF*^{fb} auf den Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg.

1.3 Bestimmung der Kohlenstoffflusses in den Aromatenbiosyntheseweg nach Überexpression von *aroF^{br}*

Zur Bestimmung der Auswirkungen der Überexpression von *aroF^{br}* auf den Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg wurden beide Stämme (s. **Abbildung 5**) in Minimalmedium mit Glucose als Kohlenstoffquelle kultiviert. *E. coli* kann diese Kohlenstoffquelle am besten nutzen. Die Kultivierung der Stämme kann prinzipiell auf unterschiedliche Art durchgeführt werden.

So können die Stämme in geregelten Fermentern kultiviert werden. Diese Methode ist gut reproduzierbar, scheidet jedoch wegen des großen Aufwandes aus, wenn viele Klone kultiviert werden sollen.

In Schüttelkolben können jedoch eine Vielzahl von Klone untersucht werden. Nachteil der Schüttelkolbenkultivierung ist, daß wegen der Säurebildung, vorwiegend durch Essigsäure (Luli und Strohl, 1990), nur begrenzte Glucosekonzentrationen eingesetzt werden können. So konnte der Stamm W3110 (=LJ110) nach Batch-Kultivierung in einem Medium mit Glucosekonzentration von 28 mM (5 g / l) Acetat in einer Konzentration von 61 mM (0,5 g / l) produzieren (Luli und Strohl, 1990). Wegen der begrenzten Pufferkapazität des Mediums, so betrug die Konzentration des Phosphatpuffers im Minimalmedium nach Tanaka ca. 100 mM (Tanaka *et al.*, 1967), ist die produzierte Säuremenge nicht beliebig hoch abpufferbar. Die Überschreitung der Pufferkapazität des Mediums kann zu einem Absinken des pH-Wertes unter pH 5 führen. Dieser kann bei *Escherichia coli* zur Einstellung des Wachstums führen und ist letztendlich letal für die Zellen (Small *et al.*, 1994). Zwar könnte eine Erhöhung der Pufferkapazität des Mediums ein Absinken des pH-Wertes im Medium verhindern, jedoch kann die Pufferkapazität des Mediums wegen Wachstumshemmungen bei hohen Salzkonzentrationen nicht beliebig erhöht werden (Trchounian und Kabayashi, 1999): Die aerobe Kultivierung von *E. coli* W3110 (= LJ110) in Minimalmedium mit 300 mM KCl führte zu einer Verminderung der Wachstumsrate um etwa 10 %, die Kultivierung in Minimalmedium mit 500 mM KCl zur einer Verringerung der Wachstumsrate um ca. 50 % (Trchounian und Kabayashi, 1999).

Die Stämme wurden deshalb in Schüttelkolben unter pH-statischen Bedingungen kultiviert. Der pH-Wert jeder Kultur wurde jeweils über eine pH-Elektrode ermittelt und durch einen Regler unter Zugabe von 5N KOH auf pH 6,9 eingestellt (s. **Abbildung 3**, Seite 17).

Die Stämme wurden in einer Kombination aus Batch- und Fed-Batch kultiviert. Um einen möglichst hohen Sauerstoffeintrag zu bekommen, wurden die Kolben (1 l) 10 %ig (100 ml) mit Medium befüllt und bei einer Umdrehungszahl von 175 rpm geschüttelt. Höhere Umdrehungszahlen waren wegen der entstehenden Vibrationen des Schüttlers nicht möglich.

Die Anfangskonzentration von Glucose betrug 13,5 g / l. Nach Unterschreitung der Glucosekonzentration von 5 g / l wurde Glucose kontinuierlich zugegeben (Fed-Batch-Kultivierung) und die Glucosedosierung wurde entweder über ein aus Vorversuchen ermitteltes Feedprofil so eingestellt, daß eine Glucosekonzentration über den Kultivierungsverlauf zwischen ca. 5 bis 10 g / l lag, oder aber Glucose manuell so gesteuert, daß diese Konzentration (zwischen 5 – 10 g / l) erreicht wurde. So sollte eine Akkumulierung von Glucose verhindert werden, die zur übermäßigen Produktion von Acetat bei schnellem Wachstum führen könnte (Luli und Strohl, 1990). Die Ergebnisse aus Vorversuchen zeigten, daß sich durch Titration mit KOH zur Neutralisierung der entstehenden Säuren bzw. durch Glucosedosierung das Volumen um ca. 10 – 20 % erhöhen konnte.

Die Kulturen wurden 10%ig angeimpft und IPTG (100 µM Endkonzentration) wurden den Kulturen bei einer OD von 2 bis 3 zugegeben. Aus Vorversuchen konnte ermittelt werden, daß eine 26 stündige Kultivierung bei 37°C notwendig war, um Unterschiede der Kohlenstoffflüsse in den Aromatenbiosyntheseweg verschiedener Stämme festzustellen.

Der Wachstumsverlauf des Stammes (LJ 110 *aroB*⁻ / pJF *aroF*^{br} / pMK) nach IPTG-Zugabe bzw. eines Kontrollstammes (LJ 110 *aroB*⁻ / pJF / pMK) ist in **Abbildung 6** dargestellt.

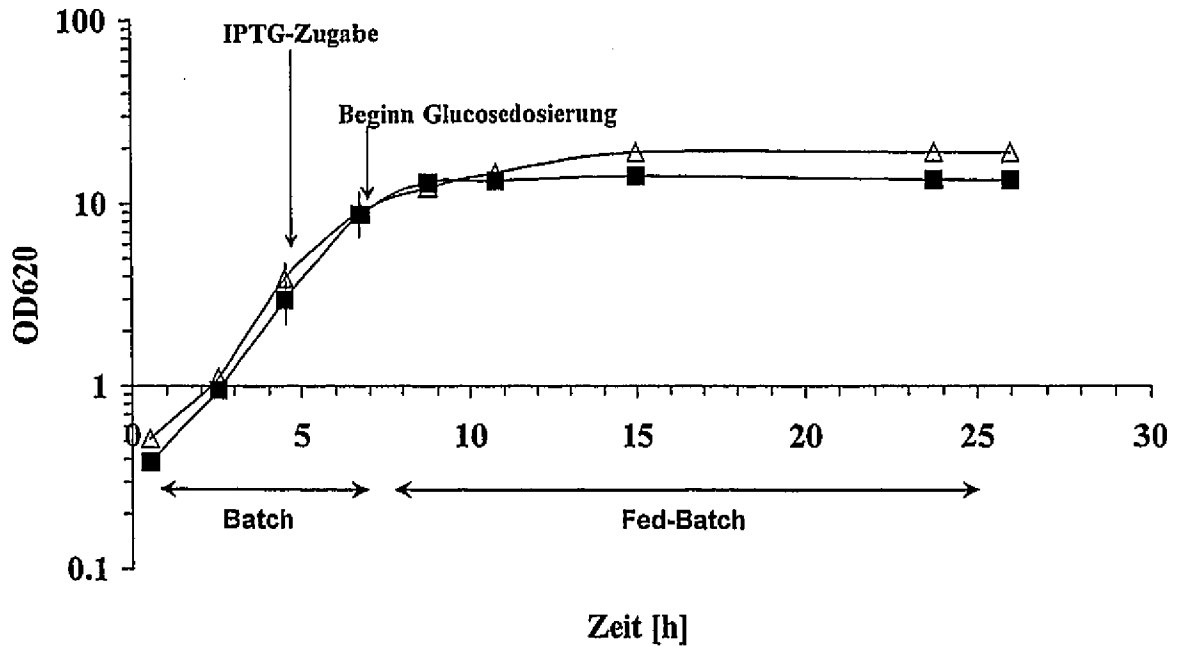


Abbildung 6: Abhängigkeit der Biomassebildung der Stämme LJ 110 *aroB*⁻ / pJF / pMK [Δ] und LJ 110 *aroB*⁻ / pJF *aroF*^{ᶠᵇʳ} / pMK [■] von der Zeit. Die mit einem Balken gekennzeichneten Datenpunkte wurden zur Berechnung der Wachstumsrate verwendet.

Im Kultivierungssystem wuchsen die Bakterienstämme ohne Lag-Phase bis zu einer OD von etwa 10 exponentiell (nach 8 Stunden). Nach 8 stündiger Kultivierung stagnierte das Wachstum der Zellen. Nach Analyse der Proben am Ende der Kultivierung konnten die Supplemente Tyrosin und Phenylalanin nicht mehr nachgewiesen werden, deshalb wäre es möglich, daß die Biomassenbildung durch diese Aminosäuren limitiert ist.

Sauerstoff konnte ab einer OD von 6 nicht ($\leq 0,1\%$) nachgewiesen werden (Sauerstoffmessung mittels O₂-Sonde), die Kultivierungen der Stämme in diesem System wurde somit durch Sauerstoff limitiert.

Bestimmung von Wachstumsraten

Die Wachstumsraten der Stämme lagen um $0,5 \text{ h}^{-1}$ (Tabelle 5, aus Abb. 6 ermittelt), was einer Verdopplungszeit von etwa 1 Stunde und 23 Minuten entsprach. Dieser Wert war etwas niedriger als die in der Literatur angegebene Wachstumsrate für den Stamm W3110 (= LJ110) von $\mu = 0,57 \text{ h}^{-1}$ (Verdopplungszeit von 1h und 13 Minuten), wenn dieser Stamm in

Minimalmedium im Schüttelkolben kultiviert wird (Trchounian und Kabayashi, 1999). Da W3110 *aroB*⁺ ist, die eigenen Untersuchungen aber mit *aroB*⁻ - Stämmen erfolgten, wäre es möglich, daß die etwas niedrigeren Wachstumsraten durch die zu geringen Konzentrationen der Supplemente L-Phe, L-Tyr, L-Trp oder Shikimat verursacht sein könnten. In Vorversuchen in Schüttelkolben wurde eine Verdopplungszeit von ca. 1 Stunde und 30 Minuten ermittelt. In der Fed-Batch-Kultivierung konnten Zellerträge zwischen OD 12 - 18 erzielt werden. Diese waren höher als in Schüttelkolben, die zwischen 5 und 6 lagen. Die Zelldichten der Fed-Batch-Kultivierungen waren gut reproduzierbar.

Tabelle 5: Einfluß der *aroF*^{br} - Induktion auf Wachstumsraten [μ], Zellerträge und gebildeter Biotrockenmasse. Die Daten sind die Mittelwerte zweier Parallelansätze.

eingebrahtes Gen	IPTG-Induktion (100 μ M)	μ [h^{-1}]	End OD ₆₂₀	Biotrockenmasse ¹ [mg]
-.-	+	0,47 $\pm$ 0,02	18 $\pm$ 0,3	590 $\pm$ 17
<i>aroF</i> ^{br}	+	0,5	13,8 $\pm$ 0,7	505 $\pm$ 56
<i>aroF</i> ^{br}	-	0,49	12,3	505 $\pm$ 96

Eine Steuerung des Wachstums der Zellen wurde über die Glucosekonzentration erreicht. Die Zellen verbrauchten bis zum Ende der Kultivierung Glucose, sie waren somit physiologisch aktiv. Der Glucoseverbrauch ist in **Tabelle 6** dargestellt.

Tabelle 6: Glucoseverbrauch in Abhängigkeit von der Expression von *aroF*^{br}. Die Daten sind die Mittelwerte zweier Parallelansätze.

Eingebrachtes Gen	IPTG-Induktion (100 μ M)	Glucoseverbrauch	
		[g]	[%] ²
-.-	+	8,1	100
<i>aroF</i> ^{br}	+	8,1	100

¹ volumenkorrigiert

²Der Glucoseverbrauch des Stammes LJ 110 *aroB*⁻ / pJF / pMK (Wildtypderivat, dessen Aromatenbiosynthese unterbrochen wurde und in dem beide Leerplasmide eingebracht wurde) wurde 100% gesetzt.

Der Glucoseverbrauch der verwendeten LJ 110 *aroB*⁻ - Derivate war nahezu gleich groß. Das Einbringen und die Expression von *aroF^{br}* führte somit zu keiner nennenswerten Veränderung des Glucoseverbrauchs.

Bestimmung des Kohlenstoffflusses in den Aromatenbiosyntheseweg

Zur Bestimmung des Kohlenstoffflusses in den Aromatenbiosyntheseweg wurde die Konzentration von DAHP und DAH nach 26 Stunden bestimmt. Exemplarische Untersuchungen ergaben, daß die Konzentration von DAH im Vergleich zur DAHP Konzentration im Überschuß vorlag (etwa 80 : 20 %). Diese Verhältnis von DAH zu DAHP bestätigte das Ergebnis von Frost und Knowles, 1984.

Zur Analyse des Kohlenstoffflusses wurde die Summe aus DAH und DAHP als DAH(P) betrachtet. **Tabelle 7** stellt die Konzentration von DAH(P) dar. Um von der Biomasse unabhängig zu sein, wurde die spezifische DAH(P) Produktion berechnet. Dazu wurde das Endvolumen des Mediums bestimmt und daraus die produzierte Menge an DAH(P) ermittelt. Die produzierte Menge von DAH(P) wurde durch das berechnete Trockengewicht der Biomasse dividiert. Für die Ermittlung des Trockengewichts aus der optischen Dichte wurde angenommen, daß 1 OD₆₂₀ 0,33g Trockengewicht (dw) / l Medium entspricht (Schmidt K., unveröffentlichte Ergebnisse).

Die spezifische Ausbeute gibt den Anteil der produzierten Menge an DAH(P) pro eingesetzter Glucosemenge in % (C DAH(P) [mol] / C Glucose [mol]) wider. Dieser Wert gibt an, wieviel von dem eingesetzten Kohlenstoff aus der Glucose in DAH(P) überführt wurde.

Tabelle 7 : Endkonzentrationen von DAH(P), gebildete DAHP-Mengen, Spezifische Produktivität sowie spezifische Ausbeute in Abhängigkeit vom Einbringen von *aroF^{fb}* und IPTG-Induktion. Die Daten sind die Mittelwerte zweier Parallelansätze.

Eingebrachtes Gen	IPTG-Induktion (100 µM)	End DAH(P) Konz. [mM]	DAHP-Menge ³ [mmol]	DAH(P)-Produktion [mmol DAH(P) / g dw]	spezifische Ausbeute [% ⁴]
-	+	11,5 ± 1,5	1,1 ± 0,2	1,9 ± 0,3	2,9 ± 0,8
<i>aroF^{fb}</i>	+	30,3 ± 1	2,6 ± 0,5	5,3 ± 0,3	6,9 ± 1,2
<i>aroF^{fb}</i>	-	14,4 ± 0,3	1,6 ± 0,3	3,2 ± 0,1	4,9 ± 0,8

Bereits die Unterbrechung des Kohlenstoffflusses des Aromatenbiosyntheseweges des Wildtypstammes führte zur Exkretion von DAH(P). Das zusätzliche Einbringen von *aroF^{fb}* ohne IPTG-Zugabe führte zu einer geringen Erhöhung der DAH(P) - Konzentration und der spezifischen Ausbeute. Wurde *aroF^{fb}* exprimiert, so führte dies zu einer Erhöhung der Endkonzentration von DAH(P), der spezifischen Produktion und der spezifischen Ausbeute um mehr als das Doppelte. Somit wurde gezeigt werden, daß die Expression von *aroF^{fb}* zu einer Erhöhung des Kohlenstoffflusses in den Aromatenbiosyntheseweg führte. Die Erhöhung des Kohlenstoffflusses in den Aromatenbiosyntheseweg durch eine feedback-deregulierte DAHP-Synthase (*aroG^{fb}*) konnte bereits von Draths und Frost (1992) bzw. von Patnaik und Liao (1995) gezeigt werden.

Bestimmung von Enzymaktivitäten in Rohextrakten

Am Ende der Kultivierung wurden die Zellen geerntet und die spezifische Enzymaktivitäten der DAHP-Synthasen bestimmt. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 8** dargestellt.

³ volumenkorrigiert

⁴ gebildetes DAH(P) [mol C] / verbrauchte Glucosemenge [mol C] in [%]

Tabelle 8: Spezifische Aktivitäten (in mU / mg Protein) der DAHP-Synthasen in zellfreien Rohextrakten von *Escherichia coli* LJ 110 *aroB*⁻ Derivaten in Abhängigkeit vom eingebrachten *aroF*^{fb}-Gen und IPTG-Induktion. Die Daten sind die Mittelwerte zweier Parallelansätze. (-.): Leerplasmid

eingebrachtes Gen	IPTG-Induktion [100 µM]	DAHP-Synthasen
(-.)	+	< 20
<i>aroF</i> ^{fb}	+	480 ± 50
<i>aroF</i> ^{fb}	-	194 ± 15

Der Stamm LJ 110 *aroB*⁻ mit den Leerplasmiden pMK und pJF wies niedrige DAHP-Synthase-Aktivitäten auf. Das Einbringen eines Gens einer feedback-inhibitionsresistenten DAHP-Synthase führte zu einer Erhöhung der spezifischen Aktivität von DAHP-Synthasen. Diese Aktivität war schon ohne Induktion durch IPTG meßbar und höher als im LJ110 *aroB*⁻-Stamm mit den beiden Leerplasmiden. Deshalb kann angenommen werden, daß der vorgeschaltete *tac*-Promotor nicht dicht ist. Durch Induktion der Expression mit IPTG erhöhte sich die spezifische Aktivität der DAHP-Synthase um etwa das Zwei- bis Dreifache.

1.4 Erhöhung der Verfügbarkeit von Erythrose-4-Phosphat

Nachdem gezeigt wurde, daß die Induktion von *aroF*^{fb} zu einer Erhöhung des Kohlenstoffflusses in den Aromatenbiosyntheseweg führte, sollte die Erhöhung der Bereitstellung von E4P durch Erhöhung der Expression der Gene *tal*, *tkt* bzw. der Kombination aus *tkt* und *tal* untersucht werden. Dazu wurden die Plasmide pMK, pMK *tkt*, pMK *tal* sowie pMK *tkt tal* in den Stamm LJ 110 *aroB*⁻ pJF119 EH *aroF*^{fb} eingebracht.

Abbildung 7 stellt die Genkombinationen auf den jeweiligen Plasmiden in den Stamm LJ 110 *aroB*⁻ dar.

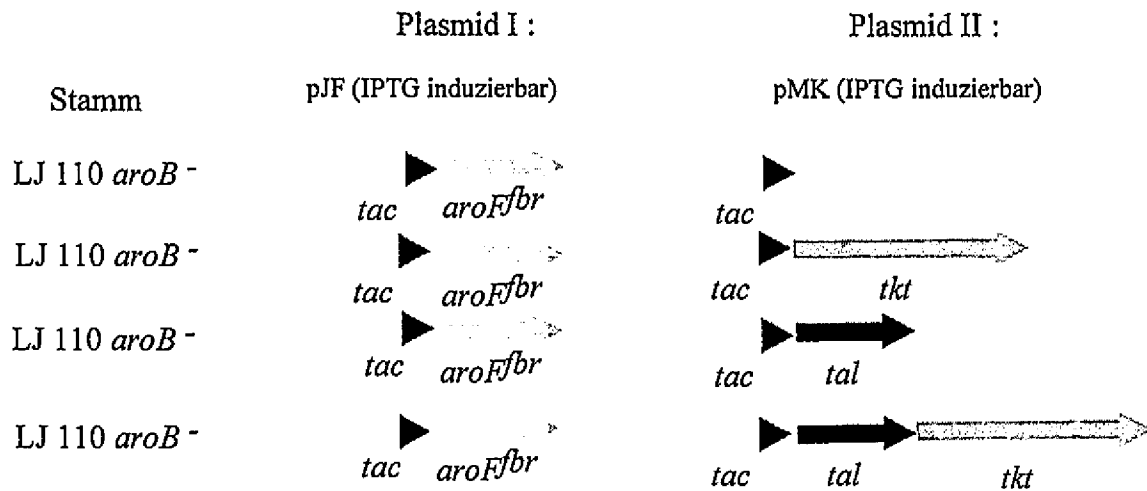


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Genkombinationen rekombinanter *Escherichia coli* Stämme zur Untersuchung der Erhöhung der Bereitstellung von E4P.

Die Stämme wurden unter Fed-Batch-Bedingungen kultiviert (s. S. 16 u. 35), um die Auswirkungen der Überexpression der Transketolase und der Transaldolase auf das Wachstum in der Fed-Batch-Kultivierung zu analysieren. Dazu wurden die Wachstumsraten ermittelt (s. Tabelle 9).

Bestimmung von Wachstumsraten

Tabelle 9: Wachstumsraten von LJ 110 *aroB*⁻ - Derivaten in Abhängigkeit der Genkombination und IPTG-Induktion. Die Daten sind die Mittelwerte zweier Parallelansätze.

Genkombination	IPTG-Induktion (100 μ M)	μ [h ⁻¹]	End OD ₆₂₀	Biotrockenmasse ⁵ [mg]
<i>aroFfbr</i> / -,-	+	0,50	13,8 $\pm$ 0,7	505 $\pm$ 56
<i>aroFfbr</i> / <i>tal</i>	+	0,46	16,7 $\pm$ 2	554 $\pm$ 16
<i>aroFfbr</i> / <i>tkt</i>	+	0,48	13,2 $\pm$ 2	473 $\pm$ 43
<i>aroFfbr</i> / <i>tkt tal</i>	+	0,49	14,8 $\pm$ 0,2	512 $\pm$ 43
<i>aroFfbr</i> / -,-	-	0,49	12,3	505 $\pm$ 96
<i>aroFfbr</i> / <i>tal</i>	-	0,52 $\pm$ 0,03	12,5 $\pm$ 0,5	538 $\pm$ 3

⁵ volumenkorrigiert

In der Fed-Batch-Kultivierung war die Wachstumsrate der Stämme unabhängig von der Art der eingebrachten Gene und der Expression dieser Gene. Daraus folgt, daß die Erhöhung der Expression der Gene der Transketolase, der Transaldolase sowie die Kombination aus Transketolase und Transaldolase zusätzlich zu *aroF^{br}* keinen deutlichen Einfluß auf die Wachstumsrate ausübt.

Während der Kultivierung wurden Proben aus den Schüttelkolben entnommen und die DAH(P)-Konzentration in Abhängigkeit der Kultivierungszeit bestimmt. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 8** dargestellt.

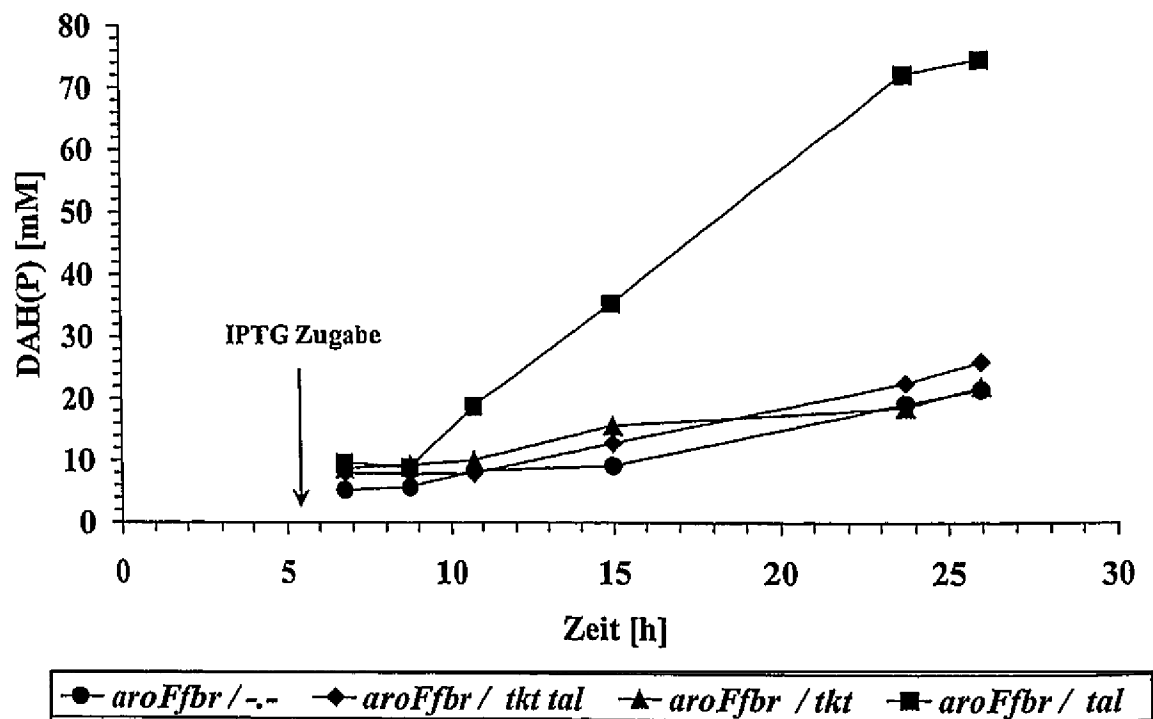


Abbildung 8: DAH(P)-Konzentrationen von Überständen als Funktion der Kultivierungszeit in Abhängigkeit von der Genkombination (*aroFfbr* = *aroF^{br}*).

Die Konzentration von DAH(P) stieg im Laufe der Kultivierungszeit an. Das Einbringen und die Induktion von *aroF^{br}* in den Stamm LJ 110 *aroB*⁻ führte zum Anstieg der DAH(P)-Konzentration von ca. 5 mM auf 20 mM. Wurde das Gen *tkt* oder die Kombination aus *tkt* und *tal* zusätzlich zu *aroF^{br}* eingebracht und exprimiert, so veränderte sich der zeitliche Verlauf der DAH(P) Konzentration im Medium wenig (s. **Abbildung 8**).

Dagegen führte das Einbringen und die Expression von *tal* allein zusätzlich zu *aroF^{br}* zu einem starken Anstieg der DAH(P)-Konzentration von knapp 10 mM auf fast 75 mM.

DAH(P) wurde erst nach Erreichen des Endes der logarithmischen Wachstumsphase bzw. in der stationären Phase von den Zellen produziert. Exemplarisch ist dazu in **Abbildung 9** die Biomasse sowie die DAH(P)-Konzentration im Medium der Kombination aus *aroF^{br}* und *tal* in den LJ 110 *aroB⁻* - Stamm in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit dargestellt.

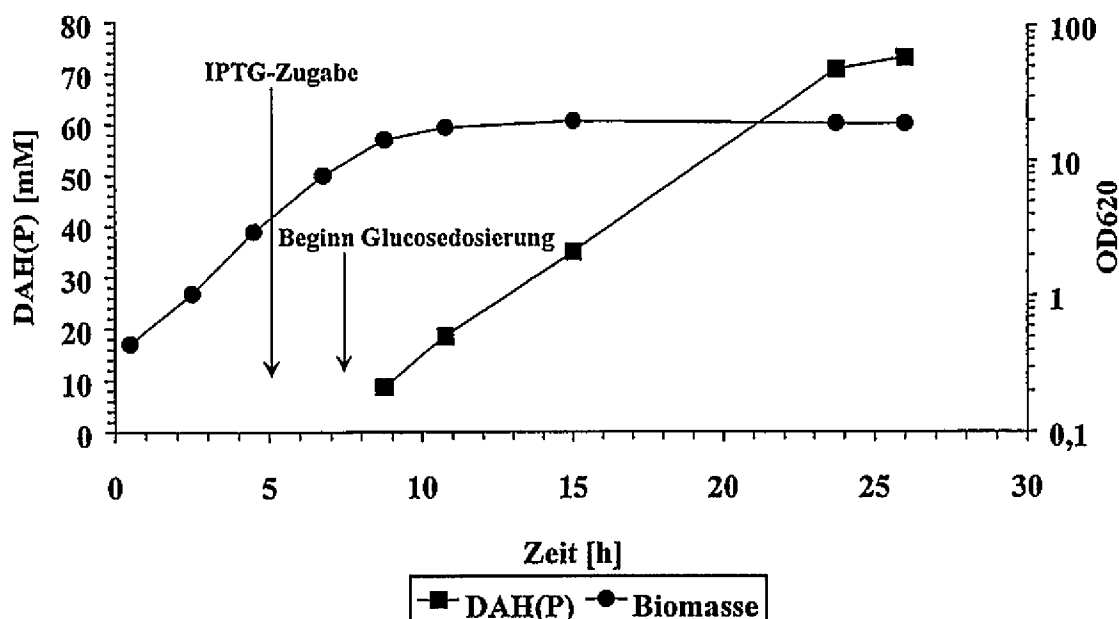


Abbildung 9: Stamm LJ 110 *aroB⁻* / pJF *aroF^{br}* / pMK *tal*: DAH(P)-Konzentrationen und Biomasse in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit.

Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg der Genkombinationen aus *aroF^{br}*, *tal* und *tkl* in LJ 110 *aroB⁻* Derivaten

Für die Bestimmung des Kohlenstoffflusses in den Aromatenbiosyntheseweg wurden die spezifische Produktivität sowie die spezifische Ausbeute von DAH(P) bestimmt. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 10** dargestellt.

Tabelle 10: Endkonzentrationen von DAH(P), gebildete DAHP-Mengen, Spezifische Produktivität sowie spezifische Ausbeute in Abhängigkeit von der Genkombination und IPTG-Induktion. Die Daten sind die Mittelwerte zweier Parallelansätze.

Genkombination	IPTG- Induktion (100 μ M)	End DAHP Konz. [mM]	DAHP-Menge ⁶ [mmol]	DAH(P)- Produktion [mmol DAH(P) / g dw]	Spezifische Ausbeute [% ⁷]
<i>aroF^{br} / -,-</i>	+	26 $\pm$ 5	2,7 $\pm$ 0,5	5,3 $\pm$ 0,3	6,9 $\pm$ 1,2
<i>aroF^{br} / tal</i>	+	60 $\pm$ 13	5,8 $\pm$ 1,0	10,5 $\pm$ 1,5	15,0 $\pm$ 2,6
<i>aroF^{br} / tkt</i>	+	20 $\pm$ 1	2,3 $\pm$ 0,3	4,9 $\pm$ 1	5,9 $\pm$ 0,8
<i>aroF^{br} / tkt tal</i>	+	22 $\pm$ 3	2,0 $\pm$ 0,5	4,1 $\pm$ 1,4	5,5 $\pm$ 1
<i>aroF^{br} / tal</i>	-	13 $\pm$ 1	1,8 $\pm$ 0,1	3,4 $\pm$ 0,1	5,6 $\pm$ 0,7

Die Expression von *tkt* oder die der Kombination aus *tkt* und *tal* zusätzlich zu *aroF^{br}* führte zu keiner signifikanten Veränderung der DAH(P)-Produktion oder der spezifischen Ausbeute. Somit konnte weder durch Erhöhung der Expression von *tkt* noch durch eine Kombination aus *tkt* und *tal* der Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg gesteigert werden.

Dagegen konnten durch Erhöhung der Expression von *tal* zusätzlich zum *aroF^{br}*-Gen die spezifische Produktion und die spezifische Ausbeute von DAH(P) auf fast das Doppelte erhöht werden. Somit führte die Erhöhung der Expression des Gens der Plasmid-kodierten Transaldolase (*tal*) zur Erhöhung des Kohlenstoffflusses in den Aromatenbiosyntheseweg. Für die Erhöhung des Kohlenstoffflusses ist die Expression der Gene *aroF^{br}* und *tal* notwendig. Ohne Expression dieser Gene ist der Eintrag in den Aromatenbiosyntheseweg gering.

Da DAHP-Produktion erst nach Erreichen der stationären Phase und nach Einschalten der Glucosedosierung einsetzt (s. Abb. 9, s.S 45), waren die spezifischen Ausbeuten von DAH(P) über die Produktionsphase um ca. 20 % höher (Stamm LJ110 *aroB⁻* / pJF119 EH *aroF^{br}* / pMK *tal*), als die spezifischen Ausbeuten von DAH(P) über den gesamten Kultivierungsverlauf.

⁶ volumenkorrigiert

⁷ gebildetes DAH(P) [mol C] / verbrauchte Glucosemenge [mol C] in [%]

Glucoseverbrauch von Genkombinationen aus *aroF^{br}* mit *tal*, *tkl* und *tkl* und *tal* in LJ 110 *aroB⁻*-Derivaten

Nach der Kultivierung wurde der Glucoseverbrauch der Stämme analysiert. **Tabelle 11** stellt die Ergebnisse dar.

Tabelle 11: Glucoseverbrauch von Genkombinationen von LJ 110 *aroB⁻*-Derivaten mit Genkombinationen aus *aroF^{br}* und *tal*, *tkl* sowie *tkl* und *tal* nach Fed-Batch-Kultivierung. Die Daten sind die Mittelwerte zweier Parallelansätze.

Genkombination	IPTG-Induktion (100 µM)	Glucoseverbrauch	
		[g]	[%] ⁸
<i>aroF^{br}</i> / -.-	+	8,1	101
<i>aroF^{br}</i> / <i>tkl</i>	+	8,1 ± 0,1	101 ± 1
<i>aroF^{br}</i> / <i>tal</i>	+	8,2 ± 0,1	100
<i>aroF^{br}</i> / <i>tkl tal</i>	+	7,6 ± 0,5	94 ± 8

Das Einbringen und die Expression der Gene *tkl*, *tal* bzw. *tkl tal* zusätzlich zu *aroF^{br}* führten zu keiner Veränderung des Glucoseverbrauchs.

Analyse organischer Säuren von Genkombinationen aus *aroF^{br}* und *tal* LJ 110 *aroB⁻*

Die Induktion der Expression von *aroF^{br}* und *aroF^{br}* in Kombination mit *tal* führte zur Erhöhung des Kohlenstoffflusses in den Aromatenbiosyntheseweg. Um die Effekte der Erhöhung des Kohlenstoffflusses in den Aromatenbiosyntheseweg zu analysieren, wurde die Zusammensetzung des Spektrums der organischen Säuren untersucht. So können Rückschlüsse auf Stoffflüsse gezogen werden.

Das Spektrum der organischen Säuren wurde aus Überständen ermittelt, die am Ende des Kultivierungszeitpunktes (nach 26 Stunden) entnommen wurden. Untersucht wurde die Anwesenheit von Fumarat, Acetat, Lactat, Pyruvat, sowie Malat. **Abbildung 10** stellt die Ergebnisse dar.

⁸Der Glucoseverbrauch des Stammes LJ 110 *aroB⁻* / pJF / pMK wurde 100% gesetzt.

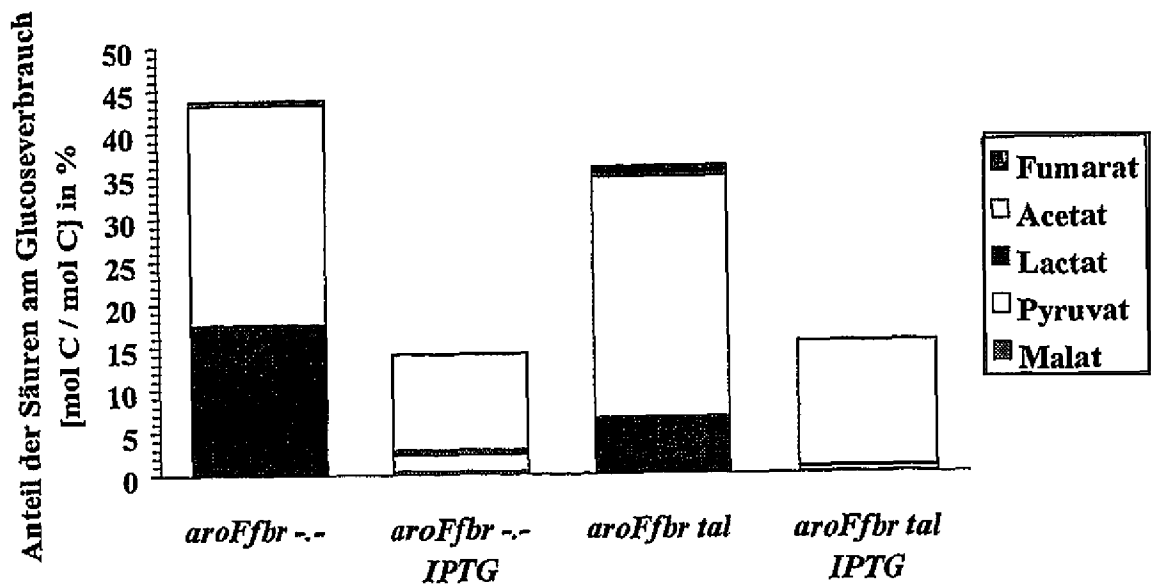


Abbildung 10: Anteil produzierter organischer Säuren am Glucoseverbrauch [in mol / mol C] in % in Abhängigkeit der eingebrachten Gene und IPTG-Zugabe. Die Daten sind die Mittelwerte zweier Parallelansätze ($aroFfbr = aroF^{fbr}$).

Ohne Expression von $aroF^{fbr}$ wurde ein großer Anteil (etwa 45%) des Kohlenstoffs aus der Glucose in organische Säuren umgesetzt. Die produzierten Säuren setzten sich fast zu gleichen Teilen aus Acetat und Lactat zusammen. Nach Expression verringerte sich der Anteil der organischen Säuren auf etwa ein Drittel (etwa 14%). Den Hauptanteil bildete Acetat. Geringe Anteile bildeten Pyruvat (ca. 2% und Lactat unter 1%).

Wurde die Expression von *tal* zusätzlich zu $aroF^{fbr}$ induziert, wurde nahezu der gleiche Anteil des Kohlenstoffs in organische Säuren überführt, wie bei einer alleinigen Expression von $aroF^{fbr}$. Die zusätzliche Expression von *tal* zur feedback-deregulierten DAHP-Synthase $aroF^{fbr}$ führte somit zu keiner Veränderung bezüglich des Kohlenstoffflusses in organische Säuren. Die organischen Säuren setzten sich nach Expression von *tal* fast vollständig aus Acetat zusammen. Pyruvat und Lactat bildeten sehr niedrige Anteile von jeweils unter 1%.

Eine Bestimmung der entstehenden Kohlendioxidmenge war nicht möglich, weil das Gas über den Deckel aus dem Kultivierungssystem entweichen konnte und so durch einen Abgasanalysator nicht erfaßbar war. Deshalb konnte keine geschlossene Kohlenstoffbilanz ermittelt werden: Für den Stamm LJ 110 $aroB^-$ / pJF $aroF^{fbr}$ / pMK *tal* konnte nach Induktion etwa ein Drittel des eingesetzten Kohlenstoffs nachgewiesen werden, ohne Induktion über die Hälfte (s. Tabelle 13).

Tabelle 13: Kohlenstoffbilanzierung von LJ 110 *aroB*⁻ / pJF *aroF*^{br} / pMK *tal* nach Fed-Batch-Kultivierung [in mol C Produkte / mol C Glucose in %]. Die Daten sind die Mittelwerte zweier unabhängiger Experimente.

Produkte	<i>aroF</i> ^{br} / <i>tal</i>	<i>aroF</i> ^{br} / <i>tal</i>
IPTG-Induktion (100 µM)		
Summe organischer Säuren ⁹	15,2 ± 2,2	41,3 ± 9,0
Biomasse	7,7 ± 0,6	8,7 ± 0,9
DAH(P)	15,3 ± 3,1	5,6 ± 0,8
Summe	40 ± 8	55 ± 7

Nach der Kultivierung wurden die Zellen geerntet sowie die spezifischen Aktivitäten der Transaldolase (Tal), der Transketolase (Tkt) und der DAHP-Synthasen bestimmt. **Tabelle 14** stellt die Ergebnisse dar.

Tabelle 14: Spezifische Aktivitäten (in mU / mg Protein) der Enzyme Transaldolase (Tal), Transketolase (Tkt) und DAHP-Synthasen in zellfreien Rohextrakten von LJ 110 *aroB*⁻ - Derivaten in Abhängigkeit von der Genkombination. Die Daten sind die Mittelwerte zweier Parallelansätze.

Genkombination	IPTG-Zugabe	Tal	Tkt	DAHP-Synthasen
<i>aroF</i> ^{br} / -,-	+	271 ± 47	265 ± 48	480 ± 50
<i>aroF</i> ^{br} / <i>tkt</i>	+	246 ± 47	3502 ± 278	530 ± 70
<i>aroF</i> ^{br} / <i>tal</i>	+	2718 ± 568	489 ± 51	1100 ± 11
<i>aroF</i> ^{br} / <i>tkt tal</i>	+	1908 ± 243	3937 ± 278	366 ± 45

Nach Einbringen und Expression der Gene *tkt* und *tal* in Kombination mit *aroF*^{br} erhöhte sich die spezifische Aktivität der Transaldolase um ca. das 7 - 14-fache, die der Transketolase etwa um das 7 - 10-fache.

Das Einbringen und die Expression von *tkt* sowie des Operons aus *tkt* und *tal* zusätzlich zu *aroF*^{br} führten zu keiner Veränderung der spezifischen Aktivität der DAHP-Synthasen. Dagegen war, wenn *tal* in Kombination mit *aroF*^{br} eingebracht und exprimiert wurde, nahezu eine Verdopplung der spezifischen Aktivität der DAHP-Synthasen meßbar.

Offenbar korrelierte die Expression von *tal* mit einer Erhöhung der spezifischen Aktivität der DAHP-Synthase. Dieser Effekt trat nicht auf, wenn zusätzlich das Gen der Transketolase exprimiert wurde. Die Bedeutung dieses Ergebnisses wird im Diskussionsteil erörtert.

Eine Erhöhung des Kohlenstoffflusses in den Aromatenbiosyntheseweg wurde durch Steigerung der Expression des Genes einer feedback-deregulierten DAHP-Synthase (*aroF^{br}*) erreicht. Der Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg wurde weiter verstärkt, wenn zusätzlich zur Expression einer feedback-deregulierten DAHP-Synthase die Expression des Gens der Transaldolase erhöht wurde.

Dagegen konnte der Kohlenstofffluß weder durch eine Erhöhung der Expression der Transketolase noch durch eine Kombination aus Transketolase und Transaldolase verstärkt werden. Die Erhöhung des Eintrags des Kohlenstoffs in den Aromatenbiosyntheseweg geht mit einer Verminderung von Nebenprodukten einher.

⁹ Bestimmt wurden die Säuren Acetat, Fumarat, Lactat, Malat und Pyruvat.

2. Untersuchungen zur Erhöhung der Bereitstellung von Phosphoenolpyruvat auf den Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg

Phosphoenolpyruvat entsteht in der Glycolyse aus der Wasserabspaltung von 2-Phosphoglycerat, das durch Enolase katalysiert wird. Um die Bereitstellung von PEP zu erhöhen, stehen prinzipiell zwei Möglichkeiten zur Verfügung:

- a) Erhöhung von Aktivitäten von Enzymen, die an Reaktionen beteiligt sind, welche zur Synthese von PEP führen.

Zur Erhöhung der Bereitstellung von PEP war z.B. die PEP-Synthetase überexprimiert worden (Patnaik *et al.*, 1995).

- b) Ausschaltung von Reaktionen, die am Verbrauch von PEP beteiligt sind. Die Verminderung des Verbrauchs von PEP konnte durch Ausschalten der Pyruvat-Kinasen erreicht werden (Gosset *et al.*, 1996).

Eine weitere, möglicherweise effektivere Methode besteht darin, das PEP verbrauchende Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferase-System (PTS) auszuschalten. Da PTS⁻ - Stämme von *E. coli* ohne zusätzliche Mutationen (z. B. im Gen einer Galaktosepermease, *galP* (Flores *et al.*, 1996)) keine Glucose aufnehmen können, muß eine alternative Glucoseaufnahme erfolgen. Es konnte bisher gezeigt werden, daß Glucose über ein Glucosetransport- und Phosphorylierungssystem aus Glucosetransportprotein (Glf) und Glucokinase (Glk) aus *Zymomonas mobilis* verstoffwechselt werden konnte (Snoep *et al.*, 1994, Parker *et al.*, 1995, Weisser *et al.*, 1995).

2.1 Untersuchungen in PTS⁺ - Stämmen

Die Auswirkungen dieses Systems auf den Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg sollte untersucht werden. Da *E. coli* – Wildtypstämme nur eine schwach aktive Glucokinase aufweisen (Curtis und Epstein, 1975), sollte auch das Glucosetransport- und

Phosphorylierungssystem aus Glucosetransportprotein (Glf) und die vorhandene Glucokinase (Glc) aus *E. coli* eingesetzt werden.

Um die Auswirkungen des Glucosetransport- und Phosphorylierungssystems aus Glf und Glk auf den Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg zu untersuchen, sollten die kodierende Gene *glf* und *glk_{zm}* kloniert und überexprimiert werden. Die Sequenzen der Gene *glf* und *glk_{zm}* waren bekannt (Barnell *et al.*, 1990) und lagen bereits kloniert vor (Weisser *et al.*, 1995). Die Gene des Systems *glf* und *glk* sollten zunächst in Kombination mit einem aktiven PTS-System eingesetzt und mit *aroF^{br}* im *aroB⁻* - Stamm kombiniert werden.

Abbildung 11 stellt die eingebrachten Veränderungen schematisch dar.

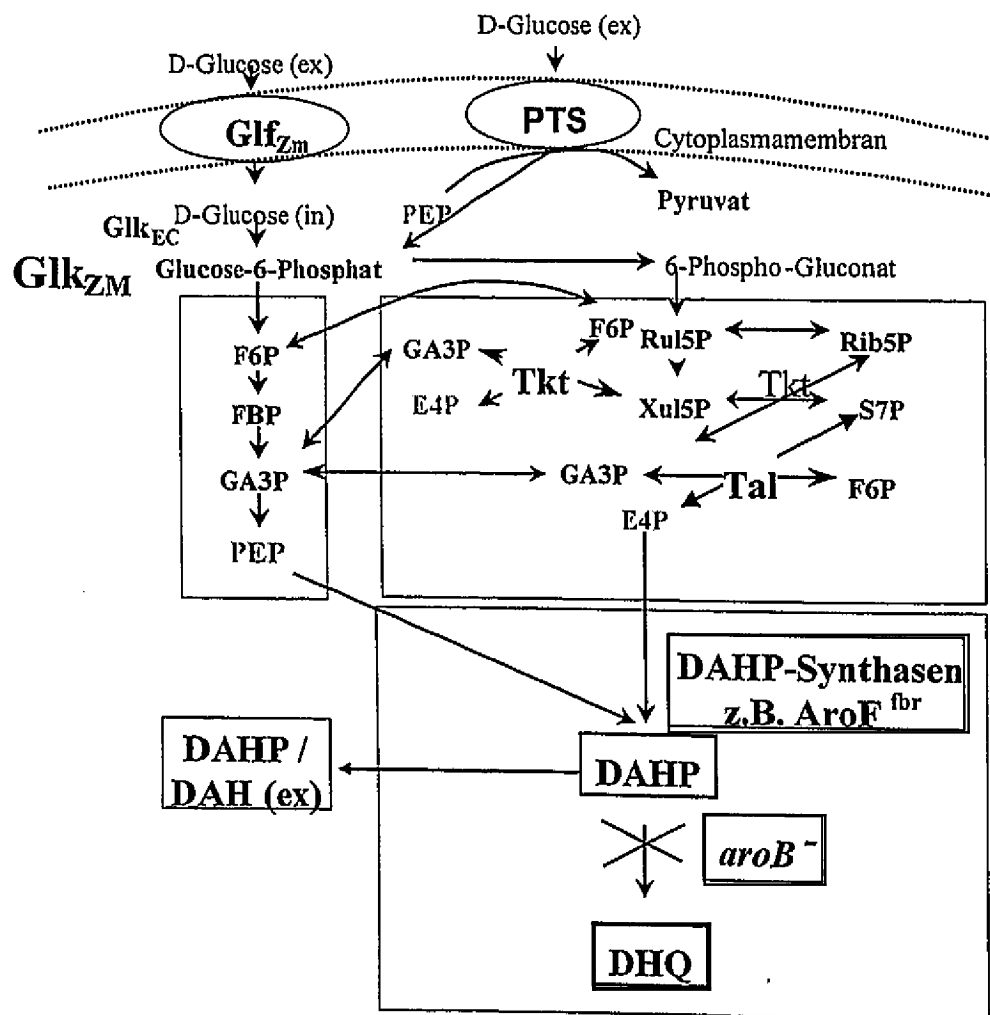


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Prinzipes der Bestimmung des Kohlenstoffflusses in den Aromatenbiosyntheseweg. Glucose sollte über das PTS-System bzw. über Glf und Glk in die Zelle transportiert und phosphoryliert werden. PEP aus der Glykolyse bzw. E4P aus dem Pentose-Phosphat-Weg wird über eine feedback-inhibitionsresistente DAHP-Synthase zu DAHP katalysiert. Der Aromatenbiosyntheseweg wurde nach der Eingangsreaktion unterbrochen. Anhand der externen DAH(P)-Konzentrationen konnte der Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg berechnet werden. RPE: Ribulose-5-Phosphat-Epimerase, RPI: Ribose-5-Phosphat-Isomerase, PTS: Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferase-System; Glf Glucosefacilitator; Glk_{EC}, Glk_{zm}:

Glucokinase aus *E. coli*, aus *Zymomonas mobilis* ; Tkt: Transketolase, Tal: Transaldolase, GA3P: Glycerinaldehyd-3-Phosphat, Ru5P: Ribulose-5-Phosphat, Rib5P: Ribose-5-Phosphat, Xu5P: Xylulose-5-Phosphat, F6P: Fructose-6-Phosphat, FBP: Fructose-bis-Phosphat, PEP: Phosphoenolpyruvat; E4P: Erythrose-4-Phosphat; S7P: Sedoheptulose-5-Phosphat; DAHP, DAH: 3-Desoxy-D-Arabino-Heptulose-7-Phosphat, 3-Desoxy-D-Arabino-Heptulose; DHQ: 3-Dehydroquinate.

Zur Konstruktion des Stoffwechselweges mußten die Gene kloniert und auf ihre Funktionsfähigkeit untersucht werden.

Klonierung von *glk_{zm}* in pMK

Das Gen *glk_{zm}* wurde ohne eigenen Promotor in den Vektor pMK hinter den Promotor *P_{tac}* kloniert. Zur Überprüfung wurde das Plasmid in den Stamm LJ110 eingebracht. Der Stamm LJ110 / pMK *glk* wurde im Vollmedium in Gegenwart bzw. Abwesenheit von IPTG (100µM) kultiviert. Nach der Kultivierung wurden die spezifischen Aktivitäten der Glucokinase dieses Stammes sowie des Kontrollstammes LJ 110 / pMK in zellfreien Rohextrakten bestimmt. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 14** dargestellt.

Tabelle 14: Spezifische Enzymaktivitäten (in U / mg Protein) der Glucokinase. Die Plasmide pMK und pMK *glk* wurden in den Stamm LJ 110 eingebracht und in (+) bzw. ohne (-) Gegenwart von IPTG (100µM) in LB-Medium kultiviert. (n.b.: nicht bestimmt).(-.-): Leerplasmid.

Eingebrachtes Gen	Glucokinase (- / + IPTG)
(-.-)	0,01 / n.b.
<i>glk</i>	0,06 / 9,6

Durch Expression von *glk* stieg die spezifische Aktivität auf fast das 160-fache an. Schon ohne IPTG-Zugabe war die spezifische Aktivität der Glucokinase höher als im isogenen Stamm mit dem Leerplasmid. Dies weist darauf hin, daß der *tac*-Promotor schwach leaky war. Im Kontrollstamm war die Glucokinaseaktivität, wie erwartet, sehr niedrig (Curtis und Epstein, 1975). Das Plasmid pMK *glk* war somit funktionell aktiv, und es konnte in geeignete Systeme eingesetzt werden.

Klonierung von *glf* in pJF *aroF^{br}*

Das Gen *glf* wurde auf dem Plasmid hinter dem Gen der feedback-deregulierten DAHP-Synthase (*aroF^{fb}*) kloniert. Um die Funktion dieses Plasmides (pJF *aroF^{fb}* *glf*) zu überprüfen, wurde das Plasmid in den Stamm ZSC112L Δ *pts* / pMK *glk*, einem *E. coli* Stamm ohne Glucoseaufnahmesystem, eingebracht. Zur Kontrolle wurde auch das Plasmid pJF *aroF^{fb}* transformiert. Die Stämme wurden auf MacConkey Platten mit 1%iger Glucose mit bzw. ohne IPTG (500 μ M) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 15** dargestellt.

Tabelle 15: Ergebnisse von Kultivierungen auf MacConkey pH-Indikatorplatten mit 1% Glucose mit bzw. ohne IPTG (500 μ M).

Genkombination in ZSC112L Δ <i>pts</i> ¹⁰	Färbung: (- / + IPTG)
<i>aroF^{fb}</i> / <i>glk</i>	weiß / weiß
<i>aroF^{fb}</i> <i>glf</i> / <i>glk</i>	hellrot / rot

Rotfärbung der Mac Conkey Indikatorplatten durch Säurebildung zeigt die Verwertung von Glucose an. Glucose kann wegen eines nicht vorhandenen Glucoseaufnahme- und Phosphorylierungssystems des Stammes ZSC112L Δ *pts* nur über Glf und Glk verwertet werden (Snoep *et al.*, 1994, Weisser *et al.*, 1995).

Das Ergebnis zeigt, daß nur die Kombination aus *aroF^{fb}*, *glf* und *glk* zur Säurebildung führte und durch Zugabe von IPTG die Säurebildung weiter gesteigert werden konnte. Somit wurde gezeigt, daß *glf* funktionell exprimiert wurde und IPTG die Expression weiter steigerte.

Die Genkombination aus *aroF^{fb}*, *glf_{Zm}* und *glk_{Zm}* wurde durch Transformation der Plasmide pJF *aroF^{fb}* *glf_{Zm}* und pMK *glk_{Zm}* in den Stamm LJ110 *aroB*⁻ eingebracht. Um die Genkombination aus *aroF^{fb}*, *glf* mit der vorhandenen chromosomalen Glukokinase aus *E. coli* zu kombinieren wurde das Plasmid pJF *aroF^{fb}* *glf* zusammen mit dem Leerplasmid pMK in den Stamm LJ110 *aroB*⁻ transformiert. Die konstruierte Stämme sind in **Abbildung 12** dargestellt.

¹⁰ ZSC112L Δ *pts* ist ein Stamm ohne Glucoseaufnahme und Phosphorylierungssystem.

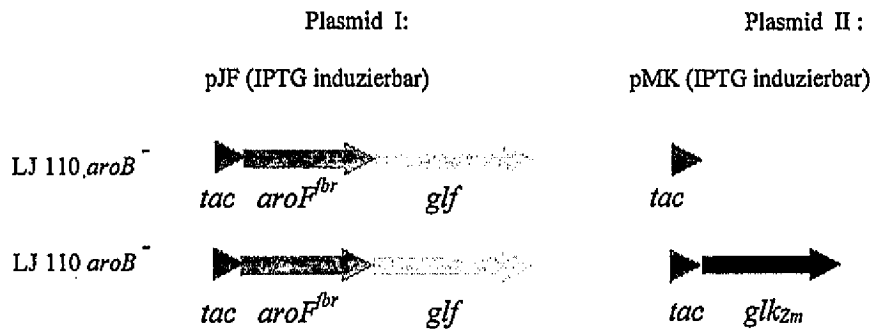


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Genkombinationen rekombinanter *Escherichia coli* Stämme zur Untersuchung der Erhöhung der Bereitstellung von PEP mit den Glucoseaufnahmesystemen aus *glf* und *glk*, beide aus *Zymomonas mobilis*, bzw. *glf* aus *Zymomonas mobilis* und *glk* aus *E. coli*. Der Rezipientenstamm weist ein intaktes PTS-System auf.

Die Stämme wurden in Minimalmedium nach Tanaka (Tanaka *et al.*, 1967) mit 0,5% (= 28 mM) Glucose kultiviert (250 ml Kolben mit 50 ml Medium). Dazu wurden die Zellen zu einer OD von 0,05 angeimpft und die Stämme nach zwei bis drei Teilungen mit IPTG (100 µM) induziert. Es wurde festgestellt, daß sehr niedrige Mengen von DAH(P) in das Medium exkretiert wurden (1 - 2 mM). Der Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg war somit mit diesem System sehr gering. Diese Vorversuche ergaben den Hinweis, daß die Glucoseaufnahme des PTS-Systems gegenüber dem System aus Glf und Glk möglicherweise dominant war.

Deshalb sollten die gleichen Genkombinationen in PTS negative Stämme eingebracht werden, und durch Kultivierung der Stämme der Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg bestimmt werden.

2.2 Untersuchungen in PTS⁻ - Stämmen : Konstruktion von LJ110 *ptsI::glf*

In Wildtypzellen wird Glucose über eine PEP-verbrauchende Phosphorylierungskaskade aus Hpr, E1 sowie E_{IIA}^{Glc} und über das Membranprotein E_{IIBC}^{Glc} in die Zelle transportiert. Die Gene der Komponenten der Phosphorylierungskaskade liegen als Operon *ptsH*, *ptsI* und *crr* vor (Postma *et al.*, 1996). Um die Verfügbarkeit von PEP zu erhöhen, wurde die Phosphorylierungskaskade durch Insertion von *glf* in *ptsI* unterbrochen. Ein Glucosephosphorylierung ist somit über das PTS-System nicht möglich. Glucose kann jedoch

über das heterologe Glucoseaufnahme- und Phosphorylierungssystem bestehend aus Glucosefacilitator und Glucokinase in die Zelle transportiert und phosphoryliert werden. *glf* wurde in *ptsI* des Plasmides pGP 704 *ptsH ptsI crr* kloniert (Siewe R., unveröffentlichte Ergebnisse). Das konstruierte Plasmid pGP 704 *ptsH ptsI::glf crr* repliziert nur in λ -*pir* Stämmen (Miller *et al.*, 1988). Es kann wegen der flankierenden Bereiche *ptsH* und *crr* in homologe Bereiche des Chromosoms (*ptsH* bzw. *crr*) integrieren und in nicht- λ -*pir* Stämmen nur als Episom repliziert werden. Da pGP 704 einen Marker für Ampicillinresistenz trägt, ist eine Selektion von Klonen mit integriertem Plasmid über Ampicillinresistenz möglich. Das Plasmid pGP704 *ptsH ptsI::glf crr* wurde in das Chromosom des Stammes AT2471 über homologe Rekombination eingebracht (Siewe R., unveröffentlichte Ergebnisse). Dieser Stamm ist Ampicillin-resistent. In **Abbildung 13** ist die PTS-Genkassette im Chromosom des Stammes AT2471:: pGP 704 *ptsH ptsI::glf crr* dargestellt.

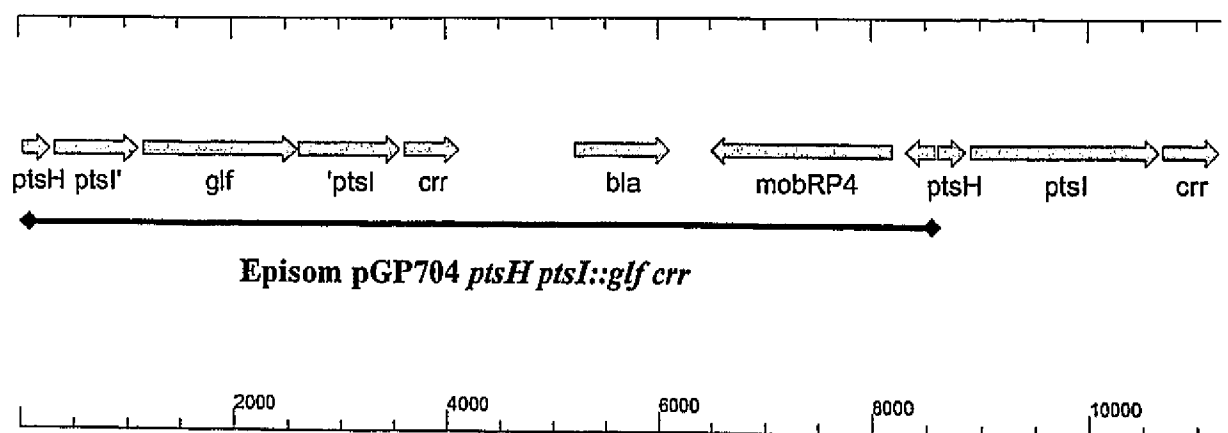


Abbildung 13: Anordnung des Episoms pGP704 *ptsH ptsI::glf crr* in AT 2471. Die Größe des Episoms beträgt 12,3 kbp. *bla* und *mobRP4* sind Bestandteile des Vektors pGP704. *bla* : Gen für β -Lactamase (vermittelt die Ampicillinresistenz), *ptsH*: Gen für Hpr, *ptsI*: Gen für E1, *crr*: Gen für E_{IIA}Glc, *glf*: Gen für Glucosefacilitator.

Das Episom pGP 704 *ptsH ptsI::glf crr* wurde in LJ110 *aroB*⁻ mittels P1-Phagen transduziert. Ein erfolgreich transduzierter Klon LJ 110 *aroB*⁻ pGP 704 *ptsI::glf* war wegen des Episoms Ampicillin-resistent. Dieser Stamm war wegen eines intakten Operons aus *ptsH*, *ptsI* und *crr* (s. **Abbildung 13**) weiterhin PTS⁺. Um PTS⁻ - Stämme zu selektionieren, wurde die Methode der Fosfomycinanreicherung verwendet (Cordaro *et al.*, 1976). Fosfomycin ist ein Struktur analogon von PEP. Stämme, die PTS⁻ sind, sind Fos^R. Zur Selektion eines LJ110 *aroB* Stammes, der PTS⁻ ist, wurde der Klon LJ110 *aroB*⁻ pGP 704 *ptsI::glf* auf

fosfomycinhaltigen Agarplatten ausgestrichen. So konnte ein Klon (LJ 110 *aroB*⁻ *ptsI::glf*), der durch Doppelcross-over in *err* die PTS-Genkassette mit dem Plasmid pGP 704 herausrekombinierte und nun PTS⁻ war, angereichert werden. Dieser Stamm war Fosfomycin-resistent und Ampicillin-sensitiv. Das inaktive PTS-System des Stammes wurde physiologisch über das Fehlen der Ansäuerung von Sorbit, einem typischen PTS-Zucker, bestätigt. Dazu wurde der Stamm auf MacConkey-Agarplatten mit 1% Sorbit ausgestrichen. Der Stamm konnte aber auf Agarplatten mit Minimalmedium und Glucose als Kohlenstoffquelle (0,4 %) langsam wachsen. Dieses Wachstum war wahrscheinlich möglich, weil Glucose über den chromosomal kodierten Glucosefacilitator in die Zelle transportiert und über die Glucokinase phosphoryliert wird. Da die Aktivität der Glucokinase in *E. coli* niedrig ist (Curtis und Epstein, 1975), ist es möglich, daß diese Aktivität für die Glucoseverwertung limitierend war. Die Charakteristika des Stammes LJ 110 *aroB*⁻ *ptsI::glf* wurden mit den Stämmen LJ 110 *aroB*⁻ und LJ 110 *aroB*⁻ pGP 704 *ptsI::glf* verglichen. Die Zusammenfassung der ermittelten Phänotypen ist in Tabelle 16 dargestellt. Anhand der physiologischen Ergebnissen wurde festgestellt, daß das PTS-System des Stammes LJ 110 *aroB*⁻ inaktiviert worden war.

Tabelle 16: Phänotypen von LJ 110 *aroB*⁻ / LJ 110 *aroB*⁻ pGP 704 *ptsI::glf* / LJ 110 *aroB*⁻ *ptsI::glf*

	LJ 110 <i>aroB</i> ⁻	LJ 110 <i>aroB</i> ⁻ pGP 704 <i>ptsI::glf</i>	LJ 110 <i>aroB</i> ⁻ <i>ptsI::glf</i>
Ampicillin-Empfindlichkeit (100 mg/l)	sensitiv	resistent	sensitiv
Fosfomycin-Empfindlichkeit (100 mg/l)	sensitiv	sensitiv	resistent
Vergärung von Sorbit (1%) auf Mac Conkey Platten	positiv	positiv	negativ
Wachstum auf Minimalplatten¹¹ mit Glucose (0,4%) nach 12 stündiger Inkubation	gut (große Kolonien)	gut (große Kolonien)	moderat (kleine Kolonien)

¹¹ Minimalmedium nach Tanaka (Tanaka et al, 1967).

Nachweis der Insertion von *glf* in *ptsI* in LJ 110 *aroB*⁻ *ptsI::glf*

Die korrekte Integration von *ptsI::glf* im Chromosom wurde durch PCR überprüft. Dazu wurden geeignete Primer und chromosomale DNA eingesetzt. Die Größe des Produktes wurde mit der Größe des Wildtypstammes verglichen.

ptsH, *ptsI* sowie *crr* bilden im Wildtypstamm ein Gencluster. Wird der Bereich *ptsH* bis *crr* über PCR durch geeignete Primer amplifiziert, so entsteht ein Fragment mit der Größe von 2,2 kb (s. **Abbildung 14**). Nach Insertion von *glf* in *ptsI* entsteht ein Gencluster, das etwa 1,4 kb (*glf*) größer ist, als der des Wildtyps. Der amplifizierte Bereich von *ptsH* bis *crr* weist somit eine Fragmentgröße von 3,7 kb auf (s. **Abbildung 14**).

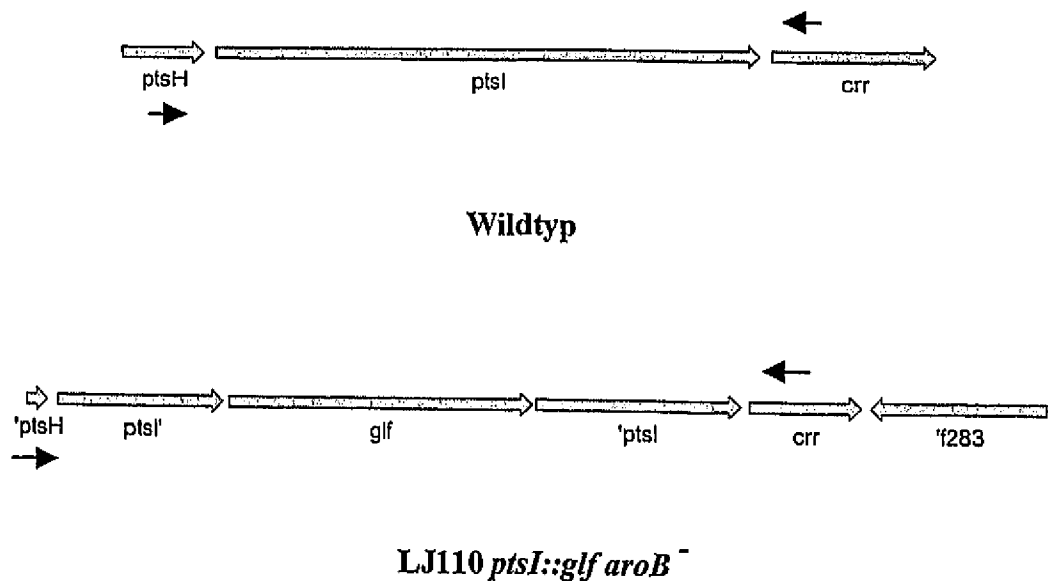


Abbildung 14: Anordnung des Genclusters von *ptsH* bis *crr* in *E. coli* Wildtyp (LJ 110) und in LJ110 *ptsI::glf aroB*⁻. Die Pfeile stellen den Hybridisierungsbereich der Primer dar.

Ergebnis der PCR-Amplifikation (Bereich *ptsH* bis *crr*):

Die PCR-Fragmente des Genclusters *ptsH* bis *crr* der Stämme LJ 110 sowie LJ 110 *aroB*⁻ *ptsI::glf* entsprachen der erwarteten Größe von 2,2 kb (**Abbildung 15**, Spur 3) und 3,7 kb (**Abbildung 15**, Spur 2).

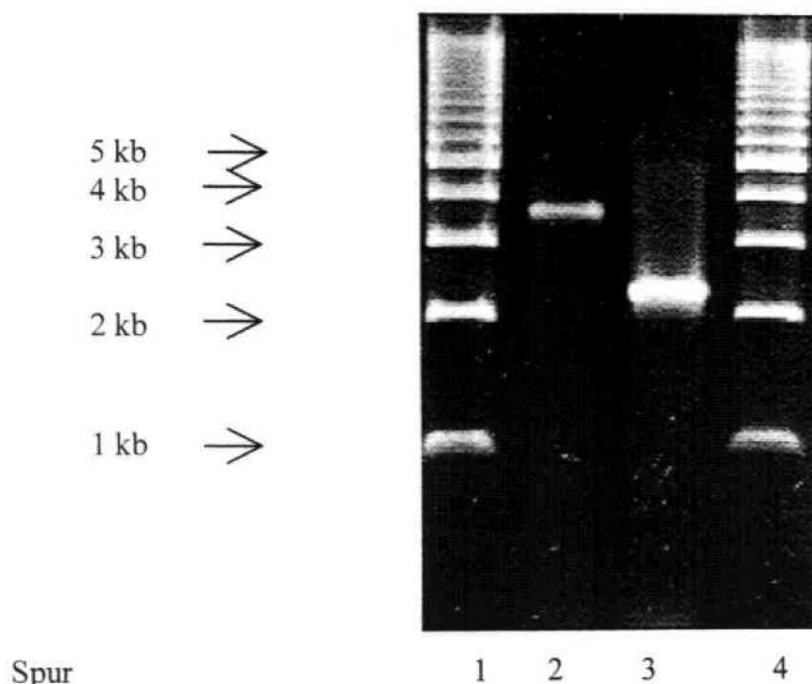


Abbildung 16: Ergebnis der PCR-Amplifizierung (0,8% Agarosegel) zur Bestimmung der Fragmentgröße der Genkassette von *ptsH* bis *crr* in LJ110 *aroB*⁻ *ptsI::glf* (Spur 2) und LJ110 (Spur 3). Der Bereich *ptsH* bis *crr* wurde durch geeignete Primer amplifiziert.

Somit konnte festgestellt werden, daß die Genkassette in LJ110 *aroB*⁻ *ptsI::glf* nicht der des Wildtyps entsprach. Aus der Differenz der Größe des Genclusters (1,4 kb), die der Größe von *glf* entspricht, läßt sich annehmen, daß *glf* in das Operon aus *ptsH*, *ptsI* und *crr* inseriert wurde. Da *ptsI* im Donorstamm AT2471 pGP704 *ptsI::glf ptsI* durch *glf* inseriert wurde (Siewe, unveröffentlichte Ergebnisse) ist anzunehmen, daß auch im Stamm LJ110 *aroB*⁻ *ptsI::glf ptsI* durch *glf* inseriert wurde, da die physiologischen Ergebnisse zeigten, daß der konstruierte Stamm ein inaktives PTS-System besitzt.

Kombination von *glf* und *glk* in einem PTS⁻ - Stamm

Um Glucosetransport und Phosphorylierung über Glf und Glk in einem PTS⁻ - Stamm zu untersuchen, wurden analoge Stammkonstruktionen wie in PTS⁺ - Stämmen verwendet (s.S. 55). Da festgestellt wurde, daß die Aktivität des chromosomal kodierten Glucosefacilitators niedrig war (Peter, H.; unveröffentlichte Ergebnisse), wurde *glf* auch auf einem Hochkopienplasmid (pJF 119 EH) in den PTS⁻ Stamm eingebracht.

Um auch *glk* in das System einzubringen, wurde das Plasmid pMK *glk* in den Stamm LJ110 *aroB*⁻ *ptsI::glf* / pJF *aroF*^{br} *glf* transformiert. Zur Kontrolle wurde auch das Leerplasmid pMK

Tabelle 17: Wachstumsraten von PTS⁻ - Stämmen (Rezipientenstamm LJ 110 *aroB⁻ ptsI::glf*) in Abhängigkeit der Genkombination und IPTG-Induktion. Die Daten sind die Mittelwerte zweier Parallelansätze.

Genkombination	IPTG-Induktion	μ [h ⁻¹] (Bereiche)	End OD ₆₂₀	Biotrockenmasse ¹² [mg]
	(100 μ M)			
<i>aroF^{thr} glf / -.-</i>	+	0,16 $\pm$ 0,02 (I) 0,07 (II)	13,3	369 $\pm$ 9
<i>aroF^{thr} glf / -.-</i>	-	0,26	12,2 $\pm$ 0,8	430 $\pm$ 14
<i>aroF^{thr} glf / glk</i>	+	0,18 $\pm$ 0,01 (I) 0,02 (II) 0,05 $\pm$ 0,01 (III)	10,4 $\pm$ 0,9	298 $\pm$ 16
<i>aroF^{thr} glf / glk</i>	-	0,24	16,2 $\pm$ 1,3	605 $\pm$ 30

In der Fed-Batch Kultivierung wuchsen beide Stämme ohne IPTG-Induktion unabhängig von der Art der eingebrachten Gene nahezu gleich schnell. Die Wachstumsrate ohne Expression der Gene war um etwa die Hälfte gegenüber PTS⁺ - Stämmen vermindert ($\mu \approx 0,49$ (Genkombination *aroF^{thr} / -.-*, **Tabelle 5** s.S. 39) gegen $\mu \approx 0,25$.

Nach Expression der Gene *aroF^{thr}* und *glf* verringerte sich die Wachstumsrate des Stammes geringfügig (**Abbildung 18, Bereich I**) und verminderte sich im Laufe der Kultivierungsdauer weiter (**Bereich II**) bis nach knapp 25 Stunden die stationäre Wachstumsphase erreicht wurde (**Bereich III**).

Die zusätzliche Expression der Glukokinase von *Zymomonas mobilis*, führte zur Verminderung der Wachstumsrate (**Abbildung 19, Bereich I**). 6 Stunden nach IPTG-Zugabe (10,5 Stunden Kultivierungsdauer) stagnierte das Zellwachstum (**Bereich II**) bis die Zellen nach 20 Stunden bis zur Ende der Kultivierung ihr Wachstum langsam wieder aufnahmen (**Bereich III**).

¹² volumenkoriigiert

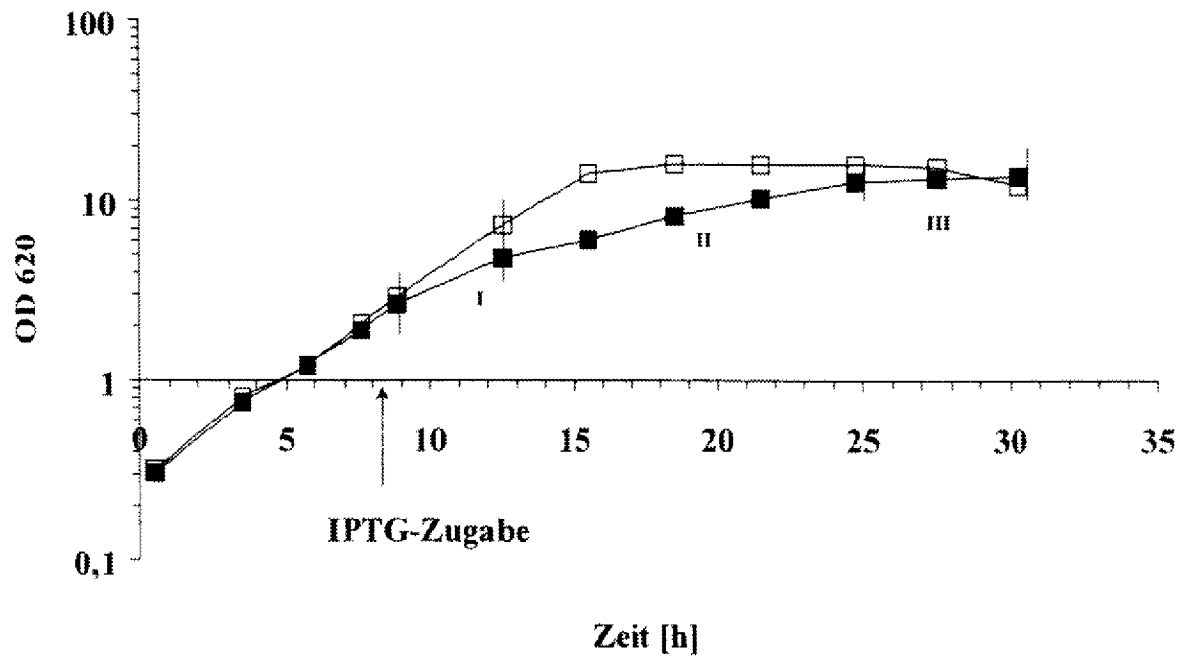


Abbildung 18: Biomassebildung in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit der Genkombination *aroF^{fbr} glf* im PTS⁻-Stamm (LJ110 *aroB⁻ ptsI::glf*) nach [■] bzw. ohne [□] IPTG-Induktion. Die mit einem Balken gekennzeichneten Datenpunkte wurden zur Berechnung der Wachstumsrate verwendet.

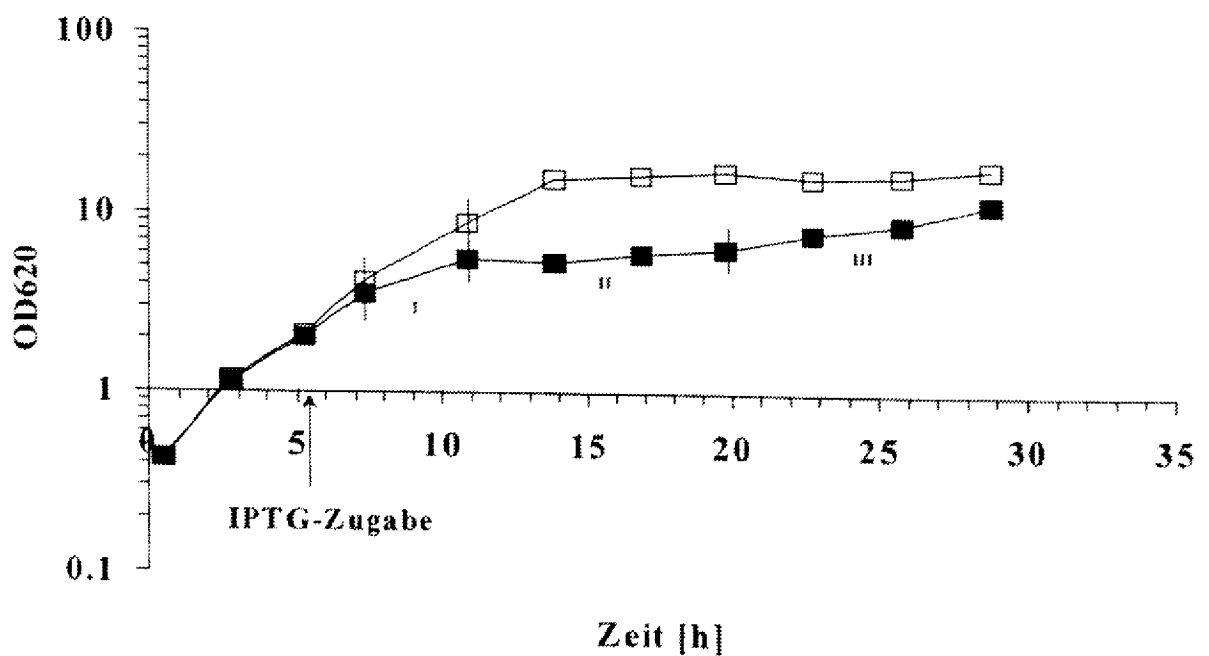


Abbildung 19: Biomassebildung in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit der Genkombination aus *aroF^{fbr} glf / glk* im PTS⁻-Stamm (LJ110 *aroB⁻ ptsI::glf*) nach [■] bzw. ohne [□] IPTG-Induktion. Die mit einem Balken gekennzeichneten Datenpunkte wurden zur Berechnung der Wachstumsrate verwendet.

Offenbar führte die Expression von *glk* zu einer starken Belastung für die Zellen. Diese Belastung kann durch die Proteinbildung der Glucokinase verursacht worden sein. Eine andere Möglichkeit ist, daß durch die Expression von *glk* für die Zelle schädliche Metabolite gebildet wurden. So wäre es möglich, daß durch die Expression von *glk* und *glf* im PTS⁻ Hintergrund aufgrund der erhöhten Verfügbarkeit von PEP der Kohlenstofffluß in die Glykolyse stark erhöht sein könnte. Dies könnte dazu führen, daß der Kohlenstofffluß in einen Nebenweg der Glykolyse, den Methylglyoxal-Stoffwechselweg, einmündet. Da Methylglyoxal Proteinsynthese inhibiert (Cooper, 1984), könnte Bildung von Methylglyoxal Ursache des verlangsamten Wachstums sein. Proben vor IPTG-Zugabe, 3 Stunden nach IPTG-Zugabe und am Ende der Kultivierung wurden die Methylglyoxalkonzentrationen bestimmt. Jedoch konnten in Überständen kein Methylglyoxal (< 0,3 mM) nachgewiesen werden. Methylglyoxal inhibiert ab einer Konzentration von 0,4 mM das logarithmische Wachstum einer Bakterienkultur bei einer Wachstumsrate von $\mu = 0,7$ (Ferguson *et al.*, 1998).

Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg der Genkombination *glf* / *glk* im PTS⁻ - Stamm

Für die Bestimmung des Kohlenstoffflusses in den Aromatenbiosyntheseweg wurden die spezifische Produktivität sowie die spezifische Ausbeute von DAH(P) im PTS⁻ - Stamm, LJ 110 *ptsI::glf* *aroB*⁻, analysiert. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 18** dargestellt.

Tabelle 18: Endkonzentrationen von DAH(P), gebildeter DAHP-Mengen, Spezifische Produktivität sowie spezifische Ausbeute in Abhängigkeit von der Genkombination und IPTG-Induktion (Rezipientenstamm LJ 110 *aroB*⁻ *ptsI::glf*). Die Daten sind die Mittelwerte zweier Parallelansätze.

Genkombination	IPTG- Induktion (100 µM)	End DAHP Konz. [mM]	DAHP- Menge ¹³ [mmol]	DAH(P)-Produktion [mmol DAH(P) / g dw]	Spezifische Ausbeute [% ¹⁴]
<i>aroF^{br} glf / -,-</i>	+	28,9 ± 0,8	2,9 ± 0,2	8,0 ± 0,5	18,7 ± 0,3
<i>aroF^{br} glf / -,-</i>	-	12 ± 0,5	1,8 ± 0,5	4,1 ± 1,2	8,6 ± 1,5
<i>aroF^{br} glf / glk</i>	+	34,8 ± 1,6	3,0 ± 0,2	10,3 ± 1,4	30,4 ± 3,2
<i>aroF^{br} glf / glk</i>	-	21,4 ± 3,3	2,4 ± 0,3	4,0 ± 0,3	11,8 ± 3,0

Die Expression von *glf* und *aroF^{br}* in dem PTS⁻ - Stamm führte gegenüber einen PTS⁺ - Stamm zu einer Erhöhung der spezifischen Produktion und Ausbeute. Die zusätzliche Expression von *glk* führte zu einer weiteren Steigerung. Die Erhöhung der Expression einer Glucokinase aus *Zymomonas mobilis* führte zur Erhöhung des Kohlenstoffflusses in den Aromatenbiosyntheseweg, jedoch auch zu einer starken Belastung der Zellen nach Expression des Gens.

Glucoseverbrauch von Genkombinationen aus *aroF^{br}* mit *glf* und *glk* in PTS⁻ - Derivaten (LJ 110 *aroB*⁻ *ptsI::glf*-Abkömmlinge)

Nach der Kultivierung wurde der Glucoseverbrauch der Stämme analysiert. **Tabelle 19** stellt die Ergebnisse dar.

¹³ volumenkorrigiert

¹⁴ gebildetes DAH(P) [mol C] / verbrauchte Glucosemenge [mol C] in [%]

Tabelle 19: Glucoseverbrauch von LJ 110 *aroB*⁻ *ptsI::glf*- Derivaten in Abhängigkeit von der Genkombination. Die Daten sind die Mittelwerte zweier Parallelansätze.

Genkombination	IPTG-Induktion (100 µM)	Glucoseverbrauch	
		[g]	[%] ¹⁵
<i>aroF^{br} glf</i> / -.-	+	3,3 ± 0,3	40 ± 4
<i>aroF^{br} glf</i> / -.-	-	4,3 ± 0,6	53 ± 7
<i>aroF^{br} glf</i> / <i>glk</i>	+	2,1 ± 0,4	26 ± 5
<i>aroF^{br} glf</i> / <i>glk</i>	-	4,5 ± 0,4	55 ± 4

Die PTS⁻ - Stämme verbrauchten fast die Hälfte weniger Glucose als die PTS⁺ - Stämme. Die Expression der Gene *aroF^{br} glf* und *glk* verminderte den Glucoseverbrauch weiter um die Hälfte des Wertes der nicht exprimierten Stämme.

Um das Nebenproduktspektrum zu bestimmen, wurde die Zusammensetzung der organischen Säuren analysiert.

Analyse der Zusammensetzung der organischen Säuren

Am Ende der Kultivierung wurde die Zusammensetzung der gebildeten organischen Säuren der Überstände der Genkombinationen analysiert. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 19** dargestellt.

¹⁵Der Glucoseverbrauch des Stammes LJ 110 *aroB*⁻ / pJF / pMK wurde 100% gesetzt.

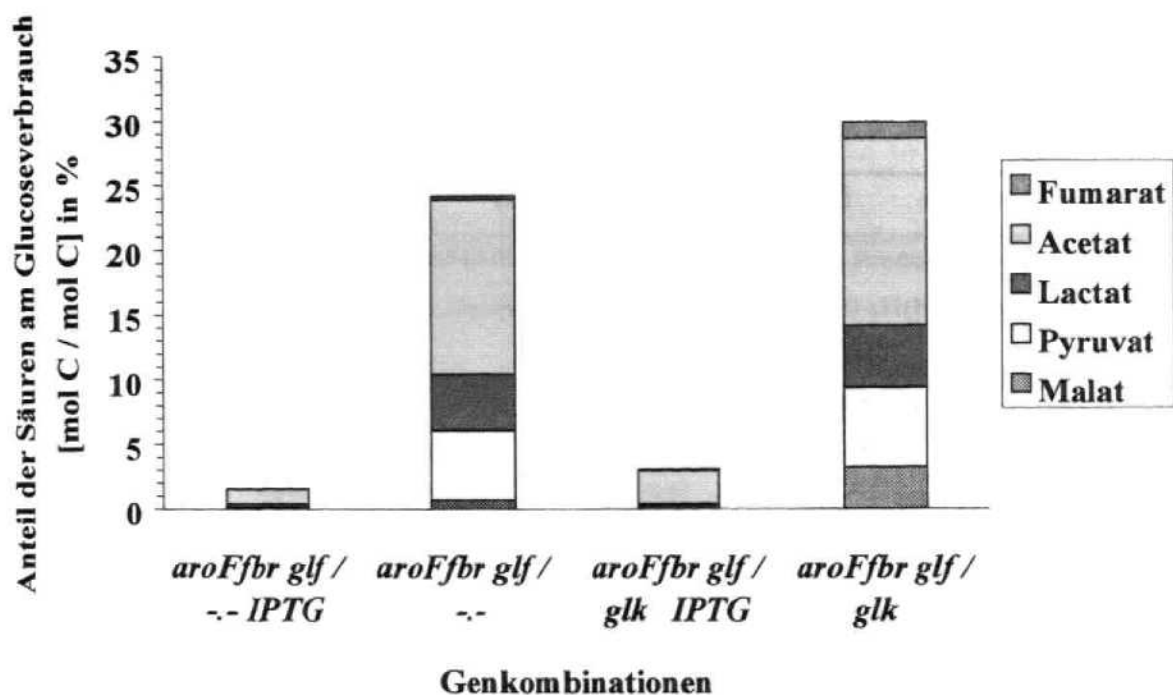


Abbildung 19: Anteil produzierter organischen Säuren [in %] am Glucoseverbrauch [in mol C organische Säure / mol C Glucose] in Abhängigkeit der eingebrachten Gene in PTS^- - Stämmen. Die Daten sind die Mittelwerte zweier Parallelansätze. 100% entspricht den gesamten Glucoseverbrauch des jeweiligen Stammes in C (*aroFfbr* = *aroF^{fbr}*).

Die konstruierten PTS^- - Stämme setzen etwa ein Viertel bis ein Drittel des Kohlenstoffs aus der Glucose in organische Säuren um. Es entstanden etwa 13 – 14 % Acetat und um 4 % Lactat. Desweiteren wurde ca. 5 - 6 % Pyruvat sowie geringe Mengen von Malat (1 – 3 %) gebildet. Nach Induktion wurden nur sehr geringe Mengen organischer Säuren, hauptsächlich Acetat, gebildet (ca. 1 - 2%). Diese Ergebnisse werden im Diskussionsteil näher erläutert.

Spezifische Enzymaktivitäten von PTS^- - Stämmen in Kombination von *aroF^{fbr}*, *glf* und *glk*

Nach Fed-Batch-Kultivierung wurden die Zellen abgeerntet und die spezifischen Aktivitäten der Glucokinase und der DAHP-Synthasen bestimmt. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 20** dargestellt.

Tabelle 20: Spezifische Aktivitäten (in mU / mg Protein) der Enzyme Glucokinase (Glc) und DAHP-Synthasen in zellfreien Rohextrakten von PTS⁻ - Stämmen (LJ 110 *aroB⁻ ptsI::glf* - Derivaten) in Abhängigkeit von der Genkombination und IPTG-Induktion. Die Daten sind die Mittelwerte zweier Parallelansätze.

Genkombination	IPTG-Induktion	Glc	DAHP-Synthasen
<i>aroF^{br} glf</i> / -.-	+	6 ± 0,1	1055 ± 50
<i>aroF^{br} glf</i> / -.-	-	4 ± 0,3	212
<i>aroF^{br} glf</i> / <i>glk</i>	+	3350 ± 50	810 ± 100
<i>aroF^{br} glf</i> / <i>glk</i>	-	27 ± 8	254 ± 6

Die Expression der Gene *aroF^{br}* im PTS⁻ Hintergrund ergab, daß die spezifischen Enzymaktivitäten der DAHP-Synthasen nach Induktion um das Fünffache gegenüber den Werten ohne Induktion erhöht waren. Die spezifische Aktivität der DAHP-Synthasen war um das Doppelte gegenüber den spezifischen Enzymaktivitäten der DAHP-Synthasen der PTS⁺ - Stämme erhöht (siehe **Tabelle 8**, s.S. 42).

Das Einbringen und Expression des Gens der Glucokinase aus *Zymomonas mobilis* führte zu einer Erhöhung der Aktivität der Glucokinase. Dagegen war die spezifische Aktivität der homologen Glucokinase von *E. coli* niedrig.

Durch das Ausschalten des PTS-Systems und das Einbringen und Expression von *aroF^{br}*, *glf* und *glk* konnte die spezifische Aktivität der DAHP-Synthasen um das Zweifache erhöht werden. Fast ein Drittel des Kohlenstoffs wurde in den Aromatenbiosyntheseweg gelenkt. Die Erhöhung des Eintrags des Kohlenstoffs in den Aromatenbiosyntheseweg ging mit einer Verminderung der Nebenprodukte einher.

3. Untersuchungen zur Erhöhung der Bereitstellung von Phosphoenolpyruvat und Erythrose-4-Phosphat auf den Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg

3.1 Untersuchungen in PTS⁻-Stämmen

Die Erhöhung der Bereitstellung von PEP durch Ausschalten des homologen PTS-Systems von *E. coli* und Einbringen der Gene des Glucosetransport- und Phosphorylierungssystems aus *glf* und *glk*, jeweils aus *Zymomonas mobilis*, erhöhte den Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg. Jedoch wurde nur knapp ein Drittel des maximal möglichen Kohlenstoffs in den Aromatenbiosyntheseweg gelenkt.

Deshalb sollte untersucht werden, ob durch Erhöhung der Verfügbarkeit von E4P durch Erhöhung der Expression der Transaldolase, der Transketolase oder der Kombination aus Transaldolase und Transketolase der Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg weiter gesteigert werden kann. **Abbildung 20** stellt die eingebrachten Veränderungen schematisch dar.

So mußten Kombinationen der Gene *aroF^{br}*, *glf*, *glk*, *tkl* und *tal* kloniert und in einem PTS⁻-Stamm überexprimiert werden. Da ein Plasmid mit den klonierten Genen *aroF^{br}* und *glf* bereits vorlag (s.S. 54, **Tabelle 15**), wurden Kombinationen aus *glk*, *tkl* und *tal* auf einem anderen Plasmid (pMK) erstellt.

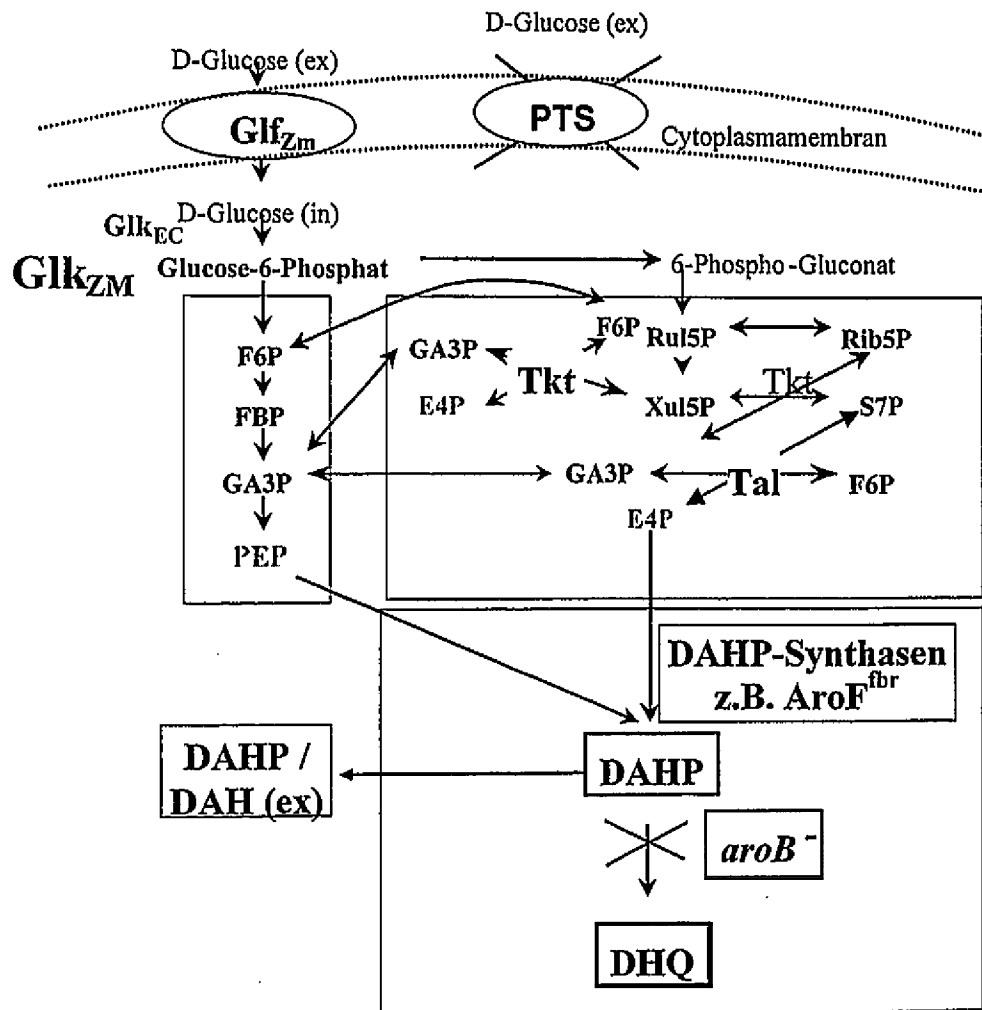


Abbildung 20: Schematische Darstellung des Prinzips der Bestimmung des Kohlenstoffflusses in den Aromatenbiosyntheseweg. Glucose sollte über Glf und Glk in die Zelle transportiert und phosphoryliert werden. Die Erhöhung der Bereitstellung von E4P sollte durch Überexpression von Tkt und Tal erfolgen. PEP aus der Glykolyse bzw. E4P aus dem Pentose-Phosphat-Weg wird über eine feedback-inhibitionsresistente DAHP-Synthase (AroF^{fbr}) zu DAHP katalysiert. Der Aromatenbiosyntheseweg wurde nach der Eingangsreaktion unterbrochen. Anhand der externen DAH(P)-Konzentrationen konnte der Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg berechnet werden. PTS: Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferase-System; Glf_{Zm} Glucosefacilitator, Glk_{EC}, Glk_{Zm}: Glucokinase aus *E. coli* oder *Zymomonas mobilis*; Tkt: Transketolase, Tal: Transaldolase, GA3P: Glycerinaldehyd-3-Phosphat, Ru5P: Ribulose-5-Phosphat, Rib5P: Ribose-5-Phosphat, Xul5P: Xylulose-5-Phosphat, F6P: Fructose-6-Phosphat, FBP: Fructose-bis-Phosphat, PEP: Phosphoenolpyruvat; E4P: Erythrose-4-Phosphat; S7P: Sedoheptulose-5-Phosphat; DAHP, DAH: 3-Desoxy-D-Arabino-Heptulosonat-7-Phosphat, 3-Desoxy-D-Arabino-Heptulosonat-7; DHQ: 3-Dehydroquinat.

Klonierung von Kombinationen aus *glk*, *tkl* und *tal* in pMK.

Die Kombination aus *glk* und *tal* wurde erstellt, indem *glk* ohne eigenen Promotor in den Vektor pMK *tal* (s.S. 31) vor dem Gen der Transaldolase kloniert wurde (Siewe, unveröffentlichte Ergebnisse). Um zusätzlich die Kombination aus *tkl*, *glk* und *tal* zu konstruieren, wurde über PCR das Gen der Transketolase hinter dem *tac* Promotor kloniert. Ausgehend vom Plasmid pMK *tkl glk tal* wurde *tal* durch *PvuI* Restriktion deletiert, um so eine Kombination aus *tkl* und *glk* zu erhalten.

Zur Überprüfung wurden die Plasmide pMK *glk tal*, pMK *tkl glk tal* sowie pMK *tkl glk* jeweils in den Stamm LJ110 eingebracht. Diese wurden in Vollmedium in Gegenwart bzw. Abwesenheit des Induktors (IPTG, 100µM) kultiviert. Nach Ende der Kultivierung der Stämme wurden die spezifische Aktivitäten der Glucokinase, der Transketolase sowie der Transaldolase in zellfreien Rohextrakten bestimmt. Zur Kontrolle wurde auch der Stamm LJ 110 / pMK kultiviert und die spezifischen Enzymaktivitäten dieser Enzyme analysiert. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 21** dargestellt.

Tabelle 21: Spezifische Enzymaktivitäten (in U / mg Protein) der Glucokinase, Transketolase und der Transaldolase. Die Plasmide pMK und pMK *glk* wurden in den Stamm LJ 110 eingebracht und in (+) bzw. ohne (-) Gegenwart von IPTG (100µM) in LB-Medium kultiviert. (n.b.: nicht bestimmt). (-.): Leerplasmid.

Eingebrachte Gene	Glucokinase (- / + IPTG)	Transketolase (- / + IPTG)	Transaldolase (- / + IPTG)
(-.)	0,01 / n.b.	0,16 / n.b.	0,18 / n.b.
<i>glk tal</i>	0,6 / 7,5	n.b.	0,4 / 1,8
<i>tkl glk</i>	0,3 / 6,8	0,6 / 3,1	n.b. / 0,7
<i>tkl glk tal</i>	0,4 / 7,8	0,6 / 8,1	0,5 / 2,6

Durch Expression der Genkombination aus *tkl* und *glk* stiegen die spezifischen Aktivitäten der Glucokinase bzw. der Transketolase um das 20-fache bzw. das fünffache an. Die Expression von *glk* und *tkl* führte zur Erhöhung der Aktivitäten der Glucokinase und der Transaldolase um das Fünf- bzw. das Zwölffache. Wurde eine Kombination aus *glk tkl* und *tal* eingebracht und exprimiert, wurden hohe spezifische Aktivitäten der Glucokinase, der Transketolase und der Transaldolase bestimmt.

Aufgrund dieser Ergebnisse konnte man feststellen, daß die Gene der Plasmide pMK *glk tal*, pMK *tkl glk* und pMK *tkl glk tal* durch IPTG exprimiert wurden und somit die Plasmide funktionell aktiv waren. Sie konnten nun in geeignete Systeme eingesetzt werden.

Stammkonstruktionen in PTS⁻ - Stämmen

Um die Operons aus *glk tkt*, *glk tkt tal* und *glk tal* mit den Genen *aroF^{br}* und *glf* zu kombinieren wurden die Plasmide in den PTS⁻ - Stamm LJ110 *aroB⁻ ptsI::glf*, in dem bereits das Plasmid pJF *aroF^{br} glf* transformiert worden war, eingebracht. **Abbildung 21** stellt die Genkombinationen auf den jeweiligen Plasmiden in Verbindung mit dem PTS⁻ - Stamm (LJ110 *aroB⁻ ptsI::glf*) dar.

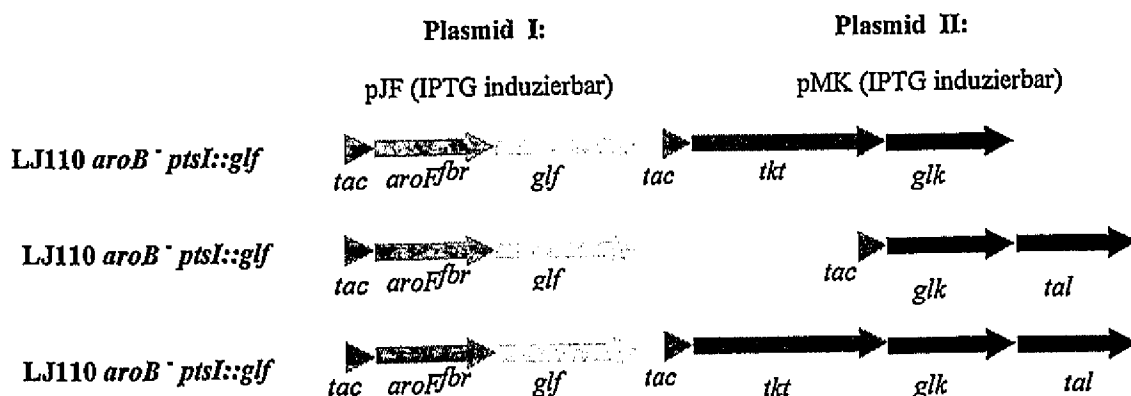


Abbildung 21: Schematische Darstellung der Genkombinationen rekombinanter *Escherichia coli* Stämme zur Untersuchung der Erhöhung der Bereitstellung von PEP und Erythrose-4-Phosphat mit dem Glucoseaufnahme- und Phosphorylierungssystem aus *glf* und *glk*, beide aus *Zymomonas mobilis*. Der Rezipientenstamm weist ein inaktives PTS-System auf.

Die Stämme wurden unter Fed-Batch-Bedingungen kultiviert (s. S. 36), um die Auswirkungen der Glucoseaufnahme- und Phosphorylierungssystems aus Glf, Glk in Kombination mit Tkt und / oder Tal auf das Wachstum der Stämme zu untersuchen und um den Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg zu ermitteln. Die Wachstumsraten sind in **Tabelle 22** dargestellt.

Tabelle 22: Wachstumsraten von PTS⁻ - Stämmen (Rezipientenstamm LJ 110 *aroB⁻ ptsI::glf*) in Abhängigkeit der Genkombination und IPTG-Zugabe. Die Daten sind die Mittelwerte zweier Parallelansätze.

Genkombination	IPTG-Zugabe (100 µM)	µ [h ⁻¹] (Bereich)	End OD ₆₂₀	Biotrockenmasse ¹⁶ [mg]
<i>aroF^{br} glf / glk</i>	+	0,18 ± 0,01 (I) 0,02 (II) 0,05 ± 0,01 (III)	10,4 ± 0,9	298 ± 16
<i>aroF^{br} glf / glk</i>	-	0,24	16,2 ± 1,3	605 ± 30
<i>aroF^{br} glf / glk tkt</i>	+	0,06 (I) 0,21 (II)	14,1 ± 0,2	429 ± 7
<i>aroF^{br} glf / glk tkt</i>	-	0,32	12,2 ± 0,2	422 ± 54
<i>aroF^{br} glf / glk tal</i>	+	0,25 ± 0,02	9,6 ± 0,6	294 ± 26
<i>aroF^{br} glf / glk tal</i>	-	0,30 ± 0,01	10,3 ± 1,3	349 ± 23
<i>aroF^{br} glf / tkt glk</i>	+	0,04 (I)	14,5 ± 0,9	426 ± 11
<i>tal</i>		0,17 ± 0,01 (II)		
<i>aroF^{br} glf / tkt glk</i>	-	0,31 ± 0,01	12 ± 0,1	396 ± 37
<i>tal</i>				

In der Fed-Batch Kultivierung wuchsen die Stämme ohne IPTG-Zugabe unabhängig von der Art der Genkombination nahezu gleich schnell. Das Einbringen der Gene *tal*, *tkt* bzw. des Operons aus *tkt* und *tal* zusätzlich zu den Genen *aroF^{br}* und *glf* führten im wesentlichen zu keinen Veränderungen der Wachstumsraten (s. **Abbildungen 22 – 23**).

IPTG-Zugabe der Genkombinationen aus *glk tkt* bzw. *glk tkt tal* in Verbindung mit *aroF^{br}* und *glf* führte zum Einbruch des exponentiellen Wachstums (s. **Abbildungen 22 und 23, jeweils Bereich I**), das Wachstum der Stämme stagnierte. Nach ca. 18 Stunden nahmen die Stämme (s. **Abbildung 22, 23, jeweils Bereich II**) ihr Wachstum wieder auf und erreichten nach 21 bis 24 Stunden ihre stationäre Phase (s. **Abbildung 22, 23, jeweils Bereich III**).

Dagegen war nach IPTG-Zugabe der Genkombination aus *glk tal* in Kombination mit *aroF^{br}* und *glf* nur eine geringe Abnahme der Wachstumsrate gegenüber der Kontrolle (ohne IPTG-Zugabe, s. **Abbildung 24**) meßbar, eine Wachstumsstagnation blieb aus.

¹⁶ volumenkorrigiert

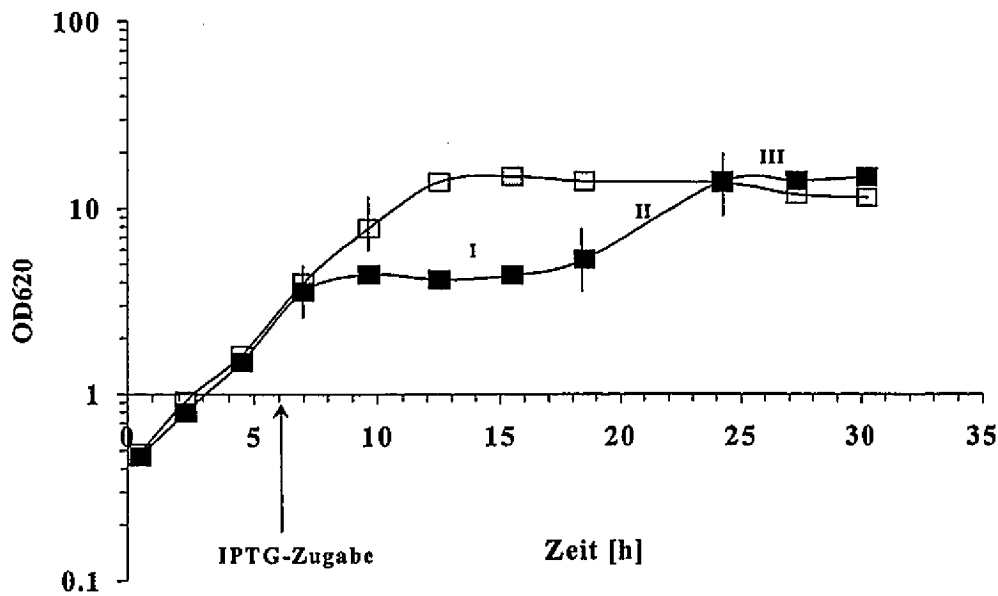


Abbildung 22: Biomassebildung in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit von Genkombinationen aus *aroF^{fbr} glf / glk tkt tal* im PTS⁻- Stamm (LJ110 *aroB⁻ ptsI::glf*) nach [■] bzw. ohne [□] IPTG-Induktion. Die mit einem Balken gekennzeichneten Datenpunkte wurden zur Berechnung der Wachstumsrate verwendet.

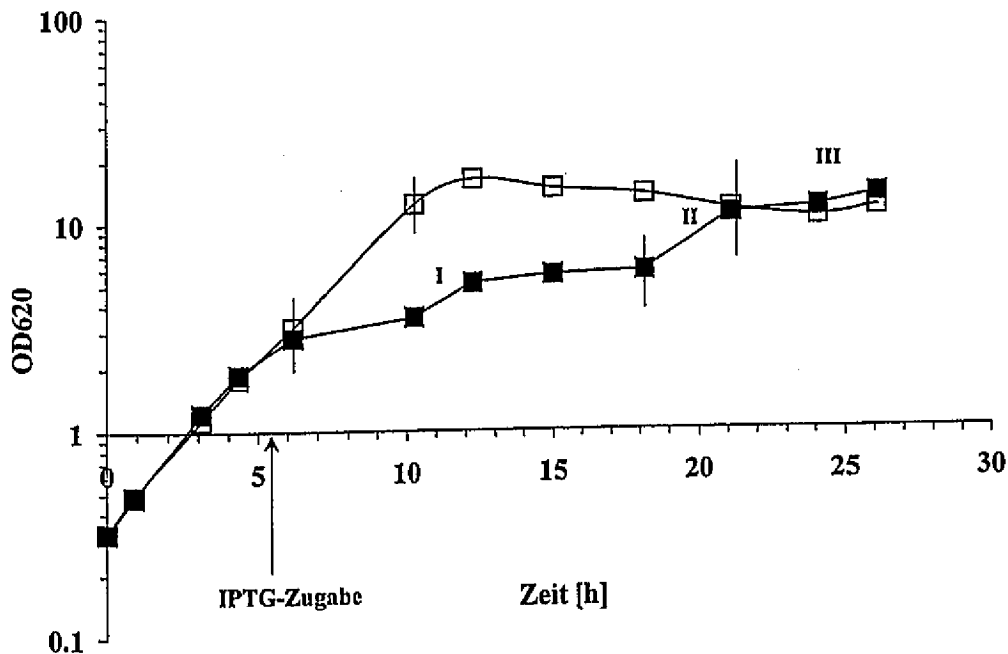


Abbildung 23: Biomassebildung in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit der Genkombination aus *aroF^{fbr} glf / glk tkt* im PTS⁻- Stamm (LJ110 *aroB⁻ ptsI::glf*) nach [■] bzw. ohne [□] IPTG-Induktion. Die mit einem Balken gekennzeichneten Datenpunkte wurden zur Berechnung der Wachstumsrate verwendet.

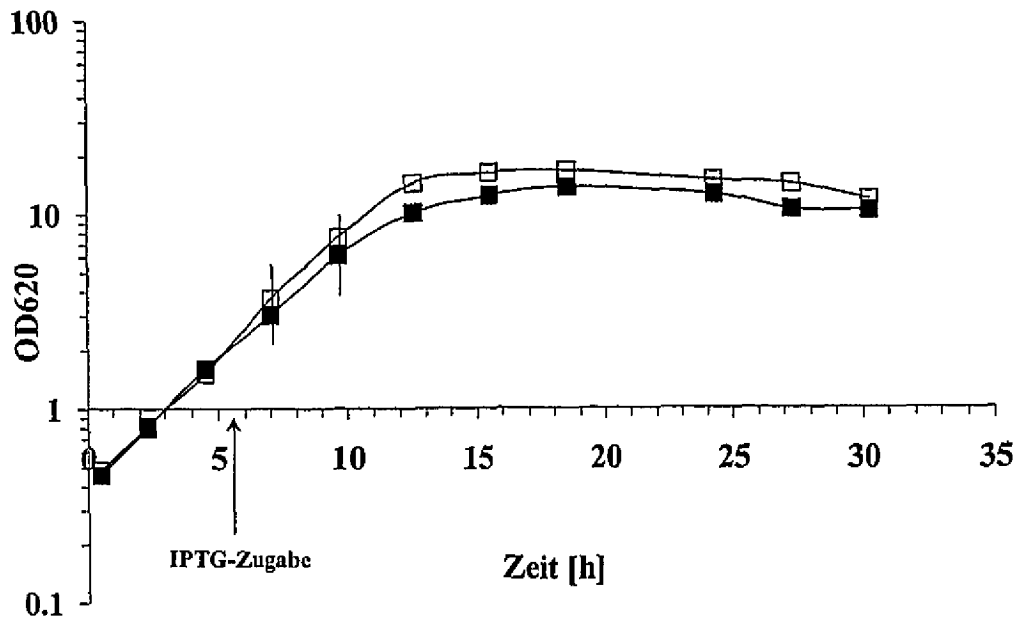


Abbildung 24: Biomassebildung in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit der Genkombination aus *aroF^{br} glf / glk tal* im PTS⁻ - Stamm (LJ110 *aroB⁻ ptsI::glf*) nach [■] ohne [□] IPTG-Induktion. Die mit einem Balken gekennzeichneten Datenpunkte wurden zur Berechnung der Wachstumsrate verwendet.

Das Einbringen und Expression von *aroF^{br}*, *glf* und *glk_{Zm}* im PTS⁻ - Stamm führten zu einer starken Belastung der Zellen (s.S. 62). Dies war auch festzustellen, wenn zusätzlich *tkl* bzw. *tkl* und *tal* exprimiert wurde. Die zusätzliche Expression von *tal* führte jedoch zu keiner starken physiologischen Belastung der Zellen.

Produktion von DAH(P)

Die Auswirkungen der Überexpression der Genkombinationen aus *glk*, *tkl* und *tal* im PTS⁻ - Hintergrund (LJ 110 *ptsI::glf aroB⁻*) auf den Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg wurden untersucht. Dazu wurden die rekombinanten Stämme (s. **Abbildung 21**) im Fed-Batch-Verfahren kultiviert. Während der Kultivierungszeit wurden Proben aus dem Schüttelkolben entnommen und die DAH(P)-Konzentration über die Kultivierungszeit bestimmt. Die externe DAH(P) - Konzentration ist als Funktion der Kultivierungszeit in **Abbildung 25** dargestellt.

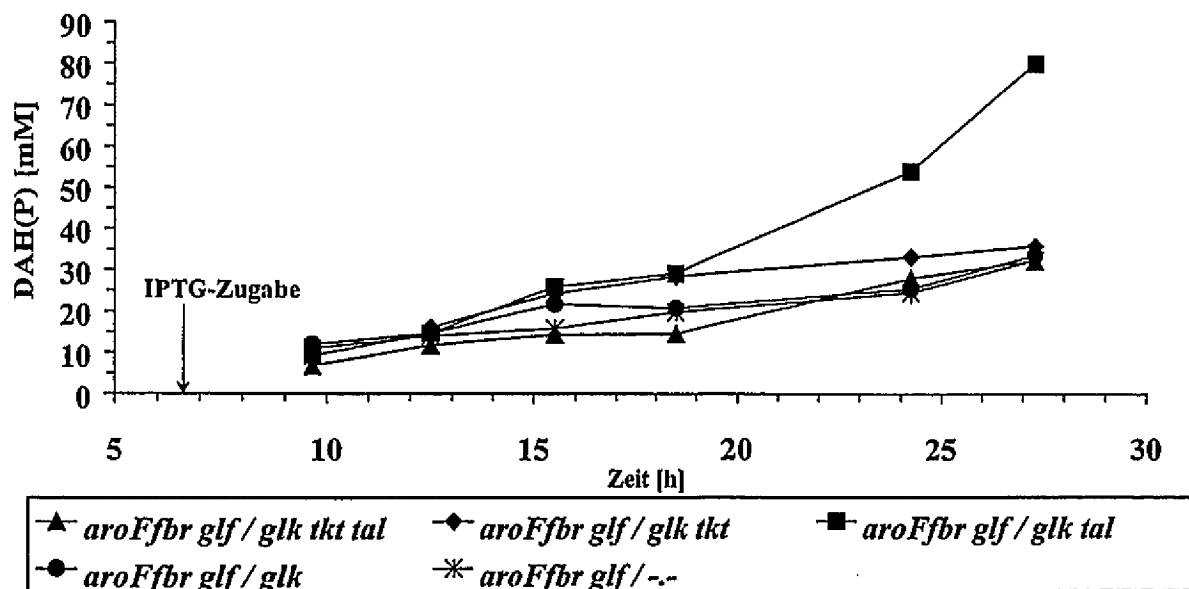


Abbildung 25: DAH(P)-Konzentrationen aus Überständen von Kombinationen aus *glk*, *tkt* und *tal* in Verbindung mit *aroF^{fbr}* und *glf* im PTS⁻ - Hintergrund (LJ 110 *ptsI::glf aroB⁻*) in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit (*aroFfbr* = *aroF^{fbr}*).

Mit zunehmender Kultivierungsdauer schied der Stamm mit der Genkombination aus *aroF^{fbr}* und *glf* DAH(P) ins Medium aus. Weder durch zusätzliches Einbringen der plasmidgebundenen Genkombinationen aus *glk*, *glk tkt* noch durch *glk tkt tal* konnte die DAH(P)-Konzentration im Verlauf der Kultivierungszeit im wesentlichen erhöht werden. Dagegen führte das Einbringen der Kombination aus *glk* und *tal* zu einer starken Steigerung der DAH(P)-Konzentration im Verlauf der Kultivierungszeit. Es wäre möglich, daß eine weitere Steigerung der DAH(P)-Konzentrationen erreicht werden könnte, wenn die Kultivierungsdauer verlängert wäre.

Spezifische Produktion sowie spezifische Ausbeute von DAH(P) von Kombinationen aus *tkt* und / oder *tal* in PTS⁻ - Stämmen (LJ 110 *ptsI::glf aroB⁻* - Derivate).

Aus den produzierten DAH(P)-Mengen wurde die spezifische Produktivität sowie die spezifische Ausbeute bestimmt. **Tabelle 23** stellt die Ergebnisse dar.

Tabelle 23: Endkonzentrationen von DAH(P), gebildete DAHP-Mengen, spezifische Produktivität sowie spezifische Ausbeute in Abhängigkeit von der Genkombination und IPTG-Induktion (Rezipientenstamm LJ 110 *aroB*⁻ *ptsI::glf*). Die Daten sind die Mittelwerte zweier Parallelansätze.

Genkombination	IPTG- Induktion (100 µM)	End DAHP Konz. in [mM]	DAHP- Menge ¹⁷ [mmol]	DAH(P)-Produktion [mmol DAH(P) / g dw]	spezifische Ausbeute in [% ¹⁸]
<i>aroF^{thr} glf / glk</i>	+	34,8 ± 1,6	3,0 ± 0,2	10,3 ± 1,4	30,4 ± 3,2
<i>aroF^{thr} glf / glk</i>	-	21,4 ± 3,3	2,4 ± 0,3	4,0 ± 0,3	8,6 ± 1,5
<i>aroF^{thr} glf / tkt glk</i>	+	33,1	3,1 ± 0,1	7,2 ± 0,1	19,4 ± 2,8
<i>aroF^{thr} glf / tkt glk</i>	-	18,1	1,6 ± 0,6	3,6 ± 1	6,8
<i>aroF^{thr} glf / glk tal</i>	+	88,7 ± 8,6	8,2 ± 0,5	28,4 ± 4,4	53,1 ± 5,8
<i>aroF^{thr} glf / glk tal</i>	-	37,5 ± 3,1	3,9 ± 0,5	11,4 ± 2,3	15,5 ± 2,4
<i>aroF^{thr} glf / tkt glk</i>	+	41 ± 2,9	3,7 ± 0,41	8,7 ± 1,2	22,5 ± 5,8
<i>tal</i>					
<i>aroF^{thr} glf / tkt glk</i>	-	14,9 ± 3	1,5 ± 0,4	3,8 ± 0,9	7,8
<i>tal</i>					

Das Einbringen und die Expression des Gens der Transketolase allein bzw. in Verbindung mit der Transaldolase im PTS⁻ - Stamm mit der Kombination aus *aroF^{thr}*, *glf*, *glk* führten weder zu einer Erhöhung der spezifischen DAH(P)-Produktion noch zur Erhöhung der spezifischen Ausbeute. Somit blieb der Eintrag in den Aromatenbiosyntheseweg nahezu unverändert.

Dagegen konnte nach Einbringen und Expression der Transaldolase eine signifikante Steigerung der spezifischen Produktion und der spezifischen Ausbeute nachgewiesen werden. Durch Erhöhung der Expression der Transaldolase konnte der Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg um fast das Doppelte gesteigert werden. Ohne Expression der eingebrachten Gene waren weitaus geringere spezifische Ausbeuten und Produktionen von DAH(P) meßbar. Somit führte die Expression von *tal* zur Erhöhung des Kohlenstoffflusses in den Aromatenbiosyntheseweg.

¹⁷ volumenkorrigiert

¹⁸ gebildetes DAH(P) [mol C] / verbrauchte Glucosemenge [mol C] in [%]

Glucoseverbrauch von Genkombinationen aus *aroF^{br}*, *glf* und *glk* in Kombination mit *tal* und / oder *tkl* in PTS⁻ (LJ 110 *aroB⁻ ptsI::glf*) - Derivaten

Nach der Kultivierung wurde der Glucoseverbrauch der Stämme analysiert. **Tabelle 21** stellt die Ergebnisse dar.

Tabelle 24: Glucoseverbrauch von LJ 110 *aroB⁻ ptsI::glf* Derivaten in Abhängigkeit von der Genkombination. Die Daten sind die Mittelwerte zweier Parallelansätze.

Genkombination	IPTG-Induktion (100 µM)	Glucoseverbrauch	
		[g]	[%] ¹⁹
<i>aroF^{br} glf / glk</i>	+	3,3 ± 0,4	40 ± 4
<i>aroF^{br} glf / glk</i>	-	4,3 ± 0,6	53 ± 7
<i>aroF^{br} glf / tkl glk</i>	+	3,9 ± 0,6	49 ± 8
<i>aroF^{br} glf / tkl glk</i>	-	6,7	83
<i>aroF^{br} glf / glk tal</i>	+	3,3 ± 0,2	39 ± 1
<i>aroF^{br} glf / glk tal</i>	-	5,3	67
<i>aroF^{br} glf / tkl glk tal</i>	+	3,6 ± 0,5	44 ± 6
<i>aroF^{br} glf / tkl glk tal</i>	-	5,3	65

Die zusätzliche Expression der Gene *tkl*, *tal* bzw. *tkl* und *tal* neben den Genen *aroF^{br}*, *glf* und *glk* führten zu keinen Veränderungen des Glucoseverbrauchs. Nach Expression der Gene in den PTS⁻ - Stämmen war der Glucoseverbrauch um etwa ein Drittel vermindert.

Analyse der Zusammensetzung der organischen Säuren

Die Zusammensetzung der gebildeten Säuren wurden am Ende der Kultivierungen analysiert. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 27** dargestellt.

¹⁹ Der Glucoseverbrauch des Stammes LJ110 *aroB⁻ / pJF119 EH / pMK* wurde 100% gesetzt.

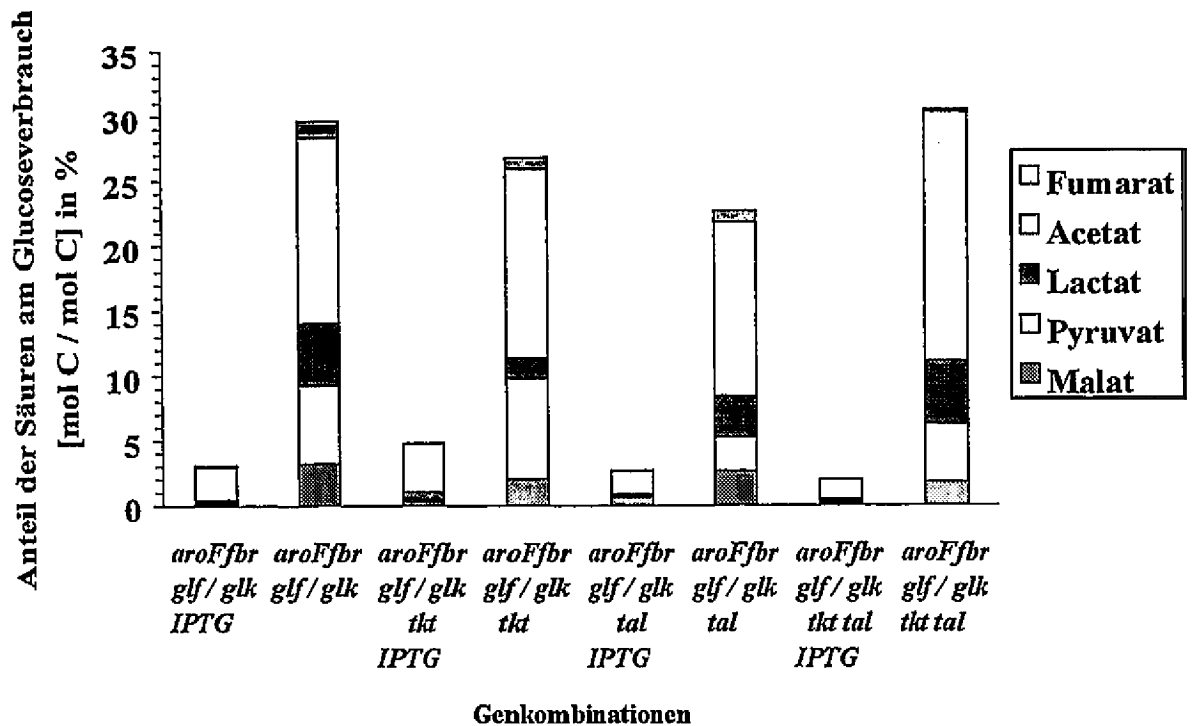


Abbildung 27: Zusammensetzung der organischen Säuren [in %] am Glucoseverbrauch [in mol C organische Säure / mol Glucose] in Abhängigkeit der Genkombinationen in PTS⁻ - Stämmen. Die Daten sind die Mittelwerte zweier Parallelansätze. 100% entspricht den gesamten Glucoseverbrauch des jeweiligen Stammes in C (*aroFfbr* = *aroF^{fbr}*).

Das zusätzliche Einbringen und Expression der Gene *tkt*, *tal* sowie des Operons führte in Kombination mit *glf* und *glk_{zm}* im PTS⁻ - Stamm im wesentlichen zu keiner Veränderung in der Zusammensetzung der organischen Säuren. Nach Expression der eingebrachten Gene wurde ein geringer Anteil des Kohlenstoffs in organische Säuren überführt.

Eine geschlossene Kohlenstoffbilanz konnte nicht ermittelt werden, weil Kohlendioxyd nicht erfaßt wurde: Für die Stamm LJ 110 *ptsI::glf aroB⁻* / pJF *aroF^{fbr}* / pMK *glk tal* konnte durch Induktion der Expression der plasmidkodierte Gene knapp zwei Drittel des eingesetzten Kohlenstoffs nachgewiesen werden, ohne IPTG - Induktion knapp die Hälfte (s. **Abbildung 25**) Das Ergebnis zeigt, daß ein Großteil des Kohlenstoffs nach IPTG-Induktion in den Aromatenbiosyntheseweg gelenkt wurde.

Tabelle 25: Kohlenstoffbilanzierung von LJ 110 *ptsI::glf aroB⁻* / pJF *aroF^{br}* / pMK *glk tal* nach Fed-Batch-Kultivierung [in mol C Produkte / mol C Glucose in %]. Die Daten sind die Mittelwerte zweier paralleler Experimente.

Produkte	<i>aroF^{br} glf / glk tal</i>	<i>aroF^{br} glf / glk tal</i>
	IPTG-Induktion [100 μ M]	
Σ organische Säuren ²⁰	2,7 $\pm$ 1,6	22 $\pm$ 10
Biomasse	9,8 $\pm$ 0,5	7,1 $\pm$ 0,3
DAH(P)	53,1 $\pm$ 5,8	15,5 $\pm$ 2,4
Summe	66 $\pm$ 3	45 $\pm$ 12

Bestimmung der Enzymaktivitäten von PTS⁻ – Derivaten (LJ110 *ptsI::glf aroB⁻*) in Kombination mit *aroF^{br}*, *glf*, *glk*, *tkl* und *tal*.

Nach Ablauf der Fed-Batch Kultivierung wurden die Zellen abgeerntet und die spezifischen Aktivitäten von DAHP-Synthasen, Glucokinase, Transaldolase sowie der Transketolase ermittelt. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 26** dargestellt.

²⁰ bestimmt wurden die Säuren Acetat, Fumarat, Lactat, Malat, und Pyruvat.

Tabelle 26: Spezifische Aktivitäten (in mU / mg Protein) der Enzyme Glucokinase (Glk), Transaldolase (Tal), Transketolase (Tkt) und DAHP-Synthasen in zellfreien Rohextrakten von PTS⁻ - Stämmen (LJ 110 *aroB⁻ ptsI::glf* Derivaten) in Abhängigkeit von der Genkombination und IPTG-Induktion. Die Daten sind die Mittelwerte zweier Parallelansätze.

Genkombination	IPTG- Induktion	Glk	Tal	Tkt	DAHP- Synthasen
<i>aroF^{br} glf / glk</i>	+	3350 ± 50	474 ± 44	495 ± 35	810 ± 100
<i>aroF^{br} glf / glk</i>	-	27 ± 8	527 ± 38	449 ± 100	254 ± 6
<i>aroF^{br} glf / glk tkt</i>	+	2610 ± 640	260 ± 23	2190 ± 810	997 ± 82
<i>aroF^{br} glf / glk tkt</i>	-	19 ± 1	345 ± 19	662 ± 11	339 ± 60
<i>aroF^{br} glf / glk tal</i>	+	1730	2840 ± 243	714 ± 10	1487 ± 34
<i>aroF^{br} glf / glk tal</i>	-	76	550	448 ± 39	284 ± 42
<i>aroF^{br} glf / glk tkt</i>	+	1240	2945 ± 45	2697 ± 305	916 ± 95
<i>tal</i>					
<i>aroF^{br} glf / glk tkt</i>	-	51	487	600 ± 14	314
<i>tal</i>					

Nach Expression der Plasmid-kodierten Gene *glk*, *tkt* und *tal* konnten hohe spezifische Aktivitäten der Glucokinase, der Transketolase und der Transaldolase bestimmt werden. Die Glucokinaseaktivität erhöhte sich so um das Hundertfache, die Aktivität der Transketolase und der Transaldolase um etwa das Fünf- bis Sechsfache.

Die Expression von *aroF^{br}* in Kombination mit *glf* und *glk* im PTS⁻ - Hintergrund führte dazu, daß die spezifischen Enzymaktivitäten der DAHP-Synthasen, um das Fünffache erhöht war. Das zusätzliche Einbringen und die Expression des Plasmid-kodierten Gens der Transketolase bzw. des Operons aus Transketolase und Transaldolase führten zu keiner Erhöhung der spezifischen Aktivität der DAHP-Synthasen.

Dagegen war nach Expression des plasmidkodierten Gens der Transaldolase eine um 50% erhöhte spezifische Aktivität von DAHP-Synthasen meßbar.

Offenbar korrelierte die Induktion der plasmidkodierten Transaldolase mit einer Steigerung der DAHP-Synthase-Aktivität. Diese hohe Aktivität der DAHP-Synthasen korrelierte mit einem hohen Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg (vergl. **Tabelle 23** mit **Tabelle 25**). Diese Ergebnisse werden im Diskussionsteil diskutiert.

3.2 Untersuchungen in PTS⁺ - Stämmen

Das Einbringen und die Expression der Genkombination aus *aroF^{fbr}*, *glf*, *glk* und *tal* führte in einem PTS⁻ - Stamm zu einem hohen Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg (s.S. 76, Tabelle 23). Um den Einfluß eines aktiven PTS-Systems auf den Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg zu untersuchen, wurden die gleichen Gene in einen PTS⁺ - Stamm (s. Abbildung 27) eingebracht.

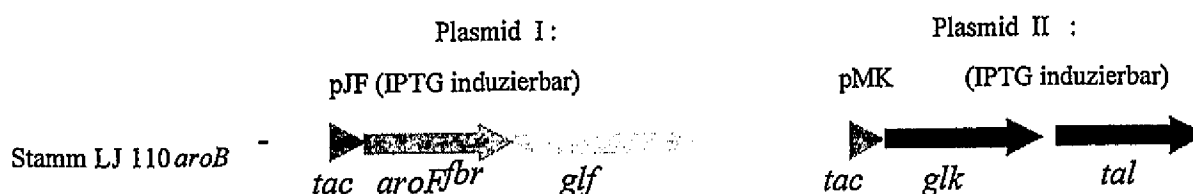


Abbildung 27: Schematische Darstellung der Genkombinationen rekombinanter *Escherichia coli* Stämme zur Untersuchung der Erhöhung der Bereitstellung von PEP und Erythrose-4-Phosphat mit dem Glucoseaufnahmesystem aus *glf* und *glk*, beide aus *Zymomonas mobilis* in einem PTS⁺ - Stamm.

Ermittlung der Wachstumsraten

Untersucht wurde das Wachstum des Stammes in Fed-Batch-Kultur. Festgestellt werden konnte, daß der Stamm etwa doppelt so schnell wuchs (ohne IPTG $\mu = 0,56 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$) wie der isogene PTS-negative Stamm (s. Tabelle 22). Durch IPTG-Zugabe verlangsamte sich das Wachstum kaum ($\mu = 0,54 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$).

Ermittlung der DAH(P)-Produktion sowie der spezifischen Ausbeute

Im PTS negativen - isogenen Stamm mit der Kombination aus *aroF^{fbr}*, *glf*, *glk* und *tal* wurden hohe spezifische Ausbeuten und hohe DAH(P)-Produktionen bestimmt (s. Tabelle 23). Der isogene PTS⁺ - Stamm produzierte dagegen wenig DAH(P) (s. Tabelle 27). Der Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg war somit auch gering.

Tabelle 27: Endkonzentrationen von DAH(P), gebildete DAHP-Mengen, Spezifische Produktivität sowie spezifische Ausbeute des Stammes LJ 110 *aroB*⁻ / pJF *aroF^{abr} glf* / pMK *glk tal*) in Abhängigkeit von der IPTG-Induktion. Die Daten sind die Mittelwerte zweier Parallelansätze.

IPTG-Induktion (100 µM)	End DAHP Konz. in [mM]	DAHP-Menge ²¹ [mmol]	DAH(P)- Produktion [mmol DAH(P) / g dw]	Spezifische Ausbeute in [% ²²]
+	13,3 ± 1,4	1,0 ± 0,1	2,4 ± 0,3	3,8 ± 0,1
-	13,4 ± 6,4	1,7 ± 0,8	3,4 ± 1,8	4,3 ± 1,8

Diese geringe spezifische Ausbeute war niedriger als der Kohlenstofffluß der Genkombination aus *aroF^{abr}* und *tal* (15,0 ± 2,6 % s. S. 46). Offenbar führte die Expression der Genkombination von *glf* und *glk* zu einem niedrigerem Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg.

Glucoseverbrauch

Nach Fed-Batch Kultivierung verbrauchte der Stamm nach IPTG-Induktion 6,0 ± 0,3 g (= 74 ± 4 %²³) bzw. ohne Induktion 8,0 ± 0,5 g (= 99 ± 7 %) Glucose. Diese Werte lagen deutlich höher als die des PTS-negativen isogenen Stammes (vergl. **Tabelle 24**, Seite 77).

Analyse der Zusammensetzung der organischen Säuren

Ohne IPTG- Induktion wurde fast die Hälfte, nach Induktion fast ein Viertel der eingesetzten Glucose zu Säuren umgesetzt (s. **Abbildung 28**).

²¹ volumenkorrigiert

²² gebildetes DAH(P) [mol C] / verbrauchte Glucosemenge [mol C] in [%]

²³ Der Glucoseverbrauch des Stammes LJ 110 *aroB*⁻ / pJF / pMK wurde 100% gesetzt.

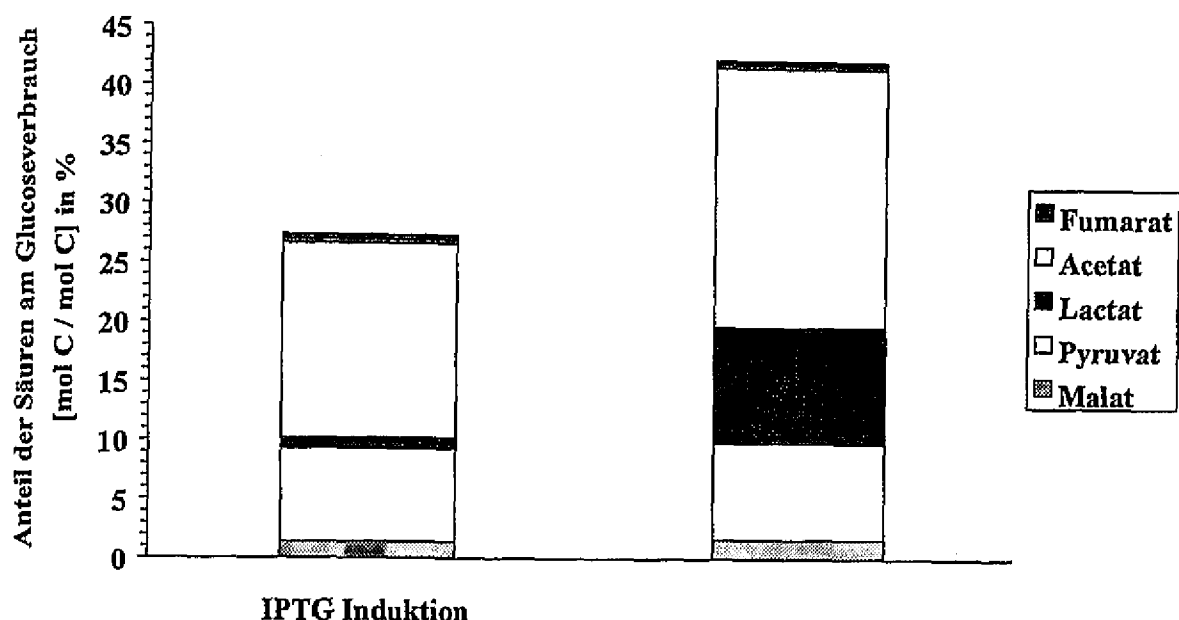


Abbildung 28: Anteil [in %] von Säuren am Glucoseverbrauch [in mol C organische Säuren / mol C Glucose] des Stammes LJ 110 *aroB⁻* / pJF 119 EH *aroF^{br} glf* / pMK *glk tal*). Die Daten sind die Mittelwerte zweier Parallelansätze. 100% entspricht dem Glucoseverbrauch des jeweiligen Stammes in C.

Die organischen Säuren setzten sich ohne Expression der Gene hauptsächlich aus Acetat (ca. 22%), Lactat (ca. 10%) und Pyruvat (ca. 8%) zusammen. Nach Expression reduzierte sich der Anteil des Lactats auf knapp 1% und der des Acetats auf ca. 16%. Dagegen blieb der Pyruvatanteil konstant.

Bestimmungen von spezifischen Enzymaktivitäten in Rohextrakten von LJ 110 *aroB⁻* / pJF *aroF^{br} glf* / pMK *glk tal*

Nachdem die Zellen nach der Fedbatch-Kultivierung geerntet wurden, wurde die spezifische Aktivitäten der DAHP-Synthase, der Transaldolase, der Glucokinase sowie der Transketolase bestimmt. Durch Induktion konnte die Glucokinase um das 300-fache, die Transaldolase um das 20-fache gesteigert werden. Diese spezifische Enzymaktivitäten waren außerordentlich hoch. Dagegen war die spezifische Aktivität der DAHP-Synthasen um die Hälfte gegenüber der nicht induzierten Kultur vermindert (s. Tabelle 28).

Tabelle 28: Spezifische Aktivitäten (in mU / mg Protein) der Glucokinase (Glc), der Transaldolase (Tal), der Transketolase (Tkt) und DAHP-Synthasen des Stammes LJ 110 *aroB⁻* / pJF 119 EH *aroF^{br} glf* / pMK *glk tal*.

IPTG [100µM]	Glc	Tal	Tkt	DAHP- Synthasen
+	9850 ± 750	14020 ± 1190	443 ± 77	145 ± 24
-	30 ± 3	790 ± 207	nicht bestimmt	273 ± 3

Offenbar korrelierte eine niedrige Aktivität der DAHP-Synthase mit niedrigen Kohlenstoffflüssen in den Aromatenbiosyntheseweg. Da durch IPTG-Zugabe der Kombination aus *aroF^{br}* und *tal* in einem PTS⁺-Hintergrund fast achtmal so hohe DAHP-Synthase Aktivitäten erzielt wurden (s.S. 49, **Tabelle 14**), war vielleicht die Induktion von *glf* und *glk* Ursache für die niedrige DAHP-Synthase-Aktivität.

Dieses Ergebnis ist nicht erklärbar. Vielleicht war durch eine veränderte Kopienzahl der Plasmide eine niedrige Aktivität der DAHP-Synthasen begründet.

4. Untersuchungen zur Erhöhung der Bereitstellung von Phosphoenolpyruvat und Erythrose-4-Phosphat auf den Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg durch Umleitung des Kohlenstoffflusses in den Pentose-Phosphat-Weg.

Glucose sollte über ein neues Glucosetransport- und Phosphorylierungssystem aus Glucosetransportprotein (Glf) und Glucosedehydrogenase (Gdh) aus *Bacillus megaterium* und Gluconatkinase (GntK) verstoffwechselt werden (s. **Abbildung 29**). Da *E. coli* LJ 110 eine schwach aktive Glucokinase besitzt (s. S. 53), ist der Kohlenstofffluß über Glucose zu Glucose-6-Phosphat vermutlich gering.

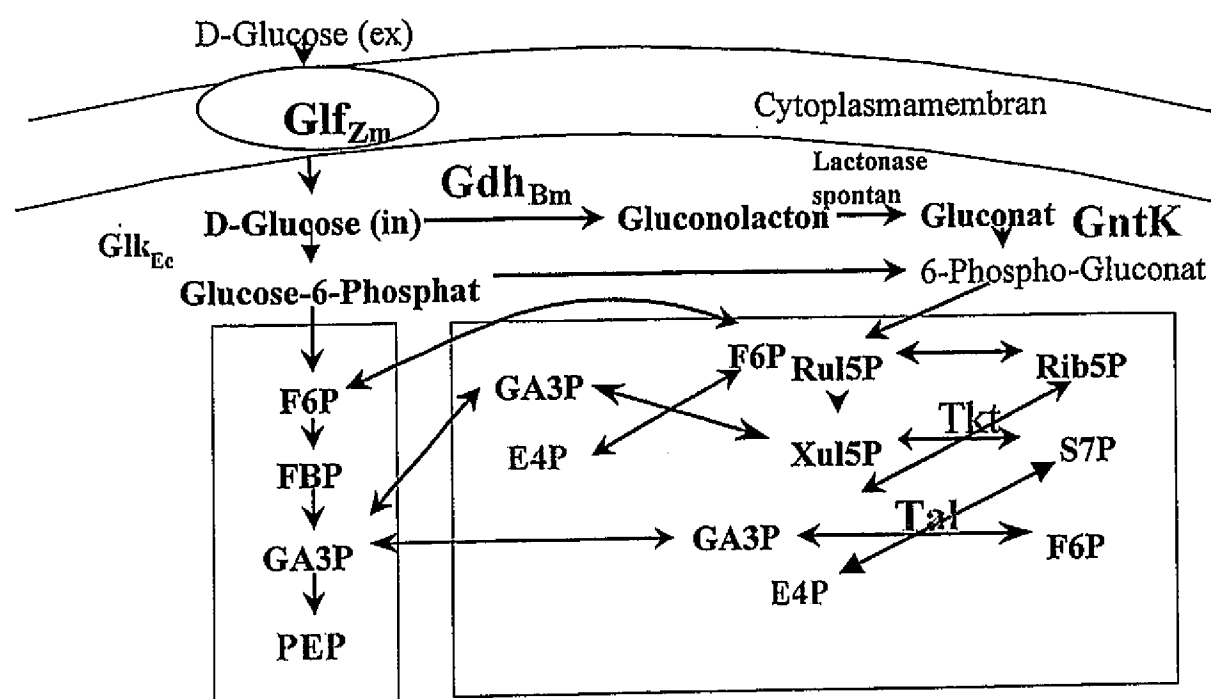


Abbildung 29: Umlenkung des Kohlenstoffflusses von der Glykolyse in den Pentose-Phosphat-Weg durch den Glucosefacilitator (Glf), der Glucosedehydrogenase (Gdh) und der Gluconatkinase (GntK). Glk_{Ec} : Glucokinase (*E. coli*); F6P: Fructose-6-Phosphat, GA3P: Glycerinaldehyd-3-Phosphat, PEP: Phosphoenolpyruvat; Ru5P: Ribulose-5-Phosphat; Xul5P: Xylulose-5-Phosphat, Rib5P: Ribose-5-Phosphat; S7P: Sedoheptulose-7-Phosphat; E4P : Erythrose-4-Phosphat.

Um die Verfügbarkeit von E4P zu steigern, sollte der Kohlenstofffluß in den Pentose-Phosphat-Weg gelenkt werden. Weil auch der Pentose-Phosphat-Weg mit der Glykolyse über die Metabolite Fructose-6-Phosphat und 3-Phosphoglycerat verbunden ist, könnte eine Erhöhung der Verfügbarkeit von PEP möglich sein. Diese könnte durch Verwendung eines

neuen zum PTS-Systems alternativen Glucosetransport und Phosphorylierungssystems aus Glf, Gdh und GntK in einem PTS⁻ - Stamm weiter gesteigert werden.

4.1 Etablierung eines heterologen Glucosetransport- und Phosphorylierungssystems aus Glucosefacilitator, Glucosedehydrogenase sowie Gluconatkinase

Die Genkombinationen aus *glf*, *gdh* sowie *gntK* sollten auf Eignung als heterologes Aufnahme Glucosetransport- und Phosphorylierungssystem in *E. coli* untersucht werden. Dazu wurden die Gene der Glucosedehydrogenase IV (*gdh*) aus *Bacillus megaterium* und Gluconatkinase (*gntK*) aus *Escherichia coli* einzeln sowie als Genkasette (*gntK gdh*) in den Vektor pGEM 7 kloniert. Die Sequenzen der Gene *gdh* und *gntK* waren bekannt (Nagao *et al.*, 1992, Tong *et al.*, 1996) und konnten daher durch PCR amplifiziert werden.

Um die Funktion der konstruierten Plasmide zu untersuchen, wurden die Plasmide in den Stamm LJ 110 transformiert. Zur Kontrolle wurde das Leerplasmid pGEM7 eingebracht. In Rohextrakten der Klone LJ110 / pGEM7, LJ110 / pGEM 7 *gntK*, LJ 110 / pGEM 7 *gdh* und LJ 110 / pGEM 7 *gntK gdh* wurden die spezifischen Gluconatkinase- und Glucosedehydrogenaseaktivität bestimmt. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 29** dargestellt.

Tabelle 29: Spezifische Aktivitäten der Gluconatkinase (GntK) sowie der Glucosedehydrogenase (Gdh) [in U / mg Protein] in Abhängigkeit der eingebrachten Gene. (-.-) : Leerplasmid.

eingebrachte Gene	GntK	Gdh
(-.-)	< 0,003	< 0,003
<i>gntK</i>	0,9	< 0,003
<i>gdh</i>	nicht bestimmt	0,4
<i>gntK / gdh</i>	0,9	1

Im Wildtypstamm von *E. coli* mit dem Leerplasmid lag die spezifische Aktivität der Glucosedehydrogenase sowie der Gluconatkinase nahe der Nachweisgrenze. Die klonierten Gene konnten in dem System einzeln sowie in Kombination überexprimiert werden. Somit konnte die Funktion der Plasmide bestätigt werden.

Um die Funktion als neues Glucoseaufnahme- und Phosphorylierungssystem zu untersuchen wurde das Gen des Glucosefacilitators *glf*, das auf dem IPTG-induzierbaren Vektor pZY 507 vorlag (Weisser *et al.*, 1995) in den Stamm ZSC 112L Δpts , eine *E. coli* Mutante ohne Aufnahme- und Phosphorylierungssystem für Glucose, transformiert. Anschließend wurden die Gene *gntK*, *gdh* oder das Operon *gntK* und *gdh* über die Plasmide PGEM7 *gdh*, PGEM7 *gntK* und PGEM7 *gntK gdh* eingebracht. Zur Kontrolle wurde das Leerplasmid pGEM7 in den Stamm ZSC 112L Δpts / pZY507 *glf* transformiert. Die Genkombinationen der Stämme sind in **Abbildung 30** dargestellt.

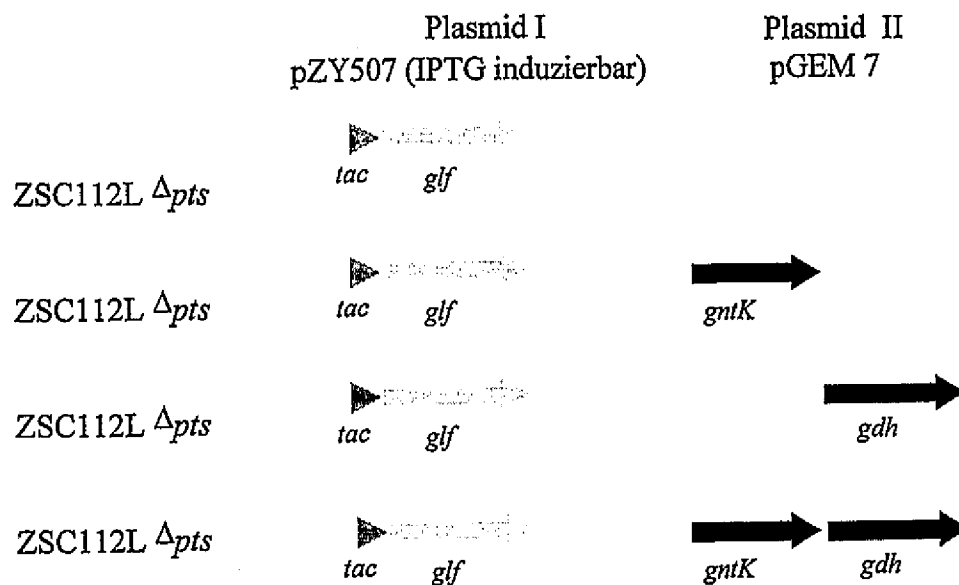


Abbildung 30: Darstellung von Genkombinationen in ZSC 112L – Stämmen.

Mit den konstruierten ZSC112L-Derivaten wurden Wachstumsexperimente in Minimalmedium nach Tanaka (Tanaka *et al.*, 1968) mit den Kohlenstoffquellen Gluconat (0,4%), Glycerin (0,8%) oder Glucose (0,4%) durchgeführt. Die Stämme wurden zu einer OD von 0,05 angeimpft. Nach 2-3 Teilungen wurden den Kulturen IPTG (100 μ M) zugegeben, um *glf* zu exprimieren. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 30** dargestellt.

Tabelle 30: Wachstumsraten [in h⁻¹] von Kombinationen aus *gntK* und *gdh* auf dem Plasmid pGEM 7 im Stamm ZSC 112 L Δ *pts* pZY507 *glf*. Der Stamm ZSC 112 L Δ *pts* pZY507 *glf* ist *glk*⁻.

Genkombination	C-Quellen		
	Glycerin (- / + IPTG)	Gluconat (- / + IPTG)	Glucose (- / + IPTG)
<i>glf</i> / -.-	0,31 / 0,32	0,42 / 0,38	kein Wachstum
<i>glf</i> / <i>gntK</i>	0,35 / 0,32	0,42 / 0,42	kein Wachstum
<i>glf</i> / <i>gdh</i>	0,20 / 0,25	0,28 / 0,28	0,02 / 0,03
<i>glf</i> / <i>gntK</i> <i>gdh</i>	0,30 / 0,30	0,40 / 0,40	0,05 / 0,15

Wachstum auf Glucose:

Der Stamm ZSC 112L Δ *pts* konnte wegen des Defekts des PTS-Systems keine Glucose aufnehmen. Freie, im Cytoplasma vorliegende Glucose kann wegen einer fehlenden Glucokinase nicht weiter umgesetzt werden. Das Einbringen und Expression von *glf* und des Leerplasmides pGEM7 führte somit zu keinem Wachstum auf Glucose als Kohlenstoffquelle. Auch das Einbringen und die Expression von *gntK* zusätzlich zu *glf* führte zu keinem Wachstum des Stammes auf Glucose, d.h. in *E. coli* ist kein intrazelluläres Glucose-oxidierendes Enzym vorhanden.

Das Einbringen von *gdh* in Kombination mit *glf* dagegen führte zum langsamen Wachstum auf Glucose. Die Wachstumsgeschwindigkeit auf Glucose wurde durch IPTG-Induktion leicht gesteigert. Da die Expression von *glf* durch IPTG wegen des IPTG induzierbaren Promotors erhöht wurde, könnte die niedrigere Wachstumsgeschwindigkeit ohne IPTG durch einen geringeren Transport von Glucose in die Zelle erklärt werden.

Gdh oxidiert die im Cytoplasma vorliegende Glucose zu Gluconolacton. Gluconolacton kann durch eine Lactonase (Hucho und Wallenfels, 1972) oder durch spontane chemische Reaktion zu Gluconsäure bzw. Gluconat umgesetzt werden. Im Medium konnte jedoch Gluconsäure nicht nachgewiesen werden. Gluconat wurde nicht ausgeschieden, sondern offensichtlich weiter verstoffwechselt.

Durch Einbringen der Genkombination *gntK* und *gdh* konnte ZSC 112 L Δ *pts* pZY507 *glf* Glucose besser verwerten. Die Wachstumsgeschwindigkeit auf Glucose wurde durch IPTG-

Induktion leicht gesteigert. Da die Expression von *glf* durch IPTG wegen des IPTG induzierbaren *tac* Promotors erhöht wurde, könnte die niedrigere Wachstumsgeschwindigkeit ohne IPTG durch einen geringeren Transport von Glucose in die Zelle erklärt werden.

Im Cytoplasma befindliche Glucose wurde über die Plasmid-kodierte Glucosedehydrogenase und Gluconatkinase über Gluconat und 6-Phosphogluconat oxidiert bzw. phosphoryliert.

Anschließend könnte eine weitere Verstoffwechslung entweder über den Pentose-Phosphat-Weg oder über den Entner-Doudoroff-Weg erfolgen.

Somit konnte die physiologische Funktion des neuen Glucoseaufnahme- und Phosphorylierungssystem aus *Gl*f, *Gdh* und *GntK* bestätigt werden.

Wachstum auf Gluconat / Glycerin

Die Stämme wuchsen auf Gluconat schneller als auf Glycerin, und erheblich schneller als auf Glucose. Vergleicht man die Stämme, die auf Gluconat sowie Glycerin kultiviert wurden, so war die Verdopplungszeit der Stämme relativ einheitlich. Eine Ausnahme bildete die Kombination aus *glf* und *gdh*. Möglicherweise war die Überexpression von *Gdh* als Belastung für die Zelle Ursache des langsameren Wachstums.

4.2 Untersuchungen zum Einfluß des Stoffwechselweges über den Glucosefacilitator, der Glucosedehydrogenase und der Gluconatkinase auf den Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg

Da die Stoffwechselwege über *Gl*f, *GntK* und *Gdh* bzw. *Gl*f und *Gdh* *in vivo* aktiv (s. 5.1) waren, wurde untersucht, ob durch dieses heterologe Glucoseaufnahme- und Phosphorylierungssystem der Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg gesteigert werden kann. Um dies zu untersuchen, sollten die Genkombinationen *glf* / *gdh* / *gntK* bzw. *glf* und *gdh* in einer PTS⁻ *aroB*-Mutante in Verbindung mit einem Gen einer feedback-deregulierten DAHP-Synthase (*aroF^{br}*) kombiniert werden. Anhand der externen Konzentration von DAH(P) wurde der Kohlenstofffluß (DAH(P) in mol C / Glucose on mol C in %) bestimmt. **Abbildung 31** stellt das Prinzip der Bestimmung des Kohlenstoffflusses schematisch dar.

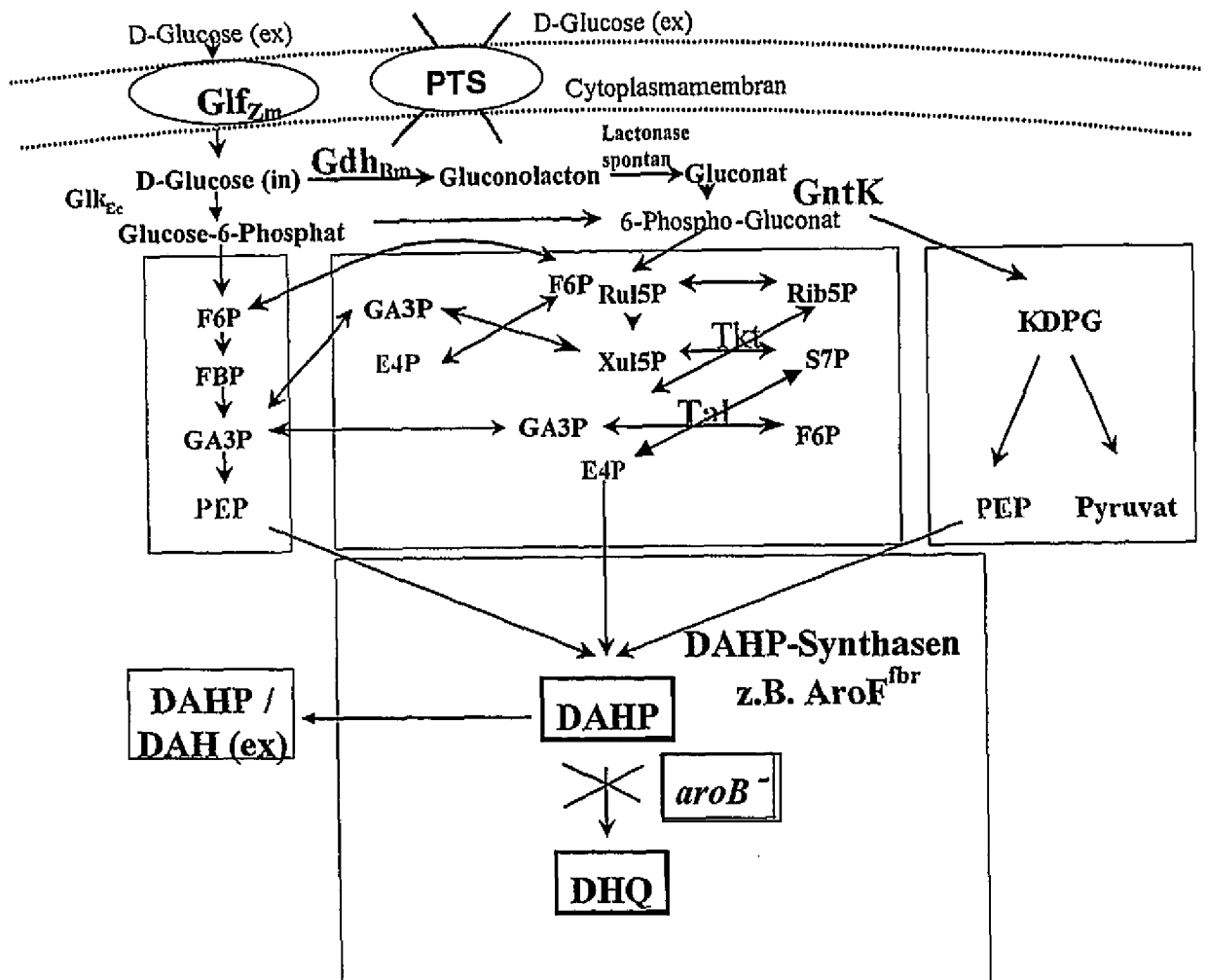


Abbildung 31: Schematische Darstellung des Prinzips der Bestimmung des Kohlenstoffflusses in den Aromatenbiosyntheseweg. Glucose sollte über Glf, Gdh und GntK in die Zelle transportiert, oxidiert und zu 6-Phospho-Gluconat phosphoryliert werden. 6-Phospho-Gluconat kann entweder in den ED-Weg oder über den Pentose-Phosphat-Weg verstoffwechselt werden. Glucose kann wegen der schwach aktiven Glucokinase auch zu Glucose-6-Phosphat umgesetzt werden. Durch Umlenkung des Kohlenstoffflusses in den Pentose-Phosphat-Weg entsteht E4P. Da die Glykolyse mit dem Pentose-Phosphat-Weg über F6P und GA3P in Verbindung steht, kann PEP bereitgestellt werden. Durch Ausschalten des PTS-Systems sollte der Verbrauch von PEP reduziert werden. PEP und E4P wurden über eine feedback-inhibitionsresistente DAHP-Synthase zu DAHP katalysiert. Der Aromatenbiosyntheseweg wurde nach der Eingangsreaktion unterbrochen. Anhand der externen DAH(P)-Konzentrationen konnte der Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg berechnet werden. KDPG: 2-Keto-3-Desoxy-6-Phosphogluconat, RPE: Ribulose-5-Phosphat-Epimerase, RPI: Ribose-5-Phosphat-Isomerase, PTS: Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferase-System; Glf_{Zm}: Glucosefacilitator_{Zm} aus *Zymomonas mobilis*, Gdh_{Bm}: Glucosedehydrogenase aus *Bacillus megaterium*, GntK: Gluconatkinase, Tkt: Transketolase, Tal: Transaldolase, GA3P: Glycerinaldehyd-3-Phosphat, Ru5P: Ribulose-5-Phosphat, Rib5P: Ribose-5-Phosphat, Xu5P: Xylulose-5-Phosphat, F6P: Fructose-6-Phosphat, FBP: Fructose-bis-Phosphat, PEP: Phosphoenolpyruvat; E4P: Erythrose-4-Phosphat; S7P: Sedoheptulose-5-Phosphat; DAHP, DAH: 3-Desoxy-D-Arabino-Heptulosonat-7-Phosphat, 3-Desoxy-D-Arabino-Heptulosonat; DHQ: 3-Dehydroquinat.

Dazu wurde das Gen der Glucosedehydrogenase allein bzw. in Kombination mit dem Gen der Gluconatkinase auf dem Plasmid pMK hinter dem *tac* Promotor kloniert. Zur Überprüfung wurden die Plasmide in den Stamm LJ 110 transformiert und in Vollmedium in Gegenwart bzw. Abwesenheit des Induktors (IPTG, 100µM) kultiviert. Nach der Kultivierung wurden die spezifischen Aktivitäten der Glucosedehydrogenase und der Gluconatkinase sowie des Kontrollstammes LJ110 pMK in zellfreien Rohextrakten bestimmt. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 31** dargestellt.

Tabelle 31: Spezifische Enzymaktivitäten (in U / mg Protein) der Glucosedehydrogenase und der Gluconatkinase. Die Plasmide pMK, pMK *gdh*, pMK *gntK* *gdh* wurden in den Stamm LJ 110 eingebracht und in (+) bzw. ohne (-) Gegenwart von IPTG (100µM) in LB-Medium kultiviert (n.b.: nicht bestimmt). (-.-) : Leerplasmid.

eingebraachte Gene	Gluconatkinase (- / + IPTG)	Glucosedehydrogenase (- / + IPTG)
(-.-)	< 0,01	< 0,01
<i>gdh</i>	n.b. / n.b.	3,2 / 11,2
<i>gntK gdh</i>	0,03 / 3,1	0,7 / 11

Im Kontrollstamm lag die spezifische Aktivität der Gluconatkinase und der Glucosedehydrogenase unterhalb der Nachweisgrenze. Nach Einbringen von *gdh* war eine hohe Glucosedehydrogenaseaktivität meßbar, die nach IPTG Induktion weiter gesteigert werden konnte. Nach Einbringen des Gens der Gluconatkinase zusätzlich zur Glucosedehydrogenase wurden nach Kultivierung in IPTG hohe Gluconatkinaseaktivitäten, aber auch hohe Aktivitäten der Glucosedehydrogenase bestimmt.

Die Plasmide pMK *gdh gntK* und pMK *gdh* waren somit funktionell aktiv und konnten in geeignete Systeme eingesetzt werden.

Die Plasmide pMK *gdh* und pMK *gntK gdh* wurden jeweils in einem PTS⁻ - *aroB* Stamm, in dem bereits *glf* und *aroF^{br}* eingebracht waren (Stamm LJ110 *aroB*⁻ *ptsI::glf* / pJF *aroF^{br}* *glf*), transformiert. **Abbildung 32** stellt die Zusammensetzung der Genkombinationen dar.

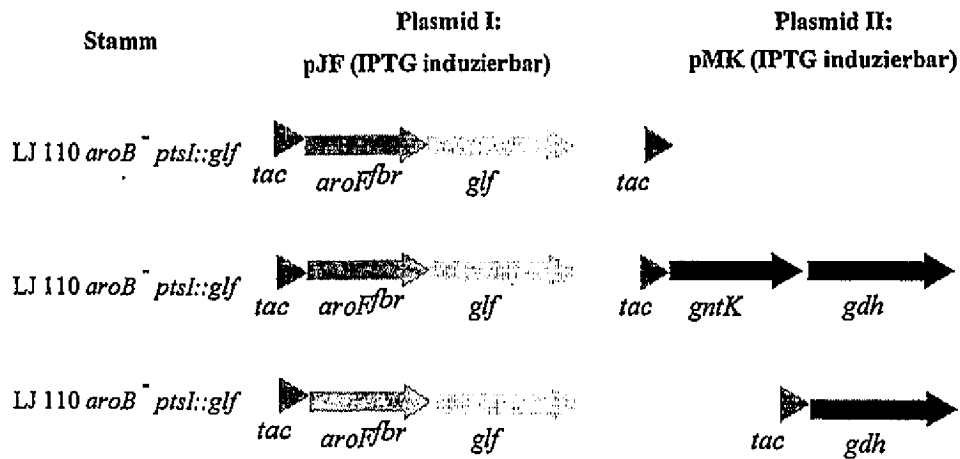


Abbildung 32: Schematische Darstellung rekombinanter *Escherichia coli* Stämme zur Untersuchung des Kohlenstoffflusses in den Aromatenbiosyntheseweg über das Glucosetransportprotein (Glf), der Glucosedehydrogenase (Gdh) und der Gluconatkinase (GntK).

Die Stämme wurden unter Fed-Batch-Bedingungen kultiviert (s. S. 37), um die Auswirkungen des Glucoseaufnahme- und Phosphorylierungssystems aus Glf, Gdh und GntK bzw. der Genkombination aus Glf und Gdh zu analysieren. Dazu wurden die Wachstumsraten ermittelt (s. Tabelle 32). Zur Kontrolle wurde auch ein Stamm (LJ110 *aroB⁻ ptsI::glf* / pJF *aroF^{fbr} glf* / pMK), der die plasmidkodierte Gene *gntK* und *gdh* nicht trägt (Abbildung 32), kultiviert (s. S. 60).

Tabelle 32: Wachstumsraten von PTS⁻ - Stämmen (Rezipientenstamm LJ 110 *aroB⁻ ptsI::glf*) in Abhängigkeit von der Genkombination. Die Daten sind die Mittelwerte zweier Parallelansätze.

Genkombination	IPTG-Induktion (100 µM)	μ [h ⁻¹]	End OD ₆₂₀	Biotrockenmasse ²⁴ [mg]
<i>aroF^{fbr} glf</i> / -.-	+	0,14 ± 0,02 ²⁵	13,3	369 ± 9
<i>aroF^{fbr} glf</i> / -.-	-	0,26	12,2 ± 0,8	430 ± 14
<i>aroF^{fbr} glf</i> / <i>gntK gdh</i>	+	0,2	12,7 ± 1,5	448 ± 49
<i>aroF^{fbr} glf</i> / <i>gntK gdh</i>	-	0,28 ± 0,01	9,9 ± 1,3	354 ± 27
<i>aroF^{fbr} glf</i> / <i>gdh</i>	+	0,22	8,5 ± 1,6	320 ± 67
<i>aroF^{fbr} glf</i> / <i>gdh</i>	-	0,39 ± 0,01	12,1 ± 1,9	392 ± 40

²⁴ volumenkorrigiert

²⁵ Bereich I der Wachstumskurve (s.S. 60, Abbildung 18)

Die LJ110 *aroB*⁻ *ptsI::glf*-Derivate konnten wegen einer aktiven chromosomalen Glucokinase im Gegensatz zu den ZSC112L - Derivaten auf Glucose wachsen (Vergl. **Tabelle 29**, s.S. 87). Das Einbringen der Genkombination aus *gntK* und *gdh* in den PTS⁻ - Stamm in Kombination mit *aroF^{thr}* und *glf* führte zu keiner Beeinträchtigung der Wachstumsrate im Vergleich zum Kontrollstamm (ohne *gntK* und *gdh*). Dagegen war nach Einbringen von *gdh* eine Erhöhung der Wachstumsrate festzustellen.

Die Expression von *gdh* und des Operons aus *gntK* und *gdh* führten zu einer Verminderung der Wachstumsrate. Jedoch war die Wachstumsrate immer noch um das Zweifache höher als beim Kontrollstamm. Die Expression der Gene *gdh* bzw. des Operons aus *gntK* und *gdh* führten somit zu einer Verbesserung des Wachstums der Zellen.

Bestimmung des Kohlenstoffflusses in den Aromatenbiosyntheseweg

Zur Analyse des Kohlenstoffflusses in den Aromatenbiosyntheseweg wurden die spezifische Produktion sowie die spezifische Ausbeute von DAH(P) bestimmt. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 33** dargestellt.

Tabelle 33: Endkonzentrationen von DAH(P), gebildete DAHP-Mengen, Spezifische Produktivität sowie spezifische Ausbeute in Abhängigkeit von der Genkombination und IPTG-Induktion (Rezipientenstamm LJ 110 *aroB*⁻ *ptsI::glf*). Die Daten sind die Mittelwerte zweier Parallelansätze.

Genkombination	IPTG-Induktion (100 µM)	DAH(P) Konz. in [mM]	DAH(P)-Menge ²⁶ [mmol]	DAH(P)-Produktion [mmol DAH(P) / g dw]	Spezifische Ausbeute in [% ²⁷]
<i>aroF^{thr} glf</i> / -,-	+	28,9 ± 0,8	2,9 ± 0,2	8,0 ± 0,5	18,7 ± 0,5
<i>aroF^{thr} glf</i> / -,-	-	12 ± 0,5	1,8 ± 0,5	4,1 ± 1,2	8,6 ± 1,5
<i>aroF^{thr} glf</i> / <i>gntK gdh</i>	+	8,4 ± 1,7	0,9 ± 0,2	2 ± 0,2	4,0 ± 0,9
<i>aroF^{thr} glf</i> / <i>gntK gdh</i>	-	10,4 ± 0,3	1,1 ± 0,1	3,2 ± 0,5	4,6 ± 0,4
<i>aroF^{thr} glf</i> / <i>gdh</i>	+	10,4 ± 0,8	1,1 ± 0,1	3,5 ± 0,5	3,6 ± 0,1
<i>aroF^{thr} glf</i> / <i>gdh</i>	-	9,7	1,1 ± 0,1	2,9 ± 0,2	3,6

²⁶ volumenkorrigiert

²⁷ gebildetes DAH(P) [mol C] / verbrauchte Glucosemenge [mol C] in [%]

Die DAH(P) Produktion bzw. die spezifische Ausbeute an DAH(P) war nach Einbringen bzw. Expression der Gene *gdh* bzw. *gntK* und *gdh* niedrig. Somit war der Kohlenstofffluß dieser Genkombination in den Aromatenbiosyntheseweg gering. Dagegen wurde in der Kontrolle (ohne Plasmid gebundene Gene *gdh* und *gntK*) wesentlich höhere spezifische Produktionen bzw. spezifische Ausbeuten von DAH(P) nachgewiesen. Durch Expression der Gene *gntK* bzw. *gntK* und *gdh* wurde somit der Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg verringert.

Glucoseverbrauch von Genkombinationen aus *aroF^{br}* und *glf* mit Kombinationen aus *gntK* und *gdh* in PTS⁻ - Derivaten

Nach der Kultivierung wurde der Glucoseverbrauch der Stämme analysiert. Tabelle 34 stellt die Ergebnisse dar.

Tabelle 34: Glucoseverbrauch von PTS - Derivaten (LJ 110 *aroB⁻ ptsI::glf*) in Abhängigkeit von der Genkombination. Die Daten sind die Mittelwerte zweier Parallelansätze.

Genkombination	IPTG-Zugabe [100 µM]	Glucoseverbrauch	
		[g]	[%] ²⁸
<i>aroF^{br} glf / -,-</i>	+	3,3 ± 0,3	40 ± 4
<i>aroF^{br} glf / -,-</i>	-	4,3 ± 0,6	53 ± 7
<i>aroF^{br} glf / gntK gdh</i>	+	5,0 ± 0,4	61 ± 3
<i>aroF^{br} glf / gntK gdh</i>	-	5,2 ± 0,3	64 ± 4
<i>aroF^{br} glf / gdh</i>	+	7,0 ± 0,5	87 ± 7
<i>aroF^{br} glf / gdh</i>	-	5,9 ± 0,9	72 ± 12

Das Einbringen und die Expression des Gens der Glucosedehydrogenase *gdh* in Kombination mit *aroF^{br}* und *glf* führte zu einer Erhöhung des Glucoseverbrauchs. Auch nach Expression der Genkombination aus *gntK* und *gdh* erfolgte eine Steigerung des Glucoseverbrauchs gegenüber des Kontrollstammes (ohne *gntK* und *gdh*). Möglicherweise erfolgte mit diesen

²⁸Der Glucoseverbrauch des Stammes LJ 110 *aroB⁻ / pJF / pMK* wurde 100% gesetzt.

Genkombinationen eine erhöhte Bildung von Nebenprodukten. Um diese Vermutung zu untersuchen, wurde das Spektrum der organischen Säuren untersucht.

Zusammensetzung des Spektrums der organischen Säuren der Genkombinationen aus *aroF^{fb}*, *glf*, *gdh* und *gntK* nach Fed-Batch-Kultivierung.

Ohne Expression der Genkombination aus *aroF^{fb}*, *glf*, *gntK* und *gdh* in dem PTS⁻ - Stamm wurde etwa ein Fünftel des Kohlenstoffs in organische Säuren umgesetzt. Sie setzten sich hauptsächlich aus Acetat, Lactat und Pyruvat zusammen (s. **Abbildung 33**).

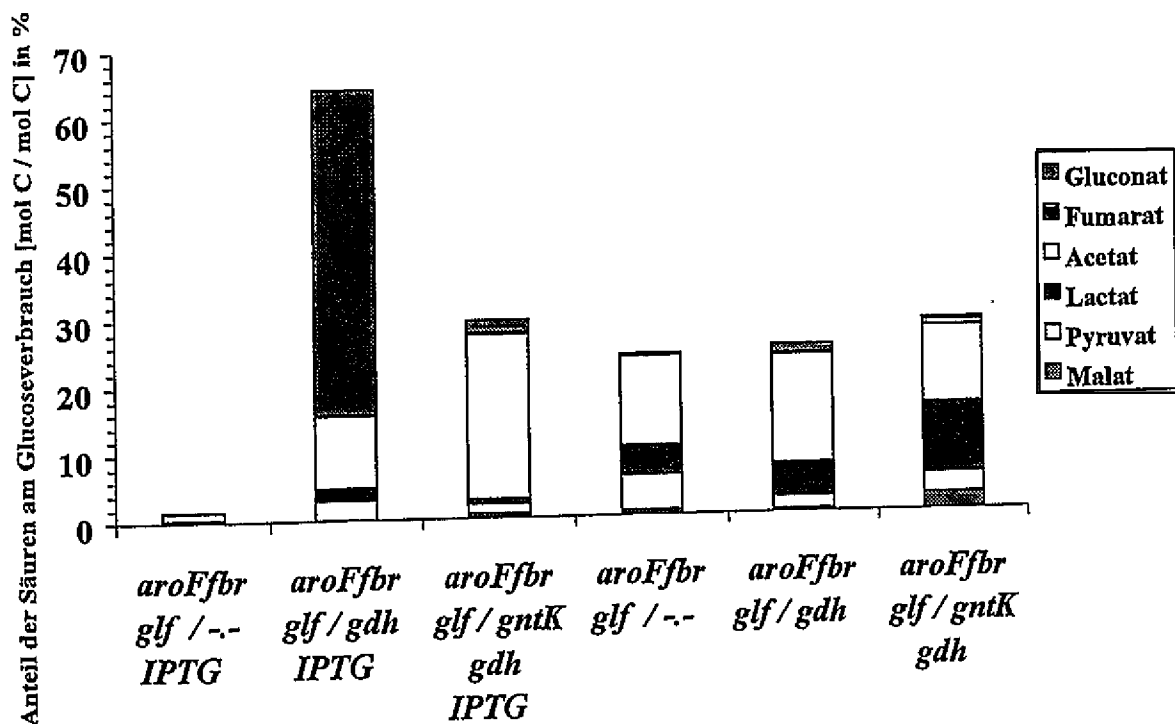


Abbildung 33: Anteil gebildeter Säuren am Glucoseverbrauch [in mol C organische Säuren / mol C Glucose] in [%] von PTS⁻ - Stämmen in Abhängigkeit von der Genkombination. Die Daten sind die Mittelwerte zweier Parallelansätze. 100% entspricht dem Glucoseverbrauch des jeweiligen Stammes in C (*aroFfb* = *aroF^{fb}*).

Nach Expression der Gene des Glucosefacilitators und der feedback-deregulierten DAHP-Synthase wurde nur ein sehr geringer Anteil des Kohlenstoffs (unter 2%) in organische Säuren umgesetzt. Wurde *gdh* zusätzlich eingebracht und exprimiert, wurde ein hoher Anteil des Kohlenstoffs (etwa 50%) in Gluconat überführt. Die zeitliche Abhängigkeit der Gluconatproduktion ist in **Abbildung 34** dargestellt.

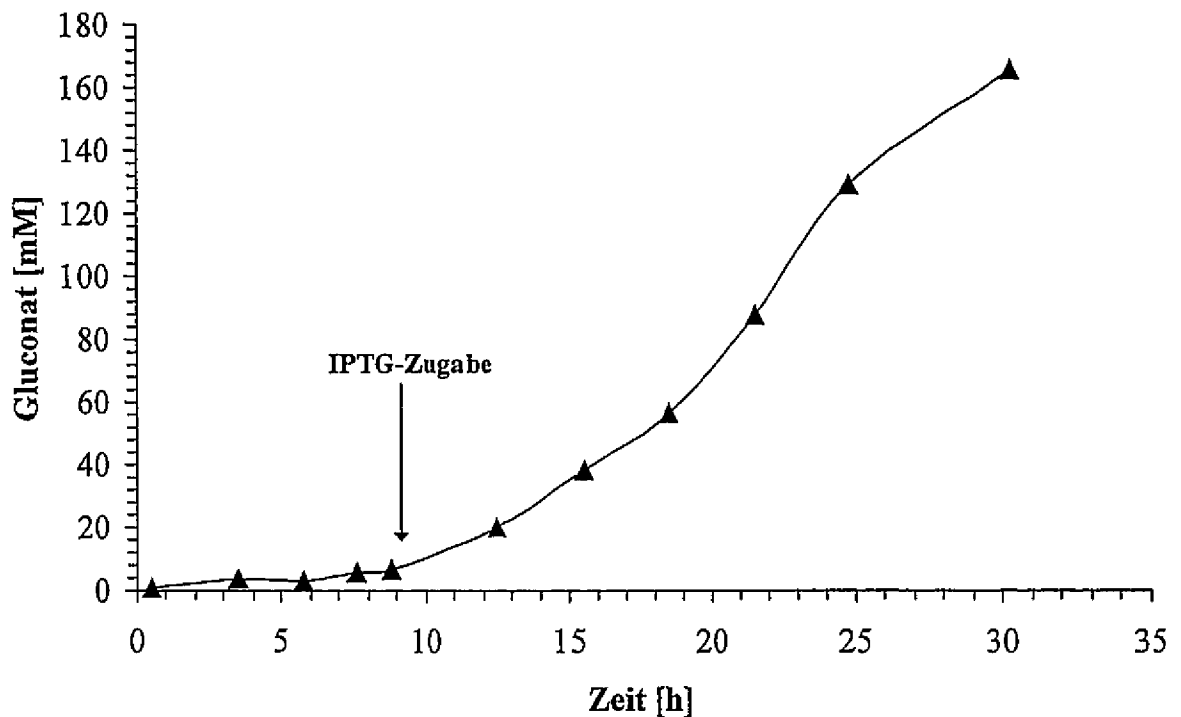


Abbildung 34: Gluconatproduktion von LJ110 *ptsI::glf aroB⁻* / pJF *aroF^{br} glf* / pMK *gdh* nach IPTG-Zugabe in Abhängigkeit von der Zeit.

Der Anteil der anderen organischen Säuren war niedrig. Geringe Mengen Acetat (um 11%), Lactat (um 2%) sowie Pyruvat (um 3%) wurden produziert.

Gluconatbildung wurde fast unterbunden, wenn zusätzlich zur Expression des Gens der Glucosedehydrogenase das Gen der Gluconatkinase exprimiert wurde. Offensichtlich konnte Gluconat durch eine zu niedrige Aktivität der Gluconatkinase (s. **Tabelle 34**) nicht weiter verstoffwechselt werden und wurde ins Medium ausgeschieden. Die Aktivität der Gluconatkinase war nach Expression von *gntK* um das 15-fache erhöht. Wahrscheinlich war diese höhere Aktivität für die weitere Umsetzung des Gluconats nicht mehr limitierend, da kaum Gluconat ausgeschieden wurde. Der Anteil der produzierten organischen Säuren verringerte sich nach zusätzlicher Expression von *gntK* und *gdh* auf ein Viertel des eingesetzten Kohlenstoffs an Glucose. Die organischen Säuren setzten sich hauptsächlich aus Acetat (25 %) zusammen.

Die Produktion von organischen Säuren war jedoch wesentlich höher als beim Kontrollstamm (Genkombination *aroF^{br}, glf*, IPTG-induziert). Die Expression der Gene *gdh* und *gntK* ging somit mit einer Erhöhung der Nebenproduktbildung einher.

Ergebnisse der Aktivitätsbestimmungen

Nach Ende der Kultivierung wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen und die spezifischen Enzymaktivitäten der Gluconatkinase (GntK), Glucosedehydrogenase (Gdh) sowie der DAHP-Synthasen bestimmt. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 35** dargestellt.

Tabelle 35: Spezifische Aktivitäten (in mU / mg Protein) der Enzyme Glucosedehydrogenase (Gdh), Gluconatkinase (GntK) und DAHP-Synthasen in Abhängigkeit von der Genkombination und IPTG-Induktion. Die Daten sind die Mittelwerte zweier Parallelansätze. n.n.: nicht nachweisbar.

Genkombination	IPTG-Induktion (100µM)	Gdh	GntK	DAHP-Synthase
<i>aroF^{br} glf / -.-</i>	+	n.n.	n.n.	1055 ± 50
<i>aroF^{br} glf / gdh</i>	+	7685 ± 3680	107 ± 17	465 ± 48
<i>aroF^{br} glf / gdh</i>	-	508 ± 15	82 ± 2	311 ± 23
<i>aroF^{br} glf / gntk</i>	+	1270 ± 40	1820 ± 40	530 ± 70
<i>gdh</i>				
<i>aroF^{br} glf / gntk</i>	-	n.n.	101 ± 12	307 ± 56
<i>gdh</i>				

In Rohextrakten des Kontrollstamms mit der Genkombination aus *aroF^{br}* und *glf* wurde weder Aktivitäten der Glucosedehydrogenase noch der Gluconatkinase nachgewiesen.

Nach Einbringen und Expression der Gene *gdh* und *gntK* stiegen die Aktivitäten der Glucosedehydrogenase und der Gluconatkinase jeweils um das 15 – 20-fache. Nach Einbringen und Expression von *gdh* wurden niedrige Aktivitäten der Gluconatkinase nachgewiesen. Offensichtlich führte die Induktion der Glucosedehydrogenase zur Induktion der chromosomal kodierten Gluconatkinase. Die Kombination aus *glf* und *aroF^{br}* in Verbindung mit *gdh* und / oder *gntK* steigerte nach IPTG-Induktion die spezifischen Aktivitäten der DAHP-Synthasen. Diese spezifische Aktivitäten waren jedoch um die Hälfte niedriger als beim Kontrollstamm. Offenbar ging die Expression von *gdh* bzw. *gdh* und *gntK* mit einer Verminderung der Aktivitäten der DAHP-Synthasen einher.

Durch die Expression der Genkombination aus *glf*, *gdh* und *gntK* wurde ein geringer Teil des Kohlenstoffflusses in den Aromatenbiosyntheseweg gelenkt, ein hoher Teil dagegen in Nebenprodukte wie organische Säuren.

IV. Diskussion

Für eine optimale Produktion von aromatischen Aminosäuren ist es notwendig, die Limitierungen des Aromatenbiosyntheseweges zu erkennen und zu überwinden. Dies war bisher in vielfältigen klassischen Ansätzen unter Verwendung von Antimetaboliten oder nach Selektion nach dem Einsatz von Mutagenen erzielt worden, um die vielfältigen Kontrollmechanismen des Aromatenbiosyntheseweges aufzuheben (Tsuchida *et al.*, 1987; Tribe *et al.*, 1979; Backman *et al.*, 1990). Dabei waren undefinierte Mutanten selektioniert worden, deren genauen genetischen Veränderungen nicht immer erfaßt worden waren (Leuchtenberger, 1996). Durch exakt bestimmte genetische Veränderungen eines definierten Ausgangsstammes, eines Wildtypstammes von *E. coli* K-12 (LJ 110) war die rationale Entwicklung eines deregulierten Aromatenbiosyntheseweges durchgeführt worden (Bongaerts, unveröffentlichte Ergebnisse). So war durch Einbringen und Überexpression der DAHP-Synthase und der Chorismat-Mutase - Prephenatdehydratase die Aromatenbiosynthese für die Produktion von Phenylalanin dereguliert (Backman *et al.*, 1990, Bongaerts, unveröffentlichte Ergebnisse) worden.

Nachdem die ersten Limitierungen im Aromatenbiosyntheseweg erkannt und überwunden worden waren, kann die Versorgung mit Vorläufermetaboliten, Erythrose-4-Phosphat und Phosphoenolpyruvat, aus dem Zentralstoffwechselweg limitierend sein (Patnaik und Liao, 1994, Draths *et al.*, 1992). Deshalb wurden in dieser Arbeit unterschiedliche Ansätze mit definierten Stämmen durchgeführt, um die Bereitstellung von PEP und E4P zu erhöhen und die Einflüsse auf den Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg zu analysieren:

1. Erhöhung der Expression von Transaldolase (Tal) und / oder Transketolase (Tkt), um die Verfügbarkeit von E4P zu erhöhen.
2. Erhöhung der Verfügbarkeit von PEP durch Ausschalten des PEP verbrauchenden PTS-Systems und Einbringen eines heterologen alternativen ATP-verbrauchenden Glucoseaufnahme- und Phosphorylierungssystems aus Glucosefacilitator (Glf) und Glucokinase (Glk).
3. Erhöhung der Bereitstellung von PEP und E4P durch Einbringen von Kombinationen aus Glf, Glk mit Tal und / oder Tkt.
4. Umlenkung des Kohlenstoffflusses in den Pentose-Phosphat-Stoffwechselweg durch Ausschalten des PTS-Systems und Einbringen eines heterologen alternativen Glucoseaufnahme- und Phosphorylierungssystems aus Glucosefacilitator, Glucosedehydrogenase und Gluconatkinase.

1. Bestimmung des Kohlenstoffflusses in den Aromatenbiosyntheseweg durch Messung des ausgeschiedenen DAH(P)

Um den Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg quantitativ zu bestimmen, sind verschiedene Ansätze denkbar:

In *vivo* Kohlenstoffflüsse im Zentralstoffwechsel können bei Wachstum auf Glucose durch ^{13}C -Markierungsexperimente und anschließender NMR-spektroskopischer Analyse zellulärer Aminosäuren in Kombination mit der Metabolitbilanzierung quantifiziert werden (Wendisch *et al.*, 1997). Diese Methode ist, da mit viel experimenteller Arbeit verbunden, sehr aufwendig für die Charakterisierung der Stoffflüsse einer großen Anzahl unterschiedlicher Stämme.

Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit ein alternativer Ansatz gewählt: Durch Einbringen eines defekten Allels der 3-Dehydroquinat-Synthase (*aroB*) wurde der Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg nach Synthese des Eingangsproduktes, DAHP (3-Desoxy-D-Arabino-Heptulose-7-Phosphat, unterbrochen und anhand der von diesen Stämmen exkretierte Menge von DAH(P) quantifiziert.

Diese Methodik war bereits vielfach angewandt worden (Draths und Frost, 1990, Draths und Frost, 1992; Lu und Liao, 1997, Patnaik und Liao, 1994, Gosset *et al.*, 1996; Flores *et al.*, 1996). Vorteil dieser Methode ist, daß der Kohlenstofffluß aus dem Zentralstoffwechselweg in den Aromatenbiosyntheseweg direkt ohne weitere Reaktionen (mit Ausnahme des Transports) gemessen werden kann.

Nach Einbringen und Expression von einer feedback-deregulierten DAHP-Synthase, *aroF^{br}*, in *aroB*-Derivate wurden im Überstand DAHP und DAH-Konzentrationen von zusammen 30 mM gemessen.

Das Verhältnis der Konzentrationen von DAH zu DAHP, die über HPLC-Analysen gewonnen wurden, betrug in eigenen Experimenten etwa 80 : 20 %, d.h. die nicht phosphorylierte Form des Metaboliten überwog. Untersuchungen, die mit ^1H und ^{13}C NMR durchgeführt worden waren, hatten einen Anteil von DAH an DAHP von 71 – 86% ergeben (Frost und Knowles, 1984). Da DAH aus DAHP entsteht, ist ein Großteil des gebildeten DAHP dephosphoryliert worden. Dies wäre über unspezifische Phosphatasen möglich (Frost and Knowles, 1984). Die zelluläre Lokalisation der Dephosphorylierung ist nicht bekannt (Frost und Draths, 1995).

In eigenen Experimenten wurde die spezifische Aktivität der DAHP-Synthasen nach Induktion von *AroF^{br}* mit etwa 500 mU / mg Protein bestimmt. Messungen von internen Konzentrationen von DAH oder DAHP wurden nicht durchgeführt. Möglicherweise wird die

feedback-deregulierte DAHP-Synthase *in vivo* kaum von DAH oder DAHP inhibiert, sonst wäre eine hohe Aktivität in Gegenwart dieser hohen Konzentrationen nicht meßbar. Aus *in vitro* Daten war nachgewiesen worden, daß DAHP ein nicht kompetitiver Inhibitor von AroF in Konzentrationen zwischen 100 µM und 200 µM ist (Schoner und Hermann, 1976). Ergebnisse aus Untersuchungen, ob auch AroF^{tblr} durch DAHP oder DAH inhibiert wird, liegen bisher nicht vor.

Durch welchen Transportweg DAH oder DAHP ausgeschieden wird, ist bisher nicht bekannt. Es ist aber bekannt, daß *E. coli* Transporter für Metabolite des Aromatenbiosyntheseweges besitzt. So ist ein Transportprotein (ShiA) für die Aufnahme von Shikimat beschrieben worden (Whipp *et al.*, 1998). Shikimat wird jedoch nicht nur aufgenommen, sondern auch ins Medium abgegeben (Draths *et al.*, 1999). Chorismat, ein anderer Metabolit des Shikimatstoffwechselweges, wird von Mutanten, die *phe*⁻, sowie *tyrA*⁻ sind, ausgeschieden (Grisostomi *et al.*, 1997). Auch die Exkretion von Dehydroshikimat ist beschrieben (Li *et al.*, 1999). Jedoch sind die Komponenten der Exkretionssysteme für Shikimat, Dehydroshikimat und Chorismat nicht bekannt.

Um den Kohlenstofffluß in den Aromatenstoffwechselweg zu ermitteln, wurde die Summe der Konzentration aus DAH und DAHP bestimmt, die als DAH(P) bezeichnet wurde. DAH(P) war in allen bisherigen Arbeiten colorimetrisch über eine Spaltung von DAHP und DAH zu β-Formylpyruvat und anschließender Derivatisierung mit Thiobarbitursäure bestimmt worden (Gollub, 1971). Zwischen DAHP und DAH kann mit diesem Testsystem nicht differenziert werden. Eine Reaktion des Testsystems mit anderen chemisch ähnlichen Molekülen ist möglich (Srinivasan and Sprinson, 1959). Allerdings kann der colorimetrische Test für DAH(P) mit einem hohen Fehler von bis zu 30% behaftet sein (Liao *et al.*, 1994). Deshalb wurde eine Methode zur Analyse für DAH(P) über HPLC entwickelt und damit die Bestimmung dieser Metabolite durchgeführt.

Zur Analyse des Kohlenstoffflusses in den Aromatenbiosyntheseweg über DAH(P)-Exkretion waren bisher überwiegend Kultivierungsexperimente mit nicht wachsenden Zellen (Patnaik und Liao, 1994; Patnaik und Liao 1995, Lu und Liao, 1997) oder als Batch-Kultivierung unter manueller pH-Regulation durchgeführt worden (Draths *et al.*, 1992, Gosset *et al.*, 1996, Flores *et al.*, 1996). In eigenen Experimenten wurden die Stämme unter pH-statischen Fed-Batch Bedingungen kultiviert.

Mit nicht wachsenden Zellen kann der Katabolismus erfaßt werden (Emmerling *et al.*, 1999).

Die eingesetzte Glucose wird somit zu DAH(P) verstoffwechselt, ohne daß ein Großteil der Glucose in die Biomasse gelangt. Nachteil dieser Kultivierungsmethode ist, daß ein upscaling für anwendungsorientierte Fermentationen kaum möglich ist (Ikeda und Katsumata, 1999). Außerdem können in nicht wachsenden Zellen die Wirkungen der Induktionen der überexprimierten Enzyme auf das Wachstum der Stämme nicht erfaßt werden (Ikeda und Katsumata, 1999), so daß diese Kultivierungsmethode nicht verwendet wurde.

Fed-Batch Kultivierungen sind für die Analyse des Kohlenstoffflusses gegenüber der Batch-Kultivierung von Vorteil. Durch die kontinuierliche Zugabe der Kohlenstoffquelle können höhere Mengen von Glucose eingesetzt werden, so daß die Produktion von großen Mengen von DAH(P) möglich ist und so der Kohlenstofffluß genauer bestimmt werden kann. Außerdem können so Glucoselimitierungen oder hohe Acetatproduktionen durch hohe Glucosekonzentrationen vermieden werden. In eigenen Experimenten konnten fast die vierfache Menge (ca. 80 g / l) von Glucose gegenüber Literaturwerten (Gosset *et al.*, 1996) eingesetzt und verbraucht werden. Würde diese Konzentration von Glucose als Batch-Kultivierung eingesetzt werden, so könnte hohe Glucosekonzentrationen zur Bildung von großen Mengen organischer Säuren wie z.B. Essigsäure führen, die wiederum zu Wachstumsinhibierungen der Stämme führen (Luli und Strohl, 1990) könnten.

Die Fed-Batch Kultivierung wurde unter pH-statischen Bedingungen durchgeführt, denn nur in Verbindung mit einem konstanten pH-Wert können definierte und reproduzierbare Kultivierungsbedingungen für verschiedene Stämme geschaffen werden.

Mit diesem Kultivierungssystem wurden ausgehend vom definierten Wildtypstamm LJ 110 *aroB*⁻ isogene Derivate kultiviert, in denen die Verfügbarkeit von E4P und / oder PEP erhöht sein soll.

2. Einfluß der Erhöhung der Bereitstellung von Erythrose-4-Phosphat auf den Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg

Untersuchungen hatten ergeben, daß der Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg durch E4P limitiert ist (Lu und Liao, 1996; Liao *et al.*, 1996, Frost und Draths, 1995). Unter der Voraussetzung, daß der Kohlenstofffluß direkt in die Glykolyse gelenkt wird und anschließend erst in den nicht-oxidativen Pentose-Phosphat-Weg einmündet, können 7 Glucosemoleküle zu maximal 3 Molekülen DAHP (s. **Abbildung 35**) umgesetzt werden.

Somit beträgt die maximale Ausbeute 43 % (mol DAHP / mol Glucose) oder 50 % (DAHP in mol C / Glucose in mol C), d.h., maximal können 50 % des Kohlenstoffs aus der Glucose in den Aromatenbiosyntheseweg gelenkt werden, wenn der Kohlenstofffluß direkt in die Glykolyse gelenkt wird, d.h. auf den oxidativen Pentose-Phosphat-Stoffwechselweg verzichtet wird und unter der Voraussetzung, daß das entstehende Pyruvat nicht weiter umgesetzt werden kann.

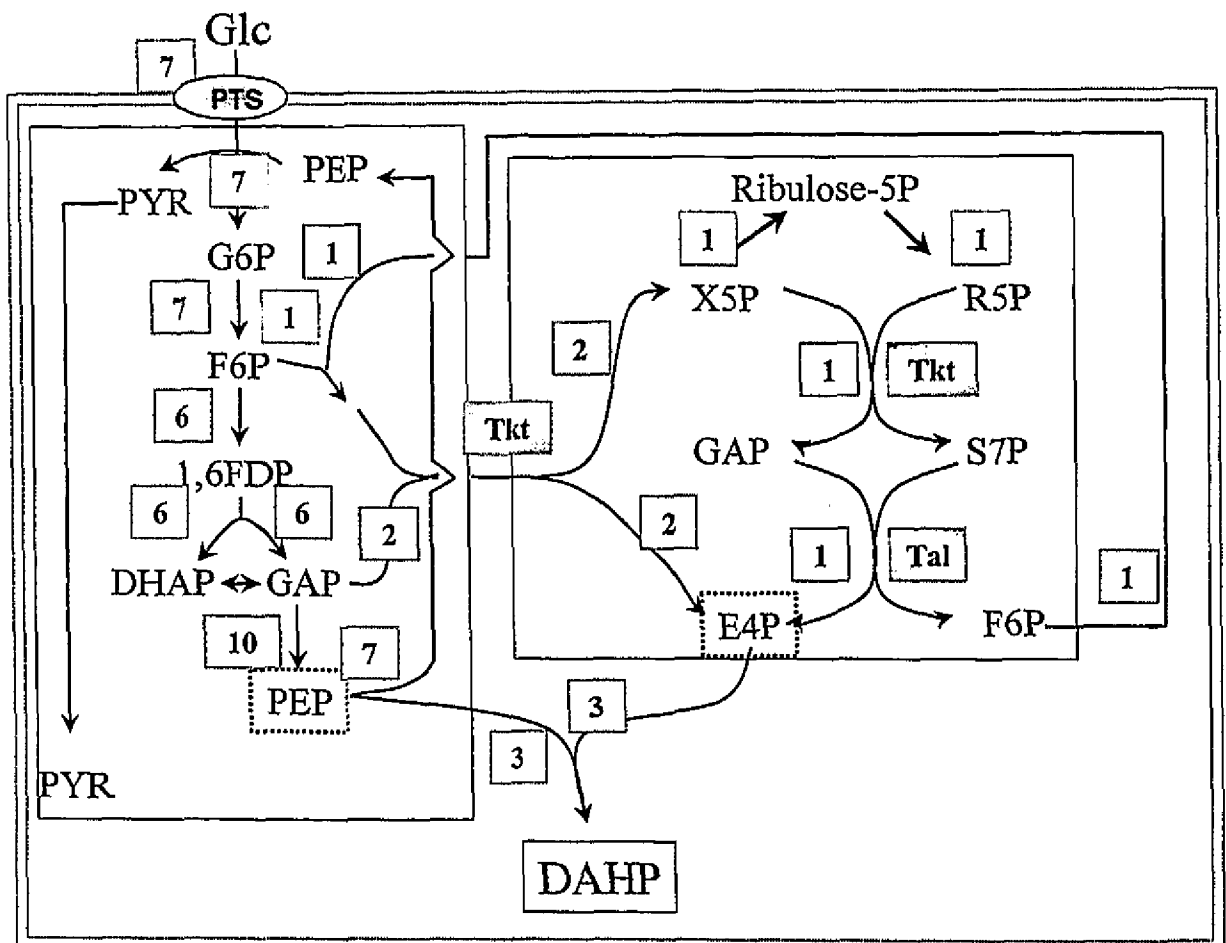


Abbildung 35: Stöchiometrie der Bildung von DAHP aus Glucose als Kohlenstoffquelle in PTS⁺ - Stämmen (verändert nach Liao *et al.*, 1995). Aus 7 Glucosemolekülen können maximal 3 Moleküle DAHP gebildet werden. Die max. Ausbeute beträgt 43% mol DAHP/mol Glucose bzw. 50% DAHP in mol C / Glucose in mol C.

Im Pentose-Phosphat-Stoffwechselweg katalysieren zwei Enzyme die Bildung von E4P: Transketolase und Transaldolase (Sprenger, 1995).

Es war beschrieben worden, daß die Erhöhung der Aktivität der Transketolase um knapp das zehnfache zusätzlich zu einer feedback-deregulierten DAHP-Synthase (AroG^{fbr}) zu einer Steigerung der DAH(P)-Konzentration um das Zweifache führte (Draths *et al.*, 1992). Desweiteren war gezeigt worden, daß durch Erhöhung der Expression von *tkt* die Produktion von DAH(P) pro Trockenzellmasse um das 2 - 5 fache erhöht worden war (Gosset *et al.*

1996). Patnaik *et al.* (1995) hatten gezeigt, daß sich zwar nach Überexpression der Transketolase und einer feedback-deregulierten DAHP-Synthase die Konzentration von DAH(P) um etwa ein Drittel gesteigert hatte, jedoch war die spezifische Ausbeute von etwa 63% (mol DAH(P) / mol Glucose) gegenüber dem Kontrollstamm (60% (mol DAH(P) / mol Glucose)) wenig erhöht.

Diese Ausbeuten könnten zu hoch bestimmt worden sein, denn bei Überwindung der Limitierungen durch E4P kann die spezifische Ausbeute nur maximal 43% (mol DAH(P) / mol Glucose) betragen (s. **Abbildung 35**). Ursache dieser Diskrepanz könnte einerseits darin liegen, daß Pyruvat zu PEP umgesetzt wurde oder in der Meßmethodik von DAHP bedingte hohe Fehlerrate (Patnaik *et al.*, 1994)

Ein positiver Effekt auf den Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg durch Überexpression von *tkt* war nicht nur in *E. coli* gezeigt worden. Nach Überexpression der Transketolase hatte sich im Überstand eines Phenylalanin produzierenden *Corynebacterium glutamicum* - Stammes die Phenylalaninkonzentration um etwa 10% (Ikeda *et al.*, 1999) erhöht.

Nur durch eine moderate Expression der Transketolase war die Tryptophanproduktion eines Tryptophan-produzierenden Stammes von *Corynebacterium glutamicum* gesteigert worden, weil eine erhöhte Aktivität der Transketolase den Kohlenstofffluß offensichtlich in den nicht-oxidativen Pentose-Phosphatstoffwechselweg gelenkt hatte und so die Verfügbarkeit von E4P steigerte (Ikeda und Katsumata, 1999). Eine starke Expression der Transketolase hatte in diesem Stamm zu einer Verringerung der Wachstumsrate geführt, wodurch sich die Tryptophanproduktion verminderte (Ikeda und Katsumata, 1999). Diese Werte sind mit denen für DAH(P) nicht direkt vergleichbar, denn zur Synthese von aromatischen Aminosäuren werden u.a. 2 PEP, ATP und Reduktionsäquivalente benötigt. DAHP dagegen entsteht durch enzymatische Kondensation aus einem Molekül PEP und E4P. Die Ergebnisse weisen jedoch tendenziell auf eine positive Wirkung der Transketolase hin.

In eigenen Experimenten wurde gezeigt, daß die Erhöhung der Expression der Transketolase zusätzlich zur Expression einer feedback-deregulierten DAHP-Synthase weder zu einer signifikanten Änderung der DAH(P) Konzentration noch zu einer Erhöhung der spezifischen Produktivität führte. Die spezifische Ausbeute war gegenüber dem Kontrollstamm, der erhöhte DAHP-Synthase-Aktivitäten aufwies, nahezu unverändert. Die Expression des plasmidkodierten Transketolase-Gens hatte somit in Widerspruch zu bisher beschriebenen

Ergebnissen (Draths *et al.*, 1992, Gosset *et al.*, 1996) keine Veränderungen des Kohlenstoffflusses in den Aromatenbiosyntheseweg zur Folge. Ursache dieser Diskrepanz könnte in den unterschiedlichen Rezipientenstämmen und Plasmiden liegen. Bisherige Untersuchungen waren mit einem nicht definierten Stamm AB2847 (Draths *et al.*, 1992; Patnaik *et al.*, 1995; Patnaik und Liao, 1994) bzw. mit einem Derivat eines Tryptophan-produzierenden Stammes (PB103) durchgeführt worden (Gosset *et al.*, 1996).

Diese können, da sie durch ungerichtete Mutagenese entstanden sind, nicht bekannte genetische Veränderungen tragen. Dagegen wurden eigene Experimente mit definierten Stämmen durchgeführt. Außerdem war in bisher beschriebenen Untersuchungen, mit einer Ausnahme (Draths und Frost, 1990) in dem *aroF* exprimiert worden war, *aroG^{br}* exprimiert worden (Draths *et al.*, 1992; Patnaik *et al.*, 1995; Patnaik und Liao, 1994, Gosset *et al.*, 1996). In eigenen Experimenten wurde jedoch eine andere feedback-deregulierte DAHP-Synthase (*aroF^{br}*) eingebracht und exprimiert.

Die Erhöhung der Expression der Transaldolase in Kombination mit einer feedback-deregulierten DAHP-Synthase führte in eigenen Untersuchungen zu einer Verdopplung des Kohlenstoffflusses in den Aromatenbiosyntheseweg auf $15,0 \pm 2,6$ % des eingesetzten Kohlenstoffs (C DAH(P) / C Glucose).

Die maximale spezifische Ausbeute für Glucose liegt bei Überwindung der Limitierungen durch E4P theoretisch bei 50 % des eingesetzten Kohlenstoffs, bei der Annahme, daß dieser vollständig in die Glykolyse einmündet. Diese maximalen Ausbeute trifft nur für ideale Bedingungen wie fehlende Bildung von Biomasse und Nebenprodukte zu. Unter der verwendeten Fed-Batch Kultivierung wurden jedoch Biomasse und Nebenprodukte produziert. Die eingesetzte Kohlenstoffquelle Glucose wurde nicht vollständig in den Aromatenbiosyntheseweg gelenkt, sondern ging in die Biomasse sowie in die Produktion von organischen Säuren ein, so daß geringe spezifische Ausbeuten von DAH(P) erreicht wurden. Die Produktion von CO₂ konnte aus technischen Gründen nicht bestimmt werden, jedoch ist anzunehmen, daß CO₂ entsteht und somit für den Eintrag in den Aromatenbiosyntheseweg nicht zur Verfügung steht.

Für die Bestimmung der spezifischen Ausbeute wurde die verbrauchte Menge Glucose und die produzierte Menge von DAH(P) über den gesamten Kultivierungszeitraum berücksichtigt. DAH(P)-Produktion, wie exemplarisch gezeigt wurde, setzte erst am Ende der exponentiellen Wachstumsphase ein. Deshalb wären die spezifischen Ausbeuten über den Produktionszeitraum höher als über den gesamten Kultivierungszeitraum.

Die Analyse der spezifischen Aktivitäten in Rohextrakten ergab, daß hohe spezifische Aktivitäten der Transaldolase gemessen wurden, die etwa 10-fach höher waren als in Rohextrakten des Referenzstammes. Unerwartet war jedoch eine Verdopplung der spezifischen Aktivitäten der DAHP-Synthasen gegenüber einem Kontrollstamm, dessen plasmidgebundenes *aroF^{fbr}*-Gen exprimiert worden war.

Deshalb kann mit den erzielten Ergebnissen keine eindeutige Aussage getroffen werden, ob E4P für den Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg limitierend ist.

Offensichtlich ging die Erhöhung der Transaldolase mit einer Erhöhung der spezifischen Aktivität der DAHP-Synthase einher. Diese Erhöhung könnte einerseits in der Aktivierung der feedback-deregulierten DAHP-Synthase liegen oder aber in der Erhöhung der Expression des Gens *aroF^{fbr}*. Die Induktion der Transaldolase könnte zu einer Erhöhung der Bereitstellung von E4P führen. Diese könnte vielleicht zu einer Aktivierung von AroF^{fbr} führen. Jedoch sind Substrate, die feedback-deregulierte DAHP-Synthasen aktivieren, bisher nicht bekannt. Andere Möglichkeiten bestehen darin, daß E4P AroF^{fbr} stabilisieren könnte oder das Transaldolase und AroF^{fbr} zur Weitergabe von E4P einen Komplex bilden. Bisher ist bekannt, daß PEP stabilisierend auf das Protein wirkt (Schoner und Herrmann, 1976). Ob auch E4P AroF^{fbr} *in vitro* oder *in vivo* stabilisiert, wurde bisher noch nicht untersucht. Desweiteren wäre es denkbar, daß das Protein der Transaldolase auf AroF^{fbr} stabilisierend oder aktivierend wirkt. Unwahrscheinlich, aber nicht auszuschließen, wäre eine Erhöhung der Expression von *aroF^{fbr}* durch Erhöhung der Expression von *tal*. Da *aroF^{fbr}* durch den *tac*-Promotor kontrolliert wird, müßte die Expression von *tal* einen Induktor liefern, den die Expression von *aroF^{fbr}* erhöht. Desweiteren wäre nicht auszuschließen, daß die Kopienzahl der Vektoren sich verändert hatte und so zu einer Erhöhung der Aktivität der DAHP-Synthase führte.

Die Ergebnisse stimmten nur zum Teil mit bisherigen Untersuchungen überein: Die Erhöhung der Expression von *tal* in Kombination mit *aroG^{fbr}* hatte zu einer Erhöhung der DAH(P)-Konzentrationen in Überständen geführt, jedoch war in Gegensatz zu eigenen Experimenten keine Erhöhung der spezifischen Ausbeuten (mol DAH(P) / mol Glucose) nachgewiesen worden (Liao *et al.*, 1996; Lu und Liao, 1997). In diesen Arbeiten waren jedoch nicht die spezifischen Aktivitäten der DAHP-Synthasen bestimmt worden, so daß nicht auszuschließen ist, daß auch eine erhöhte DAHP-Synthase Aktivität vorlag.

Eigene Ergebnisse zeigten, daß die zusätzliche Überexpression der Transketolase zur Transaldolase und DAH(P)-Synthase keinen Effekt auf den Kohlenstofffluß ausübte.

Offenbar kompensiert die Überexpression der Transketolase, zusätzlich zur Transaldolase und der feedback-deregulierten DAHP-Synthase, den positiven Effekt, den die Überexpression der Transaldolase auf die Ausbeute von DAH(P) ausübt. Die Aktivität der DAHP-Synthasen veränderte sich gegenüber den Kontrollstamm nicht und war damit niedriger als nach Expression der plasmidkodierten Transaldolase und feedback-deregulierten DAHP-Synthase. Untersuchungen, die mit nicht wachsenden Zellen durchgeführt worden waren (Lu und Liao, 1997), hatten ergeben, daß die Überexpression von *tal* und *aroG^{br}* zu einer Erhöhung der DAH(P)-Konzentration führte, die zusätzliche Überexpression von *tkt* zu dieser Genkombination jedoch die Produktion von DAHP nicht erhöhte. Dies steht in Widerspruch zu eigenen Ergebnissen, in der die Expression des plasmidkodierten Gens von *tkt* und Kombination mit *tal* und *aroP^{br}* die DAH(P)-Konzentration sogar verminderte. Folgende Erklärungsmöglichkeiten bieten sich an: Die Induktion der Transaldolase könnte zu einer Erhöhung der Verfügbarkeit von E4P führen, wodurch sich die feedback-resistente DAHP-Synthase stabilisierte. Die zusätzliche Induktion der Transketolase könnte dann das durch die Transaldolase gebildete E4P in die Glykolyse zurück lenken, wodurch die stabilisierende Wirkung auf die feedback-deregulierte DAHP-Synthase unterbunden wäre.

3. Einfluß der Erhöhung der Bereitstellung von Phosphoenolpyruvat auf den Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg

50% des PEP wird in *Escherichia coli* für die Glucoseaufnahme verwendet (s. **Abbildung 36**). Dieser Anteil ist von allen PEP-abhängigen Reaktionen der höchste. Deshalb ist das PTS-System ein wichtiger Angriffspunkt für die Verminderung des PEP-Verbrauchs, wodurch PEP für andere Reaktionen wie z.B. für die Synthese von DAH(P) verwendet werden kann.

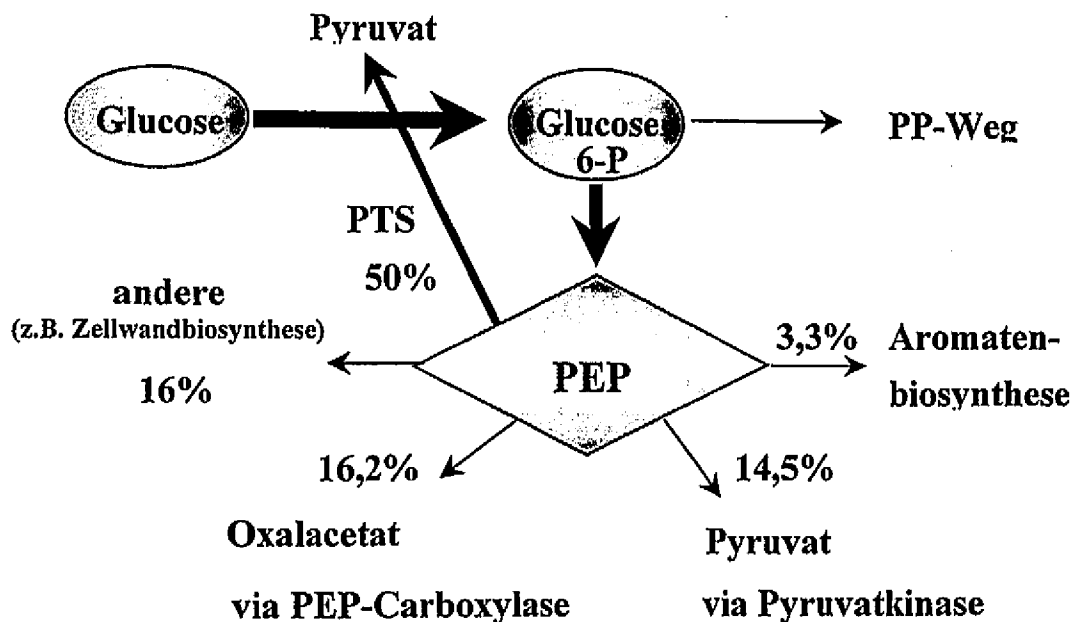


Abbildung 36: Relative Verteilung der Flüsse von Phosphoenolpyruvat von *Escherichia coli* nach aerober Fed-Batch Kultivierung auf Minimalmedium mit Glucose nach Holmes, 1986 und Valle *et al.*, 1996.

Ziel war es den Fluß von PEP in den Aromatenbiosyntheseweg zu erhöhen, so daß dieser von den 3,3 % des Wildtyps (**Abbildung 36**) gesteigert wird.

Der Verbrauch von PEP durch das PTS-System führt dazu, daß die maximale spezifische Ausbeute von DAHP auf 50 % mol C DAHP / mol C Glucose bzw. 43 % mol DAHP / mol Glucose begrenzt ist (s. **Abbildung 35**). Wird dagegen kein PEP über das PTS-System verbraucht, könnte sich die spezifische Ausbeute auf maximal 100 % mol C DAHP / mol C Glucose bzw. maximal 86 % mol DAHP / mol Glucose verdoppeln, bei Annahme, daß der Kohlenstofffluß über die Glykolyse in den Pentose-Phosphat-Stoffwechselweg gelangt (s. **Abbildung 37**), wenn gleiche Annahmen vorliegen. Dabei wird vorausgesetzt, daß keine Biomasse und Nebenprodukte gebildet werden, keine Reaktionen vorliegen, in der Pyruvat oder Oxalacetat zu PEP katalysiert werden und der Kohlenstofffluß von der Glykolyse direkt in den Pentose-Phosphat-Weg gelenkt wird (s. **Abbildung 35 und 37**).

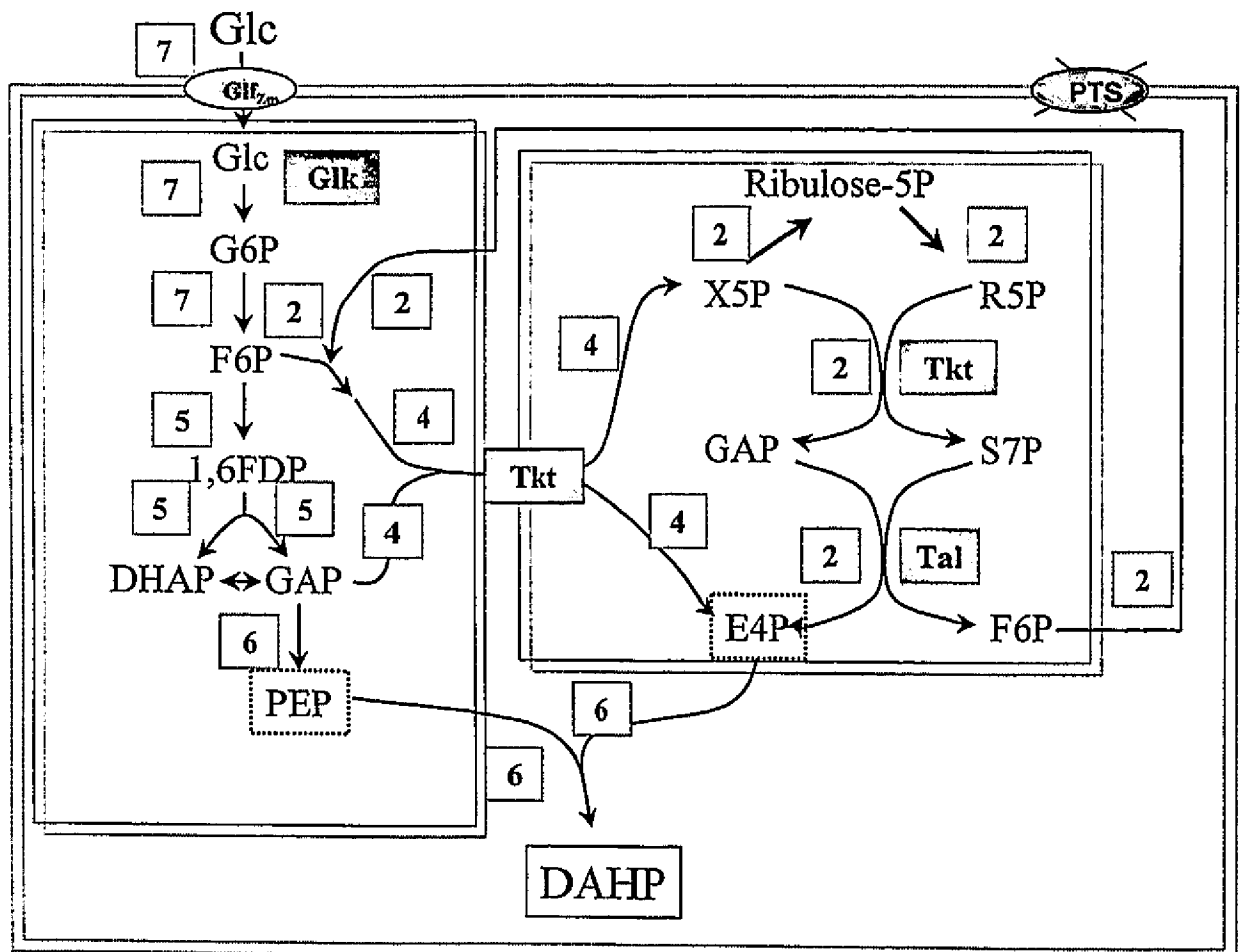


Abbildung 37: Stöchiometrie der Bildung von DAHP aus Glucose als Kohlenstoffquelle in PTS⁻ - Stämmen (verändert nach Liao *et al.*, 1995). Aus 7 Glucosemolekülen können maximal 6 Moleküle DAHP gebildet werden. Die maximale Ausbeute beträgt 86% (mol DAHP/ mol Glucose) bzw. 100% (DAHP in mol C / Glucose in mol C).

Diese Annahme ist ein Extremfall, z.B. wird über den oxidativen Pentose-Phosphat-Weg NADPH + H⁺ für anabole Reaktionen bereitgestellt. Jedoch kann in *E. coli* NADPH + H⁺ über eine Transhydrogenase aus NADH + H⁺ bereitgestellt werden (Gottschalk, 1986; Hoek und Rydström, 1988). Ferner muß Biomasse gebildet werden, sonst wäre eine DAHP-Produktion nicht möglich.

Da in *E. coli* Glucosephosphorylierung über das PTS-System mit PEP als Phosphordonor erfolgt (Postma *et al.*, 1996) mußten für die Glucoseaufnahme alternative Glucosetransport- und Phosphorylierungssysteme verwendet werden.

Bisher waren Untersuchungen mit Mutanten von *E. coli* durchgeführt worden, die Glucosemoleküle statt über das PEP verbrauchende PTS-System über ein PEP unabhängiges Galaktosepermeasesystem (GalP) aufnehmen (Flores *et al.*, 1996; Chen *et al.* 1997). Die

Autoren nahmen an, daß eine Glucokinase (Glc) dann die Phosphorylierung der im Cytoplasma vorliegenden Glucose übernahm.

In Kombination mit erhöhten Aktivitäten einer feedback-resistenten DAHP-Synthase (AroG^{fbr}) waren höhere Konzentrationen von DAHP nachgewiesen worden als mit vergleichbaren PTS^+ - Derivaten (Flores *et al.*, 1996). In dieser Arbeit waren auch die spezifischen Ausbeuten der PTS^- - Stämme mit 14 % (mol C DAH(P) / mol C Glucose) gegenüber PTS^+ - Stämmen mit 4,2 % (mol C DAH(P) / mol C Glucose) erhöht. Eine Kohlenstoffbilanzierung war in dieser Arbeit nicht durchgeführt worden.

In eigenen Versuchen wurde das PTS-System durch Insertion von *glf* von *Zymomonas mobilis* in das Chromosom von LJ110 *aroB* ausgeschaltet. Nachdem in diesem Stamm eine feedback-deregulierte DAHP-Synthase und eine weitere Genkopie von *glf* überexprimiert wurden, erhöhte sich die spezifische Ausbeute um fast das Dreifache ($18,7 \pm 0,3$ % mol C DAH(P) / mol C Glucose) gegenüber einem isogenen PTS^+ Stamm *aroB*⁻, mit einer erhöhten Expression einer feedback-deregulierten DAHP-Synthase ($6,9 \pm 1,2$ % mol C DAH(P) / mol C Glucose).

Nach Bestimmung der spezifischen Aktivität der DAHP-Synthasen wurde festgestellt, daß diese (in einem PTS^- - Stamm mit exprimiertem *aroF*^{fbr} und *glf*) um fast das Doppelte (um 1000 mU / mg Protein) gegenüber einem PTS^+ - Stamm mit exprimiertem *aroF*^{fbr} (um 500 mU / mg Protein) erhöht war. Die Aussage, daß der Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg durch PEP limitiert sei, läßt sich in Gegensatz zu bisherigen Arbeiten (Patnaik *et al.*, 1995) wegen der erhöhten Aktivitäten der DAHP-Synthasen somit nicht bestätigen.

Offenbar korrelierte das Ausschalten des PTS-Systems durch Insertion von *glf* und Expression des plasmidkodierten *glf* - Gens mit einer Erhöhung der spezifischen DAHP-Synthase-Aktivität.

Das Ausschalten des PTS-System führte zu einer Ersparnis von Phosphoenolpyruvat, wodurch sich die Verfügbarkeit von PEP erhöhte und zu einer Erhöhung der spezifischen Ausbeute von DAH(P) führte.

Ursache der erhöhten spezifischen DAHP-Synthase Aktivität könnte darauf zurückzuführen sein, daß PEP DAHP-Synthasen aktiviert oder stabilisiert. Bisher war bekannt, daß PEP *in vitro* AroF stabilisiert (Schoner und Hermann, 1976). AroF^{fbr} ist im Gegensatz zu AroF temperaturlabiler (Jossek, unveröffentlichte Ergebnisse). Möglicherweise kann PEP auch

AroF^{br} stabilisieren, wodurch sich die spezifische Aktivität der DAHP-Synthasen erhöhen könnte.

Ohne Expression der Gene *aroF^{br}* und *glf* wurde in PTS⁻ - Stämmen etwa 25% des Kohlenstoffs aus der Glucose in organische Säuren überführt, wobei knapp ein Viertel (ca. 6%) der organischen Säuren aus Pyruvat bestand. Bis zu 4% des Kohlenstoffs wurde in Malat umgesetzt. In PTS⁺ - Stämmen wurden dagegen fast 40% der Glucose in organische Säuren umgesetzt, Pyruvat und Malat wurden nicht gebildet.

Pyruvat könnte als Überschußreaktion bei einem hohen Angebot von PEP entstanden sein. Malat entsteht aus der Carboxylierung von PEP zu Oxalacetat durch die PEP-Carboxylase und Reduktion zu Malat über die Malatdehydrogenase (s. **Abbildung 38**). Ein anderer Weg über die Malatsynthase ist wegen der Glucoserepression der Malatsynthase vermutlich nicht möglich (Cronan und LaPorte, 1996). Eine Bestimmung der Aktivität der Malatsynthase wurde jedoch nicht durchgeführt. Malat gibt somit den Fluß von PEP in den Citronensäurezyklus wieder.

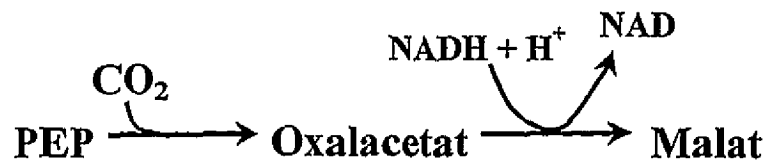


Abbildung 38. Bildung von Malat aus PEP.

Dieser war mit 2 - 4 % (mol C Malat / mol C Glucose) zwar nicht sehr groß, jedoch wird für die Bildung von einem Molekül Malat ein Molekül PEP benötigt, welches somit für den Eintrag in den Aromatenbiosyntheseweg nicht zur Verfügung steht.

Die Exkretion von Pyruvat und Malat ist ein Hinweis, daß durch Ausschalten des PTS-Systems die Verfügbarkeit von PEP erhöht wird. Nach Expression der Gene *aroF^{br}* und *glf* wurde keine Exkretion von Pyruvat und Malat mehr festgestellt, weil offenbar durch Erhöhung der spezifischen Aktivität der DAHP-Synthasen PEP in den Aromatenbiosyntheseweg gelenkt wurde. Dies spiegelte sich in einer erhöhten DAH(P)-Ausbeute wieder. Eine hohe Ausbeute von DAH(P) ging somit mit einer niedrigen Ausbeute von Nebenprodukten einher bzw. ein hoher Anteil von Nebenprodukten korrelierte mit niedrigen Ausbeuten von DAH(P).

Ebenfalls kaum Nebenproduktbildung war in PTS⁻ - Stämmen bestimmt worden, die aerob Glucose über eine konstitutive Galactosepermease und eine Glucokinase verwerten (Chen *et*

al., 1997a, Chen *et al.*, 1997b). Dagegen war in isogenen PTS^+ -Stämmen Acetat als Nebenprodukt nachgewiesen worden (Chen *et al.*, 1997a, Chen *et al.*, 1997b). Die Autoren vermuten, daß der Kohlenstofffluß zum Pyruvat in den PTS^- -Stämmen zu gering ist, um eine Exkretion von Pyruvat sowie des aus dem Pyruvat entstehenden Acetats zu ermöglichen (Chen *et al.*, 1997b). Auch unter anaerober Kultivierung waren in PTS^- Stämmen erheblich weniger organische Säuren wie Acetat, Formiat, Ethanol, Lactat und Succinat gebildet worden als in PTS^+ Stämmen (Chen *et al.*, 1997b).

Die gleichzeitige Überexpression einer PEP-Synthetase mit einer feedback-deregulierten DAHP-Synthase (*aroG^{br}*) und einer Transketolase um die Verfügbarkeit von PEP und E4P zu erhöhen hatte ebenfalls zu keiner Nebenproduktbildung geführt, weil wegen der Erhöhung der spezifischen Aktivität der DAHP-Synthasen PEP (und E4P) in den Aromatenbiosyntheseweg gelenkt worden war (Patnaik *et al.*, 1994). Dies spiegelte sich in einer erhöhten DAHP Produktion wieder (Patnaik *et al.*, 1994).

Durch Insertion von *glf* in *ptsI* wird das Protein EI des PTS-Systems nicht exprimiert. Daraus folgt, daß die Phosphorylierungskaskade über PtsI, HPr, $\text{E}_{\text{IIA}}^{\text{Glc}}$ und $\text{E}_{\text{IIBC}}^{\text{Glc}}$, die letztendlich zur Phosphorylierung des Glucose führt, unterbrochen wird (s: Abbildung 39).

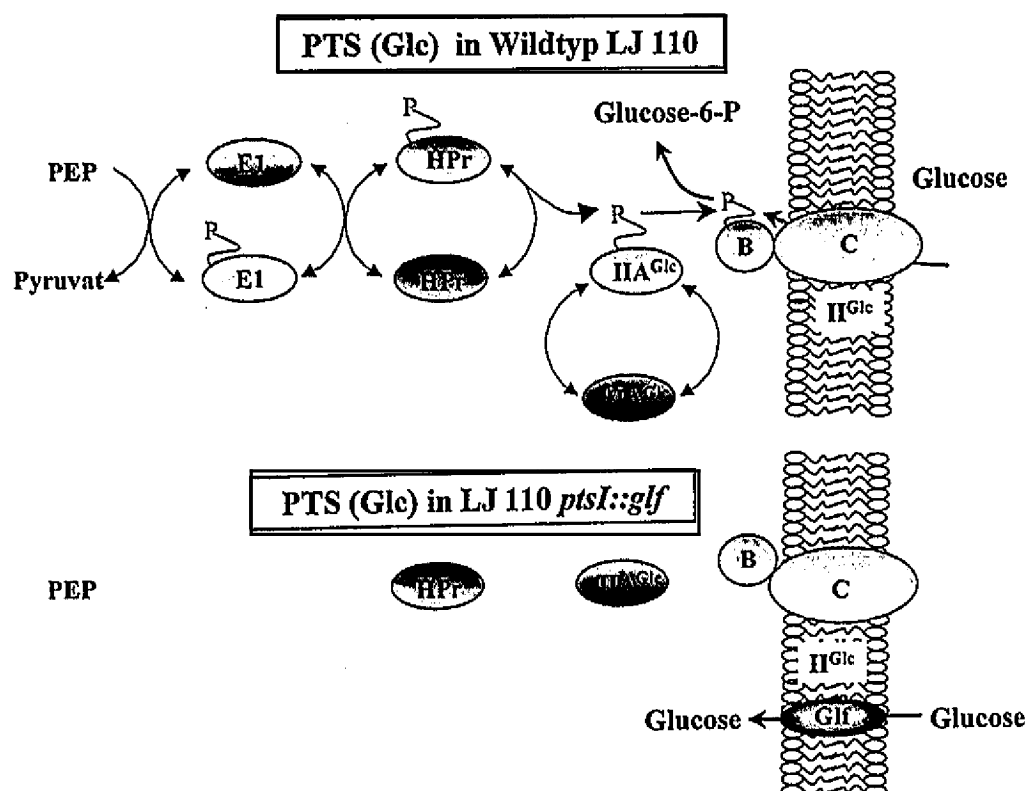


Abbildung 39: Phosphorylierungskaskade in Wildtyp bzw. nach Insertion von *glf* in *ptsI*. EI, HPr und $\text{E}_{\text{IIA}}^{\text{Glc}}$ sind die Genprodukte von *ptsI*, *ptsH* und *crr*.

Nach Unterbrechung des Phosphorylierungskaskade liegen die beteiligten Komponenten Hpr II_A^{Glc} und $\text{II}_{BC}^{\text{Glc}}$ unphosphoryliert vor. Die Komponente EI wird nicht gebildet. Dies hat folgende Auswirkungen:

- ♦ Hpr ist ein Vermittler für die Phosphorylierung anderer PTS-Zucker. Durch dephosphorylierte Hpr-Proteine können andere PTS-Zucker nicht verstoffwechselt werden. Dies wurde in eigenen Untersuchungen dadurch bestätigt, daß Sorbit, ein PTS-Zucker, nicht verwertet wurde.
- ♦ II_A^{Glc} ist ein wichtiges Regulatorprotein des globalen Regulationssystems von *E. coli* (Postma *et al.*, 1996). Unphosphoryliertes II_A^{Glc} führt zu einer dauerhaften Katabolitrepression und „inducer exclusion“. Dies führt dazu, daß eine Vielzahl von cAMP-Crp abhängigen Abbauwegen (für Arabinose, Lactose, Maltose, Galactose, Glycerin u.a.) nicht möglich sind (Katabolitrepression), bzw. daß II_A^{Glc} Lactose-, Melibiose-, oder Maltosepermease bzw. Glycerokinase inhibiert (Postma *et al.*, 1996) und so *E. coli* die entsprechenden Kohlenstoffquellen nicht verwerten kann („inducer exclusion“).

Die regulatorischen Auswirkungen der Unterbrechung der Phosphorylierungskaskade des PTS-Systems wurden in eigenen Experimenten nicht untersucht.

Es zeigte sich, daß konstruierte PTS^- - Stämme nach Insertion von *glf* in *ptsI* und Einbringen der plasmidkodierten Gene *aroF^{br}* und *glf* auf Glucose weiterhin relativ gut wuchsen. Die Wachstumsrate verminderte sich gegenüber PTS^+ - Stämmen ($\mu = 0,57 \text{ h}^{-1}$, Trchounian und Kabayashi, 1999; $\mu \approx 0,5 \text{ h}^{-1}$, s. **Tabelle 5**, s. Seite 39) auf etwa die Hälfte ($\mu = 0,26 \text{ h}^{-1}$).

Nach Expression der Gene *aroF^{br}* und *glf* war das Wachstum stark vermindert. *glf* war auf einem Hochkopienvektor kloniert worden. Somit könnte die starke Expression von *glf* und somit die Induktion von Glf als Membranprotein Ursache für die starke Belastung der Zellen und somit eine Verringerung der Wachstumsrate sein, da oft eine Überexpression eines Membranproteins mit einer Verschlechterung der Wachstums einhergeht (Mattanovich *et al.*, 1998).

Eine andere Ursache könnte sein, daß die erhöhte Bereitstellung von PEP zur Erhöhung des Kohlenstoffflusses in der Glykolyse führte, wodurch der Kohlenstofffluß in einen Nebenweg

der Glykolyse, den Methylglyoxalweg, gelenkt wird (Abbildung 40).

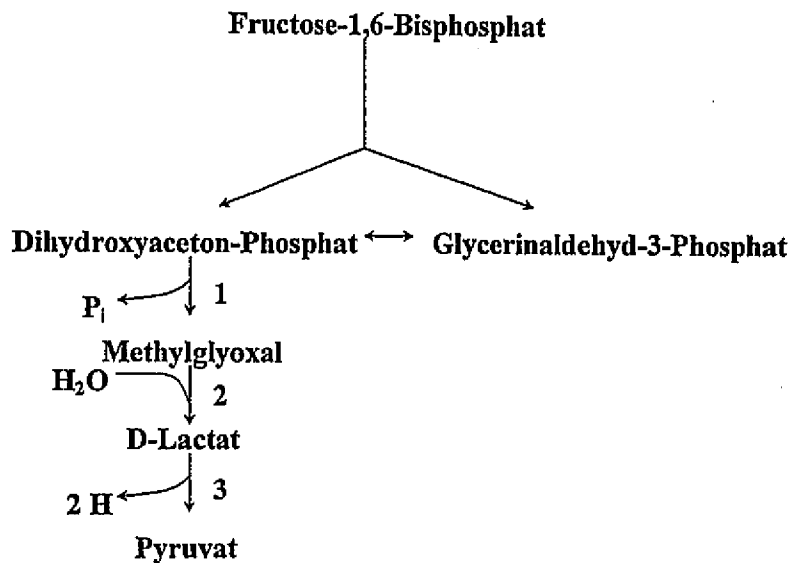


Abbildung 40: Schematische Darstellung des Methylglyoxalweges (nach Gottschalk, 1986). 1: Methylglyoxal Synthase, 2: Glyoxalase I und II, 3: D-Lactat Oxidase

Da Methylglyoxal als Zwischenprodukt dieses Stoffwechselweges gebildet wird (Cooper, 1984) und toxisch für die Bakterienzelle ist, wäre es möglich, daß Methylglyoxal das Zellwachstum inhibiert. Jedoch konnte in eigenen Untersuchungen kein Methylglyoxal (< 0,3 mM) in Überständen nachgewiesen werden. Methylglyoxal inhibiert ab einer Konzentration von 0,4 mM das logarithmische Wachstum einer Bakterienkultur bei einer Wachstumsrate von $\mu = 0,7$ (Ferguson *et al.*, 1998). Da diese Konzentration nahe an der Nachweisgrenze der Bestimmungsmethode für Methylglyoxal liegt, ist es möglich, daß die produzierten Methylglyoxalmengen nicht bestimmbar waren. Eine andere Möglichkeit besteht darin, daß Methylglyoxal wegen der Instabilität zwar gebildet, aber nicht nachgewiesen werden konnte. Ferner wäre denkbar, daß der Kohlenstoff nicht über den Methylglyoxalweg gelenkt wird. Die Möglichkeit der Bildung von Methylglyoxal und die daraus folgende Wachstumsinhibierung bleibt weiterhin offen.

4. Einfluß der gleichzeitigen erhöhten Bereitstellung von Phosphoenolpyruvat und Erythrose-4-Phosphat auf den Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg

Die Erhöhung der Bereitstellung von PEP durch Überexpression der PEP-Synthase hatte ergeben, daß eine höhere PEP-Verfügbarkeit allein für eine maximale Ausbeute nicht

ausreichend war, weil dann Erythrose-4-Phosphat limitierend wirkt (Patnaik *et al.*, 1994). Erst nachdem diese E4P-Limitierung durch Überexpression der Transketolase überwunden worden war, konnte eine fast vollständige Umsetzung von Pyruvat zu PEP erreicht werden. Die theoretisch maximale DAHP-Ausbeute von 6 mol DAHP pro 7 mol eingesetzter Glucose, was 100 % mol C DAH(P) / mol C Glucose entspricht (s. **Abbildung 37**, s. Seite 108), wurde somit erzielt. Jedoch war der relative Fehler der Produktbestimmung mit 30% sehr hoch (Patnaik *et al.*, 1994). Diese hohe Ausbeute konnte nur erreicht werden, weil mit nicht wachsenden Zellen DAH(P) produziert wurde. Der Kohlenstoff aus der Glucose wurde somit nicht für die Biomassenproduktion verwendet, sondern konnte zu einem hohen Anteil in den Aromatenbiosyntheseweg einmünden. Eigene Untersuchungen wurden mit wachsenden Zellen durchgeführt. Diese produzierten Biomasse sowie Nebenprodukte wie Kohlendioxyd und organische Säuren, was dazu führte, daß der Eintrag in Aromatenbiosyntheseweg immer unterhalb des Maximums von 100 % mol C DAH(P) / mol C Glucose liegen mußte. Eigene Ergebnisse sind somit mit denen in der Literatur beschriebenen Ergebnissen wegen der unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen nicht direkt vergleichbar.

Ein PTS⁻ - Stamm, in dem die Genkombination aus *aroF^{br}*, *glf_{Zm}* und *glk_{Zm}* eingebracht und überexprimiert wurde, zeigte höhere spezifische Ausbeuten von DAH(P) gegenüber PTS⁺ - Stämmen: $30,4 \pm 3,2$ % des Kohlenstoffs aus der Glucose wurden in DAH(P) umgesetzt. Eine weitere Erhöhung des Eintrags in den Aromatenbiosyntheseweg wäre nur möglich, wenn die Limitierung durch Erythrose-4-Phosphat überwunden worden wäre (Patnaik *et al.*, 1994). Deshalb wurden zur Erhöhung der Verfügbarkeit von E4P jeweils die Gene *tkt*, *tal* einzeln sowie die Genkombination *tkt* und *tal* eingebracht und überexprimiert.

In eigenen Experimenten führte ausschließlich die Überexpression der Transaldolase zu einer weiteren Erhöhung der spezifischen Ausbeute von DAH(P) von $30,4 \pm 3,2\%$ auf $53,1 \pm 5,8\%$ (mol C DAH(P) / mol C Glucose). Die spezifische DAH(P)-Ausbeute lag somit im Mittelwert über 50%. Sie war also höher als stöchiometrisch in PTS⁺ - Stämmen möglich (s. **Abbildung 35**, s.S. 102). Somit wurde die Erhöhung der Verfügbarkeit von PEP gezeigt. Wegen der Bildung von Biomasse, geringer Mengen organischer Säuren und auch Kohlendioxyd konnte eine vollständige Überführung des Kohlenstoffs in den Aromatenbiosyntheseweg jedoch nicht erfolgen.

Für die Bestimmung der spezifischen Ausbeute wurde die verbrauchte Glucose und die produzierte Menge von DAH(P) über den gesamten Kultivierungszeitraum berücksichtigt.

DAH(P)-Produktion, wie exemplarisch wurde, setzte erst am Ende der exponentiellen Wachstumsphase ein. Deshalb wären die spezifischen Ausbeuten über den Produktionszeitraum höher als über den gesamten Kultivierungszeitraum.

Wenn *tkt* und die Genkombination aus *tkt* und *tal* in dem PTS⁻ - Stamm überexprimiert wurden, erhöhte sich die spezifische Ausbeute von DAH(P) nicht.

Die Analyse der spezifischen Enzymaktivitäten von Rohextrakten ergab, daß die DAHP-Synthase-Aktivität durch das Einbringen und Expression von *tal* um etwa ein Drittel (ca. 1500 mU / mg Protein) erhöht war. Dagegen war nach Einbringen und Expression von *tkt* oder der Genkombination aus *tkt* und *tal* die Aktivitäten der DAHP-Synthasen etwa so hoch wie ohne zusätzliches Einbringen der Kombinationen aus *tkt* und *tal* (etwa 1000 mU / mg Protein).

Die Expression von *tal* führte somit wie bei PTS⁺ - Stämmen mit gleichen Genkombinationen zu einer Erhöhung der spezifischen Aktivitäten der DAHP-Synthase. Wiederum wurde dieser Effekt unterbunden, wenn *tkt* exprimiert worden war.

Da die spezifischen Aktivitäten der DAHP-Synthasen in den Rohextrakten unterschiedlich waren, kann keine Aussage getroffen werden, ob die Limitierungen von E4P überwunden wurden. Analog zu den PTS⁺ - Stämmen könnte die Induktion der Transaldolase zu einer Erhöhung der Verfügbarkeit von E4P führen, wodurch sich die feedback-resistente DAHP-Synthase stabilisiert. Die zusätzliche Induktion der Transketolase könnte das durch die Transaldolaseaktivität produzierte E4P in die Glykolyse lenken, wodurch der stabilisierende Effekt auf die feedback-deregulierte DAHP-Synthasen aufgehoben wird.

Bisher war erkannt worden, daß die Überexpression einer Transketolase und einer feedback-resistenten DAHP-Synthase (AroG^{fbr}) in einer PTS-Mutante, die Glucose über ein PEP unabhängiges Galaktosepermeasesystem (GalP) aufnimmt und über eine Glucokinase (Glk) phosphoryliert, die DAH(P)-Konzentration in Überständen erhöht (Flores *et al.*, 1996; Gosset *et al.*, 1996).

Dieses Ergebnis widersprach eigenen Messungen in denen eine Überexpression der Transketolase keinen Effekt ausübte. Jedoch waren in diesen Arbeiten die spezifischen Enzymaktivitäten der DAHP-Synthasen nicht bestimmt worden, so daß nicht auszuschließen ist, daß höhere DAHP-Synthase Aktivitäten die Ursache erhöhter Konzentrationen von DAH(P) gewesen waren.

In einem isogenen PTS⁺ Stamm, in den die Gene *glf* / *glk* / *aroF*^{fbr} und *tal* eingebracht und

überexprimiert wurden, war der Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg sehr niedrig ($3,8 \pm 0,1\%$ mol DAH(P) in C / mol Glucose in C, s. **Tabelle 27**). Offenbar führte ein intaktes PTS-System mit dieser Genkombination zur drastischen Verringerung der DAH(P)-Produktion.

Die Analyse von Rohextrakten ergab, daß die spezifische Aktivität der DAHP-Synthasen trotz IPTG-Expression von *aroF^{br}* niedrig war, die Transaldolase-Aktivität dagegen war sehr hoch. Dieses Ergebnis ist so nicht verständlich, weil die Expression von *aroF^{br}* zur Erhöhung der Aktivität der DAHP-Synthasen führen sollte. Ein PTS⁺ Hintergrund Stamm in dem die Gene *aroF^{br}* und *tal* überexprimiert waren, bildete dagegen moderate Ausbeuten von DAH(P) ($15 \pm 2,6\%$ mol DAH(P) in C / mol Glucose in C). Aufgrund dessen kann vermutet werden, daß die Überexpression der Gene *glf* und / oder *glk* eine Verringerung der Aktivität der DAHP-Synthase zur Folge hatte. Die Veränderung dieser Aktivitäten wäre durch Inhibierung von AroF^{br} bzw. Repression des entsprechenden Gens denkbar. Eine andere Möglichkeit besteht darin, daß die niedrige Aktivität der DAHP-Synthase mit einer Verringerung der Plasmidkopienzahl verbunden war, also auf die Instabilität der Plasmide begründet sein könnte. Das ermittelte Ergebnis ist so ohne weitere Untersuchungen nicht erklärbar.

5. Einfluß des Kohlenstoffflusses in den Aromatenbiosyntheseweg durch Umlenkung des Kohlenstoffflusses über Glf, Gdh und GntK

Eine neues, vom PTS-System unabhängiges Glucoseaufnahme- und Phosphorylierungssystem sollte in *E. coli* - Zellen etabliert werden: Glucosetransport und Oxidation sollten durch Einbringen und Expression der Gene des Glucosesfacilitators aus *Zymomonas mobilis* und einer cytoplasmatischen Glucosedehydrogenase aus *Bacillus megaterium* zu Gluconat erfolgen. Über eine Phosphorylierung des Gluconats zu 6-Phosphogluconat sollte der Kohlenstofffluß in den Pentose-Phosphat-Stoffwechsel gelenkt werden, um so die Verfügbarkeit von E4P erhöhen.

Da dieser Stoffwechselweg bisher noch nicht beschrieben, und theoretisch „vom Reißbrett“ aus entwickelt wurde, wurde zur Funktionsüberprüfung dieses neuen Stoffwechselweges Kombinationen der Gene *glf*, *gdh* und *gntK* in eine *E. coli* Mutante ohne Glucoseaufnahme- und Phosphorylierungssystem eingebracht und überexprimiert.

Für eine Verwertung von Glucose war bei dieser Mutante die Aufnahme und Phosphorylierung von Glucose nötig. Das Einbringen und die Überexpression der

Genkombinationen aus *glf*, *gdh* und *gntK* bzw. *glf* und *gdh* führten zum Wachstum dieses Stammes auf Glucose als alleinige Kohlenstoffquelle.

Somit konnte die physiologische Funktion dieses neue Glucoseaufnahme- und Phosphorylierungssystems bestätigt werden. Das Glucosetransportprotein Glf vermittelt den Glucosetransport ins Cytoplasma. Freie im Cytoplasma befindliche Glucose kann jedoch wegen einer inaktiven Glucokinase im ZSC 112 Stamm nicht phosphoryliert werden. Durch Oxidation von Glucose aufgrund einer funktionell aktiven Glucosedehydrogenase (Gdh) entsteht Gluconolacton, das von *E. coli* enzymatisch über eine Lactonase oder spontan zu Gluconsäure reagiert (Hucho und Wallenfels, 1972). Gluconsäure wird über eine Gluconatkinase (GntK) zu 6-Phosphogluconat phosphoryliert. 6-Phosphogluconat kann prinzipiell auf zwei Wegen weiter umgesetzt werden (s. **Abbildung 41**).

- Oxidative Decarboxylierung zu Ribulose-5-Phosphat und weitere Umsetzung in den Pentose-Phosphatstoffwechselweg
- Verstoffwechslung im Entner-Doudoroff-Weg über 2-Keto-3-Desoxy-6-Phosphogluconat zu Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat.

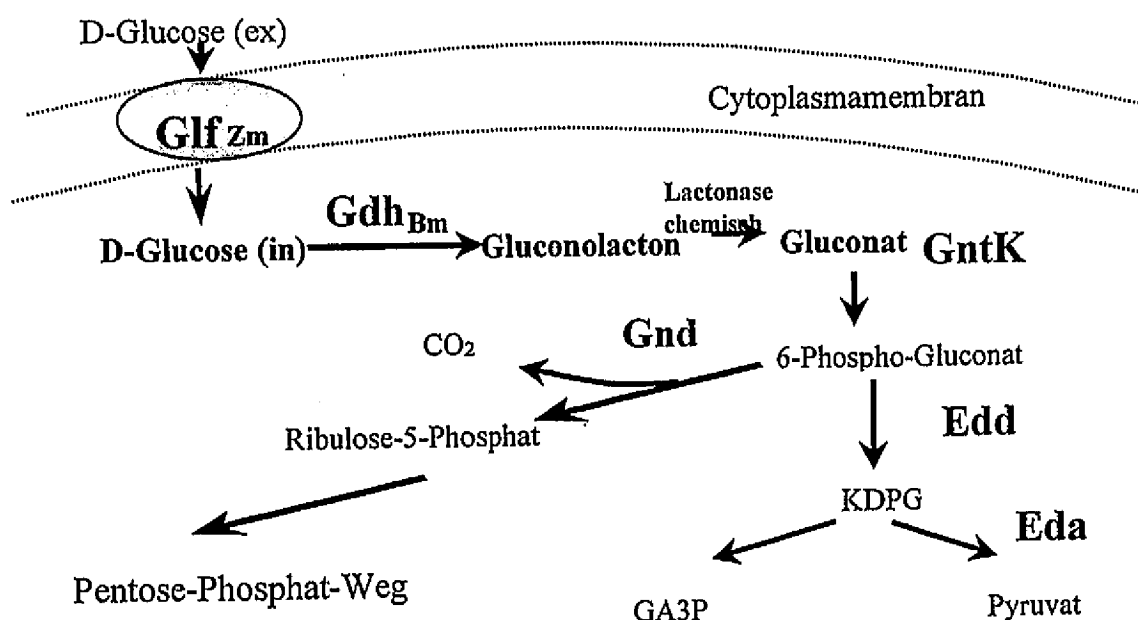


Abbildung 41: Möglichkeiten der Verwertung von 6-Phosphogluconat über den oxidativen Pentose-Phosphat-Weg und den Entner-Doudoroff-Weg. Glf_{Zm}: Glucosetransportprotein (*Zymomonas mobilis*); Gdh_{Bm}: Glucosedehydrogenase (*Bacillus megaterium*); GntK: Gluconatkinase; Gnd: 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase; Edd: KDPG-Dehydratase; Eda: KDPG-Aldolase.

Von *E. coli* ist bekannt, daß Glucose über eine membrangebundene PQQ-

(Pyrrolochinidinchinon) abhängige Glucosedehydrogenase (Gdc) zu Gluconat oxidiert (Bouvet und Grimont, 1988) werden kann. Das gebildete Gluconat wird aufgenommen und durch Phosphorylierung des Gluconats über eine Gluconatkinase wird Gluconat über 6-Phosphogluconat in den Entner-Doudoroff-Weg gelenkt (Fliege *et al.* 1992). Da PQQ von *E. coli* K12 nicht gebildet werden kann (Matsushita *et al.*, 1997), ist dieser Stoffwechselweg in Wildtypzellen von *E. coli* K-12 nicht aktiv (Adamowicz *et al.*, 1991).

Nach Zugabe von PQQ ins Medium war die Bildung von Gluconat und damit die physiologische Funktion dieses alternativen Glucoseaufnahmesystems gezeigt worden (Babu-Khan *et al.*, 1995).

Auch das Einbringen und Überexprimieren der Gene *glf* und *gdh* in den *E. coli* Stamm ohne Glucoseaufnahme- und Phosphorylierungssystem führte zum Wachstum auf Glucose als Kohlenstoffquelle, jedoch war dieses Wachstum langsam (25h Verdopplungszeit). Glucoseaufnahme und Oxidation zu Gluconat könnten über *Glf* und *Gdh* erfolgen. Das Wachstum auf Glucose kann nur durch die weitere Verwertung des Gluconats erklärt werden. Dazu muß mindestens eine der beiden chromosomal kodierten Gluconatkinasen, *idnK* (Bausch *et al.*, 1998) bzw. *gntK* (Tong *et al.*, 1996), von *E. coli* aktiv sein. In Rohextrakten der Mutante konnte eine niedrige Gluconatkinaseaktivität (5 mU / mg Protein) bestimmt werden, so daß über eine Phosphorylierung zu 6-Phosphogluconat eine weitere Verstoffwechslung möglich ist.

Es wurde gezeigt, daß das Glucoseaufnahmesystem über *Glf* / *Gdh* und *GntK* physiologisch aktiv war. Die Gene *aroF^{br}*, *glf*, *gdh* und *gntK* wurden in die *aroB* – Mutante LJ110 mit inaktivem PTS – System eingebracht. Dieser Stamm wurde unter Fed-Batch Bedingungen kultiviert.

Die Expression der Gene *aroF^{br}*, *glf* und *gdh* führten zu einer massiven Produktion von Gluconat. Offenbar wurde Glucose über das Glucosetransportprotein in die Zelle aufgenommen und zu Gluconat oxidiert. Gluconat wurde in großen Mengen ins Medium exkretiert.

Eine massive Exkretion von Gluconat war bereits von Hommes *et al.* (1991) beschrieben worden. In diesen Untersuchungen war eine Gluconat-Exkretion über eine kontinuierliche Zugabe von PQQ in einer Fed-Batch Kultivierung erreicht worden. Dadurch war das Apoenzym der nicht aktiven periplasmatische Glucosedehydrogenase zum aktiven Holoenzym rekonstituiert worden.

Offensichtlich ist die Gluconatkinaseaktivität mit der Kombination aus *glf* und *gdh* in diesem

Stamm limitierend, so daß Gluconat nicht oder nicht schnell genug zu 6-Phosphogluconat phosphoryliert wurde. Der Eintrag in den Aromatenbiosyntheseweg war gering, weil fast 50 % der eingesetzten Glucose zu Gluconat oxidiert wurde.

Wurde dagegen die Gluconatkinase *gntK* zusätzlich zur Genkombination *aroF^{br}*, *glf* und *gdh* exprimiert, so führte die Expression dieser Genkombination zu keiner Anhäufung von Gluconat. Das zusätzliche Einbringen und Expression von *gntK* führte somit offenbar zur weiteren Umsetzung des Gluconats zu 6-Phosphogluconat. 6-Phosphogluconat kann weiter über den Pentosephosphatstoffwechsel verstoffwechselt werden und somit die Verfügbarkeit von E4P und PEP erhöhen bzw. könnte über den Entner-Doudoroff-Weg abgebaut werden.

Der Eintrag in den Aromatenbiosyntheseweg war sehr niedrig. Möglicherweise gelangte 6-Phosphogluconat statt in den Pentose-Phosphat-Stoffwechselweg in den ED-Weg (s. **Abbildung 41**). Die Einmündung von 6-Phosphogluconat in den ED-Weg führt jedoch zu einem Verlust an PEP, da unmittelbar Pyruvat entsteht.

Während die Glykolyse mit dem Pentose-Phosphat-Stoffwechselweg über die Moleküle F6P und GA3P in Verbindung steht, wodurch PEP produziert werden kann, entsteht aus der Spaltung von KDPG ein Molekül GA3P und ein Molekül Pyruvat. Somit steht weniger PEP für die Synthese von DAHP und letztendlich für aromatische Aminosäuren zur Verfügung. Außerdem könnte durch die verringerte Verfügbarkeit von PEP durch Induktion des ED-Weges die stabilisierende Wirkung des PEP auf die induzierte DAHP-Synthase (*AroF^{br}*) entfallen: In eigenen Untersuchungen führte die Induktion von Gdh sowie Gdh und GntK fast zu einer Halbierung der Aktivitäten der DAHP-Synthasen.

Ein weiterer Nachteil für den Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg besteht in der Bildung von KDPG, ein Zwischenprodukt des ED-Weges. In *in vitro* Studien war gezeigt worden, daß KDPG ein effektiver Inhibitor der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase ist (Faik *et al.* 1971). Deshalb wäre es möglich, daß der Kohlenstofffluß in den Pentose-Phosphat-Weg durch Inhibierung der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase verringert war. So könnte die Verfügbarkeit von E4P nicht gesteigert werden, sondern durch Verringerung des Kohlenstoffflusses in den oxidativen Teil des Pentose-Phosphat-Stoffwechselweges eher vermindert werden.

Von Wildtypzellen von *E. coli* ist bekannt, daß Glucose nach PQQ-Zugabe über eine membrangebundene PQQ-abhängige Glucosedehydrogenase (Gdc) extrazellulär zu Gluconat oxidiert (Bouvet und Grimont, 1988) wird, Gluconat in die Zelle transportiert wird und weiter durch Phosphorylierung mittels einer Gluconatkinase zu 6-Phosphogluconat in den Entner-

Doudoroff-Weg einmündet (Fliege *et al.* 1992). Dieser Stoffwechselweg ist sehr ähnlich zu dem neu etablierten Stoffwechselweg über Glf, Gdh und GntK. Gluconat entsteht jedoch über Glf, Gdh und GntK intrazellulär, wogegen Gluconat über Gdc extrazellulär entsteht.

Die Gene des ED-Weges *edd* und *eda* werden über das GntR Regulon kontrolliert (Peekhaus und Conway, 1998). Dabei ist Gluconat der Induktor (Tong *et al.*, 1996). Da Gluconat bei der Verstoffwechslung über Glf, Gdh und GntK gebildet werden muß, könnte durch intrazelluläres Gluconat der ED-Weg induziert werden.

Es bleibt zu überprüfen, ob durch Induktion des Stoffwechselweges über Glf, Gdh und GntK auch der ED-Weg induziert wird. Dies ließe sich durch Bestimmung der Aktivitäten der KDPG-Dehydratase und der KDPG-Aldolase feststellen, wenn die Zellen auf Glucose als Kohlenstoffquelle angezogen und die Gene *glf*, *gdh* und *gntK* exprimiert werden.

Wird festgestellt, daß der ED-Weg induziert ist, kann er z.B. durch Deletion des Gens der KDPG-Dehydratase (*edd*) unterbrochen werden. Damit käme es nicht mehr zum PEP-Verlust über den ED-Weg. Der Kohlenstofffluß könnte dann über den Pentose-Phosphat-Weg verstoffwechselt werden.

6. Bedeutung der Eingangsreaktion für den Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg

In der Eingangsreaktion des Aromatenbiosyntheseweges werden die Metabolite des Zentralstoffwechselweges, Erythrose-4-Phosphat (E4P) und Phosphoenolpyruvat (PEP), zu 3-Desoxy-D-Arabino-Heptulosonat-7-Phosphat (DAHP), dem ersten Metaboliten des Shikimatstoffwechselweges, kondensiert. Diese Reaktion wird von drei Isoenzymen, AroG, AroF und AroH, katalysiert, wobei die Aktivität von AroG mit etwa 80% den höchsten Anteil an der Gesamtaktivität der DAHP-Synthasen ausmacht (Pittard *et al.*, 1996). Die jeweiligen Genprodukte der Eingangsreaktion werden von den Endprodukten des Aromatenbiosyntheseweges, L-Phenylalanin, L-Tyrosin und L-Tryptophan, inhibiert. Dies ist eine typische Form der feedback-Inhibition.

In eigenen Untersuchungen, in denen Wildtypzellen, deren Aromatenbiosyntheseweg nach der Eingangsreaktion unterbrochen wurde, konnten schwache Aktivitäten der DAHP-Synthasen (< 20 mU / mg Protein) bestimmt werden. Diese niedrige spezifische Aktivität könnte auf die Supplementierung mit aromatischen Aminosäuren zurückzuführen sein. Da die aromatischen Aminosäuren die DAHP-Synthasen der Eingangsreaktion inhibieren, wurde

auch nur ein geringer Teil ($2,9 \pm 0,8\%$) des Kohlenstoffs aus dem Zentralstoffwechselweg in den Aromatenbiosyntheseweg gelenkt. Liao *et al.*, 1996 hatte mit dem *aroB*-Stamm AB2847 festgestellt, daß dieser etwa 10% des Kohlenstoffs in den Aromatenbiosyntheseweg gelenkt hatte, ohne daß eine feedback-deregulierte DAHP-Synthase eingebracht und induziert worden war.

Das Einbringen und Expression des Genes der feedback-deregulierten DAHP - Synthase (*aroF^{br}*) führte zur Erhöhung der spezifischen Enzymaktivität der DAHP-Synthasen (ca. 500 mU / mg Protein), gegenüber < 20 mU / mg Protein (s.o). Die Erhöhung der Aktivitäten der DAHP-Synthase führte zur Erhöhung der spezifischen Ausbeute von DAH(P) und somit zur Erhöhung des Kohlenstoffflusses in den Aromatenbiosyntheseweg. Die Aktivität der DAHP-Synthase ist in *E. coli* somit für die Produktion von DAHP und auch für den Kohlenstofffluß in den Shikimatstoffwechselweg limitierend. Dieses Ergebnis entspricht den Ergebnissen aus Arbeiten, in denen jedoch *aroG^{br}* verwendet worden war (Draths *et al.* 1992, Patnaik *et al.*, 1995). Die Erhöhung der DAHP-Synthase Aktivität hatte jedoch nicht beliebig zur Steigerung des Kohlenstoffflusses in den Aromatenbiosyntheseweg geführt (Draths *et al.*, 1992). Die Steigerung der spezifischen Aktivität von *AroG^{br}* über 60 mU / mg Protein hatte zu keiner weiteren Erhöhung der DAH(P)-Konzentration geführt (Patnaik *et al.*, 1995). In einer anderen Arbeit (Draths *et al.*, 1992) betrug dieser Wert ca. 300 mU / mg Protein. Eigene Untersuchungen, die mit der gleichen DAH(P)-Bestimmungsmethode durchgeführt wurden (Gollub, 1971), ergaben, daß eine Expression von *aroF^{br}* zu spezifischen Enzymaktivitäten um 500 mU / mg Protein führte. Die spezifischen Enzymaktivitäten der DAHP-Synthasen wurde durch Einbringen und Expression von weiteren Genen erhöht. Dies wurde in bisherigen Arbeiten mit Ausnahme von Draths *et al.*, 1992, in der sich die spezifischen Aktivitäten der DAHP-Synthasen nach Überexpression der Transketolase fast verdoppelt hatte, bisher noch nicht beschrieben.

Folgende Maßnahmen führten zur Erhöhung der spezifischen Enzymaktivität der DAHP-Synthasen neben der Expression von *aroF^{br}* (s. **Tabelle 36**):

1. Einbringen und Expression in Kombination mit *tal*
2. Ausschalten des PTS-Systems sowie Einbringen und Expression der Gene des heterologen Glucosaaufnahme- und Phosphorylierungssystems aus *glf* und *glk*
3. Ausschalten des PTS-Systems sowie Einbringen und Expression der Gene des heterologen Glucoseaufnahme- und Phosphorylierungssystems aus *glf* und *glk* in Kombination mit *tal*

Die Erhöhung der spezifischen Aktivität der DAHP-Synthasen korrelierte in diesen Fällen mit einer Erhöhung der spezifischen Produktion bzw. der spezifischen Ausbeute von DAH(P) (**Tabelle 36**).

Tabelle 36. Vergleichende Übersicht der Aktivitäten der DAHP-Synthasen, der spezifischen Produktion bzw. spezifischen Ausbeute in Abhängigkeit der eingebrachten Genkombination in LJ110 *aroB⁻* - Derivaten nach Induktion.

Eingebrachte(s) und exprimierte(s) Gen(e)	Aktivität der DAHP-Synthasen [mU / mg Protein]	spezifische Produktion [mmol DAH(P) / g dw]	spezifische Ausbeute in [%] ³⁶
-.-	< 20	1,9 ± 0,3	2,9 ± 0,8
<i>aroF^{br}</i>	480 ± 50	5,3 ± 0,3	6,9 ± 1,2
<i>aroF^{br} tal</i>	1100 ± 11	10,5 ± 1,5	15,0 ± 2,6
<i>ptsI::glf / aroF^{br} glf / glk</i>	810 ± 100	10,1 ± 1,3	30,4 ± 3,2
<i>ptsI::glf / aroF^{br} glf / glk tal</i>	1487 ± 34	28,1 ± 4,3	53,1 ± 5,8

Um zu untersuchen, ob auch im Fall der *aroF^{br}*-Expression die Aktivität der Eingangsreaktion für die Produktion von DAH(P) limitierend ist, wurde ein *aroB*-Stamm konstruiert in dem das Gen einer feedback-deregulierten DAHP-Synthase (*aroF^{br}*) auf zwei verschiedenen Plasmiden eingebracht wurde. Nach Kultivierung dieses Stammes unter Fed-Batch Bedingungen erhöhte sich die spezifischen Aktivitäten der DAHP-Synthasen um das Dreifache. Die spezifische Produktion und die spezifische Ausbeute von DAH(P) konnten verdoppelt werden (s. **Tabelle 37**).

³⁶ gebildetes DAH(P) [mol C] / verbrauchte Glucosemenge [mol C] in [%]

Tabelle 37. Vergleichende Übersicht der Aktivitäten der DAHP-Synthasen, der spezifischen Produktion und spezifischen Ausbeute von DAH(P) in Abhängigkeit von der Anzahl der eingebrachten Kopien von *aroF^{br}* in LJ110 *aroB⁻* nach Induktion.

Eingebrachte(s) und exprimierte(s) Gen(e)	Aktivität der DAHP-Synthasen [mU / mg Protein]	spezifische Produktion [mmol DAH(P) / g dw]	spezifische Ausbeute in [%] ³⁶
<i>aroF^{br}</i>	480 ± 50	5,3 ± 0,3	6,9 ± 1,2
<i>aroF^{br} / aroF^{br}</i>	1310 ± 260	10,8 ± 1,8	16,1 ± 2,6

Offenbar war die Aktivität der Eingangsreaktion zumindest für die Genkombination im PTS⁺ - Hintergrund für den Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg limitierend.

Das war überraschend, denn bisher war nur bekannt, daß das Einbringen und die Expression von zwei Kopien einer feedback-deregulierten DAHP-Synthase (*aroG^{br}*) auf jeweils unterschiedlichen Plasmiden die spezifische Enzymaktivität der DAHP-Synthase zwar um das 6-fache steigern konnte, jedoch die Konzentrationen von DAH(P) in Überständen nicht erhöht hatte (Draths *et al.*, 1992).

Die Diskrepanz dieser Ergebnisse könnte auf die verwendeten Plasmide zurückzuführen sein. In der Arbeit von Draths *et al.*, 1992 und in eigenen Untersuchungen waren die Gene hinter einem *tac* Promotor kloniert worden. Jedoch war auf dem Plasmid ein anderes Gen (*aroG^{br}*) einer feedback-deregulierten DAHP-Synthase kloniert worden als in eigenen Experimenten (*aroF^{br}*). So wäre es möglich, daß diese unterschiedlichen Ergebnisse auf unterschiedliche Charakteristika der Gene der DAHP-Synthasen zurückzuführen waren.

Obwohl in eigenen Untersuchungen die Eingangsreaktion in den Aromatenbiosyntheseweg offensichtlich noch limitierend war, wurde gezeigt, daß der Zentralstoffwechsel ein wichtiger Angriffspunkt für eine Verbesserung des Kohlenstoffflusses in den Shikimatstoffwechselweg ist. Um den Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg weiter zu steigern, wäre es sinnvoll, die Aktivität der Eingangsreaktion weiter zu erhöhen. Diese Aktivitätserhöhung könnte man durch Einbringen und Expression einer oder mehrerer zusätzlicher Kopien von *aroF^{br}* erreichen.

V. Zusammenfassung

Die Primärmetabolite des Zentralstoffwechselweges Erythrose-4-Phosphat und Phosphoenolpyruvat sind für den Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg von *Escherichia coli* limitierend, wenn Glucose als Kohlenstoffquelle verwertet wird.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Auswirkungen der Erhöhung der Bereitstellung von Erythrose-4-Phosphat und Phosphoenolpyruvat auf den Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg zu untersuchen.

1. Zur Bestimmung des Kohlenstoffflusses wurde der Aromatenbiosyntheseweg eines Wildtypstammes von *Escherichia coli* nach der Eingangsreaktion (*aroB*) unterbrochen und der Kohlenstofffluß über die 3-Desoxy-D-arabino-heptulosonat-7-(phosphat) (DAH(P)) - Exkretion nach Fed-Batch Kultivierung quantifiziert. $2,9 \pm 0,8$ % des Kohlenstoffs wurden in den Aromatenbiosyntheseweg gelenkt. Nach Einbringen und Expression eines Gens einer feedback-deregulierten DAHP-Synthase erhöhte sich der Anteil des Kohlenstoffs in den Aromatenbiosyntheseweg auf $6,9 \pm 1,2$ %.
2. Zur Erhöhung der Verfügbarkeit von Erythrose-4-Phosphat wurden die Gene der Transaldolase, der Transketolase sowie das Operon aus Transketolase und der Transaldolase in Kombination mit einer feedback-deregulierten DAHP-Synthase überexprimiert: Die Überexpression der Transaldolase führte zu einer Erhöhung des Kohlenstoffflusses in den Aromatenbiosyntheseweg. Dabei wurden $15,0 \pm 2,6$ % des Kohlenstoffs in den Aromatenbiosyntheseweg gelenkt. Nach Induktion der Transaldolase waren erhöhte spezifische Aktivitäten von DAHP-Synthasen meßbar. Dagegen war weder nach Überexpression der Transketolase noch nach Überexpression der Kombination aus Transketolase und Transaldolase der Kohlenstofffluß verstärkt. Die DAHP-Synthase Aktivität war dann nicht erhöht.
3. Zur Erhöhung der Verfügbarkeit von Phosphoenolpyruvat wurde das Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferasesystem von *E. coli* durch Insertion des Gens des Glucosefacilitators aus *Zymomonas mobilis* (*glf*) in *ptsI* ausgeschaltet. Nach Expression einer feedback-deregulierten DAHP-Synthase, des Glucosefacilitators und

der Glucokinase wurden $30,4 \pm 3,2$ % des Kohlenstoffs in den Aromatenbiosyntheseweg gelenkt.

4. Zur Erhöhung der Verfügbarkeit von Phosphoenolpyruvat und Erythrose-4-Phosphat wurden die Gene der Transketolase, Transaldolase sowie das Operon aus Transketolase und Transaldolase mit dem Stamm aus 3. kombiniert. Die Überexpression der Transaldolase führte zu einer weiteren Steigerung des Kohlenstoffflusses: $53,1 \pm 5,8$ % des Kohlenstoffs wurden in den Aromatenbiosyntheseweg gelenkt. Nach Induktion der Transaldolase waren wiederum erhöhte spezifische Aktivitäten von DAHP-Synthasen meßbar. Überexpression der Transketolase sowie der Kombination der Transketolase und der Transaldolase führten weder zu einer weiteren signifikanten Erhöhung des Kohlenstoffflusses in den Aromatenbiosyntheseweg noch zur Erhöhung der spezifischen Aktivitäten von DAHP-Synthasen.
5. Um die Bereitstellung von Erythrose-4-Phosphat und Phosphoenolpyruvat durch Umlenkung des Kohlenstofffluß in den Pentose-Phosphat-Weg zu erhöhen, wurde ein neuartiges Glucoseaufnahme- und Phosphorylierungssystem in *E. coli* - Zellen etabliert: Nach Einbringen der Gene des Glucosefacilitators aus *Zymomonas mobilis*, einer Glucosedehydrogenase aus *Bacillus megaterium* und einer homologen Gluconatkinase erfolgte in einer *Escherichia coli* Mutante ohne Glucoseaufnahme- und Phosphorylierungssystem Wachstum auf Glucose.
6. Die Expression der Gene des Glucosefacilitators, der Glucosedehydrogenase, der Gluconatkinase sowie einer feedback-deregulierten DAHP-Synthase in einem *E. coli*-Stamm dessen Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferasesystem durch Insertion von *glf* in *ptsI* ausgeschaltet wurde, führte zu einem geringen Kohlenstofffluß in den Aromatenbiosyntheseweg. $4,0 \pm 0,9$ % des Kohlenstoffs wurden in den Aromatenbiosyntheseweg gelenkt.

VI. Literaturverzeichnis

- Adamowicz M., Conway T. & Nickerson K.W. 1991. Nutritional complementation of oxidative glucose metabolism in *Escherichia coli* via pyrroloquinoline quinone-dependent glucose dehydrogenase and the Entner-Doudoroff pathway. *Appl Environ Microbiol.* 57:2012-5.
- Babu-Khan S., Yeo T.C., Martin W.L., Duron M.R., Rogers R.D. & Goldstein A.H. 1995. Cloning of a mineral phosphate-solubilizing gene from *Pseudomonas cepacia*. *Appl Environ Microbiol.* 61:972-8.
- Bachmann B.J. 1972. Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12. *Bacteriol Rev.* 36:525-57.
- Backman K., O'Connor M.J., Maruya A., Rudd E., McKay D., Balakrishnan R., Radjai M., Di-Pasquantonio V., Shoda D. & Hatch R. 1990. Genetic engineering of metabolic pathways applied to the production of phenylalanine. *Ann NY. Acad. Sci.* 589:16-24.
- Barnell W.O., Yi K.C., & Conway T. 1990. Sequence and genetic organization of a *Zymomonas mobilis* gene cluster that encodes several enzymes of glucose metabolism. *J Bacteriol.* 172:7227-40.
- Bailey J. E. 1991. Toward a science of metabolic engineering. *Science.* 252:1668-75.
- Bausch C., Peekhaus N., Utz C., Blais T., Murray E., Lowary T. & Conway T. 1998. Sequence analysis of the GntII (subsidiary) system for gluconate metabolism reveals a novel pathway for L-idonic acid catabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 180:3704-10.
- Bergmeyer H.U., Bergmeyer J. & Graßl M. 1981. Methods of enzymatic analysis. VCH. Verlagsgesellschaft Weinheim.
- Berry A., 1996. Improving production of aromatic compounds in *Escherichia coli* cells by metabolic engineering. *Tibtech.* 14:250-256.
- Bouvet O.M. & Grimont P.A. 1988. Extracellular oxidation of D-glucose by some members of the Enterobacteriaceae. *Ann. Inst. Pasteur. Microbiol.* 139:59-77.
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Chang A.C.Y and Cohen, S.N. 1978. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the p15A cryptic miniplasmid, *J. Bacteriol.* 134:1141-1156.
- Chao Y.P. & Liao J.C. 1993. Alteration of growth yield by overexpression of phosphoenolpyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 59:4261-5.
- Chen R., Hatzimanikatis V., Yap W.M., Postma P.W. & Bailey J.E. 1997a. Metabolic consequences of phosphotransferase (PTS) mutation in a phenylalanine-producing recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog.* 13:768-75.
- Chen R., Yap W.M.G.J, Postma P.W. & Bailey J.E. 1997b. Comparative studies of *Escherichia coli* strains using different glucose uptake systems: Metabolism and energetics. *Biotechnol.-Biong.* 56:583-590.
- Cooper R.A. 1984. Metabolism of methylglyoxal in microorganisms. *Annu Rev Microbiol.* 38:49-68.
- Cordaro J.C., Melton T., Stratis J.P., Atagun M., Gladding C., Hartman P.E. & Roseman S. 1976. Fosfomycin resistance: selection method for internal and extended deletions of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase genes of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 128:785-93.
- Cronan J.E. & LaPorte D. 1996. Tricarboxylic acid cycle and glyoxylate bypass. In: Neidhardt F.C. [et al.]. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. Vol. 1, ASM Press, Washington.
- Curtis S.J. & Epstein W. 1975. Phosphorylation of D-glucose in *Escherichia coli* mutants defective in glucosephosphotransferase, mannosephosphotransferase, and glucokinase. *J. Bacteriol.* 122:1189-99.

- Dell K.A. & Frost J.W. 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. A. Chem. Soc.* 115:11581-11589.
- della-Cioppa G., Garger S.J., Sverlow G.G., Turpen T.H. & Grill L.K. 1990. Melanin production in *Escherichia coli* from a cloned tyrosinase gene. *Biotechnology (N Y)*. 8:634-8.
- Doelle, H.W. 1982. Kinetic characteristics and regulatory mechanisms of glucokinase and fructokinase from *Zymomonas mobilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 49:241-246.
- Draths K.M. & Frost J.W. 1990. Synthesis using plasmid-based biocatalysis: Plasmid assembly and 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate production. *J. Am. Chem. Soc.* 112:1657-1659.
- Draths K.M., Ward T.L. & Frost J.W. 1992. Biocatalysis and nineteenth century organic chemistry: conversion of D-glucose into quinoid organics *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, 114:9725-9726.
- Draths K.M., Knop D.R. & Frost J.W. 1999. Shikimic acid and quinic acid: Replacing isolation from plant sources with recombinant microbial biocatalysis. *J. Am. Chem. Soc.*, 121:1603-1604.
- Draths K.M., Pompliano D.L., Conley D.L., Frost J.W., Berry A., Disbrow G.L., Staversky R.J. & Lievense J.C. 1992. Biocatalytic Synthesis of Aromatics from D-Glucose: The Role of Transketolase. *J. Am. Chem. Soc.* 114:3956-3962.
- Emmerling M., Bailey J.E. & Sauer U. 1999. Glucose catabolism of *Escherichia coli* strains with increased activity and altered regulation of key glycolytic enzymes. *Metabolic engineering*. 1:117-127.
- Ensley B.D., Ratzkin B.J., Osslund T.D., Simon M.J., Wackett L.P. & Gibson D.T.. 1983. Expression of naphthalene oxidation genes in *Escherichia coli* results in the biosynthesis of indigo. *Science*. 222:167-9.
- Faik P., Korneberg H.L. & McEvoy E. 1971. Isolation and properties of *Escherichia coli* mutants defective in 2-keto-3-desoxy-6-phosphogluconate aldolase activity. *FEBS letters*. 19:225-228.
- Ferguson G.P., Töttemeyer S., MacLean M.J. & Brooth I.R. 1998. Methylglyoxal production in bacteria: suicide or survival? *Arch. Microbiol.* 170:209 - 219.
- Farmer W. R. & Liao J. C. 1997. Reduction of aerobic acetate production by *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 63:3205-10
- Fliege R., Tong S., Shibata A., Nickerson K.W. & Conway T. 1992. The Entner-Doudoroff pathway in *Escherichia coli* is induced for oxidative glucose metabolism via pyrroloquinoline quinone-dependent glucose dehydrogenase. *Appl Environ Microbiol.* 58:3826-9.
- Flores N., Xiao J., Berry A., Bolivar F. & Valle F. 1996. Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnol.* 14:620-3.
- Fraenkel D.G. 1996. Glycolysis, pentose phosphate pathway, and Entner-Doudoroff pathway. In Neidhardt F.C. (Hrsg.) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. Vol 1, ASM Press, Washington, D.C.
- Frost J.W. & Knowles J.R. 1984. 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonic acid 7-phosphate: chemical synthesis and isolation from *Escherichia coli* auxotrophs. *Biochemistry*. 23:4465-9.
- Frost, J. W. & Draths, K.M. 1995. Biocatalytic syntheses of aromatics from D-glucose: renewable microbial sources of aromatic compounds. *Annu Rev Microbiol.* 49:557-79.
- Fürste J.P., Pansegrau W., Frank R., Blöcker H., Scholz P., Bagdasarian M. & E. Lanka. 1986. Molecular cloning of the plasmid RP4 primase region in a multi-host-range *tacP* expression vector. *Gene*. 48:119-131.
- Gerhardt P., Murray E.J., Wood T., & Krieg N.R. 1994. Methods for General and Molecular Bacteriology. American Society for Microbiology. Washington DC.

- Gollub E. 1971. Assay for 3-desoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase. Methods in Enzymology. XVII. Academic press. N.Y.
- Gosset G., Yong-Xiao J. & Berry A. 1996. A direct comparison of approaches for increasing carbon flow to aromatic biosynthesis in *Escherichia coli*. J. Ind. Microbiol. 17:47-52.
- Gottschalk G. 1986. Bacterial metabolism. 2nd edition. Springer series in microbiology.
- Grinter N. 1998. Developing an L-phenylalanine process. Chemtech. 33-37.
- Hanahan D. 1985. Techniques for transformation of *Escherichia coli*. DNA Cloning Volume 1, ed. D.M. Glover, IRL Press Oxford, Washington DC.
- Herrmann K.M. 1983. The common aromatic biosynthetic pathway. In: Hermann K.M. and Sommerville R.L. Amino Acids: Biosynthesis and genetic regulation. Reading, MA. Addison-Wesley.
- Hoek J.B. & Rydström J. 1988. Physiological role of nicotinamide nucleotide transhydrogenase. Biochem. J. 254:1-10.
- Holmes W.H. 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 Current Topics in cellular regulation, vol. 28.
- Hommes R.W., Simons J.A., Snoep J.L., Postma P.W., Tempest D.W., & Neijssel O.M. 1991. Quantitative aspects of glucose metabolism by *Escherichia coli* B/r, grown in the presence of pyrroloquinoline quinone. Antonie Van Leeuwenhoek. 60:373-82.
- Hucho F. & Wallenfels K. 1972. Glucono-lactonase from *Escherichia coli*. Biochim Biophys Acta. 13:176-9.
- Ikeda M. & Katsumata R. 1999. Hyperproduction of tryptophan by *Corynebacterium glutamicum* with the modified pentose phosphate pathway. Appl. Environ. Microbiol. 65:2497-2502.
- Ikeda M., Okamoto K. & Katsumata R. 1999. Cloning of the transketolase gene and the effect of its dosage on aromatic amino acid production in *Corynebacterium glutamicum*. Appl Microbiol Biotechnol. 51:201-206.
- Izu H., Adachi O. & Yamada M. 1996. Purification and characterization of the *Escherichia coli* thermoresistant glucokinase encoded by the *gntK* gene. FEBS Lett. 394:6-14.
- Keasling J.D. 1999. Gene expression tools for the metabolic engineering of bacteria. Tibtech. 17: 452-459.
- Kikuchi Y., Tsujimoto K. & Kurahashi O. 1997. Mutational analysis of the feedback sites of phenylalanine-sensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase of *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol 63:761-2.
- Konstantinov K.B., Nishio N., Seki T. & Yoshida T. 1991. Physiologically motivated strategies for control of the fed-batch cultivation of recombinant *Escherichia coli* for phenylalanine production. J. Ferment. Bioeng. 71: 350-355.
- Leuchtenberger W. 1996. Amino Acids – Technical Production and Use. In: Rehm H. J., Reed G., Pühler A. & Stadler, Biotechnology. 6:465-502.
- Li K., Mikola M.R., Draths K.M., Worden R.M. & Frost J.W.; 1999. Fed-batch fermentor synthesis of 3-dehydroshikimic acid using recombinant *Escherichia coli*. Biotechn. Bioeng. 64:61-73.
- Liao J.C., Hou S.Y. & Chao Y.P. 1996. Pathway analysis, engineering, and physiological considerations for redirecting central metabolism. Biotechnol. Bioeng., 52:129-140.
- Liao J.C., Chao Y.P. & Patnaik R. 1994. Alteration of the biochemical valves in the central metabolism of *Escherichia coli*. Ann N Y Acad Sci. 30:21-34

- Lu J.L. & Liao J.C. 1997. Metabolic engineering and control analysis for production of aromatics: role of transaldolase. *Biotechnol. Bioeng.* 53:132-138.
- Luli G.W. & Strohl W.R. 1990. Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. *Appl Environ Microbiol.* 56:1004-11.
- Lyngstadaas A., Sprenger G.A. & Boye, E. 1998. Impaired growth of an *Escherichia coli rpe* mutant lacking ribulose-5-phosphate epimerase activity. *Biochim Biophys Acta.* 1381:319-30.
- Mao Q., Schunk T., Gerber B. & Erni B. 1995. A string of enzymes, purification and characterization of a fusion protein comprising the four subunits of the glucose phosphotransferase system of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 270:18295-18300
- Mascarenhas D., Ashworth D.J. & Chen C.S. 1991. Deletion of *pgi* alters tryptophan biosynthesis in a genetically engineered strain of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 57:2995-9.
- Mattanovich D., Kramer W., Lüttich C., Welk R., Bayer K. & Katinger H. 1998. Rational design of an improved induction scheme for recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 2-3: 296 – 298.
- Matsushita K., Arents J.C., Bader R. Yamada M., Adachi O. & Postma P.W. 1997. *Escherichia coli* is unable to produce pyrroloquinoline quinone (PQQ). *Microbiology.* 143:3149 - 3156.
- Miller, V.L. & Mekalanos J.J. 1988. A novel suicide vectors and its use in construction of insertion of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. *J. Bacteriol.* 170: 2575-2583.
- Miller J.E., Backman K.C., O'Connor M.J., & Hatch R.T. 1987. Production of phenylalanine and organic acids by phosphoenolpyruvate carboxylase-deficient mutants of *Escherichia coli*. *J. Ind. Microbiol.* 2:143-149.
- Miller J.H. 1992. A short course in bacterial genetics. A laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbour Laboratory Press, N.Y.
- Mullis K.B. & Faloona F.A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction, *Meth. Enzymol.* 155:335-350.
- Murdock D., Ensley B.D., Serdar C. & Thalen M. 1993. Construction of metabolic operons catalyzing the de novo biosynthesis of indigo in *Escherichia coli*. *Biotechnology (N.Y.)*. 11:381-6.
- Nagao T., Mitamura T., Wang X.H., Negoro S., Yomo T., Urabe I. & Okada H. 1992. Cloning, nucleotide sequences, and enzymatic properties of glucose dehydrogenase isozymes from *Bacillus megaterium* IAM1030. *J. Bacteriol.* 174:5013-20.
- Neidhardt F.C., Curtis III R., Ingraham J.L., Lin E.C.C., Low K.B., Magasanik B., Reznikoff W.S., Riley M. Schaechter M. & Umberger H.E. 1996. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. Vol 1, ASM Press, Washington, D.C.: X-Y
- Neidhardt F.C., Ingraham J.L. & Schaechter M. 1990. Physiology of the bacterial cell: A molecular approach.
- Pan G.P., Rhee J.S. & Lebeault J.M. 1987. Physiological Constraints in increasing biomass concentration of *Escherichia coli* B in fed-batch culture. *Biotechnology Letters.* 9:89 – 94.
- Park O.K. & Bauerle R. 1999. Metal-catalyzed oxidation of phenylalanine-sensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase from *Escherichia coli*: inactivation and destabilization by oxidation of active-site cysteines. *J. Bacteriol.* 81:1636-42
- Parker C., Barnell W.O., Snoep J.L., Ingram L.O & Conway T. 1995. Characterization of the *Zymomonas mobilis* glucose facilitator gene product (*glf*) in recombinant *Escherichia coli*: examination of transport mechanism, kinetics and the role of glucokinase in glucose transport. *Mol Microbiol.* 15:795-802.

- Patnaik R. & Liao, J.C. 1994. Engineering of *Escherichia coli* central metabolism for aromatic metabolite production with near theoretical yield. *Appl Environ Microbiol.* **60**:3903-8.
- Patnaik R., Roof, W.D., Young, R. F. & Liao, J.C. 1992. Stimulation of glucose catabolism in *Escherichia coli* by a potential futile cycle. *J Bacteriol.* **174**:7527-32.
- Patnaik R., Spitzer R. & Liao J.C. 1995. Pathway engineering for production of aromatics in *Escherichia coli*: confirmation of stoichiometric analysis by independent modulation of AroG, TktA, and Pps activities. *Biotechnology and Bioengineering*, **46**:361-370.
- Peekhaus N. & Conway T. 1998. What's for dinner ? Entner-Doudoroff metabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **180**:3495-502
- Peekhaus N., Tong S., Reizer J., Saier M.H. Jr, Murray E. & Conway T. 1997. Characterization of a novel transporter family that includes multiple *Escherichia coli* gluconate transporters and their homologues. *FEMS Microbiol Lett.* **15**:233-8
- Pittard J., & Wallace B.J. 1966. Distribution and function of genes concerned with aromatic biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **91**:1494-508.
- Pittard, 1996. Biosynthesis of the aromatic amino acids. In: Neidhardt F.C. [et al.]. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. Vol. 1, ASM Press, Washington, D.C.
- Postma P.W., Lengeler J.W & Jacobson G.R. 1996. Phosphoenolpyruvate:Carbohydrate Phosphotransferase Systems. In: Neidhardt F.C. [et al.]. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. Vol. 1, ASM Press, Washington, D.C.
- Ramaley R.F. & Vasantha N. 1983. Glycerol protection and purification of *Bacillus subtilis* glucose dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **258**:12558-65.
- Ramilo C.A. & Evans J.N. 1997. Overexpression, purification, and characterization of tyrosine-sensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulosonic acid 7-phosphate synthase from *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* **9**:253-61
- Schilz S. 1993. Entwicklung von Vektorensystemen zur regulierten Verminderung der Pyruvatdecarboxylase-Aktivität in *Zymomonas mobilis*. Diplomarbeit RWTH Aachen.
- Schoner R. & Herrmann K.M. 1976. 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase. Purification, properties, and kinetics of the tyrosine-sensitive isoenzyme from *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **251**:5440-7
- Small P., Blankenhorn D., Welty D., Zinser E. & Slonczewski J.L. 1994. Acid and base resistance in *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: role of *rpoS* and growth pH. *J Bacteriol.* **176**:1729-37
- Snell K.D., Draths K.M. & Frost J.W. 1996. Synthetic modification of the *Escherichia coli* chromosome: enhancing the biocatalytic conversion of glucose into aromatic chemicals. *J. Am. Chem. Soc.* **116**:5605-5614
- Snoep J.L., Arfman N., Yomano L.P., Fliege R.K., Conway T., Ingram L.O. 1994. Reconstruction of glucose uptake and phosphorylation in a glucose-negative mutant of *Escherichia coli* by using *Zymomonas mobilis* genes encoding the glucose facilitator protein and glucokinase. *J Bacteriol.* **176**:2133-5.
- Sprenger G.A., Schörken U., Sprenger G. & Sahm H. 1995a. Transketolase A of *Escherichia coli* K12. Purification and properties of the enzyme from recombinant strains. *Eur J Biochem.* **230**:525-32
- Sprenger G.A., Schörken U, Sprenger G. & Sahm H. 1995b. Transaldolase B of *Escherichia coli* K-12: cloning of its gene, *talB*, and characterization of the enzyme from recombinant strains. *J Bacteriol.* **177**:5930-6.
- Sprenger G.A. 1995. Genetics of pentose-phosphate pathway enzymes of *Escherichia coli* K-12. *Arch Microbiol.* **164**:324-30.
- Srinivasan P.R. & Sprinson D.B. 1959. 2-keto-3-deoxy-D-arabo-heptonic Acid 7-phosphate synthase. *J. Biol. Chem.* **234**:713-716.

- Stahl U. & Esser K. 1983. Plasmid heterogeneity in various strains of *Bacillus megaterium*. Eur J. Appl. Biotechnol. 17:248-251.
- Tanaka S., Lerner S.A. & Lin E.C.C. 1967. Replacement of a phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase by a nicotinamide adenine nucleotide-linked dehydrogenase for the utilization of manitol. J. Bacteriol. 93:642-648.
- Tong S., Porco A., Isturiz T. & Conway T. 1996. Cloning and molecular genetic characterization of the *Escherichia coli* *gntR*, *gntK*, and *gntU* genes of GntI, the main system for gluconate metabolism. J Bacteriol. 178:3260-9.
- Trchounian A. & Kobayashi A. 1999. Fermenting *Escherichia coli* is able to grow in media of high osmolarity, but is sensitive to the presence of sodium ion. Current Microbiology. 39:109-114.
- Tribe D.E. & Pittard, J. 1979. Hyperproduction of tryptophan by *Escherichia coli*: genetic manipulation of the pathways leading to tryptophan formation. Appl Environ Microbiol. 38:181-90.
- Tsuchida T., Kubota K., Morinaga Y., Matsui H., Enei H. & Yoshinaga F. 1987. Production of L-phenylalanine by a mutant of *Brevibacterium lactofermentum* 2256. Agric.-Biol.-Chem. 51:2095-2101.
- Valle F., Munoz E., Ponce E., Flores N. & Bolivar F. 1996. Basic and applied aspects of metabolic diversity: the phosphoenolpyruvate node. J.-Ind.-Microbiol.-Biotechnol. 17:458-462.
- Weaver L.M. & Herrmann K. M. 1990. Cloning of an *aroF* allele encoding a tyrosine-insensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase. J Bacteriol. 172:6581-4.
- Weisser P., Krämer R., Sahm H. & Sprenger G.A. 1995. Functional expression of the glucose transporter of *Zymomonas mobilis* leads to restoration of glucose and fructose uptake in *Escherichia coli* mutants and provides evidence for its facilitator action. J Bacteriol. 177:351-4.
- Weisser P. 1996. Aufnahme und Verwertung von Zuckern durch *Zymomonas mobilis* : Charakterisierung des Glucosefacilitators und Konstruktion einer Stoffwechselweges für Mannose. Dissertation Universität Düsseldorf.
- Wendisch V. 1997. Physiologische und NMR-spektroskopische Untersuchungen zur *in vivo*-Aktivität zentraler Stoffwechselwege im Wildstamm und in rekombinanten Stämmen von *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation Universität Düsseldorf.
- Yanisch-Perron C., Vieira J., & Messing J. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene. 33:103-19.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biotechnologie 1 des Forschungszentrums Jülich GmbH angefertigt.

Herrn PD Dr. G. A. Sprenger danke ich für die Überlassung des Themas, für seine ständige Diskussionsbereitschaft sowie seine guten Ratschläge und wertvollen Anregungen, die maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Frau Prof. Dr. M. Kula danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

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

Besonders möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Johannes Bongaerts bedanken, der sich für mich immer viel Zeit zum Diskutieren genommen hat.

Weiterhin gilt mein Dank allen (auch ehemaligen) Mitarbeitern der AG Sprenger Ulli Degner, Regine Halbach, Dirk Halbig, Ralf Jossek, Birgit Laufer, Britta Meyer, Heidi Peter, Melanie Schäfer, Brigitte Schauf, Uli Schörken, Martin Schürmann, Ruth Siewe, Peter Weisser, Thomas Wiegert und Alice Zweering, die immer für ein gutes Arbeitsklima gesorgt haben.

Allen (auch ehemaligen) Mitarbeitern des "FAME-Teams" gilt mein Dank, vor allem Andrea Kreutzer (Institut für Biotechnologie 2) für die gute Zusammenarbeit bei der technischen Durchführung der Fed-Batch Kultivierungen.

Ein weiterer Dank geht an die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Floss (Seattle, USA) für die Zusendung von 3-Desoxy-D-Arabino-Heptulose-7-Phosphat sowie an die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Hillen (Erlangen-Nürnberg) für die Zusendung des Stammes DSM 319.

Allen Mitarbeitern der Institute für Biotechnologie 1 und 2 danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft und gute Zusammenarbeit.

..... nicht zuletzt einen ganz herzlichen Dank an Martina für ihr Verständnis, für ihre immer gewährte Unterstützung und für ihre unendliche Geduld mit mir.

Forschungszentrum Jülich



Jüli-3824
November 2000
ISSN 0944-2952