Forschungszentrum Jülich
in der Helmholtz-Gemeinschaft



Institut für Biotechnologie 1

Gewinnung von D-Mannitol mit rekombinanten Escherichia coli Stämmen

Björn Kaup

Jül-4155

Gewinnung von D-Mannitol mit rekombinanten Escherichia coli Stämmen

Björn Kaup

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 4155
ISSN 0944-2952
Institut für Biotechnologie 1 Jül-4155
D 61 (Diss., Düsseldorf, Univ., 2004)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek
D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland
☎ 02461 61-5220 · Telefax: 02461 61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Die vorliegende Arbeit wurde von Februar 2002 bis Oktober 2004 am Institut für Biotechnologie 1 des Forschungszentrums Jülich unter Anleitung von Prof. Dr. H. Sahm angefertigt.

Teile der vorliegenden Dissertation erschienen in folgenden Publikationen:

- Hahn G, Kaup B, Bringer-Meyer S, Sahm H (2003). A zinc-containing mannitol-2-dehydrogenase from *Leuconostoc pseudomesenteroides* ATCC 12291: purification of the enzyme and cloning of the gene. *Arch Microbiol* **179**:101–107

- Kaup B, Bringer-Meyer S, Sahm H (2004). Metabolic engineering of *Escherichia coli*: construction of an efficient biocatalyst for D-mannitol formation in a whole-cell biotransformation. *Appl Microbiol Biotechnol* **64** (3): 333 – 339

Teile der vorliegenden Dissertation erschienen in folgenden Patentanmeldungen:

- Sahm H, Hahn G, Bringer-Meyer S, Kaup B, Hemmerling C. Beschreibung für eine Mannitol-2-Dehydrogenase codierende Nukleotidsequenz sowie Verfahren zur Herstellung von D-Mannitol. Patentanmeldung Deutschland, 102 20 848.4 (08.05.02)

- Sahm H, Bringer-Meyer S, Kaup B, Hemmerling C. Verfahren sowie Organismus zur Herstellung von D-Mannitol. Patentanmeldung Deutschland, 102 47 147.9 (09.10.02)

Abstract

Aim of this work was the construction of recombinant *Escherichia coli* strains for the formation of D-mannitol from D-fructose and D-glucose in whole-cell biotransformations. First the NAD-dependent mannitol dehydrogenase from *Leuconostoc pseudomesenteroides* ATCC12291 was expressed in *E. coli*. Despite of its high enzyme activity this *E. coli* strain was not able to form D-mannitol from D-fructose as resting cell suspension in a whole-cell biotransformation. The coexpression of the NAD-dependent formate dehydrogenase of the methylotrophic *Mycobacterium vaccae* N10 for the regeneration of NADH resulted in the formation of a minor amounts of D-mannitol from D-fructose and formate, again regardless of high enzyme activities in the respective strain.

Because D-fructose uptake in wildtype *E. coli* is catalysed by the PTS-system, this sugar is phosphorylated and therefore not a substrate of the mannitol dehydrogenase. This problem was overcome by the coexpression of the glucose facilitator of *Zymomonas mobilis* for uptake of D-fructose without concomitant phosphorylation. This strain was able to form D-mannitol up to a concentration of 1 M in a reaction time of 18 hours with a yield $Y_{D\text{-mannitol/D-fructose}}$ of 84 - 90 mol% from D-fructose and formate as substrates. The maximum specific productivity was 9,5 [$g_{D\text{-mannitol}} \times (g_{CDW} \times h)^{-1}$].

However, this *E. coli* strain was not able to form D-mannitol from D-glucose. Therefore, glucose isomerases were supplemented to reaction mixture and the the glucose isomerase from *E. coli* was coexpressed. In both cases this resulted in D-mannitol formation solely from D-glucose as carbohydrate source and formate as source of redox equivalents without the participation of phosphorylated intermediates.

Inhaltsverzeichnis

I Einleitung

1 Biokatalyse und Biotransformation 5

2 D-Mannitol 7

3 Ziel der Arbeit 11

II Material und Methoden

1 Material 13

1.1 Lösungen, Puffer und Medien 13

1.2 Bakterienstämme 13

1.3 Plasmide 15

1.4 Oligonukleotide 16

2 Methoden 17

2.1 Molekular- und Mikrobiologische Methoden 17

2.1.1 Amplifikation von DNA Fragmenten durch Polymerasekettenreaktion (PCR) 17

2.1.2 DNA Isolierung 18

2.1.3 DNA Restriktion und Ligation 19

2.1.4 Gelelektrophorese 19

2.1.5 Kompetente Zellen und Transformation 19

2.2 Biochemische Methoden 20

2.2.1 Zellaufschluss 20

2.2.2 Bestimmung von Enzymaktivitäten und Proteinkonzentrationen 20

2.2.3 Quantifizierung von intrazellulären Pyridinnukleotidpools 23

2.2.4 Bestimmung der Zelltrockenmasse 24

2.3 Kultivierung von Bakterienstämmen und Ganzzell-Biotransformation 24

2.3.1 Zellkultivierung von *E. coli* und Expression rekombinanter Proteine 24

2.3.2 Zellernte 25

2.3.3 Ganzzell-Biotransformation 25

2.3.4 HPLC Analysen 27

2.4 Nukleotidsequenzen 28

II Ergebnisse

1 Mannitol-2-Dehydrogenase aus *Leuconostoc pseudomesenteroides* in *E. coli* 29

1.1 Klonierung des Mannitol-2-Dehydrogenase Gens aus *L. pseudomesenteroides* und Expression des Enzyms in *E. coli* 29

1.2 Katalytische Eigenschaften der Mannitol-2-Dehydrogenase aus *L. pseudomesenteroides* 31

2 Ganzzell-Biotransformation mit rekombinanten *E. coli* Zellen zur Bildung von D-Mannitol aus D-Fruktose 38

2.1 Mannitol-2-Dehydrogenase aus *L. pseudomesenteroides* in *E. coli* 38

2.2 Mannitol-2-Dehydrogenase *L. pseudomesenteroides* und Formiat-Dehydrogenase aus *Mycobacterium vaccae* in *E. coli* 39

2.3 Formiat-Dehydrogenase aus *M. vaccae*, Mannitol-2-Dehydrogenase aus *L. pseudomesenteroides* und Glukose-Facilitator aus *Zymomonas mobilis* in *E. coli* 42

2.4 Kinetische Analysen zur D-Mannitol Bildung während der Biotransformation 44

2.5 Optimierung der Ganzzell-Biotransformation mit Formiat Dehydrogenase, Mannitol-2-Dehydrogenase und Glukose Facilitator exprimierenden *E. coli* 47

2.5.1 Entfernung von Mutationen im *fdh*-Gen 47

2.5.2 Einfluss des pH Wertes auf die D-Mannitol Bildung 49

2.5.3 Kontinuierliche Substratzudosierung 50

2.5.4 Produktinhibition während der D-Mannitol Bildung 53

2.5.5 Analysen zur Kofaktor-Verfügbarkeit während der Biotransformation 56

2.5.6 Analyse des NAD(H)-Pools während der Biotransformation 60

2.5.7 Zusammenfassung der Ergebnisse zur D-Mannitol Bildung aus D-Fruktose 61

3 Ganzzell-Biotransformation mit rekombinanten *E. coli* zur Bildung von D-Mannitol aus D-Glukose 62

3.1 Zugabe von Glukose-Isomerasen in den Biotransformationsansatz 63

3.2 Koexpression einer Glukose-Isomerase 64

3.2.1 Klonierung und Expression der Glukose-Isomerase in *E. coli* 65

3.2.2 Ergänzung des Plasmids pET24 *fdh mdh* durch das Glukose Isomerase Gen aus *E. coli* 67

3.2.3 Ganzzell-Biotransformation mit koexprimierter Glukose-Isomerase 68
3.2.4 Variation der Expressionssysteme für Formiat Dehydrogenase, Mannitol-2-Dehydrogenase und Glukose-Isomerase 69
3.2.5 Einfluss des pH Wertes auf die D-Mannitol Bildung aus D-Glukose 71

IV Diskussion

1 Die Mannitol-2-Dehydrogenase aus *L. pseudomesenteroides* 75
2 Ganzzell-Biotransformation mit dem Substrat D-Fruktose 77
3 Ganzzell-Biotransformation mit dem Substrat D-Glukose 83
4 Einfluss des Stoffwechsels von *E. coli* auf die D-Mannitol Bildung 86

V Zusammenfassung 87

VI Literatur 88

VII Anhang 103

Abkürzungen

bp	Basenpaare
ca.	circa
°C	Grad Celsius
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol
E	Extinktion
ε	Extinktionskoeffizient
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s^2)
g	Gramm
h	Stunde
HPLC	high pressure liquid chromatography
IPTG	Isopropylthio-β-D-Galaktosid
k	Kilo
l	Liter
M	Molar, Mol pro Liter
µ	Mikro
m	Meter
min	Minute
n	Nano
$NAD^+(H)$	Nikotinamid Adenin Dinukleotid (oxidierte / reduzierte Form)
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
pH	potentia hydrogenii ($-lga_{H^+}$)
RNA	Ribonukleinsäure
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sp.	Spezies
TAE	Tris-Acetat-EDTA
T_M	Schmelztemperatur der DNA
Tris	Tri-(hydroxymethyl)-aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
U	Unit
ZTM	Zelltrockenmasse

I Einleitung

1 Biokatalyse und Biotransformation

Biokatalysatoren haben in den letzten Jahren in vielen Bereichen der Feinchemie, pharmazeutischen Industrie und Lebensmittelindustrie an Bedeutung gewonnen (Panke *et al.,* 2004). Diese Entwicklung beruht auf einigen entscheidenden Vorteilen biologischer Herstellungsmethoden gegenüber den entsprechenden chemischen Synthesen. Im Vordergrund stehen dabei die milden Bedingungen bezüglich Druck und Temperatur sowie die hohe Stereospezifität mit denen biologische Katalysatoren die gewünschten Reaktionen oft nebenproduktfrei durchführen.

Als Biokatalysatoren werden einerseits Enzyme eingesetzt. So dienen z.B. Aminotransferasen zur Synthese enantiomerenreiner α-Aminosäuren oder Alkohol-Dehydrogenasen zur Reduktion von Ketonen zu chiralen Alkoholen (Li *et al.,* 2002; Groeger *et al.,* 2004). Nachteil enzymatischer *in vitro* Redox-Reaktionen ist, dass bei dem Einsatz Kofaktor abhängiger Enzyme, die Kofaktoren zugesetzt werden müssen (z.B. Drauz und Waldmann, 1995). Daher finden andererseits auch ganze Mikroorganismen Anwendung als Biokatalysatoren, da diese die notwendigen Kofaktoren selber synthetisieren. So wurden zur Reduktion von (2,5)-Hexandion über Hexan-(2)-on zu (2,5)-Hexandiol ruhende Zellen von *Lactobacillus kefir* DSM 20587 verwendet. Der zur Substratreduktion notwendige Kofaktor NADPH wurde hierbei durch die Verstoffwechslung des Kosubstrats D-Glukose generiert, wodurch eine dem D-Glukose Verbrauch entsprechende Laktat Menge als Nebenprodukt gebildet wurde (Haberland *et al.,* 2002). Die intrazelluläre Regeneration von NAD(P)H ist bei solchen reduktiven Biotransformationen, neben der Aktivität des Produkt bildenden Enzyms, zur Erhaltung der Produktivität von zentraler Bedeutung und kann beispielsweise durch (Über)-Expression des Produktbildungsenzyms und NAD(P)H regenerierenden Enzymen gesteigert werden. So wurde zur Synthese von *(S)*-4-Chloro-3-Hydroxybutanoat aus Ethyl-4-Chloro-Acetoacetat neben der Produkt bildenden Carbonyl-Reduktase aus *Candida magnoliae* die Glukose-Dehydrogenase aus *Bacillus megaterium* zur Kofaktor-Regeneration in *Escherichia coli* exprimiert. Als Kosubstrat diente D-Glukose (Kizaki *et al.,* 2001). Auch das (*R*)-Stereoisomer des gleichen Produktes konnte durch Ganzzell-Biotransformation mit rekombinanten

E. coli, ausgehend vom gleichen Substrat hergestellt werden. Hier diente die Aldehyd-Reduktase aus *Sporobolomyces salmonicolor* zur Bildung des *(R)*-4-Chloro-3-Hydroxybutanoat und ebenfalls die Glukose-Dehydrogenase aus *B. megaterium* zur Kofaktor-Regeneration (Kataoka *et al.,* 1999). Der Vergleich dieser Ganzzell-Biotransformation mit überexprimirten Enzymen zur Produktbildung und Kofaktor-Regenaration mit der durch Wildtyp *L. kefir* katalysierten Reaktion zeigt eine 34-fach erhöhte spezifischen Produktivität (Kataoka *et al.,* 1999; Haberland *et al.,* 2002). Dies verdeutlicht die Leistungsfähigkeit rekombinanter Bakterienstämme mit erhöhten Enzymaktivitäten für Produktbildung und Kofaktor-Regeneration. Infolge der Glukose-Dehydrogenase Aktivität kommt es allerdings durch die Oxidation der eingesetzten D-Glukose zur Nebenproduktbildung von Glukonat. Eine Möglichkeit zur nahezu nebenproduktfreien NADH-Regeneration bieten Formiat-Dehydrogenasen (Shaked und Whitesides, 1980). Bei der von diesen Enzymen katalysierten Formiat Oxidation entsteht als Endprodukt Kohlendioxid. Es kommt daher nicht zur Akkumulation von Nebenprodukten in der Reaktionslösung. Darüber hinaus ist der Reaktionsverlauf nahezu unidirektionell, wodurch sich das Reaktionsgleichgewicht auf die Seite der NADH + H^+-Regeneration verschiebt (Hummel und Kula, 1989; Kula und Wandrey, 1987; Neuhauser *et al.*, 1998). Beispiel für eine Anwendung der Kofaktor-Regeneration mit Formiat-Dehydrogenase bei der Ganzzell-Biotransformation mit rekombinanten *E. coli* ist die Synthese von L-Aminosäuren aus α-Ketosäuren. Durch die Koexpression der Formiat-Dehydrogenase aus *Mycobacterium vaccae* und verschiedener Aminosäure-Dehydrogenasen wie Leucin-, Alanin- und Phenylalanin-Dehydrogenase konnten z.B. L-Leucin, L-Alanin, L-Phenylalanin, L-Valin, L-Methionin und L-Tyrosin aus entsprechenden Vorstufen gebildet werden (Galkin *et al.,* 1997).

Nebenprodukt bildende Reaktionen können auch durch Entfernung der daran beteiligten Enzyme blockiert werden. So wurden in *E. coli* für eine effizientere Bildung von Pyruvat aus D-Glukose die Gene von Pyruvat-Dehydrogenase (*aceEF*), Pyruvat:Formiat-Lyase (*pflB*), Pyruvat-Oxidase (*poxB*) und Phospho*enol*pyruvat-Synthase (*pps*) deletiert. Die damit unterbundene Bildung von Acetyl-CoA, Phospho*enol*pyruvat oder Acetat aus Pyruvat führte zu einer Akkumulation des Pyruvats aus der Glykolyse (Zelic *et al.,* 2003).

2 D-Mannitol

D-Mannitol ist ein in Pflanzen, Pilzen und Mikroorganismen weit verbreiteter Zuckeralkohol (Lewis und Smith, 1967; Rephaeli und Saier, 1980; Stoop *et al.,* 1995; Stoop und Mooibroek, 1998). Er dient den Organismen als Kohlenstoff- und Energiequelle, Kohlenstoffspeicherverbindung, Radikalfänger und zur Verringerung von osmotischem Stress (Loesche und Kornman, 1976; Smirnoff und Cumbes, 1989; Leslie *et al.,* 1995; Chaturvedi *et al.,* 1996; Chaturvedi *et al.,* 1997; Shen *et al.,* 1997). D-Mannitol ist nicht hygroskopisch und hat ca. 60 % der Süßkraft von Saccharose und wird in Lebensmitteln als für Diabetiker geeigneter Süßstoff eingesetzt. In der medizinischen Therapie dient D-Mannitol als Infusionsmittel zur Diurese und das Derivat D-Mannitolhexanitrat zur Gefäßerweiterung (Johnson, 1976). Die Verbindung 1-O-Lauroyl-D-Mannitol findet als nicht-ionisches Tensid Anwendung (Pinna *et al.*, 2004). Die weltweite Jahresproduktion von D-Mannitol beträgt ca. 40 000 Tonnen.

Die industrielle Synthese von D-Mannitol erfolgt durch katalytische Hydrierung von Glukose / Fruktose Gemischen mit aktivierten Nickel-Katalysatoren (Abb. 1). Dabei entsteht neben D-Mannitol ein dreifacher Überschuss an D-Sorbitol als Nebenprodukt, wodurch eine teure Produktaufarbeitung notwendig ist (Makkee *et al.,* 1985; Soetaert *et al.,* 1999).

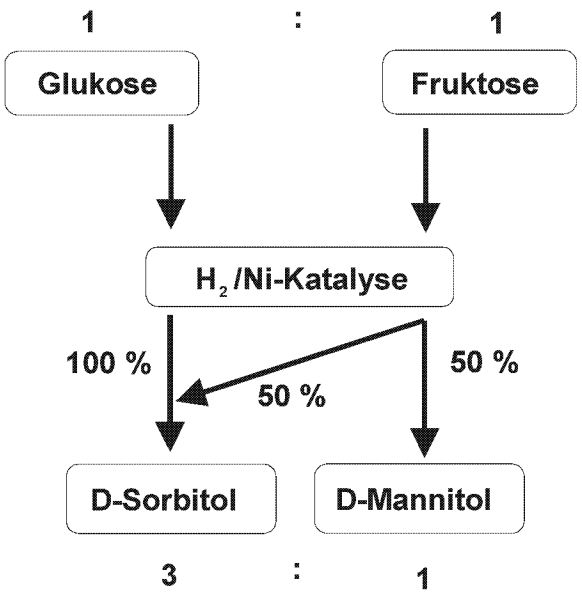


Abb. 1: Schematische Darstellung der katalytischen Hydrierung von Glukose / Fruktose Gemischen zur Synthese von D-Mannitol.

Aufgrund dieser Nebenproduktbildung wurden biologische Methoden zur Bildung von D-Mannitol entwickelt. Ein Ansatz war die enzymatische *in vitro* Synthese von D-Mannitol. NAD-abhängige Mannitol-2-Dehydrogenasen unterschiedlicher Herkunft dienten zur Reduktion von D-Fruktose zu D-Mannitol. Zur NADH-Regeneration wurde parallel eine Formiat-Dehydrogenase eingesetzt (Abb. 2). Diese Systeme hatten eine deutlich höhere Selektivität und Ausbeute als der chemische Prozess. Das notwendige NAD^+ musste allerdings zugesetzt werden (Haltrich *et al.*, 1996; Nidetzky *et al.* 1996; Slatner *et al.* 1998 a/b).

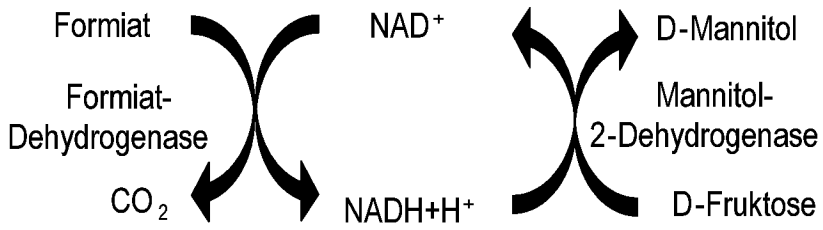


Abb. 2: Bildung von D-Mannitol aus D-Fruktose durch eine Mannitol Dehydrogenase und Kofaktor-Regeneration durch eine Formiat-Dehydrogenase

Ein weiterer Ansatz bestand in der fermentativen Gewinnung von D-Mannitol durch heterofermentative Milchsäurebakterien wie *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 9135 und *Leuconostoc pseudomesenteroides* ATCC 12291. Hierbei wurden Glukose / Fruktose Gemische als Substrate für wachsende Kulturen oder ruhende Zellen in Zell-Rückgewinnungsreaktoren eingesetzt und D-Mannitol Ausbeuten von 90% erzielt, bezogen auf die eingesetzte D-Fruktose (Soetaert *et al.,* 1995; von Weymarn *et al.*, 2002). Nach Aufnahme der Zucker dient D-Fruktose den heterofermentativen *Leuconostoc* sp. Stämmen als Wasserstoff- und Elektronenakzeptor und wird durch eine NAD-abhängige Mannitol-2-Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.67) zu D-Mannitol reduziert (Aarnikunnas *et al.*, 2002; Wisselink *et al.,* 2002; Hahn *et al.,* 2003; Abb. 3). Das für diese Reduktion notwendige NADH wird bei der Oxidation der D-Glukose gebildet. Dabei entstehen im weiteren Verlauf die Gärungsprodukte Laktat und Acetat, die vom Produkt D-Mannitol abgetrennt werden müssen (Erten, 1998; Grobben *et al.*, 2001; Abb. 3).

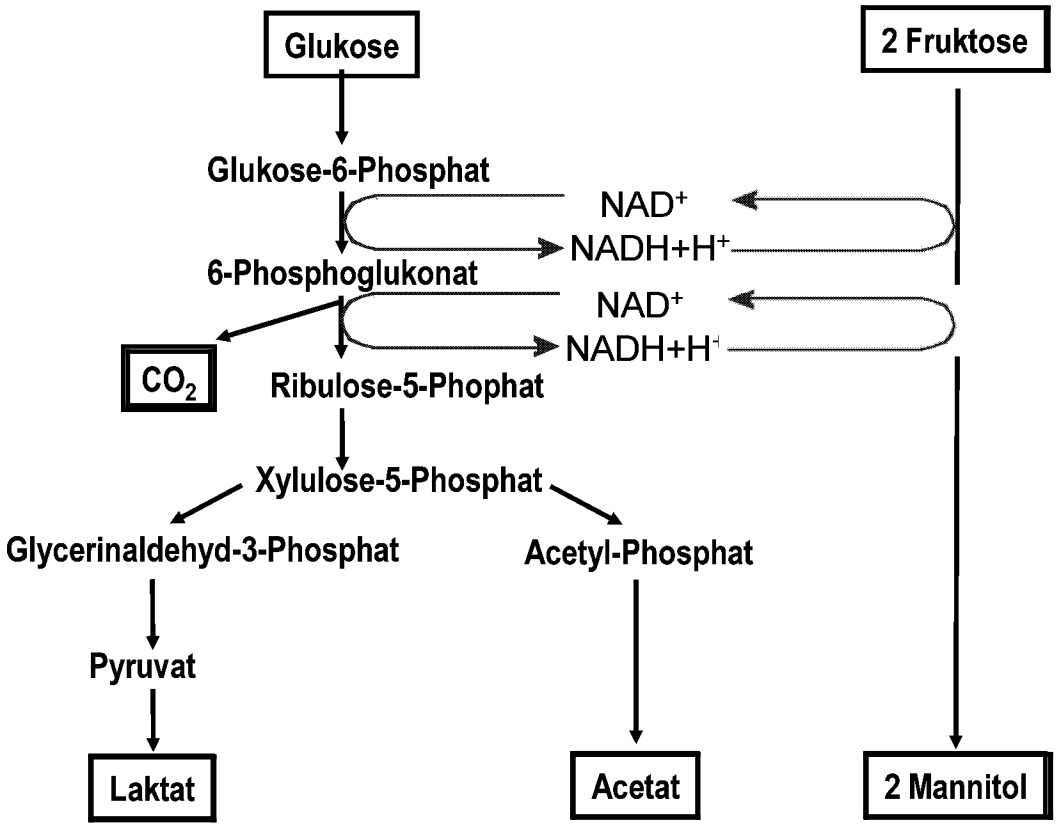


Abb. 3: Schematische Darstellung einer fermentativen Umsetzung von Glukose und Fruktose zu Laktat, Acetat und D-Mannitol mit heterofermentativen Milchsäurebakterien.

Homofermentative Milchsäurebakterien bilden in Anwesenheit von D-Glukose oder D-Fruktose fast ausschließlich Laktat. Da bei homofermentativen Milchsäurebakterien, im Gegensatz zu den heterofermentativen Milchsäurebakterien, die Zucker über das Phospho*enol*pyruvat-Phosphotransferase-System (PTS) aufgenommen werden, liegen sie intrazellulär als Fruktose-6-Phosphat bzw. Glukose-6-Phosphat vor. Glukose-6-Phosphat wird durch die Phosphoglukose-Isomerase in Fruktose-6-Phosphat umgewandelt. Fruktose-6-Phosphat wird glykolytisch zu Pyruvat abgebaut. Das bei der Oxidation des Glycerinaldehyd-3-Phosphat gebildete NADH wird bei der Reduktion von Pyruvat zu Laktat durch die Laktat-Dehydrogenase oxidiert (Abb. 4). Unter bestimmten Bedingungen findet jedoch auch eine gemischte Säuregärung statt mit Produkten wie Acetat, Ethanol Acetoin und in manchen Fällen D-Mannitol (Axelsson, 1993). Eine erhöhte D-Mannitol Bildung findet allerdings in Stämmen mit einer mutierten oder inaktivierten Laktat Dehydrogenase statt (Ferain *et al.,* 1996; Neves *et al.,* 2000; Wisselink *et al.,* 2002). Die D-Mannitol Bildung erfolgt in homofermentativen Milchsäurebakterien

durch eine Mannitol-1-Phosphat-Dehydrogenase, die Fruktose-6-Phosphat zu Mannitol-1-Phosphat reduziert. Freies D-Mannitol entsteht durch Dephosphorylierung mittels einer Mannitol-1-Phosphatase (Hugenholtz *et al.*, 2002; Wisselink *et al.,* 2002, Wisselink *et al.,* 2004; Abb. 4). Eine Steigerung der D-Mannitol Bildung z.B. in dem homofermentativen Milchsäurebakterium *Lactococcus lactis* wurde durch rekombinante Expression der Mannitol-1-Phosphat Dehydrogenase aus *Lactobacillus plantarum* und Deletion der Laktat-Dehydrogenase als Konkurrent um NADH erreicht (Wisselink *et al.,* 2004). Hier diente die D-Fruktose-6-Phosphat Reduktion anstelle der Pyruvat Reduktion zur Oxidation des NADH, welches in der Glykolyse gebildet wurde (Wisselink et al., 2002). Des Weiteren existiert in homofermentativen Milchsäurebakterien ein PTS-Aufnahmesystem für D-Mannitol. Dieses Aufnahmesystem und die im Wildtyp nur sehr geringe D-Mannitol Bildung steht in Übereinstimmung dazu, dass homofermentative Milchsäurebakterien D-Mannitol eher als Kohlenstoffquelle nutzen, als es zu bilden (Kandler und Weiss, 1986; Wisselink *et al.,* 2002).

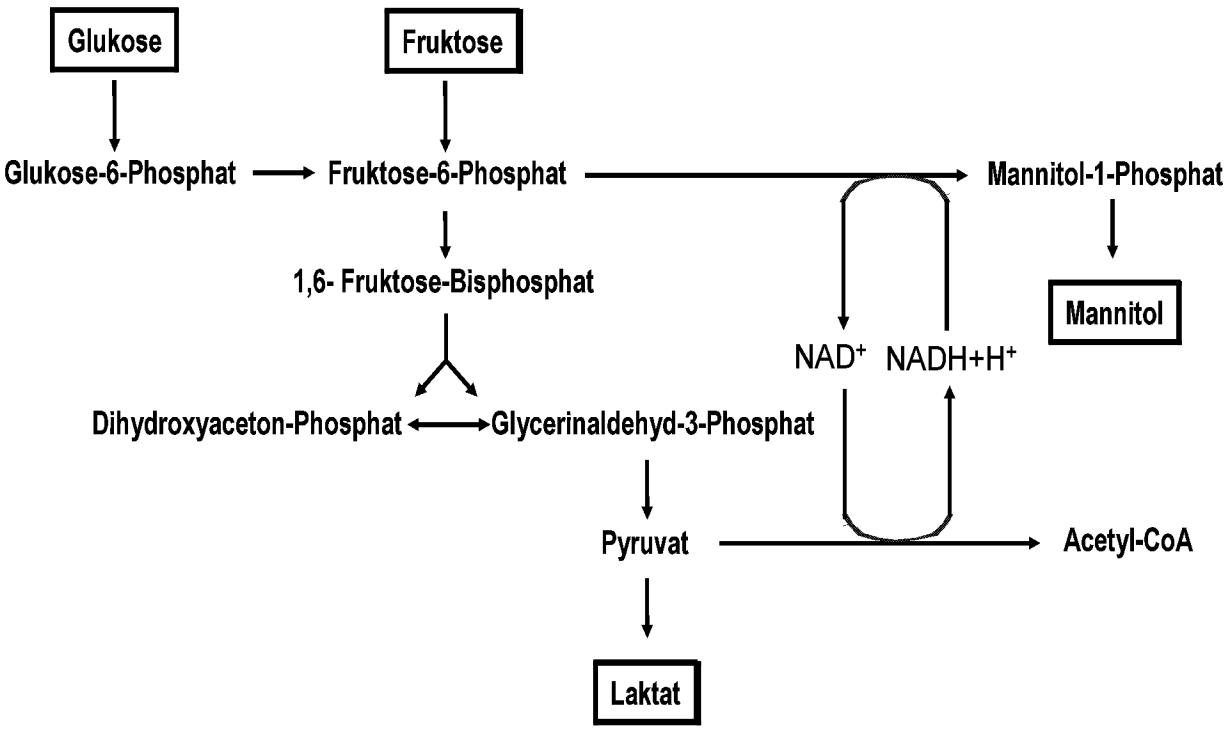


Abb. 4: Schematische Darstellung einer fermentativen Umsetzung von Glukose und Fruktose zu Laktat und D-Mannitol mit homofermentativen Milchsäurebakterien.

3 Ziel der Arbeit

Das Ziel der Arbeit war die Konstruktion eines bakteriellen Biokatalysators zur D-Mannitol Bildung, der die Vorteile der enzymatischen Synthese mit denen der Fermentation verband. Dazu sollte dieser Bakterienstamm einerseits als ganze Zellen eingesetzt werden, um intrazelluläre Kofaktoren und deren Regeneration bei Reduktions- / Oxidationsreaktionen zu nutzen. Andererseits sollte die D-Mannitol Bildung ohne Nebenprodukte, wie sie bei der chemischen Synthese oder den Fermentationen mit Milchsäurebakterien auftreten, stattfinden.

Als Stammhintergrund wurde *Escherichia coli* gewählt. Dieses Enterobakterium ist im Gegensatz zu den oben beschriebenen, heterofermentativen Milchsäurebakterien, kein natürlicher D-Mannitol Produzent. Unter anaeroben Bedingungen ist *E. coli* ein gemischter Säuregärer und bildet z.B. Acetat, Laktat, Succinat und Formiat (Schlegel, 1992). Ähnlich wie homofermentative Milchsäurebakterien besitzt *E. coli* eine Mannitol-1-Phosphat-Dehydrogenase, die dem Organismus, in Verbindung mit dem für D-Mannitol spezifischen PTS-Aufnahmesystem, zur Metabolisierung des Zuckeralkohols als Kohlenstoffquelle und nicht zur D-Mannitol Bildung dient. D-Mannitol wird während der Aufnahme durch dieses PTS-System phosphoryliert (Wolff und Kaplan 1956; Novotny *et al.,* 1984; Tchieu *et al.,* 2001; Otte *et al.*, 2003). Die Mannitol-1-Phosphat-Dehydrogenase oxidiert darauf das Mannitol-1-Phosphat zu Fruktose-6-Phosphat, das in den zentralen Stoffwechsel einfließt (Rosenberg *et al.,* 1984; Teschner *et al.,* 1990).

Für *E. coli* existieren eine Vielzahl von etablierten Methoden und Vektorsystemen zur Konstruktion rekombinanter Stämme. Diese Möglichkeiten sollten zur Konstruktion eines rekombinanten *E. coli* Stammes genutzt werden, der zur D-Mannitol Bildung eine Mannitol-2-Dehydrogenase besitzt. Darüber hinaus sollte die intrazelluläre NADH-Regeneration durch eine rekombinante Formiat-Dehydrogenase gesteigert und die Bildung von Nebenprodukten verhindert werden, wie dies bereits bei der Bildung von chiralen Hydroxyverbindungen oder L-Aminosäuren mit rekombinanten *E. coli* Stämmen gezeigt werden konnte (Galkin *et al.,* 1997; Kataoka *et al.,* 1999).

Die Formiat-Dehydrogenase von *E. coli* ist für eine NADH-Regeneration nicht geeignet. Sie ist Teil des Pyruvat:Formiat-Lyase-Komplex (*pfl*), der unter anaeroben Bedingungen eine Pyruvatspaltung zu Acetyl-CoA und Formiat katalysiert. Dieses Formiat wird dann ohne Beteiligung von NAD^+ zu CO_2 und H_2 umgesetzt (Knappe und Sawers, 1990; Schlegel, 1992).

II Material und Methoden

1 Material

Es wurden Chemikalien der Firmen Merck KGaA (Darmstadt), Sigma Chemie (Deisendorf) und Difco Laboratories (Detroit, USA) in p.A.-Qualität verwendet. Biochemikalien und Enzyme mit den zugehörigen Puffern wurden von Roche Diagnostics (Mannheim) bezogen. Der *Escherichia coli* Stamm BL21 (DE3) stammten von Novagen (EMD Biosciences, Inc., Novagen Brand, Madison, USA), der *E. coli* Stamm DH5α von Invitrogen (Carlsbad, USA). Die Plasmide pET24a(+) und pCDF-Duett 1 wurden von Novagen (EMD Biosciences, Inc., Novagen Brand, Madison, USA), das Plasmid pQE80L von Qiagen (Hilden), das Plasmid pBtac2 von Boehringer (Mannheim) und der DNA-Größenmarker von Promega (Madison, USA) bezogen. Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech (Ebersberg) und Qiagen (Hilden) synthetisiert. Die Glukose-Isomerase aus *Streptomyces rubiginosus* wurden von Hampton Research, USA, das Glukose-Isomerase Immobilisat Sweetzyme IT® von Novozymes, Dänemark, bezogen.

1.1 Lösungen, Puffer und Medien

Als Puffer für DNA und Proteinextrakte sowie für deren elektrophoretische Auftrennung wurden Standard-Puffer und -Lösungen nach Sambrook *et al.* (1989) verwendet. Zur Kultivierung der verwendeten *E. coli* Stämme dienten Luria-Bertani (LB) Medium (Miller, 1972). Zur Herstellung von Festmedien wurde 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt.

1.2 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tab. 1 zusammengefasst.

Tab. 1: Verwendete *Escherichia coli* Stämme

***E. coli* Stamm**	**Genotyp**	**Verwendung**	**Referenz**
DH5α	F⁻ ø80d*lac*ZΔM15 Δ(*lac*ZYA-*arg*F) U169 *deoR recA1 endA1 hsdR*17 (rk^-, mk^+) *phoA supE*44 λ^- *thi*-1 *gyrA*96 *relA*1	Plasmidamplifikation	Hanahan, 1983; Invitrogen
BL21 (DE3) Star	F^- *ompT hsdS*$_B$ (r_B^- m_B^-) *gal dcm rne 131 (DE3)*	Expression / Ganzzell-Biotransformation	Studier und Moffatt, 1986; Invitrogen
BL21 (DE3) Star pET24 *mdh*	wie BL21 (DE) Star; *mdh* aus *L. pseudomesenteroides*	Expression / Ganzzell-Biotrnasformation	Diese Arbeit,
BL21 (DE3) Star pMcFDH	wie BL21 (DE) Star; *fdh* aus *M. vaccae* N10	Expression / Ganzzell-Biotransformation	Diese Arbeit
BL21 (DE3) Star pET24 *xylA*$_{Ec}$	wie BL21 (DE) Star; *xylA* aus *E. coli*	Expression	Diese Arbeit
BL21 (DE3) Star pQE80 *xylA*$_{Ec}$	wie BL21 (DE) Star; *xylA* aus *E. coli*	Expression	Diese Arbeit
BL21 (DE3) Star pBtac *xylA*$_{Ec}$	wie BL21 (DE) Star; *xylA* aus *E. coli*	Expression	Diese Arbeit
BL21 (DE3) Star pET24 *xylA*$_{Am}$	wie BL21 (DE) Star; *xylA* aus *A. missouriensis*	Expression	Diese Arbeit
BL21 (DE3) Star pZY507 *glf*	wie BL21 (DE) Star; *glf* aus *Z. mobilis*	Expression / Ganzzell-Biotransformation	Diese Arbeit
BL21 (DE3) Star pET24 *fdh mdh*	wie BL21 (DE) Star; *mdh* aus *L. pseudomesenteroides; fdh* aus *M. vaccae N10*	Expression / Ganzzell-Biotransformation	Diese Arbeit
BL21 (DE3) Star pET24 *mdh* pZY507 *glf*	wie BL21 (DE) Star; *mdh* aus *L. pseudomesenteroides; glf* aus *Z. mobilis*	Expression / Ganzzell-Biotransformation	Diese Arbeit
BL21 (DE3) Star pMcFDH pZY507 *glf*	wie BL21 (DE) Star; *fdh* aus *M. vaccae N10; glf* aus *Z. mobilis*	Expression / Ganzzell-Biotransformation	Diese Arbeit
BL21 (DE3) Star pET24 *fdh mdh* pZY507 *glf*	wie BL21 (DE) Star; *mdh* aus *L. pseudomesenteroides; fdh* aus *M. vaccae N10; glf aus Z. mobilis*	Expression / Ganzzell-Biotransformation	Diese Arbeit
BL21 (DE3) Star pET24 *fdh mdh* P_{T7} *xylA*$_{Ec}$ pZY507 *glf*	wie BL21 (DE) Star; *mdh* aus *L. pseudomesenteroides; fdh* aus *M. vaccae N10; glf aus Z. mobilis; xylA aus E. coli*	Expression / Ganzzell-Biotransformation	Diese Arbeit
BL21 (DE3) Star pET24 *fdh mdh* pCDF Duett *xylA*$_{Ec}$ pZY507 *glf*	wie BL21 (DE) Star; *mdh* aus *L. pseudomesenteroides; fdh* aus *M. vaccae N10; glf aus Z. mobilis; xylA aus E. coli*	Expression / Ganzzell-Biotransformation	Diese Arbeit
BL21 (DE3) Star pCDF Duett *fdh mdh* pET24 *xylA*$_{Ec}$ pZY507 *glf*	wie BL21 (DE) Star; *mdh* aus *L. pseudomesenteroides; fdh* aus *M. vaccae N10; glf aus Z. mobilis; xylA aus E. coli*	Expression / Ganzzell-Biotransformation	Diese Arbeit

E. coli Stamm	Genotyp	Verwendung	Referenz
BL21 (DE3) Star pCDF Duett *fdh mdh* pQE80 *xylA*$_{Ec}$ pZY507 *glf*	wie BL21 (DE) Star; *mdh* aus *L. pseudomesenteroides; fdh* aus *M. vaccae N10; glf aus Z. mobilis; xylA aus E. coli*	Expression / Ganzzell-Biotransformation	Diese Arbeit
BL21 (DE3) Star pCDF Duett *fdh mdh* pBtac *xylA*$_{Ec}$ pZY507 *glf*	wie BL21 (DE) Star; *mdh* aus *L. pseudomesenteroides; fdh* aus *M. vaccae N10; glf aus Z. mobilis; xylA aus E. coli*	Expression / Ganzzell-Biotransformation	Diese Arbeit
BL21 (DE3) Star pCDF Duett *fdh mdh* pET24 *xylA*$_{Am}$ pZY507 *glf*	wie BL21 (DE) Star; *mdh* aus *L. pseudomesenteroides; fdh* aus *M. vaccae N10; glf aus Z. mobilis; xylA aus A. missouriensis*	Expression / Ganzzell-Biotransformation	Diese Arbeit
BL21 (DE3) Star pCDF Duett *fdh mdh xylA*$_{Ec}$ pZY507 *glf*	wie BL21 (DE) Star; *mdh* aus *L. pseudomesenteroides; fdh* aus *M. vaccae N10; glf aus Z. mobilis; xylA aus E. coli*	Expression / Ganzzell-Biotransformation	Diese Arbeit
BL21 (DE3) Star pCDF Duett *fdh mdh xylA*$_{AB}$ pZY507 *glf*	wie BL21 (DE) Star; *mdh* aus *L. pseudomesenteroides; fdh* aus *M. vaccae N10; glf aus Z. mobilis; xylA aus Arthrobacter* NRRL B-3728	Expression / Ganzzell-Biotransformation	Diese Arbeit

1.3 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tab. 2 zusammengefasst.

Tab. 2: Verwendete Plasmide

Plasmide	Eigenschaften	Verwendung	Referenz
pET24a(+)	*Kan*^{R}*; lacI; P*$_{T7}$*; ColE1*	Expressions-plasmid	Novagen
pCDF Duett-1	*lacI; Sm*^{R}*;* 2 x *P*$_{T7}$*; CloDF13*	Expressions-plasmid	Novagen
pQE80L	*bla;lacI; P*$_{T5}$*; ColE1*	Expressions-plasmid	Qiagen
pBtac2	*bla ; P*$_{tac}$*; ColE1*	Expressions-plasmid	Boehringer
p*Lmdh*	pUC18 Derivat; 4,2 kb *Eco*RI Fragment gen. DNA von *L. pseudomesenteroides*; *mdh; bla*	PCR Template	Hahn *et al.*, 2003

Plasmide	Eigenschaften	Verwendung	Referenz
pMcFDH	pUC119 Derivat; 2,3 kb Fragment gen. DNA von *M. vaccae* N10; *fdh ; bla*	PCR Template; Expression	Galkin *et al.*,1995
pZY507*glf*	pACYC Derivat; *glf; lacI^q; Cm^R ; P_{tac}; P15A*	Expression	Weisser *et al.*,1995
pRA4	pBR322 Derivat; *xylA$_{Am}$*	PCR Template	Amore und Hollenberg, 1989
pET24 *mdh*	pET24a(+) Derivat; *mdh; Kan^R ;lacI*	Expression	Diese Arbeit
pET24 *mdh* b	pET24a(+) Derivat; *mdh; Kan^R ;lacI*	Klonierungs-intermediat	Diese Arbeit
pET24 *fdh mdh*	pET24a(+) Derivat; *fdh; mdh*	PCR Template; Expression	Diese Arbeit
pET24 *xylA$_{Ec}$*	pET24a(+) Derivat; *xylA$_{Ec}$*	PCR Template; Expression	Diese Arbeit
pQE80 *xylA$_{Ec}$*	pQE80L Derivat; *xylA$_{Ec}$*	PCR Template; Expression	Diese Arbeit
pBtac *xylA$_{Ec}$*	pBtac2 Derivat; *xylA$_{Ec}$*	PCR Template; Expression	Diese Arbeit
pET24 *xylA$_{Am}$*	pET24a(+) Derivat; *xylA$_{Am}$*	Expression	Diese Arbeit
pET24 *fdh mdh P$_{T7}$ xylA$_{Ec}$*	pET24a(+) Derivat; *fdh; mdh; xylA$_{Ec}$;* 2 x *P$_{T7}$*	Expression	Diese Arbeit
pCDF Duett *xylA$_{Ec}$*	pCDF Duett-1 Derivat; *xylA$_{Ec}$*	Expression	Diese Arbeit
pCDF Duett *fdh mdh*	pCDF Duett-1 Derivat; *fdh; mdh*	Expression	Diese Arbeit
pCDF Duett *fdh mdh xylA$_{Ec}$*	pCDF Duett-1 Derivat; *fdh; mdh; xylA$_{Ec}$*	Expression	Diese Arbeit
pCDF Duett *fdh mdh xylA$_{AB}$*	pCDF Duett-1 Derivat; *fdh; mdh; xylA$_{AB}$*	Expression	Diese Arbeit

1.4 Oligonukleotide

Die in der vorliegenden Arbeit zur Amplifikation von DNA Fragmenten verwendeten Oligonukleotide sind in Tab. 3 zusammengefasst. Alle Oligonukleotide wurden als PCR-Primer eingesetzt.

Tab. 3: Verwendete Oligonukleotide. Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')
***mdh-Nde*I-f**	CGAACATATGGAAGCACTTGTGTTAACTGGTAC
***mdh-Sac*I-f**	CGATGAGCTCAAAAGGAGAACAAACATGGAAGCACTTGTGTTAACT
***mdh-Xho*I-r**	ACAGCTCGAGTTATGCCTCTTCGCCACCAACC
***mdh-Eco*RV-r**	ATATGATATCTTATGCCTCTTCGCCACCAAC
***fdh-Nde*I-f**	CGATCATATGGCAAAGGTCCTGTGCGTTCTTTACGATGATCCG
***fdh-Bam*HI-r**	GCTAGGATCCTCAGACCGCCTTCTTGAACTTGGCGGCCTCTTC
***P_{T7}-Bst1107*I-f**	TATAGTATACATTAATACGACTCACTATAGG
***xylA$_{Ec}$-Bst1107*I-r**	TATAGTATACTTATTTGTCGAACAGATAATGGTT
***xylA$_{Ec}$-Not*I-r**	TATAGCGGCCGCTTATTTGTCGAACAGATAATGGTT
***xylA$_{Ec}$-Eco*RI-r**	ATATGAATTCAGCCGTTATTTGTCGAACAG
***xylA$_{Ec}$-Nco*I-f**	TATACCATGGAGTTCAATATGCAAGCCTAT
***xylA$_{Ec}$-Nde*I-f**	TATACATATGGAGTTCAATATGCAAGCCTAT
***xylA$_{Ec}$-Bam*HI-f**	TATAGGATCCTGGAGTTCAATATG
***xylA$_{Ec}$-Hind*III-r**	ATATAAGCTTTTATTTGTCGAACAG
***xylA$_{Am}$-Nde*I-f**	TATACATATGTCTGTCCAGGCCACACGCGAA
***xylA$_{Am}$-Eco*RI-r**	ATATGAATTCTCAGCGGGCTCCGAGCAGGTGC
***xylA$_{AB}$-Nco*I-f**	ATATCCATGGGCGTTCAGCCGACC
***xylA$_{AB}$-Not*I-r**	TATAGCGGCCGCTTAGCGGGAGCC

2 Methoden

2.1 Molekular- und mikrobiologische Methoden

2.1.1 Amplifikation von DNA Fragmenten durch Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA Fragmenten wurde das High Fidelity PCR Master Kit von Roche Diagnostics (Mannheim) nach Herstellerangaben eingesetzt. Die betreffenden DNA Fragmente wurden mittels sequenzspezifischer Oligonukleotid Primer amplifiziert. Die Anlagerungstemperatur wurde so gewählt, dass sie 5 – 7°C unter dem niedrigsten T_M-Wert der verwendeten Oligonukleotide lag. Diente Plasmid DNA als PCR Template wurde dieses Template nach der PCR Reaktion durch das Restriktionsenzym *Dpn*I aufgrund der Methylierung der Plasmid DNA selektiv geschnitten (Lacks und Greenberg, 1975, 1977; Geier und Modrich, 1979).

Die in dieser Arbeit amplifizierten Gene, die verwendeten Oligonukleotidprimer, die eingesetzten DNA-Templates, die verwendeten Zielplasmide und die Klonierungsprodukte sind in Tab. 4 zusammengefasst.

Tab. 4: Amplifizierte Gene, Oligonukleotidprimer, DNA-Templates, Zielplasmide und resultierende Klonierungsprodukte.

Amplifiziertes Gen	**Primer forward**	**Primer reverse**	**Template**	**Ausgangs-Plasmid**	**Klonierungs-produkt**
mdh L. pseudo-mesenteroides	*mdh-Nde*I-f	*mdh-Xho*I-r	p*Lmdh*	pET24a(+)	pET24 *mdh*
mdh L. pseudo-mesenteroides	*mdh-Sac*I-f	*mdh-Xho*I-r	p*Lmdh*	pET24a(+)	pET24 *mdh* b
fdh M. vaccae	*fdh-Nde*I-f	*fdh-Bam*HI-r	pMcFDH	pET24 *mdh*	pET24 *fdh mdh*
xylA E. coli	*xylA*$_{Ec}$-*Nde*I-f	*xylA*$_{Ec}$-*Eco*RI-r	gen. DNA *E. coli* BL21 (DE3)	pET24a(+)	pET24 *xylA*$_{Ec}$
P_{T7} + *xylA E. coli*	P_{T7}- *Bst1107*I-f	*xylA*$_{Ec}$-*Bst1107*I-r	pET24 *xylA*$_{Ec}$	pET24 *fdh mdh*	pET24 *fdh mdh* P_{T7} *xylA*$_{Ec}$
xylA A. missouriensis	*xylA*$_{Am}$-*Nde*I-f	*xylA*$_{Am}$-*Eco*RI-r	pRA4	pET24a(+)	pET24 *xylA*$_{Am}$
mdh L. pseudo-mesenteroides + *fdh M. vaccae*	*fdh-Nde*I-f	*mdh-Eco*RV-r	pET24 *fdh mdh*	pCDF Duett-1	pCDF Duett *fdh mdh*
xylA E. coli	*xylA*$_{Ec}$-*Nco*I-f	*xylA*$_{Ec}$-*Eco*RI-r	gen. DNA *E. coli* BL21 (DE3)	pCDF Duett-1	pCDF Duett *xylA*$_{Ec}$
xylA E. coli	*xylA*$_{Ec}$-*Nco*I-f	*xylA*$_{Ec}$-*Not*I-r	gen. DNA *E. coli* BL21 (DE3)	pCDF Duett-1 *fdh mdh*	pCDF Duett *fdh mdh xylA*$_{Ec}$
xylA E. coli	*xylA*$_{Ec}$-BamHI-f	*xylA*$_{Ec}$-*Hind*III-r	gen. DNA *E. coli* BL21 (DE3)	pQE80L	pQE80 *xylA*$_{Ec}$
xylA E. coli	*xylA*$_{Ec}$-BamHI-f	*xylA*$_{Ec}$-*Hind*III-r	gen. DNA *E. coli* BL21 (DE3)	pBtac2	pBtac *xylA*$_{Ec}$
xylA Arthrobacter NRRL B-3728	*xylA*$_{AB}$-*Nco*I-f	*xylA*$_{AB}$- *Not*I-r	gen. DNA *Arthrobacter* NRRL B-3728	pCDF Duett-1 *fdh mdh*	pCDF Duett *fdh mdh xylA*$_{AB}$

2.1.2 DNA Isolierung

Plasmidisolierungen wurden mit Hilfe des Qiaprep Spin Miniprep-Kits (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Genomische DNA wurde mittels Genomc-Tips 100/G Säulen und dem Genomic Buffer Set (Qiagen, Hilden) isoliert. Die Aufreinigung von PCR-Produkten und DNA Fragmenten erfolgte mit dem QiaexII Gel Extraction Kit oder dem High Pure PCR Product Purification Kits (Roche Diagnostics, Mannheim).

2.1.3 DNA Restriktionen und Ligation

Die Zusammensetzung eines typischen DNA Restriktionansatzes war 1 – 10 Units Restriktionsenzym pro µg eingesetzte DNA in einfach konzentriertem Puffer des Herstellers (1/10 Volumen des 10 x Puffers in sterilem H_2O_{bidest}). Nach der Restriktionsreaktion von Plasmiden, die im weiteren Experimentverlauf zu Ligationen mit DNA Fragmenten (z.B. PCR Amplifikaten) eingesetzt werden sollten, erfolgte eine Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase (SAP, Roche Diagnostics; Mannheim) nach Herstellerangaben. Ein typischer Ligationsansatz bestand aus PCR Produkt (ca. 200 ng), Plasmid (geschnitten, ca. 50 ng), T4 DNA Ligase Puffer und T4 DNA Ligase (10 U). Der Ansatz wurde mit H_2O auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

2.1.4 Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA nach Plasmidpräparationen oder Restriktionsanalysen wurde der DNA Ladepuffer, bestehend aus aus 2,5 mg/ml Bromphenolblau, 50% Glycerin und 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,6 in H_2O zugegeben und die resultierenden Proben auf 0,8%ige Agarosegele mit 1 x TAE Puffer als Laufmittel elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA wurde mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht fotografiert (Image Master® VDS-System, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Die Auftrennung von Proteinextrakten erfolgte nach Zugabe von Probenpuffer bestehend aus 0,1 mg/ml Bromphenolblau, 8% SDS, 40% Glycerin, 40 mM DTT und 250 mM Tris-HCl, pH 6,8 in H_2O auf 12%igen, denaturierenden Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE) nach der Methode von Laemmli (1970). Die aufgetrennten Proteine wurden mit Gelcode® Blue Staining Reagent von Pierce (Rockford, USA) nach Herstellerangaben detektiert.

2.1.5 Kompetente Zellen und Transformationen

Die Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen sowie deren Transformation mit Plasmid DNA erfolgte nach Hanahan (1983). Die Transformationsansätze wurden vor der Plattierung auf LB-Agar Platten in SOC-Medium für 45 min inkubiert (Sambrook *et al.,* 1989). Bei der Konstruktion von *E. coli* Stämmen, die mehrere Plasmide trugen

wurden zunächst ein Plasmid in den Stamm transformiert, von einer selektierten Einzelkolonie des transformierten Stammes erneut kompetente Zelle präpariert und darin das nächste Plasmid transformiert. Bei Bedarf wurden aus einer doppelt transformierten Einzelkolonie erneut kompetente Zellen für die Transformation eines dritten Plasmids präpariert. Die betreffenden Plasmide wurden jeweils mit Antibiotika selektiert (Tab. 5, S. 25).

2.2 Biochemische Methoden

2.2.1 Zellaufschluss

Zellpellets mit einem Nassgewicht von 0,1 – 0,2 g wurden in 1 – 2 ml KP_i-Puffer (100 mM; pH = 6,5; 1 mM DTT) resuspendiert und durch Ultraschall im Eisbad für 4 min aufgeschlossen (Beschallungszyklus 0,5; Amplitude 55). Nach dem Aufschluss wurden die Proben bis zur Bestimmung der Enzymaktivitäten auf Eis gekühlt. Die Abtrennung der Zelltrümmer erfolgte durch Zentrifugation bei 20 000 *g* für 60 min und 4°C. Der Überstand diente als Rohextrakt zur Analyse von Enzymaktivitäten und wurde auf Eis gekühlt.

2.2.2 Bestimmung von Enzymaktivitäten und Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung der Enzymaktivitäten von Mannitol-2-Dehydrogenase und Formiat-Dehydrogenase erfolgte photometrisch bei 340 nm. Dazu wurden die Zell-Rohextrakte mit den entsprechenden Puffern so verdünnt, dass das jeweils getestete Enzym geschwindigkeitsbegrenzender Faktor der Reaktion war. Alle Messwerte wurden bei 30°C mindestens im Doppelansatz bestimmt. Die Reaktionszeit betrug 120 s und eine Datenerfassung erfolgte alle 5 s. Aus den ermittelten Steigungen wurden die volumetrischen Enzymaktivitäten der einzelnen Enzyme bestimmt. Das Gesamtvolumen aller Ansätze zur Bestimmung von Enzymaktivitäten betrug jeweils 1 ml. Der Extinktionskoeffizient ε für NADH bei 340 nm ist 6,22 [cm^2 x μmol^{-1}). Die Enzymaktivität wurde in Units angegeben, wobei 1 U (= 1 Unit) als die Enzymmenge definiert wurde, die 1 µmol Substrat pro Minute umsetzt. Die spezifische Aktivität der einzelnen Enzyme ergab sich aus der Division der Enzymaktivität pro ml im Test durch die Proteinkonzentration in mg / ml.

Die Aktivität der Formiat-Dehydrogenase aus *M. vaccae* N10 wurde durch die Reduktion von NAD^+ zu NADH ermittelt (Schütte *et al.,* 1976; Galkin *et al.*, 1995). Der Testansatz enthielt 100 mM KP_i-Puffer, pH 6,5, 2 mM NAD^+, 200 mM Natrium-Formiat und Zell-Rohextrakt.

Die Aktivität der Mannitol-2-Dehydrogenase aus *L. pseudomesenteroides* ATCC 12291 wurde durch Oxidation von NADH zu NAD^+ mit D-Fruktose als Substrat und durch Reduktion von NAD^+ zu NADH mit D-Mannitol als Substrat ermittelt (Schneider und Giffhorn, 1989; Hahn *et al.,* 2003). Ein Testansatz enthielt 100 mM KP_i-Puffer, pH 6,5, 200 µM NADH bzw. 2 mM NAD^+, 200 mM D-Fruktose bzw. 200 mM D-Mannitol und Zell-Extrakt.

Zur Analyse der pH-Wert Abhängigkeit der Mannitol-2-Dehydrogenase Aktivität wurden Zell-Extrakte mit Mannitol-2-Dehydrogenase in Puffer bei einem pH-Wert von 6,0 inkubiert. Nach 20 min wurde die Mannitol-2-Dehydrogenase Aktivität bei pH-Werten von 5,0 bis 7,5 bestimmt.

Zur Bestimmung der pH-Wert Abhängigkeit der Mannitol-2-Dehydrogenase Stabilität wurden Zell-Extrakte mit Mannitol-2-Dehydrogenase in Puffern mit pH-Werten von 5,0 bis 7,5 inkubiert. Nach 20 min wurde die Mannitol-2-Dehydrogenase Aktivität bei einem pH-Wert von 6,0 bestimmt.

Zur Ermittlung der Zn^{2+}-Abhängigkeit der Mannitol-2-Dehydrogenase Aktivität wurden entsprechende Zell-Extrakte in Natrium-Acetat Puffer bei einem pH-Wert von 5,4 mit 0,5 – 2,0 mM EDTA für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach die Enzymaktivität getestet. Zur Reaktivierung der Mannitol-2-Dehydrogenase wurde den Zell-Extrakten äquimolare Zn^{2+}-Konzentrationen zugegeben und nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur erneut die Enzymaktivitäten gemessen.

Die Bestimmung der K_m-Werte der Mannitol-2-Dehydrogenase für D-Fruktose und D-Mannitol erfolgte durch Messung der Enzymaktivität in Zell-Extrakten bei Konzentrationen für D-Fruktose und D-Mannitol von 10, 20, 25, 40, 50, 100 und 200 mM in Anwesenheit von 200 µM NADH bzw. 2 mM NAD^+ in 100 mM KP_i-Puffer, pH 6,5. Die K_m Werte der Mannitol-2-Dehydrogenase für NADH und NAD^+ wurden durch

Messung der Enzymaktivität in Zell-Extrakten bei Konzentrationen für NADH und NAD^+ von 5, 10, 12,5, 20, 25, 40, 50, 80 und 200 µM in Anwesenheit von 200 mM D-Fruktose bzw. 200 mM D-Mannitol in 100 mM KP_i-Puffer, pH 6,5 ermittelt. Die Auswertung der Daten erfolgte nach Lineweaver und Burk (1934).

Die Analyse der Inhibition der Mannitol-2-Dehydrogenase durch D-Mannitol wurde Messung der Enzymaktivität in Zell-Extrakten in Anwesenheit von 200 µM NADH und 200 mM D-Fruktose und D-Mannitol in Konzentrationen 25, 30, 40, 50 und 75 mM bzw. ohne D-Mannitol in 100 mM KP_i-Puffer, pH 6,5 durchgeführt. Die Daten wurden nach Segel (1993) ausgewertet.

Die spezifische Glukose-Isomerase Aktivität wurde durch Inkubation von Zell-Rohextrakten (200 µl) mit Substratlösung (200 µl), bestehend aus 1 M D-Glukose in 500 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,5 bei 30°C und 50°C bestimmt. Die Abhängigkeit der Aktivität von Mg^{2+}- und Co^{2+}-Ionen wurde durch Zugabe von je 5 mM $MgCl_2$ und $CoCl_2$ ermittelt. Die Ansätze wurden je nach erwarteter Aktivität bis zu zwei Stunden inkubiert und während dieser Zeit mindestens 3 Proben entnommen. Zur Vorbereitung für die nachfolgende Bestimmung der D-Glukose- und D-Fruktose-Konzentration wurde die Reaktion sofort nach Probenentnahme durch eine Proteinfällung mit 50 - 100 µl Trichloressigsäure abgestoppt und der Überstand nach Präzipitation des denaturierten Proteins mit 25 – 50 µl 10 N NaOH neutralisiert. Die D-Fruktose- und D-Glukose-Konzentrationen dieses neutralisierten Überstands wurden mit HPLC oder einem D-Glukose / D-Fruktose Test Kit von Boehringer Mannheim / R-Biopharm photometrisch bestimmt. Die Enzymaktivität wurde anhand der Konzentration der bebildeten D-Fruktose und des eingesetzten Proteins berechnet.

Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford (1976) mit dem Bio-rad Protein Assay nach Herstellerangaben mit Rinderserumalbumin als Standard bestimmt.

2.2.3 Quantifizierung von intrazellulären Pyridinnukleotidpools

Die Größe des intrazellulären Pyridinnukleotidpools wurden nach der Methode von Bernofsky und Swan (1973), modifiziert nach Leonardo *et al.* (1996) und San *et al.* (2002), bestimmt. Dazu wurden die rekombinanten *E. coli* Zellen nach der Expression und Ernte zu 3 g_{ZTM} / l in Kaliumphosphatpuffer, pH 6,5 resuspendiert, die daraus entnommene Zellsuspensionsprobe als Zeitpunkt t_0 zur Bestimmung des intrazellulären NAD(H) Pools gewählt und der resultierende intrazelluläre NAD(H) Pool als 100% definiert. Nach der Probenentnahme wurden die Zellen erneut präzipitiert, in Biotransformationslösung zu 3 g_{ZTM} / l resuspendiert und nach 10, 20, 60 und 120 min Proben der Zellsuspension entnommen. Alle entnommenen Zellsuspensionen wurden sofort nach Entnahme präzipitiert, der Überstand entfernt, die Zellen bei -196°C gefroren und bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C gelagert.

Zur Vorbereitung der Proben für die Bestimmung des intrazellulären NAD^+-Pools wurden die präzipitierten Zellen in 300 µl 0,2 M HCl resuspendiert und zum Aufschluss für 10 min bei 50°C inkubiert. Nach Abkühlen der Probe auf 0°C wurde der pH-Wert der Probe durch tropfenweise Zugabe von 300 µl 0,1 M NaOH Lösung auf 5,0 eingestellt und die Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 10 000 *g* für 5 min abgetrennt. Die Probenvorbereitung zur Bestimmung des NADH-Pools erfolgte analog. Es wurde jedoch zum Zellaufschluss 300 µl 0,2 M NaOH verwendet und der pH-Wert nach dem Aufschluss mit 300 µl 0,1 M HCl auf 9,0 eingestellt. Ein 1 ml Testansatz enthielt 50 µl Probe, 300 µl H_2O, 50 µl Hefe Alkohol Dehydrogenase II (20 Units) in 0,1 M Bicin, pH 8,0 und 600 µl Reagenz-Mix. Dieser enthielt 16 % (vol) Ethanol, 7,0 mM EDTA, pH 8,0, 0,7 mM 3-[4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) und 2,8 mM Phenazin-Ethosulfat (PES) in 170 mM Bicin, pH 8,0. Es wurde die Extinktionszunahme bei 570 nm bei 30 °C für 10 min gemessen. Der resultierenden Gradensteigung (ΔE/min) wurde eine entsprechende NAD(H) Konzentration einer externen Standardisierung zugeordnet. Alle Messungen der NAD(H) Pools wurden mit und ohne entsprechende interne Standards als Doppelbestimmung durchgeführt.

2.2.4 Bestimmung der Zelltrockenmasse

Die Bestimmung der Zelltrockenmasse von *E. coli* erfolgte nach Gerhardt *et al.* (1981) Dazu wurden 2 mal 2 g Zellfeuchtmasse mittels Zentrifugation bei 10 000 *g* und 4°C für 5 min präzipitiert und auf einem bei 100 °C gelagerten Filterpapier mit bekanntem Gewicht für 72 Stunden bei 100 °C getrocknet und anschließend mit einer Feinwaage die resultierende Zelltrockenmasse bestimmt.

2.3 Kultivierung von Bakterien und Ganzzell-Biotransformation

2.3.1 Zellkultivierung von *E. coli* und Expression rekombinanter Proteine

Zur Isolierung von DNA wurden jeweils Einzelkolonien in 5 ml LB – Medium und den entsprechenden Antibiotika zur Plasmidselektion (Tab. 5) inokuliert und über Nacht bei 37°C und 170 Upm inkubiert. Für Expressionsexperimente und Ganzzell-Biotransformationen wurden Einzelkolonien in 25 ml LB – Medium mit 0,4% (w/v) D-Glukose und den entsprechenden Antibiotika zur Plasmidselektion (Tab. 5) mit einer Einzelkolonie inokuliert und über Nacht bei 30°C und 180 Upm inkubiert.

Die resultierenden Vorkulturen dienten zur Inokulation der Hauptkulturen in 50 ml des gleichen Mediums zu einer optischen Dichte OD_{600} von 0,1. Es folgte eine Inkubation bei 30°C und 180 Upm. Nach Erreichen einer optischen Dichte OD_{600} von 0,5 erfolgte die Expression der rekombinanten Gene durch Zugabe von IPTG mit einer Endkonzentration 0,7 mM. Die Expression der rekombinanten Enzyme erfolgte bei 27°C und 200 Upm für 4 Stunden. Größere Zellmassen für den Einsatz in Ganzzell-Biotransformationen wurden durch die parallele Kultivierung identischer Kulturen im 50 ml Maßstab gewonnen.

Tab. 5: Verwendete Antibiotika zur Plasmidselektion

Antibiotikum	**selektierte Plasmide**	**Endkonzentration**
Kanamycin (in H_20)	pET24a(+) und Derivate	50 µg / ml
Carbenicillin (in H_20)	p*Lmdh* (pUC18 Derivat); pMcFDH (pUC119 Derivat); pRA4 (pBR322 Derivat); pQE80L und Derivate; pBtac2 und Derivate	50 µg / ml
Chloramphenicol (in Ethanol)	pZY507 *glf* (pACYC Derivat)	25 µg / ml
Streptomycin (in H_20)	pCDF Duett-1 und Derivate	50 µg / ml

2.3.2 Zellernte

Zur Zellernte wurden die Zellsuspensionen wurden bei 10 000 *g* und 4°C für 5 min zentrifugiert und das überstehenden Kulturmedium verworfen. Anschließend wurde das Pellet mit 20 ml 100 mM KP_i-Puffer, pH 6,5 gewaschen und erneut bei 10 000 *g* und 4°C für 5 min zentrifugiert. Zellpellets für Ganzzell-Biotransformationen wurden sofort weiterverwendet. Die Lagerung von Zellpellets zur weiteren Verwendung bei Zellaufschlüssen erfolgte bei -20°C.

2.3.3 Ganzzell-Biotransformation

Experimente mit dem Substrat D-Fruktose

Gewaschene Zellpellets verschiedener *E. coli* Stämme wurden zu Zellkonzentrationen von 1,5, 3 oder 6 g_{ZTM} / l in Biotransformationslösung resuspendiert und bei 30°C Inkubiert. Die Biotransformationslösungen enthielten 500 mM D-Fruktose und 500 mM Natrium-Formiat in 100 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,5 für Schüttelkolbenexperimente oder 500 mM D-Fruktose und 250 mM Natrium-Formiat in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,5 für Bioreaktorexperimente. Abweichungen von dieser Experimentdurchführung und die unterschiedlichen Inkubationszeiten sind gesondert beschrieben.

Experimente mit dem Substrat D-Glukose

Gewaschene Zellpellets verschiedener *E. coli* Stämme wurden zu Zellkonzentrationen von 3 oder 5 g_{ZTM} / l in Biotransformationslösung resuspendiert und bei 37°C Inkubiert. Die Biotransformationslösung enthielt 1 M D-Glukose, 500 mM Natrium-Formiat und je 5 mM $MgCl_2$, $CoCl_2$ und NAD^+ in 100 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5 für Schüttelkolben- und Bioreaktorexperimente. Abweichungen von dieser Experimentdurchführung und die unterschiedlichen Inkubationszeiten sind gesondert beschrieben. Diese Anpassung der Reaktionsbedingungen im Vergleich zu den Experimenten mit dem Substrat D-Fruktose erfolgte aufgrund der Eigenschaften der Glukose-Isomerasen, die erst bei höheren Temperaturen, pH-Wert, Substratkonzentrationen und der Anwesenheit der entsprechenden Ionen eine erhöhte Aktivität besitzen (Chen, 1980 a/b; Bhosale *et al.*, 1996). Darüber hinaus wurden NAD^+ zum Startzeitpunkt zugegeben, da dies die Reduzierung des NAD(H)-Pools kompensierte und zu einer Stabilisierung der spezifischen Produktivität und damit zu einer verlängerten Reaktionszeit führte.

Den Experimenten mit *E. coli* BL21 (DE3) pET24 *fdh mdh* pZY507 *glf* und Glukose-Isomerasen im Biotransformationsansatz wurden entweder 2 g / l Glukose-Isomerase aus *Streptomyces rubiginosus* oder 200 g / l Sweetzyme IT® (darin 1% – 10% Enzymprotein Glukose-Isomerase nach Herstellerangaben) zugegeben.

Regulation des pH-Werts und Substratzudosierung

Die Regulation des pH-Wertes und die Dosierung von Substraten während der Ganzzell-Biotransformationen wurden mit dem Titration Manager TIM 856 von Radiometer Analytical (Lyon, Frankreich) und der dazugehörigen Software durchgeführt. Als Titrant diente 3 M Ameisensäure oder eine Lösung aus 3 M Ameisensäure und 3 M D-Fruktose.

2.3.4 HPLC Analysen

Die Quantifizierung von D-Glukose, D-Fruktose, D-Mannitol und Natrium Formiat erfolgte mit dem HPLC System der Firma Merck / Hitachi (L7000 Serie). Dabei wurde D-Mannitol, D-Fruktose und D-Glukose mit einer Biorad-Säule HPX-87C 300×7.8 mm bei 70°C mit H_2O als Eluent und Natrium-Formiat mit einer Biorad-Säule HPX-87H 300×7.8 mm bei 65°C mit 6 mM H_2SO_4 als Eluent analysiert. Die Flussrate war in beiden Fällen 6 ml / min. Die Detektion der Substanzen erfolgte durch einen photometrischen Detektor bei 190 nm (UV) und im Fall der Zucker / Zuckeralkohole zusätzlich durch einen Brechungsindex-Detektor (RI). Die entsprechenden Retentionszeiten sind der Tab. 6 zu entnehmen. Für alle analysierten Substanzen wurden Reinsubstanzlösungen und Substanzgemischlösungen im Bereich von 1 – 10 g / l in 100 mM KP_i-Puffer als Konzentrationsstandards eingesetzt. Proben der Ganzzell-Biotransformationen (1 ml) wurden 1 min bei 10 000 *g* zentrifugiert und der Überstand steril filtriert. Die resultierenden Lösungen wurden vor der HPLC Analyse in den Konzentrationsbereich der Standards verdünnt.

Tab. 6: Retentionszeiten von D-Glukose, D-Fruktose, D-Mannitol und Natrium-Formiat bei HPLC Analysen bei der Detektion bei 190 nm (UV). Die Retentionszeiten bei der Detektion mittels Brechungsindex (RI) waren um 30 s verzögert.

Substanz	**Retentionszeit [min] (+/- 0,05)**
D-Glukose	10,23
D-Fruktose	13,34
D-Mannitol	17,88
Natrium-Formiat	12,80

2.4 Nukleotidsequenzen

Die Nukleotid Sequenzen der in dieser Arbeit genutzten Gene sind unter den folgenden GenBank „nucleotide accession numbers“ verfügbar:

- *mdh* aus *Leuconostoc pseudomesenteroides* ATCC12291: AJ486977
(Hahn *et al.,* 2003);

- *fdh* aus *Mycobacterium vaccae* N10: AB072394
(Galkin *et al.,* 1995);

- *glf* aus *Zymomonas mobilis*: M37982
(Barnell e*t al.,* 1990) ;

- *xylA* aus *Escherichia coli*: K01996
(Lawlis *et al.,* 1984; Schellenberg *et al.,*1984)

- *xylA* aus *Actinoplanes missouriensis*: X16042
(Amore und Hollenberg, 1989)

- *xylA* aus *Arthrobacter* sp. NRRL B-3728: X59466
(Loviny-Anderton *et al.,* 1991)

III Ergebnisse

1 Mannitol-2-Dehydrogenase aus *Leuconostoc pseudomesenteroides* in *E. coli*

Ziel der Arbeit war die Konstruktion von D-Mannitol bildenden *E. coli* Stämmen, die dazu als Substrat entweder D-Fruktose oder D-Glukose nutzen. Heterofermentative Milchsäurebakterien reduzieren D-Fruktose zu D-Mannitol durch eine Mannitol-2-Dehydrogenase. Da *E. coli* keine Mannitol-2-Dehydrogenase Aktivität besitzt, war der erste Schritt zur Konstruktion eines rekombinanten *E. coli* Stammes zur D-Mannitol Bildung die Expression einer rekombinanten Mannitol-2-Dehydrogenase. Eine Mannitol-2-Dehydrogenase mit vergleichsweise hoher spezifischer Aktivität war aus *Leuconostoc. pseudomesenteroides* ATCC 12291 isoliert, und das entsprechende Gen (*mdh*) innerhalb eines 4,2 kb großen Fragments genomischer DNA auf dem Plasmid p*Lmdh* lokalisiert worden (Hahn *et al.,* 2003).

1.1 Klonierung des Mannitol-2-Dehydrogenase Gens aus *L. pseudomesenteroides* und Expression des Enzyms in *E. coli*

Da sich stromaufwärts des *mdh* Gens auf dem Plasmid p*Lmdh* kein für *E. coli* geeigneter Promotor befindet, ist dieses Plasmid für die Expression der Mannitol-2-Dehydrogenase aus *L. pseudomesenteroides* in *E. coli* ungeeignet. Daher wurde das *mdh* Gen, ausgehend vom Plasmid p*Lmdh* mit den sequenzspezifischen Oligonukleotidprimern *mdh-Nde*I-f / *mdh-Xho*I-r amplifiziert und über die angefügten Restriktionsschnittstellen 5'-*Nde*I / 3'-*Xho*I in das *E. coli* Expressionsplasmid pET24a(+) hinter einen *T7*-Promotor kloniert. Das so konstruierte Plasmid pET24 *mdh* (Abb. 1) wurde nach Überprüfung der erfolgreichen Klonierung durch Restriktionsanalyse in den *E. coli* Stamm BL21 (DE3) transformiert. Dieser Stamm besitzt eine chromosomal integrierte Kopie des T7 RNA Polymerase Gens. Nach Expression der T7 RNA Polymerase erkennt diese den *T7*-Promotor des pET-Plasmids und transkribiert die stromabwärts des *T7*-Promotors gelegenen Gene, was letztlich zu einer Überexpression der darin kodierten Proteine führt (Studier und Moffatt, 1986).

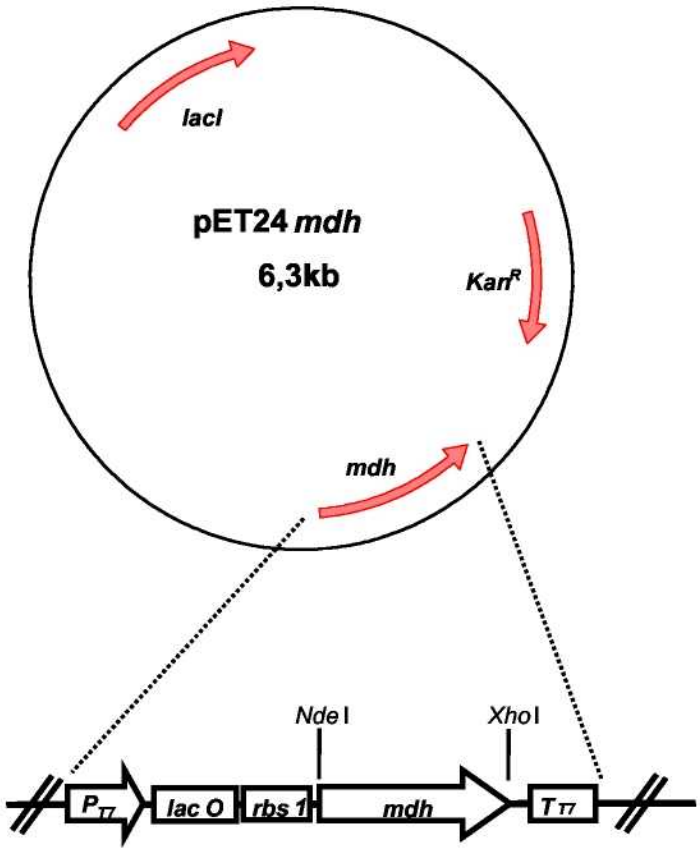


Abb. 1: Plasmid pET24 *mdh* bestehend aus *T7* Promotor (P_{T7}), *lac* Operator (*lac O*), pET24a(+) kodierte Ribosomen Bindestelle (*rbs* 1), Mannitol-2-Dehydrogenase-Gen aus *L. pseudomesenteroides* ATCC 12291 (*mdh*) und *T7* Terminator (T_{T7}).

Expressionsexperimente mit dem *E. coli* Stamm BL21 (DE3) pET24 *mdh* und dem Kontrollstamm *E. coli* BL21 (DE3) pET24a(+) ohne *mdh*-Gen zeigten eine IPTG induzierbare Expression der Mannitol-2-Dehydrogenase in *E. coli* BL21 (DE3) pET24 *mdh* (Abb. 2). Es wurde dabei eine Enzymaktivität von mindestens 35 U x $(mg_{Protein})^{-1}$ im *E. coli* Zell-Rohextrakt erzielt.

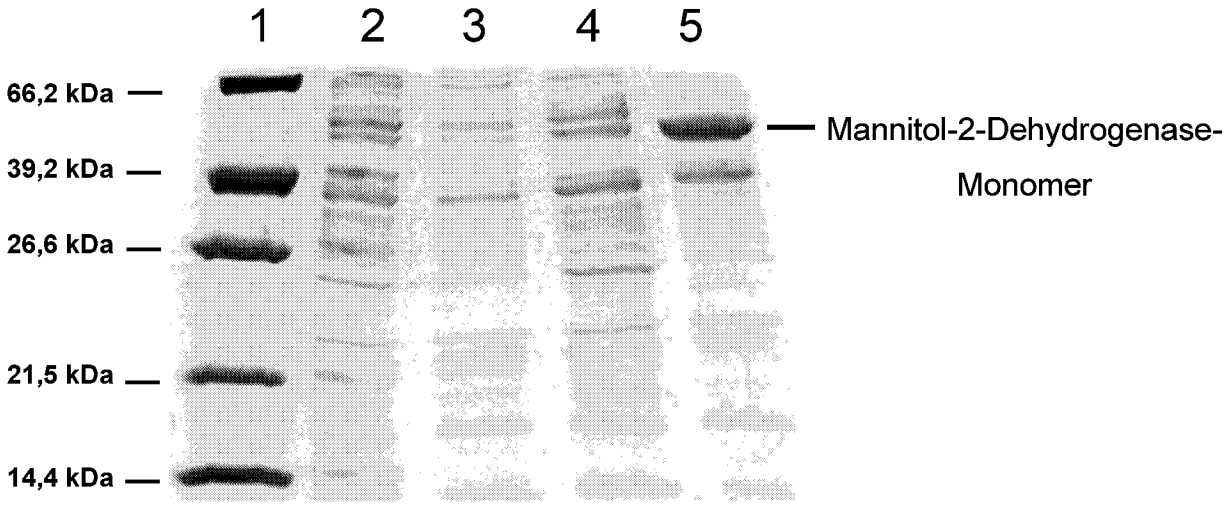
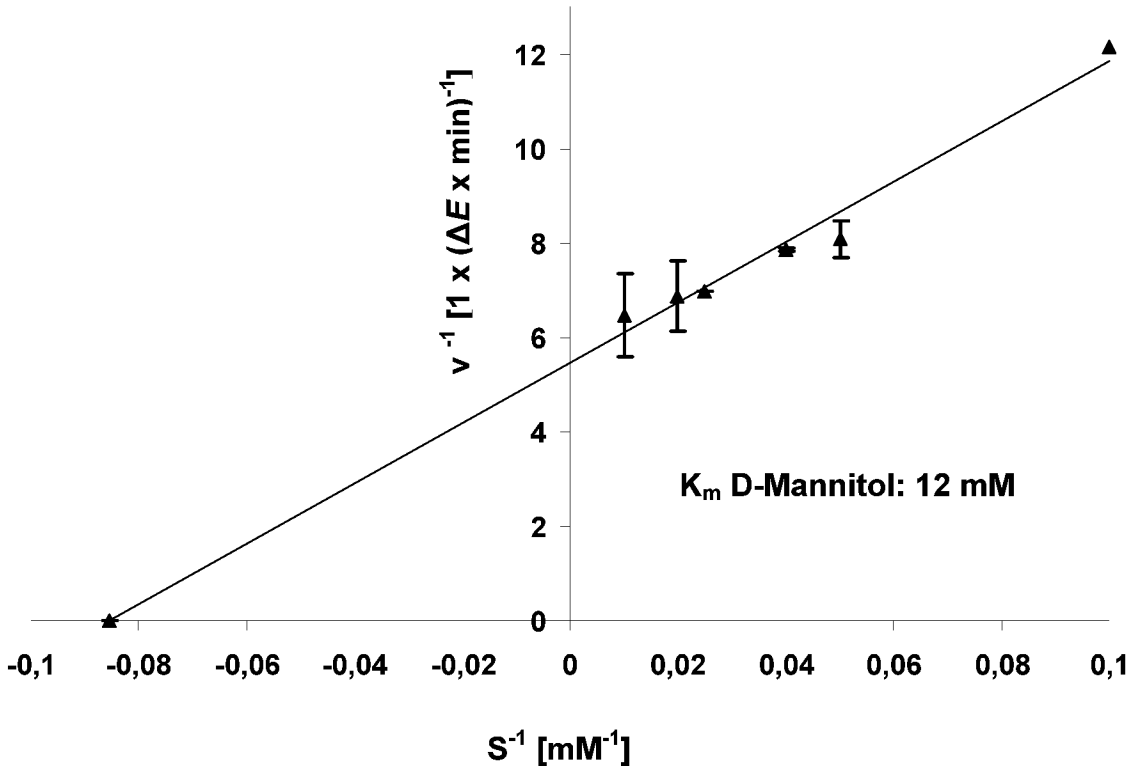


Abb. 2: SDS-PAGE Analyse von Zell-Rohextrakten verschiedener *E. coli* Stämme. Spur 1: Protein-Größenmarker; Spur 2: *E. coli* BL21 (DE3) pET24 (uninduziert); Spur 3: *E. coli* BL21 (DE3) pET24 (induziert); Spur 4: *E. coli* BL21 (DE3) pET24 *mdh* (uninduziert); Spur 5: *E. coli* BL21 (DE3) pET24 *mdh* (induziert).

1.2 Katalytische Eigenschaften der Mannitol-2-Dehydrogenase aus *L. pseudomesenteroides*

Bevor der *E. coli* Stamm mit Mannitol-2-Dehydrogenase in Ganzzell-Biotransformationsexperimenten zum Einsatz kam wurden einige katalytische Eigenschaften des rekombinanten Enzyms bestimmt, die für die D-Mannitol Bildung von Bedeutung sind. Dazu gehörten Substrat- und Kofaktor-Affinität, Produktinhibition sowie Ionen- und pH-Wert Abhängigkeit der Aktivität.

Für die durch die Mannitol-2-Dehydrogenase katalysierte Reaktion D-Fruktose + NADH ↔ D-Mannitol + NAD^+ ist die Affinität des Enzyms zu den Substraten und Kofaktoren von Bedeutung. Entsprechende Analysen ergaben K_m-Werte von 44 mM für D-Fruktose und 12 mM für D-Mannitol (Abb. 3 A) bzw. 93 µM für NADH und 201 µM für NAD^+ (Abb. 3 B).



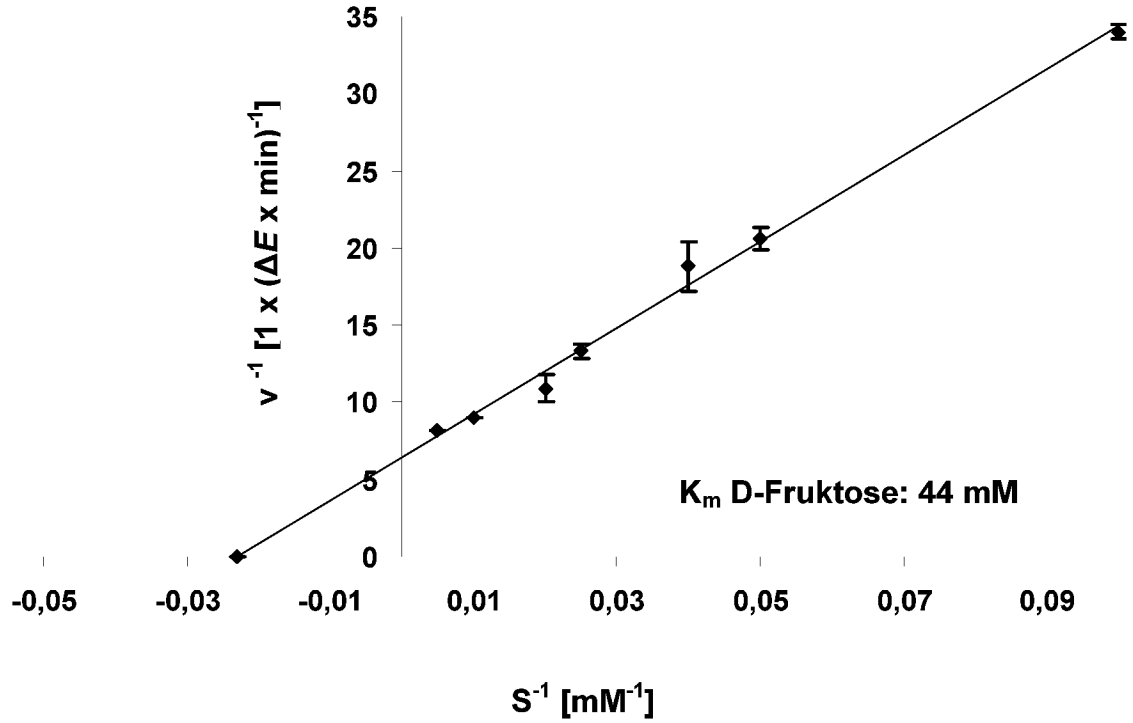
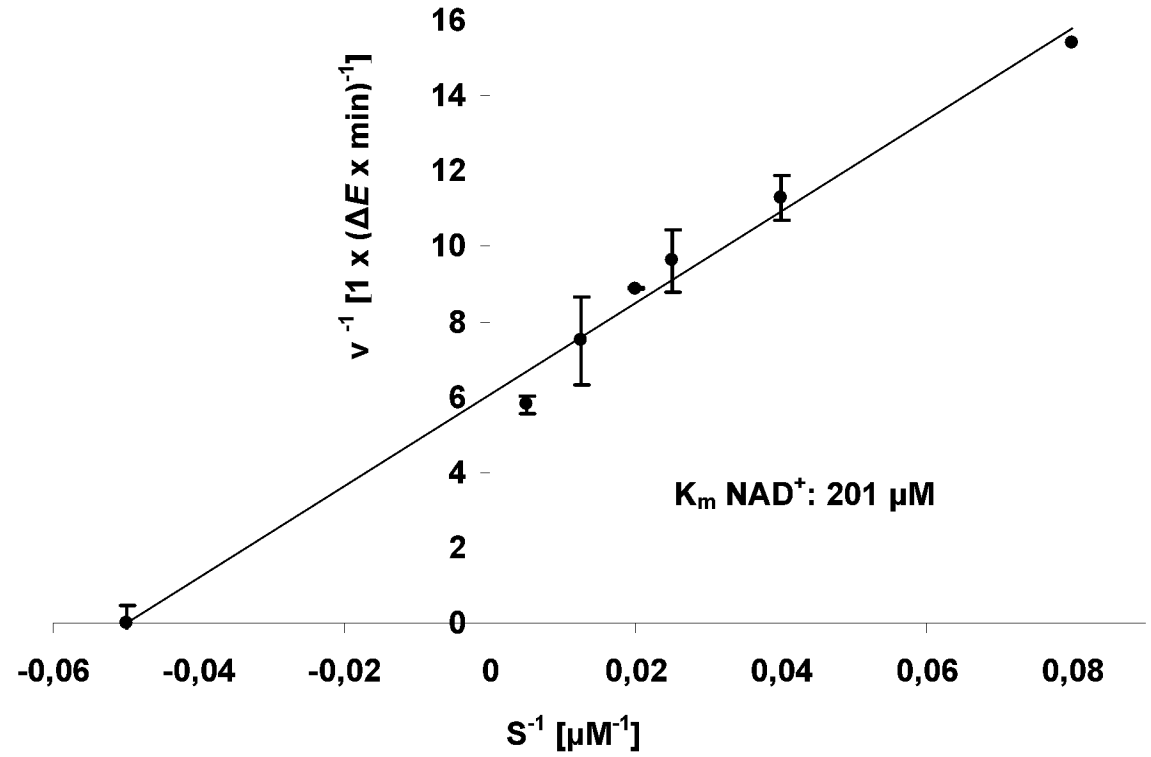


Abb. 3 A: Lineweaver-Burk Diagramme der Aktivität der Mannitol-2-Dehydrogenase bei verschiedenen Konzentrationen von D-Mannitol und D-Fruktose und die daraus ermittelten K_m-Werte.



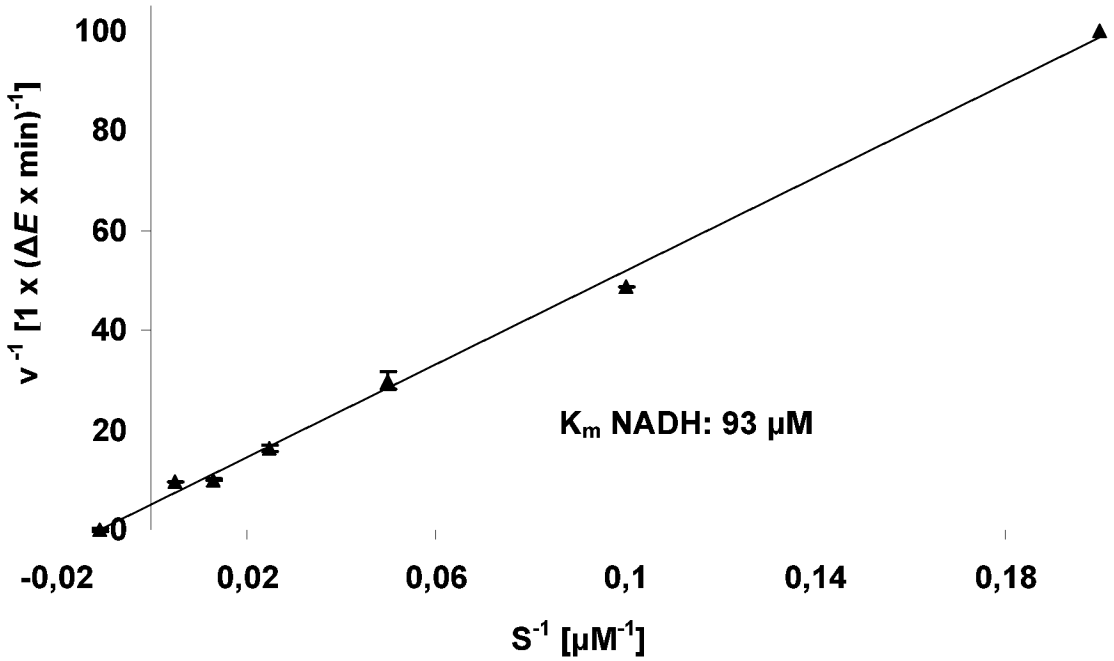


Abb. 3 B: Lineweaver-Burk Diagramme der Aktivität der Mannitol-2-Dehydrogenase bei verschiedenen Konzentrationen von NAD^+ und NADH und die daraus ermittelten K_m-Werte.

Der Vergleich der K_m-Werte für D-Mannitol der Mannitol-2-Dehydrogenasen aus *L. pseudomesenteroides* (12 mM) und *Pseudomonas fluorescens* (2 mM) zeigt eine 6–fach geringere D-Mannitol Affinität der Mannitol-2-Dehydrogenase aus *L. pseudomesenteroides* gegenüber dem Enzym aus *P. fluorescens* (Bruenker *et al.*, 1997). Die spezifische Aktivität der D-Fruktose Reduktion der Mannitol-2-Dehydrogenase aus *L. pseudomesenteroides* (450 U x $(mg_{Protein})^{-1}$) ist 8-fach höher als die des Enzyms aus *P. fluorescens* (55 U x $(mg_{Protein})^{-1}$) (Bruenker *et al.*, 1997; Hahn *et al.,* 2003). Dies deutet darauf hin, dass die rekombinante Mannitol-2-Dehydrogenase aus *L. pseudomesenteroides* in *E. coli* für die Katalyserichtung D-Fruktose → D-Mannitol, insbesondere bei D-Fruktose-Überschuss, besser geeignet ist als das Enzym aus *P. fluorescens*, welches bei der enzymatischen D-Mannitol Bildung eingesetzt wurde (Slatner *et al.,* 1998 a/b).

Die hohe Aktivität der Mannitol-2-Dehydrogenase *L. pseudomesenteroides* in *E. coli* sollte im Verlauf einer Biotransformation zur Akkumulation von D-Mannitol führen. Es wurden daher Untersuchungen zur Inhibition der Mannitol-2-Dehydrogenase durch D-Mannitol durchgeführt. Ein Lineweaver-Burk Diagramm der ermittelten Daten zeigt, dass sich mit ansteigender D-Mannitol Konzentration die Affinität des Enzyms für das Substrat D-Fruktose verringert (Abb. 4A). Der beobachtete Effekt entspricht einer kompetitiven Hemmung der D-Fruktose Reduktion durch D-Mannitol (Segel, 1993). Die Auftragung der apparenten K_m-Werte des Lineweaver-Burk Diagramms gegen die D-Mannitol Konzentration (Abb. 4B) bzw. der Steigungen aus dem Lineweaver-Burk Diagramm gegen die D-Mannitol Konzentration (Abb. 4C) ergeben einen Durchschnittswert der Inhibitionskonstante (K_i-Wert) für D-Mannitol von 71 mM.

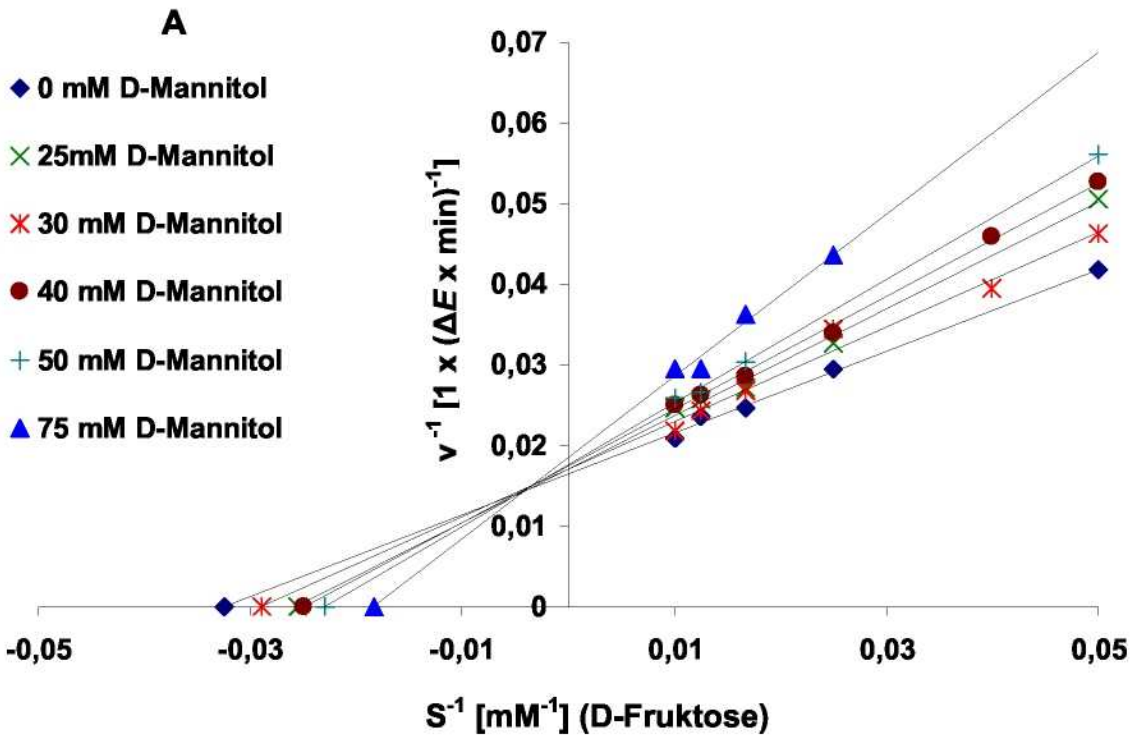


Abb. 4A: Inhibition der D-Fruktose Reduktion der rekombinanten Mannitol-2-Dehydrogenase aus *L. pseudomesenteroides* durch D-Mannitol. Lineweaver-Burk Diagramm einer Enzymaktivitäts-Kurvenschar mit ansteigenden Konzentrationen des Inhibitors D-Mannitol.

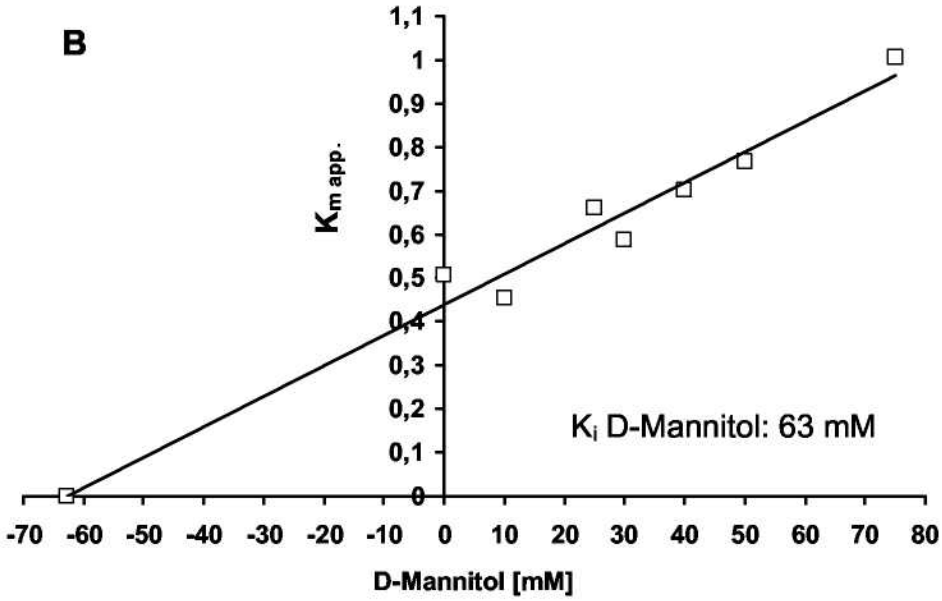


Abb. 4B: Auftragung der apparenten K_m-Werte des Lineweaver-Burk Diagramms aus Abb. 4A gegen die D-Mannitol Konzentration (□) zur Ermittlung der Inhibitionskonstante der Mannitol-2-Dehydrogenase (K_i).

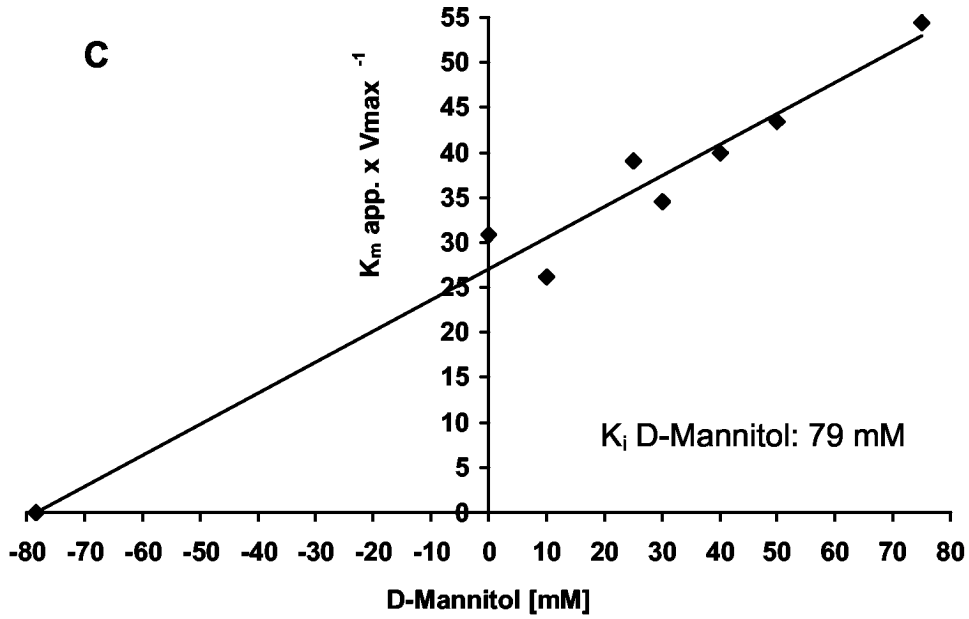


Abb. 4C: Auftragung der Steigungen aus dem Lineweaver-Burk Diagramm aus Abb. 4A gegen die D-Mannitol Konzentration (♦) zur Ermittlung der Inhibitionskonstante der Mannitol-2-Dehydrogenase (K_i).

In der Ganzzell-Biotransformation sollte ein Mannitol-2-Dehydrogenase exprimierender *E. coli* Stamm als ruhende Zellen eingesetzt werden. Die Stoffwechselleistung der Zellen konnte dabei im Verlauf der Reaktion abnehmen. Unter Umständen reduzierten sich damit auch die Reaktionen, die zur Aufrechterhaltung des intrazellulären pH-Werts beitragen, so dass sich der intrazelluläre pH-Wert dem der umgebenden Lösung anglich. Daher wurden Untersuchungen zur pH-Abhängigkeit der Enzymaktivität der Mannitol-2-Dehydrogenase aus *L. pseudomesenteroides* im Bereich von pH 5,0 bis 7,5 durchgeführt. Diese ergaben ein breites pH-Optimum mit einem Aktivitätsmaximum zwischen pH 5,5 und 6,0 (Abb. 5A). Des Weiteren konnte keine irreversible Verringerung der Aktivität durch Inkubation des Enzyms bei pH-Werten im Bereich von pH 5,0 bis 7,5 festgestellt werden (Abb. 5B). Zur Inkubation von Mannitol-2-Dehydrogenase exprimierenden *E. coli* stellte sich daher ein pH-Wert im Bereich von 6,0 als geeignet heraus.

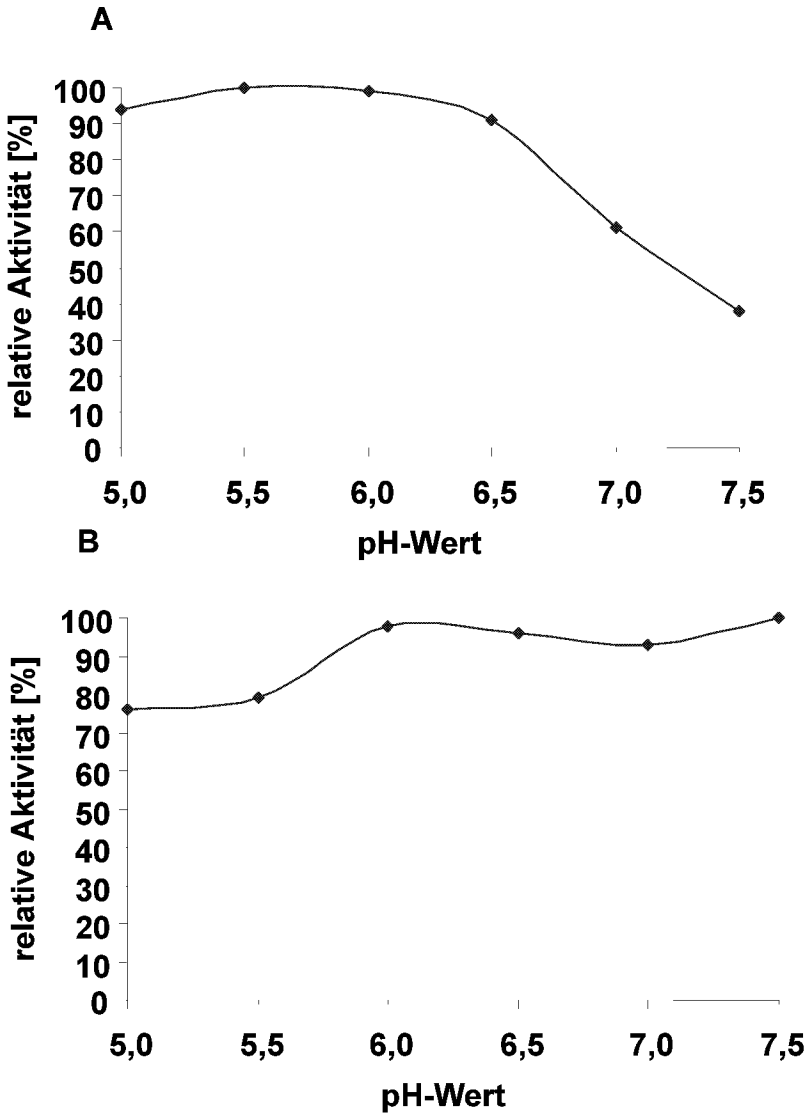


Abb 5: A) Aktivität der rekombinanten Mannitol-2-Dehydrogenase aus *L. pseudomesenteroides* bei verschiedenen pH-Werten (♦). B) Aktivität der rekombinanten Mannitol-2-Dehydrogenase aus *L. pseudomesenteroides* bei pH 6,0 nach 20 min Inkubation bei verschiedenen pH Werten (♦).

Die Mannitol-2-Dehydrogenase aus *L. pseudomesenteroides* ist *in vivo* ein Tetramer und gehört zur Gruppe der „medium chain reductases" (MDR), wie beispielsweise die Sorbitol-Dehydrogenase der Ratte, deren Aktivität von Zn^{2+}-Ionen abhängt (Johansson *et al.,* 2001; Hahn *et al.,* 2003). Eine entsprechende Analyse zeigte auch eine Zn^{2+}-abhängige Enzymaktivität der Mannitol-2-Dehydrogenase (Hahn *et al.,* 2003; Abb. 6). Durch die Zugabe von EDTA im Konzentrationsbereich von 0,5 – 2,0 mM und einer darauf folgende 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die zweiwertigen Ionen in Zell-Extrakten mit Mannitol-2-Dehydrogenase komplexiert.

Dies führte zu einem Verlust der Enzymaktivität, der nur durch die Zugabe äquimolarer Konzentrationen von Zn^{2+}-Ionen, nicht aber anderer zweiwertiger Ionen aufgehoben werden konnte (Abb. 6; Hahn *et. al.,* 2003). Die Zn^{2+}-Abhängigkeit der Mannitol-2-Dehydrogenase aus *L. pseudomesenteroides* unterscheidet das Enzym von anderen bakteriellen Mannitol-2-Dehydrogenasen, wie den Enzymen aus *P. fluorescens* oder *R. sphaeroides.* Die letzteren Enzyme benötigen keine Zn^{2+}-Ionen für ihre Aktivität. Außerdem zeigen Vergleiche zwischen den Aminosäuresequenzen dieser Enzyme und der Mannitol-2-Dehydrogenase aus *L. pseudomesenteroides* keine signifikante Homologie (Schneider und Giffhorn 1989; Schneider *et al.*, 1993; Bruenker *et al.*, 1997; Slatner *et al.,* 1998, 1999).

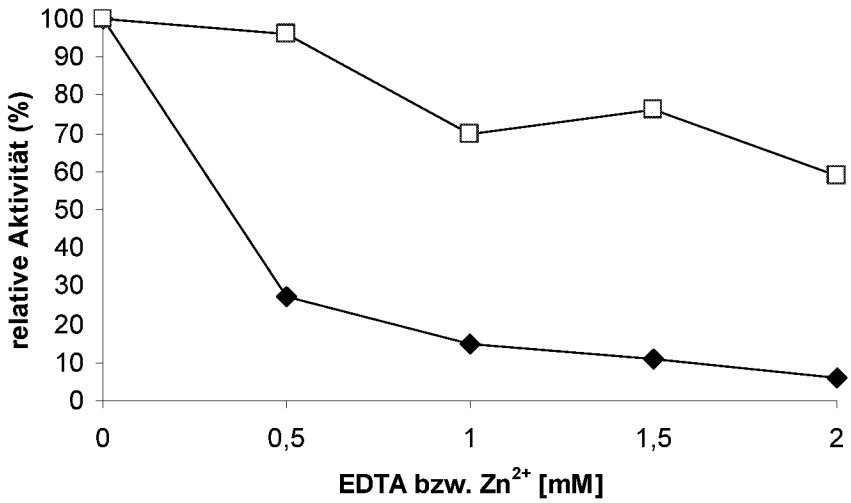


Abb. 6: Inaktivierung der Mannitol-2-Dehydrogenase von *L. pseudomesenteroides* durch EDTA (♦) und Reaktivierung des Enzyms durch Zugabe äquimolarer Konzentrationen von Zn^{2+} (□).

2. Ganzzell-Biotransformationen mit rekombinanten *E. coli* Zellen zur Bildung von D-Mannitol aus D-Fruktose

2.1 Mannitol-2-Dehydrogenase aus *L. pseudomesenteroides* in *E. coli*

Da im *E. coli* Stamm BL21 (DE3) pET24 *mdh* eine hohe der Mannitol-2-Dehydrogenase Aktivität nachgewiesen werden konnte, wurde dieser *E. coli* Stamm daraufhin auf die Fähigkeit zur D-Mannitol Bildung aus D-Fruktose in Ganzzell-Biotransformation überprüft. Dazu wurden ruhenden Zellen dieses Stammes nach Expression der rekombinanten Mannitol-2-Dehydrogenase 18 h bei 30°C in einer

gepufferten Lösung mit 500 mM D-Fruktose inkubiert. In dieser Zeit wurden zwar 57 mM des Substrats verbraucht, jedoch kein D-Mannitol in den Reaktionsüberstand ausgeschieden (Tab. 1). Die fehlende D-Mannitol Bildung resultierte nicht aus einem Aktivitätsverlust der Mannitol-2-Dehydrogenase, da nach 18 h Inkubation noch 70 – 80% der Ausgangsaktivität in Extrakten der eingesetzten Zellen vorhanden war.

2.2 Mannitol-2-Dehydrogenase aus *L. pseudomesenteroides* und Formiat-Dehydrogenase aus *Mycobacterium vaccae* in *E. coli*

Arbeiten zu reduktiven Ganzzell-Biotransformationen mit rekombinanten *E. coli* Stämmen verdeutlichen den Einfluss einer NAD(P)H-Regeneration durch überexprimierte Glukose-Dehydrogenase aus *Bacillus megaterium* oder Formiat-Dehydrogenase aus *Mycobacterium vaccae* N10 auf die Produktbildung (Galkin *et al.,* 1997; Kataoka *et al.,* 1999). Auch bei der enzymatischen Synthese von D-Mannitol mit isolierter Mannitol-2-Dehydrogenase aus *P. fluorescens* wurde durch die gleichzeitige Aktivität der Formiat-Dehydrogenase aus *Candida boidinii* effizient NADH regeneriert (Slatner *et al.,* 1998b). Allerdings besitzt die Formiat-Dehydrogenase aus *C. boidinii* (2,4 U x $(mg_{Protein})^{-1}$) eine im Vergleich zur Formiat-Dehydrogenase aus *M. vaccae* (14,0 U x $(mg_{Protein})^{-1}$) niedrige spezifische Aktivität. (Schütte *et al.,* 1976; Popov und Lamzin, 1994; Galkin *et al.,* 1995). Daher wurde auch für den Mannitol-2-Dehydrogenase exprimierenden *E. coli* Stamm zur Kofaktor-Regeneration die Formiat-Dehydrogenase aus *M. vaccae* ausgewählt. Diese Formiat-Dehydrogenase wurde zunächst, ausgehend von dem Plasmid pMcFDH (Galkin *et al.,* 1995), in *E. coli* BL21 (DE3) mit einer spezifischen Aktivität von 1,2 U x $(mg_{Protein})^{-1}$ in Zell-Rohextrakten nach IPTG Induktion exprimiert. Sowohl das Plasmid pET24 *mdh* als auch das Plasmid pMcFDH besitzen den *ColE1* Replikations-ursprung. Aus der daraus resultierenden Plasmidinkompatibilität ist das Plasmid pMcFDH für eine stabile Etablierung durch Kotransformation in *E. coli* BL21 (DE3) pET24 *mdh* nicht geeignet. Eine gleichzeitige, stabile Expression von Mannitol-2-Dehydrogenase und Formiat-Dehydrogenase in *E. coli* ist mit dieser Plasmid-kombination demnach nicht zu erreichen. Daher wurde ein Expressionsplasmid, kodierend sowohl für die Mannitol-2-Dehydrogenase aus *L. pseudomesenteroides*, als auch für die Formiat-Dehydrogenase aus *M. vaccae* konstruiert. Dazu wurde zunächst das *mdh*-Gen mit seiner Wildtyp-Ribosomenbindestelle mittels der

sequenzspezifischen Oligonukleotidprimer *mdh-Sac*I-f / *mdh-Xho*I-r, ausgehend von dem Plasmid p*Lmdh,* amplifiziert. Die so an das *mdh*-Gen angefügten Restriktionsschnittstellen 5'-*Sac*I / 3'-*Xho*I dienten zur Klonierung in das Plasmid pET24a(+). In das so konstruierte Plasmid pET24 *mdh* b wurde stromaufwärts der Wildtyp-Ribosomenbindestelle des *mdh*-Gens das *fdh*-Gen kloniert. Dazu wurde das *fdh*-Gen mittels der sequenzspezifischen Oligonukleotidprimer *fdh-Nde*I-f / *fdh-Bam*HI-r, ausgehend von dem Plasmid pMcFDH amplifiziert. Die an das *fdh*-Gen angefügten Restriktionsschnittstellen 5'-*Nde*I / 3'- *Bam*HI wurden zur Klonierung in das Plasmid pET24 *mdh* b genutzt. Das so konstruierte Plasmid pET24 *fdh mdh* (Abb. 7) wurde in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert und Analysen zur Expression der Formiat-Dehydrogenase und Mannitol-2-Dehydrogenase durchgeführt.

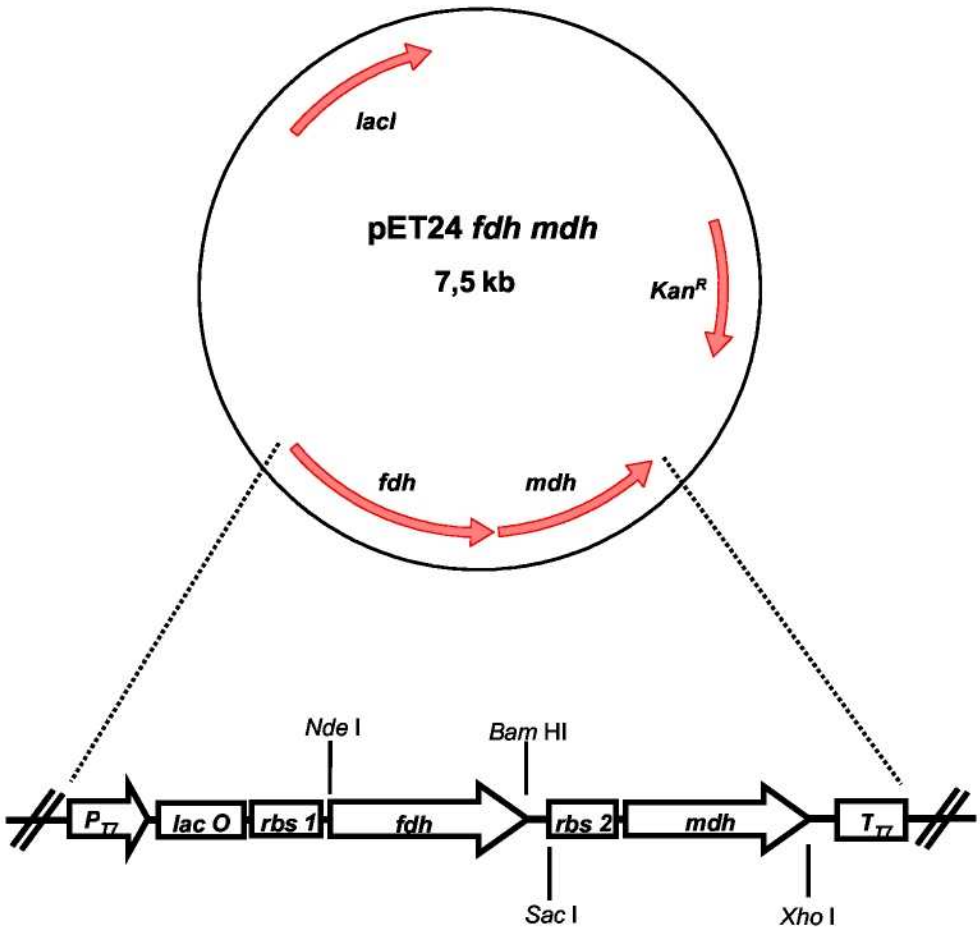


Abb. 7: Plasmid pET24 *fdh mdh* mit *T7* Promotor (P_{T7}), *lac* Operator (*lac O*), pET24a(+) kodierter Ribosomenbindestelle (*rbs* 1), Formiat-Dehydrogenase Gen aus *M. vaccae* N10 (*fdh*), Wildtyp-Ribosomenbindestelle und Mannitol-2-Dehydrogenase Gen aus *L. pseudomesenteroides* (*rbs* 2, *mdh*) und *T7* Terminator (T_{T7}).

SDS-PAGE Analysen von zellfreien Proteinextrakten des Stammes *E. coli* BL21 (DE3) pET24 *fdh mdh* zeigten eine gleichzeitige Überexpression von Formiat-Dehydrogenase und Mannitol-2-Dehydrogenase (Abb. 8). Die Formiat-Dehydrogenase hatte dabei eine spezifische Aktivität von 1,0 U x $(mg_{Protein})^{-1}$ und die Mannitol-2-Dehydrogenase von 14,0 U x $(mg_{Protein})^{-1}$. Damit war in *E. coli* BL21 (DE3) pET24 *fdh mdh* ein rekombinanter Redoxzyklus konstruiert worden, der sowohl Enzymaktivitäten zur D-Mannitol Bildung aus D-Fruktose und NADH, als auch zur Regeneration von NADH aus Formiat und NAD^+ hat.

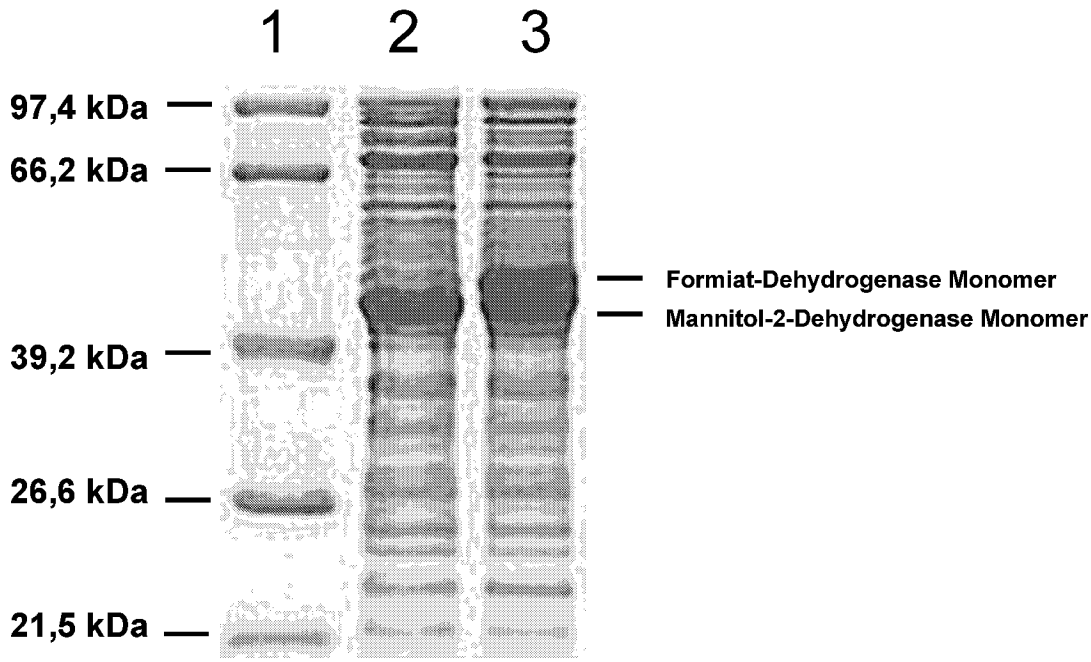


Abb. 8: SDS-PAGE Analyse von verschiedenen *E. coli* Rohextrakten. Spur 1: Protein-Größenmarker; Spur 2: *E. coli* BL21 (DE3) pET24 *mdh* (induziert); Spur 3: *E. coli* BL21 (DE3) pET24 *fdh mdh* (induziert).

Der *E. coli* Stamm BL21 (DE3) pET24 *fdh mdh* wurde daraufhin auf die Fähigkeit zur D-Mannitol Bildung in Ganzzell-Biotransformationen überprüft Dazu wurden ruhende Zellen dieses Stammes nach Expression von Mannitol-2-Dehydrogenase und Formiat-Dehydrogenase in einer gepufferten Reaktionslösung mit 500 mM D-Fruktose und 500 mM Natrium-Formiat 18 h bei 30°C inkubiert. Analysen des Reaktionsüberstands zeigten einen Verbrauch von 159 mM Formiat und 61 mM D-Fruktose aber nur eine Bildung von 15 mM D-Mannitol (Tab. 1).

2.3 Formiat-Dehydrogenase aus *M. vaccae*, Mannitol-2-Dehydrogenase aus *L. pseudomesenteroides* und Glukose-Facilitator aus *Zymomonas mobilis* in *E. coli*

Wildtyp *E. coli* Stämme nehmen Zucker, wie D-Fruktose und D-Glukose, über das Phospho*enol*pyruvat-Phosphotransferase System (PTS) auf (Kornberg *et al.,* 2000; Kornberg, 2001; Tchieu *et al.*, 2001). Die Zucker werden während der Aufnahme phosphoryliert. D-Fruktose wird in Anwesenheit höherer Konzentrationen (> 2 mM) über die Membran assoziierten Mannose-spezifischen PTS Komponenten *manXYZ* aufgenommen und zu Fruktose-6-Phosphat phosphoryliert (Kornberg *et al.,* 2000; Kornberg, 2001). Dieses Aufnahmesystem liefert intrazellulär demnach keine unphosphorylierte D-Fruktose, die das Substrat der Mannitol-2-Dehydrogenase ist und eine D-Mannitol Bildung ist nicht möglich. In Anbetracht der sehr hohen D-Fruktose Konzentrationen (500 mM) in der Substratlösung resultierte die geringe D-Mannitol Bildung möglicherweise aus einem Transport einer geringen Menge freier D-Fruktose. Hinweise für einen Import von freier D-Fruktose in *E. coli* lieferte die Untersuchung von *E. coli* Mutanten, denen die Fähigkeit zur D-Fruktose Aufnahme über die oben beschriebenen PTS-Fruktose Aufnahmesysteme fehlt (Kornberg, 2001). In diesen Mutanten gelangt die D-Fruktose über erleichterte Diffusion mittels einer Isoform des Glukose Transporters PtsG in freier Form in die Zelle und wird dort durch eine ATP-abhängige Manno(Frukto)Kinase phosphoryliert (Mak^+), die im Normalfall eine sehr geringe Aktivität besitzt (Mak-o) (Kornberg, 2001).

Der Ethanol bildenden Bakterienstamm *Zymomonas mobilis* kann sowohl D-Fruktose als auch D-Glukose mittels erleichterter Diffusion aufnehmen ohne diese Zucker dabei zu phosphorylieren. Dies geschieht durch einen Glukose-Facilitator (GLF) der auch in *E. coli* funktionell exprimiert werden konnte (Parker *et al.,* 1995; Weisser *et al.,* 1995). Die Koexpression dieses Glukose-Facilitators neben Formiat-Dehydrogenase und Mannitol-2-Dehydrogenase in *E. coli* sollte daher die intrazelluläre Konzentration unphosphorylierter D-Fruktose erhöhen und damit die D-Mannitol Bildung steigern. Das Glukose-Facilitator Gen aus *Z. mobilis* (*glf*) lag auf dem Plasmid pZY507 *glf* vor. Die Expression dieses Gens in *E. coli* geschieht durch ein induzierbares *lacI*^{q}*-tac* Promotor System (Weisser *et al.,* 1995). Da das Plasmid pZY507 *glf* einen *P15A* Replikationsursprung besitzt, gibt es keine Inkompatibilität

mit dem Plasmid pET24 *fdh mdh* mit *ColE1* Replikationsursprung. Daher konnte das Plasmid pZY507 *glf* für eine stabile Etablierung und Expression des Glukose-Facilitators in den *E. coli* Stamm BL21 (DE3) pET24 *fdh mdh* kotransformiert werden, ohne dass weitere Klonierungschritte erforderlich waren. Expressionsanalysen des *E. coli* Stammes BL21 (DE3) pET24 *fdh mdh* pZY507 *glf* ergaben Enzymaktivitäten von 1,0 U x $(mg_{Protein})^{-1}$ für die Formiat-Dehydrogenase und 13,0 U x $(mg_{Protein})^{-1}$ für die Mannitol-2-Dehydrogenase im zellfreien *E. coli* Extrakt. Die Aktivität des Glukose-Facilitators wurde nicht bestimmt. Es ist jedoch aus der Literatur bekannt, dass die Transportaktivität dieses Enzyms im Bereich von 410 – 1800 nmol x $(mg \times min)^{-1}$ liegt (Belaich *et al.*, 1968; DiMarco *et al.,* 1985, Weisser *et al.,* 1995).

Der *E. coli* Stamm BL21 (DE3) pET24 *fdh mdh* pZY507 *glf* wurde nach der Analyse der Enzymaktivitäten auf seine Fähigkeit zur D-Mannitol Bildung in Ganzzell-Biotransformationen untersucht. Ruhende Zellen dieses Stammes wurden nach Expression von Formiat-Dehydrogenase, Mannitol-2-Dehydrogenase und Glukose-Facilitator für 18 h bei 30°C in gepufferter Substratlösung mit 500 mM D-Fruktose und 500 mM Natrium Formiat inkubiert. Analysen des Reaktionsüberstands zeigten einen Verbrauch von 411 mM Formiat, 251 mM D-Fruktose und eine Bildung von 216 mM D-Mannitol im Reaktionsüberstand (Tab. 1). Die D-Mannitol Konzentration war demnach um mehr als 15-fach gegenüber der in der Ganzzell-Biotransformation mit dem *E. coli* Stamm ohne Glukose-Facilitator erhöht. Dies zeigte die Notwendigkeit des Zuckeraufnahmesystems für die D-Mannitol Bildung. Ganzzell-Biotransformations-experimente mit dem *E. coli* Stamm BL21 (DE3) pET24 *mdh* pZY507 *glf*, der nur die Mannitol-2-Dehydrogenase und den Glukose-Facilitator exprimierte führten unter gleichen Bedingungen zur Bildung von 20 mM D-Mannitol bei einem Verbrauch von 48 mM D-Fruktose und 81 mM Formiat. Diese Daten verdeutlichten, dass für eine effiziente D-Mannitol Bildung mit *E. coli* Mannitol-2-Dehydrogenase, Formiat-Dehydrogenase und Glukose-Facilitator essentiell sind. In dem *E. coli* Stamm BL21 (DE3) pET24 *fdh mdh* pZY507 *glf* wurde folglich ein funktionsfähiger Stoffwechselweg zur D-Mannitol Bildung, bestehend aus Formiat-Dehydrogenase, Mannitol-2-Dehydrogenase und Glukose-Facilitator konstruiert. Daher wurde dieser Stamm für weitere Analysen zur D-Mannitol Bildung in Ganzzell-Biotransformationen ausgewählt.

Tab. 1: D-Mannitol Bildung, D-Fruktose- und Natrium-Formiat Verbrauch nach 18 Stunden Ganzzell-Biotransformation mit verschiedenen, rekombinanten *E. coli* Stämmen (3 g_{ZTM} / l).

E. coli BL21 (DE3)	D-Mannitol Bildung [mM]	D-Fruktose Verbrauch [mM]	Formiat Verbrauch [mM]
pET24 *mdh*; + IPTG	0	57	35
pET24 *mdh*; - IPTG	0	n.d.	n.d.
pMcFDH; +/- IPTG	0	n.d.	n.d.
pZY507 *glf*; +/- IPTG	0	n.d.	n.d.
pET24 *mdh*; pZY507 *glf*;+ IPTG	20	48	81
pET24 *mdh*; pZY507 *glf* ; - IPTG	0	n.d.	n.d.
pET24 *fdh mdh*; + IPTG	15	61	159
pET24 *fdh mdh*; - IPTG	0	n.d.	n.d.
pMcFDH; pZY507 *glf*; +/- IPTG	0	n.d.	n.d.
pET24 *fdh mdh*; pZY507 *glf* ; + IPTG	216	251	411
pET24 *fdh mdh*; pZY507 *glf* ; - IPTG	0	n.d.	n.d.
pET24 *fdh mdh*; pZY507 *glf* ; + IPTG / - Formiat	11	76	n.d.

2.4 Kinetische Analysen zur D-Mannitol während der Biotransformation

In den Schüttelkolbenexperimenten zur D-Mannitol Bildung mit *E. coli* BL21 (DE3) pET24 *fdh mdh* pZY507 *glf* wurde nur etwa die Hälfte der eingesetzten D-Fruktose zu D-Mannitol reduziert. Eine detaillierte, kinetische Analyse der Ganzzell-Biotransformationen im Schüttelkolben unter gleichen Bedingungen zeigte, dass in 8 h 210 mM D-Mannitol aus 230 mM D-Fruktose und 318 mM Formiat (Abb. 9) mit einer Ausbeute von $Y_{\text{D-Mannitol/D-Fruktose}}$ 92 mol% gebildet wurde. In den ersten 2 h war die spezifische Produktivität der D-Mannitol Bildung mit 3,3 g x $(g_{ZTM} \times h)^{-1}$ hoch. In der Zeit von 2 - 8 h verlangsamte sich die spezifische Produktivität auf 1,0 g x $(g_{ZTM} \times h)^{-1}$. Nach 8 h wurde nahezu kein D-Mannitol mehr gebildet. Eine Substratlimitierung wurde ausgeschlossen, da nach dieser Zeit sowohl D-Fruktose als auch Natrium-Formiat im Überstand vorhanden waren. Die Analyse der Extrakte dieser 8 h eingesetzten *E. coli* Zellen ergab Enzymaktivitäten von 0,9 U x $(mg_{Protein})^{-1}$ für die

Formiat-Dehydrogenase und 9,6 U x $(mg_{Protein})^{-1}$ für die Mannitol-2-Dehydrogenase. Demnach war auch kein Aktivitätsverlust dieser Enzyme für den Reaktionsabbruch verantwortlich.

Arbeiten zur enzymatischen Synthese von Xylitol mit Xylose Reduktase aus *Candida tenius* in Verbindung mit einer Kofaktorregeneration durch Formiat-Dehydrogenase aus *C. boidinii* zeigten, dass es durch die Formiat-Dehydrogenase Aktivität zu einer Alkalisierung des Reaktionsmediums und infolge dessen zur Inhibition der Reaktion kommt (Neuhauser *et al.,* 1998). Auch in den hier durchgeführten Biotransformationen wurde eine Alkalisierung des Reaktionsüberstands von pH 6,6 auf pH 7,9 innerhalb von 8 h festgestellt (Abb. 9). In der durch die Formiat-Dehydrogenase katalysierten Reaktion wird durch die Oxidation von (Natrium-) Formiat zu CO_2 der Kofaktor NAD^+ zu NADH reduziert. Bei der nachfolgenden, durch die Mannitol-2-Dehydrogenase katalysierten Reduktion von D-Fruktose zu D-Mannitol werden Elektronen von NADH auf den Zucker übertragen. Es entsteht eine negative Ladung am Sauerstoffatom des C_2-Atoms des Zuckers. Da diese negative Ladung nicht durch ein Proton aus dem ursprünglich oxidierten Formiat ausgeglichen werden kann, dient dazu ein Proton aus H_2O, wodurch ein Hydroxyl-Ion gebildet wird und die Alkalisierung entsteht (persönliche Mitteilung Prof. Dr. M. Bott, Forschungszentrum Jülich).

In der enzymatischen Synthese von (*R*)-Mandelsäure wurde bei der Kofaktor-Regeneration mit Formiat-Dehydrogenase als Substrat Ammonium-Formiat statt Natrium Formiat eingesetzt. Hierbei wurde keine Alkalisierung des Reaktionsmediums berichtet. Stattdessen entstand CO_2 und NH_3 (Vasic-Racki *et al.,* 1989). Dies kann damit erklärt werden, dass hier zum Ladungsausgleich das Proton des NH_4^+ diente.

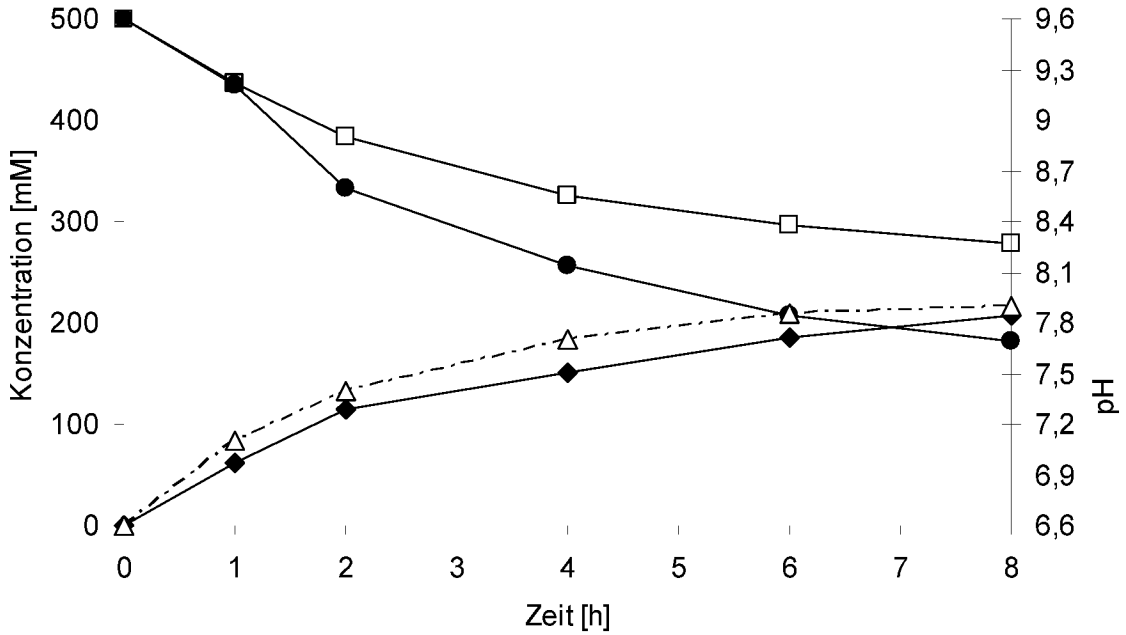


Abb. 9: Ganzzell-Biotransformation im Schüttelkolben mit *E. coli* BL21 (DE3) pET24 *fdh mdh* pZY507 *glf.* Dargestellt sind die Konzentrationen von D-Mannitol (♦), D-Fruktose (□) und Natrium-Formiat (●) im Reaktionsüberstand und der pH Wert (Δ) im Verlauf von 8 Stunden der Ganzzell-Biotransformation.

Die Studien zur enzymatischen Xylitolbildung verdeutlichten auch, dass durch Titration mit Ameisensäure, die gleichzeitig Substrat der Formiat-Dehydrogenase war, die beschriebene Alkalisierung verhindert werden konnte (Neuhauser *et al.,* 1998). Daher wurden auch Ganzzell-Biotransformationen mit *E. coli* BL21 (DE3) pET24 *fdh mdh* pZY507 *glf* unter pH-statischen Bedingungen bei pH 6,5 durch Titration mit Ameisensäure im Bioreaktor durchgeführt. Unter diesen Bedingungen wurden nach 8 h 362 mM D-Mannitol aus 433 mM der eingesetzten 500 mM D-Fruktose (Abb. 10) mit einer Ausbeute von $Y_{\text{D-Mannitol/D-Fruktose}}$ 84 mol% gebildet. Die spezifische Produktivität der D-Mannitol Bildung lag in den ersten 3 - 4 h bei 4,1 g x $(g_{ZTM} \times h)^{-1}$. Danach reduzierte sich diese auf 1,3 g x $(g_{ZTM} \times h)^{-1}$. Die Analyse der Extrakte dieser 8 h eingesetzten *E. coli* Zellen ergab mit Enzymaktivitäten von 1,0 U x $(mg_{Protein})^{-1}$ für die Formiat-Dehydrogenase und 10,4 U x $(mg_{Protein})^{-1}$ für die Mannitol-2-Dehydrogenase eine nur unwesentliche Verringerung gegenüber den entsprechenden Ausgangsaktivitäten. Die Zellen konnten also auch eine längere Zeit in der Ganzzell-Biotransformation eingesetzt werden.

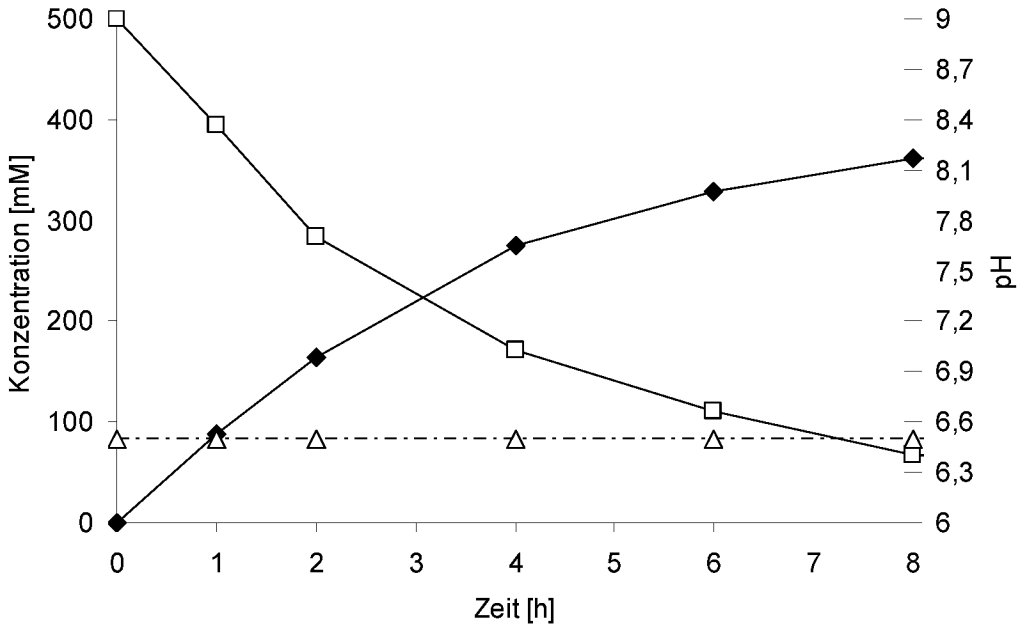


Abb. 10: Ganzzell-Biotransformation unter pH-statischen Bedingungen mit *E. coli* BL21 (DE3) pET24 *fdh mdh* pZY507 *glf.* Dargestellt sind die Konzentrationen von D-Mannitol (♦) und D-Fruktose (□) im Reaktionsüberstand und der pH Wert (Δ).

Zur Verlängerung der D-Mannitol Bildung und Erzielung höherer Produktkonzentrationen wurde in einer weiteren Ganzzell-Biotransformation unter gleichen Bedingungen eine Fruktosezudosierung vorgenommen. Nach 9 Stunden der Reaktion, als die D-Fruktose Konzentration von ursprünglich 500 mM auf 26 mM gesunken war, wurde sie auf 260 mM im Reaktionsansatz erhöht. Nach weiteren 14 Stunden der Reaktion wurde eine Konzentration von 500 mM D-Mannitol und 100 mM D-Fruktose im Reaktionsüberstand gemessen. Die Zudosierung zusätzlicher D-Fruktose hatte also eine weitere D-Mannitol Bildung zur Folge.

2.5 Optimierung der Ganzzell-Biotransformationen mit Formiat-Dehydrogenase, Mannitol-2-Dehydrogenase und Glukose-Facilitator exprimierenden *E. coli*

2.5.1 Entfernung von Mutationen im *fdh*-Gen

Sequenzanalysen von vier Klonierungsprodukten des Plasmids pET24 *fdh mdh* ergaben in allen vier dieser Plasmidkonstrukte die gleichen Punktmutationen am 5'- und 3'- Ende des *fdh*-Gens. Diese Mutationen führen im translatierten Genprodukt zu den Aminosäureaustauschen Prolin 11 → Arginin und Alanin 400 → Prolin.

Da die Positionen der Mutationen im Sequenzbereich der für die Amplifikation des *fdh*-Gens genutzten Oligonukleotide liegen, ließ dies auf Synthesefehler dieser Oligonukleotide schließen. Diese Mutationen wurden darauf durch erneute Amplifikation des *fdh*-Gens mit korrekten Oligonukleotiden und Klonierung in das Plasmid pET24 *mdh* b entfernt. Das konstruierte Plasmid wurde ebenfalls als pET24 *fdh mdh* bezeichnet. Das ursprüngliche Plasmid wurde ab diesem Zeitpunkt mit pET24 fdh_{mut} *mdh* gekennzeichnet. Expressionsanalysen mit dem Plasmid, kodierend für Wildtyp Formiat-Dehydrogenase und Mannitol-2-Dehydrogenase, ergaben spezifische Enzymaktivitäten von 1,6 U x $(mg_{Protein})^{-1}$ für die Formiat-Dehydrogenase und 12,0 U x $(mg_{Protein})^{-1}$ für die Mannitol-2-Dehydrogenase im zellfreien *E. coli* Extrakt. Die Formiat-Dehydrogenase mit der Wildtyp-Aminosäuresequenz hat demnach eine 1,6-fach erhöhte spezifischen Aktivität gegenüber der mutierten Formiat-Dehydrogenase.

Zur Analyse des Einflusses dieser erhöhten Formiat-Dehydrogenase Aktivität auf die Ganzzell-Biotransformation wurde das Plasmid pET24 *fdh mdh,* kodierend für Wildtyp Formiat-Dehydrogenase und Mannitol-2-Dehydrogenase, in den *E. coli* Stamm BL21 (DE3) pZY507 *glf* transformiert. Ein Vergleich von Ganzzell-Biotransformationen mit dem resultierenden *E. coli* Stamm BL21 (DE3) pET24 *fdh mdh* pZY507 *glf* und dem *E. coli* Stamm BL21 (DE3) pET24 fdh_{mut} *mdh* pZY507 *glf* zeigten, dass der Stamm mit Wildtyp Formiat-Dehydrogenase nach 3 h 340 mM D-Mannitol mit einer spezifischen Produktivität von 6,9 g x $(g_{ZTM} \times h)^{-1}$ gebildet hatte. Der *E. coli* Stamm mit mutierter Formiat-Dehydrogenase bildete im gleichen Zeitraum nur 210 mM D-Mannitol (Abb. 11) mit einer spezifischen Produktivität von 4,2 g x $(g_{ZTM} \times h)^{-1}$. Die Steigerung der Formiat-Dehydrogenase Aktivität resultierte somit in einer Steigerung der spezifischen Produktivität der D-Mannitol Bildung während der Ganzzell-Biotransformation.

2.5.2 Einfluss des pH-Wertes auf die D-Mannitol Bildung

Die Experimente zur D-Mannitol Bildung mit und ohne pH-Regulation verdeutlichten den Einfluss des pH-Wertes auf die D-Mannitol Bildung während der Biotransformation. Der Literatur ist zu entnehmen, dass Ganzzell-Biotransformationen mit rekombinanten *E. coli* oft im pH-Bereich von 6,5 – 7,5 durchgeführt wurden (Galkin *et al.,* 1997; Kizaki *et al.,* 2001; Overhage *et al.,* 2003; Yamamoto *et al.,* 2004; Walton und Steward, 2004). Es sollte daher der für die D-Mannitol Bildung optimale pH-Bereich festgestellt werden. Dazu wurden Ganzzell-Biotransformationen mit *E. coli* BL21 (DE3) pET24 *fdh mdh* pZY507 *glf* bei konstanten pH-Werten von 5,5, 6,5 und 7,5 durchgeführt. Nach 3 h Biotransformation bei einem pH-Wert von 6,5 wurden 340 mM D-Mannitol gebildet. Bei einem pH-Wert von 7,5 waren es im gleichen Zeitraum 244 mM und bei pH 5,5 nur 66 mM D-Mannitol (Abb. 12). Das pH-Optimum für die D-Mannitol Bildung liegt somit auch im Bereich von pH 6,5, vergleichbar zu dem pH-Wert anderer Biotransformationen mit rekombinanten *E. coli* Stämmen. Die weiteren pH-statischen Ganzzell-Biotransformationen mit dem *E. coli* Stamm BL21 (DE3) pET24 *fdh mdh* pZY507 *glf* wurden daher bei pH 6,5 durchgeführt.

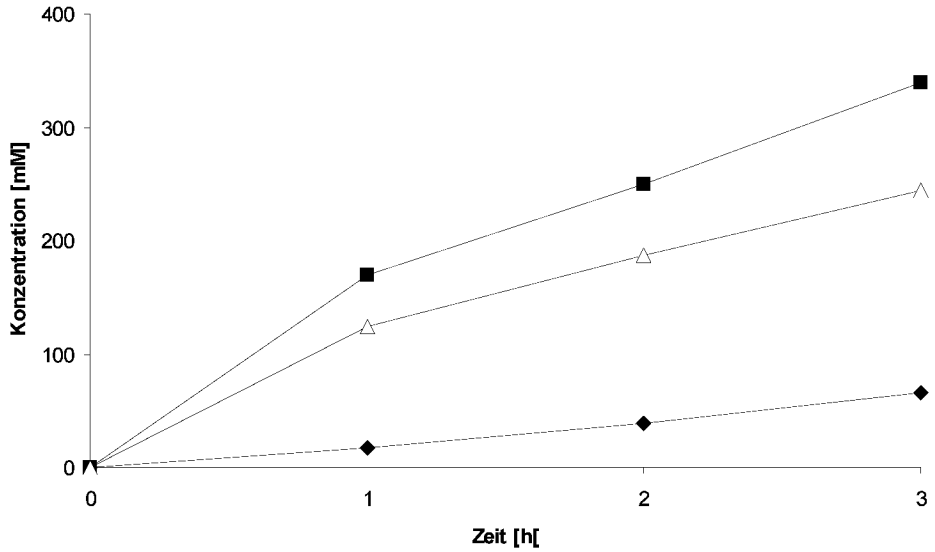


Abb. 11: D-Mannitol Bildung mit *E. coli* BL21 (DE3) pET24 *fdh mdh* pZY507 *glf* als ruhende Zellen (3 g_{ZTM} / l) bei konstanten pH-Werten von 5,5 (◆), 6,5 (■) und 7,5 (△). Die weiteren Bedingungen waren wie unter Abb. 10.

2.5.3 Kontinuierliche Substratzudosierung

Die Ganzzell-Biotransformationen mit einmaliger D-Fruktosezudosierung bzw. kontinuierlicher Ameisensäure-Titration hatten eine Erhöhung der D-Mannitol Konzentration bzw. der spezifischen Produktivität zur Folge. Diese Maßnahmen wurden daraufhin kombiniert und deren Einfluss auf die Ganzzell-Biotransformation analysiert. Ruhende Zellen des *E. coli* Stammes BL21 (DE3) pET24 *fdh mdh* pZY507 *glf* wurden nach Expression von Formiat-Dehydrogenase, Mannitol-2-Dehydrogenase und Glukose-Facilitator in Substratlösung mit D-Fruktose und Natrium-Formiat unter Titration mit 3 M Ameisensäure und paralleler Zudosierung von 3 M D-Fruktose bei 30°C inkubiert. Nach 18 h der Reaktion wurden 700 mM D-Mannitol gebildet (Abb. 12). Nach Abzug der durch die kontinuierliche Titration bzw. Substratdosierung bedingten Verdünnung, lag die D-Mannitol Konzentration im Biotransformationsansatz bei ca. 980 mM (Abb. 12). Die spezifische Produktivität der D-Mannitol Bildung war 9,5 g x $(g_{ZTM} \times h)^{-1}$ in der ersten Inkubationsstunde, 8,0 g x $(g_{ZTM} \times h)^{-1}$ innerhalb der ersten drei und 6,3 g x $(g_{ZTM} \times h)^{-1}$ innerhalb ersten 7 Inkubations-Stunden. Die Produktausbeute $Y_{D\text{-Mannitol/D-Fruktose}}$ lag bei 89 – 100 mol% (Abb. 13). Die Kombination aus kontinuierlicher Ameisensäure-Titration und kontinuierlicher D-Fruktosezudosierung während der 18 h Ganzzell-Biotransformation führte im Vergleich zu Ansätzen ohne diese oder nur der jeweils einzelnen Maßnahme, sowohl zu einer höheren spezifischen Produktivität, als auch einer höheren D-Mannitol Konzentration im Reaktionsansatz. Nach Ablauf der 18 h wurden die Zellen zusätzliche 22 h unter den gleichen Bedingungen inkubiert, jedoch kein weiteres D-Mannitol gebildet.

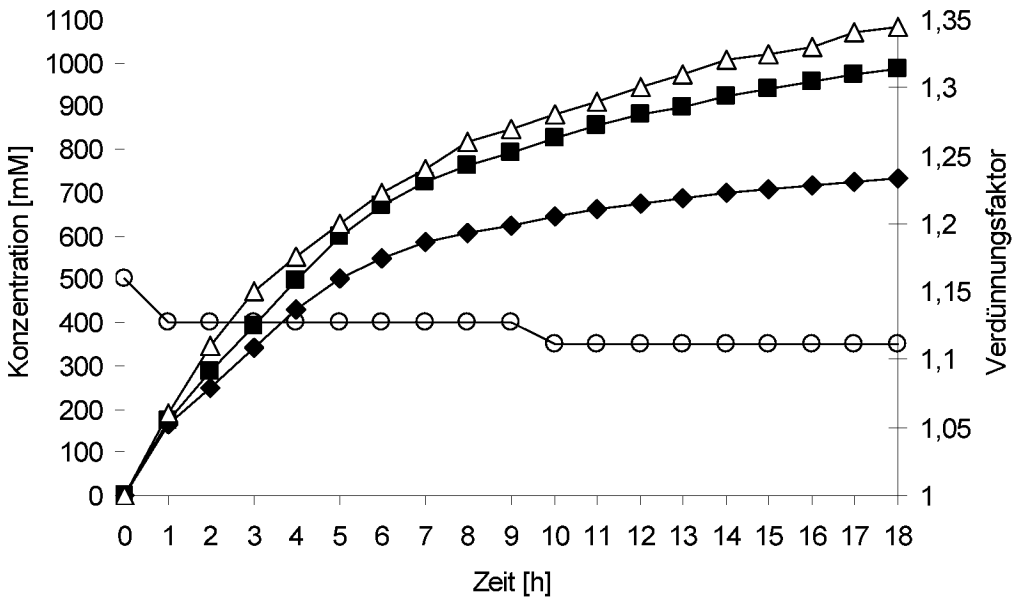


Abb. 12: D-Mannitol Bildung mit *E. coli* BL21 (DE3) pET24 *fdh mdh* pZY507 *glf* bei einem pH-Wert von 6,5 und kontinuierlicher D-Fruktosedosierung. D-Mannitol Bildung verdünnt durch Substratzudosierung (◆), D-Mannitol Bildung abzüglich der Verdünnung (■), D-Fruktose Konzentration (○) und Verdünnungsfaktor (△).

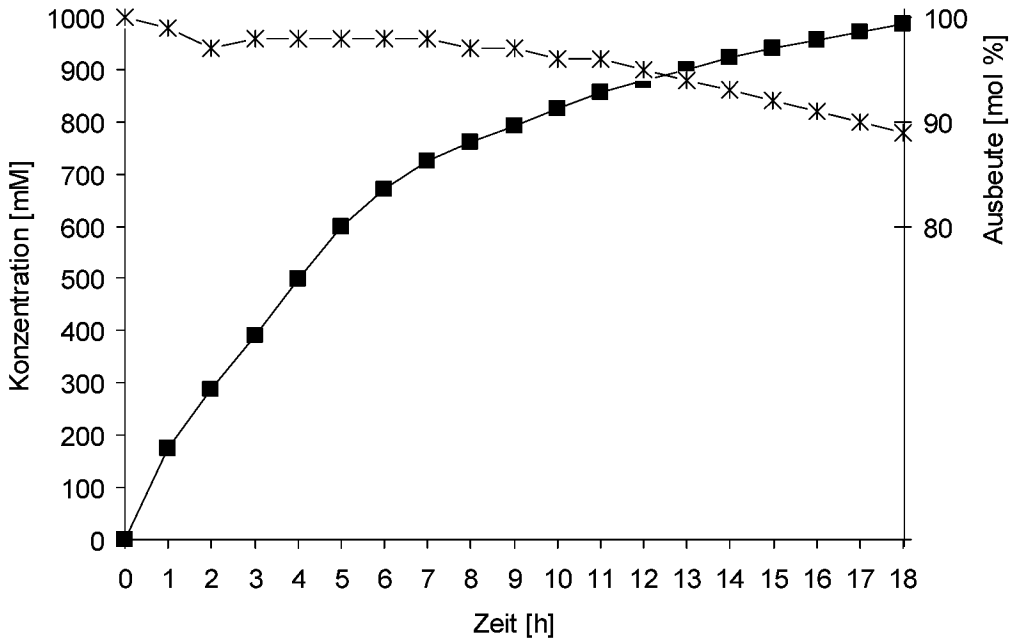


Abb. 13: D-Mannitol Bildung abzüglich der Verdünnung (■) und Produktausbeute $Y_{\text{D-Mannitol/D-Fruktose}}$ (✳) während der Ganzzell-Biotransformation.

Durch die kontinuierliche Ameisensäure-Titration und D-Fruktosezudosierung konnte neben dem pH-Wert auch die Konzentration der Substrate Formiat und D-Fruktose im Biotransformationsansatz über die Dauer der Reaktion konstant gehalten werden. Eine Substratzugabe in großem Überschuss war also nicht notwendig. Daher wurden die für eine maximale D-Mannitol Bildung erforderlichen Mindest-substratkonzentrationen ermittelt. Dazu wurden Ganzzell-Biotransformationen mit dem *E. coli* Stamm pET24 *fdh mdh* pZY507 *glf* bei dem pH-Wert 6,5 und Substrat-Anfangskonzentrationen von 500 mM D-Fruktose / 500 mM Natrium-Formiat, 500 mM D-Fruktose / 250 mM Natrium-Formiat, 250 mM D-Fruktose / 250 mM Natrium-Formiat, 500 mM D-Fruktose / 150 mM Natrium-Formiat, 500 mM D-Fruktose / 100 mM Natrium-Formiat und 500 mM D-Fruktose / 50 mM Natrium-Formiat durchgeführt. Diese Konzentrationen waren im Verlauf der Biotransformationen durch die gleichzeitige Ameisensäure-Titration und D-Fruktosezudosierung konstant.

Es stellte sich heraus, dass eine Reduzierung der Natrium-Formiat Konzentration von 500 mM auf 250 mM zu keiner Verringerung der gebildeten D-Mannitol Konzentration innerhalb der ersten 3 h der Ganzzell-Biotransformation führte. Die weitere Reduzierung auf 150, 100 und 50 mM Natrium-Formiat resultierte jedes mal in einer Verringerung der gebildeten D-Mannitol Konzentration innerhalb der ersten 3 h der Ganzzell-Biotransformation von durchschnittlich 345 mM auf 210 mM. Bei D-Fruktose führte bereits die Reduzierung der Konzentration von 500 mM auf 250 mM zu einer Verringerung der gebildeten D-Mannitol Konzentration von durchschnittlich 345 mM auf 206 mM innerhalb der ersten 3 h Ganzzell-Biotransformation (Abb. 14). Die D-Mannitol Bildung war demnach bei konstanten Mindestsubstratkonzentrationen von 500 mM D-Fruktose und 250 mM Natrium-Formiat und einem pH-Wert von 6,5 am höchsten.

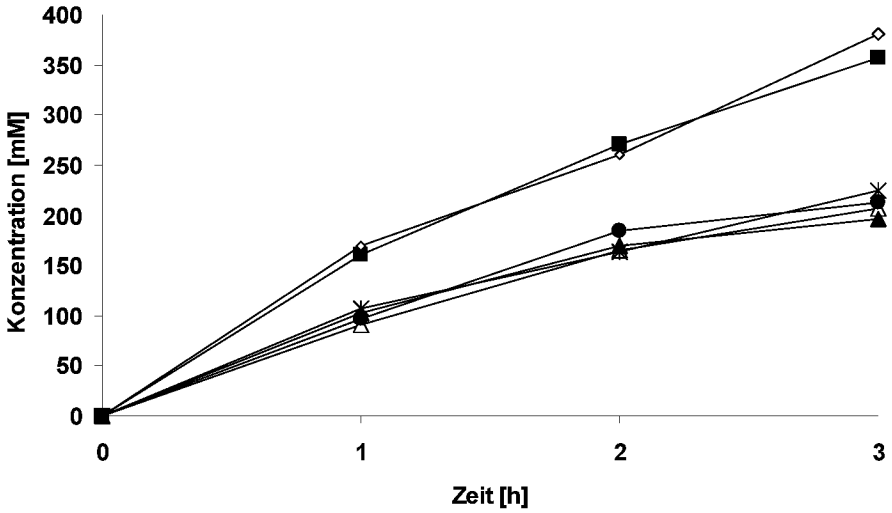


Abb. 14: D-Mannitol Bildung mit *E. coli* BL21 (DE3) pET24 *fdh mdh* pZY507 *glf* bei konstantem pH-Wert 6,5 in 50 mM Kaliumphosphatpuffer. Die konstanten Substratkonzentrationen waren 500 mM D-Fruktose / 500 mM Natrium-Formiat (◇), 500 mM D-Fruktose / 250 mM Natrium-Formiat (■), 250 mM D-Fruktose / 250 mM Natrium-Formiat (△), 500 mM D-Fruktose / 150 mM Natrium-Formiat (Ж), 500 mM D-Fruktose / 100 mM Natrium-Formiat (▲) und 500 mM D-Fruktose / 50 mM Natrium-Formiat (●).

2.5.4 Produktinhibition während der D-Mannitol Bildung

In den durchgeführten Biotransformationen zeigte sich bei zunehmender D-Mannitol Konzentration eine Verlangsamung der weiteren D-Mannitol Bildung (Abb. 13). Bei der D-Mannitol Bildung mit ruhenden Zellen des Milchsäurebakteriums *L. mesenteroides* ATCC 9135 wird die D-Mannitol Bildung ebenfalls durch eine ansteigenden D-Mannitol Konzentration inhibiert (von Weymarn *et al.,* 2002). Zur genaueren Bestimmung des Einflusses der ansteigenden D-Mannitol Konzentration auf die D-Mannitol Bildung mit *E. coli* pET24 *fdh mdh* pZY507 *glf* wurden Ganzzell-Biotransformationen unter den optimierten Bedingungen bei Zellkonzentrationen von 1,5, 3 und 6 g_{ZTM} / l durchgeführt. Durch die stufenweise Erhöhung der Katalysator-konzentration sollte eine unterschiedlich schnelle Produktbildung erreicht werden. Erwartungsgemäß erhöhte sich in den ersten 4 h der Reaktion die D-Mannitol Bildung mit zunehmender Zellkonzentration (Abb. 15). Mit zunehmender D-Mannitol Konzentration im Reaktionsverlauf nach 4 h verlangsamte sich in allen Ansätzen die weitere D-Mannitol Bildung. Dieser Effekt war umso stärker, je höher die

Zellkonzentration des Ansatzes war. Es war also ein Zusammenhang zwischen steigender D-Mannitol Konzentration und Verlangsamung der D-Mannitol Bildung zu erkennen.

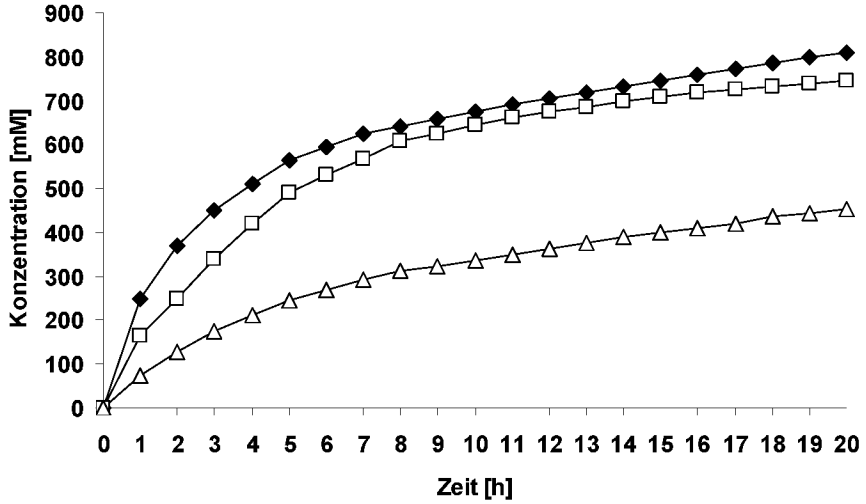


Abb. 15: D-Mannitol Bildung mit *E. coli* Stamm BL21 (DE3) pET24 *fdh mdh* pZY507 *glf* bei 6 g_{ZTM} / l (◆), 3 g_{ZTM} / l (□) und 1,5 g_{ZTM} / l (△).

Zur genaueren Betrachtung dieses Zusammenhangs wurden die spezifischen Produktivitäten der D-Mannitol Bildung in Abhängigkeit von der jeweiligen D-Mannitol Konzentration der verschiedenen Ansätze verglichen. Hierbei zeigte sich, dass in allen Ansätzen die spezifische Produktivität der D-Mannitol Bildung mit zunehmender D-Mannitol Konzentration abnahm (Abb. 16).

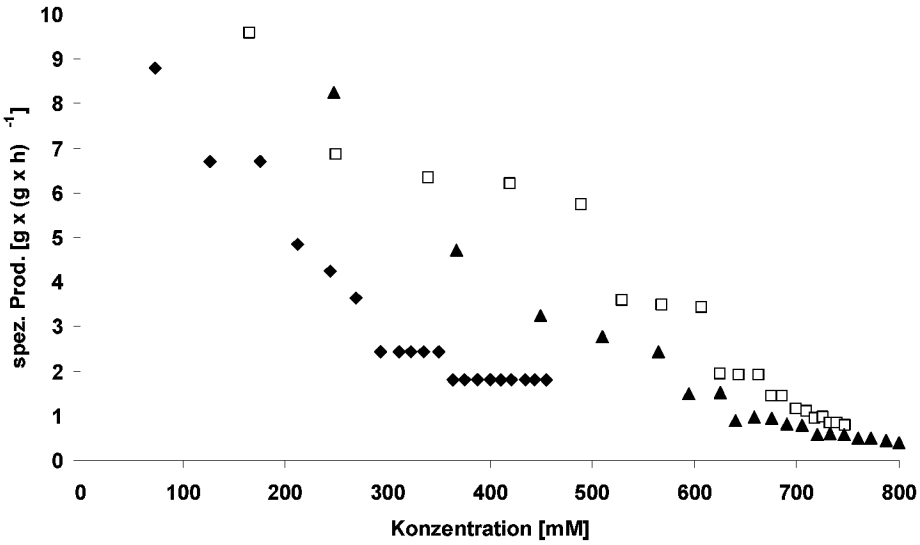


Abb. 16: Spezifische Produktivität der D-Mannitol Bildung während Ganzzell-Biotransformationen mit *E. coli* BL21 (DE3) pET24 *fdh mdh* pZY507 *glf* bei 6 g_{ZTM} / l (▲), 3 g_{ZTM} / l (□) und 1,5 g_{ZTM} / l (◆) in Abhängigkeit der D-Mannitol Konzentration.

Einen weiteren Hinweis für eine Produktinhibition ergab der Vergleich von Biotransformationen mit dem *E. coli* Stamm BL21 (DE3) pET24 *fdh mdh* pZY507 *glf* (3 g_{ZTM} / l) in Anwesenheit und in Abwesenheit von 400 mM D-Mannitol im Biotransformationsansatz zum Startzeitpunkt der Reaktion. Dabei war die spezifische Produktivität innerhalb der ersten 8 h der Ganzzell-Biotransformation in Anwesenheit von 400 mM D-Mannitol zum Startzeitpunkt im Vergleich zur Ganzzell-Biotransformation in dessen Abwesenheit reduziert. Im weiteren Reaktionsverlauf nach 8 h waren die verglichenen spezifischen Produktivitäten im Wesentlichen gleich (Abb. 17). Demnach hatte die erhöhte D-Mannitol Konzentration innerhalb der ersten 8 h der Ganzzell-Biotransformation einen inhibierenden Effekt auf die spezifische Produktivität der D-Mannitol Bildung.

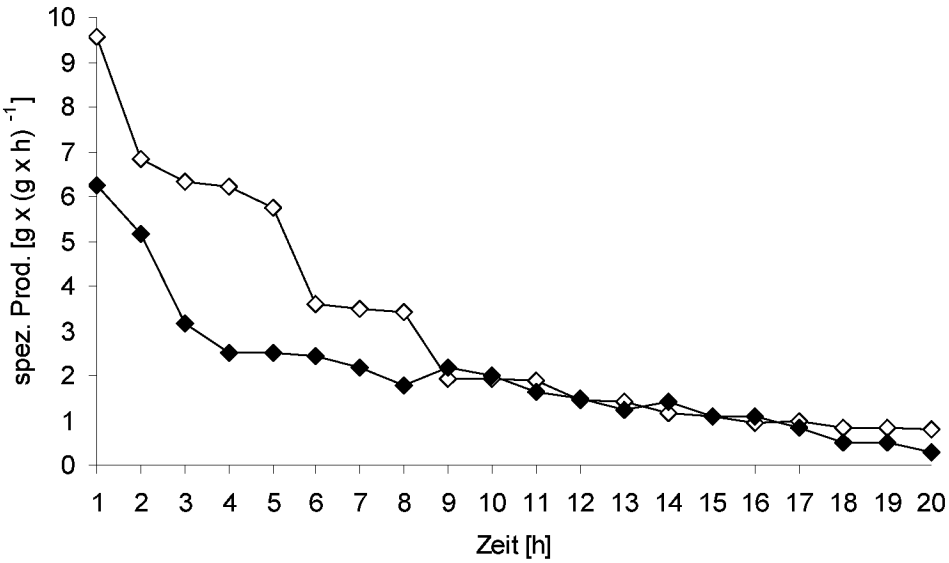


Abb. 17: Spezifische Produktivitäten der D-Mannitol Bildung während Ganzzell-Biotransformationen mit *E. coli* Stamm pET24 *fdh mdh* pZY507 *glf* mit 400 mM D-Mannitol zum Startzeitpunkt (◆) und ohne D-Mannitol zum Startzeitpunkt (◇).

Die Höhe und Abnahme der spezifischen Produktivität in Abhängigkeit von der jeweiligen D-Mannitol Konzentration im Reaktionsansatz dieser verglichenen Biotransformationen war nahezu gleich (Abb.18).

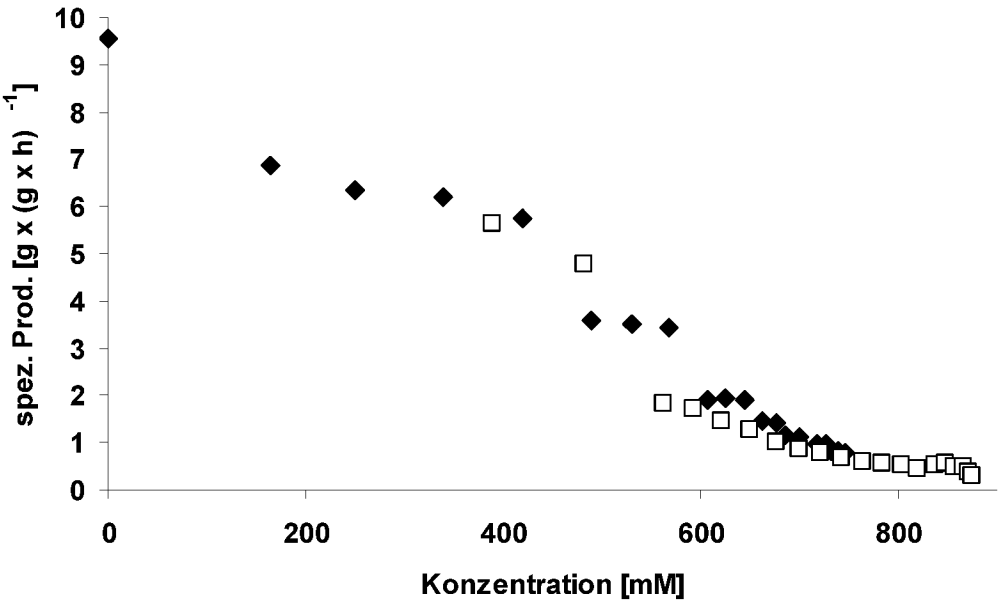


Abb. 18: Spezifische Produktivitäten der D-Mannitol Bildung während Ganzzell-Biotransformationen mit *E. coli* Stamm pET24 *fdh mdh* pZY507 *glf* mit 400 mM D-Mannitol zum Startzeitpunkt (□) und ohne D-Mannitol zum Startzeitpunkt (◆) in Abhängigkeit der D-Mannitol Konzentration.

Die D-Mannitol Bildung mit dem *E. coli* Stamm BL21 (DE3) pET24 *fdh mdh* pZY507 *glf* wird also wie die D-Mannitol Bildung mit *L. mesenteroides* durch ansteigende D-Mannitol Konzentrationen inhibiert (von Weymarn *et al.,* 2002). Außerdem steht dies in Übereinstimmung mit der hier ermittelten Inhibition der Mannitol-2-Dehydrogenase durch D-Mannitol.

2.5.5 Analysen der Kofaktor-Verfügbarkeit während der Biotransformation

Da die sich spezifische Produktivität von *E. coli* pET24 *fdh mdh* pZY507 *glf* durch ansteigende D-Mannitol Konzentrationen reduzierte, lag es nahe, die Biomasse eines ersten Biotransformationsansatzes nach Erreichen einer hohen D-Mannitol Konzentration abzutrennen und in einem zweiten Ansatz in einer Substratlösung ohne D-Mannitol erneut einzusetzen. Die D-Mannitol Bildung des ersten Biotransformationsansatzes (3 g_{ZTM} / l) verlief wie bereits zuvor beschrieben (Abb. 19 A). Auch die spezifische Produktivität dieser ersten Biotransformation verringerte sich während der 20 h Inkubation, in Übereinstimmung mit den bereits beschriebenen Experimenten, von über 8 g x $(g_{ZTM} \times h)^{-1}$ auf unter 0,5 g x $(g_{ZTM} \times h)^{-1}$. Daraufhin

wurde die Biomasse abgetrennt, gewaschen und in Biotransformationslösung in Abwesenheit von D-Mannitol resuspendiert (3 g_{ZTM} / l). Innerhalb der ersten Stunde der zweiten Biotransformation wurde jedoch keine wesentliche Erhöhung der D-Mannitol Konzentration und der spezifischen Produktivität festgestellt. Es musste ein weiterer, unter Umständen zeitabhängiger Faktor zur Verringerung der spezifischen Produktivität beitragen.

In Ganzzell-Biotransformationen mit rekombinanten *E. coli* BL21 (DE3) als ruhende Zellen zur Bildung von ε-Caprolacton nahmen unter ähnlichen Biotransformationsbedingungen die intrazellulären NAD(P) und NAD(P)H Konzentrationen im Verlauf der Inkubation ab (Walton und Stewart, 2004). Die Anwesenheit von NAD(H) ist aber eine Vorraussetzung für die Funktionsfähigkeit des Redoxzyklus zur D-Mannitol Bildung. Daher wurde nach der ersten Stunde der zweiten Biotransformation NAD^+ mit einer Endkonzentration von 5 mM dem Biotransformationsansatz zugegeben. Daraufhin stieg die spezifische Produktivität auf etwa 50 % des Ausgangswertes zu Beginn der ersten Biotransformation an (Abb. 19 B). Dies war ein erster Hinweis, dass der Rückgang der spezifischen Produktivität der D-Mannitol Bildung auf einer Verringerung des intrazellulären NAD(H)-Pools beruhte.

Die Enzymaktivitäten waren vor der ersten Biotransformation 12,6 U x $(mg_{Protein})^{-1}$ für die Mannitol-2-Dehydrogenase und 1,5 U x $(mg_{Protein})^{-1}$ für die Formiat-Dehydrogenase, bzw. nach der zweiten Biotransformation 8,3 U x $(mg_{Protein})^{-1}$ für die Mannitol-2-Dehydrogenase und 1,1 U x $(mg_{Protein})^{-1}$ für die Formiat-Dehydrogenase. Die spezifischen Enzymaktivitäten hatten demnach einen geringeren Einfluss auf den Verlauf der spezifischen Produktivität während der zwei aufeinander folgenden Biotransformationen.

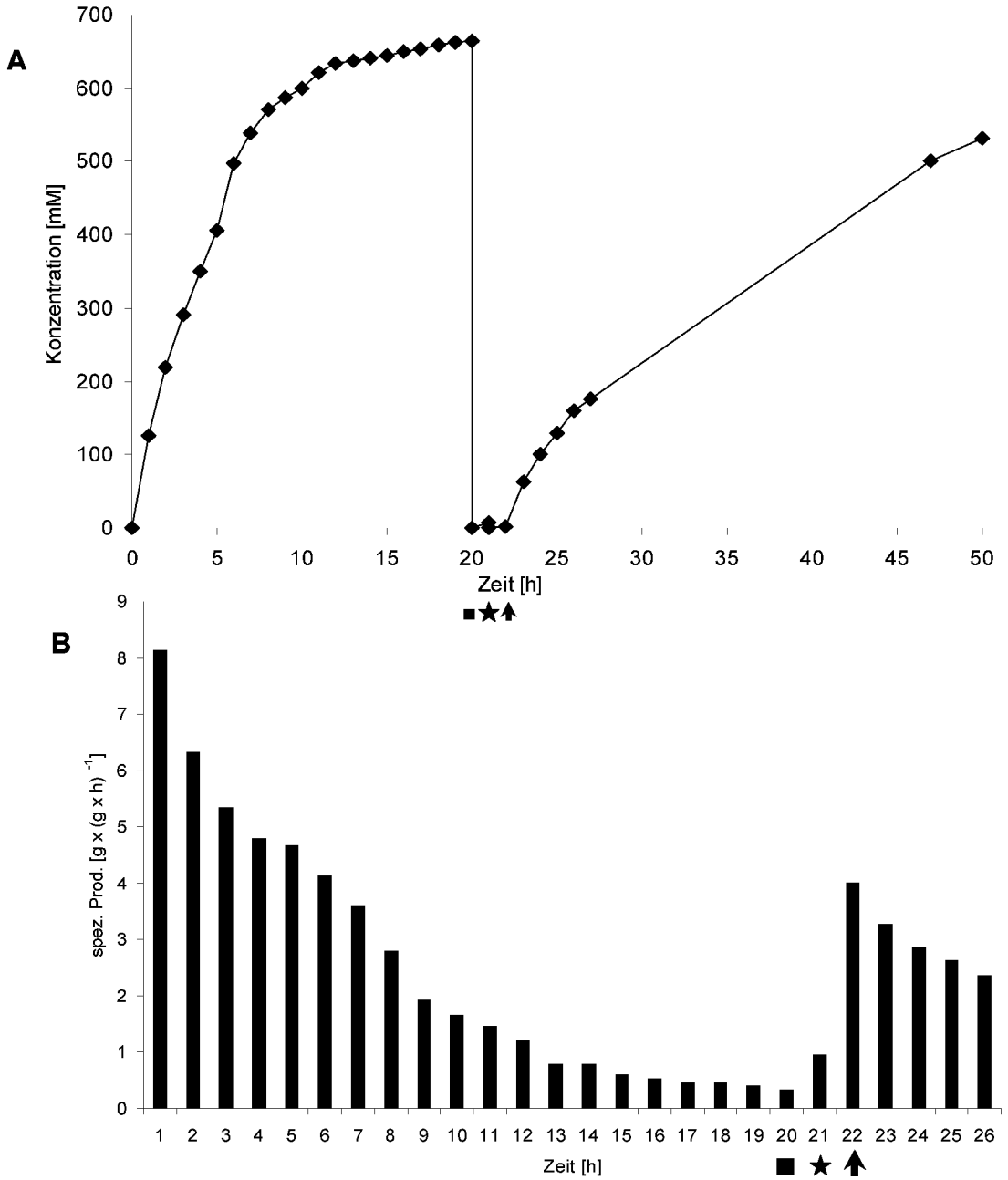


Abb. 19: A) D-Mannitol Bildung mit *E. coli* BL21 (DE3) pET24 *fdh mdh* pZY507 *glf* (◆). Waschschritt (■), Resuspension (★) in Substratlösung ohne D-Mannitol und Zugabe von 5 mM NAD^+ (⬆). B) Spezifische Produktivität der D-Mannitol (Kennzeichnung wie unter A)

Es wurde daraufhin überprüft, zu welchem Zeitpunkt der Biotransformation ein abnehmender NAD(H)-Pool Einfluss auf die spezifische Produktivität der D-Mannitol Bildung hat. Dazu wurde der Verlauf der spezifischen Produktivitäten von Ganzzell-Biotransformationen in Anwesenheit und in Abwesenheit von 5 mM NAD^+ im Biotransformationsansatz zum Startzeitpunkt der Reaktion verglichen (Abb. 20). Dabei zeigte sich bereits nach der ersten Inkubationsstunde, dass die spezifische

Produktivität der D-Mannitol Bildung in Anwesenheit von NAD^+ in der Biotransformationslösung langsamer abnahm als im Ansatz in Abwesenheit von NAD^+. Diese Tendenz war durchgehend bis zur 20sten Inkubations-Stunde zu beobachten (Abb. 20).

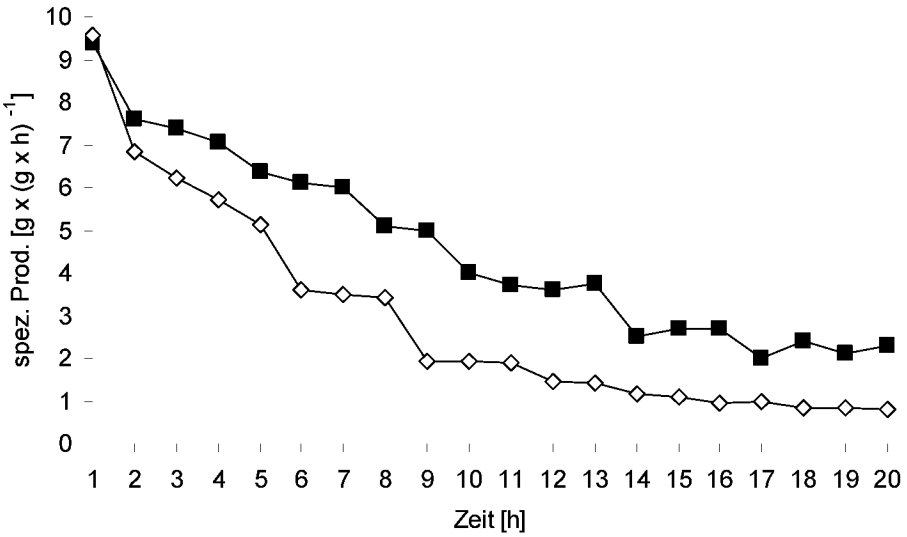


Abb. 20: Spezifische Produktivität der D-Mannitol Bildung mit *E. coli* BL21 (DE3) pET24 *fdh mdh* pZY507 *glf* (3 g_{ZTM} / l) ohne NAD^+ (◊) und mit 5 mM NAD^+ (■).

So wurde in Anwesenheit von NAD^+ in der Biotransformationslösung nach 20 h Biotransformation D-Mannitol in einer Konzentration von 1040 mM gebildet, die im Reaktionsverlauf von 20 – 40 h weiter anstieg. Dem gegenüber wurde in Abwesenheit von NAD^+ nach 20 h Biotransformation D-Mannitol in einer Konzentration von 750 mM gebildet, die im weiteren Reaktionsverlauf nicht anstieg (Abb. 21).

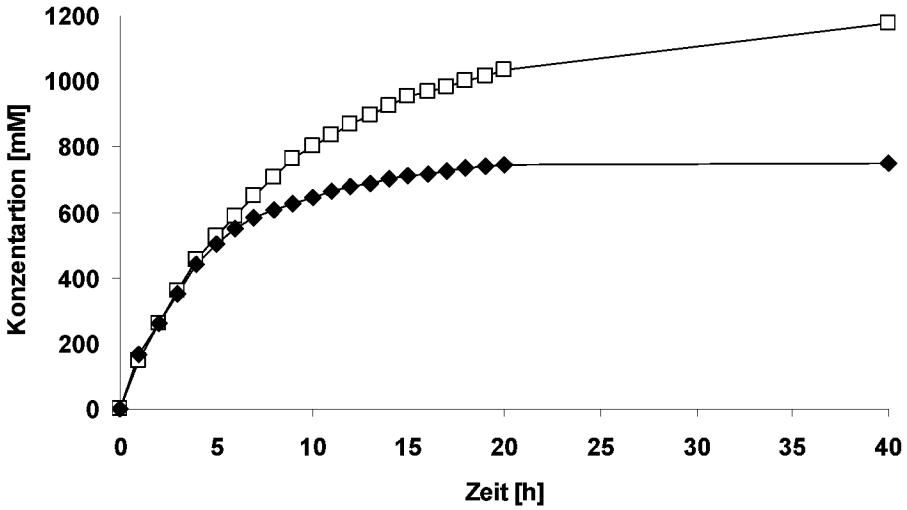


Abb. 21: D-Mannitol Bildung mit *E. coli* BL21 (DE3) pET24 *fdh mdh* pZY507 *glf* (3 g_{ZTM} / l) ohne NAD^+ (◆) und mit 5 mM NAD^+ zum Startzeitpunkt (□).

2.5.6 Analyse des NAD(H)-Pools während der Biotransformation

Die Anwesenheit von NAD^+ im Biotransformationsansatz zeigte bereits nach der ersten Stunde einen stabilisierenden Effekt auf die spezifische Produktivität während der Biotransformation. Dies ließ darauf schließen, dass es schon während dieser Zeit zu einer Abnahme des intrazellulären NAD(H)-Pools von *E. coli* BL21 (DE3) pET24 *fdh mdh* pZY507 *glf* kam. Zur Bestätigung einer solchen Abnahme wurde der intrazelluläre NAD(H)-Pool ruhender Zellen des *E. coli* Stammes BL21 (DE3) pET24 *fdh mdh* pZY507 *glf* im Verlauf der ersten zwei Biotransformationsstunden verfolgt. Hierbei zeigte sich in Anwesenheit von Formiat eine Abnahme des intrazellulären NAD(H) Pools um 50 % innerhalb der ersten Stunde, bzw. ca. 60 % innerhalb der ersten zwei Stunden der Reaktion (Abb. 22). In Abwesenheit von Formiat konnte keine signifikante Abnahme des NAD(H)-Pools innerhalb von 2 Stunden beobachtet werden. Damit übereinstimmend ist die Entwicklung der NAD(H)-Poolgröße eines rekombinanten *E. coli* Stamms während Biotransformationen zur Bildung von ε-Caprolacton. Dort nahm der NAD(H)-Pool in Abwesenheit von Formiat erst nach über 20 Stunden um 50% ab (Walton und Stewart, 2004). Dies ist ein Hinweis darauf, dass Formiat einen Einfluss auf die Abnahmegeschwindigkeit des NAD(H)-Pools während der Biotransformation mit *E. coli* BL21 (DE3) pET24 *fdh mdh* pZY507 *glf* und damit auf die Verringerung der spezifischen Produktivität hat.

Neben der Abnahme des NAD(H)-Pools konnte eine Verschiebung des NADH/NAD^+-Redox-Verhältnisses in *E. coli* BL21 (DE3) pET24 *fdh mdh* pZY507 *glf* in Anwesenheit von Formiat festgestellt werden. Zum Zeitpunkt t_0 der Reaktion betrug dieses 0,29. Bereits 10 Minuten nach Zugabe von Formiat verschob sich dieses Verhältnis um das Fünffache auf 1,51 in Richtung des NADH und verblieb, trotz Abnahme des NAD(H)-Pools innerhalb des Beobachtungszeitraums von zwei Stunden, auf diesem Niveau (Abb. 22). In Abwesenheit von Formiat blieb das NADH/NAD^+-Redox-Verhältnis im gleichen Zeitraum etwa bei 0,3. Dabei wurde jedoch kein D-Mannitol gebildet (siehe auch Ergebnisse 2.3, Tab. 1). Die Formiat abhängige Verschiebung des NADH/NAD^+-Redox-Verhältnisses durch die Formiat-Dehydrogenase in Richtung NADH ist also entscheidend für die D-Mannitol Bildung während der Ganzzell-Biotransformation mit dem *E. coli* Stamm BL21 (DE3) pET24 *fdh mdh* pZY507 *glf.*

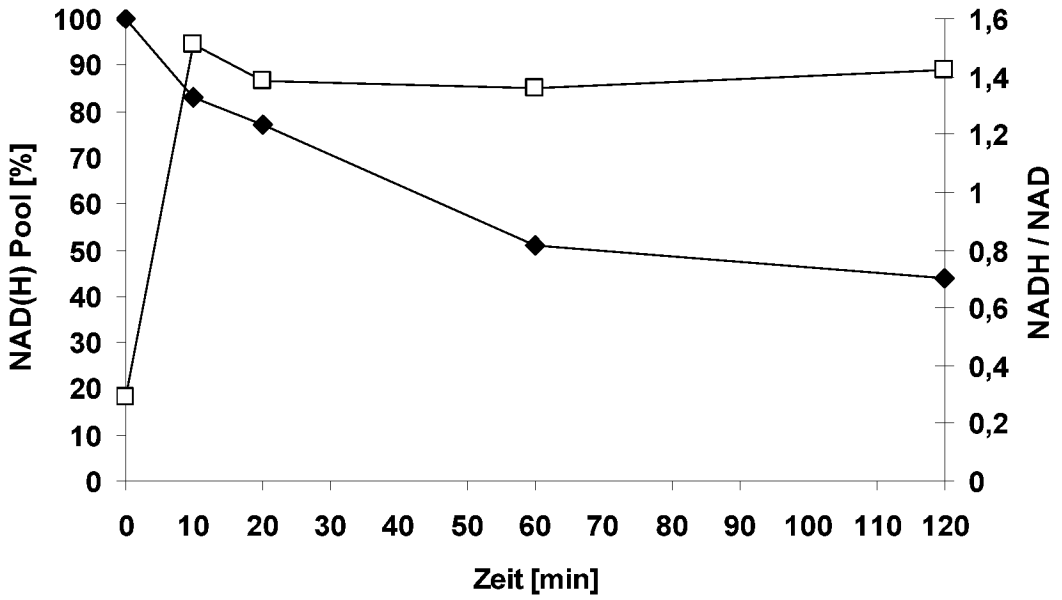


Abb. 22: NAD(H) Pool Größe (♦) und Redoxzustand (□) von *E. coli* BL21 (DE3) pET24 *fdh mdh* pZY507 *glf* während der Bildung von D-Mannitol aus D-Fruktose.

2.5.7. Zusammenfassung der Ergebnisse zur D-Mannitol Bildung aus D-Fruktose

Die Analyse verschiedener, rekombinanter *E. coli* Stämmen zeigte, dass für eine Bildung von hohen D-Mannitol Konzentrationen aus D-Fruktose, neben der Mannitol-2-Dehydrogenase sowohl eine Formiat-Dehydrogenase zur Kofaktor-Regeneration, als auch ein Glukose-Facilitator zur Zuckeraufnahme notwendig ist (Abb. 23). Die D-Mannitol Bildung konnte durch eine Aktivitätssteigerung der Formiat-Dehydrogenase nach der Entfernung von Punktmutationen im *fdh*-Gen und dem Einsatz von Ameisensäure-Titration bzw. kontinuierlicher D-Fruktose Zudosierung weiter gesteigert werden (Abb.23). Darüber hinaus stellte sich heraus, dass die D-Mannitol Bildung im Verlauf der Biotransformation durch ansteigende D-Mannitol Konzentrationen inhibiert wurde. Außerdem kam es durch die Abnahme des intrazellulären NAD(H)-Pools des verwendeten *E. coli* Stammes zu einer Verminderung der spezifischen Produktivität, die durch NAD^+-Zugabe wieder erhöht werden konnte.

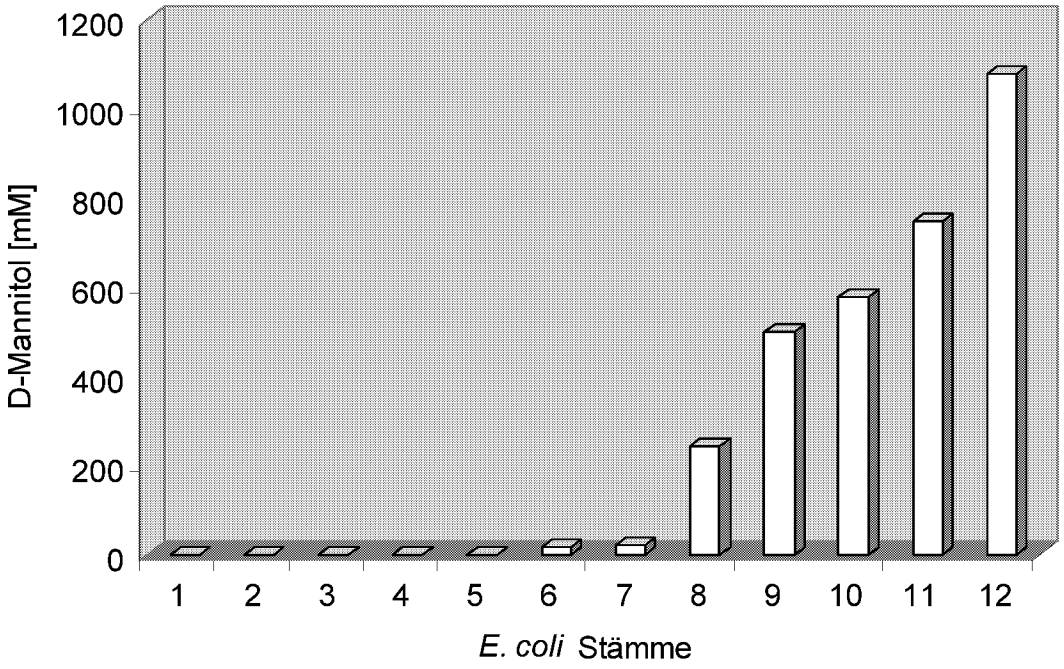


Abb. 23: Entwicklung der D-Mannitol Bildung aus D-Fruktose in Ganzzell-Biotransformationen mit verschiedenen *E. coli* BL21 (DE3) Stämmen. Rekombinante Proteine in den verschiedenen *E. coli* Stämmen (MDH = Mannitol-2-Dehydrogenase; FDH = Formiat-Dehydrogenase; GLF = Glukose-Facilitator: **1**: - ; **2**: MDH; **3**: FDH (mutiert); **4**: GLF; **5**: FDH (mutiert) / GLF; **6**: FDH (mutiert) / MDH; **7**: MDH / GLF; **8**: FDH (mutiert) / MDH / GLF (Schüttelkolben); **9**: FDH (mutiert) / MDH / GLF (Bioreaktor, pH 6,5); **10**: FDH (Wildtyp) / MDH / GLF (Bioreaktor, pH 6,5); **11**: wie 10; zusätzlich kontinuierliche Substratdosierung; Produktkonzentration verdünnt durch Titration / Substratdosierung; **12**: wie 11; zusätzlich 5 mM NAD^+; Produktkonzentration verdünnt durch Titration / Substratdosierung.

3 Ganzzell-Biotransformationen mit rekombinanten *E. coli* zur Bildung von D-Mannitol aus D-Glukose

Es wurde gezeigt, dass *E. coli* BL21 (DE3) pET24 *fdh mdh* pZY507 *glf* als effizienter Biokatalysator in Ganzzell-Biotransformation zur D-Mannitol Bildung aus D-Fruktose eingesetzt werden konnte. Darauf aufbauend sollte der rekombinante Stoffwechselweg zur D-Mannitol Bildung durch eine Glukose-Isomerase ergänzt werden und dadurch die D-Mannitol Bildung mit der günstigeren D-Glukose als Substrat anstelle der D-Fruktose erfolgen.

3.1 Zugabe von Glukose-Isomerasen in den Biotransformationsansatz

Eine Möglichkeit besteht in der Zugabe einer Glukose-Isomerase in den Reaktionsansatz. Dies hat den Vorteil, dass der *E. coli* Stamm BL21 (DE3) pET24 *fdh mdh* pZY507 *glf* in unveränderter Form weiter eingesetzt werden kann. Für diese Zugabe wurden die Glukose-Isomerase aus *Streptomyces rubiginosus* bzw. immobilisierter Glukose-Isomerase Sweetzyme IT® ausgewählt (Sudfeldt *et al*, 1990; Whitlow *et al,* 1991; Wong *et al,* 1991; Whitaker *et al*, 1995). Die Aktivität dieser Glukose-Isomerasen ist pH-Wert- und Ionen-Abhängigkeit. Sie haben darüber hinaus eine relativ niedrige Affinität zu D-Glukose und erreichen ihre maximale Katalysegeschwindigkeit erst bei höheren D-Glukose Konzentrationen. Außerdem steigt die Enzymaktivität mit zunehmender Temperatur (Chen, 1980 a/b; Bhosale *et al.*, 1996). Aufgrund dieser Enzymeigenschaften enthielt die Biotransformationslösung 1 M D-Glukose, 5 mM $CoCl_2$ und 5 mM $MgCl_2$ bei einem pH-Wert von 7,5.

Die ausgewählten Glukose-Isomerasen wurden jeweils mit dem *E. coli* Stamm BL21 (DE3) pET24 *fdh mdh* pZY507 *glf* bei 37°C (statt 30°C) und konstantem pH-Wert 7,5 inkubiert. Da die Anwesenheit von NAD^+ während der Biotransformationen mit D-Fruktose einen stabilisierenden Effekt auf die spezifische Produktivität hatte, wurde auch diesen Ansätzen 5 mM NAD^+ zum Startzeitpunkt zugegeben. Im Ansatz mit Glukose-Isomerase aus *S. rubiginosus* wurden nach 18 h 625 mM und nach 40 h 781 mM D-Mannitol aus 1 M D-Glukose gebildet (Tab. 4). Im Ansatz mit Sweetzyme IT® erfolgte unter gleichen Bedingungen eine Bildung von 644 mM D-Mannitol nach 18 h bzw. von 821 mM D-Mannitol nach 40 h Inkubation (Tab. 4). In der Reaktion mit Glukose-Isomerase aus *S. rubiginosus* verblieben nach 40 h 7 mM D-Fruktose bzw. 28 mM D-Glukose im Überstand (Tab. 4). Im Experiment mit Sweetzyme IT® wurde nach 40 h weder D-Glukose noch D-Fruktose im Überstand gemessen (Tab. 4). Die spezifische Produktivität der Biotransformationen, bezogen auf 18 h Reaktionszeit, waren in beiden Fällen 2,1 g x $(g_{ZTM} \times h)^{-1}$ und die D-Mannitol Ausbeute $Y_{D\text{-Mannitol/D-Glukose}}$ der Reaktionen war 78 - 82 mol%. Ohne Zugabe von Glukose-Isomerase war der *E. coli* Stamm BL21 (DE3) pET24 *fdh mdh* pZY507 *glf* unter gleichen Bedingungen zu keiner D-Mannitol Bildung aus D-Glukose fähig. Es konnte auch keine intrazelluläre Glukose-Isomerase Aktivität festgestellt werden.

Durch Zugabe von Glukose-Isomerasen in den Biotransformationsansatz wurde die D-Glukose dort zu D-Fruktose isomerisiert. Dies ist daran zu erkennen, dass nach 18 h Biotransformation 67 bzw. 111 mM D-Fruktose im Überstand vorhanden war. Der *E. coli* Stamm BL21 (DE3) pET24 *fdh mdh* pZY507 *glf* nahm die enzymatisch gebildete D-Fruktose auf und reduzierte sie zu D-Mannitol.

Tab. 4: Konzentrationen von D-Mannitol, D-Fruktose und D-Glukose während Ganzzell-Biotransformationen mit *E. coli* Stamm BL21 (DE3) pET24 *fdh mdh* pZY507 *glf* und zugesetzten Glukose-Isomerasen.

Zugesetzte Glukose-Isomerase	Spezifische Produktivität (nach 18 h) [$g_{D\text{-}Mannitol}$ x (g_{ZTM} x h)$^{-1}$]	Konzentration im Biotransformationsansatz [mM]					
		nach 18 h			nach 40 h		
		D-Mannitol	D-Fruktose	D-Glukose	D-Mannitol	D-Fruktose	D-Glukose
S. rubiginosus	2,1	625	67	156	781	7	28
Sweetzyme IT®	2,1	644	111	142	821	0	0

3.2 Koexpression einer Glukose-Isomerase

Nachdem mit dem *E. coli* Stamm BL21 (DE3) pET24 *fdh mdh* pZY507 *glf* in Anwesenheit von Glukose-Isomerasen im Biotransformationsansatz eine D-Mannitol Bildung aus D-Glukose gezeigt worden war, sollte dies auch mittels einer koexprimierten Glukose-Isomerase geschehen.

3.2.1 Klonierung und Expression der Glukose-Isomerase in *E. coli*

In Zellextrakten von *E. coli* BL21 (DE3) pET24 *fdh mdh* pZY507 *glf* war aufgrund der regulierten Expression des *xyl*-Operons keine Glukose-Isomerase Aktivität nachweisbar (David und Wiesmeyer, 1970; Shamanna *et al.*, 1979a/b; Briggs *et al.*, 1984; Schellenberg *et al.*, 1984). Daher sollte zunächst eine Glukose-Isomerase in *E. coli* überexprimiert werden. Dazu wurde das Glukose (Xylose) Isomerase Gen aus *E. coli* ($xylA_{Ec}$) von genomischer DNA mit den sequenzspezifischen Oligonukleotidprimern $xylA_{Ec}$-*Nde*I-f / $xylA_{Ec}$-*Eco*RI-r amplifiziert. Mittels der dabei angefügten Restriktionsschnittstellen 5'-*Nde*I / 3'-*Eco*RI erfolgte die Klonierung in das Expressionsplasmid pET24a(+) hinter einen *T7*-Promotor. Das so konstruierte Plasmid pET24 $xylA_{Ec}$ (Abb. 24) wurde in den *E. coli* Stamm BL21 (DE3) transformiert.

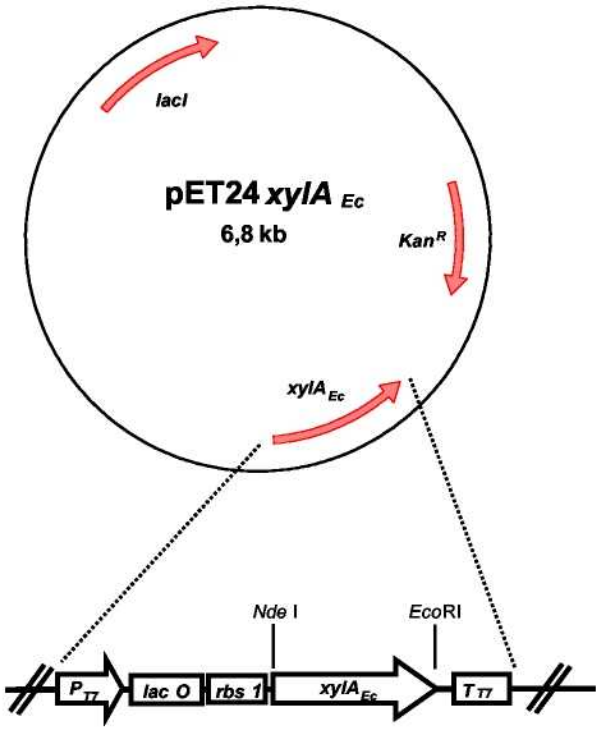


Abb. 24: Plasmid pET24 $xylA_{Ec}$ mit *T7* Promotor (P_{T7}), *lac* Operator (*lac O*), pET24a(+) kodierter Ribosomen Bindestelle (*rbs* 1), Xylose Isomerase Gen aus *E. coli* ($xylA_{Ec}$) und *T7* Terminator (T_{T7}).

Anschließende Expressionsexperimente mit dem *E. coli* Stamm BL21 (DE3) pET24 $xylA_{Ec}$ zeigten in SDS-PAGE Analysen von zellfreien Extrakten eine Überexpression der Glukose-Isomerase (Abb. 25).

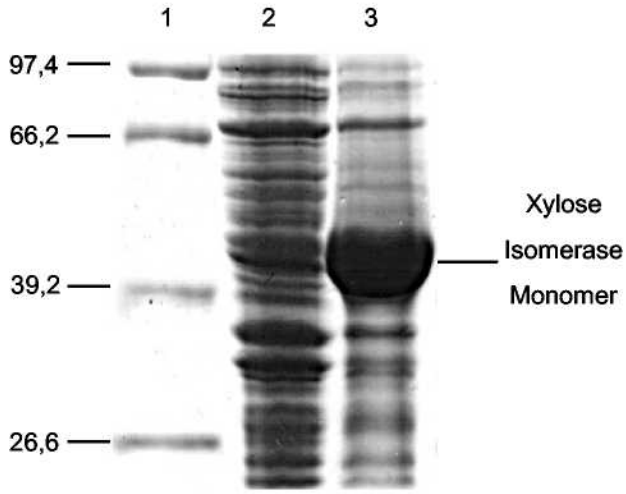


Abb. 25: SDS-PAGE Analyse von zellfreien *E. coli* Extrakten. Spur 1: Proteingrößen-Marker; Spur 2: *E. coli* BL21 (DE3) pET24 $xylA_{Ec}$ (uninduziert); Spur 3: *E. coli* BL21 (DE3) pET24 $xylA_{Ec}$ (induziert).

Trotz der starken Überexpression der Glukose-Isomerase in *E. coli* BL21 (DE3) pET24 $xylA_{Ec}$ (Abb. 25) war dessen spezifische Aktivität in zellfreien Extrakten mit dem Substrat D-Glukose (500 mM) bei 30 °C und einem pH-Wert von 6,5 mit 0,08 U x $(mg_{Protein})^{-1}$ sehr niedrig. Die Zugabe von Co^{2+} und Mg^{2+} Ionen führte zu einer Aktivitätserhöhung auf 0,16 U x $(mg_{Protein})^{-1}$, die anschließende Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 50 °C zu einer Aktivitätserhöhung auf 1,25 U x $(mg_{Protein})^{-1}$.

Xylose Isomerasen, darunter auch das Enzym aus *E. coli*, haben eine geringere Affinität zu D-Glukose im Vergleich zu dem Substrat D-Xylose. Auch die Enzymaktivität mit D-Glukose ist geringer als mit D-Xylose. Außerdem sind die Enzyme abhängig von Mg^{2+} und / oder Co^{2+} Ionen. Die Enzyme haben ein Temperaturoptimum deutlich über 30 °C und ihr pH-Optimum liegt oberhalb von pH 7,0 (Chen, 1980; Schellenberg *et al.,* 1984; Batt *et al.,* 1990; Bor *et al.*, 1992; Bhosale *et al.*, 1996). Die Ergebnisse der Aktivitätsanalysen der Glukose-Isomerase aus *E. coli* in dieser Arbeit sind damit übereinstimmend.

Wie im *E. coli* Stamm BL21 (DE3) pET24 *fdh mdh* pZY507 *glf* war im Kontrollstamm *E. coli* BL21 (DE3) pET24a(+) keine Glukose-Isomerase Aktivität nachweisbar.

Auch das Glukose (Xylose) Isomerase Gen aus *Actinoplanes missouriensis* ($xylA_{Am}$) wurde, nach Amplifikation vom Plasmid pRA4 mit den Oligonukleotidprimer $xylA_{Am}$-*Nde*I-f / $xylA_{Am}$-*Eco*RI-r, in das Plasmid pET24a(+) kloniert. SDS-PAGE Analysen von zellfreien Extrakten des *E. coli* Stamm BL21 (DE3) pET24 $xylA_{Am}$ nach Expressionsexperimenten zeigten zwar eine Expressionsbande des Glukose-Isomerase Monomers, eine Enzymaktivität war aber nahezu nicht messbar. Für die weiteren Experimente wurde daher das *xylA* Gen aus *E. coli* verwendet.

3.2.2 Ergänzung des Plasmids pET24 *fdh mdh* durch das Glukose-Isomerase Gen aus *E. coli*

Sowohl Plasmid pET24 $xylA_{Ec}$ als auch das Plasmid pET24 *fdh mdh* sind Derivate des Ausgangsplasmid pET24a(+). Die Plasmide haben damit den gleichen *ColE1* Replikationsursprung und kodieren das gleiche Kanamycin-Resistenzgen. Daraus resultiert zum einen eine Plasmidinkompatibilität und zum anderen können die Plasmide nicht mit verschiedenen Antibiotika selektiert werden. Die stabile Etablierung des Plasmids pET24 $xylA_{Ec}$ im *E. coli* Stamm BL21 (DE3) pET24 *fdh mdh* pZY507 *glf* ist durch Kotransformation also nicht möglich. Damit ist das Plasmid pET24 $xylA_{Ec}$ für die Koexpression der Glukose-Isomerase im *E. coli* Stamm BL21 (DE3) pET24 *fdh mdh* pZY507 *glf* nicht geeignet. Daher wurde das *xylA* Gen und sein stromaufwärts gelegener *T7*-Promotor mit den sequenzspezifischen Oligonukleotidprimern $xylA_{Ec}$-*Bst*1107I-f / $xylA_{Ec}$-Bst1107I-r vom Plasmid pET24 $xylA_{Ec}$ (Abb. 24) amplifiziert. Die dabei angefügten 5' / 3' *Bst*1107I-Restriktionsschnittstellen dienten zur Klonierung in das Plasmid pET24 *fdh mdh* (Abb. 7). Nach Transformation des so konstruierten Plasmids pET24 *fdh mdh* P_{T7} $xylA_{Ec}$ in den *E. coli* Stamm BL21 (DE3) pZY507 *glf* wurden zunächst Expressions-experimente durchgeführt. Analysen zellfreier Extrakte des *E. coli* Stammes BL21 (DE3) pET24 *fdh mdh* P_{T7} $xylA_{Ec}$ pZY507 *glf* ergaben Enzymaktivitäten von 0,16 U x $(mg_{Protein})^{-1}$ füt die Formiat-Dehydrogenase, 0,80 U x $(mg_{Protein})^{-1}$ für die Mannitol-2-Dehydrogenase und 0,01 U x $(mg_{Protein})^{-1}$ für die Glukose-Isomerase (Tab. 5; Seite 72). Dies war eine Absenkung der Enzymaktivitäten auf etwa ein Zehntel im Vergleich zu den jeweiligen Enzymaktivitäten in den Ausgangsstämmen *E. coli* BL21 (DE3) pET24 *fdh mdh* pZY507 *glf* bzw. *E. coli* BL21 (DE3) pET24 $xylA_{Ec}$ (Tab. 5, S. 70).

3.2.3 Ganzzell-Biotransformation mit koexprimierter Glukose-Isomerase

Da im *E. coli* Stamm BL21 (DE3) pET24 *fdh mdh* P_{T7} $xylA_{Ec}$ pZY507 *glf* Enzymaktivitäten für Formiat-Dehydrogenase-, Mannitol-2-Dehydrogenase und Glukose-Isomerase nachweisbar waren, wurde dieser Stamm in Ganzzell-Biotransformationen mit D-Glukose als Substrat eingesetzt. Die Biotransformationslösung entsprach derjenigen aus den Experimenten mit zugesetzten Glukose-Isomerasen. Zum Ausgleich der verringerten Enzymaktivitäten wurde die Zellkonzentration auf 5 g_{ZTM} / l erhöht. Dies führte nach 18 h Inkubation im Schüttelkolben bei 37 °C zu einer Bildung von 92 mM D-Mannitol und 117 mM D-Fruktose. Es verblieben 750 mM D-Glukose in der Lösung. Die spezifische Produktivität der D-Mannitol Bildung war mit 0,19 g x $(g_{ZTM} \times h)^{-1}$ geringer als die spezifischen Produktivitäten in den Biotransformationen mit dem Substrat D-Fruktose. Dies war einerseits die Folge der vergleichsweise niedrigeren Enzymaktivitäten von Formiat-Dehydrogenase und Mannitol-2-Dehydrogenase. Andererseits hatte die Glukose-Isomerase im *E. coli* Stamm BL21 (DE3) pET24 *fdh mdh* P_{T7} $xylA_{Ec}$ eine noch wesentlich geringere Aktivität als die Formiat- und Mannitol-2-Dehydrogenase. Somit lag die Limitierung der spezifischen Produktivität zunächst hauptsächlich an der Glukose-Isomerase Aktivität. Das Auftreten von D-Fruktose im Reaktionsüberstand folgte aus einer weiteren Aktivitätsabnahme des NAD(H)-abhängigen Redox-Zyklus aus Formiat- und Mannitol-2-Dehydrogenase. Dies konnte aus einer Abnahme des intrazellulären NAD(H)-Pools resultieren, wie es in den Biotransformationen mit D-Fruktose der Fall war. Die D-Fruktose Reduktion im *E. coli* Stamm BL21 (DE3) pET24 *fdh mdh* P_{T7} $xylA_{Ec}$ kam dabei zum Stillstand, während die Isomerisierung von D-Glukose zu D-Fruktose durch die Glukose-Isomerase weiterhin ablief.

Dennoch war der *E. coli* Stamm BL21 (DE3) pET24 *fdh mdh* P_{T7} $xylA_{Ec}$ pZY507 *glf* eine Zeit lang in der Lage, aufgenommene D-Glukose intrazellulär in D-Fruktose zu isomerisieren und diese anschließend zu D-Mannitol zu reduzieren. Ein paralleler Ansatz mit dem *E. coli* Stamm BL21 (DE3) pET24 *fdh mdh* pZY507 *glf* unter gleichen Bedingungen führte zu keiner D-Mannitol bzw. D-Fruktose Bildung und es verblieben 950 mM D-Glukose in der Lösung.

3.2.4 Variation der Expressionssysteme für Formiat-Dehydrogenase, Mannitol 2-Dehydrogenase und Glukose-Isomerase

Die gleichzeitige Expression von Formiat-Dehydrogenase, Mannitol-2-Dehydrogenase und Glukose-Isomerase führte zu reduzierten Enzymaktivitäten in *E. coli* BL21 (DE3) pET24 *fdh mdh* P_{T7} $xylA_{Ec}$ pZY507 *glf* und damit zu einer geringeren spezifischen Produktivität der D-Mannitol Bildung. Es wurden daher eine Reihe von Plasmiden konstruiert, die es erlauben, die gleichzeitige Expression von Formiat-Dehydrogenase, Mannitol-2-Dehydrogenase und Glukose-Isomerase, in *E. coli* auf verschieden Weise zu kombinieren (Tab. 5). Die verwendeten Plasmide haben unterschiedliche Replikationsursprünge und Resistenzgene und es können daher drei verschiedene Plasmide gleichzeitig in einem *E. coli* Stamm gehalten werden (Held *et al.,* 2003; Tab. 5). Dadurch gelang es auch die Plasmide pET24 *fdh mdh* und pET24 $xylA_{Ec}$ jeweils zur gleichzeitigen Expression von Formiat-Dehydrogenase, Mannitol-2-Dehydrogenase und Glukose-Isomerase einzusetzen (Tab. 5). Vorangegangene Expressionsexperimenten mit diesen Plasmiden zeigten vergleichsweise hohe Aktivitäten der jeweiligen Enzyme. Nach Transformation dieser Plasmide in entsprechende *E. coli* BL21 (DE3) Stämme wurden zunächst Expressionsexperimente mit den resultierenden Stämmen durchgeführt (Tab. 5).

Doch auch in den so konstruierten Stämmen sanken bei gleichzeitiger Expression von Formiat-Dehydrogenase, Mannitol-2-Dehydrogenase und Glukose-Isomerase die spezifischen Enzymaktivitäten im Vergleich zur alleinigen Expression der jeweiligen Enzyme (Tab. 5). War allerdings z.B. das Glukose-Isomerase Gen vorhanden, das Protein jedoch nicht oder nur sehr schwach exprimiert, sank die Aktivität der Formiat-Dehydrogenase und Mannitol-2-Dehydrogenase meist nur unwesentlich. Diese Effekte waren unabhängig von der jeweils verwendeten Plasmid Kombination (Tab. 5). Die Verminderung der Enzymaktivität von Formiat-Dehydrogenase, Mannitol-2-Dehydrogenase und Glukose-Isomerase bei gleichzeitiger Expression war vermutlich auf die zunehmende Anzahl der exprimierten Proteine zurückzuführen. Dies wurde bereits bei der gleichzeitigen Expression mehrerer Reporter-Proteine beobachtet (Held *et al.,* 2003).

Die Variation des Promotors des *xylA*-Gens war für eine Erhöhung der Glukose-Isomerase Expression nicht geeignet. Expressionsexperimente mit den T7-RNA-Polymerase unabhängigen Plasmiden pQE80 $xylA_{Ec}$ (*T5* Promotor) und pBtac $xylA_{Ec}$ (*tac* Promotor) führten zu keinen Glukose-Isomerase Aktivitäten in zellfreien *E. coli* Extrakten. Auch die Expression der Glukose-Isomerase aus *Arthrobacter* sp. NRRL B-3728, nach Klonierung des entsprechenden Gens ($xylA_{AB}$) in eines der Expressionsplasmide, war nicht erfolgreich.

Unter den analysierten Stämmen hatte *E. coli* BL21 (DE3) pET24 $xylA_{Ec}$ pCDF Duett *fdh mdh* pZY507 *glf* mit 0,3 U x $(mg_{Protein})^{-1}$ für die Formiat-Dehydrogenase, 3,0 U x $(mg_{Protein})^{-1}$ für die Mannitol-2-Dehydrogenase und 0,02 U x $(mg_{Protein})^{-1}$ für die Glukose-Isomerase die höchsten Enzymaktivitäten (Tab. 5). In zwei weiteren konstruierten *E. coli* Stämmen waren die jeweiligen Enzymaktivitäten mit denen des zuvor analysierten Stammes *E. coli* BL21 (DE3) pET24 *fdh mdh* P_{T7} $xylA_{Ec}$ pZY507*glf* nahezu identisch (Tab. 5).

Tab. 5: Plasmidkombinationen zur gleichzeitigen Expression von Formiat-Dehydrogenase, Mannitol-2-Dehydrogenase, Glukose-Isomerase und Glukose-Facilitator und spezifische Aktivitäten der rekombinanten, cytosolischen Enzyme (n.b.: nicht bestimmt).

E. coli Stamm BL21 (DE3) Replikationsursprünge der Plasmide			spezifische Aktivität [U x $(mg_{Protein})^{-1}$] bei 30 °C (ohne Supplementation von Kofaktoren)		
ColE1	*CloDF13*	*P15A*	Formiat-Dehydrogenase	Mannitol-2-Dehydrogenase	Glukose-Isomerase
pET24 *fdh mdh*		pZY507 *glf*	1,60	12,00	0,00
-	pCDF Duett *fdh mdh*	pZY507 *glf*	1,20	12,00	0,00
pET24 $xylA_{Ec}$	-	-	0,00	0,00	0,08
-	pCDF Duett $xylA_{Ec}$	-	0,00	0,00	0,05
pET24 *fdh mdh* P_{T7} $xylA_{Ec}$	-	pZY507 *glf*	0,16	0,80	0,01
-	pCDF Duett *fdh mdh* $xylA_{Ec}$	pZY507 *glf*	0,12	0,80	0,02
pET24 *fdh mdh*	pCDF Duett $xylA_{Ec}$	pZY507 *glf*	0,10	0,60	0,02
pET24 $xylA_{Ec}$	pCDF Duett *fdh mdh*	pZY507 *glf*	0,30	3,00	0,02

Der *E. coli* Stamm BL21 (DE3) pET24 $xylA_{Ec}$ pCDF Duett *fdh mdh* pZY507 *glf* und die zwei weiteren *E. coli* Stämme wurden erneut in Ganzzell-Biotransformations-experimente im Schüttelkolben eingesetzt. Das geschah in Anwesenheit von 5 mM NAD^+ im Biotrasnformationsansatz zur Stabilisierung der spezifischen Produktivität. Unter den analysierten Stämmen war *E. coli* BL21 (DE3) pET24 $xylA_{Ec}$ pCDF Duett *fdh mdh* pZY507 *glf* der beste D-Mannitol Produzent. Er bildete mit 357 mM die höchste D-Mannitol Konzentration aus 1 M D-Glukose und hatte mit 0,72 $g_{D\text{-}Mannitol}$ x $(g_{ZTM} \times h)^{-1}$ auch die höchste spezifische Produktivität (Tab. 6). Eine Erhöhung der Enzymaktivitäten für Formiat-Dehydrogenase, Mannitol-2-Dehydrogenase und Glukose-Isomerase führte also zu einer Steigerung der spezifischen Produktivität.

Tab. 6: Konzentrationen von D-Mannitol, D-Fruktose und D-Glukose im Überstand von Biotransformationsansätzen mit verschiedenen *E. coli* Stämmen.

E. coli Stamm BL21 (DE3) Replikationsursprünge der Plasmide			Spezifische Produktivität $[g_{D\text{-}Mannitol} \times (g_{ZTM} \times h)^{-1}]$	Konzentration nach 18 h [mM]		
ColE1	*CloDF13*	*P15A*		D-Mannitol	D-Fruktose	D-Glukose
pET24 *fdh mdh*	pCDF Duett $xylA_{Ec}$	pZY507 *glf*	0,31	155	320	465
-	pCDF Duett *fdh mdh* $xylA_{Ec}$	pZY507 *glf*	0,40	196	111	656
pET24 $xylA_{Ec}$	pCDF Duett *fdh mdh*	pZY507 *glf*	0,72	357	57	556

3.2.5 Einfluss des pH-Wertes auf die D-Mannitol Bildung aus D-Glukose

Entsprechend den Experimenten mit dem Substrat D-Fruktose wurde die pH-Abhängigkeit der Ganzzell-Biotransformation mit dem Substrat D-Glukose analysiert. Es wurden Ganzzell-Biotransformationen mit dem Stamm *E. coli* BL21 (DE3) pET24 *fdh mdh* pCDF Duett $xylA_{Ec}$ pZY507 *glf* bei verschiedenen pH-Werten zwischen 6,0 und 8,0 in Anwesenheit von NAD^+ durchgeführt. Bei pH-Werten von 6,0 – 7,0 kam es nur zu geringer D-Mannitol Bildung. Bei pH-Werten von 7,5 – 8,0 wurde mehr D-Mannitol gebildet, bei gleichzeitiger Akkumulation von D-Fruktose im Reaktionsüberstand (Tab. 7).

Es lag demnach eine pH-Abhängigkeit der D-Mannitol Bildung aus D-Glukose vor. Die D-Mannitol Bildung war bei einem pH-Wert von 7,5 hoch aber die D-Fruktose Akkumulation vergleichsweise gering. Das pH-Optimum der Biotransformation mit *E. coli* BL21(DE3) pET24 *fdh mdh* pCDF Duett $xylA_{Ec}$ pZY507 *glf* und dem Substrat D-Glukose liegt also bei einem pH-Wert von 7,5 und damit höher als bei Biotransformation mit *E. coli* BL21(DE3) pET24 *fdh mdh* pZY507 *glf* und dem Substrat D-Fruktose (pH 6,5). Dies konnte daran liegen, dass die Glukose-Isomerase ein pH Optimum oberhalb von pH 7,0 hat (Chen, 1980 a/b; Bhosale *et al.*, 1996). Die Akkumulation der D-Fruktose bei zunehmendem pH-Wert konnte damit zusammenhängen, dass die D-Fruktose Reduktion durch den Redoxzyklus mit Formiat- und Mannitol-2-Dehydrogenase bei pH-Werten über 7,5 verringert war. Dieses wurde bereits in den kinetischen Analysen zur D-Mannitol Bildung aus D-Fruktose bei einem pH-Wert Anstieg auf 7,9 im Schüttelkolben beobachtet (siehe Ergebnisse 2.5). Diese Erklärung ist allerdings nur dann zutreffend, wenn die Zelle den intrazellulären pH-Wert nicht mehr regulierte und sich dieser dann der Umgebung anpasste.

Tab. 7: Konzentrationen von D-Mannitol, D-Fruktose und D-Glukose im Überstand von Ganzzell-Biotransformationen bei verschiedenen pH-Werten mit *E. coli* BL21(DE3) pET24 *fdh mdh* pCDF Duett $xylA_{Ec}$ pZY507 *glf*.

pH-Wert	Spezifische Produktivität $[g_{D\text{-}Mannitol} \times (g_{ZTM} \times h)^{-1}]$	Konzentration nach 18 h [mM]		
		D-Mannitol	D-Fruktose	D-Glukose
pH 6,0	0,05	22	9	741
pH 6,5	0,08	36	27	833
pH 7,0	0,12	60	13	806
pH 7,5	0,51	250	67	517
pH 8,0	0,55	269	114	479

Nach Ermittlung des optimalen pH-Bereichs wurden die drei rekombinanten *E. coli* Stämme, die bereits im Schüttelkoben auf ihre Fähigkeit zur D-Mannitol Bildung überprüft worden waren (Tab. 6) auch bei konstantem pH-Wert von 7,5, in Anwesenheit von NAD^+, getestet. Dabei stellte sich unter den untersuchten Stämmen *E. coli* BL21 (DE3) pET24 $xylA_{Ec}$ pCDF Duett *fdh mdh* pZY507 *glf* erneut als bester D-Mannitol Produzent heraus (Tab. 8). Dieser bildete dabei mit 313 mM zwar keine höhere D-Mannitol Konzentration als im Schüttelkolben, jedoch akkumulierte keine D-Fruktose. Dies bestätigte noch einmal die beschriebene pH-Wert Abhängigkeit der Aktivität des Redoxzyklus zur D-Mannitol Bildung.

Tab. 8: Ganzzell-Biotransformationen mit verschiedenen *E. coli* Stämmen (5 g_{ZTM} / l) bei 37 °C in 1 M D-Glukose, 500 mM Natrium-Formiat, je 5 mM NAD^+, $MgCl_2$, $CoCl_2$ in 100 mM Kaliumphosphatpuffer bei einem pH-Wert von 7,5.

Stamm *E. coli* BL21 (DE3)	Spezifische Produktivität $[g_{D\text{-}Mannitol} \times (g_{ZTM} \times h)^{-1}]$	Konzentration nach 18 h [mM]		
		D-Mannitol	D-Fruktose	D-Glukose
pZY507 *glf;* pET24 *fdh mdh;* pCDF Duett $xylA_{Ec}$	0,51	250	67	517
pZY507 *glf;* pCDF Duett *fdh mdh* $xylA_{Ec}$	0,52	260	3	566
pZY507 *glf;* pET24 $xylA_{Ec}$; pCDF Duett *fdh mdh*	0,63	313	< 1	617

Im weiteren Verlauf der Biotransformation mit dem *E. coli* Stamm BL21(DE3) pET24 $xylA_{Ec}$ pCDF Duett *fdh mdh* pZY507 *glf* wurden nach 40 Stunden 420 mM D-Mannitol aus D-Glukose gebildet.

Entsprechend der Analyse zum Einfluss der Anwesenheit von NAD^+ während der Ganzzell-Biotransformation mit D-Fruktose wurde dies auch bei der Ganzzell-Biotransformation mit D-Glukose durchgeführt. Dazu wurden Ganzzell-Biotransformationen mit dem *E. coli* Stamm BL21(DE3) pET24 $xylA_{Ec}$ pCDF Duett *fdh mdh* pZY507 *glf* und dem Substrat D-Glukose in An- und Abwesenheit von 5 mM NAD^+ in der Biotransformationslösung verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass es in Abwesenheit von NAD^+ in der Biotransformationslösung zu einer Bildung von 104 mM D-Mannitol und der Akkumulation von 200 mM D-Fruktose kam, während in Anwesenheit von NAD^+ in der Biotransformationslösung 313 mM D-Mannitol ohne D-Fruktose Akkumulation gebildet wurde. Die Konzentration der umgesetzten D-Glukose war in beiden Fällen mit etwa 400 mM nahezu identisch. Es zeigte sich also auch hier die Abhängigkeit der D-Mannitol Bildung durch den Redoxzyklus von der Anwesenheit ausreichender NAD(H) Konzentrationen. Demnach nahm auch in diesen Biotransformationen der NAD(H)-Pool über die Zeit ab.

IV. Diskussion

D-Mannitol wird industriell durch chemisch Reduktion von Glukose / Fruktose Gemischen hergestellt. Biotechnologische Ansätze zur Gewinnung von D-Mannitol waren bisher die Bildung durch Fermentation mit heterofermentativen Milchsäurebakterien aus D-Fruktose / D-Glukose Gemischen bzw. die enzymatische Reduktion von D-Fruktose. Die chemische Reduktion und die Fermentation liefern dabei Nebenprodukte. Bei der enzymatischen D-Mannitol Bildung muss der zur Fruktose-Reduktion notwendige Kofaktor zugesetzt werden (Makkee *et al.,* 1985; Slatner *et al.,* 1998 a/b; Soetaert *et al.,* 1995, 1999; von Weymarn *et al.*, 2002). Ziel dieser Arbeit war die Konstruktion von *E. coli* Stämmen, die nur aus D-Fruktose bzw. nur aus D-Glukose D-Mannitol ohne Nebenprodukte bilden konnte. Dazu wurde zunächst die Mannitol-2-Dehydrogenase des heterofermentativen Milchsäure-bakteriums *Leuconostoc pseudomesenteroides* in *E. coli* exprimiert.

1 Die Mannitol-2-Dehydrogenase aus *L. pseudomesenteroides*

Die Mannitol-2-Dehydrogenase aus *L. pseudomesenteroides* ist *in vivo* ein Tetramer, ihre Aktivität ist Zn^{2+}-abhängig und sie gehört zur Proteinfamilie der „medium-chain dehydrogenases / reductases" (MDR) (Hahn *et al.,* 2003). Das Enzym unterscheidet sich damit von anderen bakteriellen Mannitol-2-Dehydrogenasen, wie den Enzymen aus *Pseudomonas fluorescens* oder *Rhodobacter sphaeroides.* Diese benötigen keine Zn^{2+}-Ionen für ihre Aktivität und gehören zur Proteinfamilie der „long-chain dehydrogenases / reductases" (LDR) (Schneider und Giffhorn 1989; Schneider *et al.*, 1993; Bruenker *et al.*, 1997; Slatner *et al.,* 1998a/b, 1999; Klimacek *et al.,* 2003). Die Funktion der Zn^{2+}-Ionen bei der Katalyse durch die Mannitol-2-Dehydrogenase besteht vermutlich in der Polarisierung der Carbonylfunktion der D-Fruktose. Der Übergangszustand des Substrats bei der Reduktion zu D-Mannitol wird dabei stabilisiert, ähnlich wie es bei der Reduktion von Acetaldehyd zu Ethanol durch die Alkohol-Dehydrogenase der Hefe der Fall ist (Stryer, 1994; S. 379). Die Stabilisierung eines Übergangszustands durch Polarisation mittels Zn^{2+}-Ionen tritt auch bei der Umwandlung von $H_2O + CO_2$ zu $HCO_3^- + H^+$ durch die Carboanhydrase auf. Dies führt zu einer starken Beschleunigung der Reaktionsgeschwindigkeit (Stryer, 1994; S. 38).

In Übereinstimmung damit hat die Zn^{2+}-abhängige Mannitol-2-Dehydrogenase aus *L. pseudomesenteroides* eine etwa 8-fach höhere Aktivität der D-Fruktose Reduktion im Vergleich zu den Enzymen aus *P. fluorescens* und *R. sphaeroides* (Schneider und Giffhorn 1989; Slatner *et al.,* 1998, 1999; Schneider *et al.*, 1993; Bruenker *et al.*, 1997). Die Mannitol-2-Dehydrogenase aus dem heterofermentativen Milchsäurebakterium *Lactobacillus intermedius* ist ebenfalls Kationen-abhängig (unter anderem Zn^{2+}). Deren Aktivität liegt dementsprechend in der gleichen Größenordnung wie die Aktivität der Mannitol-2-Dehydrogenase aus *L. pseudomesenteroides* (Saha, 2004). Außerdem ist die Affinität der Mannitol-2-Dehydrogenase aus *L. pseudomesenteroides* zu D-Mannitol deutlich geringer als die der Enzyme aus *P. fluorescens* oder *R. sphaeroides* (Schneider und Giffhorn 1989; Schneider *et al.*, 1993; Bruenker *et al.*, 1997).

Diese Eigenschaften sind ein Hinweis darauf, dass die physiologische Rolle der Mannitol-2-Dehydrogenase in *L. pseudomesenteroides* die Übertragung von Elektronen von NADH auf Fruktose ist (Wisselink *et al.,* 2002; Hahn *et al.,* 2003). Die Enzyme in *P. fluorescens* und *R. sphaeroides* hingegen dienen eher der D-Mannitol Oxidation und erlauben so den Mikroorganismen D-Mannitol als Kohlenstoffquelle zu nutzen. Damit übereinstimmend sind die größeren Substratspektren der Mannitol-2-Dehydrogenasen aus *P. fluorescens* und *R. sphaeroides*, die im Gegensatz zu dem Enzym aus *L. pseudomesenteroides* neben D-Fruktose und D-Mannitol auch D-Ribulose, D-Xylulose, D-Arabinitol und D-Sorbitol als Substrate akzeptieren (Schneider und Giffhorn 1989; Schneider *et al.*, 1993; Bruenker *et al.*, 1997). Folglich war unter diesen Enzymen die Mannitol-2-Dehydrogenase aus *L. pseudomesenteroides* zur D-Mannitol Bildung in einem rekombinanten *E. coli* am besten geeignet.

2 Ganzzell-Biotransformation mit dem Substrat D-Fruktose

Es zeigte sich, dass allein die Expression der Mannitol-2-Dehydrogenase aus *L. pseudomesenteroides* bzw. die Koexpression dieser Mannitol-2-Dehydrogenase und der Formiat-Dehydrogenase aus *M. vaccae* zur Kofaktor-Regeneration in *E. coli* nicht, oder nur in sehr geringem Maße zur D-Mannitol Bildung führen. Demgegenüber genügte es in anderen *E. coli* Stämmen zur Ganzzell-Biotransformation nur das Produktbildungsenzym, bzw. darüber hinaus ein Kofaktor regenerierendes Enzym, zu exprimieren (Galkin *et al.,* 1997; Kataoka *et al.,* 1999; Doig *et al.,* 2003; Walton und Stewart, 2004; Ernst *et al.,* 2004). Außerdem konnten Slatner *et al.* (1998a/b) zeigen, dass durch die gekoppelte enzymatische Aktivität der Mannitol Dehydrogenase aus *P. fluorescens* und der Formiat-Dehydrogenase aus *Candida boidinii* eine *in vitro* Synthese von D-Mannitol aus D-Fruktose und Ammonium Formiat möglich ist. Dies ließ darauf schließen, dass die D-Mannitol Bildung mit *E. coli* nicht durch den Redoxzyklus aus Formiat-Dehydrogenase und Mannitol-2-Dehydrogenase limitiert war. Zwar war die Aktivität der Formiat-Dehydrogenase geringer als die der Mannitol-2-Dehydrogenase, aber vergleichbar mit der Aktivität des gleichen Enzyms in anderen rekombinanten *E. coli* Stämme bei Ganzzell-Biotransformationen (Galkin *et al.,* 1997; Yamamoto *et al.,* 2004).

Tatsächlich lag die Limitierung der D-Mannitol Bildung mit *E. coli* darin begründet, dass *E. coli* D-Fruktose über das Phospho*enol*pyruvat abhängige Phosphotransferase System (PTS) aufnimmt und dabei zu Fruktose-6-Phosphat phosphoryliert (z.B. Kornberg *et al.,* 2000; Tchieu *et al.*, 2001). Fruktose-6-Phosphat ist jedoch kein Substrat der Mannitol-2-Dehydrogenase. Dieses Problem wurde durch den Glukose-Facilitator aus *Z. mobilis* gelöst. Dieser transportiert D-Fruktose und D-Glukose mittels erleichterter Diffusion in die Zelle, ohne diese Zucker dabei zu phosphorylieren. Eine funktionelle Expression dieses Glukose-Facilitators in *E. coli* wurde bereits Parker *et al.* (1995) und Weisser *et al.* (1995) gezeigt. Ein *E. coli* Stamm mit koexprimierter Formiat-Dehydrogenase, Mannitol-2-Dehydrogenase und Glukose-Facilitator stellte sich als effizienter Produzent von D-Mannitol aus D-Fruktose heraus (Abb.1).

Anstelle der Expression des Glukose-Facilitators hätte eine D-Mannitol Bildung in *E. coli* auch durch (Über-)Expression einer Mannitol-1-Phosphat-Dehydrogenase erreicht werden können. Dieses Enzym akzeptiert D-Fruktose-6-Phosphat als Substrat (Ferain *et al.,* 1996; Neves *et al.,* 2000; Wisselink *et al.,* 2002; Hugenholtz *et al.*, 2002). Das dabei gebildete D-Mannitol-1-Phosphat hätte danach jedoch durch eine Mannitol-1-Phosphatase dephosphoryliert werden müssen. In Wildtyp *E. coli* Stämmen findet keine D-Mannitol Bildung durch die zelleigene Mannitol-1-Phosphat-Dehydrogenase Aktivität statt, da durch die von diesen Stämmen durchgeführte gemischte Säuregärung ausreichend NAD^+ regeneriert wird. D-Mannitol wird stattdessen als Kohlenstoffquelle genutzt, indem das durch die Aufnahme gebildete D-Mannitol-1-Phosphat zu Fruktose-6-Phosphat oxidiert und in den zentralen Stoffwechsel eingeschleust wird (Rosenberg *et al.,* 1984; Teschner *et al.,* 1990; Schlegel 1992).

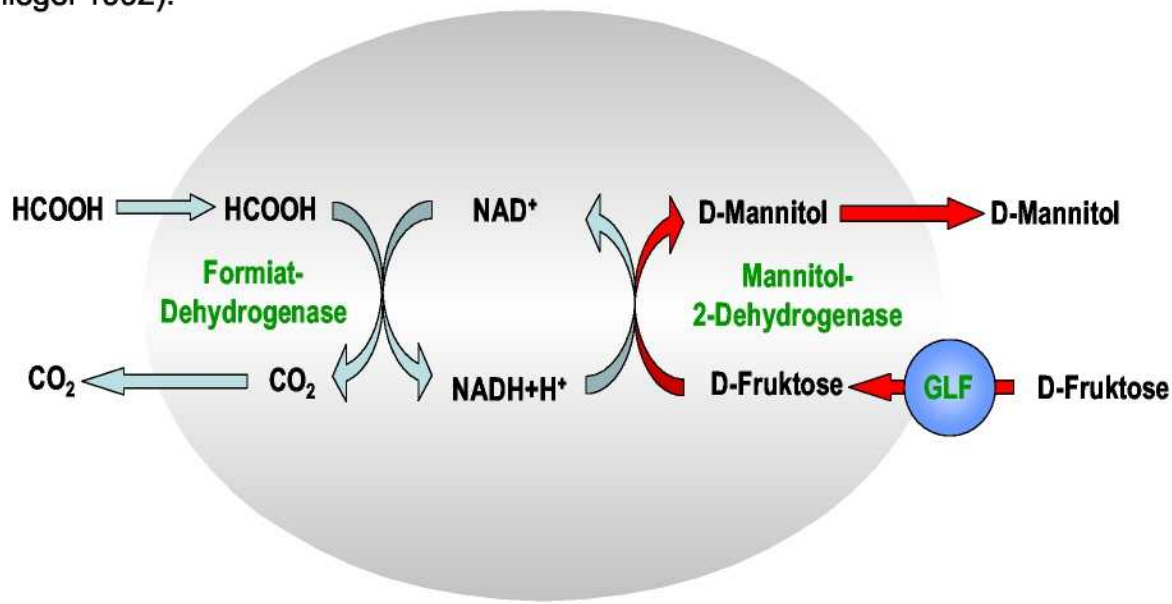


Abb. 1: Rekombinanter *E. coli* Stamm zur Bildung von D-Mannitol aus D-Fruktose.

Der Stoffwechselweg zur D-Mannitol Bildung des rekombinanten *E. coli* ähnelt zunächst dem in heterofermentativen Milchsäurebakterien wie *L. mesenteroides*. D-Fruktose wird ohne Phosphorylierung aufgenommen durch eine Mannitol-2-Dehydrogenase zu D-Mannitol reduziert (Wisselink *et al.*, 2002). Die Gewinnung des dafür notwendigen NADH geschieht jedoch auf unterschiedliche Weise. In *E. coli* dient dazu eine Formiat-Dehydrogenase und deren Substrat Formiat. Es entstanden dabei neben CO_2 keine Nebenprodukte und es wurden bis zu 980 mM D-Mannitol mit einer Ausbeute von 90 % gebildet.

In heterofermentativen Milchsäurebakterien wird das NADH aus dem Abbau von Zuckern gewonnen. Dazu werden D-Glukose und D-Fruktose durch Kinasen zu Glukose-6-Phosphat bzw. Fruktose-6-Phosphat phosphoryliert. Fruktose-6-Phosphat kann durch eine Phosphoglukose-Isomerase auch zu Glukose-6-Phosphat umgewandelt werden. Glukose-6-Phosphat wird erst zu 6-Phosphoglukonat und danach unter CO_2 Abspaltung zu Ribulose-5-Phosphat oxidiert. Die dabei aus einem Molekül D-Glukose bzw. D-Fruktose gebildeten zwei Moleküle NADH können dann zur Reduktion von zwei Molekülen D-Fruktose genutzt werden (Kandler und Weiss, 1986; Wisselink *et al.*, 2002). Ribulose-5-Phosphat wird in Xylulose-5-Phosphat umgewandelt und durch die Phosphoketolase in Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Acetyl-Phosphat gespalten. Daraus werden dann Laktat bzw. Acetat gebildet. In Fermentationen mit *L. mesenteroides* wurde daher D-Fruktose in einem Verhältnis von 2:1 zur D-Glukose den Kulturmedien zugesetzt. Die D-Fruktose wurde mit Ausbeuten von bis zu 93 % (bezogen auf die eingesetzte D-Fruktose) zu D-Mannitol reduziert und dabei D-Mannitol Konzentrationen von bis zu 825 mM erreicht. Die Energiegewinnung und Kofaktor-Regeneration aus D-Glukose führte unter anderem zur Bildung von Laktat und Acetat (Soetaert *et al.* 1995, 1999).

Die D-Mannitol Bildung mit rekombinanten *E. coli* führt also, trotz des unterschiedlichen Stoffwechselwegs, zu ähnlichen Produktkonzentrationen und Ausbeuten wie die Fermentation mit *L. mesenteroides*. Die D-Mannitol Bildung mit rekombinanten *E. coli* verläuft durch die Kofaktor-Regeneration mittels Formiat-Dehydrogenase, im Gegensatz zur Mannitol Bildung mit *L. mesenteroides,* nahezu ohne Nebenprodukte. Eine D-Mannitol Bildung ohne Nebenprodukte ist sonst nur bei der enzymatischen Synthese bekannt (Slatner *et al.,* 1998 a/b).

Die spezifische Produktivität der D-Mannitol Bildung mit dem rekombinanten *E. coli* Stamm (3,3 – 9,5 g x $(g_{ZTM} \times h)^{-1}$) war höher als die mit *L. mesenteroides* (1,5 – 2,6 g x $(g_{ZTM} \times h)^{-1}$) (von Weymarn *et al.,* 2002). Dies konnte mit einer effektiveren Kofaktor-Regeneration durch die Formiat-Dehydrogenase in dem rekombinanten *E. coli* Stamm zusammenhängen. Auch dort war die Höhe der spezifischen Produktivität von der Höhe der Formiat-Dehydrogenase Aktivität abhängig. Eine weitere Steigerung der spezifischen Produktivität der Mannitol Bildung mit rekombinanten *E. coli* Stämmen kann daher durch Erhöhung der Formiat-Dehydrogenase Aktivität

erreicht werden. Die Aktivität der Mannitol-2-Dehydrogenase ist dabei nicht limitierend, da sie in den rekombinanten *E. coli* Stämmen wesentlich höher war als die der Formiat-Dehydrogenase.

Die spezifische Produktivität des rekombinanten *E. coli* Stammes sank allerdings im Verlauf der D-Mannitol Bildung ab. Das war auf eine Abnahme des intrazellulären NAD(H)-Pools des *E. coli* Stammes zurüchzuführen. Diese Abnahme war wesentlich schneller, als z.B. die des *E. coli* Stammes in der von Walton und Stewart (2004) beschrieben Biotransformation in Abwesenheit von Formiat. Inkubierte man den hier konstruierten, rekombinanten *E. coli* Stamm in Abwesenheit von Formiat, so wurde zwar kein D-Mannitol gebildet, jedoch nahm auch der NAD(H)-Pool nicht ab. Bei geringeren Formiat Konzentrationen konnte der rekombinante *E. coli* Stamm bis zu dreimal für Biotransformationen eingesetzt werden. Die spezifische Produktivität der D-Mannitol Bildung war dabei allerdings vermindert (Dr. C. Hemmerling, Nordzucker InnoCenter, persönliche Mitteilung). Dem gegenüber konnte *Leuconostoc* sp. als ruhende Zellen 14-mal hintereinander mit etwa konstanter spezifischer Produktivität zur D-Mannitol Bildung eingesetzt werden (von Weymarn *et al.,* 2002). Der intrazelluläre NAD(H)-Pool von *Leuconostoc* sp. verringerte sich in diesen, von Formiat unabhängigen Biotransformationen offenbar nicht.

Die Abnahme des NAD(H)-Pools im rekombinanten *E. coli* Stamm wurde demnach durch die hohen Formiat Konzentrationen in der Biotransformationslösung beschleunigt. Dies konnte mit den antibakteriellen Eigenschaften kurzkettiger, organischer Säuren wie Ameisensäure in Verbindung stehen (Hinton, 1990; Cherrington *et al.,* 1991; Thompson und Hinton, 1997). Es wird angenommen, dass die Säure in undissoziierter Form die Membran passiert und intrazellulär, abhängig vom dortigen pH-Wert dissoziiert. Es entstehen toxische Säureanionen und die frei werdenden Protonen führen zur Ansäuerung des Cytoplasmas sowie zum Verlust des transmembranen Protonenpotentials (Eklund, 1983; Leitch und Stewart, 2002). Walton und Stewart (2004) vermuteten eine partielle Membran-permeabilisierung als Grund für die vergleichsweise langsame Abnahme des intrazellulären NAD(H)-Pools der ruhenden *E. coli* Zellen während der Ganzzell-Biotransformation. Formiat könnte aufgrund der oben beschriebenen Eigenschaften eine Membranpermeabilisierung der hier verwendeten *E. coli* Stämmen beschleunigt haben. Der Anstieg der

spezifischen Produktivität der D-Mannitol Bildung mit *E. coli* in Anwesenheit von NAD^+ in der Biotransformationslösung resultierte dann auch aus einer Diffusion des NAD^+ durch die permeabilisierten Membranen in die Zellen.

E. coli ist andererseits auch zur Aufnahme von NAD^+ fähig. Dies geschieht durch dessen Spaltung zu Nikotinamid-Mononukleotid (NMN) und ATP durch eine Membran assoziierte NAD-Pyrophosphatase. NMN gelangt dann entweder über den NadR-PnuC-Transporter direkt in die Zelle, oder wird nach Spaltung durch eine ebenfalls membranständige NMN-Glykohydrolase als Nikotinamid aufgenommen. Diese Aufnahmevorgänge, sowie einige NAD^+-Biosynthese-Enzyme unterliegen einer negativen Regulation auf Transkriptionsebene durch den Regulator NadR (Foster und Moat, 1980; Foster *et al.,* 1987; Flachmann *et al.,* 1988; Penfound und Foster 1999). Das aufgenommene NMN wird nach Deaminierung über die durch das Enzym Nikotinsäure-Phosphoribosyltransferase (NAPRTase) katalysierte Reaktion als Nikotinsäure-Mononukleotid in den Pyridinnukleotid-Cycling-Stoffwechsel eingeschleust. Der Pyridinnukleotid-Cycling-Stoffwechsel konnte jedoch auch durch NAD(H)-Abbaureaktionen für die Abnahme des intrazellulären NAD(H)-Pools verantwortlich sein (Foster und Moat, 1980; Penfound und Foster, in Neidhardt *et al.,* 1996).

Eine Stabilisierung oder Vergrößerung des intrazellulären NAD(H)-Pools kann also zu einer Verlängerung der D-Mannitol Bildungsaktivität der ruhenden Zellen des rekombinanten *E. coli* Stammes führen. Ein Ansatz zur Vergrößerung des intrazellulären NAD(H)-Pools ist die Überexpression der NAPRTase (*pncB*) im Pyridinnukleotid-Cycling-Stoffwechsel. Dies führte zu einer 2-fach erhöhten intrazellulären NAD(H) Konzentration, bzw. bei zusätzlicher Supplementation von Nikotinsäure zu einer 5-fachen Vergrößerung des NAD(H)-Pools (Wubbolts *et al.,* 1990; Berrios-Rivera *et al.*, 2002; San *et al,.* 2002).

Der Einsatz einer Biotransformationslösung mit Stickstoffquelle und Salzen oder der Zusatz der Biotransformationssubstrate zum Kultivierungsmedium zur Aufrechterhaltung des intrazellulären NAD(H)-Pools durch den *E. coli* eigenen Stoffwechsel waren keine geeigneten Maßnahmen zu Steigerung der spezifischen Produktivität. Zusätze in der Biotransformationslösung hatte keinen Effekt. Dies

konnte daran gelegen haben, dass die für die NAD-Synthese unter diesen Bedingungen erforderlichen Substanzen nicht oder nicht in ausreichender Konzentration vorhanden waren. Die Zugabe der Biotransformationssubstrate in das Kultivierungsmedium führte zu einer stark verringerten Produktivität der D-Mannitol Bildung (Dr. C. Hemmerling, Nordzucker InnoCenter, persönliche Mitteilung). Dies konnte daran gelegen haben, dass unter diesen Bedingungen Wachstum / Expression und Biotransformation gleichzeitig abliefen. Die Aktivität der Enzyme des zentralen Stoffwechsels der eingesetzten *E. coli* Zellen blieb unter diesen Bedingungen auf dem hohen Niveau einer wachsenden Kultur. Damit konnte auch ein größerer Teil der intrazellulären D-Fruktose in die Glykolyse eingeschleust werden und stand der Mannitol-2-Dehydrogenase nicht mehr als Substrat zur Verfügung. Auch das durch die Formiat-Dehydrogenase gebildete NADH konnte unter diesen Bedingungen häufiger in Konkurrenzreaktionen oxidiert werden. Hinweise für die Aktivität solcher Konkurrenzreaktionen zeigte die Expression einer rekombinanten, NAD-abhängigen Formiat-Dehydrogenase in *E. coli* unter Kultivierungsbedingungen. Dabei vergrößerte sich die Konzentration reduzierter Metabolite deutlich. Beispielsweise stieg das Ethanol/Acetat-Verhältnis an (Berrios-Rivera *et al.,* 2002). Bei Biotransformationsbedingungen in Substratlösung waren die eingesetzten *E. coli* Zellen ruhend. Die Aktivität der Enzyme des zentralen Stoffwechsels war dabei offensichtlich so weit vermindert, dass die Mannitol-2-Dehydrogenase die eingesetzte D-Fruktose zu ca. 90 mol% zu D-Mannitol reduziert unter Oxidation des durch die Formiat-Dehydrogenase gebildeten NADH.

Ein weiterer, limitierender Faktor der spezifischen Produktivität des rekombinanten *E. coli* Stammes ist D-Mannitol, welches die Aktivität der Mannitol-2-Dehydrogenase aus *L. pseudomesenteroides* kompetitiv hemmt. Gleiches wurde auch bei der D-Mannitol Bildung mit ruhenden Zellen des Milchsäurebakteriums *L. mesenteroides* ATCC 9135 beobachtet (von Weymarn *et al.,* 2002). Dieser Stamm besitzt eine zu *L. pseudomesenteroides* sehr ähnliche Mannitol-2-Dehydrogenase (Aarnikunnas *et al.,* 2002). Der Einfluss des D-Mannitols auf die Mannitol-2-Dehydrogenasen und damit auf die Produktbildung ist also in dieser Hinsicht unabhängig von dem verwendeten Bakterienstamm. Eine *in situ* Produktabtrennung könnte, sowohl bei der D-Mannitol Bildung mit rekombinanten *E. coli,* als auch mit *L. mesenteroides* zu einer größeren Produktmenge führen.

3 Ganzzellbiotransformation mit dem Substrat D-Glukose

Der zur D-Mannitol Bildung eingesetzte *E. coli* Stamm konnte nur D-Fruktose aber keine D-Glukose als Substrat nutzen. D-Glukose wird durch isolierte oder immobilisierte Glukose-Isomerasen effektiv zu D-Fruktose isomerisiert (Bhosale *et al.*, 1996). Durch den Zusatz von Glukose-Isomerasen konnte der zur D-Mannitol Bildung eingesetzte *E. coli* Stamm dementsprechend auch D-Glukose als Substrat nutzen. Dabei wurde die D-Glukose in der Substratlösung zu D-Fruktose isomerisiert und diese dann durch den *E. coli* Stamm zu D-Mannitol reduziert (Abb. 2).

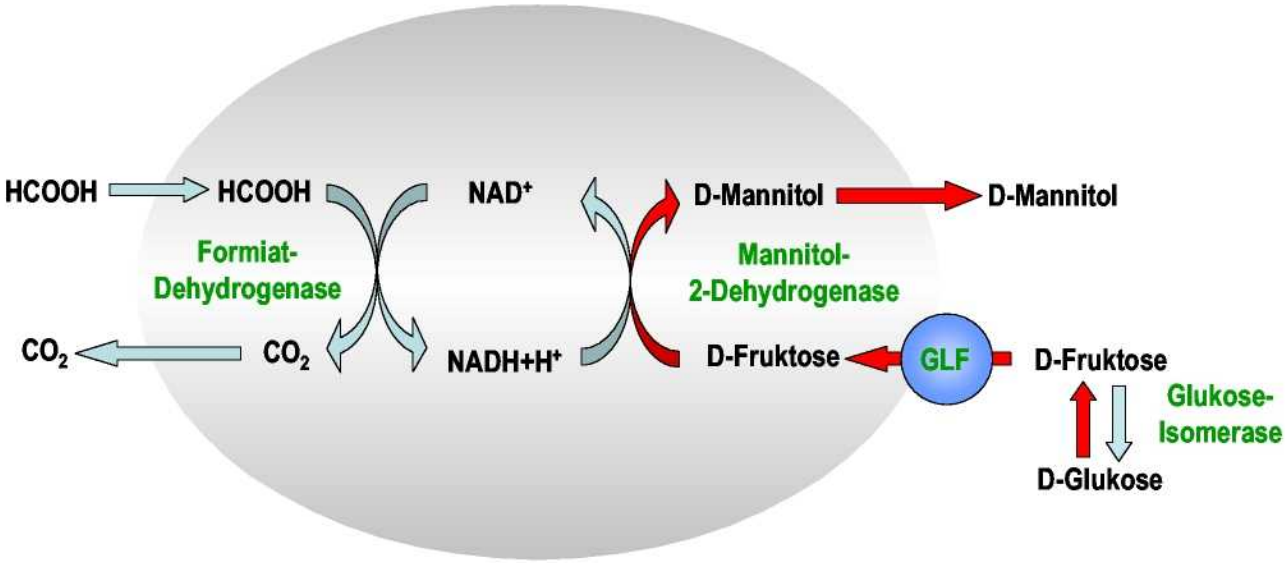


Abb. 2: Rekombinanter *E. coli* Stamm und Glukose-Isomerase im Biotransformationsansatz zur Bildung von D-Mannitol aus D-Glukose.

Die spezifische Produktivität der D-Mannitol Bildung aus D-Glukose war im Vergleich zur D-Mannitol Bildung aus D-Fruktose geringer. Dies lag an der Aktivität der verwendeten Glukose-Isomerasen, da der *E. coli* Stamm unverändert blieb. Glukose-Isomerasen haben eine niedrige Affinität zu D-Glukose und ein Temperaturoptimum über 50 °C (Chen, 1980 a/b; Bhosale *et al.*, 1996). So hat die auch in dieser Arbeit verwendete Glukose-Isomerase aus *Streptomyces rubiginosus* eine maximale Aktivität bei 60°C und einer D-Glukose Konzentration von 300 g/l (1,7 M) (Herstellerangaben, Hampton Research, USA). Ähnliche Eigenschaften besitzt auch das ebenso eingesetzte Immobilisat Sweetzyme® mit den Glukose-Isomerasen aus *Bacillus coagulans* und *Streptomyces murinus* (Bhosale *et al.*, 1996; Novozymes,

Dänemark). Eine Anpassung der Biotransformation an diese Reaktionsbedingungen ist nicht möglich, da dies zu einer Inaktivierung der *E. coli* Zellen bzw. der anderen exprimierten Enzyme führen würde. Eine Erhöhung der spezifischen Produktivität der D-Mannitol Bildung aus D-Glukose könnte jedoch durch eine Steigerung der Menge der Glukose-Isomerase in der Biotransformationslösung erreicht werden. Die Nutzung von immobilisierten Glukose-Isomerasen bietet auch die Möglichkeit der Wiederverwendung. Da Glukose-Isomerasen industriell in großem Maßstab hergestellt und eingesetzt werden, sind diese Enzyme zudem einfach und kostengünstig verfügbar (ca. 30 EUR / Kg z.B. Novozymes, Dänemark).

Auch durch Koexpression der eigenen Glukose-Isomerase konnten *E. coli* Stämme mit Formiat-Dehydrogenase, Mannitol-2-Dehydrogenase und Glukose-Facilitator aus D-Glukose D-Mannitol bilden. Dabei verlief sowohl die Isomerisierung der D-Glukose als auch die D-Fruktose Reduktion intrazellulär (Abb. 3). Interessant ist dabei, dass die D-Glukose ohne phosphorylierte Zwischenstufen zu D-Mannitol umgewandelt wurde.

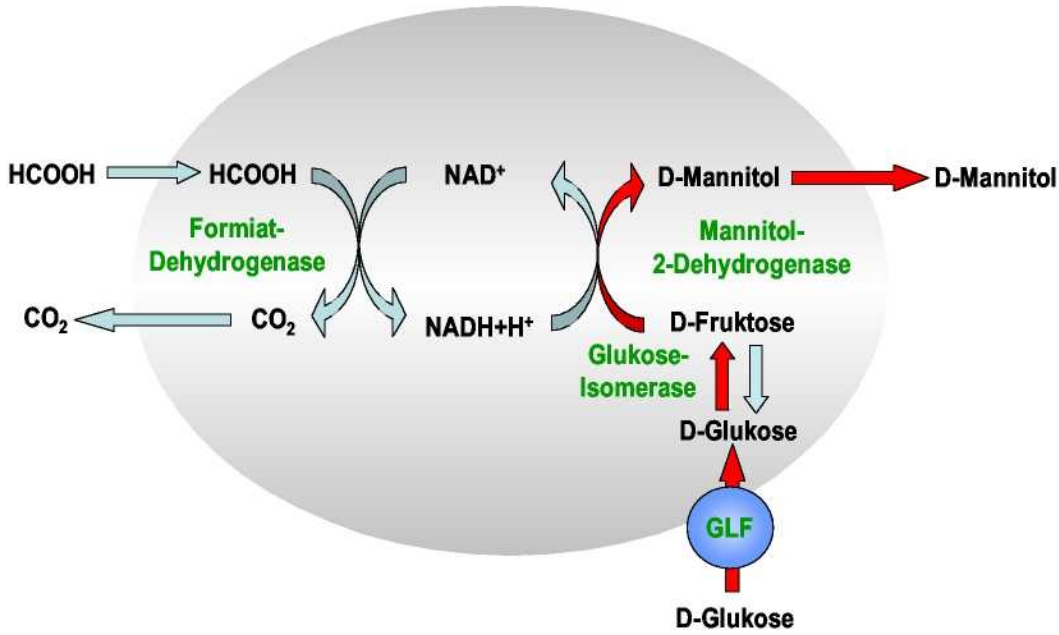


Abb. 3: Rekombinanter *E. coli* Stamm mit koexprimierter Glukose-Isomerase zur Bildung von D-Mannitol aus D-Glukose.

Auch homofermentative Milchsäurebakterien und die Hefe *Candida magnoliae* bilden unter bestimmten Bedingungen aus D-Glukose D-Mannitol (Wisselink *et al.*, 2002; Baek *et al.*, 2003).

Dies geschieht jedoch unter Beteiligung phosphorylierter Zwischenstufen. D-Glukose wird beispielsweise in homofermentativen Milchsäurebakterien über das Phospho*enol*pyruvat Phosphotransferase System (PTS) aufgenommen und zu D-Glukose-6-Phosphat phosphoryliert. D-Glukose-6-Phosphat wird darauf durch die Phosphoglukose-Isomerase zu D-Fruktose-6-Phosphat umgewandelt und durch eine Mannitol-1-Phosphat-Dehydrogenase zu D-Mannitol-1-Phosphat reduziert. Darauf folgt eine Dephosphorylierung des D-Mannitol-1-Phosphats zu D-Mannitol durch eine Mannitol-1-Phosphatase. Eine Glukose-Isomerase Aktivität ist an diesen Umsetzungen nicht beteiligt (Wisselink *et al.*, 2002; Baek *et al.,* 2003).

Die spezifische Produktivität bei der D-Mannitol Bildung aus D-Glukose durch die *E. coli* Stämme mit koexprimierter Glukose-Isomerase war geringer als die spezifischen Produktivitäten vorheriger Biotransformationen. Das war einerseits auf die insgesamt verminderten Aktivitäten der rekombinanten Enzyme zurückzuführen. Diese reduzierten Enzymaktivitäten resultierten aus einer Abnahme der Expressionshöhe, die vermutlich Folge der zunehmenden Anzahl der rekombinant exprimierten Proteine war. Ähnliche Beobachtungen sind bereits bei der gleichzeitigen Expression mehrerer (Reporter)-Proteine beschrieben worden (Held *et al.,* 2003; Wu *et al.,* 2003). Eine Steigerung der Expressionshöhen insgesamt wäre daher eine geeignete Maßnahme zur Erhöhung der spezifischen Produktivität. Dabei muss unter Umständen ein anderes Expressionssystem in betracht gezogen werden. Andererseits hatte die Glukose-Isomerase eine noch wesentlich geringere Aktivität als die Formiat- und Mannitol-2-Dehydrogenase. Somit lag die Limitierung der spezifischen Produktivität auch an der Glukose-Isomerase Aktivität. Zudem hatte die Glukose-Isomerase aus *E. coli* bei Temperaturen der Biotransformation eine geringe Aktivität. *In vitro* konnte durch eine Temperaturerhöhung auf 50°C diese Aktivität gesteigert werden. Dies entsprach den Eigenschaften von Glukose-Isomerasen anderer Mikroorganismen (Bhosale *et al.,* 1996). Die Biotransformation kann, wie bereits diskutiert, aus Gründen der Zellstabilität bzw. Stabilität der anderen exprimierten Enzyme nicht bei dieser hohen Temperatur durchgeführt werden. Eine Steigerung der spezifischen Produktivität wäre allerdings durch Expression einer Glukose-Isomerase mit höherer Aktivität bei den gewählten Bedingungen möglich.

4 Einfluss des Stoffwechsels von *E. coli* auf die D-Mannitol Bildung

Die in dieser Arbeit konstruierten *E. coli* Stämme wurden in den Biotransformationen als ruhende Zellen eingesetzt. Der zelleigene Stoffwechsel war dadurch vermindert und hatte insgesamt wenig Einfluss auf die D-Mannitol Bildung. Dementsprechend konnte in den Analysen der Reaktionsüberstände nahezu keine Nebenprodukte festgestellt werden. Die verwendeten *E. coli* Stämme besitzen neben dem rekombinanten Glukose-Facilitator auch die nativen Phospho*enol*pyruvat Phosphotransferase Systeme für die Aufnahme von D-Glukose und D-Fruktose (Kornberg, 2000). Diese Zuckeraufnahmesysteme, die intrazelluläres Fruktose-6-Phosphat und Glukose-6-Phosphat liefern, konkurrieren in nur sehr geringem Umfang mit dem rekombinanten Glukose-Facilitator um die Substrate. Während es sich bei dem PTS-System um ein hoch-affines, akkumulatives Zuckertransportsystem mit geringer Maximalgeschwindigkeit handelt (Kornberg 2000), ist der Glukose-Facilitator ein niedrig-affiner, konzentrationsabhängiger Facilitator mit hoher Maximalgeschwindigkeit (Parker *et al.,* 1995; Weisser et al., 1995). Daher ist auch eine D-Mannitol Bildung durch die *E. coli* eigene Mannitol-1-Phosphat Dehydrogenase aus Fruktose-6-Phosphat vernachlässigbar klein oder nicht vorhanden. Außerdem müsste das gebildete Mannitol-1-Phosphat dephosphoryliert werden. Die Mannitol-1-Phosphat Dehydrogenase aus *E. coli* dient zudem, in Verbindung mit den D-Mannitol spezifischen PTS-Komponenten, zur Oxidation von Mannitol-1-Phosphat zu Fruktose-6-Phosphat, das als Kohlenstoffquelle in die Glykolyse eingeht. Darüber hinaus unterstützt das PTS-System sowie die ebenfalls vorhandene Glukokinase die Aufrechterhaltung des Energiestoffwechsels der ruhenden *E. coli* Zellen während der Ganzzell-Biotransformation (Fukuda *et al.,* 1983; Rosenberg *et al.,* 1984; Tchieu *et al.,* 2001). Dies ist für die Funktionalität der Zellen eher förderlich als nachteilig zu bewerten.

V Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Konstruktion eines rekombinanten *Escherichia coli* Stammes, der aus D-Fruktose bzw. D-Glukose D-Mannitol, ohne Nebenprodukte, bildet. Es wurde im ersten Schritt die NAD-abhängige Mannitol-2-Dehydrogenase des heterofermentativen Milchsäurebakteriums *Leuconostoc pseudomesenteroides* ATCC 12291 in *E. coli* exprimiert. Trotz hoher Enzymaktivität war dieser *E. coli* Stamm nicht in der Lage, in Ganzzell-Biotransformationen D-Mannitol aus D-Fruktose zu bilden. Die Koexpression der NAD-abhängigen Formiat-Dehydrogenase des methylotrophen *Mycobacterium vaccae* N10 zur Kofaktor-Regeneration führte, trotz hoher Aktivitäten der beiden Enzyme, nur zur Bildung geringer Mengen D-Mannitol aus D-Fruktose und Formiat.

Da *E. coli* normalerweise D-Fruktose über das Phospho*enol*pyruvat-Phosphotransferase System aufnimmt, ist dieser Zucker intrazellulär phosphoryliert und damit kein Substrat für die Mannitol-2-Dehydrogenase. Dieses Problem wurde durch die zusätzliche Expression des Glukose-Facilitators aus *Zymomonas mobilis* überwunden, der D-Fruktose und D-Glukose durch erleichterte Diffusion ohne Phosphorylierung dieser Zucker, transportiert. Dieser *E. coli* Stamm war in der Lage, innerhalb von 18 Stunden bis zu 1 M D-Mannitol mit einer Ausbeute von 84 - 90 mol% und einer maximalen spezifischen Produktivität von 9,5 g x $(g_{ZTM} \times h)^{-1}$ aus D-Fruktose zu bilden. Da dieser Stamm D-Glukose als Substrat zur D-Mannitol Bildung nicht nutzen konnte, wurden sowohl Glukose-Isomerasen zum Reaktionsansatz zugegeben, als auch die Glukose-Isomerase aus *E. coli* koexprimiert. Daraufhin bildete *E. coli* D-Mannitol aus D-Glukose als einziger Kohlenstoff- und Formiat als Elektronendonor, ohne Beteiligung von phosphorylierten Zwischenstufen.

VI Literatur

- Aarnikunnas J, Ronnholm K, Palva A (2002). The mannitol dehydrogenase gene (*mdh*) from *Leuconostoc mesenteroides* is distinct from other known bacterial *mdh* genes. *Appl Microbiol Biotechnol* **59** (6):665-71

- Amore R, Hollenberg CP (1989). Xylose isomerase from *Actinoplanes missouriensis*: primary structure of the gene and the protein. *Nucleic Acids Res* **17** (18):7515

- Axelsson LT (1993). Lactic acid bacteria: classification and physiology, p. 1-63. In Salminen S, von Wright A (ed.), Lactic acid bacteria. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y

- Baek H, Song KH, Park SM, Kim SY, Hyun HH (2003). Role of glucose in the bioconversion of fructose into mannitol by *Candida magnoliae. Biotechnol Lett* **25** (10):761-765

- Barnell WO, Yi KC, Conway T (1990). Sequence and genetic organization of a *Zymomonas mobilis* gene cluster that encodes several enzymes of glucose metabolism. *J Bacteriol* **172** (12):7227-7240

- Batt CA, Jamieson AC, Vandeyar MA (1990). Identification of essential histidine residues in the active site of *Escherichia coli* xylose (glucose) isomerase. *Proc Natl Acad Sci* **87** (2):618-622

- Belaich JP, Senez JC, Murgier M (1968). Microcalorimetric study of glucose permeation in microbial cells. *J Bacteriol* **95** (5):1750-1757

- Bernofsky C, Swan M (1973). An improved cycling assay for nicotinamide adenine dinucleotide. *Anal Biochem* **53** (2):452-458

- Berrios-Rivera SJ, Bennett GN, San KY (2002). Metabolic engineering of *Escherichia coli*: increase of NADH availability by overexpressing an NAD(+)-dependent formate dehydrogenase.*Metab Eng* **4** (3):217-229

- Bhosale SH, Rao MB, Deshpande VV (1996). Molecular and industrial aspects of glucose isomerase. *Microbiol Rev* **60** (2):280-300

- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248–254

- Briggs KA, Lancashire WE, Hartley BS (1984). Molecular cloning, DNA structure and expression of the *Escherichia coli* D-xylose isomerase. *EMBO J* **3** (3):611-616

- Bor YC, Moraes C, Lee SP, Crosby WL, Sinskey AJ, Batt CA (1992). Cloning and sequencing the *Lactobacillus brevis* gene encoding xylose isomerase. *Gene* **114** (1):127-132

- Bruenker P, Altenbuchner J, Kulbe KD, Mattes R (1997). Cloning, nucleotidesequence and expression of a mannitol dehydrogenase gene from *Pseudomonas fluorescens* DSM 50106 in *Escherichia coli. Biochim Biophys Acta* **1351**: 157-167

- Chaturvedi V, Wong B, Newman SL (1996). Oxidative killing of *Cryptococcus neoformans* by human neutrophils. Evidence that fungal mannitol protects by scavenging reactive oxygen intermediates. *J Immunol* **156**: 3836–3840

- Chaturvedi V, Bartiss A, Wong B (1997). Expression of bacterial *mtl*D in *Saccharomyces cerevisiae* results in mannitol synthesis and protects a glycerol-deficient mutant from high-salt and oxidative stress. *J Bacteriol* **179**: 157–162

- Chen WP (1980a). Glucose Isomerase. *Process Biochem* **15**: 30-35

- Chen WP (1980b). Glucose Isomerase. *Process Biochem* **15**: 46-41

- Cherrington CA, Hinton M, Mead GS, Chopra I (1991). Organic acids: chemistry, antibacterial activity and practical applications. *Adv Microb Physiol* **32**: 87–108

- David JD, Wiesmeyer H (1970). Control of xylose metabolism in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **201** (3): 497-499

- DiMarco AA, Romano AH (1985). D-Glucose transport system of Zymomonas mobilis. *Appl Environ Microbiol* **49**: 151-157

- Doig SD, Simpson H, Alphand V, Furstoss R, Woodley JM (2003). Characterization of a recombinant *Escherichia coli* TOP10[pQR239] whole-cell biocatalyst for stereoselective Baeyer-Villiger oxidations. *Enzyme Microb Technol* **32**:347-355

- Drauz K, Waldmann H (1995). Enzyme Catalysis in Organic Synthesis. Vol. 1, VCH, Weinheim: 157 – 161

- Eklund T (1983). The antimicrobial effect of dissociated and undissociated sorbic acid at different pH levels. *J Appl Bacteriol* **69** :814–821

- Ernst M, Kaup B, Müller M, Bringer-Meyer S, Sahm H (2004). Enantioselective reduction of carbonyl-compounds by whole-cell biotransformation, combining a formate dehydrogenase and a (R)-specific alcohol dehydrogenase. *Appl Microbiol Biotechnol* ***in Press***

- Erten H (1998). Metabolism of fructose as an electron acceptor by *Leuconostoc mesenteroides*. *Process Biochemistry* **33**: 735–739

- Ferain T, Schanck AN & Delcour J (1996). 13C nuclear magnetic resonance analysis of glucose and citrate end products in an ldhL-ldhD double-knockout strain of *Lactobacillus plantarum*. *J Bacteriol* **178**: 7311–7315

- Flachmann R, Kunz N, Seifert J, Gutlich M, Wientjes FJ, Laufer A, Gassen HG (1988). Molecular biology of pyridine nucleotide biosynthesis in *Escherichia coli*. Cloning and characterization of quinolinate synthesis genes *nad*A and *nad*B. *Eur J Biochem***175** (2):221-228

- Foster JW, Moat AG (1980). Nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis and pyridine nucleotide cycle metabolism in microbial systems. *Microbiol Rev* **44** (1):83-105

- Foster JW, Holley-Guthrie EA, Warren F (1987). Regulation of NAD metabolism in *Salmonella typhimurium*: genetic analysis and cloning of the *nad*R repressor locus. *Mol Gen Genet* **208** (1-2):279-87

- Fukuda Y, Yamaguchi S, Shimosaka M, Murata K, Kimura A (1983). Cloning of the glucokinase gene in *Escherichia coli* B. *J Bacteriol* **156** (2): 922-925

- Galkin A, Kulakova L, Tishkov V, Esaki N, Soda K (1995). Cloning of formate dehydrogenase gene from a methanol-utilizing bacterium Mycobacterium vaccae N10. *Appl Microbiol Biotechnol* **44** (3-4):479-483

- Galkin A, Kulakova L, Yoshimura T, Soda K, Esaki N (1997). Synthesis of optically active amino acids from alpha-keto acids with *Escherichia coli* cells expressing heterologous genes. *Appl Environ Microbiol* **63**:4651–4656

- Geier GE and Modrich P (1979). Recognition Sequence of the dam Methylase of *Escherichia coli* K12 and Mode of Cleavage of *Dpn*I Endonuclease. *J Bio Chem* **254** (4): 3408-3413

- Gerhardt P, Murray RGE, Costilow RN, Nester EW, Wood WA, Krieg NR, Philips GB (1981). Manual of methods for general bacteriology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.:505 – 506

- Grobben GJ, Peters SW, Wisselink HW, Weusthuis RA, Hoefnagel MH, Hugenholtz J, Eggink G (2001). Spontaneous formation of a mannitol-producing variant of *Leuconostoc pseudomesenteroides* grown in the presence of fructose. *Appl Environ Microbiol* **67** (6):2867-2870

- Groeger H, Hummel W, Rollmann C, Chamouleau F, Husken H, Werner H, Groeger H, Wunderlich C, Abokitse K, Drauz K, Buchholz S (2004). Preparative asymmetric reduction of ketones in a biphasic medium with an (S)-alcohol dehydrogenase under in situ cofactor-recycling with a formate dehydrogenase. *Tetrahedron* **60**:633-640

- Haberland J, Hummel W, Dausmann T, Liese A (2002) New continuous production process for enantiopure (2R, 5R)-hexanediol. Org Proc Res Dev 6:458-462

- Hahn G, Kaup B, Bringer-Meyer S, Sahm H (2003). A zinc-containing mannitol-2-dehydrogenase from *Leuconostoc pseudomesenteroides* ATCC 12291: purification of the enzyme and cloning of the gene. *Arch Microbiol* **179**:101–107

- Haltrich D, Nidetzky B, Miemietz G, Gollhofer D, Lutz S, Stolz P, Kulbe KD (1996). Simultaneous enzymatic synthesis of mannitol and gluconic acid: I. Characterization of the enzyme system. *Biocatal Biotrans* **14**: 31-45

- Hanahan D (1983). Studies on the transformation of *E. coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**:557–580

- Held D, Yeager K, Novy R (2003) New coexpression vectors for expanded compatibilities in *E. coli. inNovations* **18**: 4-6

- Hinton M (1990). Antibacterial activity of short-chain organic acids. *Vet Rec* **14** 126 (15): 370

- Hugenholtz J, Sybesma W, Groot MN, Wisselink W, Ladero V, Burgess K, van Sinderen D, Piard JC, Eggink G, Smid EJ, Savoy G, Sesma F, Jansen T, Hols P, Kleerebezem M (2002). Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of nutraceuticals. Antonie Van Leeuwenhoek **82** (1-4):217-35

- Hummel W, Kula MR (1989). Dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. *Eur J Biochem* **184** (1):1-13

- Johansson K, El-Ahmad M, Kaiser C, Jornvall H, Eklund H, Hoog J, Ramaswamy S (2001). Crystal structure of sorbitol dehydrogenase. *Chem Biol Interact* **130-132** (1-3):351-358

- Johnson JC (1976). Sugar alcohols and derivatives. In: Specialized sugars for the food industry. Noyes Data Corporation, NJ, p 313

- Kandler O, Weiss N (1986). Regular, nonsporing gram-positive rods. In Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG (Eds.), Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 2 (9^{th} ed.) (pp. 1208 – 1234). Baltimore: Williams & Wilkins Company

- Kataoka M, Yamamoto K, Kawabata H, Wada M, Kita K, Yanase H, Shimizu S (1999) Stereoselective reduction of ethyl 4-chloro-3-oxobutanoate by *Escherichia coli* transformant cells coexpressing the aldehyde reductase and glucose dehydrogenase genes. *Appl Microbiol Biotechnol* **51**: 486-490

- Kizaki N, Yasohara Y, Hasegawa J, Wada M, Kataoka M, Shimizu S (2001). Synthesis of optically pure ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxybutanoate by *Escherichia coli* transformant cells coexpressing the carbonyl reductase and glucose dehydrogenase genes. *Appl Microbiol Biotechnol* **55** (5):590-5

- Klimacek M, Kavanagh KL, Wilson DK, Nidetzky B (2003). *Pseudomonas fluorescens* Mannitol-2-Dehydrogenase and the family of polyol-specific long-chain dehydrogenases/reductases: sequence-based classification and analysis of structure-function relationships. *Chem Biol Interact* **143-144**:559-582

- Knappe J, Sawers G (1990). A radical-chemical route to acetyl-CoA: the anaerobically induced pyruvate formate-lyase system of *Escherichia coli. FEMS Microbiol Rev* **6** (4):383-398

- Kornberg HL, Lambourne LTM, Sproul AA (2000). Facilitated diffusion of fructose via the phosphoenolpyruvate/glucose phosphotransferase system of *Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci* **97**:1808–1812

- Kornberg HL (2001). Routes for fructose utilization by *Escherichia coli. J Mol Microbiol Biotechnol* **3**:355–359

- Kula MR, Wandrey C (1987). Continuous enzymatic transformation in an enzyme-membrane reactor with simultaneous NADH regeneration. *Methods Enzymol* **136**:9-21

- Lacks S, Greenberg B (1975). A deoxyribonuclease of *Diplococcus pneumoniae* specific for methylated DNA. *J Biol Chem* **250** (11):4060-4066

- Lacks S, Greenberg B (1977). Complementary specificity of restriction endonucleases of *Diplococcus pneumoniae* with respect to DNA methylation. *J Mol Biol* **114** (1):153-168

- Lawlis VB, Dennis MS, Chen EY, Smith DH, Henner DJ (1984). Cloning and sequencing of the xylose isomerase and xylulose kinase genes of *Escherichia coli. Appl Environ Microbiol* **47** (1): 15-21

- Leonardo MR, Dailly Y, Clark DP (1996). Role of NAD in regulating the *adhE* gene of *Escherichia coli. J Bacteriol* **178** (20):6013-6018

- Leslie SB, Israeli E, Lighthart B, Crowe JH, Crowe LM (1995). Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl Environ Microbiol* **61**: 3592–3597

- Lewis DH, Smith DC (1967). Sugar alcohols (polyols) in fungi and green plants. I. Distribution, physiology and metabolism. *NewPhytol* **66**: 143-184

- Li T, Kootstra AB, Fotheringham IG (2002). Nonproteinogenic α-amino acid preparation using equilibrium shifted transamination. *Org Process Res Dev* **6**: 533–538

- Lineweaver H, Burk D (1934). The determination of enzyme dissociation constants. *J Am Chem Soc* **56**: 658-666

- Loesche WJ, Kornman KS (1976). Production of mannitol by *Streptococcus* mutans. *Arch Oral Biol* **21**: 551–553

- Loviny-Anderton T, Shaw PC, Shin MK, Hartley BS (1991). D-Xylose (D-glucose) isomerase from *Arthrobacter* strain N.R.R.L. B3728. Gene cloning, sequence and expression. *Biochem J* **277** (Pt 1):263-271

- Makkee M, Kieboom APG, Bekkum H (1985). Production Methods of D-Mannitol. *Starch* **37** (4): 136-141

- Miller JH (1972). Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, pp 352–355

- Neidhardt FC, Curtiss R, Ingraham JL, Lin ECC, KB, Magasanik B, Reznikoff WS, Riley M, Schaechter M, Umbarger HE (1996). *Escherichia coli* and *Salmonella:* Cellular and Molecular Biology. *American Society for Microbiology*. 2 vols. 2898 pages.

- Neuhauser W, Steininger M, Haltrich D, Kulbe KD, Nidetzky B. (1998). A pH-controlled fed-batch process can overcome inhibition by formate in NADH-dependent enzymatic reductions using formate dehydrogenase-catalyzed coenzyme regeneration. *Biotechnol Bioeng* **60** (3):277-282

- Neves AR, Ramos A, Shearman C, Gasson MJ, Almeida JS & Santos H (2000). Metabolic characterization of *Lactococcus lactis* deficient in lactate dehydrogenase using in vivo 13C-NMR. *Eur J Biochem* **267**: 3859–3868.

- Nidetzky B, Haltrich D, Schmidt K, Schmidt H, Weber A, Kulbe KD (1996). Simultaneous enzymatic synthesis of mannitol and gluconic acid: II. Development of a continuous process for a coupled NAD(H)-dependent enzyme system. *Biocatal Biotrans* **14**:47–65

- Novotny MJ, Reizer J, Esch F, Saier MH Jr (1984). Purification and properties of D-mannitol-1-phosphate dehydrogenase and D-glucitol-6-phosphate dehydrogenase from *Escherichia coli. J Bacteriol* **159** (3):986-990

- Otte S, Scholle A, Turgut S, Lengeler JW (2003). Mutations which uncouple transport and phosphorylation in the D-mannitol phosphotransferase system of *Escherichia coli* K-12 and *Klebsiella pneumoniae* 1033-5P14. *J Bacteriol* **185**: 2267-2276

- Overhage J, Steinbuchel A, Priefert H (2003). Highly efficient biotransformation of eugenol to ferulic acid and further conversion to vanillin in recombinant strains of Escherichia coli. *Appl Environ Microbiol* **69** (11): 6569-6576

- Parker C, Barnell WO, Snoep JL, Ingram LO, Conway T (1995). Characterization of the *Zymomonas mobilis* glucose gacilitator gene product (*glf*) in recombinant *Escherichia coli*: examination of transport mechanism, kinetics and the role of glucokinase in glucose transport. *Mol Microbiol* **15**: 759–802

- Penfound T, Foster JW (1999). NAD-dependent DNA-binding activity of the bifunctional NadR regulator of *Salmonella typhimurium.* J *Bacteriol* **81** (2): 648-655

- Pinna MC; Salis A, Monduzzi M (2004). Novel mannitol based non-ionic surfactants from biocatalysis Part two: improved synthesis. *J Mol Catal B. Enzymatic* **27**: 233-236

- Popov VO, Lamzin VS (1994). NAD(+)-dependent formate dehydrogenase. *Biochem J* **301**: 625-643 (Erratum in: *Biochem J* (1994) *302*: 967)

- Rephaeli AW, Saier MH (1980). Substrate specificity and kinetic characterization of sugar uptake and phosphorylation, catalysed by the mannose enzyme II of the phosphotransferase system in *Salmonella typhimurium. J Biol Chem* **255**: 8585-8591

- Rosenberg H, Pearce SM, Hardy CM, Jacomb PA (1984). Rapid turnover of mannitol-1-phosphate in *Escherichia coli. J Bacteriol* **158** (1): 63-68

- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

- Saha BC (2004). Purification and characterization of a novel mannitol dehydrogenase from *Lactobacillus intermedius. Biotechnol Prog* **20** (2):537-542

- San KY, Bennett GN, Berrios-Rivera SJ, Vadali RV, Yang YT, Horton E, Rudolph FB, Sariyar B, Blackwood K (2002). Metabolic engineering through cofactor manipulation and its effects on metabolic flux redistribution in *Escherichia coli. Metab Eng* **4** (2): 182-192

- Schlegel, HG (1992). Allgemeine Mikrobiologie. 7. Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart, New York

- Schellenberg GD, Sarthy A, Larson AE, Backer MP, Crabb JW, Lidstrom M, Hall BD, Furlong CE (1984). Xylose isomerase from *Escherichia coli*. Characterization of the protein and the structural gene *J Biol Chem* **259** (11): 6826-6832

- Schneider KH, Giffhorn F (1989). Purification and properties of a polyol dehydrogenase from the phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *Eur J Biochem* **184**: 15-19

- Schneider KH, Giffhorn F, Kaplan S (1993). Cloning, nucleotide sequence and characterization of a mannitol dehydrogenase gene from *Rhodobacter sphaeroides*. *J Gen Microbiol* **139**: 2475-2484

- Schütte H, Flossdorf J, Sahm H, Kula MR (1976). Purification and properties of formaldehyde dehydrogenase and formate dehydrogenase from *Candida boidinii*. *Eur J Biochem* **62**: 151–160

- Shen B, Jensen RG, Bohnert HJ (1997). Mannitol protects against oxidation by hydroxyl radicals. *Plant Physiol* **115**: 527–532

- Segel, I. H.: Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems. Wiley Classics Library ed.; Wiley, 1993.

- Shaked Z, Whitesides GM (1980). Enzyme-catalyzed organic synthesis: NADH regeneration by using formate dehydrogenase. *J Am Chem Soc* **102**: 7105-7107

- Shamanna DK, Sanderson KE (1979a). Uptake and catabolism of D-xylose in *Salmonella typhimurium* LT2. *J Bacteriol* **139** (1):64-70

- Shamanna DK, Sanderson KE (1979b). Genetics and regulation of D-xylose utilization in *Salmonella typhimurium* LT2. *J Bacteriol* **139** (1):71-79

- Slatner M, Nagl G, Haltrich D, Kulbe KD, Nidetzky B (1998a). Enzymatic synthesis of mannitol. Reaction engineering for a recombinant mannitol dehydrogenase. *Ann NY Acad Sci* **864**: 450–453

- Slatner M, Nagl G, Haltrich D, Kulbe KD, Nidetzky B (1998b). Enzymatic production of pure D-mannitol at high productivity. *Biocat Biotrans* **16**: 351–363

- Slatner M, Nidetzky B, Kulbe KD (1999). Kinetic studies of catalytic mechanism of mannitol dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens. Biochemistry* **38**: 10489-10498

- Smirnoff N, Cumbes QJ (1989). Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* **28**: 1057–1060

- Soetaert W, Buchholz K, Vandamme EJ (1995). Production of D-mannitol and D-lactic acid by fermentation with *Leuconostoc mesenteroides*. *Agro-Food-Industry Hi-Tech* **6**: 41–44

- Soetaert W, Vanhooren PT, Vandamme EJ (1999). The production of mannitol by fermentation. In: Bucke C (ed) *Methods in biotechnology* **10**. Humana, Totowa New Jersey, pp 261–275

- Stoop JM, Williamson JD, Conkling MA, Pharr DM (1995). Purification of NAD-dependent mannitol dehydrogenase from celery suspension cultures. *Plant Physiol* **108**: 1219-1225

- Stoop JM, Mooibroeck H (1998). Cloning and characterization of $NADP^+$-mannitol dehydrogenase cDNA from the button mushroom *Agaricus bisporus*, and its expression in response to NaCl stress. *Appl Environ Microbiol* **64**: 4689-4696

- Stryer L (1994). Biochemie. 2. korrigierter Nachdruck; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

- Studier FW, Moffatt BA (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189** (1):113-130

- Sudfeldt C, Schaffer A, Kagi JH, Bogumil R, Schulz HP, Wulff S, Witzel H (1990). Spectroscopic studies on the metal-ion-binding sites of Co2(+)-substituted D-xylose isomerase from *Streptomyces rubiginosus*. *Eur J Biochem* **193** (3): 863-871

- Tchieu, JH, Norris, V, Edwards, JS, Saier, MH jr (2001). The complete phosphotranferase system in *Escherichia coli*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**: 329-346

- Thompson JL, Hinton M (1997). Antibacterial activity of formic and propionic acids in the diet of hens on Salmonellas in the crop. *Br Poult Sci* **38** (1):59-65

- Teschner W, Serre MC, Garel JR (1990). Enzymatic properties, renaturation and metabolic role of mannitol-1-phosphate dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Biochimie* **72** (1): 33-40

- Vasic-Racki D, Jonas M, Wandrey C, Hummel W, Kula MR (1989). Continuous (R)-mandelic acid production in an enzyme membrane reactor. *Appl Microbiol Biotechnol* **31**: 215-222

- Walton AZ, Stewart JD (2004). Understanding and improving NADPH-dependent reactions by nongrowing *Escherichia coli* cells. *Biotechnol Prog* **20** (2):403-411

- Weisser P, Krämer R, Sahm H, Sprenger GA (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**: 3351-3354

- von Weymarn N, Kiviharju K, Leisola M (2002). High-level production of D-mannitol with membrane cell-recycle bioreactor. *J Ind Microbiol Biotechnol* **29**:44–49

- Whitaker RD, Cho Y, Cha J, Carrell HL, Glusker JP, Karplus PA, Batt CA (1995). Probing the roles of active site residues in D-xylose isomerase. *J Biol Chem* **270** (39): 22895-22906

- Whitlow M, Howard AJ, Finzel BC, Poulos TL, Winborne E, Gilliland GL (1991). A metal-mediated hydride shift mechanism for xylose isomerase based on the 1.6 A *Streptomyces rubiginosus* structures with xylitol and D-xylose. *Proteins* **9** (3): 153-173

- Wisselink HW, Weusthuis RA, Eggink G, Hugenholtz J, Grobben GJ (2002). Mannitol production by lactic acid bacteria: a review. *International Dairy Journal* **12** 151–161

- Wisselink HW, Mars AE, van der Meer P, Eggink G, Hugenholtz J (2004). Metabolic engineering of mannitol production in *Lactococcus lactis*: influence of overexpression of mannitol 1-phosphate dehydrogenase in different genetic backgrounds. *Appl Environ Microbiol* **70** (7):4286-4292

- Wolff JB, Kaplan NO (1956). D-Mannitol 1-phosphate dehydrogenase from *Escherichia coli. J Biol Chem* **218** (2):849-869

- Wong HC, Ting Y, Lin HC, Reichert F, Myambo K, Watt KW, Toy PL, Drummond RJ (1991). Genetic organization and regulation of the xylose degradation genes in *Streptomyces rubiginosus*. *J Bacteriol* **173** (21): 6849-6858

- Wu YQ, Jiang PH, Fan CS, Wang JG, Shang L, Huang WD (2003). Co-expression of five genes in E coli for L-phenylalanine in *Brevibacterium flavum*. *World J Gastroenterol* **9** (2):342-346

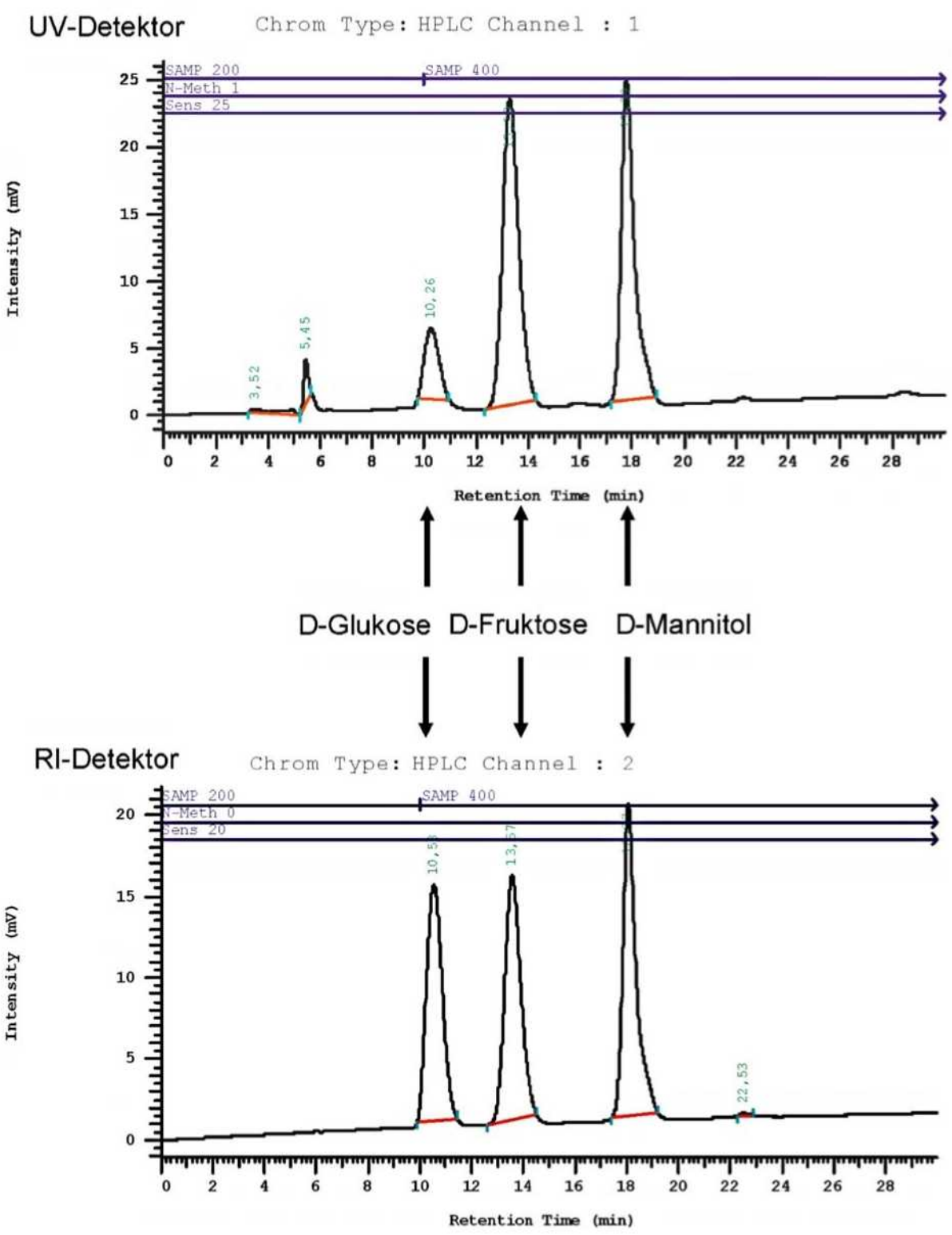
- Wubbolts MG, Terpstra P, van Beilen JB, Kingma J, Meesters HA, Witholt B (1990). Variation of cofactor levels in *Escherichia coli*. Sequence analysis and expression of the *pnc*B gene encoding nicotinic acid phosphoribosyltransferase. *J Biol Chem* **265** (29):17665-17672

- Yamamoto H, Mitsuhashi K, Kimoto N, Matsuyama A, Esaki N, Kobayashi (2004). A Novel NADH-Dependent Carbonyl Reductase from *Kluyveromyces aestuarii* and Comparison of NADH-Regeneration System for the Synthesis of Ethyl (S)-4-Chloro-3-hydroxybutanoate. *Biosci Biotechnol Biochem* **68** (3):638-649

- Zelic B, Gerharz T, Bott MC, Vasic-Racki D, Wandrey C, Takors R (2003). Fed-batch process for pyruvate production by recombinant *Escherichia coli* YYC202 strain. *Eng Life Sci* **3**:299-305

VII Anhang

Abb. 1: Typisches HPLC Elutionsprofil für D-Glukose, D-Fruktose und D-Mannitol.



Danksagung

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

Bei Herrn Prof. Dr. C. P. Hollenberg bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Korreferats und die Überlassung des Plasmids pRA4.

Frau Dr. S. Bringer-Meyer danke ich besonders herzlich für die große Diskussionsbereitschaft und ihre Ratschläge, die diese Arbeit begleitet haben. Die wissenschaftlichen Debatten führten oft zu erfolgreiche Lösungs-Ansätzen experimenteller Fragestellungen.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Biotechnologie gilt mein Dank für Ihre kollegiale Zusammenarbeit, besonders Frau M. Chmielus. Herrn Prof. Dr. N. Esaki danke ich für die Zusendung des Plasmids pMcFDH, Herrn Prof. Dr. G. Sprenger für die Überlassung des Plasmids pZY507 *glf*. Den Mitarbeitern des Nordzucker InnoCenter, Braunschweig danke ich für die konstruktiven Diskussionen.

Forschungszentrum Jülich
in der Helmholtz-Gemeinschaft

Jül-4155
Dezember 2004
ISSN 0944-2952