

**KONSTRUKTION VON *ESCHERICHIA COLI*
PRODUKTIONSSTÄMMEN ZUR FERMENTATIVEN HERSTELLUNG
VON SUCCINAT AUS GLYCERIN**

Von der Fakultät 4 (Energie-, Verfahrens- und Biotechnik)
der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von

Stefan Söllner

aus Schweinfurt

Hauptberichter: Prof. Dr. rer. nat. Ralf Mattes

Mitberichter: Prof. Dr.-Ing. Ralf Takors

Tag der mündlichen Prüfung: 29.02.2012

Institut für Industrielle Genetik

Universität Stuttgart

2012

Vielen Dank!

... Herrn Prof. Dr. R. Mattes danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, des Arbeitsplatzes, für gelegentliches Aufmuntern und für die Erstellung des Erstgutachtens dieser Arbeit.

... Herrn Prof. Dr. R. Takors danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens und für spannende Diskussionen.

... Herrn Dr. Josef Altenbuchner danke ich für die praktische Betreuung dieser Arbeit, für diverse Einladungen zu Grillfesten und ganz besonders für die intensive Durchsicht des Manuskriptes!!!

... Herrn Dr. Martin Siemann-Herzberg danke ich für die motivierende, überschwängliche Begeisterung, die meine Ideen und Ergebnisse bei deren Besprechung jedesmal auslösten.

... Herrn Prof. Dr. Reuss danke ich für die Initiierung des Projektes lange vor meiner Zeit.

... Meinen Kollegen und Exkollegen danke ich für die gute Zusammenarbeit, das abwechslungsreiche Arbeitsklima sowie die vielen fachlichen und nichtfachlichen Gespräche, welche die Arbeit immer spannend gestalteten. Vor allem danke ich für das Verständnis für die von mir durchgeführten, absolut notwendigen, regelmäßigen Arbeitskontrollen.

... Frau Dr. Anne Völker hat mir die Integration zu Beginn meines Aufenthaltes am IIG sehr erleichtert. Herzlichen Dank dafür!

... Herrn Kambiz Morabbi Heravi danke ich recht herzlich für die Einladung ans National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology in Teheran, Iran und für die internationale Freundschaft.

... Ich danke Frau Gisela Wajant vielmals für die Keksgespräche mit Masir-Tee.

... Ich danke Frau Gisela Kwiatkowski, meiner einzigen, dauerhaften Laborkollegin für problemlose Abläufe, Gespräche und viele kleine Geschenke.

... Ich danke Frau Dr. Hildegard Watzlawick für Aufmunterungen, stetige Hilfsbereitschaft, viele konstruktive fachliche Ratschläge, den stetigen Austausch und die angenehme Büroatmosphäre.

... Herrn Tobias Vallon danke ich für die Erstellung des ersten Prototyps der Abbildungen und zahlreiche Gespräche.

... Frau Michaela Moses-Endewardt danke ich für pantomimische Aufheiterungen.

... Frau Corinna Kempter danke ich ebenfalls für die gute Zusammenarbeit und Diskussionen.

... Frau Maria Rahnert danke ich für die Zusammenarbeit während der letzten Jahre, für die Auswertung und Generierung der ¹³C-Rohdaten und für durchgeführte Fermentationen.

... Herrn Dr. Oliver Vielhauer und insbesondere Frau Mira Lenfers-Lücker danke ich für die Hauptarbeit bei den durchgeführten HPLC-Analysen. Ich habe noch nie eine derart niedrige Fehlerquote und Reproduzierbarkeit von unabhängigen Messläufen erleben dürfen!

... Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern dafür, dass sie mir alle Freiheiten gelassen haben und mein Studium wohlwollend unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
ZUSAMMENFASSUNG	10
SUMMARY	12
1 EINLEITUNG	
1.1 Relevanz des Projektes	15
1.1.1 Glycerin als geeignetes Edukt für die Succinatproduktion	15
1.1.2 Produkt Succinat als bedeutende Plattformchemikalie.....	19
1.1.3 Auswahl von <i>E. coli</i> als Organismus für die Succinatproduktion	21
1.1.4 Stand der Forschung und Beispiele aus der Industrie	24
1.2 Strategien zur Succinatproduktion	27
1.2.1 Übersicht über den Zentralstoffwechsel auf Glukose und Glycerin	27
1.2.2 Succinatproduktion durch PEP-Carboxylierung oder über den Glyoxylatzyklus.....	41
1.2.3 Succinatproduktion durch Carboxylierung von Pyruvat	44
1.2.4 Succinatproduktion ausschließlich durch Carboxylierung von PEP	48
1.2.5 Export von Succinat aus der Zelle	52
1.2.6 Übersicht über Energetik, Ausbeuten und Redoxbilanzen der einzelnen Routen.....	54
1.3 Ausblick auf das Endziel	59
2 MATERIALIEN UND METHODEN	
2.1 Materialien	61
2.1.1 Enzyme	61
2.1.2 Chemikalien	61
2.1.3 Verbrauchsmaterialien	62
2.1.4 Verwendete Kits	62
2.1.5 Geräte.....	62

Inhaltsverzeichnis

2.1.6	Medien	63
2.1.7	Antibiotika und andere Zusätze.....	64
2.1.8	Puffer und Lösungen.....	65
2.2	Bakterienstämme	66
2.3	Bakteriophagen	68
2.4	Verwendete synthetische Oligodesoxynukleotide	69
2.5	Plasmide	72
2.6	Methoden.....	74
2.6.1	Stammhaltung von <i>E. coli</i>	74
2.6.2	Routinemethoden der Molekularbiologie	74
2.6.3	Biotransformationen im Kleinmaßstab.....	83
2.6.4	Bestimmung der extrazellulären Metabolitkonzentrationen durch HPLC	87
2.6.5	Gaschromatographie und Massenspektrometrie der exkretierten Metabolite	88
2.6.6	Wachstumskurven und Wachstumsraten.....	89
2.6.7	Gezielte Gendelektionen mit dem λ -Red-System	91
2.6.8	Aerobe Selektion auf schnelleres Wachstum auf Glycerin durch serielle Transfers	98
3	ERGEBNISSE	
3.1	Herstellung und Charakterisierung der Stämme.....	101
3.1.1	Herstellung der Stämme	101
3.1.2	Wachstumsverhalten von Stämmen ohne LipA.....	104
3.1.3	Wachstumsverhalten von Stämmen ohne Pyruvatkinasen auf Glycerin	105
3.1.4	Versuch der Beseitigung des Wachstumsdefekts auf Glycerin und Auftreten von Spontanmutationen.....	107
3.2	Aerobe Selektion der $\Delta pykA \Delta pykF$ Stämme auf Glycerin und Charakterisierung der Mutanten	109
3.3	Entwicklung der Biotransformation im Kleinmaßstab	115

Inhaltsverzeichnis

3.3.1	Beschreibung des Protokolls für Biotransformationen.....	115
3.3.2	Einfluss verschiedener Anfangszellichten auf die Succinatproduktion.....	116
3.3.3	Einfluss der Anfangszellichte bei anfänglich gleichem Sauerstoffangebot pro Zelle auf die Succinatproduktion des Stammes ss277	122
3.3.4	Einfluss der Hydrogencarbonat-Konzentration auf die Succinatproduktion	126
3.4	Succinatproduktion durch PEP-Carboxylierung oder über den Glyoxylatzyklus	128
3.4.1	Einfluss verschiedener Deletionen auf die Succinatproduktion	128
3.4.2	Succinatproduktion mit dem Stamm ss328 aus Glycerin	130
3.4.3	Succinatproduktion mit dem Stamm ss328 aus Glukose.....	133
3.5	Succinatproduktion durch Pyruvat-Carboxylierung	135
3.5.1	Biotransformationen mit dem Stamm ss331 und verschiedenen Malic-Enzymen.....	135
3.5.2	Biotransformationen mit dem Stamm ss364 und verschiedenen Malic-Enzymen.....	137
3.6	Succinatproduktion ausschließlich durch PEP-Carboxylierung	139
3.6.1	Auswahl und Vergleich der auf Glycerin selektionierten Stämme	139
3.6.2	Einfluss der Deletion des Gens für das Malic-Enzym SfcA auf die Succinatproduktion.....	142
3.6.3	Einfluss von ausgewählten Enzymen auf die Kinetik und Ausbeute der Succinatproduktion	144
3.7	Analyse der CO₂-Fixierung durch ¹³C-Markierungsexperimente	147
4	DISKUSSION UND AUSBLICK	
4.1	Beurteilung der λRed-Methode zur Stammkonstruktion.....	151
4.2	Adaption der Zellen an Minimalmedium	152
4.3	Selektion auf schnelleres Wachstum und Pyruvatbildung über den POMP-Weg	153
4.4	Bewertung der Biotransformationsmethode im Kleinmaßstab	155
4.4.1	Allgemeine Bewertung der Biotransformationsmethode	155
4.4.2	Anaerobes Wachstum von <i>E. coli</i> in Minimalmedium mit Glycerin	156
4.4.3	Redoxbilanz bei der Succinatproduktion aus Glycerin	158

Inhaltsverzeichnis

4.4.4	Wachstum der Zellen in der aerob-anaeroben Übergangsphase	160
4.4.5	Einfluss von Hydrogencarbonat auf die Succinatausbeute und den Glycerinverbrauch	161
4.5	Succinatproduktion über die Carboxylierung von PEP und den Glyoxylatzyklus	162
4.6	Succinatproduktion über die Carboxylierung von Pyruvat	163
4.7	Succinatproduktion über die ausschließlich PEP-carboxylierende Route.....	167
4.8	Produktbildung bei Biotransformationen mit Glukose als C-Quelle	170
4.9	Vergleich der drei Strategien zur Succinatproduktion bezüglich der Ausbeuten an Succinat	171
4.10	Vergleich der Succinatproduktion des Stammes ss279 aus Glycerin mit den publizierten Ergebnissen anderer Gruppen	174
5	LITERATURVERZEICHNIS	179

Abkürzungsverzeichnis

<i>aac(3)IV</i>	Gen für Aminoglykosid-3-N-Acetyltransferase
Abb.	Abbildung
AceA	Isocitrat-Lyase
AceB	Malat-Synthase A
AceE	Pyruvat-Dehydrogenase
AceF	Dihydrolipoyl-Transacetylase
AckA	Acetat-Kinase
AcnA	Aconitase A
AcnB	Aconitase B
Acs	Acetyl-CoA-Synthetase
AdhE	Alkohol-Dehydrogenase
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
Amp ^R	Resistenz gegen Ampicillin
Apr ^R	Resistenz gegen Apramycin
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATCC	American Type Culture Collection (Stammsammlung)
ATP	Adenosintriphosphat
<i>bla</i>	Gen für β -Lactamase
bp	Basenpaare
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
<i>cat</i>	Gen für Chloramphenicol-Acetyltransferase
Cml ^R	Resistenz gegen Chloramphenicol
CoA	Coenzym A
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
Δ	Deletion
D-Glycerinaldehyd-3-P	D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat
DHA	Dihydroxyaceton
DhaKLM	Dihydroxyaceton-Kinase (PEP-abhängig)
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure

Abkürzungsverzeichnis

ds-DNA	doppelsträngige DNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Eno	Enolase
F6P	Fruktose-6-Phosphat
FbaA	Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase I
FbaB	Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase II
FdhF	Formiat-Dehydrogenase H
ff	fortfahrend, folgende
FHLK	Formiat-Hydrogen-Lyase-Komplex
Flp	Flp-Rekombinase
FRDK	Fumarat-Reduktase-Komplex
FRT-Sequenz	flip recombination target (Erkennungssequenz für Flp-Rekombinase)
Fruktose-1,6-bisP	Fruktose-1,6-bisphosphat
FumABC	Fumarase Isoenzyme (FumA, FumB, FumC)
g	Gramm
GapA	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GC	Gaschromatographie
GK	Glycerindauerkultur
Glc	Glukose
GldA	Glycerindehydrogenase
GloA	Glyoxylase I
GloB	Glyoxylase II
GlpACB	Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase (Menachinonabhängig)
GlpD	Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase (Ubichinonabhängig)
GlpK	Glycerinkinase
GltA	Citratsynthase
GpmA / GpmM	Phosphoglyceratmutase A oder M
Gro	Glycerin
h	Stunde
HPLC	High Performance / Pressure Liquid Chromatography
Hyc....	Hydrogenase 3 Untereinheiten
Icd	Isocitrat-Dehydrogenase
Ile	Isoleucin
<i>kan</i>	Gen für Kanamycinresistenz
Kan ^R	Resistenz gegen Kanamycin
KGDHK	α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex
K _M	Michaelis-Menten-Konstante

Abkürzungsverzeichnis

kV	Kilovolt
l	Liter
LB-Medium	Lysogeny Broth (Komplexmedium)
LdhA	D-Laktat-Dehydrogenase
L-Gro-3-P	L-Glycerin-3-Phosphat
LipA	Lipoatsynthase
LpdA	Lipoamid-Dehydrogenase
LplA	Lipoyl-Protein-Ligase A
Lys	Lysin
<i>m/q</i>	Verhältnis von Masse zu Ladung
M	molar = Mol pro Liter
MaeA	Malic-Enzym A von <i>E. coli</i> ≡ SfcA
MaeB	Malic-Enzym B von <i>E. coli</i>
Mdh	Malat-Dehydrogenase
ME	Malic-Enzym
Met	Methionin
MgsA	Methylglyoxal-Synthase
mM	millimolar
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propan-Sulfonsäure
MQ	Menachinon
MQH2	Menachinol
MrpA	MrpA-Rekombinase
<i>mrpS</i> -Sequenz	Erkennungssequenz für MrpA Rekombinase
MS	Massenspektrometrie
ms	Millisekunden
NAD ⁺	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (oxidiert)
NADH/H ⁺	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (reduziert)
NADP ⁺	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (oxidiert)
NADPH/H ⁺	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduziert)
<i>natI</i>	Gen für Nourseothricin-Acetyltransferase
n.d.	nicht detektiert
nm	Nanometer
Nou ^R	Resistenz gegen Nourseothricin
nt	Länge in Nukleotiden
OD ₆₀₀	Optische Dichte gemessen bei 600 nm
P1	Bakteriophage P1
Pck	PEP-Carboxykinase

Abkürzungsverzeichnis

PDHK	Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex
PEP	Phosphoenolpyruvat
PfkA	Phosphofrukto-Kinase I
PfkB	Phosphofrukto-Kinase II
PflB	Pyruvat-Formiat-Lyase
Pgi	Glukose-6-Phosphat-Isomerase
Pgk	Phosphoglycerat-Kinase
P _i	Orthophosphat
PoxB	Pyruvat-Oxidase
Ppc	PEP-Carboxylase
PPi	Pyrophosphat
Pps bzw. PpsA	Phosphoenolpyruvat-Synthetase
Pta	Phosphotransacetylase
PTFE	Polytetrafluorethylen
PTS	Phosphotransferasesystem
Pyc	Pyruvat-Carboxylase
PykA	Pyruvat-Kinase II
PykF	Pyruvat-Kinase I
rpm	<i>engl.</i> revolutions per minute = Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SdhA	Succinat-Dehydrogenase Flavoprotein
SdhB	Succinat-Dehydrogenase Eisen-Schwefel-Protein
SdhC	Succinat-Dehydrogenase Membranprotein
SdhD	Succinat-Dehydrogenase Membranprotein
SDHK	Succinatdehydrogenase-Komplex
SfcA	≡ MaeA, Malic-Enzym von <i>E. coli</i>
ss	single strand (Einzelstrang)
Suc	Succinat
SucA	Ketoglutarat-Dehydrogenase
SucB	Dihydrolipoyl-Transsuccinylase
SucC	Succinyl-CoA-Synthetase Untereinheit C
SucD	Succinyl-CoA-Synthetase Untereinheit D
Tab.	Tabelle
TdcD	Propionat-Kinase
TdcE	Ketobutyrat-Formiat-Lyase
Tet ^R	Resistenz gegen Tetracyclin

Abkürzungsverzeichnis

Thr	Threonin
Tpi	Triosephosphatisomerase
ts	Temperatur-sensitiv
TSS	Transformation and Storage Solution
ÜNK	Übernachtkultur
UQ	Ubichinon
UQH2	Ubichinol
VE-H ₂ O	vollentsalztes Wasser
vgl.	vergleiche
vs.	versus
v/v	Volumenkonzentration
WT	Wildtyp
w/v	Gewichtsanteil pro Volumen (0,5 % w/v = 5 g / l)
w/w	Gewichtsanteil
YeaE, YqhE, YafB, YghZ	verschiedene NADP-abhängige Aldo-Keto-Reduktasen
z. B.	zum Beispiel
≡	identisch zu

Zusammenfassung

Glycerin fällt in großen Mengen bei der Biodieselproduktion an und kann als billiger, nachwachsender Rohstoff betrachtet werden, aus dem sich biotechnologisch viele industriell relevante Fein- oder Bulkchemikalien herstellen lassen. Eine der Bulkchemikalien ist Succinat, das Anion der Bernsteinsäure, welche in Studien des Department of Energy der USA (DOE) in den Jahren 2004 und 2010 als wichtige Plattformchemikalie bezeichnet wurde. Plattformchemikalien bzw. chemische Bausteine können kostengünstig in eine Vielzahl von weiteren, höherpreisigen Materialien umgewandelt werden. Dies würde die Basis für eine nachhaltige, chemische Industrie schaffen. Succinat kann beispielsweise leicht in die Bulkchemikalien 1,4-Butandiol (BDO), Tetrahydrofuran (THF), γ -Butyrolakton (GBL) und andere C4-Chemikalien umgewandelt werden, die zusammen weltweit ein Marktvolumen von über 275.000 Tonnen pro Jahr haben.

In dieser Arbeit wurden *Escherichia coli* Produktionsstämme für Succinat konstruiert. Die Bildung größerer Zellmassen erfolgte vor der Produktionsphase in einer aeroben Wachstumsphase in Minimalmedium mit Glycerin als C-Quelle. In der mikroaeroben oder anaeroben Produktionsphase wurde dann wachstumsentkoppelt Succinat aus Glycerin und Kohlenstoffdioxid bzw. Hydrogencarbonat gebildet. Die Entstehung von 1 mol Succinat aus 1 mol Glycerin unter Fixierung von 1 mol CO₂ ist redoxneutral und stellt die theoretisch maximale Succinatausbeute dar. Zuerst wurde eine Methode entwickelt, um die Succinatproduktion verschiedener Stämme schnell und einfach miteinander vergleichen zu können. Diese Biotransformationen im Kleinmaßstab wurden in 1,5 ml Plastikgefäßen durchgeführt. Zuvor wurden diese mit 1,2 ml einer Zellsuspension von 0,5 OD₆₀₀/ml in M9-Minimalmedium gefüllt, welches definierte Mengen Glycerin und Hydrogencarbonat enthielt. Anschließend wurde der zeitliche Verlauf der Zelldichte und der exkretierten Metabolite gemessen. Nach einem anfänglichen, kleinen Anstieg der Zelldichte auf durchschnittlich 0,7 OD₆₀₀/ml blieb diese während des Produktionszeitraumes bis zu 15 Tage konstant. In einem Experiment wurde der Einbau von ¹³C-markiertem Hydrogencarbonat in das gebildete Succinat per Massenspektrometrie bestätigt.

Verschiedene Stoffwechselwege führen zum Succinat. Aus diesen Wegen wurden drei Strategien zur Succinatproduktion abgeleitet, wobei jede Strategie eine Kombination mehrerer Wege beinhaltet. Der metabolische Fluß über bestimmte Wege wurde durch die Deletion von Genen mit der λ Red-Rekombinationsmethode oder durch Plasmid-basierte Expression von Genen, die für auf den jeweiligen Routen benötigte Enzyme codieren, begünstigt. Außerdem

sollten die Deletionen die Entstehung von Nebenprodukten wie beispielsweise Acetat verhindern.

Nach der ersten Strategie sollte Succinat durch PEP-Carboxylierung und über den Glyoxylatzyklus produziert werden. Dem Stamm ss328 ($\Delta ackA\text{-}pta \Delta mgsA \Delta gldA \Delta tdcE \Delta ldhA \Delta poxB \Delta pflB$) fehlt der Großteil der Pyruvat-verbrauchenden Enzyme. Zusätzlich wurde die Acetatentstehung verhindert. Stamm ss328 verbrauchte bei einer Biotransformation mit 0,5 OD₆₀₀/ml Zellen innerhalb von 6 Tagen $43,2 \pm 5,7$ mM Glycerin und bildete $28,1 \pm 3,3$ mM Succinat. Dies entsprach einer molaren Succinatausbeute von $65,1 \pm 1,4$ %.

Nach der zweiten Strategie sollte Succinat neben PEP-Carboxylierung vor allem durch Pyruvat-Carboxylierung gebildet werden. Stamm ss331 ($\Delta lipA \Delta ldhA \Delta poxB \Delta pflB$) kann viele Pyruvat-verbrauchende Enzyme nicht mehr synthetisieren. Außerdem ist wegen $\Delta lipA$ der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex inaktiv, falls keine Liponsäure zugegeben wird. ss331 wurde mit Plasmid pSS84.4 transformiert, welches das Gen für das Malic-Enzym 2 von *Arabidopsis thaliana* trug. Der resultierende Stamm verbrauchte bei einer Biotransformation mit 0,5 OD₆₀₀/ml Zellen innerhalb von 6 Tagen $37,6 \pm 1,4$ mM Glycerin und bildete $26,6 \pm 0,7$ mM Succinat. Dies kam einer molaren Succinatausbeute von $70,9 \pm 0,7$ % gleich.

Nach der dritten Strategie sollte Succinat ausschließlich durch PEP-Carboxylierung entstehen, weswegen die Gene *pykA* und *pykF*, die für Pyruvatkinasen codieren, deletiert wurden. Die Pyruvatkinasen katalysieren die direkte Umwandlung von PEP in Pyruvat. Die erhaltenen Stämme konnten auf Glycerin kaum wachsen, da sie nur ungenügende Mengen Pyruvat bilden konnten. Erst nach einer Selektion auf schnelleres Wachstum in Minimalmedium mit Glycerin zeigten die erhaltenen Mutanten Wachstumsraten im Bereich von $0,3 \text{ h}^{-1}$. Pyruvat wurde in diesen Stämmen vermutlich verstärkt über die POMP-Umleitung gebildet, welche folgende Schritte beinhaltet: PEP-Carboxylierung zum Oxalacetat, Umwandlung von Oxalacetat in Malat und Decarboxylierung von Malat zum Pyruvat. Mit dem Stamm ss279 ($\Delta gldA \Delta tdcE \Delta pykA \Delta pykF \Delta ldhA \Delta poxB \Delta pflB$) wurde in Biotransformationen mit 0,5 OD₆₀₀/ml Zellen innerhalb von 6 Tagen $57,8 \pm 2,8$ mM Glycerin verbraucht und $47,1 \pm 1,1$ mM Succinat gebildet. Dies entsprach einer molaren Succinatausbeute von $81,5 \pm 2,0$ %. Berücksichtigt man nur den reinen Produktionszeitraum ohne Zellmassebildung ab dem zweiten Tag, so wurden noch höhere Ausbeuten von $89,5 \pm 3,7$ % erhalten.

Summary

Glycerol is produced in large quantities in the process of biodiesel production. It is a cheap, renewable resource that can be biotechnologically transformed into many industrially relevant fine or bulk chemicals. One such bulk chemical is succinate, the anion of succinic acid, which was described in studies of the U.S. Department of Energy (DOE) in 2004 and 2010 as an important platform chemical. Platform chemicals or chemical building blocks can be economically converted into a variety of other, higher-priced materials. This would create the basis for a sustainable and “green” chemical industry. Succinate for example, can be easily converted into bulk chemicals like 1,4-butanediol (BDO), tetrahydrofuran (THF), γ -butyrolactone (GBL) and other C4 chemicals, which together have a worldwide market volume of over 275,000 metric tons per year.

In this work succinate production strains of *Escherichia coli* were constructed. The generation of substantial cell mass occurred prior to the production phase during an aerobic growth phase in minimal medium with glycerol as sole carbon source. In the following microaerobic or anaerobic production phase succinate was produced from glycerol and carbon dioxide or bicarbonate under non-growth conditions. The formation of 1 mol of succinate from 1 mol of glycerol with concomitant fixation of 1 mol of CO₂ is redox neutral, and represents the theoretical maximum yield. First, a protocol was developed to compare the succinate production of different strains easily and quickly. 1.5 ml plastic vials were used for this small-scale biotransformation assay. They were filled beforehand with 1.2 ml cell suspension of 0.5 OD₆₀₀/ml in M9 minimal medium, which contained defined amounts of glycerol and bicarbonate. Then the time course of cell density and excreted metabolites was analyzed. After an initial, small increase in cell density to 0.7 OD₆₀₀/ml on average it remained constant up to 15 days during the the production period. In one experiment, the incorporation of ¹³C-labeled bicarbonate into the produced succinate was confirmed by mass spectrometry.

Several metabolic pathways lead to succinate. Three strategies for the production of succinic acid were derived from these pathways. Each strategy is comprised of a combination of several routes. The metabolic flux through the desired routes was favored by deletion of genes of competing pathways with the λ Red-recombination method or by plasmid-based expression of genes that code for enzymes needed for the particular route. In addition, the deletions prevented the formation of by-products such as acetate.

Summary

Production strains following the first strategy should produce succinate by PEP carboxylation and the glyoxylate shunt. Strain ss328 ($\Delta ackA\text{-}pta \Delta mgsA \Delta gldA \Delta tdcE \Delta ldhA \Delta poxB \Delta pflB$) amongst others lacks the majority of pyruvate-consuming enzymes. Moreover the formation of acetate was prevented. It consumed 43.2 ± 5.7 mM glycerol and produced 28.1 ± 3.3 mM succinate during a biotransformation with $0.5 \text{ OD}_{600}/\text{ml}$ cells within 6 days. This corresponded to a molar yield of 65.1 ± 1.4 %.

Strains that were constructed according to the second strategy could form succinate by PEP carboxylation and especially by pyruvate carboxylation. The strain ss331 ($\Delta lipA \Delta ldhA \Delta poxB \Delta pflB$) lacks many of the pyruvate-consuming enzymes. In addition, the pyruvate dehydrogenase complex is inactive if no lipoic acid is added to the medium. Strain ss331 transformed with plasmid pSS84.4 carrying the malic enzyme 2 from *Arabidopsis thaliana* was used in a biotransformation with $0.5 \text{ OD}_{600}/\text{ml}$ cells. Within 6 days 37.6 ± 1.4 mM glycerol was used and 26.6 ± 0.7 mM succinate was formed. This represented a molar yield of 70.9 ± 0.7 %.

The third strategy involved succinic acid production exclusively by PEP carboxylation, which is why the genes *pykF* and *pykA*, encoding pyruvate kinases have been deleted. The pyruvate kinases catalyze the direct conversion of PEP into pyruvate. The resulting strains could barely grow on glycerol. Only after a selection for faster growth in minimal medium with glycerol, the resulting mutants showed growth rates on glycerol in the range of 0.3 h^{-1} . Pyruvate was formed in these strains through the POMP-pathway, a local rerouting of metabolism which includes the following steps: PEP carboxylation to oxaloacetate, conversion of oxaloacetate to malate, and decarboxylation of malate to pyruvate. Strain ss279 ($\Delta gldA \Delta tdcE \Delta pykA \Delta pykF \Delta ldhA \Delta poxB \Delta pflB$) was used in biotransformations with $0.5 \text{ OD}_{600}/\text{ml}$ cells. In 6 days 57.8 ± 2.8 mM glycerol was consumed and 47.1 ± 1.1 mM succinate was produced. This corresponded to a molar yield of 81.5 ± 2.0 %. When only the production period from the second day on is considered an even higher yield of 89.5 ± 3.7 % was obtained.

1 Einleitung

1.1 Relevanz des Projektes

Der Fokus dieser Dissertationsschrift liegt auf der Entwicklung und Optimierung von *Escherichia coli* Produktionsstämmen, die für die biotechnologische Umwandlung von Glycerin, zum Beispiel aus der Biodieselproduktion, in Succinat eingesetzt werden können.

1.1.1 Glycerin als geeignetes Edukt für die Succinatproduktion

Der Agrarausblick für die Jahre 2010-2019, der gemeinsam von der OECD (Organization for Economic Co-operation and Development) und der FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) herausgegeben wurde, liefert Prognosen für die Entwicklung des Biokraftstoffmarktes und den globalen Anbau von Nutzpflanzen ¹. Es wurde dabei prognostiziert, dass die jährliche globale Biodieselproduktion im Jahr 2019 $41 \cdot 10^9$ Liter betragen wird. Die Biokraftstoffe aus erneuerbaren Ressourcen stehen in Konkurrenz zu den nicht erneuerbaren fossilen Kraftstoffen. Das Ende vom billigen Erdöl scheint aber nahe zu sein, da die Vorräte in den natürlichen Lagerstätten begrenzt sind. Über den genauen Zeitpunkt gibt es Kontroversen, aber spätestens 2050 sollten die Vorräte erschöpft sein ².

Biodiesel wird durch die Umesterung von Pflanzenölen oder Tierfetten mit Methanol gewonnen ³. Dabei entsteht eine Mischung von Methylestern diverser Fettsäuren, die auch als FAME (fatty acid methyl esters) bezeichnet werden und den eigentlichen Bestandteil von Biodiesel darstellen ⁴. Bei der Gewinnung von Biodiesel entstehen zwangsläufig große Mengen an Rohglycerin. So fallen ungefähr 10 % (w/w) Rohglycerin als Hauptnebenprodukt bei der Biodieselproduktion an ⁵. Abhängig vom Herstellungsprozess des Biodiesels und der Nachbehandlung ist die Zusammensetzung des Rohglycerins variabel. Wird beispielsweise nach der alkalischen Methanolyse von Pflanzenölen die dabei entstandene schwere Glycerinphase durch Ansäuern mit starken Mineralsäuren nachbehandelt, so trennt sich diese erneut in eine wasserlösliche Rohglycerinphase und eine leichtere, wasserunlösliche Phase (Methylester und freie Fettsäuren) auf. Dieses Rohglycerin besteht dann typischerweise aus 78-82 % Glycerin, 10-12 % Wasser, 6-8 % Alkalisalzen und 1-2 % Methanol (Angaben in

Gewichtsanteilen)⁶. Parallel zum Wachstum der Biodieselindustrie in den letzten Jahren entstand auch ein Überangebot von Rohglycerin⁷. Dies blieb nicht ohne Auswirkungen auf dessen Preis, der zwischen den Jahren 2004 und 2006 dramatisch gefallen ist. Der Preis für Rohglycerin fiel um 90 % auf circa US-\$ 0,025 pro Pfund (1 Pfund = 1 lb = 0,453 kg)⁸. Dies führte dazu, dass Firmen Anlagen für die Glycerinproduktion stilllegen mussten. Dow Chemical hat die Produktion im Werk Freeport in Texas eingestellt und auch Procter & Gamble Chemicals hat eine Glycerinraffinerie in England stillgelegt⁹. Die Nevest AG, ehemals einer der größten deutschen Biodieselhersteller, hat wegen des Preisverfalls beim Glycerin im Jahr 2003 Insolvenz angemeldet. Statt des erwarteten Preises von 1000 € pro Tonne, konnte Nevest das Glycerin gerade einmal für die Hälfte verkaufen¹⁰.

Im großen Angebot und niedrigen Preis des Glycerins liegt ein Potential für neuartige Verwendungsmöglichkeiten. Das Rohglycerin könnte als Ausgangsstoff für die chemische Synthese von Grundstoffchemikalien dienen. Epichlorhydrin ist beispielsweise eine Bulkchemikalie, die bei der Herstellung von Epoxidharzen verwendet wird. Traditionell wurde Epichlorhydrin ausgehend von Propylen synthetisiert und wurde sogar noch bis 2006 für die Produktion synthetischen Glycerins eingesetzt. Nun ist es gerade umgekehrt. Wegen der Veränderung des Preisverhältnisses von fossilem Öl zu Glycerin ist die chemische Synthese von Epichlorhydrin aus Glycerin rentabel geworden. Das Syntheseverfahren wurde unter anderem von Dow Chemical entwickelt und patentiert¹¹. Die Verwendung von Rohglycerin als Additiv für die Verbesserung von Betoneigenschaften in der Bauindustrie wird ebenfalls diskutiert¹². 1,3-Propandiol ist eine weitere Chemikalie mit vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten, die ausgehend von Glycerin chemisch synthetisiert werden kann¹³. Auch für die Futtermittelindustrie ist Glycerin von Interesse. So kann Rohglycerin aus der Biodieselproduktion direkt in der Schweinmast eingesetzt werden^{14,15}. Indirekt kann Rohglycerin auch über die Zucht des essbaren Pilzes *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* in die Nutztierhaltung gelangen. Dieser Pilz enthält hohe Mengen an Threonin, welches eine der limitierenden Aminosäuren in Futtermitteln darstellt¹⁶.

Im Folgenden soll auf das Potential von Glycerin als Edukt für die industrielle Biokonversion von erneuerbaren Ressourcen in Chemikalien eingegangen werden. Die biotechnologische

Herstellung von Grundstoffen für die chemische Industrie steht in Konkurrenz zur konventionellen chemischen Synthese. Obwohl die Biokonversion einige Vorteile, wie eine verbesserte Umweltverträglichkeit aufweist, konnte sich diese Methode aus Kostengründen noch nicht für viele Chemikalien etablieren. Durch den langfristig erwarteten Preisanstieg beim Erdöl, gesteigertes Umweltbewusstsein, verbesserten Methoden für die Stammentwicklung und nicht zuletzt den Preisverfall beim Glycerin wird die Biotechnologie zunehmend konkurrenzfähiger^{17,18}.

Viele Mikroorganismen (u. a. *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*) können auf Glycerin wachsen¹⁹. Man unterscheidet dabei zwei Wege, über die Glycerin in die Glykolyse eingeschleust werden kann. In einem Fall wird das Glycerin zuerst mit einer Glycerin-Dehydrogenase zum Dihydroxyaceton oxidiert, woraufhin es zu einer Phosphorylierung durch eine Dihydroxyaceton-Kinase zum Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) kommt. Im anderen Fall kommt es erst zu einer Phosphorylierung von Glycerin zum Glycerin-3-Phosphat durch eine Glycerinkinase und anschließend zur Oxidation zum DHAP. Erstaunlicherweise kann *Corynebacterium glutamicum* nicht auf Glycerin wachsen. Dieser Organismus hat bereits eine herausragende Bedeutung in der biotechnologischen Herstellung von Aminosäuren. So werden durch diesen Organismus mehr als 1,5 Mio Jahrestonnen L-Glutamat und mehr als 750.000 Jahrestonnen L-Lysin hergestellt. Durch plasmidbasiertes Einführen der Glycerinkinase GlpK und der Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase GlpD aus *E. coli* erwarb *C. glutamicum* die Eigenschaft, auf Glycerin wachsen zu können und daraufhin wieder Glutamat zu produzieren²⁰. Mit *E. coli* gelang es, 40 g l⁻¹ Glycerin zu Ethanol umzusetzen. Dies benötigte 48 h und es wurden 90 % der theoretisch maximalen Ethanolausbeute erreicht. Der verwendete Stamm weist immense Manipulationen auf. Es wurden 9 Gene deletiert und es erfolgte eine metabolische Evolution über 50 Runden²¹. Auch Pigmente wie Prodigiosin könnten aus Glycerin biotechnologisch hergestellt werden. Prodigiosin ist ein tiefrotes Pigment mit potentiellen Anwendungsmöglichkeiten in der Krebstherapie, welches von *Serratia marcescens* produziert wird. Glycerin stellte sich dabei als überlegenes Substrat heraus. Es konnten 583 mg l⁻¹ Prodigiosin in 30 h in einem 5 Liter-Bioreaktor gewonnen werden²².

Es muss klar sein, dass für die Produktion von Feinchemikalien im Industriemaßstab aus Kostengründen schlussendlich Rohglycerin verwendet werden muss. Dennoch wird in vielen Veröffentlichungen, ebenso wie in dieser Arbeit (Fokus auf Stammentwicklung und nicht auf den industriellen Prozess) nur mit gereinigtem Glycerin gearbeitet. Das macht die Ergebnisse vergleichbarer, da es keine definierte Rohglycerinzusammensetzung gibt. Die Zusammensetzung verschiedener Chargen von Rohglycerin ist sehr variabel²³. Eine Arbeit zur Untersuchung der 1,3-Propandiolproduktion mit *Klebsiella pneumoniae* DSM 4799 ist auf diese Problematik eingegangen. Nach 47 Stunden konnte mit ungereinigtem Rohglycerin aus einem Biodieselproduktionsprozess eine Produktivität von $1,51 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erreicht werden. Mit reinem Glycerin war die Produktivität 44 % niedriger, was die Autoren zu der Interpretation veranlasste, dass die Verunreinigungen im Rohglycerin keine inhibierenden Effekte ausüben²⁴. In einer Untersuchung zur 1,2-Propandiolfermentation, mit eigens dafür veränderten *E. coli* Stämmen, wurde mit reinem Glycerin eine Massenausbeute von 21,3 % (g g^{-1}) erhalten. Die Ausbeute auf Rohglycerin war höher und betrug 23,9 %. Dafür wurden bei letzterem Experiment nur 18,9 g Rohglycerin, statt 26,2 g Glycerin im Vergleichsexperiment verbraucht²⁵. Mit dem photosynthetischen Bakterium *Rhodospseudomonas palustris* wurde eine photofermentative Umwandlung von Glycerin in Wasserstoff beschrieben. Es gelang dabei, 6 mol H_2 aus 1 mol Glycerin zu produzieren, was 75 % der theoretisch maximalen Ausbeute darstellte. Im Vergleich zu reinem Glycerin zeigten sich bei Verwendung von bis zu 100 mM Rohglycerin nur unwesentliche negative Effekte²⁶. Bei der Untersuchung zur Ethanolproduktion mit einer Mutante von *Klebsiella pneumoniae* wurden $21,5 \text{ g l}^{-1}$ Ethanol mit einer Produktivität von $0,93 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ aus Glycerin hergestellt. Dabei machte die Verwendung von Rohglycerin keinen Unterschied²⁷.

Nachdem auf den Unterschied zwischen Rohglycerin und gereinigtem Glycerin kurz eingegangen wurde, soll noch der Unterschied zu Glukose, einer oft verwendeten, alternativen C-Quelle für Biotransformationen, erörtert werden. Glycerin weist einen höheren Reduktionsgrad als Glukose auf. Dies kommt dadurch zum Ausdruck, dass bei der Glykolyse vom C3-Molekül Glycerin bis zur PEP/Pyruvatstufe zwei Reduktionsäquivalente H in der Form NADH oder UQH_2 gebildet werden. Beim C6-Molekül Glukose kann pro C3-Einheit nur ein Reduktionsäquivalent gebildet werden. Die doppelte Ausbeute an

Reduktionsäquivalenten kann insbesondere bei anaeroben Biotransformationen zu höheren Produktausbeuten von reduzierten Chemikalien und Treibstoffen aus Glycerin im Vergleich zu Glukose führen. Beispiele für Produkte, deren Entstehung ausgehend von Glycerin redoxneutral ist, oder bei denen sogar Reduktionsäquivalente verbraucht werden, sind 1,3-Propandiol, Propionat, Succinat, Butanol und die äquimolare Koproduktion von Ethanol und Formiat⁸. Bei der Produktion von Succinat wird die Bedeutung des unterschiedlichen Reduktionsgrades von Glycerin und Glukose deutlich. Ohne zusätzlich zugeführte Reduktionsmittel beträgt die theoretisch maximale Ausbeute 1,71 mol Succinat pro mol Glukose²⁸. Pro C-3 Molekül können also maximal 0,86 Moleküle Succinat entstehen. Aus Glycerin, das einer C-3 Einheit entspricht, kann durch CO₂-Fixierung genau 1 mol Succinat pro mol Glycerin entstehen²⁹.

1.1.2 Produkt Succinat als bedeutende Plattformchemikalie

Bernsteinsäure, auch als Succinylsäure oder 1,4-Butandisäure bezeichnet, ist eine aliphatische, gesättigte Dicarbonsäure mit vier Kohlenstoffatomen. Als Succinat bezeichnet man das Anion dieser Säure. In der Natur tritt Succinat als ein Intermediat des Citratzyklus auf. Bei einem aeroben Stoffwechsel kommt es normalerweise nicht zu einer Akkumulation und Exkretion des Metaboliten, da Succinat im oxidativen Citratzyklus fortlaufend gebildet und wieder abgebaut wird³⁰. Viele obligat oder fakultativ anaerobe Mikroorganismen produzieren aber bei Sauerstoffmangel Succinat als ein Endprodukt³¹.

Im Jahr 2004 hat das Department of Energy der USA (DOE) das Ergebnis eines Screening- und Auswahlprozesses veröffentlicht, bei dem nach biotechnologisch herstellbaren Chemikalien mit breitem Anwendungspotential gesucht wurde. Diese Plattformchemikalien bzw. chemische Bausteine mussten die Eigenschaft aufweisen, kostengünstig in eine Vielzahl von weiteren, höherpreisigen Materialien umgewandelt werden zu können. Dies würde die Basis für eine nachhaltige, chemische Industrie schaffen. Die Bausteine „building blocks“ sind Moleküle mit mindestens zwei funktionellen Gruppen, die deswegen das Potential besitzen viele chemische Reaktionen einzugehen. Es wurden zwölf Klassen von Bausteinen definiert und Succinat steht dabei an der Spitze als ein wichtiger Vertreter der C4-Dicarbonsäuren³². Auch in einer aktuelleren Neueinschätzung von 2010 erscheint Succinat

wieder als bedeutende Chemikalie in einer überholten und geschrumpften Liste ³³. Viele Übersichtsartikel befassen sich mit dem Potential von Succinat als Plattformchemikalie und diskutieren Anwendungsmöglichkeiten von Succinat und den nachfolgenden Produkten, so wie die technische Machbarkeit und Wirtschaftlichkeit ³⁴⁻³⁷.

Die möglichen Einsatzgebiete für Succinat sind sehr vielfältig. Daher können nachfolgend nur einige der zahlreichen Verwendungszwecke beschrieben werden. Ungefähr 92.000 Tonnen Salz werden jedes Jahr als Enteisungsmittel für Straßen allein in den USA verwendet. Succinatsalze könnten insbesondere in der Luftverkehrsbranche aktuell verwendete Salze ersetzen, weil sie eine verbesserte Auftauleistung bringen und dies kombinieren mit einer geringeren Beeinträchtigung von Oberflächen und neutraleren Effekten auf die Umwelt ^{37,38}. Aus Succinat können biologisch abbaubare Polymere hergestellt werden. Die Produkte Bionolle[®] oder GS Pla[®] sind Polyester von mehrwertigen Alkoholen und Succinat, die als Abfalltüten, Mulchfolien und Verpackungsmaterial eine Verwendung finden ^{39,40}. Es handelt sich dabei vereinfacht gesprochen um einen „biologisch abbaubaren Plastikersatz“. Succinat kann leicht in die Bulkchemikalien 1,4-Butandiol (BDO), Tetrahydrofuran (THF), γ -Butyrolakton (GBL) und andere C4-Chemikalien umgewandelt werden, die zusammen weltweit ein Marktvolumen von über 275.000 Tonnen pro Jahr haben ³⁵. Des Weiteren können Succinat-basierte Chemikalien als Stimulans für das Pflanzenwachstum, Lebensmittelzusatzstoffe, Futtermitteladditive, umweltfreundliche Lösemittel, Detergentien, Chelatoren und Korrosionsinhibitoren verwendet werden ³⁵. Succinat lässt sich somit als Basis weitverzweigter Produktionsstammbäume verwenden.

Im Jahr 2009 betrug der Jahresumsatz von Succinat 30.000 Tonnen, was einem Marktwert von US-\$225 Millionen entsprach ⁴¹. Der Großteil der Produktion wurde dabei petrochemisch abgedeckt und zwar hauptsächlich über die Maleinsäureanhydridroute. Das in der Destillatfraktion des Roherdöls (Naphtha) enthaltene *n*-Butan wird dabei durch Oxidation in Maleinsäureanhydrid überführt und anschließend durch Hydrierung in Bernsteinsäure umgewandelt ⁴². Dieser Prozess benötigt Schwermetallkatalysatoren, organische Lösemittel, hohe Temperaturen und hohe Drücke. Alle Faktoren zusammen machen den Prozess teuer und ökologisch fragwürdig ^{43,44}. Sollte die alternative Herstellung über biotechnologische

Verfahren wettbewerbsfähig werden, so würden diese ökologischen Nachteile entfallen und es könnten noch weitere Anwendungsmöglichkeiten für günstiges „Biosuccinat“ erdacht werden. Es wird vorausgesagt, dass sich die Jahresproduktion von Succinat hauptsächlich durch die Einführung biotechnologischer Methoden bis zum Jahr 2015 auf 180.000 Tonnen steigern wird⁴¹.

1.1.3 Auswahl von *E. coli* als Organismus für die Succinatproduktion

Das Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) ist ein sehr gut untersuchter Mikroorganismus mit einer langen akademischen Tradition. Zuerst isoliert und beschrieben von Theodor Escherich als *Bacterium coli communis* im Jahr 1885, beginnt die dokumentierte Historie des Stammes K-12 erst mit einer Isolierung im Jahr 1922 in Kalifornien⁴⁵. Die im Labor oft verwendeten K-12 Stämme sind nicht pathogen und daher ist der Umgang mit diesen Stämmen problemlos. *E. coli* ist ein gramnegativer, stäbchenförmiger Prokaryont, der unter Umständen eine peritriche Begeißelung ausbilden kann. Als fakultativer Anaerobier ist der Organismus unter vielen Bedingungen kultivierbar⁴⁶. Anspruchslos ist er auch in Bezug auf das Nährmedium, da er in synthetischen Nährmedien ohne komplexe Bestandteile auf einer Vielzahl von C-Quellen wachsen kann^{47,48}. Der mesophile Organismus kommt in der Natur unter anderem im Verdauungstrakt von Säugetieren vor. Daher findet die Kultivierung in der Regel bei 37 °C statt.

Die mikrobiologische und molekularbiologische Charakterisierung ist sehr detailliert und die Genomsequenzen vieler Stämme⁴⁹ bekannt, was sich in zahlreichen Internetdatenbanken niederschlägt, die während des Projektes in großem Umfang genutzt worden sind. Die Datenbank EcoCyc (<http://EcoCyc.org>)⁵⁰ enthält die komplette Gensequenz und Annotierung des K-12 Stammes MG1655. Weiterhin können Stoffwechselwege gesucht und dargestellt werden, in denen bestimmte Metabolite vorkommen. Es wird dabei durchgehend auf die Primärliteratur verwiesen. Eine weitere Datenbank ist RegulonDB (<http://regulondb.ccg.unam.mx/>)⁵¹. Dort wird eine Übersicht über das transkriptionelle Netzwerk präsentiert und man kann nach Sigmulons, Regulons und Operons suchen.

Seit der Entdeckung und Weiterentwicklung der λ -Red Rekombinationstechnologie ist es möglich ganz gezielt und basengenau die Genomsequenz zu verändern. So können beispielsweise unerwünschte Gene deletiert, bestimmte Sequenzen integriert oder auch Promotoren ausgetauscht werden⁵²⁻⁵⁷. Dies stellt einen großen Fortschritt für die biotechnologische Nutzung des Organismus dar, denn durch „*metabolic engineering*“ sind nun Stoffwechselflüsse gezielt beeinflussbar⁵⁸⁻⁶¹. Bei der Arbeit mit *E. coli* kann man durch einfach zugängliche Bezugsquellen auf viele vorgefertigte Bausteine zurückgreifen. So kann man bei der Stammsammlung CGSC der Yale Universität (The *Coli Genetic Stock Center*, <http://cgsc.biology.yale.edu> in New Haven, CT, USA) eine Vielzahl von Stämmen bestellen. Auch die Stämme der KEIO Sammlung⁶², einer Sammlung von 3985 Stämmen, die jeweils ein nicht essentielles Gen deletiert haben, sind dort vertreten. Die ASKA-Bibliothek⁶³ ist eine Sammlung von Plasmiden. Jedes Plasmid enthält einen anderen offenen Leserahmen (ORF) von *E. coli*. In der Gesamtheit sind alle bekannten und bioinformatisch vorhergesagten ORFs enthalten. Mit IPTG kann dann die Expression eines gewünschten Gens induziert werden. Im Jahr 2006 wurde dann eine Studie veröffentlicht, die sich die ASKA-Bibliothek zu Nutze machte und große Datenmengen über direkte Protein-Protein-Interaktionen lieferte⁶⁴. Dabei wurden viele schon bekannte Protein-Protein-Wechselwirkungen bestätigt und neue Wechselwirkungen entdeckt. Es wurde die Expression von 4339 ORFs induziert, und danach konnten die mit einem His-Tag versehenen Proteine über eine Affinitätssäule gereinigt werden. Durch MALDI-TOF Massenspektrometrie wurden die Proteine identifiziert, die durch die Reinigung zusammen mit den markierten Proteinen eluiert wurden. Diese Studie lieferte neue Strategien für die Systembiologie des Organismus.

Bei anaerobem Wachstum eines Wildtyps kommt es zu einer Exkretion von Metaboliten wie Ethanol, Acetat, Formiat, Laktat und auch Succinat⁶⁵. Dies wird als gemischte Säuregärung bezeichnet. Der Anteil von Succinat an den Produkten hängt natürlich von den genauen Bedingungen ab, ist aber verhältnismäßig gering. So entstanden bei einer Fermentation eines *E. coli* B Stammes auf LB-Medium mit 2 g l^{-1} Glukose nur $6,1 \text{ mM}$ Succinat. Dies entsprach einem molaren Anteil von $12,5 \%$ an den eben genannten Metaboliten⁶⁶. Bei einer Fermentation des Stammes K1060 auf Komplexmedium mit 30 g l^{-1} Glycerin betrug die molare Succinatausbeute, bezogen auf das verbrauchte Glycerin, $16,4 \%$ (Acetat $29,1 \%$,

Laktat, 19,1 %, Ethanol 25,3 %, Pyruvat 13,3 % und Formiat 48,2 %) ⁶⁷. Mit einem *E. coli* C Wildtypstamm (ATCC 8739) konnte in einem Minimalmedium mit 5 % (w/v) Glukose eine molare Succinatausbeute von 19 % erhalten werden (Pyruvat 12,8 %, Acetat 58,9 %, Laktat 38 %, 101 % Formiat) ⁶⁸. Die geringen Succinatausbeuten von *E. coli* Wildtypstämmen machen Verbesserungen absolut notwendig, bieten aber gleichzeitig einen großen Spielraum für die Entwicklung der Produktionsstämme. Die Stoffwechselwege vom Glycerin zum Succinat und deren Beeinflussungsmöglichkeiten sind in Kapitel 1.2 ausführlich erläutert.

Neben *E. coli* gibt es auch die natürlichen Succinatproduzenten. Diese Eigenschaft ist in vielen Fällen auch Bestandteil ihres lateinischen Namens. Im Jahr 2010 wurde die Erstbeschreibung von *Basfia succiniciproducens*, unter anderem von der BASF AG (Ludwigshafen), veröffentlicht ⁶⁹. Das Isolat stammt aus dem Pansen einer Kuh aus der Schweiz. Mit diesem Stamm konnten in einem kontinuierlichen Produktionsprozess Succinatkonzentrationen von 5,21 g l⁻¹ und Ausbeuten von 1,02 g g⁻¹ auf Rohglycerin erreicht werden ⁷⁰.

Schon elf Jahre zuvor wurde die Art *Actinobacillus succinogenes* erstmals beschrieben ⁷¹. Das vorherige Screening auf Succinatproduktion erfolgte ebenfalls mit Proben aus Kuhpannen, denn dort wandeln Bakterien die Kohlenhydrate von Pflanzen in Fettsäuren und in einem großen Ausmaß auch in Succinat um. *A. succinogenes* hat die Fähigkeit, sehr hohe Konzentrationen von Succinat zu bilden. Auf Glukose konnte er 74 g l⁻¹ Succinat akkumulieren. Im Jahr 2010 wurde dann die Sequenzierung des Genoms von *A. succinogenes* publiziert ⁷², die Erklärungen für viele physiologische Eigenschaften wie Auxotrophien lieferte. Der Stamm benötigt beispielsweise Glutamat in Minimalmedium, weil er den Vorgänger α -Ketoglutarat aufgrund des Fehlens einer Isocitratdehydrogenase nicht synthetisieren kann. Eine Citratsynthase ist ebenso nicht vorhanden. Es fehlt somit ein kompletter Citratzyklus. Ein Glyoxylatzyklus ist auch nicht vorhanden. Nur der reduktive Teil des Citratzyklus ist durch das Vorhandensein von einer Malatdehydrogenase, einer Fumarase und einer Fumaratreduktase möglich. Das Genom codiert für eine Phosphoenolpyruvat-carboxykinase, wohingegen es keine Sequenzen für eine Phosphoenolpyruvat-Carboxylase gibt.

Die Auxotrophien der natürlichen Succinatproduzenten stellen einen Nachteil gegenüber *E. coli* dar. Außerdem entstehen auch bei den natürlichen Produzenten unerwünschte Nebenprodukte. Somit ist auch dort keine Homosuccinatgärung gegeben. Mit dem Stamm *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E, isoliert aus dem Pansen einer koreanischen Kuh, wurde eine Fermentation auf einem Komplexmedium mit 22,5 g l⁻¹ Glukosezusatz durchgeführt. Es entstanden dabei 88,8 mM Succinat, aber auch 82,6 mM Acetat, 88,9 mM Formiat und 38,4 mM Laktat⁷³. Das Auftreten dieser Nebenprodukte ließ sich nicht alleine durch das Verändern von Prozessparametern verhindern. Dennoch konnte mit dem gleichen Stamm die Massenausbeute von Succinat aus Glukose durch Erhöhung der gelösten CO₂-Konzentration von 0,39 g g⁻¹ (bei 8,74 mM CO₂) auf 0,59 g g⁻¹ (bei 141 mM CO₂) gesteigert werden. Parallel zur Erhöhung der Succinatausbeute stieg auch das Massenverhältnis vom Succinat zum Acetat von 1,98 g g⁻¹ auf 3,05 g g⁻¹ an⁷⁴.

Um unerwünschte Nebenwege auch bei den natürlichen Produzenten auszuschalten, bedarf es Techniken der gezielten Genommanipulation, die aber nicht so weit fortgeschritten sind wie bei *E. coli*. Daher wurde *E. coli* als Basis für die Entwicklung eines Succinatproduzenten ausgewählt. Ein weiterer Grund war, dass am Institut für Industrielle Genetik IIG viele molekularbiologische Methoden für die Manipulation des Genoms von *E. coli* bereits etabliert waren. Die Erkenntnisse, die mit den natürlichen Succinatproduzenten gewonnen wurden, sollten sich als eine Art metabolische Mimikry auf den Stoffwechsel von *E. coli* übertragen lassen. Wichtige Unterschiede zwischen den natürlichen Produzenten und *E. coli* bezüglich der Stoffwechselwege sind dann im Abschnitt 1.2 bei den jeweiligen Produktionsstrategien erläutert.

1.1.4 Stand der Forschung und Beispiele aus der Industrie

Die mikrobielle Herstellung von Succinat wurde ausgehend von verschiedenen C-Quellen wie Glukose und Glycerin und mit vielen Organismen in zahlreichen Übersichtsartikeln beschrieben^{31,37,68}. Zunächst sollen kurz zwei aktuelle und herausragende Beispiele der Succinatproduktion auf Glukose beschrieben werden, bevor dann genauer auf die Succinatproduktion ausgehend von Glycerin und auf die Anwendung in der Industrie eingegangen wird.

Die Arbeitsgruppe von Professor Ingram aus Florida hat sich intensiv mit der Succinatproduktion ausgehend von Glukose durch *E. coli* auseinandergesetzt^{68,75-77}. Als Endergebnis wurde im Jahr 2008 der Stamm KJ134 erhalten. Dieser Stamm weist 10 Gendeletionen auf ($\Delta ldhA \Delta adhE \Delta ackA\text{-}pta \Delta focA\text{-}pflB \Delta mgsA \Delta poxB \Delta tdcDE \Delta citF \Delta aspC \Delta sfcA$). Weiterhin hat der Stamm einige Mutationen akkumuliert, die im Rahmen einer metabolischen Evolution entstanden sind. Hierfür wurden 261 serielle Transfers in einem auf Wachstumsraten basierten Selektionsprozess durchgeführt. Zwei Mutationen konnten genauer charakterisiert werden. Es handelt sich um eine Inaktivierung des Phosphotransferasesystems (PTS) durch eine Deletion im *ptsI* Gen und um eine Mutation in der Promotorregion des Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Gens (*pck*), welche zu einer 8-fach erhöhten Expression von *pck* führt. Mit diesem Stamm wurden bei einer anaeroben Fermentation in Minimalmedium auf Glukose nach 4 Tagen 606 mM Succinat gebildet (Malat 13 mM, Pyruvat 22 mM, Acetat 37 mM). Dies entsprach einer molaren Succinatausbeute von 1,53 mol mol⁻¹ Glukose, was 89 % der theoretisch maximal möglichen Ausbeute entsprach.

Ebenfalls im Jahr 2008 und auf Glukose, aber mit *Corynebacterium glutamicum* als Produzent, hat eine andere Gruppe nach nur zwei Tagen anaerober Produktionsphase in Minimalmedium eine Succinatkonzentration von 1,24 mol l⁻¹ erhalten. Die molaren Ausbeuten an Succinat und Acetat betragen 1,4 mol mol⁻¹ bzw. 0,29 mol mol⁻¹. Der Stamm war defekt für Laktatdehydrogenase und hatte erhöhte Mengen an Pyruvat-Carboxylase⁷⁸. Die beiden Beispiele zeigen, dass die Entwicklung der auf Glukose basierenden fermentativen Succinatproduktion schon sehr weit fortgeschritten ist. Dies ist auch ein Grund, weshalb in dieser Arbeit der Fokus auf der Glycerin-basierenden Succinatproduktion liegt.

Im Folgenden werden die Ergebnisse von zwei aktuellen Veröffentlichungen beschrieben, welche die fermentative Herstellung von Succinat aus Glycerin beschreiben. Für die Auswahl wurden nur Publikationen berücksichtigt, die wegen der Verwendung von Minimalmedium, der eingesetzten Produktionsstrategie und den erzielten Ausbeuten eine hohe Messlatte für eine weitere Optimierung setzen. Mit einem *E. coli* Stamm, der fünf Deletionen ($\Delta adhE \Delta pta \Delta poxB \Delta ldhA \Delta ppc$) aufweist und zusätzlich ein Gen für eine heterologe Pyruvat-Carboxylase exprimiert, konnte in 3 Tagen aus 221 mM Glycerin unter mikroaeroben Bedingungen

120 mM Succinat gebildet werden. Dies entsprach einer molaren Ausbeute des Hauptproduktes Succinat von nur 54,3 %. Es fand somit auch keine Nettofixierung von CO₂ statt. Weitere Nebenprodukte waren 14 mM Acetat und 2 mM Pyruvat. Ungefähr 30 % der C-Atome des komplett verbrauchten Glycerins fehlten in der Kohlenstoffbilanz, in die die gebildeten Produkte und die Biomasse eingeflossen sind. Es wurde vermutet, dass dieser Anteil komplett zu CO₂ oxidiert worden ist. Kompletta anaerob schien das System nicht zu funktionieren²⁹.

Erneut aus der Arbeitsgruppe von Professor Ingram stammt eine Publikation mit dem *E. coli* Stamm XZ721 ($\Delta pflB \Delta ptsI pck^+$). Dieser Stamm mit erhöhter Pck Aktivität erreichte nach 6 Tagen ausgehend von 543 mM Glycerin eine Succinatkonzentration von 102 mM. Dies entsprach einer molaren Ausbeute von 80 % und kam einer geringen Nettofixierung von CO₂ gleich. Es entstanden auch 6 mM Laktat und 12 mM Acetat als Nebenprodukte⁷⁹.

Nun sollen noch Beispiele aus der Industrie beschrieben werden. BioAmber ist ein US-amerikanisches Unternehmen mit großem Know-how auf dem Gebiet der biotechnologischen Herstellung von Succinat. Es besitzt eine große Patentfamilie, die die Produktion, Reinigung und Weiterverarbeitung von Succinat abdeckt. In Frankreich wurde eine Pilotanlage mit dem ausschließlichen Ziel der Succinatproduktion gebaut. Im Dezember 2009 wurde mit der Succinatproduktion begonnen. Als Rohstoff dient unter anderem Glukose aus Weizen. Aktuell beträgt die maximale Produktionskapazität 3.000 Tonnen pro Jahr (www.bio-amber.com vom 21.04.2011). Es ist geplant die Produktion im Jahr 2013 in einem deutlich größeren Maßstab nach Nordamerika zu verlagern.

Myriant Technologies ist ein weiteres US-amerikanisches Unternehmen, welches 2004 gegründet wurde. Der Fokus des Unternehmens liegt auf der Entwicklung und Kommerzialisierung von Technologien für die biotechnologische Umwandlung erneuerbarer Rohstoffe in hochpreisige Chemikalien. Zur Zeit wird eine Produktionsanlage in Lake Providence, Louisiana, USA gebaut, deren Produktion noch 2011 anlaufen soll. Dabei wird eine jährliche Produktion von 14.000 Tonnen Succinat angestrebt. Professor Ingram, der am Anfang dieses Kapitels schon erwähnt wurde, sitzt im Management dieses Unternehmens und hat vier Patente beigesteuert (www.myriant.com vom 21.04.2011).

Die BASF AG hat in einer Pressemitteilung im September 2009 bekanntgegeben, dass sie eine Partnerschaft mit der holländischen PURAC, dem weltweiten Marktführer in der fermentativen Milchsäureherstellung, eingegangen ist (www.basf.com/group/pressrelease/P-09-395). Ziel ist ebenfalls die Entwicklung biotechnologischer Succinatproduktion. Als Startzeitpunkt wurde das zweite Quartal 2010 anvisiert.

1.2 Strategien zur Succinatproduktion

In den folgenden Unterkapiteln werden nach der Darstellung des Zentralstoffwechsels von *E. coli* verschiedene Strategien und Routen zur Succinatproduktion vorgestellt und diskutiert. Dabei wird an entscheidenden Stellen auch auf die Unterschiede im Proteom zu anderen Organismen, insbesondere den Succinogenen (= natürliche Succinatproduzenten) eingegangen.

1.2.1 Übersicht über den Zentralstoffwechsel auf Glukose und Glycerin

Abbildung 1 zeigt den für eine Succinatproduktion relevanten Ausschnitt aus dem Zentralstoffwechsel von *E. coli* bei Wachstum auf Glukose oder Glycerin. Die Übersicht wurde mit den Inhalten der Datenbank Ecocyc⁵⁰ und den Informationen aus der in diesem Kapitel im Fließtext angegebenen Primärliteratur erstellt.

Glukose ist die bevorzugte C-Quelle von *E. coli* und kann durch die Glykolyse zu Pyruvat verstoffwechselt werden. In einem Wildtypstamm erfolgt die Glukoseaufnahme durch das Phosphotransferase-system PTS. Die Aufnahme des Zuckers ist dabei gekoppelt mit dessen Phosphorylierung, wobei der Phosphatdonor Phosphoenolpyruvat (PEP) dabei zu Pyruvat umgewandelt wird. Die Nettoreaktion der gesamten Glykolyse besteht in der Bildung von einem Molekül PEP und einem Molekül Pyruvat. Dabei kommt es zur Bildung von einem ATP und zwei NADH/H⁺. Das PEP kann optional noch durch eine der beiden Pyruvatkinasen PykA oder PykF unter ATP-Bildung zum Pyruvat dephosphoryliert werden^{80,81}.

Es folgt eine kurze Aufzählung der glykolytischen Schritte bis zum Dihydroxyacetonphosphat (DHAP). Die restlichen Schritte sind in Abbildung 1 dargestellt.

Einleitung

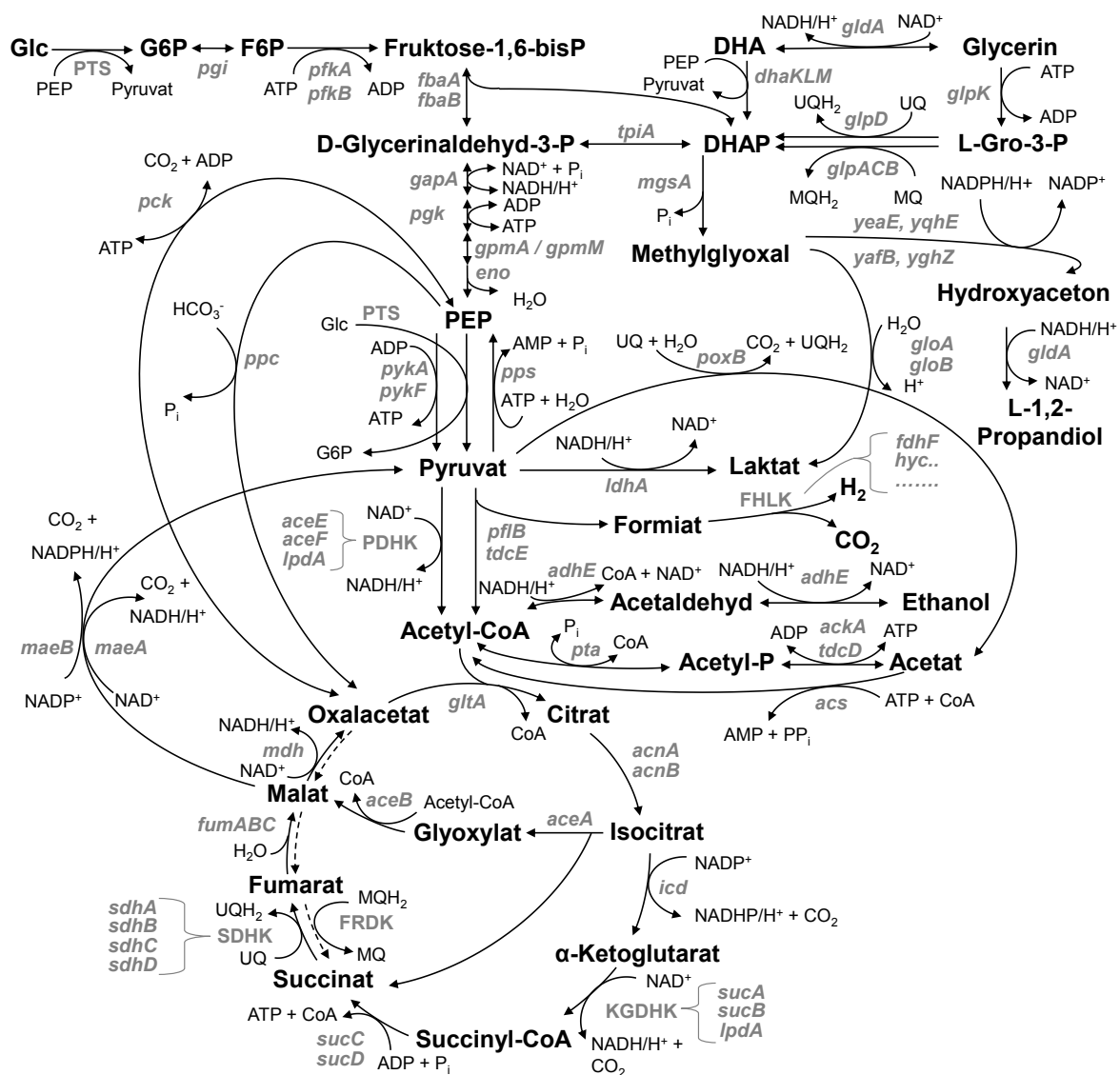


Abbildung 1: Ausschnitt aus dem Zentralstoffwechsel von *E. coli* mit Glukose oder Glycerin als C-Quelle. Gene sind kursiv und in grau dargestellt. Proteinkomplexe sind in grauen Großbuchstaben dargestellt. Abkürzungen sind im Abkürzungsverzeichnis erläutert. Symbol - - - - = reduktiver Ast des Citratzyklus

Nach Aufnahme der Glukose durch das PTS liegt diese als Glukose-6-Phosphat (G6P) vor. G6P wird dann durch die Glukose-6-Phosphat-Isomerase (*pji*) zu Fruktose-6-Phosphat (F6P) isomerisiert. F6P wird unter Einwirkung der Phosphofruktokinase I (*pfiA*) oder der Phosphofruktokinase II (*pfiB*) ATP-abhängig zu Fruktose-1,6-bisphosphat (Fru-1,6-bP) phosphoryliert. Anschließend erfolgt eine Aufspaltung in DHAP und D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP), die von einer der beiden Aldolasen *fbaA* oder *fbaB* katalysiert wird. Die beiden Produkte GAP und DHAP können von der Triosephosphatisomerase (*tpiA*) ineinander

umgewandelt werden, so dass für den weiteren Verlauf zwei Moleküle GAP zur Verfügung stehen. Über DHAP ist der Glycerinstoffwechsel mit der Glykolyse verbunden.

Der Glycerinstoffwechsel beginnt mit der Aufnahme von Glycerin in die Zelle. Glycerin kann durch passive Diffusion in die Zelle gelangen. Durch das Aquaglyceroporin GlpF wird diese Diffusion insbesondere bei niedrigen extrazellulären Glycerinkonzentrationen erleichtert und beschleunigt⁸². Bei einer extrazellulären Glycerinkonzentration von 1,36 mM ist GlpF für das Wachstum in Minimalmedium mit Glycerin essentiell. Aber schon ab einer Glycerinkonzentration von 5 mM aufwärts scheint GlpF keinen großen Anteil an der Glycerinaufnahme mehr zu leisten, da sich die Wachstumsraten des Wildtyps und einer *glpF* Deletionsmutante immer mehr annähern⁸³.

Über DHAP einem Intermediat der Glykolyse ist der Glycerinstoffwechsel mit dem Zentralstoffwechsel verbunden. Die Verstoffwechslung von Glycerin zum Dihydroxyacetonphosphat kann über zwei Wege erfolgen. Beim ersten Weg erfolgt zuerst eine ATP-abhängige Phosphorylierung des Glycerins zum L-Glycerin-3-phosphat (G3P) durch die Glycerinkinase GlpK. Der Metabolit G3P kann nicht mehr frei aus der Zelle diffundieren^{84,85}. Danach erfolgt eine Oxidation zum DHAP, welche im Aeroben von der G3P-Dehydrogenase GlpD und im Anaeroben vor allem von der G3P-Dehydrogenase GlpACB katalysiert wird⁸⁶. Die Gene die für diesen Weg benötigt werden, sind in den Operons *glpFKX*, *glpD* und *glpACB* organisiert. Die Transkription dieser Operons wird hauptsächlich über zwei Mechanismen reguliert. Der Glycerinrepressor GlpR reprimiert die Transkription. Sobald genügend Induktor G3P vorhanden ist, setzt dieser durch Bindung an GlpR dessen Affinität zu den Promotorbereichen herab, und die Reprimierung ist aufgehoben. Zusätzlich werden diese Operons durch das cAMP Rezeptor Protein (CRP) positiv reguliert^{87,88}.

Bei dem zweiten Weg der Glycerinassimilierung wird Glycerin zuerst oxidiert und dann phosphoryliert. Die Oxidation erfolgt durch die Glycerin-Dehydrogenase GldA. Als Cofaktor dient hier NAD⁺. Das dabei entstandene Dihydroxyaceton (DHA) wird dann PEP-abhängig durch die Dihydroxyacetonkinase DhaKLM zu DHAP phosphoryliert. Dieser Weg der Phosphorylierung weist Parallelen zum Glukose-PTS auf, mit dem Unterschied, dass dieses DHA-PTS mit keinem Transport eines Zuckers in die Zelle verknüpft ist. Die siebenstufige

Kaskade von Phosphatübertragungen beginnt mit PEP, welches E1 (*ptsI*) phosphoryliert. Dann wird die Phosphatgruppe weiter übertragen auf HPr (*ptsH*). DhaM besteht aus den drei funktionellen Domänen EI-DHA, HPr und EIIA, welche in der eben genannten Reihenfolge den Phosphatrest vom HPr auf DhaL weitergeben. Während die Phosphatgruppe bei E1, HPr und DhaM jeweils kovalent an einen spezifischen Histidinrest gebunden ist, besitzt die Untereinheit DhaL einen mit hoher Affinität gebundenen ADP-Cofaktor, der die Phosphatgruppe von DhaM übernimmt und schlussendlich auf DHA überträgt, welches von der DhaK Untereinheit gebunden wird^{81,89,90}.

Bei aerobem Wachstum auf Minimalmedium mit Glycerin ist nur der GlpK-GlpD-Weg aktiv und damit auch absolut essentiell⁸³. Unter mikroaeroben Bedingungen und bei hohen Glycerinkonzentrationen (217 mM) trägt sowohl der GlpK-GlpD/GlpACB-Weg als auch der GldA-DhAKLM-Weg zum Glycerin-Stoffwechsel bei⁹¹. Die Möglichkeit des Wachstums von *E. coli* via des GldA-Weges wurde entdeckt, nachdem man einen Ausgangsstamm, der wegen Deletionen von *glpK* und *glpD* nur marginal und nur bei einer Glycerinkonzentration von 100 mM wachsen konnte, auf Glycerin selektionierte. Die erhaltenen Mutanten zeigten ein deutlich verbessertes Wachstum, auch bei nur 10 mM Glycerin⁹². Dem lag ein mehr als 300-facher konstitutiver Anstieg einer Glycerin-Dehydrogenase-Aktivität zu Grunde. Interessant ist, dass GldA in Wildtypstämmen nicht durch Glycerin, sondern durch Hydroxacetone induziert wird^{93,94}. Außerdem weist GldA ein breites Substratspektrum auf und kann beispielsweise Dihydroxacetone zu Glycerin, Hydroxyacetone zu 1,2-Propandiol und Methylglyoxal zu Laktaldehyd reduzieren. Bei pH7 ist die Reduktion von DHA zu Glycerin statt der Bildung von DHA aus Glycerin bevorzugt, da der K_M bezüglich DHA nur 0,3 mM beträgt und bezüglich Glycerin 56 mM. Die Expressionsdaten zusammen mit den Enzymeigenschaften haben zu der Annahme geführt, dass die primäre physiologische Aufgabe von GldA in der Entfernung giftiger Intermediate besteht⁹⁵.

Egal auf welchem Weg DHAP entstanden ist, kann es entweder über die Triosephosphatisomerase TpiA in die Glykolyse eintreten oder durch die Methylglyoxal-Synthase MgsA zu Methylglyoxal (MG) dephosphoryliert werden. MG kann theoretisch auch über andere Wege entstehen. So wurde gezeigt, dass polyvalente Anionen wie Phosphat *in*

in vitro die Bildung von MG aus DHA katalysieren können⁹⁶. Der physiologisch einzig bedeutende Entstehungsweg scheint aber die Katalyse durch MgsA zu sein⁹⁷. Bei einer *mgsA* Deletionsmutante konnte im Gegensatz zum Wildtyp keine Bildung von MG mehr nachgewiesen werden und es zeigte sich kein Wachstumsdefekt auf Glukose. Eine Überexpression von MgsA führte bei Wachstum in Minimalmedium mit Glycerin zum Wachstumsstopp, zur Bildung von MG und zum Verlust der Zellviabilität⁹⁸. MG ist ein sehr toxisches Elektrophil, weshalb sich die Frage stellt, warum es in vielen Organismen enzymatisch gebildet wird⁹⁷.

Es wurde spekuliert, dass die konstitutiv exprimierte MgsA, welche stark durch Orthophosphat gehemmt wird, einen Kontrollpunkt in der Glykolyse darstellen könnte⁹⁹. Bei niedrigen Phosphatkonzentrationen könnte die Glykolyse auf der Stufe von G3P zum Erliegen kommen, da Phosphat als ein Substrat der G3P-Dehydrogenase limitierend wäre. Durch die Aktivität von MgsA würde zum einen ein Phosphat pro DHAP frei werden, zum anderen könnte nachfolgend in mehreren Schritten aus Methylglyoxal das Endprodukt der Glykolyse Pyruvat entstehen. Dies ist ein möglicher Abbauweg für MG und wird vom Glutathion-abhängigen Glyoxylase-System katalysiert. Die Glyoxylase I (*gloA*) katalysiert die Bildung von *S*-lactoyl-Glutathion aus MG und Glutathion, welches dann durch die Aktivität der Glyoxylase II (*gloB*) zu D-Laktat hydrolysiert wird. Dieser Weg scheint das wichtigste Detoxifikationssystem für MG in *E. coli* zu sein, da Stämme, die keine Glyoxylase I bilden können, extrem empfindlich auf MG reagieren^{100,101}. Das D-Laktat könnte dann durch die aerobe Laktatdehydrogenase Dld zu Pyruvat oxidiert werden¹⁰².

Es soll noch auf einen weiteren Abbauweg für MG eingegangen werden, bei dem als Endprodukt 1,2-Propandiol entsteht. In seiner Gesamtheit ist der folgende Weg für *E. coli* die einzige Möglichkeit die Reduktionsäquivalente, die sich bei der Bildung von Zellmasse im Anaeroben ausgehend von Glycerin unweigerlich anhäufen, zu entsorgen. Daher wurde diesem Weg eine gewisse Relevanz zugeschrieben¹⁰³. Als erster Schritt wird MG durch NADPH-abhängige Aldo-Keto-Reduktasen (YeaE, YqhE, YghZ, YafB) zu Hydroxyaceton (HA) reduziert. Im Anschluss erfolgt die Bildung von 1,2-Propandiol aus HA durch NADH-abhängige Reduktion durch die schon erwähnte GldA^{103,104}.

Die Umwandlung von PEP in Pyruvat kann durch PykA, PykF oder zum Teil durch das PTS erfolgen. Diese Umwandlungen sind unter physiologischen Bedingungen irreversibel. Um PEP direkt aus Pyruvat zu synthetisieren, wird die Aktivität der Phosphoenolpyruvat-Synthetase PpsA benötigt. Sie katalysiert die Bildung von PEP, AMP und Phosphat aus Pyruvat, ATP und H₂O¹⁰⁵. Die Transkription von *ppsA* wird von dem Transkriptionsregulator Cra (\equiv FruR) gesteuert. Durch Bindung von Fruktose-1-Phosphat an Cra wird die Aktivierung der Transkription von *ppsA* aufgehoben¹⁰⁶. In der Zelle muss dafür gesorgt werden, dass die Pyruvatkinasen und die PpsA nicht gleichzeitig aktiv sind, da es sonst zu einem ATP-verbrauchenden Zyklus kommt¹⁰⁷. In *E. coli* gibt es zwei Isoenzyme der Pyruvatkinase. Die Aktivität der Pyruvatkinase II (PykA) wird durch AMP stimuliert, wohingegen die Pyruvatkinase I (PykF) durch Fru-1,6-bP aktiviert wird¹⁰⁸. Letztere ist für den Großteil der Gesamtaktivität verantwortlich, falls die Zellen auf Minimalmedium mit Glukose wachsen¹⁰⁹.

Der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex (PDHK) stellt eine mögliche Verbindung zwischen der Glykolyse und dem Citratzyklus dar. Er katalysiert die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA und CO₂, wobei NAD⁺ zu NADH/H⁺ reduziert wird. Er wird aus drei verschiedenen enzymatischen Untereinheiten gebildet. Der Kern wird durch ein Oligomer aus 24 Monomeren der Dihydrolipoyltransacetylase AceF (E2p) gebildet. An diesen lagern sich noch 12 Dimere der Pyruvatdehydrogenase AceE (E1p) und 6 Dimere der Lipoamid-Dehydrogenase LpdA (E3) an¹¹⁰. Die Expression erfolgt durch das *pdh*-Operon mit der Genreihenfolge *pdhR-aceEF-lpdA*. Die Transkription wird hauptsächlich durch den Pyruvat-Dehydrogenase-Repressor (PdhR) gesteuert. In Abwesenheit von Pyruvat bindet dieser stromabwärts des *pdhR* Promotors und reprimiert seine eigene Transkription (Autoregulation) und die der nachfolgenden Gene *aceEF-lpdA*¹¹¹. Auf enzymatischer Ebene wird der Komplex durch Acetyl-CoA und NADH inhibiert^{112,113}.

Eine weitverbreitete Annahme ist, dass der PDH-Komplex im Anaeroben keine Funktion erfüllt. Dabei wurde gezeigt, dass der PDH-Komplex auch im Anaeroben exprimiert wird und enzymatisch aktiv ist¹¹⁴. Es wurde diskutiert, dass die *in vivo* Aktivität des Komplexes im Anaeroben maximal 4 bis 5-fach geringer ist als unter Sauerstoffsättigung¹¹⁵. Dies stimmt überein mit der Feststellung, dass eine Deletion der Pyruvat-Formiat-Lyase, keinen Nachteil

beim Wachstum durch Nitrataatmung bringt ¹¹⁶. Diesem Enzymkomplex wird normalerweise die Aufgabe der Acetyl-CoA Bereitstellung im Anaeroben zugeschrieben. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass der PDH-Komplex auch im Anaeroben eine nicht unerhebliche Rolle spielt. Eine darüberhinausgehende Verstärkung der PDH-Komplexaktivität im Anaeroben ist möglich und wurde schon für zwei biotechnologische Anwendungen beschrieben. Eine Arbeitsgruppe hat die transkriptionelle Regulation des PDH-Komplexes verändert, indem sie den nativen Promotor durch den Promotor der Pyruvat-Formiat-Lyase ausgetauscht hat. Die resultierende Erhöhung der PDH-Aktivität im Anaeroben durch erhöhte Transkription führte zu einem besseren Wachstum und zu einer sehr hohen Ethanolausbeute via Acetyl-CoA und Acetaldehyd ⁶⁶. Eine andere Gruppe selektionierte einen Stamm, der keine Pyruvat-Formiat-Lyase synthetisieren kann, auf schnelles Wachstum unter mikroaeroben Bedingungen. Es konnten schnellwachsende, ethanolproduzierende Mutanten isoliert werden. Eine Analyse ergab, dass es zu Mutationen in der E3-Untereinheit des PDH-Komplexes gekommen ist, die diese weniger empfindlich gegenüber der Inhibition durch NADH macht ¹¹⁷.

Die Pyruvat-Formiat-Lyase PflB stellt eine alternative Verbindung zwischen Glykolyse und Citratzyklus dar. Die Genexpression wird im Anaeroben durch multiple Promotoren induziert und es wird zunächst ein inaktives PflB-Dimer gebildet. Die Aktivase PflA aktiviert die PflB durch Erzeugung eines freien Glycyl-Radikals in der Polypeptidkette von PflB. Diese posttranslationelle Umwandlung hat allerdings zur Folge, dass die aktivierte PflB sauerstoffempfindlich ist und durch O₂ irreversibel inaktiviert werden kann. Die aktivierte PflB kann durch die PFL-Deaktivasefunktion der Alkoholdehydrogenase (AdhE) wieder in den inaktiven, aber geschützten Grundzustand, zurückversetzt werden. Dieser Zyklus reguliert die Aktivität des Enzyms in der anaeroben Zelle. Die enzymatische Aktivität von PflB besteht in der Katalyse der Spaltung von Pyruvat in Acetyl-CoA und Formiat ¹¹⁸. Es gibt noch ein weiteres Enzym, welches diese Aktivität als Nebenaktivität aufweist. Es handelt sich um die zur PflB zu 82 % identische 2-Ketobutyrat-Formiat-Lyase (TdcE). Das entsprechende Gen *tdcE* ist Teil eines großen Operons, welches für Funktionen des anaeroben Threoninabbaus codiert. Allerdings unterliegt dieses Operon einer starken Katabolitrepression ¹¹⁹.

Das durch die PflB gebildete Formiat kann entweder durch den Formiat-Transporter (FocA) aus der Zelle ausgeschleust werden oder durch den Formiat-Hydrogen-Lyase-Komplex (FHLK) zu molekularem Wasserstoff H_2 und Kohlenstoffdioxid CO_2 umgewandelt werden¹²⁰. Zusammen mit der Hydrogenase 3, bestehend aus sechs verschiedenen Untereinheiten (HycDCFGBE), bildet die Formiat-Dehydrogenase H (FDH-H), codiert durch *fdhF*, den FHLK. Die Assemblierung des Multienzymkomplexes ist sehr kompliziert. Die Hydrogenase 3 ist ein Metalloenzym, welches Nickel und Eisen-Schwefel-Zentren enthält. Die FDH-H ist ein Molybdo-Selenoprotein, welches ebenfalls Eisen-Schwefel-Zentren enthält¹²¹.

Die Pyruvat-Oxidase PoxB katalysiert die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetat und CO_2 . Als Elektronenakzeptor dient Ubichinon, welches zu Ubichinol reduziert wird. Die Bedeutung des Enzyms ist nicht endgültig geklärt, da eine Deletion des Gens keine Wachstumsdefekte zeigt¹²². Die Expression des Proteins wird auf transkriptioneller Ebene reguliert und steigt in der stationären Phase stark an. Dabei ist der stationäre Sigmafaktor RpoS zwingend erforderlich. Es wurde vermutet, dass die PoxB wichtig für das Überleben der Zellen beim Übergang von der exponentiellen Wachstumsphase in die Stationärphase sein könnte. Unter den dann vorherrschenden mikroaeroben Bedingungen ist die Aktivität des PDH-Komplexes erniedrigt und die Aktivität der Pyruvat-Formiat-Lyase noch nicht vorhanden. Daher könnte die Acetatentstehung durch die PoxB eine Überbrückungsfunktion haben¹²³. Im Chemostat wurde bei niedrigen Wachstumsraten gezeigt, dass die PoxB einen positiven Beitrag zur Wachstumseffizienz liefert. So ergab sich beim Wildtypstamm ein Ertragskoeffizient Y_{XS} von 93 g gebildeter Trockenmasse pro Mol Glukose, während dieser beim *poxB* Deletionsstamm nur 80 g mol^{-1} betrug¹²⁴. Verkompliziert wird die ganze Thematik dadurch, dass sich *E. coli* Stämme im Zentralmetabolismus stark unterscheiden können. So wird der Großteil der Acetatexkretion des K12-Stammes JM109 der PoxB zugerechnet, wohingegen beim B-Stamm BL21 die Expression von PoxB deutlich erniedrigt ist¹²⁵.

Im Unterschied zu der Pyruvat-Formiat-Lyase und dem PDH-Komplex entsteht durch die PoxB Acetat und nicht Acetyl-CoA. Ersteres kann nicht direkt in den Citratzyklus eingehen, sondern muss erst durch Umwandlung in Acetyl-CoA aktiviert werden. Es gibt zwei mögliche

Wege für diese Umwandlung. Die Acetyl-CoA Synthetase Acs kann Acetat direkt in Acetyl-CoA umwandeln. Mechanistisch kommt es erst zu einer Bildung von Acetyl-AMP aus ATP und Acetat. Dabei wird Pyrophosphat gebildet, welches durch die Pyrophosphatase zu zwei Orthophosphaten hydrolysiert wird. Das Coenzym A substituiert dann das AMP, wodurch Acetyl-CoA und AMP entsteht. Dieser Weg dient vor allem als hochaffines Acetataufnahmesystem zur nachfolgenden Assimilierung bei niedrigen extrazellulären Acetatkonzentrationen. Wegen des niedrigen K_M -Wertes von 200 μM für Acetat und der Hydrolyse von Pyrophosphat ist diese Reaktion unter physiologischen Bedingungen irreversibel ¹²⁶.

Der zweite Weg besteht in der Umwandlung von Acetat in Acetyl-Phosphat durch die Acetatkinase AckA. Dabei wird ATP in ADP und Phosphat gespalten. Das Acetat im Acetyl-Phosphat wird durch die Phosphotransacetylase Pta auf CoA unter Phosphatabspaltung übertragen. Dieser AckA-Pta-Weg ist reversibel. Die Affinität von AckA für Acetat ist geringer als die von der Acs. Der K_M für Acetat liegt im Bereich von 7-10 mM. Daher wird der AckA-Pta-Weg für die Assimilierung vor allem beim Wachstum unter hohen Acetatkonzentrationen benutzt. Bei der gemischten Säuregärung hingegen wird durch diesen Weg Acetat und ein ATP gebildet, und auch die Acetatexkretion bei schnellem aeroben Wachstum durch Glukoseüberschuss kommt durch diesen Weg zustande ^{127,128}. Neben AckA besitzt auch die Propionatkinase (TdcD) eine Acetatkinaseaktivität ¹¹⁹.

Bei Sauerstoffmangel kann Acetyl-CoA durch die Alkoholdehydrogenase (AdhE) über die Zwischenstufe Acetaldehyd zu Ethanol reduziert werden. Die AdhE bildet Homopolymere mit 40-60 Untereinheiten aus, die helixartig angeordnet sind und eine stabförmige Struktur ausbilden. Diese Strukturen werden auch als Spirosomen bezeichnet. Als Cofaktoren dienen Fe^{2+} , Coenzym A und NAD^+ . Das trifunktionale Enzym kann als Pyruvat-Formiat-Lyase-Deaktivase, als Alkohol-Dehydrogenase und als Acetaldehyd-Dehydrogenase agieren ¹²⁹. Die Bildung von Ethanol aus Acetyl-CoA ist reversibel. Die Expression von AdhE wird auf transkriptioneller und translationaler Ebene reguliert. Unter anaeroben Bedingungen wird das Gen verstärkt transkribiert, wobei die Zugabe von Nitrat einen reprimierenden Effekt hat. Erst nach Spaltung der mRNA durch die Ribonuklease III kann es zu einer effizienten Initiation

der Translation kommen¹³⁰. Im Aeroben kann *E. coli* auf Ethanol als alleinige C-Quelle normalerweise nicht wachsen, weil die Expression der AdhE zu gering ist und wegen der Empfindlichkeit des Enzyms gegenüber metallkatalysierter Oxidation. Es konnten aber Stämme isoliert werden, die auf Ethanol mit einer Verdopplungszeit von 90 Minuten aerob wachsen können. Die Mutationen konnten im strukturellen Bereich der Alkohol-Dehydrogenasen lokalisiert werden¹³¹. Eine Deletion des *adhE* Gens kann sogar zu Wachstumsproblemen im Aeroben auf Minimalmedium führen. Es wurde daraufhin postuliert, dass die aerobe Funktion der AdhE in der Inaktivierung von niedrigen Konzentrationen an Wasserstoffhydrogenperoxid liegen könnte, bevor Katalasen diese Funktion wahrnehmen können¹³².

Intrazelluläres Pyruvat kann durch die fermentative Laktatdehydrogenase LdhA spezifisch zu D-Laktat reduziert werden. Damit einhergehend wird NADH/H^+ zu NAD^+ reoxidiert. Es kommt somit zur Regeneration der oxidierten Form des Elektronenüberträgers. Die Expression des Enzyms ist unter anaeroben Bedingungen und saurem pH ungefähr um den Faktor 10 verstärkt. Das Substrat Pyruvat ist zugleich allosterischer Aktivator der LdhA. Im Genom von *E. coli* sind noch zwei weitere Laktatdehydrogenasen codiert. Die Dld (spezifisch für D-Laktat) und die LldD (spezifisch für L-Laktat) sind membrangebundene Flavoproteine, die mit der Atmungskette gekoppelt sind. Diese werden für ein aerobes Wachstum auf Laktat benötigt und sind nicht ursächlich für die Laktatexkretion unter anaeroben Bedingungen^{133,134}.

Im oxidativen Citratzyklus wird der Acetatanteil des Acetyl-CoA zu zwei Molekülen CO_2 komplett oxidiert. Nach einem kompletten Durchlauf des Zyklus sind die Konzentrationen der Metabolite, die in dem Zyklus vorkommen, unverändert. Es kommt aber zur Reduktion von Elektronenüberträgern, so dass in einem Durchgang zwei NADH/H^+ , ein NADPH/H^+ und ein Ubichinol UQH_2 aus den jeweiligen oxidierten Formen gebildet werden. Zusätzlich kommt es durch eine Substratkettenphosphorylierung zur Bildung von einem ATP aus je einem Molekül ADP und anorganischem Phosphat. Die Reduktionsäquivalente werden in der Atmungskette auf molekularen Sauerstoff übertragen und dabei werden die oxidierten Zustände der

Elektronenüberträger wieder regeneriert. Die frei werdende Energie in der Atmungskette wird durch ATP-Bildung chemisch konserviert.

Das Acetyl-CoA tritt in den Zyklus ein, indem es durch die Citratsynthase GltA mit einem Oxalacetatmolekül kondensiert wird. Dabei entsteht Citrat und freies Coenzym A¹³⁵. Das Citrat wird dann über die Zwischenstufe *cis*-Aconitat zu Isocitrat isomerisiert. Dieser Schritt wird von einer der zwei Aconitasen AcnA oder AcnB katalysiert¹³⁶. Die Isocitratdehydrogenase Icd decarboxyliert Isocitrat zu α -Ketoglutarat, wobei NADP⁺ zu NADPH/H⁺ reduziert wird¹³⁷. Im Anschluss kommt es zum zweiten Decarboxylierungsschritt des Zyklus durch Bildung von Succinyl-CoA, CO₂ und NADH/H⁺ aus α -Ketoglutarat, CoA und NAD⁺ durch den α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex (KGDHK). Dieser Komplex hat Ähnlichkeiten zu dem vorher beschriebenen PDHK. Der Komplex setzt sich zusammen aus einer variablen Anzahl der drei verschiedenen Untereinheiten SucA, SucB und LpdA. Die genaue Quartärstruktur ist flexibel¹³⁸. Die Succinyl-CoA Synthetase ist ein Tetramer, das von einem SucD-Dimer und einem SucC-Dimer gebildet wird. Das Enzym katalysiert die reversible Umwandlung des Thioesters Succinyl-CoA in Succinat. Die Bildung von Succinat ist gekoppelt mit der Phosphorylierung von ADP zu einem ATP¹³⁹.

Das Succinat kann dann durch den Succinatdehydrogenase-Komplex (SDHK) reversibel zum Fumarat oxidiert werden. Dieser Schritt geht einher mit der Reduktion von Ubichinon (UQ) zu Ubichinol (UQH₂). Der Komplex setzt sich aus vier verschiedenen Untereinheiten zusammen. Die Untereinheiten SdhC und SdhD sind hydrophobe integrale Membranproteine, wohingegen die hydrophilen Untereinheiten SdhA und SdhB sich auf der cytoplasmatischen Seite der Zellmembran befinden. Es gibt noch einen zweiten Komplex, der die reversible Umwandlung von Succinat in Fumarat katalysieren kann. Dabei handelt es sich um den Fumaratreduktase-Komplex (FRDK). Er weist strukturelle Homologien zum SDHK auf. Die zwei Untereinheiten FrdC und FrdD sind entsprechend SdhC und SdhD ebenfalls integrale Membranproteine. Das Flavoprotein FrdA und das Eisen-Schwefel-Protein FrdB bilden die restlichen Komponenten der Fumaratreduktase¹⁴⁰. Im Unterschied zur Succinatdehydrogenase verwendet die Fumaratreduktase Menachinon MQ als Cosubstrat. Obwohl beide Enzymkomplexe prinzipiell reversibel arbeiten können, ist die Fumarat-

reduktase mit einem K_M von $1,7 \times 10^{-5}$ M für Fumarat besser für die Fumaratreduktion geeignet als die Succinatdehydrogenase mit einem K_M von 45×10^{-5} M für Fumarat. Das Gegenteil gilt für die Succinatdehydrogenase (K_M für Succinat = $2,6 \times 10^{-4}$ M), die die Oxidation von Succinat effizienter katalysieren kann als die Fumaratreduktase (K_M für Succinat = $1,0 \times 10^{-3}$ M) ¹⁴¹. Zusätzlich zu den enzymologischen Unterschieden wird die Succinatdehydrogenase vor allem unter aeroben Bedingungen exprimiert und die Fumaratreduktase unter anaeroben Bedingungen. Die Anwesenheit von Fumarat kann die Transkription der Fumaratreduktase um den Faktor 1,5 verstärken. Falls im Anaeroben Nitrat als Elektronenakzeptor vorhanden ist, wird die Transkription der Fumaratreduktase jedoch um den Faktor 23 reprimiert ¹⁴².

Als nächster Schritt im Citratzyklus wird Fumarat durch Hydratation der Doppelbindung zu (S)-Malat umgewandelt. Dieser Schritt wird durch eine der drei Fumarasen FumA, FumB oder FumC katalysiert. FumA und FumB weisen große Homologien zueinander auf und liegen in der Zelle als Dimere vor. Beide enthalten Eisen-Schwefel-Zentren, welche die Enzyme bei hohen Sauerstoffkonzentrationen empfindlich gegenüber oxidativer Inaktivierung machen. Die dritte Fumarase FumC existiert als Tetramer in der Zelle und enthält kein Eisen. Unter Sauerstoffsättigung ist die Expression von FumC am höchsten. Falls mikroaerobe Bedingungen vorliegen, besteht die Fumaraseaktivität in den Zellen hauptsächlich aus FumA und FumB. Die Expression von FumB ist im Anaeroben am größten. Da die Affinität von FumB für Malat größer ist als für Fumarat, wird durch dieses Enzym vor allem der rückläufige Citratzyklus katalysiert ¹⁴³.

Der letzte Schritt im Citratzyklus ist die Regeneration von Oxalacetat, welches im ersten Schritt durch Kondensation mit Acetyl-CoA verbraucht wurde. Das Oxalacetat entsteht durch die Oxidation von Malat. Dieser reversible Schritt wird von der Malat-Dehydrogenase (Mdh) katalysiert, die als Dimer vorliegt. Dabei wird NAD^+ zu NADH/H^+ reduziert. Es gibt noch ein weiteres Enzym in *E. coli*, welches Malat zum Oxalacetat oxidieren kann. Es handelt sich um die membran-gebundene Malat-Chinon-Oxidoreduktase (Mqo). Dieses Enzym scheint allerdings keine große Rolle im Metabolismus zu spielen, da eine Deletion des entsprechenden *mgo* Gens zu keinem erkennbaren Defekt führte ¹⁴⁴.

Unter anaeroben Bedingungen wird die Protein-expression der meisten Enzyme des Citratzyklus stark herunterreguliert, da eine Anreicherung von NADH/H^+ vermieden werden muss. Durch das Fehlen von Sauerstoff kann kein NAD^+ in der Atmungskette regeneriert werden¹⁴⁵. Ein Teil des Citratzyklus kann allerdings auch rückwärts ablaufen und somit oxidierte Elektronenüberträger regenerieren. Dieser auch als reduktiver Ast des Citratzyklus bezeichnete Weg, beginnt beim Oxalacetat und endet mit der Exkretion von Succinat. Das Oxalacetat wird zum Beispiel durch Carboxylierung von Phosphoenolpyruvat aus der Glykolyse durch die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase Ppc gebildet.

Der Glyoxylatzyklus überlappt teilweise mit dem Citratzyklus und stellt eine Abkürzung desselben unter Umgehung der Decarboxylierungsschritte des Citratzyklus dar. Im Verlauf des Glyoxylatzyklus wird aus zwei Molekülen Acetyl-CoA netto ein Molekül des C4-Metaboliten Succinat gebildet. Zusätzlich kommt es noch zu einer Reduktion von NAD^+ zu NADH/H^+ . Während des Wachstums von Zellen werden dem Citratzyklus permanent Moleküle als biosynthetische Vorstufen, beispielsweise für die Produktion von Aminosäuren, entnommen. Diese Entnahmen müssen wieder ausgeglichen werden. Reaktionen, die Intermediate des Citratzyklus bilden, werden als anaplerotische Sequenzen bezeichnet und der Glyoxylatzyklus ist eine mögliche Form davon¹⁴⁶.

Die Schritte, die dieser Zyklus nicht mit dem Citratzyklus gemeinsam hat, werden nun beschrieben: Die Isocitratlyase AceA katalysiert die Spaltung des C6-Moleküls Isocitrat in Glyoxylat (C2) und Succinat (C4). Die Malatsynthase A, abgekürzt als AceB, kondensiert unter Verbrauch von H_2O ein Molekül Glyoxylat mit Acetyl-CoA. Dabei entsteht freies Coenzym A und Malat. Das Malat kann wieder bis zum Isocitrat über den oxidativen Citratzyklus verstoffwechselt werden, womit sich der Kreis schließt. Im Genom sind die Gene im *aceBAK* Operon organisiert. Das terminale Gen *aceK* codiert für eine Proteinkinase, welche die Isocitratdehydrogenase reversibel phosphorylieren kann. Die phosphorylierte Icd ist inaktiv. Dadurch kann der metabolische Fluß am Verzweigungspunkt Isocitrat in Richtung Glyoxylatzyklus gelenkt werden. Im dephosphorylierten Zustand sorgt die hohe Affinität der Icd für Isocitrat dafür, dass der Großteil desselben über den Citratzyklus verstoffwechselt wird. Die Transkription des Operons wird durch den Transkriptionsfaktor IclR (Isocitrate

lyase Regulator) reguliert. IclR dient auch als Repressor für seine eigene Synthese. Pyruvat und Glyoxylat dienen als antagonistische Effektoren für den Repressor. Glyoxylat begünstigt den inaktiven dimeren Zustand von IclR, so dass das *aceBAK* Operon transkribiert werden kann. Im Gegenteil dazu stabilisiert Pyruvat die aktive tetramere Form des Repressors, was zur Repression des Operons führt.

Der Glyoxylatzyklus ist normalerweise aktiv, wenn *E. coli* auf Acetat als alleinige C-Quelle wächst¹⁴⁷. Es gibt größere Unterschiede zwischen verschiedenen Stämmen. Bei Wachstum auf Glukose ist die Transkription der Acetyl-CoA Synthetase im Stamm BL21 (B-Stamm) höher als im Stamm JM109 (K12-Stamm). Außerdem hat der Glyoxylatzyklus im Stamm BL21 eine hohe Basalaktivität, wohingegen er im Stamm JM109 reprimiert ist¹⁴⁸. Durch die Deletion von *iclR* werden die Enzyme des Glyoxylatzyklus auf jeden Fall konstitutiv synthetisiert. Diese Manipulation war Teil einer Strategie zur aeroben und anaeroben Produktion von Succinat aus Glukose^{149,150}.

Nun werden noch vier Enzyme vorgestellt, die den Citratzyklus durch Carboxylierungs- oder Decarboxylierungsreaktionen mit der Glykolyse verbinden:

Die PEP-Carboxylase (Ppc) katalysiert die irreversible Bildung von Oxalacetat durch Carboxylierung von PEP unter Abspaltung des Phosphats. Es wurde ein zweistufiger Reaktionsmechanismus postuliert. Zuerst werden aus PEP und Hydrogencarbonat die Enolatform des Pyruvats und ein Carboxyphosphat gebildet. Dann wird das Enolat unter Freisetzung von Phosphat carboxyliert^{151,152}. Diese Reaktion stellt die wichtigste anaplerotische Sequenz beim Wachstum auf Glukose dar¹⁵³. Weiterhin ist das Gen *ppc* essentiell für das Wachstum auf Minimalmedium mit Glycerin⁸³. Die Ppc liegt als Homotetramer vor und wird auf enzymatischer Ebene komplex reguliert. Als Aktivatoren dienen Acetyl-CoA, Fru-1,6-bP und GTP. Eine Inhibition verursachen Malat und Aspartat. Ohne Acetyl-CoA müssen beispielsweise ~200 mM PEP für das Erreichen der halbmaximalen Geschwindigkeit eingesetzt werden. Bei Zusatz von 2 mM Acetyl-CoA wird die gleiche Umsatzrate schon mit nur 1,4 mM PEP erreicht¹⁵⁴.

Die PEP-Carboxykinase (Pck) katalysiert die reversible Carboxylierung von PEP zum Oxalacetat. Dabei wird im Gegensatz zur Reaktion der Ppc das Phosphat im PEP nicht als Orthophosphat abgespalten, sondern wird auf ein ADP übertragen. Somit kann ein Teil des hohen Gruppenübertragungspotentials von PEP als ATP konserviert werden. Interessant ist, dass das eigentliche Substrat für die Pck CO_2 und nicht HCO_3^- ist¹⁵⁵. Die Pck ist ein monomeres Enzym, dessen Expression induziert wird, wenn die Zellen auf C4-Dicarbonsäuren wachsen. Daher hat die Pck eine glukoneogenetische Funktion und katalysiert unter diesen Bedingungen bevorzugt die Decarboxylierung von Oxalacetat als ersten Schritt in der Glukoneogenese¹⁵⁶.

Es gibt zwei Malic-Enzyme in *E. coli*, die eine oxidative Decarboxylierung von Malat zu Pyruvat und Kohlenstoffdioxid katalysieren können. Das Malic-Enzym MaeA (\equiv SfcA) ist abhängig vom Cofaktor NAD^+ und das Malic-Enzym MaeB benötigt NADP^+ ¹⁵⁷. Die Malic-Enzyme werden beim Wachstum auf Acetat hochreguliert und führen zur Pyruvatproduktion. Das Pyruvat dient dann als Substrat für die Pps während der Glukoneogenese^{158,159}. MaeA assembliert zu Tetrameren und MaeB kann Oktamere ausbilden. Diese Komplexe unterliegen einer allosterischen Regulation durch viele Metabolite. Aspartat kann beispielsweise sowohl MaeA als auch MaeB aktivieren und Oxalacetat hemmt beide Enzyme. Die C-terminale Domäne von MaeB weist eine große Identität zur Phosphotransacetylase auf und ist vermutlich an der allosterischen Regulation beteiligt. Acetyl-Phosphat ist ein Metabolit, welcher die beiden Enzyme gegensätzlich reguliert, indem er MaeA inhibiert und MaeB aktiviert. Dieser Effekt ist allerdings nicht auf die Pta-Domäne zurückzuführen. Beide Enzyme können auch die Gegenrichtung, das heißt die reduktive Carboxylierung von Pyruvat zu Malat, katalysieren. Allerdings sind die Affinitäten beider Enzyme für Pyruvat im Vergleich zu Malat deutlich niedriger und die Reaktionsraten sind um den Faktor 28 (MaeA) beziehungsweise 175 (MaeB) geringer als bei der oxidativen Decarboxylierung¹⁵⁷.

1.2.2 Succinatproduktion durch PEP-Carboxylierung oder über den Glyoxylatzyklus

Viele Stoffwechselwege führen zum Succinat. Bei der hier vorgestellten ersten Strategie zur Succinatproduktion soll die Metabolisierung von Glycerin zu variablen Anteilen über zwei

Wege verlaufen. Dies ist in Abbildung 2 dargestellt. Dabei wird Glycerin erst zu PEP umgewandelt. An diesem Knotenpunkt erfolgt eine Auftrennung.

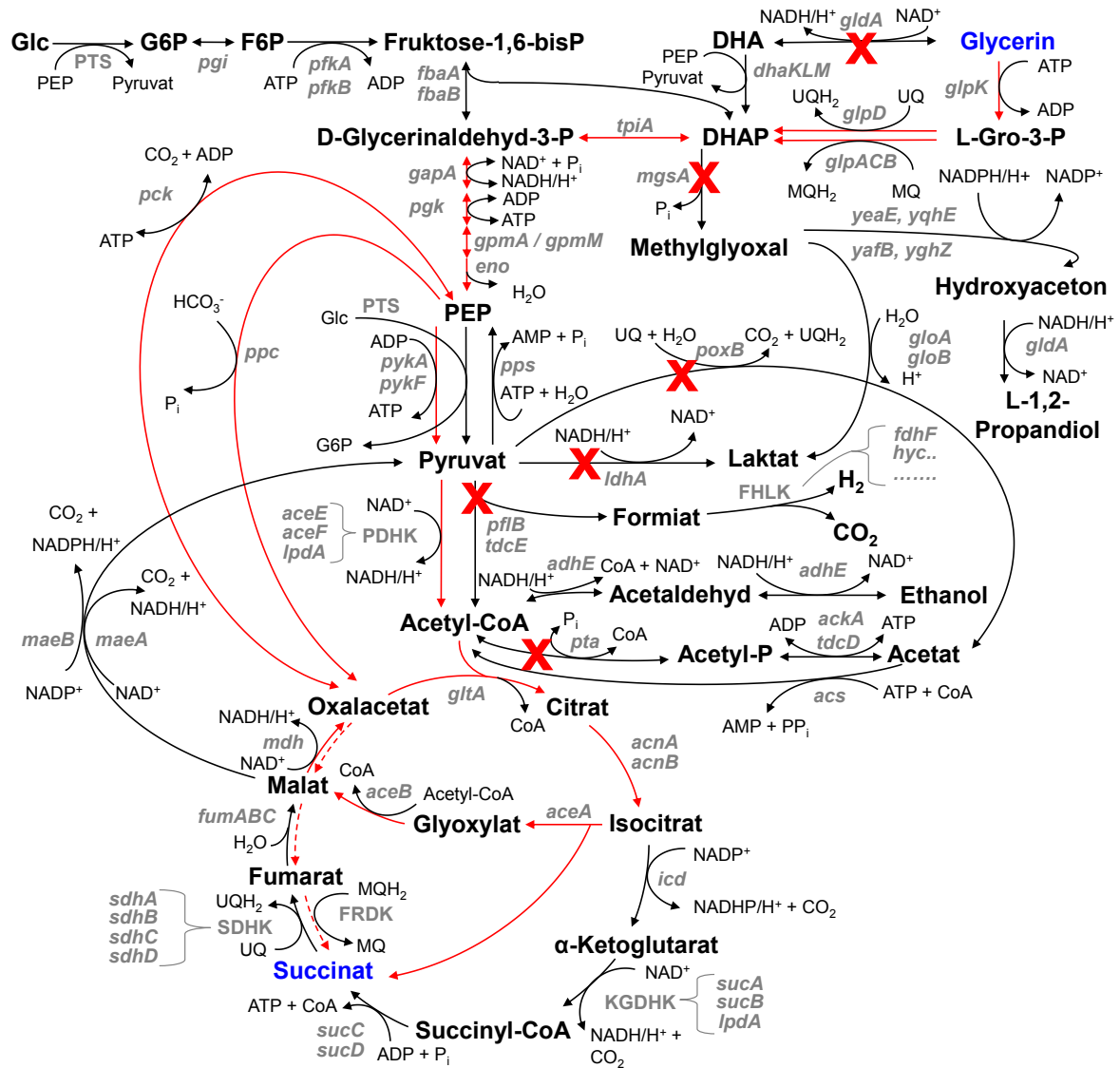


Abbildung 2: Stoffwechselweg zum Succinat über PEP-Carboxylierung und den Glyoxylatzyklus. Gene sind kursiv und in grau dargestellt. Proteinkomplexe sind in grauen Großbuchstaben dargestellt. Abkürzungen sind im Abkürzungsverzeichnis erläutert. Symbol - - - = reduktiver Ast des Citratzyklus. Möglichkeiten für Gendelektionen sind mit roten Kreuzen angezeigt. Die Richtung des erwünschten Stoffflusses ist mit roten Pfeilen markiert.

Ein Teil des PEP-Pools kann durch die Pck oder die Ppc zum Oxalacetat carboxyliert werden (für einen Vergleich von Ppc und Pck siehe Kapitel 1.2.1 und 1.2.4). Aus dem Oxalacetat wird dann über den reduktiven Ast des Citratzyklus Succinat gebildet, falls genügend reduzierte

Elektronenüberträger vorhanden sind. Bei diesem Weg kommt es zu einer Fixierung von CO_2 und der Bildung von einem Molekül Succinat aus einem Molekül Glycerin. Insgesamt kommt es zur Bildung von zwei Reduktionsäquivalenten während der Glykolyse und zum anschließenden Verbrauch derselben im reduktiven TCA. Die Redoxbilanz ist daher ausgeglichen, solange keine Elektronen auf Elektronenakzeptoren wie Sauerstoff, Nitrat, etc. übertragen werden können.

Der andere Teil des PEP-Pools wird zu Pyruvat dephosphoryliert und tritt einen Schritt später in den TCA ein. Im Aeroben würde der oxidative Citratzyklus ablaufen und es würde kein Succinat akkumulieren. Unter mikroaeroben bzw. vollständig anaeroben Bedingungen sind die Decarboxylierungsschritte des TCA, die zum Verlust der C-Atome des Glycerins führen würden, gehemmt. Deswegen kann sich Isocitrat anreichern und über den Glyoxylatzyklus zu Succinat und Malat umgewandelt werden. Über diesen zweiten Weg (Glyoxylatzyklus) würde aus zwei Molekülen Glycerin nur ein Molekül Succinat entstehen. Es kommt zu keiner Fixierung von Kohlenstoffdioxid. Außerdem führt dieser Weg zu einer Anreicherung von Reduktionsäquivalenten. Die genaue Stöchiometrie ist abhängig vom Weg der Acetyl-CoA Entstehung (PDHK oder PflB) und vom Anteil des Isocitrats, der noch ungewollt über den TCA metabolisiert wird. Diese Elektronen müssen dann auf terminale Elektronenakzeptoren übertragen werden. Unter mikroaeroben Bedingungen wäre dies bspw. molekularer Sauerstoff.

In Kapitel 1.2.6 werden die Ausbeuten und die Energetik der einzelnen Wege bilanziert. Auf Grund der höheren Ausbeute beim ersten Weg (PEP-Carboxylierung) gegenüber dem zweiten Weg (Glyoxylatzyklus) ist es wünschenswert, dass ein möglichst hoher Prozentsatz des PEP-Pools carboxyliert wird. Des Weiteren können natürlich auch über zahlreiche Nebenwege unerwünschte Produkte entstehen, die die Ausbeute zusätzlich schmälern. Daher wurde mit einer Deletionsstrategie versucht, die Succinatausbeute zu erhöhen. Es wurden sukzessiv Gene deletiert, die für Nebenwege codieren oder die die Aufteilung des Flusses am Knotenpunkt PEP negativ beeinflussen.

Es wurde noch nicht erwähnt, dass es auf dem Weg zur Bildung von PEP aus Glycerin noch einen weiteren variablen Abschnitt gibt. Die Bildung von DHAP verläuft entweder über den

GlpK-GlpD/GlpACB-Weg oder über den GldA-DhaKLM-Weg. Bei Letzterem würde kein PEP akkumulieren, da PEP als Phosphatdonor für DHA verbraucht werden würde. Eine Deletion von *gldA* könnte daher vorteilhaft für die Succinatproduktion sein, da der Fluß über die PEP-carboxylierende Route relativ verstärkt werden würde.

Andere Beispiele für sinnvolle Gendeletionen sind die Eliminierung von Pyruvat-verbrauchenden Reaktionen durch Deletion von *poxB* und *ldhA*, oder die Einschränkung des Flusses in den Citrat- bzw. Glyoxylatzyklus durch Ausschalten des Gens der im Anaeroben sehr aktiven PflB (siehe 1.2.1). Diese Gendeletionen sollten keinen Einfluss auf das aerobe Wachstum haben, da nur nicht-essentielle Gene in Betracht gezogen wurden. Im Ergebnisteil werden dann Produktionsstämme mit verschiedenen Deletionen miteinander verglichen, die sowohl durch PEP-Carboxylierung als auch über den Glyoxylatzyklus Succinat produzieren können.

1.2.3 Succinatproduktion durch Carboxylierung von Pyruvat

Im vorherigen Kapitel wurde beschrieben, dass die höchsten Succinatausbeuten erreicht werden, wenn kein Verlust der C-Quelle in Form von CO₂ durch Decarboxylierungen auftritt. Das Ziel ist vielmehr eine CO₂-Fixierung durch Carboxylierung von C3-Intermediaten auf dem Weg zum C4-Produkt Succinat. Bei der jetzt vorgestellten Strategie zur Succinatproduktion sollen Decarboxylierungsschritte vollständig vermieden werden, und die C4-Moleküle des reduktiven TCA sollen möglichst zum Großteil durch die Carboxylierung von Pyruvat entstehen.

Im Vergleich zum vorherigen Kapitel werden also die gleichen Wege bis zum PEP genutzt, dann daraus Pyruvat gebildet, welches aber nicht mehr zum Acetyl-CoA decarboxyliert wird, sondern durch Umwandlung in das C4-Molekül Malat in den reduktiven TCA eintritt. Diese Pyruvat-Carboxylierung ist das Hauptmerkmal der neuen Strategie.

Es muss klar sein, dass solange noch Ppc und Pck vorhanden sind, parallel auch noch PEP-Carboxylierungen ablaufen können, was aber keinen negativen Effekt haben sollte. Bezüglich der zu blockierenden Nebenwege gibt es nur zwei Veränderungen im Vergleich zum

vorherigen Kapitel. Erstens ist eine *gldA* Deletion nicht mehr notwendig, da eine Entstehung von Pyruvat durch DhaKLM nicht mehr von Nachteil wäre. Zweitens muss der Verlust von Pyruvat durch den PDH-Komplex während der Succinatproduktion möglichst komplett vermieden werden.

Am einfachsten wäre das komplette Ausschalten des PDH-Komplexes beispielsweise durch Deletion von *aceE*. Dies würde aber ein Problem generieren, da die Stämme dann auxotroph für Acetat wären. Eine unvermeidbar nötige Zufütterung von Acetat in der Wachstumsphase würde zu Kostensteigerungen in einem industriellen Produktionsprozess führen. Ideal wäre es daher einen Stamm zu konstruieren, dessen PDH-Komplex man gezielt regulieren könnte. Viele Möglichkeiten wurden in Betracht gezogen. Unter anderem wurde überlegt einen Temperatur-sensitiven PDH-Komplex zu designen oder dessen Aktivität nach Erreichen einer hohen Zelldichte durch Induktion von Kamel-antikörpern gegen das aktive Zentrum stillzulegen.

Letztendlich wurden Stämme durch die Deletion des Gens *lipA*, codierend für die Lipoatsynthase, auxotroph für Liponsäure gemacht. Der Gedanke dahinter ist, dass die Stämme mit geringsten Mengen von zugesetzter Liponsäure prototroph wie ein Wildtyp wachsen sollten. Nach dem Verbrauch der Liponsäure würde es dann zu einem Wachstumsarrest kommen und die Aktivität des PDH-Komplexes sollte stetig fallen. Im Vergleich zur *aceE* Deletion handelt es sich hier zwar auch um die Erzeugung einer im Prinzip negativen Auxotrophie, aber da nur nanomolare Konzentrationen von Liponsäure nötig wären, würde dies zu keiner relevanten Kostensteigerung führen. Die AceF-Untereinheit des PDH-Komplexes benötigt für den Transfer von Acetyl-CoA den kovalent gebundenen Cofaktor Liponsäure. Normalerweise wird durch die Lipoyl-Protein-Ligase B (LipB) ein Oktansäureamid an der ϵ -NH₂-Gruppe eines Lysins der AceF-Untereinheit ausgebildet. Die Oktansäure stammt vom Acyl-Carrier-Protein. Danach synthetisiert LipA durch Einführung von zwei Schwefelatomen aus dem Oktansäureamid ein Liponsäureamid.

Fehlt nun LipA wegen der Deletion des Gens, dann kann nur noch die Lipoyl-Protein-Ligase A (LplA) aus dem Medium aufgenommene Liponsäure ATP-abhängig an das entsprechende Lysin von AceF anheften^{160,161}. Für das Wachstum einer *lplA* Deletionsmutante

in Minimalmedium wurden nur 5 ng/ml racemische Liponsäure, entsprechend einer Konzentration von 25 nM, zugesetzt¹⁶². Dabei sollten auch noch niedrigere Konzentrationen von nur 0,5 ng/ml Liponsäure (2,5 nM) ausreichen, um gleiches Wachstum wie beim Wildtyp zu erhalten¹⁶³.

Die beschriebenen Modifikationen ($\Delta aceE$ oder $\Delta lipA$) sollten zu einem Anstieg der intrazellulären Pyruvatkonzentration führen. Nun werden auf dem weiteren Weg zum Succinat anaplerotische Enzyme gebraucht, die Pyruvat carboxylieren können. In Frage kommen diverse Malic-Enzyme und Pyruvat-Carboxylasen (Pyc). In *E. coli* gibt es keine Pyruvat-Carboxylasen. Es können aber Plasmid-codierte heterologe Pyruvat-Carboxylasen löslich und aktiv exprimiert werden. Die Biotin-abhängigen Enzyme werden durch Acetyl-CoA allosterisch aktiviert. Sie katalysieren die Bildung von Oxalacetat aus Pyruvat und Hydrogencarbonat unter ATP-Verbrauch^{28,164-166}. Der Verlust eines ATPs ist der Nachteil dieses Weges.

Die Succinatproduktion mit Hilfe von Malic-Enzymen wurde schon in der Literatur beschrieben. Bezüglich der Lage des thermodynamischen Gleichgewichts zwischen Malat/NAD⁺ und Pyruvat/NADH/CO₂ gibt es widersprüchliche Aussagen¹⁶⁷⁻¹⁷⁰. Jedoch ist sicher, dass *in vitro* die enzymatische Malatbildung aus Pyruvat mit Malic-Enzymen möglich, aber kinetisch ungünstig ist. Dies liegt an den niedrigen Affinitäten der meisten Malic-Enzyme für Pyruvat und geringen Umsatzraten selbst bei einer Substratsättigung. Die maximale Malatbildungsrate pro Monomer des Malic-Enzyms SfcA aus *E. coli* liegt beispielsweise bei 2,17 Molekülen pro Sekunde. Der K_M-Wert für Pyruvat beträgt 50 mM¹⁷⁰. Eine andere Arbeitsgruppe hat für das gleiche Enzym eine ähnliche Umsatzrate von 2,93 s⁻¹ ermittelt. Allerdings geben sie einen K_M-Wert für Pyruvat von nur 2,59 mM an¹⁵⁷.

Um Malic-Enzyme mit hohen Affinitäten für Pyruvat und schnellen Umsatzraten für die Carboxylierungsrichtung zu finden, wurde die Literaturrecherche auf andere Organismen ausgedehnt. Das Malic-Enzym des hyper-thermophilen Archaeons *Thermococcus kodakaraensis* zum Beispiel zeigt keine Präferenz für eine der beiden Reaktionsrichtungen¹⁷¹. Es ist aber für die Produktion in *E. coli* nicht geeignet, da es nennenswerte Aktivität erst ab 70 °C zeigt. Alle weiteren Treffer beschränkten sich auf NADP-abhängige Malic-Enzyme

pflanzlicher Herkunft. Einige für die Malatproduktion relevante enzymologische Parameter dieser Enzyme sind in Tabelle 1 angegeben.

Tabelle 1: Kinetische Parameter pflanzlicher Malic-Enzyme.

Nt = *Nicotiana tabacum*, *At* = *Arabidopsis thaliana*, ME = Malic-Enzym

	<i>Nt</i> -NADP-ME1A [#]	<i>At</i> -NADP-ME2 ⁺	<i>At</i> -NADP-ME3 ⁺
k_{cat} (Carboxylierung) (s^{-1})	158	75	237
K_M (Pyruvat) (mM)	0,69	0,54	4,92
$\frac{k_{\text{cat}} \text{ (Decarboxylierung)}}{k_{\text{cat}} \text{ (Carboxylierung)}}$	0,97	4,3	1,1

aus ¹⁷², + aus ¹⁷³

In dieser Arbeit wurde versucht, die Succinatproduktion durch Verwendung von *At*-NADP-ME2 und ME3 zu verbessern.

Betrachtet man den Stoffwechselweg vom Glycerin zum Succinat (siehe Abbildung 3) so fällt auf, dass in der Glykolyse NADH gebildet wird. Die beschriebenen Malic-Enzyme aus *Arabidopsis* verwenden allerdings NADPH als Cofaktor. Eventuell kann dieses Ungleichgewicht durch Transhydrogenasen von *E. coli* ausgeglichen werden ^{174,175}.

Alternativ könnte man die NADH-bildende G3P-Dehydrogenase (GapA) von *E. coli* durch GapB aus *Bacillus subtilis* ersetzen, welches die gleiche Reaktion NADP^+ -abhängig katalysiert ¹⁷⁶. Die Ausbeuten und die Energetik der einzelnen Wege dieser Produktionsstrategie sind in Kapitel 1.2.6 bilanziert.

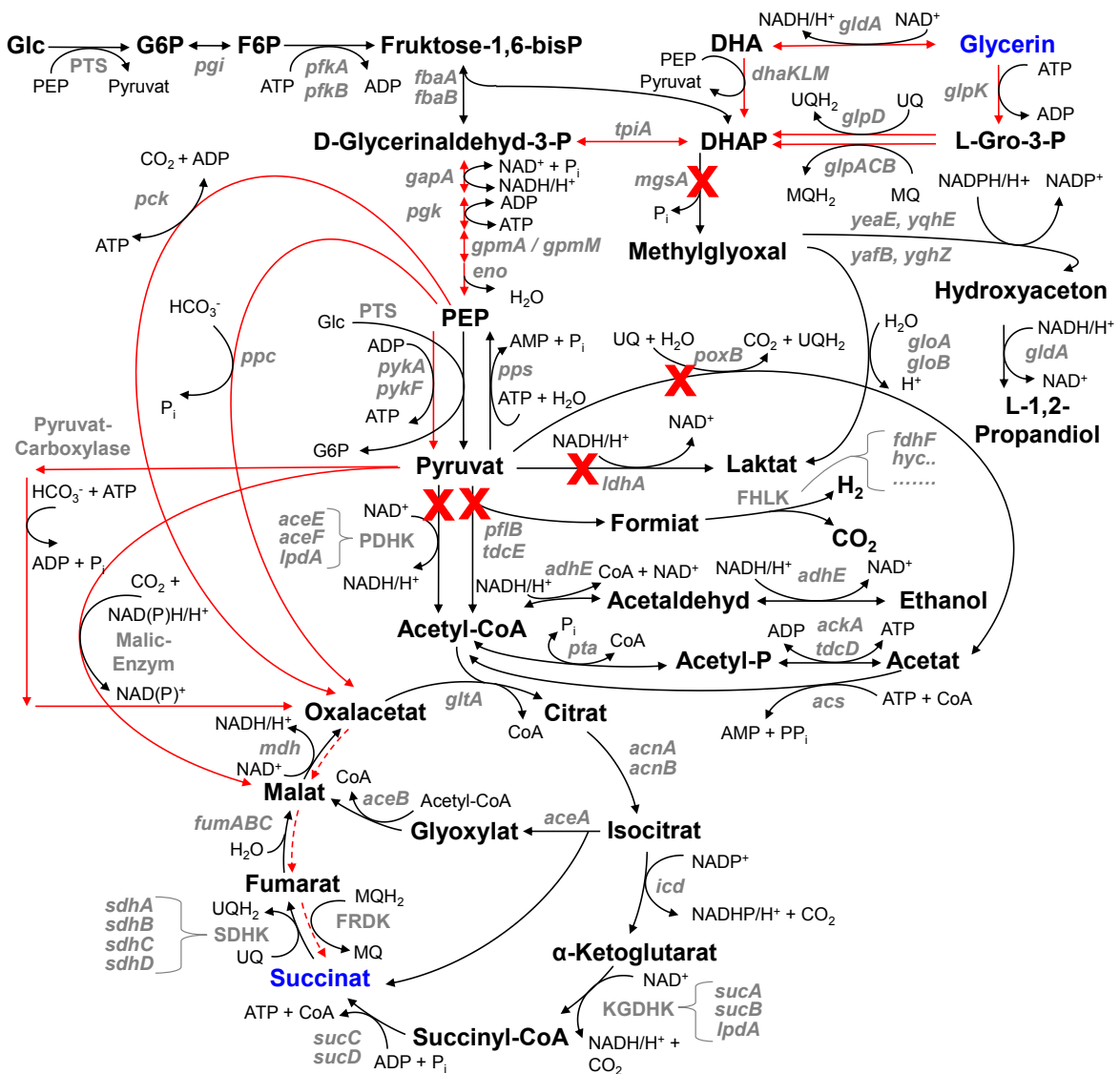


Abbildung 3: Stoffwechselweg zum Succinat über PEP- oder Pyruvat-Carboxylierung.

Gene sind kursiv und in grau dargestellt. Proteinkomplexe sind in grauen Großbuchstaben dargestellt.

Abkürzungen sind im Abkürzungsverzeichnis erläutert. Symbol - - - - = reduktiver Ast des Citratzyklus.

Möglichkeiten für Gendelektionen sind mit roten Kreuzen angezeigt. Die Richtung des erwünschten Stoffflusses ist mit roten Pfeilen markiert.

1.2.4 Succinatproduktion ausschließlich durch Carboxylierung von PEP

In den beiden vorherigen Kapiteln wurden flexible Routen zum Succinat beschrieben, die eine Kombination von Glyoxylatzyklus und PEP-Carboxylierung oder PEP-Carboxylierung und

Pyruvat-Carboxylierung darstellen. Nun wird eine letzte Strategie beschrieben, bei der Succinat ausschließlich und unzweideutig via PEP-Carboxylierung entstehen sollte (siehe Abbildung 4).

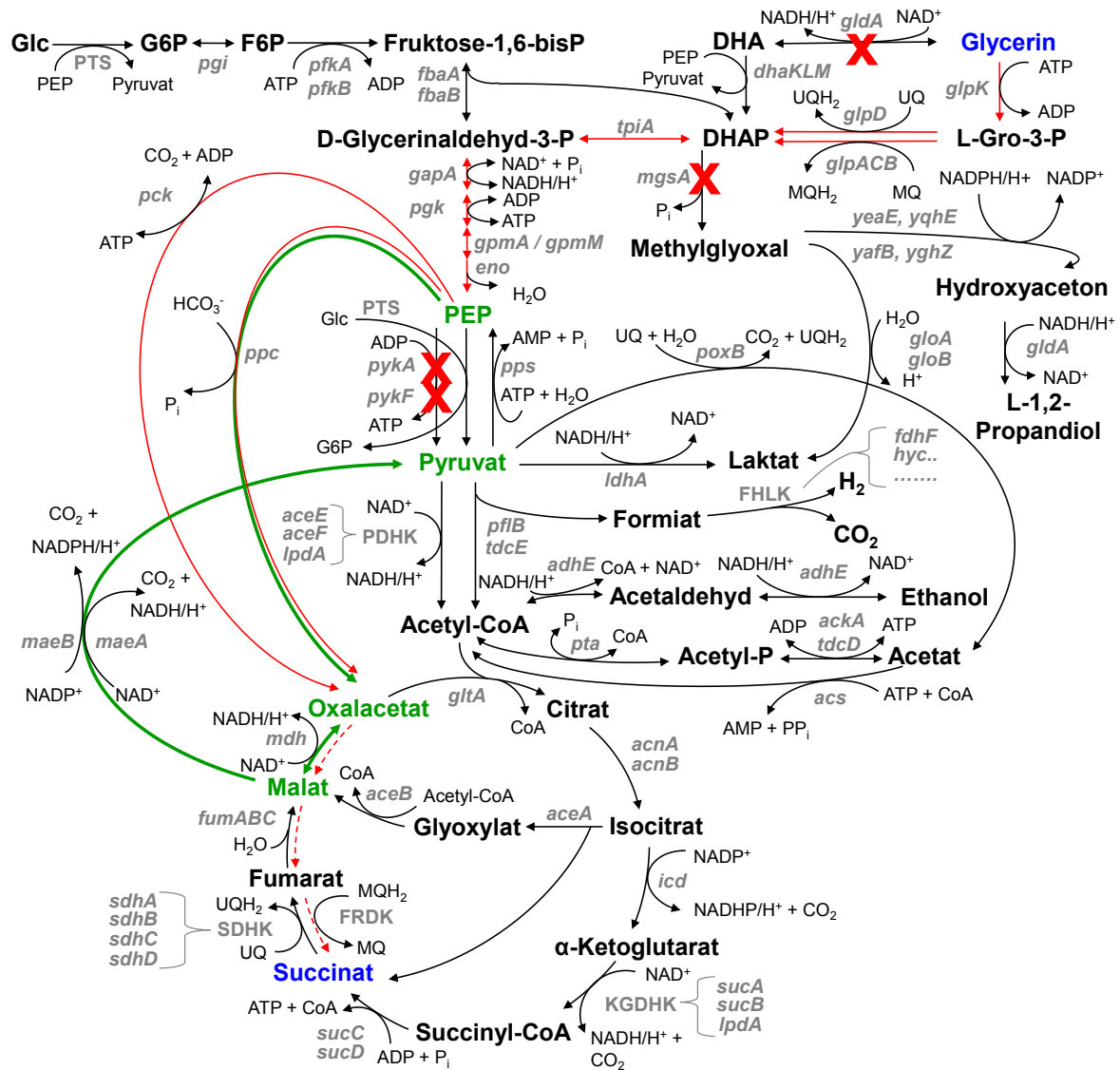


Abbildung 4: POMP-Umleitung und Stoffwechselweg zum Succinat via PEP-Carboxylierung.
 Dargestellt ist die POMP-Umleitung vom PEP zum Pyruvat (grüne Pfeile), die wegen der Deletion von *pykA* und *pykF* auftreten sollte. Aus dem gleichen Grund sollte die Succinatproduktion im Anaeroben ausschließlich über PEP-Carboxylierung erfolgen (rote Pfeile). Gene sind kursiv und in grau dargestellt. Proteinkomplexe sind in grauen Großbuchstaben dargestellt. Abkürzungen sind im Abkürzungsverzeichnis erläutert. Symbol - - - = reduktiver Ast des Citratzyklus. Wichtige Gendeletionen sind mit roten Kreuzen angezeigt.

Durch die Deletion beider Pyruvatkinasegene *pykA* und *pykF* stoppt die Verstoffwechslung von Glycerin beim PEP während der Glykolyse und es kann kein Pyruvat mehr in nur einem Schritt aus PEP gebildet werden. In einer Dissertation über die Verwertung von Rohglycerin mit $\Delta pykA \Delta pykF$ Mutanten und dem Ziel einer Phenylalanin-Produktion wurde dieser Sachverhalt ausführlich diskutiert ¹⁷⁷. Über eine metabolische Umleitung könnte aber dennoch Pyruvat entstehen und Stämme ohne Pyruvatkinasen sollten folglich auf Minimalmedium mit Glycerin wachsen können. Diese Umleitung beginnt mit der Carboxylierung von PEP zum Oxalacetat durch die Ppc oder Pck. Anschließend wird Oxalacetat zu Malat reduziert, welches von einem Malic-Enzym im letzten Schritt zu Pyruvat decarboxyliert wird. Diese Umleitung (siehe auch Abbildung 4) wird in dieser Arbeit als POMP-Umleitung oder POMP-Weg (PEP/Oxalacetat/Malat/Pyruvat) bezeichnet.

Dass dieser Stoffwechselweg prinzipiell möglich ist, wurde in einer metabolischen Flußanalyse eines $\Delta pykA \Delta pykF$ Stammes auf Glukose schon gezeigt ¹⁷⁸. Allerdings wurde nur ein sehr geringer Teil des glykolytischen Flusses über den POMP-Weg umgeleitet, da der Großteil des Pyruvats noch über das PTS entstand. Beim Wachstum auf Glycerin wäre das völlig anders, falls der GldA-DhaKLM-Weg (entspricht Glycerin-PTS) nicht genutzt werden würde. Das benötigte Pyruvat müsste dann komplett über den POMP-Weg entstehen. Übrigens war die Zerstörung des PTS durch eine Spontanmutation von *ptsG* ein Durchbruch in der Succinatproduktion mit *E. coli* auf Glukose. Durch die Mutation wurden nicht mehr automatisch 50 % der Glukose zu Pyruvat verstoffwechselt, folglich standen größere Mengen von PEP zur Succinatbildung durch CO₂-Fixierung zur Verfügung ¹⁷⁹.

Der entscheidende Schritt bei dieser Route der Succinatentstehung ist die Carboxylierung von PEP, bevor dann durch die weiteren Schritte im reduktiven TCA Succinat entsteht. Dieser Schritt kann sowohl von der Ppc als auch von der Pck katalysiert werden. Dass die Pck auch *in vivo* in Richtung Carboxylierung mit anschließender Succinatbildung arbeiten kann, wurde schon 1985 am Beispiel von *Crithidia fasciculata*, einem Isolat aus der Stechmücke *Anopheles*, gezeigt ¹⁸⁰. Auf die Unterschiede zwischen den beiden Enzymen wurde schon kurz eingegangen (siehe 1.2.1). Leider ist ein Kreislauf zwischen Ppc und Pck möglich, bei dem netto ein Verlust von ATP auftritt ¹⁸¹. Diese Möglichkeit muss in Betracht gezogen

werden, wenn in einem Stamm noch beide Enzyme existieren. Im Prinzip wären beide Enzyme für die Succinatproduktion geeignet, was in der vorliegenden Arbeit untersucht werden sollte.

Nimmt man sich die Natur als Vorbild, so scheint die Pck das Enzym der Wahl bei den Succinogenen zu sein. So beträgt der Massenanteil der Pck an den Proteinen im Rohextrakt von *Anaerobiospirillum succiniciproducens* 10 %¹⁸². Im Genom von *Actinobacillus succinogenes* ist eine Pck, aber keine Ppc, codiert⁷². In einer weiteren Arbeit wurden die spezifischen Aktivitäten von 36 Enzymen des Zentralstoffwechsels in Rohextrakten gemessen. Verglichen wurden dabei die Rohextrakte von anaerob gewachsenen Kulturen von *E. coli* mit entsprechenden Kulturen von *A. succinogenes*. Die Aktivität der Pck im Rohextrakt von *A. succinogenes* war 34-fach, die der Fumarasen 19-fach und die der Malat-Dehydrogenase 13-fach höher als in *E. coli*. Umgekehrt waren in *E. coli* die Acetat-, Ethanol-, und Laktat-bildenden Enzyme stärker aktiv, wie man es für eine gemischte Säuregärung erwarten würde¹⁸³.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Succinatbildung der Succinogenen über die Pck und den reduktiven TCA verläuft. Gleichzeitig ergeben sich hiermit Ansatzpunkte für Optimierungsmöglichkeiten in *E. coli*. In einem *E. coli* Stamm, der auf mikroaerobes Wachstum mit Glukose selektiert wurde, ist es dann tatsächlich zu einer Mutation im Promotorbereich von *pck* gekommen. Dies hatte einen ungefähr 8-fachen Anstieg der Pck-Aktivität zur Folge, was wiederum die Succinatproduktion verbesserte⁷⁵. Mit einer Mutante der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, die wegen Deletionen aller anaplerotischen Sequenzen nicht mehr auf Minimalmedium mit Glukose wachsen konnte, wurde gezeigt, dass eine Überexpression diverser Pcks wieder Wachstum ermöglichte. Dies funktionierte aber nur, wenn hohe CO₂-Konzentrationen eingesetzt wurden und zusätzlich die Aktivität der Pyruvatkinase durch eine Mutation verringert war. Diese Mutation führte vermutlich zu einem Anstieg der intrazellulären PEP-Konzentration¹⁸⁴.

Dieses Ergebnis macht auf einen weiteren bedeutenden Unterschied zwischen Ppc und Pck aufmerksam. Es handelt sich um die Affinitäten der Enzyme zum Substrat Hydrogencarbonat beziehungsweise CO₂. Der K_M-Wert der Ppc von *E. coli* für Hydrogencarbonat liegt bei

0,15 mM. Für die Pck von *E. coli* gilt ein um zwei Größenordnungen höherer K_M -Wert von 13 mM¹⁸⁵⁻¹⁸⁷. Dies ist der Grund dafür, dass eine Überexpression von *pck* die Succinatproduktion von Wildtyp-Stämmen auf Glukose erst dann steigerte, wenn 120-240 mM NaHCO₃ zugesetzt wurden¹⁸⁷. Andernfalls hatte die Überexpression von *pck* keinen Effekt, wohingegen eine Überexpression des *ppc* Gens die Succinatproduktion noch leicht verbesserte¹⁸⁶. Bei großen Hydrogencarbonatmengen und erhöhter Konzentration von Pck in der Zelle leistet das Vorhandensein der Ppc keinen Beitrag mehr für die Produktion, wie anhand von Δppc Mutanten gezeigt wurde^{185,187}.

Diese Strategie der Succinatproduktion aus Glycerin mit einem Stamm ohne Pyruvatkinasen wurde in der Literatur noch nicht beschrieben. Insgesamt wird mit dieser Strategie der Produktionsweg der natürlichen Succinatbildner nachgestellt und zusätzliche Vorteile entstehen durch das völlige Fehlen der Pyruvatkinasen. Denn aus deren Produkt Pyruvat können direkt oder in weiteren Reaktionsschritten die meisten unerwünschten Nebenprodukte gebildet werden. Falls die Stämme den Metaboliten PEP im Aeroben ausschließlich über den POMP-Umweg verstoffwechseln, so verläuft der komplette Fluss durch den TCA vor Eintritt in denselben über Malat. Diese C4-Säure ist nur noch zwei Stoffwechselschritte vom Zielprodukt Succinat entfernt. Insofern ist es denkbar, dass eine Umstellung von aerobem Wachstum auf anaerobe Produktion für diese Stämme weniger kritisch als für Wildtypstämme ist. Für eine Bilanz der Ausbeuten und Energetik der einzelnen Wege dieser Strategie siehe Kapitel 1.2.6.

1.2.5 Export von Succinat aus der Zelle

Nachdem verschiedene Stoffwechselwege, die zum Succinat führen, aufgezeigt wurden, stellt sich die Frage, über welchen Weg Succinat die Zelle verlässt. Keine der mir bekannten Publikationen, die sich explizit mit der Succinatproduktion durch *E. coli* befassen, thematisierte den Transport von Succinat und eventuelle energetische Konsequenzen davon. Dies ist erstaunlich, da umfangreiches Datenmaterial bezüglich des Dicarboxylattransports in *E. coli* existiert¹⁸⁸⁻¹⁹⁵. Vertreter der Dcu-Transporter (Dicarboxylate uptake) können Import und Export von Succinat katalysieren. Die Fumarat:Succinat Antiporter DcuA und DcuB haben vor allem die Funktion, einen elektroneutralen Austausch von intrazellulär gebildetem

Succinat mit extrazellulärem Fumarat zu katalysieren. Diese Funktion ist essentiell für die anaerobe Fumaratatmung¹⁸⁹. Die Hauptaufgabe von DcuC scheint dagegen in der Katalyse des Succinatexports zu liegen^{192,193}. Fünffach-Deletionsmutanten ($\Delta dctA$, $\Delta dcuA$, $\Delta dcuB$, $\Delta dcuC$, $\Delta dcuD$ oder $\Delta citT$), die keine der bekannten Succinattransporter mehr exprimieren können, zeigten erwartungsgemäß Wachstumsdefekte auf Minimalmedium mit Succinat, da der Succinatimport nicht mehr möglich war. Jedoch war die Succinatexkretion unter anaeroben Bedingungen auf Glukose identisch zum Wildtyp, was die Existenz anderer Exportsysteme bewies. Ein Beitrag von unkatalysierter Diffusion von Succinat in Form des Monoanions durch die Membran wurde dabei ausgeschlossen¹⁹¹. Es ist gut möglich, dass mehrere Proteine unabhängig voneinander den Succinatexport katalysieren können, und somit jedes einzelne Gen für sich betrachtet nicht absolut notwendig für einen Produktionsstamm ist. Hinweise auf potentielle weitere Succinatexporter in *E. coli* lieferten Experimente mit einem anderen Organismus.

In *Corynebacterium glutamicum* wurden durch einen rein bioinformatischen Ansatz 20 Gene ermittelt, die für einen Succinatexporter codieren könnten. Von 12 dieser Gene konnten dann Deletionsmutanten konstruiert und charakterisiert werden. Dabei wurde SucE (*cg2425*) als Succinat-Exporter identifiziert und charakterisiert. Eine Deletionsmutante zeigte eine deutlich verringerte Exkretionsrate von Succinat und eine erhöhte intrazelluläre Succinatkonzentration. Die Suche nach homologen Proteinsequenzen in *E. coli* lieferte zwei potentielle Kandidaten für Succinatexporter. Es handelt sich um die Gene *yidE* und *ybjL*¹⁹⁶.

Ebenfalls in *C. glutamicum* wurde ein weiterer Succinatexporter mit der Bezeichnung SucE1 (*NCgl2130*) gefunden. Er konnte identifiziert werden, indem man die im Aeroben und Anaeroben gebildeten mRNA-Populationen eines $\Delta ldhA$ Stammes mit denen eines Wildtyps vergleichend analysierte. Ein $\Delta ldhA$ Stamm produziert unter anaeroben Bedingungen hauptsächlich Succinat und kein Laktat, im Gegensatz zum Wildtyp, der hauptsächlich Laktat produziert. Ein $\Delta sucE1$ Stamm produzierte deutlich weniger Succinat als der Vergleichsstamm¹⁹⁷. Die Proteinsequenzen von SucE und SucE1 sind völlig identisch, was aber in der später erschienenen Publikation (SucE1) nicht erwähnt wird¹⁹⁷.

Solange der wichtigste Succinatexporter in *E. coli* und dessen Transportmechanismus nicht bekannt ist, kann keine definitive Aussage über die Energetik des Exports getroffen werden (evtl. ATP-Verbrauch, evtl. Einfluss auf das Membranpotential durch Symport von Protonen). Für die Betrachtung des Gesamtsystems zur Produktion von Succinat aus Glycerin wird daher vereinfacht angenommen, dass der Export ATP-neutral über erleichterte Diffusion durch eine Permease erfolgt.

1.2.6 Übersicht über Energetik, Ausbeuten und Redoxbilanzen der einzelnen Routen

In diesem Kapitel wird eine tabellarische Übersicht über die Energetik, die Ausbeuten und die Redoxbilanzen der in den vorherigen Kapiteln (siehe 1.2.2 bis 1.2.4) vorgestellten Routen zum Succinat präsentiert. Für die Berechnungen wurde davon ausgegangen, dass die Aufnahme von Glycerin in die Zelle durch erleichterte Diffusion erfolgt und der Export von Succinat aus der Zelle (siehe 1.2.5) ATP-neutral ist. Die Anzahl von ATP-Molekülen, die über Substratkettenphosphorylierung entstehen, wird aus den jeweiligen Abbildungen der Stoffwechselwege ersichtlich.

Insgesamt wurden in den Kapiteln 1.2.2 bis 1.2.4 drei Strategien zur Succinatproduktion aus Glycerin präsentiert. Bei diesen Strategien sollen durch jeweils unterschiedliche Gendelektionen bzw. durch Überexpression von Genen metabolische Flüsse über bestimmte Wege verstärkt oder verhindert werden. Dabei umfasst jede Strategie immer noch mehrere Routen, die vom Glycerin zum Succinat möglich sind. Der tatsächliche Fluss zum Succinat erfolgt vermutlich jeweils über eine Kombination dieser Routen. Die ATP-Ausbeute, die erreicht werden kann, ist von den jeweiligen Anteilen der eingeschlagenen Routen abhängig. Folgende fünf Elementarwege können unterschieden werden:

1. Glyoxylatzyklus via PDH-Komplex (da *pflB* deletiert ist):

Glycerin wird entweder über GldA und DhaKLM (= Gld-Weg) oder über GlpK und einer G3P-Dehydrogenase (GlpD oder GlpACB) (= Glp-Weg) in die Glykolyse eingeschleust und zu Pyruvat umgewandelt. Pyruvat wird über Acetyl-CoA in den Glyoxylatzyklus eingeschleust.

2. Pyruvat-Carboxylierung via Malic-Enzym:
Verstoffwechslung über den Gld-Weg oder den Glp-Weg wie bei 1. bis zum Pyruvat, danach Carboxylierung des Pyruvats zum Malat. Zum Schluss reduktiver TCA bis zum Succinat.
3. Pyruvat-Carboxylierung via Pyruvat-Carboxylase:
wie bei 2., nur dass das Malic-Enzym durch die Pyc ersetzt ist.
4. PEP-Carboxylierung via Phosphoenolpyruvat-Carboxylase:
Der Gld-Weg entfällt hier und es erfolgt eine Verstoffwechslung von Glycerin zu PEP ausschließlich über den Glp-Weg. Danach wird PEP durch die Ppc carboxyliert und über den reduktiven Ast des TCA wird Succinat gebildet.
5. PEP-Carboxylierung via Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase:
Hier entfällt ebenfalls der Gld-Weg und PEP wird wie bei 4. nur über den Glp-Weg gebildet. Im Unterschied zu 4. erfolgt die Carboxylierung von PEP durch die Pck.

Bei der zuerst vorgestellten Strategie (siehe 1.2.2, Succinatproduktion durch PEP-Carboxylierung oder über den Glyoxylatzyklus) können die Elementarwege 1, 2 und 5 beschritten werden. Bei der zweiten Strategie (siehe 1.2.3, Succinatproduktion durch Carboxylierung von Pyruvat) sollen nur die Reaktionen der Elementarwege 2 und 3 ablaufen. Durch die Stämme für die dritte Strategie (siehe 1.2.4, Succinatproduktion ausschließlich durch Carboxylierung von PEP) soll Succinat nur über die Elementarwege 4 und 5 gebildet werden. Die Ausbeuten an ATP, die auf diesen Elementarwegen durch Substratkettenphosphorylierungen erreicht werden können, sind in Tabelle 2 angegeben.

Neben der Bildung von ATP durch Substratkettenphosphorylierungen besteht noch die Möglichkeit, über verschiedene Mechanismen in der Elektronentransportkette einen Protonengradienten über die Zellmembran aufzubauen. Beim Abbau dieses Protonengradienten durch Rückstrom der Protonen in die Zelle über die ATP-Synthase kommt es dann ebenfalls zur Synthese von ATP. Das H^+/ATP Verhältnis der ATP-Synthase gibt dabei die Anzahl der Protonen an, die für die Synthese eines ATPs benötigt werden. Für *E. coli* werden Werte zwischen 2 und 4 H^+/ATP angegeben¹⁹⁸⁻²⁰⁰. Für die Berechnung der ATP-Ausbeuten in diesem Kapitel wurde mit einem Konsensuswert von 3 H^+/ATP gerechnet. Bei anaerobem

Wachstum von *E. coli* auf Glycerin gibt es zwei Möglichkeiten, über die Elektronentransportkette ATP zu bilden, die im Folgenden erläutert werden:

Wenn *E. coli* anaerob auf Glycerin und Fumarat wächst, so wird die Bildung der Komplexe GlpACB und FrdABCD induziert. Miki und Lin haben 1973 zuerst gezeigt, dass die beiden Enzymkomplexe zusammen sedimentiert werden können und einen noch größeren funktionalen Komplex ausbilden können. Ohne weitere Zugabe von Cofaktoren konnte dieser Komplex die Oxidation von G3P zu DHAP mit der Reduktion von Fumarat zu Succinat koppeln. Die gekoppelte Aktivität der Fumarat-Reduktase mit der anaeroben G3P-Dehydrogenase wurde durch niedrige Konzentrationen von Detergentien zerstört, die die nicht gekoppelte Aktivität der beiden Enzyme nicht beeinträchtigten²⁰¹.

Später wurde dann mit Membranvesikeln gezeigt, dass durch diese gekoppelte Reaktion ein Laktosederivat durch LacY in die Vesikel transportiert werden kann. Der Transporter LacY nimmt normalerweise Laktose in die Zelle auf. Diese Reaktion wird von einem Symport von Protonen angetrieben, wofür ein Protonengradient notwendig ist. Die Orientierung der Enzyme in den Membranvesikeln entsprach dabei dem *in vivo* Zustand. Es wurde die Bildung von 1 μmol ATP pro 10 μmol oxidiertem G3P gemessen. Diese ATP-Bildung wurde damit erklärt, dass evertierte Membranvesikel, bei denen sich die Bindestellen für G3P und Fumarat außerhalb befanden, während der gekoppelten G3P-Fumarat-Redoxreaktion Protonen nach innen transloziert haben.

Beim Ausstrom der Protonen bildete die ATP-Synthase dann ATP. Die niedrige ATP-Ausbeute wurde unter anderem damit erklärt, dass Vesikel teilweise die falsche Orientierung aufwiesen. In der gleichen Publikation wurde gezeigt, dass *uncA* Stämme, die keine funktionale ATP-Synthase mehr ausbilden können, kaum noch anaerob in Minimalmedium mit Glycerin und Fumarat wachsen konnten²⁰². Es ist daher zu vermuten, dass unter diesen Wachstumsbedingungen ein Membranpotential aufgebaut wird, welches durch die ATP-Synthase nutzbar gemacht werden kann.

Für die Energieausbeute über diesen Weg kann man nur einen Bereich angeben. Die gemessene Ausbeute von 0,1 mol ATP/mol G3P ist die Untergrenze. Theoretisch könnten bei

jeder Oxidation von G3P durch GlpACB zwei Protonen in den extrazellulären Raum transloziert werden. Dies entspricht 0,67 mol ATP und stellt die Obergrenze dar. Die Fumaratreduktase nimmt zwar zwei Protonen aus dem Cytoplasma auf, pumpt diese aber nicht nach außen²⁰³.

An dieser Stelle muss darauf hingewiesen werden, dass sich die in diesem Absatz beschriebenen ATP-erzeugenden Reaktionen auf Stämme beziehen, die auf Glycerin wegen Zugabe von Fumarat anaerob gewachsen sind. In dieser Arbeit wurde den Zellen aber kein Fumarat zugesetzt. Dennoch ist es wahrscheinlich, dass die beschriebene Bildung von ATP auch mit geringen Konzentrationen von intrazellulär gebildetem Fumarat möglich ist, welches schlussendlich zum Succinat reduziert wird. Genau genommen handelt es sich bei der Succinatproduktion aus Glycerin um eine Succinatgärung, da der terminale Elektronenakzeptor Fumarat endogen gebildet wird. Interessant ist, dass dabei die Enzyme der Fumarat-atmung verwendet werden.

Verläuft die anaerobe Verstoffwechslung von Glycerin über den GldA-DhaKLM-Weg, so entsteht bei der Oxidation von Glycerin zum DHA ein NADH. Die NADH-Dehydrogenase I (NDH-I) besteht aus 14 Untereinheiten und wird vom *nuo* Operon codiert. Das Enzym kann die Elektronen von NADH auf Ubichinon oder Menachinon übertragen. Pro NADH werden dabei vier Protonen, entsprechend einem H^+/e^- Verhältnis von 2 transloziert. Die alternative NADH-Dehydrogenase II (NDH-II) wird vom Gen *ndh* codiert, kann aber keinen elektrochemischen Gradienten aufbauen. Es wurde beschrieben, dass bei der Fumarat-atmung hauptsächlich NDH-I gebildet wird²⁰⁴. Insgesamt werden über diesen Weg die Elektronen vom NADH über MQH₂ auf den terminalen Akzeptor Fumarat übertragen. Entsprechend der verwendeten NADH-Dehydrogenase werden dabei keine oder vier Protonen transloziert. Dies entspricht einer ATP-Ausbeute von 0 bis 1,3 Molekülen ATP pro Glycerinmolekül.

Bei der mikroaeroben Verstoffwechslung von Glycerin über die aerobe GlpD, den PDH-Komplex und den Glyoxylatzyklus, kann molekularer Sauerstoff noch als terminaler Elektronenakzeptor dienen. Auf diesem Weg werden molare Ausbeuten von 0,5 mol Succinat und 1 mol CO₂ pro mol Glycerin erreicht. Durch Substratkettenphosphorylierung wird 1 ATP gebildet. In der Atmungskette können die gebildeten Reduktionsäquivalente (1 UQH₂, 2,5

NADH) auf Sauerstoff übertragen werden. Die 2,5 NADH werden unter Bildung von 2,5 UQH₂ durch NDH-I oder NDH-II reoxidiert. Dabei werden entweder keine (NDH-II) oder 10 (2,5 NADH x 4 H⁺) Protonen (NDH-I) transloziert. Insgesamt liegen jetzt also 3,5 UQH₂ vor und es wurden 0 bis 10 Protonen nach außen transloziert. Die reduzierten Chinone können ihre Elektronen im letzten Schritt der Atmungskette auf Sauerstoff übertragen. Dies wird von einer der beiden terminalen Reduktasen katalysiert. Die Chinol-Oxidase *bo₃* (*cyoABCDE*) kann pro Ubichinol vier Protonen translozieren, und die Chinol-Oxidase *bd* (*cydAB*) transloziert nur zwei Protonen pro Ubichinol. Das bedeutet, dass 7 bis 14 Protonen nach außen gepumpt werden (3,5 UQH₂ x aH⁺/UQH₂, wobei a = 2 bis 4)²⁰⁵. Insgesamt wird also mit 7 bis 24 Protonen (0 bis 10 durch NDH-I/II plus 7 bis 14 durch Chinol-Oxidasen) pro Glycerinmolekül eine protonenmotorische Kraft aufgebaut. Dies entspricht 2,3-8 Molekülen ATP, die über die ATP-Synthase gebildet werden können.

In Tabelle 2 sind die Ergebnisse der Berechnungen von Stoff- und Energieausbeuten zusammengefasst.

Eine zumindest geringe Nettobildung von ATP auf dem Weg vom Glycerin zum Succinat ist wahrscheinlich Voraussetzung für eine gute Produktion. Neben den beschriebenen Bildungsmechanismen für ATP gibt es noch wahrscheinliche Verlustreaktionen, die bei dieser theoretischen Betrachtung nicht genau quantifiziert werden können. Zum Verlust von ATP könnte es durch Stoffwechselkreisläufe zwischen Pck und Ppc oder zwischen einer Pyruvatkinase und Pps kommen. Weiteres ATP wird durch den Erhaltungsstoffwechsel verbraucht. Der Protonengradient wiederum könnte durch die Rotation eventuell ausgebildeter Flagellen verringert werden.

Eine molare Succinatausbeute von 75 % (bezogen auf verbrauchtes Glycerin) stellt eine bedeutende Schwelle dar. Hier halten sich Einbau von CO₂ und Decarboxylierungen genau die Waage. Aus 100 C₃-Molekülen werden insgesamt 75 C₄-Moleküle, wobei die Gesamtzahl der C-Atome im gebildeten Produkt (= 300) der Zahl der verbrauchten C-Atome des Substrats entspricht. Netto wird also weder CO₂ fixiert noch gebildet. Erst bei Succinatausbeuten, die größer als 75 % sind, verbraucht der Prozess CO₂. Entstehen außer Succinat noch

Nebenprodukte wie Ethanol oder Acetat, ist auch schon bei Succinatausbeuten von 75 % eine Nettofixierung von CO₂ gegeben.

Tabelle 2: Stoff- und Energiebilanzen bei der Succinatproduktion über verschiedene Wege.

Route der Succinatbildung	Ausbeute (mol Succinat / mol Glycerin)	CO ₂ -Fixierung (mol CO ₂ / mol Glycerin)	Redoxbilanz	Energiegewinn (mol ATP / mol Glycerin)	
				SK ^a	Elektronentransportkette
Glyoxylatzyklus ^b via PDH-Komplex	0,5	-1	+3,5 [H] ^c , Ausgleich durch Übertrag auf O ₂ im Mikroaeroben	1	2,3-8
Pyruvat-Carboxylierung via Malic-Enzym	1	+1	anaerob geschlossen	1	0-1,3 (Gld ^d) oder 0,1-0,67 (Glp ^e)
Pyruvat-Carboxylierung via Pyc	1	+1	anaerob geschlossen	0	0-1,3 (Gld) oder 0,1-0,67 (Glp)
PEP-Carboxylierung via Ppc	1	+1	anaerob geschlossen	0	0,1-0,67 (Glp)
PEP-Carboxylierung via Pck	1	+1	anaerob geschlossen	1	0,1-0,67 (Glp)

^a SK = Substratkettenphosphorylierung

^b bei Sauerstoffsättigung ist für eine Succinatproduktion über diesen Weg eine Deletion von *sdhABCD* notwendig ^{30,149}

^c [H] = NADH oder UQH₂

^d Gld = Route über die Glycerindehydrogenase GldA

^e Glp = Route über den GlpACB-FrdABCD-Komplex

1.3 Ausblick auf das Endziel

Das Ziel dieser Arbeit war, die in den vorherigen Kapiteln identifizierten Stoffwechselwege zum Succinat durch gezielte Manipulationen im Genom zu implementieren. Für eine Homosuccinatgärung geeignete Produktionsstämme sollten konstruiert und optimiert werden. Mit diesen Stämmen sollte dann in einem parallelen Projekt ein Produktionsprozess etabliert werden. Dieser Prozess könnte wie folgt ablaufen:

- **Aerobe Wachstumsphase:** Als C-Quelle dienen Rohglycerin aus der Biodieselproduktion oder auch glukosehaltige Alternativmedien. Es kommt zu einer schnellen und effizienten Erzeugung von Biomasse in einem kostengünstigen Medium. Dabei reichern sich keine unerwünschten Stoffwechselprodukte wie Acetat im Medium an.
- **Übergangsphase:** Es wird auf mikroaerobe bzw. anaerobe Bedingungen umgeschaltet. Dabei werden Schlüsselenzyme, insbesondere der Fumarat-Reduktase-Komplex und der anaerobe Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase-Komplex GlpACB, gebildet. Zusätzlich wird die Synthese von PEP- oder Pyruvat-carboxylierenden Enzymen induziert.
- **Produktionsphase:** Unter mikroaeroben bzw. vollständig anaeroben Bedingungen soll Succinat als einziges Produkt aus Rohglycerin und CO₂ entstehen. Bei dieser Homosuccinatgärung werden hohe Ausbeuten bei hohen volumetrischen Produktivitäten erzielt. Die Redoxbilanz ist ausgeglichen und es kommt zu einer Nettofixierung des Treibhausgases CO₂. Im Anaeroben findet keine Biomassebildung mehr statt. Die Produktion erfolgt daher entkoppelt vom Wachstum.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Enzyme

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Enzyme und deren Hersteller.

Enzym	Hersteller
Restriktionsendonukleasen (5-20 U/μl)	Roche, New England Biolabs (NEB)
T4-DNA-Ligase (1 U/μl)	Roche
Klenow-Polymerase (2 U/μl)	Roche
Alkalische Phosphatase (20 U/μl)	Roche
<i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 U/μl)	biomaster GmbH, Windeck, Deutschland
PHUSION™ Hot Start DNA-Polymerase (2 U/μl)	Finnzymes

2.1.2 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Lösungen wurden, soweit in der nachfolgenden Tabelle nicht anders vermerkt, von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim), Carl Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) und Serva (Heidelberg) im jeweils höchsten Reinheitsgrad bezogen.

Tabelle 4: Für diese Arbeit wichtige Chemikalien.

Bezeichnung	Hersteller
(±)-α-Liponsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
¹³ C-NaHCO ₃ (98 atom % ¹³ C)	Isotec™, Miamisburg, Ohio, USA
Nourseothricin	Jena Bioscience GmbH, Jena
LE Agarose	Biozym® Scientific GmbH, Oldendorf
BD-Euro-Agar	Difco Laboratories, Le Pont de Claix, Frankreich
Bacto™ Hefeextrakt	Difco Laboratories, Le Pont de Claix, Frankreich
Bacto™ Trypton	Difco Laboratories, Le Pont de Claix, Frankreich

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Hersteller
Sterilfilter Filtropur S Porengröße 0,2 µm	Sarstedt AG, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Sarstedt AG, Nümbrecht
PS-Küvetten Halbmikro Art.-Nr. 2712120	Ratiolab® GmbH, Dreieich
0,2 ml PCR-Gefäße „Soft Tubes“ Art.-Nr. 711088	Biozym Scientific, Oldendorf
1,5 ml Reaktionsgefäße 3810X aus Plastik	Eppendorf AG, Hamburg
2,0 ml Probenröhrchen Art. 710067	Biozym Scientific, Oldendorf
15 ml Plastikgefäße Cellstar® Polypropylen Tubes	Greiner Bio-One GmbH
50 ml Plastikgefäße aus Polypropylen	nerbe plus GmbH

2.1.4 Verwendete Kits

Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Kits und deren Hersteller.

Kit-Bezeichnung	Hersteller	Zweck
Qia prep® Spin Miniprep Kit	Qiagen	Plasmidisolierung (bis 20 µg)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen	PCR-Fragment-Reinigung
Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research	PCR-Fragment-Reinigung, Fragmentisolierung aus Agarosegel

2.1.5 Geräte

Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete Geräte und deren Hersteller.

Gerät	Hersteller
Kühlzentrifuge SORVALL RC-5B Plus	DuPont Instruments
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus Instruments
Thermomixer 5350 (01735)	Eppendorf AG, Hamburg
Gio Gyrotory® Shaker	New Brunswick Scientific
Rollator TC-7 Rollordrum™	New Brunswick Scientific

Gerät	Hersteller
Wasserbadschüttler Gyrotory® Water Bath Shaker Model G76,	New Brunswick Scientific
Rotator, Modell 2-1175 (34528)	neoLab, Heidelberg
PCR-Maschine Modell: T Personal 48	biometra GmbH, Göttingen
Photometer Genesys 10 Vis	Thermo Scientific
pH-Meter Calimatic 761	Knick GmbH, Berlin
GenePulser® I inklusive Pulse Controller	BioRad, München

2.1.6 Medien

Tabelle 8: Zusammensetzung der verwendeten Medien.

Medium	Bestandteile	Konzentration
LB-Medium (pH 7,2)	Trypton	10,0 g
	Hefeextrakt	5,0 g
	NaCl	5,0 g
	VE-H ₂ O	ad 1,0 l
M9-Minimalmedium	H ₂ O	450,0 ml
	M9-Salze (10x)	50,0 ml
	CaCl ₂ (0,1 M)	0,5 ml
	MgSO ₄ (1 M)	0,5 ml
	Thiamin (10 mg/ml)	200 µl
M9hP-Minimalmedium (1,15x)	M9hP-Salze (1,15x)	500 ml
	CaCl ₂ (0,1 M)	0,5 ml
	MgSO ₄ (1 M)	0,5 ml
	Thiamin (10 mg/ml)	200 µl
TSS (Transformationslösung)	LB-Medium (pH 6,5)	82,5 ml
	PEG 6000	10,0 g
	DMSO	5,0 ml
	MgCl ₂ (2 M)	2,5 ml
TY-Medium (pH 7,2)	Trypton	5,0 g
	Hefeextrakt	2,5 g
	VE-H ₂ O	ad 0,5 l
Glycerinkulturmedium	86 % (w/v) Glycerin	57,5 ml
	TY-Medium	42,5 ml
(erst nach dem Autoklavieren mischen)		

Die pH-Werte wurden mit 2 M NaOH- bzw. 1 M HCl-Lösung eingestellt. Für LB- (*engl.* Lysogeny Broth²⁰⁶) oder M9-Agar-Nährböden wurde zusätzlich Euro-Agar (15 g l⁻¹) zugegeben. Die Medien wurden ca. 30 min bei 121 °C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Wenn nicht anders angegeben, wurden die für diese Arbeit hergestellten Medien, Puffer und Lösungen mit Reinstwasser aus einer Ionenaustauscheranlage angesetzt (MODULAB™ Research Grade UF / Polishing System Modell-Nr. LBPUU-20-1002 von Continental® Water Systems Corporation, San Antonio, Texas, USA). Für einige Einsatzgebiete wie beispielsweise die Herstellung von Komplexmedien wurde vollentsalztes Wasser (VE-H₂O) aus dem Leitungsnetz der Universität Stuttgart verwendet.

2.1.7 Antibiotika und andere Zusätze

Die verwendeten Antibiotika, die C-Quellen und andere Zusätze wurden sterilfiltriert.

Tabelle 9: Antibiotika und andere Medienzusätze.

Antibiotikum/Zusatz	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/ml in 50 % EtOH	100 µg/ml
Chloramphenicol	25 mg/ml in EtOH	25 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml in 0,1M NaOH	50 µg/ml (Plasmide), 25 µg/ml (Stämme)
Apramycin	50 mg/ml in H ₂ O	50 µg/ml
Nourseothricin	10 mg/ml in H ₂ O	10-40 µg/ml
D,L-Liponsäure	5 mg/ml in 50 % EtOH	0-5 ng/ml
Glycerin	20 % (w/v) in H ₂ O	0,1-0,5 % (w/v)
D-Glukose	20 % (w/v) in H ₂ O	0,5 % (w/v)
L-Rhamnose	20 % (w/v) in H ₂ O	0,1-0,5 % (w/v)
D-Xylose	20 % (w/v) in H ₂ O	0,5 % (w/v)
L-Arabinose	20 % (w/v) in H ₂ O	0,5 % (w/v)

2.1.8 Puffer und Lösungen

Tabelle 10: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen.

Puffer/Lösung	Bestandteile	Konzentration / Menge
P1-Saline (0,1 M Natriumcitrat)	Na ₃ Citrat x 2 H ₂ O	14,7 g
	pH 7,0 Einstellen mit 1 M HCl	
	VE-H ₂ O	ad 500 ml
10x M9-Salze	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	42,5 g
	KH ₂ PO ₄	15,0 g
	NaCl	2,5 g
	NH ₄ Cl	5,0 g
	VE-H ₂ O	ad 500 ml
1,15x M9hP-Salze	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	20,47 g
	KH ₂ PO ₄	15,65 g
	NaCl	1,15 g
	NH ₄ Cl	2,30 g
	VE H ₂ O	ad 2,0 l
50x TAE	Tris Base	242,0 g
	Eisessig	57,1 ml
	EDTA	18,6 g
	VE-H ₂ O	ad 1,0 l
TE 10.01	Tris/HCl (pH 8,0)	10,0 mM
	EDTA (pH 8,0)	0,1 mM
10x Auftragspuffer für Agarosegelelektrophorese	Xylencyanol	0,25 g
	Bromphenolblau	0,25 g
	Glycerin 86 % (w/v)	58 ml
	0,5 M EDTA (pH 8,0)	ad 100 ml
4 M NH ₃ , pH 10,2	(NH ₄) ₂ SO ₄	2,64 g
	25 %-NH ₃	30 ml
	HPLC-Wasser	ad 100 ml
3 M Na-Acetat, pH5,2	Na-Acetat x 3 H ₂ O	40,8 g
	pH Einstellen mit Eisessig	+ ~80 ml H ₂ O
	H ₂ O	ad 100 ml
1,2 M MgSO ₄	29,58 g MgSO ₄ x 7H ₂ O	
	HPLC-Wasser	ad 100 ml
0,1 M H ₂ SO ₄	2 ml einer 5 M H ₂ SO ₄ -Lösung	
	HPLC-Wasser	ad 100 ml

Die pH-Werte wurden mit 2 M NaOH- bzw. 1 M HCl-Lösung eingestellt. Das für einige Lösungen verwendete HPLC-Wasser bezeichnet das Produkt Rotisolv[®] mit der Artikelnummer A511.3 von der Carl Roth GmbH aus Karlsruhe.

2.2 Bakterienstämme

Tabelle 11: Verwendete *E. coli* Stämme.

IMB = Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart; IIG = Institut für Industrielle Genetik, Universität Stuttgart; CGSC = The *Coli* Genetic Stock Center, <http://cgsc.biology.yale.edu>, in New Haven, CT, USA; P1 (A) x (B) = Transduktion in Stamm B mit einem P1*kc*-Lysat von Stamm A; pCP20 (Flp) bzw. pJOE5555.1 (MrpA) = Ausschneiden der Resistenz durch Rekombination zwischen zwei FRT- bzw. *mrpS*-Sequenzen; Stämme mit dem Präfix „ss“ ohne Angabe von Referenzen wurden selbst konstruiert, pJOE6038.1 = Deletion von Genen durch Rekombination einer Deletionskassette mit dem Genom, die von auf dem Plasmid codierten Rekombinase-enzymen katalysiert wird. Symbol * = unbekannt Mutation.

Stamm	Genotyp	Referenz bzw. Konstruktion
BW25113	<i>lacI^f rrnB_{T14} ΔlacZ_{WJ16} hsdR514 ΔaraBAD_{AH33} ΔrhaBAD_{LD78}</i>	Datsenko & Wanner, 2000 ⁵⁷
JM109	<i>recA1, supE44, endA1, hsdR17, gyrA96, relA1, thi, Δ(lac-proAB), F' [traD36 proAB+ lacIq lacZΔM15]</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985 ²⁰⁷
NM519	<i>thr-1, araC14, leuB6(Am), Δ(gpt-proA)62, lacY1, tsx-33, glnV44(AS), galK2(Oc), λ, sbcA23 (Rac), his-60, relA1, recB21, recC22, rpsL31(strR), xylA5, mtl-1, argE3(Oc), thi-1, hsdR24(del)</i>	Sain & Murray, 1980 ²⁰⁸
W3110	F ⁻ , λ, <i>rpoS (Am), rph-1, Inv (rrnD-rrnE)</i>	Hayashi, K., 2006 ²⁰⁹
Lin43	Hfr <i>fhuA22, ΔphoA8, fadL701(T2R), relA1, glpR2(glpC), pitA10, spoT1, glpK22(fbR)(G304S), rrnB-2, mcrB1, creC510</i>	CGSC
CGSC#11940	BW25113 <i>ΔgldA732::FRT-kan-FRT</i>	CGSC
MW1	NM519 <i>Lac⁺</i>	Wenzel, M., IIG
MW4	NM519 <i>Lac⁺ ΔldhA::FRT-aac(3)IV-FRT</i>	Wenzel, M., IIG
WA66.1	BW25113 <i>Lac⁺</i>	Wegerer, A., IIG
WA66xa	WA66.1 <i>ΔxthA::FRT-aac(3)IV-FRT</i>	Wegerer, A., IIG
WA66x	WA66.1 <i>ΔxthA::FRT</i>	Wegerer, A., IIG
ss67	WA66.1 <i>ΔaceE::FRT-aac(3)IV-FRT</i>	WA66.1 (pJOE6038.1)
ss137	WA66x <i>ΔpoxB::FRT-aac(3)IV-FRT</i>	WA66x (pJOE6038.1)
ss138	WA66x <i>ΔpflB::FRT-aac(3)IV-FRT</i>	WA66x (pJOE6038.1)
ss145	WA66x <i>ΔtdcE::FRT-aac(3)IV-FRT</i>	WA66x (pJOE6038.1)
ss153	WA66x <i>ΔpflB::FRT</i>	ss138 pCP20 (Flp)

Materialien und Methoden

Stamm	Genotyp	Referenz bzw. Konstruktion
ss154	WA66x Δ poxB::FRT-aac(3)IV-FRT Δ pflB::FRT	P1 (ss137) x (ss153)
ss168	BW25113 Δ pykA::FRT-kan-FRT	Gottlieb, K., IMB ¹⁷⁷
ss169	BW25113 Δ pykF::FRT-kan-FRT	Gottlieb, K., IMB ¹⁷⁷
ss171	WA66x Δ poxB::FRT Δ pflB::FRT	ss154 pCP20 (Flp)
ss172	WA66x Δ ldhA::FRT-aac(3)IV-FRT Δ poxB::FRT Δ pflB::FRT	P1 (MW4) x (ss171)
ss173	WA66x Δ ldhA::FRT-aac(3)IV-FRT Δ poxB::FRT Δ pflB::FRT	P1 (MW4) x (ss171)
ss174	ss173 Δ pykF::FRT-kan-FRT	P1 (ss169) x (ss173)
ss181	WA66x Δ pykF::FRT Δ ldhA::FRT Δ poxB::FRT Δ pflB::FRT	ss174 pCP20 (Flp)
ss182	ss181 Δ pykA::FRT-kan-FRT	P1 (ss168) x (ss181)
ss192	WA66x Δ ldhA::FRT Δ poxB::FRT Δ pflB::FRT	ss172 pCP20 (Flp)
ss193	ss192 Δ tdcE::FRT-aac(3)IV-FRT	P1 (ss145) x (ss192)
ss195	ss182 Δ tdcE::FRT-aac(3)IV-FRT	P1 (ss145) x (ss182)
ss220	ss192 Δ tdcE::FRT-aac(3)IV-FRT Δ gldA732::FRT-kan-FRT	P1 (CGSC#11940) x (ss193)
ss224	WA66.1 Δ pck::mrpS-nat1-mrpS	WA66.1 (pJOE6038.1)
ss225	WA66.1 Δ ppc::mrpS-nat1-mrpS	WA66.1 (pJOE6038.1)
ss231	WA66.1 Δ mgsA::mrpS-nat1-mrpS	WA66.1 (pJOE6038.1)
ss237	ss182 Δ tdcE::FRT-aac(3)IV-FRT Δ pck::mrpS-nat1-mrpS	P1 (ss224) x (ss195)
ss241	Lin43 Δ pykA::FRT-kan-FRT	P1 (ss168) x (Lin43)
ss243	Lin43 Δ pykA::FRT	ss241 pCP20 (Flp)
ss245	Lin43 Δ pykF::FRT-kan-FRT Δ pykA::FRT	P1 (ss169) x (ss243)
ss248	ss182* (spontane Mutante)	diese Arbeit
ss249	ss182* (spontane Mutante)	diese Arbeit
ss250	ss237* (spontane Mutante)	diese Arbeit
ss251	ss195* (selektioniert auf Glycerin, Transfer 16)	diese Arbeit
ss253	ss237*(selektioniert auf Glycerin, Transfer 16)	diese Arbeit
ss262	WA66.1 Δ gldA::mrpS-nat1-mrpS	WA66.1 (pJOE6038.1)
ss266	WA66.1 Δ pps::mrpS-nat1-mrpS	WA66.1 (pJOE6038.1)
ss271	ss251 Δ gldA::mrpS-nat1-mrpS	P1 (ss262) x (ss251)
ss274	ss251 Δ pps::mrpS-nat1-mrpS	P1 (ss266) x (ss251)

Stamm	Genotyp	Referenz bzw. Konstruktion
ss277	ss192 Δ <i>mgsA::mrpS-nat1-mrpS Δ<i>tdcE::FRT-aac(3)IV-FRT Δ<i>gldA732::FRT-kan-FRT</i></i></i>	P1 (ss231) x (ss220)
ss279	ss251 Δ <i>gldA::mrpS</i>	ss271 MrpA (pJOE5555.1)
ss281	ss251 Δ <i>mgsA::mrpS-nat1-mrpS Δ<i>gldA::mrpS</i></i>	P1 (ss231) x (ss279)
ss296	WA66.1 Δ <i>maeA::mrpS-nat1-mrpS</i>	WA66.1 (pJOE6038.1)
ss298	WA66.1 Δ (<i>ackA-pta</i>):: <i>mrpS-nat1-mrpS</i>	WA66.1 (pJOE6038.1)
ss301	WA66.1 Δ <i>lipA::mrpS-nat1-mrpS</i>	WA66.1 (pJOE6038.1)
ss303	WA66.1 Δ <i>lipA::mrpS-nat1-mrpS Δ<i>poxB::FRT Δ<i>pflB::FRT</i></i></i>	P1 (ss301) x (ss171)
ss308	WA66.1 Δ <i>lipA::mrpS Δ<i>poxB::FRT Δ<i>pflB::FRT</i></i></i>	ss303 MrpA (pJOE5555.1)
ss310	ss251 Δ <i>maeA::mrpS-nat1-mrpS Δ<i>gldA::mrpS</i></i>	P1 (ss296) x (ss279)
ss312	ss253 Δ <i>pck::mrpS</i>	ss253 MrpA (pJOE5555.1)
ss314	ss253 Δ <i>maeA::mrpS-nat1-mrpS Δ<i>pck::mrpS</i></i>	P1 (ss296) x (ss312)
ss320	ss308 Δ <i>ldhA::FRT-aac(3)IV-FRT</i>	P1 (MW4) x (ss308)
ss322	ss277 Δ <i>mgsA::mrpS</i>	ss277 MrpA (pJOE5555.1)
ss328	ss277 Δ (<i>ackA-pta</i>):: <i>mrpS-nat1-mrpS</i> Δ <i>mgsA::mrpS</i>	P1 (ss298) x (ss322)
ss331	ss308 Δ <i>ldhA::FRT</i>	ss320 pCP20 (Flp)
ss364	ss192 Δ <i>aceE::FRT-aac(3)IV-FRT</i>	P1 (ss67) x (ss192)
ss374	ss251 Δ <i>ppc::mrpS-nat1-mrpS Δ<i>gldA::mrpS</i></i>	P1 (ss225) x (ss279)

2.3 Bakteriophagen

Tabelle 12: Verwendeter Bakteriophage.

Phage	Beschreibung	Referenz
P1 <i>kc</i>	Bakteriophage mit hoher Transduktionseffizienz für <i>E. coli</i> , macht klare Plaques	Lennox, 1955 ²¹⁰

2.4 Verwendete synthetische Oligodesoxynukleotide

Alle verwendeten Oligodesoxynukleotide (Primer) wurden von der Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland synthetisiert. Die Primerbezeichnungen bestehen aus einer vierstelligen Zahl mit vorangestelltem s bspw. s4770. Es wurden Stammlösungen mit einer Konzentration von 100 μ M in TE10.01 angesetzt und bei -20 °C gelagert. Aus dieser wurden 20x verdünnte Lösungen in H₂O hergestellt, die für die Erstellung der PCR-Ansätze verwendet wurden.

Tabelle 13: Oligonukleotide, die zum Klonieren und Sequenzieren verwendet wurden.

Primer	Sequenz (5' → 3')	Funktion
s3767	TAATACGACTCACTATAGGG	<i>T7</i> , Sequenzierung
s3768	ATTTAGGTGACACTATAG	<i>SP6</i> , Sequenzierung
s4083	GGCTCGTATGTTGTGTGG	Sequenzierung von pWA38.4 Derivaten
s4084	GCAAGGCGATTAAGTTGG	Sequenzierung von pWA38.4 Derivaten
s4962	AAAAACAATTGGCATCATGTACAATCAGATGG	Promotor <i>glpFK</i> for + <i>MunI</i>
s4963	AAAAAAGTTAAGAGTTAATGTTTGTGTATGC	Promotor <i>glpFK</i> rev+ <i>AflIII</i>
s6180	AAAAACAATTGGAATCAAACAGCGGTGG	Promotor <i>frdA</i> for + <i>MunI</i>
s6181	AAAAAAGTTAAGTTACGGTCTGCGAACG	Promotor <i>frdA</i> rev+ <i>AflIII</i>
s6276	ATGTCAGCTACTGGGCTATC	Nourseothricin-Resistenzgen for
s6277	ATGATGAACCTGAATCGCC	Nourseothricin-Resistenzgen rev
s6306	TGCAGCGGAAATGCAGCTC	Apramycin-Resistenzgen for
s6307	TGAGCTCAGCCAATCGACTG	Apramycin-Resistenzgen rev
s6308	AAAAACATATGCAAGAGACGGGCGTG	<i>pck</i> aus pMG200 for + <i>NdeI</i>
s6309	AAAAAAGCTTGCCGGGTGTCCGGCAC	<i>pck</i> aus pMG200 rev + <i>HindIII</i>
s6352	AAAAACATATGCGCGTTAACAATGGTTTG	<i>pck</i> aus <i>E. coli</i> for + <i>NdeI</i>
s6353	AAAAAAGCTTACAGTTTCGGACCAGCC	<i>pck</i> aus <i>E. coli</i> rev + <i>HindIII</i>
s6670	TCTAGATATCGCATCCGGGCAGTAG	<i>pck</i> aus <i>E. coli</i> for <i>XbaI</i> - <i>fruR</i> - <i>Ppck</i> -ORF
s6671	TCTAGATTCCCGCCATATAAACCAAG	<i>pck</i> aus <i>E. coli</i> for <i>XbaI</i> - <i>Ppck</i> -ORF
s6672	GCGGCCGCAGGGCACGACAAAAGAAG	<i>pck</i> aus <i>E. coli</i> rev <i>NotI</i> -Terminator-ORF
s6673	CTCGAGCATGCATCTAGAG	pCG19 <i>XhoI</i> - <i>XbaI</i> -for
s6674	AAAAAGCGCCGCTCACAATTCACAC	pCG19 5A- <i>NotI</i> -rev
s6992	AAAAACATATGGGAAGTACTCCGACTGA	<i>At</i> -ME2 5A- <i>NdeI</i> -for
s6993	AAAAAGGTACCTCTAGATTAACGGTAGTTTCTGTACAC	<i>At</i> -ME2 5A- <i>Acc65I</i> - <i>XbaI</i> -rev
s6994	AAAAACATATGGGCACCAATCAGACTCA	<i>At</i> -ME3 5A- <i>NdeI</i> -for
s6995	AAAAAGGTACCTCTAGATTAACGGAAGTTTCTGTAGAC	<i>At</i> -ME3 5A- <i>Acc65I</i> - <i>XbaI</i> -rev

Tabelle 14: Primer für die Überprüfung von Stämmen durch genomische PCR.

Primer	Sequenz (5' → 3')		
s4770	GTAGCTTAAATGTGATTCAACATCACTGGAGAAAGTCTTTGTAGGCTGGAGCTGCTTC		
s5608	GTAAATAAAAAATCCACTTAAGAAGGTAGGTGTTACATGATTCCGGGGATCCGTCGACC		
s5512	GTGGAGCCTTTATTGTACGC	s6324	TATGGAAGAGGCGCTACTGC
s5513	ATGGTTGTGCAAGTACGCAG	s6325	ATATTCGCGCCAATGCGACG
s5715	ATTCACCAAACCTGCAACCGG	s6326	CCTGGACTTCTGTGGAATGC
s5716	TCATCGCCACTTTATCCAGC	s6563	TTTGCTTGAACGATTCACCG
s5741	ATTTTTATCGCTGGTCACGG	s6564	CGTTTAACGCAGGATGTCTG
s5747	TTAGGCAAAGTTAACGCGCC	s6577	CGCATTTGGCACTACTCATC
s5748	TGAACATAAGGGCCGATTGC	s6578	ATTGCGTAGGCCTGATAAGC
s5805	ACCGTGATAGATGTGCTGG	s6740	CCATTGGCTGAAAATTACGC
s5806	TCGTCTGACGATTCAGGTG	s6741	GCAATTCATTGATGCAGCGC
s5807	TTCAGCGTATAATGCGCGC	s6742	ACATTTTCGCGACCGCTTTG
s5808	GTAGAACCCAGGATTACCG	s6743	TCAGGCTGAAAAGCTCTCTC
s6150	CCTGAAGTAATCCGGTAGC	s6769-1	ATGTTTCAGTGAGCGCAGTG
s6151	TGAGCGGGAAATTGAAACC	s6791	GTAAATAACCCAACCGGCAG
s6323	TAACAAATCCGCGAAACGCG		

Tabelle 15: Oligodesoxynukleotide für die Herstellung von Deletionskassetten.

Die Sequenzen der Oligonukleotide (Primer) für die Herstellung von Deletionskassetten durch PCR sind angegeben. Für jedes Gen gibt es einen „forward“ (for) und einen „reverse“ (rev) Primer. Die zur genomischen Sequenz identischen Bereiche der Primer sind unterstrichen. Die Start- und Stoppcodons sind, falls in der Primersequenz vorhanden, fett markiert. Die Kompatibilität mit den Plasmiden, die als Template für die PCR dienen ist angegeben: A = kompatibel zu pIJ773, B = kompatibel zu pWA38.4 / pSS55.11 / pSS57.2

Primer	Sequenz (5' → 3')	Gen / PCR-Template
s5115	<u>CAGAAA</u> ACTCAACGTTATTAGATAGATAAGGAATA <u>ACCC</u> ATTCCGGGG ATCCGTCGACC	<i>aceE</i> for A
s5116	<u>CCG</u> TACTTTGATTTGATAGCCATTATTCTTTTACCTCTGTAGGCTG GAGCTGCTTC	<i>aceE</i> rev A

Materialien und Methoden

Primer	Sequenz (5' → 3')	Gen / PCR-Template
s5608	<u>GTAAATAAAAAATCCACTTAAGAAGGTAGGTGTTAC</u> ATG ATTCCGGGG ATCCGTCGACC	<i>pflB</i> for A
s5609	<u>GTACGCTTTTTACTGTACGATTTTCAGTCAAATCTAA</u> TTA TGTAGGCTG GAGCTGCTTC	<i>pflB</i> rev A
s5614	<u>CTTGTACCGTTATCACATTCAGGAGATGGAGAACC</u> ATG ATTCCGGGG ATCCGTCGACC	<i>poxB</i> for A
s5615	<u>GGCATGTCCTTATTATGACGGGAAATGCCACCCTTT</u> TTA TGTAGGCTG GAGCTGCTTC	<i>poxB</i> rev A
s5725	<u>TAATTTAGTTGAAGTATTGTAGAGAGATTATTTTT</u> CATG ATTCCGGGG ATCCGTCGACC	<i>tdcE</i> for A
s5726	<u>TGCGTTTCGATAATCTTTTTCATAACATCCTCCGGCG</u> TCA TGTAGGCTG GAGCTGCTTC	<i>tdcE</i> rev A
s6319	<u>GGCTATCAAACGATAAGATGGGGTGTCTGGGGTAAT</u> ATG ACCATGATT ACGAATTC	<i>ppc</i> for B
s6320	<u>TCGCGCAAAAAGCACGAGGGTTTGCAGAAGAGGAAG</u> TTA ACGACGGCC AGTGCCAAGC	<i>ppc</i> rev B
s6321	<u>AGTAATCTGTAGGAAAAGTTAACTACGGATGTACATT</u> ATG ACCATGATT ACGAATTC	<i>mgsA</i> for B
s6322	<u>CGTAAGAAACAGGTGGCGTTTGCCACCTGTGCAATA</u> TTA ACGACGGCC AGTGCCAAGC	<i>mgsA</i> rev B
s6575	<u>CCGCATTTGGCACTACTCATCTCTAAAGGAGCAATT</u> ATG ACCATGATT ACGAATTC	<i>gldA</i> for B
s6576	<u>TTCAAACCTCCCGGACAAGCCGGGAGTTTGGAGTAGG</u> TTA ACGACGGCC AGTGCCAAGC	<i>gldA</i> rev B
s6579	<u>TCTCAAACCGTTTCATTTATCACAAAAGGATTGTT</u> CGATG ACCATGATT ACGAATTC	<i>pps</i> for B
s6580	<u>ATAACCCCGCGACTAAACGCCCGCGGGGATTTATTT</u> TTA ACGACGGCC AGTGCCAAGC	<i>pps</i> rev B
s6111	<u>TATTCAGGCAATACATATTGGCTAAGGAGCAGTGAA</u> ATG ACCATGATT ACGAATTC	<i>pck</i> for B
s6112	<u>TAAGATACTGGATAGATATTCTCCAGCTTCAAATCA</u> TTA AACGACGGC CAGTGCCAAGC	<i>pck</i> rev B
s6732	<u>CCCCAGGGATGGATATTCAAAAAAGAGTGAGTGAC</u> ATG ACCATGATT ACGAATTC	<i>maeA</i> for B
s6733	<u>GAAATAGCCCGGTAGCCTTCACTACCGGGCGCAGGC</u> TTA AACGACGGC CAGTGCCAAGC	<i>maeA</i> rev B
s6734	<u>CGTTTTTTTAGCCACGTATCAATTATAGGTACTTCC</u> ATG ACCATGATT ACGAATTC	<i>ackA-ptA</i> for B
s6735	<u>GATATCCGCAGCGCAAAGCTGCGGATGATGACGAGA</u> TTA AACGACGGC CAGTGCCAAGC	<i>ackA-ptA</i> rev B
s6736	<u>CTTTCCTTCGTAATTCGCAACTGGAACACGCACGCT</u> ATG ACCATGATT ACGAATTC	<i>lipA</i> for B

Primer	Sequenz (5' → 3')	Gen / PCR-Template
s6737	TTTTTTATCAGACAGATGTAAGTAATTATTACAGGATTTAAACGACGGC CAGTGCCAAGC	<i>lipA</i> rev B

2.5 Plasmide

Tabelle 16: Für diese Arbeit verwendete Plasmide.

pSS = in dieser Arbeit konstruierte Plasmide; (Amp^R), (Apr^R), (Cml^R), (Kan^R), (Nou^R) oder (Tet^R) = Resistenz gegen Ampicillin, Apramycin, Chloramphenicol, Kanamycin, Nourseothricin oder Tetracyclin; *aac(3)IV* = Gen für Aminoglykosid-3-N-Acetyltransferase, *bla* = Gen für β -Lactamase, *cat* = Gen für Chloramphenicol-Acetyltransferase, *nat1* = Gen für Nourseothricin-Acetyltransferase.

Plasmid	relevanter Genotyp bzw. Funktion	Referenz bzw. Konstruktion
pCG19	(Tet ^R) pSC101-Derivat mit niedriger Kopienzahl pro Zelle	Gotting, C. <i>et al.</i> , 1998 ²¹¹
pCP20	<i>flp bla</i> (Amp ^R) <i>cat</i> (Cml ^R) <i>repA101</i> Ausschneiden der Resistenz zwischen zwei FRT-Sequenzen ts-Replikation und thermoinduzierbare Expression der Flp-Rekombinase bei 42 °C	Cherepanov & Wackernagel, 1995 ²¹²
pET32- <i>At</i> -ME2	<i>At</i> -NADP-ME2 Überexpression von Malic-Enzym 2 aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	Wheeler, M. C. <i>et al.</i> , 2008 ¹⁷³
pET32- <i>At</i> -ME3	<i>At</i> -NADP-ME3 Überexpression von Malic-Enzym 3 aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	Wheeler, M. C. <i>et al.</i> , 2008 ¹⁷³
pGLP1	<i>bla</i> (Amp ^R) <i>glpACB glpTQ</i> 7236 bp Ausschnitt aus dem <i>E. coli</i> Genom zur Sequenzierung	Cole, S. T. <i>et al.</i> , 1988 ²¹³
pH3	<i>bla</i> (Amp ^R) <i>frdABCD</i> Überexpression von FrdABCD durch natürlichen Promotor	Cohen-Ben-Lulu <i>et al.</i> , 2008 ²¹⁴
pIJ773	FRT- <i>aac(3)IV</i> -FRT (Apr ^R) <i>bla</i> (Amp ^R) Vektor zur Erstellung von Deletionskassetten durch PCR	Gust <i>et al.</i> , 2003 ²¹⁵
pIJ790	<i>cat</i> (Cml ^R) <i>repA101 araC</i> λ -RED (<i>gam</i> , <i>bet</i> , <i>exo</i>) Induktion von Rekombinasen durch L-Arabinose und ts-Replikation / Erzeugung von Gendeletionen durch Rekombination mit Deletionskassetten	Gust <i>et al.</i> , 2003 ²¹⁵
pJOE4786.1	<i>bla</i> (Amp ^R) <i>lacZα</i> Positiver Selektionsvektor mit sehr hoher Kopienzahl und für Sequenzierung von PCR-Produkten mit SP6- und T7-Primern	Altenbuchner, J., IIG
pJOE5555.1	<i>Prha-mrpA cat</i> (Cml ^R) <i>repA101</i> Induktion von MrpA durch Rhamnose, ts-Replikation Ausschneiden der Resistenz zwischen zwei <i>mrpS</i> -Sequenzen durch die Rekombinase MrpA	Altenbuchner, J., IIG
pJOE5747.2	<i>cat</i> (Cml ^R) <i>xyle</i> pACYC184 Derivat, p15A Replikon	Altenbuchner, J., IIG
pJOE6038.1	Verbesserung von pIJ790 durch zusätzliches <i>recA</i> auf Plasmid	pIJ790 mit <i>recA</i> Insert

Materialien und Methoden

Plasmid	relevanter Genotyp bzw. Funktion	Referenz bzw. Konstruktion
pMG200	<i>bla</i> (Amp ^R) <i>pckA</i> (<i>Rhodopseudomonas palustris</i>) Heterologe Expression von <i>Pck</i> durch eigenen Promotor	Inui <i>et al.</i> , 1999 ²¹⁶
pWA38.4	<i>bla</i> (Amp ^R) <i>mrpS-kan-mrpS</i> (Kan ^R) Vektor zur Erstellung von Deletionskassetten durch PCR	Wegerer, A., IIG,
pSS46.22	<i>cat</i> (Cml ^R) <i>PglpFK-sfcA</i> Durch Glycerin induzierbare Expression von <i>sfcA</i> aus <i>E. coli</i>	pJOE5747.2 + pSS44.7
pSS55.11	<i>bla</i> (Amp ^R) <i>mrpS-nat1-mrpS</i> (Nou ^R) Vektor zur Erstellung von Deletionskassetten durch PCR	Austausch der Resistenz in pWA38.4
pSS57.2	<i>bla</i> (Amp ^R) <i>mrpS-aac(3)IV-mrpS</i> (Apr ^R) Vektor zur Erstellung von Deletionskassetten durch PCR	pSS55.11 (<i>XmaI</i>) ligiert mit PCR (s6306/s6307) von pIJ773
pSS61.13	<i>cat</i> (Cml ^R) <i>PglpFK-pckA</i> (<i>R. palustris</i>) Durch Glycerin induzierbare heterologe Expression von <i>pckA</i> von <i>Rhodopseudomonas palustris</i> in <i>E. coli</i>	pMG200 PCR ligiert mit pSS46.22 (<i>NdeI</i> / <i>HindIII</i>)
pSS69.1	<i>bla</i> (Amp ^R) <i>pck</i> Expression von <i>pck</i> durch natürlichen Promotor (inkl. FruR-Bindestelle)	pJOE4786.1 (<i>SmaI</i>) ligiert mit PCR (s6670/s6672) von BW25113
pSS70.8	<i>bla</i> (Amp ^R) <i>pck</i> Expression von <i>pck</i> durch natürlichen Promotor (ohne FruR-Bindestelle)	siehe pSS69.1 aber PCR mit (s6671/s6672)
pSS71.1	(Tet ^R) <i>pck</i> Leichte Überexpression von <i>pck</i>	PCR pCG19 (s6673/s6674) ligiert mit pSS69.1 (<i>NotI</i> / <i>XbaI</i>)
pSS75.12	(Tet ^R) <i>glpACB</i> Leichte Überexpression von <i>glpACB</i> durch natürlichen Promotor	PCR pCG19 (s6673/s6674) ligiert mit pGLP1 (<i>HindIII</i> / <i>NcoI</i>)
pSS76.2	(Tet ^R) <i>frdABCD</i> Leichte Überexpression von <i>frdABCD</i> durch natürlichen Promotor	PCR pCG19 (s6673/s6674) ligiert mit pH3 (<i>HindIII</i>)
pSS84.4	<i>bla</i> (Amp ^R) <i>PfrdABCD-At-NADP-ME2 rrnB</i> Expression des Malic-Enzym 2 Gens aus <i>Arabidopsis thaliana</i> unter der Kontrolle des Fumarat-Reduktase-Promotors aus <i>E. coli</i>	pSS54.1 (<i>BsrGI</i> / <i>NdeI</i>) ligiert mit Fragment aus pET32- <i>At-ME2</i>
pSS85.1	<i>bla</i> (Amp ^R) <i>PfrdABCD-At-NADP-ME3 rrnB</i> Expression des Malic-Enzym 3 Gens aus <i>Arabidopsis thaliana</i> unter der Kontrolle des Fumarat-Reduktase-Promotors aus <i>E. coli</i>	siehe pSS84.4, Fragment aus pET32- <i>At-ME3</i>
pSS91.1	<i>bla</i> (Amp ^R) <i>Prha-At-NADP-ME2 rrnB</i> Durch Rhamnose induzierbare Expression des Malic-Enzym 2 Gens aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	PCR (pET32- <i>At-</i> <i>ME2</i>) in pWA21 kloniert

2.6 Methoden

2.6.1 Stammhaltung von *E. coli*

Für die Herstellung von Dauerkulturen wurde je eine Einzelkolonie mit einem sterilen Zahnstocher in ein Zentrifugenröhrchen überimpft, welches mit 5 ml LB-Medium, dem entsprechenden Antibiotikum und falls erforderlich anderen Zusätzen, befüllt war. Nach Inkubation (Rollator TC-7 Rollordrum, Stufe 6, NBS) bei 37 °C (falls erforderlich auch 30 °C) über Nacht wurden die Zellen der Übernachtskultur (ÜNK) pelletiert (Megafuge, 4500 rpm, 5 min, RT) und der Überstand verworfen. Als Kontrolle auf Kontaminationen wurde immer auch das Medium ohne Übertragung einer Kolonie parallel behandelt. Die pelletierten Zellen wurden in 2-3 ml Glycerinkulturmedium resuspendiert und zu gleichen Teilen in zwei 2 ml Probenröhrchen pipettiert. Die erhaltenen Glycerinkulturen (GK) wurden in zwei Gefrierschränken, die sich in unterschiedlichen Räumen befinden, bei -20 °C und -70 °C (Langzeitarchivierung) gelagert. Die GKs wurden direkt, ohne vorherige Schockgefrierung, vom Eisbad in die Gefrierschränke befördert. Für die Anzucht der Stämme wurden die GKs aus dem -20 °C Gefrierschrank kurz im Eisbad gelagert und mit der Impföse auf entsprechenden Nährböden bis zur Vereinzellung ausgestrichen. Die nach Inkubation über Nacht erhaltenen Einzelkolonien wurden als Inokulum für Flüssigkulturen verwendet. Die erhaltenen Platten wurden anschließend zur weiteren Verwendung bis zu 10 Tage im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

2.6.2 Routinemethoden der Molekularbiologie

2.6.2.1 Plasmidisolierung

Um Plasmid-DNA für Klonierungen, Archivierung und Übertragungen in andere Stämme zu isolieren, wurden 5 ml ÜNKs angefertigt. Die Plasmidisolierung wurde mit dem Qia prep[®] Spin Miniprep Kit nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die Elution erfolgte je nach Kopienzahl des Plasmids mit 30-100 µl Wasser oder TE10.01. Das Eluat wurde in drei Teile aufgeteilt und an zwei Orten bei -20 °C für die Dauerlagerung und bei 4 °C für aktuelle Verwendung aufbewahrt.

2.6.2.2 Agarosegelelektrophorese

Die Analyse von Restriktionsspaltungen und PCR-Fragmenten sowie die präparative Trennung von Restriktionsfragmenten für Klonierungen erfolgte durch Elektrophorese in 0,8 %-igen Agarosegelen, die aus LE-Agarose und 1 x TAE-Puffer (inklusive 0,5 µg/ml Ethidiumbromid) durch Aufkochen in der Mikrowelle bei 600 Watt für 2 min hergestellt wurden. Für die Trennung von Fragmenten mit einer Länge von weniger als 1000 bp wurden 2 %-ige Gele hergestellt. Die kochende Flüssigkeit wurde nach Abkühlen (15 min) zum Gelieren in einen mit Auslaufsperrern und Kamm versehenen Schlitten gegossen. Nach der Gelbildung wurden Kamm und Auslaufsperrern entfernt und das Gel in eine Gelkammer überführt, die mit 1x TAE-Puffer und Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) gefüllt war. Die aufzutrennende DNA (10-25 µl) wurde mit einem Zehntel des Volumens 10x DNA-Auftragspuffer gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Die DNA-Auftrennung nach ihrem Molekulargewicht erfolgte bei einer angelegten Spannung von 5 V/cm Elektrodenabstand. Unter UV-Licht konnte die DNA nach der Elektrophorese wegen der Interkalation von Ethidiumbromid in die DNA detektiert werden. Als DNA-Längenstandard wurden dabei 7,5 µl der 1 kb-ladder von Gibco/Invitrogen mit aufgetragen. Für die 2 %-igen Gele wurde als Größenstandard die 100 bp Leiter von NEB verwendet.

2.6.2.3 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die für eine Ligation benötigten DNA-Fragmente wurden nach einer Restriktionsspaltung von Plasmiden oder nach Gewinnung durch PCR im Agarosegel aufgetrennt, unter UV-Licht detektiert, und mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die Gelblöcke wurden in ein 1,5 ml Plastikgefäß überführt. Die Reinigung erfolgte mit dem Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit nach dem Protokoll des Herstellers. Die DNA wurde mit 20 µl TE 10.01 oder H₂O eluiert und direkt für die Ligation eingesetzt oder bei 4 °C zwischengelagert.

2.6.2.4 DNA-Amplifikation durch PCR

Für die Überprüfung von Stämmen sowie für die Herstellung von Deletionskassetten und Plasmiden wurden PCRs durchgeführt. Durch diese Kettenreaktion (PCR = *engl.* für

polymerase chain reaction) kommt es zur Amplifikation von DNA-Sequenzen. Die PCRs wurden in einem Volumen von 50 μl durchgeführt. Als PCR-Maschine wurde das Modell T Personal 48 der biometra GmbH aus Göttingen verwendet. Die dNTPs (Desoxynukleosid-triphosphate) wurden von Roth bezogen (Rotimix PCR 3, insgesamt 10 mM dNTPs, je 2,5 mM dATP, dGTP, dTTP und dCTP). Es wurden zwei verschiedene DNA-Polymerasen verwendet. Für die Analyse von Stämmen wurde die *Taq* DNA-Polymerase (keine Korrekturlesefunktion) verwendet (5 U/ μl , biomaster GmbH, Windeck, Deutschland). Für Klonierungen wurde die PHUSION™ Hot Start DNA-Polymerase mit hoher Genauigkeit und Korrekturlesefunktion verwendet (2 U/ μl , Finnzymes). Falls mehrere PCR-Reaktionen parallel angesetzt wurden, so wurde für alle Ansätze zusammen eine Reaktionslösung erstellt, die alle Komponenten außer Primer und Template enthielt. In die einzelnen Reaktionsgefäße wurden dann 35 μl dieser Lösung, je 5 μl eines jeden Primers und 5 μl des Templates pipettiert.

Tabelle 17: Zusammensetzung von PCR-Reaktionen mit der *Taq*-Polymerase.

Zusatz	Volumen / Konzentration
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	0,4 μl
10x <i>Taq</i> Puffer (inkl. MgCl_2)	5 μl
Primer (5 μM in H_2O)	je 5 μl (Endkonzentration je Primer = 0,5 μM)
DMSO	2 μl
dNTPs	1 μl (Endkonzentration je dNTP = 50 μM)
Zellsuspension in H_2O	5 μl
H_2O	ad 50 μl

Bei genomischen PCRs wurde eine Zellsuspension als Template verwendet. Eine Isolierung genomischer DNA fand nicht statt. Die Zellsuspension wurde gewonnen, indem man 100 μl aus einer ÜNK des entsprechenden Stammes in LB-Medium in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß pelletierte (Tischzentrifuge, 10000 rpm, 5 min). Das Pellet wurde im gleichen Volumen mit Wasser resuspendiert und bis zur Verwendung bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ neben der entsprechenden Glycerin-

dauerkultur des Stammes gelagert. Die Zusammensetzungen von PCR-Ansätzen sind in Tabelle 17 und Tabelle 18 angegeben.

Für die Herstellung von Deletionskassetten mit der PHUSION™ DNA-Polymerase wurde folgendes Programm benutzt:

PCR-Programm Delkas:

Lid (*engl.* Deckel) 99 °C

94 °C 1 min

5x (98 °C 7 s, 43 °C 20 s, 72 °C 40 s)

25x (98 °C 7 s, 57 °C 20 s, 72 °C 40 s)

72 °C 10 min, dann 4 °C bis zur Entnahme der Proben

Für Klonierungen wurde folgendes Programm verwendet:

typisches PCR-Programm für Klonierungen:

Lid (*engl.* Deckel) 99 °C

98 °C 1 min

25x (98 °C 7 s, Annealingtemperatur 20 s, 72 °C 15-30s/kb Produktlänge)

72 °C 10 min, dann 4 °C bis zur Entnahme der Proben

Zum Annealing der Primer wurde eine Temperatur gewählt, die 5 °C unterhalb der mit dem Programm „OligoCalc“ berechneten Schmelztemperatur für die anfänglich hybridisierenden Sequenzen lag²¹⁷.

Tabelle 18: Zusammensetzung von PCR-Reaktionen mit der PHUSION™-DNA-Polymerase.

Zusatz	Volumen / Konzentration
PHUSION®-Polymerase	0,5 µl
5x HF-Puffer	10 µl
Primer (5 µM in H ₂ O)	je 5 µl (Konzentration je Primer in der PCR = 0,5 µM)
dNTPs	1 µl (Endkonzentration je dNTP = 50 µM)
DNA-template	5 µl (Menge in der PCR = 1 pg bis 50 ng) oder 5 µl Zellsuspension
H ₂ O	ad 50 µl

2.6.2.5 Reinigung von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden gereinigt, bevor sie für eine Ligation oder für eine Restriktionsspaltung verwendet wurden. Die Reinigung erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification Kit nach Anweisungen des Herstellers. Die Elution erfolgte mit 100 µl Wasser. Der erfolgreiche Verlauf der Reinigung wurde zum Schluss durch Gelelektrophorese überprüft. Dabei wurde auch die Konzentration der DNA im Eluat durch Vergleich mit den bekannten Konzentrationen der Fragmente des Molekulargewichtsstandards abgeschätzt.

2.6.2.6 Restriktionsspaltung von DNA

Für Klonierungen oder Charakterisierungen von Plasmiden und PCR-Produkten wurde DNA mit Restriktionsendonukleasen behandelt. Das Vorgehen erfolgte nach Anweisungen der Hersteller NEB oder Roche. Das Volumen eines typischen Ansatzes mit nur einem Enzym betrug 15 µl. Dieser enthielt 1,5 µl 10-fach konzentrierten Puffer, 1 µl Enzym (5-20 U/µl) und 200 ng DNA in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß. Inkubiert wurde für ca. 1 h bei dem Temperaturoptimum des jeweiligen Enzyms. Musste die DNA mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen behandelt werden, so betrug die Ansatzgröße 20 µl, wobei je 1 µl eines jeden Enzyms verwendet wurde. Dabei musste ein für beide Enzyme kompatibler Puffer eingesetzt werden. Nach der Inkubation wurde den Ansätzen unabhängig von dem Volumen 1 µl DNA-Auftragspuffer zugesetzt, bevor die Trennung und Analyse der Spaltprodukte durch Agarosegelelektrophorese erfolgte.

2.6.2.7 Isopropanolfällung von DNA

Eine Isopropanolfällung wurde als Zwischenschritt durchgeführt, wenn DNA in mehreren aufeinanderfolgenden Schritten behandelt wurde und die jeweiligen Puffer oder Enzyme nicht kompatibel waren. Durch die Fällung wurde das zuvor verwendete Enzym nebst Puffer entfernt. Die DNA wurden mit 1/10 Volumen 3 M Natrium-Acetat (pH 5,2) und 1 Volumen Isopropanol versetzt. Nach einer Zentrifugation (Tischzentrifuge, 13.200 rpm, 10 min, RT) wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet wurde mit 20 µl 100 % EtOH gewaschen. Nach der Trocknung des Pellet bei geöffnetem Reaktionsgefäß für 5 min im

Brutschrank bei 50 °C, konnte es durch Zugabe der Reaktionslösung (Enzym, Puffer und Wasser) des nächsten Arbeitsschritts gelöst werden.

2.6.2.8 Behandlung mit alkalischer Phosphatase

Wenn bei einer Klonierung ein Vektor mit nur einem Restriktionsenzym geschnitten wird, so entstehen lineare ds-DNA-Fragmente mit kompatiblen Enden. Bei der nachfolgenden Ligation reagieren diese Fragmente bevorzugt intramolekular, ohne das gewünschte Insert aufzunehmen. Diese Rezirkularisierung des Vektors muss verhindert werden, damit man nach der Übertragung des Ligationansatzes in kompetente Zellen möglichst viele korrekte Klone (Vektor mit Insert) erhält und die Zahl der falschpositiven Klone (rezirkularisierter oder ungeschnittener Ausgangsvektor) klein bleibt. Daher wurde bei entsprechenden Klonierungen die linearisierte DNA nach einer Isopropanolfällung mit alkalischer Phosphatase (AP) behandelt. Das Enzym spaltet endständige Phosphate am 5'-Ende ab und verhindert somit eine Rezirkularisierung. Der Ansatz enthielt 1 µl AP (Roche 20 U/µl) und 1 µl 10x Phosphatase-Puffer in einem Volumen von 10 µl. Es wurde für 20 min bei 37 °C inkubiert. Zum Schluss wurde die dephosphorylierte DNA durch Gelelektrophorese von dem Enzym getrennt und danach aus dem Gel extrahiert (siehe 2.6.2.3).

2.6.2.9 Behandlung mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I

Die Behandlung mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I wurde durchgeführt, um nach einer Restriktionsspaltung von Plasmid-DNA durch Restriktionsenzyme, die überstehende Enden erzeugen, die Enden der gespaltenen DNA zu glätten. Lineare ds-DNA-Fragmente können nur miteinander ligiert werden, wenn sie kompatible Enden aufweisen. Lassen sich in der Sequenz des Basisvektors und des Vektor, der das Insert enthält, keine geeigneten und kompatiblen Restriktionsschnittstellen finden, so kann das Insert immer noch durch eine Ligation von glatten Enden kloniert werden. Das Klenow-Fragment besitzt eine 5'→3' DNA-Polymerase- und eine 3'→5' Exonukleaseaktivität. Deshalb können mit dem Enzym 5'-überstehende Enden aufgefüllt und 3'-überstehende Einzelstrangenden abgebaut werden. Das Ergebnis sind glatte Enden. Durch das Auffüllen oder den Abbau der Enden können die Schnittstellen der Restriktionsenzyme verloren gehen. Für die Klenow-

Behandlung wurde die mit Isopropanol gefällte DNA mit 8 µl TE10.01, 1 µl 10 mM dNTPs (je 2,5 mM ATP, GTP, CTP, TTP), 1 µl 10x Roche-Restriktionspuffer B und 1 µl Klenow-Polymerase (Roche 2 U/µl) gemischt und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Die nachfolgende Reinigung erfolgte durch Agarosegelelektrophorese und Gelextraktion.

2.6.2.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Kompatible DNA-Fragmente, die 3'-OH und 5'-Phosphatenden besitzen, können enzymatisch durch eine Ligase kovalent verbunden und dadurch zirkularisiert werden. Alle Ligationen wurden in einem Volumen von 15 µl durchgeführt. Der Reaktionsansatz enthielt 1,5 µl 10x T4-DNA-Ligase-Puffer (Roche, enthält ATP), 1 µl T4-DNA-Ligase (Roche, 1 U/µl) und die zu ligierende DNA in unterschiedlichen Vektor-zu-Insert-Verhältnissen. Insgesamt befanden sich 5-100 ng DNA in jedem Ligationsansatz. Als Kontrolle wurde bei Bedarf der geschnittene Vektor ohne Insert jeweils mit oder ohne Ligase parallel behandelt. Unabhängig von der Ligationsart (glatte oder überstehende Enden) wurden alle Ansätze über Nacht bei 16 °C im Wasserbad inkubiert.

2.6.2.11 Sequenzierung

Die GATC Biotech AG in Konstanz bietet Sequenzierungsdienstleistungen an. Diese Dienstleistung wurde immer dann in Anspruch genommen, nachdem ein durch PCR entstandenes DNA-Fragment zum ersten Mal kloniert wurde, um durch PCR eingeführte Fehler auszuschließen. Zu sequenzierende Plasmide wurden an das Unternehmen gesendet (30-100 ng/µl in H₂O, Gesamtvolumen 30 µl). Die erhaltenen Chromatogramme wurden mit der kostenlosen Software GATCViewer™ ausgewertet.

2.6.2.12 *In silico* Arbeiten mit DNA-Sequenzen

Die Erstellung von Plasmidkarten, die Klonierungsplanung und bioinformatische Arbeiten wurden mit der Software Clone Manager 8 Basic von Sci-Ed Software, Cary, NC, USA, durchgeführt. Sequenzalignments wurden mit dem kostenlosen Programm BioEdit (Version 7.0.9.0) von Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA, durchgeführt.

2.6.2.13 P1*kc*-Phagenlysatzgewinnung und Transduktion

Der Bakteriophage P1*kc* baut zu einem geringen Prozentsatz die DNA des Wirtes in Phagenköpfe ein, bevor die infizierten Zellen des Wirtes lysiert werden und Phagenpartikel freigesetzt werden. Ein Teil der Phagenpartikel enthält daher keine Phagen-DNA, sondern DNA von *E. coli*, die in andere Zellen injiziert werden kann. Durch Rekombination dieser Donor-DNA mit der genomischen DNA des Rezipienten kann es zur Transduktion von Eigenschaften kommen, auf die dann selektioniert werden kann. Um ein P1-Lysat des Stammes mit der später zu transduzierenden Eigenschaft zu erhalten, wurde eine ÜNK des Stammes in LB-Medium hergestellt (siehe 2.6.1). Je 100 µl dieser Kultur wurden mit 100 µl eines Phagenlysats (produziert im entsprechenden Wildtypstamm) in einem Zentrifugenröhrchen vermischt. Insgesamt wurden vier Ansätze hergestellt, wobei das Phagenlysat unverdünnt, 10²-fach, 10⁴-fach oder 10⁶-fach verdünnt in LB mit 2,5 mM CaCl₂ eingesetzt wurde. Nach einer Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur wurden 3 ml LB-Weichagar (0,7 % LE-Agarose oder Euro-Agar, beide inklusive 2,5 mM CaCl₂), der nach dem Aufkochen in der Mikrowelle im Wasserbad auf 50 °C abgekühlt wurde, zugegeben. Diese Mischung wurde sofort gründlich gemischt (Reax 2000 Mixer, Heidolph GmbH), auf LB-Nährböden gegossen und durch Schwenken homogen verteilt. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Orientierung war dabei so, dass sich der Weichagar oberhalb des Nährbodens befand. Am nächsten Tag wurde diejenige Platte, die eine konfluente Lyse zeigte, mit 4 ml LB-Medium überschichtet und für 10 min auf dem Schüttler (Edmund Bühler GmbH, Tübingen, Modell: Swip KS-10, 100 rpm) geschwenkt. Die Flüssigkeit wurde abgenommen und in ein Corex-Zentrifugenröhrchen gegeben. Nach der Zugabe von 0,5 ml Chloroform und Mischen (Reax 2000 Mixer, Heidolph GmbH) wurde zentrifugiert (SS34, 15000 rpm, 10 min, SORVALL Kühlzentrifuge, 4 °C). Der Überstand wurde abgenommen und die Prozedur ab Zugabe des Chloroforms ein zweites Mal wiederholt. Der Überstand wurde dann zur Lagerung in ein mit Schraubdeckel verschließbares Glasröhrchen gegeben und mit 50 µl Chloroform versetzt. Es wurde MgCl₂ zugegeben, so dass die Konzentration 10 mM MgCl₂ betrug. Für die Langzeitlagerung wurden die Phagenlysate bei 4 °C aufbewahrt. Auf die Bestimmung des Phagentiters wurde in allen Fällen verzichtet.

Für die eigentliche Transduktion wurde eine 5 ml ÜNK des zu transduzierenden Stammes in LB-Medium hergestellt. In vier parallelen Ansätzen wurde dann in Zentrifugenröhrchen je 1 ml der ÜNK zu 400 µl einer Verdünnung von Phagenlysate aus dem Donorstamm gegeben. Die Verdünnung des Phagenlysates erfolgte zuvor in LB-Medium mit 10 mM CaCl₂. Folgende Verdünnungsstufen wurden verwendet: unverdünnt, 10-, 100- und 1000-fach. Nach 20-minütiger Inkubation (Rollator TC-7 Rollordrum, Stufe 6, NBS) bei 37 °C wurde den vier Ansätzen je 3-5 ml P1-Saline zugesetzt und die Zellen wurden pelletiert (Megafuge, 4500 rpm, 5 min). Die Überstände wurden verworfen, die Zellen in je 1 ml P1-Saline resuspendiert und in insgesamt vier 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach erneuter Zentrifugation (Tischzentrifuge, 5 min, 5000 rpm) wurden die Überstände verworfen und die Zellen in je 1 ml LB-Medium resuspendiert und für 20 min bei 37 °C inkubiert (Rotator, neoLab). Zum Schluss wurde abermals zentrifugiert (Tischzentrifuge, 5 min, 5000 rpm) und die Überstände wurden abgegossen. Die vier Pellets wurden in dem jeweils verbliebenen Flüssigvolumen resuspendiert, auf vier LB-Agar Nährböden mit entsprechendem Antibiotikum plattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. In der Regel kam es zu einer Koloniebildung auf 3-4 Platten, wobei die Anzahl der Kolonien pro Platte mit steigender Verdünnung des Phagenlysates abnahm.

2.6.2.14 Transformation von *E. coli* mit Plasmiden

Um Plasmide in *E. coli* zu übertragen wurden nach dem TSS-Protokoll (*engl.* Transformation and Storage Solution) kompetente Zellen hergestellt ²¹⁸. Die Kompetenz wurde dabei chemisch, durch Behandlung mit Polyethylenglykol (PEG), induziert. Aus einer ÜNK in LB-Medium wurde eine 40 ml Kultur (250 ml Glaskolben ohne Schikanen) in LB-Medium 1:100 angeimpft. Nach einer zwei- bis dreistündigen Inkubation auf dem Schüttler bei 37 °C wurde eine Zelldichte von ungefähr 0,4 OD₆₀₀/ml erreicht. Der Glaskolben mit der Kultur wurde bis zur Zentrifugation auf Eis gestellt. Nach Überführung in SS34-Röhrchen wurden die Zellen pelletiert (Kühlzentrifuge SORVALL, 10 min, 4 °C, 4500 rpm). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 2 ml Eis-gekühlter Transformationslösung (TSS) resuspendiert und auf Eis gelagert. Jeweils 200 µl der Zellsuspension wurden zu 15 µl eines Ligationsansatzes oder zu 1 µl einer Plasmidpräparation pipettiert. Anschließend erfolgte eine

Inkubation auf Eis für 5-60 Minuten. Dann wurden die 1,5 ml Reaktionsgefäße für 60 s einer Hitzeschockbehandlung bei 42 °C im Wasserbad unterzogen, wonach sie sofort wieder auf Eis gelagert wurden. Die Ansätze wurden daraufhin in Glasröhrchen mit 2 ml LB-Medium gegeben und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert (Rollator TC-7 Rollordrum, Stufe 6, NBS). Zum Schluss wurden die Zellen abzentrifugiert (Megafuge, 4500 rpm, 5 min), der Überstand verworfen, die Zellen in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert und komplett auf LB-Nährböden mit entsprechenden Zusätzen ausplattiert. Falls Plasmide übertragen wurden, musste am Schluss nicht zentrifugiert werden, sondern es reichte aus, 50-100 µl der Zellsuspension direkt nach der einstündigen Inkubation zu plattieren. Als Positivkontrolle diente 1 ng pUC18-Plasmid-DNA und als Negativkontrolle wurden die kompetenten Zellen mit TE10.01 versetzt.

2.6.3 Biotransformationen im Kleinmaßstab

Zur Beurteilung der konstruierten Produktionsstämme wurden Biotransformationen im Kleinmaßstab durchgeführt, um die Succinatbildung aus Glycerin zu untersuchen. Aus einer 5 ml ÜNK in M9-Medium mit 0,4 % (w/v) Glukose und entsprechenden Antibiotika wurde eine Vorkultur angeimpft. Das Volumen der Vorkultur betrug 15 ml in einem 100 ml Kolben ohne Schikanen. Das Medium dieser Vorkultur war ebenfalls M9-Medium mit 0,4 % C-Quelle (Glycerin oder Glukose) und entsprechenden Antibiotika. Die Größe des Inokulums wurde so gewählt, dass die Zelldichte nach vierstündiger Inkubation bei 37 °C auf dem Schüttler mit 200 rpm zwischen 0,4 und 0,6 OD₆₀₀/ml betrug. Die Kolben wurden auf Eis gestellt, die Zellen in zwei Zentrifugenröhrchen pelletiert (5 min, 4500 rpm, Heraeus Megafuge 1.0) und in einem Volumen von 5 ml M9-Minimalmedium (ohne C-Quelle, ohne Antibiotika) resuspendiert und auf Eis gestellt. Es wurde die optische Dichte dieser Zellsuspension gemessen, um das Volumen für die Erstellung der Biotransformationslösung zu berechnen.

Konkrete Beispielansätze sind in den nächsten beiden Unterkapiteln aufgeführt. Die Ansätze wurden in einem 15 ml Plastikröhrchen mit Schraubdeckelverschluss zusammenpipettiert und bestanden aus der Zellsuspension, Minimalmedium, Natriumhydrogencarbonat, MOPS-Puffer (optional) und der C-Quelle (Glycerin oder Glukose). Nach der Zugabe von MOPS-Puffer, C-Quelle und Minimalmedium wurde die Zellsuspension zugegeben. Zuletzt erfolgte die

Zugabe von Natriumhydrogencarbonat. Das verschlossene Gefäß wurde zur besseren Durchmischung dreimal invertiert. Dabei wurde sehr behutsam und dennoch zügig vorgegangen, um das Ausgasen von CO₂ einzuschränken. Der Ansatz wurde dann in Reaktionsgefäße mit 1,5 ml Nennvolumen aliquotiert. In jedes Gefäß wurden 1,2 ml pipettiert und danach wurde es sofort fest verschlossen. Das tatsächliche Volumen der Gefäße wurde bestimmt und betrug 1,79 ml. Somit entsprechen 1,2 ml einem Flüssigvolumenanteil von 67 % am Gesamtvolumen. Das Restvolumen von 33 % ist die Gasphase. Einem der 1,5 ml Gefäße wurden 200 µl entnommen, um die tatsächliche Anfangszellichte zum Start des Experiments zu bestimmen. Der Rest wurde pelletiert (Tischzentrifuge, 5 min, 13000 rpm). Der verbliebene Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und für eine spätere HPLC-Analyse bei -20 °C eingefroren. Die restlichen Aliquots wurden in der Regel bei 37 °C inkubiert (Rotator, neoLab). Die Behandlung führte zu einer Invertierung der Gefäße, wobei der Mittelpunkt der Gefäße immer 10 cm von der Drehachse entfernt war, welche mit 10 Umdrehungen pro Minute rotierte. Zu vordefinierten Zeitpunkten wurde dann immer ein Gefäß entnommen und genauso verfahren wie mit dem ersten Gefäß.

2.6.3.1 Protokoll der Biotransformation mit MOPS- und Phosphatpufferung

Bei diesem Protokoll wurde der Biotransformationsansatz mit MOPS und Phosphat (enthalten im M9-Minimalmedium) gepuffert. Der Vorteil des Zusatzes von MOPS war eine größere Pufferkapazität. Als nachteilig stellte sich aber im Verlauf des Projektes heraus, dass bei Experimenten, die nach diesem Protokoll durchgeführt wurden, eine Vermessung im GC-MS-System am IBVT wegen MOPS nicht durchgeführt werden konnte. Außerdem konnte nach Umstieg auf eine andere Säule in der HPLC kein Ethanol mehr neben MOPS quantifiziert werden. Im Folgenden ist das Pipettierschema dargestellt.

Beispielexperiment: Kinetik mit 4 Zeitpunkten

Volumen	Stammlösung	Endkonzentration
600 µl	1 M MOPS pH7,20	100 mM
480 µl	1 M NaHCO ₃	80 mM
150 µl	20 % (w/v) Glycerin	0,5 % Glycerin / 54 mM

3 ml Zellsuspension à 1 OD₆₀₀/ml
 in M9 (1x) 0,5 OD₆₀₀/ml

ad 6 ml mit M9-Medium (1x). Der pH-Wert dieses Ansatzes betrug 7,25.

2.6.3.2 Protokoll der Biotransformation mit erhöhter Phosphatkonzentration ohne MOPS

Im Verlauf des Projektes wurde auf ein Minimalmedium ohne MOPS-Pufferung umgestellt, welches jeweils 100 mM Phosphat und 100 mM Hydrogencarbonat enthielt. Im Folgenden ist das Pipettierschema dargestellt.

Beispielexperiment: Kinetik mit 5 Zeitpunkten

Volumen	Stammlösung	Endkonzentration
720 µl	1 M NaHCO ₃	100 mM
180 µl	20 % (w/v) Glycerin	0,5 % Glycerin / 54 mM
3,6 ml	Zellsuspension à 1 OD ₆₀₀ /ml	
in M9hP (1,15x konzentriert)		0,5 OD ₆₀₀ /ml

ad 7,2 ml mit M9hP-Medium (1,15x konzentriert)

Die Endkonzentration in den Ansätzen entsprach dann unverdünntem M9hP-Medium (1x konzentriert) mit einer Phosphatkonzentration von 100 mM. Der pH-Wert dieses Ansatzes betrug 7,04. Das M9hP-Medium besteht aus einem größeren Anteil des saureren Salzes KH₂PO₄ im Vergleich zum gewöhnlichen M9-Medium. Durch Vereinigung mit basischer NaHCO₃-Lösung ergab sich dann der neutrale pH-Wert.

2.6.3.3 Berechnung des Verhältnisses Luftvolumen pro Zelle

Für das Experiment mit verschiedenen Zelldichten bei gleicher Verfügbarkeit von Sauerstoff pro Zelle (siehe 3.3.3) musste berechnet werden, welches Volumen die Zellsuspensionen mit verschiedenen vordefinierten Zelldichten in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß einnehmen müssen. Es wurde die Vereinfachung eingeführt, die im Flüssigmedium gelöste Sauerstoffmenge gegenüber der Sauerstoffmenge in der Gasphase zu vernachlässigen. Weiterhin wurde davon ausgegangen, dass die gemessene Zelldichte in OD₆₀₀/ml proportional zur Zellanzahl ist. Für

alle Zelldichten zwischen 0,5-10 OD₆₀₀/ml sollte das Verhältnis von Gasphasenvolumen (ml) zur Gesamtzellmenge (OD₆₀₀gesamt) 0,987 ml/OD₆₀₀gesamt betragen, wie es in dem Standardprotokoll mit 0,5 OD₆₀₀/ml und 1,2 ml Zellsuspension in einem Reaktionsgefäß mit dem Gesamtvolumen von 1,79 ml der Fall ist (siehe 2.6.3). Folgende Parameter und Variablen waren für die Berechnung erforderlich:

Flüssigvolumen (Zellsuspension) (ml) =	Variable A
Zelldichte (OD ₆₀₀ /ml) =	Parameter C
Gesamtzellmenge (OD ₆₀₀ gesamt) =	Variable D
Gesamtvolumen (ml) =	Parameter E
Gasphasenvolumen (ml) =	Variable B
Verhältnis Gasphasenvolumen zur Gesamtzellmenge	Parameter F

Folgende Gleichungen wurden damit aufgestellt:

$$C \bullet A = D \quad \text{Gleichung 1}$$

$$E = A + B \quad \text{Gleichung 2}$$

$$B / D = F \quad \text{Gleichung 3}$$

Umformen der drei Gleichungen und Auflösen nach A (Flüssigvolumen) ergab:

$$A = E / (1 + C \bullet F) \quad \text{Gleichung 4}$$

Für die festgesetzten Parameter E (= 1,792 ml Gesamtvolumen) und F (Verhältnis Gasphasenvolumen zur Gesamtzellmenge = 0,987 ml/OD₆₀₀gesamt) siehe oben, ergaben sich folgende Zellsuspensionsvolumen: 902 µl (für 1,0 OD₆₀₀/ml), 517 µl (für 2,5 OD₆₀₀/ml), 302 µl (für 5,0 OD₆₀₀/ml) und 165 µl (für 10 OD₆₀₀/ml).

Bei der höchsten eingestellten Zelldichte von 10 OD₆₀₀/ml mussten in einem kleinen Volumen alle Komponenten der Biotransformation zusammenpipettiert werden. Dies ist eventuell der Grund dafür, dass es bei höheren Zelldichten zu größeren Abweichungen zwischen der

berechneten theoretischen Glycerinkonzentration zu Beginn des Experiments und der tatsächlich bei der HPLC-Analyse gemessenen Konzentration gekommen ist (siehe Tabelle 27).

2.6.4 Bestimmung der extrazellulären Metabolitkonzentrationen durch HPLC

Die extrazellulären Konzentrationen der in den Biotransformationen gebildeten Metabolite wurden durch HPLC-Analyse quantifiziert. Zuvor war eine Probenvorbereitung erforderlich.

2.6.4.1 Vorbereitung der Proben durch Phosphatfällung

In den Medien der Biotransformationen waren Phosphatanionen bis zu einer Konzentration von 100 mM vorhanden. Diese Phosphate hätten bei der nachfolgenden HPLC-Analyse gestört und mussten deswegen ausgefällt werden. Im Laufe des beschriebenen Protokolls wurde unlösliches MgNH_4PO_4 gebildet, welches abzentrifugiert werden konnte. Die aufgetauten Proben aus den Biotransformationen wurden mit H_2O (HPLC-Wasser Rotisol[®], HPLC Gradient Grade, Artikelnummer A511.3, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, auch für alle Folgeschritte) auf ein Volumen von 1 ml in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß verdünnt. Der Verdünnungsfaktor richtete sich nach der erwarteten Konzentration der Metabolite und lag zwischen 1 (unverdünnt) und 4. Zu dieser Lösung wurden zügig 45 μl 4M NH_3 ($\text{NH}_3/(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH10,2) und 100 μl 1,2 M MgSO_4 pipettiert.

Das Gefäß wurde geschlossen und der Inhalt sofort auf dem Mischer gemischt, bevor mit der nächsten Probe fortgefahren wurde. Nach einer fünfminütigen Inkubation der Proben wurde der Niederschlag (MgNH_4PO_4) abzentrifugiert (13000 rpm, 5 min, Eppendorf Zentrifuge 5430R) und es wurde durch Indikatorpapier überprüft, dass der pH-Wert mindestens 9 betrug. Anschließend wurden 500 μl des Überstandes in ein neues 1,5 ml Gefäß überführt. Diesem Überstand wurden 500 μl 0,1 M H_2SO_4 zugesetzt und es wurde wieder gemischt. Mit Indikatorpapier wurde überprüft, dass der pH-Wert nach diesem Schritt kleiner als 3 war. Nach fünfzehnminütiger Inkubation wurden die Proben für 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert und per Sichtkontrolle überprüft, dass keine Schwebstoffe vorhanden waren. Dann wurden 800 μl des Überstandes in braune Vials aus Glas gefüllt und per HPLC-analysiert.

2.6.4.2 HPLC-Analyse

Die HPLC-Analyse erfolgte durch Mira Lenfers-Lücker am Institut für Bioverfahrenstechnik (IBVT, Professor Dr.-Ing Takors). Für die Analyse wurde ein HPLC-System aus der 1200er Serie von Agilent Technologies verwendet. Die einzelnen Substanzen wurden mit einem Brechungsindexdetektor (RI-Detektor) nachgewiesen. Die Auftrennung der Metabolite durch die Trennsäule erfolgte isokratisch mit 5 mM Schwefelsäure als Laufmittel. Zum Schutz der Trennsäule wurde eine Vorsäule (Phenomenex, Security Guard Cartridge Kit) verwendet. Zu Beginn des Projektes wurde die Trennsäule REZEX ROA 300 x 7,8 mm eingesetzt, welche Ethanol und MOPS trennen konnte. Später wurde dann auf die kürzere Trennsäule (Ionenaffinitätschromatographiesäule REZEX ROA 250 x 4,6 mm von Phenomenex) umgestellt, die höhere Durchsatzraten ermöglichte. Allerdings hatte dies zur Folge, dass Ethanol und MOPS nicht mehr getrennt werden konnten. Zwischenzeitlich konnte daher der Metabolit Ethanol nicht mehr quantifiziert werden. Daher wurde im Verlauf des Projektes das Biotransformationsmedium angepasst, so dass auf die Verwendung von MOPS verzichtet werden konnte. Dies ermöglichte auch die spätere Vermessung der Proben in einem gekoppelten GC-MS-System. Folgende Metabolite konnten durch die HPLC-Analyse nebeneinander bestimmt werden: Glukose, Glycerin, Pyruvat, Succinat, Malat, Acetat, Laktat, Ethanol, Formiat und Fumarat. Die Konzentrationen der Metabolite in den vorbereiteten Proben wurden mit Hilfe einer Kalibrationsgeraden berechnet, die für Metabolitkonzentrationen zwischen 50 (teilweise auch 25) und 1000 mg l⁻¹ erstellt wurde.

2.6.5 Gaschromatographie und Massenspektrometrie der exkretierten Metabolite

Die Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC-MS-Analytik) erfolgte durch Lara Bogner und Dr. Oliver Vielhauer ebenfalls am Institut für Bioverfahrenstechnik (IBVT, Professor Dr.-Ing Takors). Die Rohdaten wurden von Maria Rahnert (IBVT) ausgewertet.

Für die Probenanalyse wurde das Quadrupol GC-MS-System Turbo Mass von Perkin Elmer verwendet. Nach Derivatisierung und Evaporation wurden die filtrierten Überstände aus den Biotransformationen in das System injiziert²¹⁹. Das Ziel der Messungen war die Bestimmung

der Massenisotopomer-Verteilung des gebildeten Succinats. Dabei wurden die Proben vor der MS-Analyse mit Hilfe eines Gaschromatographen (GC) getrennt.

Ein fiktives Molekül mit n C-Atomen, das nur aus Kohlenstoff besteht, kann durch MS in $n + 1$ (in relevanten Mengen gibt es nur ^{12}C - und ^{13}C -Atome) Massenisotopomere getrennt werden. Das Massenspektrum enthält somit nur Informationen über die Anzahl der im Molekül im Durchschnitt vorhandenen ^{12}C - und ^{13}C -Atome. Über deren Position kann keine Aussage getroffen werden. In der Realität sind die MS-Messwerte durch die Anwesenheit unterschiedlicher Isotope von Nicht-C-Atomen verschoben. Die gemessenen Moleküle bestehen aus dem zu untersuchenden Kohlenstoff-Skelett und den daran gebundenen Nicht-C-Skelett-Atomen (dazu zählen auch alle (C-)Atome der Derivatisierung). Diese Nicht-C-Skelett-Atome kommen in der natürlichen Verteilung ihrer Isotope vor (z. B. ^1H , ^2H , ^{16}O , ^{18}O). Die stabilen natürlichen Isotope führen zu einer Verschiebung der Massenisotopomeren-Verteilung zu höheren Massen.

Die Verschiebung der Massenisotopomeren-Verteilung nimmt mit der Anzahl der gebundenen Atome zu und kann nicht vernachlässigt werden. Um die ermittelte Massenisotopomeren-Verteilung auf das C-Skelett zu bereinigen, wurde das MS-Korrektur-Tool von S. A. Wahl benutzt ²²⁰. Dieses *MatLab*-Tool bereinigt das Massenspektrum mit Hilfe eines Korrekturalgorithmus. Durch die Eingabe des zu untersuchenden Metaboliten, seiner Fragmente, sowie der Derivatisierung in Form der chemischen Summenformeln, stellt das Programm zunächst eine Massenisotopeneffektenmatrix (MIEM) zusammen. Diese beschreibt die Verschiebung des Massenspektrums durch die natürlichen Isotope der Nicht-C-Skelett-Atome. Werden nun die Messdaten (m/q Werte mit den entsprechenden Intensitäten) eingegeben, errechnet es mit Hilfe der MIEM die korrigierten Intensitäten.

2.6.6 Wachstumskurven und Wachstumsraten

Für die Aufzeichnung von Wachstumskurven wurde eine Glycerindauerkultur auf einer Platte ausgestrichen und über Nacht inkubiert. Mit einer Kolonie wurde dann eine 5 ml Vorkultur in einem Zentrifugenröhrchen über Nacht bei 37 °C angezogen. Das Medium der Vorkultur war,

wenn nicht anders angegeben, M9-Minimalmedium mit 0,4 % (w/v) Glukose und entsprechenden Antibiotikazusätzen.

Am nächsten Morgen wurden diese Vorkulturen pelletiert (Megafuge, 4500 rpm, 5 min, RT), in 1 ml M9-Medium ohne C-Quelle resuspendiert und auf Eis gestellt. Nach Nephelometrie bei einer Wellenlänge von 600 nm (Photometer Genesys 10 Vis, Thermo Scientific) wurde das benötigte Volumen des Inokulums berechnet. In 100 ml Kolben ohne Schikanen wurden 15 ml M9-Medium vorgelegt (unabhängig von der Vorkultur bspw. mit Glycerin, Xylose oder Glukose) und mit so viel resuspendierten Zellen aus der Glukosevorkultur versetzt, dass die Zelldichte je nach Versuch zwischen 0,01 und 0,1 OD₆₀₀/ml lag.

Für das Wachstum im Kolben wurde, wenn nicht anders angegeben kein Antibiotikum mehr zugesetzt. Nach mehrmaligem Schwenken des Kolbens wurde die tatsächliche Zelldichte (OD₆₀₀/ml) gemessen und das Wachstum durch Inkubation im 37 °C Raum auf dem Schüttler (Gio Gyrotory® Shaker, NBS) bei ~200 rpm gestartet. In gleichmäßigen Abständen wurde der Verlauf des Wachstums verfolgt. Ab einer Zelldichte von 0,250 OD₆₀₀/ml wurde die Zellsuspension vor der Messung mit Wachstumsmedium verdünnt, um Proportionalität zwischen dem Messwert und dem vorhandenen Bakterientiter zu gewährleisten.

Um die Wachstumsrate μ (h⁻¹) zu bestimmen wurde der Bereich des exponentiellen Wachstums ausgewählt. Mindestens 4-6 Datenpunkte wurden für die Ermittlung herangezogen. Bei halblogarithmischer Auftragung konnte durch diese Datenpunkte eine Ausgleichsgerade gelegt werden. Dies wurde mit der Software Excel 2010 von Microsoft durchgeführt. Die Gleichung der Ausgleichsgeraden erscheint in der Form $y = a \cdot e^{\mu \cdot x}$, wobei die Variable x die Zeit in Stunden angibt. Der Parameter μ bzw. μ_{\max}^e ist die maximale Wachstumsrate pro Stunde zur Basis e. y ist in diesem Fall die optische Dichte bei 600 nm zu einem bestimmten Zeitpunkt. a ist die berechnete optische Dichte bei Beginn des Experiments, die aber für die Ermittlung der Wachstumsrate keine Relevanz hat. Ein Wert von 0,69 h⁻¹ für die Wachstumsrate μ entspricht beispielsweise einer Verdopplungszeit von 60 min.

2.6.7 Gezielte Gendeletionen mit dem λ -Red-System

2.6.7.1 Übersicht über das Protokoll für Gendeletionen

Mit der λ -Red-Rekombinationsmethode, die auf den Genen des *red*-Operons des Phagen Lambda basiert, können im Genom von *E. coli* basengenau gezielte Deletionen vorgenommen werden⁵⁷. Hierbei kommt es zu einer homologen Rekombination zwischen einer in die Zelle durch Elektroporation aufgenommenen Deletionskassette mit dem Genom. Die Deletionskassette ist ein doppelsträngiges DNA-Fragment, welches an den Enden kurze, circa 40 nt lange perfekte Homologien zu den gewünschten Stellen im Genom aufweist. Innerhalb dieser Sequenzen befindet sich auf der Deletionskassette ein von zwei FRT- oder *mrpS*-Sequenzen eingerahmtes Resistenzgen, um Klone zu identifizieren, die die Deletionskassette im Austausch mit der zu deletierenden natürlichen Sequenz integriert haben.

Der Selektionsmarker kann durch Transformation mit einem Helferplasmid wieder entfernt werden, welches für eine Rekombinase codiert. Die Aktivität der FLP-Rekombinase führt beispielsweise zu einer ortsspezifischen Rekombination zwischen zwei gleich orientierten FRT-Sequenzen. Dabei wird der Resistenzmarker ausgeschnitten und es verbleibt genau eine FRT-Sequenz im Genom, die Teil der sogenannten Narbensequenz ist. Alternativ führt die Rekombination mit der Rekombinase MrpA zu einer Rekombination zwischen zwei *mrpS*-Sequenzen. Die Vektoren, die zur Konstruktion der Deletionskassetten verwendet wurden sind so konstruiert, dass die Narbensequenz zur Expression eines kleinen Peptids führt. Somit bleibt der Leserahmen bestehen, falls man in einem Operon das erste Gen deletieren will und polare Effekte auf nachgeschaltete Gene des Operons vermeiden möchte. Das Deletieren von mehreren Genen in einem Stamm mit Deletionskassetten, die dieselbe Resistenz vermitteln, macht das Ausschneiden der Resistenz vor jeder neuen Deletion ebenfalls notwendig.

2.6.7.2 Herstellung der Deletionskassetten

Ausgehend von einem Vektor, der den gewünschten Resistenzmarker (Apramycin, Kanamycin oder Nourseothricin) umrahmt von Rekombinations-Sequenzen (FRT oder *mrpS*) enthielt, wurde eine PCR durchgeführt. Als Vorlage für die PCR diente der durch Restriktionsspaltung außerhalb der zu amplifizierenden Sequenz linearisierte Vektor, der

durch nachfolgende Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion gereinigt wurde. Dieser Schritt ist notwendig, um den Hintergrund an falschpositiven Kolonien nach der späteren Elektroporation der Kassetten gering zu halten. Die Primer für die PCR wurden in den meisten Fällen so gewählt, dass das 5'-Ende des vorwärts Primers mindestens 39 Nukleotide an Homologie zur Genomsequenz vor dem zu deletierenden Gen aufweist und mit ATG, dem Startcodon des Gens, endet. Weiter in 3'-Richtung folgt dann eine 17-20 nt lange Sequenz, die homolog zum PCR-template ist. Diese Sequenz befindet sich direkt vor den ortsspezifischen Rekombinationsstellen des Vektors und wird später zu einem Teil der Narbensequenz. Der Primer sollte nicht direkt an die ortsspezifische Rekombinationsstelle binden, weil andernfalls unerwünschte PCR Produkte entstehen würden, da der reverse Primer dann an die gleiche Stelle der Vorlage binden würde wie der vorwärts Primer. Die Sequenz des reversen Primers wurde analog ausgewählt, nur dass die zum Genom homologen Bereiche auf dem entsprechenden Stoppcodon enden und das 3'-Ende des Primers außerhalb der anderen ortsspezifischen Rekombinationssequenz hybridisieren kann.

Die PCRs wurden nach dem Phusion-Hot-Start-Protokoll mit zwei unterschiedlichen Annealingtemperaturen (siehe 2.6.2.4) und mit mehreren Verdünnungsstufen des Templates durchgeführt. Der Reaktionsansatz, welcher im Verhältnis zur eingesetzten Template Menge am meisten DNA ergab wurde direkt durch Elution mit H₂O gereinigt (siehe 2.6.2.5) und bei -20 °C zur weiteren Verwendung eingefroren. Auf eine zwischengeschaltete Reinigung des PCR Produktes durch Gelelektrophorese und Gelextraktion sollte verzichtet werden, da im direkten Vergleich der beiden Methoden sich eine erhebliche Reduktion der Rekombinationseffizienz gezeigt hat.

2.6.7.3 Elektroporation und Rekombination der Deletionskassetten

Eine frische ÜNK eines Stammes (bspw. WA66.1x) mit Plasmid pJOE6038.1 wurde 1:100 in einen 250 ml Kolben ohne Schikanen mit 40 ml LB-Medium und Chloramphenicol überimpft und bei 30 °C im Schüttler inkubiert. Nach 3,5 h oder einer OD₆₀₀/ml von ~0,30 wurde die Transkription der Rekombinasegene durch Zugabe von 0,4 % (w/v) L-Arabinose induziert und auf 37 °C weiterinkubiert (pJOE6038.1 hat ein Temperatur-sensitives Replikon und wird nach der Rekombination nicht mehr benötigt). Nach 1 h (OD₆₀₀/ml sollte zwischen 0,8 und

1,0 sein) wurde die Kultur auf Eis gestellt und dann für 10 min bei 4500 rpm in einem SS34 Rotor bei 4 °C zentrifugiert. Alle weiteren Schritte erfolgten unter permanenter Kühlung im Eisbad. Das Zellpellet wurde mit 30 ml vorgekühltem Wasser (Eisbad) gewaschen, indem man es mit einer 10 ml Glaspipette auf- und abpipettierte. Nach erneuter analoger Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 700 µl Wasser resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß umgefüllt. Für die Elektroporationen wurden dann 60 µl Zellen und 5 µl einer in H₂O gelösten Deletionskassette (20-200 ng DNA) verwendet. Die verwendeten 1,5 ml Reaktionsgefäße mit vorgelegter DNA wurden auf Eis gekühlt, bevor die Zellen dazugegeben wurden.

Die Zellsuspension inklusive DNA wurde nach dem Umfüllen in Elektroporationsküvetten elektroporiert (25 µF, 200 Ohm, 2,5 kV, GenePulser, BioRad), wobei die Küvetten vorher auf Eis gelagert wurden. Die Zeitkonstante bei dieser Einstellung lag bei 3,9 ms. Gleich nach dem elektrischen Puls wurde 1 ml vorgekühltes LB-Medium zugegeben und die komplette Suspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Danach erfolgte eine Inkubation bei 37 °C für 1-2 h (Rollator TC-7 Rollordrum, Stufe 6, NBS). Anschließend wurde auf LB-Platten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und zwar je Ansatz einmal 50 µl und einmal der komplette Rest (nach zwischenzeitlicher Konzentration durch Zentrifugation). Je nach Art der Deletionskassette und Qualität der präparierten Zellen konnten über Nacht mehrere Dutzend bis mehrere tausend Kolonien erhalten werden. Die erhaltenen Klone wurden dann anschließend durch genomische PCR auf die korrekte Integration der Deletionskassette überprüft (siehe 2.6.7.5). Zusätzlich wurde sichergestellt, dass das nicht mehr benötigte Temperatur-sensitive Plasmid pJOE6038.1 verlorengegangen ist, indem der Verlust der durch dieses Plasmid codierten Chloramphenicol-Resistenz überprüft wurde.

2.6.7.4 Ausschneiden der Resistenzen

Liegt eine verifizierte Gendeletion durch Austausch mit einem von Rekombinations-Sequenzen flankierten Resistenzgen vor, so kann dieses Resistenzgen durch Rekombination zwischen den *mrpS*- bzw. FRT-Sequenzen wieder ausgeschnitten werden. Der entsprechende Stamm wurde hierfür mit pCP20 (FRT) oder pJOE5555.1 (*mrpS*) transformiert und bei 30 °C mit entsprechenden Antibiotika inkubiert. Jeweils vier erhaltene Kolonien wurden dann bei

42 °C auf einer in vier Quadranten eingeteilten LB-Platte ohne Antibiotika vereinzelt. Falls mit pJOE5555.1 gearbeitet wurde, wurde dieser Platte noch 0,2 % (w/v) Rhamnose zugesetzt. Die Temperaturerhöhung auf 42 °C führte zum Verlust der Temperatur-sensitiven Plasmide. Weiterhin kam es zur Induktion der sequenzspezifischen Rekombinasen.

Von ca. 10-30 der erhaltenen Einzelkolonien wurde mit sterilen Zahnstochern Zellmaterial entnommen und auf insgesamt drei LB-Platten übertragen. Das Zellmaterial der jeweiligen Kolonie wurde zuerst auf eine Platte mit dem Antibiotikum, welches den Erhalt des Rekombinationsplasmids anzeigt, übertragen. Dann wurden mit dem gleichen Zahnstocher Zellen auf die entsprechende Position der zweiten Platte übertragen. Diese Platte enthielt das Antibiotikum, gegen welches die integrierte Deletionskassette eine Resistenz vermittelte. Die dritte Platte enthielt kein Antibiotikum. Als Kontrollen dienten der entsprechende Stamm, der nicht mit dem Rekombinationsplasmid transformiert wurde und der nicht resistente Stamm vor der Integration der Deletionskassette. Nach Inkubation bei 37 °C über Nacht, konnten Klone identifiziert werden, die nur noch auf der Platte ohne Antibiotika wuchsen. Diese Klone sollten sowohl das Plasmid, als auch die durch die Gendeletion vermittelte Resistenz, verloren haben. Dies wurde durch genomische PCR bestätigt (siehe 2.6.7.5).

2.6.7.5 Verifizierung der Deletionen durch genomische PCR

Jeder neu konstruierte Stamm wurde mittels genomischer PCR (siehe 2.6.2.4) überprüft. Die Primersequenzen wurden in der Regel so ausgewählt, dass sie etwa 200 Nukleotide entfernt von der interessierenden Gensequenz binden. Der erste Primer (vorwärts) bindet dabei vor der Sequenz und weist mit seinem 3'-Ende in Richtung derselben und der zweite Primer (revers) bindet nach der Sequenz und ist entgegengesetzt zum ersten Primer orientiert.

Bei der PCR können dann drei mögliche Produkte entstehen (Wildtyp, Deletion mit Resistenz gegen Antibiotikum, Deletion mit ausgeschnittener Resistenz), die wegen unterschiedlicher Längen leicht unterschieden werden können. Die PCRs wurden mit folgendem Programm durchgeführt:

PCR-Programm deltest:

Lid (*engl.* Deckel) 99 °C

94 °C 2:30 min

30x (94 °C 15 s, 50 °C 20 s, 72 °C 2:00 min)

72 °C 10 min, dann 4 °C bis zur Entnahme der Proben

Jede neue Primerkombination wurde beim ersten Versuch darauf getestet, dass mit einem Primer alleine keine PCR-Produkte mit dem Wildtyp als Template entstanden sind. Als Negativkontrolle wurde bei einer Reaktion mit beiden Primern kein Template zugesetzt und das gleiche Aliquot der für alle Reaktionen angesetzten Reaktionslösung verwendet. Beim Testen von Stämmen wurde immer der Wildtyp als Kontrolle mitgetestet. Die verwendeten Primersequenzen sind in Tabelle 14 aufgeführt. Die erwarteten PCR-Produktlängen für alle manipulierten Gene sind nachfolgend angegeben.

ΔdhA

Testprimer s5741/s4770:

Wildtyp = nicht möglich, da nur ein Primer an Wildtypsequenz bindet

$\Delta dhA::FRT-aac(3)IV-FRT$ = 1691 bp

$\Delta dhA::FRT$ = 403 bp

$\Delta poxB$

Testprimer s5715/s5716:

Wildtyp = 2492 bp

$\Delta poxB::FRT-aac(3)IV-FRT$ = 2148 bp

$\Delta poxB::FRT$ = 860 bp

$\Delta pflB$

Testprimer s5512/s5513:

Wildtyp = 2388 bp

$\Delta pflB::FRT-aac(3)IV-FRT$ = 1480 bp

$\Delta pflB::FRT$ = 192 bp (dieses Fragment konnte nicht erhalten werden)

Testprimer s5512/s5608:

s5608 bindet an den Narbenbereich vor der FRT-Stelle jedweder Deletion, die mit einer Deletionskassette gemacht wurde, die von pIJ773 abstammt. Ob die Apramycinresistenz noch vorhanden ist oder nicht spielt für die Primerbindung keine Rolle.

Wildtyp = nicht möglich, da nur ein Primer an Wildtypsequenz bindet

$\Delta pflB::FRT-aac(3)IV-FRT$ = 1495 bp

$\Delta pflB::FRT$ = 173 bp

Testprimer s5513/s4770:

Wildtyp = nicht möglich, da nur ein Primer an Wildtypsequenz bindet

$\Delta pflB::FRT-aac(3)IV-FRT = 1466$ bp
 $\Delta pflB::FRT = 178$ bp

$\Delta tdcE$

Testprimer s5747/s5748:

Wildtyp = 2433 bp

$\Delta tdcE::FRT-aac(3)IV-FRT = 1513$ bp

$\Delta tdcE::FRT = 225$ bp (wurde nicht überprüft, da kein entsprechender Stamm vorliegt)

$\Delta pykF$

Testprimer s5807/s5808:

Wildtyp = 2019 bp

$\Delta pykF::FRT-kan-FRT = 2264$ bp (Verdau durch *Tth111I* ergibt 1251 bp und 1013 bp)

$\Delta pykF::FRT = 883$ bp

$\Delta pykA$

Testprimer s5805/s5806:

Wildtyp = 2043 bp

$\Delta pykA::FRT-kan-FRT = 2234$ bp (Verdau durch *Tth111I* ergibt 1219 bp und 1015 bp)

$\Delta pykA::FRT = 841$ bp

Δpck

Testprimer s6150/s6151:

Wildtyp = 2549 bp

$\Delta pck::mrpS-nat1-mrpS = 2029$ bp

$\Delta pck::mrpS = 1007$ bp

Δppc

Testprimer s6325/s6326:

Wildtyp = 2793 bp

$\Delta ppc::mrpS-nat1-mrpS = 1244$ bp

$\Delta ppc::mrpS = 222$ bp (wurde nie überprüft, da kein entsprechender Stamm vorliegt)

$\Delta mgsA$

Testprimer s6323/s6324:

Wildtyp = 977 bp

$\Delta mgsA::mrpS-nat1-mrpS = 1662$ bp

$\Delta mgsA::mrpS = 599$ bp

Δpps

Testprimer s6563/s6564:

Wildtyp = 2576 bp

$\Delta pps::mrpS-nat1-mrpS = 1300$ bp

$\Delta pps::mrpS-aac(3)IV-mrpS = 1344$ bp

$\Delta pps::mrpS = 280$ bp (wurde nie überprüft, da kein entsprechender Stamm vorliegt)

$\Delta gldA$

Testprimer s6577/s6578:

Wildtyp = 1218 bp

$\Delta gldA::mrpS-nat1-mrpS$ = 1217 bp

$\Delta gldA::mrpS-aac(3)IV-mrpS$ = 1261 bp

$\Delta gldA::mrpS$ = 194 bp

$\Delta gldA732::FRT-kan-FRT$ = 1417 bp

$\Delta gldA732::FRT$ = 195 bp (wurde nie überprüft, da kein entsprechender Stamm vorliegt)

Die PCR-Fragmentgrößen des Wildtyps (1218 bp) und der Deletionen mit *mrpS*-Sequenzen (1217 bp und 1261 bp) sind im Agarosegel nicht zu unterscheiden. Daher mussten die Fragmente zur Verifizierung mit Restriktionsenzymen geschnitten werden, was dann unterscheidbare Muster für jeden Stammhintergrund ergab.

Tabelle 19: Überprüfung der Deletion von *gldA* durch genomische PCR.

Genotyp	Fragmentlänge des PCR-Produktes in bp nach Restriktionsverdau durch das jeweilige Enzym			
	unverdaut	<i>NcoI</i>	<i>AccI</i>	<i>XbaI</i>
<i>gldA</i> Wildtyp	1218	617 / 601	728 / 490	1218
$\Delta gldA::mrpS-aac(3)IV-mrpS$	1261	1261	1261	1066 / 115 / 80
$\Delta gldA::mrpS-nat1-mrpS$	1217	1002 / 215	1217	860 / 162 / 115 / 80

$\Delta ackA-pta$

Testprimer s6740/s6741:

Wildtyp = 3722 bp

$\Delta ackA-pta::mrpS-nat1-mrpS$ = 1403 bp

$\Delta ackA-pta::mrpS$ = 381 bp (wurde nie überprüft, da kein entsprechender Stamm vorliegt)

$\Delta sfcA$ (= $\Delta maeA$)

Testprimer s6791/s6769-1:

Wildtyp = 2101 bp

$\Delta sfcA::mrpS-nat1-mrpS$ = 1506 bp

$\Delta sfcA::mrpS$ = 484 bp (wurde nie überprüft, da kein entsprechender Stamm vorliegt)

$\Delta lipA$

Testprimer s6742/s6743:

Wildtyp = 1240 bp (Verdau mit *SfoI* keine Veränderung)

$\Delta lipA::mrpS-nat1-mrpS$ = 1377 bp (Verdau mit *SfoI* = 545, 470, 362 bp)

$\Delta lipA::mrpS$ = 355 bp

2.6.8 Aerobe Selektion auf schnelleres Wachstum auf Glycerin durch serielle Transfers

Aus einer Glycerindauerkultur wurde direkt eine 5 ml ÜNK in M9-Medium mit 0,2 % (w/v) Glc angeimpft und bei 37 °C inkubiert (Rollator TC-7 Rollordrum, Stufe 6, NBS). Diese Glukosevorkultur diente als Inokulum zum Start der Selektion auf schnelleres Wachstum in Minimalmedium mit Glycerin. Hierfür wurden in einem 500 ml Kolben ohne Schikanen 100 ml M9-Minimalmedium mit 0,4 % (w/v) Glycerin und Kanamycin (25 µg/ml) vorgelegt und die Inokulumgröße so gewählt, dass die Anfangszell-dichte 0,01 OD₆₀₀/ml betrug. Diese erste Kultur in Glycerin wurde als T1 (T für Transfer) bezeichnet und auf dem Schüttler inkubiert. Für T2 wurde die Kultur T1 als Inokulum verwendet, nachdem diese eine Zelldichte zwischen 0,8 und 1,2 OD₆₀₀/ml erreicht hatte.

Die Größe der Inokula wurde immer so gewählt, dass der neue Transfer unter Berücksichtigung der aktuellen Wachstumsrate der Mischkultur während des nächsten Tages eine Zelldichte von ~ 1 OD₆₀₀/ml erreichen konnte. So wurden beispielsweise am Anfang die Kulturen nur 100x verdünnt und 2 Tage inkubiert und zum Schluss des Experiments wurden die Kulturen 1000x verdünnt und nur 24 h oder über Nacht inkubiert. Ein Aliquot jeder Kultur wurde direkt vor dem Animpfen der darauffolgenden Kultur als Glycerindauerkultur GK gesichert, indem man 800 µl der Kultur mit 200 µl sterilem 100 %-igen Glycerin versetzte und in einem 2 ml Probenröhrchen bei -20 °C einlagerte. Um das Experiment bei auftretenden Problemen im aktuellen Kolben schnell wieder fortsetzen zu können, wurden zur Sicherheit immer die 500 ml Kolben von den zwei vorangegangenen Transfers bei 4 °C gelagert, bevor sie entsorgt wurden.

Zum genaueren Überprüfen der aktuellen Wachstumsrate und dem Fortschreiten des Experiments wurden in regelmäßigen Abständen Aliquots einer Kultur (sobald die Zelldichte mindestens 0,3 OD₆₀₀/ml betrug) entnommen und mit so viel frischem Medium versetzt, dass eine Wachstumskurve beginnend mit 0,1 OD₆₀₀/ml aufgenommen werden konnte. Da die Stämme Resistenzen für Kanamycin und Apramycin aufweisen, wurden diese Antibiotika den Kulturen zugesetzt, um die Wahrscheinlichkeit zu verringern, dass sich Kontaminationen manifestieren. Für die Transfers wurden diese Antibiotika abwechselnd verwendet. So gab es

beispielsweise T6 mit Apramycin (T6apra) und T7 mit Kanamycin (T7kan). Der kontinuierliche Fluss des Experiments (sofortiges Animpfen der neuen Kultur kurz vor Erreichen der stationären Phase der aktuellen Kultur) konnte nicht immer gewährleistet werden. In diesen Fällen wurde der Kolben des aktuellen Transfers bis zum Fortsetzen der Selektion bei 4 °C gelagert.

Bei den archivierten GKs ist unklar, ob es sich um Reinkulturen handelt, da verschiedene Mutationen zu verschiedenen Zeitpunkten auftreten können und es lange dauern kann bis sie sich, falls überhaupt, durchsetzen. Daher sollten diese GKs konsequenterweise als Glycerinmischkulturen (GMKs) bezeichnet werden. Zur Archivierung von Reinkulturen wurden entsprechende GMKs zweimal hintereinander auf LB-Platten mit Kanamycin oder Apramycin vereinzelt und dann wurde mit einer Kolonie eine ÜNK in LB-Medium mit Kanamycin oder Apramycin angeimpft und am nächsten Tag als GK archiviert.

3 Ergebnisse

3.1 Herstellung und Charakterisierung der Stämme

3.1.1 Herstellung der Stämme

Ausgehend von dem *Escherichia coli* Stamm IIG-WA66x, einem Abkömmling des ausführlich charakterisierten K12-Stammes BW25113 wurden sukzessiv Stämme mit mehreren Deletionen hergestellt, um damit die Succinatproduktion über die im Abschnitt 1.2 erläuterten Routen zu untersuchen. Der Stamm BW25113 eignet sich gut für die Deletion von Genen und wurde unter anderem für die Erstellung der KEIO-Stammsammlung verwendet⁶². Die genaue Historie aller Stämme ist der Tabelle 11 im Materialien- und Methodenteil zu entnehmen. Ebenso findet sich dort die genaue Beschreibung des Protokolls für die Einführung von Deletionen und deren Überprüfung durch genomische PCR. Hier soll nur auf die Besonderheiten und Abweichungen bei den durchgeführten Deletionen anhand einiger Beispielstämme eingegangen werden.

In der KEIO-Stammsammlung sind 3985 Stämme zusammengefasst, die jeweils eine Deletion eines nicht essentiellen Gens aufweisen. Die entsprechenden Gene sind durch eine von FRT-Sequenzen umrahmte Kanamycinresistenz ersetzt. Will man nun Stämme mit mehreren Deletionen erhalten, so müsste man die Kanamycinresistenz erst mit Hilfe des Plasmids pCP20 ausschneiden. Dieses Plasmid codiert für die Flp-Rekombinase, welche den Bereich zwischen zwei gleich orientierten FRT-Sequenzen ausschneiden kann. Erst nach dem Ausschneiden der Resistenz kann eine weitere Deletion durch die λ Red-Rekombinationsmethode oder durch P1-Transduktion eingeführt werden. Diese Methodik ist zeitaufwendig. Daher wurde bei diesem Projekt versucht die Anzahl der Arbeitsschritte beim Ausschneiden von Resistenzen zu verringern.

Man könnte auf das Ausschneiden verzichten, wenn die Deletionen mit Hilfe unterschiedlicher Selektionsmarker erstellt werden würden. Danach könnte man alle Resistenzen auf einmal ausschneiden, oder alternativ die akkumulierten Resistenzen im Genom belassen. Ersteres ist bei der Konstruktion von Stamm ss181 = WA66x $\Delta pykF::FRT$

$\Delta dhA::FRT \Delta poxB::FRT \Delta pflB::FRT$ gelungen, der nach dem Ausschneiden beider Resistenzen in nur einem Versuchsschritt aus dem Stamm ss174 = WA66x $\Delta pykF::FRT-kan-FRT \Delta dhA::FRT-aac(3)IV-FRT \Delta poxB::FRT \Delta pflB::FRT$ erhalten worden ist.

Nach jedem Ausschneiden einer Resistenz bleibt im Genom eine zusätzliche FRT-Sequenz zurück. Diese Sequenzen akkumulieren daher und es ist denkbar, dass es dann beim Ausschneiden der Resistenzen neu eingeführter Deletionen auch zu unerwünschten Rekombinationen kommen könnte. Je nach Orientierung der FRT-Sequenzen könnte es dann im Genom zu Inversionen oder Deletionen von größeren Bereichen kommen. Deswegen reichte es bei der Überprüfung eines neuen Stammes nicht aus, nur die zuletzt eingeführte Deletion per PCR zu überprüfen. Ein Problem dieser Art trat erstmals auf, als versucht wurde die Kanamycinresistenz des Stammes ss182 = WA66x $\Delta pykA::FRT-kan-FRT \Delta pykF::FRT \Delta dhA::FRT \Delta poxB::FRT \Delta pflB::FRT \Delta xthA::FRT$ auszuschneiden. Dieser Stamm weist bereits 7 FRT-Sequenzen auf. Die Kanamycinresistenz ging zwar wie erwartet verloren, allerdings konnte kein Klon isoliert werden, bei dessen Überprüfung durch PCR alle korrekten Banden auftraten. Es konnte auch nicht festgestellt werden, was im Genom passiert ist. Daher wurden diese Stämme nicht weiterverwendet.

Um dennoch weitere Deletionen in Stamm ss182 einführen zu können, wurde das Repertoire der möglichen Deletionskassetten erweitert. Anstelle des FRT-Flp Systems können auch andere ortsspezifische Rekombinationssysteme verwendet werden. Das *mrpS*-MrpA System wurde von Lydia Warth am IIG entwickelt, wobei *mrpS* die Sequenz ist, die spezifisch von der Rekombinase MrpA erkannt wird²²¹. Es wurden neue Plasmide hergestellt, mit denen Deletionskassetten erstellt werden können, die kompatibel zum *mrpS*-MrpA System sind und neue Selektionsmarker aufweisen. Diese Plasmide sind zusammen mit den anderen in dieser Arbeit verwendeten Plasmide in Tabelle 20 aufgeführt.

Tabelle 20: Plasmide zur Erstellung von Deletionskassetten.

Es sind die vorhandenen Plasmide zur Erstellung von Deletionskassetten durch PCR aufgeführt. Die Plasmide mit dem Präfix pSS wurden selbst konstruiert. Dabei sind verschiedene Resistenzgene von jeweils zwei gleich orientierten Rekombinationssequenzen umrahmt. *aac(3)IV* = Gen für Apramycinresistenz, *kan* = Gen für Kanamycinresistenz, *nat1* = Gen für Nourseothricinresistenz.

Plasmid	Resistenzgen und Rekombinations-Sequenz
pIJ773	FRT- <i>aac(3)IV</i> -FRT
pWA38.4	<i>mrpS-kan-mrpS</i>
pSS57.2	<i>mrpS-aac(3)IV-mrpS</i>
pSS55.11	<i>mrpS-nat1-mrpS</i>

Bei dem Versuch die chromosomale Region, in der *pps* durch ein Resistenzgen ersetzt wurde ($\Delta pps::mrpS-nat1-mrpS$), in den Stamm ss251 (u. a. $\Delta pykF::FRT$ $\Delta pykA::FRT-kan-FRT$) zu transduzieren, wurde ein Klon erhalten, der bei der Überprüfung durch PCR das Produkt des *pykF* Wildtyps ergab. Es scheint zum Verlust der *pykF* Deletion durch Kotransduktion der Wildtypsequenz von *pykF* mit $\Delta pps::mrpS-nat1-mrpS$ gekommen zu sein. Da die Gene *pykF* und *pps* nur 29.000 bp voneinander entfernt sind, ist dies sehr wahrscheinlich.

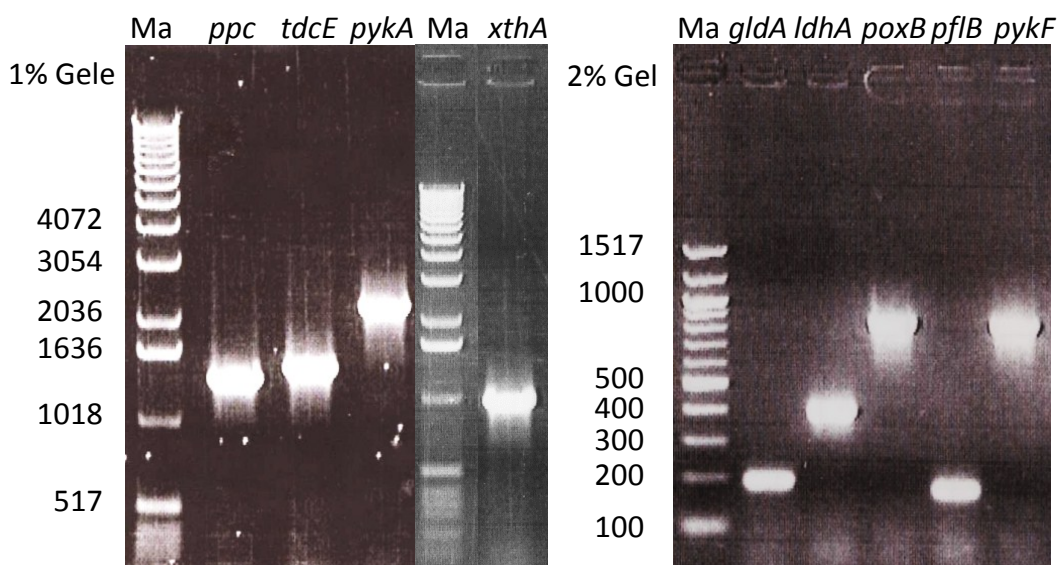


Abbildung 5: Überprüfung des Stammes ss374 auf Gendeletionen durch genomische PCR.

Mit einer Suspension von Zellen des Stammes ss374 wurden PCRs zur Überprüfung aller Deletionen durchgeführt. Ma = Längenstandard (links der einzelnen Banden sind die Größen in Basenpaaren angegeben). Im Folgenden sind die manipulierten Bereiche im Genom, in der Form (Sollzustand, Primer1/Primer2, erwartete Fragmentlänge in bp) aufgeführt: $\Delta ppc::mrpS-nat1-mrpS$, s6325/s6326, 1244; $\Delta tdcE::FRT-aac(3)IV-FRT$, s5748/s5725, 1480; $\Delta pykA::FRT-kan-FRT$, s5805/s5806, 2234; $\Delta xthA::FRT$, s6174/s6175, 1036; $\Delta gldA::mrpS$, s6577/s6578, 194; $\Delta ldhA::FRT$, s5741/s4770, 403; $\Delta poxB::FRT$, s5715/s5716, 860; $\Delta pflB::FRT$, s5513/s4770, 178; $\Delta pykF::FRT$, s5807/s5808, 883.

Zuletzt soll die Überprüfung der Stämme durch PCR gezeigt werden. Als Beispiel dient der Stamm ss374 = WA66.1 $\Delta ppc::mrpS-nat1-mrpS$ $\Delta gldA::mrpS$ $\Delta tdcE::FRT-aac(3)IV-FRT$ $\Delta pykA::FRT-kan-FRT$ $\Delta pykF::FRT$ $\Delta ldhA::FRT$ $\Delta poxB::FRT$ $\Delta pflB::FRT$ $\Delta xthA::FRT$, der 9 Deletionen und drei Resistenzen aufweist. Alle Deletionen wurden per PCR überprüft. In Abbildung 5 sind Agarosegele mit den aufgetragenen PCR-Produkten gezeigt. Die Größe aller PCR-Produkte entsprach den Erwartungen.

3.1.2 Wachstumsverhalten von Stämmen ohne LipA

Der Stamm ss303 ($\Delta lipA$ $\Delta poxB$ $\Delta pflB$) sollte zum Wachsen wegen der Deletion des Pyruvat-Oxidase-Gens *poxB*, des Pyruvat-Formiat-Lyase-Gens *pflB* und des Lipoatsynthese-Gens *lipA* entweder Liponsäure oder Acetat benötigen (siehe 1.2.3), da er ohne Liponsäurezusatz keinen funktionellen Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex mehr ausbilden kann. Erwartungsgemäß sind Kulturen von dem Stamm in M9-Minimalmedium mit 0,4 % (w/v) Glukosezusatz ohne Supplementation von Acetat oder Liponsäure nicht gewachsen (Daten nicht gezeigt).

Der Einfluss von Liponsäure auf das Wachstum wurde nun untersucht. Hierfür wurde eine 5 ml Übernachtskultur in M9-Minimalmedium mit 0,4 % (w/v) Glukose erstellt, die durch Zusatz von 2 ng/ml Liponsäure angewachsen ist. Die Kultur wurde dann zweimal mit Medium ohne Liponsäure gewaschen, um vorhandene Liponsäure möglichst komplett zu entfernen. Die erhaltene Zellsuspension diente als Inokulum für Kulturen mit verschiedenen Liponsäurekonzentrationen. Das Wachstum der Kulturen ist in Abbildung 6 dargestellt.

Ohne Zusatz von Liponsäure war erwartungsgemäß kaum Wachstum zu erkennen. Mit steigendem Zusatz von Liponsäure wurde das Wachstum immer besser. Ab einer Konzentration von 1 ng/ml schien Liponsäure nicht mehr limitierend zu sein, da das Wachstum mit 1 oder 2 ng/ml kaum mehr unterscheidbar war.

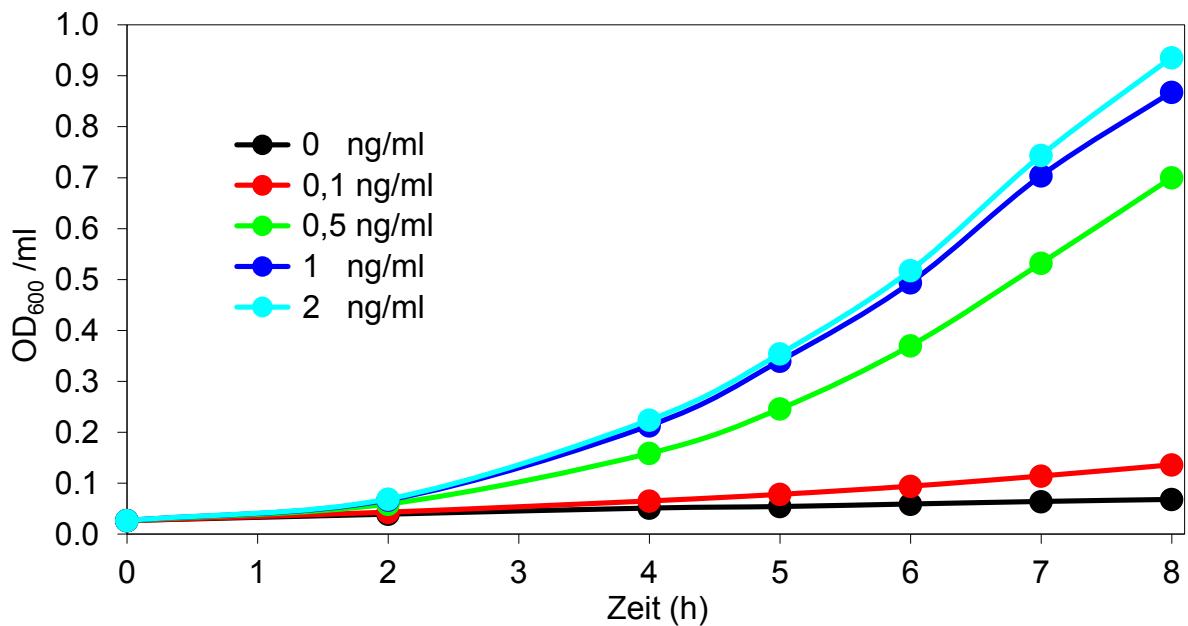


Abbildung 6: Einfluss von Liponsäure auf das Wachstum des Stammes ss303 in Minimalmedium.

Das Wachstum erfolgte bei 37 °C in M9-Minimalmedium mit 0,4 % (w/v) Glukose und mit der in der Legende angegebenen Menge Liponsäure. Die Vorkultur enthielt 2 ng/ml Liponsäure und wurde zweimal mit Medium ohne Liponsäure gewaschen. Dem Stamm ss303 fehlen drei Gene ($\Delta lipA \Delta poxB \Delta pflB$).

3.1.3 Wachstumsverhalten von Stämmen ohne Pyruvatkinasen auf Glycerin

Es wurden Stämme erstellt, die keine der beiden in *E. coli* codierten Pyruvatkinasen PykA und PykF mehr synthetisieren können, indem jeweils der komplette offene Leserahmen von *pykA* und *pykF* durch Resistenzgene ersetzt wurde. Die relevanten Ausschnitte der Stammbäume dieser Stämme sind in Abbildung 7 dargestellt.

Die Deletionen wurden in zwei unabhängige Stammhintergründe eingeführt. Zum einen wurde ein BW25113 Derivat (= ss173) verwendet, und zum anderen wurde der Stamm Lin43 manipuliert. Dieser Stamm ist auf Grund eines defekten Repressorallels *glpR22* konstitutiv für das Glycerin-Regulon und synthetisiert eine mutierte Glycerinkinase GlpK22 (G403S), die konstitutiv aktiv ist, indem sie keiner allosterischen Inhibition mehr unterliegt. Daher wächst dieser Stamm schneller als ein Wildtyp auf Glycerin ²²².

Ergebnisse

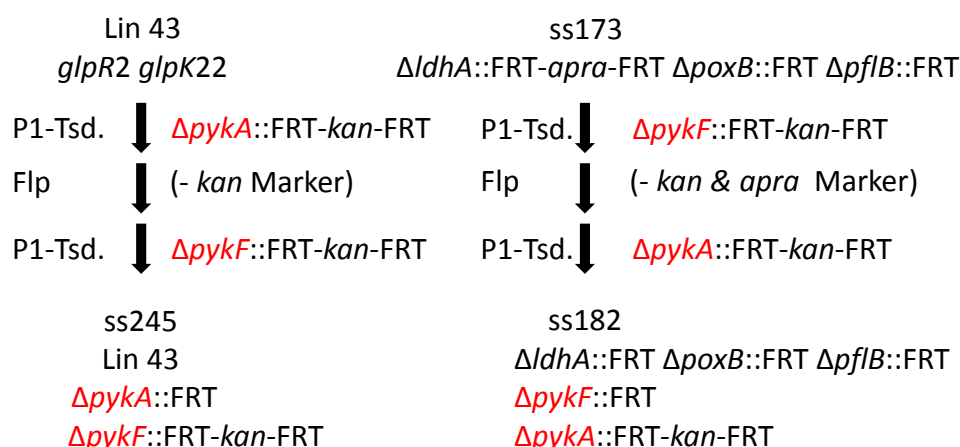


Abbildung 7: Konstruktion von Stämmen ohne Pyruvatkinasen.

P1-Tsd. = Transduktion von Genomregionen mit dem Phagen P1*kc*. Flp = ortsspezifische Rekombination zwischen zwei FRT-Sequenzen durch die Rekombinase Flp. Dadurch wurden die Resistenzgene ausgeschnitten.

Diese $\Delta pykA$ $\Delta pykF$ Stämme können PEP nicht mehr direkt in Pyruvat umwandeln. Wachsen diese Stämme auf einer C-Quelle wie Glycerin, die nicht über das PTS aufgenommen wird, ist auch dieser alternative Weg der Pyruvatentstehung nicht mehr möglich. Allerdings könnten sie theoretisch über die metabolische Umleitung PEP-OA-Mal-Pyr (= POMP-Weg) wieder Pyruvat synthetisieren. Der Abschnitt des POMP-Weges bis zum Malat ist auch der Zielweg zur Succinatproduktion über die ausschließlich PEP-carboxylierende Route (siehe 1.2.4).

Folglich wurde das Wachstum der erstellten Stämme getestet. Es zeigte sich, dass die Stämme vor und nach der Deletion der Pyruvatkinase-Gene auf Nährböden mit M9-Minimalmedium und Glukose nach 1-2 Tagen Kolonien bildeten. Nach Ausstrich dieser Kolonien auf M9-Platten mit Glycerin, bildeten sich nur bei den Stämmen mit noch vorhandenen Pyruvatkinasen Kolonien. Bei den $\Delta pykA$ $\Delta pykF$ Stämmen bildeten sich erst nach 3-4 Tagen Mikrokolonien, die gerade noch mit dem Auge zu sehen waren. Das Wachstum von allen Stämmen wurde daher genauer durch Aufnahme von Wachstumskurven in Flüssigmedium untersucht. Die Vorkulturen wurden immer in M9-Medium mit 0,4 % (w/v) Glukose angeimpft. Nach Waschen der Zellen in Medium ohne C-Quelle wurden dann die Wachstumsraten in Glukose (Glc) und Glycerin (Gro) bestimmt. In Tabelle 21 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Man kann erkennen, dass die Stämme vor den Deletionen der Pyruvatkinase-Gene auf Glycerin gut gewachsen sind. Im Gegensatz dazu haben sich die

Wachstumsraten auf Gro nach den Deletionen stark verringert. Auf Glc wuchsen die Stämme mit den Deletionen schneller als die Vorgängerstämme auf Gro gewachsen sind. Die Fähigkeit in Minimalmedium zu wachsen ist folglich durch die Manipulationen im Genom nicht verlorengegangen.

Tabelle 21: Wachstumsraten von Stämmen ohne Pyruvatkinaseaktivitäten im Vergleich zu den Vorgängern.

Wachstumsraten wurden in M9-Medium mit Glukose oder Glycerin bei 37 °C ermittelt. Dargestellt ist die Wachstumsrate μ (h^{-1}) inklusive Standardabweichung. In Klammern steht die Anzahl der durchgeführten Versuche. -- = nicht gemessen

Stamm (relevanter Genotyp)	Wachstumsrate μ (h^{-1})	
	Glukose 0,4 % (w/v)	Glycerin 0,4 % (w/v)
ss173	--	0,33 \pm 0,03 (2x)
ss182 (= ss173 Δ pykAF)	0,56 (1x)	0,10 \pm 0,01 (2x)
Lin43 (<i>glpR</i> , <i>glpK22</i>)	--	0,46 \pm 0,01 (2x)
ss245 (= Lin43 Δ pykAF)	0,49 (1x)	0,09 \pm 0,01 (2x)

3.1.4 Versuch der Beseitigung des Wachstumsdefekts auf Glycerin und Auftreten von Spontanmutationen

Nach den Deletionen der Pyruvatkinase-Gene ist ein Wachstumsproblem auf Glycerin aufgetreten. Daher wurde versucht durch Aktivierung oder Verstärkung des vermutlich zum Wachstum erforderlichen POMP-Wegs wieder eine schnellere Wachstumsrate zu erhalten. Durch Transformationen der Stämme mit verschiedenen Kombinationen von Plasmiden, die für homologe und heterologe (mit anderer allosterischer Regulation) PEP-Carboxylasen und / oder Malic-Enzyme codieren, wurde versucht den POMP-Weg gezielt zu aktivieren. Diese transformierten Stämme wuchsen in keinem Fall besser als die Ausgangsstämme (Daten nicht gezeigt). Der Versuch über diese Strategie die Defizienz der Pyruvatkinasen zu kompensieren schlug fehl.

Allerdings traten spontane Mutanten auf, die auf Glycerin schneller wachsen konnten als ihre Vorgänger. Diese Mutanten wurden nach zweifacher Vereinzlung auf Platten isoliert und als Glycerinkulturen archiviert (ss248, ss249 und ss250). Durch genomische PCR wurden die Identitäten dieser neuen Stämme bezüglich der Pyruvatkinase-Deletionen erneut überprüft.

Ergebnisse

Die Wachstumsraten dieser Stämme sind in Tabelle 22 dargestellt. Nun wird kurz die Historie dieser Stämme beschrieben.

Tabelle 22: Wachstumsraten von Stämmen ohne Pyruvatkinasen und deren Mutanten.

Wachstumsraten wurden in M9-Medium mit Glukose oder Glycerin als C-Quelle bei 37 °C ermittelt. Dargestellt ist die Wachstumsrate μ (h^{-1}) inklusive Standardabweichung. In Klammern steht die Anzahl der durchgeführten Versuche. -- = nicht gemessen, * = mutierter Stamm

Stamm (relevanter Genotyp)	Wachstumsrate μ (h^{-1})	
	Glukose 0,4 % (w/v)	Glycerin 0,4 % (w/v)
ss182 (= ss173 $\Delta pykAF$)	0,56 (1x)	0,10 \pm 0,01 (2x)
ss248 (ss182*)	--	0,26 \pm 0,01 (3x)
ss249 (ss182*)	0,55 (1x)	0,28 \pm 0,01 (4x)
ss250 (ss237* $\Delta pykAF \Delta pck$)	0,55 (1x)	0,29 (1x)

Die isolierte Mutante ss250 ist ein Abkömmling von ss237, einem Stamm, der neben den Pyruvatkinasen auch die PEP-Carboxykinase (Pck) wie in Abbildung 10 dargestellt, deletiert hat. Somit ist ein Verlust von ATP durch Umwandlung von PEP in Oxalacetat durch die Ppc und Rückreaktion durch die ATP-hydrolysierende Pck nicht mehr möglich. Dennoch ist der Stamm ss237 auf M9-Platten mit Glycerin ebenfalls kaum gewachsen. In einer Flüssigkultur mit M9-Medium und Glycerin trat allerdings nach 4 Tagen eine leichte Trübung auf. Nach Vereinzelung dieser Kultur auf einer Platte mit M9-Minimalmedium und Glycerin und anschließend auf einer Platte mit Glukose wurde die Mutante als ss250 archiviert.

Die isolierten Mutanten ss248 und ss249 stammen von ss182 ab, der mit Plasmiden, die für die Ppc von *Pseudomonas putida* und das Malic-Enzym SfcA von *E. coli* codieren, transformiert wurde. Nach dem Ausstrich auf M9-Platten mit Glycerin ohne die Antibiotika, für die die Plasmide Resistenzen vermitteln, bildeten sich vereinzelt Kolonien. Davon wurde die größte Kolonie ausgewählt und erneut vereinzelt. Danach wurden getrennt voneinander zwei verschiedene Kolonien vereinzelt. Es wurde deswegen in zwei Linien aufgeteilt, weil die Kolonien einen uneinheitlichen Phänotyp zeigten (große und mittelgroße Kolonien). Nach dieser letzten Vereinzelung waren die Kolonien beider Linien aber ununterscheidbar und wurden als ss248 und ss249 archiviert. Falls es bei der letzten Vereinzelung zu keinen weiteren Mutationen gekommen ist, sollten ss248 und ss249 identisch sein. Die ehemals

enthaltenen Plasmide sind verloren gegangen, was durch Plasmidpräparationen überprüft wurde. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass es zu Rekombinationen oder Integrationen von Plasmidsequenzen in das Chromosom gekommen ist.

Offensichtlich können von Stämmen ohne Pyruvatkinasen leicht Mutanten erhalten werden, die auf Glycerin im Gegensatz zu Ihren Vorgängern gut wachsen können. Im nächsten Abschnitt wird ein Experiment beschrieben, bei dem gezielt auf höhere Wachstumsraten selektioniert wurde.

3.2 Aerobe Selektion der $\Delta pykA \Delta pykF$ Stämme auf Glycerin und Charakterisierung der Mutanten

Um weitere unabhängige Mutanten zu erhalten und um Aufschluss über die zeitliche Verbesserung der Wachstumsraten zu bekommen, wurden zwei Selektionsexperimente parallel durchgeführt (siehe 2.6.8). Diese Selektion auf schnelleres Wachstum fand im Aeroben statt, wobei das Endziel aber eine Succinatproduktion im Anaeroben war. In Abbildung 8 ist der Verlauf dieser zwei Experimente dargestellt.

Beginnend mit einer Flüssigkultur der Stämme ss195 und ss237 in M9-Minimalmedium mit Glukose wurde eine Kultur in Minimalmedium mit Glycerin auf eine Zelldichte von 0,01 OD₆₀₀/ml angeimpft. Diese Kultur T1 (T für Transfer) wurde nach Erreichen einer Zelldichte zwischen 0,8 und 1,2 OD₆₀₀/ml durch Beimpfen von frischem Medium in einem neuen Kolben verdünnt, wodurch T2 erhalten wurde. Dieses Vorgehen erfolgte bis T16, wobei die Kulturen abwechselnd Kanamycin oder Apramycin enthielten. Von den Mischpopulationen ausgewählter Kulturen wurden Aliquots entnommen und direkt im Anschluss die Wachstumsraten ermittelt. Dies ist in Abbildung 9 dargestellt. Man kann erkennen, dass die Wachstumsraten zwischen manchen Transfers sprunghaft angestiegen sind. Das Experiment wurde mit einer Wachstumsrate im Bereich von $\mu = 0,11 \text{ h}^{-1}$ begonnen und mit einer Wachstumsrate von $\mu = 0,48 \text{ h}^{-1}$ beendet. Nach der Vereinzlung und Archivierung der Stämme des letzten Transfers (ss251 = ss195 T16 und ss253 = ss237 T16) konnten keine derart hohen Wachstumsraten mehr erreicht werden. Die Wachstumsrate von ss251 betrug $0,28 \text{ h}^{-1}$ und die von ss253 betrug $0,33 \text{ h}^{-1}$ (siehe Tabelle 23).

Ergebnisse

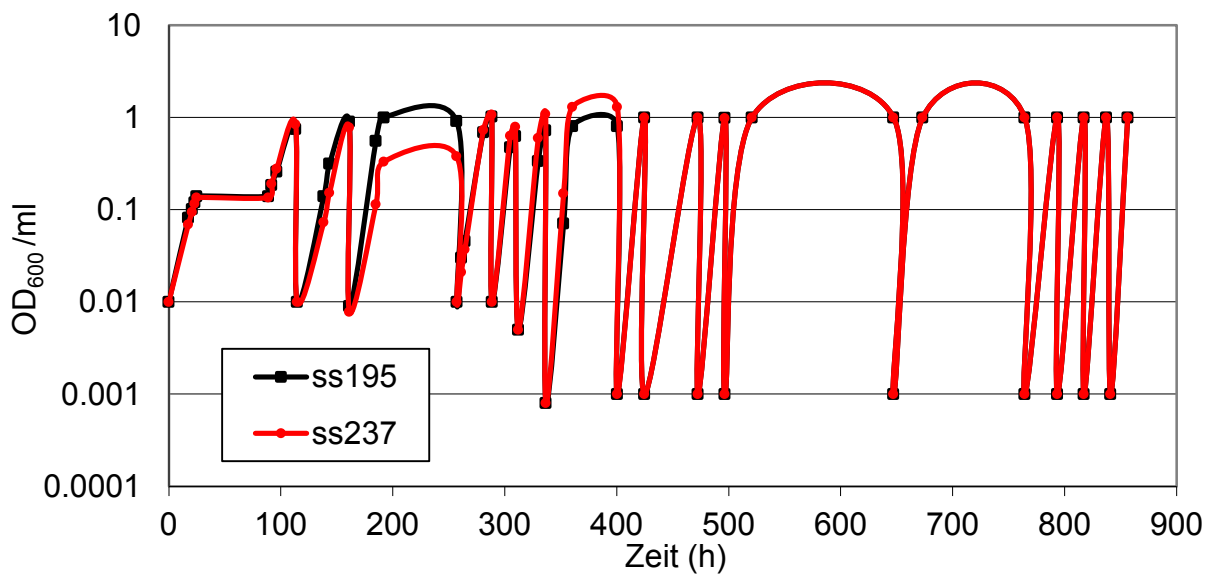


Abbildung 8: Verlauf der Selektion auf schnelleres Wachstum in M9-Minimalmedium mit Glycerin.

Kulturen der Stämme ss195 und ss237 (beide ohne Pyruvatkinasen) wurden nach Erreichen einer Zelldichte von ungefähr 1 OD₆₀₀/ml in M9-Medium mit 0,4 % (w/v) Glycerin in neue Kolben mit frischem Medium verdünnt. Insgesamt wurden 16 Transfers durchgeführt. Bis zum Zeitpunkt $t = 400$ h sind alle eingetragenen Werte gemessen worden. Ab $t = 400$ h wurde immer 1000 x verdünnt (vorher 100x) und die eingetragenen Werte der Zelldichte sind geschätzt.

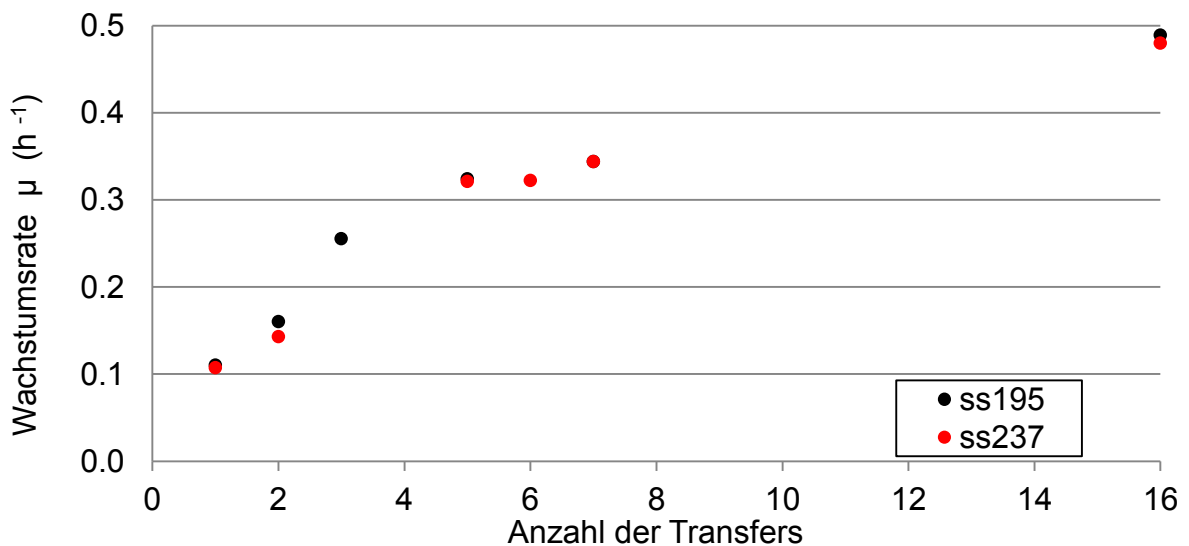


Abbildung 9: Wachstumsraten ausgewählter Mischpopulationen des Selektionsexperiments.

Die Bestimmung der Wachstumsraten erfolgte bei 37 °C in M9-Minimalmedium mit 0,5 % (w/v) Glycerin als C-Quelle. Aliquots aus dem laufenden Selektionsexperiment wurden direkt als Inokulum zur Bestimmung der Wachstumsraten verwendet.

Es wurden weitere Deletionen durch P1-Transduktionen in die durch die Selektion erhaltenen Stämme eingeführt, um die Mutanten und deren Stoffwechselwege genauer zu charakterisieren. Der Stammbaum aller dieser Stämme ist in Abbildung 10 veranschaulicht.

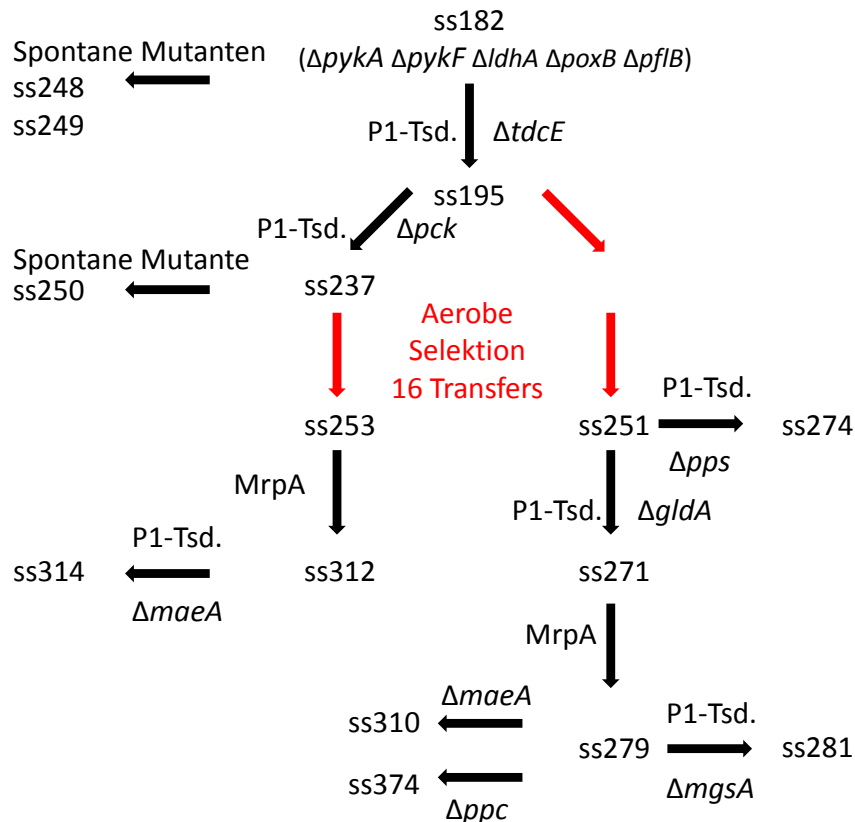


Abbildung 10: Stammbaum von $\Delta pykA \Delta pykF$ Stämmen vor und nach der aeroben Selektion auf Glycerin. P1-Tsd. = Transduktion von Deletionen mit dem Phagen P1*kc*. MrpA = Ausschneiden von Resistenzgenen zwischen zwei *mrpS*-Sequenzen durch die Rekombinase MrpA, um erneute Selektion auf die Resistenz nach nochmaliger P1-Transduktion zu ermöglichen.

So wurde zum einen in beiden erhaltenen Stämmen das Gen *maeA* für das Malic-Enzym A deletiert, um dessen Einfluss auf das Wachstum zu erkennen (ss310 und ss314). Zum anderen wurden basierend auf dem Stamm ss251 diverse weitere Gene deletiert, die entweder zum POMP-Weg (Δppc in ss374) beitragen oder für alternative Wege der Pyruvatentstehung codieren (Δpps in ss274, $\Delta mgsA$ in ss281). Von den Stämmen wurden die Wachstumsraten auf Glukose und Glycerin, teilweise auch auf Xylose bestimmt. Die Wachstumsraten sind in Tabelle 23 aufgelistet.

Ergebnisse

Tabelle 23: Wachstumsraten von auf Glycerin selektierten Stämmen ohne Pyruvatkinaseaktivitäten, deren Nachfolgern und dem letzten gemeinsamen Vorgänger.

Wachstumsraten wurden in M9-Medium mit Glukose, Glycerin oder Xylose bei 37 °C ermittelt. Dargestellt ist die Wachstumsrate μ (h^{-1}) inklusive Standardabweichung. In Klammern steht die Anzahl der durchgeführten Versuche. Symbol: -- = nicht gemessen, * = mutierter Stamm.

Stamm (relevanter Genotyp, Kurzbeschreibung)	Wachstumsrate μ (h^{-1})		
	Glukose 0,4 %	Glycerin 0,4 %	Xylose 0,4 %
ss195 ($\Delta pykAF$, letzter gemeinsamer Vorgänger)	0,52 \pm 0,01 (2x)	0,09 \pm 0,01 (2x)	0,15 \pm 0,01 (2x)
ss251 (ss195* Transfer16)	0,56 \pm 0,01 (3x)	0,28 \pm 0,02 (4x)	--
ss253 (ss237* Transfer16)	0,54 (1x)	0,33 (1x)	--
ss314 (ss253 $\Delta maeA$)	0,49 \pm 0,02 (2x)	0,09 \pm 0,01 (3x)	--
ss274 (ss251 Δpps)	0,53 (1x)	0,26 (1x)	--
ss271 (ss251 $\Delta gldA$)	0,57 \pm 0,02 (3x)	0,26 \pm 0,01 (3x)	--
ss279 (ss271 ohne Resistenmarker)	0,49 \pm 0,01 (2x)	0,28 \pm 0,01 (2x)	0,17 \pm 0,02 (2x)
ss281 (ss279 $\Delta mgsA$)	0,52 (1x)	0,25 (1x)	--
ss310 (ss279 $\Delta maeA$)	0,50 \pm 0,01 (2x)	0,09 \pm 0,01 (2x)	--
ss374 (ss279 Δppc)	--	kein Wachstum	--

Aus der Tabelle ist ersichtlich, dass sich durch die Selektion in den beiden parallelen Experimenten, die zu ss251 und ss253 geführt haben, die Wachstumsraten auf Glycerin um den Faktor 3-4 verbessert haben. Die Wachstumsraten auf Glukose haben sich durch alle Manipulationen und durch die Selektion nur unwesentlich verändert. Die höchste gemessene Wachstumsrate mit Glukose betrug $0,57 \text{ h}^{-1}$ (ss271) und die niedrigste $0,49 \text{ h}^{-1}$ (ss279), was einem Unterschied von 16 % entspricht. Die Deletion von *maeA* in den beiden Endstämmen der Selektion (ss251 und ss253) hatte eine große Auswirkung auf die Wachstumsrate in Minimalmedium mit Glycerin. Sie fiel wieder auf das Niveau von ss195 ($\mu = 0,09 \text{ h}^{-1}$) vor der Selektion zurück und betrug bei den beiden Stämmen ss310 und ss314 ebenfalls $0,09 \text{ h}^{-1}$. Dies ist anschaulich in Abbildung 11 gezeigt. Alle anderen Deletionen mit Ausnahme der *ppc* Deletion in ss374 beeinflussten die Wachstumsrate in Minimalmedium mit Glycerin nur unwesentlich.

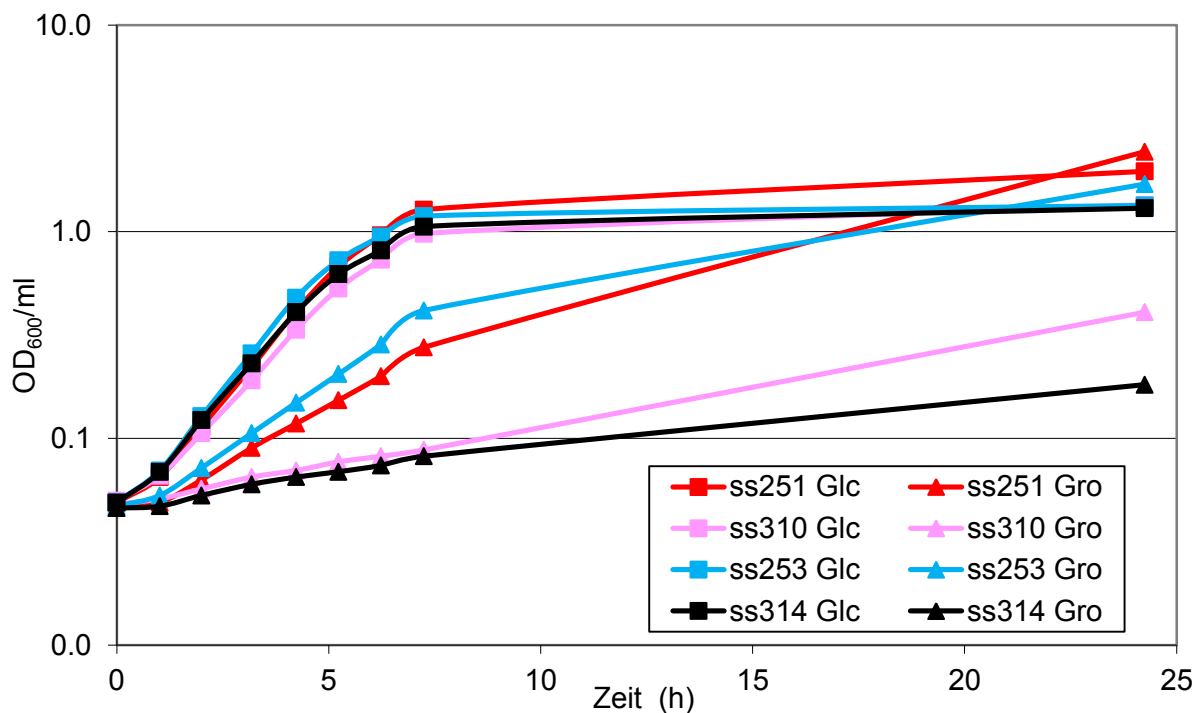


Abbildung 11: Wachstumskurven von auf Glycerin selektionierten $\Delta pykAF$ Stämmen und deren $\Delta maeA$ Nachfolgern mit Glukose oder Glycerin als C-Quelle.

Das Wachstum erfolgte bei 37 °C in M9-Minimalmedium mit jeweils 0,4 % (w/v) Glukose (Glc) oder Glycerin (Gro). ss251 = ss195*T16, ss310 = ss251 $\Delta maeA$, ss253 = ss237*T16, ss314 = ss253 $\Delta maeA$.

Der C5-Zucker Xylose wird nicht über das PTS aufgenommen. Deswegen entsteht bei dem Transport in die Zelle auch kein Pyruvat aus PEP wie das bei Glukose der Fall ist. Xylose wird über den Pentosephosphatweg in die Glykolyse eingeschleust²²³⁻²²⁶. Das schließlich gebildete PEP kann dann in den Stämmen ohne Pyruvatkinasen ebensowenig direkt in Pyruvat umgewandelt werden wie das aus Glycerin entstandene PEP. Die Pyruvatbildung der Stämme ohne Pyruvatkinasen sollte daher mit Xylose als C-Quelle auch über den POMP-Weg verlaufen. Es ist denkbar, dass die auf Glycerin selektionierten Stämme durch die Aktivierung des POMP-Weges auch auf Xylose schneller wachsen können als die Vorgängerstämme. Dies war aber nicht der Fall, da der Stamm ss195 vor der Selektion eine Wachstumsrate von $0,15 \text{ h}^{-1}$ auf Xylose hatte, die in etwa der Wachstumsrate von $0,17 \text{ h}^{-1}$ des Stammes ss279 mehrere Schritte nach der Selektion entsprach.

Der Stamm ss374 (= ss279 Δppc) zeigte in Minimalmedium mit Glycerin keinerlei Wachstum nach 24 h. Eine Supplementation von NaHCO_3 in Konzentrationen von bis zu 100 mM

änderte daran nichts (Daten nicht gezeigt). Theoretisch sollte bei hohen CO₂-Konzentrationen auch die Pck ein Wachstum über den POMP-Weg (siehe 1.2.4) vermitteln können, wenn das Gen *ppc* deletiert ist. Daher wurden analog zu den Biotransformationen (siehe 2.6.3) Zellsuspensionen in verschließbaren Plastikgefäßen angesetzt, um das Ausgasen von CO₂ zu verhindern. Abweichend zu den Biotransformationen wurde hier auf 15 ml Plastikröhrchen mit Schraubkappen hochskaliert, die zusätzlich noch mit Parafilm abgedichtet wurden. Das Flüssigvolumen betrug in diesen Fällen 10 ml und das Gesamtvolumen 15 ml. So konnte der Stamm ss374 erneut auf Wachstum getestet werden.

Zusätzlich wurde der Stamm mit Plasmiden transformiert, die für die *E. coli* eigene Pck und diverse heterologe Pcks codieren. Die Zellsuspensionen wurden 24 h lang bei 37 °C inkubiert und danach wurden die erreichten Zelldichten bestimmt. In Tabelle 24 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Die Zelldichte hat bei allen Experimenten um den Faktor 3-9 zugenommen. Somit ist das Wachstum von ss374 in Minimalmedium mit Glycerin prinzipiell möglich, was gezeigt werden sollte. Für genauere Analysen bedarf es aber einer Charakterisierung im Fermenter, um die vielen Nachteile (bspw. begrenzter Sauerstoffvorrat) des dafür aber einfachen Systems zu beseitigen.

Tabelle 24: Wachstum von Stamm ss374 in M9-Minimalmedium mit Glycerin als C-Quelle.

10 ml einer Zellsuspension in Minimalmedium mit 0,5 % (w/v) Glycerin und 100 mM NaHCO₃ wurden in einem luftdicht verschlossenen Plastikröhrchen mit 15 ml Gesamtvolumen für 24 h bei 37 °C inkubiert. Die Plasmide codieren für diverse PEP-Carboxkinasen. Dem Stamm ss374 (siehe Abbildung 10) fehlen unter anderem die Gene für die Synthese von Pyruvatkinasen und der PEP-Carboxylase.

Stamm / Plasmid	Anfangszelldichte in OD ₆₀₀ /ml	Zelldichte nach 24 h in OD ₆₀₀ /ml
ss374 ^a ohne Plasmid	0,05	0,35
ss374 pMG200 ^b	0,05	0,17
ss374 pSS61.13 ^c	0,05	0,44
ss374 pSS69.1 ^d	0,05	0,35
ss374 pSS70.8 ^e	0,05	0,37

^a = $\Delta ppc \Delta pykA \Delta pykF \Delta gldA \Delta tdcE \Delta ldhA \Delta poxB \Delta pflB \Delta xthA$

^b = pMG200 Expression von *pckA* aus *R. palustris* durch den entsprechenden Promotor aus *R. palustris*

^c = pSS61.13 Expression von *pckA* aus *R. palustris* durch den *E. coli* Promotor *PglpFK*

^d = pSS69.1 Expression von *pck* aus *E. coli* durch den natürlichen Promotor (inklusive FruR-Bindestelle)

^e = pSS70.8 Expression von *pck* aus *E. coli* durch den natürlichen Promotor (ohne FruR-Bindestelle)

3.3 Entwicklung der Biotransformation im Kleinmaßstab

Um eine Vielzahl unterschiedlicher Strategien für die Succinatproduktion testen zu können (Einfluss einzelner Gendelektionen, Einfluss von Plasmid-codierten Enzymen, Einfluss der CO₂-Konzentration, etc.) war es erforderlich, ein einfaches Protokoll für Biotransformationen zu entwickeln, so dass möglichst viele Ansätze parallel getestet werden konnten. Zudem sollte durch das Protokoll die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse hoch und die Anfälligkeit für technische Fehler gering sein. Weiterhin sollte der Materialverbrauch niedrig sein, um später Tracereperimente mit Isotopenmarkierungen durchführen zu können. Daher wurde nach Vortests und Abwägung anderer Alternativen ein Protokoll gewählt, bei dem die Succinatproduktion in gewöhnlichen Plastikreaktionsgefäßen à 1,5 ml erfolgte, die mit 1,2 ml einer Zellsuspension gefüllt wurden. Das Prinzip dieses Protokolls wird im nächsten Unterpunkt beschrieben. In den darauffolgenden Abschnitten werden Experimente beschrieben, bei denen einzelne Parameter dieses Ansatzes variiert wurden, um die Auswirkungen dieser Parameter ebenso wie die Empfindlichkeit des Systems auf Veränderungen zu testen.

3.3.1 Beschreibung des Protokolls für Biotransformationen

Aus einer Übernachtskultur in Minimalmedium wurde eine Vorkultur in einem 100 ml Kolben angeimpft und für 4 h bei 37 °C inkubiert. Die Zellen befanden sich somit in der exponentiellen Wachstumsphase. Nach Pelletieren der Zellen durch Zentrifugation wurden sie in Minimalmedium ohne C-Quelle gewaschen und resuspendiert. Nun konnte aus den einzelnen Komponenten (gewaschene Zellen, Medium, C-Quelle, Puffer, H₂O, NaHCO₃) eine Lösung hergestellt werden, die alle Komponenten in der gewünschten Menge enthielt. Das System war somit bezüglich einzelner Komponenten leicht variierbar, wobei die restlichen Bestandteile insbesondere die Zellen aus einer identischen Charge stammten. Von dieser Lösung wurden jeweils 1,2 ml in Plastikreaktionsgefäße mit dem Nennvolumen 1,5 ml aliquotiert. Dann wurden die Gefäße auf einem Über-Kopf-Invertierer bei 37 °C inkubiert.

Zu jedem Messzeitpunkt wurde dann ein Gefäß entnommen, die optische Dichte gemessen und nach Pelletieren der Restsuspension wurde der Überstand für spätere HPLC-

Metabolitanalysen eingefroren. Das Standardprotokoll (genauerer siehe 2.6.3), nach dem die folgenden Experimente (falls nicht anders angegeben) durchgeführt wurden, hatte folgende Parameter:

- 100 mM MOPS Pufferung
- pH (nach Zufügen aller Komponenten) = 7,25
- Zelldichte zu Beginn zwischen 0,1 und 10 OD₆₀₀/ml
- M9-Minimalmedium 1x konzentriert
- 80 mM NaHCO₃ als Kohlenstoffdioxidquelle
- Glycerinkonzentration zu Beginn 50-70 mM

3.3.2 Einfluss verschiedener Anfangszelldichten auf die Succinatproduktion

Nachdem die grundlegenden Eigenschaften des Protokolls für die Biotransformationen beschrieben worden sind, wurde zuerst der Parameter „Anfangszelldichte“ variiert. Der Einfluss verschiedener Anfangszelldichten von 0,1 bis 10 OD₆₀₀/ml auf die Kinetik der Succinat- und Nebenproduktbildung und auf den zeitlichen Verlauf der Zelldichte wurde untersucht. Diese Versuche wurden mit den Stämmen ss277 und ss328 durchgeführt, die Succinat durch PEP-Carboxylierung oder über den Glyoxylatzyklus produzieren sollten (siehe 1.2.2).

3.3.2.1 Einfluss der Anfangszelldichte auf die Succinatproduktion des Stammes ss277

Mit dem Stamm ss277 ($\Delta mgsA \Delta tdcE \Delta ldhA \Delta poxB \Delta pflB \Delta gldA$) wurden Biotransformationen mit Anfangszelldichten von 0,5 / 1 / 3 und 10 OD₆₀₀/ml angesetzt. Das Volumen der Zellsuspensionen in den 1,5 ml Plastikgefäßen betrug jeweils 1,2 ml. Es wurde 100 mM MOPS zur Pufferung verwendet, 80 mM NaHCO₃ und 65 mM Glycerin zugesetzt. Für alle Experimente wurde die gleiche Charge an Zellen verwendet.

Abbildung 12 zeigt den zeitlichen Verlauf der Zelldichten dieses Experiments.

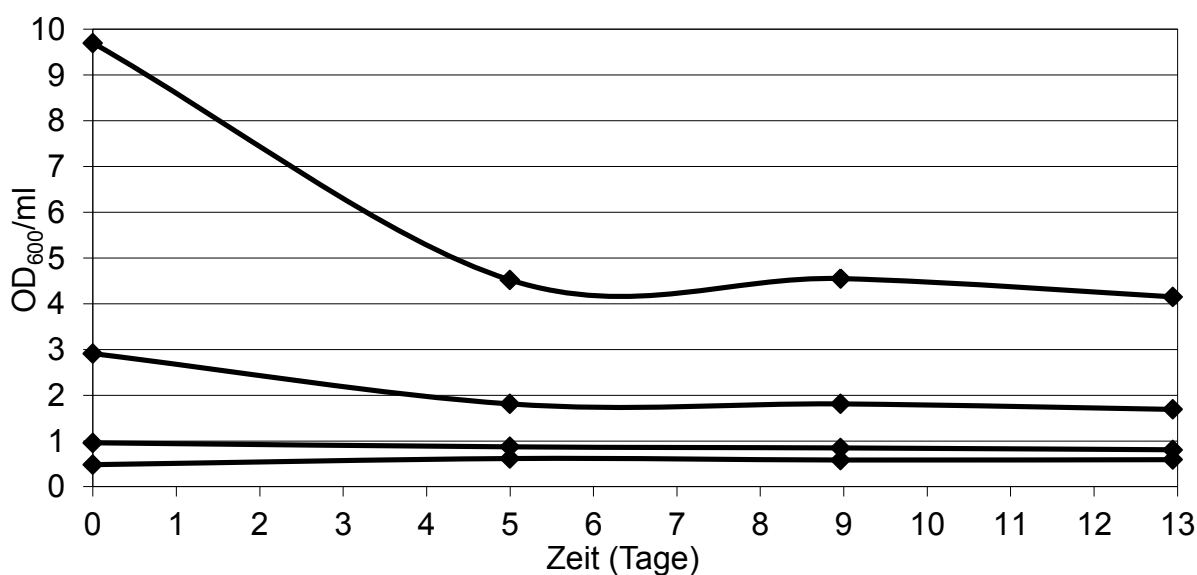


Abbildung 12: Verlauf der Zelldichten bei Biotransformationen mit dem Stamm ss277.

Es wurden vier Biotransformationen zur Succinatproduktion mit Anfangszelldichten von 0,5 / 1 / 3 / 10 OD₆₀₀/ml in 1,5 ml Plastikgefäßen durchgeführt, die 1,2 ml Zellsuspension enthielten. Dabei wurden dem M9-Medium 65 mM Glycerin, 100 mM MOPS zur Pufferung und 80 mM NaHCO₃ zugesetzt.

Bei der niedrigsten eingestellten Zelldichte von 0,5 OD₆₀₀/ml ist es innerhalb der ersten fünf Tage noch zu einem Anstieg der gemessenen Werte von 0,48 auf 0,62 OD₆₀₀/ml gekommen. Die Zelldichten bei den anderen Biotransformationen fielen im gleichen Zeitraum prozentual umso stärker je höher die Anfangszelldichte war. So kam es zum Abfall von 0,96 auf 0,87 OD₆₀₀/ml (9,4 %), von 2,91 auf 1,81 OD₆₀₀/ml (38 %) und von 9,7 auf 4,52 OD₆₀₀/ml (53 %).

Abbildung 13 zeigt beispielhaft den Verlauf der gemessenen extrazellulären Metabolite des Experiments mit einer Anfangszelldichte von 0,5 OD₆₀₀/ml. Die anderen Kurven sind nicht in Abbildungen dargestellt. Stattdessen sind die Ergebnisse in Tabelle 25 zum Vergleich aufbereitet.

Die Menge an Glycerin nahm bei allen Zelldichten mit der Zeit ab. Der Glycerinverbrauch war umso niedriger, je höher die Zelldichte zu Beginn des Experiments war. Betrachtet man die verbrauchte Menge an Glycerin im Verhältnis zur eingesetzten Menge an Zellen, so erhielt man beispielsweise nach 5 Tagen einen Glycerinverbrauch von 86 µmol Gro / OD₆₀₀gesamt bei der Versuchsreihe mit 0,5 OD₆₀₀/ml Anfangszelldichte. (Beispielrechnung: 43,21 mM Gro / 0,5 (OD₆₀₀/ml)). Bei der Versuchsreihe mit 10 OD₆₀₀/ml erhielt man einen Wert von

1,8 $\mu\text{mol Gro} / \text{OD}_{600\text{gesamt}}$. Dieser war um den Faktor 48 niedriger als der Wert des Experiments mit 0,5 $\text{OD}_{600}/\text{ml}$ Anfangszellichte.

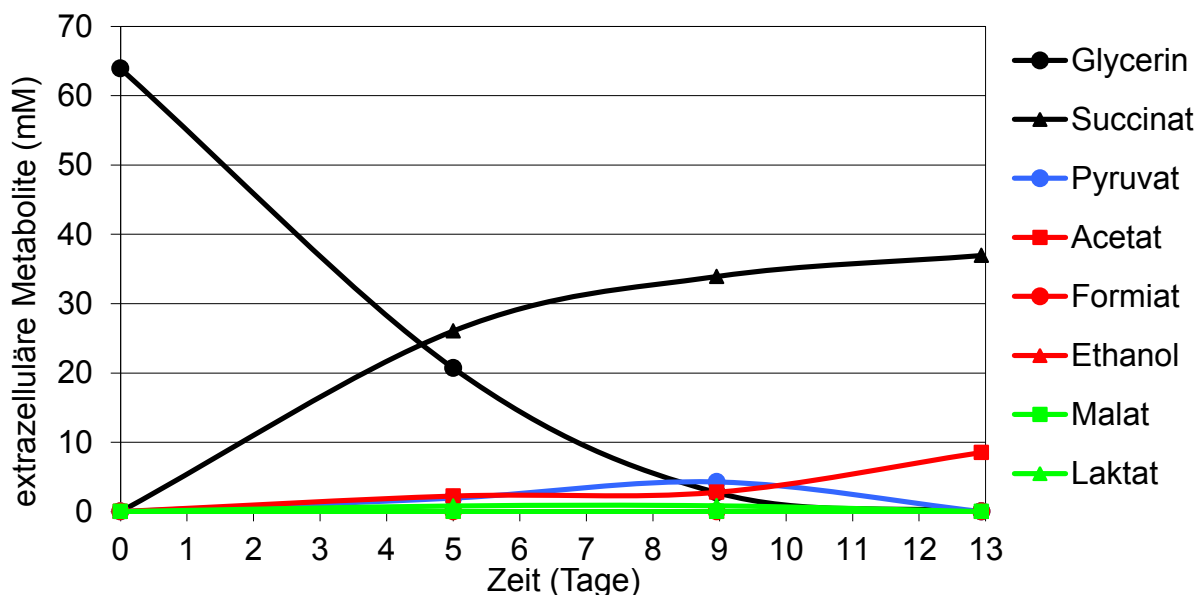


Abbildung 13: Aus Glycerin gebildete Metabolite bei einer Biotransformation mit dem Stamm ss277.

Zu Beginn wurde die Zelldichte auf 0,5 $\text{OD}_{600}/\text{ml}$ eingestellt. Die Biotransformation im Kleinmaßstab mit 1,2 ml Zellsuspension in einem 1,5 ml Plastikgefäß erfolgte mit 65 mM Glycerin, 80 mM NaHCO_3 und 100 mM MOPS in M9-Minimalmedium. Der pH zu Beginn betrug 7,25. Die gemessenen Metabolite sind in der Legende aufgeführt. Fumarat konnte nicht detektiert werden. Stamm ss277 hat folgende Gendelektionen: $\Delta\text{mgsA} \Delta\text{tdcE} \Delta\text{ldhA} \Delta\text{poxB} \Delta\text{pflB} \Delta\text{gldA}$.

Succinat stellte zu allen Zeitpunkten und unabhängig von der Anfangszellichte das Hauptprodukt dar. Die molaren Ausbeuten von Succinat bezogen auf das verbrauchte Glycerin lagen zwischen 42 % und 66 %. Als Nebenprodukte traten Pyruvat, Acetat und Ethanol auf. Pyruvat trat nach 9 Tagen mit einer molaren Ausbeute von 0 % bis 7 % auf. Acetat entstand nach 9 Tagen mit einer Ausbeute von 4,6 % (0,5 $\text{OD}_{600}/\text{ml}$) bis 28,4 % (10 $\text{OD}_{600}/\text{ml}$). Auffällig ist, dass Ethanol als Produkt bei den Umsetzungen mit niedrigen Anfangszellichten von 0,5 oder 1,0 $\text{OD}_{600}/\text{ml}$ nicht aufgetreten ist. Bei den Umsetzungen mit hohen Anfangszellichten trat Ethanol vermehrt auf. Die molare Ausbeute an Ethanol betrug bei der Biotransformation mit 10 $\text{OD}_{600}/\text{ml}$ Zellen nach 9 Tagen 28,4 %.

Ergebnisse

Tabelle 25: Ergebnis von Biotransformationen mit dem Stamm ss277 in Abhängigkeit von der Anfangszelldichte.

In der ersten Spalte ist die jeweilige Umsetzung bezeichnet mit der Anfangszelldichte und in Klammern der Messzeitpunkt t in Tagen eingetragen. In Klammern ist das molare Verhältnis des gebildeten Metabolits zum verbrauchten Glycerin in Prozent angegeben. Die Glycerinkonzentration zu Beginn betrug 65 mM in M9-Minimalmedium mit 80 mM NaHCO₃ und 100 mM MOPS zur Pufferung.

Anfangszelldichte (OD ₆₀₀ /ml) / Messzeitpunkt t (Tage)	Glycerin verbraucht (mM)	Succinat gebildet (mM)	Pyruvat gebildet (mM)	EtOH gebildet (mM)	Acetat gebildet (mM)
0,5 / (t5)	43,21	26,05 (60 %)	1,95 (4,5 %)	nd** (0 %)	2,24 (5,2 %)
0,5 / (t9)	61,17 k*	33,91 (55 %)	4,28 (7,0 %)	nd (0 %)	2,79 (4,6 %)
1,0 / (t5)	43,23	26,01 (60 %)	2,02 (4,7 %)	nd (0 %)	2,34 (5,4 %)
1,0 / (t9)	61,19 k	38,39 (63 %)	nd (0 %)	nd (0 %)	6,25 (10,2 %)
3,0 / (t5)	26,58	17,55 (66 %)	2,44 (9,2 %)	3,88 (14,6 %)	2,46 (9,3 %)
3,0 / (t9)	48,54	32,07 (66 %)	3,47 (7,1 %)	6,26 (12,9 %)	3,23 (6,7 %)
10,0 / (t5)	18,11	7,60 (42 %)	1,35 (7,5 %)	5,29 (29,2 %)	5,29 (29,2 %)
10,0 / (t9)	30,44	16,17 (53 %)	nd (0 %)	8,76 (28,8 %)	8,65 (28,4 %)

* k = kompletter Verbrauch der C-Quelle

** nd = nicht detektiert

In diesem Kapitel wurde anhand des Stammes ss277 gezeigt, dass eine gute Succinatproduktion durch Biotransformation nach dem durchgeführten Protokoll (siehe 2.6.3.1) nur bei niedrigen Zelldichten von 0,5 oder 1,0 OD₆₀₀/ml möglich war. Eine Erhöhung der Zelldichten auf 10 OD₆₀₀/ml führte zu einer geringeren Glycerinverbrauchsrate, zum Abfall der Zelldichte während des Produktionszeitraumes, zu geringeren Succinatausbeuten und zu einer erhöhten Ausbeute an Acetat und insbesondere an Ethanol. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch mit den Stämmen ss220, ss251, ss253, ss274 und ss281 erhalten (Daten nicht gezeigt).

3.3.2.2 Einfluss der Anfangszellichte auf die Succinatproduktion des Stammes ss328

Mit dem Stamm ss328 ($\Delta ackA\text{-}pta \Delta mgsA \Delta tdcE \Delta ldhA \Delta poxB \Delta pflB \Delta gldA$), der Succinat vor allem durch Carboxylierung von PEP (als Zwischenschritt) bilden sollte (siehe 1.2.2), wurden ebenfalls Biotransformationen mit verschiedenen Anfangszellichten durchgeführt. Der Unterschied bestand nur in dem abgedeckten Bereich der Anfangszellichten. Diesmal wurden die Umsetzungen mit maximal 1,0 OD₆₀₀/ml gestartet, dafür wurde der untere Bereich bis auf 0,1 OD₆₀₀/ml weiter ausgedehnt. Abbildung 14 zeigt den zeitlichen Verlauf der Zellichten von Biotransformationen abhängig von den Anfangsbedingungen.

Bei der niedrigsten Zelldichte von 0,1 OD₆₀₀/ml kam es innerhalb der ersten 3 Tage noch zu einem Anstieg von 0,10 auf 0,41 OD₆₀₀/ml. Dies entsprach einer Vermehrung um den Faktor 4. Die Zelldichte des nächstgrößten Ansatzes stieg ebenfalls und zwar von 0,25 auf 0,60 OD₆₀₀/ml. Dies entsprach einer Vermehrung um den Faktor 2,5. Bei einer Anfangszelldichte von 0,48 OD₆₀₀/ml kam es nur noch zu einer 1,4-fachen Vermehrung. Beim Start mit 1,0 OD₆₀₀/ml blieb die Zelldichte annähernd konstant.

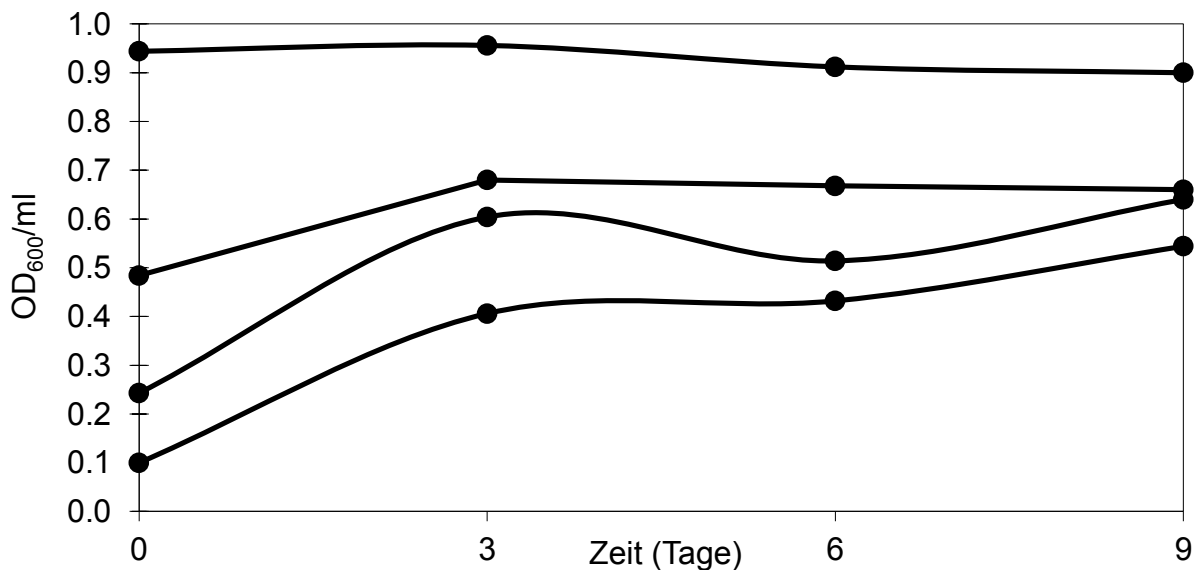


Abbildung 14: Zeitlicher Verlauf der Zellichten von Biotransformationen mit dem Stamm ss328.

Mit dem Stamm ss328 ($\Delta ackA\text{-}pta \Delta mgsA \Delta tdcE \Delta ldhA \Delta poxB \Delta pflB \Delta gldA$) wurden vier Biotransformationen zur Succinatproduktion mit Anfangszellichten von 0,1 / 0,25 / 0,5 und 1,0 OD₆₀₀/ml in 1,5 ml Plastikgefäßen angesetzt, die 1,2 ml Zellsuspension enthielten. Es wurde M9-Medium mit 57 mM Glycerin, 100 mM MOPS zur Pufferung und 80 mM NaHCO₃ verwendet.

Ergebnisse

In Tabelle 26 sind die Ergebnisse des Experiments bezüglich der Succinatausbeuten aufgeführt. Es ist anzumerken, dass in keinem Fall Acetat entstanden ist. Ethanol konnte auf Grund der Überlagerung durch MOPS in der HPLC nicht mehr bestimmt werden (siehe 2.6.4.2). Pyruvat trat nur ein einziges Mal auf und zwar nach 9 Tagen in der Biotransformation mit einer Anfangszell-dichte von 1,0 OD₆₀₀/ml in einer Konzentration von 2,86 mM. Aus der Tabelle wird ersichtlich, dass die erhaltene Endkonzentration von Succinat umso höher war, je höher die Anfangszell-dichte war. Ebenfalls stieg die molare Succinatausbeute ausnahmslos mit der Anfangszell-dichte bis auf einen Maximalwert von 73,5 % bei einer Anfangszell-dichte von 1,0 OD₆₀₀/ml an. Dies lag vermutlich daran, dass bei den niedrigen Zelldichten noch Glycerin für den Aufbau von Zellmasse (Anstieg der Zelldichte) und nicht zur Bildung von Succinat verbraucht wurde. Weiterhin wurde untersucht, ob es eine Korrelation zwischen der gebildeten Succinatmenge nach 3 Tagen und der tatsächlichen Zellmenge nach 3 Tagen gab. Der erhaltene Quotient müsste unabhängig von der Anfangszell-dichte gleich sein, falls die Succinatbildungsrate proportional zur Zellmasse war. Dabei wurde vereinfacht angenommen, dass die nach 3 Tagen gemessene Zelldichte tatsächlich schon ein paar Stunden nach dem Beginn des Experiments erreicht wurde und dann konstant blieb. Tatsächlich bewegt sich dieser Quotient bei allen vier Experimenten in einem engen Bereich zwischen 21,8 und 27,1 mM Succinat / (OD₆₀₀/ml) nach drei Tagen.

Tabelle 26: Succinatausbeuten des Stammes ss328 mit Glycerin als Substrat.

Mit dem Stamm ss328 (*ΔackA-pta ΔmgsA ΔtdcE ΔldhA ΔpoxB ΔpflB ΔgldA*) wurden Biotransformationen mit Anfangszelldichten zwischen 0,1 und 1,0 OD₆₀₀/ml durchgeführt. Es wurde M9-Medium mit 57 mM Glycerin, 100 mM MOPS zur Pufferung und 80 mM NaHCO₃ verwendet. Angegeben sind die Metabolite Succinat und Glycerin nach 9 Tagen (t₉), die molare Ausbeute von gebildetem Succinat im Verhältnis zum verbrauchten Glycerin in Prozent nach 9 Tagen und das Verhältnis von gebildetem Succinat in mM nach 3 Tagen zur OD₆₀₀/ml nach 3 Tagen (t₃).

Anfangszelldichte (OD ₆₀₀ /ml)	Glycerin verbraucht (mM) (t ₉)	Succinat gebildet (mM) (t ₉)	Ausbeute (mol Succinat / mol Glycerin) (t ₉)	Succinat (mM) / (OD ₆₀₀ /ml) jeweils (t ₃)
0,1	54,75	31,69	57,9 %	23,42
0,25	54,16	32,91	60,8 %	27,12
0,5	49,38	33,38	67,6 %	23,91
1,0	56,99 k*	41,91	73,5 %	21,83

* k = kompletter Verbrauch der C-Quelle

3.3.3 Einfluss der Anfangszelldichte bei anfänglich gleichem Sauerstoffangebot pro Zelle auf die Succinatproduktion des Stammes ss277

In Kapitel 3.3.2.1 wurde beschrieben, dass es bei Biotransformationen des Stammes ss277 mit 1,2 ml Zellsuspension in 1,5 ml Plastikgefäßen mit steigenden Anfangszelldichten zu einem verringerten Glycerinverbrauch, zum Abfall der Zelldichten während des Produktionszeitraumes und zu verstärkter Nebenproduktbildung gekommen ist. Es wurde vermutet, dass der begrenzte Sauerstoffvorrat in den Gefäßen bei höheren Anfangszelldichten schneller aufgebraucht wurde und somit der mikroaerobe Zeitraum für die benötigte Umstellung des Metabolismus auf die Succinatproduktion im Anaeroben nicht ausreichend war. Daher wurden die Produktbildung aus Glycerin und der Verlauf der Zelldichten in neuen Biotransformationen untersucht, bei denen der Sauerstoffvorrat (Luftvolumen) pro Zelle immer gleich war, obwohl unterschiedliche Anfangszelldichten eingestellt wurden. Dabei wurde ein zu den Anfangszelldichten proportionaler Glycerinverbrauch mit entsprechend guter Succinatproduktion angestrebt. Außerdem sollte es nicht zu einem Abfall der Zelldichten während der Biotransformationen kommen.

Es wurden Biotransformationen mit dem Stamm ss277 durchgeführt. Verschiedene Parameter wurden konstant gehalten (55 mM Glycerin in M9-Medium, 100 mM MOPS, 80 mM NaHCO₃). Variiert wurden die Anfangszelldichten, die zwischen 0,5 OD₆₀₀/ml und 10 OD₆₀₀/ml eingestellt wurden und das Volumen der Flüssigphase in den Reaktionsgefäßen. Bisher wurden immer 1,2 ml einer Suspension mit allen erforderlichen Komponenten für eine Biotransformation zum Start in ein 1,5 ml Plastikreaktionsgefäß pipettiert, welches danach fest verschlossen wurde. Dies war hier nur für das Experiment mit einer Anfangszelldichte von 0,5 OD₆₀₀/ml der Fall. Für die restlichen Experimente mit höheren Anfangszelldichten wurde das Flüssigvolumen so herabgesetzt, dass ein konstantes Verhältnis von Restluftvolumen im Gefäß zur Gesamtzellmasse vorhanden war. Die Berechnung der Volumina ist im Abschnitt 2.6.3.3 erläutert. Es ergaben sich folgende Zellsuspensionsvolumen: 902 µl (für 1,0 OD₆₀₀/ml), 517 µl (für 2,5 OD₆₀₀/ml), 302 µl (für 5,0 OD₆₀₀/ml) und 165 µl (für 10 OD₆₀₀/ml).

In Abbildung 15 ist der zeitliche Verlauf der Zelldichten der Biotransformationen mit unterschiedlichen Anfangsbedingungen dargestellt. Es ist vor allem zu erkennen, dass die Zelldichte bei den Experimenten mit einem Anfangswert von 5,0 oder 2,5 OD₆₀₀/ml über 9 Tage konstant geblieben ist. In dem Experiment mit 10 OD₆₀₀/ml Anfangswert kam es nur zu einem geringfügigen Abfall nach 3 Tagen (Vergleich siehe Abbildung 12). Bei den restlichen Experimenten kam es bis zum dritten Tag zu einem leichten Anstieg der Zelldichte (von 0,48 auf 0,65 OD₆₀₀/ml und von 0,98 auf 1,22 OD₆₀₀/ml), danach blieben die Werte ebenfalls konstant.

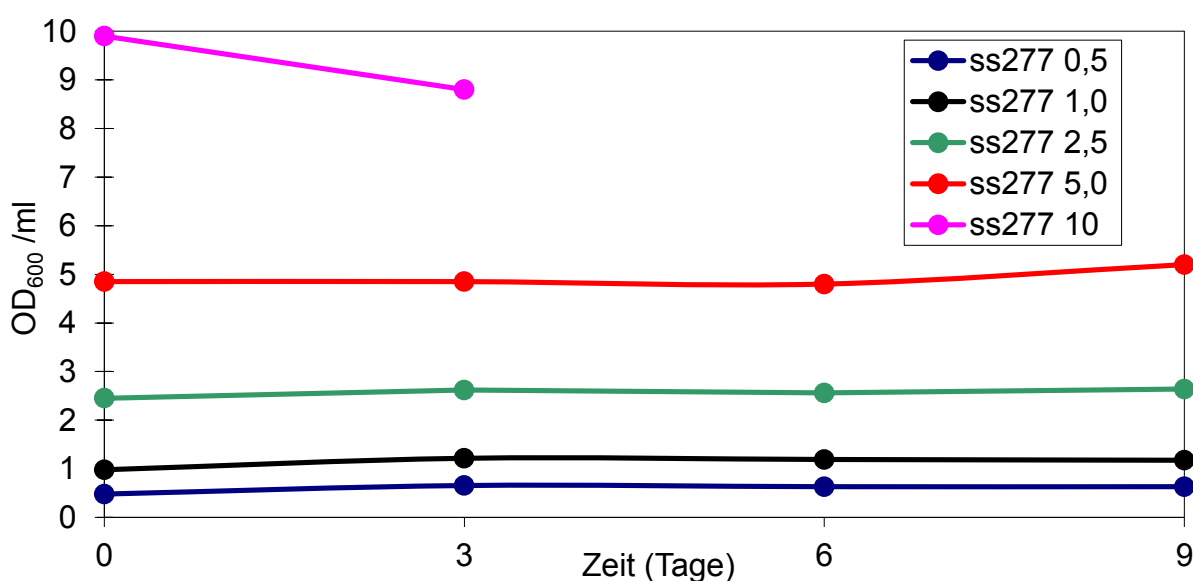


Abbildung 15: Zeitlicher Verlauf der Zelldichten bei Biotransformationen mit dem Stamm ss277.

Den Zellsuspensionen in M9-Medium wurden zu Beginn 100 mM MOPS, 80 mM NaHCO₃ und 55 mM Glycerin zugesetzt. Die Anfangszelldichte wurde auf die Werte 0,5 / 1 / 2,5 / 5 / 10 OD₆₀₀/ml (siehe Legende) eingestellt. Die Volumina der Zellsuspensionen in den 1,5 ml Gefäßen wurden so eingestellt, dass das Verhältnis des Gasphasenvolumens zur Gesamtzellmasse bei allen Kinetiken gleich war. Stamm ss277 hat folgende Gendelektionen: $\Delta mgsA \Delta tdcE \Delta ldhA \Delta poxB \Delta pflB \Delta glcA$.

Die Erhöhung des Sauerstoffvorrates hat bei den Biotransformationen mit Zelldichten zwischen 2,5 und 10 OD₆₀₀/ml dazu geführt, dass die Zelldichten anders als in dem Vergleichsexperiment (siehe Abbildung 12) nicht oder weniger stark abgenommen haben.

Die Ergebnisse der Metabolitmessungen und die bei dem Experiment erzielten Ausbeuten sind in Tabelle 27 aufgeführt. Da es innerhalb der ersten drei Tage bei Anfangszelldichten von 2,5 OD₆₀₀/ml und höher zu einem kompletten Verbrauch der C-Quelle Glycerin gekommen

ist, wurden vor allem die Werte zum Zeitpunkt t_3 miteinander verglichen. Bei dem Experiment wurde Glycerin jeweils in einer Konzentration von 55 mM eingesetzt. Die tatsächliche Konzentration wurde zu Beginn des Experiments gemessen und wich nur leicht von der Zielkonzentration von 55 mM ab. Eine Ausnahme bildete die Biotransformation mit 10 OD₆₀₀/ml Zellen, bei dem die Glycerinkonzentration nur 40,08 mM betrug. Der Grund dieser Abweichung ist nicht bekannt.

Falls Glycerin komplett verbraucht wurde, blieb die Konzentration der gemessenen extrazellulären Metabolite danach annähernd konstant (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich zu den t_3 -Werten wurden die t_6 -Werte der Biotransformationen mit niedrigen Anfangszelldichten mit in die Tabelle aufgenommen, um den weiteren zeitlichen Verlauf zu verfolgen.

Aus der Tabelle wird ersichtlich, dass die nach drei Tagen erhaltene Ausbeute des unerwünschten Nebenprodukts Acetat ausgehend von 0 % (0,5 OD₆₀₀/ml) stetig mit der Anfangszelldichte anstieg und Werte von 42,4 % (10 OD₆₀₀/ml) erreichte. Die Acetatentstehung bei hohen Zelldichten ging zu Lasten der molaren Ausbeute an Succinat aus Glycerin. Diese betrug 75,2 % nach drei Tagen bei einer Anfangszelldichte von 1 OD₆₀₀/ml. Succinat war somit das Hauptprodukt. Bei einer Anfangszelldichte von 5 OD₆₀₀/ml war die Ausbeute von Succinat und Acetat in etwa gleich und lag im Bereich von 30 %. Bei dem Experiment mit der höchsten Anfangszelldichte von 10 OD₆₀₀/ml entstand sogar mehr Acetat (17 mM) als Succinat (7,89 mM). Vermutlich ist in den Biotransformationen auch Ethanol entstanden (siehe 3.3.2.1), welches aber nicht mehr detektiert werden konnte (siehe 2.6.4.2).

Bei diesem Experiment, bei dem die Volumina der Zellsuspensionen so variiert wurden, dass in den verschiedenen Biotransformation jeder Zelle ungefähr die gleiche Menge Sauerstoff zur Verfügung stand, konnte ein steigender Glycerinverbrauch bei höheren Zelldichten festgestellt werden. Allerdings war dieser steigende Glycerinverbrauch nicht proportional zu den Anfangszelldichten, die in diesem Experiment nahezu konstant geblieben sind. So wurden mit 0,5 OD₆₀₀/ml Zellen nach 3 Tagen 29,64 mM Glycerin umgesetzt. Mit einer zweifach erhöhten Zelldichte von 1,0 OD₆₀₀/ml wurde zwar mehr Glycerin (40,78 mM) verbraucht, aber dies entsprach aber nur einem 1,38-fach gesteigerten Umsatz. Ab einer Zelldichte von 2,5 OD₆₀₀/ml wurde jeweils die komplette Menge von 55 mM eingesetztem Glycerin

Ergebnisse

verbraucht, weswegen hier nur eine Aussage über die Mindestverbrauchsrate getroffen werden konnte.

Der positiv zu bewertende, erhöhte Glycerinverbrauch bei höheren Anfangszellichten hat aber nicht zu höheren Succinatausbeuten geführt. Betrachtet man die molaren Succinatausbeuten nach drei Tagen, so sind diese ab einer Anfangszellichte von 2,5 OD₆₀₀/ml deutlich gefallen. Sie betragen 53,8 % (2,5 OD₆₀₀/ml), 31,5 % (5 OD₆₀₀/ml) und 19,7 % (10 OD₆₀₀/ml). Nur bei den niedrigen Anfangszellichten wurden Ausbeuten von über 70 % (70,8 % bei 0,5 OD₆₀₀/ml und 75,2 % bei 1,0 OD₆₀₀/ml) ermittelt.

Tabelle 27: Abhängigkeit der Produktausbeuten bei Biotransformationen des Stammes ss277 von der Anfangszellichte.

Zellsuspensionen des Stammes ss277 in M9-Medium wurden zu Beginn 100 mM MOPS, 80 mM NaHCO₃ und 55 mM Glycerin zugesetzt. Die Anfangszellichte wurde auf die Werte 0,5 / 1 / 2,5 / 5 und 10 OD₆₀₀/ml eingestellt. Die Volumina der Zellsuspensionen in den 1,5 ml Gefäßen wurden so eingestellt, dass das Verhältnis des Gasphasenvolumens zur Gesamtzellmasse bei allen Kinetiken gleich war. Die Ausbeute wird definiert als der molare Anteil des jeweiligen gebildeten Metabolits im Verhältnis zum verbrauchten Glycerin in Prozent und steht unter den Konzentrationsangaben in Klammern. Über EtOH konnte keine Aussage getroffen werden.

Anfangszellichte (OD ₆₀₀ /ml) und Tag der Probenahme (t _x)		Glycerin verbraucht (mM)	Succinat gebildet (mM)	Pyruvat gebildet (mM)	Acetat gebildet (mM)
0,5	t3	29,64	20,99 (70,8 %)	nd ** (0%)	nd (0%)
	t6	45,15	34,17 (75,7 %)	2,47 (5,5 %)	nd (0%)
1	t3	40,78	30,66 (75,2 %)	2,26 (5,5 %)	2,40 (5,9 %)
	t6	52,81 k *	41,04 (77,7 %)	nd (0%)	5,43 (10,3 %)
2,5	t3	56,79 k	30,58 (53,8 %)	nd (0%)	10,96 (19,3 %)
5	t3	58,18 k	18,31 (31,5 %)	nd (0%)	17,53 (30,1 %)
10	t3	40,08 k	7,89 (19,7 %)	nd (0%)	17,00 (42,4 %)

* k = kompletter Verbrauch der C-Quelle

** nd = nicht detektiert

Es ist denkbar, dass die Ursache der geringeren Succinatausbeuten bei höheren Anfangszelldichten ein Verlust von in der Flüssigphase gelöstem Hydrogencarbonat war. Das Hydrogencarbonat, welches sich in einem dynamischen Gleichgewicht mit CO_2 befand, könnte als CO_2 in die mit höheren Anfangszelldichten immer größer gewordene Gasphase übergetreten sein. Eine konstante Hydrogencarbonatkonzentration war aber bei den Biotransformationen im Kleinmaßstab mit unterschiedlichen Flüssigvolumina grundsätzlich nicht zu gewährleisten. Der Einfluss der Hydrogencarbonat-Konzentration auf die Succinatproduktion bei konstanten Anfangszelldichten und Flüssigvolumina in den Plastikgefäßen wird im nächsten Kapitel beschrieben.

3.3.4 Einfluss der Hydrogencarbonat-Konzentration auf die Succinatproduktion

Nachdem der Einfluss der Anfangszelldichte auf die Succinatproduktion bei der gewählten Biotransformationsmethode untersucht wurde, sollte nun der Einfluss der Hydrogencarbonat-Konzentration auf die Produktion von Succinat festgestellt werden. In der Einleitung (siehe 1.2.6) wurde bereits erläutert, dass bei der von Glycerin ausgehenden Succinatproduktion über manche Stoffwechselwege theoretisch eine Nettofixierung von CO_2 möglich ist. Bei einer molaren Ausbeute von 75 % Succinat pro Glycerin hält sich der Verbrauch von Hydrogencarbonat respektive Kohlenstoffdioxid durch Carboxylierung von C3-Metaboliten und die Bildung durch Decarboxylierungsreaktionen die Waage.

In Abbildung 16 sind die erreichten Zelldichten eines Experiments dargestellt, bei denen unterschiedliche Mengen an Natriumhydrogencarbonat zu Biotransformationen zugesetzt worden sind.

Es zeigte sich, dass die Zelldichten nach 8 Tagen alle höher waren als zu Beginn des Experiments. Dieser Anstieg war umso größer, je mehr NaHCO_3 zugesetzt wurde. Bei einer Konzentration von 80-120 mM NaHCO_3 scheint ein Optimum erreicht worden zu sein. Am stärksten wich das Ergebnis des Stammes ss337 bei keinerlei Zusatz von Hydrogencarbonat vom Gesamtbild ab. Hier stieg die Zelldichte kaum an und lag bei einem Wert von 0,51 $\text{OD}_{600}/\text{ml}$.

Ergebnisse

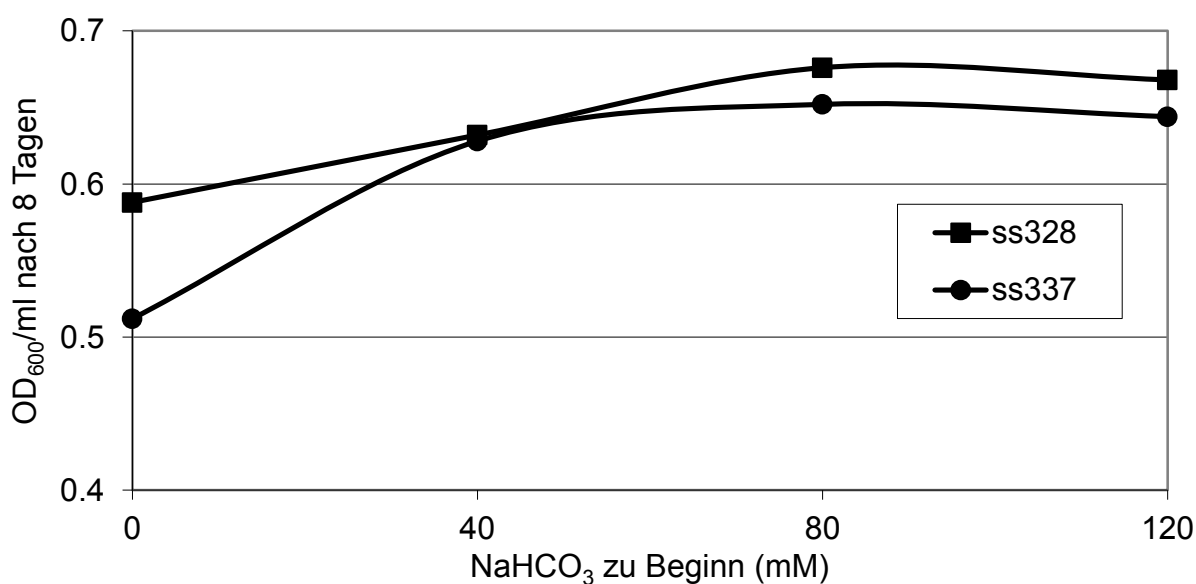


Abbildung 16: Abhängigkeit der Zelldichten bei Biotransformationen mit den Stämmen ss328 und ss337 von der Hydrogencarbonatkonzentration.

Mit den Stämmen ss328 (*ΔackA-pta ΔmgsA ΔtdcE ΔldhA ΔpoxB ΔpflB ΔgldA*) und ss337 (= ss328 pSS71.1) wurden Biotransformationen durchgeführt. Die Ansätze (1,2 ml Zellsuspension in 1,5 ml Plastikgefäßen) enthielten 76 mM Glycerin, 100 mM MOPS und zu Beginn unterschiedliche Mengen NaHCO₃. pSS71.1 ist ein Plasmid mit niedriger Kopienzahl, welches das Gen für die *E. coli* eigene Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase mit eigenem Promotor trägt. Die Anfangszelldichten betragen 0,48 OD₆₀₀/ml (ss328) und 0,47 OD₆₀₀/ml (ss337). Nach 8 Tagen wurden die erreichten Zelldichten gemessen.

Tabelle 28: Abhängigkeit der Succinatausbeuten von Biotransformationen von der NaHCO₃-Konzentration.

Mit den Stämmen ss328 und ss337 wurden Biotransformationen (siehe Abbildung 16) durchgeführt. Die extrazellulären Metabolite wurden nach 8 Tagen Inkubation der Zellen gemessen. Die Ausbeute wurde definiert als der molare Anteil des gebildeten Succinats im Verhältnis zum verbrauchten Glycerin in Prozent. Die Konzentration von Acetat, Fumarat oder Laktat lag jeweils unter 1,6 mM. Über EtOH konnte keine Aussage getroffen werden.

Experiment		gemessene Metabolite (extrazellulär)			Ausbeute (mol Succinat / mol Glycerin)
Stamm	NaHCO ₃ Zugabe (mM)	Glycerin verbraucht (mM)	Pyruvat gebildet (mM)	Succinat gebildet (mM)	
ss328	0	21,2	4,10	5,6	26,6 %
	40	38,5	1,95	23,1	59,9 %
	80	46,4	nd*	30,9	66,4 %
	120	58,9	nd	44,2	75,1 %
ss337 (= ss328 mit pSS71.1)	0	22,7	4,6	9,1	40,2 %
	40	46,6	2,5	32,2	69,1 %
	80	55,8	nd	40,5	72,6 %
	120	49,9	nd	32,5	65,1 %

* nd = nicht detektiert

Die Ergebnisse der Metabolitmessungen und die Ausbeuten dieses Experiments sind in Tabelle 28 aufgeführt. Man kann erkennen, dass sowohl der Glycerinverbrauch als auch die Ausbeute an Succinat zunahmen, je mehr Natriumhydrogencarbonat zugesetzt wurde. Pyruvat trat nur bei geringen Carbonatkonzentrationen auf. Succinat war mengenmäßig immer das Hauptprodukt. Die höchste ermittelte molare Succinatausbeute war 75,1 % (ss328 bei Zugabe von 120 mM NaHCO₃). Dabei ist das geringe Zellwachstum, durch welches auch Glycerin verbraucht wurde, nicht berücksichtigt. Dieser Wert spricht dafür, dass CO₂ netto weder verbraucht noch gebildet wurde.

3.4 Succinatproduktion durch PEP-Carboxylierung oder über den Glyoxylatzyklus

3.4.1 Einfluss verschiedener Deletionen auf die Succinatproduktion

Nach der Entwicklung eines Protokolls für Biotransformationen im Kleinmaßstab konnten verschiedene Stämme und der Einfluss ihrer Deletionen auf die Succinatbildung miteinander verglichen werden. Zuerst wurden Stämme untersucht, deren Weg zum Succinat über PEP-Carboxylierung oder über den Glyoxylatzyklus (siehe 1.2.2) verlaufen sollte. Dem Stamm ss172 ($\Delta ldhA \Delta poxB \Delta pflB$) fehlen drei Gene, deren Produkte in einem Wildtypstamm zur Bildung großer Mengen der Nebenprodukte Acetat und Laktat führen. Die Deletion dieser Gene stellt die Basis für einen guten Succinatproduzenten dar²²⁷⁻²³⁰. Ausgehend von diesem Stamm wurde der Einfluss weiterer Deletionen auf die Succinatausbeute und auf die Entstehung von Nebenprodukten getestet.

Die 2-Ketobutyrat-Formiat-Lyase TdcE kann Pyruvat in Formiat und Acetyl-CoA umwandeln. Eine hohe Aktivität dieses Enzyms könnte den Fluss vom PEP zum Oxalacetat verringern, der die höchsten Ausbeuten an Succinat liefert. Daher könnte die Deletion von *tdcE* zu höheren Ausbeuten führen. Die Deletion von *mgsA* sollte die Bildung der Nebenprodukte Methylglyoxal und Laktat ausschließen. Eine Deletion von *gldA* sollte die Verkleinerung des PEP-Pools zu Gunsten des Pyruvat-Pools verhindern, indem sie die Entstehung des Substrats Dihydroxyaceton für das Glycerin-spezifische PTS verhindert. Schlussendlich könnte die Deletion von *ackA-pta* die Bildung von Acetat einschränken oder

verhindern. Für eine detailliertere Beschreibung der Bedeutung der einzelnen Gene siehe Kapitel 1.2.1.

Für alle Stämme wurden die zeitlichen Metabolitverläufe aufgenommen, indem nach 0, 3, 6 und 9 Tagen gemessen wurde. Dabei wurde das Protokoll mit 54 mM Glycerin, 80 mM NaHCO₃ und 100 mM MOPS angewendet (siehe 2.6.3.1). Um die Ergebnisse zu vergleichen, wurde der Messzeitpunkt nach 6 Tagen ausgewählt, da zu diesem Zeitpunkt noch bei allen Stämmen unverbrauchtes Glycerin vorhanden war. Dies sollte eventuelle Unterschiede in der Umsetzungsgeschwindigkeit von Glycerin deutlicher machen. Der Verlauf der Zelldichten ausgehend von einem Wert zu Beginn von 0,5 OD₆₀₀/ml war bei allen Stämmen ähnlich (Daten nicht gezeigt) wie in Abbildung 14.

In Tabelle 29 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Der Glycerinverbrauch bei allen Stämmen lag im Bereich von 40 mM Glycerin nach 6 Tagen. Die molare Ausbeute von Succinat im Verhältnis zum verbrauchten Glycerin lag zwischen 61 % und 65 %. Succinat war somit immer das Hauptprodukt. Bei den Stämmen ss172, ss193 und ss277 kam es in geringen Maßen (Ausbeuten < 10 %) zur Bildung von Pyruvat und Acetat. Erst nach der Deletion der Gene *ackA-pta* (ss328) trat kein Acetat und Pyruvat mehr auf. Die Standardabweichungen bezüglich der Succinatausbeuten waren gering. Nur beim Stamm ss277 kam es zu einer größeren Abweichung. Hier betrug die Standardabweichung 14,2 % bei einer Ausbeute von 61,3 %.

Abgesehen von den Nebenprodukten Acetat und Pyruvat wurde auch auf die Entstehung von Fumarat, Malat, Formiat und Laktat getestet. Diese Nebenprodukte lagen unterhalb der jeweiligen Nachweisgrenze von ~ 1,6 mM. Über EtOH konnte in diesen Experimenten keine Aussage getroffen werden, da die Retentionszeit für EtOH bei der HPLC-Messung im Bereich der Elution von MOPS lag und von dieser überdeckt wurde. Die Bildung von Ethanol ist prinzipiell möglich, trat aber in vorherigen Experimenten nur bei hohen Zelldichten auf (siehe Tabelle 25). Der Stamm ss328 zeigte die höchste Ausbeute an Succinat von 65,1 % und bildete kein Acetat und Pyruvat mehr.

Tabelle 29: Aus Glycerin gebildete Produkte bei Biotransformationen verschiedener Stämme nach 6 Tagen.

Die Versuche wurden in 1,5 ml Plastikgefäßen mit 0,5 OD₆₀₀/ml Zellen in M9-Minimalmedium, 54 mM Glycerin, 100 mM MOPS und 80 mM NaHCO₃ durchgeführt. Die Spalte Ausbeute entspricht dem Quotienten (mol Succinat gebildet / mol Glycerin verbraucht) in Prozent. Die Konzentrationen von Fumarat, Laktat, Formiat und Malat lagen unter der Nachweisgrenze von ~1,6 mM. Über Ethanol konnte keine Aussage getroffen werden. nd = nicht detektiert

Stamm	Anzahl Versuche	Glycerin verbraucht (mM)	Succinat gebildet (mM)	Ausbeute (mol Succinat / mol Glycerin)	Acetat gebildet (mM)	Pyruvat gebildet (mM)
ss172 ^a	2x	38,4 ± 1,9	24,4 ± 1,5	63,7 ± 0,7 %	1,2 ± 1,6	2,2 ± 0,2
ss193 ^b	2x	41,9 ± 9,5	27,0 ± 5,8	64,5 ± 0,8 %	2,9 ± 1,2	4,2 ± 2,6
ss277 ^c	3x	51,6 ± 10,5	30,8 ± 3,1	61,3 ± 14,2 %	2,0 ± 1,8	2,4 ± 0,1
ss328 ^d	3x	43,2 ± 5,7	28,1 ± 3,3	65,1 ± 1,4 %	nd *	nd

^a ss172 ($\Delta ldhA \Delta poxB \Delta pflB$)

^b ss193 ($\Delta tdcE \Delta ldhA \Delta poxB \Delta pflB$)

^c ss277 ($\Delta mgsA \Delta glcA \Delta tdcE \Delta ldhA \Delta poxB \Delta pflB$)

^d ss328 ($\Delta ackA\text{-}pta \Delta mgsA \Delta glcA \Delta tdcE \Delta ldhA \Delta poxB \Delta pflB$)

* nd = nicht detektiert

Zusammenfassend kann man sagen, dass schon mit dem Ausgangsstamm ss172, der nur drei Deletionen aufweist, eine ähnlich hohe Succinatausbeute (63,7 %) wie mit dem Stamm ss328 (65,1 %) erzielt werden konnte. Der Stamm ss328 hat schon 7 Gendelektionen akkumuliert, wobei anscheinend nur die Deletion von *ackA-pta* eine signifikante Verbesserung gebracht hat, indem danach kein Pyruvat und Acetat mehr als Nebenprodukte detektiert werden konnten. Eine zusätzliche Steigerung durch das Einfügen weiterer Deletionen scheint schwierig zu sein. Daher wird in den Kapiteln 3.5 und 3.6 die Succinatproduktion mit anderen Stämmen beschrieben, die auf Grundlage alternativer Strategien zur Succinatproduktion (siehe 1.2 ff) konstruiert worden sind.

3.4.2 Succinatproduktion mit dem Stamm ss328 aus Glycerin

Im vorangegangenen Kapitel wurde der Stamm ss328 ($\Delta ackA\text{-}pta \Delta mgsA \Delta glcA \Delta tdcE \Delta ldhA \Delta poxB \Delta pflB$) als bester Succinatproduzent unter den Stämmen, die Succinat durch PEP-Carboxylierung oder den Glyoxylatzyklus produzieren sollten, ermittelt. Die gute Ausbeute sollte nun mit einem leicht veränderten Protokoll erneut bestätigt und näher charakterisiert

werden. Zum einen wurde als Carbonatquelle 100 mM $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ verwendet, um zu ermitteln, ob und zu welchem Anteil das entstandene Succinat durch Carboxylierung von C3-Metaboliten entstanden ist (siehe Kapitel 3.7). Zum anderen wurde durch ein modifiziertes M9-Medium mit 100 mM Phosphat der Verzicht auf MOPS als Puffer möglich. Der Puffer MOPS hat vorher den Ethanolnachweis in der HPLC verhindert.

Es wurden Biotransformationen mit dem Stamm ss328 angesetzt, wobei die Zellen zu einer Dichte von 0,5 $\text{OD}_{600}/\text{ml}$ resuspendiert wurden. Als Medium diente M9hP mit 60 mM Glycerin und 100 mM $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$. Der zeitliche Verlauf der optischen Dichte ist in Abbildung 17 gezeigt. Man kann erkennen, dass es innerhalb des ersten Tages annähernd zu einer Verdopplung gekommen ist. Danach blieben die Werte 8 Tage lang konstant.

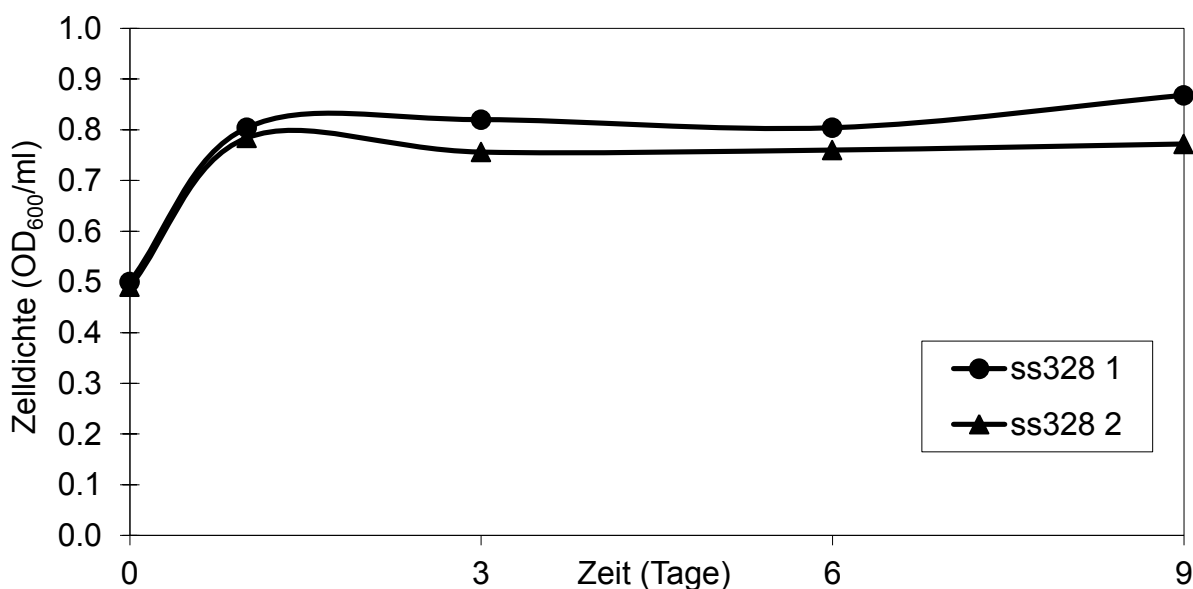


Abbildung 17: Verlauf der Zelldichten bei Biotransformationen mit dem Stamm ss328.

Es wurden zwei unabhängige Biotransformationen durchgeführt und nach 0, 1, 3, 6 und 9 Tagen die Zelldichte bestimmt. Das Medium war M9hP mit 60 mM Glycerin und 100 mM $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$.

In Abbildung 18 ist der zeitliche Konzentrationsverlauf der Metabolite Glycerin und Succinat dargestellt. Innerhalb von 9 Tagen wurde das Glycerin (60 mM zu Beginn) komplett verbraucht. Es kam zu einer stetigen Succinatbildung und am Ende wurden Konzentrationen von über 40 mM Succinat erhalten. Für die Untersuchung von Nebenprodukten wurden die Proben nach 6 Tagen Fermentation ausgewählt. Es entstand $5,7 \pm 0,2$ mM Ethanol. Außer

Spuren von Pyruvat im Bereich von 1 mM konnten keine weiteren Nebenprodukte durch die HPLC-Analytik detektiert werden.

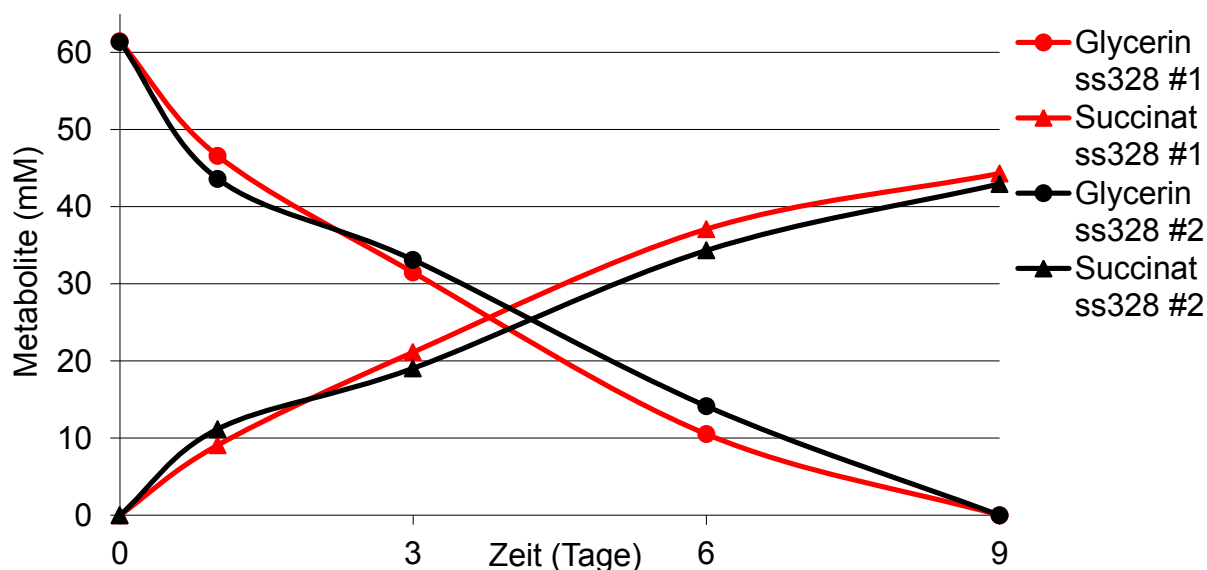


Abbildung 18: Kinetik der Succinatbildung aus Glycerin mit dem Stamm ss328.

Es wurden zwei unabhängige Biotransformationen mit dem Stamm ss328 (*ΔackA-pta ΔmgsA ΔgldA ΔtdcE ΔldhA ΔpoxB ΔpflB*) durchgeführt. Die Zellen wurden auf 0,5 OD₆₀₀/ml resuspendiert. Als Medium diente 60 mM Glycerin in M9hP mit 100 mM NaH¹³CO₃. Jeder Zeitpunkt entspricht einem 1,5 ml Plastikgefäß, welches mit 1,2 ml Zellsuspension gefüllt war.

Tabelle 30: Succinatausbeuten aus Glycerin bei Biotransformationen mit dem Stamm ss328.

Es wurden zwei unabhängige Versuche mit dem Stamm ss328 (*ΔackA-pta ΔmgsA ΔgldA ΔtdcE ΔldhA ΔpoxB ΔpflB*) mit 0,5 OD₆₀₀/ml Zellen in M9hP, 60 mM Glycerin und 100 mM NaH¹³CO₃ durchgeführt. Die Spalte Ausbeute entspricht dem Quotienten (mol Succinat gebildet / mol Glycerin verbraucht) in Prozent.

	Zeitraum t in Tagen	Glycerin verbraucht (mM)	Succinat gebildet (mM)	Ausbeute (mol Succinat / mol Glycerin)
ss328 #1	t0-t6	50,94	37,09	72,8 %
ss328 #2		47,24	34,33	72,7 %
Ø*		49,1 ± 2,6	35,7 ± 2,0	72,7 ± 0,1 %
ss328 #1	t0-t9	61,45 k**	44,31	72,1 %
ss328 #2		61,38 k	42,95	70,0 %
Ø		61,4 ± 0,1	43,6 ± 1,0	71,0 ± 1,5 %
ss328 #1	t1-t6	36,09	28,01	77,6 %
ss328 #2		29,48	23,17	78,6 %
Ø		32,8 ± 4,7	25,6 ± 3,4	78,1 ± 0,7 %

* Ø = Mittelwert + Standardabweichung

** k = kompletter Verbrauch der C-Quelle

In Tabelle 30 werden die molaren Ausbeuten an Succinat in unterschiedlichen Zeiträumen betrachtet. Über den kompletten Zeitraum von 9 Tagen wurde eine Ausbeute von $71,0 \pm 1,5 \%$ erhalten. Hier wurde der Glycerinverbrauch durch die Generierung von Zellmasse bis zum Tag 1 nicht berücksichtigt. Betrachtet man hingegen den Zeitraum t1-t6, innerhalb dessen die Zelldichte konstant blieb und das Glycerin noch nicht komplett verbraucht wurde, so betrug die Ausbeute sogar $78,1 \pm 0,7 \%$.

3.4.3 Succinatproduktion mit dem Stamm ss328 aus Glukose

Der Stamm ss328 erwies sich bisher als bester Succinatproduzent unter allen Stämmen, die Succinat theoretisch durch PEP-Carboxylierung oder über den Glyoxylatzyklus produzieren können (siehe 3.4.1.). Obwohl in dieser Arbeit hauptsächlich die Succinatproduktion aus Glycerin beschrieben wird, wurde mit dem Stamm ss328 auch getestet, welche Produkte gebildet werden, wenn Glukose statt Glycerin als Substrat in den Biotransformationen eingesetzt wird. Außerdem wird später kurz diskutiert werden, warum die für die Succinatproduktion aus Glycerin geeigneten Stammkonstruktionen nicht zwangsläufig auch für die Produktion ausgehend von Glukose geeignet sind.

In Abbildung 19 ist der zeitliche Verlauf der Metabolite von drei unabhängigen Biotransformationen mit dem Stamm ss328 in M9-Minimalmedium dargestellt. Der Begriff Unabhängigkeit bezieht sich bei diesen und auch allen anderen Experimenten dieser Arbeit darauf, dass ausgehend von einem Ausstrich einer Glycerindauerkultur aus den entstandenen Einzelkolonien unabhängige Übernachtskulturen und Vorkulturen hergestellt wurden (eine Einzelkolonie pro Kultur). Es wurden 60 mM Glukose, 100 mM MOPS und 80 mM NaHCO_3 zugesetzt (siehe 2.6.3.1).

In Tabelle 31 sind die Zahlenwerte der nach 9 Tagen gemessenen extrazellulären Metabolite zusammen mit den Mittelwerten und den Standardabweichungen eingetragen. Es entstanden reproduzierbar gleiche Mengen an Succinat, Pyruvat und Malat. Pyruvat wurde in einer Konzentration von $25,16 \pm 0,08$ mM gebildet und stellte somit das Hauptprodukt dar. Zum ersten Mal konnte Malat in nennenswerten Mengen von $5,58 \pm 0,12$ mM detektiert werden. Succinat wurde in einer Konzentration von $4,98 \pm 0,02$ mM gebildet und machte den

Ergebnisse

geringsten Anteil an den Produkten aus. Somit ist eine effiziente Succinatproduktion aus Glukose mit dem Stamm ss328 nicht möglich.

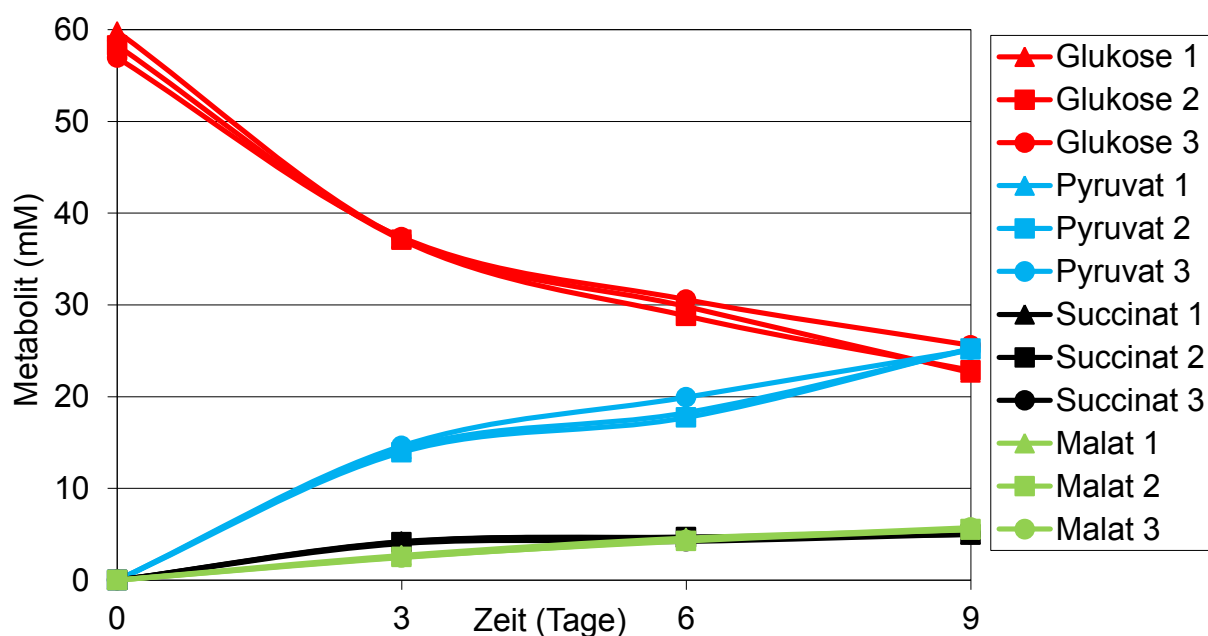


Abbildung 19: Aus Glukose gebildete Produkte bei Biotransformationen mit dem Stamm ss328.

Es wurden drei unabhängige Biotransformationen im Kleinmaßstab (1,2 ml) mit dem Stamm ss328 ($\Delta ackA$ - Δpta $\Delta mgsA$ $\Delta glcA$ $\Delta tdcE$ $\Delta ldhA$ $\Delta poxB$ $\Delta pflB$) mit Glukose als alleinige C-Quelle angesetzt. Es wurden 60 mM Glukose, 100 mM MOPS zur Pufferung und 80 mM NaHCO_3 zugesetzt. Die Anfangszell-dichte betrug 0,5 $\text{OD}_{600}/\text{ml}$ in M9-Minimalmedium. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der extrazellulären Metabolite. Über Ethanol konnte keine Aussage getroffen werden.

Tabelle 31: Succinatbildung des Stammes ss328 mit Glukose als C-Quelle.

Es wurden drei unabhängige Biotransformationen im Kleinmaßstab (1,2 ml) mit dem Stamm ss328 ($\Delta ackA$ - Δpta $\Delta mgsA$ $\Delta glcA$ $\Delta tdcE$ $\Delta ldhA$ $\Delta poxB$ $\Delta pflB$) auf Glukose als alleinige C-Quelle angesetzt. Es wurden 60 mM Glukose, 100 mM MOPS zur Pufferung und 80 mM NaHCO_3 zugesetzt. Die Anfangszell-dichte betrug 0,5 $\text{OD}_{600}/\text{ml}$ in M9-Minimalmedium. Über Ethanol konnte keine Aussage getroffen werden. Die nach 9 Tagen verbrauchte oder gebildete Menge von Metaboliten ist angegeben.

Biotransformation	Glukose verbraucht (mM)	Succinat gebildet (mM)	Pyruvat gebildet (mM)	Malat gebildet (mM)
1	37,16	4,97	25,15	5,48
2	35,39	4,97	25,25	5,55
3	31,34	5,01	25,09	5,72
Mittelwert	34,63	4,98	25,16	5,58
Standardabweichung	2,98	0,02	0,08	0,12

3.5 Succinatproduktion durch Pyruvat-Carboxylierung

In den folgenden Unterkapiteln wird die von Pyruvat (als Intermediat) ausgehende Succinatproduktion untersucht (siehe 1.2.3). Die Stämme, die für die Succinatproduktion über diese Route in Frage kommen, haben Deletionen von Genen, deren Produkte Pyruvat umwandeln. Dies ist die Voraussetzung dafür, dass Pyruvat als Substrat akkumulieren kann und es verringert zudem die Entstehung von Nebenprodukten aus Pyruvat. Allen verwendeten Stämmen gemeinsam ist die Deletion von *poxB*, *ldhA* und *pflB*. Die Deletion dieser drei Gene ist die Basis für einen Succinatproduzenten (siehe 3.4.1). Der Stamm ss331 hat zusätzlich das Gen *lipA* deletiert. Falls dem Medium keine ausreichenden Mengen Liponsäure zugegeben werden (siehe 3.1.2) führt dies zu einer starken Einschränkung der Aktivität des PDH-Komplexes, welcher unter optimalen Bedingungen große Mengen Pyruvat verbraucht. Der Stamm ss364 hat stattdessen das Gen *aceE* deletiert, welches eine komplette Inaktivität des PDH-Komplexes unter allen Bedingungen garantiert.

Für eine Carboxylierung von Pyruvat in *E. coli* ist es notwendig, anaplerotische Enzymaktivitäten bereitzustellen. Dies geschah in Form Plasmid-codierter Malic-Enzyme verschiedener Herkunft. In Minimalmedium und in Stämmen, die keine nennenswerten Pyruvat-verbrauchenden Aktivitäten mehr besitzen, wurde der Einfluss von endogenen Malic-Enzymen bisher nicht untersucht. Desweiteren wurde der Einfluss von heterologen Malic-Enzymen untersucht, die laut enzymologischer Parameter, wie geringere K_M -Werte für Pyruvat und größere V_{max} -Werte für die Carboxylierungsrichtung, besser für die Succinatproduktion geeignet sein könnten.

3.5.1 Biotransformationen mit dem Stamm ss331 und verschiedenen Malic-Enzymen

Es wurde der Einfluss von Plasmiden, die für diverse Malic-Enzyme codieren, auf die Succinatproduktion untersucht. Die Ergebnisse mit dem Stamm ss331 sind in Tabelle 32 aufgelistet. Auf Grund der Liponsäureauxotrophie wurde den Vorkulturen, nicht aber den Biotransformationsexperimenten 5 ng/ml Liponsäure zugesetzt. Die Versuche erfolgten bei 30 °C, da bei dieser Temperatur eine höhere lösliche Expression der heterologen Gene für Malic-Enzyme aus *Arabidopsis thaliana* als bei 37 °C festgestellt wurde (Daten nicht

gezeigt). Wegen der besseren Vergleichbarkeit mit den Daten aus den vorherigen Abschnitten wurde auch hier nach 6 Tagen ausgewertet. Der Stamm ss331 wurde sowohl ohne Plasmid, als auch mit den Plasmiden pSS84.4 und pSS85.1 getestet. Das Plasmid pSS84.4 hat eine mittlere Kopienzahl, und trägt das Gen für das NADP-abhängige Malic-Enzym 2 aus *A. thaliana* unter der Kontrolle des nativen Fumaratreduktasepromotors $P_{frdABCD}$ aus *E. coli*. Das Plasmid pSS85.1 unterscheidet sich nur in dem codierten Protein, welches das NADP-abhängige Malic-Enzym 3 ebenfalls aus *A. thaliana* ist. Der Verlauf der Zelldichte, ausgehend von einem Wert zu Beginn im Bereich von 0,5 OD₆₀₀/ml, war bei allen Stämmen ähnlich (Daten nicht gezeigt) und vergleichbar mit den bisherigen Ergebnissen (siehe Abbildung 14). Aus der Tabelle wird ersichtlich, dass der Stamm mit dem Plasmid pSS84.4 mit 70,9 % die höchste Ausbeute an Succinat aufwies. Die Ausbeute ohne Plasmid betrug 57,2 % und die Ausbeute mit dem Plasmid pSS85.1 betrug 62,5 %. Als weiteres Produkt konnte nur Pyruvat detektiert werden. Bei dem Stamm ss331 mit Plasmid pSS84.4, der die höchste Ausbeute an Succinat zeigte, betrug der molare Anteil des Pyruvats an der Gesamtheit der Produkte nur 7,6 %.

Tabelle 32: Succinatausbeuten des Stammes ss331 ohne und mit verschiedenen Plasmiden mit Genen für Malic-Enzyme aus *A. thaliana*.

Die Versuche wurden mit 0,5 OD₆₀₀/ml Zellen in M9-Medium, 54 mM Glycerin, 100 mM MOPS und 80 mM NaHCO₃ bei 30 °C durchgeführt. Nach 6 Tagen wurden die extrazellulären Konzentrationen von Metaboliten per HPLC bestimmt. Die Spalte Ausbeute entspricht dem Quotienten (mol Succinat gebildet / mol Glycerin verbraucht) in Prozent. Die Konzentrationen von Fumarat, Laktat, Formiat und Malat lagen unter der Nachweisgrenze von ~1,6 mM. Über Ethanol konnte keine Aussage getroffen werden.

Stamm/ Plasmid	Anzahl Versuche	Glycerin verbraucht (mM)	Succinat gebildet (mM)	Ausbeute (mol Succinat / mol Glycerin)	Acetat gebildet (mM)	Pyruvat gebildet (mM)
ss331 ^a	2x	35,5 ± 7,0	20,3 ± 3,7	57,2 ± 1,0 %	nd *	3,7 ± 2,3
ss331 pSS84.4 ^b	3x	37,6 ± 1,4	26,6 ± 0,7	70,9 ± 0,7 %	nd	2,2 ± 0,4
ss331 pSS85.1 ^c	2x	30,6 ± 2,0	19,2 ± 3,0	62,5 ± 5,9 %	nd	2,2 ± 0,2

^a ss331 ($\Delta lipA \Delta ldhA \Delta poxB \Delta pflB$)

^b ss331 pSS84.4 (Replikon pBR322, $P_{frdABCD}$ -*At*-NADP-ME2)

^c ss331 pSS85.1 (Replikon pBR322, $P_{frdABCD}$ -*At*-NADP-ME3)

* nd = nicht detektiert

3.5.2 Biotransformationen mit dem Stamm ss364 und verschiedenen Malic-Enzymen

Zusätzlich zum Stamm ss331, von dem die Aktivität des PDH-Komplexes unter den gewählten Bedingungen (anaerob und limitierte Mengen an Liponsäure) nicht genau bekannt ist, wurden Experimente mit dem Stamm ss364 durchgeführt, der wegen der Deletion des für die Aktivität des PDH-Komplexes absolut essentiellen Gens *aceE* auf jeden Fall keine PDH-Komplexaktivität mehr aufweisen darf. Dies äußerte sich darin, dass den Vorkulturen 5 mM Acetat zugesetzt werden musste, um Wachstum zu ermöglichen. Bei den Biotransformationen wurde dann kein Acetat mehr zugesetzt. Es wurden wie beim Stamm ss331 Biotransformationen angesetzt und die nach 6 Tagen gebildeten Metabolite ausgewertet. Dies ist in Tabelle 33 aufgeführt. Es wurden neben dem bereits erwähnten pSS84.4 zwei neue Plasmide verwendet. Das Plasmid pSS91.1 hat eine mittlere Kopienzahl, und produziert das NADP-abhängige Malic-Enzym 2 aus *A. thaliana* unter der Kontrolle des Rhamnose-Promotors aus *E. coli*. Zur Induktion der Genexpression wurde den Vorkulturen daher 0,2 % (w/v) Rhamnose zugesetzt. Während den Biotransformationen wurde keine Rhamnose zugefügt. Das Plasmid pSS46.22 hat eine niedrige Kopienzahl und exprimiert das Gen für das *E. coli* eigene Malic-Enzym SfcA unter der Kontrolle des starken Glycerinpromotors *glpFK*.

Der Verlauf der Zelldichten zeigte sich uneinheitlich. So kam es beim Stamm ss364 mit Plasmid pSS84.4 zu einem leichten Anstieg der Zelldichte von $0,49 \pm 0,05$ OD₆₀₀/ml auf $0,58 \pm 0,06$ OD₆₀₀/ml nach 6 Tagen. Ohne Plasmid und mit anderen Plasmiden als pSS84.4 ist die Zelldichte 6 Tage lang stetig gefallen. Beim Stamm ss364 fiel der Mittelwert der Anfangszelldichte von $0,45 \pm 0,01$ OD₆₀₀/ml auf $0,41 \pm 0,01$ OD₆₀₀/ml und beim Stamm ss364 mit Plasmid pSS91.1 fiel der Mittelwert der Zelldichte von $0,46 \pm 0,01$ OD₆₀₀/ml auf $0,43 \pm 0,01$ OD₆₀₀/ml. Die stärkste Abnahme der Zelldichte trat beim Stamm ss364 mit Plasmid pSS46.22 auf. Dort fiel der Mittelwert der Zelldichte von $0,47 \pm 0,02$ OD₆₀₀/ml zu Beginn auf $0,39 \pm 0,01$ OD₆₀₀/ml nach 6 Tagen. Der Tabelle kann man entnehmen, dass kein Acetat entstanden ist. Weiterhin entstanden größere Mengen an Pyruvat im Bereich zwischen 6,6 mM und 8,8 mM. Durch für Malic-Enzyme codierende Plasmide konnte die Succinatausbeute ausgehend von 39,6 % (ss364 ohne Plasmid) auf 50,0 % (mit pSS91.1) und 61,5 % (mit pSS84.4) gesteigert werden. Eine Ausnahme bildete der Stamm ss364 mit

Ergebnisse

pSS46.22. Hier konnte überhaupt kein Succinat detektiert werden. Es entstand nur Pyruvat in einer Konzentration von 6,6 mM, welche 75 % der verbrauchten Glycerinkonzentration entsprach.

Der Glycerinverbrauch stieg mit der Succinatausbeute an und betrug $20,5 \pm 0,6$ mM beim Stamm ss364, $24,0 \pm 0,1$ mM beim gleichen Stamm mit Plasmid pSS91.1 und $30,7 \pm 4,7$ mM mit Plasmid pSS84.4.

Tabelle 33: Succinatproduktion des Stammes ss364 mit verschiedenen Plasmid-codierten Malic-Enzymen.

Die Versuche wurden mit $0,5 \text{ OD}_{600}/\text{ml}$ Zellen in M9-Medium, 54 mM Glycerin, 100 mM MOPS und 80 mM NaHCO_3 bei 30°C durchgeführt. Nach 6 Tagen wurden die extrazellulären Konzentrationen von Metaboliten per HPLC bestimmt. Die Spalte Ausbeute entspricht dem Quotienten (mol Succinat gebildet / mol Glycerin verbraucht) in Prozent. Die Konzentrationen von Fumarat, Laktat, Formiat und Malat lagen unter der Nachweisgrenze von $\sim 1,6$ mM. Über Ethanol konnte keine Aussage getroffen werden.

Stamm/ Plasmid	Anzahl der Versuche	Glycerin verbraucht (mM)	Succinat gebildet (mM)	Ausbeute (mol Succinat / mol Glycerin)	Acetat gebildet (mM)	Pyruvat gebildet (mM)
ss364 ^a	2x	$20,5 \pm 0,6$	$8,11 \pm 0,14$	$39,6 \pm 0,5 \%$	nd *	$7,2 \pm 0,04$
ss364 pSS91.1 ^b	3x	$24,0 \pm 0,1$	$12,0 \pm 0,4$	$50,0 \pm 1,5 \%$	nd	$6,8 \pm 0,6$
ss364 pSS84.4 ^{c,e}	3x	$30,7 \pm 4,7$	$19,0 \pm 3,9$	$61,5 \pm 3,3 \%$	nd	$8,8 \pm 0,6$
ss364 pSS46.22 ^{d,e}	3x	$8,8 \pm 2,0$	nd	0%	nd	$6,6 \pm 0,1$

^a ss364 ($\Delta aceE \Delta ldhA \Delta poxB \Delta pflB$)

^b ss364 pSS91.1 (Replikon pBR322, P_{rha} -*At*-NADP-ME2)

^c ss364 pSS84.4 (Replikon pBR322, $P_{frdABCD}$ -*At*-NADP-ME2)

^d ss364 pSS46.22 (Replikon p15a, P_{glpFK} -*Ec*-*sfcA*)

^e Diese Versuche wurden ohne MOPS in M9hP-Medium und mit 100 mM NaHCO_3 durchgeführt.

* nd = nicht detektiert

Insgesamt konnte mit beiden Stämmen ss331 und ss364, die Succinat aus Glycerin durch Carboxylierung des Intermediats Pyruvat als bedeutenden Zwischenschritt produzieren sollen, eine Verbesserung der Succinatausbeute durch Plasmide, die für Malic-Enzyme codieren, erreicht werden. Genau genommen handelt es sich hier um eine Mischung aus Pyruvat-Carboxylierung und PEP-Carboxylierung, da die Gene *ppc* und *pck* in den verwendeten Stämmen noch vorhanden waren. Mit dem Plasmid pSS84.4, welches für das NADP-abhängige Malic-Enzym 2 von *A. thaliana* codiert, wurde jeweils die höchste Succinat-ausbeute erreicht. Das Ergebnis des besten Stammes ss331 mit Plasmid pSS84.4 (siehe

Kapitel 3.5 Succinatproduktion durch Pyruvat-Carboxylierung) mit einer Succinatausbeute von 70,9 % und einem Glycerinverbrauch von 37,6 mM war ähnlich zu dem besten Stamm ss328 (siehe Kapitel 3.4.1 Succinatproduktion durch PEP-Carboxylierung oder über den Glyoxylatzyklus) mit einer Succinatausbeute von 65,1 % und einem Glycerinverbrauch von 43,2 mM. Beide Ergebnisse waren noch nicht ganz zufriedenstellend. Eventuell können die Ausbeuten durch eine andere Strategie noch weiter gesteigert werden. Daher werden im nächsten Kapitel 3.6 erstmals Biotransformationen mit Stämmen ($\Delta pykA \Delta pykF$) beschrieben, die ausschließlich durch PEP-Carboxylierung Succinat produzieren sollen.

3.6 Succinatproduktion ausschließlich durch PEP-Carboxylierung

In den folgenden Unterkapiteln wird die Succinatproduktion von Stämmen mit deletierten Genen für Pyruvatkinasen beschrieben. Diese Stämme sollten folglich ausschließlich über die PEP-carboxylierende Route Succinat bilden (siehe 1.2.4).

3.6.1 Auswahl und Vergleich der auf Glycerin selektierten Stämme

3.6.1.1 Succinatproduktion aus Glycerin mit den Stämmen ss310 und ss314

Durch die aerobe Selektion auf Glycerin (siehe 3.2) wurden Pyruvatkinase-defiziente Stämme erhalten, die anders als ihre Vorgänger auf Minimalmedium mit Glycerin wachsen konnten. Da vermutet wurde, dass diese Stämme über den POMP-Weg den Metabolit PEP sehr effizient in Pyruvat umwandeln können, wurden zuerst Folgestämme in Biotransformationen untersucht, die zusätzlich eine Deletion des Gens *sfcA* aufweisen. Diese Deletion sollte eine möglichst hohe Succinatausbeute durch PEP-Carboxylierung erzwingen, da Malat nicht mehr durch Decarboxylierung durch das Malic-Enzym von der erwünschten Produktionsroute entfernt werden kann, bevor es zum Succinat umgewandelt wird. Der Stamm ss310 (relevante Deletionen $\Delta sfcA \Delta gldA \Delta pykA \Delta pykF$) basiert auf dem Vorgänger ss251 und ist somit ein Vertreter aus der Linie der Stämme, die noch eine PEP-Carboxykinase (Pck) bilden können. Im Unterschied dazu ist der Stamm ss314 (u.a. $\Delta sfcA \Delta pck \Delta pykA \Delta pykF$) ein Abkömmling von ss253 und damit ein Vertreter der Linie, deren Stämme keine Pck mehr bilden können (siehe Abbildung 10).

Ergebnisse

Diese Stämme wurden nun in Biotransformationen auf Succinatproduktion getestet. Aufgrund der Deletion des *sfcA* Gens und der daraus resultierenden Pyruvat-Auxotrophie wurde den Vorkulturen 10 mM Pyruvat zugesetzt. In den nachfolgenden Biotransformationen wurde auf den Zusatz von Pyruvat verzichtet. Als Medium wurde M9-Minimalmedium mit 60 mM Glycerin, 100 mM MOPS und 80 mM NaHCO₃ verwendet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 34 protokolliert. Beim Stamm ss310 ist die Zelldichte von $0,46 \pm 0,01$ OD₆₀₀/ml zu Beginn des Experiments innerhalb von 6 Tagen auf $0,73 \pm 0,01$ OD₆₀₀/ml angestiegen. Dieser Anstieg fiel stärker aus als beim Stamm ss314, dessen Zelldichte von $0,46 \pm 0,01$ OD₆₀₀/ml nur auf $0,55 \pm 0,01$ OD₆₀₀/ml angestiegen ist. Die molare Succinatausbeute war mit 76,4 % beim Stamm ss310 höher als beim Stamm ss314, bei dem die Ausbeute 70,1 % betrug. Somit zeichnet den Stamm ss310 sowohl eine höhere Succinatbildung als auch eine höhere Biomassebildung aus. Bei beiden Stämmen kam es zu einer geringen Acetatbildung im Bereich von ~2 mM. Bezüglich der verbrauchten Glycerinmenge und folglich auch der gebildeten Succinatmenge zeigte der Stamm ss310 einen ungefähr doppelt so hohen Umsatz (42,4 mM vs 18,6 mM Succinatbildung) als der Stamm ss314.

Tabelle 34: Succinatausbeuten selektionierter Stämme ohne Pyruvatkinasen mit Glycerin als C-Quelle.

Die Versuche wurden mit $0,5$ OD₆₀₀/ml Zellen, 100 mM MOPS, 60 mM Glycerin und 80 mM NaHCO₃ in M9-Medium bei 37 °C durchgeführt. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen der nach 6 Tagen gemessenen extrazellulären Metabolitkonzentrationen. Die Konzentrationen von Fumarat, Laktat, Formiat und Malat lagen unter der Nachweisgrenze von ~1,6 mM. Über Ethanol konnte keine Aussage getroffen werden. Δ OD₆₀₀/ml bezeichnet die Änderung der Zelldichte im Verlauf von 6 Tagen. Mit jedem Stamm wurden zwei unabhängige Biotransformationen durchgeführt.

Stamm	Glycerin verbraucht (mM)	Succinat gebildet (mM)	Ausbeute (mol Succinat / mol Glycerin)	Acetat gebildet (mM)	Δ OD ₆₀₀ /ml
ss310 ^a	$55,5 \pm 0,1$	$42,4 \pm 1,9$	$76,4 \pm 3,3$ %	$1,9 \pm 1,0$	$0,27 \pm 0,01$
ss314 ^b	$26,5 \pm 0,5$	$18,6 \pm 0,1$	$70,1 \pm 1,0$ %	$1,8 \pm 0,9$	$0,09 \pm 0,01$

^a = u.a. Δ *gldA* Δ *sfcA* Δ *tdcE* Δ *pykA* Δ *pykF* Δ *ldhA* Δ *poxB* Δ *pflB*

^b = u.a. Δ *pck* Δ *sfcA* Δ *tdcE* Δ *pykA* Δ *pykF* Δ *ldhA* Δ *poxB* Δ *pflB*

Der Stamm ss310 ist somit nicht nur ein deutlich besserer Succinatproduzent als der direkte Vergleichsstamm ss314, der über die gleiche Route Succinat produzieren kann, sondern auch besser als die jeweils besten Stämme aus den vorherigen Kapiteln, die über andere Routen

Succinat produzieren. Stamm ss310 zeigte mit 55,5 mM verbrauchtem Glycerin nicht nur den höchsten Substratverbrauch aller bisher getesteten Stämme, sondern erreichte auch die höchste Ausbeute von 76,4 % in den ersten 6 Tagen der Biotransformationen.

3.6.1.2 Succinatproduktion aus Glukose mit den Stämmen ss310 und ss314

Die beiden eben untersuchten Stämme wurden mit dem gleichen Protokoll auch auf Succinatproduktion mit Glukose statt mit Glycerin als Substrat getestet, um zu sehen, ob es auch hier zu hoher Succinatbildung kommt. Theoretisch könnte es zu einer Coproduktion von 1 mol Succinat und 1 mol Pyruvat aus 1 mol Glukose kommen. Hier wurde den Vorkulturen kein Pyruvat zugesetzt, weil die Stämme über das PTS Pyruvat aus Glukose bilden können. Die Biotransformationen erfolgten mit 60 mM Glukose. Die Ergebnisse sind in Tabelle 35 eingetragen. Der Stamm ss314 zeigte mit einem Verbrauch von 52,0 mM Glukose im Gegensatz zu den Versuchen mit Glycerin eine bessere Verwertung der C-Quelle als der Stamm ss310 mit einem Verbrauch von 40,7 mM Glukose. Pyruvat war das Hauptprodukt bei beiden Stämmen, gefolgt von Succinat. Trotz der Deletion des *ldhA* Gens konnte erstmals Laktat in Konzentrationen von $7,7 \pm 0,9$ mM (ss310) und $7,7 \pm 0,1$ mM (ss314) nachgewiesen werden. Wahrscheinlich ist das Laktat über Methylglyoxylat entstanden.

Tabelle 35: Produktausbeuten selektionierter Stämme ohne Pyruvatkinasen mit Glukose als C-Quelle.

Die Versuche wurden mit 0,5 OD₆₀₀/ml Zellen, 100 mM MOPS und 80 mM NaHCO₃ in M9-Minimalmedium mit 60 mM Glukose bei 37 °C durchgeführt. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen der nach 6 Tagen gemessenen extrazellulären Metabolitkonzentrationen. Die Konzentrationen von Fumarat, Laktat, Formiat und Malat lagen unter der Nachweisgrenze von ~1,6 mM. Über Ethanol konnte keine Aussage getroffen werden. ΔOD₆₀₀/ml bezeichnet die Änderung der Zelldichte im Verlauf von 6 Tagen. Mit jedem Stamm wurden zwei unabhängige Biotransformationen durchgeführt.

Stamm	Glukose verbraucht (mM)	Pyruvat gebildet (mM)	Succinat gebildet (mM)	Laktat gebildet (mM)	Acetat gebildet (mM)	ΔOD ₆₀₀ /ml
ss310 ^a	40,7 ± 0,6	24,9 ± 0,3	13,8 ± 1,1	7,7 ± 0,9	3,7 ± 0,4	0,13 ± 0,01
ss314 ^b	52,0 ± 0,3	36,8 ± 0,6	24,8 ± 0,2	7,7 ± 0,1	3,8 ± 0,1	0,15 ± 0,01

^a = u.a. Δ*glcA* Δ*sfcA* Δ*tdcE* Δ*pykA* Δ*pykF* Δ*ldhA* Δ*poxB* Δ*pfIB*

^b = u.a. Δ*pck* Δ*sfcA* Δ*tdcE* Δ*pykA* Δ*pykF* Δ*ldhA* Δ*poxB* Δ*pfIB*

Die Stämme ss310 und ss314 können wegen des breiten Produktspektrums nicht sinnvoll für die Succinatproduktion aus Glukose eingesetzt werden. Dennoch ist interessant, dass die Stämme trotz der Deletion von *ldhA* Laktat bilden konnten. Dieses Problem ist mit Glycerin als C-Quelle nicht aufgetreten.

3.6.2 Einfluss der Deletion des Gens für das Malic-Enzym SfcA auf die Succinatproduktion

Im Kapitel 3.6.1.1 wurde gezeigt, dass die von Glycerin ausgehende Succinatproduktion mit dem Stamm ss310 deutlich besser war als die mit dem entsprechenden Stamm ss314, der zusätzlich *pck* deletiert hat und unabhängig selektioniert wurde. Deswegen beschränken sich alle weiteren Versuche zur Succinatproduktion auf Stämme aus der gleichen Linie wie ss310. Der Nachteil von ss310 (u.a. $\Delta sfcA \Delta gldA \Delta tdcE \Delta pykA \Delta pykF \Delta ldhA \Delta poxB \Delta pflB$) ist die Auxotrophie für Pyruvat. Daher wurde der Stamm ss310 im Vergleich zu seinem direkten prototrophen Vorgänger ss279, der noch alle Malic-Enzyme besitzt, erneut getestet. Damit konnte der Einfluss von SfcA auf die Succinatproduktion und Nebenproduktbildung bewertet werden.

Als Medium für die angesetzten Biotransformationen mit den Stämmen ss279 und ss310 diente M9hP mit 60 mM Glycerin und 100 mM $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$, in dem die Zellen zu einer Zelldichte von 0,5 $\text{OD}_{600}/\text{ml}$ resuspendiert wurden. Dem Stamm ss310 wurden in den Vorkulturen, nicht aber in den Biotransformationen, 10 mM Pyruvat zugesetzt. Der Verlauf der Zelldichten ist in Abbildung 20 gezeigt. Man kann erkennen, dass es innerhalb des ersten Tages bei den beiden Stämmen zu einem vergleichbaren Anstieg der Zelldichte gekommen ist. Danach blieben die Werte 8 Tage lang annähernd konstant.

In Tabelle 36 werden die molaren Ausbeuten an Succinat nach unterschiedlichen Zeiträumen betrachtet. Über den kompletten Zeitraum von 9 Tagen erhielt man eine molare Succinatausbeute von $76,5 \pm 3,7 \%$ (ss279) und $80,9 \pm 2,7 \%$ (ss310). Hier ist der Glycerinverbrauch durch die Generierung von Zellmasse am ersten Tag nicht berücksichtigt. Betrachtet man hingegen den Zeitraum t1-t6, während dem die Zelldichte konstant blieb und das Glycerin noch nicht komplett verbraucht wurde, so erhält man größere Ausbeuten (mol

Ergebnisse

Succinat gebildet pro mol Glycerin verbraucht) von $89,5 \pm 3,7 \%$ (ss279) und $85,7 \pm 0,9 \%$ (ss310).

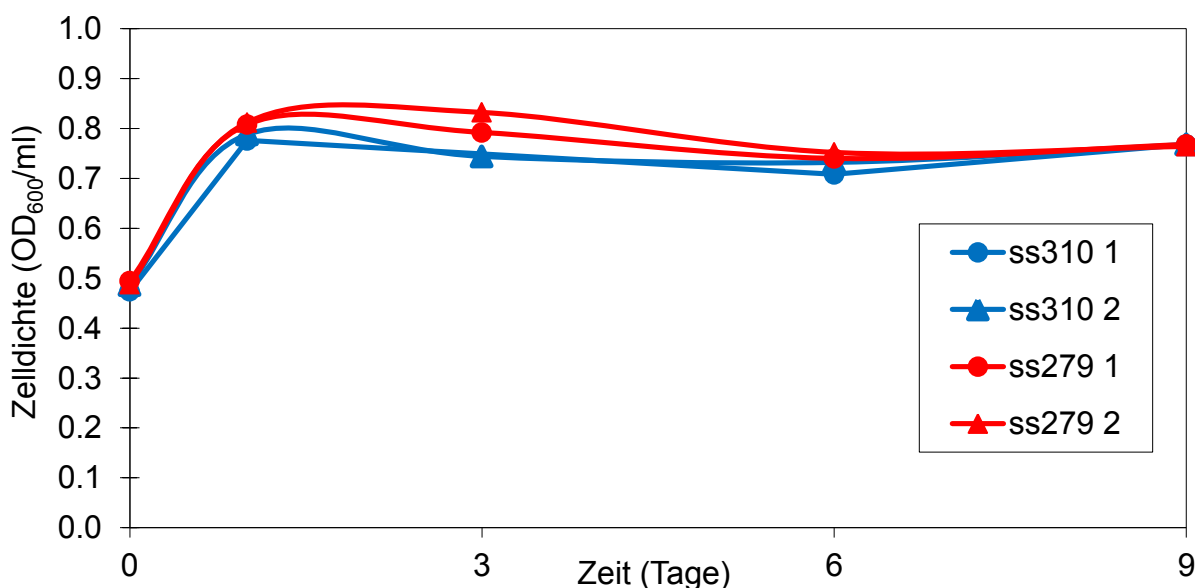


Abbildung 20: Verlauf der Zelldichten bei Biotransformationen mit den Stämmen ss279 und ss310.

Es wurden zwei unabhängige Biotransformationen pro Stamm durchgeführt und nach 0, 1, 3, 6 und 9 Tagen die Zelldichte bestimmt. Das Medium war M9hP mit 60 mM Glycerin und 100 mM $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$.

Tabelle 36: Succinatausbeuten bei Biotransformationen der Stämme ss279 und ss310 mit Glycerin als Substrat.

Die Versuche wurden mit 0,5 OD₆₀₀/ml Zellen bei 37 °C durchgeführt. Das Medium war M9hP mit 60 mM Glycerin und 100 mM $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen der zu verschiedenen Zeitpunkten gemessenen extrazellulären Metabolitkonzentrationen. Es wurden zwei unabhängige Biotransformationen pro Stamm durchgeführt.

Stamm	Zeitraum t in Tagen	Glycerin verbraucht (mM)	Succinat gebildet (mM)	Ausbeute (mol Succinat / mol Glycerin)
ss279 ^a	t0-t6	$57,8 \pm 2,8$	$47,1 \pm 1,1$	$81,5 \pm 2,0 \%$
ss310 ^b		$57,3 \pm 0,7$	$45,7 \pm 0,7$	$79,8 \pm 0,3 \%$
ss279 ^a	t0-t9	$63,7 \pm 2,2 \text{ k}^*$	$48,7 \pm 0,6$	$76,5 \pm 3,7 \%$
ss310 ^b		$62,3 \pm 0,05 \text{ k}$	$50,4 \pm 1,6$	$80,9 \pm 2,7 \%$
ss279 ^a	t1-t6	$40,0 \pm 0,6$	$35,8 \pm 1,0$	$89,5 \pm 3,7 \%$
ss310 ^b		$41,7 \pm 0,7$	$35,7 \pm 0,2$	$85,7 \pm 0,9 \%$

^a = u.a. $\Delta\text{gldA} \Delta\text{tdcE} \Delta\text{pykA} \Delta\text{pykF} \Delta\text{ldhA} \Delta\text{poxB} \Delta\text{pflB}$

^b = u.a. $\Delta\text{sfcA} \Delta\text{gldA} \Delta\text{tdcE} \Delta\text{pykA} \Delta\text{pykF} \Delta\text{ldhA} \Delta\text{poxB} \Delta\text{pflB}$

* k = kompletter Verbrauch der C-Quelle

Es wurde auch versucht, die entstandenen Nebenprodukte zu quantifizieren, die nach 6 Tagen vorhanden waren. Die Konzentrationen von manchen dieser Metabolite lagen im Bereich der jeweiligen Nachweisgrenzen und waren teilweise mit großen Standardabweichungen behaftet. Beim Stamm ss310 konnte nur Ethanol in einer Konzentration von $4,7 \pm 0,1$ mM nachgewiesen werden. Beim Stamm ss279 konnten $1,5 \pm 2,2$ mM Ethanol, $2,0 \pm 0,2$ mM Pyruvat und $2,4 \pm 0,4$ mM Acetat nachgewiesen werden.

3.6.3 Einfluss von ausgewählten Enzymen auf die Kinetik und Ausbeute der Succinatproduktion

Es wurde getestet, ob die Succinatproduktion durch Plasmide gesteigert werden kann, die für essentielle Enzyme auf dem Weg vom Glycerin zum Succinat codieren. Denkbar wären ein schnellerer Glycerinverbrauch oder eine Erhöhung der Ausbeute. Als Stammhintergrund wurde der schon charakterisierte Stamm ss310 ausgewählt und mit drei verschiedenen Plasmiden transformiert. Die Plasmide codieren für Enzyme, für deren Aktivierung aller Wahrscheinlichkeit nach kein Selektionsdruck in der aeroben Selektion auf Wachstum mit Glycerin als C-Quelle (siehe 3.2) bestand. Dies wären zum einen Enzymkomplexe des anaeroben Stoffwechsels wie der Fumaratreduktase-Komplex FrdABCD (in pSS76.2) und der Glycerin-Dehydrogenase-Komplex GlpACB (in pSS75.12) und zum anderen die bei hoher CO_2 -Konzentration auch anaplerotisch funktionierende Pck (in pSS71.1). Die Plasmide basieren auf dem Replikon des Plasmids pSC101 (geringe Kopienzahl) und codieren für die eben beschriebenen *E. coli* Enzyme, deren Gene von dem gleichen Promotor wie im Wildtyp transkribiert werden.

Es wurden zwei Biotransformationen für jeden Stamm mit je einem der drei Plasmide angesetzt. Den Vorkulturen mussten 10 mM Pyruvat für das Wachstum und $7,5 \text{ mg l}^{-1}$ Tetracyclin für die Selektion auf den Erhalt der Plasmide zugesetzt werden. Als Medium diente M9hP mit 60 mM Glycerin und 100 mM NaHCO_3 . Die Zelldichte wurde auf $0,5 \text{ OD}_{600/\text{ml}}$ eingestellt. In Abbildung 21 ist der zeitliche Verlauf der Zelldichten dargestellt. Wie in vergleichbaren Experimenten stellte sich nach anfänglichem Wachstum eine Konstanz der Zelldichte ein.

Ergebnisse

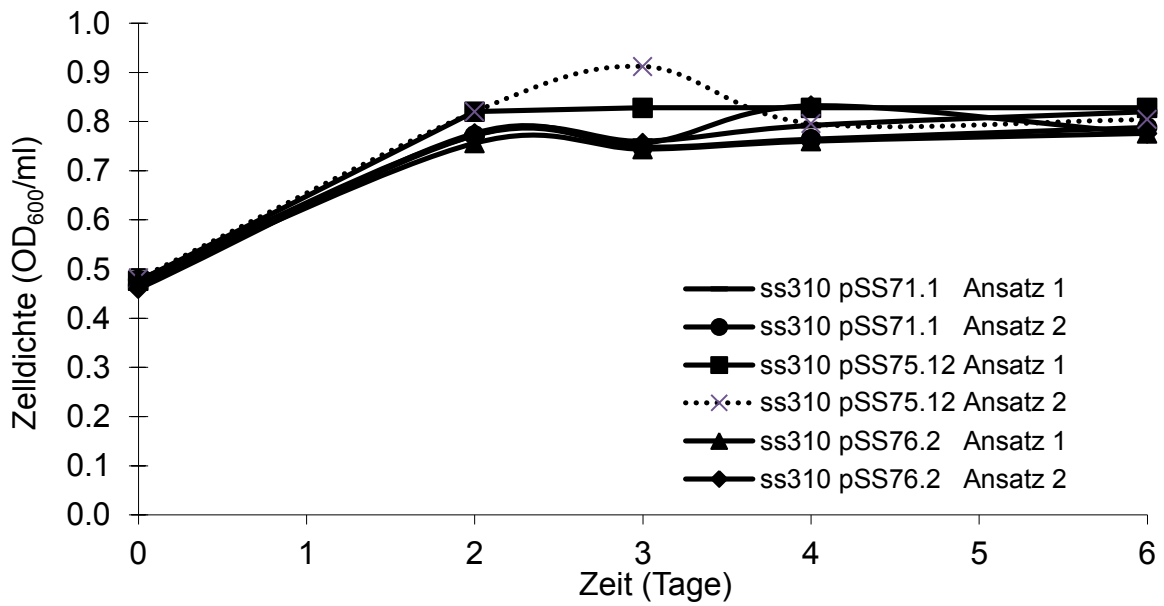


Abbildung 21: Verlauf der Zelldichte bei Biotransformationen des Stammes ss310 mit Plasmiden, die für die Succinatbildung förderlich sein könnten.

Es wurden zwei unabhängige Biotransformationen pro Stamm durchgeführt und nach 0, 2, 3, 4 und 6 Tagen wurde die Zelldichte bestimmt. Das Medium war M9hP mit 60 mM Glycerin und 100 mM NaHCO₃. Plasmid pSS71.1 codiert für die Pck, pSS75.12 codiert für GIpACB und pSS76.2 codiert für FrdABCD.

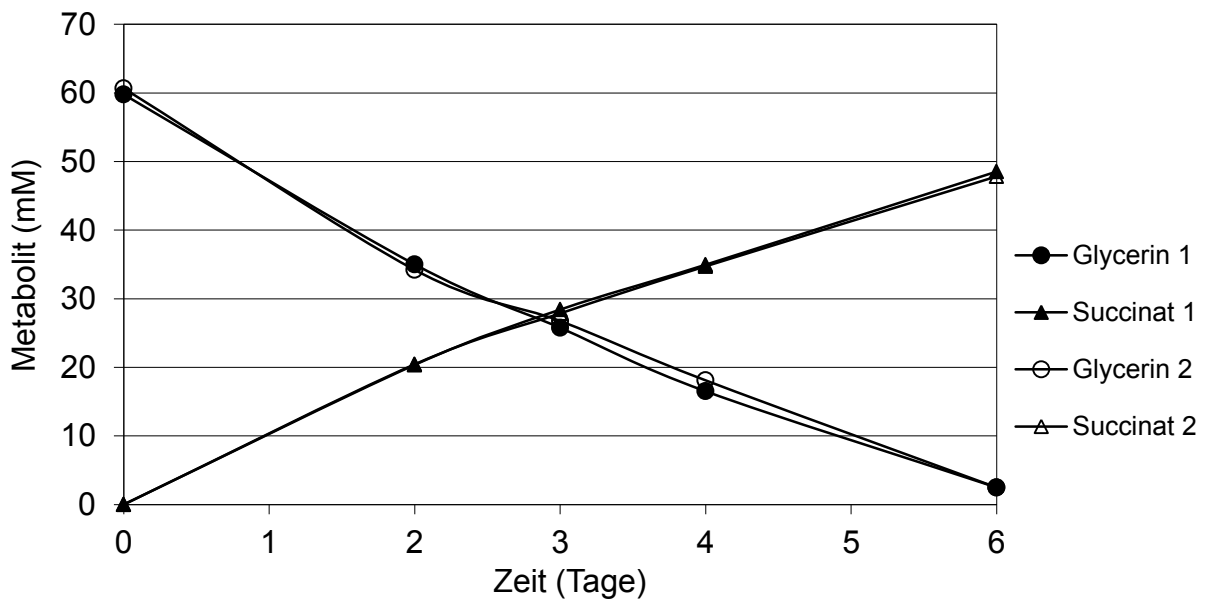


Abbildung 22: Verlauf der Succinatbildung aus Glycerin mit dem Stamm ss310 pSS71.1.

Es wurden zwei unabhängige Biotransformationen mit dem Stamm ss310 (u. a. $\Delta sfcA \Delta gldA \Delta tdcE \Delta pykA \Delta pykF \Delta ldhA \Delta poxB \Delta pflB$) mit Plasmid pSS71.1 (codiert für *pck*) durchgeführt. Die Umsetzungen fanden in 1,5 ml Plastikgefäßen mit 1,2 ml Inhalt statt. Die Zelldichte wurde auf 0,5 OD₆₀₀/ml eingestellt. Als Medium diente M9hP mit 60 mM Glycerin und 100 mM NaHCO₃. Dargestellt ist der Konzentrationsverlauf der extrazellulären Metabolite.

Ergebnisse

In Abbildung 22 sind exemplarisch für alle Experimente die zeitlichen Verläufe der extrazellulären Metabolitkonzentrationen von Glycerin und Succinat aus den Versuchen mit dem Plasmid pSS71.1 dargestellt.

In Tabelle 37 sind die Ausbeuten von unterschiedlichen Zeiträumen der Biotransformationen eingetragen. Die Auswertung über den gesamten Zeitraum von 6 Tagen (= t0-t6) berücksichtigt nicht den Glycerinverlust durch Bildung von Zellmasse (Wachstumsphase zu Beginn), weswegen die Ausbeuten geringer sind als während der reinen Produktionsphase (kein Wachstum) im Zeitraum t2-t6. Das Ergebnis des Stammes ss310 mit Plasmid pSS71.1 im Zeitraum t0-t6 mit $57,7 \pm 0,6$ mM verbrauchtem Glycerin und einer molaren Succinatausbeute von $83,5 \pm 1,8$ % ist vergleichbar mit dem Ergebnis desselben Stammes ohne Plasmid, der $57,3 \pm 0,7$ mM Glycerin verbrauchte und eine molare Succinatausbeute von $79,8 \pm 0,3$ % erreichte. Die Ausbeuten mit den Plasmiden pSS75.12 und pSS76.2 lagen ebenfalls im gleichen Bereich. Im Gegensatz zum Stamm ohne Plasmid und zum Stamm mit pSS71.1 verbrauchten die Stämme mit den beiden letztgenannten Plasmiden aber deutlich weniger Glycerin.

Tabelle 37: Succinatausbeuten aus Glycerin bei Biotransformationen des Stammes ss310 mit Plasmiden, die für die Succinatbildung förderlich sein könnten.

Es wurden zwei unabhängige Biotransformationen pro Stamm durchgeführt. Das Medium war M9hP mit 60 mM Glycerin und 100 mM NaHCO₃. Die Biotransformationen wurden mit 0,5 OD₆₀₀/ml Zellen gestartet und fanden bei 37 °C in 1,5 ml Plastikgefäßen mit 1,2 ml Inhalt statt.

Plasmid in ss310 ^a und codiertes Enzym	Zeitraum t (Tage)	Glycerin verbraucht (mM)	Succinat gebildet (mM)	Ausbeute (mol Succinat / mol Glycerin)
ohne Plasmid ^b	t0-t6	$57,3 \pm 0,7$	$45,7 \pm 0,7$	$79,8 \pm 0,3$ %
pSS71.1 (Pck)		$57,7 \pm 0,6$	$48,2 \pm 0,5$	$83,5 \pm 1,8$ %
pSS75.12 (GlpACB)		$46,5 \pm 3,5$	$37,7 \pm 2,8$	$81,0 \pm 0,0$ %
pSS76.2 (FrdABCD)		$48,5 \pm 2,2$	$40,4 \pm 1,7$	$83,4 \pm 0,2$ %
ohne Plasmid	t2-t6	--*	--	--
pSS71.1 (Pck)		$32,1 \pm 0,6$	$27,8 \pm 0,6$	$86,5 \pm 0,2$ %
pSS75.12 (GlpACB)		$25,6 \pm 2,9$	$22,2 \pm 1,4$	$87,0 \pm 4,5$ %
pSS76.2 (FrdABCD)		$24,8 \pm 4,4$	$22,7 \pm 3,3$	$92,0 \pm 2,9$ %

^a = u. a. $\Delta sfca \Delta gldA \Delta tdcE \Delta pykA \Delta pykF \Delta ldhA \Delta poxB \Delta pflB$

^b = hier wurde NaH¹³CO₃ verwendet.

* -- = Zeitraum nicht erfasst

In diesem Kapitel wurde gezeigt, dass sich die Succinatausbeuten durch Transformation des Produktionsstammes ss310 mit Plasmiden, die für Proteine codieren, welche Reaktionen auf dem gewünschten Weg vom Glycerin zum Succinat katalysieren, nicht deutlich steigern ließen. Bei den Plasmiden pSS75.12 und pSS76.2 traten sogar negative Effekte in der Art auf, dass der Glycerinverbrauch um ~20% abgenommen hat. Die Ergebnisse bestätigen aber nochmals, dass mit einem Stamm ohne Pyruvatkinasen molare Succinatausbeuten von über 86 % in einem Zeitraum ohne Biomassebildung erreicht werden können.

3.7 Analyse der CO₂-Fixierung durch ¹³C-Markierungsexperimente

In der Einleitung (siehe 1.2.6) wurde beschrieben, dass ab einer molaren Succinatausbeute (aus Glycerin) von 75 % auf jeden Fall eine Nettofixierung von CO₂ stattfinden muss. In den vorherigen Kapiteln wurden molare Succinatausbeuten in der Produktionsphase von 78,1 % mit dem Stamm ss328 (siehe Tabelle 30) und von 89,5 % bzw. 85,7 % mit den Stämmen ss279 und ss310 (siehe Tabelle 36) beschrieben. Die Succinatproben aus den entsprechenden, mit 100 mM NaH¹³CO₃ durchgeführten Biotransformationen, wurden mittels GC-MS-Analyse analysiert (siehe 2.6.5). Das Ziel war, Aufschluss darüber zu erhalten, ob das Succinat tatsächlich durch CO₂-Fixierung entstanden ist.

Bei der Auswertung der Rohdaten der massenspektrometrischen Analyse wurden nur zwei Kohlenstoffatome des Succinats betrachtet, da dies die theoretisch maximal mögliche Anzahl von Kohlenstoffen darstellt, die in den C4-Molekülen Succinat, Fumarat, Malat und Oxalacetat mit ¹³C künstlich markiert sein können, wenn das Substrat unmarkiertes Glycerin ist. Wird zum Beispiel PEP mit ¹³C-Hydrogencarbonat zum Oxalacetat carboxyliert, so entstehen über den reduktiven Ast des TCA einfach markierte Dicarbonsäuren. Eine zweifache Markierung kann es nur geben, wenn gebildetes Fumarat, bei dem C1 und C4 nicht zu unterscheiden sind, so zum PEP zurück reagiert, dass die ¹³C-Carboxylatgruppe erhalten bleibt und eine erneute Carboxylierung von PEP mit ¹³C-Hydrogencarbonat stattfindet.

In Abbildung 23 sind die ¹³C-Markierungsmuster von Succinatproben aus den Überständen von verschiedenen Biotransformationen dargestellt.

Ergebnisse

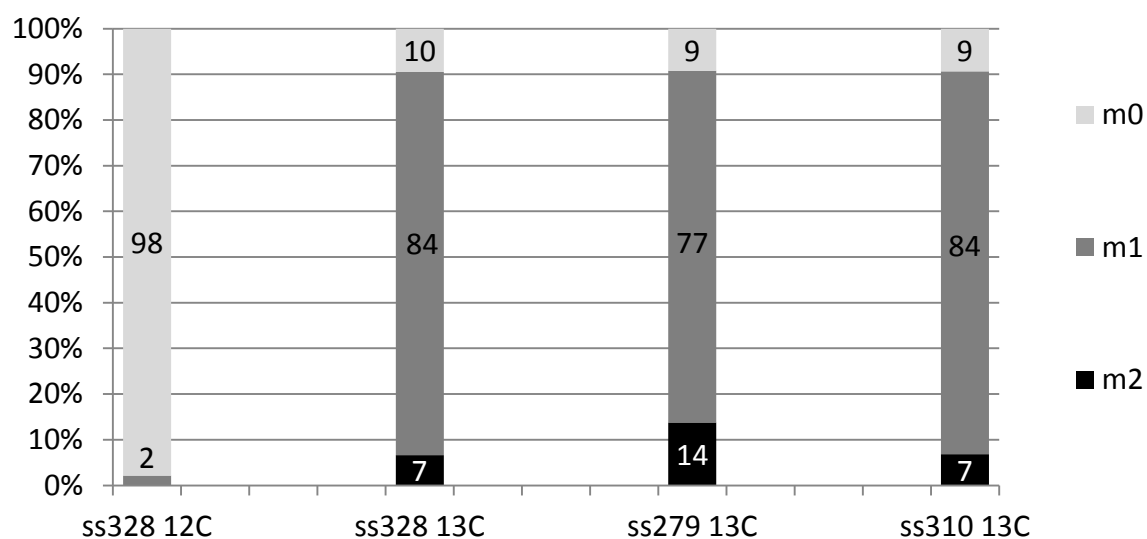


Abbildung 23: ^{13}C -Markierungsverteilung des aus Glycerin in Biotransformationen hergestellten Succinats.

Es wurden nur 2 Kohlenstoffatome des Succinats in der Auswertung berücksichtigt. Dieses „C2-Molekül“ setzt sich aus den Isotopen ^{12}C und ^{13}C zusammen und kann entweder unmarkiert (m0), einfach markiert (m1) oder doppelt markiert (m2) bezüglich des Isotops ^{13}C sein. Dargestellt sind die Mittelwerte der Isotopenmarkierungsmuster aus je zwei unabhängigen Fermentationen der Stämme ss328, ss279 und ss310. Dabei wurde das nach drei Tagen gebildete Succinat mittels GC-MS untersucht. Als CO_2 -Quelle diente entweder 100 mM NaHCO_3 mit natürlicher Isotopenverteilung (= Balken 12C) oder $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ mit einem molaren Anteil des ^{13}C Isotops von 98% (= Balken 13C).

Succinat, welches bei einer Biotransformation mit dem Stamm ss328 aus Glycerin und Natriumhydrogencarbonat mit natürlicher Isotopenverteilung entstanden ist, zeigte zu 98 % keine Markierung. Nur 2 % des Succinats waren in dieser Probe einfach markiert. Dieses Kontrollexperiment entsprach den Erwartungen (natürliche Isotopenverteilung). Die restlichen Succinatproben aus Überständen von Biotransformationen, bei denen ^{13}C -markiertes Hydrogencarbonat eingesetzt wurde, weisen zu ungefähr 90 % eine Einfach- oder Zweifachmarkierung auf. Das bedeutet, dass das gebildete Succinat fast komplett oder sogar ausschließlich durch Carboxylierung des C3-Substrates entstanden ist.

Eine 100 %-ige Markierung konnte nicht erreicht werden, da das verwendete $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ nach Angabe des Herstellers nur zu 98 % markiert ist. Außerdem wurde zu Anfang der Experimente noch Zellmasse gebildet (siehe Abbildung 20). Dabei muss es zu Decarboxylierungen gekommen sein, bei denen $^{12}\text{CO}_2$ freigesetzt wurde, welches zu einer Verringerung des ^{13}C -Anteils führte. Das vom Stamm ss279 gebildete Succinat hat mit 14 %

den größten Anteil an zweifach markiertem Succinat. Dies lässt darauf schließen, dass bei diesem Stamm gebildetes Fumarat evtl. zum Teil reversibel zum PEP zurückreagiert.

Succinat aus dem Stamm ss328 (mit Pyruvatkinasen), der theoretisch auch über den Glyoxylatzyklus Succinat produzieren könnte, hat keine signifikant geringere ^{13}C -Markierung als Succinat aus den Stämmen ss279 und ss310 (beide ohne Pyruvatkinasen). Daher entsteht im Stamm ss328 das Succinat über die gleiche Route wie in den Stämmen ss279 und ss310. Der Unterschied liegt nur in den molaren Ausbeuten (siehe oben), die mit den Stämmen erzielt werden konnten.

4 Diskussion und Ausblick

4.1 Beurteilung der λ Red-Methode zur Stammkonstruktion

In diesem Projekt wurden *E. coli* K12-Stämme erstellt, die bis zu 9 Gendelektionen (Stamm ss374) aufwiesen. Die Herstellung von Stämmen mit einer einzigen Gendelektion (vgl. 2.6.7) war in allen Fällen problemlos möglich. Durch Rekombination von Deletionskassetten mit dem Genom kam es erst zu einem Austausch des zu deletierenden Gens mit einem Resistenzgen. Danach konnte das Resistenzgen optional wieder ausgeschnitten werden. Dies erfolgte durch Rekombination zwischen zwei FRT- oder *mrpS*-Sequenzen, die das Resistenzgen flankierten. Um Stämme mit mehreren Gendelektionen zu erhalten, wurden die chromosomalen Regionen mit einzelnen Deletionen nacheinander mit dem Phagen P1*kc* transduziert. Zwischenzeitlich mussten die durch die Transduktionen erworbenen Resistenzgene gegen Antibiotika wieder ausgeschnitten werden.

In einer Publikation, die die Möglichkeiten des in dieser Arbeit verwendeten λ -Red-Systems zur Gendelektion in *E. coli* beschreibt, wurde in der Diskussion auf eventuelle Probleme hingewiesen⁵⁷. Dort wurde diskutiert, dass es beim Versuch, die Resistenz durch die Flp-Rekombinase auszuschneiden, auch zu unerwünschten Rekombinationen zwischen FRT-Sequenzen kommen könnte, die im Genom als Teil der Narbensequenz von vorherigen Deletionen noch vorhanden sind. Diese Rekombinationen könnten zu Inversionen oder Deletionen im Genom führen. Derartige Probleme bei dem Ausschneiden von Resistenzgenen aus dem Genom sind in dieser Arbeit kaum aufgetreten. Nur nach dem Ausschneiden der Kanamycinresistenz aus dem Stamm ss182 ($\Delta pykA::FRT$ -*kan*-FRT $\Delta pykF::FRT$ $\Delta ldhA::FRT$ $\Delta poxB::FRT$ $\Delta pflB::FRT$ $\Delta xthA::FRT$), der bereits sieben FRT-Sequenzen enthielt, traten Probleme auf. Bei keinem der in mehreren unabhängigen Versuchen isolierten Kanamycinsensitiven Klonen konnten durch genomische PCR alle zu erwartenden DNA-Fusionen nachgewiesen werden. Daher wurde die Methode zur Manipulation des Genoms um das *mrpS* / MrpA-System erweitert, welches nicht mit dem FRT / Flp-System interferiert. Somit konnten weitere Gene im Stamm ss182 deletiert werden.

Das Deletieren von ungefähr 10 Genen in einem Stamm sollte mit den vorhandenen Möglichkeiten (siehe Tabelle 20) problemlos möglich sein. Werden bspw. nur drei Deletionen benötigt, so ist die sukzessive Kotransduktion mit drei verschiedenen Resistenzgenen die konkurrenzlos schnellste Methode, falls entsprechende Stämme, aus denen die *P1kc*-Lysate hergestellt werden können, schon vorhanden sind. Dennoch empfiehlt sich bei neuen Projekten der Einsatz von optimierten Deletionsmethoden, bei denen im Genom keine Spuren (Narbensequenzen) zurückbleiben, die zu Problemen führen können. Derartige Methoden wurden in den letzten Jahren publiziert ^{55,231-233}.

4.2 Adaption der Zellen an Minimalmedium

Bestimmte *E. coli* Stämme überleben die Zugabe von Glycerin nicht, falls sie in Komplexmedien wachsen ²³⁴. Der Grund liegt in der konstitutiven und unregulierten Synthese einer mutierten Glycerinkinase, die nicht mehr allosterisch gehemmt werden kann. Bei Zugabe von Glycerin werden dann hohe Mengen von G3P gebildet, welches nach der Umwandlung in DHAP durch MgsA zum giftigen Methylglyoxylat weiterreagiert (siehe 1.2.1).

Teilweise sind prototrophe Stämme in dieser Arbeit nicht in Minimalmedium mit Glycerin als C-Quelle gewachsen, falls man die Flüssigkulturen direkt aus der archivierten Glycerindauerkultur oder mit einer Kolonie von einer Platte mit LB-Agar beimpft hat. In einigen Fällen sind Stämme in Minimalmedium mit Glycerin zwar gewachsen, bei der Bestimmung der Wachstumsraten lagen diese allerdings deutlich unter den Erwartungen (Daten nicht gezeigt). Da vermutet wurde, dass diese beobachteten Phänomene mit der unregulierten Bildung von Methylglyoxylat in Zusammenhang stehen, wurden alle Stämme erst an Minimalmedium mit Glukose adaptiert, bevor sie in Minimalmedium mit Glycerin transferiert wurden. Diese Vorgehensweise lieferte reproduzierbare Ergebnisse bei der Ermittlung der Wachstumsraten der Stämme in Minimalmedium mit Glycerin und die mit Einzelkolonien beimpften Übernachtskulturen erreichten mit Glukose als C-Quelle früher die notwendigen Zelldichten.

4.3 Selektion auf schnelleres Wachstum und Pyruvatbildung über den POMP-Weg

Die Doppeldeletion von *pykA* und *pykF* in *E. coli* wurde in der neueren Literatur als letal in Minimalmedium mit Glycerin als alleinige C-Quelle beschrieben²³⁵. Die in der vorliegenden Arbeit konstruierten $\Delta pykA \Delta pykF$ Stämme konnten aber unter diesen Bedingungen mit einer niedrigen Wachstumsrate von $\sim 0,10 \text{ h}^{-1}$ wachsen. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Aussage, dass Stämme ohne Pyruvatkinasen marginal auf Glycerin wachsen können²³⁶. Durch eine Selektion auf schnelleres Wachstum in Minimalmedium mit Glycerin konnten Mutanten isoliert werden, die Wachstumsraten im Bereich von $\sim 0,30 \text{ h}^{-1}$ in diesem Medium zeigten (siehe Tabelle 23). Derartige Selektionsexperimente (adaptive Evolution) sind gängige Praxis und wurden mit *E. coli* auch schon mit Glycerin als C-Quelle durchgeführt^{237,238}. Besonders interessant sind dabei die Experimente, bei denen das Wachstum mit der Produktion eines Metaboliten gekoppelt ist, so dass die Verbesserung der Wachstumsrate auch automatisch zu einem besseren Produzenten führt, wie dies mit Ethanol produzierenden Stämmen gezeigt wurde^{21,239}.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch die aerobe Selektion von $\Delta pykA \Delta pykF$ Stämmen in Minimalmedium mit Glycerin den Stofffluss vom PEP zum Pyruvat über die POMP-Umleitung (siehe 1.2.4) zu ermöglichen oder zu verstärken. Eine Aktivierung anderer Stoffwechselwege, die zum Pyruvat ohne eine C4-Zwischenstufe führen, hätte voraussichtlich einen negativen Einfluss auf die Succinatproduktion gehabt. Durch die Deletion von *sfcA* in zwei mutierten Stämmen aus unabhängigen Selektionsexperimenten konnte gezeigt werden, dass bei dem Wachstum auf Glycerin der POMP-Weg eine essentielle Rolle spielt. Die Wachstumsraten hatten sich nur durch die *sfcA* Deletion von $\sim 0,3 \text{ h}^{-1}$ auf $\sim 0,1 \text{ h}^{-1}$ stark erniedrigt. Eine Deletion von anderen Genen (*pps*, *mgsA* oder *gldA*), die für alternative Wege der Pyruvatentstehung codieren, hatte kaum Einfluss auf das Wachstum der Mutanten in Minimalmedium mit Glycerin (siehe Tabelle 23).

Durch die Deletion von *sfcA* haben sich die Wachstumsraten mit Glycerin als C-Quelle zwar deutlich verringert, ein kompletter Wachstumsstopp ist aber nicht aufgetreten. Vermutlich leistet das zweite Malic-Enzym MaeB von *E. coli* auch einen geringen Beitrag zum metabolischen Fluss über die POMP-Umleitung. Daher wäre es interessant zu sehen, ob das

Wachstum durch die zusätzliche Deletion von *maeB* völlig zum Erliegen gebracht werden kann. Es gibt noch weitere Möglichkeiten der Pyruvatentstehung in der Zelle. Vermutlich leisten diese Reaktionen aber keinen entscheidenden Anteil. Ein Beispiel ist die Decarboxylierung von Oxalacetat zu Pyruvat, die spontan abläuft^{240,241} und auch von der multifunktionalen Entner-Doudoroff Aldolase (Eda) enzymatisch katalysiert wird²⁴².

Die Deletion von *ppc* in einem selektierten Stamm ohne Pyruvatkinasen brachte das aerobe Wachstum auf Minimalmedium mit Glycerin vollständig zum Erliegen. Dies entsprach den Erwartungen, weil die Ppc den ersten Schritt der POMP-Umleitung katalysiert. Theoretisch könnte bei aerobem Wachstum auch die Pck die Carboxylierung von PEP bei hohen intrazellulären Konzentrationen von CO₂ gewährleisten, falls sie in ausreichender Menge in der Zelle vorliegen würde (vgl. Kapitel 1.2.1 und 1.2.4). Dies wurde beispielsweise schon in einem Hefestamm gezeigt, der keine Alternative zur Pck für die Bildung von C4-Metaboliten hatte¹⁸⁴. Tatsächlich gelang es auch in der vorliegenden Arbeit ein Wachstum des Stammes ss374 mit den relevanten Deletionen $\Delta ppc \Delta gldA \Delta pykA \Delta pykF$ in Minimalmedium mit Glycerin nachzuweisen. Wachstum trat aber nur in verschlossenen Gefäßen auf, weil vermutlich nur dadurch das Entweichen von zugesetztem Hydrogencarbonat in Form von CO₂ vermieden werden konnte (siehe Tabelle 24). Höhere Zelldichten als 0,4 OD₆₀₀/ml konnten vermutlich wegen der limitierten Sauerstoffmenge in den verschlossenen Gefäßen nicht erreicht werden. Eine weitergehende Charakterisierung wäre nur in einem Fermenter sinnvoll, in dem die Sauerstoff- und CO₂-Konzentration adäquat reguliert werden kann.

Zusätzlich zur Charakterisierung der $\Delta pykA \Delta pykF$ Stämme durch die Aufnahme von Wachstumskinetiken, wäre es interessant, die unbekannt Mutationen zum Beispiel durch DNA-Sequenzierung zu identifizieren. Weiterhin könnte man Transkriptom- oder Metabolomanalysen durchführen. Durch die beiden letzten Methoden könnte man Aussagen über den mRNA-Pool und die Stoffwechselaktivitäten in der Zelle machen. Eine DNA-Sequenzierung könnte Aufschluss darüber geben, welche zusätzlichen Mutationen während der Selektion aufgetreten sind. In einer Publikation wurde die Resequenzierung von 11 auf Minimalmedium mit Laktat selektierten *E. coli* Stämmen beschrieben²⁴³. Dort traten bestimmte Mutationen in mehreren Stämmen unabhängig auf und viele Mutationen konnten eindeutig dem

Laktatmetabolismus zugeordnet werden. Allerdings wurden auch viele Mutationen von globalen Regulatoren oder der RNA-Polymerase festgestellt, die pleiotrope Auswirkungen zeigten. Die Interpretation solcher Mutationen ist enorm schwierig. Für die im Succinatprojekt erhaltenen Mutanten wäre vor allem interessant zu wissen, ob die Mutationen nur eine positive Auswirkung auf das aerobe Wachstum in Minimalmedium mit Glycerin haben, oder ob vielmehr auch die Succinatproduktion im Anaeroben durch die Mutationen begünstigt wird. Der durch die Selektion erzwungene metabolische Fluss über den POMP-Weg entspricht nur einer teilweisen Kopplung mit der gewünschten Produktionsroute zum Succinat über die Carboxylierung von PEP. Zuletzt sei gesagt, dass die Glycerin über den POMP-Weg verstoffwechselnden Mutanten auch für eine Produktion von anderen industriell relevanten Produkten geeignet sein könnten. Oxalacetat als Intermediat des POMP-Weges ist beispielsweise ein Vorläufermolekül für Aminosäuren aus der Aspartatfamilie (Asn, Asp, Ile, Met, Lys, Thr)²⁴⁴.

4.4 Bewertung der Biotransformationsmethode im Kleinmaßstab

4.4.1 Allgemeine Bewertung der Biotransformationsmethode

Die Durchführung von Biotransformationen in 1,5 ml Plastikgefäßen (siehe 2.6.3) lieferte reproduzierbare Ergebnisse (vgl. beispielsweise Tabelle 29). Mit dem einfachen Protokoll konnten viele Ansätze parallel durchgeführt werden und der Materialverbrauch beschränkte sich auf ein Minimum. Eine vereinfachte analoge Methode wurde bei Experimenten zur Identifikation des Succinatexporters in *C. glutamicum* eingesetzt¹⁹⁷. Hier wurden in einem 1,5 ml Plastikgefäß 700 µl einer Vorkultur mit 700 µl Medium gemischt und für zwei Tage inkubiert. Zur unkomplizierten Charakterisierung und Überprüfung von neu konstruierten Stämmen war das bisher verwendete Protokoll ideal.

Allerdings hat die Methode auch einige Nachteile. Es ist weder eine Steuerung noch eine Überwachung von Parametern in Echtzeit möglich, wie dies in einem Fermenter möglich ist. Somit können beispielsweise keine genauen Aussagen über den Verlauf der Sauerstoffkonzentration gemacht werden. Man kann davon ausgehen, dass die Sauerstoffkonzentration innerhalb der ersten Stunden nach Verschließen der Plastikgefäße

rapide abnimmt. Es sollten dann anaerobe Bedingungen vorherrschen. Eventuell sind die Bedingungen aber auch nur mikroaerob, da nicht bekannt ist, wie dicht die verwendeten Plastikgefäße wirklich schließen. Es könnte immer noch zu einem marginalen Austausch verschiedener Gase (O_2 , CO_2 , H_2) kommen. Bei der Literaturrecherche konnte keine Publikation gefunden werden, welche die Produktion von Succinat aus Glycerin in Minimalmedium unter rein anaeroben Bedingungen beschreibt. Es ist zwar immer die Rede von anaeroben Bedingungen, bei genauer Analyse der Methodenteile wurde aber in keinem Fall ein Fermenter verwendet, sondern nur mehr oder weniger gut verschlossene Gefäße^{29,79}.

Am Institut für Bioverfahrenstechnik wurden von Maria Rahnert Biotransformationen im Fermenter durchgeführt. Es wurde versucht, die in dieser Arbeit beschriebenen Biotransformationen im Kleinmaßstab in einem größeren Maßstab nachzustellen. Dabei zeigte sich, dass nach dem Abbruch der Belüftung die Sauerstoffsättigung innerhalb von zwei Stunden auf 0 % gefallen ist. Die Zunahme der Zelldichte stoppte genau in diesem Moment. Danach kam es zu einem Abfall der Zelldichte und die Succinatproduktion war deutlich geringer als in den 1,5 ml Plastikgefäßen, die zu Beginn des Experiments mit je 1,2 ml der Zellsuspension aus dem Fermenter gefüllt worden sind (Daten nicht gezeigt). Ein entsprechender Abfall der Zelldichte bei den Biotransformationen im Kleinmaßstab wurde nur dann beobachtet, wenn Anfangszelldichten von 2,5 OD_{600}/ml oder mehr eingesetzt wurden.

Es ist von enormer Wichtigkeit, dass es gelingt, die Succinatproduktion im Fermenter zu etablieren und zu optimieren. Nur so können beispielsweise durch höhere Zelldichten auch bessere Produktionsraten erreicht werden. Es ist denkbar, dass man dafür mikroaerobe Bedingungen einstellen muss.

4.4.2 Anaerobes Wachstum von *E. coli* in Minimalmedium mit Glycerin

E. coli kann im Aeroben problemlos in Minimalmedium mit Glycerin als alleinige C-Quelle wachsen. Unter anaeroben Bedingungen im gleichen Medium ist Wachstum nur möglich, wenn zusätzlich terminale Elektronenakzeptoren wie Nitrat, Fumarat, Dimethylsulfoxid oder Trimethylamin-N-oxid vorhanden sind²⁴⁵.

Die Arbeitsgruppe um Professor Gonzalez hat sich in den letzten Jahren intensiv mit dem anaeroben Wachstum von *E. coli* auf Glycerin auseinandergesetzt und behauptet, dass dies auch ohne Zusatz von Elektronenakzeptoren möglich ist^{91,103,246,247}. Es wurde dargestellt, dass der Reduktionsgrad einer *E. coli* Zelle niedriger ist als der von Glycerin. Deshalb ist es im Anaeroben für eine ausgeglichene Redoxbilanz erforderlich, netto Elektronen auf Moleküle zu übertragen, die nicht Teil der Biomasse der Zelle werden. Der einzig native Weg in *E. coli*, um dies mit Glycerin zu gewährleisten, ist die Bildung von 1,2-Propandiol über die Zwischenstufen Methylglyoxal und Hydroxyaceton (siehe Kapitel 1.2.1). Im Überstand einer Fermentation in Minimalmedium mit Glycerin konnten zwar geringe Mengen 1,2-Propandiol (0,5 mM) nachgewiesen werden, aber die Zelldichte hat sich nach mehreren Tagen unter rein anaeroben Bedingungen nur von 0,05 auf 0,14 OD₅₅₀/ml erhöht¹⁰³. Der in diesem Experiment verwendete Stamm MG1655 trug zusätzlich ein Plasmid in sich, welches die Entstehung von 1,2-Propandiol begünstigte. Ohne Plasmid konnte kein Wachstum detektiert werden.

Warum dennoch an der Aussage festgehalten wurde, dass *E. coli* anaerob ohne Zusätze mit Glycerin als C-Quelle wachsen kann, ist unverständlich. Das Wachstum hat sich durch Zusatz von 2 g l⁻¹ Trypton verbessert, aber es wurden nur sehr geringe Wachstumsraten von $\mu = 0,04 \text{ h}^{-1}$ ermittelt^{103,247}. Somit waren die Bedingungen nicht mehr erfüllt, um behaupten zu können, dass anaerobes Wachstum ohne Zusätze möglich ist. Es ist wahrscheinlich, dass Reduktionsäquivalente auf Inhaltsstoffe des Tryptons übertragen werden konnten. Die Bildung von Ethanol und Formiat über PflB (nicht über PDHK) und AdhE und die Bildung von Succinat durch Carboxylierung von PEP sind dagegen redoxneutrale Prozesse²⁴⁶.

In der aktuellsten der genannten Publikationen aus der Arbeitsgruppe von Professor Gonzalez wurde schlussendlich der mikroaerobe Metabolismus von *E. coli* untersucht, weil nur so der Verzicht auf komplexe Bestandteile im Medium möglich war. Unter mikroaeroben Bedingungen hat der Stamm BW25113 (auch Vorgänger der Stämme in der vorliegenden Arbeit) 200 mM Glycerin in drei Tagen komplett verbraucht und in 120 mM Ethanol und 45 mM organische Säuren umgewandelt. In der exponentiellen Wachstumsphase wurde mit $\mu = 0,24 \text{ h}^{-1}$ eine deutlich höhere Wachstumsrate als in den rein anaeroben Experimenten ermittelt⁹¹.

Bei den in dieser Arbeit vorgestellten Versuchen war kein Wachstum auf Glycerin in anaerobem Milieu festgestellt worden. Das war auch nicht das Ziel, da die Biomasse während der aeroben Phase gebildet werden sollte, während in der anaeroben Phase Succinat gebildet werden sollte.

4.4.3 Redoxbilanz bei der Succinatproduktion aus Glycerin

In der Einleitung (siehe 1.2.6) und im vorherigen Kapitel wurde angesprochen, dass im Anaeroben nur die Bildung von Ethanol/Formiat und von Succinat durch PEP-Carboxylierung aus Glycerin zu einer ausgeglichenen Redoxbilanz führt. Die Bildung von Zellmasse (Wachstum der Kultur) oder anderer Metabolite wie Acetat, Malat oder Fumarat würde zu einer Akkumulierung von reduzierten Elektronenüberträgern (NADH, UQH₂, MQH₂) führen, die im Anaeroben nicht mehr aufgehoben werden kann. Das intrazelluläre Gleichgewicht zwischen oxidierten und reduzierten Formen der Elektronenüberträger wäre stark beeinträchtigt. Es könnte dann zu einem Stillstand des Metabolismus kommen, wenn keine oxidierten Elektronenüberträger mehr vorhanden sind.

In diesem Projekt gab es eine weitere Einschränkung der Anzahl der Reaktionen, die eine ausgeglichene Redoxbilanz gewährleisten. Durch die Deletion von *pflB* in allen Produktionsstämmen war auch die redoxneutrale Entstehung von Ethanol nicht mehr möglich, weil bei der alternativen Entstehung von Acetyl-CoA als Ethanolvorstufe ein Molekül NADH durch den PDH-Komplex gebildet wurde, welches bei der Bildung durch die Pyruvat-Formiat-Lyase nicht aufgetreten wäre. Somit blieb nur noch die Entstehung von Succinat aus Glycerin durch Carboxylierung von C₃-Metaboliten als einzige redoxneutrale Reaktion im Anaeroben übrig.

Bei den durchgeführten Biotransformationen wurde aber nur eine annähernd quantitative Succinatbildung festgestellt, da es auch zur Bildung von Nebenprodukten wie Ethanol gekommen ist. Somit war die Redoxbilanz theoretisch nicht ausgeglichen. Es stellt sich daher die Frage, welches Molekül als zusätzlicher Elektronenakzeptor im Anaeroben diene. Ein minimaler Eintrag von Sauerstoff in die Plastikgefäße könnte für einen Redoxausgleich gesorgt haben und wäre die einfachste Erklärungsmöglichkeit. Eine weitere Möglichkeit wäre

die Bildung von molekularem Wasserstoff, die in *E. coli* hauptsächlich über die Formiat-Hydrogen-Lyase erfolgt^{239,248-250}. Dieser Weg schied bei den verwendeten $\Delta pflB$ Stämmen aber aus, weil kein Formiat mehr gebildet werden konnte. Die direkte Produktion von Wasserstoff in *E. coli* ohne die Zwischenstufe Formiat wurde mit Stämmen gezeigt, die heterologe Hydrogenasen, Ferredoxine und Ferredoxinreduktasen bildeten²⁵¹⁻²⁵³. Eine Wasserstoffproduktion ohne die Zwischenstufe Formiat tritt in einem Wildtypstamm aber wahrscheinlich nicht oder nur in nicht detektierbaren Mengen auf. Daher wurde dieser theoretischen Möglichkeit zum Ausgleich der Redoxbilanz keine große Bedeutung beigemessen. Weiterhin könnten Elektronen auf Zellbestandteile von abgestorbenen und lysierten Zellen übertragen worden sein.

Als letzte Möglichkeit um oxidierte Elektronenüberträger zu regenerieren, kommt die Reduktion von Sulfat zu Sulfid in Frage, die beispielsweise bei dem Biosyntheseweg der Aminosäure Cystein abläuft^{254,255}. Die in dieser Arbeit verwendeten Minimalmedien M9 oder M9hP enthielten jeweils 1 mM Sulfat. Dieses Sulfat könnte als Oxidationsmittel ebenfalls einen geringen Anteil an der Beseitigung überschüssiger reduzierter Elektronenüberträger gehabt haben. Dies gilt aber nur für die bisher geringen Mengen Glycerin (~ 50 mM), die in den Biotransformationen umgesetzt wurden. Falls es irgendwann gelänge 1 M Glycerin umzusetzen, würde Sulfat in dem eingesetzten Konzentrationsbereich keine Rolle mehr spielen.

Damit das Nebenprodukt Ethanol bei den verwendeten $\Delta pflB$ Stämmen entstehen kann, muss zuvor eine oxidative Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA durch den PDH-Komplex stattfinden. Derartige irreversible Decarboxylierungen, bei denen zwangsläufig NADH gebildet wird, führen zu einer Akkumulation von NADH. Zur Optimierung der Succinatausbeute und zur Wahrung der Reduktionsbilanz ist es eine Überlegung wert, wie diese und andere Decarboxylierungsreaktionen vermieden werden können. Strategien beispielsweise zur Einschränkung der Aktivität des PDH-Komplexes wurden bereits erörtert (siehe Kapitel 1.2.3).

Zusammenfassend kann man sagen, dass unter rein anaeroben Bedingungen mit Glycerin als einzige C-Quelle nur die Bildung von Succinat möglich ist, um eine ausgeglichene

Redoxbilanz zu gewährleisten. Unvermeidbare und irreversible Decarboxylierungen durch den PDH-Komplex, auch wenn dies nur in geringen Raten geschieht, führen zu einer Akkumulation von NADH. Die Redoxbilanz kann daher nur ausgeglichen werden, wenn NADH auf externe Elektronenakzeptoren übertragen werden kann. Daher müssen höchstwahrscheinlich mikroaerobe Bedingungen für eine Succinatproduktion vorherrschen. Alternativ könnten Bestandteile im Rohglycerin oder in einem industriell relevanten, weil billigen Medienzusatz als Elektronenakzeptoren dienen.

4.4.4 Wachstum der Zellen in der aerob-anaeroben Übergangsphase

Ziel des Projektes war, eine quantitative Succinatproduktion aus Glycerin im Anaeroben zu erreichen, wobei die Biomasse der dafür konstruierten Stämme in einer aeroben Wachstumsphase gebildet werden sollte (siehe 1.3). Die Biotransformation im Kleinmaßstab stellte dabei einen Ausschnitt des anvisierten Gesamtprozesses dar und umfasste den letzten Abschnitt der aeroben Wachstumsphase, die aerob-anaerobe Übergangsphase und die anaerobe bzw. mikroaerobe Produktionsphase.

In allen Biotransformationen, die mit Zelldichten zwischen 0,1 und 0,5 OD₆₀₀/ml gestartet wurden, kam es zu Beginn zu einem leichten Anstieg der Zelldichten bis auf 0,7 OD₆₀₀/ml (zum Beispiel Abbildung 14), die dann für einen Zeitraum von mehreren Tagen während der reinen Produktionsphase konstant blieben. Der Wachstumsstopp und der Start der Produktionsphase waren mit der Abwesenheit von Sauerstoff gekoppelt. Die aerob-anaerobe Übergangsphase, in der vermutlich die entscheidenden Enzyme für die Succinatproduktion gebildet wurden, schien ein kritischer Moment bei den Biotransformationen zu sein. Wie diese Phase in den 1,5 ml Plastikgefäßen genau ablief, ist nicht bekannt und konnte im Fermenter leider noch nicht nachgestellt werden. In einer Publikation über die Succinatproduktion aus Glukose mit *E. coli* wurde die Bedeutung der Begasung in dieser Phase beschrieben. Die Dauer der mikroaeroben Phase, die der rein anaeroben Produktionsphase vorgeschaltet wurde, hatte einen bedeutenden Einfluss auf die Succinatproduktion²⁵⁶.

Mit der gewählten Methode in den 1,5 ml Plastikgefäßen war es nicht möglich, die Produktivität durch Einsatz von hohen Zelldichten zu erhöhen. Entgegen den Erwartungen

wurde die Succinatbildung bei Zelldichten größer als 1 OD₆₀₀/ml immer geringer (vgl. Tabelle 25). Dieses Ergebnis könnte die Folge davon sein, dass der limitierte Sauerstoffvorrat in den Gefäßen bei hohen Zelldichten nicht für eine ausreichend lange Adaptation an anaerobe Bedingungen ausreichte. Dies zeigt eine weitere Limitation der verwendeten Methode auf, weshalb es unerlässlich ist, auf Experimente im Fermenter umzusteigen.

In einem weiteren Experiment (siehe Kapitel 3.3.3) wurden Biotransformationen mit unterschiedlichen Anfangszelldichten durchgeführt. Durch die stufenweise Herabsetzung des Flüssigvolumens in den Plastikgefäßen mit steigenden Anfangszelldichten wurde dafür gesorgt, dass in jeder Biotransformation anfänglich eine identische Menge Sauerstoff pro Zelle zur Verfügung stand. Damit sollte die Limitation, dass große Zelldichten zu langsamer Verstoffwechslung der C-Quelle führten, aufgehoben werden. Der positive Effekt war, dass die Zelldichten nicht mehr wie zuvor gefallen, sondern konstant geblieben sind. Auch der Glycerinverbrauch war bei höheren Zelldichten nun größer, auch wenn keine direkte Proportionalität gegeben war. Dennoch verringerte sich die molare Succinatausbeute mit höheren Zelldichten. Dies könnte daran liegen, dass Hydrogencarbonat, welches im Gleichgewicht mit CO₂ war, im Verlauf der mehrtägigen Biotransformation aus der Flüssigphase ausgetreten ist und somit nicht mehr als Substrat zur Verfügung stand. Dieser Effekt würde bei höheren Zelldichten eine größere Rolle spielen, da hier das Verhältnis von Luftvolumen zu Flüssigvolumen aufgrund des experimentellen Aufbaus am größten ist.

4.4.5 Einfluss von Hydrogencarbonat auf die Succinatausbeute und den Glycerinverbrauch

Im Kapitel 3.3.4 wurde der Einfluss von Hydrogencarbonat auf die Succinatausbeute und den Glycerinverbrauch bestimmt. Der Stamm ss328 (*ΔackA-pta ΔmgsA ΔgldA ΔtdcE ΔldhA ΔpoxB ΔpflB*) erreichte mit steigender NaHCO₃-Konzentration höhere Succinatausbeuten und verbrauchte mehr Glycerin. Ohne Zugabe von NaHCO₃ wurde nur 21,2 mM Glycerin verbraucht und die molare Succinatausbeute aus Glycerin betrug 26,6 %. Bei Zugabe von 120 mM NaHCO₃ wurde fast die dreifache Menge an Glycerin (58,9 mM) verbraucht und auch die Succinatausbeute erhöhte sich um den Faktor 2,8 auf einen Wert von 75,1 % (vgl. Tabelle 28). Die Zugabe von Kohlenstoffdioxid in Form von NaHCO₃ hatte eindeutig einen

positiven Effekt auf die Succinatproduktion. Dies entsprach den Erwartungen, da bei allen erörterten Strategien (siehe Kapitel 1.2.2 bis 1.2.4) möglichst viel Succinat durch Carboxylierung von C3-Metaboliten entstehen soll. Hydrogencarbonat ist das Substrat für die Ppc und CO₂ ist das Substrat für die Pck für die Carboxylierung von PEP zum Oxalacetat. Es wurde in der Einleitung auch erwähnt, dass hohe Konzentrationen von CO₂ die Carboxylierung von PEP durch die Pck begünstigen, da diese eine nur niedrige Affinität für CO₂ hat (vgl. Kapitel 1.2.4).

Ein Einfluss von CO₂ auf die Succinatproduktion, der über die Verwendung als Substrat für die carboxylierenden Enzyme Pck oder Ppc hinausgeht, ist ebenfalls denkbar. Eine hohe Konzentration von CO₂ könnte zum Beispiel für eine Veränderung des Genexpressionsmusters sorgen, welches förderlich für die Succinatproduktion wäre. Es gibt zum Beispiel Hinweise darauf, dass die Expression von *pck* durch Erhöhung der CO₂-Konzentration verstärkt wird²⁵⁷. Es wurde aber maximal eine Erhöhung um den Faktor 1,7 festgestellt.

4.5 Succinatproduktion über die Carboxylierung von PEP und den Glyoxylatzyklus

Der Einfluss von verschiedenen Gendelektionen auf die anaerobe Succinatproduktion aus Glycerin wurde mit Stämmen untersucht, die durch Carboxylierung von PEP und über den Glyoxylatzyklus Succinat bilden können (siehe Kapitel 1.2.2), weil sie noch alle Gene für die Carboxylierung von PEP (*pck*, *ppc*) und ausreichend Gene für die Bildung von Acetyl-CoA (*pykA*, *pykF*, *aceEF*, *lpdA*), ebenfalls aus PEP, besitzen. Der erste untersuchte Stamm war ss172 ($\Delta ldhA \Delta poxB \Delta pflB$), der wegen der Deletion von *ldhA* kein Laktat mehr aus Pyruvat bilden sollte. Die Deletion von *poxB* sollte die direkte Entstehung von Acetat aus Pyruvat ohne Acetyl-CoA Zwischenstufe verhindern. Die *pflB* Deletion sollte die Entstehung von Formiat aus Pyruvat verhindern. Mit dem Stamm ss172 wurde eine molare Succinatausbeute von $63,7 \pm 0,7$ % erreicht.

Die zusätzliche Deletion der Gene *mgsA*, *gldA* und *tdcE* führte zu keiner bedeutenden Veränderung der Succinatausbeute. Unter den in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen der Biotransformation waren diese Deletionen daher nicht notwendig (vgl. 3.4.1). Die Deletion von *ackA-pta* (Stamm ss328) führte zu einer geringen Steigerung der Ausbeute auf

65,1 ± 1,4 %. Die entscheidende Veränderung aber war, dass hier kein Acetat mehr detektiert werden konnte, welches bei allen Vorgängerstämmen als unerwünschtes Nebenprodukt auftrat.

Mit dem Stamm ss328 wurde ein weiteres Experiment durchgeführt, bei dem kein MOPS als Puffer mehr zugesetzt wurde und ¹³C-markiertes Natriumhydrogencarbonat in einer Konzentration von 100 mM eingesetzt wurde. Die Daten aus der GC-MS Analyse des gebildeten Succinats zeigten, dass mindestens 90 % des Succinats eine Markierung mit dem Kohlenstoffisotop ¹³C aufwies (vgl. Kapitel 3.7). Wenn man nur den Zeitraum des Experiments betrachtet, in dem kein Zellwachstum mehr auftrat, betrug die molare Succinatausbeute 78,1 ± 0,7 %. Als Nebenprodukt konnte Ethanol detektiert werden. Die Ethanolkonzentration betrug 5,7 ± 0,2 mM am 6. Tag des Experiments. Im Vergleich zu 35,7 ± 2,0 mM Succinat, die zum gleichen Zeitpunkt vorhanden waren, ist dies eine nicht unerhebliche Menge (siehe Kapitel 3.4.2). Über den zeitlichen Verlauf der Ethanolkonzentration lagen keine Daten vor. Die Tatsache, dass Ethanol gebildet wurde und die über 90 %-ige Markierung des Succinats mit ¹³C sprechen dafür, dass eine Succinatentstehung über den Glyoxylatzyklus bei dem Experiment nicht stattgefunden hat. Vorhandenes Acetyl-CoA, welches durch den PDH-Komplex gebildet wurde und durch die Deletion von *ackA-pta* nicht mehr in Acetat umgewandelt und exkretiert werden konnte, ist wahrscheinlich bevorzugt von der AdhE zu Ethanol umgewandelt worden. Auf diesem Weg können mehr NAD-Moleküle aus NADH-Molekülen regeneriert werden, als dies beim Glyoxylatzyklus der Fall wäre. Für eine Erhöhung der Succinatausbeute beziehungsweise um eine Ethanolbildung zu vermeiden, wäre die Deletion von *adhE* sinnvoll. Falls die dann erhöhte Konzentration von Acetyl-CoA nicht ausreicht, um den Glyoxylatzyklus zu induzieren, ist eventuell noch die zusätzliche Deletion von *iclR* notwendig (siehe 1.2.1).

4.6 Succinatproduktion über die Carboxylierung von Pyruvat

In Kapitel 3.5 wurde die Succinatproduktion von Stämmen beschrieben, die wegen mehrerer Gendeletionen in der Bildung von Pyruvat-verbrauchenden Enzymen stark beeinträchtigt waren und daher intrazellulär Pyruvat akkumulieren sollten. Die Gemeinsamkeiten der verwendeten Stämme liegen in der Deletion von *pf1B*, *poxB* und *ldhA* (siehe Kapitel 4.5). Die

Unterschiede liegen in dem Zustand des PDH-Komplexes, dessen Aktivität durch die Deletion von *lipA* vermutlich eingeschränkt oder durch die Deletion von *aceE* komplett zerstört wurde. Durch die Überexpression von Genen, die für Malic-Enzyme codieren, sollte dann durch die Carboxylierung von Pyruvat zum Malat und den reduktiven Ast des Citratzyklus schließlich Succinat gebildet werden. Da die Gene *pck* und *ppc* in allen Fällen noch vorhanden waren, handelte es sich aber um einen Mischweg, da Succinat auch noch durch die Carboxylierung von PEP durch die Ppc oder Pck gebildet werden konnte. Die Deletion von *pck* wäre bei aerobem Wachstum auf Minimalmedium mit Glycerin phänotypisch vermutlich ohne Auswirkungen geblieben, allerdings sind Stämme ohne *ppc* nicht mehr auf Minimalmedium mit Glycerin oder Glukose gewachsen (Daten nicht gezeigt), weswegen nur die kombinierte Route der Succinatproduktion durch PEP-Carboxylierung und Pyruvat-Carboxylierung untersucht werden konnte.

Der Stamm ss331 ($\Delta lipA \Delta ldhA \Delta poxB \Delta pflB$) wurde mit und ohne Plasmide, die Gene für Malic-Enzyme aus *A. thaliana* trugen, auf Succinatbildung untersucht (siehe Kapitel 3.5.1). Aufgrund der Deletion von *lipA* konnte dieser Stamm ohne den Zusatz von Liponsäure keinen funktionellen PDH-Komplex mehr ausbilden. Da aber in der Wachstumsphase limitierte Mengen von Liponsäure zugesetzt wurden, konnten keine Aussagen über die Aktivität des PDH-Komplexes während der anschließenden Biotransformation gemacht werden. Die Umwandlung von Pyruvat durch den PDH-Komplex ist für den Stamm die einzig relevante Möglichkeit Acetyl-CoA zu bilden, welches essentiell für das Wachstum ist. Für die Succinatproduktion ist die Bildung von Acetyl-CoA nicht erwünscht. Innerhalb von 6 Tagen verbrauchte der Stamm ss331 ohne Plasmid $35,5 \pm 7,0$ mM Glycerin und erreichte eine molare Succinatausbeute von $57,2 \pm 1,0$ %. Mit dem Plasmid pSS84.4, welches das Gen für das NADP-abhängige Malic-Enzym 2 aus *A. thaliana* unter Kontrolle des Fumaratreduktase-Promotors aus *E. coli* trägt, konnte die molare Succinatausbeute deutlich auf $70,9 \pm 0,7$ % gesteigert werden. Der Glycerinverbrauch war ähnlich dem Stamm ohne Plasmid und betrug $37,6 \pm 1,4$ mM. Die Expression des Gens für das Malic-Enzym 3 im Stamm ss331 mit dem Plasmid pSS85.1 führte dagegen zu einem geringeren Glycerinverbrauch von $30,6 \pm 2,0$ mM und zu einer Succinatausbeute von $62,5 \pm 5,9$ %, die nur geringfügig über der des Stammes ohne Plasmid lag.

Weiterhin wurde die Succinatproduktion mit dem Stamm ss364 ($\Delta aceE \Delta ldhA \Delta poxB \Delta pflB$) untersucht (siehe Kapitel 3.5.2). Im Vergleich zum Stamm ss331 ist bei diesem Stamm der Verlust von Pyruvat durch Bildung von Acetyl-CoA durch den PDH-Komplex wegen der Deletion von *aceE* ausgeschlossen. Innerhalb von 6 Tagen verbrauchte der Stamm ss364 $20,5 \pm 0,6$ mM Glycerin und die molare Succinatausbeute betrug $39,6 \pm 0,5$ %. Als Nebenprodukt entstand aber auch $7,2 \pm 0,1$ mM Pyruvat. Mit Plasmiden, die das Gen für das Malic-Enzym 2 aus *A. thaliana* tragen, konnte die Ausbeute gesteigert werden. Der Stamm ss364 mit Plasmid pSS91.1 (Replikon pBR322, P_{rha-At} -NADP-ME2) erreichte eine Succinatausbeute von $50,0 \pm 1,5$ %, verbrauchte $24,0 \pm 0,1$ mM Glycerin und bildete $6,8 \pm 0,6$ mM Pyruvat. Eine weitere Erhöhung der Succinatausbeute auf $61,5 \pm 3,3$ % wurde mit dem Stamm ss364 mit Plasmid pSS84.4 (Replikon pBR322, $P_{frdABCD-At}$ -NADP-ME2) erreicht. Dieser setzte mit $30,7 \pm 4,7$ mM auch die größte Menge von Glycerin um, bildete aber auch $8,8 \pm 0,6$ mM Pyruvat. Der gleiche Stamm, der das *E. coli* eigene Gen für das Malic-Enzym SfcA exprimiert (ss364 pSS46.22), produzierte dagegen ausschließlich $6,6 \pm 0,1$ mM Pyruvat, wobei $8,8 \pm 2,0$ mM Glycerin verbraucht wurden. Succinat konnte nicht detektiert werden.

Insgesamt gelang es in den beiden Stämmen ss331 und ss364 die Succinatausbeute durch die Expression des Gens für das NADP-abhängige Malic-Enzym 2 aus *A. thaliana* zu steigern. Es konnte aber leider nicht bestimmt werden, ob überhaupt oder zu welchem Anteil Succinat durch die Carboxylierung von Pyruvat entstanden ist, da in den verwendeten Stämmen Succinat auch noch über Pck oder Ppc gebildet werden konnte. Die Tatsache, dass bei den Biotransformationen mit dem Stamm ss364 mit Plasmiden, die für Malic-Enzyme codieren, auch hohe Mengen von Pyruvat im Bereich von 7 mM gebildet wurden, die zudem nicht geringer waren als bei den Biotransformationen ohne Plasmide, spricht eher für eine unzureichende Carboxylierung von Pyruvat. Es könnte sein, dass die Erhöhung der Succinatausbeute nicht wie erwünscht durch eine Carboxylierung von Pyruvat zustande gekommen ist, sondern durch andere Effekte. Es ist beispielsweise denkbar, dass die Malic-Enzyme während der aeroben Wachstumsphase den Pool der Metabolite im Citratzyklus laufend verkleinert haben, indem sie Malat zu Pyruvat decarboxylierten. Dies könnte zu einer

verstärkten Expression von *ppc* führen, um den Citratzyklus wieder aufzufüllen. Eine erhöhte Aktivität der Ppc in der Zelle könnte dann die erhöhten Succinatausbeuten ebenfalls erklären.

Die Verbesserung der Succinatausbeuten mit Malic-Enzymen wurde in Publikationen schon beschrieben^{170,258-261}. Ein direkter Vergleich ist nicht möglich, da in allen Publikationen die Succinatbildung aus Glukose untersucht wurde und Komplexmedien verwendet wurden. Die höchste Succinatausbeute und der höchste Titer wurden mit dem *E. coli* Stamm NZN111 ($\Delta pflB \Delta ldhA$) erreicht, der das Gen *sfcA* überexprimierte. Dieser Stamm konnte 110 mM Succinat akkumulieren und verbrauchte 111 mM Glukose. Dies entsprach aber nur 58 % der theoretisch maximalen Ausbeute auf Glukose von $1,71 \text{ mol mol}^{-1}$ und reicht nicht an die in dieser Arbeit erreichten Ausbeuten heran¹⁷⁰. In den genannten Publikationen wurde zudem nicht darauf eingegangen, dass die erhöhte Succinatbildung auch unter anderem durch eine erhöhte Ppc Aktivität zu erklären ist, so dass eine *in vivo* Carboxylierung von Pyruvat durch Malic-Enzyme nicht bewiesen wurde. Dies wurde in der Einleitung einer Publikation, die sich mit der anaplerotischen, also carboxylierenden Rolle von Malic-Enzymen in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* befasst, zu Recht kritisiert²⁶². Dort wurde ein Hefestamm beschrieben, der wegen der Deletion des Pyruvat-Decarboxylase-Gens hohe Mengen Pyruvat akkumuliert. Weiterhin wurde das Gen für die Pyruvat-Carboxylase entfernt, so dass eine Anaplerotik nur noch über Malic-Enzyme stattfinden konnte. Dennoch wuchsen diese Hefestämme, die zusätzlich noch *sfcA* von *E. coli* exprimierten, nicht unter einer CO₂-Atmosphäre, welche eine Carboxylierung von Pyruvat unterstützen sollte. Erst durch eine Spontanmutation von *sfcA* (führt zu Aminosäureaustausch Asp336Gly) wurde eine Wachstumsrate von $0,06 \text{ h}^{-1}$ erhalten. Die Autoren führten dieses, wenn auch langsame Wachstum, darauf zurück, dass das mutierte SfcA spezifisch für den Cofaktor NADP⁺ (vorher NAD⁺) war und unter den Bedingungen in der Zelle Pyruvat carboxylieren kann. Eine anaplerotische Rolle von Malic-Enzymen scheint daher, wenn auch mit geringer Effizienz, möglich zu sein. Kritisch anzumerken ist, dass die enzymologischen Parameter des mutierten SfcA mit Rohextrakten ermittelt wurden. Ebenso kritisch ist, dass nur die Decarboxylierungsrichtung gemessen wurde. Die Bildung von Malat aus Pyruvat, welche allein von Interesse war, wurde *in vitro* nicht untersucht.

Die Succinatproduktion mit Hilfe eines geeigneten Malic-Enzyms noch weiter zu optimieren scheint weder schnell umsetzbar noch aussichtsreich. Ein Umstieg auf Pyruvat-Carboxylasen als carboxylierende Enzyme, die unidirektional Pyruvat zum Oxalacetat umsetzen, könnte eine Alternative sein, um über eine fast identische Route Succinat zu produzieren. Trotz des Nachteils, dass dabei 1 ATP pro Glycerin weniger gebildet würde, könnten der Zelle dennoch genug ATP für den Erhaltungsstoffwechsel zur Verfügung stehen (siehe Kapitel 1.2.6). Es stellt sich dabei die Frage, ob in den Stämmen ss331 oder ss364 noch die beiden Gene *sfcA* und *maeB* für Malic-Enzyme deletiert werden müssen, um einen ATP-verbrauchenden Stoffwechselkreislauf (Pyruvat-OA-Malat-Pyruvat) zu verhindern, der von der Pyruvat-Carboxylase, der Malat-Dehydrogenase und einem der beiden Malic-Enzyme katalysiert werden könnte. Dieser Kreislauf wurde bisher noch nicht in Publikationen thematisiert, welche die Succinatbildung mit Hilfe von Pyruvat-Carboxylasen beschreiben^{29,263}. Abgesehen von der Succinatproduktion, die das Hauptthema dieser Arbeit ist, könnte man den Stamm ss331 ($\Delta lipA \Delta ldhA \Delta poxB \Delta pflB$) auch für eine aerobe Laktatproduktion aus Glycerin einsetzen, wenn man das Gen *ldhA* Plasmid-basiert exprimieren würde¹⁰².

4.7 Succinatproduktion über die ausschließlich PEP-carboxylierende Route

Stämme ohne Pyruvatkinasen sollten Succinat ausschließlich über die PEP-carboxylierende Route aus Glycerin produzieren (siehe Kapitel 1.2.4). Diese $\Delta pykAF$ Stämme sind aber sehr schlecht auf Glycerin gewachsen, weshalb sie erst auf schnelleres Wachstum in Minimalmedium mit Glycerin als C-Quelle selektioniert wurden (siehe 4.3). Die Nachfolger zweier unabhängig selektionierter Mutanten wurden in Biotransformationen auf Succinatbildung untersucht. Mit dem Stamm ss310 (u. a. $\Delta gldA \Delta sfcA \Delta tdcE \Delta pykA \Delta pykF \Delta ldhA \Delta poxB \Delta pflB$) wurde in 6 Tagen 55,5 mM Glycerin verbraucht und molare Succinatausbeuten von 76,4 % erreicht (siehe Tabelle 34). Der Stamm ss314 (u. a. $\Delta pck \Delta sfcA \Delta tdcE \Delta pykA \Delta pykF \Delta ldhA \Delta poxB \Delta pflB$) aus einer unabhängigen Selektion konnte nur 26,5 mM Glycerin umsetzen und auch die Succinatausbeute von 70,1 % war geringer als im Stamm ss310. Wegen der deutlichen Unterschiede wurden folglich nur Stämme aus der Linie des besseren Succinatproduzenten ss310 näher charakterisiert.

Die Unterschiede zwischen ss310 und ss314 liegen, abgesehen von der unabhängigen Selektion, in der Deletion von *gldA* in ss310 und *pck* in ss314. Falls in dem verwendeten *E. coli* K12 Hintergrund der metabolische Fluss über den GldA-DhaKLM-Weg überhaupt eine Rolle spielt (siehe 1.2.1), so ist die Deletion von *gldA* auf jeden Fall förderlich für die Succinatproduktion via PEP-Carboxylierung, da kein Pyruvat mehr über das Glycerinspezifische PTS entstehen kann. Die Bewertung der *pck* Deletion ist dagegen schwieriger. Einerseits führt eine PEP-Carboxylierung durch die Pck zu einer Bildung von ATP, welche bei der entsprechenden von der Ppc katalysierten Reaktion nicht stattfindet. Andererseits kann es in einem Δpck Stamm zu keinem ATP-verbrauchenden Kreislauf zwischen PEP und Oxalacetat mehr kommen, indem die Carboxylierungsreaktion von der Ppc und die Decarboxylierungsreaktion von der Pck katalysiert wird. In dieser Arbeit produzierte der Stamm ss310, der das Gen *pck* noch hat und dem das Gen *gldA* fehlt, mehr Succinat als der Stamm ss314 mit genau umgekehrten Deletionen. Da die beiden Stämme aber aus unabhängigen Selektionen stammen, ist ein direkter Vergleich hier nicht möglich. Es wäre interessant zu sehen, ob sich beispielsweise die Succinatproduktion des Stammes ss314 durch die Plasmid-basierte Expression von *pck* und der Deletion von *gldA* im Genom noch steigern lässt.

Der Einfluss von *pck* und *gldA* auf die Succinatproduktion wurde auch in Publikationen schon beschrieben. Eine Promotormutation vor dem *pck* Gen führte zu einer 8-fach erhöhten Menge der entsprechenden mRNA und einer 25-fach erhöhten Aktivität der Pck in Rohextrakten⁷⁵. Diese Promotormutation allein führte mit Glycerin als C-Quelle zu einer fast doppelt so hohen molaren Succinatausbeute von 44 % im Vergleich zu *E. coli* Wildtypstamm ATCC 8739, der nur eine Ausbeute von 25 % erreichte⁷⁹. Die zusätzliche Deletion eines der Gene *gldA*, *dhaKL*, *dhaM*, *ptsI* oder *ptsH*, welche im Wildtyp die Nettoentstehung von Pyruvat aus Glycerin über den GldA-DhaKLM-Weg (siehe 1.2.1) ermöglichen, führte zu molaren Succinatausbeuten zwischen 68 und 80 %.

In dieser Arbeit führte eine zusätzliche Plasmid-basierte (siehe Tabelle 37) Expression von *pck* im Stamm ss310 zu einer geringen Ausbeutesteigerung. Die molare Succinatausbeute betrug $79,8 \pm 0,3$ % beim Stamm ss310 und $83,5 \pm 1,8$ % beim Stamm ss310 mit Plasmid

pSS71.1, welches das Gen *pck* trägt. Angesichts der Standardabweichungen und der Anzahl der durchgeführten Experimente stellt dies aber keinen signifikanten Unterschied dar. Wahrscheinlich ist es aus diversen Gründen in einem $\Delta pykAF$ Hintergrund gar nicht nötig, für eine schnelle Succinatproduktion und hohe Ausbeuten die Expression von *pck* durch zusätzliche Mutationen im Genom oder Plasmid-basiert zu erhöhen. Zum Beispiel konkurriert die Pck in derartigen Stämmen nicht mit den Pyruvatkinasen um das Substrat. Weiterhin könnte es in Folge der Deletionen von *pykA* und *pykF* automatisch zu einem veränderten Genexpressionsmuster in der Zelle führen, wovon das Gen *pck* betroffen sein könnte. Es wurde beispielsweise gezeigt, dass die Expression von *ppc* und *pck* in einem $\Delta pykF$ Stamm stark erhöht ist. Allerdings wurde dies nur mit Glukose als C-Quelle untersucht²⁶⁴.

Mit den Stämmen ss279 ($\Delta glcA \Delta tdcE \Delta pykA \Delta pykF \Delta ldhA \Delta poxB \Delta pflB$) und ss310 (=ss279 $\Delta sfcA$) wurde der Einfluss des Malic-Enzyms SfcA auf die Succinatproduktion untersucht. Dies war von Interesse, weil SfcA eine kritische Position im Stoffwechsel einnimmt. Zum einen ist gezeigt worden, dass die Aktivität von SfcA unentbehrlich für gutes Wachstum der $\Delta pykAF$ Stämme in Minimalmedium mit Glycerin als C-Quelle ist (siehe 4.3). Zum anderen könnte diese Aktivität auch nachteilig für die Succinatproduktion sein, indem sie Malat von der gewünschten Produktionsroute zum Succinat durch Decarboxylierung zum Pyruvat entfernt. Wenn der durch SfcA, Ppc und Mdh vermittelte POMP-Weg so effizient genutzt würde, käme dies im Endergebnis der Reaktion einer Pyruvatkinase gleich, nur dass kein ATP gebildet würde. Dies wäre fatal, denn dann wäre die Deletion der Pyruvatkinasegene hinfällig. Die molare Succinatausbeute aus Glycerin, die mit dem Stamm ss279 ($81,5 \pm 2,0$ %) nach 6 Tagen Biotransformation erhalten wurde, unterschied sich nur unwesentlich von der Ausbeute des Stammes ss310 ($79,8 \pm 0,3$ %). Auch die verbrauchte Glycerinmenge war bei beiden Stämmen sehr ähnlich. Der Stamm ss279 verbrauchte $57,8 \pm 2,8$ mM Glycerin und der Stamm ss310 $57,3 \pm 0,7$ mM Glycerin (siehe Tabelle 36). Unter den gewählten Bedingungen (Biotransformation im Kleinmaßstab mit Anfangszelldichten von $0,5$ OD₆₀₀/ml) war der Einfluss von SfcA auf die Succinatproduktion somit marginal. Deswegen kann das Gen *sfcA* im Genom verbleiben, was den Vorteil hat, dass das Wachstum auf Glycerin nicht eingeschränkt wird. Andernfalls müsste das Wachstum auf Glukose erfolgen, bevor die Succinatproduktion aus Glycerin in der anaeroben Produktionsphase abläuft.

Eine Verbesserung der Ausbeuten und Produktbildungsraten mit dem bis dato besten Stamm ss310 (bzw. ss279 aus der gleichen Linie) konnte durch gezielte Expression von den ausgewählten Genen *glpACB* und *frdABCD* nicht erreicht werden (siehe Kapitel 3.6.3). Eine weitere Optimierung der Stämme ist wahrscheinlich am einfachsten durch die Fortsetzung der Selektionsexperimente möglich. Im Unterschied zur schon erfolgten Selektion im Aeroben auf Minimalmedium mit Glycerin könnte man eine entsprechende Selektion auf schnelleres Wachstum im Anaeroben durchführen, um die Entstehung und den Export von Succinat mit der ATP-Produktion über die Pck zu koppeln, was im Aeroben nicht möglich war. Da *E. coli* in Minimalmedium mit Glycerin ohne weitere Zusätze anaerob nicht wachsen kann (siehe 4.4.2) wäre es erforderlich einen Metaboliten zuzugeben, der als Redoxpuffer dienen kann, indem er einen Überschuss von reduzierten Elektronenüberträgern wie NADH beseitigt. In Frage kommen hier Malat oder Fumarat. Die erhaltenen Stämme sollten dann im Anaeroben ohne Zugabe des Redoxpuffers nicht mehr wachsen, dafür aber nur noch Succinat mit hohen Produktionsraten bilden.

4.8 Produktbildung bei Biotransformationen mit Glukose als C-Quelle

Mit den Stämmen ss328 ($\Delta ackA\text{-}pta \Delta mgsA \Delta gldA \Delta tdcE \Delta ldhA \Delta poxB \Delta pflB$), ss310 ($\Delta gldA \Delta sfcA \Delta tdcE \Delta pykA \Delta pykF \Delta ldhA \Delta poxB \Delta pflB$) und ss314 ($\Delta pck \Delta sfcA \Delta tdcE \Delta pykA \Delta pykF \Delta ldhA \Delta poxB \Delta pflB$) wurden auch Biotransformationen in Minimalmedium mit Glukose als C-Quelle durchgeführt (vgl. Tabelle 31 und Tabelle 35). In allen drei Fällen entstand eine Vielzahl von Produkten und das Hauptprodukt war nicht Succinat, sondern immer Pyruvat. Für eine Succinatproduktion aus Glycerin optimierte Stämme sind somit nicht ohne weiteres auch für eine Succinatproduktion aus Glukose verwendbar. Dies verwundert nicht, da für eine Homosuccinatgärung auf Glukose 71,4 % der in der Glykolyse entstehenden C3-Metabolite (PEP und Pyruvat) zum Oxalacetat carboxyliert werden müssen, um eine ausgeglichene Redoxbilanz zu erhalten²⁸. Als Substrat für eine Carboxylierung kommt in einem Wildtypstamm nur PEP in Frage. Durch die Aktivität des PTS entsteht aber zwangsläufig zur Hälfte Pyruvat aus dem verfügbaren PEP. Somit beträgt der Anteil von PEP an den gebildeten Endprodukten der Glykolyse maximal 50 %. Dieser kann durch die Aktivität der Pyruvatkinasen noch weiter verringert werden. Alle Stämme in dieser Arbeit weisen noch ein

funktionierendes PTS auf. Durch Inaktivierung einer Komponente des PTS in den getesteten Stämmen, beispielsweise durch die Deletion von *ptsG*, könnte man den Anteil von PEP erhöhen und das Potential der konstruierten Stämme auch auf die von Glukose ausgehende Succinatproduktion ausweiten.

Alle in dieser Arbeit präsentierten Biotransformationen wurden mit $\Delta ldhA$ Stämmen durchgeführt. Deswegen konnte auch fast nie Laktatbildung nachgewiesen werden. Eine Ausnahme bildeten nur die Versuche mit ss310 und ss314 mit Glukose als C-Quelle. Hier wurde bei beiden Stämmen die Bildung von 7,7 mM Laktat festgestellt (Tabelle 35). Beide Stämme sind auf schnelles Wachstum in M9-Medium mit Glycerin selektioniert worden und können keine Pyruvatkinasen mehr bilden. Im Gegensatz zum Stamm ss328, der in M9-Medium mit Glukose kein Laktat bildete, besitzen sie noch das *mgsA* Gen. Vermutlich ist das Laktat in den Stämmen ss310 und ss314 über Methylglyoxylat entstanden. Die Daten aus einer Publikation, in der die Ethanolproduktion mit *E. coli* untersucht worden war, lassen dies vermuten. Dort wurde aus 500 mM Glukose nach vier Tagen hauptsächlich Ethanol gebildet. Es entstanden allerdings auch 27 mM Laktat in dem $\Delta ldhA$ Stamm LY165. Die Deletion von *mgsA* in Stamm LY165 beendete diese Laktatentstehung. Interessant war weiterhin, dass durch die Deletion von *mgsA* die Kometabolisierung von Glukose mit anderen Zuckern deutlich gesteigert wurde ²⁶⁵.

4.9 Vergleich der drei Strategien zur Succinatproduktion bezüglich der Ausbeuten an Succinat

In dieser Arbeit wurden drei Strategien zur Succinatproduktion aus Glycerin verfolgt (siehe 1.2). Die Ergebnisse des jeweils produktivsten Stammes jeder Strategie werden in Tabelle 38 miteinander verglichen.

Tabelle 38: Vergleich der mit verschiedenen Strategien erhaltenen Succinatausbeuten mit Glycerin als C-Quelle.

Die Versuche wurden mit 0,5 OD₆₀₀/ml Zellen, 100 mM MOPS, 60 mM Glycerin und 80 mM NaHCO₃ in M9-Medium bei 37 °C durchgeführt. Angegeben sind die nach 6 Tagen gemessenen extrazellulären Metabolitkonzentrationen. Die Konzentrationen von Fumarat, Laktat, Formiat und Malat lagen unter der Nachweisgrenze von ~1,6 mM. Über Ethanol konnte keine Aussage getroffen werden.

Stamm	Anzahl der Versuche	Glycerin verbraucht (mM)	Succinat gebildet (mM)	Ausbeute (mol Succinat / mol Glycerin)	Acetat gebildet (mM)	Pyruvat gebildet (mM)
ss328 ^a	3x	43,2 ± 5,7	28,1 ± 3,3	65,1 ± 1,4 %	nd*	nd
ss331 pSS84.4 ^{b,d}	3x	37,6 ± 1,4	26,6 ± 0,7	70,9 ± 0,7 %	nd	2,2 ± 0,4
ss310 ^c	2x	55,5 ± 0,1	42,4 ± 1,9	76,4 ± 3,3 %	1,9 ± 1,0	nd

^a ss328 (*ΔackA-pta ΔmgsA ΔgldA ΔtdcE ΔldhA ΔpoxB ΔpflB*)

^b ss331 (*ΔlipA ΔldhA ΔpoxB ΔpflB*) pSS84.4 (Replikon pBR322, P_{frdABCD}-*At*-NADP-ME2)

^c ss310 (*ΔgldA ΔsfcA ΔtdcE ΔpykA ΔpykF ΔldhA ΔpoxB ΔpflB*)

^d Versuche bei 30 °C statt bei 37 °C

* nd = nicht detektiert

Im direkten Vergleich von Biotransformationen nach dem Standardprotokoll mit MOPS und 80 mM NaHCO₃ (siehe 2.6.3.1) zeigte der Stamm ss310 mit 76,4 % die höchste molare Succinatausbeute aus Glycerin. Es folgen der Stamm ss331 pSS84.4, der eine Ausbeute von 70,9 % erreichte und der Stamm ss328, der eine Ausbeute von 65,1% lieferte. Bei diesen Angaben wurde der Ausbeuteverlust durch Bildung von Biomasse zu Beginn des Experiments nicht berücksichtigt. Den höchsten Substratumsatz zeigte der Stamm ss310, der 55,5 mM Glycerin in 6 Tagen verbraucht hat. Im gleichen Zeitraum verbrauchte der Stamm ss328 43,2 mM Glycerin und der Stamm ss331 pSS84.4 konnte 37,6 mM Glycerin umsetzen.

Vergleicht man die von den drei Stämmen gebildeten Nebenprodukte, so fällt auf, dass der Stamm ss331 pSS84.4 2,2 ± 0,4 mM Pyruvat exkretiert hat. Bei den Stämmen ss328 und ss310 konnte kein Pyruvat detektiert werden. Im Gegensatz dazu wurde der Metabolit Acetat nur in den Überständen der Biotransformationen des Stammes ss310 detektiert. Die gemessene Acetatkonzentration von 1,9 ± 1,0 mM lag aber nur geringfügig über der Nachweisgrenze von ~ 1,6 mM. Problematisch ist weiterhin, dass in diesen Biotransformationen Ethanol wegen der Verwendung von MOPS als Puffer nicht quantifiziert werden konnte. Es ist außerdem denkbar, dass weitere Nebenprodukte gebildet wurden, die mit der

gewählten Analysemethode prinzipiell nicht erfasst werden konnten oder unterhalb der Nachweisgrenze lagen.

Die Experimente zur Analyse der CO₂-Fixierung (siehe 3.7) haben gezeigt, dass das gebildete Succinat zu mehr als 90 % eine Markierung durch das Kohlenstoffisotop ¹³C aufweist und somit fast komplett oder sogar ausschließlich durch CO₂-Fixierung entstanden ist. Mit dem Stamm ss331 pSS84.4 wurden keine derartigen Analysen vorgenommen. Daher wurde dieser Stamm bei den folgenden Betrachtungen nicht berücksichtigt. Das Markierungsmuster des vom Stamm ss328 gebildeten Succinats war fast identisch zu dem des Succinats aus Stamm ss310. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass die unterschiedlichen Ausbeuten dieser zwei Stämme nicht auf unterschiedlichen Wegen der Succinatentstehung beruhen, sondern darauf, dass beim Stamm ss328 mehr Nebenprodukte entstehen. Beim Stamm ss328 könnten dies beispielsweise Nebenprodukte sein, die direkt oder in mehreren Schritten aus Pyruvat entstehen, da die Bildung von größeren Mengen Pyruvat aus PEP durch die Pyruvatkinasen noch in einem Schritt möglich ist. Ethanol ist beispielsweise solch ein Metabolit, der in den Überständen der Biotransformationen des Stammes ss328 noch nachgewiesen werden konnte (vgl. 4.5). Leider war die Quantifizierung von Ethanol nur bei einigen Experimenten möglich (vgl. 2.6.3.1). Auch Aminosäuren wie Alanin, welche aus Pyruvat entstehen könnten, konnten *per se* nicht mit der verwendeten HPLC-Säule detektiert werden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass bei dem jeweils besten Succinatproduzenten der drei verfolgten Strategien Succinat immer das Hauptprodukt bei den Biotransformationen mit Glycerin als Substrat darstellte und hauptsächlich über Carboxylierung von PEP, eventuell auch von Pyruvat (Stamm ss331 pSS84.4), entstanden ist. Der Stamm ss310 zeigte im direkten Vergleich (Biotransformation mit 100 mM MOPS und 80 mM NaHCO₃) den höchsten Glycerinverbrauch, die größte gebildete Succinatmenge und die größte molare Succinatausbeute aus Glycerin. Der Stamm ss310 hatte aber den Nachteil, dass er wegen der Deletion von *sfcA* auf Minimalmedium mit Glycerin als alleinige C-Quelle nur schlecht wachsen konnte. Bei einem Produktionsprozess mit dem Stamm ss310 könnte die Zellmassebildung daher stattdessen mit Glukose als C-Quelle erfolgen, bevor im Anaeroben

aus Glycerin Succinat gebildet werden würde. Eine Alternative zum Stamm ss310 ist der unmittelbare Vorgängerstamm ss279 ohne *sfcA* Deletion. Der Stamm ss279 zeigte im Gegensatz zum Stamm ss310 gutes Wachstumsverhalten auf Glycerin. Im direkten Vergleich durch Biotransformationen mit einem leicht veränderten Protokoll ohne MOPS und mit 100 mM NaHCO₃ waren beide Stämme bezüglich der Succinatproduktivität kaum unterscheidbar (siehe 3.6.2 und 4.7). Es zeigten sich nur geringe Unterschiede in den gemessenen Konzentrationen der gebildeten Nebenprodukte Ethanol, Pyruvat und Acetat. Es ist aber denkbar, dass der Stamm ss279, der noch SfcA bilden kann, unter gewissen Bedingungen deutlich mehr Nebenprodukte bildet als der Stamm ss310 mit eingeschränkten (nur noch durch MaeB) Decarboxylierungsmöglichkeiten vom Malat zum Pyruvat. Grundsätzlich bieten sich beide Stämme für die Succinatproduktion an. Welchen man letztendlich wählt, hängt von den noch zu etablierenden Prozessbedingungen im Fermenter ab. Bei starker Gewichtung der Vorteile des Wachstumsvermögens mit Glycerin und der Einfachheit des Prozesses kann der Stamm ss279 als der optimale Succinatproduzent angesehen werden, der in dieser Arbeit konstruiert wurde.

4.10 Vergleich der Succinatproduktion des Stammes ss279 aus Glycerin mit den publizierten Ergebnissen anderer Gruppen

Die Ergebnisse des in dieser Arbeit als geeignetsten für die Succinatproduktion eingestuften Stammes ss279 (siehe 3.6.2 und 4.9) werden nun mit den publizierten Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen verglichen. Mit dem Stamm ss279 ($\Delta gl d A \Delta t d c E \Delta p y k A \Delta p y k F \Delta l d h A \Delta p o x B \Delta p f l B$ und unbekannte Mutationen) wurde in 6 Tagen $47,1 \pm 1,1$ mM Succinat gebildet und $57,8 \pm 2,8$ mM Glycerin verbraucht. Dies entsprach einer molaren Succinatausbeute von $81,5 \pm 2,0$ %. Im Verlauf des Experiments kam es zu einem Anstieg der Zelldichte von 0,50 auf 0,76 OD₆₀₀/ml. Als Nebenprodukte konnten $1,5 \pm 2,2$ mM Ethanol, $2,0 \pm 0,2$ mM Pyruvat und $2,4 \pm 0,4$ mM Acetat nachgewiesen werden.

Mit einem auf *E. coli* K12 MG1655 basierenden Stamm ohne Namenskürzel, der fünf Deletionen ($\Delta a d h E \Delta p t a \Delta p o x B \Delta l d h A \Delta p p c$) aufwies und zusätzlich das Gen für die Pyruvat-Carboxylase aus *Lactococcus lactis* exprimierte, konnte in 3 Tagen aus 221 mM Glycerin unter mikroaeroben Bedingungen 120 mM Succinat gebildet werden²⁹. Dies entsprach einer

molaren Ausbeute des Hauptproduktes Succinat von nur 54,3 %, die deutlich unter der des Stammes ss279 ($81,5 \pm 2,0$ %) lag. Es fand somit auch keine Nettofixierung von CO_2 statt. Weitere Nebenprodukte waren 14 mM Acetat und 2 mM Pyruvat. Ungefähr 30 % der C-Atome des komplett verbrauchten Glycerins fehlten in der Kohlenstoffbilanz, in welche die gebildeten Produkte und die gebildete Biomasse (Anstieg von 0,05 auf 4 $\text{OD}_{550}/\text{ml}$) eingeflossen sind. Es wurde vermutet, dass dieser Anteil wegen dem Vorhandensein von Sauerstoff komplett zu CO_2 oxidiert wurde. Mit der Bildung von Biomasse konnten nur 6,6 % (14,6 mM) des Glycerinverbrauchs erklärt werden. Kompletta anaerob schien das System nicht zu funktionieren. Die mikroaeroben Bedingungen wurden eingestellt, indem die fast vollständig gefüllten Erlenmeyerkolben (20 ml Flüssigvolumen in 25 ml Kolben) mit einem Wattestopfen nur leicht abgedichtet wurden. Als pH-Puffer und CO_2 -Quelle wurde den Fermentationen in Minimalmedium mit MOPS 55 g l^{-1} CaCO_3 zugegeben. Es fällt auf, dass trotz der Deletion von *poxB* und *pta* 14 mM Acetat gebildet wurde. Diese Konzentration entsprach 11,6 % der gebildeten Succinatkonzentration. Auf den Entstehungsweg des Acetats wurde nicht eingegangen. Eine molare Succinatausbeute von 54 % aus Glycerin liegt deutlich unter der theoretisch maximalen Ausbeute von 100 %, die möglich ist, wenn Succinat durch CO_2 -Fixierung entsteht. In diesem Fall sollte die Pyruvat-Carboxylase den Schritt der CO_2 -Fixierung übernehmen. Es ist fraglich, ob es mit diesem System gelingt, die Ausbeuten noch zu steigern, indem man die mögliche Sauerstoffzufuhr weiter drosselt, ohne nachteilige Effekte auf die Produktivität zu erhalten. Ohne die Sauerstoffzufuhr hätte höchstwahrscheinlich auch keine Zelldichte von 4 $\text{OD}_{550}/\text{ml}$ erreicht werden können. Ausbeuten von ~50 % sind uninteressant und könnten vermutlich auch unter rein aeroben Bedingungen über einen aktivierten Glyoxylatzyklus erreicht werden (siehe Tabelle 2)^{30,149}.

Eine weitere Publikation beschreibt die Succinatproduktion aus Glycerin mit dem *E. coli* C-Stamm XZ721 (= ATCC#8739 $\Delta pflB \Delta ptsI pck^+$) in einem Minimalmedium (NBS) unter anaeroben Bedingungen im Maßstab von 300 ml⁷⁹. Dieser Stamm mit erhöhter Pck Aktivität erreichte nach 6 Tagen ausgehend von 543 mM Glycerin eine Succinatkonzentration von 102 ± 25 mM und verbrauchte mit 128 mM Glycerin nur einen geringen Anteil des ursprünglich vorhandenen Glycerins. Dies entsprach einer molaren Succinatausbeute von 80 ± 1 % und kam vermutlich einer geringen Nettofixierung von CO_2 gleich. Im Vergleich mit

ss279 ($81,5 \pm 2,0 \%$) war die Ausbeute mit XZ721 fast identisch. Die Standardabweichung der durchschnittlich gebildeten Succinatmenge ($102 \pm 25 \text{ mM}$) war aber ziemlich groß und bei der verbrauchten Glycerinmenge wurde gar keine Standardabweichung angegeben. Außerdem wurden im Vergleich zu den Experimenten in der vorliegenden Arbeit ungefähr 10-fach höhere Glycerinmengen (543 mM vs $50\text{-}60 \text{ mM}$ Glycerin) bei diesen Fermentationen eingesetzt, wovon nur 128 mM verbraucht wurden. Bei den Biotransformationen mit dem Stamm ss279 in dieser Arbeit wurde gezeigt, dass ein kompletter Verbrauch von Glycerin möglich ist. Ein entsprechendes Ergebnis wurde mit dem Stamm XZ721 noch nicht gezeigt. Mit dem Stamm XZ721 entstanden auch 6 mM Laktat und 12 mM Acetat als Nebenprodukte. Während der 6-tägigen Fermentation kam es zu einem Anstieg der Zelltrockenmasse von $0,033 \text{ g l}^{-1}$ auf $0,5 \text{ g l}^{-1}$. Dies entsprach einer Vermehrung um den Faktor 15. Eine Zelltrockenmasse von $0,5 \text{ g l}^{-1}$ entspricht nur einer geringen Zelldichte in der Größenordnung von $1 \text{ OD}_{600}/\text{ml}$, die je nach verwendetem Photometer und Wellenlänge von diesem Wert abweichen kann. Es handelt sich aber definitiv nicht um eine Hochzelldichtefermentation. Höhere Zelldichten als $\sim 1 \text{ OD}_{600}/\text{ml}$ konnten vermutlich bei diesen anaeroben Fermentation nicht erreicht werden, weil *E. coli* anaerob auf Glycerin ohne externe Elektronenakzeptoren nicht wachsen kann (siehe 4.4.2). Wahrscheinlich wurden deshalb alle beschriebenen Fermentationen nach 6 Tagen abgebrochen, obgleich noch hohe Mengen Substrat ($>400 \text{ mM}$ Glycerin) vorhanden waren, der pH-Wert reguliert werden konnte und auch die bis dahin gebildete Succinatkonzentration von 102 mM noch lange nicht die Konzentration von 606 mM erreicht hat, die mit anderen *E. coli* Stämmen mit Glukose als Substrat in einem vergleichbaren System erreicht wurden⁷⁷. Als CO_2 -Quelle wurde zu Beginn des Experiments 100 mM KHCO_3 zugesetzt. Der pH-Wert wurde durch automatisierte Zugabe einer basischen Lösung ($2,4 \text{ M}$ K_2CO_3 / $1,2 \text{ M}$ KOH) konstant bei $7,0$ gehalten. Durch diese Regulation erfolgte ein zusätzlicher Eintrag von CO_2 bzw. Hydrogencarbonat in das System. Daher war auch das Substrat CO_2 vermutlich noch nicht limitierend. Daten über den zeitlichen Verlauf der Zelldichten und der Produktbildung fehlen in der Publikation. Es wäre interessant zu erfahren, wie der zeitliche Verlauf der behaupteten 15-fachen Vermehrung der Zellmasse innerhalb der 6 Tage verlaufen ist, um zu wissen, ob in diesem System eine wachstumsentkoppelte Succinatproduktion, wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben, stattfand. Die Autoren vermuten, dass das anaerobe System nicht 100% abgedichtet war und daher geringe

Mengen Sauerstoff vorhanden waren, die zur Oxidation von NADH beigetragen haben, weil andernfalls die Redoxbilanz nicht schließen würde.

Ein direkter Vergleich der in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse mit den zwei in den vorherigen Absätzen beschriebenen Publikationen ist schwer möglich, da jeweils eine Vielzahl von Bedingungen unterschiedlich war. Zum Beispiel waren die verwendeten Minimalmedien nicht identisch und es gab unterschiedliche Strategien zur Bereitstellung von CO₂ (Zugabe von schwer löslichem CaCO₃, gesteuerte Zuführung von K₂CO₃ durch die pH-Regulation oder einmalige Zugabe von NaHCO₃). Die Konzentrationen von CO₂ bzw. HCO₃⁻ in der Lösung während der Biotransformationen waren nicht bekannt und vermutlich in allen Arbeiten unterschiedlich. In Kapitel 4.4.5 wurde der große Einfluss, den die zugegebene Hydrogencarbonatmenge auf die Succinatproduktion hatte, bereits diskutiert. Die verwendeten Ausgangsstämme vor der Einführung definierter Mutationen waren ebenfalls unterschiedlich. Auch konnte in keiner Arbeit der Sauerstoffeintrag quantifiziert werden bzw. vollständig anaerobe Bedingungen garantiert werden.

Dass bisher keine höheren Succinatkonzentrationen als 50 mM Succinat erhalten wurden (bei den anderen Gruppen lag das Maximum in der gleichen Größenordnung, war aber mit Werten im Bereich von 100 mM höher als in der vorliegenden Arbeit), ist vermutlich nur durch den verwendeten, technisch einfachen Biotransformationsansatz im Kleinmaßstab bedingt, bei dem die Pufferkapazität und die Konzentrationen der Substrate Glycerin und CO₂ bzw. Hydrogencarbonat begrenzt waren, und nicht während der Biotransformation zugefüttert werden konnten. Unter stärker kontrollierten Bedingungen in einem Fermenter besteht aber mit den erstellten Stämmen eine gute Aussicht auf weitere Verbesserungen in der erreichbaren Succinatkonzentration durch kontinuierliche Begasung mit CO₂ und auf eine Verbesserung der volumetrischen Produktivität durch höhere Zelldichten.

In keiner Publikation wurde für einen Zeitraum, in dem noch Zellmassebildung stattgefunden hat, eine Succinatausbeute beschrieben, die höher war als die in der vorliegenden Arbeit ermittelte Ausbeute von $81,5 \pm 2,0$ % mit dem Stamm ss279. Außerdem wurde gezeigt, dass eine wachstumsentkoppelte Succinatproduktion stattgefunden hat. In diesem Zeitraum erhöhte sich die molare Succinatausbeute aus Glycerin auf $89,5 \pm 3,7$ % (siehe Tabelle 36).

5 Literaturverzeichnis

1. OECD-FAO Agricultural Outlook 2010-2019
OECD Publishing (2010), ISBN 978-92-64-08376-9.
2. Campbell CJ & Laherrère JH. The end of cheap oil. *Sci Am* 78-83 (1998).
3. Marchetti JM, Miguel VU & Errazu AF. Possible methods for biodiesel production. *Renewab Sustain Energy Rev* **11**, 1300-1311 (2007).
4. Yadav, P. K., Singh, O. & Singh, R. P. Palm fatty acid biodiesel: process optimization and study of reaction kinetics. *J.Oleo.Sci.* **59**, 575-580 (2010).
5. Thompson JC & B.He. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. *Appl.Eng.Agric.* **22**, 261-265 (2006).
6. Kocsisova, T. & Cvengros, J. G-Phase from methyl ester production - splitting and refining. *Petroleum & Coal* **48**, 1-5 (2006).
7. Engelhaupt, E. Biodiesel boom creates glut of glycerin. *Environ.Sci.Technol.* **41**, 5175 (2007).
8. Yazdani, S. S. & Gonzalez, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Curr.Opin.Biotechnol.* **18**, 213-219 (2007).
9. McCoy, M. Glycerin surplus. *Chem Eng News* **84**, 7 (2006).
10. Trechow, P. Ökosprit mit Makel. VDI-Nachrichten, 11 (2004).
11. Bell, B. *et al.* Glycerin as a Renewable Feedstock for Epichlorohydrin Production. The GTE Process. *Clean* **36**, 657-661 (2008).
12. Rossi, M., Della, P. C., Pagliaro, M., Ciriminna, R. & Forni, P. Greening the construction industry: enhancing the performance of cements by adding bioglycerol. *ChemSusChem.* **1**, 809-812 (2008).
13. Wang, K., Hawley, M. & DeAthos, S. Conversion of Glycerol to 1,3-Propanediol via Selective Dehydroxylation. *Ind.Eng.Chem.Res.* **42**, 2913-2923 (2003).
14. Lammers, P. J. *et al.* Digestible and metabolizable energy of crude glycerol for growing pigs. *J.Anim Sci.* **86**, 602-608 (2008).
15. Schieck, S. J., Shurson, G. C., Kerr, B. J. & Johnston, L. J. Evaluation of glycerol, a biodiesel coproduct, in grow-finish pig diets to support growth and pork quality. *J.Anim Sci.* **88**, 3927-3935 (2010).
16. Nitayavardhana, S. & Khanal, S. K. Biodiesel-derived crude glycerol bioconversion to animal feed: A sustainable option for a biodiesel refinery. *Bioresour.Technol.* **102**, 5808-5814 (2011).
17. da Silva, G. P., Mack, M. & Contiero, J. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnol.Adv.* **27**, 30-39 (2009).
18. Willke, T. & Vorlop, K. D. Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **66**, 131-142 (2004).
19. Lin, E. C. Glycerol dissimilation and its regulation in bacteria. *Annu.Rev.Microbiol.* **30**, 535-578 (1976).

20. Rittmann, D., Lindner, S. N. & Wendisch, V. F. Engineering of a glycerol utilization pathway for amino acid production by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 6216-6222 (2008).
21. Trinh, C. T. & Srienc, F. Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for Efficient Conversion of Glycerol into Ethanol. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 6696-6705 (2009).
22. Tao, J., Wang, X., Shen, Y. & Wei, D. Strategy for the Improvement of Prodigiosin Production by a *Serratia marcescens* Mutant through Fed-Batch Fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **21**, 969-972 (2005).
23. Thompson, J. & B, H. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. *Appl. Eng. Agri.* **22**, 261-265 (2006).
24. Jun, S. A. *et al.* Microbial fed-batch production of 1,3-propanediol using raw glycerol with suspended and immobilized *Klebsiella pneumoniae*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **161**, 491-501 (2010).
25. Clomburg, J. M. & Gonzalez, R. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of 1,2-propanediol from glycerol. *Biotechnol. Bioeng.* **108**, 867-879 (2011).
26. Sabourin-Provost, G. & Hallenbeck, P. C. High yield conversion of a crude glycerol fraction from biodiesel production to hydrogen by photofermentation. *Bioresour. Technol.* **100**, 3513-3517 (2009).
27. Oh, B. R. *et al.* Efficient production of ethanol from crude glycerol by a *Klebsiella pneumoniae* mutant strain. *Bioresour. Technol.* **102**, 3918-3922 (2011).
28. Vemuri, G. N., Eiteman, M. A. & Altman, E. Effects of growth mode and pyruvate carboxylase on succinic acid production by metabolically engineered strains of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 1715-1727 (2002).
29. Blankschien, M. D., Clomburg, J. M. & Gonzalez, R. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of succinate from glycerol. *Metab Eng* **12**, 409-419 (2010).
30. Lin, H., Bennett, G. N. & San, K. Y. Metabolic engineering of aerobic succinate production systems in *Escherichia coli* to improve process productivity and achieve the maximum theoretical succinate yield. *Metab Eng* **7**, 116-127 (2005).
31. Beauprez, J. J., De Mey, M. & Soetaert, W. K. Microbial succinic acid production: Natural versus metabolic engineered producers. *Process Biochemistry* **45**, 1103-1114 (2010).
32. Werpy T & Petersen G. Top Value Added Chemicals from Biomass. - Volume I- Results of Screening for Potential Candidates form Sugars and Synthesis Gas. Springfield, VA: National Technical Information Service. Available: <http://nrel.gov/docs/fy04osti-35523.pdf> (2004).
33. Bozell, J. J. & Petersen, G. R. Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates-the US Department of Energy's "Top 10" revisited. *Green Chem.* **12**, 539-554 (2010).
34. Cukalovic, A. & Stevens, C. Feasibility of production methods for succinic acid derivatives: a marriage of renewable resources and chemical technology. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* **2**, 505-529 (2008).
35. Zeikus, J. G., Jain, M. K. & Elankovan, P. Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Applied Microbiology and Biotechnology* **51**, 545-552 (1999).

36. Bechthold, I., Bretz, K., Kabasci, S., Kopitzky R. & Springer, A. Succinic Acid A New Platform Chemical for Biobased Polymers from Renewable Resources. *Chem.Eng. Technol.* **31**, 647-654 (2008).
37. McKinlay, J. B., Vieille, C. & Zeikus, J. G. Prospects for a bio-based succinate industry. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **76**, 727-740 (2007).
38. Potera, C. Making succinate more successful. *Environ.Health Perspect.* **113**, A832-A835 (2005).
39. Fujimaki, T. Processability and properties of aliphatic polyesters, 'BIONOLLE', synthesized by polycondensation reaction. *Polymer Degradation and Stability* **59**, 209-214 (1998).
40. Higson Adrian. Succinic Acid Factsheet 2010. NNFCC The UK's National Centre for Biorenewable Energy, Fuels & Materials www.nnfcc.co.uk.
41. Taylor, P. Biosuccinic acid ready for take off? *Chemistry World* **7**, (2010).
42. Fürch, T. *et al.* Biotech-Produktion der "Top Value" - Chemikalie Bernsteinsäure. *Laborwelt* **10**, 4-8 (2009).
43. Cornils, B. & Lappe, B. Dicarboxylic Acids - Aliphatic in *Ullmann's Enzyklopedia of Industrial Chemistry*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, (2002).
44. Song, H. & Lee, S. Y. Production of succinic acid by bacterial fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* **39**, 352-361 (2006).
45. Daegelen, P., Studier, F. W., Lenski, R. E., Cure, S. & Kim, J. F. Tracing ancestors and relatives of *Escherichia coli* B, and the derivation of B strains REL606 and BL21(DE3). *J.Mol.Biol.* **394**, 634-643 (2009).
46. Clements, L. D., Miller, B. S. & Streips, U. N. Comparative growth analysis of the facultative anaerobes *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, and *Escherichia coli*. *Syst.Appl.Microbiol.* **25**, 284-286 (2002).
47. Paliy, O. & Gunasekera, T. S. Growth of *E. coli* BL21 in minimal media with different gluconeogenic carbon sources and salt contents. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **73**, 1169-1172 (2007).
48. Neidhardt, F. C., Bloch, P. L. & Smith, D. F. Culture medium for enterobacteria *J.Bacteriol.* **119**, 736-747 (1974).
49. Archer, C. T. *et al.* The genome sequence of *E. coli* W (ATCC 9637): comparative genome analysis and an improved genome-scale reconstruction of *E. coli*. *BMC.Genomics* **12**, 9 (2011).
50. Keseler, I. M. *et al.* EcoCyc: a comprehensive database of *Escherichia coli* biology. *Nucleic Acids Res.* **39**, D583-D590 (2011).
51. Gama-Castro, S. *et al.* RegulonDB (version 6.0): gene regulation model of *Escherichia coli* K-12 beyond transcription, active (experimental) annotated promoters and Textpresso navigation. *Nucleic Acids Res.* **36**, D120-D124 (2008).
52. Wang, J. *et al.* An improved recombineering approach by adding RecA to lambda Red recombination. *Mol.Biotechnol.* **32**, 43-53 (2006).
53. Poteete, A. R. What makes the bacteriophage lambda Red system useful for genetic engineering: molecular mechanism and biological function. *FEMS Microbiol.Lett.* **201**, 9-14 (2001).

54. Braatsch, S., Helmark, S., Kranz, H., Koebmann, B., & Jensen, P. R. *Escherichia coli* strains with promoter libraries constructed by Red/ET recombination pave the way for transcriptional fine-tuning. *Biotechniques* **45**, 335-337 (2008).
55. Feher, T. *et al.* Scarless engineering of the *Escherichia coli* genome. *Methods Mol. Biol.* **416**, 251-259 (2008).
56. Yu, B. J. *et al.* Rapid and efficient construction of markerless deletions in the *Escherichia coli* genome. *Nucleic Acids Res.* **36**, e84 (2008).
57. Datsenko, K. A. & Wanner, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **97**, 6640-6645 (2000).
58. Raab, R. M., Tyo, K. & Stephanopoulos, G. Metabolic engineering. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **100**, 1-17 (2005).
59. Koffas, M., Roberge, C., Lee, K. & Stephanopoulos, G. Metabolic engineering. *Annu. Rev. Biomed. Eng* **1**, 535-557 (1999).
60. Kohlstedt, M., Becker, J. & Wittmann, C. Metabolic fluxes and beyond-systems biology understanding and engineering of microbial metabolism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **88**, 1065-1075 (2010).
61. Nielsen, J. Metabolic engineering. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**, 263-283 (2001).
62. Baba, T. *et al.* Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* **2**, 2006 (2006).
63. Kitagawa, M. *et al.* Complete set of ORF clones of *Escherichia coli* ASKA library (a complete set of *E. coli* K-12 ORF archive): unique resources for biological research. *DNA Res.* **12**, 291-299 (2005).
64. Arifuzzaman, M. *et al.* Large-scale identification of protein-protein interaction of *Escherichia coli* K-12. *Genome Res.* **16**, 686-691 (2006).
65. Becker, S., Vlad, D., Schuster, S., Pfeiffer, P. & Uden, G. Regulatory O₂ tensions for the synthesis of fermentation products in *Escherichia coli* and relation to aerobic respiration. *Arch. Microbiol.* **168**, 290-296 (1997).
66. Zhou, S., Iverson, A. G. & Grayburn, W. S. Engineering a native homoethanol pathway in *Escherichia coli* B for ethanol production. *Biotechnol. Lett.* **30**, 335-342 (2008).
67. Nikel, P. I., Pettinari, M. J., Ramirez, M. C., Galvagno, M. A. & Mendez, B. S. *Escherichia coli arcA* mutants: metabolic profile characterization of microaerobic cultures using glycerol as a carbon source. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **15**, 48-54 (2008).
68. Jantama, K. *et al.* Combining metabolic engineering and metabolic evolution to develop nonrecombinant strains of *E. coli* C that produce succinate and malate. *Biotechnol. Bioeng.* **99**, 1140-1153 (2011).
69. Kuhnert, P., Scholten, E., Haefner, S., Mayor, D. & Frey, J. *Basfia succiniciproducens* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Pasteurellaceae* isolated from bovine rumen. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**, 44-50 (2010).
70. Scholten, E., Renz, T. & Thomas, J. Continuous cultivation approach for fermentative succinic acid production from crude glycerol by *Basfia succiniciproducens* DD1. *Biotechnol. Lett.* **31**, 1947-1951 (2009).

71. Guettler, M. V., Rumler, D. & Jain, M. K. *Actinobacillus succinogenes* sp. nov., a novel succinic-acid-producing strain from the bovine rumen. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **49 Pt 1**, 207-216 (1999).
72. McKinlay, J. B. *et al.* A genomic perspective on the potential of *Actinobacillus succinogenes* for industrial succinate production. *BMC.Genomics* **11**, 680 (2010).
73. Lee, S. J., Song, H. & Lee, S. Y. Genome-based metabolic engineering of *Mannheimia succiniciproducens* for succinic acid production. *Appl.Environ.Microbiol.* **72**, 1939-1948 (2006).
74. Song, H. *et al.* Effects of dissolved CO₂ levels on the growth of *Mannheimia succiniciproducens* and succinic acid production. *Biotechnol.Bioeng.* **98**, 1296-1304 (2007).
75. Zhang, X. *et al.* Metabolic evolution of energy-conserving pathways for succinate production in *Escherichia coli*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **106**, 20180-20185 (2009).
76. Zhang, X., Jantama, K., Shanmugam, K. T. & Ingram, L. O. Re-Engineering *Escherichia coli* for succinate production in mineral salts medium. *Appl.Environ.Microbiol.* **75**, 7807-7813 (2009).
77. Jantama, K. *et al.* Eliminating side products and increasing succinate yields in engineered strains of *Escherichia coli* C. *Biotechnol.Bioeng.* **101**, 881-893 (2008).
78. Okino, S. *et al.* An efficient succinic acid production process in a metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* strain. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **81**, 459-464 (2008).
79. Zhang, X., Shanmugam, K. T. & Ingram, L. O. Fermentation of glycerol to succinate by metabolically engineered strains of *Escherichia coli*. *Appl.Environ.Microbiol.* **76**, 2397-2401 (2010).
80. Hogema, B. M. *et al.* Inducer exclusion in *Escherichia coli* by non-PTS substrates: the role of the PEP to pyruvate ratio in determining the phosphorylation state of enzyme IIAGlc. *Mol.Microbiol.* **30**, 487-498 (1998).
81. Deutscher, J., Francke, C. & Postma, P. W. How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **70**, 939-1031 (2006).
82. Cymer, F. & Schneider, D. A single glutamate residue controls the oligomerization, function, and stability of the aquaglyceroporin GlpF. *Biochemistry* **49**, 279-286 (2010).
83. Joyce, A. R. *et al.* Experimental and computational assessment of conditionally essential genes in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* **188**, 8259-8271 (2006).
84. Voegelé, R. T., Sweet, G. D. & Boos, W. Glycerol kinase of *Escherichia coli* is activated by interaction with the glycerol facilitator. *J.Bacteriol.* **175**, 1087-1094 (1993).
85. Zwaig, N., Kistler, W. S. & Lin, E. C. Glycerol kinase, the pacemaker for the dissimilation of glycerol in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* **102**, 753-759 (1970).
86. Iuchi, S., Cole, S. T. & Lin, E. C. Multiple regulatory elements for the *glpA* operon encoding anaerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase and the *glpD* operon encoding aerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase in *Escherichia coli*: further characterization of respiratory control. *J.Bacteriol.* **172**, 179-184 (1990).
87. Freedberg, W. B. & Lin, E. C. Three kinds of controls affecting the expression of the *glp* regulon in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* **115**, 816-823 (1973).

88. Deborah L. Weissenborn, Nicola Wittekindt & Timothy J. Larson. Structure and Regulation of the *glpFK* Operon Encoding Glycerol Diffusion Facilitator and Glycerol Kinase of *Escherichia coli* K-12*. *J.Biol.Chem.* **2**, 6122-6131 (1992).
89. Bachler, C., Flukiger-Bruhwiller, K., Schneider, P., Bahler, P. & Erni, B. From ATP as substrate to ADP as coenzyme: functional evolution of the nucleotide binding subunit of dihydroxyacetone kinases. *J.Biol.Chem.* **280**, 18321-18325 (2005).
90. Gutknecht, R., Beutler, R., Garcia-Alles, L. F., Baumann, U. & Erni, B. The dihydroxyacetone kinase of *Escherichia coli* utilizes a phosphoprotein instead of ATP as phosphoryl donor. *EMBO J.* **20**, 2480-2486 (2001).
91. Durnin, G. *et al.* Understanding and harnessing the microaerobic metabolism of glycerol in *Escherichia coli*. *Biotechnol.Bioeng.* **103**, 148-161 (2009).
92. St Martin, E. J., Freedberg, W. B. & Lin, E. C. Kinase replacement by a dehydrogenase for *Escherichia coli* glycerol utilization. *J.Bacteriol.* **131**, 1026-1028 (1977).
93. Truniger, V. & Boos, W. Mapping and cloning of *gldA*, the structural gene of the *Escherichia coli* glycerol dehydrogenase. *J.Bacteriol.* **176**, 1796-1800 (1994).
94. Jin, R. Z. & Lin, E. C. An inducible phosphoenolpyruvate: dihydroxyacetone phosphotransferase system in *Escherichia coli*. *J.Gen.Microbiol.* **130**, 83-88 (1984).
95. Subedi, K. P., Kim, I., Kim, J., Min, B. & Park, C. Role of GldA in dihydroxyacetone and methylglyoxal metabolism of *Escherichia coli* K12. *FEMS Microbiol.Lett.* **279**, 180-187 (2008).
96. Riddle, V. & Lorenz, F. W. Nonenzymic, polyvalent anion-catalyzed formation of methylglyoxal as an explanation of its presence in physiological systems. *J.Biol.Chem.* **243**, 2718-2724 (1968).
97. Ferguson, G. P., Totemeyer, S., MacLean, M. J. & Booth, I. R. Methylglyoxal production in bacteria: suicide or survival? *Arch.Microbiol.* **170**, 209-218 (1998).
98. Totemeyer, S., Booth, N. A., Nichols, W. W., Dunbar, B. & Booth, I. R. From famine to feast: the role of methylglyoxal production in *Escherichia coli*. *Mol.Microbiol.* **27**, 553-562 (1998).
99. Hopper, D. J. & Cooper, R. A. The regulation of *Escherichia coli* methylglyoxal synthase; a new control site in glycolysis? *FEBS Lett.* **13**, 213-216 (1971).
100. Ozyamak, E. *et al.* The critical role of *S*-lactoylglutathione formation during methylglyoxal detoxification in *Escherichia coli*. *Mol.Microbiol.* **78**, 1577-1590 (2010).
101. MacLean, M. J., Ness, L. S., Ferguson, G. P. & Booth, I. R. The role of glyoxalase I in the detoxification of methylglyoxal and in the activation of the KefB K⁺ efflux system in *Escherichia coli*. *Mol.Microbiol.* **27**, 563-571 (1998).
102. Mazumdar, S., Clomburg, J. M. & Gonzalez, R. *Escherichia coli* Strains Engineered for Homofermentative Production of *D*-lactic Acid from Glycerol. *Appl.EnvIRON.Microbiol.* **76**, 4327-4336 (2010).
103. Gonzalez, R., Murarka, A., Dharmadi, Y. & Yazdani, S. S. A new model for the anaerobic fermentation of glycerol in enteric bacteria: trunk and auxiliary pathways in *Escherichia coli*. *Metab Eng* **10**, 234-245 (2008).
104. Ko, J. *et al.* Conversion of methylglyoxal to acetol by *Escherichia coli* aldo-keto reductases. *J.Bacteriol.* **187**, 5782-5789 (2005).

105. Burnell, J. N. Cloning and characterization of *Escherichia coli* DUF299: a bifunctional ADP-dependent kinase--Pi-dependent pyrophosphorylase from bacteria. *BMC.Biochem.* **11**, 1 (2010).
106. Ramseier, T. M. *et al.* In vitro binding of the pleiotropic transcriptional regulatory protein, FruR, to the *fru*, *pps*, *ace*, *pts* and *icd* operons of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J.Mol.Biol.* **234**, 28-44 (1993).
107. Patnaik, R., Roof, W. D., Young, R. F. & Liao, J. C. Stimulation of glucose catabolism in *Escherichia coli* by a potential futile cycle. *J.Bacteriol.* **174**, 7527-7532 (1992).
108. Malcovati, M. & Valentini, G. AMP- and fructose 1,6-bisphosphate-activated pyruvate kinases from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* **90 Pt E**, 170-179 (1982).
109. Ponce, E., Flores, N., Martinez, A., Valle, F. & Bolivar, F. Cloning of the two pyruvate kinase isoenzyme structural genes from *Escherichia coli*: the relative roles of these enzymes in pyruvate biosynthesis. *J.Bacteriol.* **177**, 5719-5722 (1995).
110. Perham, R. N. Swinging arms and swinging domains in multifunctional enzymes: catalytic machines for multistep reactions. *Annu.Rev.Biochem.* **69**, 961-1004 (2000).
111. Quail, M. A., Haydon, D. J. & Guest, J. R. The *pdhR-aceEF-lpd* operon of *Escherichia coli* expresses the pyruvate dehydrogenase complex. *Mol.Microbiol.* **12**, 95-104 (1994).
112. Snoep, J. L. *et al.* Differences in sensitivity to NADH of purified pyruvate dehydrogenase complexes of *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus lactis*, *Azotobacter vinelandii* and *Escherichia coli*: implications for their activity in vivo. *FEMS Microbiol.Lett.* **114**, 279-283 (1993).
113. Schwartz, E. R. & Reed, L. J. Regulation of the activity of the pyruvate dehydrogenase complex of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **9**, 1434-1439 (1970).
114. Utrilla, J., Gosset, G. & Martinez, A. ATP limitation in a pyruvate formate lyase mutant of *Escherichia coli* MG1655 increases glycolytic flux to D-lactate. *J.Ind.Microbiol.Biotechnol.* **36**, 1057-1062 (2009).
115. de Graef, M. R., Alexeeva, S., Snoep, J. L. & Teixeira de Mattos, M. J. The steady-state internal redox state (NADH/NAD) reflects the external redox state and is correlated with catabolic adaptation in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* **181**, 2351-2357 (1999).
116. Kaiser, M. & Sawers, G. Pyruvate formate-lyase is not essential for nitrate respiration by *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol.Lett.* **117**, 163-168 (1994).
117. Kim, Y., Ingram, L. O. & Shanmugam, K. T. Dihydrolipoamide Dehydrogenase Mutation Alters the NADH Sensitivity of Pyruvate Dehydrogenase Complex of *Escherichia coli* K-12. *J.Bacteriol.* **190**, 3851-3858 (2008).
118. Knappe, J. & Sawers, G. A radical-chemical route to acetyl-CoA: the anaerobically induced pyruvate formate-lyase system of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol.Rev* **6**, 383-398 (1990).
119. Hesslinger, C., Fairhurst, S. A. & Sawers, G. Novel keto acid formate-lyase and propionate kinase enzymes are components of an anaerobic pathway in *Escherichia coli* that degrades L-threonine to propionate. *Mol.Microbiol.* **27**, 477-492 (1998).
120. Wang, Y. *et al.* Structure of the formate transporter FocA reveals a pentameric aquaporin-like channel. *Nature* **462**, 467-472 (2009).

121. Sawers, G. The hydrogenases and formate dehydrogenases of *Escherichia coli*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **66**, 57-88 (1994).
122. Chang, Y. Y. & Cronan, J. E., Jr. Genetic and biochemical analyses of *Escherichia coli* strains having a mutation in the structural gene (*poxB*) for pyruvate oxidase. *J.Bacteriol.* **154**, 756-762 (1983).
123. Chang, Y. Y., Wang, A. Y. & Cronan, J. E., Jr. Expression of *Escherichia coli* pyruvate oxidase (PoxB) depends on the sigma factor encoded by the *rpoS* (*katF*) gene. *Mol.Microbiol.* **11**, 1019-1028 (1994).
124. Abdel-Hamid, A. M., Attwood, M. M. & Guest, J. R. Pyruvate oxidase contributes to the aerobic growth efficiency of *Escherichia coli*. *Microbiology* **147**, 1483-1498 (2001).
125. Phue, J. N., Noronha, S. B., Hattacharyya, R., Wolfe, A. J. & Shiloach, J. Glucose metabolism at high density growth of *E. coli* B and *E. coli* K: differences in metabolic pathways are responsible for efficient glucose utilization in *E. coli* B as determined by microarrays and Northern blot analyses. *Biotechnol.Bioeng.* **90**, 805-820 (2005).
126. Kumari, S., Tishel, R., Eisenbach, M. & Wolfe, A. J. Cloning, characterization, and functional expression of *acs*, the gene which encodes acetyl coenzyme A synthetase in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* **177**, 2878-2886 (1995).
127. Castano-Cerezo, S. *et al.* An insight into the role of phosphotransacetylase (*pta*) and the acetate/acetyl-CoA node in *Escherichia coli*. *Microb.Cell Fact.* **8**, 54 (2009).
128. Wolfe, A. J. The acetate switch. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **69**, 12-50 (2005).
129. Kessler, D., Herth, W. & Knappe, J. Ultrastructure and pyruvate formate-lyase radical quenching property of the multienzymic AdhE protein of *Escherichia coli*. *J.Biol.Chem.* **267**, 18073-18079 (1992).
130. Aristarkhov, A., Mikulskis, A., Belasco, J. G. & Lin, E. C. Translation of the *adhE* transcript to produce ethanol dehydrogenase requires RNase III cleavage in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* **178**, 4327-4332 (1996).
131. Membrillo-Hernandez, J. *et al.* Evolution of the *adhE* gene product of *Escherichia coli* from a functional reductase to a dehydrogenase. Genetic and biochemical studies of the mutant proteins. *J.Biol.Chem.* **275**, 33869-33875 (2000).
132. Echave, P., Tamarit, J., Cabisco, E. & Ros, J. Novel antioxidant role of alcohol dehydrogenase E from *Escherichia coli*. *J.Biol.Chem.* **278**, 30193-30198 (2003).
133. Jiang, G. R., Nikolova, S. & Clark, D. P. Regulation of the *ldhA* gene, encoding the fermentative lactate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Microbiology* **147**, 2437-2446 (2001).
134. Bunch, P. K., Mat-Jan, F., Lee, N. & Clark, D. P. The *ldhA* gene encoding the fermentative lactate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Microbiology* **143** (Pt 1), 187-195 (1997).
135. Park, S. J., McCabe, J., Turna, J. & Gunsalus, R. P. Regulation of the citrate synthase (*gltA*) gene of *Escherichia coli* in response to anaerobiosis and carbon supply: role of the *arcA* gene product. *J.Bacteriol.* **176**, 5086-5092 (1994).
136. Gruer, M. J., Bradbury, A. J. & Guest, J. R. Construction and properties of aconitase mutants of *Escherichia coli*. *Microbiology* **143** (Pt 6), 1837-1846 (1997).
137. Jung, I. L., Kim, S. K. & Kim, I. G. The RpoS-mediated regulation of isocitrate dehydrogenase gene expression in *Escherichia coli*. *Curr.Microbiol.* **52**, 21-26 (2006).

138. Murphy, G. E. & Jensen, G. J. Electron cryotomography of the *E. coli* pyruvate and 2-oxoglutarate dehydrogenase complexes. *Structure*. **13**, 1765-1773 (2005).
139. Buck, D. & Guest, J. R. Overexpression and site-directed mutagenesis of the succinyl-CoA synthetase of *Escherichia coli* and nucleotide sequence of a gene (g30) that is adjacent to the *suc* operon. *Biochem.J.* **260**, 737-747 (1989).
140. Cecchini, G., Schroder, I., Gunsalus, R. P. & Maklashina, E. Succinate dehydrogenase and fumarate reductase from *Escherichia coli*. *Biochim.Biophys.Acta* **1553**, 140-157 (2002).
141. Hirsch, C. A., Rasminsky, M., Davis, B. D. & Lin, E. C. A Fumarate Reductase in *Escherichia coli* Distinct from Succinate Dehydrogenase. *J.Biol.Chem* **238**, 3770-3774 (1963).
142. Jones, H. M. & Gunsalus, R. P. Regulation of *Escherichia coli* fumarate reductase (*frdABCD*) operon expression by respiratory electron acceptors and the *fnr* gene product. *J.Bacteriol.* **169**, 3340-3349 (1987).
143. Tseng, C. P., Yu, C. C., Lin, H. H., Chang, C. Y. & Kuo, J. T. Oxygen- and growth rate-dependent regulation of *Escherichia coli* fumarase (FumA, FumB, and FumC) activity. *J.Bacteriol.* **183**, 461-467 (2001).
144. van der Rest, M. E., Frank, C. & Molenaar, D. Functions of the membrane-associated and cytoplasmic malate dehydrogenases in the citric acid cycle of *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* **182**, 6892-6899 (2000).
145. Peng, L. & Shimizu, K. Global metabolic regulation analysis for *Escherichia coli* K12 based on protein expression by 2-dimensional electrophoresis and enzyme activity measurement. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **61**, 163-178 (2003).
146. Kornberg, H. L. The role and control of the glyoxylate cycle in *Escherichia coli*. *Biochem.J.* **99**, 1-11 (1966).
147. Gui, L., Sunnarborg, A., Pan, B. & LaPorte, D. C. Autoregulation of *iclR*, the gene encoding the repressor of the glyoxylate bypass operon. *J.Bacteriol.* **178**, 321-324 (1996).
148. Phue, J. N. & Shiloach, J. Transcription levels of key metabolic genes are the cause for different glucose utilization pathways in *E. coli* B (BL21) and *E. coli* K (JM109). *J.Biotechnol.* **109**, 21-30 (2004).
149. Lin, H., Bennett, G. N. & San, K. Y. Genetic reconstruction of the aerobic central metabolism in *Escherichia coli* for the absolute aerobic production of succinate. *Biotechnol.Bioeng.* **89**, 148-156 (2005).
150. Sanchez, A. M., Bennett, G. N. & San, K. Y. Novel pathway engineering design of the anaerobic central metabolic pathway in *Escherichia coli* to increase succinate yield and productivity. *Metab Eng* **7**, 229-239 (2005).
151. Terada, K. & Izui, K. Site-directed mutagenesis of the conserved histidine residue of phosphoenolpyruvate carboxylase. His138 is essential for the second partial reaction. *Eur.J.Biochem.* **202**, 797-803 (1991).
152. Izui, K., Matsumura, H., Furumoto, T. & Kai, Y. Phosphoenolpyruvate carboxylase: a new era of structural biology. *Annu.Rev.Plant Biol.* **55**, 69-84 (2004).
153. Peng, L., Arauzo-Bravo, M. J. & Shimizu, K. Metabolic flux analysis for a *ppc* mutant *Escherichia coli* based on ¹³C-labelling experiments together with enzyme activity assays and intracellular metabolite measurements. *FEMS Microbiol.Lett.* **235**, 17-23 (2004).

154. Wohl, R. C. & Markus, G. Phosphoenolpyruvate carboxylase of *Escherichia coli*. Purification and some properties. *J.Biol.Chem* **247**, 5785-5792 (1972).
155. Cotelesage, J. J. *et al.* How does an enzyme recognize CO₂? *Int.J.Biochem.Cell Biol.* **39**, 1204-1210 (2007).
156. Goldie, A. H. & Sanwal, B. D. Allosteric control by calcium and mechanism of desensitization of phosphoenolpyruvate carboxykinase of *Escherichia coli*. *J.Biol.Chem* **255**, 1399-1405 (1980).
157. Bologna, F. P., Andreo, C. S. & Drincovich, M. F. *Escherichia coli* malic enzymes: two isoforms with substantial differences in kinetic properties, metabolic regulation, and structure. *J.Bacteriol.* **189**, 5937-5946 (2007).
158. Oh, M. K., Rohlin, L., Kao, K. C. & Liao, J. C. Global expression profiling of acetate-grown *Escherichia coli*. *J.Biol.Chem* **277**, 13175-13183 (2002).
159. Kao, K. C., Tran, L. M. & Liao, J. C. A global regulatory role of gluconeogenic genes in *Escherichia coli* revealed by transcriptome network analysis. *J.Biol.Chem* **280**, 36079-36087 (2005).
160. Booker, S. J. Unraveling the pathway of lipoic acid biosynthesis. *Chem.Biol.* **11**, 10-12 (2004).
161. Hermes, F. A. & Cronan, J. E. Scavenging of cytosolic octanoic acid by mutant LplA lipoate ligases allows growth of *Escherichia coli* strains lacking the LipB octanoyltransferase of lipoic acid synthesis. *J.Bacteriol.* **191**, 6796-6803 (2009).
162. Zhao, X., Miller, J. R., Jiang, Y., Marletta, M. A. & Cronan, J. E. Assembly of the covalent linkage between lipoic acid and its cognate enzymes. *Chem.Biol.* **10**, 1293-1302 (2003).
163. Morris, T. W., Reed, K. E. & Cronan, J. E., Jr. Identification of the gene encoding lipoate-protein ligase A of *Escherichia coli*. Molecular cloning and characterization of the *lplA* gene and gene product. *J.Biol.Chem.* **269**, 16091-16100 (1994).
164. Gokarn, R. R. *et al.* The physiological effects and metabolic alterations caused by the expression of *Rhizobium etli* pyruvate carboxylase in *Escherichia coli*. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **56**, 188-195 (2001).
165. March, J. C., Eiteman, M. A. & Altman, E. Expression of an anaplerotic enzyme, pyruvate carboxylase, improves recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Appl.Environ.Microbiol.* **68**, 5620-5624 (2002).
166. Vemuri, G. N., Minning, T. A., Altman, E. & Eiteman, M. A. Physiological response of central metabolism in *Escherichia coli* to deletion of pyruvate oxidase and introduction of heterologous pyruvate carboxylase. *Biotechnol.Bioeng.* **90**, 64-76 (2005).
167. Feist, A. M. *et al.* A genome-scale metabolic reconstruction for *Escherichia coli* K-12 MG1655 that accounts for 1260 ORFs and thermodynamic information. *Mol.Syst.Biol.* **3**, 121 (2007).
168. Henry, C. S., Jankowski, M. D., Broadbelt, L. J. & Hatzimanikatis, V. Genome-scale thermodynamic analysis of *Escherichia coli* metabolism. *Biophys.J.* **90**, 1453-1461 (2006).
169. Cao, Y., Cao, Y. & Lin, X. Metabolically engineered *Escherichia coli* for biotechnological production of four-carbon 1,4-dicarboxylic acids. *J.Ind.Microbiol.Biotechnol.* (2010).

170. Stols, L. & Donnelly, M. I. Production of succinic acid through overexpression of NAD(+)-dependent malic enzyme in an *Escherichia coli* mutant. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2695-2701 (1997).
171. Fukuda, W., Ismail, Y. S., Fukui, T., Atomi, H. & Imanaka, T. Characterization of an archaeal malic enzyme from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *Archaea.* **1**, 293-301 (2005).
172. Muller, G. L., Drincovich, M. F., Andreo, C. S. & Lara, M. V. *Nicotiana tabacum* NADP-malic enzyme: cloning, characterization and analysis of biological role. *Plant Cell Physiol* **49**, 469-480 (2008).
173. Wheeler, M. C. *et al.* *Arabidopsis thaliana* NADP-malic enzyme isoforms: high degree of identity but clearly distinct properties. *Plant Mol. Biol.* **67**, 231-242 (2008).
174. Holm, A. K. *et al.* Metabolic and transcriptional response to cofactor perturbations in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **285**, 17498-17506 (2010).
175. Sauer, U., Canonaco, F., Heri, S., Perrenoud, A. & Fischer, E. The soluble and membrane-bound transhydrogenases UdhA and PntAB have divergent functions in NADPH metabolism of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **279**, 6613-6619 (2004).
176. Fillinger, S. *et al.* Two glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases with opposite physiological roles in a nonphotosynthetic bacterium. *J. Biol. Chem.* **275**, 14031-14037 (2000).
177. Gottlieb, K. Nutzung von Glycerin und Rohglycerin als C-Quelle für die Produktion von L-Phenylalanin mit rekombinanten *Escherichia coli*-Stämmen (2011)
URL: <http://elib.uni-stuttgart.de/opus/volltexte/2011/6626> or URN: urn:nbn:de:bsz:93-opus-66262
178. Sauer, U. & Eikmanns, B. J. The PEP-pyruvate-oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**, 765-794 (2005).
179. Chatterjee, R., Millard, C. S., Champion, K., Clark, D. P. & Donnelly, M. I. Mutation of the *ptsG* gene results in increased production of succinate in fermentation of glucose by *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 148-154 (2001).
180. de los, S. C., Buldain, G., Frydman, B., Cannata, J. J. & Cazzulo, J. J. Carbon-13 nuclear magnetic resonance analysis of [1-¹³C]glucose metabolism in *Crithidia fasciculata*. Evidence of CO₂ fixation by phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Eur. J. Biochem.* **149**, 421-429 (1985).
181. Yang, C., Hua, Q., Baba, T., Mori, H. & Shimizu, K. Analysis of *Escherichia coli* anaerobic metabolism and its regulation mechanisms from the metabolic responses to altered dilution rates and phosphoenolpyruvate carboxykinase knockout. *Biotechnol. Bioeng.* **84**, 129-144 (2003).
182. Podkovyrov, S. M. & Zeikus, J. G. Purification and characterization of phosphoenolpyruvate carboxykinase, a catabolic CO₂-fixing enzyme, from *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 223-228 (1993).
183. Van der Werf, M. J., Guettler, M. V., Jain, M. K. & Zeikus, J. G. Environmental and physiological factors affecting the succinate product ratio during carbohydrate fermentation by *Actinobacillus sp.* 130Z. *Arch. Microbiol.* **167**, 332-342 (1997).
184. Zelle, R. M., Trueheart, J., Harrison, J. C., Pronk, J. T. & van Maris, A. J. Phosphoenolpyruvate carboxykinase as the sole anaerobic enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 5383-5389 (2010).

185. Kim, P., Laivenieks, M., Vieille, C. & Zeikus, J. G. Effect of overexpression of *Actinobacillus succinogenes* phosphoenolpyruvate carboxykinase on succinate production in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 1238-1241 (2004).
186. Millard, C. S., Chao, Y. P., Liao, J. C. & Donnelly, M. I. Enhanced production of succinic acid by overexpression of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1808-1810 (1996).
187. Kwon, Y. D., Sang Yup Lee & Pil Kim. Influence of Gluconeogenic Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (PCK) Expression on Succinic Acid Fermentation in *Escherichia coli* Under High Bicarbonate Condition. *J. Microbiol. Biotechnol.* **19** [9], 1448-1452. (2006).
188. Scheu, P. D., Kim, O. B., Griesinger, C. & Uden, G. Sensing by the membrane-bound sensor kinase DcuS: exogenous versus endogenous sensing of C(4)-dicarboxylates in bacteria. *Future Microbiol.* **5**, 1383-1402 (2010).
189. Janausch, I. G., Zientz, E., Tran, Q. H., Kroger, A. & Uden, G. C4-dicarboxylate carriers and sensors in bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **1553**, 39-56 (2002).
190. Kim, O. B. & Uden, G. The L-tartrate/succinate antiporter TdtT (YgjE) of L-tartrate fermentation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **189**, 1597-1603 (2007).
191. Janausch, I. G., Kim, O. B. & Uden, G. DctA- and Dcu-independent transport of succinate in *Escherichia coli*: contribution of diffusion and of alternative carriers. *Arch. Microbiol.* **176**, 224-230 (2001).
192. Zientz, E., Six, S. & Uden, G. Identification of a third secondary carrier (DcuC) for anaerobic C4-dicarboxylate transport in *Escherichia coli*: roles of the three Dcu carriers in uptake and exchange. *J. Bacteriol.* **178**, 7241-7247 (1996).
193. Zientz, E., Janausch, I. G., Six, S. & Uden, G. Functioning of DcuC as the C4-dicarboxylate carrier during glucose fermentation by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**, 3716-3720 (1999).
194. Engel, P., Kramer, R. & Uden, G. Transport of C4-dicarboxylates by anaerobically grown *Escherichia coli*. Energetics and mechanism of exchange, uptake and efflux. *Eur. J. Biochem.* **222**, 605-614 (1994).
195. Kleefeld, A., Ackermann, B., Bauer, J., Kramer, J. & Uden, G. The fumarate/succinate antiporter DcuB of *Escherichia coli* is a bifunctional protein with sites for regulation of DcuS dependent gene expression. *J. Biol. Chem.* (2008).
196. Huhn, S., Jolkver, E., Kramer, R. & Marin, K. Identification of the membrane protein SucE and its role in succinate transport in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2010).
197. Fukui, K. *et al.* Identification of succinate exporter in *Corynebacterium glutamicum* and its physiological roles under anaerobic conditions. *J. Biotechnol.* **154**, 25-34 (2011).
198. Saraste, M. Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science* **283**, 1488-1493 (1999).
199. Jiang, W., Hermolin, J. & Fillingame, R. H. The preferred stoichiometry of c subunits in the rotary motor sector of *Escherichia coli* ATP synthase is 10. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **98**, 4966-4971 (2001).
200. Ballhausen, B., Altendorf, K. & Deckers-Hebestreit, G. Constant c10 ring stoichiometry in the *Escherichia coli* ATP synthase analyzed by cross-linking. *J. Bacteriol.* **191**, 2400-2404 (2009).

201. Miki, K. & Lin, E. C. Enzyme complex which couples glycerol-3-phosphate dehydrogenation to fumarate reduction in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* **114**, 767-771 (1973).
202. Miki, K. & Lin, E. C. Anaerobic energy-yielding reaction associated with transhydrogenation from glycerol 3-phosphate to fumarate by an *Escherichia coli* system. *J.Bacteriol.* **124**, 1282-1287 (1975).
203. Iverson, T. M., Luna-Chavez, C., Cecchini, G. & Rees, D. C. Structure of the *Escherichia coli* fumarate reductase respiratory complex. *Science* **284**, 1961-1966 (1999).
204. Tran, Q. H., Bongaerts, J., Vlad, D. & Uden, G. Requirement for the proton-pumping NADH dehydrogenase I of *Escherichia coli* in respiration of NADH to fumarate and its bioenergetic implications *Eur.J.Biochem.* **244**, 155-160 (1997).
205. Uden, G. & Bongaerts, J. Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochim.Biophys.Acta* **1320**, 217-234 (1997).
206. Bertani, G. Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems. *J.Bacteriol.* **186**, 595-600 (2004).
207. Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119 (1985).
208. Sain, B. & Murray, N. E. The *hsd* (host specificity) genes of *E. coli* K 12. *Mol.Gen.Genet.* **180**, 35-46 (1980).
209. Hayashi, K. *et al.* Highly accurate genome sequences of *Escherichia coli* K-12 strains MG1655 and W3110. *Mol.Syst.Biol.* **2**, 2006 (2006).
210. Lennox, E. S. Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. *Virology* **1**, 190-206 (1955).
211. Gotting, C., Thierbach, G., Puhler, A. & Kalinowski, J. Versatile low-copy-number plasmids for temperature-inducible overexpression of bacterial genes in *Escherichia coli*. *Biotechniques* **24**, 362-4, 366 (1998).
212. Cherepanov, P. P. & Wackernagel, W. Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* **158**, 9-14 (1995).
213. Cole, S. T. *et al.* Nucleotide sequence and gene-polypeptide relationships of the *glpABC* operon encoding the anaerobic sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase of *Escherichia coli* K-12. *J.Bacteriol.* **170**, 2448-2456 (1988).
214. Cohen-Ben-Lulu, G. N. *et al.* The bacterial flagellar switch complex is getting more complex. *EMBO J.* **27**, 1134-1144 (2008).
215. Gust, B., Challis, G. L., Fowler, K., Kieser, T. & Chater, K. F. PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**, 1541-1546 (2003).
216. Inui, M., Nakata, K., Roh, J. H., Zahn, K. & Yukawa, H. Molecular and functional characterization of the *Rhodopseudomonas palustris* no. 7 phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *J.Bacteriol.* **181**, 2689-2696 (1999).
217. Kibbe, W. A. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res.* **35**, W43-W46 (2007).

218. Chung, C. T., Niemela, S. L. & Miller, R. H. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **86**, 2172-2175 (1989).
219. Vielhauer, O., Zakhartsev, M., Horn, T., Takors, R. & Reuss, M. Simplified absolute metabolite quantification by gas chromatography-isotope dilution mass spectrometry on the basis of commercially available source material. *submitted* (2011).
220. Wahl, S. A., Dauner, M. & Wiechert, W. New tools for mass isotopomer data evaluation in (13)C flux analysis: mass isotope correction, data consistency checking, and precursor relationships. *Biotechnol.Bioeng.* **85**, 259-268 (2004).
221. Warth, L., Haug, I. & Altenbuchner, J. Characterization of the tyrosine recombinase MrpA encoded by the *Streptomyces coelicolor* A3(2) plasmid SCP2*. *Arch.Microbiol.* **193**, 187-200 (2011).
222. Pettigrew, D. W., Liu, W. Z., Holmes, C., Meadow, N. D. & Roseman, S. A single amino acid change in *Escherichia coli* glycerol kinase abolishes glucose control of glycerol utilization in vivo. *J.Bacteriol.* **178**, 2846-2852 (1996).
223. Underwood, S. A., Buszko, M. L., Shanmugam, K. T. & Ingram, L. O. Lack of protective osmolytes limits final cell density and volumetric productivity of ethanologenic *Escherichia coli* KO11 during xylose fermentation. *Appl.Environ.Microbiol.* **70**, 2734-2740 (2004).
224. Akinterinwa, O. & Cirino, P. C. Heterologous expression of D-xylulokinase from *Pichia stipitis* enables high levels of xylitol production by engineered *Escherichia coli* growing on xylose. *Metab Eng* **11**, 48-55 (2009).
225. Andersson, C., Hodge, D., Berglund, K. A. & Rova, U. Effect of different carbon sources on the production of succinic acid using metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol.Prog.* **23**, 381-388 (2007).
226. Patnaik, R., Spitzer, R. G. & Liao, J. C. Pathway engineering for production of aromatics in *Escherichia coli*: Confirmation of stoichiometric analysis by independent modulation of AroG, TktA, and Pps activities. *Biotechnol.Bioeng.* **46**, 361-370 (1995).
227. Wu, H., Li, Z. M., Zhou, L. & Ye, Q. Improved succinic acid production in the anaerobic culture of an *Escherichia coli* *pflB ldhA* double mutant as a result of enhanced anaerobic activities in the preceding aerobic culture. *Appl.Environ.Microbiol.* **73**, 7837-7843 (2007).
228. Singh, A., Lynch, M. D. & Gill, R. T. Genes restoring redox balance in fermentation-deficient *E. coli* NZN111. *Metab Eng* (2009).
229. Singh, A., Soh, C. K., Hatzimanikatis, V. & Gill, R. T. Manipulating redox and ATP balancing for improved production of succinate in *E. coli*. *Metab Eng* (2010).
230. Ma, J. F. *et al.* Strategies for efficient repetitive production of succinate using metabolically engineered *Escherichia coli*. *Bioprocess Biosyst.Eng* (2010).
231. Herring, C. D., Glasner, J. D. & Blattner, F. R. Gene replacement without selection: regulated suppression of amber mutations in *Escherichia coli*. *Gene* **311**, 153-163 (2003).
232. Jarboe, L. R. *et al.* Metabolic engineering for production of biorenewable fuels and chemicals: contributions of synthetic biology. *J.Biomed.Biotechnol.* **2010**, 761042 (2010).
233. DeVito, J. A. Recombineering with *tolC* as a selectable/counter-selectable marker: remodeling the rRNA operons of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **36**, e4 (2008).

-
234. Freedberg, W. B., Kistler, W. S. & Lin, E. C. Lethal synthesis of methylglyoxal by *Escherichia coli* during unregulated glycerol metabolism. *J.Bacteriol.* **108**, 137-144 (1971).
235. Cunningham, D. S. *et al.* Pyruvate kinase-deficient *Escherichia coli* exhibits increased plasmid copy number and cyclic AMP levels. *J.Bacteriol.* **191**, 3041-3049 (2009).
236. Pertierra, A. G. & Cooper, R. A. Pyruvate formation during the catabolism of simple hexose sugars by *Escherichia coli*: studies with pyruvate kinase-negative mutants. *J.Bacteriol.* **129**, 1208-1214 (1977).
237. Weikert, C., Sauer, U. & Bailey, J. E. Use of a glycerol-limited, long-term chemostat for isolation of *Escherichia coli* mutants with improved physiological properties. *Microbiology* **143 (Pt 5)**, 1567-1574 (1997).
238. Herring, C. D. *et al.* Comparative genome sequencing of *Escherichia coli* allows observation of bacterial evolution on a laboratory timescale. *Nat.Genet.* **38**, 1406-1412 (2006).
239. Hu, H. & Wood, T. K. An evolved *Escherichia coli* strain for producing hydrogen and ethanol from glycerol. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **391**, 1033-1038 (2010).
240. Weston, C. J., Cureton, C. H., Calvert, M. J., Smart, O. S. & Allemann, R. K. A stable miniature protein with oxaloacetate decarboxylase activity. *Chembiochem.* **5**, 1075-1080 (2004).
241. Wolfenden, R., Lewis, C. A. & Yuan, Y. Kinetic challenges facing oxalate, malonate, acetoacetate, and oxaloacetate decarboxylases. *J.Am.Chem Soc.* **133**, 5683-5685 (2011).
242. Patil, R. V. & Dekker, E. E. Cloning, nucleotide sequence, overexpression, and inactivation of the *Escherichia coli* 2-keto-4-hydroxyglutarate aldolase gene. *J.Bacteriol.* **174**, 102-107 (1992).
243. Conrad, T. M. *et al.* Whole-genome resequencing of *Escherichia coli* K-12 MG1655 undergoing short-term laboratory evolution in lactate minimal media reveals flexible selection of adaptive mutations. *Genome Biol.* **10**, R118 (2009).
244. Chen, Z., Meyer, W., Rappert, S., Sun, J. & Zeng, A. P. Co-evolutionary analysis enables rational deregulation of allosteric enzyme inhibition in *Corynebacterium glutamicum* for lysine production. *Appl.Environ.Microbiol.* **77**, 4352-4360 (2011).
245. Sambasivarao, D. & Weiner, J. H. Dimethyl sulfoxide reductase of *Escherichia coli*: an investigation of function and assembly by use of in vivo complementation. *J.Bacteriol.* **173**, 5935-5943 (1991).
246. Dharmadi, Y., Murarka, A. & Gonzalez, R. Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: a new platform for metabolic engineering. *Biotechnol.Bioeng.* **94**, 821-829 (2006).
247. Murarka, A., Dharmadi, Y., Yazdani, S. S. & Gonzalez, R. Fermentative utilization of glycerol by *Escherichia coli* and its implications for the production of fuels and chemicals. *Appl.Environ.Microbiol.* **74**, 1124-1135 (2008).
248. Fan, Z., Yuan, L. & Chatterjee, R. Increased hydrogen production by genetic engineering of *Escherichia coli*. *PLoS.One.* **4**, e4432 (2009).
249. Yoshida, A., Nishimura, T., Kawaguchi, H., Inui, M. & Yukawa, H. Enhanced hydrogen production from formic acid by formate hydrogen lyase-overexpressing *Escherichia coli* strains. *Appl.Environ.Microbiol.* **71**, 6762-6768 (2005).

250. Redwood, M. D., Mikheenko, I. P., Sargent, F. & Macaskie, L. E. Dissecting the roles of *Escherichia coli* hydrogenases in biohydrogen production. *FEMS Microbiol.Lett.* **278**, 48-55 (2008).
251. Agapakis, C. M. *et al.* Insulation of a synthetic hydrogen metabolism circuit in bacteria. *J.Biol.Eng* **4**, 3 (2010).
252. Do, P. M. *et al.* Engineering *Escherichia coli* for fermentative dihydrogen production: potential role of NADH-ferredoxin oxidoreductase from the hydrogenosome of anaerobic protozoa. *Appl.Biochem.Biotechnol.* **153**, 21-33 (2009).
253. Akhtar, M. K. & Jones, P. R. Construction of a synthetic YdbK-dependent pyruvate:H₂ pathway in *Escherichia coli* BL21(DE3). *Metab Eng* **11**, 139-147 (2009).
254. Wang, C. L., Maratukulam, P. D., Lum, A. M., Clark, D. S. & Keasling, J. D. Metabolic engineering of an aerobic sulfate reduction pathway and its application to precipitation of cadmium on the cell surface. *Appl.Environ.Microbiol.* **66**, 4497-4502 (2000).
255. Tsang, M. L. Assimilatory sulfate reduction in *Escherichia coli*: identification of the alternate cofactor for adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate reductase as glutaredoxin. *J.Bacteriol.* **146**, 1059-1066 (1981).
256. Martinez, I., Bennett, G. N. & San, K. Y. Metabolic impact of the level of aeration during cell growth on anaerobic succinate production by an engineered *Escherichia coli* strain. *Metab Eng* **12**, 499-509 (2010).
257. Baez, A., Flores, N., Bolivar, F. & Ramirez, O. T. Metabolic and transcriptional response of recombinant *Escherichia coli* to elevated dissolved carbon dioxide concentrations. *Biotechnol.Bioeng.* **104**, 102-110 (2009).
258. Hong, S. H. & Lee, S. Y. Metabolic flux analysis for succinic acid production by recombinant *Escherichia coli* with amplified malic enzyme activity. *Biotechnol.Bioeng.* **74**, 89-95 (2001).
259. Stols, L., Kulkarni, G., Harris, B. G. & Donnelly, M. I. Expression of *Ascaris suum* malic enzyme in a mutant *Escherichia coli* allows production of succinic acid from glucose. *Appl.Biochem.Biotechnol.* **63-65**, 153-158 (1997).
260. Hong, S. H. & Lee, S. Y. Importance of redox balance on the production of succinic acid by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **58**, 286-290 (2002).
261. Kwon, Y. D., Kwon, O. H., Lee, H. S. & Kim, P. The effect of NADP-dependent malic enzyme expression and anaerobic C₄ metabolism in *Escherichia coli* compared with other anaerobic enzymes. *J.Appl.Microbiol.* **103**, 2340-2345 (2007).
262. Zelle, R. M., Harrison, J. C., Pronk, J. T. & van Maris, A. J. An anaerobic role for cytosolic malic enzyme in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Appl.Environ.Microbiol.* (2010).
263. Martinez, I., Lee, A., Bennett, G. N. & San, K. Y. Culture conditions' impact on succinate production by a high succinate producing *Escherichia coli* strain. *Biotechnol.Prog.* doi: 10.1002/btpr.641, (2011).
264. Siddiquee, K. A., Arauzo-Bravo, M. J. & Shimizu, K. Effect of a pyruvate kinase (*pykF*-gene) knockout mutation on the control of gene expression and metabolic fluxes in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol.Lett.* **235**, 25-33 (2004).

265. Yomano, L. P., York, S. W., Shanmugam, K. T. & Ingram, L. O. Deletion of methylglyoxal synthase gene (*mgsA*) increased sugar co-metabolism in ethanol-producing *Escherichia coli*. *Biotechnol.Lett.* **31**, 1389-1398 (2009).

Erklärung

Diese Arbeit wurde von mir selbstständig und nur mit Hilfe der angegebenen Mittel und Literatur durchgeführt und angefertigt.

Stuttgart, den 08.03.2012

Stefan Söllner