

**Herstellung von 1,2-Dihydro-1,2-dihydroxybenzoat aus  
Toluol**

**Konstruktion von Stämmen für die selektive Hydroxylierung**

Von der Fakultät Geo- und Biowissenschaften der Universität Stuttgart  
zur Erlangung der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
genehmigte Abhandlung

vorgelegt von

**Simone Gittinger**  
aus Birkenfeld (Nahe)

Hauptberichter:	Prof. Dr. H.-J. Knackmuss
Mitberichter:	Prof. Dr. M. Schlömann
Tag der mündlichen Prüfung:	20. Dezember 2002

Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart

2003

Die experimentellen Arbeiten für die vorliegende Abhandlung wurden am Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart unter Leitung von Herr Prof. Dr. H.-J. Knackmuss durchgeführt.

*Für meine Mutter  
und  
in Erinnerung an meinen Vater ( † 1983)*



## Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGEN</b> .....	<b>9</b>
<b>1 ABSTRACT</b> .....	<b>11</b>
<b>2 KURZFASSUNG</b> .....	<b>13</b>
<b>3 EINLEITUNG</b> .....	<b>15</b>
<b>3.1 Biotransformationsprozesse in der chemischen Industrie</b> .....	<b>15</b>
<b>3.2 Chemische Synthese von Phenol</b> .....	<b>18</b>
<b>3.3 Einsatz von Oxygenasen für die Synthese organischer Stoffe</b> .....	<b>21</b>
<b>3.4 Biotechnologische Herstellung von Phenol</b> .....	<b>24</b>
<b>3.5 Strategien zur Herstellung von Phenol aus Toluol</b> .....	<b>27</b>
<b>4 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>32</b>
<b>4.1 Organismen und Plasmide</b> .....	<b>32</b>
<b>4.2 Medien und Pufferlösungen</b> .....	<b>34</b>
4.2.1 Mineralmedien.....	34
4.2.2 Komplexmedien .....	35
4.2.3 Medienzusätze .....	35
<b>4.3 Stammerhaltung</b> .....	<b>36</b>
<b>4.4 Kultivierung der Bakterien und Zellernte</b> .....	<b>37</b>
4.4.1 Anzucht und Zellernte von <i>E. coli</i> -Stämmen .....	37
4.4.2 Anzucht und Zellernte von <i>Ralstonia</i> - und <i>Pseudomonas</i> -Stämmen .....	37
4.4.3 Anzucht von <i>P. putida</i> U_TP10 im Bioreaktor .....	38
<b>4.5 Messung des Bakterienwachstums</b> .....	<b>41</b>
<b>4.6 Trockengewichtsbestimmung</b> .....	<b>41</b>
<b>4.7 Bestimmung von D-Glukose</b> .....	<b>42</b>
<b>4.8 Ruhezelleexperimente</b> .....	<b>43</b>
<b>4.9 Biuret-Proteinbestimmung mit ganzen Zellen</b> .....	<b>43</b>
<b>4.10 Herstellung zellfreier Extrakte</b> .....	<b>44</b>
<b>4.11 Proteinbestimmung nach Bradford</b> .....	<b>44</b>
<b>4.12 Bestimmung von Enzymaktivitäten</b> .....	<b>44</b>
4.12.1 Toluat- bzw. Benzoat- <i>cis</i> -1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase.....	45

4.12.2	Brenzcatechin-2,3-Dioxygenase .....	45
4.12.3	Brenzcatechin-1,2-Dioxygenase .....	46
<b>4.13</b>	<b>Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC).....</b>	<b>46</b>
<b>4.14</b>	<b>Bestimmung von Toluol.....</b>	<b>48</b>
<b>4.15</b>	<b>Isolierung und Reinigung von DNA.....</b>	<b>50</b>
<b>4.16</b>	<b>Enzymatische Behandlung von DNA.....</b>	<b>52</b>
4.16.1	DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen .....	52
4.16.2	Klenow-Enzymbehandlung .....	52
4.16.3	Dephosphorylierung von Vektor-DNA.....	52
4.16.4	Ligation von DNA-Fragmenten.....	53
4.16.5	Herstellung eines T-Vektors .....	53
<b>4.17</b>	<b>Agarosegelelektrophorese.....</b>	<b>53</b>
<b>4.18</b>	<b>Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....</b>	<b>54</b>
<b>4.19</b>	<b>Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA.....</b>	<b>54</b>
<b>4.20</b>	<b>Filterkreuzungen.....</b>	<b>56</b>
<b>4.21</b>	<b>Koloniehybridisierung .....</b>	<b>56</b>
<b>4.22</b>	<b>Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....</b>	<b>57</b>
<b>4.23</b>	<b>DNA-Sequenzierung .....</b>	<b>61</b>
<b>4.24</b>	<b>Chemikalien und Biochemikalien .....</b>	<b>64</b>
<b>5</b>	<b>EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE.....</b>	<b>65</b>
<b>5.1</b>	<b>Auswahl geeigneter Bakterienstämme für die Konstruktion von Derivaten .....</b>	<b>65</b>
<b>5.2</b>	<b>Eigenschaften von <i>R. eutropha</i> 335 und <i>R. eutropha</i> B9 .....</b>	<b>65</b>
5.2.1	Wachstum auf verschiedenen C-Quellen .....	66
5.2.2	Untersuchungen zur Toluoltoleranz.....	68
5.2.3	Induktion der Benzoat-Dioxygenase.....	70
5.2.4	Umsatz von Benzoat zu Benzoatdihydrodiol .....	71
<b>5.3</b>	<b>Einbringen der Gene für den Abbau von Toluol mittels Transposition in <i>R. eutropha</i>.....</b>	<b>72</b>
5.3.1	pCK05 – Träger der Gene für den Toluolabbau.....	72
5.3.2	Übertragung des Transposons in <i>R. eutropha</i> durch Konjugation.....	73
<b>5.4</b>	<b>Transkonjuganten von <i>R. eutropha</i> 335 und <i>R. eutropha</i> B9 mit Transposon ....</b>	<b>76</b>

<b>5.5 Einbau der Gene für den Abbau von Toluol auf einem zusätzlichen Plasmid in <i>R. eutropha</i>.....</b>	<b>80</b>
5.5.1 Konstruktion von Plasmiden mit den Genen für den Abbau von Toluol zu Benzoat.....	81
5.5.2 Übertragung der Plasmide in <i>R. eutropha</i> 335 und <i>R. eutropha</i> B9.....	84
<b>5.6 Transkonjuganten von <i>R. eutropha</i> mit Plasmid.....</b>	<b>84</b>
<b>5.7 Eigenschaften von <i>P. putida</i> U-JT103 .....</b>	<b>87</b>
5.7.1 Wachstum auf verschiedenen C-Quellen.....	87
5.7.2 Untersuchungen zur Toluoltoleranz.....	88
5.7.3 Induktion der Benzoat-Dioxygenase.....	90
5.7.4 Umsatz von Benzoat zu Benzoatdihydrodiol.....	91
<b>5.8 Einbringen der Gene für den Abbau von Toluol mittels Transposition in <i>P. putida</i>.....</b>	<b>92</b>
<b>5.9 Transkonjuganten von <i>P. putida</i> U-JT103 mit Transposon .....</b>	<b>93</b>
<b>5.10 Ursachen des Wachstums von <i>P. putida</i> U-JT103 mit Benzoat.....</b>	<b>100</b>
5.10.1 Untersuchungen zur Existenz eines zweiten Gens für die Benzoatdihydrodiol-Dehydrogenase.....	101
5.10.2 Untersuchungen zur Reversion der Mutation.....	102
<b>5.11 Einsatz von <i>P. putida</i> U_TP10 als Biokatalysator für die Produktion von Phenol aus Toluol.....</b>	<b>105</b>
5.11.1 Hochzelllichtfermentation.....	105
5.11.2 Induktion .....	109
5.11.3 Untersuchungen zur Aktivität des Biokatalysators .....	110
5.11.3.1 Umsatz von Toluol zu Benzoatdihydrodiol.....	110
5.11.3.2 Langzeitstabilität des Biokatalysators.....	112
5.11.3.3 Lagerstabilität des Biokatalysators .....	113
<b>5.12 Einbau der Gene für den Abbau von Toluol auf einem zusätzlichen Plasmid in <i>P. putida</i>.....</b>	<b>114</b>
<b>5.13 Transkonjuganten von <i>P. putida</i> U-JT103 mit dem Plasmid pBBSG1.....</b>	<b>115</b>
<b>5.14 Expression der Gene für den Abbau von Toluol in <i>E. coli</i>.....</b>	<b>116</b>
5.14.1 Umsatz von Toluol zu Benzoat.....	117
5.14.2 Versuche zur Konstruktion eines Plasmids mit Genen für den Abbau von Toluol zu Benzoatdihydrodiol .....	119
5.14.2.1 Klonierung der Benzoat-Dioxygenase aus <i>Acinetobacter</i> sp. ADP1.....	119
5.14.2.2 Klonierung des „catabolic segment <i>upp</i> TOL“ in pBBSG2 .....	121

---

5.14.2.3	Weitere Versuche zur Konstruktion eines Plasmids für den Abbau von Toluol zu Benzoatdihydrodiol .....	124
5.14.3	Umsatz von Toluol zu Benzoatdihydrodiol mit einer Mischkultur .....	129
5.14.4	Umsatz von Toluol zu Benzoatdihydrodiol mit einem Stamm.....	131
<b>6</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>134</b>
<b>6.1</b>	<b>Biotechnische Herstellung von Phenol aus Toluol .....</b>	<b>134</b>
<b>6.2</b>	<b>Konstruierte Biokatalysatoren .....</b>	<b>137</b>
<b>6.3</b>	<b>Umsatzraten.....</b>	<b>139</b>
<b>6.4</b>	<b>Problem der Ausbeuten an Produkt .....</b>	<b>143</b>
<b>6.5</b>	<b>Berechnungen zur Reaktorproduktivität .....</b>	<b>149</b>
<b>6.6</b>	<b>Einfluss der Toleranz gegenüber Toluol.....</b>	<b>152</b>
<b>6.7</b>	<b>Problem der Stabilitäten.....</b>	<b>155</b>
6.7.1	Stabilität der Mutationen .....	155
6.7.2	Stabilität der Transkonjuganten mit Transposon bzw. mit Plasmid .....	156
6.7.3	Lagerstabilität der Transkonjuganten.....	157
<b>6.8</b>	<b>Induktion der Gene der Toluoloxidation.....</b>	<b>158</b>
<b>6.9</b>	<b>Aspekte zur Cofaktorregeneration .....</b>	<b>159</b>
<b>6.10</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>160</b>
<b>7</b>	<b>LITERATUR.....</b>	<b>163</b>



**Abkürzungen**

Abb.	Abbildung
Ap <sup>r</sup>	Ampicillin-Resistenz
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Cm <sup>r</sup>	Chloramphenicol-Resistenz
CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
C <sub>x</sub>	Biotrockenmasse
dATP	Desoxyadenin-5'-triphosphat
DHB	1,2-Dihydro-1,2-dihydroxybenzoat, <i>cis</i> -Cyclohexa-3,5-dien-1,2-diol-1-carboxylat
DIG	Digoxygenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosid-5'-triphosphat
DSM(Z)	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen (und Zellkulturen)
E	Extinktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galaktosid
Km <sup>r</sup>	Kanamycin-Resistenz
LB	Luria-Bertani
NAD	Nicotinamidadenindinucleotid
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid (reduziert)
NB	Nutrient broth
OD <sub>546nm</sub>	Optische Dichte bei 546 nm
OD <sub>600nm</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
OD <sub>Klett</sub>	Optische Dichte in Kletteinheiten
<i>P. putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
<i>R. eutropha</i>	<i>Ralstonia eutropha</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sp.	Spezies
Tab.	Tabelle
TB	Puffer für die Transformation (transformation buffer)
t <sub>D</sub>	Verdopplungszeit
U	internationale Enzymeinheit [μmol pro Minute]
Upm	Umdrehungen pro Minute
Vol.	Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoyl-β-D-galaktosid
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent



## 1 Abstract

### Gittinger, Simone: **Production of 1,2-dihydro-1,2-dihydroxybenzoate from toluene: Genetic engineering of strains for the selective hydroxylation**

The aim of the present work was to develop a biotechnical process for the selective hydroxylation of hydrocarbons. As an example for such a process the synthesis of phenol from toluene was chosen. For the production of phenol from toluene two steps are necessary: the bioconversion of toluene to benzoatedihydrodiol (*cis*-cyclohexa-3,5-diene-1,2-diol-1-carboxylate or 1,2-dihydro-*cis*-1,2-dihydroxybenzoate, DHB), which is further converted to phenol by an acid catalyzed process. For the bioconversion new toluene-tolerant bacteria have to be constructed, which are able to transform toluene to benzoatedihydrodiol. For this purpose the genes involved in the oxidation of toluene via benzoate had to be introduced into a toluene-tolerant strain, which could not degrade toluene or benzoatedihydrodiol.

At the beginning of this work the isolation of an appropriate strain with sufficient tolerance toward toluene for the construction failed. Therefore *R. eutropha* B9 and *P. putida* U-JT103 were selected as hosts for the genes involved in the oxidation of toluene. These mutant strains already harbored the ability to convert benzoate to benzoatedihydrodiol. Both strains were not able to degrade toluene but their tolerance against toluene was very low. The additional genes for the conversion of toluene to benzoate were introduced using the transposon donor pCK05 (Panke *et al.*, 1998). Transposon donor pCK05 carries the gene cassette encoding the complete upper operon of plasmid pWW0 of *Pseudomonas putida* mt-2 along with its native toluene-responsive regulator gene on the mini-Tn5 transposon. pCK05 was conjugated into *R. eutropha* B9 and *P. putida* U-JT103 in order to obtain stable strains that have the expression cassette integrated in the genome. Selected transconjugants of *P. putida* U-JT103 were able to transform toluene and benzylalcohol to benzoatedihydrodiol. Positive transconjugants of *R. eutropha* B9 could only convert benzylalcohol to benzoatedihydrodiol but not toluene.

In addition the genes for the conversion of toluene to benzoate were introduced in both strains on a plasmid. Therefore the gene cassette was cloned into broad-host-range vectors, which are able to replicate in other Gram-negative bacterial species. The constructed plasmids pBBSG1 and pMMSG6 were conjugated into *R. eutropha* B9 and *P. putida* U-JT103. Transconjugants of *R. eutropha* again were able to transform benzylalcohol to benzoatedihydrodiol but not toluene. Transconjugants of *P. putida* U-JT103 oxidized toluene to benzoatedihydrodiol, but compared to the transconjugants with the gene cassette introduced into the genome the rates of bioconversion were not improved efficiently.

The expression of the genes cloned into the broad-host-range vectors was also tested in *E. coli* DH5 $\alpha$ . In the case of *E. coli* the genes for the benzoate-dioxygenase had to be cloned in addition to the genes for the transformation of toluene to benzoate. In this work attempts in combining the genes for the whole necessary degradation pathway failed, but the genes for the benzoate-dioxygenase could be cloned separately on a second plasmid. Thus two different recombinants were available, one for the conversion of toluene to benzoate and the other for the conversion of benzoate to benzoatedihydrodiol. In a mixed culture formation of benzoatedihydrodiol was accomplished. It was also possible to maintain the two plasmids together in the single host *E. coli* DH5 $\alpha$ , which could also carry out the bioconversion.

The weak solvent-tolerance of the recipient strains *P. putida* U-JT103 and *E. coli* DH5 $\alpha$  leads to a high instability of the constructed biocatalysts during bioconversion of toluene. Only very low amounts of toluene (not more than 0,5 mmol in a closed system with 50 ml buffer) could be added. Best conversion rates (0,3 - 0,5 mmol $\cdot$ l $^{-1}$  $\cdot$ h $^{-1}$ ) were achieved by keeping the concentration of toluene below 0,1 mmol. Yields obtained with the *E. coli* constructs were about 85 to 99 %. With *P. putida* U\_TP10 (transconjugant of *P. putida* U-JT103 with the gene cassette introduced into the genome) at least 70 % of benzoatedihydrodiol were produced, although toluene was fully degraded. The loss of product during transformations of toluene with the transconjugant U\_TP10 was due to the formation of revertants.

Properties of *P. putida* U\_TP10 were further investigated in regard to use this strain as biocatalyst in industrial process. With high cell density culture technique strain U\_TP10 was grown efficiently on glucose as the sole carbon source. A final cell concentration of 30 g $\cdot$ l $^{-1}$  (dry weight) was obtained in 33 hours of fed-batch cultivation in a 2-l-reactor. The genes for the degradation of toluene were induced two hours before the end of exponential growth. The available fermentation equipment did not allow safe continuous transformation of toluene/oxygen mixtures. Therefore the activity of U\_TP10 cultivated through high cell density fermentation was measured in a closed batch system. With these results a very low volumetric reactor activity of about 0,02 mol $\cdot$ l $^{-1}$  $\cdot$ h $^{-1}$  for an industrial process was estimated. Because of its instability the biocatalyst could not be recycled more than two times for the process. So the amount of biocatalyst needed in regard to the available amount of product is too high and economical insufficient.

A biotechnical process for the production of the bulk chemical phenol using the constructed biocatalysts of this work is economical not efficient compared with the common chemical processes of industry.

## 2 Kurzfassung

### Gittinger, Simone: **Herstellung von 1,2-Dihydro-1,2-dihydroxybenzoat aus Toluol: Konstruktion von Stämmen für die selektive Hydroxylierung**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein biotechnisches Verfahren zur selektiven Hydroxylierung von Kohlenwasserstoffen zu entwickeln. Als Beispiel für einen derartigen Prozess sollte die Herstellung von Phenol aus Toluol ermöglicht werden. Für die Produktion von Phenol aus Toluol ist ein zweistufiges Verfahren notwendig: Die Biotransformation von Toluol zu Benzoatdihydrodiol (*cis*-Cyclohexa-3,5-dien-1,2-diol-1-carboxylat oder 1,2-Dihydro-1,2-dihydroxybenzoat, DHB) und die anschließende mit Säure katalysierte Umsetzung von Benzoatdihydrodiol zu Phenol. Für die Bereitstellung eines geeigneten Biokatalysators sollten in einen toluoltoleranten Stamm, der weder Toluol noch Benzoatdihydrodiol verwerten konnte, die erforderlichen Gene auf einem Transposon oder Plasmid integriert werden.

Da zu Beginn dieser Arbeit kein geeigneter toluoltoleranter Bakterienstamm isoliert werden konnte, wurden die Gene für die Toluoloxidation in die Stämme *R. eutropha* B9 und *P. putida* U-JT103 übertragen. Von diesen Stämmen war bekannt, dass sie im Stoffwechsel von Benzoat auf der Stufe des Benzoatdihydrodiols bereits blockiert waren. Es konnte nachgewiesen werden, dass beide Stämme Toluol nicht oxidierten. Allerdings zeigten sie nur eine sehr geringe Toleranz gegenüber Toluol. Die zusätzlichen Gene für die Transformation von Toluol zu Benzoat wurden mit Hilfe des rekombinanten Plasmids pCK05 (Panke *et al.*, 1998) übertragen. Dieses Plasmid trägt auf einem Transposon die erforderlichen Struktur- und Regulatorgene aus dem TOL-Plasmid pWW0 von *P. putida* mt-2. Mittels Konjugation konnte die Genkassette stabil in das bakterielle Chromosom von *R. eutropha* B9 und *P. putida* U-JT103 integriert werden. Transkonjuganten von *P. putida* U-JT103 oxidierten Toluol und Benzylalkohol zu Benzoatdihydrodiol. Dagegen setzten Transkonjuganten von *R. eutropha* B9 nur Benzylalkohol nicht aber Toluol zu Benzoatdihydrodiol um.

Zusätzlich wurden die Gene für die Oxidation von Toluol zu Benzoat extrachromosomal auf einem Plasmid in die beiden Stämme eingebracht. Dazu wurde die Genkassette in „broad-host-range“ Vektoren kloniert. Die konstruierten Plasmide pBBSG1 und pMMSG6 wurden ebenfalls mittels Konjugation in die Stämme *R. eutropha* B9 und *P. putida* U-JT103 übertragen. Transkonjuganten von *R. eutropha* B9 setzten wiederum nur Benzylalkohol nicht aber Toluol zu Benzoatdihydrodiol um. Transkonjuganten von *P. putida* U-JT103 oxidierten zwar Toluol zu Benzoatdihydrodiol, allerdings konnten im Vergleich zu den Transkonjuganten mit den zusätzlichen Genen im Chromosom keine besseren Umsatzraten erreicht werden.

Die Expression der Gene wurde auch in *E. coli* DH5 $\alpha$  untersucht. Hierfür mussten neben den Genen der Enzyme für die Oxidation von Toluol zu Benzoat auch die Gene für die Benzoat-Dioxygenase kloniert werden. In dieser Arbeit gelang es nicht, die Gene für die Enzyme des vollständigen Abbauweges auf einem Plasmid bereitzustellen. Die Gene für die Oxidation von Benzoat zu Benzoatdihydrodiol konnten aber separat auf einem weiteren Plasmid (pBBSG2) kloniert werden. Somit standen zwei verschiedene rekombinante *E. coli* DH5 $\alpha$ -Stämme zur Verfügung: einer für die Transformation von Toluol zu Benzoat und ein weiterer für den Umsatz von Benzoat zu Benzoatdihydrodiol. Eine Mischkultur aus beiden rekombinanten Stämmen setzte Toluol zu Benzoatdihydrodiol um. Des Weiteren war es gelungen, die beiden Plasmide zusammen in einen Stamm (ebenfalls *E. coli* DH5 $\alpha$ ) zu transformieren. Auch mit diesem Konstrukt konnte Toluol zu Benzoatdihydrodiol umgesetzt werden.

Die geringe Toluoltoleranz von *P. putida* U-JT103 und *E. coli* DH5 $\alpha$  während des Umsatzes von Toluol zu Benzoatdihydrodiol führte zu einer hohen Instabilität der konstruierten Stämme. Es konnten nur geringe Mengen an Toluol (bis zu 0,5 mmol in einem geschlossenen System mit 50 ml Puffer) zugesetzt werden. Die höchsten Umsatzraten von 0,3 - 0,5 mmol $\cdot$ l $^{-1}$  $\cdot$ h $^{-1}$  wurden bei Zugabe von maximal 0,1 mmol Toluol erreicht. Die Ausbeuten mit den *E. coli*-Konstrukten lagen zwischen 85 und 99 %. *P. putida* U\_TP10 (Transkonjugante mit der Genkassette im Chromosom) lieferte immerhin noch ca. 70 %, obwohl Toluol ebenfalls vollständig abgebaut worden war. Der Ausbeuteverlust bei den Transformationen mit dieser Transkonjugante war wahrscheinlich durch die Bildung von Revertanten verursacht.

Die Transkonjugante U\_TP10 wurde für einen möglichen Einsatz als Biokatalysator in einem großtechnischen Prozess weiter untersucht. Mit Hilfe der Hochzelllichtfermentation konnten in einem Reaktor ( $V = 2$  l) innerhalb von ca. 30 Stunden Zellkonzentrationen von 30 g $\cdot$ l $^{-1}$  mit Glukose als Substrat erzielt werden. Die Gene für die Oxidation von Toluol wurden zwei Stunden vor Ende der exponentiellen Wachstumsphase induziert. Da kein Reaktorsystem zur Verfügung stand, das eine kontinuierliche explosions sichere Prozessführung mit dem leicht flüchtigen Toluol ermöglichte, wurde die Aktivität des Biokatalysators aus der Hochzelllichtfermentation in einem abgeschlossenen Batch-Versuch bestimmt. Mit den Ergebnissen konnte eine volumetrische Reaktorproduktivität von 0,02 mol $\cdot$ l $^{-1}$  $\cdot$ h $^{-1}$  für einen technischen Prozess abgeschätzt werden. Die Instabilität des Biokatalysators führte dazu, dass dieser maximal zweimal für eine Biotransformation eingesetzt werden konnte, wodurch der Biokatalysatorverbrauch für einen wirtschaftlichen Prozess zu hoch ist.

Ein biotechnisches Verfahren zur Herstellung des Massenprodukts Phenol unter Einsatz der in dieser Arbeit konstruierten Bakterienstämme ist gegenüber den etablierten chemischen Verfahren aus wirtschaftlicher Sicht nicht konkurrenzfähig.

### 3 Einleitung

#### 3.1 Biotransformationsprozesse in der chemischen Industrie

Chemische Synthesen sind häufig aufwendige mehrstufige Verfahren. Sie benötigen sehr viel Energie, da diese Prozesse meist nur bei hohen Temperaturen und unter Druck ablaufen. Zudem fallen hohe Salzfrachten im Zuge der Neutralisation an. Die Limitierung dieser aufwendigen Synthesen liegt in der mangelnden Regio- und Stereoselektivität der Reaktionen. Dies führt oft zur Bildung von unerwünschten Nebenprodukten und damit zu einer verminderten Ausbeute des gewünschten Stoffes. Außerdem sind die Prozesse von der Lieferung und dem Vorhandensein nicht-nachwachsender fossiler Rohstoffe abhängig, da die meisten Grundchemikalien aus Erdöl, Erdgas oder Kohle hergestellt werden (Ward, 1994).

Biotransformationsprozesse für die Synthese von organischen Stoffen bieten dagegen die Möglichkeit auf nachwachsende Rohstoffe zurückzugreifen. Ein Beispiel dafür ist die fermentative Herstellung von Ethanol aus Maisstärke oder Rohrzucker wie sie in den USA oder in Brasilien seit einigen Jahren praktiziert wird (Ward, 1994). Sie bieten sogar die Möglichkeit, Abfälle aus der chemischen Industrie oder der Landwirtschaft zu nutzen und teilweise wieder in Wertstoffe zu verwandeln. Ein weiterer großer Vorteil der Biokatalyse durch Enzyme oder Bakterien- und Hefezellen ist die hohe Substrat-, Reaktions-, Regio- und Stereoselektivität der Reaktionen, die zudem im physiologischen pH-Bereich, bei niedrigen Temperaturen und ohne Druck ablaufen können (Schmid *et al.*, 2001; Ward, 1994; Jones, 1986). Dadurch kann der Energieverbrauch eingeschränkt und auch die Verwendung von Säuren und Laugen reduziert werden.

Mittlerweile werden die Reaktionen nicht mehr nur in wässrigen Lösungen, sondern auch in Zweiphasensystemen aus Wasser und organischen Lösungsmitteln sowie ausschließlich in organischen Medien durchgeführt. In organischer Umgebung können Enzyme viele Reaktionen katalysieren, die in wässriger Umgebung wegen ungünstiger Gleichgewichtslagen so nicht ablaufen (Ward, 1994). Lipasen können zum Beispiel in organischen Lösungsmitteln Veresterungen, Aminolysen, Acyлаustausche und Thioumesterungen katalysieren, während in wässriger Umgebung die Hydrolyse dominiert (Jaeger & Reetz, 1998). Zudem wird die Wirksamkeit von enzymkatalysierten Reaktionen mit Substraten mit geringer Wasserlöslichkeit verbessert. So können Steroidtransformationen, wie die Oxidation von Cholesterol oder die Bildung von Oligoöstrogen durchgeführt werden. Ein weiterer Vorteil der Biokonversionen in

Zweiphasensystemen ist die leichte Abtrennung von wasserunlöslichen Produkten von der wässrigen katalytisch aktiven Phase.

Der Einsatz von ganzen Zellen für Biotransformationen in wässrigen Zweiphasensystemen hängt davon ab, inwieweit die Zellen in Anwesenheit eines organischen Lösungsmittels überleben können (Salter & Kell, 1995). Organische Lösungsmittel lagern sich aufgrund ihres lipophilen Charakters in die Membran der Zellen ein, und können auf diese Weise die Membranfunktionen beeinträchtigen. Die Toxizität eines Lösungsmittels korreliert mit dem  $\log P_{O/W}$ -Wert (Isken & de Bont, 1998). Der  $\log P_{O/W}$ -Wert entspricht dem Logarithmus des Verteilungskoeffizienten des Lösungsmittels zwischen n-Octanol und Wasser. Substanzen mit einem  $\log P_{O/W}$ -Wert zwischen eins und fünf sind in der Regel toxisch für die Zellen.

Produkte wie Brenzcatechine, Aldehyde, Ketone oder Epoxide sind schlecht wasserlöslich und wirken bereits in geringen Konzentrationen toxisch. Durch Transformation in Zweiphasensystemen können die Produkte abgetrennt und damit toxische Konzentrationen für die Zellen vermieden werden. Allerdings gibt es Stoffe wie zum Beispiel 3-Methylbrenzcatechin bei deren Produktion aufgrund der sehr geringen  $\log P_{O/W}$ -Werte ( $< 1,5$ ) gängige Lösungsmittel wie Octan ( $\log P_{O/W} = 4,6$ ) oder Cyclohexan ( $\log P_{O/W} = 3,5$ ) nicht eingesetzt werden können (de Bont, 1998). Mit Entdeckung der lösungsmitteltoleranten Bakterien, die in der Lage sind, Lösungsmittel mit einem  $\log P_{O/W}$ -Wert unter 4 zu tolerieren ( $\log P_{O/W}$ : *p*-Xylol 3,1; Styrol 2,9; Toluol 2,8; Heptanol 2,4; Benzol 2,1; Inoue & Horikoshi, 1989), ist der Einsatz sowie die Produktion von toxischen Substanzen wie zum Beispiel die Herstellung von 3-Methylbrenzcatechin aus Toluol möglich geworden (Wery *et al.*, 2000).

Trotz der genannten Vorteile für den Einsatz von Biokatalysatoren gibt es noch eine Reihe von Nachteilen, die die Durchführung von biologischen Synthese-Verfahren in Frage stellen:

- Hohe Herstellungskosten für den Biokatalysator durch Aufreinigung von intrazellulären Enzymen und/oder durch Immobilisierung von Enzymen oder ganzen Zellen.
- Die Immobilisierung des Biokatalysators kann aufgrund von Limitierungen im Stofftransport zum Aktivitätsverlust und damit zu einer schlechten Produktivität führen.
- Viele Reaktionen benötigen spezielle Cofaktoren und deren Regeneration, wodurch sich die Kosten für den Prozess erhöhen.



- Bei geringer Stabilität des Biokatalysators besonders in nicht-wässrigen Systemen sind die Möglichkeiten der Wiederverwendung limitiert, und kann damit zu einem hohen Biokatalysatorverbrauch führen.
- Die Bildung von unerwünschten Nebenprodukten beim Einsatz von ganzen Zellen führt zu Verlusten in der Produktausbeute.

Der Einsatz von Biokatalysatoren in der chemischen Industrie beschränkt sich daher momentan auf Produkte mit einem Preis von 20-30 US-Dollar pro Kilogramm (Schmid *et al.*, 2001). Meist sind es Vorstufen (Synthone) für weitere Synthesen (Tab. 1). Biotransformationsprozesse für die Produktion von Chemikalien, die in sehr großen Mengen pro Jahr (50000 Tonnen und mehr) mit einem Produktpreis von 2-5 US-Dollar pro Kilogramm hergestellt werden, konnten bisher noch nicht etabliert werden (Schmid *et al.*, 2001).

**Tab. 1:** Biotransformationsprozesse in der chemischen Industrie

Produkt	Substrat	Reaktion	Enzym	Tonnen*	Verwendung	Quelle
Enantiomerenreine Alkohole	Racemate von Alkoholen	Trennung	Lipasen	tausend	Reaktionen mit Alkoholen	BASF
R-Mandelsäure	Racemate von Mandelonitril	Hydrolyse	Nitrilasen	einige hundert	Anwendung in der Cyanwasertoff-Chemie	BASF
Acrylamid**	Acrylnitril	Addition von Wasser	Nitril-Hydratase	tausend	Produktion von Polyacrylamid	M. R. Co.
L-Aminosäuren	Racemate von Aminosäureamiden	Trennung	Amidasen	einige hundert	L- und D-Aminosäuren	DSM
6-Aminopenicillansäure (6-APA)	Penicillin G/V	Hydrolyse	Penicillin-Acylase	tausend	Semi-synthetische Penicilline	DSM
5-Hydroxypyrazin-carboxysäure	2-Cyano-pyrazin	Addition von Wasser	Nitrilase/Hydroxylase	wenige	Tuberkulose-Medikamente	Lonza
5-Methylpyrazin-2-carboxysäure	2,5-Dimethylpyrazin	Oxidation von Methylgruppen	Monooxygenase	einige	Synthon für Medikamente	Lonza

\*Tonnen pro Jahr; Tabelle verändert nach Schmid *et al.*, 2001.

\*\*aus Thomas *et al.*, 2002; M. R. Co.: Mitsubishi Rayon Co., Ltd (Tokyo, Japan).

### 3.2 Chemische Synthese von Phenol

Zu den Reaktionen, für die die chemische Synthese bisher nicht zufriedenstellend durchzuführen ist, gehören die direkten und selektiven Oxygenierungen von aliphatischen und aromatischen Kohlenwasserstoffen. Die Darstellung von Phenol erfolgt durch Substitution einer geeigneten anionischen Abgangsgruppe (*ipso*-Substitution). So kann man Phenol aus Natriumbenzolsulfonat durch Erhitzen in geschmolzenem Natriumhydroxid herstellen (Vollhardt, 1990) (Abb. 1C). Das dabei entstehende Phenolat wird anschließend mit Salzsäure in das freie Phenol umgewandelt. Die Bildung von Benzolmonosulfonsäure erfolgt durch elektrophile Substitution mit Schwefeltrioxid ( $\text{SO}_3$ ). In der Praxis wird für die Reaktion „rauchende Schwefelsäure“, welche freies Schwefeltrioxid (ca. 8 %) enthält, eingesetzt.

Ein weiteres Herstellungsverfahren ist das sogenannte Hale-Britton-Verfahren, bei dem Benzol chloriert wird und das Chlorbenzol anschließend bei 380 °C unter Druck mit Natronlauge zu Phenol mit einer Ausbeute von ca. 90 % umgesetzt wird (Jakob & Hoffmann, 1988) (Abb. 1B). Für die Chlorierung von Benzol wird Aluminiumchlorid als Katalysator benötigt.

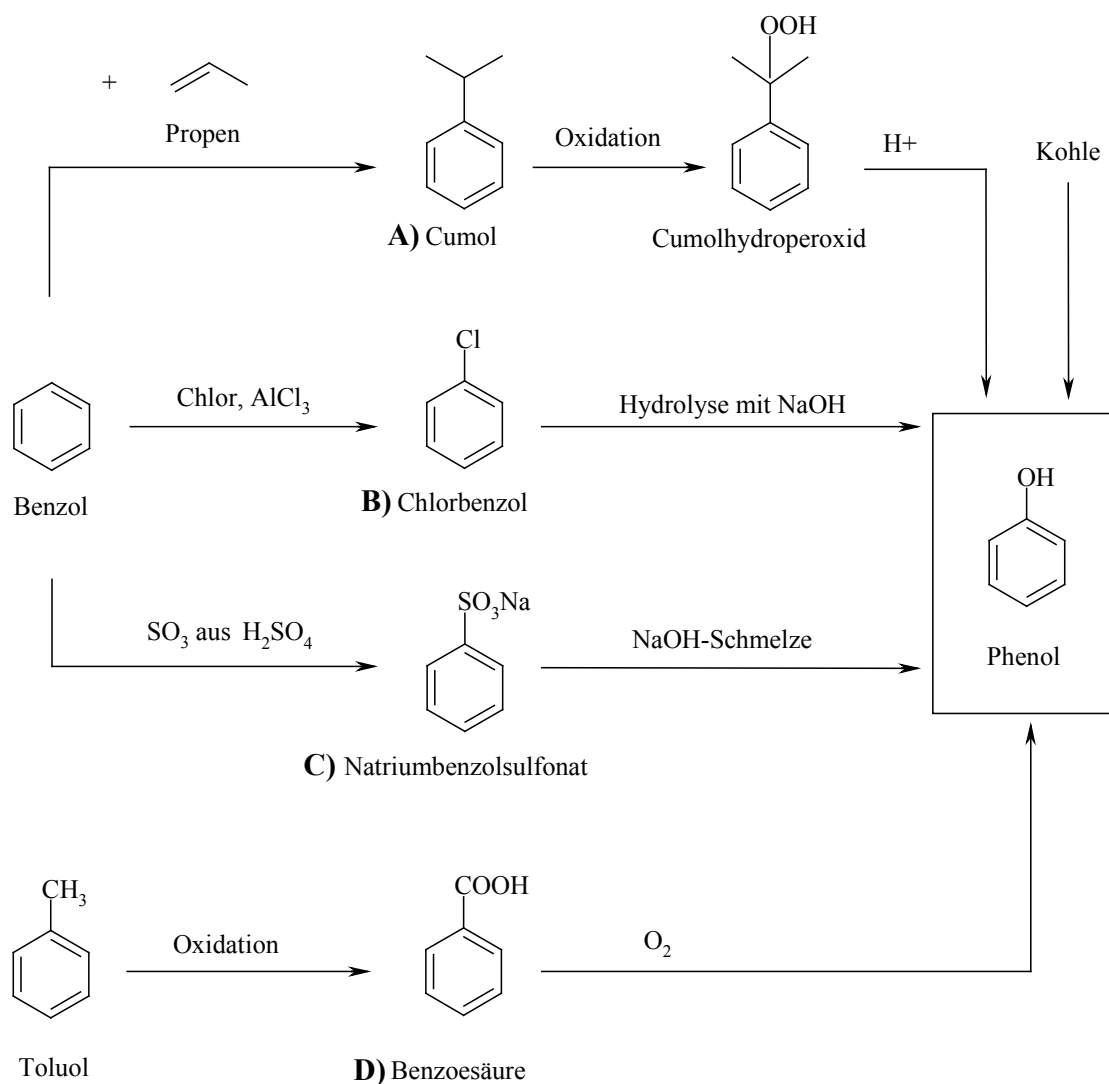
Über 90 % des Phenols weltweit wird aber mit dem sogenannten Cumolhydroperoxid-Verfahren (Hock-Verfahren) hergestellt (Vollhardt, 1990) (Abb. 1A). Bei diesem Verfahren wird Benzol zunächst durch eine Friedel-Crafts-Alkylierung mit Propen unter sauren Bedingungen in Cumol überführt. Das entstandene Alkylbenzol wird durch Luft radikalisch zum entsprechenden Hydroperoxid oxidiert. Im letzten Schritt wird das Hydroperoxid in Anwesenheit von Säure zu Phenol und Aceton gespalten. Im Prinzip läuft dieses Verfahren auf eine Oxidation von Benzol zu Phenol und von Propen zu Aceton hinaus. Obwohl das Ziel der Reaktion die Herstellung von Phenol ist, hängt die Wirtschaftlichkeit dieses Prozesses von dem Marktpreis des Keton-Nebenproduktes ab.

Im letzten Jahrzehnt wurde die direkte Einführung des Sauerstoffs durch milde Oxidationsmittel wie  $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , oder  $\text{O}_2/\text{H}_2$  sowohl in der Flüssig- als auch in der Gasphase untersucht. Technisch interessant ist bisher lediglich die Gasphasenreaktion von Benzol mit  $\text{N}_2\text{O}$  an eisenhaltigen Zeolithen (Pirutko *et al.*, 2002), die bei Umsätzen von 30 % Benzol Phenolselektivitäten von > 90 % lieferten. Dieser Prozess lohnt sich nur solange das teure  $\text{N}_2\text{O}$  als Abfallprodukt in der chemischen Industrie anfällt. Jähnisch *et al.* (2002) gelang es, die Hydroxylierung von Benzol mit  $\text{N}_2\text{O}$  in der Flüssigphase durchzuführen. Die Reaktion gelang in einem Autoklaven bei 240 °C in Gegenwart von Zeolithen als Katalysatoren. Bei einem Umsatz von 1,8 % wurde eine Phenolselektivität von > 95 % erzielt. Ehrich *et al.* (2002) beschreiben die

Oxidation von Benzol zu Phenol in der Gasphase mit einer  $O_2/H_2$ -Mischung unter der Verwendung von Platin-Vanadiumoxid- oder Palladium-Vanadiumoxid-Katalysatoren. Als Trägermaterial wurden Silikate verwendet. Bei diesen Reaktionen wurden Phenolselektivitäten von mehr als 96 % erreicht. Die Benzolumsätze betragen jedoch maximal 1 %.

Auch Toluol kann auf chemischem Weg zu Phenol oxidiert werden (<http://www.fb9-tc2.chemie.uni-oldenburg.de>). Dabei wird im ersten Schritt Toluol mit Luft in Anwesenheit eines Katalysators in einer radikalischen Kettenreaktion bei 150 °C und unter Druck zu Benzoesäure oxidiert. Anschließend wird Benzoesäure durch eine oxidative Decarboxylierung in Anwesenheit von Katalysatoren bei 250 °C zu Phenol umgesetzt. Der Nachteil dieses Verfahrens liegt im hohen Energieverbrauch, der hohen Anzahl an verschiedenen Nebenprodukten und im geringen Umsatz (aus Toluol entstehen ca. 20 % Benzoesäure, die im anschließenden Schritt in einer Ausbeute von ca. 5 % zu Phenol umgesetzt wird).

Der Einsatz von Oxygenasen für die selektive Hydroxylierung von aliphatischen und aromatischen Kohlenwasserstoffen stellt somit eine vielversprechende Alternative zur herkömmlichen chemischen Synthese dar.



**Abb. 1:** Chemische Synthesen von Phenol.

A) Alkylierung von Benzol mit Propen zu Cumol, Oxidation von Cumol zu Cumolhydroperoxid und anschließende saure Umlagerung zu Phenol und Aceton (Hock-Verfahren); B) Chlorierung von Benzol zu Chlorbenzol und anschließende Substitution von Chlor mit OH (Hale-Britton-Verfahren), C) Elektrophile Substitution von Benzol mit Schwefeltrioxid zu Benzolmonosulfonsäure, anschließend Umwandlung zu Phenol mit heißer Natronlauge. D) Oxidation von Toluol zu Benzoesaure und anschließende oxidative Decarboxylierung zu Phenol.

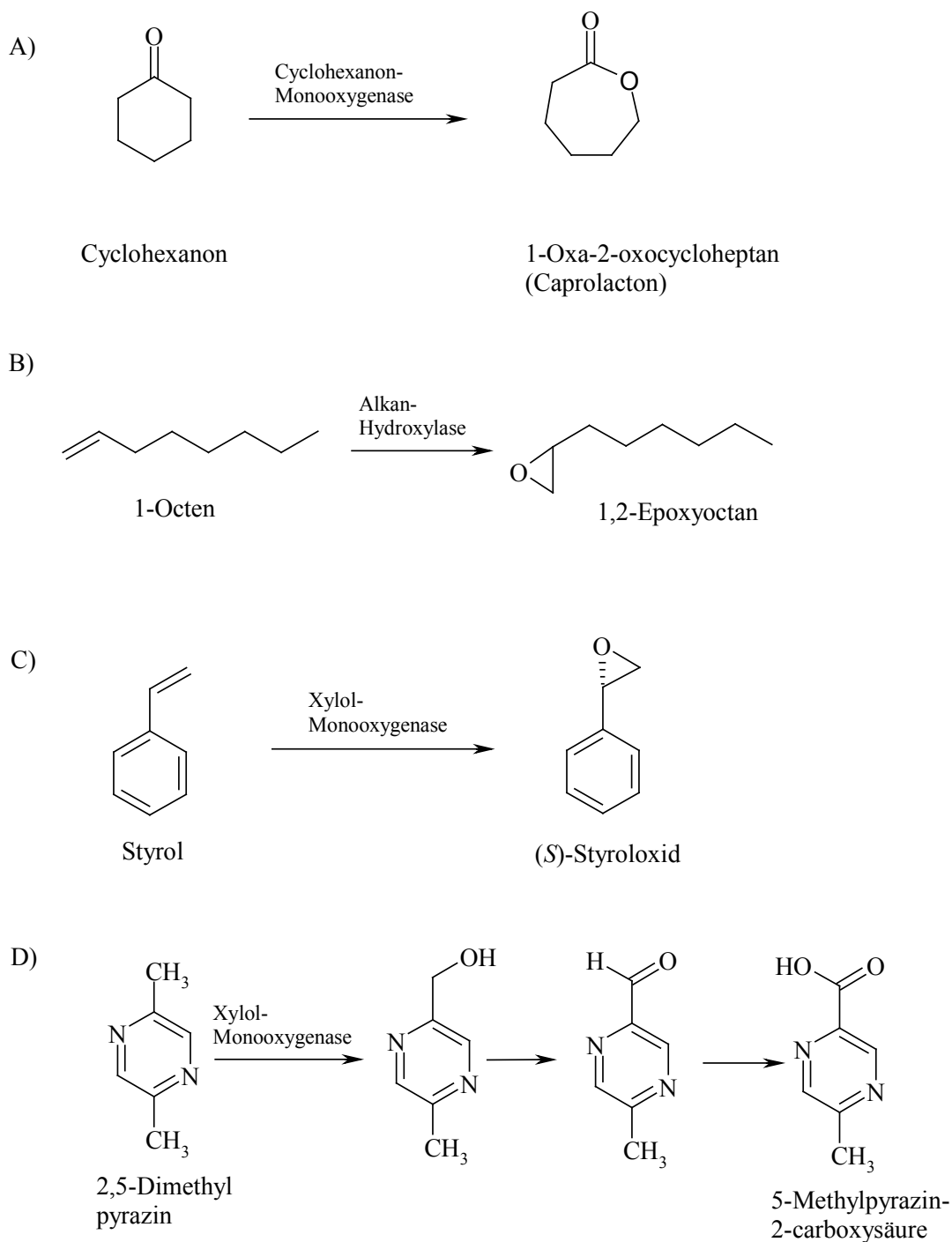
### 3.3 Einsatz von Oxygenasen für die Synthese organischer Stoffe

Die Produkte der selektiven Hydroxylierung von aliphatischen und aromatischen Kohlenwasserstoffen finden aufgrund der hohen Stereoselektivität immer größeres Interesse als Bausteine für die chemische Synthese. So sind die „Baeyer-Villiger-Monooxygenasen“ in der Lage, sowohl den nukleophilen (Oxidation von Ketonen und Aldehyden), als auch den elektrophilen (Oxidation von Sulfiden) Einbau von Sauerstoff in verschiedene Substrate mit einer hohen Regio- und Stereoselektivität zu katalysieren (Willetts, 1997). Die chiralen Produkte sind Lactone oder Sulfoxide, die als Bausteine für die weitere chemische Synthese dienen. Die am besten charakterisierte „Baeyer-Villiger-Monooxygenase“ ist die Cyclohexanon-Monooxygenase von *Acinetobacter calcoaceticus* (Abb. 2A) (Thomas *et al.*, 2002).

Weitere Produkte von Monooxygenasen sind die Epoxide. Dies sind dreigliedrige cyclische Ether (Oxacyclopropane), die zu einer Klasse der Cycloalkane gehören, in denen ein oder mehrere Kohlenstoffatome durch ein Heteroatom, in diesem Fall Sauerstoff, ersetzt wurden. Ein Weg, um Epoxide „in einem Schritt“ mit einer hohen Enantiomerenreinheit zu erhalten, ist die Epoxidation von Doppelbindungen durch Monooxygenasen (Panke *et al.*, 2000; Onumonu *et al.*, 1994). Alkene und Alkane können mit der Alkan-Hydroxylase aus *Pseudomonas oleovorans* zu den entsprechenden Mono- und Diepoxiden oxidiert werden (Witholt *et al.*, 1990; Schwartz *et al.*, 1977) (Abb. 2B). Die Xylol-Monooxygenase aus dem TOL-Plasmid pWW0 aus *Pseudomonas putida* mt-2 ist in der Lage, Styrol zum korrespondierenden Epoxid umzusetzen (Panke *et al.*, 1999; Wubbolts *et al.*, 1994) (Abb. 2C).

Die Xylol-Monooxygenase wird außerdem eingesetzt, um Methylgruppen unterschiedlich substituierter Benzole und deren Heteroaromaten zu hydroxylieren. Die Firma Lonza benutzt Zellen von *Pseudomonas putida* mt-2 für die Produktion von heteroaromatischen Säuren (Abb. 2D) im Industriemaßstab (Oxidation von 2,5-Dimethylpyrazin zu 5-Methylpyrazin-2-carboxysäure, siehe auch Tab. 1).

Brenzcatechin und dessen Derivate sind wertvolle Bausteine für Pharmazeutische Produkte (Ennis & Ghazal, 1992). Außerdem werden sie in der chemischen Industrie zur Herstellung von künstlichen Aromen verwendet (Shirai, 1986). Die chemische Synthese von substituierten Brenzcatechinen ist sehr aufwendig, und die Ausbeuten sind sehr gering. Zudem entstehen viele verschiedene Brenzcatechine als unerwünschte Nebenprodukte. Die regio- und stereoselektive Produktion von 3-substituierten Brenzcatechinen kann durch den Umbau von aromatischen Kohlenwasserstoffen erreicht werden. Held *et al.* (1998) benutzen die Monooxygenase von *Pseudomonas azelaica* HBP 1, um aus substituierten Phenolen Brenzcatechine zu bilden.

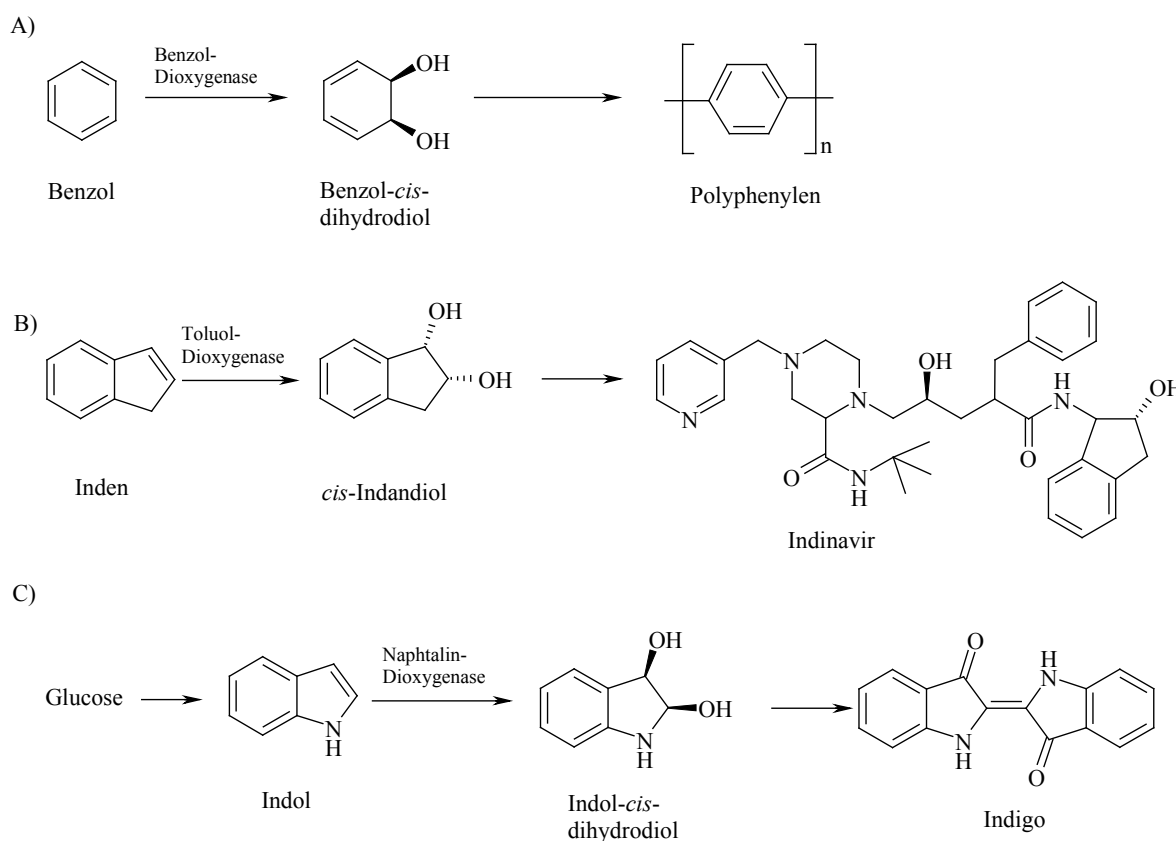


**Abb. 2:** Einsatz von Monooxygenasen für die Synthese organischer Stoffe.

A) Oxidation von Ketonen (Willett, 1997), B) Epoxidation von Alkenen (Schwartz *et al.*, 1977), C) Oxidation von Styrol (Panke *et al.*, 1999), D) Oxidation der Methylgruppe substituierter Benzole und deren Heteroaromaten (Schmid *et al.*, 2001).

Hüsken *et al.* (2001) konstruierten *Pseudomonas putida*-Stämme, die in der Lage waren, Toluol zu 3-Methylbrenzcatechin umzusetzen. Bei diesem Umsatz erfolgte eine Dioxygenierung des Toluols. Die Produkte der Reaktionen mit Dioxygenasen sind *cis*-Dihydrodihydroxy-

benzol-Derivate, die auch *cis*-Dihydrodirole genannt werden. Diese Dirole sind Bausteine für die Synthese unterschiedlicher in der Natur vorkommender Stoffe wie Inositol, Terpene oder Alkaloide (Hudlicky & Thorpe, 1996). Außerdem finden sie immer größeres Interesse in der chemischen Industrie zur Produktion von organischen Komponenten (Hudlicky *et al.*, 1999). Die bekanntesten Dioxygenasen sind die Toluol-Dioxygenasen, die monosubstituierte Benzole außer Fluorbenzol oxidieren, die Biphenyl-Dioxygenasen, die Biphenyle zu den entsprechenden 2,3- oder 3,4-*cis*-Diolen umsetzen und die Naphtalin-Dioxygenasen, die die Oxidation von Naphtalin sowie verschiedener 2- und 3-Ringsysteme katalysieren (Raschke *et al.*, 2001; Boyd & Sheldrake, 1998). Auch wenn viele Firmen seit Jahren die Möglichkeit besitzen, Dihydrodirole aus Arenen im größeren Maßstab zu produzieren, sind bisher nur wenige Prozesse mit Arendiolderivaten etabliert worden (Abb. 3). Dazu zählen die Produktion von Polyphenylen aus Benzoldihydrodiol, die umweltfreundliche Produktion von Indigo über das *cis*-Dihydrodiol von Indol und die Produktion des HIV-Proteasehemmers Indinavir (Boyd & Sheldrake, 1998).



**Abb. 3:** Einsatz von Dioxygenasen für die Synthese organischer Stoffe.

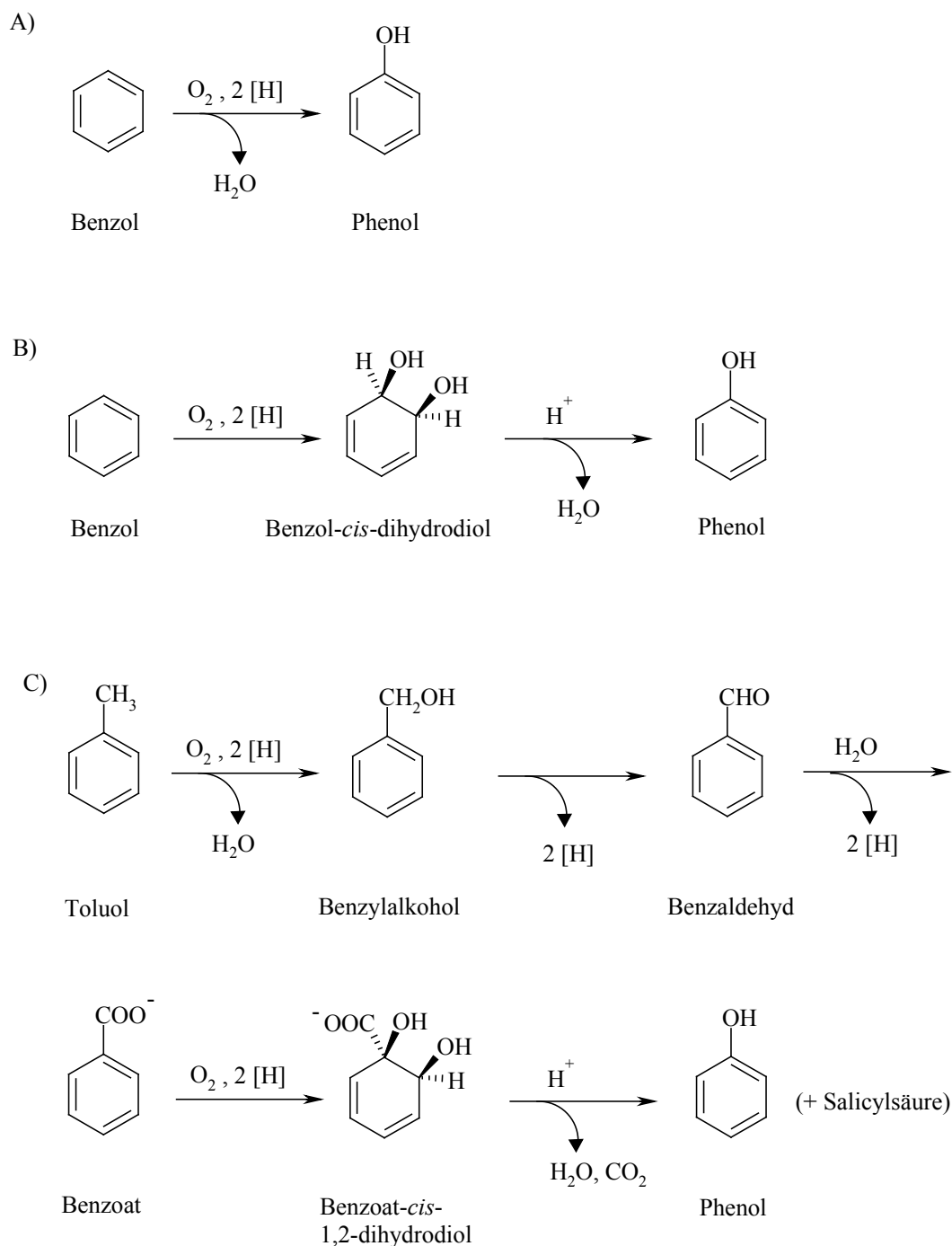
A) Oxidation von Benzol zu Benzol-*cis*-dihydrodiol, B) Oxidation von Inden zu *cis*-Indandiol, C) Oxidation von Indol zu Indol-*cis*-dihydrodiol (Boyd & Sheldrake, 1998).

### 3.4 Biotechnologische Herstellung von Phenol

Für die biotechnologische Herstellung von Phenol mit Hilfe von Oxygenasen gibt es drei mögliche Wege, wobei sowohl Benzol als auch Toluol als Ausgangssubstrate dienen:

- Benzol wird durch eine Monooxygenase direkt zu Phenol oxidiert (Abb. 4A).
- Benzol wird durch eine Dioxygenase zu Benzol-*cis*-dihydrodiol (*cis*-Cyclohexa-3,5-dien-1,2-diol) umgesetzt, welches unter sauren Bedingungen zu Phenol aromatisiert wird (Abb. 4B).
- Toluol wird über mehrere enzymatische Stufen zu Benzoatdihydrodiol (die in der vorliegenden Arbeit verwendete Bezeichnung steht anstelle von *cis*-Cyclohexa-3,5-dien-1,2-diol-1-carboxylat oder 1,2-Dihydro-1,2-dihydroxybenzoat, DHB) oxidiert, das unter sauren Bedingungen zu Phenol (Decarboxylierung und Wasserabspaltung) umgesetzt wird (Abb. 4C).





**Abb. 4:** Verschiedene Möglichkeiten für die biotechnologische Herstellung von Phenol.

A) Direkte Oxygenierung von Benzol, B) Dioxygenierung von Benzol und anschließende saure katalytische Umsetzung, C) Oxidation von Toluol (Methylgruppenoxidation) zu Benzoatdihydrodiol über mehrere enzymatische Schritte und anschließende saure Umsetzung.

Da sowohl die Ausgangssubstrate Benzol und Toluol als auch das Produkt Phenol für Bakterien sehr toxische Substanzen sind (siehe Kapitel 3.1), sollten für die biotechnologische Herstellung entsprechende lösungsmitteltolerante Stämme zum Einsatz kommen. Da die Herstellung von Phenol aus Benzol jeweils über einen „Ein-Enzym-Schritt“ durchzuführen war,

wurde zunächst versucht, aus Anreicherungsversuchen Benzol tolerierende Stämmen zu isolieren. Es zeigte sich aber, dass die isolierten Stämme nur geringe Mengen an Benzol tolerierten. Die auf Benzol angereicherten Stämme tolerierten sogar Toluol besser als Benzol. Auch aus Literaturangaben war ersichtlich, dass viele Bakterien Toluol in sehr hohen Konzentrationen, nicht aber Benzol tolerieren können (Tab. 2). Ein weiterer Vorteil des Einsatzes von Toluol gegenüber Benzol ist die interne Cofaktorregeneration. Beim Umsatz von Toluol zu Benzoesäure entstehen so viele Reduktionsäquivalente, wie für die Oxidation von Benzoesäure zu Benzoesäuredihydrodiol verbraucht werden (Abb. 4C). Somit muss gar kein oder nur sehr wenig Auxiliarsubstrat für den Biotransformationsprozess bereitgestellt werden, während beim Umsatz von Benzol eine kontinuierliche Zufuhr an Substrat notwendig wäre. Aufgrund der genannten Vorteile wurden Strategien für ein Verfahren zur Herstellung von Phenol aus Toluol entwickelt, zumal der Weltmarktpreis für Benzol meist über dem des Toluols liegt.

**Tab. 2:** Lösungsmittel tolerierende Bakterien (verändert nach Isken & de Bont, 1998)

Organismus	Isolierung mit	Quelle	Toluol-Toleranz <sup>1</sup>	Benzol-Toleranz <sup>2</sup>	Referenz
<i>P. putida</i> ICH-2000	Toluol	Boden	30 % (v/v)	kein Wachstum	Inoue & Horikoshi, 1989
<i>P. putida</i> Idaho	<i>p</i> -Xylol*	Boden	50 % (v/v)*	kein Wachstum	Cruden <i>et al.</i> , 1992
<i>P. aeruginosa</i> ST-001	<i>p</i> -Xylol	Boden	10 % (v/v)	kein Wachstum	Aono <i>et al.</i> , 1992
<i>P. putida</i> S12	Styrol*	Boden	50 % (v/v)	keine Angaben	Weber <i>et al.</i> , 1993
<i>Flavobacterium</i> sp. DS-711	Benzol	Tiefsee	10 % (v/v)	5 % (v/v)	Moriya & Horikoshi, 1993
<i>Bacillus</i> sp. DS994	Benzol	Tiefsee	10 % (v/v)	5 % (v/v)	Moriya & Horikoshi, 1993
<i>P. aeruginosa</i> LST-03	Cyclohexan	Boden	Wachstum	schwaches Wachstum	Ogino <i>et al.</i> , 1994
<i>P. putida</i> DOT-T1	Toluol*	Wasser	90 % (v/v)*	kein Wachstum	Ramos <i>et al.</i> , 1995
<i>Rhodococcus</i> sp. 33	Benzol*	Boden	keine Angaben	2 % (v/v)*	Paje <i>et al.</i> , 1997

<sup>1</sup>Wachstum in Gegenwart von Toluol; <sup>2</sup>Wachstum in Gegenwart von Benzol; \*einzige Kohlenstoffquelle; •Abbau.

### 3.5 Strategien zur Herstellung von Phenol aus Toluol

Das Verfahren, Phenol aus Toluol herzustellen, sollte aus einem biologischen Schritt (Produktion von Benzoatdihydrodiol) und einem chemischen Verfahrensschritt (Zugabe von Säure) bestehen. Dafür mussten neue Toluol tolerierende Bakterienstämme konstruiert werden, die die entsprechenden Gene für den Abbau von Toluol zu Benzoatdihydrodiol besitzen, letzteres dann aber nicht weiter umsetzen. Für die genetische Modifizierung standen zwei Möglichkeiten zur Verfügung:

- In einem toluoltoleranten Stamm, der Toluol als C-Quelle verwerten kann, könnte das für den Abbau von Benzoatdihydrodiol verantwortliche Enzym, die Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase, deletiert werden.
- In einen toluoltoleranten Stamm, der nicht in der Lage ist, Toluol, Benzoat oder Benzoatdihydrodiol zu verwerten, könnten die für die Oxidation von Toluol erforderlichen Gene auf einem mobilen genetischen Element (Transposon oder Plasmid) integriert werden.

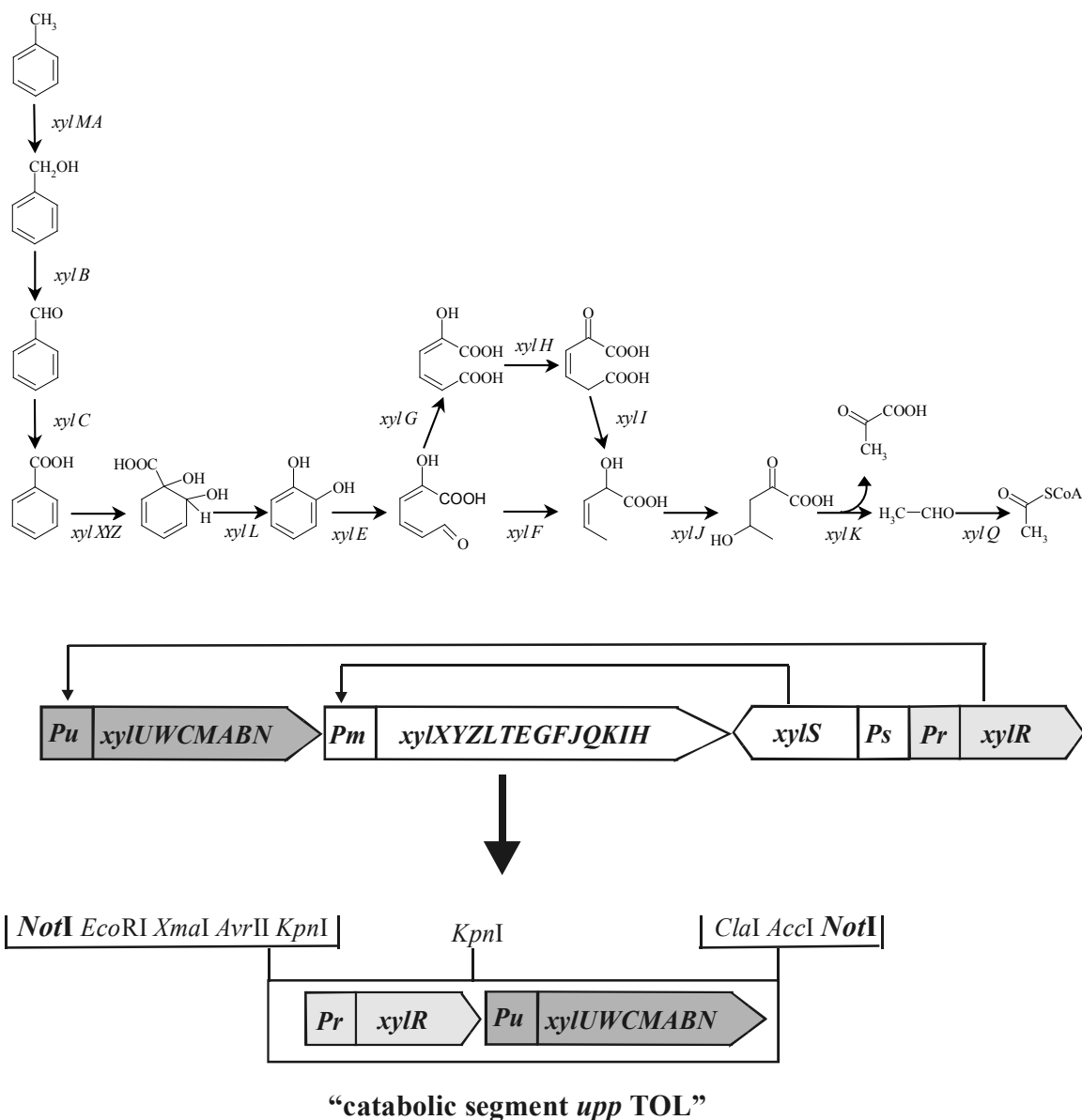
Für die erste Strategie wäre es notwendig, einen Toluol tolerierenden Stamm zu verwenden, der Toluol über Benzoat abbaut (neben der Methylgruppenoxidation sind weitere Abbauege für Toluol wie die Hydroxylierung des aromatischen Ringes in *ortho*-, *meta*- oder *para*-Stellung oder die Dioxygenierung in 2,3-Position bekannt; Mikesell *et al.*, 1993). Ein dieser Strategie entsprechender Stamm wurde mit *P. putida* Idaho (Cruden *et al.*, 1992) bereits beschrieben. Von diesem Stamm könnte eine Mutante hergestellt werden, die im Abbauweg von Toluol auf der Stufe der Benzoatdihydrodiol-Dehydrogenase blockiert ist (Germer, 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, Stämme durch das Einbringen der Gene für die Toluoloxidation auf einem mobilen genetischen Element zu konstruieren. Zur Realisierung dieser Strategie ist folgendes erforderlich:

- Ein Stamm, der Toluol toleriert es aber nicht umsetzt, und der auch Benzoat und Benzoatdihydrodiol nicht angreift.
- Die Gene der Toluoloxidation bis zu Benzoatdihydrodiol müssten auf einem übertragbaren genetischen Modul verfügbar gemacht werden.

Es ist möglich toluoltolerante Stämme zu isolieren, die dieses nicht als Kohlenstoffquelle nutzen können (Tab. 2). Inwieweit solche Stämme in der Lage sind, andere Aromaten wie Benzylalkohol, Phenol, Kresol oder Benzoat abzubauen, muss im Einzelfall untersucht werden. Die in Tab. 2 aufgelisteten Bakterien sind nur in Hinblick auf ihre Toleranzeigenschaften beschrieben. In vielen Fällen können isolierte Stämme, die hohe Toleranzen gegenüber toxischen Lösungsmitteln zeigen, diese sowie weitere Aromaten oxidieren und als Energiequelle nutzen. In diesen Stämmen müssten dann die Gene der für den Abbau von Benzoat und Benzoatdihydrodiol verantwortlichen Enzyme mutiert werden, bevor die zusätzlichen Gene für die Toluoloxidation auf einem Modul eingebaut werden können.

Für die Konstruktion der Module wurden die Gene, die dem TOL-Plasmid pWW0 aus *P. putida* mt-2 entstammen, kloniert. Auf diesem Plasmid bilden die Gene der Enzyme für den Abbau von Toluol zwei Gencluster (Abb. 5): das „upper-pathway“ Operon (Abbau von Toluol zu Benzoat) und das „meta-pathway“ Operon (Abbau von Benzoat über *meta*-Spaltung von Brenzcatechin). Beide Gencluster besitzen ihren eigenen Regulator, XylR bzw. XylS. Die Klonierung der Gene für die Enzyme des „upper-pathway“ zusammen mit dem spezifischen Regulator als eine funktionsfähige Einheit („catabolic segment *upp* TOL“, Abb. 5) wurde bereits von der Arbeitsgruppe von de Lorenzo durchgeführt (Panke *et al.*, 1998). Die konstruierten Plasmide pCK04AxylR („catabolic segment *upp* TOL“ in Vektor pCK01 ligiert) und pCK05 (trägt das „catabolic segment *upp* TOL“ auf einem Transposon, Aufbau siehe Kapitel 5.3.1) wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

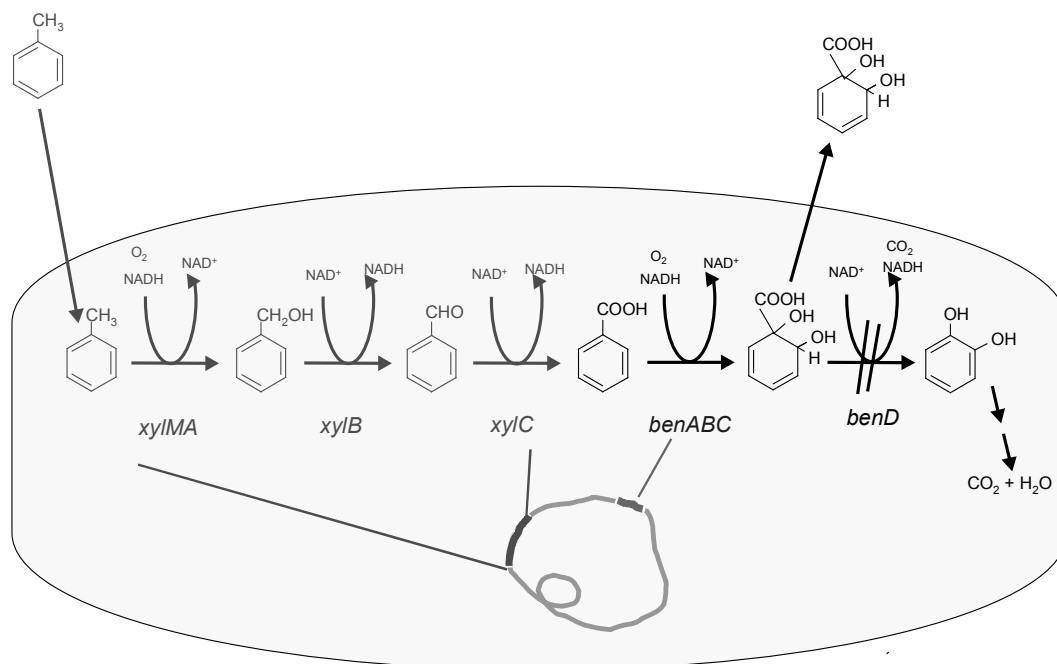


**Abb. 5:** Klonierung der Gene für den Abbau von Toluol zu Benzoesäure (Panke *et al.* 1998). Dargestellt sind die beiden Gencluster des TOL-Plasmids pWW0 aus *P. putida* mt-2: „upper-pathway“ Operon: Abbau von Toluol zu Benzoesäure. *Pu*: Promotor-Operator-Region; XylU und XylW: Funktion unbekannt; XylC: Benzaldehyd-Dehydrogenase; XylMA: Xylol-Monooxygenase; XylB: Benzylalkohol-Dehydrogenase; XylN: Transportprotein für die Aufnahme von *m*-Xylol (Kasai *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 1997; Assinder & Williams, 1990). „meta-pathway“ Operon: Abbau von Toluol über *meta*-Spaltung von Brenzcatechin. *Pm*: Promotor-Operator-Region; XylXYZ: Toluol-Dioxygenase; XylL: Toluol-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase; XylT: Ferredoxin; XylE: Brenzcatechin-2,3-Dioxygenase; XylG: 2-Hydroxymuconatsemialdehyd-Dehydrogenase; XylF: 2-Hydroxymuconatsemialdehyd-Hydrolase; XylJ: 2-Hydroxy-2,4-dienoat-Hydratase; XylQ: Acetaldehyd-Dehydrogenase; XylK: 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase; XylI: 4-Oxalacrylat-Decarboxylase; XylH: 4-Oxalacrylat-Isomerase (Hugo *et al.*, 1998; Aemprapa & Williams, 1998; Neidle *et al.*, 1992; Assinder & Williams, 1990). Anschließend an beide Gencluster sind die jeweiligen Regulatoren XylS und XylR angeordnet (Inouye *et al.*, 1988; Inouye *et al.*, 1986). Im „catabolic segment upp TOL“ wurden die Gene des „upper-pathway“ mit dem Gen für den spezifischen Regulator vereinigt und mit zwei Schnittstellen für *NotI* flankiert. Das Segment hat eine Größe von ca. 12 kb.

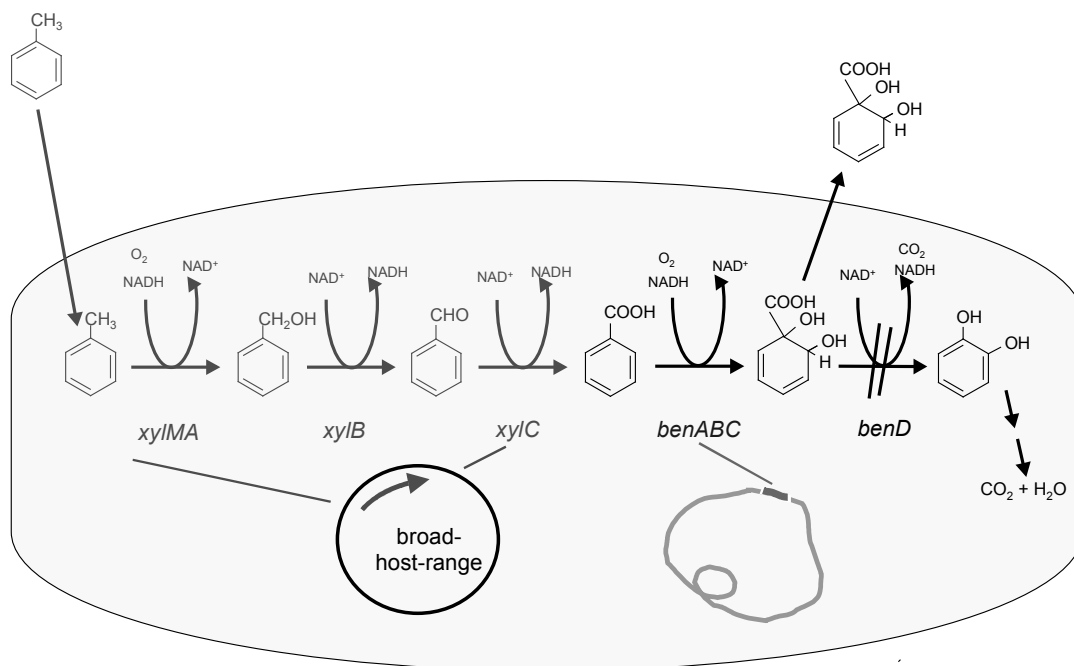
Mit Hilfe dieser Konstrukte bzw. hiervon abgeleiteter Plasmide sollte das „catabolic segment *upp* TOL“ zunächst in die beiden Stämme *R. eutropha* B9 (Reiner & Hegeman, 1971) und *P. putida* U-JT103 (Morawski *et al.*, 1997) integriert werden. Diese Stämme sind im katabolen Abbau von Benzoat bereits auf der Stufe des Benzoatdihydrodiols blockiert und scheiden dieses ins Medium aus. Die noch fehlenden Gene für den Abbau von Toluol zu Benzoat („catabolic segment *upp* TOL“) könnten mit dem Plasmid pCK05 in das Chromosom integriert werden (Abb. 6A) oder extrachromosomal auf einem Plasmid eingebaut werden (Abb. 6B). Dazu müsste das „catabolic segment *upp* TOL“ in spezielle Vektoren („broad-host-range“) kloniert werden.

Weiterhin könnten Anreicherungen durchgeführt werden, um neue für diese Strategie geeignete Stämme zu isolieren. Für diese Stämme müssten dann nicht nur die Gene für den Abbau von Toluol zu Benzoat, wie im Falle von *R. eutropha* B9 und *P. putida* U-JT103, sondern auch die benötigten Gene für die Folgereaktion auf einem übertragbaren genetischen Modul verfügbar gemacht werden.

A) Gene auf einem Transposon



B) Gene auf einem Plasmid



**Abb. 6:** Prinzip des Einbaus der Gene für den Abbau von Toluol in *R. eutropha* B9 bzw. *P. putida* U-JT103. A) Gene auf einem Transposon ins Chromosom integriert. B) Gene extrachromosomal auf einem Plasmid integriert. *XylMA*, Xylol-Monooxygenase; *XylB*, Benzylalkohol-Dehydrogenase; *XylC*, Benzaldehyd-Dehydrogenase. Die Gene für den Abbau von Benzoat über den *ortho*-Weg liegen bereits chromosomal vor, wobei das Gen für die Benzoatdihydrodiol-Dehydrogenase *benD* inaktiviert ist. Die Stämme können deshalb Benzoat nicht mehr als Substrat nutzen und scheiden das Benzoatdihydrodiol ins Medium aus.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Organismen und Plasmide

Die in dieser Arbeit eingesetzten Organismen und verwendeten Plasmide sind in den Tabellen 3 und 4 zusammengefasst. In den entsprechenden Kapiteln sind die Klonierungsschemen der neu konstruierten Plasmide erläutert.

**Tab. 3:** Verwendete Bakterienstämme

<i>Stamm</i>	<i>Eigenschaften: Genotyp/Phänotyp</i>	<i>Referenz/Herkunft</i>
<b><i>Acinetobacter sp.</i></b>		
ADP1 = BD413 (DSM 587)	früher <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , Mutante von BD4 (DSM 586), <i>iso, leu, val</i>	Juni, 1972
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
CC118 $\lambda$ pir	$\Delta(ara-leu)$ , <i>araD</i> , $\Delta lacX74$ , <i>galE</i> , <i>galK</i> , <i>phoA20</i> , <i>thi-1</i> , <i>rpsE</i> , <i>rpoB</i> , <i>argE</i> (Am), <i>recA1</i> , $\lambda$ pir phage lysogen	Herrero <i>et al.</i> , 1990
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15 $\Delta(lacZYA-argF)$ U169 <i>deoR</i> <i>hsdR17</i> <i>supE44</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>thi-1</i> <i>gyrA96</i> $\lambda^-$ <i>relA1</i>	Fa. Gibco Life Technologies, Eggenstein
S17-1	<i>thi pro hddR^- hsdM^+ recA res^- mod^+</i> RP4-2-(Tc::Mu)-(Km::Tn7)	Simon <i>et al.</i> , 1983
HB101	Sm <sup>r</sup> , <i>recA</i> , <i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>leu</i> , <i>hsdR^- M^+</i>	Miller & Mekalanos, 1988
<b><i>Ralstonia eutropha</i></b>		
335 (DSM 531)	Wildtyp, Benzoat <sup>+</sup> , Phenol <sup>+</sup>	Davis <i>et al.</i> , 1969
B9	Mutante von Stamm 335, setzt Benzoat zu Benzoat- <i>cis</i> -1,2-dihydrodiol um	Reiner & Hegeman, 1971
<b><i>Pseudomonas putida</i></b>		
U-JT103	Mutante von Stamm U (DSM 548), setzt Benzoat zu Benzoat- <i>cis</i> -1,2-dihydrodiol um	Morawski <i>et al.</i> , 1997
mt-2	(DSM 3482), TOL Plasmid pWW0, Abbau von Xylol und Methylbenzoaten	Williams & Murray, 1974
KT2442	<i>hsdR</i> , Rif <sup>r</sup>	Herrero <i>et al.</i> , 1990
Idaho	Toluol <sup>+</sup> , <i>m</i> -Xylol <sup>+</sup> , <i>p</i> -Xylol <sup>+</sup> , 1,2,4-Trimethylbenzol <sup>+</sup> , 3-Ethyltoluol <sup>+</sup>	Cruden <i>et al.</i> , 1992
BGXM1	Mutante von Stamm BG1 (DSM 6413), setzt <i>p</i> -Xylol und <i>p</i> -Toluat zu <i>p</i> -Toluat- <i>cis</i> -dihydrodiol um	Whited <i>et al.</i> , 1986



**Tab. 4:** Verwendete Plasmide

<i>Plasmid</i>	<i>Genotyp (Relevante Eigenschaften)</i>	<i>Referenz/Herkunft</i>
pCK05	Ap <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , Trägerplasmid für die Übertragung des mobilen Elementes mini-Tn5 [ <i>upp</i> TOL]	Panke <i>et al.</i> , 1998
pRK2013	Km <sup>r</sup> , Cole1 origin, RK2-Mob <sup>+</sup> RK2-Tra <sup>+</sup> , Helferplasmid für die Übertragung des mobilen Elementes mini-Tn5 [ <i>upp</i> TOL]	Figurski & Helinski, 1979
pCK04AxyIR	Cm <sup>r</sup> , 12 kb- <i>NotI</i> -insert [ <i>upp</i> TOL] mit kompletten “upper-pathway” für Toluol einschließlich Regulatorgen <i>xyIR</i> in pCK01	Panke <i>et al.</i> , 1998
pBBR1MCS	Cm <sup>r</sup> , „broad-host-range“-Vektor, origin pBBR1, Tra <sup>-</sup> , Mob <sup>+</sup> , T3- und T7- Promotor, P <sub>lac</sub> und lacZ'	Kovach <i>et al.</i> , 1994
pBBSG1	Cm <sup>r</sup> , 12 kb- <i>NotI</i> -insert [ <i>upp</i> TOL] aus pCK04AxyIR in <i>EcoRV</i> -Schnittstelle von pBBR1MCS	diese Arbeit
pBBSG2	Cm <sup>r</sup> , 3025-bp-PCR-Produkt von 5`SpebenA und 3`SacbenC aus <i>Acinetobacter</i> sp. ADP1 mit <i>benABC</i> in <i>SpeI/SacI</i> -Schnittstelle von pBBR1MCS	diese Arbeit
pBBSG3	Cm <sup>r</sup> , 12 kb- <i>NotI</i> -insert [ <i>upp</i> TOL] aus pCK04AxyIR in <i>SmaI</i> -Schnittstelle von pBBSG2	diese Arbeit
pBBSG4	Cm <sup>r</sup> , 8140-bp-PCR-Produkt von <i>xyICforPstI_2</i> und <i>benCrevSpeI</i> mit <i>xyICMABbenABC</i> in <i>PstI/SpeI</i> -Schnittstelle von pBBR1MCS	diese Arbeit
pMMB66EH	Ap <sup>r</sup> , „broad-host-range“-Vektor, origin RSF 1010, Tra <sup>-</sup> , Mob <sup>+</sup> , <i>tac</i> -Promotor, <i>lacI<sup>Q</sup></i>	Fürste <i>et al.</i> , 1986
pMMSG5	Ap <sup>r</sup> , pMMB66EH mit zusätzlicher <i>NotI</i> -Schnittstelle in der multiple cloning site	diese Arbeit
pMMSG6	Ap <sup>r</sup> , 12 kb- <i>NotI</i> -insert [ <i>upp</i> TOL] aus pCK04AxyIR in <i>NotI</i> -Schnittstelle von pMMSG5	diese Arbeit
pBluescript II SK(+)	Ap <sup>r</sup> , Derivat von pUC19, P <sub>lac</sub> , lacZ', fl(+)-origin, Cole1 origin	Fa. Stratagene, La Jolla, CA, USA
pBISG7	Ap <sup>r</sup> , 1092-bp-Produkt von <i>forbenC</i> und <i>revbenK</i> aus <i>P. putida</i> U-JT103 Benzoat <sup>+</sup> (Revertante RV) in pBluescript	diese Arbeit
pBISG8	Ap <sup>r</sup> , 1092-bp-Produkt von <i>forbenC</i> und <i>revbenK</i> aus <i>P. putida</i> U-JT103 Benzoat <sup>-</sup> (Nicht-Revertante NRV) in pBluescript	diese Arbeit

## 4.2 Medien und Pufferlösungen

### 4.2.1 Mineralmedien

Für Kultivierungen und Anreicherungen wurde die von Dorn *et al.* (1974) beschriebene Minerallösung mit entsprechender C-Quelle verwendet, wobei zur besseren Stabilisierung des pH-Wertes die Konzentration des Phosphatpuffers verdoppelt wurde (Hartmann *et al.*, 1979):

**Mineralmedium** nach Dorn *et al.* (1974):

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	14	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2	g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,2	g
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	0,05	g
Fe(III)NH <sub>4</sub> -Citrat	0,01	g
Spurenelementlösung SL6	1	ml
H <sub>2</sub> O	ad 1000	ml

**Spurenelementlösung SL6** nach Pfennig und Lippert (1966) ohne EDTA und FeSO<sub>4</sub>:

ZnSO <sub>4</sub>	100	mg
MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	30	mg
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	300	mg
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	200	mg
CuCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	10	mg
NiCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	20	mg
NaMoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	30	mg
H <sub>2</sub> O	ad 1000	ml

Phosphatpuffer, Salze und SL6-Lösung wurden getrennt autoklaviert. Als Kohlenstoffquellen in Flüssigkulturen wurden Toluol, Benzylalkohol, Benzaldehyd, Benzoat, Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol, Phenol, *o*-, *m*-, *p*-Kresol, Salicylat, Succinat, Acetat, Citrat, Fruktose und Glukose eingesetzt. Dabei wurden Toluol, Benzylalkohol und Benzaldehyd direkt als Flüssigkeit zugegeben (sterilfiltriert). Von allen weiteren Substanzen wurden wässrige Stammlösungen angefertigt, die entweder autoklaviert oder sterilfiltriert wurden. Das Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol wurde freundlicherweise von Edina Payer (Fraunhofer Institut für Grenzflächen und Bioverfahrenstechnik, Stuttgart) zur Verfügung gestellt. Es lag in kristalliner Form als Natriumsalz vor. Die Konzentration der Stammlösung wurde photometrisch bestimmt (Reiner & Hegeman, 1971).

( $c = \frac{E}{\epsilon \times d}$  ;  $\epsilon_{\text{Dihydrodiol}} = 3350 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , die Extinktion wurde bei 262 nm bestimmt.)

#### 4.2.2 Komplexmedien

Die Anzucht von *E. coli*-Stämmen erfolgte bei Expressionsversuchen mit LB-Medium und für analytische Plasmidpräparationen mit LB- oder dYT-Medium. Für die *Ralstonia*-Stämme wurde Nutrient Broth Medium (NB) verwendet. Alle weiteren in dieser Arbeit verwendeten Stämme wurden mit LB-Medium kultiviert.

**LB-Medium** („Luria-Bertani“-Medium, modifiziert nach Sambrook *et al.*, 1989):

Trypton	10	g
Hefeextrakt	5	g
NaCl	5	g
H <sub>2</sub> O	ad	1000 ml

**dYT-Medium** (Sambrook *et al.*, 1989):

Trypton	16	g
Hefeextrakt	10	g
NaCl	5	g
H <sub>2</sub> O	ad	1000 ml

**NB-Medium** (Sambrook *et al.*, 1989):

„Nutrient broth“	8	g
NaCl	5	g
H <sub>2</sub> O	ad	1000 ml

Trypton, Hefeextrakt und „Nutrient broth“ wurden von der Fa. Difco (Augsburg) bezogen. Für Selektivmedien wurden nach dem Autoklavieren und Abkühlen des Mediums auf ca. 50 °C die entsprechenden Antibiotika zugegeben. Die Medien wurden mit NaOH oder HCl auf einen pH-Wert von 7,0 - 7,4 eingestellt. Bei festen Nährböden wurde 1,5 % (w/v) Agar (Fa. Difco) zugegeben.

#### 4.2.3 Medienzusätze

Für die Kultivierung von Bakterienstämmen mit Antibiotikaresistenzen wurde Medien das jeweilige Antibiotikum in den in Tab. 5 aufgeführten Konzentrationen zugesetzt. Für *R. eutropha* 335 bzw. B9 und für *P. putida* U-JT103 mussten die einzusetzenden Konzentrationen der jeweiligen Antibiotika aufgrund bereits vorhandener Resistenzen ermittelt werden. Dazu wurden Agarplatten aus Komplexmedium bzw. aus Mineralmedium mit Citrat als C-

Quelle mit verschiedenen Konzentrationen ( $0 - 500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) der jeweiligen Antibiotika hergestellt. Die Kulturen wurden in Komplex- bzw. Mineralmedium ohne Antibiotikum wachsen gelassen und anschließend in verschiedenen Verdünnungsstufen ( $10^0 - 10^9$ ) ausplattiert. Zur Selektion wurde die Konzentration eines Antibiotikums eingesetzt, ab der kein Wachstum mehr beobachtet werden konnte.

**Tab. 5:** Stammlösungen und Arbeitskonzentrationen der verwendeten Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	Arbeitskonzentration ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	
Ampicillin	10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ in 50 % EtOH	100	für <i>E. coli</i>
		300	für <i>R. eutropha</i> 335 und B9
		300	für <i>P. putida</i> U-JT103
Chlor- amphenicol	10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ in $\text{H}_2\text{O}$	10	für <i>E. coli</i> und <i>R. eutropha</i> 335 und B9
		200	für <i>P. putida</i> U-JT103 auf Mineralmedium
		250	für <i>P. putida</i> U-JT103 auf Komplexmedium
Kanamycin (Sulfat)	50 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ in $\text{H}_2\text{O}$	30	für <i>E. coli</i> und <i>P. putida</i> U-JT103
		250	für <i>R. eutropha</i> 335 und B9 auf Mineralmedium
		300	für <i>R. eutropha</i> 335 und B9 auf Komplexmedium

Für die Erkennung von *E. coli*-Kolonien mit rekombinanten pBluescript II SK (+)-Plasmiden bzw. mit rekombinanten „broad-host-range“ pBBR1MCS-Plasmiden wurden auf LB-Agarplatten 40  $\mu\text{l}$  einer 5-Brom-4-chlor-3-indoyl- $\beta$ -D-galaktosid-Lösung (X-Gal, 20  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , gelöst in Dimethylformamid) und 4  $\mu\text{l}$  einer Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galaktosid-Lösung (IPTG, 1 M, sterilfiltriert) gleichmäßig verteilt („Blau-Weiß-Selektion“). Im Falle der Rekombination kann die  $\alpha$ -Komplementation nicht mehr erfolgen, da der N-Terminus für das  $\alpha$ -Peptid der  $\beta$ -Galaktosidase durch die Insertion nicht mehr funktionsfähig ist. Die Kolonien erscheinen weiß, da das chromogene Substrat X-Gal nicht mehr umgesetzt werden kann. Bakterien, die eine funktionelle  $\beta$ -Galaktosidase produzieren, sind an ihrer blauen Farbe zu erkennen. IPTG induziert die Expression der *lacZ*-Gene.

### 4.3 Stammerhaltung

Für kürzere Zeiträume wurden die Bakterienstämme auf Agarplatten bei 4 °C aufbewahrt. Die Stammerhaltung der *E. coli*-Stämme erfolgte auf LB-Agarplatten, wobei bei plasmidtragenden Stämmen die jeweiligen Antibiotika in den in Tab. 5 aufgelisteten Konzentrationen zuge-

setzt wurden. Die Aufbewahrung der *Ralstonia*-Stämme erfolgte auf NB-Agarplatten; alle weiteren Stämme (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*) wurden auf LB-Agarplatten gelagert. Transkonjuganten von *R. eutropha* 335 oder B9 und von *P. putida* U-JT103 wurden auf Mineralmedium mit 10 mM Citrat als Kohlenstoffquelle und dem jeweiligen Antibiotikum aufbewahrt. Die Stämme wurden alle ein bis zwei Monate auf Agarplatten, die das jeweilige Selektivmedium enthielten, neu ausgestrichen.

Zur Langzeitlagerung wurde 0,5 ml Flüssigkultur mit 0,5 ml sterilem Glycerin in Kyroröhrchen (Fa. Nunc, Roskilde, Dänemark) vermischt. Anschließend wurde das Röhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Plasmide wurden als DNA-Präparation bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

#### 4.4 Kultivierung der Bakterien und Zellernte

##### 4.4.1 Anzucht und Zellernte von *E. coli*-Stämmen

Ausgehend von *E. coli*-Einzelkolonien wurden für Plasmidisolierungen 4 ml LB- oder dYT-Medium in Reagenzgläsern mit den entsprechenden Antibiotika angeimpft. Für die Konjugationsexperimente wurden die Stämme, die als Donoren dienen sollten, in 100-ml-Schikanenkolben mit 20 ml LB-Medium und den entsprechenden Antibiotika kultiviert. Die Inkubation erfolgte 8 h bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  oder über Nacht auf einer Schüttelmaschine (RFI-125, Fa. Infors, Bottmingen, Schweiz) bei ca. 130 Upm.

Zur Expression von rekombinanten Genen in *E. coli* wurden 180 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika mit 20 ml einer gleichbehandelten Vorkultur angeimpft und in einem 1-l-Schikanenkolben bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Bei einer optischen Dichte ( $\text{OD}_{546\text{nm}}$ ) von 0,4 - 0,6 wurde der Kultur 0,4 mM IPTG bzw. 0,19 mmol Toluol [entspr. 0,01 % (v/v), wenn die Menge komplett in der Flüssigphase gelöst wäre; siehe Kapitel 4.14] zugegeben. Die Kultur wurde weitere 3 - 6 h bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 5000 Upm bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  20 min abzentrifugiert (Zentrifuge Sigma 3K-1) und für die Umsatzversuche vorbereitet (siehe Kapitel 4.8).

##### 4.4.2 Anzucht und Zellernte von *Ralstonia*- und *Pseudomonas*-Stämmen

Die als Konjugationsrezipienten eingesetzten *Ralstonia*- und *Pseudomonas*-Stämme wurden in 100-ml-Schikanenkolben mit 20 ml LB-Medium kultiviert. Die Kulturen wurden 8 h lang

bei 30 °C auf einem Rotationsschüttler (RC-406, Fa. Infors, Bottmingen, Schweiz) bei ca. 100 Upm inkubiert.

Zur Expression von rekombinanten Genen in *Ralstonia* bzw. in *Pseudomonas* wurden 180 ml Mineralmedium mit 10 mM Fruktose bzw. Glukose als Kohlenstoffquelle und mit den entsprechenden Antibiotika mit 20 ml einer gleichbehandelten Vorkultur angeimpft und in einem 1-l-Schikanenkolben bei 30 °C inkubiert. Bei einer optischen Dichte ( $OD_{546nm}$ ) von 0,4 - 0,6 wurden den Kulturen 0,01 % (v/v) Benzylalkohol bzw. 0,19 mmol Toluol [entspr. 0,01 % (v/v), wenn die Menge komplett in der Flüssigphase gelöst wäre; siehe Kapitel 4.14], 2 mM Benzoat oder 0,4 mM IPTG zur Induktion zugesetzt. Die Kolben waren mit einem Lochdeckel mit einem Septum verschlossen, durch das mit Hilfe einer Einwegspritze (Fa. Braun, Melsungen) Proben zur Bestimmung der OD-Werte entnommen werden konnten. Ein Teil der entnommenen Probe wurde 3 min bei 14000 Upm zentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge Modell 5417C) und der Überstand mittels HPLC analysiert (nicht im Falle der Proben mit IPTG als Induktor). So konnte die Abnahme des Induktors während des Wachstums verfolgt werden. Sobald der Induktor nicht mehr nachweisbar war, wurden die Zellen mit 5000 Upm 20 min bei 4 °C abzentrifugiert (Zentrifuge Sigma 3K-1). Die Zellen wurden dann entweder für Enzymtests aufgeschlossen (siehe Kapitel 4.10) oder in Ruhezelleexperimenten (siehe Kapitel 4.8) eingesetzt. Im Falle von IPTG als Induktor erfolgte die Zellernte 3 h nach Zugabe des Induktors. Bei Wachstumsversuchen ohne Analyse des Kulturüberstandes wurden die Bakterien in 100-ml-Schikanenkolben mit Klettansatz kultiviert, um die optische Dichte ohne Probeentnahme bestimmen zu können (siehe Kapitel 4.5).

#### 4.4.3 Anzucht von *P. putida* U\_TP10 im Bioreaktor

Fedbatch-Experimente wurden in einem Fermenter (Modell Labfors, Fa. Infors, Bottmingen, Schweiz) mit max. 2 l Arbeitsvolumen durchgeführt. Das Gerät war mit einer Mess- und Regeleinheit ausgestattet, welche die Überwachung von Rührerdrehzahl, Temperatur, pH-Wert,  $pO_2$ -Konzentration und Schaumbildung ermöglichte. Die Temperatur (30 °C) und der pH-Wert (7,2) des Mediums wurden mit Hilfe der Regeleinheit konstant gehalten. Die Rührerdrehzahl und die Luftzufuhr wurden während des Experiments so verändert, dass eine Gelöstsauerstoffkonzentration von über 50 % (Luftsättigung) erhalten blieb (300 - 1500 Upm, 20 - 150 l·h<sup>-1</sup>). Als Antischaummittel wurde Antifoam A (Fa. Sigma, Deisenhofen) verwendet. Die Messung des Gelöstsauerstoffs erfolgte durch eine polarographische  $O_2$ -Elektrode (Typ InPro 6100/220/S/P, Fa. Mettler-Toledo, Greifensee, Schweiz). Der pH-Wert wurde mit-

tels einer kombinierten pH-Elektrode (Typ 405-DPAS-SC-K8S/225, Fa. Mettler-Toledo) bestimmt. Zur Messung der Schaumbildung wurde eine Antischaumsonde (Fa. Infors) eingesetzt.

Die Kultivierung der Transkonjugante *P. putida* U\_TP10 erfolgte nach der Methode der Hochzell-dichtefermentation (Wilms *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 1996; Bunch, 1994).

### Medienzusammensetzung:

**Batch-Medium** (V = 800 ml):

Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,0	g·l <sup>-1</sup>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,7	g·l <sup>-1</sup>
NH <sub>4</sub> Cl	0,5	g·l <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14,6	g·l <sup>-1</sup>
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	3,6	g·l <sup>-1</sup>
H <sub>2</sub> O	ad 800	ml

Die Lösung wurde mit dem Fermenter autoklaviert. Nach Abkühlen Zugabe von:

MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,5	g·l <sup>-1</sup>
„trace element solution“	3	ml·l <sup>-1</sup>
Glukose	5	g·l <sup>-1</sup>
Inokulum	200	ml

**Zulauf-Medium** (V = 600 ml):

Feed 1 (V = 480 ml):

Glukose	220,0	g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	11,3	g
„trace element solution“	57,6	ml

Feed 2 (V = 120 ml):

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	47,52	g, pH 7,0
--	-------	-----------

Die Zugabe von Feed 1 und Feed 2 während der Fermentation erfolgte immer im gleichen Verhältnis (Zugabe von 1 ml entsprach 0,75 ml Feed 1 und 0,25 ml Feed 2). Die Lösungen wurden sterilfiltriert (VacuCap60, Ø 0,2 µm, Fa. Gelman Sciences, Ann Arbor, MI, USA).

„trace element solution“ (TES):

CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,5	g
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,18	g
MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	0,1	g
Na <sub>2</sub> EDTA	10,05	g
FeCl <sub>3</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	8,35	g
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,16	g
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,18	g
H <sub>2</sub> O	ad 1000	ml

### Kultivierung:

Für die Fermentation wurde eine Einzelkolonie im 100-ml-Schikanenkolben mit 20 ml Mineralmedium (siehe Kapitel 4.2.1), 10 mM Glukose und 30 µg·ml<sup>-1</sup> Kanamycin 18 h bei 30 °C auf einem Rotationsschüttler (RC-406, Fa. Infors, Bottmingen, Schweiz) bei ca. 100 Upm kultiviert. Die gewachsene Kultur wurde 1:100 in einen 1-l-Schikanenkolben mit 200 ml Mineralmedium mit Kanamycin und 10 mM Glukose überimpft und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Diese Kultur wurde am nächsten Morgen als Inokulum für die Fermentation verwendet. Das Batchvolumen betrug 1 l (mit Inokulum), das Zulaufvolumen betrug maximal 0,6 l. Die Zulaufrate für Glukose, Stickstoff und Magnesium wurde nach folgender Gleichung berechnet (Wilms *et al.*, 2001):

$$F(t) = \mu \times \frac{C_{X0} \times V_0}{C_S \times Y_{X/S}} \times e^{\mu \times t}$$

F(t):	Zulaufrate (l·h <sup>-1</sup> )
μ:	gewünschte Wachstumsrate (h <sup>-1</sup> )
C <sub>X0</sub> :	Biomassekonzentration vor Zulaufstart (g·l <sup>-1</sup> )
V <sub>0</sub> :	Volumen vor Zulaufstart (l)
C <sub>S</sub> :	Glukosekonzentration in der Zulauflösung (g·l <sup>-1</sup> )
Y <sub>X/S</sub> :	Spezifischer Ausbeutekoeffizient (g·g <sup>-1</sup> )
t:	Zeit nach Zulaufstart (h)

Somit konnte die Glukosekonzentration für eine bestimmte Zulaufmenge und eine gewünschte Biomassekonzentration gegen Ende des Fedbatches berechnet werden (für weitere Details des experimentellen Ablaufs siehe Kapitel 5.11.1).

Nach Ablauf der Fermentation wurden die Zellen 20 min bei 6000 Upm (Rotor JA 10, Zentrifuge Avanti™ J-25, Fa. Beckman Coulter, Fullerton, USA) und 4 °C abzentrifugiert. Die Zel-



len wurden entweder direkt für Ruhezelleexperimente eingesetzt oder in einer 30 %igen Glycerin-Pufferlösung schockgefroren und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 4.5 Messung des Bakterienwachstums

Das Bakterienwachstum wurde durch Messung der optischen Dichte der Zellsuspension bei 546 bzw. 600 nm bei einer Schichtdicke von 1 cm photometrisch bestimmt (Uvikon 941 Plus, Fa. Kontron, Eching). Als Blindwert diente der Kulturüberstand nach dem Zentrifugieren. Bei Werten über 0,5 wurden die Proben mit Na/K-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,2) bzw. mit LB-Medium entsprechend verdünnt.

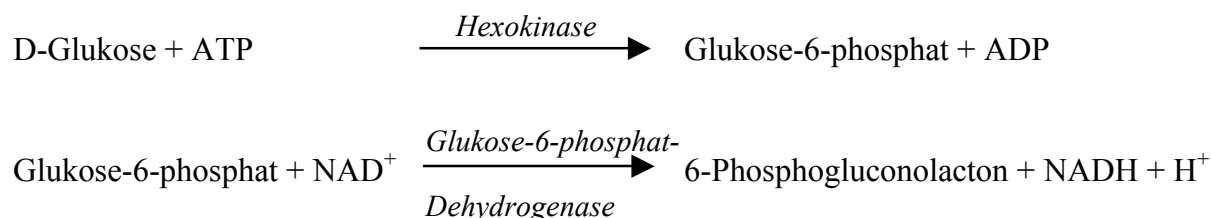
Die optische Dichte von Kulturen, die aufgrund der Flüchtigkeit des Substrates in Schikanenkolben mit Klettansatz kultiviert wurden, wurde im Klettphotometer (Modell 800-3, Fa. Klett MFG. CO. N.Y., USA) bestimmt. Die Messung erfolgte gegen Na/K-Phosphatpuffer oder gegen LB-Medium.

#### 4.6 Trockengewichtsbestimmung

Es wurde das Trockengewicht in Abhängigkeit der optischen Dichte bestimmt. Im Falle von *P. putida* U-JT103 wurde während einer Hochzelllichtfermentation zu verschiedenen Zeitpunkten Probe entnommen, die optische Dichte bestimmt und anschließend 10 ml der Bakteriensuspension in zuvor ausgewogene Reagenzgläser überführt, abzentrifugiert (15 min, 5000 Upm,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , Zentrifuge Sigma 3K-1) und die Überstände verworfen. Nach Waschen mit einer 0,85 %igen (w/v) NaCl-Lösung wurden die Zellsuspensionen erneut abzentrifugiert, zur Bestimmung der Biofeuchtmasse gewogen und anschließend das Pellet bei  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$  24 h lang getrocknet. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde die Gewichtszunahme der Zentrifugengläser mit der Feinwaage bestimmt. Für jeden Ansatz wurden drei Bestimmungen durchgeführt. Zur Bestimmung des Trockengewichts von *R. eutropha* B9 bzw. *E. coli* DH5 $\alpha$  wurden die Zellen in Mineralmedium mit Fruktose bzw. in LB-Medium in mehreren 3-l-Schikanenkolben kultiviert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden 200 ml Bakteriensuspension aus jeweils einem Ansatz abzentrifugiert (10 min, 5000 Upm,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , Zentrifuge Sigma 3K-1), in 10 ml 0,85 %iger (w/v) NaCl-Lösung resuspendiert, in zuvor ausgewogene Reagenzgläser überführt, abzentrifugiert (15 min, 5000 Upm,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , Zentrifuge Sigma 3K-1), die Überstände verworfen und das Pellet bei  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$  24 h lang getrocknet.

#### 4.7 Bestimmung von D-Glukose

Die Konzentration von D-Glukose wurde mit einem enzymatischen Test bestimmt. Der Test beruht auf folgenden Reaktionen:



Die Bildung von NADH wurde photometrisch durch die Extinktionszunahme bei 340 nm ( $\epsilon_{340 \text{ nm}} = 6230 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) gemessen. Der Testansatz enthielt in 1 ml:

Tris-HCl (pH 7,5)	300	mM
MgSO <sub>4</sub>	5	mM
ATP	1	mM
NAD <sup>+</sup>	1	mM
Probe	< 0,5	mM
Hexokinase	30	Units
Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase	50	Units

Vor Zugabe der Enzymlösung mit Hexokinase (aus Hefe, 1500 U·ml<sup>-1</sup>, Fa. Roche, Mannheim) und Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (aus *Leuconostoc mesenteroides*, 1000 U·ml<sup>-1</sup>, Fa. Roche) wurde die Extinktion bei 340 nm bestimmt. Nach Starten der Reaktion durch Zugabe der Enzymlösung wurden die Küvetten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Die Messungen wurden in Abständen von 10 min solange durchgeführt, bis die Extinktion bei 340 nm konstant blieb. Ermittelt wurde die Differenz zwischen E<sub>340</sub> bei Ende der Reaktion und E<sub>340</sub> vor Zugabe der Enzyme. Die Glukosekonzentration der Proben wurde mit Hilfe einer zuvor erstellten Kalibriergeraden (D-Glukose-Standards 0 - 0,5 mM) bestimmt.

#### 4.8 Ruhezelleexperimente

Für Ruhezelleexperimente wurden die durch Zentrifugation geernteten Bakterienzellen in Na/K-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,2) resuspendiert, nochmals abzentrifugiert und mit dem gleichen Puffer auf die gewünschte optische Dichte eingestellt. Die Umsätze wurden in 365-ml-Schikanenkolben mit Klettansatz und einem Volumen von 50 ml für die wässrige Phase durchgeführt. Die Zugabe von flüchtigen Substanzen erfolgte mit Hilfe einer gasdichten Glaspritze (Unimetrics, Fa. SGE, Darmstadt) über eine seitlich am Glasgefäß angebrachte Probenentnahmestelle, die mit einem Septum abgedichtet war. Damit eine Gleichgewichtseinstellung schwer löslicher Substanzen zwischen wässriger und gasförmiger Phase gewährleistet war, wurden die Kolben zunächst ohne Zellen mit 45 ml Na/K-Phosphatpuffer und der jeweiligen Substanz 1 h bei 30 °C und 100 Upm (RC-406, Fa. Infors, Bottmingen, Schweiz) inkubiert (siehe Kapitel 4.14). Die Zellzugabe erfolgte mit Hilfe von sterilen 5-ml- oder 10-ml-Einwegspritzen (Fa. Braun, Melsungen) über das Septum. Anschließend wurden die Kolben weiterhin bei 30 °C und 100 Upm inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden mit sterilen 1-ml-Einwegspritzen ca. 0,5 ml Probe entnommen, 3 min bei 14000 Upm (Eppendorf-Tischzentrifuge Modell 5417C) zentrifugiert und die Überstände mittels HPLC analysiert. Die Ruhezellumsätze mit nicht-flüchtigen Substanzen wurden gleich behandelt.

#### 4.9 Biuret-Proteinbestimmung mit ganzen Zellen

Der Proteingehalt ganzer Zellen wurde nach der Methode von Schmidt *et al.* (1963) in modifizierter Form bestimmt. Dazu wurden zu 1 ml unverdünnter bzw. mit H<sub>2</sub>O verdünnter Zellsuspension 100 µl NaOH (4 M) gegeben und 20 min bei 100 °C aufgeschlossen. Nach Abkühlung im Wasserbad auf Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von 400 µl Biuret-Reagenz (0,625 g K/Na-Tartrat, 0,125 g CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O, 0,313 g KJ und 0,5 g NaOH in 50 ml H<sub>2</sub>O gelöst). Die Ansätze wurden gut durchmischt und für 20 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurden sie zentrifugiert (3 min, 14000 Upm, Eppendorf-Tischzentrifuge Modell 5417C) und die Extinktion des Überstandes bei 546 nm gegen einen proteinfreien Ansatz bestimmt. Die Kalibrierung erfolgte mit Rinderserumalbumin-Lösungen (Fa. Merck, Darmstadt).

#### 4.10 Herstellung zellfreier Extrakte

Zur Herstellung von Rohextrakten wurden gewaschene Zellen in einem möglichst kleinen Volumen Na/K-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,2) aufgenommen. Der Aufschluss erfolgte in einer vorgekühlten Zelle einer French-Press bei 1000 MPa und dreimaligem Durchgang (Fa. Aminco, SLM Instruments Inc., Urbana, USA). Die erhaltenen Zellhomogenisate wurden 45 min bei 35000 Upm und 4 °C mit einer Ultrazentrifuge (Rotor Ti 50, Zentrifuge Optima™ LE-80K, Fa. Beckman) von Zellen und Zelltrümmern befreit. Der Überstand wurde zur Bestimmung von Enzymaktivitäten verwendet.

#### 4.11 Proteinbestimmung nach Bradford

Proteinbestimmungen in zellfreien Extrakten wurden mit dem Farbstoff Coomassie-Brillantblau G250 (Fa. Merck, Darmstadt) nach der Methode von Bradford (1976) durchgeführt. Kalibriergeraden im Bereich von 0 - 0,25 mg·ml<sup>-1</sup> wurden mit Rinderserumalbumin (Fa. Merck, Darmstadt) erstellt. Für die Messung wurden zu 1 ml Reagenz 100 µl Proteinlösung gegeben. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen. Als Nullwert dienten 100 µl des jeweils verwendeten Puffers in 1 ml Reagenz.

#### 4.12 Bestimmung von Enzymaktivitäten

Enzymaktivitäten wurden photometrisch in einem Spektralphotometer (Uvikon 941 Plus, Fa. Kontron, Eching) bestimmt. Die Messungen wurden in Einwegküvetten (≥ 340 nm) oder in Quarzküvetten (< 340 nm) mit einer Schichtdicke von 1 cm bei konstanter Wellenlänge und 25 °C durchgeführt. Eine Enzymeinheit (U) wird definiert als die Aktivität, die den Umsatz von 1 µmol Substrat bzw. die Bildung von 1 µmol Produkt in einer Minute katalysiert. Die spezifische Aktivität wird in Enzymeinheiten pro Milligramm oder Gramm Protein angegeben. Es wurde angestrebt, die Aktivitäten im Bereich linearer Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der eingesetzten Enzymmenge zu ermitteln. Mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon$  eines Substrates oder Produktes einer Enzymreaktion lässt sich die volumetrische Enzymaktivität (EA) folgendermaßen berechnen:

$$EA (U \cdot ml^{-1}) = \frac{\Delta E / \Delta t (min^{-1}) \times \text{Küvettenvolumen (ml)} \times 1000}{\text{Probenvolumen (ml)} \times \varepsilon (M^{-1} \times cm^{-1}) \times \text{Schichtdicke (cm)}}$$

#### 4.12.1 Toluat- bzw. Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase

Die Aktivität der Toluat- bzw. Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase wurde nach Reiner (1972) bestimmt. Der Ansatz enthielt in einem Volumen von 1 ml:

Tris-HCl (pH 8,0)	20	mM
Benzoat- <i>cis</i> -1,2-dihydrodiol	1	mM
NAD <sup>+</sup>	1	mM
Rohextrakt	10-100	μl

Die Reaktion wurde durch Zugabe des zellfreien Extraktes gestartet. Gemessen wurde die NADH-Zunahme bei 340 nm und 25 °C. Der molare Extinktionskoeffizient für NADH beträgt  $6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Das Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol lag als Natriumsalz in fester Form vor und wurde freundlicherweise von Edina Payer (Fraunhofer Institut für Grenzflächen und Bioverfahrenstechnik, Stuttgart) zur Verfügung gestellt. Die Konzentration der Stammlösung wurde vor Zugabe zu den Ansätzen photometrisch bestimmt (Reiner & Hegeman, 1971).

( $c = \frac{E}{\epsilon \times d}$  ;  $\epsilon_{\text{Dihydrodiol}} = 3350 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , die Extinktion wurde bei 262 nm bestimmt)

#### 4.12.2 Brenzcatechin-2,3-Dioxygenase

Der Reaktionsansatz enthielt verändert nach Nozaki (1970) in einem Volumen von 1 ml:

Na/K-Phosphatpuffer (pH 7,0)	50	mM
Brenzcatechin	0,1	mM
Rohextrakt	5-50	μl

Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe des Rohextraktes. Es wurde die Extinktionszunahme des Produkts 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd bei 375 nm bestimmt. Der molare Extinktionskoeffizient für das Produkt beträgt  $36000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (Sala-Trepat & Evans, 1971).

### 4.12.3 Brenzcatechin-1,2-Dioxygenase

Die Aktivität der Brenzcatechin-1,2-Dioxygenase wurde verändert nach Hegeman (1966) durchgeführt. Der Ansatz enthielt in einem Volumen von 1 ml:

Na/K-Phosphatpuffer (pH 7,0)	50	mM
Na <sub>2</sub> EDTA	1	mM
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,09	% (v/v)
Brenzcatechin	0,1	mM
Rohextrakt	5-50	µl

Die Reaktion wurde durch Zugabe von zellfreiem Extrakt gestartet. Es wurde die Extinktionszunahme des Produkts *cis,cis*-Muconat bei 260 nm bestimmt. Um eine Weiterreaktion des *cis,cis*-Muconats durch die Muconat-Cycloisomerase zu verhindern, enthielt der Testansatz EDTA. Durch die Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sollte eine mögliche Aktivität der Brenzcatechin-2,3-Dioxygenase unterdrückt werden (Nakazawa & Yokota, 1973). Der molare Extinktionskoeffizient für das Produkt *cis,cis*-Muconat beträgt 16800 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup> (Dorn & Knackmuss, 1978).

### 4.13 Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Zur Analyse von Substanzgemischen mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) stand folgendes System zur Verfügung:

Pumpen:	Modell 510 (Fa. Waters, Milford, USA)
Pumpenkontrollmodul:	(Fa. Waters)
Detektor:	Photodiode Array Detector 996 (Fa. Waters)
Handinjektionsventil:	7125 (Fa. Rheodyne)
Automatischer Probengeber:	717 plus (Fa. Waters)
Steuerungs- und Auswertungs- Software:	„Millenium 32 Chromatography Manager Version 3.05“

Die qualitative und quantitative Analyse von Substanzgemischen erfolgte durch Reversed-Phase-Chromatographie mit einer Grom-Sil C8-Säule (Partikeldurchmesser 5 µm, Säulenmaße 125 x 4 mm, Fa. Grom, Herrenberg) mit entsprechender Vorsäule (20 x 4 mm, Fa. Grom). Die Flussrate lag bei 1 ml·min<sup>-1</sup> und das Injektionsvolumen betrug 10 µl. Die Detektion der aufgetrennten Verbindungen erfolgte bei 210 und 260 nm. Die Fließmittel wurden vor

Gebrauch durch einen Filter mit 0,45  $\mu\text{m}$  Porengröße (Fa. Millipore, Eschborn) filtriert und entgast. Zur Analyse wurde der in Tab. 6 beschriebene Fließmittelgradient mit steigender Methanolkonzentration eingesetzt. Die Retentionsvolumina der untersuchten Verbindungen sind in Tab. 7 zusammengefasst.

**Tab. 6:** Fließmittel-Gradient zur Reversed-Phase-Chromatographie der Metabolite der Toluoloxidation

Zeit (min)	Fließmittel A	Fließmittel B
0 - 3,30	15 %	85 %
3,31 - 5,00	30 %	70 %
5,01 - 16,00	50 %	50 %
16,01 - 23,00	15 %	85 %

Die Steigerung des Methanolanteils im Fließmittel erfolgte stufenweise. Zusammensetzung der verwendeten Fließmittel: A: 100 % Methanol. B: 99,5 % (v/v)  $\text{H}_2\text{O}$  plus 0,5 % (v/v)  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Die Flussrate betrug  $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Als stationäre Phase wurde eine Grom-Sil C8-Fertigsäule (Partikeldurchmesser 5  $\mu\text{m}$ , Maße 125 x 4 mm, Fa. Grom, Herrenberg) mit entsprechender Vorsäule (20 x 4 mm) verwendet.

**Tab. 7:** Retentionsvolumina der zu analysierenden Metabolite der Toluoloxidation

Metabolit	Retentionsvolumen (ml)
Benzoessäure- <i>cis</i> -1,2-dihydrodiol	2,2
Brenzcatechin	4,0
<i>cis,cis</i> -Muconsäure	5,3
Phenol	7,8
Benzylalkohol	8,6
Benzaldehyd	11,3
<i>o</i> -, <i>m</i> -, <i>p</i> -Kresol	11,6
Benzoessäure	11,9
Salicylsäure	12,4
Toluol	17,0

Als stationäre Phase wurde eine Grom-Sil C8-Fertigsäule (Partikeldurchmesser 5  $\mu\text{m}$ , Maße 125 x 4 mm, Fa. Grom, Herrenberg) mit entsprechender Vorsäule (20 x 4 mm) verwendet. Die Flussrate betrug  $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Es wurde das in Tab. 6 zusammengefasste Fließmittel-Gradientenprogramm verwendet. Die Detektion der getrennten Substanzen erfolgte bei 210 und 260 nm.

#### 4.14 Bestimmung von Toluol

Toluol ist in Wasser relativ schwer löslich ( $0,5 - 0,627 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  bei  $25^\circ\text{C}$ ; Mackay & Shiu, 1981) und bildet in einem wässrigen Puffersystem eine zweite Phase, falls die Konzentration über der Löslichkeitsgrenze liegt. In den Ruhezellexperimenten (siehe Kapitel 4.8) wurde nur die Toluolkonzentration in der wässrigen Phase mittels HPLC ermittelt. Beim Ansetzen von Standardlösungen wurden gasdichte Gefäße (Serumbottles mit Teflonsepten) benutzt, in denen es möglich war, Toluolstandards in Methanol ohne Gasphase herzustellen. Für die Messungen dieser Toluolstandards mittels HPLC wurden die Vials mit minimaler Gasphase befüllt, und die Gefäße mit Teflonsepten verschlossen. Auch nach Standzeiten von drei Stunden konnten keine Verluste in der zu messenden Toluolkonzentration in der wässrigen Phase festgestellt werden. Es wurde aber trotzdem versucht, die vorbereiteten Toluolproben innerhalb einer Stunde zu analysieren.

Da die Toluolmenge in der Gasphase nicht gemessen wurde, musste diese berechnet werden. Dazu wurde zunächst die Verteilung von Toluol zwischen der Gasphase und der Flüssigphase im vorhandenen Phosphatpuffer-Toluol-System (50 ml Flüssigphase zu 315 ml Gasphase) bestimmt:

$$K_H = \frac{C_G}{C_F}$$

$K_H$ : dimensionsloser Henry-Koeffizient (0,27 bei  $25^\circ\text{C}$  in  $\text{H}_2\text{O}$ ; Schwarzenbach *et al.*, 1993)

oder berechnet mit

$$K_H = \frac{H_C}{RT}$$

$H_C$ :  $0,673 \text{ kPa}\cdot\text{m}^3\cdot\text{mol}^{-1}$  ( $25^\circ\text{C}$  in  $\text{H}_2\text{O}$ ; Mackay & Shiu, 1981)

$R$ :  $8,314 \text{ Pa}\cdot\text{m}^3\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$

$T$ :  $298 \text{ K}$

$C_G$ : Toluolkonzentration in der Gasphase ( $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ )

$C_F$ : Toluolkonzentration in der Flüssigphase ( $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ )

Mit einer maximalen Toluolkonzentration von  $0,627 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  ( $6,8 \text{ mM}$ ) in der Flüssigphase  $C_F$  berechnet sich mit dem dimensionslosen Henry-Koeffizienten  $K_H$  die Toluolkonzentration in der Gasphase  $C_G$  zu  $0,169 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  ( $1,8 \text{ mM}$ ). In einem System mit 50 ml Flüssigphase und



315 ml Gasphase verteilen sich bei Sättigung somit 0,34 mmol Toluol in der wässrigen Phase und 0,57 mmol in der Gasphase. Das bedeutet mittels HPLC ist nur etwa ein Drittel der im System enthaltenen Toluolmenge messbar. Werden dem System Toluolmengen  $> 0,91$  mmol [entspr.  $> 0,2$  % (v/v), wenn die Menge komplett in der Flüssigphase gelöst wäre] zugegeben, so bildet sich ein Zweiphasensystem aus. Die Versuche wurden in der Regel in Na/K-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,2) bei 30 °C durchgeführt. Dies wurde bei den Berechnungen nicht berücksichtigt.

Die Berechnungen gelten zudem nur unter der Annahme, dass sich ein Gleichgewicht zwischen der wässrigen Phase und der Gasphase eingestellt hat. Die Einstellung des Gleichgewichts wurde in einem System mit 50 ml Na/K-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,2) und einem Gasvolumen von 270 ml bei 30°C untersucht (Payer, 2002). Unter diesen gegebenen Bedingungen dauerte es maximal 30 Minuten bis das Gleichgewicht von Toluol zwischen der wässrigen Phase und der Gasphase eingestellt war, wenn Toluol über die Gasphase eingetragen wurde. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass keine Diffusionslimitierungen von Toluol in der Gasphase auftraten.

Somit wurden die Konzentrationen von Toluol in der Gasphase mit Hilfe der gemessenen Konzentrationen in der Flüssigkeit berechnet. In den Diagrammen sind die ermittelten Stoffmengen von Toluol im System so angegeben, als ob sich alles Toluol in der Flüssigphase und nichts in der Gasphase befände.

Ein weiteres Problem bei der Toluolmessung war die Probenaufbereitung bei den Ruhezellumsätzen. Hier mussten die Proben zunächst von den Zellen durch Zentrifugation abgetrennt werden. Zudem ist zu berücksichtigen, dass ein gewisser Teil des Toluols in der Membran der Zellen eingelagert wird. Die Toluolmessungen aus der wässrigen Phase sind somit mit einem gewissen Fehler behaftet. Um die Probenaufarbeitung mit zu berücksichtigen, wurden Toluolstandards mit dem oben beschriebenen Toluol-Puffer-System ohne Zellen angefertigt. Die Proben wurden ebenfalls zunächst zentrifugiert. Die zugegebenen Mengen von Toluol im System wurden so angegeben, als ob sich alles Toluol in der Flüssigphase und nichts in der Gasphase befände. Somit stand ein relativer Standard zur Verfügung. Zur Bilanzierung der Produktausbeute wurde als Bezugsgröße die Menge an zugegebenem Toluol verwendet.

Teilweise wurde bei Zellkultivierungen die Abnahme des Induktors Toluol während des Wachstums bestimmt. Das System bestand dabei aus 200 ml wässriger Phase und 850 ml Gasphase (siehe Kapitel 4.4.1 und 4.4.2). Auch hier wurde nur die Toluolkonzentration in der

wässrigen Phase bestimmt und die Toluolkonzentration in der Gasphase mit dem Henry-Koeffizienten berechnet (siehe oben).

#### 4.15 Isolierung und Reinigung von DNA

##### Genomische DNA:

Die Isolierung genomischer DNA wurde nach der Methode von Ausubel *et al.* (1987) durchgeführt. Dazu wurden die Bakterienstämme in 10 ml Komplexmedium 15 - 20 h lang bei 30 °C kultiviert. Von der gewachsenen Kultur wurden 2 ml abzentrifugiert (2 min, 14000 Upm, Eppendorf-Tischzentrifuge Modell 5417C) und das Pellet in 567 µl TE 10.1-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8,0) resuspendiert. Anschließend wurden 30 µl 10 %iges (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) und 3 µl Proteinase K (20 mg·ml<sup>-1</sup>) zugegeben, gemischt und 1 h bei 37°C inkubiert. Die klar gewordene Lösung wurde mit 100 µl NaCl (5 M) vermischt und nach Zusatz von 80 µl einer *N*-Cetyl-*N,N,N*-trimethylammoniumbromid/NaCl-Lösung [5 % (w/v) CTAB in 0,7 M NaCl] 10 min bei 65 °C inkubiert. Um die präzipitierten CTAB-Komplexe zu entfernen, wurde einmal mit 750 µl eines Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches [24:1 (v/v)] und einmal mit 500 µl eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches [25:24:1 (v/v/v)] extrahiert. Die Phasen wurden jeweils durch Zentrifugation (5 min bei 14000 Upm) voneinander getrennt. Die wässrige Phase wurde in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt. Durch Zugabe von Isopropanol (0,6-faches Volumen des Überstandes) wurde die DNA bei Raumtemperatur gefällt. Nach Zentrifugation (5 min bei 14000 Upm) wurde das pelletierte DNA-Präzipitat mit 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen und anschließend in einer Vakuumkonzentrierzentrifuge (Power Heater Con-1000, Fa. Froebel, Lindau) 2 min lang getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 100 µl TE 10.1-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8,0) resuspendiert. Nach beendeter Präparation wurde zusätzlich noch eine RNase-Behandlung durchgeführt. Dazu wurde die DNA-Präparation für 15 min bei 37 °C mit 1 µl RNase (10 mg·ml<sup>-1</sup>, DNase-frei) inkubiert. Zur Reinigung wurde eine erneute DNA-Fällung durchgeführt (siehe letzter Absatz). Die isolierte DNA wurde bei 4 °C gelagert.

Für die schnelle Gewinnung genomischer DNA für PCR-Reaktionen wurde eine große Einzelkolonie oder entsprechendes Material mehrerer Kolonien mit der Impföse von der Agarplatte in 30 - 50 µl sterilem Wasser suspendiert. Der Ansatz wurde 5 min bei 100 °C erhitzt, und die Zelltrümmer anschließend durch Zentrifugation (5 min bei 14000 Upm, Eppen-

dorf-Tischzentrifuge Modell 5417C) entfernt. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorf-Cup überführt und direkt für die PCR-Reaktionen eingesetzt.

**Plasmid-DNA:**

Für die Präparation von Plasmiden aus *E. coli* bzw. aus den Transkonjuganten der *Ralstonia*- und *Pseudomonas*-Stämme wurden der „Flexiprep-Kit“ und der „GFX™ Micro Plasmid Prep Kit“ der Fa. Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden) sowie der „Quiaprep Spin Miniprep Kit“ der Fa. Qiagen (Hilden) verwendet. Alle Schritte für die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgten nach Anweisung des Herstellers. Die DNA wurde in 30 - 50 µl Wasser oder TE 10.01-Puffer (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8,0) aufgenommen. Die Plasmidpräparationen wurden bei -20 °C gelagert.

**DNA-Fällung:**

Zur Aufreinigung genomischer DNA-Präparationen sowie zur Aufkonzentrierung von Plasmid-DNA wurden den wässrigen DNA-Lösungen 1/10 Volumen einer 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) und 2 - 3 Volumina eiskaltes absolutes Ethanol zugesetzt. Der Ansatz wurde 30 min bei -70 °C oder 2 h bei -20 °C inkubiert. Die gefällte DNA wurde 20 min bei 14000 Upm (Eppendorf-Tischzentrifuge Modell 5417C) abzentrifugiert und mit eiskaltem 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde 2-5 min im Vakuum (Power Heater Con-1000, Fa. Froebel, Lindau) getrocknet und in H<sub>2</sub>O oder TE 10.01-Puffer (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8,0) resuspendiert.

## **4.16 Enzymatische Behandlung von DNA**

### **4.16.1 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen**

Für den Restriktionsverdau von Plasmiden wurden 0,2 - 1 µg Plasmid-DNA mit 1 - 5 U Enzym in 10 - 20 ml Endvolumen unter Verwendung des enzymespezifischen Puffersystems 1 - 2 h lang bei optimaler Temperatur (Angabe Herstellerfirma) inkubiert. Für DNA-Spaltungen mit zwei verschiedenen Enzymen wurde ein für beide Enzyme geeigneter Puffer gewählt, oder die Verdauungen wurden einzeln nacheinander durchgeführt. Dabei wurde die DNA nach jedem Schritt entweder gefällt (siehe Kapitel 4.15) oder mit Hilfe des „Easy-Pure Kits“ (siehe Kapitel 4.18) aufgereinigt.

### **4.16.2 Klenow-Enzymbehandlung**

Gegebenenfalls mussten für die sogenannten „blunt-end“-Ligationen die überhängenden Enden der Inserts aufgefüllt bzw. verdaut werden. Mit Hilfe des Klenow-Enzyms (großes Fragment der DNA-Polymerase I, Fa. Roche, Mannheim) konnten 5'-überhängende Enden aufgefüllt (5' → 3' Polymerase-Aktivität) bzw. 3'-überstehende Enden verdaut (3' → 5' Exonuklease-Aktivität) werden. Die aus den Restriktionsverdau gereinigte DNA wurde mit 2 mM eines dNTP-Gemischs und 5 U Klenow-Enzym in entsprechendem Puffer 10 min bei 37 °C inkubiert. Bei einem Verdau der Enden wurde kein dNTP-Gemisch zugesetzt. Die Reaktion wurde durch Erhitzen für 10 min bei 75 °C beendet. Die modifizierte DNA wurde anschließend über ein Agarosegel gereinigt (siehe Kapitel 4.17 und 4.18).

### **4.16.3 Dephosphorylierung von Vektor-DNA**

Um die Religation eines geschnittenen Plasmids zu verhindern, wurden die freien 5'-Phosphatgruppen der linearisierten Plasmid-DNA dephosphoryliert. Dazu wurden ca. 0,5 - 1 µg Vektor-DNA mit 10 U alkalischer Phosphatase (aus Shrimps, SAP, Fa. Roche, Mannheim) in Dephosphorylierungspuffer (Fa. Roche) 10 min (bzw. 60 min für „blunt-ended“ DNA) bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen (15 min bei 65 °C) beendet und die DNA über Agarosegelelektrophorese (siehe Kapitel 4.17) und anschließende Gelelution (siehe Kapitel 4.18) gereinigt.

#### 4.16.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Etwa äquimolare Mengen (50 - 200 ng) von dephosphorylierter Vektor-DNA und den zu klonierenden DNA-Fragmenten wurden in Ligase-Puffer (Fa. MBI Fermentas, St. Leon-Rot) mit 2 U T4-DNA-Ligase (Fa. MBI Fermentas) versetzt und 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16 °C inkubiert. Die Ansätze für „blunt-end“-Ligationen enthielten 4 U T4-DNA-Ligase und zusätzlich noch 20 % (v/v) PEG 4000. Die Ligationsmischungen wurden anschließend direkt für die Transformation kompetenter Zellen eingesetzt (siehe Kapitel 4.19).

#### 4.16.5 Herstellung eines T-Vektors

Die *Taq*-DNA-Polymerase fügt aufgrund einer Nebenaktivität („Extendase“-Aktivität) unspezifisch ein Nukleotid am 3`-Ende des neusynthetisierten DNA-Stranges an, wobei es sich meist um einen Adenosin-Rest handelt (Clark, 1988). In Abwesenheit von dATP können aber auch andere dNTPs an DNA-Fragmente angehängt werden. Die überhängenden Adenosin-Reste kann man zur Klonierung von PCR-Produkten, die unter Verwendung der *Taq*-DNA-Polymerase gewonnen wurden, nutzen. Zu diesem Zweck wurde ein „T-Vektor“ aus dem Klonierungsvektor pBluescript II SK(+) hergestellt (Marchuk *et al.*, 1991). Dazu wurde die „Extendase“-Aktivität der *Taq*-DNA-Polymerase genutzt, um an die 3`-Enden des mit *EcoRV* linearisierten Vektors einen Thymidin-Rest anzufügen. Es wurden ca. 5 µg linearisierte Vektor-DNA mit 5 U *Taq*-DNA-Polymerase und 0,8 mM dTTP im empfohlenen Puffer 2 h bei 72 °C inkubiert. Nach Reinigung über ein Agarosegel wurden die Enden des Vektors dephosphoryliert (siehe Kapitel 4.16.3) und nach einer weiteren Reinigung über ein Agarosegel zur Ligation mit den PCR-Produkten eingesetzt.

#### 4.17 Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe (500 bp - 15 kb) wurden 1 %ige (w/v) Agarosegele (Fa. Peqlab, Erlangen) in TAE-Puffer [40 mM Tris, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 0,114 % (v/v) Essigsäure, pH 7,8] hergestellt und mit ca. 1 µg·ml<sup>-1</sup> Ethidiumbromid versetzt. Für die Auftrennung kleiner DNA-Fragmente (20 - 600 bp) wurden 2,5 %ige (w/v) Nusieve-Agarosegele (Fa. Biozym, Oldendorf) verwendet. Als Längenstandard diente im Bereich von 500 bp - 15 kb mit *EcoRI* und *HindIII* verdaute DNA des Phagen λ sowie der „GeneRuler<sup>TM</sup> 1 kb DNA Ladder“ (Fa. MBI Fermentas, St. Leon-Rot). Im Bereich von 20 - 600 bp wurde der „GeneRuler<sup>TM</sup> 100 bp DNA Ladder“ (MBI Fermentas) sowie der „100 bp

DNA Ladder“ der Fa. NEB (New England Biolabs, England) verwendet. Von den Standards wurde jeweils 1 µg DNA aufgetragen. Vor dem Auftragen wurden die Proben im Verhältnis 1:10 mit Probepuffer [0,25 % (w/v) Xylencyanol, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 50 % (w/v) Glycerin, aufgefüllt mit 0,5 M Na<sub>2</sub>EDTA] versetzt.

Die Auftrennung erfolgte in horizontalen Elektrophoresekammern (Fa. Bio-Rad, München und Fa. Biometra, Göttingen). Die Elektrophorese wurde in 1x TAE-Puffer bei 10 - 12 V·cm<sup>-1</sup> durchgeführt (Spannungsquelle Biorad Power Supply Modell 100/200, Fa. Bio-rad). Die DNA-Fragmente wurden bei 302 nm mit Hilfe des Geldokumentationssystems KS-3000 mit Videografik-Drucker 890 MD (Fa. Ultra-Lum, Inc., Carson, USA) nachgewiesen.

#### **4.18 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Die mit Ethidiumbromid gefärbten Banden wurden mit Hilfe eines Skalpell aus den Agarosegelen ausgeschnitten und mit dem „Easy Pure Kit“ (Fa. Biozym, Oldendorf) nach Herstellerangaben eluiert. Außerdem konnte mit Hilfe dieses Kits DNA direkt aus Lösungen aufgereinigt werden. Das „Easy Pure Kit“ arbeitet mit einer großendefinierten Silicamatrix, die sowohl einzel- als auch doppelsträngige DNA bindet, während DNA-Fragmente unter 40 bp (zum Beispiel Primer) nicht gebunden werden. Die Aufreinigung der gewünschten DNA erfolgt in drei Schritten über eine Bindung, Waschung und Elution. Die abschließende Elution erfolgt in einem geringen Volumen, so dass eine weitere Konzentrierung entfällt.

#### **4.19 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA**

Zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen wurden zwei verschiedene Methoden eingesetzt.

##### **Transformation nach Chung *et al.* (1989) :**

Eine Übernachtskultur von *E. coli* DH5α bzw. *E. coli* S17-1 wurde im Verhältnis 1:100 in 40 ml LB-Medium verdünnt. Die Bakterienkultur wurde bei 37 °C (Schüttler RFI-125, Fa. Infors, Bottmingen, Schweiz) bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,3 - 0,4 kultiviert. Nach Abzentrifugieren (4° C, 4500 Upm, 10 min, Zentrifuge Sigma 3K-1) wurden die Zellen in 2 ml eiskaltem TSS-Medium [10 g Polyethylen-Glykol 6000, 5 ml Dimethylsulfoxid (DMSO), 5 ml 1 M MgCl<sub>2</sub>, 90 ml LB-Medium (siehe Kapitel 4.2.2), sterilfiltriert] resuspendiert. Die Suspension wurde 2 min auf einem Vortexer kräftig durchmischt und danach direkt zur Transformation

eingesetzt. Die kompetenten Zellen wurden nicht eingefroren sondern für jede Transformation neu hergestellt.

Dazu wurden 200 µl der kompetenten Zellen mit Plasmid-DNA (< 100 ng) versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde dann zu 2 ml in Reagenzgläsern vorgewärmtem TSS-Medium gegeben und 1 h bei 37 °C und 100 Upm (Schüttler RFI-125, Fa. Infors, Bottmingen, Schweiz) geschüttelt. Anschließend wurden 10 - 300 µl der Zellsuspension auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Der Rest wurde abzentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge Modell 5417C), in 100 µl TSS-Medium resuspendiert und ebenfalls auf Selektivplatten verteilt. Die Agarplatten wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert. Als Transformationskontrollen wurden Zellen ohne Plasmid (Negativkontrolle) und mit ungeschnittener Vektor-DNA transformierte Zellen (Positivkontrolle) eingesetzt.

#### **Transformation nach Inoue *et al.* (1990) :**

Eine Vorkultur von *E. coli* DH5α bzw. *E. coli* S17-1 wurde im Verhältnis 1:100 in 200 ml SOB-Medium [2 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>] verdünnt. Die Bakterienkultur wurde bei ca. 200 Upm (Wasserbadschüttler, Modell G76, Fa. New Brunswick Scientific, Edison, USA) und Raumtemperatur inkubiert. Nach Erreichen einer optischen Dichte (OD<sub>600nm</sub>) von 0,6 wurde das Kulturgefäß mit den Zellen für 10 min auf Eis gestellt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (10 min, 5000 Upm, 4 °C, Zentrifuge Sigma 3K-1) und das Pellet in 80 ml kaltem TB-Puffer (10 mM HEPES, 55 mM MnCl<sub>2</sub>, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM KCl, pH 6,7, sterilfiltriert) resuspendiert und weitere 10 min auf Eis gestellt. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 20 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert, die Suspension vorsichtig mit Dimethylsulfoxid (DMSO) bis zu einer Endkonzentration von 7 % (v/v) vermischt und weitere 10 min auf Eis gestellt. Die Suspension wurde auf mehrere Eppendorf-Cups verteilt (je 0,5 ml), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

Zur Transformation wurde ein Aliquot der tiefgefrorenen Zellen aufgetaut und 100 µl davon der jeweiligen Plasmid-DNA bzw. dem jeweiligen Ligationsansatz (maximal 100 ng DNA) zugegeben. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Ansätze 30 sec auf 42 °C erhitzt und weitere 2 min auf Eis gekühlt. Danach wurden jedem Ansatz 500 µl SOB-Medium (siehe oben) zugefügt und die Zellen 1 h lang bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden 50 - 200 µl der Zellsuspension auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Der Rest wurde abzentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge Modell 5417C), in 100 µl SOB-Medium

resuspendiert und ebenfalls auf Selektivplatten verteilt. Die Agarplatten wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert (Transformationskontrollen siehe oben).

#### 4.20 Filterkreuzungen

Filterkreuzungen wurden nach der modifizierten Methode von de Lorenzo und Timmis (1994) durchgeführt. Für die Kreuzungen wurden autoklavierte Celluloseacetat-Filter (Ø 25 mm, 0,2 µm Porengröße, Fa. Sartorius AG, Göttingen) verwendet. Die wachsenden Kulturen der Donor-, Helfer- und Empfängerstämme wurden 15 min bei 4500 Upm und 4 °C (Zentrifuge Sigma 3K-1) zentrifugiert, und die Pellets in gleichem Volumen LB- oder NB-Medium ohne Antibiotika resuspendiert. Die Filter wurden auf LB- oder NB- Agarplatten gelegt und von den zu kreuzenden Stämmen jeweils 50 µl auf dem Filter miteinander vermischt. Die Agarplatten wurden 8 - 16 h bei 30 °C (optimale Temperatur der Empfängerstämme) inkubiert. Die Filter wurden dann unter sterilen Bedingungen in Reagenzgläser mit 5 ml 10 mM MgSO<sub>4</sub> überführt. Durch kräftiges Mischen wurden die Zellen vom Filter gelöst und nach entsprechender Verdünnung auf Selektivmedien ausplattiert. Es wurden immer die Lebendzellzahlen von Donor, Empfänger (Ausplattieren der für die Kreuzung eingesetzten Bakteriensuspensionen auf LB- oder NB-Agarplatten in verschiedenen Verdünnungsstufen) und Transkonjugante (Bestimmung der Zellzahl nach Selektion) bestimmt. Die im Ergebnisteil angegebenen Konjugationsfrequenzen ergeben sich aus den Lebendzellzahlen der Transkonjuganten bezogen auf die eingesetzten Empfängerzellen.

#### 4.21 Koloniehybridisierung

Für die Übertragung von DNA aus Bakterienkolonien wurde eine Agarplatte mit den zu untersuchenden Bakterienkolonien mit einem zurechtgeschnittenen Stück Nylonmembran (Porablot NCI, Fa. Macherey-Nagel, Düren) bedeckt und die Orientierung der Membran für die spätere Zuordnung der Kolonien markiert. Die Membran mit dem daran haftenden Zellmaterial wurde nach 1 min abgenommen, zweimal 5 min in Denaturierungslösung (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) und zweimal 5 min in Neutralisationslösung (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris/HCl, pH 7,5) inkubiert. Mit Filterpapier (3MM-Papier, Fa. Whatman International) wurden Zellreste von der Membran entfernt. Die Membran wurde 2 min in 50 mM NaCl gewaschen und auf einem Filterpapier luftgetrocknet. Die DNA wurde durch 2 - 3stündiges Erhitzen bei 70 °C auf der Membran fixiert.



Die Markierung von DNA mit Digoxigenin erfolgte mit Hilfe des „DIG DNA Labeling Kits“ der Fa. Roche nach der „Random primed labeling“-Methode (Feinberg und Vogelstein, 1983). Die Reaktion wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Sonde wurde bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Die Hybridisierung von DNA mit DIG-markierten Sonden sowie der anschließende immunologische Nachweis erfolgte nach Vorschrift des „DIG Nucleic Acid Detection Kit“ der Fa. Roche. Membranen mit fixierter DNA wurden in einem Polyethylenbeutel mit Hybridisierungspuffer [5 x SSC (0,75 M NaCl, 75 mM Na-Citrat, pH 7,0), 1 % (w/v) „Blocking Reagenz“ der Fa. Roche, 0,1 % (w/v) N-Lauroylsarcosinat, 0,02 % (w/v) SDS] 2 h bei  $68\text{ }^{\circ}\text{C}$  in einem Wasserbad prähybridisiert. Die DIG-markierte Sonde wurde vor Gebrauch 10 min bei  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  in einem Wasserbad denaturiert, auf Eis gestellt und in Hybridisierungspuffer überführt. Nach der Prähybridisierung der Membran wurde der Hybridisierungspuffer entfernt und die Membran über Nacht mit der DIG-markierten Sonde bei  $68\text{ }^{\circ}\text{C}$  hybridisiert. Am folgenden Tag wurde die Sondenlösung entfernt und Sondenreste vor der Nachweisreaktion abgewaschen [2 x 5 min in 2 x SSC (0,3 M NaCl, 30 mM Na-Citrat, pH 7,0, 0,1 % (w/v) SDS bei RT und 2 x 15 min in 0,1 x SSC (15 mM NaCl, 1,5 mM Na-Citrat, pH 7,0, 0,1 % (w/v) SDS bei  $68\text{ }^{\circ}\text{C}$ ]. Die Detektion erfolgte nach Herstellerangaben.

#### 4.22 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Mullis *et al.*, 1986) wurde zur Herstellung von DNA-Sonden, zur Klonierung der Gene für die Toluoloxidation, zur Verifizierung nach genetischen Manipulationen und für Sequenzierungen eingesetzt. Es wurden die *Taq*-DNA-Polymerase der Firmen Gibco Life Technologies (Eggenstein) und Eppendorf (Hamburg) verwendet. Bei PCR-Ansätzen zur Amplifizierung der Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase aus *P. putida* U-JT103 wurde eine DNA-Polymerase mit 3'→5'-Proofreading-Funktion gewählt (*Vent*-Polymerase, Fa. Gibco Life Technologies, Eggenstein). Zur Klonierung der Gene der Toluoloxidation wurde das „Expand Long Template PCR System“ der Fa. Roche (Mannheim) verwendet. Oligonukleotide wurden bei MWG Biotech AG (Ebersberg) synthetisiert. Es wurden Desoxyribonukleotide (dNTP) der Fa. Gibco Life Technologies verwendet. Die PCR-Ansätze enthielten jeweils 50 pmol Primer, je 0,1 mM dNTPs, 1,5 mM  $\text{Mg}^{2+}$  (teilweise im mitgelieferten Puffer bereits enthalten), 0,5 - 1 U Polymerase und 10 - 50 ng „Template“-DNA. Gegebenenfalls wurde den Reaktionsansätzen Dimethylsulfoxid (DMSO) in einer Endkonzentration

von 2 - 8 % (v/v) zugesetzt, um eine spezifischere Amplifizierung des gewünschten PCR-Produkts zu erzielen. Die Annealing-Temperatur wurde 5 - 10 °C unterhalb der vom Hersteller der Oligonukleotide berechneten Schmelztemperatur der Primer gewählt. Die Elongationsphase wurde je nach erwarteter Fragmentgröße mit einer Polymerisationsgeschwindigkeit von 50 Basen pro Sekunde abgeschätzt. Die Denaturierungstemperatur betrug 93 - 95 °C. Konnte die Annealing-Temperatur nicht genau festgelegt werden (Einsatz degenerierter Primer, wenig oder gar keine Amplifikationsprodukte) wurde eine sogenannte „Touch-down-PCR“ durchgeführt. Hierbei wurde die Annealing-Temperatur während der PCR schrittweise erniedrigt (bei 10 Zyklen um 0,5 °C pro Zyklus). Anschließend wurden bei der niedrigsten Temperatur nochmal 15 Zyklen durchgeführt. Die PCR zur Amplifizierung der Gene der Toluoloxidation wurde nach Herstellerangaben („Expand Long Template PCR System“, Fa. Roche) durchgeführt.

Die Reaktionen wurden mit den Thermocyclern PTC-100<sup>TM</sup> (Fa. MJ Research Inc., Watertown, MA, USA) und TGradient (Fa. Whatman Biometra, England) durchgeführt.

In Tab. 8 sind die Oligonukleotide aufgelistet, die für den Nachweis der Gene für die Toluoloxidation in den Transkonjuganten von *R. eutropha* 335, *R. eutropha* B9 und *P. putida* U-JT103 entworfen wurden. Außerdem enthält die Tabelle die Oligonukleotide, die zur Amplifizierung von *benD* bzw. zum Auffinden eines möglichen *xyl*-Clusters in *P. putida* U-JT103 eingesetzt wurden. Tab. 9 enthält die Oligonukleotide, die zur Klonierung der Benzoat-Dioxygenase bzw. zur Klonierung des kompletten Abbauweges von Toluol zu Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol verwendet wurden.

### **PCR-Programme:**

#### **Nachweis des oberen Abbauweges (*xylR*, *xylMA*, *xylB*, *xylC*) in den Transkonjuganten:**

3 min 95 °C → [45 sec 60 - 65 °C → 1 - 2 min 72 °C → 30 sec 95 °C] 30x → 45 sec 60 - 65 °C → 5 min 72 °C → 4 °C

#### **Nachweis des unteren Abbauweges (*xylXYZ*, *xylL*, *benD*, *xylE*) in *P. putida* U-JT103:**

3 min 94 °C → [45 sec 94 °C → 30 sec 68 °C - 0,5 °C/cycle → 30 sec - 3 min 72 °C] 10x → [45 sec 94 °C → 30 sec 60 °C → 30 sec - 3 min 72 °C] 15x → 10 min 72 °C → 4 °C

**Tab. 8:** Oligonukleotide für den Nachweis der Gene der Toluoloxidation

Primer	Nukleotidsequenz 5' → 3'	Position	Nachweis von...
<u>Primer für den Nachweis der <i>xyl</i>-Gene des „catabolic segment <i>upp</i> TOL“:</u>			
<i>xylR3</i> (for)	CTATCGGCCCATTTGCTTTCACAGAT	1-25 ( <i>xylR</i> )	Regulator mit Promotor $P_R$
<i>xylR5</i> (rev)	ACGTTCTTTTTAAGAAGCGAGAAC	1944-1967	
<i>xylM5</i> (for)	GTTACTGCTTGCGGGCTGATCGGA	33-56 ( <i>xylMA</i> )	Xylol-Monooxygenase
<i>xylA3</i> (rev)	AAAACGGTCCGCAAACTAATTC	1008-1031	
<i>xylB5</i> (for)	CAAAGCAGCAATAGTTCGCCAAAA	8-31 ( <i>xylB</i> )	Benzylalkohol-Dehydrogenase
<i>xylB3</i> (rev)	CTACCAGCACGCGTCAACCAATC	1091-1113	
<i>xylC5</i> (for)	ACTTTGAAGTTAAGGAGGCATAAT	-25-(-2) ( <i>xylC</i> )	Benzaldehyd-Dehydrogenase
<i>xylC3</i> (rev)	AAAGTAGGTGGATATATGGACACG	1478-1501	
<u>Primer zum Nachweis eines <i>ben</i>- bzw. <i>xyl</i>-Clusters für den Benzoatabbau:</u>			
<i>forbenD1</i>	CCAAGGCAAGGTTGCCCTGG	14-33 ( <i>benD</i> )	Benzoat- bzw. Toluat- <i>cis</i> -1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase
<i>forbenD2</i>	GGTAGACCGTCCGAACTGGTC	107-128 ( <i>benD</i> )	
<i>forxylL</i>	CTGGTCGGAGTCGCTGAGG	147-165 ( <i>xylL</i> )	625-643 ( <i>benD</i> ) 637-655 ( <i>xylL</i> )
<i>revbenDxylL</i>	AGGCTGCTGTCGAGGG(AT)CT		
<i>forbenC</i>	CCGGCCAACTTCTACTACGAG	969-989 ( <i>benC</i> )	Amplifikation von <i>benD</i>
<i>revbenK</i>	CGCGCGTTATCGATGATCGG	21-40 ( <i>benK</i> )	
<i>forxylX</i>	GCTTTAGGAGTGGAAACAAGGCC	301-323 ( <i>xylX</i> )	Toluat-Dioxygenase
<i>revxylZ</i>	GGCGAATGCCTCTAGCTTGTC	770-790 ( <i>xylZ</i> )	
<i>forxylE</i>	CCGGGCATGGATTTTATGGGTTTC	186-209 ( <i>xylE</i> )	Brenzcatechin-2,3-Dioxygenase
<i>revxylE</i>	CGAAGAAGTAGATGGTCTTGCCG	749-771 ( <i>xylE</i> )	

Die Primer zum Nachweis der Gene des „catabolic segment *upp* TOL“ wurden von der Sequenz für das upper-Operon aus dem TOL-Plasmid pWVO aus *P. putida* mt-2, Accessionno. D63341, Harayama, direct submission (1997) bzw. von der Sequenz für *xylR*, Accessionno. M10143, Inouye *et al.* (1988) abgeleitet. Die Positionsangaben beziehen sich auf Bindestellen in den genannten Genen (*xylC*: 1464 bp; *xylM*: 1110 bp; *xylA*: 1053 bp; *xylB*: 1101 bp; *xylR*: 1842 bp). Die Primer zum Nachweis eines *ben*- bzw. *xyl*-Clusters wurden von der Sequenz für das *meta*-Operon aus dem TOL-Plasmid pWVO aus *P. putida* mt-2, Accessionno. M64747, Neidle *et al.* (1992) bzw. von der Sequenz für das *ben*-Cluster aus *P. putida* PRS2000, Accessionno. AF218267, Cowles *et al.* (2000) abgeleitet. Die Positionsangaben beziehen sich auf Bindestellen in den genannten Genen (*xylXYZ*: 2874 bp; *xylL*: 810 bp; *xylE*: 924 bp; *benC*: 1011 bp; *benD*: 762 bp; *benK*: 1332 bp).

Tab. 9: Oligonukleotide zur Klonierung

Primer	Nukleotidsequenz 5' → 3'	Position	Amplifizierung von...
5' SpebenA	ATTTAT[ACTAGT]ATGTTGGAGAAAGGATATG	-16-3	<i>benABC</i> mit [SpeI]-
3' SacbenC	TTTATA[GAGCTC]TCCGTTTTGAGTTAG	1013-1027	Schnittstelle am 5'-En- de und [SacI]-Schnitt- stelle am 3'-Ende
xyICforPstI_1	ATATAT[CTGCAG]TAAGGAGGCATAATTATG	-5-3	<i>xy/CMAB</i> mit [PstI]-
xyICforPstI_2	ATATAT[CTGCAG]TATGCGGGAACAAAAG	-1-16	Schnittstelle am 5'-
xyIBbenArev_1	CTCCAACATTCCAAACGTC AACCAATCCGGA	-22-(-8)	( <i>xy/B</i> ) Ende und mit Homolo-
xyIBbenArev_2	CGGGAATACGTGGCATAATGCTTCAACCGTTT	1-15	( <i>benA</i> ) gie zu <i>benA</i> am 3'-Ende
xyIBbenArev_3	GTGGCATAATCCTTACCGCTCAACCAAT	-7-7	( <i>benA</i> )
xyIBbenArev_4	CAACATTCCAAACCAGCACGCGTCAA	-22-(-11)	( <i>xy/B</i> )
benCrevSpeI	ATATAT[ACTAGT]TGAGTTAGTTGGCAGAG	1004-1020	<i>benABC</i> mit [SpeI]-
xyIBbenAfor_1	TCCGGATTGGTTGACGTTTGGAAATGTTGGAG	1087-1102	( <i>benA</i> ) Schnittstelle am 3'-
xyIBbenAfor_2	AAACCGTGAAGCATATGCCACGTATTCCCG	1199-1212	( <i>benA</i> ) Ende und mit Homolo-
xyIBbenAfor_3	ATTGGTTGACGCGTAAAGGATATGCCAC	1092-1105	( <i>benA</i> ) gie zu <i>xy/B</i> am 5'-Ende
xyIBbenAfor_4	TTGACGCGTGCTGTTTGGAAATGTTG	1097-1111	( <i>benA</i> )
xyICforPstI_2	ATATAT[CTGCAG]TATGCGGGAACAAAAG	-1-16	<i>xy/CMABbenABC</i> mit
benCrevSpeI	ATATAT[ACTAGT]TGAGTTAGTTGGCAGAG	1004-1020	[PstI]- und [SpeI]-Schnitt- stelle

Primer für die *xyI*-Gene wurden von der Sequenz für das upper-Operon aus dem TOL-Plasmid pWVO aus *P. putida* mt-2, Accessionno. D63341, Harayama, direct submission (1997) abgeleitet. Die Positionsangaben beziehen sich auf Bindestellen in den genannten Genen (*xyI/C*: 1464 bp, *xyI/B*: 1101 bp). Primer für die *ben*-Gene wurden von der Sequenz für das *ben*-Cluster aus *Acinetobacter* sp. ADP1, Accessionno. AF009224, Neidle *et al.* (1991) abgeleitet. Die Positionsangaben beziehen sich auf Bindestellen in den genannten Genen (*benA*: 1386 bp; *benC*: 1016 bp).

Die Amplifizierung von *xy/CMABbenABC* erfolgte nach Higuchi (1990). Es wurden zunächst die Fragmente *xy/CMAB* und *benABC* getrennt voneinander amplifiziert. Dazu wurden Primer konstruiert, deren Sequenzen sowohl zu *xy/CMAB* als auch zu *benABC* homolog sind, und die zueinander komplementär sind (z. B. *xyIBbenAfor\_1* und *xyIBbenArev\_1*). Mit den jeweiligen Gegenprimern *xyICforPstI* bzw. *benCrevSpeI* konnten die Fragmente amplifiziert werden. In einer dritten PCR wurden die gewonnenen Fragmente als Template-DNA eingesetzt. Als Primer dienten die vorher getrennt eingesetzten Oligonukleotide *xyICforPstI* und *benCrevSpeI* (siehe Kapitel 5.14.2.3).

**PCR-Programme:****Amplifizierung von *benABC* aus *Acinetobacter sp.* ADP1:**

2 min 94 °C → [10 sec 94 °C → 30 sec 58 °C → 2 min 68 °C] 10x → [10 sec 94 °C → 30 sec 58 °C → 2 min + 20 sec/cycle 68 °C] 15x → 7 min 68 °C → 4 °C

**Amplifizierung von *xyICMABbenABC*:**1. PCR: Amplifizierung von *xyICMAB* aus *P. putida* mt-2 (pWWO):

2 min 94 °C → [10 sec 94 °C → 30 sec 65 °C – 0,5 °C/cycle → 3,5 min 68 °C] 10x → [10 sec 94 °C → 30 sec 60 °C → 3,5 min + 20 sec/cycle 68 °C] 15x → 7 min 68 °C → 4 °C

2. PCR: Amplifizierung von *benABC* aus *Acinetobacter sp.* ADP1:

2 min 94 °C → [10 sec 94 °C → 30 sec 58 °C → 2 min 68 °C] 10x → [10 sec 94 °C → 30 sec 58 °C → 2 min + 20 sec/cycle 68 °C] 15x → 7 min 68 °C → 4 °C

3. PCR: Amplifizierung von *xyICMABbenABC*:

2 min 94 °C → [10 sec 94 °C → 30 sec 50 °C + 0,8 °C/cycle → 6 min 68 °C] 10x → [10 sec 94 °C → 30 sec 58 °C → 6 min + 20 sec/cycle 68 °C] 15x → 7 min 68 °C → 4 °C

**4.23 DNA-Sequenzierung**

Die Sequenzierung von DNA erfolgte mit der Didesoxymethode nach Sanger *et al.* (1977) mit Fluoreszenzmarkierung. Als Sequenziergerät stand ein ALFexpress der Fa. Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden) zur Verfügung. Die Sequenzierreaktionen mit markierten Primern wurden mit dem „Thermo Sequenase Fluorescent Labelled Primer sequencing kit with 7-deaza-dGTP“ (Fa. Amersham Pharmacia Biotech) oder mit dem „CycleReader Auto DNA Sequencing Kit“ (Fa. MBI Fermentas, St. Leon-Rot) durchgeführt. Für Sequenzierungen mit unmarkierten Primern wurde der „Thermo Sequenase Cy5 Dye Terminator Kit“ (Fa. Amersham Pharmacia Biotech) eingesetzt. Die Sequenzierreaktionen wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Reaktionen mit markierten Primern enthielten 100 - 400 ng Plasmid-DNA und 1 - 2 pmol Primer. Zur Amplifizierung wurde folgendes PCR-Programm eingesetzt, wobei die Annealing-Temperatur, die Elongationszeit und die Anzahl der Zyklen teilweise variiert wurden: 3 min 95 °C → [30 sec 95 °C → 30 sec 60 °C → 30 sec 72 °C] 25 - 30x. Die Reaktionen mit markierten Nukleotiden enthielten 0,2 - 0,5 µg DNA pro Kilobase und 2 - 5 pmol Primer. Zur Amplifizierung wurde folgendes PCR-Programm eingesetzt, wo-

bei die Annealing-Temperatur und die Elongationszeit teilweise variiert wurden: 3 min 95 °C → [30 sec 95 °C → 30 sec 60 °C → 80 sec 72 °C] 30x. Für das Sequenziergel wurde die Fertiglösung „ReproGel Long Read“ (Fa. Amersham Pharmacia Biotech) eingesetzt. Die Gele besaßen eine Dicke von 0,3 mm. Die Elektrophorese wurde nach Empfehlung des Herstellers durchgeführt. Die Analyse und Auswertung erfolgte mit Hilfe der zugehörigen Software (ALFwin Sequence Analyser Software Version 2.10).

Zudem wurden Sequenzierungen mit dem Sequenziergerät 373A der Fa. Applied Biosystems (Forster City, CA, USA) durchgeführt. Für die Sequenzierreaktion stand ein sogenannter „Premix“ (Komponenten A-, C-, G- und T-Dye Terminator, dITP, dATP, dCTP, dTTP, Tris-HCl pH 9,0, MgCl<sub>2</sub>, thermostabile Pyrophosphatase und AmpliTaq DNA Polymerase) zur Verfügung, dem nur noch die zu sequenzierende DNA (100 - 500 ng) und die Sequenzierprimer (5 pmol·µl<sup>-1</sup>) zugefügt werden mussten. Die Reaktion wurde mit folgendem PCR-Programm durchgeführt: 3 min 94 °C → [2 min 60 - 65 °C → 30 sec 94 °C] 25x → 4 min 60 - 65 °C → 4 °C. Der PCR-Ansatz wurde anschließend mit Hilfe einer Ethanol-Fällung aufgereinigt. Die Elektrophorese sowie die Datenauswertung wurde freundlicherweise von Volker Nödinger (Institut für Technische Biochemie, Stuttgart) durchgeführt.

In Tab. 10 sind die Oligonukleotide zur Sequenzierung von *xylMA* in den Transkonjuganten von *Ralstonia* bzw. die Primer zur Sequenzierung von *benD* aus *P. putida* U-JT103 aufgelistet.

Die Auswertung von Nukleotidsequenzen erfolgte mit dem Programmpaket DNASTar (Fa. Lasergene). Datenbankvergleiche sequenzierter DNA wurden mit den Programmen BLASTN bzw. BLASTX des National Center for Biotechnology Information (Bethesda, MD, USA) durchgeführt. Zum Vergleichen von Protein- bzw. Nukleotidsequenzen untereinander wurde das Programm ClustalW (EMBL, European Bioinformatics Institute) verwendet. Die angegebenen Zugangsnummern („Accessionno.“) der Proteine bzw. Nukleotidsequenzen beziehen sich auf die Datenbank des National Center for Biotechnology Information.

**Tab. 10:** Oligonukleotide für die Sequenzierung von DNA

Oligonukleotid	Nukleotidsequenz 5' → 3'	Position/Herkunft
T3	CGCGCAATTAACCCTCACTAAAG	Primer für die Sequenzierung aus pBluescript und pBBR1MCS
T7	GCGCGTAATACGACTCACTATAG	
pMMB66EH5	TCGGCTCGTATAATGTGTGGAAT	Primer für die Sequenzierung aus pMMB66EH
pMMB66EH3	AATCTTCTCTCATCCGCCAAAAC	
pMMf3541	ACGAGTTAGCGGAGCAGATCGA	Primer zum Nachweis von pMMB66EH („back-bone“)
pMMr5011	CACCAGACCATGCCGCTCCTGC	
pBBf1799	ACGCAGTCCAGAGAAATCGGC	Primer zum Nachweis von pBBR1MCS („back-bone“)
pBBr2809	CGTCGGTTCAGGGCAGGGT	
<u>Spezifische Primer für die Benzoat-<i>cis</i>-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase <i>benD</i>:</u>		
forbenD1	CCAAGGCAAGGTTGCCCTGG	14-33 ( <i>benD</i> , PRS2000)
forbenD2	GGTAGACCGTTCCGAACCTGGTC	107-128 ( <i>benD</i> , PRS2000)
revbenDxylL	AGGCTGCTGTCGAGGG(AT)CT	625-643 ( <i>benD</i> , PRS2000)
forbenC	CCGGCCAACTTCTACTACGAG	969-989 ( <i>benC</i> , PRS2000)
revbenK	CGCGCGTTATCGATGATCGG	21-40 ( <i>benK</i> , PRS2000)
benDfor324	TTCGTTGTTCCCCACCCTGTG	324-344 ( <i>benD</i> , U-JT103)
benDrev418	TGGCGATGGACGAGACGTTG	399-418 ( <i>benD</i> , U-JT103)
<u>Spezifische Primer für die Xylol-Monooxygenase <i>xylMA</i>:</u>		
xylMA1-for	GCGGACCTGCAAGTATTGAAGAA	-107-(-85) ( <i>xylM</i> , pWW0)
xylMA2-rev	CCGTAAGCTAGACTATGCATCGAAC	1083-1107 ( <i>xylA</i> , pWW0)
xylMA3-for	ACCTTTACTTAGATACGCCTCTCG	441-465 ( <i>xylM</i> , pWW0)
xylMA4-rev	GCGGAGCGGAAAAGAATAACT	483-504 ( <i>xylA</i> , pWW0)
xylMA5-for	TCATCATATTGACGGCTATACACGG	851-875 ( <i>xylM</i> , pWW0)
xylMA6-rev	CATCGCTCAGTTAGACGCCCGT	-28-(-6) ( <i>xylA</i> , pWW0)
xylMA7-for	GGGGTTTCAGTTTAAGGTGCCAC	74-96 ( <i>xylA</i> , pWW0)
xylMA8-rev	CCCGCCAGATAAGAAACCAAG	644-665 ( <i>xylM</i> , pWW0)
xylMA9-for	TTTTCAGTGGTTGGCTATTTGGTG	556-579 ( <i>xylA</i> , pWW0)
xylMA10-rev	GCTCACTAAGTTCGATACGCCCG	254-267 ( <i>xylM</i> , pWW0)

Die Primer für die Xylol-Monooxygenase *xylMA* wurden von der Sequenz für das upper-Operon aus dem TOL-Plasmid pWWO aus *P. putida* mt-2, Accessionno. D63341, Harayama, direct submission (1997) abgeleitet. Die Positionsangaben beziehen sich auf Bindestellen in den genannten Genen (*xylM*: 1110 bp; *xylA*: 1053 bp). Primer für die Benzoat-*cis*-1,2-diol-Dehydrogenase *benD* wurden von der Sequenz für das *ben*-Cluster aus *P. putida* PRS2000, Accessionno. AF218267, Cowles *et al.* (2000) bzw. von der Sequenz für *benD* aus *P. putida* U-JT103 (diese Arbeit) abgeleitet. Die Positionsangaben beziehen sich auf Bindestellen in den genannten Genen (*benC*: 1011 bp; *benD*: 762 bp; *benK*: 1331 bp.). Sequenz für pMMB66EH: Accessionno. X15234, Morales, direct submission (1989); Sequenz für pBBR1MCS: Accessionno. U02374, Kovach *et al.*, 1994.

#### **4.24 Chemikalien und Biochemikalien**

Es wurden handelsübliche Chemikalien in p.A.-Qualität der Firmen Aldrich (Steinheim), Fluka AG (Buchs, Schweiz), Gerbu (Gaiburg), ICN (Ohio, USA) Merck (Darmstadt), Riedel-de Haen (Seelze), Roth (Karlsruhe), und Sigma (Deisenhofen) verwendet. Agarose und NuSieve-Agarose stammten von den Firmen Peqlab (Erlangen) bzw. Biozym (Oldendorf). Enzyme wurden von den Firmen Gibco Life Technologies (Eggenstein), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), New England Biolabs (England) und Roche (Mannheim) bezogen. Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol wurde freundlicherweise von Edina Payer (Institut für Grenzflächen und Bioverfahrenstechnik, Stuttgart) bereitgestellt.



## 5 Experimente und Ergebnisse

### 5.1 Auswahl geeigneter Bakterienstämme für die Konstruktion von Derivaten

Zur Konstruktion von Derivaten Toluol tolerierender Bakterienstämme, die Toluol zum Benzoatdihydrodiol (*cis*-Cyclohexa-3,5-dien-1,2-diol-1-carboxylat oder 1,2-Dihydro-*cis*-1,2-dihydroxybenzoat, DHB) umsetzen, sollten Stämme eingesetzt werden, die eine hohe Toleranz gegenüber Toluol zeigten, ohne dieses gleichzeitig als Substrat verwerten zu können. Diesen Stämmen sollten die Gene für den Abbau von Toluol bis zum Benzoatdihydrodiol auf einem mobilen genetischen Element (Transposon oder Plasmid) übertragen werden. Dabei musste gewährleistet sein, dass das Benzoatdihydrodiol nicht weiter umgesetzt wurde (siehe Kapitel 3.5).

Es konnte ein neuer Bakterienstamm isoliert werden, der in Gegenwart von 5 % (v/v) Toluol in Komplexmedium Wachstum zeigte, ohne dabei das Toluol als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen zu können. Dieser Stamm war aber in der Lage, Benzoat und Benzoatdihydrodiol abzubauen. Für die Konstruktion von Derivaten dieses Stammes, der als *Pseudomonas stutzeri* charakterisiert wurde, müssten zusätzlich noch die Benzoatdihydrodiol abbauenden Gene ausgeschaltet werden.

Da zunächst keine toluoltoleranten Stämme zur Verfügung standen, die weder Toluol noch Benzoatdihydrodiol verwerteten, wurden für die Konstruktion die Bakterienstämme *R. eutropha* B9 und *P. putida* U-JT103 eingesetzt. Von beiden Stämmen wurde aufgrund eines Defektes im Gen für die Benzoatdihydrodiol-Dehydrogenase, Benzoatdihydrodiol ins Medium ausgeschieden (siehe Kapitel 3.5). Diesen Stämmen mussten für die gewünschte Transformation von Toluol zu Benzoatdihydrodiol die noch fehlenden Gene für die Umwandlung von Toluol zu Benzoat auf einem mobilen Element übertragen werden.

### 5.2 Eigenschaften von *R. eutropha* 335 und *R. eutropha* B9

Beim Bakterienstamm *R. eutropha* B9 handelt es sich um eine Mutante von *R. eutropha* 335, einem Benzoat verwertenden Stamm, bei dem eine Blockade im Umsatz von Benzoatdihydrodiol zu Brenzcatechin vorliegt (Reiner *et al.*, 1971). Die Mutante wächst deshalb nicht mehr mit Benzoat und scheidet das Benzoatdihydrodiol quantitativ ins Medium aus. Im Folgenden wurde die Verwertung verschiedener C-Quellen (insbesondere von Toluol und von Zwischenprodukten der Toluoloxidation), die Toleranz gegenüber Toluol und die Eigenschaft, Benzoat zu Benzoatdihydrodiol umzusetzen, näher untersucht.

### 5.2.1 Wachstum auf verschiedenen C-Quellen

Aus Literaturangaben ging hervor, dass der Wildtypstamm *R. eutropha* 335 in der Lage war, alkylierte Benzole und andere aromatische Verbindungen wie Phenol oder Benzoat als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen (Lang, 1996; Davis *et al.*, 1969). Die von diesem Stamm abgeleitete Mutante *R. eutropha* B9 war hinsichtlich ihrer Fähigkeit, bestimmte aromatische Verbindungen abzubauen, noch nicht überprüft worden. Die Mutante sollte zur Konstruktion eines Stammes verwendet werden, der Toluol über Benzoat zu Benzoatdihydrodiol abbauen kann. Daher wurde hier in erster Linie das Wachstum mit Toluol sowie das Wachstum mit den Zwischenstufen des Toluolabbaus überprüft (Tab. 11).

Sowohl *R. eutropha* 335 als auch die Mutante *R. eutropha* B9 konnten mit Toluol als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle nicht wachsen. HPLC-Analysen der Kulturüberstände zeigten außerdem, dass Toluol nicht abgebaut und keine Zwischenprodukte gebildet worden waren. Somit ergab sich kein Hinweis für einen Abbau über einen der in der Einleitung bereits erwähnten Möglichkeiten des Toluolabbaus (Ringhydroxylierung in *ortho*-, *meta*- oder *para*-Stellung, Dioxygenierung des Ringes in 2,3-Position und Methylgruppenoxidation; Mikesell *et al.*, 1993). Die Zwischenprodukte Benzylalkohol, Benzaldehyd und Benzoat, die beim Abbau von Toluol durch die Oxidation der Methylgruppe entstehen, konnten ebenfalls nicht als C-Quelle genutzt werden (außer Benzoat im Falle von *R. eutropha* 335, Wildtyp). Allerdings war der Kulturüberstand beim Einsatz von Benzylalkohol nach etwa sieben Tagen braun gefärbt, und Benzylalkohol konnte nicht mehr in der Lösung nachgewiesen werden. Eine Zunahme der optischen Dichte konnte jedoch, wie bereits erwähnt, nicht gemessen werden. Beim Einbau der Gene für den Abbau von Toluol über Benzylalkohol sollte dieser Effekt keine Rolle spielen, da Benzylalkohol als Metabolit sofort zu Benzaldehyd und Benzoat abgebaut wird. Auch der Abbau von *p*-Kresol über *p*-Hydroxybenzoat sollte bei der Konstruktion eines Stammes, der Toluol über Benzoat abbauen kann, keinen Einfluss haben, da *R. eutropha* B9 Toluol nicht zu *p*-Kresol oxidieren konnte.

Somit konnte versucht werden, die Gene für den Abbau von Toluol zu Benzoat in *R. eutropha* B9 zu integrieren. Das mit Hilfe des neu konstruierten Stammes aus Toluol gewonnene Benzoatdihydrodiol sollte später unter sauren Bedingungen zu Phenol und Salicylat umgewandelt werden. Die saure Umlagerung erfolgte dann ohne Zellen, so dass die Verwertung von Phenol und Salicylat durch *R. eutropha* keinen störenden Einfluss auf die Phenolbildung haben kann.

**Tab. 11:** Wachstum von *R. eutropha* 335 und *R. eutropha* B9 mit verschiedenen C-Quellen

C-Quelle	OD-Zunahme bei Inkubation von		Beobachtungen
	<i>R. eutropha</i> 335	<i>R. eutropha</i> B9	
Glukose	–	–	
Fruktose	+	+	Wachstum innerhalb von 5 Stunden
Citrat	+	+	Wachstum innerhalb von 10 Stunden
Succinat	+	+	Wachstum innerhalb von 10 Stunden
Acetat	+	+	Wachstum innerhalb von 5 Stunden
Salicylat	+	+	Geringe Zunahme der optischen Dichte erst nach 7 Tagen messbar
Toluol	–	–	
Benzylalkohol	–	–	Nach 7 Tagen Suspension braun gefärbt, kein Benzylalkohol mehr nachweisbar
Benzaldehyd	–	–	
Benzoat	+	–	
Benzoatdihydrodiol	+	–	
Phenol	+	+	Wachstum über Nacht
<i>o</i> -Kresol	–	–	
<i>m</i> -Kresol	–	–	
<i>p</i> -Kresol	+	+	Wachstum über Nacht

+, Wachstum; –, kein Wachstum. Die Zellen wurden über Nacht in Komplexmedium wachsen gelassen, am nächsten Morgen geerntet und mit sterilem Phosphatpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in Mineralmedium mit der jeweiligen C-Quelle überimpft. Die Zellen wurden in Klettkolben mit einer Flüssigphase von 50 ml und einer Gasphase von 315 ml inkubiert. Die optische Dichte wurde mit Hilfe eines Klettphotometers bestimmt (siehe Kapitel 4.5). Die Konzentration von Glukose, Fruktose, Citrat, Succinat und Acetat betrug 10 mM. Alle wasserlöslichen aromatischen Verbindungen wurden in einer Konzentration von 2 mM zugegeben. Von Toluol wurden 0,09 mmol direkt in die wässrige Phase zudosiert [entspr. 0,02 % (v/v) bzw. 1,8 mM Toluol, wenn die Menge komplett in der Flüssigphase gelöst wäre; siehe Kapitel 4.14].

Bei Verwendung von Fruktose als C-Quelle konnten die höchsten Wachstumsraten (Verdopplungszeiten zwischen 1,8 und 2,0 Stunden) und Zellausbeuten ( $OD_{Klett}$  ca. 300 bei Zugabe von 10 mM Substrat) verzeichnet werden. Auch Citrat, Succinat und Acetat eigneten sich als Kohlenstoff- und Energiequellen (Verdopplungszeiten zwischen 2,3 und 2,6 Stunden,  $OD_{Klett}$  230 - 290 bei Zugabe von 10 mM Substrat). Glukose wurde dagegen nicht abgebaut. Die Kultivierung von *R. eutropha* erfolgte daher auf Komplexmedium oder auf Mineralmedium mit Fruktose oder Citrat als C-Quelle.

### 5.2.2 Untersuchungen zur Toluoltoleranz

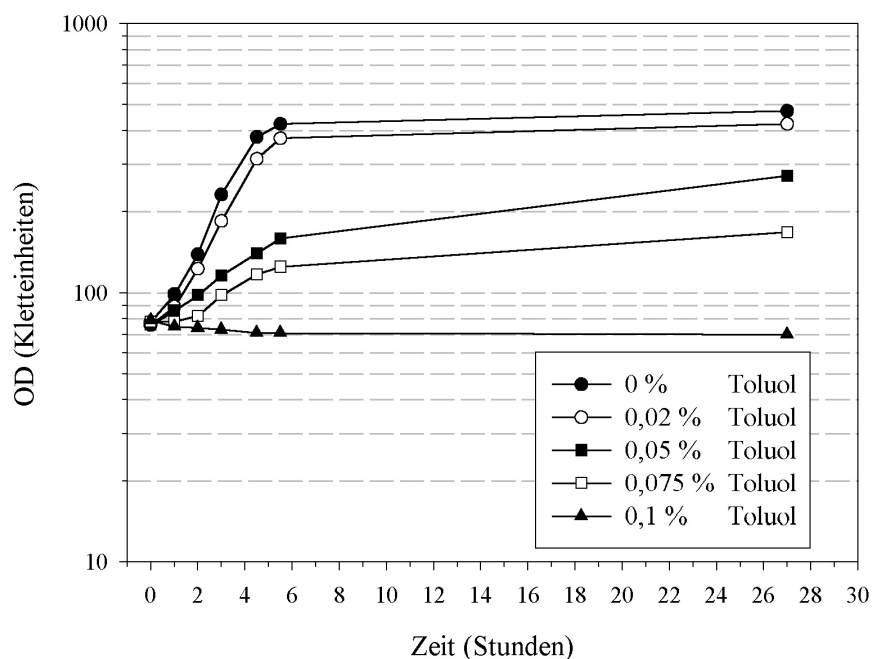
*R. eutropha* B9 war also nicht in der Lage, Toluol als C-Quelle zu nutzen. Es war aber nicht bekannt, welche Mengen an Toluol in Anwesenheit einer zusätzlichen Kohlenstoff- und Energiequelle von diesem Stamm toleriert werden konnten, ohne dass dabei das Wachstum und die Überlebensfähigkeit der Zellen beeinflusst werden. Als Kohlenstoff- und Energiequelle wurden Komplexmedium bzw. Mineralmedium mit Fruktose verwendet. Um ein Entweichen von Toluol bei den Probenahmen durch Öffnen der Kolben zu verhindern, wurden die Zellen in speziellen gasdicht verschlossenen Kolben (KlettKolben) gezüchtet. Die Bestimmung der optischen Dichte erfolgte mit Hilfe eines Klettphotometers (siehe Kapitel 4.5). Die Anzucht erfolgte dabei in einem Volumen von 50 ml. Das Volumen der Gasphase betrug in diesem System 315 ml (siehe Kapitel 4.14). Es wurden Toluolmengen von  $< 0,91$  mmol [entspr. 0,2 % (v/v), wenn die Menge komplett in der Flüssigphase gelöst wäre] eingesetzt. Die eingesetzten Konzentrationen lagen unterhalb der Löslichkeitsgrenze von Toluol in diesem System, so dass Toluol nicht in Phase vorlag.

Das Wachstum von *R. eutropha* B9 auf Komplexmedium (Abb. 7A) wurde bereits ab einer Toluolmenge von 0,23 mmol [entspr. 0,05 % (v/v)] beeinträchtigt. Die Wachstumsraten waren deutlich verringert, und auch die Zellausbeuten waren sehr niedrig, was auf eine hohe Toxizität hindeutete. Ab einer Menge von 0,46 mmol [entspr. 0,1 % (v/v)] konnte kein Wachstum mehr festgestellt werden.

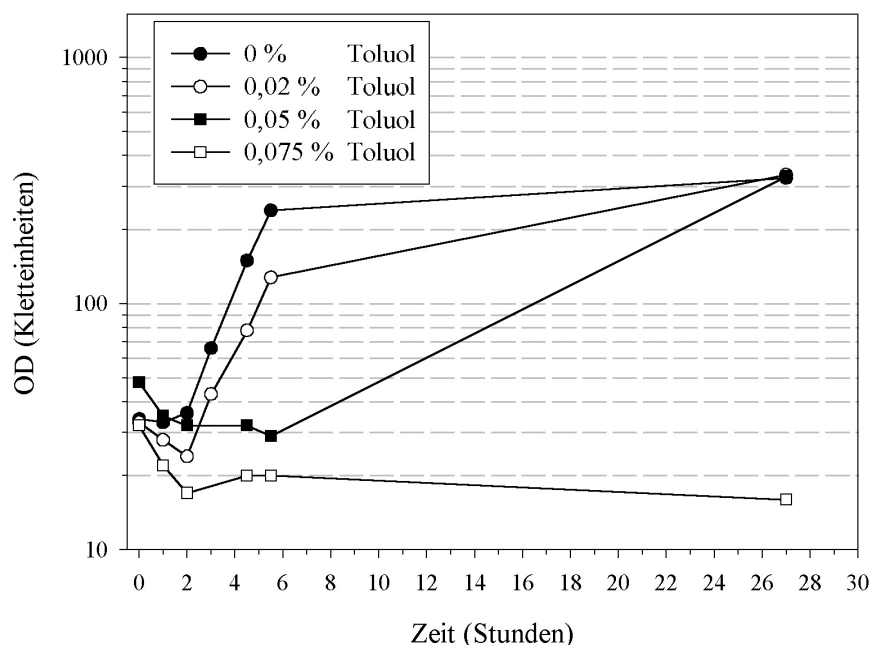
Sehr drastisch waren die Auswirkungen von Toluol, wenn *R. eutropha* B9 in Mineralmedium inkubiert wurde (Abb. 7B). Nach Zugabe der Zellen konnte zunächst nur eine Abnahme der optischen Dichte gemessen werden. Dies war darauf zurückzuführen, dass die Zellen aggregierten. Bereits bei Zugabe von 0,34 mmol Toluol [entspr. 0,075 % (v/v)] konnte kein Wachstum mehr beobachtet werden.

*R. eutropha* B9 tolerierte demnach nur sehr geringe Mengen an Toluol. Hinsichtlich bekannter Toleranzen von bis zu 50 % (v/v) Toluol (siehe Kapitel 3.4, Tab. 2) konnte *R. eutropha* nicht als toluoltoleranter Stamm eingestuft werden und war also nicht für eine technische Produktion von Benzoatdihydrodiol aus Toluol geeignet. Auch bei Umsätzen mit niedrigen Konzentrationen in kleinem Maßstab war mit Schwierigkeiten zu rechnen. Es bestand jedoch die Hoffnung, durch Einbringen der Gene für den Abbau von Toluol die Toleranz gegenüber Toluol steigern zu können.

## A) Komplexmedium



## B) Mineralmedium

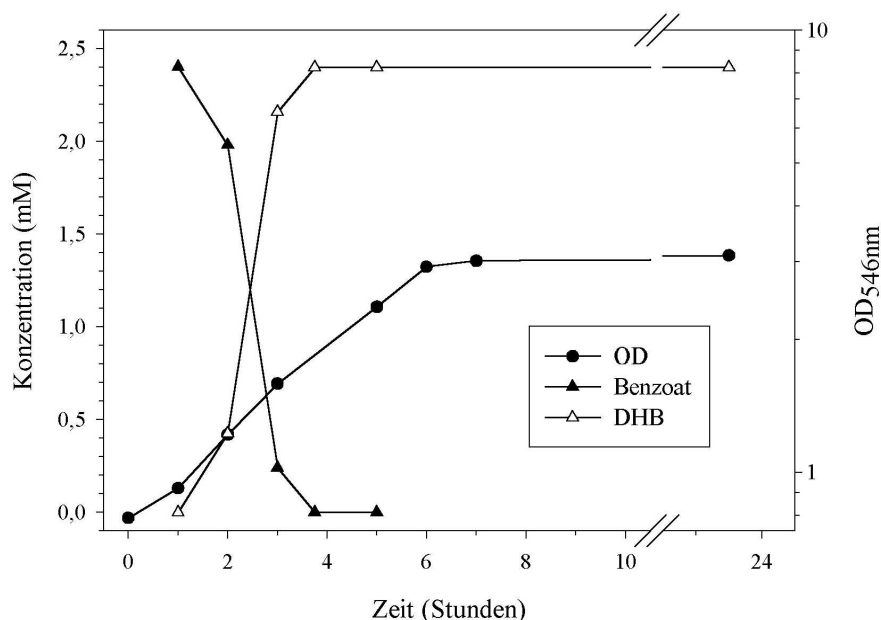


**Abb. 7:** Toluoltoleranz von *R. eutropha* B9 auf Komplex- (A) und auf Mineralmedium (B).

Die Zellen wurden über Nacht in Komplexmedium gezüchtet, am nächsten Morgen geerntet und mit sterilem Phosphatpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen sowohl in Komplexmedium (A) als auch in Mineralmedium (B) überimpft, das als C-Quelle 10 mM Fruktose enthielt. Die Inkubation erfolgte dabei in Klettkolben mit einer Flüssigphase von 50 ml und einer Gasphase von 315 ml. Es wurden Toluolmengen von 0,091, 0,23, 0,34 und 0,46 mmol [entspr. 0,02 %, 0,05 %, 0,075 % und 0,1 % (v/v) Toluol, wenn die Menge komplett in der Flüssigphase gelöst wäre] eingesetzt. Als Kontrolle diente jeweils ein Ansatz ohne Toluol. Die Zugabe von Toluol erfolgte über die wässrige Phase, bevor die Zellen überimpft wurden.

### 5.2.3 Induktion der Benzoat-Dioxygenase

Die Stämme *R. eutropha* 335 und *R. eutropha* B9 besitzen bereits das Gen für die Benzoat-Dioxygenase auf dem Chromosom. Demzufolge müssen nur noch die Gene für den Abbau von Toluol über Benzylalkohol, Benzaldehyd und Benzoat in die Stämme eingebracht werden. Es war nun von Interesse, wie schnell die Stämme in der Lage waren, den Abbauweg für Benzoat zu induzieren. Eine Ansammlung von Benzoat beim Abbau von Toluol könnte sich negativ auf die Reaktionsrate auswirken. Ein schneller Abbau von Benzoat würde zudem ein Ausschleusen von Benzoat ins Medium verhindern. Die Mutante *R. eutropha* B9 wurde auf Mineralmedium mit Fruktose als C-Quelle kultiviert. Nach einer Stunde wurde zur Induktion der Benzoat-Dioxygenase 2,5 mM Benzoat ins Medium gegeben. Es zeigte sich, dass der Stamm in der Lage war, das zugegebene Benzoat sofort zu Benzoatdihydrodiol umzusetzen (Abb. 8). Nach ca. drei Stunden konnte im Medium nur noch Benzoatdihydrodiol nachgewiesen werden, das bis zum Ende des Wachstums nicht weiter abgebaut wurde. Benzoat wurde vollständig zu Benzoatdihydrodiol umgesetzt. Das Wachstum wurde durch die Akkumulation von Benzoatdihydrodiol nicht beeinträchtigt.

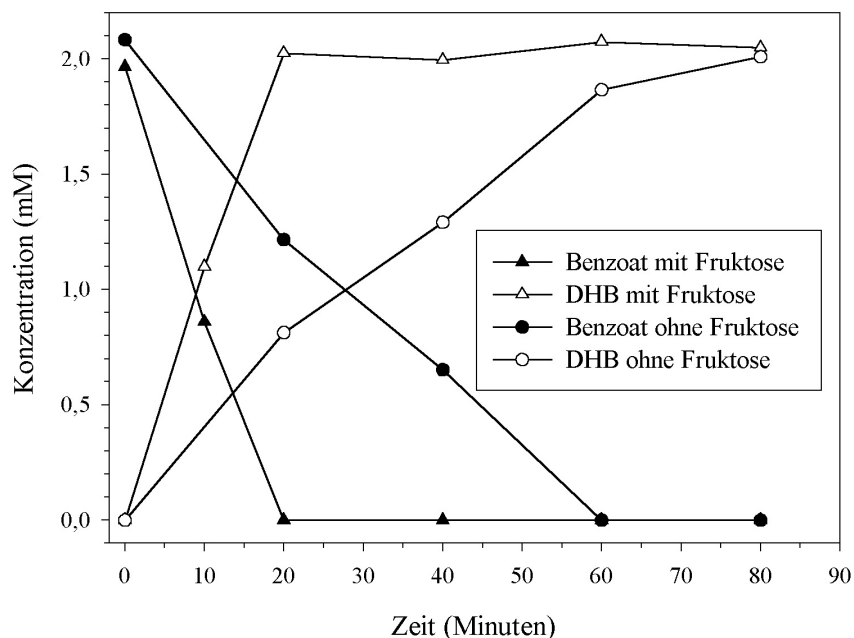


**Abb. 8:** Induktion der Benzoat-Dioxygenase von *R. eutropha* B9.

Die Zellen wurden über Nacht in Mineralmedium mit 10 mM Fruktose kultiviert und am nächsten Morgen in frisches Mineralmedium mit Fruktose überimpft. Die Zugabe von Benzoat (2,5 mM) erfolgte nach 60 Minuten Inkubation. Es wurden die optische Dichte (OD), die Abnahme von Benzoat und die Zunahme von Benzoatdihydrodiol (DHB) gemessen.

### 5.2.4 Umsatz von Benzoat zu Benzoatdihydrodiol

Um eine erste Einschätzung der Raum-Zeit-Ausbeuten des Benzoat-Umsatzes zu gewinnen, wurde die Aktivität der Benzoat-Dioxygenase in Ruhezellexperimenten bestimmt (siehe Kapitel 4.8). Um größere Mengen von Benzoat über einen längeren Zeitraum umsetzen zu können, benötigt *R. eutropha* B9 eine zusätzliche C-Quelle, da beim Umsatz von Benzoat zu Benzoatdihydrodiol Reduktionsäquivalente verbraucht werden, die nicht wieder regeneriert werden. Durch die Herstellung von Benzoat aus Toluol nach Komplettierung der entsprechenden Abbausequenz sollten später genügend Reduktionsäquivalente für einen vollständigen Umsatz zur Verfügung stehen (interne Cofaktorregeneration), so dass dann auf eine zusätzliche C-Quelle verzichtet werden kann. Wie Abb. 9 zeigt, beschleunigte die Zugabe eines Cosubstrates den Benzoatumsatz durch *R. eutropha* B9 entscheidend. Es wurden spezifische Aktivitäten von  $102,7 \text{ U} \cdot \text{g Zellprotein}^{-1}$  mit Fruktose bzw.  $30,8 \text{ U} \cdot \text{g Zellprotein}^{-1}$  ohne Fruktose ermittelt. Dies entsprach Produktbildungsraten von  $2,78$  bzw. von  $0,83 \text{ mmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g C}_X^{-1}$  ( $C_X = \text{Biotrockenmasse}$ ).



**Abb. 9:** Umsatz von Benzoat zu Benzoatdihydrodiol (DHB) mit *R. eutropha* B9.

Die Zellen wurden in Mineralmedium mit 10 mM Fruktose und 2 mM Benzoat als Induktor kultiviert, in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und einmal mit sterilem Phosphatpuffer gewaschen. Die optische Dichte der Zellsuspensionen in den Ansätzen wurde zu ca.  $OD_{546\text{nm}} = 4,8$  ( $C_X = 2,16 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ) eingestellt. Ein Ansatz für den Benzoat-Umsatz enthielt außer 2 mM Benzoat noch 1 mM Fruktose als Auxiliarsubstrat. In der Kontrolle wurde der Benzoat-Umsatz ohne Fruktose durchgeführt.

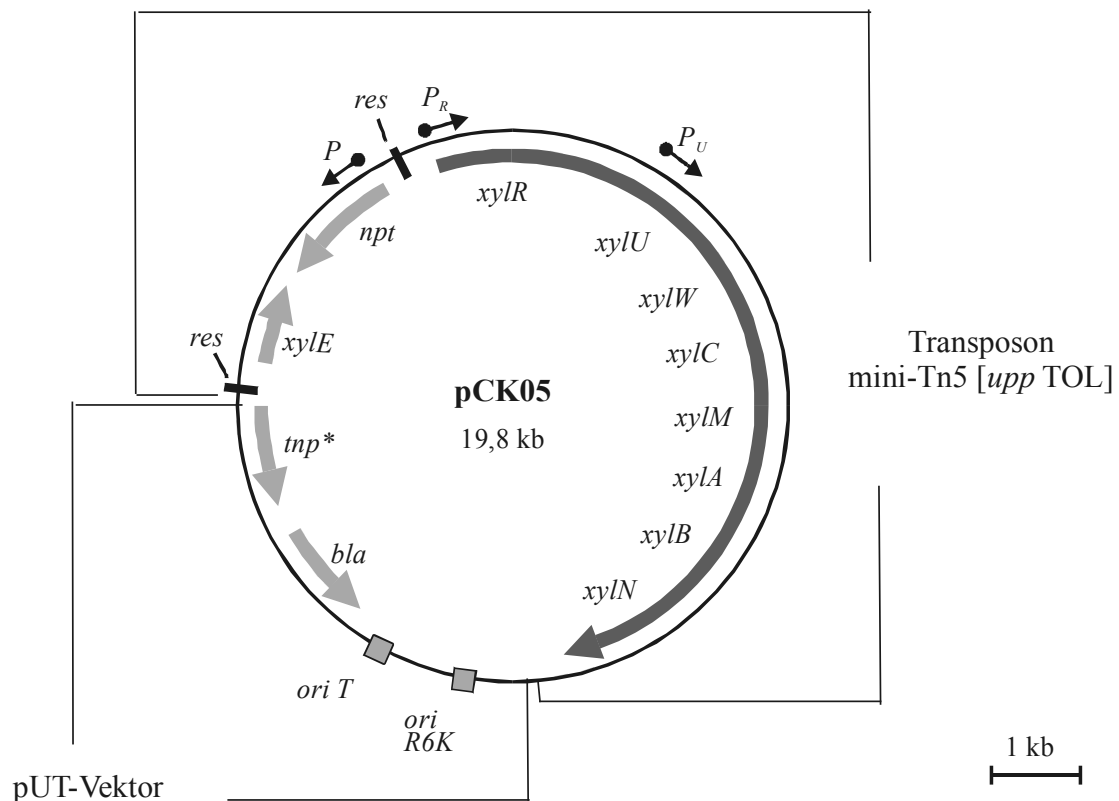
### 5.3 Einbringen der Gene für den Abbau von Toluol mittels Transposition in *R. eutropha*

Die Gene für den Abbau von Toluol sollten zusammen mit dem spezifischen Regulator mittels Transposition in das Chromosom von *R. eutropha* 335 und B9 integriert werden. Dazu mussten die für die Umwandlung von Toluol zu Benzoat erforderlichen Struktur- und Regulatorgene auf einem mobilen genetischen Element, dem Transposon, vereinigt werden (siehe Kapitel 3.5). Kloniert wurden Gene, die dem TOL-Plasmid pWW0 aus *P. putida* mt-2 entstammen. Die Klonierung der Gene für die Enzyme des Toluolabbaus zusammen mit dem spezifischen Regulator als eine funktionsfähige Einheit („catabolic segment *upp* TOL“) wurde bereits von der Arbeitsgruppe von de Lorenzo durchgeführt (Panke *et al.*, 1998). Das konstruierte Plasmid pCK05 mit dem „catabolic segment *upp* TOL“ auf einem Transposon wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

#### 5.3.1 pCK05 – Träger der Gene für den Toluolabbau

Als Träger des „catabolic segment *upp* TOL“ diente das mini-Tn5-Transposon (de Lorenzo *et al.*, 1990) mit den Selektionsmarkern für Kanamycin (*npt*) und Brenzcatechin-2,3-Dioxygenase (*xylE*) (Abb. 10). Links und rechts von beiden Genen sind die Erkennungssequenzen für eine Resolvase („*res* sites“) angebracht. Dadurch können die Selektionsmarker nach erfolgter Transposition mit Hilfe der RP4 Resolvase aus dem Transposon entfernt werden. Dies ist auch der Grund, weshalb eine Übertragung des Plasmids mit Hilfe des Stammes *E. coli* S17-1 nicht möglich war. Durch die Integration des RP4 Plasmids in das Chromosom dieses Stammes (Simon *et al.*, 1983) enthält dieser nicht nur die *tra*-Gene, wodurch er in der Lage ist, mobilisierbare Plasmide (*Mob*<sup>+</sup>) auf andere Bakterien zu übertragen, sondern auch die Resolvase, die für das Herausschneiden der Selektionsmarker aus dem Transposon verantwortlich ist. Zur Übertragung des Transposons wurde der Suizidvektor pUT (de Lorenzo & Timmis, 1994) verwendet. Dieser Vektor trägt das Gen der für die Transposition notwendigen Tn5-Transposase (*tnp*) sowie eine zusätzliche Ampicillinresistenz (*bla*). Durch den Replikationsursprung (*ori* R6K) kann der Vektor nur in speziellen *λpir* tragenden *E. coli*-Stämmen repliziert werden und geht somit bei der Transposition verloren. Mit Hilfe des Replikationsursprungs für den Transfer (*oriT*) ist der Vektor mobilisierbar (Abb. 10).



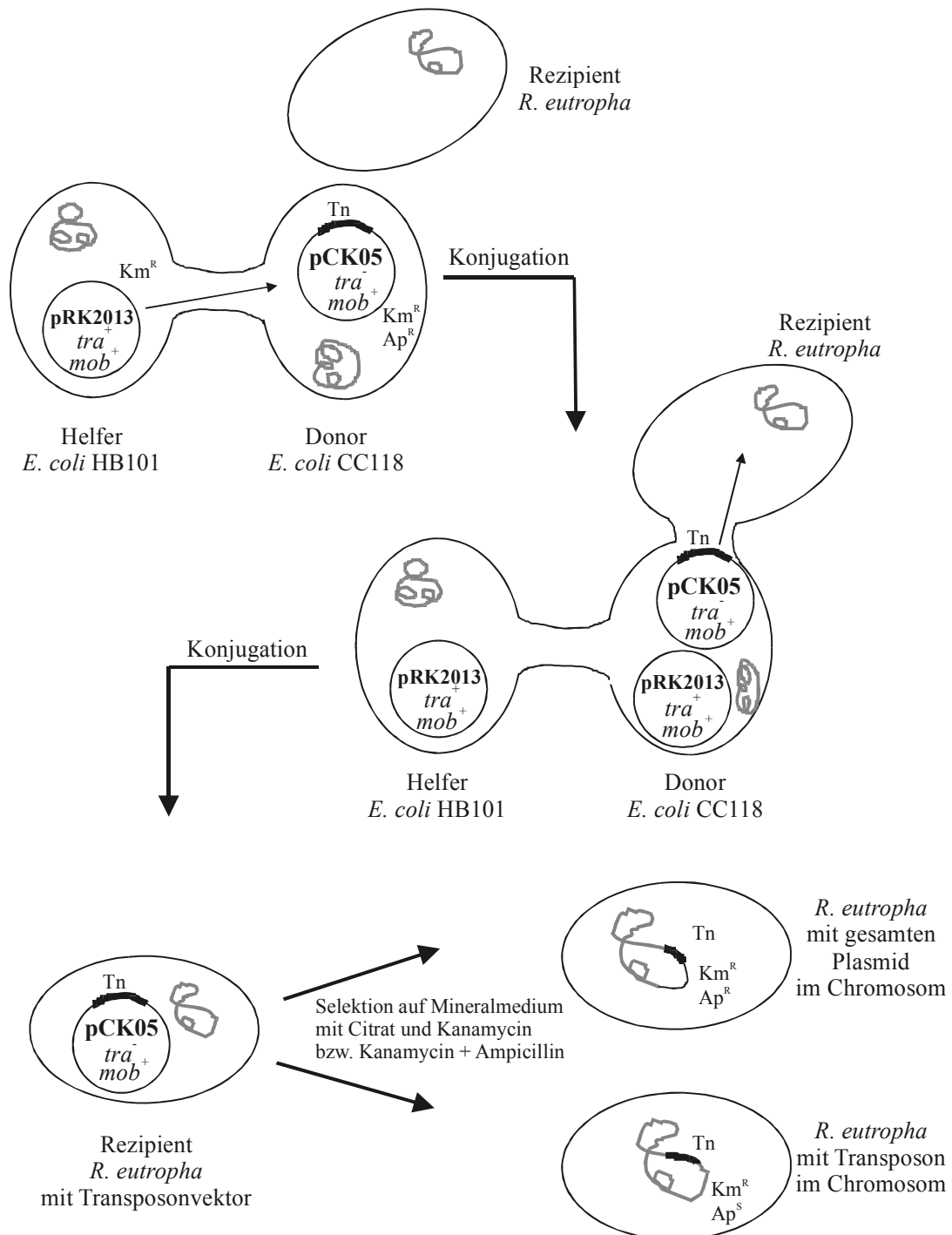


**Abb. 10:** Aufbau des Plasmids pCK05 mit dem „catabolic segment *upp* TOL“ auf einem Transposon. Träger des „catabolic segment *upp* TOL“ ist das mini-Tn5 Transposon. Das „catabolic segment *upp* TOL“ enthält die Gene für den Abbau von Toluol zu Benzoat (*xylUWCMABN*) einschließlich des Regulatorgens (*xylR*) sowie den Promotor-Operator-Regionen  $P_R$  und  $P_U$  (siehe Kapitel 3.5, Abb. 5). *xylE* (Brenzcatechin-2,3-Dioxygenase) und *npt* (Resistenz gegenüber Kanamycin) sind die Selektionsmarker des Transposons. Die Marker sind eingebettet in Erkennungssequenzen für eine Resolvase (*res*) und können auf diese Weise aus dem Transposon nach erfolgter Transposition ins Chromosom wieder entfernt werden. Als Träger des Transposons dient der pUT-Vektor. *tnp\**: Gen für die Tn5-Transposase ohne Restriktionsstellen für *NotI*; *bla*: Gen für die beta-Lactamase ( $Ap^R$ ); *ori R6K*: Replikationsursprung; *ori T*: Replikationsursprung für den Transfer.

### 5.3.2 Übertragung des Transposons in *R. eutropha* durch Konjugation

Da also *E. coli* S17-1 nicht als Donor verwendet werden konnte, musste für die Konjugation ein weiterer *E. coli* Stamm (*E. coli* HB101) eingesetzt werden, der das sogenannte Helferplasmid (pRK2013) enthielt. Dieses Plasmid trägt sowohl die *tra*- als auch die *mob*-Gene und kann sich somit selber mobilisieren. Dabei gelangt es in den Donorstamm (*E. coli* CC118  $\lambda$ pir), wo es das zu übertragende Plasmid (pCK05) mobilisiert (Abb. 11). Als Rezipienten wurden in den Konjugationsexperimenten (siehe Kapitel 4.20) die Stämme *R. eutropha* 335

und *R. eutropha* B9 eingesetzt. Selektiert wurde auf Mineralmedium mit Citrat als Kohlenstoff- und Energiequelle (Eliminierung der Donor- und Helferstämmen) und Kanamycin (Eliminierung von Zellen, die kein Transposon erhalten hatten). Da die beiden Stämme eine natürliche Resistenz gegenüber Kanamycin zeigten, musste dieses für die Selektion in einer höheren Konzentration von  $250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  statt  $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  eingesetzt werden (siehe Kapitel 4.2.3). Zudem wurden nur Kolonien gepickt, die bereits nach 24 Stunden gewachsen waren. Für das weitere Screening wurden die Kolonien mit einer einmolaren Brenzcatechin-Lösung besprüht, das mit Hilfe der im Transposon eingebauten Brenzcatechin-2,3-Dioxygenase zum gelbgefärbten 2-Hydroxymuconatsemialdehyd umgesetzt wurde. Die Insertionsrate des Transposons, definiert als das Verhältnis der Anzahl von Transkonjuganten zu der Anzahl an eingesetztem Empfängerstamm betrug  $10^{-5}$ . Die selektierten Kolonien wurden mittels Koloniehybridisierung auf das Vorhandensein des Transposons überprüft (siehe Kapitel 4.21). Als Sonde wurde ein markiertes Fragment des Gens der Xylol-Monooxygenase (*xylMA*) eingesetzt, des ersten Enzyms im Abbauweg. Mit PCR-Experimenten wurde der Einbau aller relevanten Gene (*xylR*, *xylMA*, *xylB*, *xylC*) überprüft (siehe Kapitel 4.22). Es konnten zehn Transkonjuganten von *R. eutropha* 335 (335\_TP15/21/28/34/41/42/43/46/47/50) und acht Transkonjuganten von *R. eutropha* B9 (B9\_TP6/19/20/32/44/50/51/52) isoliert werden, die den Abbauweg für Toluol ins Chromosom integriert hatten. Um zu überprüfen, ob diese Transkonjuganten nur das Transposon und nicht das gesamte Plasmid erhalten hatten, wurden diese auf eine zusätzliche Resistenz gegen Ampicillin getestet. Da *R. eutropha* bereits eine Resistenz gegen Ampicillin besaß (siehe Kapitel 4.2.3), wurden für den Test Ampicillinkonzentrationen über  $300 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  eingesetzt. Die isolierten Transkonjuganten waren nicht in der Lage, auf festem Mineralmedium mit Citrat als C-Quelle in Anwesenheit hoher Ampicillinkonzentrationen zu wachsen. Somit wurde ausgeschlossen, dass das komplette Plasmid in das Chromosom integriert worden war.



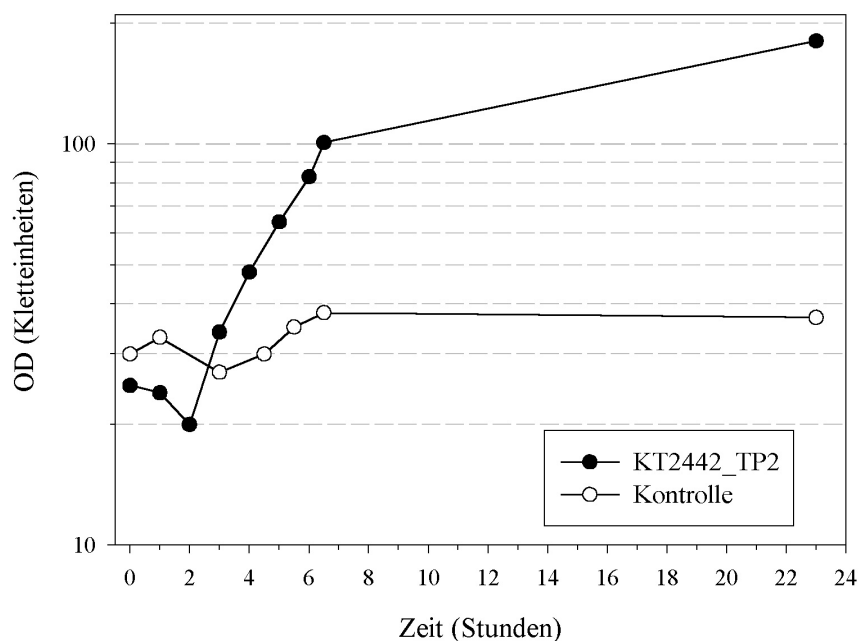
**Abb. 11:** Übertragung von pCK05 in *R. eutropha* durch Konjugation („triparental mating“). Das Helferplasmid pRK2013 gelangt mit Hilfe der *tra*- und *mob*-Gene in den Donorstamm *E. coli* CC118, Träger des Plasmids pCK05. Die Mobilisierungsproteine von pRK2013 ermöglichen dem Stamm, das Plasmid pCK05 in den Rezipienten *R. eutropha* zu übertragen. Anschließend erfolgt die Integration des Transposons (Tn) ins Chromosom durch die Aktivität der auf dem Plasmid codierten Transposase. Das Plasmid kann in *R. eutropha* nicht repliziert werden und geht somit verloren. Zellen, die ein Transposon erhalten haben, sind gegen Kanamycin resistent (Km<sup>R</sup> Selektionsmarker auf dem Transposon). Zellen, die neben Kanamycin auch eine Resistenz gegenüber Ampicillin zeigten (Ap<sup>R</sup> Selektionsmarker auf dem Plasmid), hatten das gesamte Plasmid ins Chromosom integriert. Diese Zellen könnten aufgrund der Aktivität der Transposase das Transposon wieder verlieren.

#### 5.4 Transkonjuganten von *R. eutropha* 335 und *R. eutropha* B9 mit Transposon

Die Transkonjuganten von *R. eutropha* 335 (335\_TP15/21/28/34/41/42/43/46/47/50) wurden auf ihre Fähigkeit, Toluol als alleinige C-Quelle nutzen zu können, überprüft. Um ein Entweichen von Toluol bei den Probenahmen zu verhindern, wurden die Zellen in Klettkolben kultiviert, und die optische Dichte mit Hilfe eines Klettphotometers bestimmt (siehe Kapitel 4.5). Die Zellen wurden zunächst in Mineralmedium ( $V = 50$  ml) mit 10 mM Fruktose und  $250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  Kanamycin kultiviert. Zur Induktion des auf dem Transposon liegenden Abbauweges wurden 0,09 mmol Toluol [entspr. 0,02 % (v/v), wenn die Menge komplett in der Flüssigphase gelöst wäre] zugegeben (siehe Kapitel 4.14). Anschließend wurden die Kulturen in Mineralmedium ( $V = 50$  ml) mit Toluol als einzigem Substrat überimpft. Dabei wurde das Toluol entweder direkt in die Flüssigphase gegeben oder über die Gasphase zugefügt. Es wurden Toluolmengen zwischen 0,091 und 0,46 mmol [entspr. 0,02 - 0,1 % (v/v)] eingesetzt. Keine der Transkonjuganten konnte mit Toluol wachsen.

Die Transkonjuganten der Mutante *R. eutropha* B9 (B9\_TP6/19/20/32/44/50/51/52) wurden auf ihre Fähigkeit, Toluol zu Benzoatdihydrodiol umzusetzen, getestet. Die Zellen wurden zunächst in Mineralmedium ( $V = 200$  ml) mit Fruktose und Kanamycin kultiviert (siehe Kapitel 4.4.2), und 0,38 mmol Toluol [entspr. 0,02 % (v/v)] wurden zur Induktion zugegeben. Für die Ruhezellexperimente wurden die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet (siehe Kapitel 4.8). Keine der Transkonjuganten setzte Toluol (eingesetzte Toluolmengen von 0,091 - 0,23 mmol in 50 ml Phosphatpuffer) zum Benzoatdihydrodiol um.

Die erfolgreiche Übertragung des Transposons in das Chromosom der Transkonjuganten war durch PCR-Experimente überprüft worden. Trotzdem waren die Transkonjuganten nicht in der Lage, Toluol abzubauen. Daher wurde zunächst die Funktionalität des Transposons bzw. des darin enthaltenen „catabolic segment *upp* TOL“ überprüft. Dazu wurden die Konjugationsexperimente mit dem Kontrollstamm *P. putida* KT2442 wiederholt. Dies ist der Stamm, mit dem die erfolgreiche Übertragung dieses Transposons zum erstenmal publiziert worden war (Panke *et al.*, 1998). Durch dieses Kontrollexperiment wurden wie in der Literatur beschrieben Transkonjuganten von *P. putida* KT2442 isoliert (KT2442\_TP2/3/5/6), die Toluol als C-Quelle verwerten konnten (Abb. 12). In den Ansätzen konnte kein Toluol mehr nachgewiesen werden.



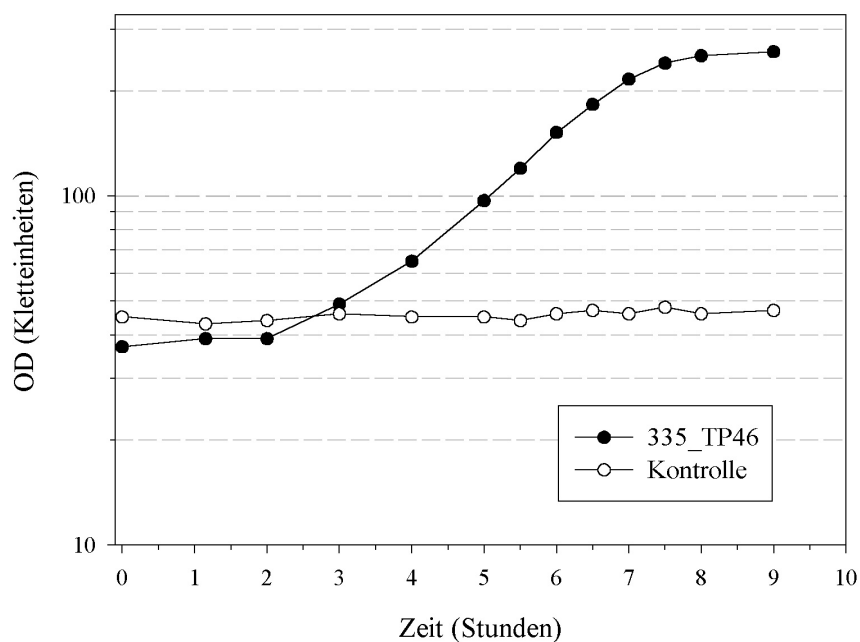
**Abb. 12:** Wachstum von *P. putida* KT2442\_TP2 mit Toluol.

Die Zellen der Transkonjugante *P. putida* KT2442\_TP2 wurden über Nacht auf Mineralmedium ( $V = 50$  ml) mit 10 mM Glukose und  $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  Kanamycin bei  $30^\circ\text{C}$  inkubiert. Zur Induktion der auf dem Transposon liegenden Gene wurden  $0,09$  mmol Toluol [entspr.  $0,02\%$  (v/v), wenn die Menge komplett in der Flüssigphase gelöst wäre] ins Medium gegeben. Am nächsten Morgen wurden die Zellen abzentrifugiert und einmal mit sterilem Phosphatpuffer gewaschen, um Reste der Glukose zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in frisches Mineralmedium ( $V = 50$  ml) mit Kanamycin überimpft, das als C-Quelle  $0,23$  mmol Toluol (entspr.  $0,05\%$  (v/v)) enthielt. Die optische Dichte wurde mit Hilfe eines Klettphotometers bestimmt (siehe Kapitel 4.5). Als Kontrolle wurde der Stamm *P. putida* KT2442 ohne Transposon eingesetzt. Das Medium zur Kultivierung der Kontrolle enthielt kein Kanamycin.

In den Transkonjuganten von *P. putida* KT2442 wurden also die Gene des „catabolic segment *upp* TOL“ exprimiert. Um auszuschließen, dass eine Induktion des Abbauweges mit Toluol aufgrund der Sensitivität von *R. eutropha* 335 und *R. eutropha* B9 gegenüber Toluol nicht stattgefunden hatte, wurden Versuche mit Benzylalkohol als Induktor durchgeführt. Dieser ist neben weiteren, weniger toxisch wirkenden aromatischen Verbindungen wie *m*-Methylbenzylalkohol und *m*-Aminotoluol, in der Lage, die Expression des Regulators XylR und damit die Expression der Gene des Abbauweges zu induzieren (Ramos *et al.*, 1997). Die Versuche wurden wie oben beschrieben wiederholt. Zur Induktion wurde  $0,02\%$  (v/v) Benzylalkohol statt Toluol zugegeben. Die anschließenden Wachstums- und Umsatzversuche wurden sowohl mit Toluol als auch mit Benzylalkohol durchgeführt. Die Transkonjuganten von *R. eutropha* konnten mit Benzylalkohol wachsen (Abb. 13) oder diesen zu Benzoatdihydrodiol umsetzen (Abb. 14). Die durchschnittlichen Wachstumsraten der Transkonjuganten von

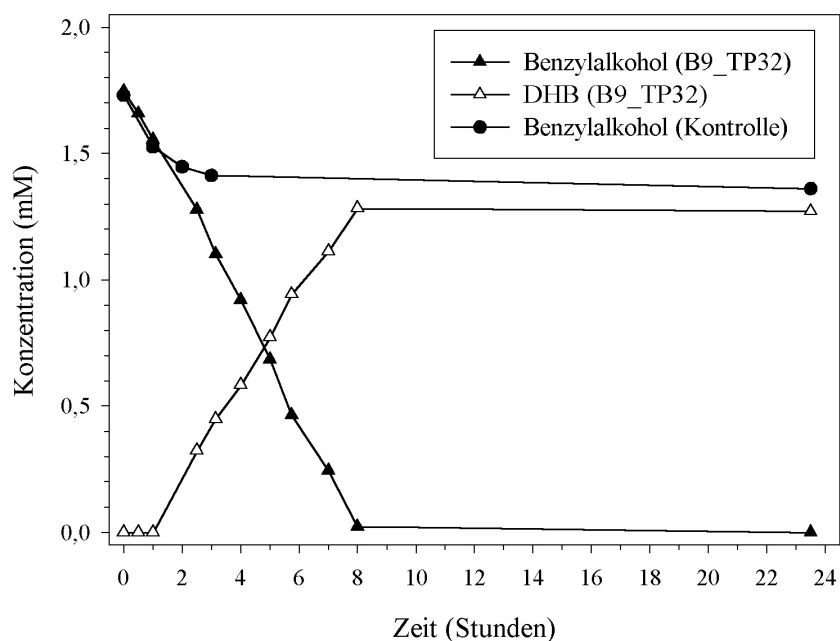
*R. eutropha* 335 betragen dabei  $0,4 \text{ h}^{-1}$ , was Verdopplungszeiten von ca. 1,7 Stunden entspricht. Mit Toluol als einziger C-Quelle (eingesetzte Toluolmengen von 0,09 - 0,23 mmol in 50 ml Mineralmedium) konnte wiederum kein Wachstum beobachtet werden.

Bei den Transkonjuganten von *R. eutropha* B9 wurde Benzoatdihydrodiol mit einer spezifischen Aktivität von  $5,2 \text{ U} \cdot \text{g Zellprotein}^{-1}$  bzw. mit einer Produktbildungsrate von  $0,14 \text{ mmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g C}_X^{-1}$  gebildet. Die Ausbeute an Benzoatdihydrodiol betrug 72,6 %. In den Kontrollansätzen konnte kein Wachstum oder Umsatz gemessen werden. Allerdings konnten beim Umsatz von Benzylalkohol mit der Kontrolle nach 24 Stunden nur noch ca. 80 % des zugegebenen Benzylalkohols nachgewiesen werden. Toluol konnte von keiner der Transkonjuganten umgesetzt werden (eingesetzte Toluolmengen von 0,09 - 0,23 mmol in 50 ml Phosphatpuffer).



**Abb. 13:** Wachstum von *R. eutropha* 335\_TP46 mit Benzylalkohol.

Die Zellen der Transkonjugante *R. eutropha* 335\_TP46 wurden in Mineralmedium ( $V = 50 \text{ ml}$ ) mit  $10 \text{ mM}$  Fruktose als C-Quelle und  $250 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  Kanamycin über Nacht bei  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. Zur Induktion der auf dem Transposon liegenden Gene wurde  $0,02 \%$  (v/v) Benzylalkohol zugegeben. Die Zellen wurden am nächsten Morgen in frisches Mineralmedium mit Kanamycin aber ohne Fruktose überimpft. Als Kohlenstoff- und Energiequelle wurde  $0,05 \%$  (v/v) Benzylalkohol zugegeben. Als Kontrolle wurde *R. eutropha* 335 ohne Transposon eingesetzt. Das Medium zur Kultivierung der Kontrolle enthielt kein Kanamycin.



**Abb. 14:** Umsatz von Benzylalcohol zu Benzoatdihydrodiol (DHB) mit *R. eutropha* B9\_TP32.

Die Zellen der Transkonjugante *R. eutropha* B9\_TP32 wurden in Mineralmedium ( $V = 50$  ml) mit 10 mM Fruktose,  $250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  Kanamycin und 0,02 % (v/v) Benzylalcohol als Induktor gezüchtet, in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und einmal mit sterilem Phosphatpuffer gewaschen. Die optische Dichte der Zellsuspensionen in den Ansätzen wurde zu ca.  $\text{OD}_{546\text{nm}} = 2,8$  ( $C_X = 1,26 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) eingestellt. Der Ansatz enthielt kein Auxiliarsubstrat. Als Kontrolle wurde *R. eutropha* B9 ohne Transposon eingesetzt. Das Medium zur Kultivierung der Kontrolle enthielt kein Kanamycin.

Benzylalcohol wurde von den Transkonjuganten von *R. eutropha* B9 zu Benzoatdihydrodiol umgewandelt, während der Stamm ohne Transposon nicht dazu in der Lage war. Somit war jeweils ein aktives Genprodukt der beiden Dehydrogenasen XylB (Benzylalcohol-Dehydrogenase) und XylC (Benzaldehyd-Dehydrogenase) exprimiert worden. Transkonjuganten, die nur mit Fruktose ohne Benzylalcohol inkubiert worden waren, bauten keinen Benzylalcohol ab. Damit konnte bestätigt werden, dass die Promotor-Operator-Region des eingebauten Abbaupfades für Toluol in Takt war. Die Xylol-Monooxygenase (XylMA), deren Gen zwischen den beiden Genen für die Dehydrogenasen angeordnet war, musste also zumindest transkribiert worden sein. Die positiven Transkonjuganten von *P. putida* KT2442 zeigten, dass das mit dem Transposon ins Chromosom integrierte „catabolic segment *upp* TOL“ keine Sequenzfehler haben konnte, da alle für den Abbau von Toluol notwendigen Enzyme aktiv exprimiert worden waren. Mögliche Mutationen in der Gensequenz für die Xylol-Monooxygenase, die zu einem Einbau falscher Aminosäuren oder gar zu einem Abbruch bei der Proteinsynthese führen, konnten somit erst bei der Transposition ins Chromosom von

*R. eutropha* stattgefunden haben. Um dies zu überprüfen, wurde das Gen für die Xylol-Monooxygenase (*xylMA*) aus jeweils einer Transkonjuganten von *R. eutropha* 335 (335\_TP46) und *R. eutropha* B9 (B9\_TP32) sequenziert. Die Primer wurden von der Sequenz für die Xylol-Monooxygenase aus *P. putida* mt-2 abgeleitet (siehe Kapitel 4.23). Dieser Stamm diente wie bereits beschrieben zur Konstruktion des „catabolic segment *upp* TOL“. Als Template wurde genomische DNA der beiden Transkonjuganten eingesetzt. Als Kontrolle diente das Transposon tragende Plasmid pCK05. Beim Vergleich der Sequenzen konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Da keine andere Erklärung gefunden werden konnte, muss angenommen werden, dass Toluol aufgrund seiner Toxizität für *R. eutropha* (siehe Kapitel 5.2.2) auf irgendeine Art und Weise seinen eigenen Umsatz hemmt, sei es in der Phase der Induktion oder des Umsatzes.

### **5.5 Einbau der Gene für den Abbau von Toluol auf einem zusätzlichen Plasmid in *R. eutropha***

Die zweite Strategie für den Einbau der initialen Gene der Toluoloxidation bestand darin, diese extrachromosomal auf einem Plasmid in einen geeigneten Rezipienten zu integrieren. Dazu musste das „catabolic segment *upp* TOL“ in spezielle Vektoren, sogenannte „broad-host-range“-Vektoren, kloniert werden. Diese Vektoren zeichnen sich dadurch aus, dass sie in der Lage sind, sich in vielen verschiedenen Wirten zu vermehren. Im Gegensatz dazu ist das Replikationssystem der „narrow-host-range“-Vektoren von einem spezifischen Wirt, meistens *E. coli*-Stämme, abhängig. Die Verwendung von Plasmiden statt Transposons hat den Vorteil, dass die erforderlichen Gene mit einer höheren Kopienzahl (< 20 für low-copy-Plasmide; > 100 - 1000 für high-copy-Plasmide; QIAprep Miniprep Handbook, April 1997) in die Empfängerstämme eingebaut werden können. Die Wahrscheinlichkeit einer Transposition dagegen ist relativ gering, so dass man davon ausgehen konnte, dass die Kopienzahl der ins Chromosom integrierten Gene höchstens 1 - 2 betrug. Die Idee bestand also darin, über die Gendosis die Konzentration an Enzymen, die den Abbau von Toluol zu Benzoat katalysieren, in der Zelle zu erhöhen und damit auch gleichzeitig die Reaktionsrate zu steigern (Plumeier *et al.*, 2002). Im Falle von *R. eutropha* B9 erhoffte man sich, auf diese Weise doch noch eine Transformation von Toluol durchführen zu können.

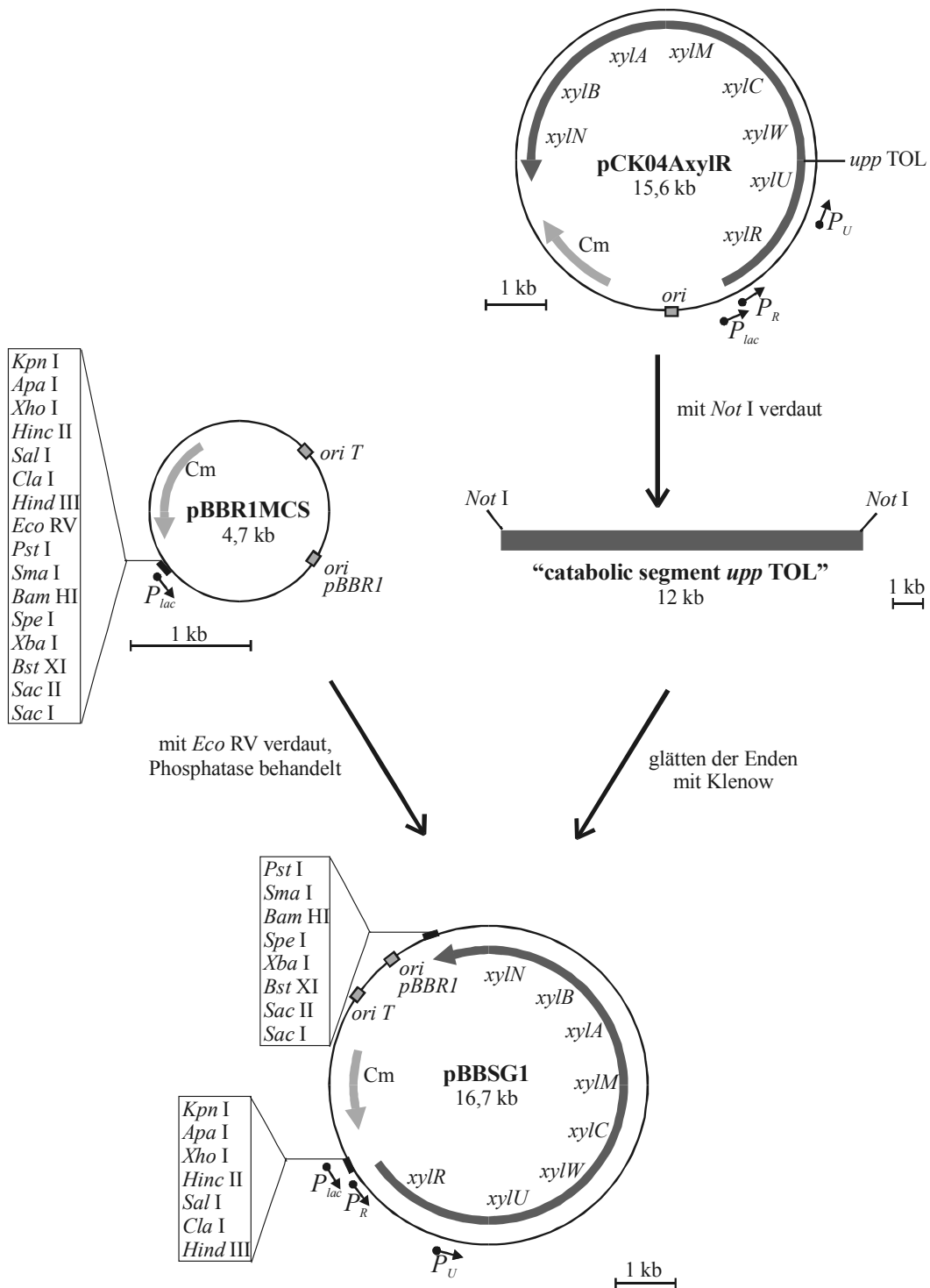


### 5.5.1 Konstruktion von Plasmiden mit den Genen für den Abbau von Toluol zu Benzoat

Zur Konstruktion wurden die „broad-host-range“-Vektoren pMMB66EH (Fürste *et al.*, 1986) und pBBR1MCS (Kovach *et al.*, 1994) eingesetzt.

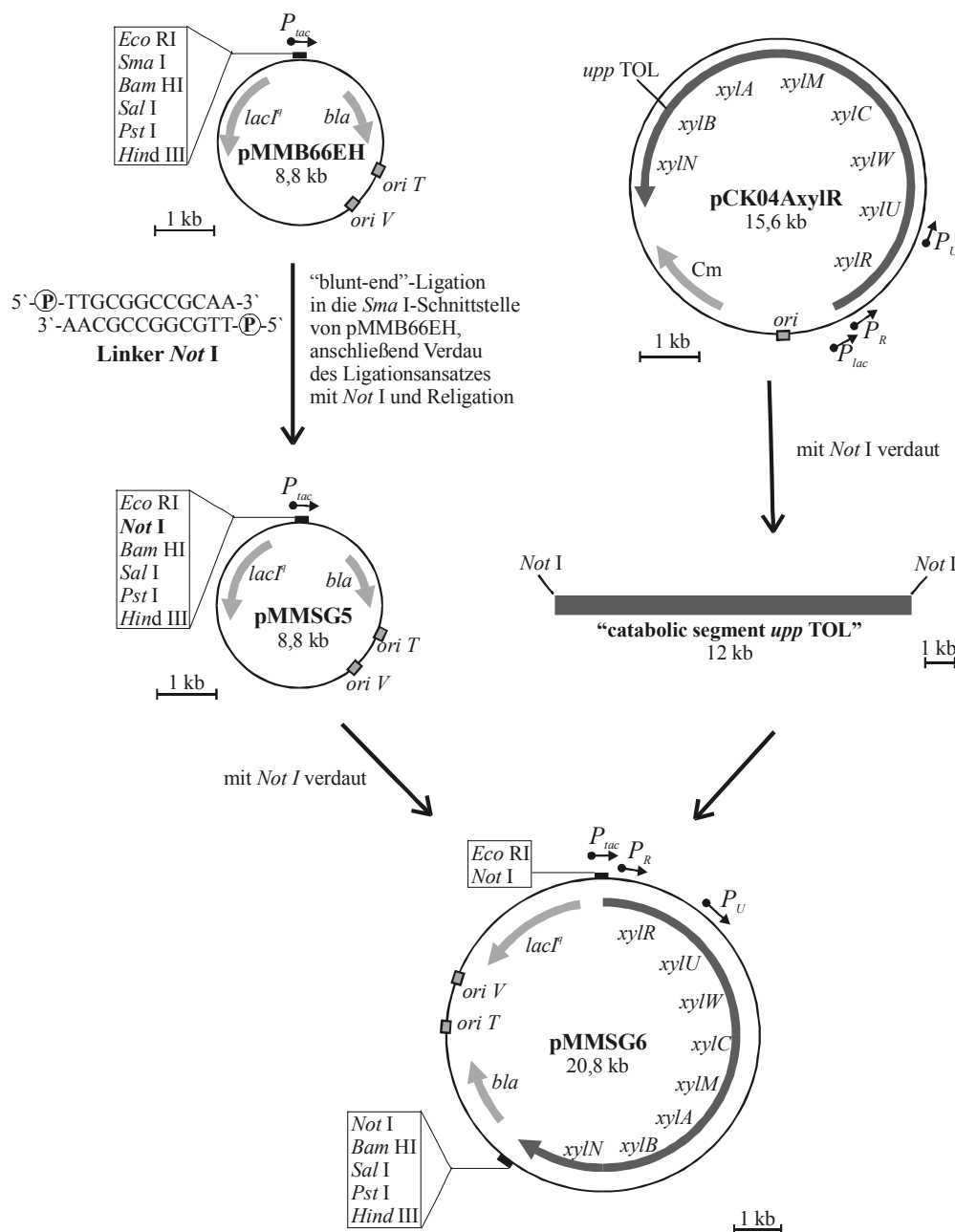
Im Vektor pBBR1MCS wurde der Replikationsursprung vom Plasmid pBBR1 aus *Bordetella bronchiseptica* S87 kombiniert mit dem pBluescript II KS-*lacZ* $\alpha$ -Polylinker. Der Vektor trägt das Genfragment für das  $\alpha$ -Peptid der  $\beta$ -Galaktosidase (*lacZ'*), wodurch mit Hilfe der „Blau-Weiß-Selektion“ nach rekombinanten Plasmiden gescreent werden kann (siehe Kapitel 4.2.3). Außerdem trägt der Vektor die Bakteriophagen-T3- und T7-Promotoren, die als Primeransatzpunkt für eine Sequenzierung dienen. Über den *lac*-Promotor ist eine gezielte Expression der klonierten Gene gewährleistet. Die Gene für den Abbau von Toluol zu Benzoat wurden durch eine „blunt-end“-Ligation des „catabolic segment *upp* TOL“ in den Vektor pBBR1MCS kloniert (Abb. 15). Die rekombinanten Plasmide wurden teilweise sequenziert (Primer T3 und T7, siehe Kapitel 4.23, Tab. 10), um die Richtung des eingefügten Segments (Transkription von *lac*-Promotor aus möglich oder Insertion des Segments entgegengesetzt) zu bestimmen. Das Plasmid wurde pBBSG1 genannt.

Der Vektor pMMB66EH (Fürste *et al.*, 1986) trägt für eine kontrollierte Transkription den *tac*-Promotor mit dem *lac*-Operator. Um die Expression unabhängig von Repressor-überproduzierenden Stämmen zu machen, wurde das Gen für den *lac*-Repressor (*lacI<sup>q</sup>*) eingebaut. Die Genkassette für die Expression wurde kombiniert mit dem RSF1010 Replikon, wodurch der Vektor in der Lage ist, sich in verschiedenen Gram-negativen Bakterien zu vermehren. Zur Selektion enthält der Vektor das Gen für die  $\beta$ -Lactamase (Ampicillinresistenz). Zur Klonierung der Gene für den Abbau von Toluol zu Benzoat wurde in den Vektor pMMB66EH eine *NotI*-Schnittstelle mit Hilfe von Linkern eingefügt (Abb. 16). In den neu konstruierten Vektor pMMSG5 wurde dann anschließend das „catabolic segment *upp* TOL“ ligiert (Abb. 16). Die Kolonien wurden durch Hybridisierung mit einer Sonde für das Gen der Xylol-Monooxygenase (*xylMA*) überprüft, um Plasmide mit Insert von religiertem Vektor zu unterscheiden. Die rekombinanten Plasmide wurden teilweise sequenziert (Primer pMMB66EH5 und pMMB66EH3, siehe Kapitel 4.23, Tab. 10), um die Richtung des eingefügten Segments (Transkription von *tac*-Promotor aus möglich oder Insertion des Segments entgegengesetzt) zu bestimmen. Das Plasmid wurde pMMSG6 genannt.



**Abb. 15:** Konstruktion des Plasmids pBBSG1.

Zur Klonierung des „catabolic segment *upp TOL*“ (Träger der Gene *xylRUCMABN* und Promotoren  $P_R$  und  $P_U$ , siehe Abb. 5) wurde der Vektor pBBR1MCS mit *EcoRV* geschnitten und die Enden dephosphoryliert, um eine Religation des Vektors zu vermeiden. Das „catabolic segment *upp TOL*“ wurde mit *NotI* aus dem Plasmid pCK04AxyIR ausgeschnitten, die überhängenden Enden mit dem Klenow-Enzym geglättet und anschließend in den Vektor ligiert. Der Ligationsansatz wurde in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert. Die Zellen wurden auf LB-Medium mit Chloramphenicol (10  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) sowie mit IPTG und X-Gal zur „Blau-Weiß-Selektion“ inkubiert.  $P_{lac}$ : lac-Promotor; *ori pBBR1*: Replikationsursprung; *ori T*: Replikationsursprung für den Transfer; *Cm*: Chloramphenicol-Resistenz.



**Abb. 16:** Konstruktion der Plasmide pMMSG5 und pMMSG6.

Zur Klonierung des „catabolic segment *upp TOL*“ (Träger der Gene *xylRUWCMABN* und Promotoren *P<sub>R</sub>* und *P<sub>U</sub>*, siehe Abb. 5) wurde in den Vektor pMMB66EH eine zusätzliche *Not I*-Schnittstelle eingefügt. Dazu wurden Linker entworfen, deren Sequenzen der *Not I*-Schnittstelle entsprachen. Der Linker wurde am 5'-Ende mit einer Phosphatgruppe modifiziert. Der Vektor wurde mit *Sma I* geschnitten, nicht dephosphoryliert und mit dem Linker für 20 Stunden ligiert. Dabei wurde der Linker im Überschuss eingesetzt (1 - 2  $\mu\text{g}$  zu 100 - 500 ng Plasmid-DNA). Der Ligationsansatz wurde danach fünf Stunden lang mit *Not I* verdaut und über ein Agarosegel gereinigt. Ein Teil wurde religiert (pMMSG5), damit der neu konstruierte Vektor für eine eventuelle Wiederholung der Ligation mit dem „catabolic segment *upp TOL*“ vermehrt werden konnte. Der andere Teil wurde mit dem „catabolic segment *upp TOL*“ ligiert, das zuvor mit *Not I* aus dem Vektor pCK04AxyIR ausgeschnitten worden war (pMMSG6). Der Ligationsansatz wurde in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert. Die Zellen wurden auf LB-Medium mit Ampicillin (100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) inkubiert. Positive Klone wurden mit einer Sonde für *xylMA* detektiert. *P<sub>tac</sub>*: tac-Promotor; *lacI<sup>r</sup>*: lac-Repressor; *bla*:  $\beta$ -Lactamase; *ori V*: Replikationsursprung; *ori T*: Replikationsursprung für den Transfer; *P<sub>tac</sub>*: lac-Promotor; Cm: Chloramphenicol-Resistenz.

### 5.5.2 Übertragung der Plasmide in *R. eutropha* 335 und *R. eutropha* B9

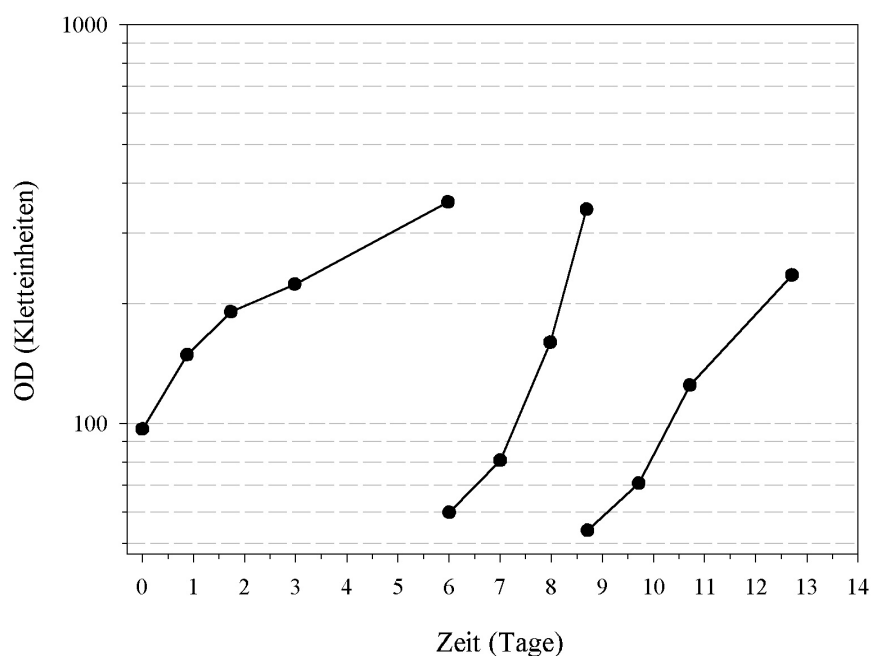
Für die Übertragung der Plasmide pBBSG1 und pMMSG6 in *R. eutropha* durch Konjugation wurden Filterkreuzungen durchgeführt (siehe Kapitel 4.20). Zur Übertragung des Plasmids pBBSG1 wurde dieses in *E. coli* S17-1 (Simon *et al.*, 1983) transformiert. Selektiert wurde auf Mineralmedium mit Citrat als C-Quelle (Eliminierung von *E. coli* S17-1) und Chloramphenicol (Eliminierung von Stämmen, die kein Plasmid erhalten hatten). Die Übertragung von pMMSG6 erfolgte mit einem Helferplasmid (pRK2013) wie es für die Übertragung des Transposons in *R. eutropha* bereits beschrieben wurde (siehe Kapitel 5.3.2). Zur Selektion (siehe oben) wurde Ampicillin statt Chloramphenicol eingesetzt. Da *R. eutropha* bereits eine natürliche Resistenz gegenüber Ampicillin zeigte, musste dieses in einer Konzentration von  $300 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  eingesetzt werden (siehe Kapitel 4.2.3). Mit Primern spezifisch für den „backbone“ der jeweiligen Plasmide (Primer pBBf1799/pBBr2809 und pMMf3541/pMMr5011 siehe Kapitel 4.23, Tab. 10) wurde überprüft, ob die Transkonjuganten tatsächlich die Plasmide erhalten hatten. Für *R. eutropha* 335 konnten sowohl Transkonjuganten mit dem Plasmid pBBSG1 (335\_PL1/2/3/4/5), als auch Transkonjuganten mit dem Plasmid pMMSG6 (335\_PL6 und 7) isoliert werden. Von *R. eutropha* B9 konnten nur Transkonjuganten mit dem Plasmid pBBSG1 (B9\_PL1/2/3/4) isoliert werden.

### 5.6 Transkonjuganten von *R. eutropha* mit Plasmid

Es wurden zunächst die Transkonjuganten von *R. eutropha* 335 mit Plasmid auf Wachstum mit Toluol als C-Quelle überprüft. Um ein Entweichen von Toluol bei den Probenahmen durch Öffnen der Kolben zu verhindern, wurden die Zellen in Klettkolben ( $V_{\text{Medium}} = 50 \text{ ml}$ ,  $V_{\text{Gasphase}} = 315 \text{ ml}$ ) inkubiert. Die Bestimmung der optischen Dichte erfolgte mit Hilfe eines Klettphotometers (siehe Kapitel 4.5). Die Zellen wurden auf Mineralmedium mit 10 mM Fruktose,  $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  Chloramphenicol (bzw.  $300 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  Ampicillin) und 0,09 mmol Toluol [entspr. 0,02 % (v/v), wenn die Menge komplett in der Flüssigphase gelöst wäre] zur Induktion der Promotor-Operator-Region des Inserts bzw. mit 1 mM IPTG zur Induktion der Promotor-Operator-Region des Plasmids inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen in Mineralmedium mit Toluol (Zugabe von 0,091 - 0,23 mmol Toluol in 50 ml Mineralmedium) als einzigem Substrat überimpft. Es konnte kein Wachstum beobachtet werden.

Daher wurde das Wachstum der Transkonjuganten mit Benzylalkohol untersucht (siehe Kapitel 5.4). Die Versuche wurden wie oben beschrieben wiederholt. Zur Induktion wurde 0,02 %

(v/v) Benzylalkohol statt Toluol oder IPTG zugegeben. Die Zellen wurden anschließend auf Mineralmedium mit 0,05 % (v/v) Benzylalkohol als einziger C-Quelle überimpft. Die Transkonjuganten, die das Plasmid pBBSG1 erhalten hatten, konnten mit Benzylalkohol wachsen (Abb. 17). Das Ende der Wachstumsphase wurde allerdings erst nach zwei bis drei Tagen erreicht. Die durchschnittlichen Wachstumsraten betragen dabei  $0,03 \text{ h}^{-1}$ , was Verdopplungszeiten von ca. 23 Stunden entspricht. Transkonjuganten, bei denen die Gene mit dem Transposon integriert worden waren, wuchsen dagegen mit Verdopplungszeiten von 1,7 Stunden (siehe Kapitel 5.4).



**Abb. 17:** Wachstum von *R. eutropha* 335\_PL2 mit Benzylalkohol.

Die Zellen der Transkonjugante *R. eutropha* 335\_PL2 mit dem Plasmid pBBSG1 wurden in Mineralmedium mit 10 mM Fruktose als C-Quelle und  $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  Chloramphenicol über Nacht bei  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. Zur Induktion der auf dem Transposon liegenden Gene wurde 0,02 % (v/v) Benzylalkohol zugegeben. Die Zellen wurden am nächsten Morgen in frisches Mineralmedium mit Chloramphenicol ohne Fruktose überimpft. Als Kohlenstoff- und Energiequelle wurde 0,05 % (v/v) Benzylalkohol zugegeben. Die Kultur wurde nach 6 bzw. nach 8 Tagen 1:10 in frisches Mineralmedium mit Benzylalkohol überimpft.

Mit Zellen, die das Plasmid pMMSG6 trugen, konnte auch nach mehreren Tagen keine Zunahme der optischen Dichte bestimmt werden. Mit Primern spezifisch für den „back-bone“ des Plasmids (siehe oben) wurde überprüft, ob die Transkonjuganten das Plasmid eventuell während der Kultivierung verloren hatten. Das Plasmid konnte tatsächlich nicht mehr nachgewiesen werden. Wahrscheinlich war aufgrund der natürlichen Resistenz des Stammes gegenüber Ampicillin der Selektionsdruck nicht ausreichend.

Die Transkonjuganten von *R. eutropha* B9 mit dem Plasmid pBBSG1 wurden auf ihre Fähigkeit, Toluol zu Benzoatdihydrodiol umzusetzen, getestet. Die Zellen wurden zunächst in Mineralmedium ( $V = 200$  ml) mit Fruktose und  $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  Chloramphenicol kultiviert, und zur Induktion wurden entweder 1 mM IPTG oder 0,02 % (v/v) Benzylalkohol oder 0,38 mmol Toluol [entspr. 0,02 % (v/v)] zugegeben. Gegen Ende der exponentiellen Wachstumsphase (nach ca. fünf Stunden) wurden die Zellen für Ruhezellexperimente entnommen (siehe Kapitel 4.8). Keine der Transkonjuganten setzte weder Toluol (eingesetzte Toluolmengen von 0,091 - 0,23 mmol in 50 ml Phosphatpuffer) noch Benzylalkohol zu Benzoatdihydrodiol um.

Auch die Transkonjuganten von *R. eutropha* mit Plasmid waren also nicht in der Lage, mit Toluol zu wachsen oder dieses zu Benzoatdihydrodiol umzusetzen. Auch beim Wachstum mit bzw. beim Umsatz von Benzylalkohol zeigten die plasmidtragenden Zellen im Gegensatz zu den Zellen mit dem Transposon im Chromosom keine bzw. nur schwache Aktivitäten. Daher wurden keine weiteren Untersuchungen mit den Transkonjuganten von *R. eutropha* durchgeführt.

## 5.7 Eigenschaften von *P. putida* U-JT103

*P. putida* U-JT103 ist ein Derivat von *P. putida* U (Dagley *et al.*, 1965). Bei diesem Stamm liegt eine Blockade im Abbau von Benzoatdihydrodiol zu Brenzcatechin vor, so dass es beim Umsatz von Benzoat zu einer Akkumulation von Benzoatdihydrodiol kommt (Morawski *et al.*, 1997). Im Folgenden wurde die Verwertung verschiedener C-Quellen (insbesondere von Toluol und von Zwischenprodukten der Toluoloxidation), die Toleranz gegenüber Toluol und die Eigenschaft, Benzoat zu Benzoatdihydrodiol umzusetzen, näher untersucht.

### 5.7.1 Wachstum auf verschiedenen C-Quellen

Aus Literaturangaben ging hervor, dass der Wildtypstamm *P. putida* U alkylierte Benzole darunter auch Toluol und andere aromatische Verbindungen wie Phenol oder Benzoat als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen kann (Lang, 1996). Die von diesem Stamm abgeleitete Mutante *P. putida* U-JT103 war hinsichtlich ihrer Fähigkeit, bestimmte aromatische Verbindungen abzubauen, noch nicht überprüft worden. In Tab. 12 ist das Wachstum von *P. putida* U und *P. putida* U-JT103 auf verschiedenen C-Quellen dargestellt.

Im Gegensatz zum Wildtyp *P. putida* U war die Mutante *P. putida* U-JT103 nicht in der Lage, mit Toluol als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle zu wachsen. HPLC-Analysen des Kulturüberstandes zeigten außerdem, dass Toluol nicht abgebaut worden war, und dass keine Zwischenprodukte gebildet worden waren. Auch aromatische Verbindungen wie Benzylalkohol, Benzaldehyd, *o*-, *m*- oder *p*-Kresole konnten nicht als C-Quelle verwertet werden. Somit eignete sich der Stamm für die Übertragung der Gene für den Abbau von Toluol über Benzoat (Methylgruppenoxidation) sehr gut. Auch *P. putida* U-JT103 konnte wie *R. eutropha* B9 Phenol als C-Quelle nutzen. Da aber, wie bereits erwähnt, Phenol erst bei der zellfreien Aufarbeitung von Benzoatdihydrodiol entsteht, eignet sich der Stamm trotzdem für eine Konstruktion. Bei Verwendung von Glukose als C-Quelle konnten die höchsten Wachstumsraten (Verdopplungszeiten von ca. 1,0 - 1,5 Stunden) und Zellausbeuten (OD<sub>Klett</sub> 350 - 400) verzeichnet werden. Auch Citrat, Succinat und Acetat eigneten sich als Energielieferanten (Verdopplungszeiten von 2,5 - 3,3 Stunden, OD<sub>Klett</sub> 200 - 350). Das Wachstum auf Fruktose zeigte eine lag-Phase von sechs Stunden. Die Kultivierung von *P. putida* U-JT103 erfolgte daher auf Komplexmedium oder auf Mineralmedium mit Glukose oder Citrat als C-Quelle.

**Tab. 12:** Wachstum von *P. putida* U und *P. putida* U-JT103 auf verschiedenen C-Quellen

C-Quelle	OD-Zunahme bei Inkubation von		Beobachtungen
	<i>P. putida</i> U	<i>P. putida</i> U-JT103	
Glukose	+	+	Wachstum innerhalb von 5 Stunden
Fruktose	+	+	Wachstum über Nacht nach lag-Phase von ca. 6 Stunden
Citrat	+	+	Wachstum innerhalb von 10 Stunden
Succinat	n.b.	+	Wachstum innerhalb von 10 Stunden
Acetat	n.b.	+	Wachstum innerhalb von 5 Stunden
Salicylat	n.b.	–	
Toluol	+ <sup>*)</sup>	–	Toluol im Ansatz von U-JT103 nicht umgesetzt
Benzylalkohol	n.b.	–	
Benzaldehyd	n.b.	–	
Benzoat	+	– <sup>**) )</sup>	
Benzoatdihydrodiol	+	–	
Phenol	+ <sup>*)</sup>	+	Geringe Zunahme der optischen Dichte nach ca. 7 Tagen messbar
<i>o</i> -Kresol	– <sup>*)</sup>	–	
<i>m</i> -Kresol	– <sup>*)</sup>	–	
<i>p</i> -Kresol	– <sup>*)</sup>	–	

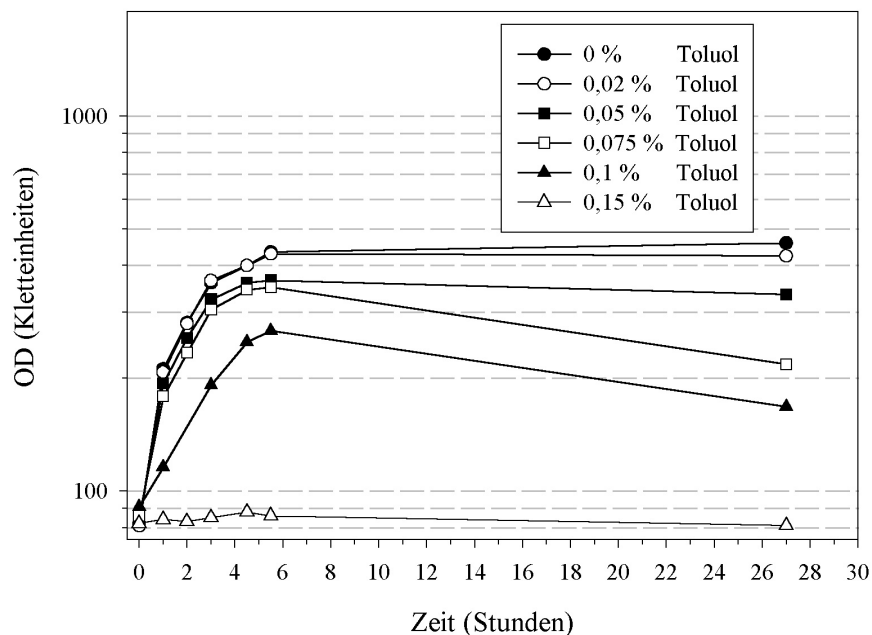
+, Wachstum; –, kein Wachstum; +<sup>\*)</sup> bzw. –<sup>\*)</sup>, Angaben aus Literatur (Lang, 1996); –<sup>\*\*) )</sup> Bildung von Revertanten möglich, die Benzoat wieder als C-Quelle verwerten können (siehe Kapitel 5.9 und 5.10). n.b., nicht bestimmt. Die Zellen wurden über Nacht in Komplexmedium inkubiert, am nächsten Morgen geerntet und mit sterilem Phosphatpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in Mineralmedium mit der jeweiligen C-Quelle überimpft. Die Zellen wurden in Klettkolben mit einer Flüssigphase von 50 ml und einer Gasphase von 315 ml inkubiert. Die optische Dichte wurde mit Hilfe eines Klettphotometers bestimmt (siehe Kapitel 4.5). Die Konzentration von Glukose, Fruktose, Citrat, Succinat und Acetat betrug 10 mM. Alle wasserlöslichen aromatischen Verbindungen wurden in einer Konzentration von 2 mM zugegeben. Von Toluol wurden 0,09 mmol direkt in die wässrige Phase zudosiert [entspr. 0,02 % (v/v) bzw. 1,8 mM Toluol, wenn die Menge komplett in der Flüssigphase gelöst wäre; siehe Kapitel 4.14].

### 5.7.2 Untersuchungen zur Toluoltoleranz

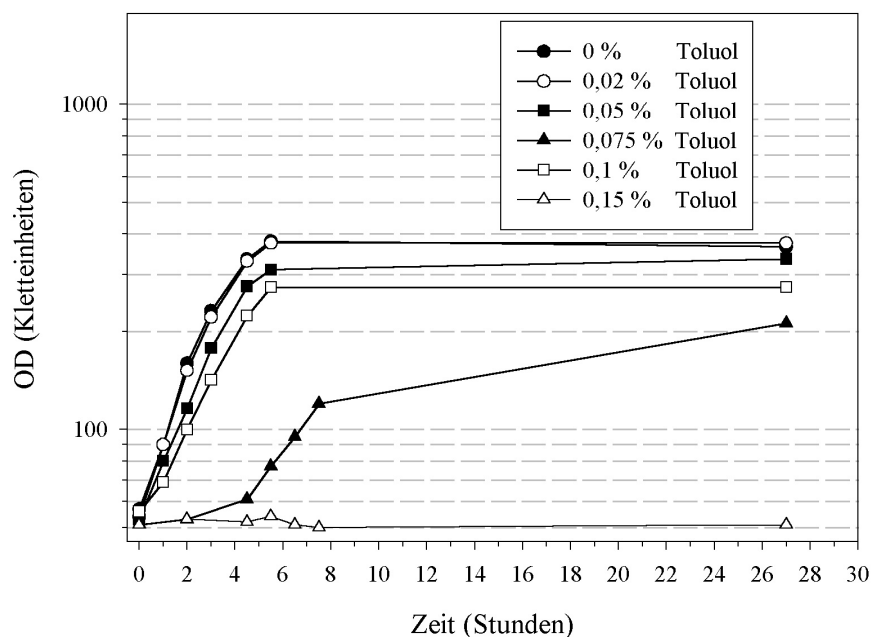
*P. putida* U-JT103 konnte also Toluol nicht als C-Quelle verwerten. Für die eventuelle Nutzung dieses Stammes zur Biotransformation war aber nicht bekannt, welche Mengen an Toluol in Anwesenheit einer zusätzlichen Kohlenstoff- und Energiequelle von diesem Stamm toleriert werden konnten. Die Versuche hierzu wurden analog zu den Untersuchungen zur Toluoltoleranz von *R. eutropha* B9 (siehe Kapitel 5.2.2) durchgeführt (Abb. 18).



## A) Komplexmedium



## B) Mineralmedium



**Abb. 18:** Toluoltoleranz von *P. putida* U-JT103 auf Komplex- und auf Mineralmedium.

Die Zellen wurden über Nacht in Komplexmedium wachsen gelassen, am nächsten Morgen gerntet und mit sterilem Phosphatpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen sowohl in Komplexmedium (A) als auch in Mineralmedium (B) überimpft, das als C-Quelle 10 mM Glukose enthielt. Die Inkubation erfolgte dabei in Klettkolben mit einer Flüssigphase von 50 ml und einer Gasphase von 315 ml. Es wurden Toluolmengen von 0,091, 0,23, 0,34 und 0,46 mmol [entspr. 0,02 %, 0,05 %, 0,075 % und 0,1 % (v/v) Toluol, wenn die Menge komplett in der Flüssigphase gelöst wäre] eingesetzt. Als Kontrolle diente jeweils ein Ansatz ohne Toluol. Die Zugabe von Toluol erfolgte über die wässrige Phase, bevor die Zellen überimpft wurden.

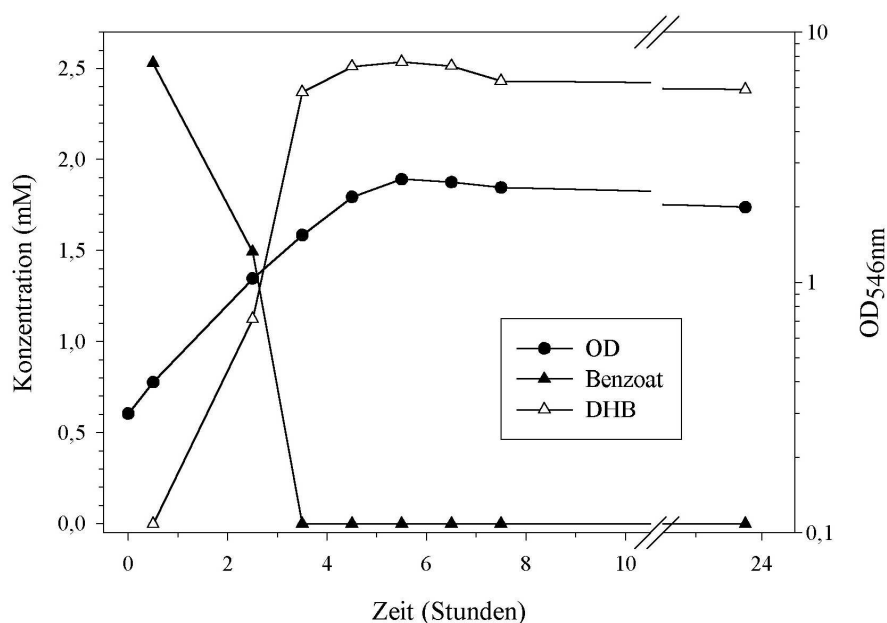
*P. putida* U-JT103 tolerierte auf Komplexmedium (Abb. 18A) Toluolmengen bis zu 0,46 mmol [entspr. 0,1 % (v/v)]. Es konnten in jedem Ansatz ähnliche Wachstumsraten ermittelt werden wie im Kontrollansatz ohne Toluol. Das Wachstum wurde also nicht beeinträchtigt. Ab Toluolmengen von 0,34 mmol [entspr. 0,075 % (v/v)] wurde gegen Ende der Wachstumsphase eine starke Abnahme der optischen Dichte gemessen. Dies könnte auf ein Absterben der Zellen hindeuten. Nach einer Zugabe von 0,68 mmol Toluol [entspr. 0,15 % (v/v)] konnte gar kein Wachstum mehr beobachtet werden.

Das Verhalten von *P. putida* U-JT103 auf Mineralmedium ähnelte dem auf Komplexmedium (Abb. 18B). Die Wachstumsraten blieben ähnlich, allerdings gab es in Anwesenheit von 0,46 mmol Toluol eine verlängerte lag-Phase. Ab einer Zugabe von 0,68 mmol Toluol war der Stamm nicht mehr in der Lage zu wachsen. Eine Abnahme der optischen Dichte, wie sie auf Komplexmedium erfolgt war, wurde nicht beobachtet.

Auch *P. putida* U-JT103 tolerierte wie *R. eutropha* B9 nur sehr geringe Mengen an Toluol, und eröffnete für den technischen Prozess keine bessere Perspektive. Allerdings zeigte dieser Stamm nicht die ausgeprägten Wachstumsschwierigkeiten wie dies bei *R. eutropha* B9 aufgetreten war. Auch hier bestand die Möglichkeit, die Toleranz gegenüber Toluol durch Einbringen der Gene für den Abbau steigern zu können.

### 5.7.3 Induktion der Benzoat-Dioxygenase

*P. putida* U-JT103 besitzt bereits das Gen für die Benzoat-Dioxygenase vermutlich auf dem Chromosom, so dass für die vorgesehene Transformation nur noch die Gene für den Abbau von Toluol über Benzylalkohol und Benzaldehyd zu Benzoat in den Stamm integriert werden mussten. Auch bei diesem Stamm sollte zunächst geprüft werden, wie schnell der Abbau von Benzoat zu Benzoatdihydrodiol induziert wird, insbesondere wenn Glukose als Kohlenstoff- und Energiequelle eingesetzt wird. Die Versuche hierzu wurden analog zu den Untersuchungen zur Induktion der Benzoat-Dioxygenase von *R. eutropha* B9 (siehe Kapitel 5.2.3) durchgeführt. Wie Abb. 19 zeigt, wurde das zugegebene Benzoat sofort zu Benzoatdihydrodiol umgesetzt. Eine mögliche Katabolit-Repression durch Glukose, (Collier *et al.*, 1996; Duetz *et al.*, 1994; Holtel *et al.*, 1994) konnte ausgeschlossen werden. Das zugegebene Benzoat wurde innerhalb von zwei Stunden vollständig zu Benzoatdihydrodiol umgesetzt, welches im weiteren Verlauf nicht weiter abgebaut wurde. Das Wachstum wurde durch den Umsatz nicht beeinträchtigt.

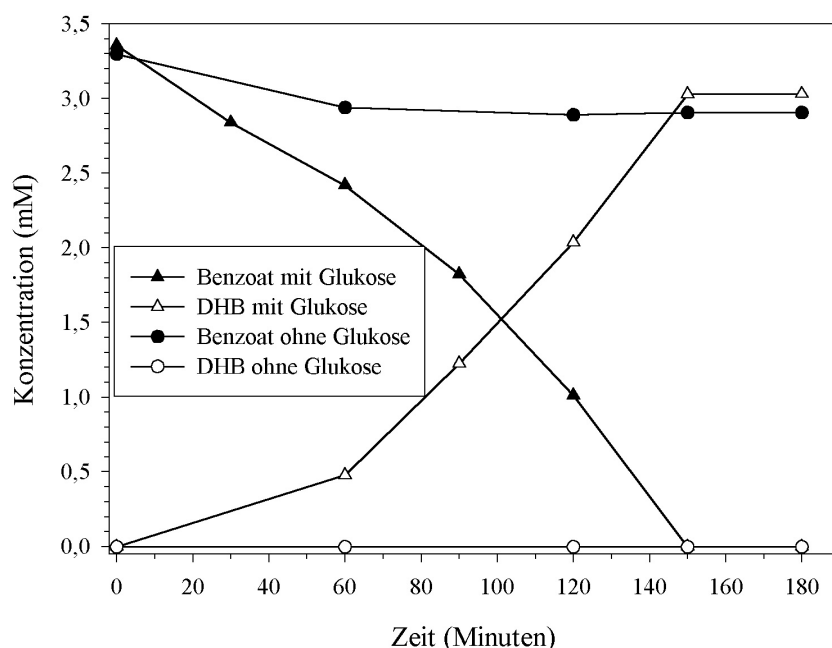


**Abb. 19:** Induktion der Benzoat-Dioxygenase von *P. putida* U-JT103.

Die Zellen wurden über Nacht in Mineralmedium mit 10 mM Glukose kultiviert und am nächsten Morgen in frisches Mineralmedium mit Glukose überimpft. Die Zugabe von Benzoat erfolgte nach 30 Minuten Inkubation. Es wurden die optische Dichte (OD), die Abnahme von Benzoat und die Zunahme von Benzoatdihydrodiol (DHB) gemessen.

#### 5.7.4 Umsatz von Benzoat zu Benzoatdihydrodiol

Um eine erste Einschätzung erzielbarer Raum-Zeit-Ausbeuten zu gewinnen, wurde die Aktivität der Benzoat-Dioxygenase aus *P. putida* U-JT103 in Ruhezelleexperimenten bestimmt (siehe Kapitel 4.8). Mit Zugabe von Glukose wurde Benzoatdihydrodiol mit einer spezifischen Aktivität von  $65 \text{ U} \cdot \text{g Zellprotein}^{-1}$  (Produktbildungsrate =  $2 \text{ mmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g C}_X^{-1}$ ) aus Benzoat gebildet (Abb. 20). Zur Bestimmung der Aktivität wurde der Zeitraum zwischen 60 und 150 Minuten gewählt. Die Ausbeute betrug 99 %. Der Stamm war ohne Zugabe eines Co-substrates nicht in der Lage, Benzoat sofort umzusetzen (Abb. 20). Erst nach 24 Stunden war Benzoat zu Benzoatdihydrodiol abgebaut, allerdings betrug die Ausbeute an Benzoatdihydrodiol dann nur 30 % (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 20:** Umsatz von Benzoat zu Benzoatdihydrodiol (DHB) mit *P. putida* U-JT103.

Die Zellen wurden in Mineralmedium mit 10 mM Glukose und 2 mM Benzoat als Induktor kultiviert, in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und einmal mit sterilem Phosphatpuffer gewaschen. Die optische Dichte der Zellsuspensionen in den Ansätzen wurde zu ca.  $OD_{546nm} = 2$  ( $C_x = 0,78g \cdot l^{-1}$ ) eingestellt. Jeweils einer der Ansätze enthielt außer Benzoat noch 1 mM Glukose als Auxiliarsubstrat.

## 5.8 Einbringen der Gene für den Abbau von Toluol mittels Transposition in *P. putida*

Für den Einbau der Gene auf einem Transposon in *P. putida* U-JT103 wurde das Plasmid pCK05 verwendet (siehe Kapitel 5.3.1). Für die Übertragung des Transposons wurden Kreuzungsexperimente zwischen drei Stämmen durchgeführt („triparental mating“). Die Versuche hierzu wurden analog zur Übertragung des Transposons durch Konjugation in *R. eutropha* B9 (siehe Kapitel 5.3.2) durchgeführt. Zur Eliminierung von Donor- und Helferstämmen wurde Mineralmedium mit Citrat als C-Quelle verwendet. Zur Selektion gegen Zellen, die kein Transposon erhalten hatten, wurde Kanamycin in einer Konzentration von  $30 \mu g \cdot ml^{-1}$  eingesetzt (siehe Kapitel 4.2.3). Nach dem Sprühtest mit Brenzcatechin betrug die Insertionsrate des Transposons, definiert als das Verhältnis der Anzahl von Transkonjuganten zu der Anzahl an eingesetztem Empfängerstamm,  $10^{-5}$ . Die selektierten Kolonien wurden mit Hilfe der Koloniehybridisierung (siehe Kapitel 4.21) auf das Vorhandensein des Transposons überprüft. Als Sonde wurde ein markiertes Fragment des Gens der Xylol-Monooxygenase (*xylMA*) ein-

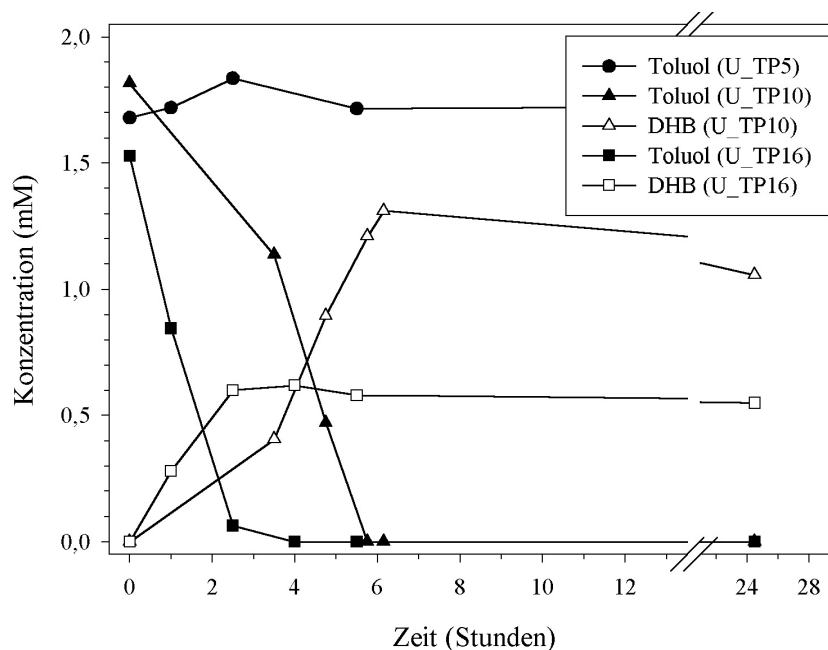
gesetzt, des ersten Enzyms im Abbauweg. Mit PCR-Experimenten (siehe Kapitel 4.22) wurde der Einbau aller relevanten Gene (*xyIR*, *xyIMA*, *xyIB*, *xyIC*) kontrolliert. Es konnten fünf Transkonjuganten (U\_TP5/6/8/10/16) isoliert werden, die den Abbauweg für Toluol ins Chromosom integriert hatten. Bei diesen Transkonjuganten lag nur das Transposon und nicht das gesamte Plasmid im Chromosom integriert vor (Test auf Ampicillinresistenz, siehe Kapitel 5.3.2).

### 5.9 Transkonjuganten von *P. putida* U-JT103 mit Transposon

Die Transkonjuganten der Mutante *P. putida* U-JT103 wurden auf ihre Fähigkeit, Toluol zu Benzoatdihydrodiol umzusetzen, getestet. Aufgrund einer möglichen Katabolit-Repression durch Glukose (Duetz *et al.*, 1994) wurden die Zellen zunächst in Mineralmedium ( $V = 200$  ml) mit Citrat und  $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  Kanamycin kultiviert (siehe Kapitel 4.4.2). Zur Induktion wurde  $0,38$  mmol Toluol [entspr.  $0,02$  % (v/v), wenn die Menge komplett in der wässrigen Phase gelöst wäre] zugegeben, das auch gleichzeitig als Transformationssubstrat diente. Während des Wachstums wurde die Abnahme von Toluol bzw. die Zunahme von Benzoatdihydrodiol gemessen (Abb. 21). Vier der fünf Transkonjuganten waren in der Lage, Toluol zu Benzoatdihydrodiol abzubauen. Allerdings betrugen die Ausbeuten an Benzoatdihydrodiol nach 24 Stunden nur  $40 - 60$  %.

Zunächst wurde vermutet, dass die Zellen ihre Aktivität verloren hatten und deshalb nicht mehr in der Lage waren, das Toluol umzusetzen. Deshalb wurden den Ansätzen entweder frische Zellen oder nochmals die gleiche Menge an Toluol zugegeben. In den Ansätzen mit frischen Zellen konnte keine Zunahme an Benzoatdihydrodiol gemessen werden. In den Ansätzen mit zusätzlichem Toluol wurde dieses vollständig abgebaut, aber die Ausbeute an Benzoatdihydrodiol betrug wiederum nur ca.  $60$  %. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die Zellen ihre Aktivität verloren hatten. Da sich das Gleichgewicht von Toluol zwischen der wässrigen Phase und der Gasphase relativ schnell einstellte (siehe Kapitel 4.14), konnte die schlechte Bilanz auch nicht darauf zurückgeführt werden, dass sich das Toluol nicht schnell genug aus der Gasphase in die wässrige Phase löste.

Deshalb sollten im Folgenden die Ursachen für die Bilanzlücke beim Abbau von Toluol zu Benzoatdihydrodiol durch die Transkonjuganten von *P. putida* U-JT103 herausgefunden werden. Für weitere Untersuchungen wurde die Transkonjugante U\_TP10, mit der die höchste Ausbeute an Benzoatdihydrodiol erzielt worden war (Abb. 21), eingesetzt.

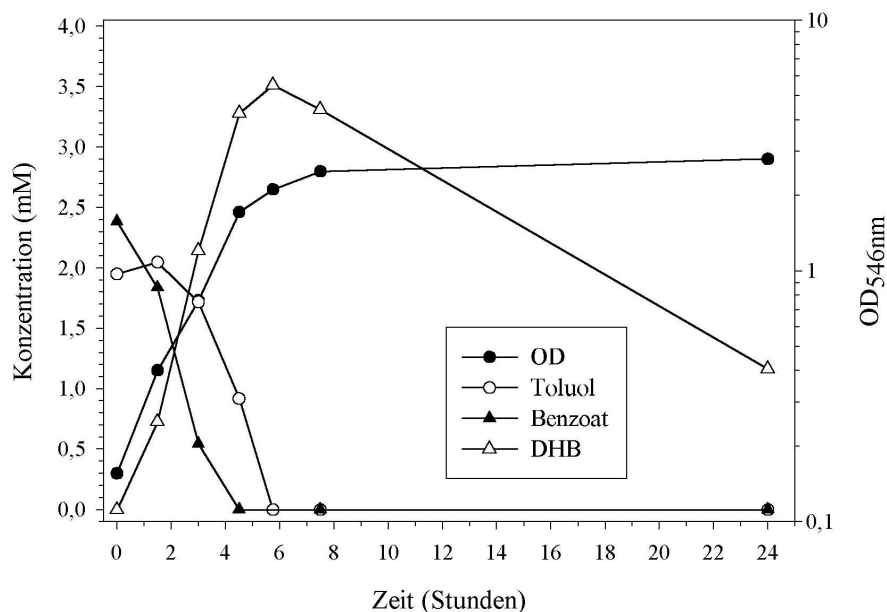


**Abb. 21:** Abbau von Toluol zu Benzoatdihydrodiol (DHB) während des Wachstums durch verschiedene Transkonjuganten (U\_TP5, U\_TP10, U\_TP16) von *P. putida* U-JT103.

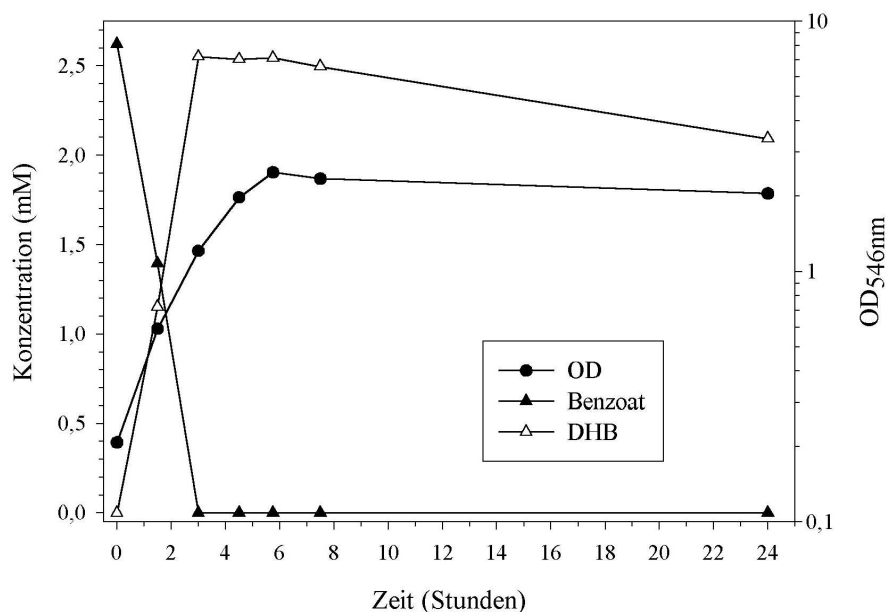
Die Zellen wurden in Mineralmedium mit 10 mM Citrat als C-Quelle und  $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  Kanamycin über Nacht bei  $30^\circ\text{C}$  kultiviert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen in frisches Mineralmedium ( $V = 200 \text{ ml}$ ) mit 10 mM Citrat in Gegenwart von Kanamycin überimpft. Zur Induktion der Gene auf dem Transposon und als Transformationssubstrat wurde  $0,38 \text{ mmol}$  Toluol [entspr.  $0,02 \%$  (v/v) bzw.  $1,8 \text{ mM}$  Toluol, wenn die Menge komplett in der Flüssigphase gelöst wäre; so auch im Diagramm dargestellt] zugegeben. Es wurden die Abnahme von Toluol, die Zunahme von Benzoatdihydrodiol (DHB) und die optische Dichte gemessen. Der Verlauf der optischen Dichte ist nicht dargestellt. Die DHB-Konzentration im Ansatz mit U\_TP5 lag unterhalb von  $0,1 \text{ mM}$  und ist nicht dargestellt.

Für eine spätere Produktion konnte Citrat nicht als C-Quelle eingesetzt werden, da die Kosten für die Anzucht der Zellen zu hoch werden würden. Daher wurde zunächst das Wachstum der Transkonjugante U\_TP10 mit Glukose wiederholt. Zur Induktion der Zellen wurde sowohl  $0,38 \text{ mmol}$  Toluol als auch  $2 \text{ mM}$  Benzoat zugegeben. Dadurch sollte gewährleistet sein, dass die Benzoat-Dioxygenase das aus Toluol gebildete Benzoat sofort zu Benzoatdihydrodiol umsetzen konnte. So sollte eine vorübergehende Akkumulation von toxischem Benzoat in der Zelle verhindert werden können. In einem zweiten Ansatz wurden die Zellen nur mit  $2 \text{ mM}$  Benzoat ohne Toluol induziert. Als Kontrolle diente der Ausgangsstamm *P. putida* U-JT103. Auch die Kontrolle wurde mit Toluol und Benzoat bzw. nur mit Benzoat induziert. In Abb. 22 ist das Wachstum der Transkonjugante U\_TP10 dargestellt.

## A) Induktion mit Toluol und Benzoat:



## B) Induktion mit Benzoat:

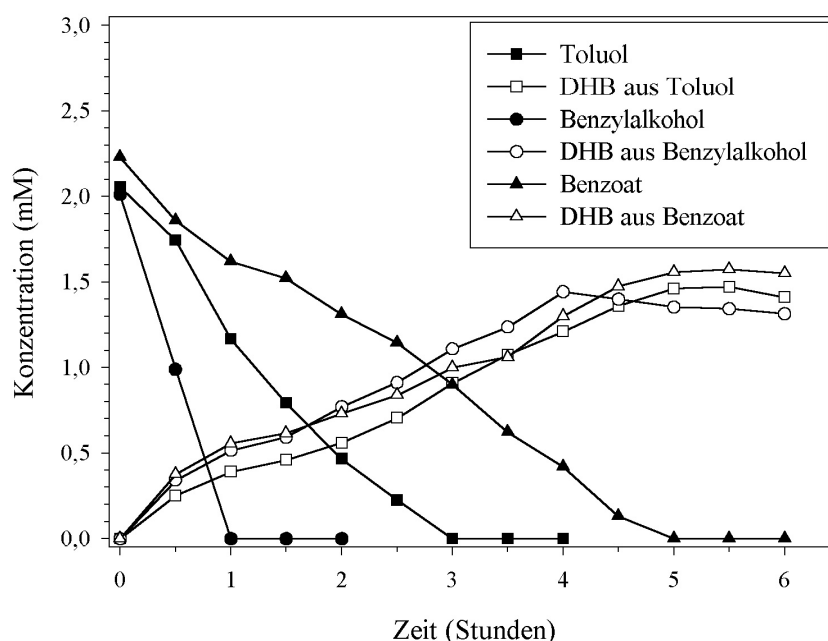


**Abb. 22:** Wachstum der Transkonjugante U\_TP10 auf Glukose bei Induktion mit Toluol und Benzoat (A) bzw. mit Benzoat ohne Toluol (B) und gleichzeitigem Umsatz der Induktoren.

Die Zellen wurden auf Mineralmedium mit 10 mM Glukose und  $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  Kanamycin bei  $30^\circ\text{C}$  über Nacht kultiviert. Am nächsten Morgen wurden diese in frisches Mineralmedium ( $V = 200 \text{ ml}$ ) mit 10 mM Glukose und  $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  Kanamycin überimpft. Zur Induktion und als Transformationssubstrate wurden  $0,38 \text{ mmol}$  Toluol [entspr.  $0,02 \%$  (v/v) bzw.  $1,8 \text{ mM}$ , wenn die Menge komplett in der Flüssigphase gelöst wäre, so auch im Diagramm dargestellt] und  $2 \text{ mM}$  Benzoat (A) oder nur  $2 \text{ mM}$  Benzoat (B) zugegeben. Es wurden die optische Dichte (OD), die Abnahme der Transformationssubstrate und die Zunahme an Benzoatdihydrodiol (DHB) gemessen.

Im Gegensatz zu Benzoat, das sofort zu Benzoatdihydrodiol abgebaut wurde, erfolgte die Induktion für den Abbau von Toluol erst in der zweiten Hälfte der exponentiellen Wachstumsphase. Die verzögerte Induktion war vermutlich bedingt durch die Katabolit-Repression des *xyl*-Operons durch Glukose (Duetz *et al.* 1996; Duetz *et al.*, 1994; Holtel *et al.*, 1994). In den Kontrollansätzen wurde nur Benzoat nicht aber Toluol zu Benzoatdihydrodiol abgebaut (nicht dargestellt).

Nach ca. 4,5 Stunden wurde jeweils ein Teil der Zellen aus allen Ansätzen (auch aus den Kontrollansätzen) für Ruhezelleexperimente abzentrifugiert (siehe Kapitel 4.8), während der Rest der Kultur weiter kultiviert wurde. Zellen der Transkonjugante U\_TP10, die sowohl mit Toluol als auch mit Benzoat induziert worden waren, waren in der Lage, Toluol, Benzylalkohol und Benzoat zu Benzoatdihydrodiol umzusetzen (Abb. 23).



**Abb. 23:** Umsatz von Toluol, Benzylalkohol und Benzoat zu Benzoatdihydrodiol (DHB) mit Ruhezellen der Transkonjugante U\_TP10 (induziert mit Toluol und Benzoat).

Ein Teil der Zellen aus Ansatz A (Abb. 22) wurde in der exponentiellen Wachstumsphase (nach 4,5 h) abzentrifugiert und einmal mit sterilem Phosphatpuffer gewaschen. Die Ruhezelleexperimente wurden in Phosphatpuffer mit einem Volumen von 50 ml ( $V_{\text{Gasphase}} = 315$  ml) durchgeführt. Der Umsatz von Toluol wurde durch Zugabe von 0,09 mmol Toluol [entspr. 0,02 % (v/v) bzw. 1,8 mM Toluol, wenn die Menge komplett in der Flüssigphase gelöst wäre; so auch im Diagramm dargestellt] gestartet. Die Umsätze von Benzylalkohol und Benzoat enthielten jeweils 2 mM Substrat. Zudem enthielten alle Ansätze Glukose (1 mM) als Auxiliarsubstrat. Die optische Dichte der Zellsuspensionen in den Ansätzen wurde zu ca.  $OD_{546\text{nm}} = 1,6$  ( $C_X = 0,62 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) eingestellt.



Die Produktbildungsraten waren in allen drei Ansätzen ähnlich. Dagegen unterschieden sich die Substratabnahmeraten untereinander sowie im Verhältnis zu den Produktbildungsraten erheblich (Tab. 13). Benzoat wurde fast doppelt so schnell abgebaut wie Benzoatdihydrodiol entstanden war. In den Umsätzen mit Toluol oder Benzylalkohol waren die Raten der Substratabnahme sogar 3-fach bzw. 6-fach höher als die Produktbildungsraten. Die Ausbeute an Benzoatdihydrodiol betrug in allen drei Ansätzen, also auch mit Benzoat, weniger als 100 %. Dieses Experiment warf zwei Fragen auf: erstens, wie kommt es zur Diskrepanz zwischen Produktbildungsraten und Substratabnahmeraten und zweitens, wieso lagen die Ausbeuten nur bei 70 %.

**Tab. 13:** Umsatzaktivitäten von *P. putida* U\_TP10 induziert mit Toluol und Benzoat

	Sp. Aktivität der DHB-Bildung (U·g <sup>-1</sup> )	Rate DHB-Bildung (mmol·h <sup>-1</sup> ·g C <sub>X</sub> <sup>-1</sup> )	Rate Substratabnahme (mmol·h <sup>-1</sup> ·g C <sub>X</sub> <sup>-1</sup> )	Ausbeute (%)
Umsatz Toluol	15,1	0,47	1,35	70,8
Umsatz Benzylalkohol	17,2	0,53	3,24	67,2
Umsatz Benzoat	15,1	0,47	0,74	69,6

DHB: Benzoatdihydrodiol

Die langsameren Produktbildungsraten deuteten darauf hin, dass ein Teil des Benzoatdihydrodiols weiter abgebaut worden war. Dies würde auch die Verluste in der Produktausbeute erklären. Diese Effekte traten nur bei Zellen auf, die auch in der Lage waren, Toluol umzusetzen. Ruhezellen der Transkonjugante U\_TP10, die nur mit Benzoat induziert worden waren (Abb. 22, Ansatz B), konnten dieses vollständig zu Benzoatdihydrodiol umsetzen (Tab. 14). Auch Ruhezellen aus den Kontrollansätzen (*P. putida* U-JT103 auf Glukose mit Toluol und Benzoat bzw. nur mit Benzoat als Transformationssubstrate) setzten ebenfalls Benzoat vollständig zu Benzoatdihydrodiol um (Tab. 14). Toluol und Benzylalkohol wurden von diesen Zellen nicht umgesetzt. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die Zellen der Transkonjugante U\_TP10 eventuell entstandenes Benzoatdihydrodiol nicht vollständig an das Medium abgegeben hatten.

**Tab. 14:** Vergleich der Ruhezellumsätze von Benzoat zu Benzoatdihydrodiol

Ruhezellen von	induziert mit	Sp. Aktivität der DHB-Bildung (U·g <sup>-1</sup> )	Ausbeute an DHB (%)
U_TP10	Toluol und Benzoat	15,1	70,8
U_TP10	Benzoat	58,3	89,3
U-JT103	Toluol und Benzoat	61,2	95,5
U-JT103	Benzoat	65	94,1

Die Zellen wurden in Mineralmedium mit Glukose und den jeweils angegebenen Induktoren kultiviert. Für die Umsätze wurden die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase abzentrifugiert, in Phosphatpuffer gewaschen und resuspendiert. Die Umsätze enthielten als Auxiliarsubstrat jeweils 1 mM Glukose. DHB: Benzoatdihydrodiol.

Nach weiteren 2,5 Stunden Inkubation konnte im Medium der restlichen Kultur der Transkonjugante U\_TP10, die mit Toluol und Benzoat induziert worden war, eine drastische Abnahme von Benzoatdihydrodiol beobachtet werden (Abb. 22A). Im Ansatz der Transkonjugante, die nur Benzoat als Transformationssubstrat erhalten hatte (Abb. 22B) sowie in den Kontrollansätzen (*P. putida* U-JT103 mit Glukose als C-Quelle und Toluol und Benzoat bzw. nur Benzoat als Transformationssubstrate) blieb das gebildete Benzoatdihydrodiol stabil. Dies bestätigte die Annahme, dass die Transkonjugante unter bestimmten Umständen (Umsatz von Toluol) tatsächlich in der Lage ist, das gebildete Benzoatdihydrodiol wieder abzubauen.

Zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellen aller Ansätze geerntet und zur Messung von Enzymaktivitäten im Rohextrakt aufgeschlossen (siehe Kapitel 4.10). Im Rohextrakt von Zellen der Transkonjugante U\_TP10, die mit Toluol und Benzoat induziert worden war, konnten Aktivitäten für die Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase von  $3,8 \cdot 10^{-3}$  U·mg<sup>-1</sup> und für die Brenzcatechin-1,2-Dioxygenase von 0,46 U·mg<sup>-1</sup> gemessen werden (Tab. 15). In Rohextrakten von Zellen der Transkonjugante U\_TP10, die nur mit Benzoat induziert worden waren, sowie in Rohextrakten von Zellen des Ausgangstammes *P. putida* U-JT103, die mit Toluol und Benzoat einerseits und mit Benzoat andererseits induziert worden waren, konnte dagegen keine Aktivität für die Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase bestimmt werden (Tab. 15).

Die obigen Versuche sprachen dafür, dass der Stamm U\_TP10 unter bestimmten Bedingungen in der Lage war, Benzoatdihydrodiol abzubauen und es eventuell sogar als Energiequelle nutzen konnte. Es wurde vermutet, dass dies mit Eigenschaften des Ausgangstammes *P. putida* U-JT103 zusammenhängen könnte. Hierauf wurde der Ausgangsstamm nochmals

auf seine Fähigkeit, Benzoat als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen zu können, untersucht. Entgegen ersten Versuchen, bei denen die Vorkultur auf Komplexmedium kultiviert worden war (siehe Kapitel 5.7.1), wurde der Stamm in Mineralmedium mit Glukose und Benzoat inkubiert und dann auf Mineralmedium mit Benzoat in einer Konzentration von 10 mM (statt 2 mM) überimpft. Nach einer lag-Phase von ca. zwei Tagen begann der Stamm tatsächlich zu wachsen. Im Rohextrakt von diesen gewachsenen Zellen konnte ebenfalls eine Aktivität für die Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase und für die Brenzcatechin-1,2-Dioxygenase nachgewiesen werden. Die Ergebnisse hierzu sind in Tab. 15 zusammengefasst.

**Tab. 15:** Enzymaktivitäten in Rohextrakten der Transkonjugante U\_TP10 und des Ausgangsstammes U-JT103 unter verschiedenen Induktionsbedingungen

Stamm Substrate	Spezifische Aktivität im Rohextrakt (U·mg <sup>-1</sup> ) der		
	Benzoatdihydrodiol- Dehydrogenase	Brenzcatechin- 1,2-Dioxygenase	Brenzcatechin- 2,3-Dioxygenase
Transkonjugante U_TP10			
Glukose, Toluol, Benzoat	0,004	0,46	0
Glukose, Benzoat	0	n.b.	n.b.
Benzoat	0,76	0,53	0
Ausgangsstamm U-JT103			
Glukose, Toluol, Benzoat	0	n.b.	n.b.
Glukose, Benzoat	0	n.b.	n.b.
Benzoat	0,52	0,46	0

n.b.: nicht bestimmt. Die Zellen wurden zu Beginn der Ruhephase (nach ca. 7 Stunden mit Glukose als Substrat, nach ca. 5 Stunden mit Benzoat als Substrat) entnommen und für die Enzymtests abgeschlossen. Für die Durchführung der Enzymtests siehe Kapitel 4.12.

Die Aktivitäten der Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase aus Zellen von *P. putida* U-JT103 und *P. putida* U\_TP10, die nur Benzoat als einzige Kohlenstoffquelle zur Verfügung hatten, lagen in der gleichen Größenordnung. Dagegen konnte in Zellen, die Toluol und Benzoat als zusätzliche Substrate erhalten hatten (Wachstum auf Glukose), gar keine (U-JT103) oder eine 200fach niedrigere Aktivität (U\_TP10) gemessen werden. Somit könnte es sich bei dem mit Toluol und Benzoat einerseits und mit Benzoat andererseits induzierten Enzym um zwei unterschiedliche Enzyme handeln, die beide in der Lage sind, Benzoatdihydrodiol umzusetzen. In Rohextrakten von Zellen, die nur auf Glukose gewachsen waren, konnten keine Enzymaktivitäten nachgewiesen werden. In allen Ansätzen, in denen Aktivitäten für die Benzo-

at-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase bzw. für die Brenzcatechin-1,2-Dioxygenase gemessen wurden, wurde mittels HPLC auch Muconat als Metabolit detektiert. Eine Aktivität für die Brenzcatechin-2,3-Dioxygenase wurde nicht gefunden. Dies deutete daraufhin, dass Benzoat ausschließlich über den *ortho*-Weg abgebaut worden war.

Die Transkonjugante *P. putida* U\_TP10 war also in der Lage, bei Wachstum mit Benzoat als alleiniger C-Quelle bzw. beim Abbau von Toluol das gebildete Benzoatdihydrodiol wieder abzubauen. Dies erklärte auch die Unterschiede zwischen den schnellen Umsatzraten von Toluol, Benzylalkohol und Benzoat einerseits und den langsameren Bildungsraten von Benzoatdihydrodiol andererseits. Auch die Ausbeuten von ca. 70 % sind auf den weiteren Abbau von Benzoatdihydrodiol zurückzuführen. Es zeigte sich, dass diese Eigenschaften der Transkonjugante mit den Eigenschaften des Ausgangsstammes *P. putida* U-JT103 zusammenhängen, der ebenfalls in der Lage ist, mit Benzoat als alleiniger C-Quelle zu wachsen. In den nachfolgenden Kapiteln sollte untersucht werden, warum die Mutante *P. putida* U-JT103, bei der eine Blockade im Umsatz von Benzoatdihydrodiol zu Brenzcatechin vorliegt, dennoch Benzoat als C-Quelle nutzen konnte.

### 5.10 Ursachen des Wachstums von *P. putida* U-JT103 mit Benzoat

Zunächst wurde untersucht, ob es sich bei der von Douglas Ribbons zur Verfügung gestellten Kultur um eine Reinkultur und nicht etwa um eine Mischkultur von Ausgangstamm *P. putida* U und der Mutante *P. putida* U-JT103 handelte. Dazu wurde die Kultur auf Mineralmedium mit Glukose als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen gelassen und anschließend in verschiedenen Verdünnungsstufen auf Mineralagar mit Glukose ausplattiert. Die gewachsenen Kolonien wurden sowohl auf Mineralagar mit Glukose als auch auf Mineralagar mit Benzoat als alleiniger C-Quelle überimpft. Dabei zeigte sich kein Wachstum auf Mineralagar mit Benzoat als alleinigem Substrat. Somit lag keine Mischkultur aus Wildstamm und Mutanten vor, so dass das Wachstum in flüssigem Mineralmedium mit Benzoat als alleiniger C-Quelle eine andere Ursache haben musste. Es waren nun folgende Fragen zu klären:

- 1.) Gibt es ein zweites Gen für die Benzoatdihydrodiol-Dehydrogenase, das nicht mutiert ist, und das nur unter bestimmten Voraussetzungen (etwa in Gegenwart von Toluol oder von Toluol-Abbauprodukten) exprimiert wird?
- 2.) Handelt es sich um eine Reversion der Mutation zum Beispiel durch den Verlust eines Transposons bei einer Transposonmutation oder durch die Reparatur einer Punktmutation?

### 5.10.1 Untersuchungen zur Existenz eines zweiten Gens für die Benzoatdihydrodiol-Dehydrogenase

Es sind Stämme bekannt, die jeweils zwei Gene für den Abbau von Benzoatdihydrodiol besitzen: das Gen für die Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase (*benD*), codiert im sogenannten *ben*-Operon („*ortho*-Weg“), und das Gen für die Toluat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase (*xylL*) aus dem *xyl*-Operon („*meta*-Weg“). In *P. putida* Idaho wurde zunächst *xylL* mutiert. Trotzdem wurde das aus Toluol entstandene Benzoatdihydrodiol weiter abgebaut, da die Zwischenstufe Benzoat das auf dem Chromosom liegende *ben*-Operon mit *benD* induziert hatte (Germer, 2002). Daher musste zusätzlich zu *xylL* auch noch *benD* inaktiviert werden, um den Abbau von Benzoat auf der Stufe des Benzoatdihydrodiols zu stoppen. Auch *P. putida* BG1 besitzt sowohl die Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase als auch eine plasmidkodierte Toluat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase (Whited *et al.*, 1986). Ein Überangebot von Benzoat und Benzoatdihydrodiol führte bei *R. eutropha* zur Induktion der *xyl*-Gene (Ampe & Lindley, 1996). Vom Stamm *P. putida* U war bekannt, dass er in der Lage war, Phenol, das normalerweise immer über den „*meta*-Weg“ (*xyl*-Operon) abgebaut wird, auch über den chromosomal kodierten „*ortho*-Weg“ (*ben*-Operon) abbauen konnte, sobald die *xyl*-Gene mutiert waren (Bayly & McKenzie, 1976). Somit war nicht ausgeschlossen, dass auch die Mutante *P. putida* U-JT103 eine weitere nicht deletierte Dehydrogenase für den Abbau von Benzoatdihydrodiol besaß.

Mit PCR-Experimenten wurde untersucht, ob sich sowohl für *benD* als auch für *xylL* spezifische Fragmente aus *P. putida* U-JT103 amplifizieren ließen. Zusätzlich wurde untersucht, ob überhaupt ein Cluster mit Genen aus dem *xyl*-Operon in diesem Stamm vorhanden war. Dazu sollten die Gene nachgewiesen werden, die im gemeinsamen Operon sowohl vor als auch nach *xylL* angeordnet sind (Benzoat-Dioxygenase *XylXYZ* und Brenzcatechin-2,3-Dioxygenase *Xyle*). Für das Primerdesign wurden die *ben*-Cluster von *P. putida* PRS2000 (Cowles *et al.*, 2000), *P. putida* P111 (Totevova *et al.*, nicht publiziert) und *P. putida* Idaho (Germer, 2002) mit den *xyl*-Clustern von *P. putida* mt-2 (pWW0, Neidle *et al.*, 1992) und *P. putida* Idaho (Germer, 2002) verglichen. Für die Gene der Benzoatdihydrodiol-Dehydrogenase *benD* bzw. der Toluatdihydrodiol-Dehydrogenase (*xylL*) wurden die Primer für den Lesestrang spezifisch gewählt. Der dazu passende Primer auf dem Gegenstrang wurde für beide gleich gewählt. Für das Gen der Toluat-Dioxygenase (*xylXYZ*) wurden beide Primer spezifisch gewählt, so dass eine Amplifizierung der Benzoat-Dioxygenase (*benABC*) aus dem *ben*-Cluster nicht möglich war. Die Primer zur Amplifizierung des Gens für die Brenzcate-

chin-2,3-Dioxygenase wurden von den Sequenzen verschiedener TOL-Plasmide abgeleitet (*xylE* aus pWW0: Accessionno. M64747; Neidle *et al.*, 1992; *xylE* aus pWW53: Accessionno. AF102891; Kok *et al.*, 1999; *xylE* aus pDK: Accessionno. M65205; Benjamin *et al.*, 1991). Als Template für die PCR diente genomische DNA von *P. putida* U-JT103, *P. putida* mt-2 und *P. putida* Idaho (siehe Kapitel 4.22). Die PCR-Ansätze wurden mittels Gelelektrophorese überprüft. Für *P. putida* U-JT103 konnten keine Fragmente spezifisch für *xylXYZ*, *xylL* oder *xylE* amplifiziert werden. Die Positivkontrollen *P. putida* Idaho und *P. putida* mt-2 lieferten dagegen jeweils ein Fragment der richtigen Größe. *BenD* konnte in allen Ansätzen mit der erwarteten Fragmentgröße amplifiziert werden. Zur weiteren Kontrolle wurden die Fragmente aus dem Gel isoliert und sequenziert (siehe Kapitel 4.23). Ein Vergleich der Sequenzen zeigte, dass die richtigen Fragmente amplifiziert worden waren. Somit konnte eine *xylL* ähnliche Toluat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase für *P. putida* U-JT103 nicht nachgewiesen werden. Es ist aber nicht ausgeschlossen, dass der Stamm ein für den Abbau von Benzoatdihydrodiol verantwortliches Enzym besitzt, dessen Gen keine Ähnlichkeiten zu den bisher bekannten zeigt.

### 5.10.2 Untersuchungen zur Reversion der Mutation

Für die Untersuchungen zur Reversion einer Mutation wurde das komplette Gen (ca. 750 bp) für die Benzoatdihydrodiol-Dehydrogenase aus der Mutante *P. putida* U-JT103 bzw. der mutmaßlichen Revertante isoliert und sequenziert. Das Gen wurde dabei nicht durch Herstellung einer angereicherten Genbank mit genomischer DNA aus dem Stamm *P. putida* U-JT103 bzw. der Revertanten kloniert, sondern direkt mit spezifischen Primern amplifiziert. Die Primer *forbenC* und *revbenK* (siehe Kapitel 4.22, Tab. 8) wurden von der Sequenz für das *ben*-Operon von *P. putida* PRS2000 (Accessionno. AF218267; Cowles *et al.*, 2000) abgeleitet.

Zur Isolierung einer Revertante von *P. putida* U-JT103 wurde die Kultur in flüssigem Mineralmedium mit Glukose kultiviert und gleichzeitig mit Benzoat induziert (Vorkultur nur auf Glukose). Die gewachsene Kultur wurde dann mehrere Male in Mineralmedium mit Benzoat als alleiniger C-Quelle überimpft. Zusätzlich wurde die Kultur vor jedem Überimpfungsschritt auf Mineralagar mit Glukose bzw. mit Benzoat als C-Quelle ausplattiert.

Für die Präparation der genomischen DNA der Mutante *P. putida* U-JT103 (Nicht-Revertante, NRV) wurde eine Kolonie der Vorkultur vermehrt, die nur auf Mineralagar mit Glukose Wachstum zeigte. Zur Isolierung der genomischen DNA der Revertante (RV) wurde eine Ko-

lonie aus der zuletzt überimpften Kultur, die sowohl Wachstum auf Mineralagar mit Glukose als auch auf Mineralagar mit Benzoat zeigte, vermehrt.

Die PCR wurde mit einer DNA-Polymerase mit 3'→5'-Proofreading-Funktion (*Vent*-DNA-Polymerase, Fa. Gibco Life Technologies) durchgeführt, um die Gefahr von Polymerase-Fehlern zu minimieren. Als Template diente genomische DNA der Mutante und Revertante sowie genomische DNA von *P. putida* mt-2 und *P. putida* Idaho als Kontrollen. In allen vier Ansätzen konnte ein DNA-Fragment von ca. 1100 bp Länge mit dem kompletten Gen *benD* amplifiziert werden. Die DNA-Fragmente wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und sequenziert. Die aufgereinigten DNA-Fragmente aus der Mutante bzw. der Revertante wurden zusätzlich noch in den „blunt-end“ geschnittenen Vektor pBluescript II SK(+) ligiert. Durch Transformation in *E. coli* DH5α und anschließender „Blau-Weiß-Selektion“ konnten die Konstrukte pBISG7 mit *benD* aus der Revertante und pBISG8 mit *benD* aus der Mutante isoliert werden.

Die Sequenzierung des Inserts erfolgte mit Hilfe von markierten Primern (siehe Kapitel 4.23). Die erhaltenen Sequenzen wurden auf Aminosäureebene miteinander verglichen (Abb. 24). Der Vergleich ergab einen Austausch von Serin (Mutante) zu Glycin (Revertante) in Position 14. Der Aminosäureaustausch war bedingt durch einen Basenaustausch (AGT→GGT). Ein Aminosäurevergleich mit weiteren Benzoat- und Toluatdihydrodiol-Dehydrogenasen zeigte, dass es sich um den Anfang einer konservierten Region handelte. Dabei findet sich in allen Fällen die Aminosäure Glycin statt Serin. Glycin ist die kleinste Aminosäure ohne ausgeprägte hydrophobe oder hydrophile Eigenschaften. Serin dagegen trägt in der Aminosäureseitenkette eine OH-Gruppe und wird somit den hydrophilen Aminosäuren zugeordnet. Aufgrund der erheblichen strukturellen Unterschiede kann nicht davon ausgegangen werden, dass sich die beiden Aminosäuren funktionell ersetzen können. Die für die Benzoatdihydrodiol-Dehydrogenase kodierenden Sequenzen der Mutante *P. putida* U-JT103 sowie der Revertante hatten in beiden Fällen die gleiche Länge (759 bp), so dass eine Mutation durch ein Transposon bzw. eine Reversion durch den Verlust eines Transposons ausgeschlossen werden konnte. Es konnten keine weiteren Basenaustausche identifiziert werden.

BenD Revertante	MNNRFQ GKVALV <b>TGAAQGI</b> GRGVCWRLKAEGAQVAVDRSELVHE	45
BenD <i>P. putida</i> U-JT103	MNNRFQ GKVALV <b>TSA</b> AQGI GRGVCWRLKAEGAQVAVDRSELVHE	
BenD <i>P. putida</i> PRS2000	MNNRFQ GKVALV <b>TGAAQGI</b> GRGVCWRLKAEGAQVAVDRSELVHE	
BenD <i>P. putida</i> Idaho	MNNRFQ GKVALV <b>TGAAQGI</b> GRGVCWRLKAEGAQVAVDRSELVHE	
XylL <i>P. putida</i> Idaho	MNKRFQDKTAVIT <b>TGAAQGI</b> GRRVAERMAAEGGRLLLVDRSELIHE	
XylL <i>P. putida</i> mt-2, pWW0	MNKRFQ GKVAIVIT <b>TGAAQGI</b> GRRVAERMAAEGGRLLLVDRSELIHE	
BenD Revertante	LAGEG-----MLTLTADLEQHADCARVMASAVEAFGRDLILVNNV	90
BenD <i>P. putida</i> U-JT103	LAGEG-----MLTLTADLEQHADCARVMASAVEAFGRDLILVNNV	
BenD <i>P. putida</i> PRS2000	LAGEG-----MLTLTADLEQHTDCARVMASAVETFGRLDILVNNV	
BenD <i>P. putida</i> Idaho	LAGEG-----MLTLTADLEQHADCARVMXSAVETHGRDLILVNNV	
XylL <i>P. putida</i> Idaho	LADELVGVAEVLTLTADLEQFAECQRMVMAAALERFGRLDILINN	
XylL <i>P. putida</i> mt-2, pWW0	LADELVGVAEVLTLTADLEQFAECQRMVMAAALERFGRLDILINN	
BenD Revertante	GGTIWAKPFEHYEVDQIEAEVRRSLFPTLWCCHAALPYMLERGS	135
BenD <i>P. putida</i> U-JT103	GGTIWAKPFEHYEVDQIEAEVRRSLFPTLWCCHAALPYMLERGS	
BenD <i>P. putida</i> PRS2000	GGTIWAKPFEHYEVEQIEAEVRRSLFPTLWCCHAALPYMLERGS	
BenD <i>P. putida</i> Idaho	GGTIWAKPFEHYEVEQIEAEVRRSLFPTLWCCHAALPYMLERGS	
XylL <i>P. putida</i> Idaho	GGTIWAKPFEHYQEHEIEAEVRRSLFPTLWCCHAALPLMLEQGS	
XylL <i>P. putida</i> mt-2, pWW0	GGTIWAKPFEHYQEREIEAEVRRSLFPTLWCCHAALAPMIEQGS	
BenD Revertante	AIVNVSSIATRGNRVVPYGAAKGGVNALTAFLAFETAGRGIRVNA	180
BenD <i>P. putida</i> U-JT103	AIVNVSSIATRGNRVVPYGAAKGGVNALTAFLAFETAGRGIRVNA	
BenD <i>P. putida</i> PRS2000	AIVNVSSIATRGNRVVPYGAAKGGVNALTAFLAFETAGRGIRVNA	
BenD <i>P. putida</i> Idaho	AIVNVSSIATRGNRVVPYGAAKGGVNALTAFLAFETAGRGIRVNA	
XylL <i>P. putida</i> Idaho	AIVNVSSVATRGIHRVPYGAAKGGVNALTAFLAFETAERGRIRVNA	
XylL <i>P. putida</i> mt-2, pWW0	AIVNVSSVATRGIHRVPYGAAKGGVNALTAFLAFETAERGRIRVNA	
BenD Revertante	TAPGGTEAPRRVPRNSAEQTEQERHWYQQIVDQTLDSSLMHRYG	225
BenD <i>P. putida</i> U-JT103	TAPGGTEAPRRVPRNSAEQTEQERHWYQQIVDQTLDSSLMHRYG	
BenD <i>P. putida</i> PRS2000	TAPGGTEAPRRVPRNSAEQSEKRWYQQIVDQTLDSSLMHRYG	
BenD <i>P. putida</i> Idaho	TAPGGTEAPRRVPRNSAEQTEQERHWYQQIVDQTLDSSLMHRYG	
XylL <i>P. putida</i> Idaho	TAPGGTEAPRRIPRNSAEPESEKRWYQQIVDQSLDSSLMKRYG	
XylL <i>P. putida</i> mt-2, pWW0	TAPGGTEARHGGF-RNSAEPSEKRWYQQIVDQSLDSSLMKRYG	
BenD Revertante	SIDEQVGAILFLASDEASYITGVTLPVGGGDLG-----	270
BenD <i>P. putida</i> U-JT103	SIDEQVGAILFLASDEASYITGVTLPVGGGDLG-----	
BenD <i>P. putida</i> PRS2000	SIDEQVGAILFLASDEASYITGVTLPVGGGDLG-----	
BenD <i>P. putida</i> Idaho	SIDEQVGAILFLASDEASYITGVTLPVGGGDLG-----	
XylL <i>P. putida</i> Idaho	SIDEQVEAILFLASDAASYITGITLPVAGGDLG-----	
XylL <i>P. putida</i> mt-2, pWW0	SIDEQVEAILFLASDAASYITGITLPVAGGDLGCSQSCSVMFSVSG	

**Abb. 24:** Vergleich der Aminosäuresequenz von BenD aus *P. putida* U-JT103, der Revertante und von weiteren BenD- und XylL-Genprodukten.

Die beiden ersten Sequenzen unterscheiden sich in der Aminosäure auf Position 14. Bei der Mutante findet sich ein Serin während bei der Revertante Glycin die Position einnimmt. Verglichen mit weiteren Benzoat- und Toluatdihydrodiol-Dehydrogenasen handelt es sich um den Anfang einer konservierten Region (schwarz unterlegt). BenD Revertante: (diese Arbeit); BenD *P. putida* U-JT103: (diese Arbeit); BenD *P. putida* PRS2000: Accessionno. AF218267 (Cowles *et al.*, 2000); BenD *P. putida* Idaho: (Germer, 2002); XylL *P. putida* Idaho: (Germer, 2002); XylL *P. putida* mt-2, pWW0: Accessionno. M64747 (Neidle *et al.*, 1992).



## 5.11 Einsatz von *P. putida* U\_TP10 als Biokatalysator für die Produktion von Phenol aus Toluol

Mit der Transkonjugante *P. putida* U\_TP10, war es gelungen, einen Stamm zu konstruieren, der Toluol zu Benzoatdihydrodiol (DHB) mit einer Ausbeute von 60 - 70 % umsetzen konnte. Es sollten nun seine Eigenschaften als Biokatalysator für einen großtechnischen Prozess untersucht werden. Für die Dimensionierung des Prozesses im Industriemaßstab mussten Daten für die Gewinnung hoher Zelldichten, für Umsatz- bzw. Bildungsraten und für die Stabilität der Umsatzaktivität ermittelt werden.

### 5.11.1 Hochzelldichtefermentation

Die Kultivierung der Transkonjugante *P. putida* U\_TP10 erfolgte nach der Methode der Hochzelldichtefermentation (Wilms *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 1996; Bunch, 1994). Die Fermentation wurde zunächst im Batch-Verfahren durchgeführt. Dazu wurden 800 ml Batch-Medium (siehe Kapitel 4.4.3) mit 200 ml einer Vorkultur der Transkonjugante U\_TP10 angeimpft. Nach ca. fünf Stunden war die zugegebene Glukose aufgebraucht und die Fedbatch-Fermentation wurde gestartet. Um eine Biomasse von  $40 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  (entspricht einer  $\text{OD}_{546\text{nm}}$  von ca. 100) zu erreichen, wurde vor dem Start des Zulaufs die notwendige Fermentationszeit sowie die dafür benötigte Substratkonzentration im Zulauf berechnet.

#### Berechnung der notwendigen Fermentationszeit:

Ausgangspunkte waren die durch den Batch erreichte Biomassekonzentration von  $C_X = 1,625 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  und dessen Volumen ( $V = 1 \text{ l}$ ) sowie das gewünschte Endvolumen ( $V = 1,6 \text{ l}$ ) und die gewünschte Biomasse ( $C_X = 40 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Aus der Gleichung für das exponentielle Wachstum bei variablem Volumen folgt (Hauck, persönliche Mitteilung, Institut für Bioverfahrenstechnik, Stuttgart)

$$t = \ln \frac{C_X \cdot V}{C_{X_0} \cdot V_0} \cdot \frac{1}{\mu} \quad (\text{Gl. 1})$$

$C_X$ : Biomassekonzentration zum Zeitpunkt  $t$  ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )

$V$ : Volumen zum Zeitpunkt  $t$  (l)

$C_{X_0}$ : Biomassekonzentration vor Zulaufstart ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )

$V_0$ : Volumen vor Zulaufstart (l)

$\mu$ : gewünschte Wachstumsrate ( $\text{h}^{-1}$ )

Die in der Batch-Fermentation erreichte Wachstumsrate von  $0,39 \text{ h}^{-1}$  ( $t_D = 1,8 \text{ h}$ ) musste für den anschließenden Fedbatch auf  $0,15$  bis  $0,1 \text{ h}^{-1}$  ( $t_D = 4,5 - 7 \text{ h}$ ) verringert werden, um eine zu schnelle Limitierung des in das Medium eingetragenen Sauerstoffs zu vermeiden. Damit berechnete sich die Fermentationsdauer des Fedbatch zu 25 Stunden ( $\mu = 0,15 \text{ h}^{-1}$ ) bzw. zu 37 Stunden ( $\mu = 0,1 \text{ h}^{-1}$ ).

Um die gewünschte Zulaufmenge von 600 ml zu realisieren, musste eine bestimmte Substratkonzentration eingestellt werden.

#### Berechnung der Substratkonzentration im Zulauf:

Die Zulaufgleichung für das exponentielle Feed lautet (Wilms *et al.*, 2001; Hauck, persönliche Mitteilung)

$$F(t) = \mu \cdot \frac{C_{X_0} \cdot V_0}{C_S \cdot Y_{X/S}} \cdot e^{\mu t} \quad (\text{Gl. 2})$$

$F(t)$ : Zulaufrate ( $\text{l} \cdot \text{h}^{-1}$ )

$\mu$ : gewünschte Wachstumsrate ( $\text{h}^{-1}$ )

$C_{X_0}$ : Biomassekonzentration vor Zulaufstart ( $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ )

$V_0$ : Volumen vor Zulaufstart (l)

$C_S$ : Glukosekonzentration in der Zulauflösung ( $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ )

$Y_{X/S}$ : Spezifischer Ausbeutekoeffizient ( $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )

$t$ : Zeit nach Zulaufstart (h)

Der spezifische Ausbeutekoeffizient für Glukose für *P. putida* U\_TP10 wurde über Anzuchten im Schüttelkolben mit verschiedenen Glukosemengen durch Bestimmung der dabei erreichten Biomasse zu  $0,3 \text{ g}$  Biomasse pro Gramm Glukose abgeschätzt.

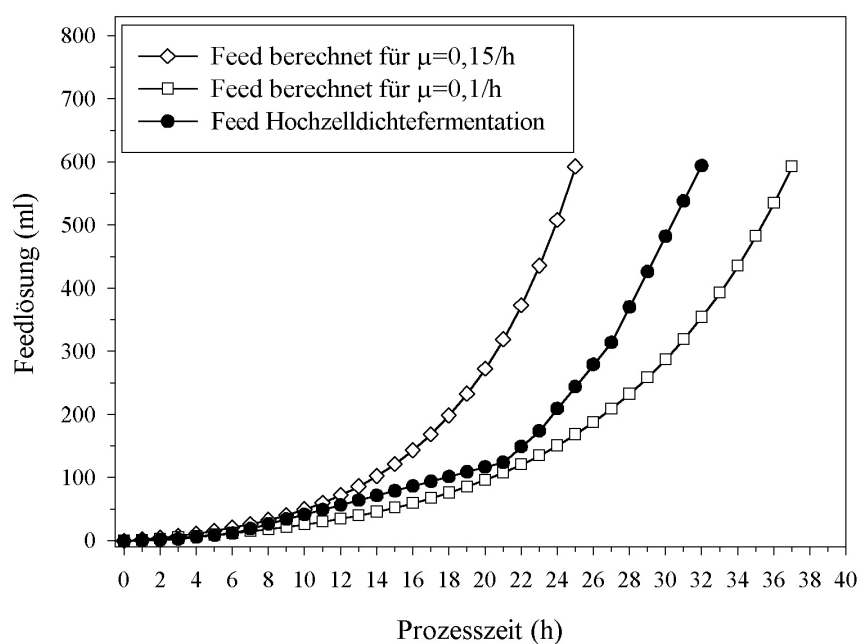
Aus der Zulaufgleichung (Gl. 2) ergibt sich für die Summe des Zulaufs (SF) zum Zeitpunkt  $t$ :

$$SF = \frac{C_{X_0} \cdot V_0}{C_S \cdot Y_{X/S}} \cdot (e^{\mu t} - 1) \quad (\text{Gl. 3})$$

Aus Gl. 3 folgt für die Substratkonzentration im gesamten Zulauf:

$$C_S = \frac{C_{X_0} \cdot V_0}{SF \cdot Y_{X/S}} \cdot (e^{\mu t} - 1) \quad (\text{Gl. 4})$$

Die Glukosekonzentration im gesamten Zulauf errechnete sich zu  $350 - 380 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , je nachdem welche Wachstumsraten und Fermentationszeiten berücksichtigt wurden. Für die Zusammensetzung der Feedlösung wurde eine Glukosekonzentration von ca.  $360 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  eingesetzt (siehe Kapitel 4.4.3). Das Pumpensystem des vorhandenen Fermenters war allerdings nicht für einen exponentiellen Feed ausgestattet. Die Pumpen konnten für Zeitintervalle mit einer bestimmten Laufzeit eingestellt werden (zum Beispiel alle fünf Minuten eine Pumpzeit von zwei Sekunden). Mit den berechneten exponentiellen Feedraten wurde ein die Möglichkeiten der Pumpensteuerung berücksichtigendes Stufenprofil für den Zulauf für eine Fermentationsdauer von ca. 30 Stunden mit einer Wachstumsrate zwischen  $0,15$  und  $0,1 \text{ h}^{-1}$  erstellt. Die Erhöhung der Zeitintervalle und Laufzeiten der Pumpen erfolgte manuell. In Abb. 25 sind die für eine Biomasseendkonzentration von  $40 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  berechneten Zuläufe sowie der für das Pumpensystem angeglichenen Zulauf in Abhängigkeit von der Prozesszeit dargestellt (maximale Zulaufmenge = 600 ml).

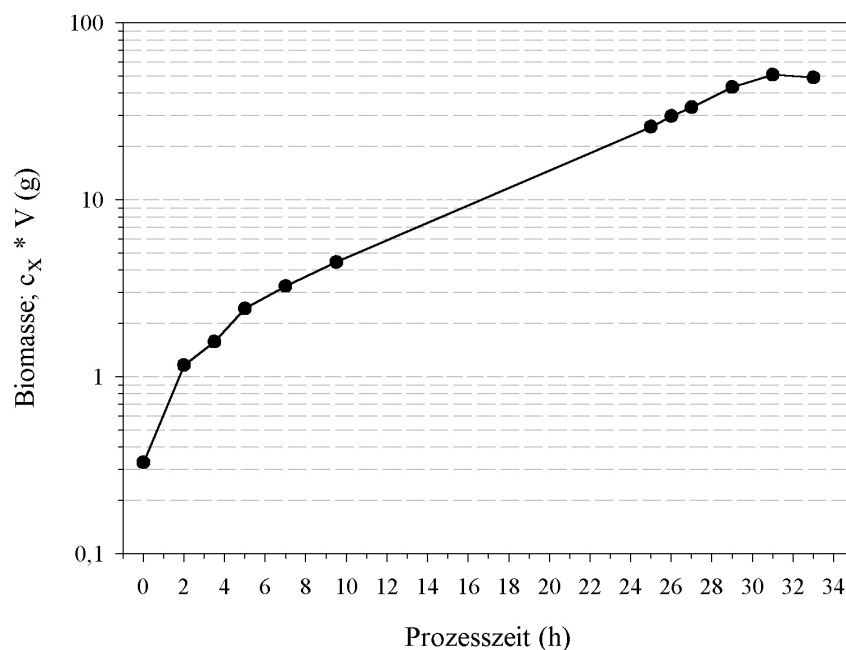


**Abb. 25:** Zugabe der Feedlösung während der Fedbatch-Fermentation.

Dargestellt sind die für eine Biomasseendkonzentration von  $40 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  berechneten Zuläufe sowie der für das Pumpensystem des Fermenters angeglichenen Zulauf in Abhängigkeit von der Prozesszeit (maximale Zulaufmenge = 600 ml). Aufgetragen ist die Summe des Feeds (SF) zum Zeitpunkt  $t$ .

Die Fedbatch-Fermentation wurde mit der oben ermittelten Zulauftrate gestartet. Zur Regelung des pH-Wertes wurde Ammoniumhydroxid eingesetzt, das damit auch gleichzeitig als weitere Quelle für Stickstoff diente. Die Fermentation musste allerdings nach 28 Stunden vor Ablauf der angepassten Fermentationszeit von 30 Stunden abgebrochen werden. Die Gelöstsauerstoffkonzentration konnte zu diesem Zeitpunkt nicht mehr erhöht werden ( $pO_2 < 5$ ). Das System arbeitete bereits mit einer maximalen Rührerdrehzahl von 1500 rpm bei einem maximalen Lufteintrag von  $150 \text{ l}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{l}^{-1}$  Fermentationsvolumen. Eine starke Schaumbildung signalisierte bereits ein Absterben der Zellen im Reaktor. Abb. 26 zeigt den Verlauf einer Hochzelldichtefermentation mit der Transkonjugante *P. putida* U\_TP10.

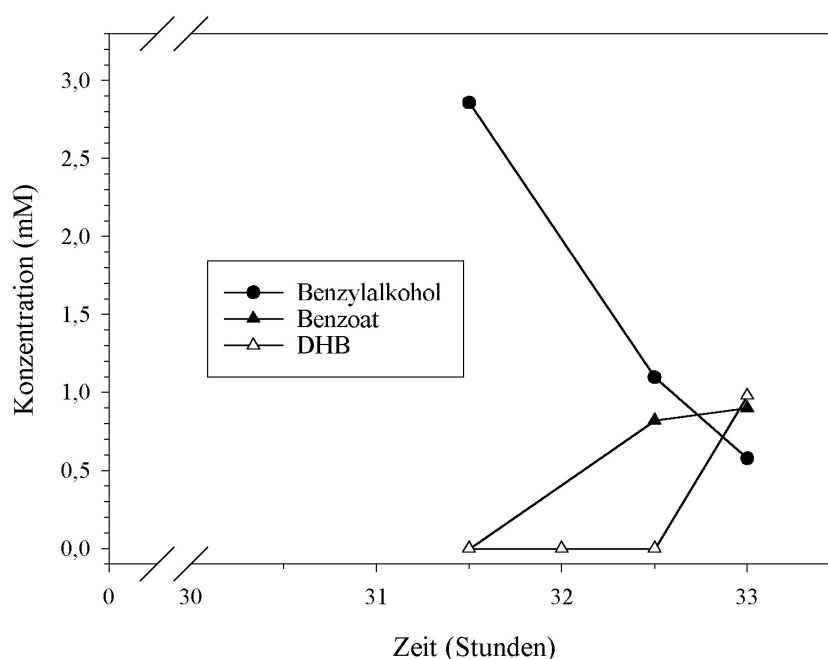
Die Wachstumsrate betrug während des Prozesses  $0,12 \text{ h}^{-1}$ . Es wurde eine Biomassekonzentration ( $C_X$ ) von  $32,9 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  bzw. eine Gesamtbiomasse ( $C_X\cdot V$ ) von  $49,3 \text{ g}$  gebildet. Das entspricht einer Feuchtbiomasse von ca.  $165 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  bzw. von  $250 \text{ g}$  Gesamtbiofeuchtmasse (siehe Kapitel 4.6). Die Zulaufmenge betrug  $384 \text{ ml}$  statt der geplanten  $600 \text{ ml}$ . Dies entsprach einer verbrauchten Glukosemenge während der Batch- und Fedbatch-Fermentation von ca.  $142 \text{ g}$  (im Fermentationsmedium konnte nach Abbruch keine Glukose mehr nachgewiesen werden). Zur pH-Regelung wurden ca.  $100 \text{ ml}$  Ammoniumhydroxid zudosiert.



**Abb. 26:** Hochzelldichtefermentation mit der Transkonjugante *P. putida* U\_TP10. Nach 5 h Fermentation im Batch-Verfahren ( $\mu_{\max} = 0,39 \text{ h}^{-1}$ ) wurde der Zulauf der Feedlösungen gestartet. Während der Fedbatch-Fermentation lag die Wachstumsrate bei  $\mu = 0,12 \text{ h}^{-1}$ . Da eine  $O_2$ -Limitierung eingetreten war, musste die Fermentation nach 33 h (28 h Zulauf) abgebrochen werden.

### 5.11.2 Induktion

Zur Induktion der Toluol umsetzenden Enzymaktivität wurde gegen Ende der Fermentation ca. 0,03 % (v/v) Benzylalkohol zugegeben. Da zu diesem Zeitpunkt mit maximaler Rührerdrehzahl und maximalem Luftvolumenstrom fermentiert wurde, musste auf die Zugabe des leichtflüchtigen Toluols verzichtet werden. Nach einer Stunde konnte Benzoat im Medium nachgewiesen werden. Nach einer weiteren halben Stunde war auch Benzoatdihydrodiol entstanden (Abb. 27). Zu diesem Zeitpunkt wurde die Fermentation aufgrund des Sauerstoffmangels (siehe Kapitel 5.11.1) abgebrochen, und die Zellen wurden abzentrifugiert. Ein Teil der Zellen wurde für Aktivitätsbestimmungen eingesetzt (siehe Kapitel 5.11.3). Die restlichen Zellen wurden in sterilem Phosphatpuffer, der 30 % Glycerin enthielt, resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei  $-70\text{ °C}$  gelagert.



**Abb. 27:** Induktion der Gene für den Abbau von Toluol gegen Ende der Hochzell-dichtefermentation. Zur Induktion wurden 3,5 Stunden vor dem berechneten Ende der Fermentation (1,5 Stunden vor Abbruch der Fermentation) ca. 0,5 ml Benzylalkohol mit einer sterilen Pipette in das Medium gegeben. Es wurde die Abnahme von Benzylalkohol und die Zunahme an Benzoat und Benzoatdihydrodiol (DHB) gemessen. Sobald DHB nachgewiesen werden konnte, wurde die Fermentation abgebrochen, und die Zellen für weitere Untersuchungen eingesetzt bzw. eingefroren.

### 5.11.3 Untersuchungen zur Aktivität des Biokatalysators

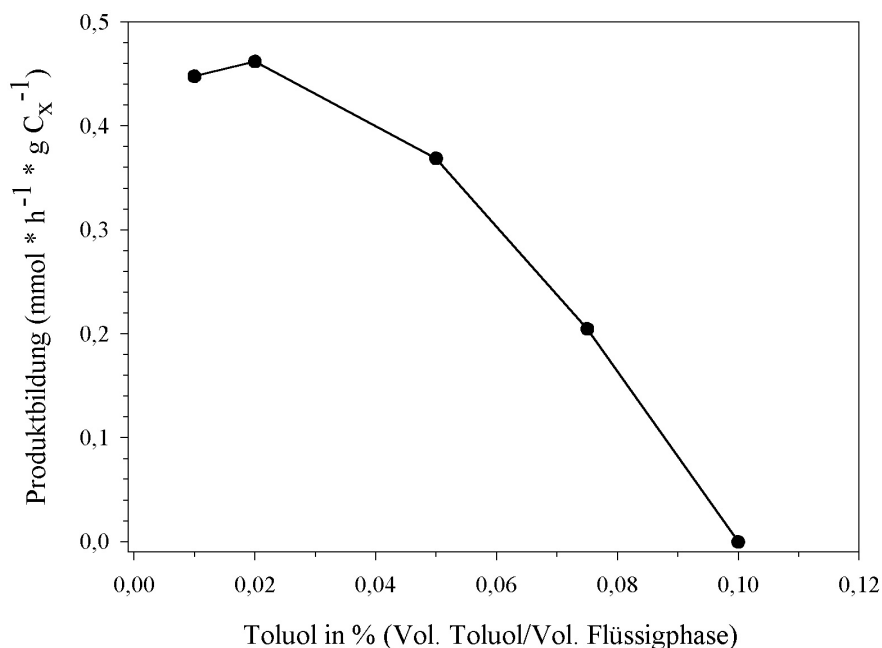
#### 5.11.3.1 Umsatz von Toluol zu Benzoatdihydrodiol

Da wegen der leichten Flüchtigkeit des Toluols Reaktorversuche schwer zu realisieren waren, wurde die Bestimmung der Aktivität des Biokatalysators in einem geschlossenen Schikanenkolben als Batch-Versuch durchgeführt (siehe Kapitel 4.14). Als Biokatalysator wurden die abzentrifugierten aber noch nicht eingefrorenen Zellen der Hochzeldichtefermentation (siehe Kapitel 5.11.1) eingesetzt. Die Biotransformation wurde in einem Einphasensystem (Zugabe von Toluolmengen  $< 0,91$  mmol) in einem Volumen von 50 ml ( $V_{\text{Gasphase}} = 315$  ml) bei  $30$  °C durchgeführt. Der Sauerstoffeintrag in das System erfolgte dabei durch Schütteln. Die mittlere Gelöstsauerstoffkonzentration während der Biotransformation war in diesem System nicht bestimmbar. Als Auxiliarsubstrat wurde Glukose (1 mM) zugegeben.

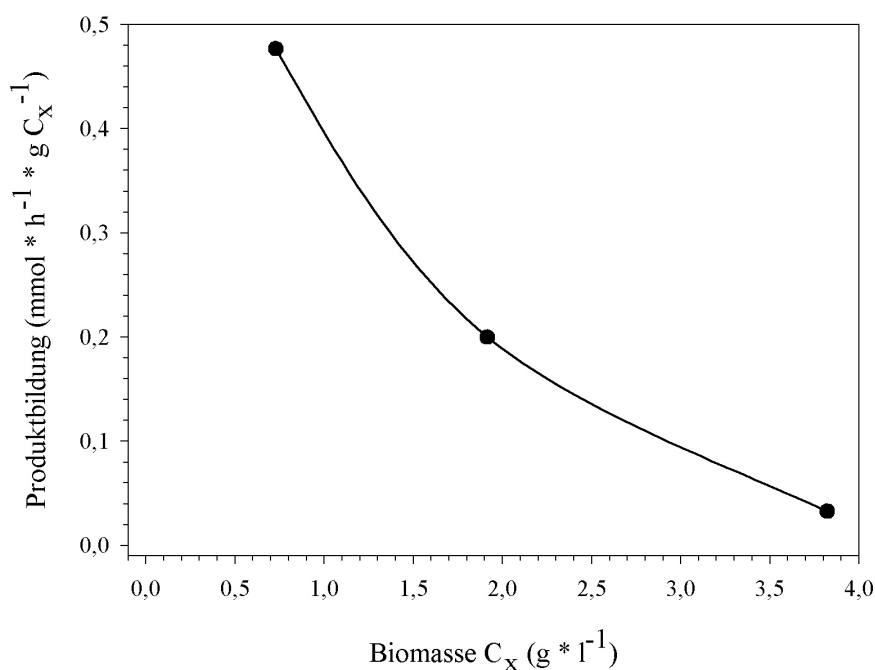
Zunächst wurde die Bildungsrate von Benzoatdihydrodiol in Abhängigkeit verschiedener Toluolkonzentrationen ermittelt (Abb. 28A). Die eingesetzte Menge an Biomasse wurde konstant gehalten. Das System war zuvor mit Luft gesättigt worden. Zudem wurde eine geringe Menge an Biomasse ( $< 1$  g·l<sup>-1</sup>) eingesetzt, so dass eine Sauerstofflimitierung nahezu ausgeschlossen werden konnte. Die Produktbildungsraten nahmen mit zunehmender Toluolmenge ab ( $0,46 - 0,2$  mmol·h<sup>-1</sup>·g C<sub>X</sub><sup>-1</sup>). Bei einer Zugabe von  $0,46$  mmol Toluol [entspr.  $0,1$  % (v/v) bzw.  $9,2$  mM, wenn die Menge komplett in der Flüssigphase gelöst wäre] konnte keine Umsatzaktivität mehr bestimmt werden. Dies spiegelt das Verhalten der Zellen des Ausgangstammes *P. putida* U-JT103 in den Versuchen zur Toluoltoleranz wider (siehe Kapitel 5.7.2).

Die Bildungsraten in Abhängigkeit der Sauerstoffkonzentration konnten in diesem System nicht bestimmt werden. Es wurde aber versucht, durch Variation der Menge an Biomasse bei gleichbleibender Konzentration an Toluol indirekt eine Beziehung zwischen Bildungsraten und Sauerstoffverbrauch herzustellen (Abb. 28B). Die Bildungsrate reduzierte sich bei Verdopplung der Biomasse bereits um  $50$  %. Bei nochmaliger Verdopplung betrug die Produktbildungsrate nur noch weniger als  $10$  % des ursprünglichen Wertes. Es zeigte sich hiermit, dass die Aktivität sehr stark von der vorhandenen Gelöstsauerstoffkonzentration abhängig ist. Für die technische Produktion von Benzoatdihydrodiol müsste die Aktivität in einem System bestimmt werden, in dem kontinuierlich Sauerstoff für die Umsetzung nachgeliefert werden kann.

## A) Bildungsrate von Benzoatdihydrodiol in Abhängigkeit von der Substratkonzentration



## B) Bildungsrate von Benzoatdihydrodiol in Abhängigkeit von der Biomasse



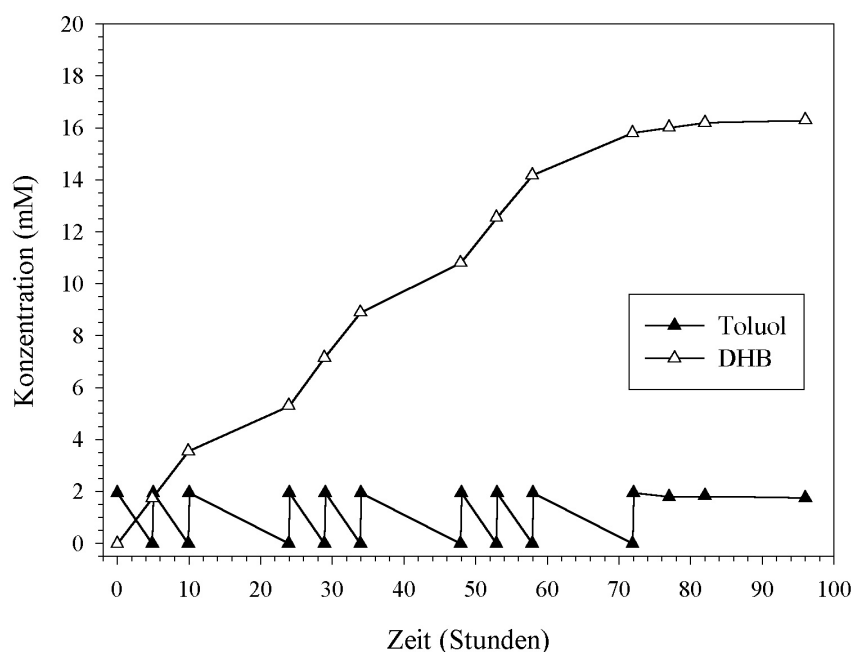
**Abb. 28:** Bildungsraten von Benzoatdihydrodiol (DHB) aus Toluol in Abhängigkeit von der Toluolkonzentration (A) bzw. in Abhängigkeit von der Biomasse (B).

Die Umsätze wurden in einem Schikanenkolben mit 50 ml Phosphatpuffer ( $V_{\text{Gasphase}} = 315 \text{ ml}$ ) durchgeführt. Als Auxiliarsubstrat wurde 1 mM Glukose zugegeben. Es wurden Toluolmengen  $< 0,91 \text{ mmol}$  [entspr. 0,19 % (v/v), wenn die Menge komplett in der Flüssigphase gelöst wäre, so auch im Diagramm dargestellt] eingesetzt. In den Versuchen zur Ermittlung der Bildungsrate von Benzoatdihydrodiol in Abhängigkeit von der Substratkonzentration wurde jeweils eine Biomasse von  $0,78 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  eingesetzt. In den Versuchen zur Ermittlung der Bildungsrate von Benzoatdihydrodiol in Abhängigkeit von der Biomasse wurde jeweils  $0,09 \text{ mmol}$  Toluol [entspr. 0,02 % (v/v)] eingesetzt.

### 5.11.3.2 Langzeitstabilität des Biokatalysators

Auch zur Bestimmung der Langzeitstabilität konnten keine Versuche in größerem Maßstab ( $> 1$ ) durchgeführt werden. Daher wurde auch in diesem Fall versucht, mit Hilfe eines abgeschlossenen Systems eine erste Einschätzung zur Standzeit des Biokatalysators zu erhalten. Der Umsatz wurde dazu in einem Schikanenkolben mit 100 ml Phosphatpuffer ( $V_{\text{Gasphase}} = 2900 \text{ ml}$ ) durchgeführt. Es wurde eine Biomasse von  $0,78 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  eingesetzt. Als Auxiliarsubstrat wurde Glukose (10 mM) zugegeben. Der Umsatz wurde mit 0,2 mmol Toluol (entspr. 0,02 % (v/v) bzw. 1,8 mM, wenn die Menge komplett in der Flüssigphase von 100 ml gelöst wäre) gestartet. Sobald kein Toluol mehr in der Lösung nachweisbar war, wurde erneut 0,2 mmol Toluol zugegeben. Zuvor wurde der Kolben immer mit Luft begast (über einen Sterilfilter). Neben Toluol wurde auch die Glukosekonzentration im Medium bestimmt. Bei Bedarf wurde Glukose erneut zugegeben (ca. einmal pro Tag). In Abb. 29 ist ein Versuch zur Ermittlung der Langzeitstabilität dargestellt. Nach ca. drei Tagen wurde kein Toluol mehr umgesetzt. Die kontinuierliche Belüftung und Zufuhr von Toluol wurde nur tagsüber ca. alle fünf Stunden durchgeführt. Über Nacht waren die Zellen vermutlich einer längeren „Hungerperiode“ ausgesetzt, in der die Zellen weder mit Toluol, Sauerstoff oder Glukose optimal versorgt wurden. In einem System, in dem kontinuierlich die Toluol-, Sauerstoff- und Glukosekonzentration bestimmt und reguliert werden können, werden die Zellen vermutlich über einen längeren Zeitraum aktiv bleiben, allerdings auch nur so lange, bis sich eine für die Zellen toxische Konzentration an Benzoatdihydrodiol im Medium angesammelt hat. Auch dies könnte ein Grund für den Aktivitätsverlust der Zellen nach drei Tagen im Schüttelkolben gewesen sein. Die Konzentration an Benzoatdihydrodiol betrug nach drei Tagen ca. 16 mM.





**Abb. 29:** Versuch zur Ermittlung der Standzeit von *P. putida* U\_TP10 beim Umsatz von Toluol zu Benzoatdihydrodiol (DHB).

Der Versuch wurde in einem 3-l-Schikanenkolben mit 100 ml Phosphatpuffer und Glukose (10 mM) als Auxiliarsubstrat durchgeführt. Es wurde eine Biomassekonzentration von  $0,8 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  eingesetzt. Der Umsatz wurde durch Zugabe von  $0,2 \text{ mmol}$  Toluol [entspr.  $0,02 \%$  (v/v) bzw.  $1,8 \text{ mM}$ , wenn die Menge komplett in der Flüssigphase gelöst wäre; so auch im Diagramm dargestellt] gestartet. Es wurde die Toluol- und DHB-Konzentration im Medium bestimmt. Bei Bedarf (ca. zweimal pro Tag) wurde erneut Toluol ins Medium zugegeben. Zuvor wurde der Kolben über einen Sterilfilter mit Luft begast.

### 5.11.3.3 Lagerstabilität des Biokatalysators

Um die Lagerstabilität des Biokatalysators zu testen, wurden die eingefrorenen Zellen aus der Hochzelllichtfermentation zu verschiedenen Zeitpunkten aufgetaut und die Bildungsrate von Benzoatdihydrodiol aus Toluol bestimmt. Die Umsätze erfolgten wieder in Phosphatpuffer im abgeschlossenen System mit 50 ml wässriger Phase und 315 ml Gasphase. Die Ansätze enthielten jeweils Glukose ( $1 \text{ mM}$ ) als Auxiliarsubstrat, eine Biomassemenge von  $0,8 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  und  $0,091 \text{ mmol}$  Toluol [entspr.  $0,02 \%$  (v/v) bzw.  $1,8 \text{ mM}$ ] als Substrat. In Tab. 16 sind die ermittelten Raten aufgelistet. Durch Einfrieren der Zellen in Gegenwart von Glycerin (siehe Kapitel 5.11.2) konnte deren Aktivität über einen längeren Zeitraum konserviert werden.

**Tab. 16:** Bildungsraten von Benzoatdihydrodiol aus Toluol zur Ermittlung der Lagerstabilität des Biokatalysators

Lagerzeit	Rate DHB-Bildung (mmol·h <sup>-1</sup> ·g C <sub>X</sub> <sup>-1</sup> )	Restaktivität (%) <sup>*</sup>
nicht eingefroren	0,477	100
2 Wochen	0,462	96,9
4 Wochen	0,467	97,9
3 Monate	0,455	95,4

<sup>\*</sup>im Vergleich zur nicht eingefrorenen Probe. Die Zellen wurden in Glycerin-Phosphatpuffer bei -70 °C gelagert. Die Bestimmung der Bildungsrate von Benzoatdihydrodiol (DHB) aus Toluol erfolgte in einem abgeschlossenen System mit 50 ml Phosphatpuffer, 1 mM Glukose und 0,019 mmol Toluol [entspr. 0,02 % (v/v) bzw. 1,8 mM, wenn die Menge komplett in der Flüssigphase gelöst wäre]. Die Ansätze enthielten eine Biomassekonzentration (C<sub>X</sub>) von ca. 0,8 g·l<sup>-1</sup>.

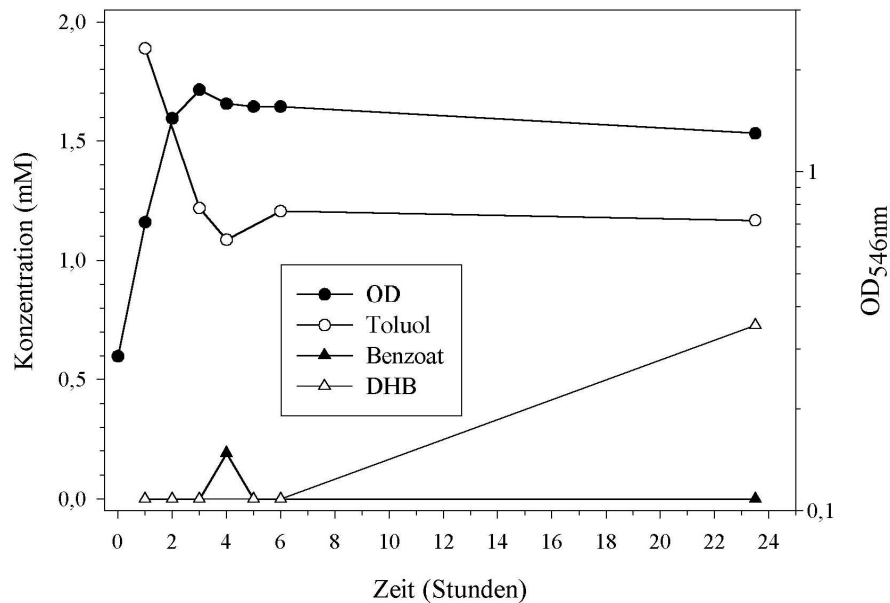
### 5.12 Einbau der Gene für den Abbau von Toluol auf einem zusätzlichen Plasmid in *P. putida*

Da *P. putida* U-JT103 im Gegensatz zu *R. eutropha* B9 in der Lage war, die Gene für den Abbau von Toluol zu exprimieren, wurde versucht, auch die konstruierten Plasmide pBBSG1 und pMMSG6 (siehe Kapitel 5.5.1) in dem Stamm zu etablieren. Für die Übertragung der Plasmide pBBSG1 und pMMSG6 wurden Filterkreuzungen durchgeführt. Die Versuche dazu wurden analog zu den Versuchen mit *R. eutropha* durchgeführt (siehe Kapitel 5.5.2). Selektiert wurde auf Mineralmedium mit Citrat als C-Quelle (Eliminierung der *E. coli*-Stämme) und Chloramphenicol bzw. Ampicillin (Eliminierung von Stämmen die kein Plasmid erhalten hatten). Da *P. putida* U-JT103 bereits eine natürliche Resistenz gegenüber Ampicillin und Chloramphenicol zeigte, mussten Konzentration von 300 bzw. 200 µg·ml<sup>-1</sup> eingesetzt werden (siehe Kapitel 4.2.3). Mit Primern spezifisch für den „back-bone“ der jeweiligen Plasmide (siehe Kapitel 4.23, Tab. 10), wurde überprüft, ob die Transkonjuganten tatsächlich die Plasmide erhalten hatten. Es konnten sechs Transkonjuganten mit dem Plasmid pBBSG1 (U\_PL1/2/3/4/5/6) isoliert werden. In Transkonjuganten, die das Plasmid pMMSG6 erhalten hatten, konnte nach Kultivierung in Flüssigkultur das Plasmid nicht mehr nachgewiesen werden.

### 5.13 Transkonjuganten von *P. putida* U-JT103 mit dem Plasmid pBBSG1

Die Transkonjuganten von *P. putida* U-JT103, die das Plasmid pBBSG1 erhalten hatten, wurden auf ihre Fähigkeit, Toluol zu Benzoatdihydrodiol umsetzen zu können, untersucht. Dazu wurden die Zellen auf Mineralmedium ( $V = 200$  ml) mit Glukose als Substrat und mit  $0,18$  mmol Toluol [entspr.  $0,02$  % (v/v) bzw.  $1,8$  mM Toluol, wenn die Menge komplett in der Flüssigphase gelöst wäre] zur Induktion der Promotor-Operator-Region des Inserts bzw. mit  $1$  mM IPTG zur Induktion der Promotor-Operator-Region des Plasmids inkubiert. In der exponentiellen Phase wurden die Zellen abzentrifugiert, und die Umsatzaktivität für Toluol mit diesen Zellen in einem abgeschlossenen System mit  $50$  ml Phosphatpuffer bestimmt. Es wurden Toluolmengen von  $0,091$  mmol [entspr.  $0,02$  % (v/v) bzw.  $1,8$  mM] eingesetzt. Keine der Transkonjuganten setzte Toluol zu Benzoatdihydrodiol um.

Es wurde vermutet, dass die Zellen nicht lange genug induziert worden waren. Daher wurde während des Wachstums der Transkonjuganten gleichzeitig die Konzentration an Toluol im Medium gemessen, um den richtigen Zeitpunkt der Induktion der Gene für den Abbau von Toluol zu ermitteln. Wie Abb. 30 zeigt, konnte gegen Ende der Wachstumsphase immer noch ca.  $60$  % des zugegebenen Toluol detektiert werden. Kurzfristig konnte auch Benzoat im Medium nachgewiesen werden. Benzoatdihydrodiol wurde aber erst am nächsten Morgen nachgewiesen. Restliches Toluol war zu diesem Zeitpunkt ebenfalls noch nachweisbar. Aufgrund der schlechten Induktion der katabolen Enzyme auf dem Plasmid konnten keine Umsatzraten mit Ruhezellen bestimmt werden. Eine mögliche Ursache für die schlechte Expression der Gene könnte in der hohen Dosis an Chloramphenicol liegen. Chloramphenicol hemmt die Proteinsynthese. Zur Selektion des Vektors reichen normalerweise  $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  aus. Der Stamm war zwar in der Lage, in Anwesenheit hoher Konzentrationen von Chloramphenicol zu wachsen, trotzdem kann dadurch die Proteinsynthese beeinträchtigt sein. Wurde die Konzentration von Chloramphenicol verringert (maximal  $100$  statt  $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), so konnten höhere Wachstumsraten ( $0,6$  statt  $0,4 \text{ h}^{-1}$ ) ermittelt werden. Allerdings wurde Toluol in diesen Fällen überhaupt nicht mehr abgebaut. Dies deutete daraufhin, dass die Zellen das Plasmid verloren hatten. Somit konnte die Reaktionsrate für den Umsatz von Toluol zu Benzoatdihydrodiol durch den Einbau der Gene auf einem Plasmid nicht erhöht werden.



**Abb. 30:** Wachstum von *P. putida* U\_PL1 auf Glukose mit gleichzeitiger Induktion der Gene für den Abbau von Toluol auf dem Plasmid pBBSG1.

Die Transkonjugante U\_PL1 wurde in Mineralmedium ( $V = 200$  ml) mit Glukose und Chloramphenicol ( $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) bei  $30^\circ\text{C}$  über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen 1:10 in frisches Mineralmedium mit Glukose und Chloramphenicol überimpft. Zur Induktion und als Transformationssubstrat wurde  $0,38$  mmol Toluol [entspr.  $0,02\%$  (v/v) bzw.  $1,8$  mM, wenn die Menge komplett in der Flüssigphase gelöst wäre, so auch im Diagramm dargestellt] ins Medium zugegeben. Es wurde die optische Dichte (OD), die Abnahme von Toluol und die Zunahme von Benzoat und Benzoatdihydrodiol (DHB) bestimmt.

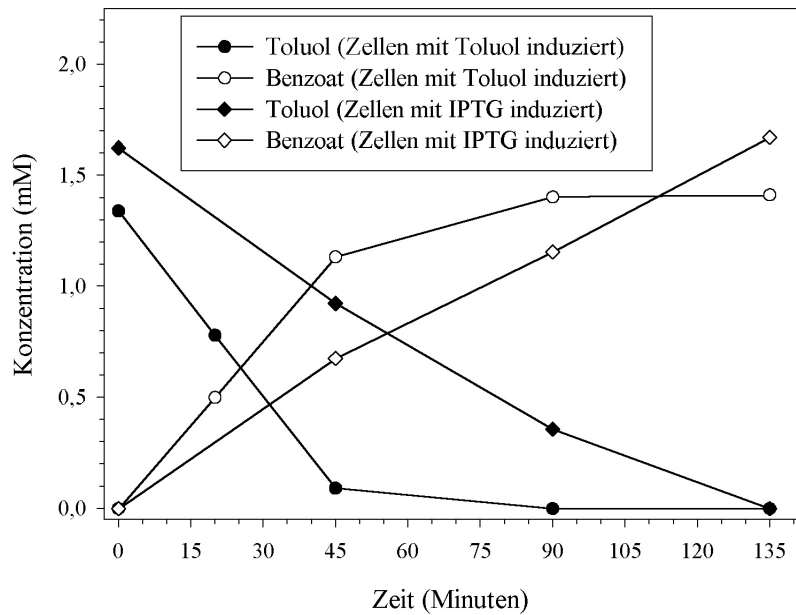
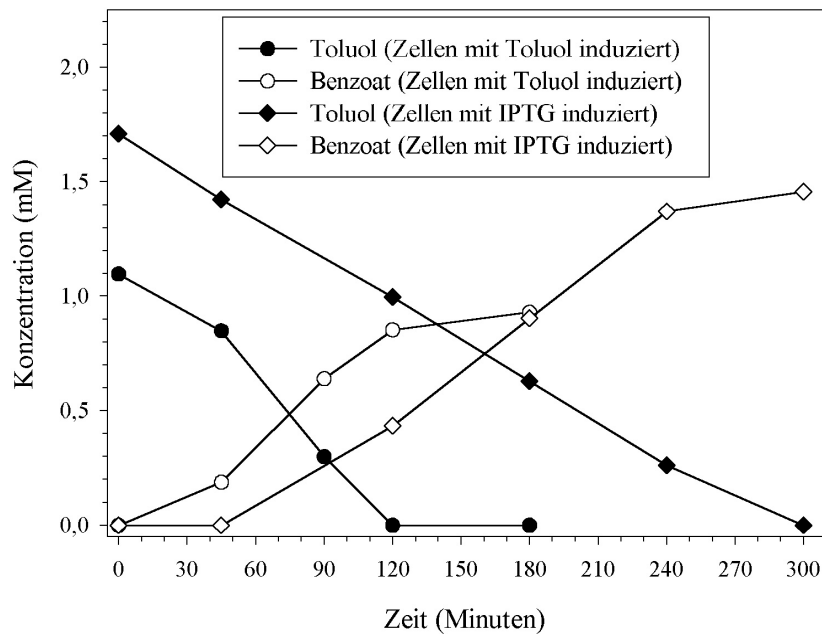
#### 5.14 Expression der Gene für den Abbau von Toluol in *E. coli*

Die Übertragung der Gene für den Abbau von Toluol mit Hilfe von Plasmiden in die Stämme *R. eutropha* B9 und *P. putida* U-JT103 führte nicht zu der erhofften Steigerung der Produktbildungsrate. Es war aber bereits gelungen, Gene für den Abbau von Toluol in *E. coli* zu exprimieren. So konnten Zystra und Gibson (1989) durch Subklonierung der Gene *todC1C2BADE* aus *P. putida* F1 und anschließende Expression in *E. coli* JM109 Toluol-*cis*-2,3-dihydrodiol aus Toluol anreichern. Wahbi *et al.* (1996) klonierten die Toluol-Dioxygenase aus *P. putida* NCIMB 11767 auf einem  $4,8$  kb großen Fragment in pUC18 und exprimierten die Gene in *E. coli* TG2. Der rekombinante Stamm wurde zur Produktion von Toluol-*cis*-2,3-dihydrodiol aus Toluol eingesetzt. Panke *et al.* (1999) klonierten die Xylol-Monooxygenase (*xylMA*) aus *P. putida* mt-2 und setzten den rekombinanten *E. coli* JM101 (pSPZ3) zur Bio-transformation von Styrol zu (*S*)- Styroloxid im Zweiphasensystem ein. Aufgrund der schwachen Toleranz gegenüber Toluol war der Stamm *E. coli* DH5 $\alpha$  zu Beginn dieser Arbeit als

möglicher Biokatalysator für die Produktion von Benzoatdihydrodiol aus Toluol zunächst nicht in Betracht gezogen worden. Der Stamm wurde zunächst nur zur Transformation der neu konstruierten Plasmide eingesetzt. Allerdings zeigten auch die Stämme *R. eutropha* B9 und *P. putida* U-JT103 eine geringe Toleranz gegenüber Toluol, die durch Einbau der Gene für den Abbau auch nicht verstärkt werden konnte. Die oben aufgeführten Beispiele zeigten, dass *E. coli*-Stämme unter bestimmten Umständen in der Lage waren, auch toxische Substanzen wie Styrol oder Toluol umzusetzen. Zudem ist *E. coli* eine geeignete Art zur Klonierung und Stabilisierung von Genen auf Plasmiden. Somit sollte versucht werden, ein rekombinantes *E. coli*-System für den Abbau von Toluol zu Benzoatdihydrodiol zu konstruieren.

#### 5.14.1 Umsatz von Toluol zu Benzoat

Zunächst wurde die Expression der Gene für den Abbau von Toluol zu Benzoat mit Hilfe der konstruierten „broad-host-range“-Plasmide pBBSG1 und pMMSG6 (siehe Kapitel 5.5.1) in *E. coli* DH5 $\alpha$  untersucht. Die Stämme wurden dazu in Komplexmedium mit dem jeweiligen Antibiotikum bei 37 °C inkubiert und mit Toluol (Induktion von *xylR* auf dem „catabolic segment *upp* TOL“) oder mit IPTG (Induktion der Vektorpromotoren) induziert. Nach drei Stunden Induktion wurden die Zellen abzentrifugiert und die Umsatzaktivitäten bestimmt (siehe Kapitel 4.4.1). *E. coli* DH5 $\alpha$  (pBBSG1) sowie *E. coli* DH5 $\alpha$  (pMMSG6) setzten Toluol zu Benzoat um (Abb. 31A und B). Dabei zeigten Zellen, die mit Toluol induziert worden waren, eine höhere Aktivität als die mit IPTG induzierten Zellen. Die Produktbildungsraten von Benzoat aus Toluol betragen im Falle von *E. coli* DH5 $\alpha$  (pMMSG6) 0,95 mmol·h<sup>-1</sup>·g C<sub>X</sub><sup>-1</sup> (31,5 U·g Zellprotein<sup>-1</sup>) mit Toluol induzierten Zellen (Zeitintervall von 0 - 45 Minuten) und 0,46 mmol·h<sup>-1</sup>·g C<sub>X</sub><sup>-1</sup> (15,3 U·g Zellprotein<sup>-1</sup>) mit IPTG induzierten Zellen (Zeitintervall von 0 - 90 Minuten). Für *E. coli* DH5 $\alpha$  (pBBSG1) wurden Bildungsraten von 0,34 mmol·h<sup>-1</sup>·g C<sub>X</sub><sup>-1</sup> (11,3 U·g Zellprotein<sup>-1</sup>) mit Toluol induzierten Zellen (Zeitintervall von 45 - 120 Minuten) und 0,27 mmol·h<sup>-1</sup>·g C<sub>X</sub><sup>-1</sup> (7,1 U·g Zellprotein<sup>-1</sup>) mit IPTG induzierten Zellen ermittelt (Zeitintervall von 45 - 180 Minuten).

A) *E. coli* DH5 $\alpha$  (pMMSG6)B) *E. coli* DH5 $\alpha$  (pBBSG1)

**Abb. 31:** Umsatz von Toluol zu Benzoat mit *E. coli* DH5 $\alpha$  (pMMSG6) (A) und *E. coli* DH5 $\alpha$  (pBBSG1) (B).

Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C in LB-Medium mit 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  Ampicillin (A) bzw. 10  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  Chloramphenicol (B) kultiviert und am nächsten Morgen 1:10 in frisches LB-Medium ( $V = 200$  ml) mit dem jeweiligen Antibiotikum überimpft. Nach ca. einer Stunde ( $\text{OD}_{546\text{nm}} = 0,41$ ) wurde 0,4 mM IPTG bzw. 0,19 mmol Toluol [entspr. 0,01 % (v/v) bzw. 1 mM] den Ansätzen zugegeben. Nach weiteren drei Stunden Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen abzentrifugiert und in Phosphatpuffer resuspendiert. Die Ruhezelleexperimente wurden in Phosphatpuffer mit einem Volumen von 50 ml ( $V_{\text{Gasphase}} = 315$  ml) durchgeführt. Der Umsatz von Toluol wurde durch Zugabe von 0,07 mmol Toluol [entspr. 0,015 % (v/v) bzw. 1,4 mM, wenn die Menge komplett in der Flüssigphase gelöst wäre; so auch im Diagramm dargestellt] gestartet. Die Bakteriensuspension in den Ansätzen wurde zu einer  $\text{OD}_{546\text{nm}}$  von ca. 4 ( $C_X = 1,6 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) eingestellt. Als Auxiliarsubstrat enthielten die Ansätze 1 mM Glukose.

### 5.14.2 Versuche zur Konstruktion eines Plasmids mit Genen für den Abbau von Toluol zu Benzoatdihydrodiol

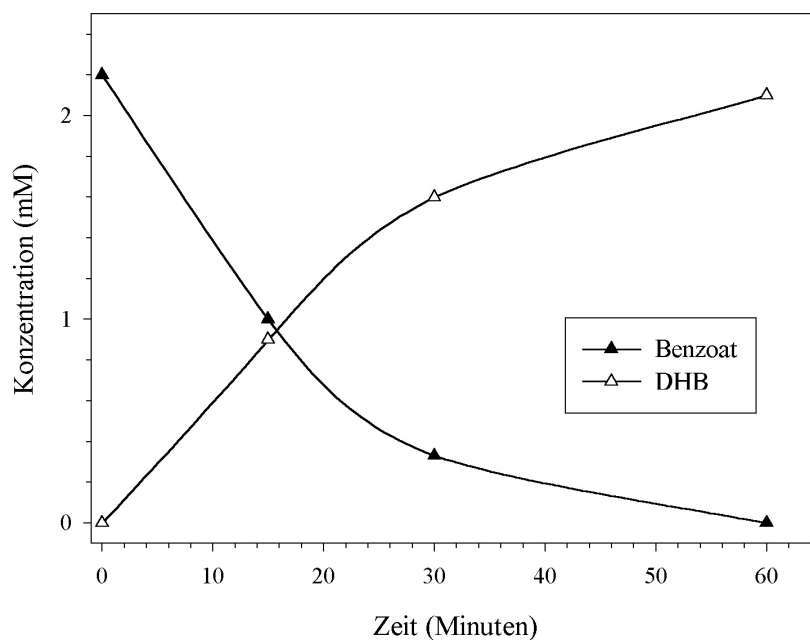
Im Gegensatz zu *R. eutropha* B9 und *P. putida* U-JT103, die beide bereits eine chromosomal integrierte Benzoat-Dioxygenase besaßen, musste zur Bereitstellung des Abbauweges von Toluol zu Benzoatdihydrodiol in *E. coli* das Gen dieses Enzyms noch zusätzlich eingebaut werden. Die Idee bestand darin, in die vorhandenen „broad-host-range“-Plasmide pMMSG6 und pBBSG1 das Gen der noch fehlenden Benzoat-Dioxygenase zu klonieren. Die Benzoat-Dioxygenase sollte dabei unter der Kontrolle des Promotors des „catabolic segment *upp* TOL“ stehen. Es sollten die Gene für die Benzoat-Dioxygenase (*benABC*) aus *Acinetobacter sp.* ADP1 kloniert werden. In den Plasmiden pMMSG6 und pBBSG1 war das „catabolic segment *upp* TOL“ bereits durch eine „blunt-end“-Ligation in die *Sma*I-Schnittstelle (pMMSG6) bzw. in die *Eco*RV-Schnittstelle (pBBSG1) kloniert worden. Für die stromabwärts vom Insert noch vorhandenen Schnittstellen der „multiple cloning site“ der Vektoren fanden sich auch Schnittstellen im bereits vorhandenen Insert. Auch ein Einfügen von zusätzlichen Schnittstellen in die Vektoren mittels PCR war durch das vorhandene Insert nicht möglich, das durch seine Größe von 12 kb sehr viele Schnittstellen für unterschiedliche Restriktionsenzyme aufwies. Daher sollte zunächst die Benzoat-Dioxygenase kloniert werden und anschließend das „catabolic segment *upp* TOL“ stromaufwärts in den Vektor eingefügt werden.

#### 5.14.2.1 Klonierung der Benzoat-Dioxygenase aus *Acinetobacter sp.* ADP1

Da der Vektor pBBR1MCS im Gegensatz zu pMMB66EH die Möglichkeit zur „Blau-Weiß-Selektion“ und damit ein schnelleres Auffinden von positiven Klonen bot, wurde dieser für die Klonierung ausgewählt. Die Gene der Benzoat-Dioxygenase, *benABC*, wurden aus *Acinetobacter sp.* ADP1 kloniert. Die Sequenz (Accessionno. AF009224, Neidle *et al.*, 1991) wies keine Schnittstellen für *Spe*I und *Sac*I auf, weshalb Primer mit überhängenden Enden, die der *Spe*I- bzw. der *Sac*I-Schnittstelle entsprachen, konstruiert wurden (siehe Kapitel 4.22, Tab. 9). Diese Primer wurden zur Amplifikation der Benzoat-Dioxygenase-Gene eingesetzt. Als Template-DNA diente genomische DNA aus *Acinetobacter sp.* ADP1. Es konnte ein 3,3 kb großes PCR-Produkt mit einer *Spe*I-Schnittstelle am 5'-Ende und einer *Sac*I-Schnittstelle am 3'-Ende amplifiziert werden (Abb. 33). Das PCR-Fragment wurde über ein Agarosegel aufgereinigt und anschließend mit *Spe*I und *Sac*I nacheinander verdaut. Auch der Vektor pBBR1MCS wurde mit beiden Enzymen geschnitten und über ein Agarosegel aufgereinigt und anschließend mit dem verdauten Fragment ligiert. Der Ligationsansatz wurde in *E. coli*

DH5 $\alpha$  transformiert. Zellen, die ein Plasmid mit Insert erhalten hatten („Blau-Weiß-Selektion“), wurden weiter untersucht. Dazu wurde das Plasmid aus den Klonen isoliert und zur Kontrolle mit *SpeI* und *SacI* verdaut. Zudem wurden Teile des Inserts sequenziert. Das erhaltene Plasmid wurde pBBSG2 genannt (Abb. 33).

Bevor die Gene für den Abbau von Toluol zu Benzoat in das Plasmid pBBSG2 ligiert wurden, wurde zunächst überprüft, ob die Benzoat-Dioxygenase auch exprimiert wird. Dazu wurde das Plasmid wieder in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert. Die Zellen wurden auf LB-Medium angezogen und mit IPTG induziert. Nach drei Stunden wurden die Zellen abzentrifugiert und ein Ruhezellumsatz mit Benzoat gestartet. Die Zellen waren in der Lage, das Benzoat zu Benzoatdihydrodiol abzubauen (Abb. 32). Die Bildungsrate von Benzoatdihydrodiol aus Benzoat (Zeitintervall von 0 - 30 Minuten) betrug  $2,5 \text{ mmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g C}_X^{-1}$  ( $83,3 \text{ U}\cdot\text{g Zellprotein}^{-1}$ ). Somit konnte versucht werden, das „catabolic segment *upp* TOL“ über eine „blunt-end“-Ligation in das Plasmid pBBSG2 zu integrieren.



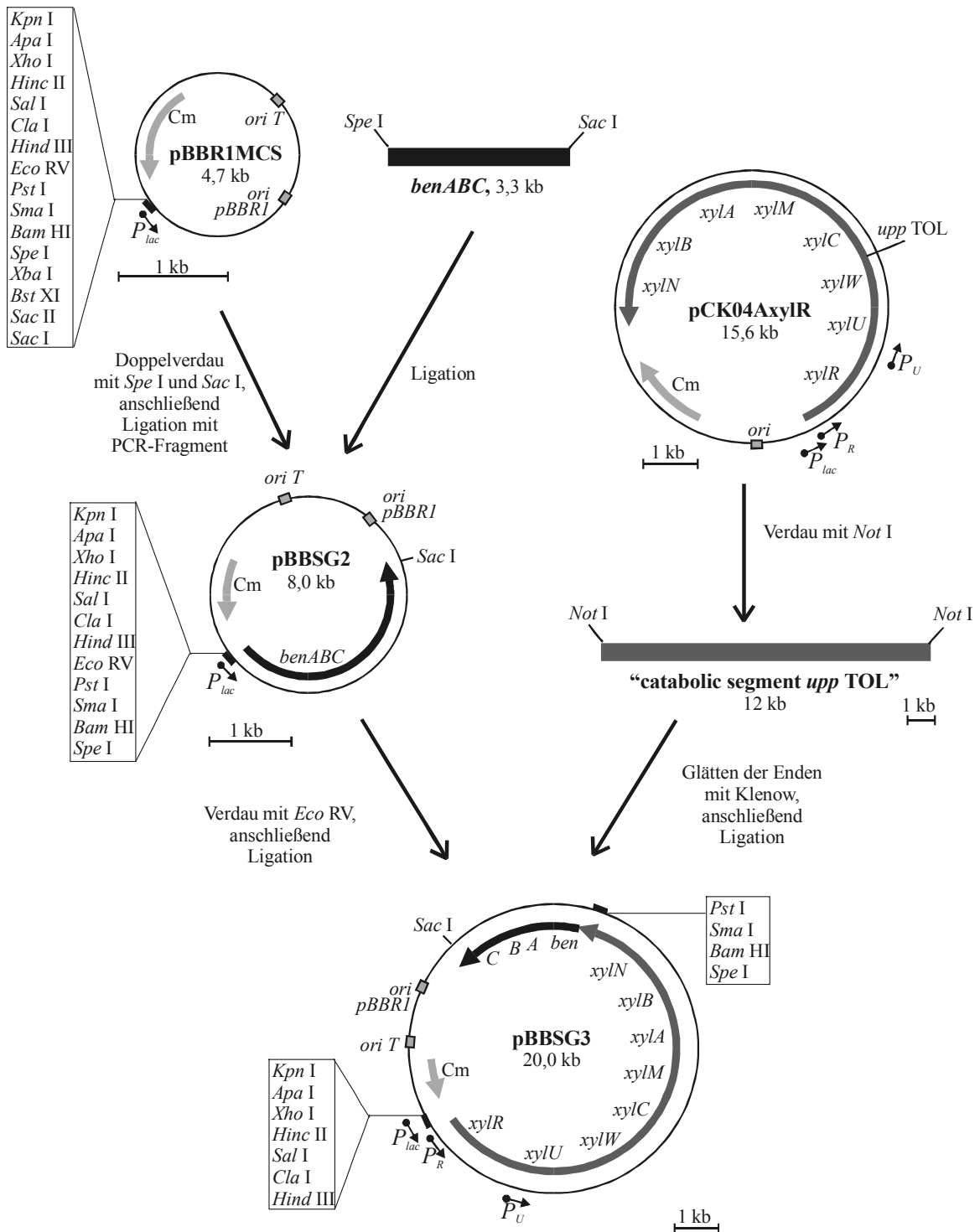
**Abb. 32:** Umsatz von Benzoat zu Benzoatdihydrodiol (DHB) mit *E. coli* DH5 $\alpha$  (pBBSG2).

Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C in LB-Medium mit  $10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  Chloramphenicol kultiviert und am nächsten Morgen 1:10 in frisches LB-Medium mit Antibiotikum überimpft. Nach ca. einer Stunde ( $\text{OD}_{546\text{nm}} = 0,53$ ) wurde  $0,4 \text{ mM}$  IPTG zur Induktion der Benzoat-Dioxygenase zugegeben. Nach weiteren drei Stunden Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen abzentrifugiert und in Phosphatpuffer resuspendiert. Die Bakteriensuspension in den Ansätzen wurde zu einer  $\text{OD}_{546\text{nm}}$  von ca. 3,2 ( $C_X = 1,3 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) eingestellt. Als Auxiliarsubstrat enthielten die Ansätze  $1 \text{ mM}$  Glukose.



#### 5.14.2.2 Klonierung des „catabolic segment *upp* TOL“ in pBBSG2

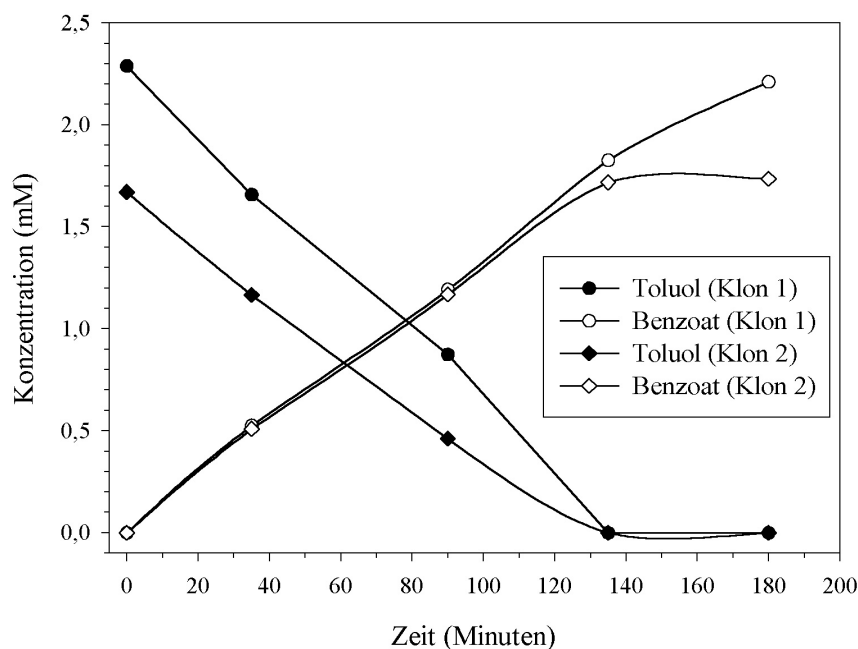
Stromaufwärts von *benABC* fanden sich Schnittstellen für *Sma*I (13 - 7 bp vor *benA*) und *Eco*RV (30 - 24 bp vor *benA*). Beide Enzyme produzieren beim Schneiden keine überhängenden Enden. Da *benABC* aber eine Schnittstelle für *Sma*I aufwies, wurde das Plasmid pBBSG2 mit *Eco*RV geschnitten. Das „catabolic segment *upp* TOL“ wurde mit *Not*I aus dem Plasmid pCK04AxylR ausgeschnitten. Die Enden des Fragments wurden mit dem Klenow-Enzym geglättet. Anschließend wurde das Fragment in das geschnittene Plasmid pBBSG2 ligiert (Abb. 33). Der Ligationsansatz wurde in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert. Da eine „Blau-Weiß-Selektion“ aufgrund des bereits vorhandenen Inserts *benABC* nicht mehr möglich war, mussten alle Klone untersucht werden. Die Kolonien wurden mit einer Koloniehybridisierung auf das Vorhandensein des „catabolic segment *upp* TOL“ überprüft (siehe Kapitel 4.21). Als Sonde wurde ein markiertes Fragment des Gens der Xylol-Monooxygenase (*xy*lMA) eingesetzt. Plasmide der positiven Klone wurden isoliert und mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut. Anhand des entstandenen Fragmentmusters konnte die Größe der Plasmide bestimmt werden. Plasmide mit der richtigen Größe (20,0 kb) wurden teilweise sequenziert, um die Richtung des eingefügten Inserts zu überprüfen. Es konnten zwei Klone isoliert werden, die Plasmide enthielten, bei denen die Gene für die Oxidation von Toluol zu Benzoat in der gleichen Richtung wie die Gene für die Benzoat-Dioxygenase angeordnet waren. Somit konnte die Transkription aller Gene über den Promotor des „catabolic segment *upp* TOL“ gesteuert werden. Das Plasmid wurde pBBSG3 genannt.



**Abb. 33:** Konstruktion der Plasmide pBBSG2 und pBBSG3.

Die Benzoat-Dioxygenase *benABC* wurde aus *Acinetobacter sp.* ADP1 amplifiziert. Die Primer wurden so konstruiert, dass überhängende Enden vorhanden waren, die der *Spe I*- bzw. *Sac I*-Schnittstelle entsprachen. Das 3,3 kb große Fragment wurde mit den Enzymen geschnitten und in den ebenfalls mit *Spe I* und *Sac I* verdauten Vektor pBBR1MCS ligiert. Das so konstruierte Plasmid pBBSG2 wurde anschließend mit *EcoRV* geschnitten, um glatte Enden für eine „blunt-end“-Ligation zu erhalten. Das „catabolic segment *upp TOL*“ wurde mit *Not I* aus dem Plasmid pCK04AxyIR ausgeschnitten und die überhängenden Enden des Fragments mit dem Klenow-Enzym geglättet. Nach Ligation des Fragments mit dem geschnittenen Plasmid pBBSG2 konnte das Plasmid pBBSG3 isoliert werden.

Mit den isolierten Klonen wurden Umsatzversuche mit Toluol als Substrat durchgeführt. Dazu wurden die Zellen auf LB-Medium kultiviert und mit Toluol bzw. IPTG induziert. Nach drei Stunden wurden die Zellen abzentrifugiert und die Umsatzaktivität von Toluol bestimmt. Die Zellen waren zwar in der Lage, Toluol zu Benzoat umzusetzen, aber der anschließende Umsatz von Benzoat zu Benzoatdihydrodiol erfolgte nicht (Abb. 34). Dabei spielte es keine Rolle, ob die Zellen mit Toluol oder mit IPTG induziert worden waren. Die Bildungsrate von Benzoat aus Toluol (Zeitintervall von 0 - 140 Minuten) betrug  $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g C}_X^{-1}$  ( $16,6 \text{ U}\cdot\text{g Zellprotein}^{-1}$ ).



**Abb. 34:** Umsatz von Toluol mit *E. coli* DH5 $\alpha$  (pBBSG3)-Klon 1 und -Klon 2.

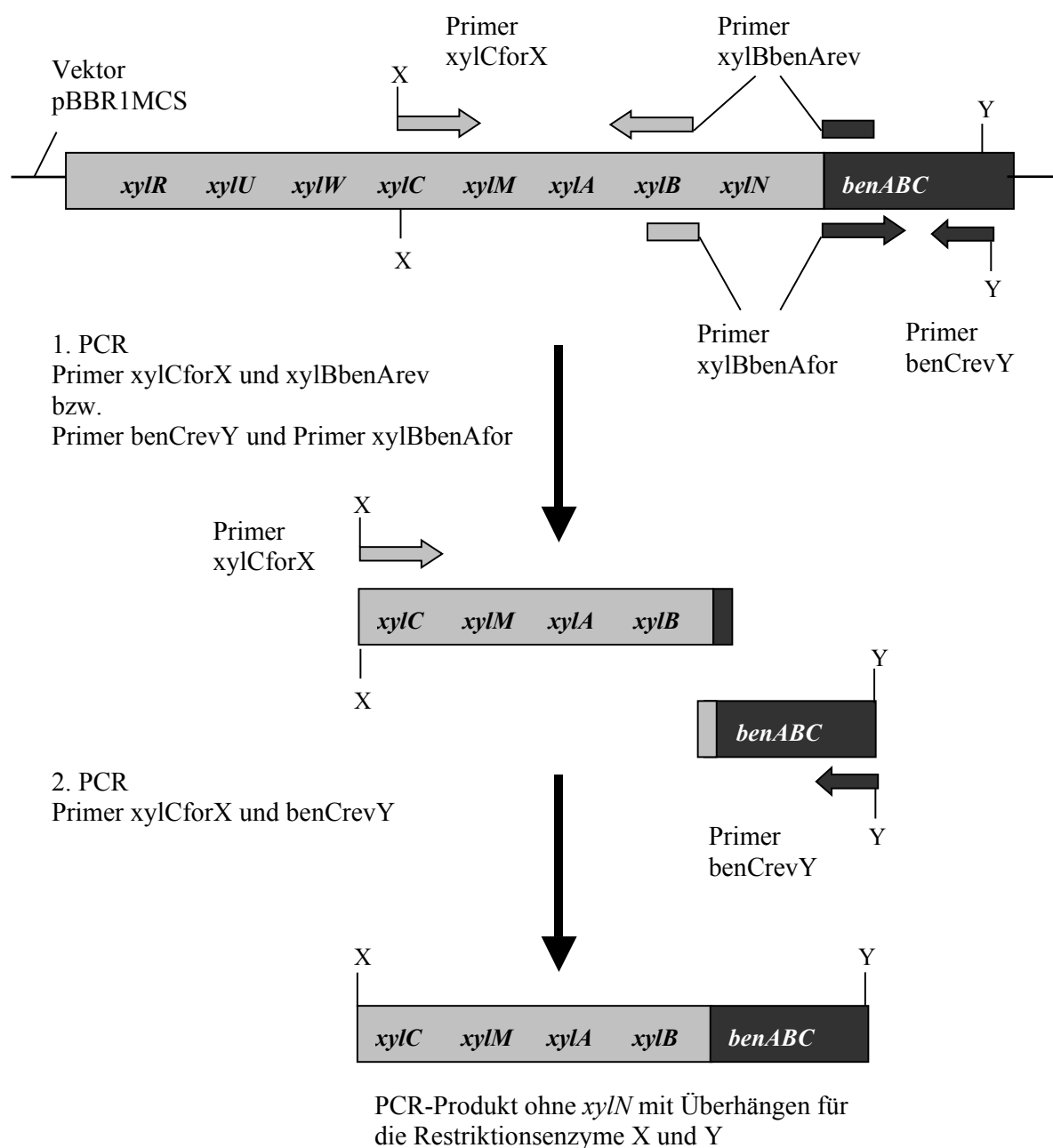
Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C in LB-Medium mit  $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  Chloramphenicol kultiviert und am nächsten Morgen 1:10 in frisches LB-Medium ( $V = 200 \text{ ml}$ ) überimpft. Nach ca. einer Stunde ( $\text{OD}_{546\text{nm}} = 0,49$ ) wurde  $0,4 \text{ mM}$  IPTG bzw.  $0,19 \text{ mmol}$  Toluol [entspr.  $0,01 \%$  (v/v) bzw.  $1 \text{ mM}$ ] zur Induktion der Enzyme auf dem Plasmid zugegeben. Nach weiteren drei Stunden Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen abzentrifugiert und in Phosphatpuffer resuspendiert. Die Ruhezelleexperimente wurden in Phosphatpuffer mit einem Volumen von  $50 \text{ ml}$  ( $V_{\text{Gasphase}} = 315 \text{ ml}$ ) durchgeführt. Der Umsatz von Toluol wurde durch Zugabe von  $0,09 \text{ mmol}$  Toluol [entspr.  $0,02 \%$  (v/v) bzw.  $1,8 \text{ mM}$  Toluol, wenn die Menge komplett in der Flüssigphase gelöst wäre; so auch im Diagramm dargestellt] gestartet. Die Bakteriensuspension in den Ansätzen wurde zu einer  $\text{OD}_{546\text{nm}}$  von ca.  $4,0$  ( $C_X = 1,6 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) eingestellt. Als Auxiliarsubstrat enthielten die Ansätze  $1 \text{ mM}$  Glukose.

### 5.14.2.3 Weitere Versuche zur Konstruktion eines Plasmids für den Abbau von Toluol zu Benzoatdihydrodiol

Es wurde vermutet, dass ein Terminationssignal im „catabolic segment *upp* TOL“ dazu geführt hatte, dass die Gene für die Benzoat-Dioxygenase nicht mehr abgelesen worden waren und somit auch nicht exprimiert werden konnten. Da das Segment neben dem Regulatorgen (*xylR*) und den Strukturgenen (*xylC*, *xylMA* und *xylB*) noch weitere Gene (*xylU*, *xylW*, *xylN*) enthält, deren Genprodukte bisher keiner Funktion für den katabolen Stoffwechsel von Toluol zugeordnet werden konnten (Kasai *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 1997), sollte versucht werden, an die Stelle eines dieser Gene die Gene für die Benzoat-Dioxygenase zu klonieren. Ausgehend vom Plasmid pBBSG3 (Abb. 33) sollte dabei *xylN*, das letzte Gen stromabwärts gesehen im Segment, deletiert werden. Die Deletion sollte mittels PCR erzeugt werden (Higuchi, 1990). In Abb. 35 ist die geplante Vorgehensweise dargestellt.

Um die gewünschte Deletion zu erzeugen, wurden Primer gewählt, bei denen ein Teil von der Sequenz für *xylB* aus *P. putida* mt-2 (pWW0) (Accessionno. D63341; Harayama direct submission, 1997) und der andere Teil von der Sequenz für *benA* aus *Acinetobacter sp.* ADP1 (Accessionno. AF009224; Neidle *et al.*, 1991) abgeleitet wurden (Abb. 35). Der Sequenzbereich von *xylN* wurde bei der Konstruktion der Primer ausgespart. Die beiden Primer waren zueinander komplementär (Primer *xylBbenAfor* und *xylBbenArev*). Die Gegenprimer sollten stromaufwärts bzw. stromabwärts von Schnittstellen X und Y gewählt werden, die in den *xyl*-Genen bzw. in den *ben*-Genen nur einmal vorliegen. In einer ersten PCR sollten damit Produkte amplifiziert werden, die den Regionen stromaufwärts („catabolic segment *upp* TOL“ ohne *xylN* mit 3'-Ende homolog zu *benA*) bzw. stromabwärts (*benABC* mit 5'-Ende homolog zu *xylB*) der Deletion von *xylN* entsprachen. In einer weiteren PCR sollte dann mit den äußeren Primern ein Fragment amplifiziert werden, in dem *benABC* direkt an *xylB* anschließen.

Bei der Restriktionsstellenanalyse wurde aber kein Enzym gefunden, das jeweils nur einmal in der *xyl*- bzw. der *ben*-Sequenz schneidet. Zudem durfte auch der Vektor pBBR1MCS (Accessionno. U02374; Kovach *et al.*, 1994) keine Schnittstellen für die Enzyme aufweisen, da das Insert aufgrund der „blunt-end“-Ligation nicht aus dem Vektor ausgeschnitten werden konnte. Dies erschwerte die Suche zusätzlich. Auch ein Enzym, das sowohl die *xyl*-Sequenz als auch die *ben*-Sequenz schneidet, konnte nicht gefunden werden, zumal dabei auch immer zusätzlich die Vektorsequenz geschnitten wurde.

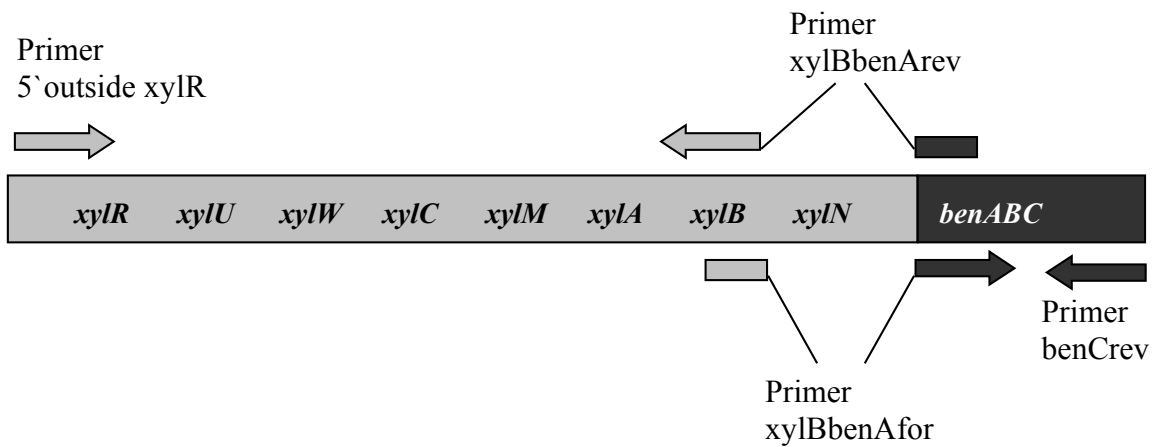


**Abb. 35:** Einfügen einer Deletion in das upper-Operon über PCR ausgehend vom Plasmid pBBSG3. Es wurden Primer gewählt, bei denen ein Teil von der Sequenz für *xylB* aus *P. putida* mt-2 (pWW0) (Accessionno. D63341; Harayama direct submission, 1997) und der andere Teil von der Sequenz für *benA* aus *Acinetobacter* sp. ADP1 (Accessionno. AF009224; Neidle *et al.*, 1991) abgeleitet wurden. Der Sequenzbereich von *xylN* wurde bei der Konstruktion der Primer ausgespart. Die beiden Primer waren zueinander komplementär (Primer xylBbenAfor und xylBbenArev). Die Gegenprimer dazu sollten stromaufwärts von der Schnittstelle Y bzw. stromabwärts von der Schnittstelle X gewählt werden. In einer ersten PCR sollten damit Produkte amplifiziert werden, die den Regionen stromaufwärts bzw. stromabwärts der Deletion von *xylN* entsprachen. In einer weiteren PCR mit den beiden Produkten als Template-DNA sollte dann mit den äußeren Primern ein Fragment amplifiziert werden, in dem *benA* direkt an *xylB* anschloss. Anschließend sollten sowohl das Plasmid pBBSG3 (Entfernen des Fragments mit *xylN*) (Vektor pBBR1MCS, Accessionno. U02374; Kovach *et al.*, 1994) als auch das amplifizierte Fragment mit den Enzymen X und Y geschnitten werden und miteinander ligiert werden.

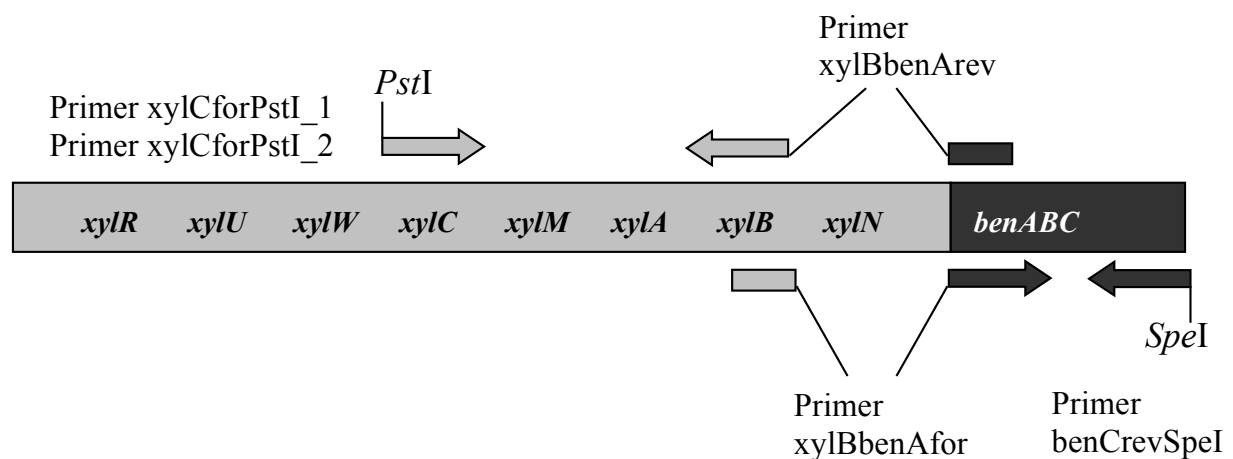
Trotz des Fehlens eines Enzyms, das nur einmal in den *xyl*- bzw. in den *ben*-Genen schneidet, wurde im Grunde die gleiche Strategie weiterverfolgt. Die Gegenprimer zu den die Deletion tragenden Primern mussten jetzt so gewählt werden, dass der komplette Abbauweg amplifiziert werden konnte (Abb. 36). Dabei wurden zwei Ansätze verfolgt: 1.) Amplifizierung des gesamten „catabolic segment *upp* TOL“ (12 kb) mit der Benzoat-Dioxygenase *benABC* (3 kb) und 2.) Amplifizierung nur der für den Abbau von Toluol zu Benzoatdihydrodiol relevanten Gene ohne Promotor-Operator-Region (5 kb + 3 kb). Im ersten Falle musste ein Fragment der Größe von 15 kb amplifiziert werden, das dann über eine „blunt-end“-Ligation in den Vektor pBBR1MCS eingebracht werden sollte. Im zweiten Ansatz musste ein 8 kb großes Fragment amplifiziert werden, an dessen Enden Schnittstellen für *Pst*I (5'-Ende) und für *Spe*I (3'-Ende) eingefügt werden konnten. Die Induktion der Gene würde in diesem Fall nicht mehr durch Zugabe von Toluol erreicht werden können, sondern musste über die Promotor-Regulator-Region des Vektors erfolgen.

Von den Primern, die die Deletion trugen, wurden vier verschiedene Paare entworfen. Dabei wurde der Bereich zwischen den beiden Genen *xylB* und *benA* variiert. Die Anzahl der Basen zwischen dem Stopcodon von *xylB* und dem Startcodon von *benA* betrug 12 (*xylBbenA*-for/rev\_3), 24 (*xylBbenA*-for/rev\_1) oder 33 (*xylBbenA*-for/rev\_4). In den Primern *xylBbenA*-for\_2 und *xylBbenA*-rev\_2 wurde das Startcodon von *xylN* durch das Startcodon von *benA* ersetzt (111 Basen zwischen Stop *xylB* und Start *benA*). Die vom Hersteller angegebenen Schmelztemperaturen lagen zwischen 65 und 68 °C. Die Sequenzen der äußeren Primer wurden bis auf den Primer *xylC*-for/*Pst*I\_1 und \_2 nicht variiert. Die Schmelztemperaturen dieser Primer lagen zwischen 60 und 62 °C. Für die PCR wurde das „Expand Long Template PCR System“ der Fa. Roche eingesetzt, das die Amplifikation besonders großer Fragmente ermöglichen sollte. Als Template-DNA wurde genomische DNA von *Acinetobacter* sp. ADP1 und Plasmid-DNA von pCK04*AxylR* eingesetzt. Die Primer sowie die PCR-Programme sind in Kapitel 4.22 beschrieben.

A) mit Promotor-Operator-Region:



B) ohne Promotor-Operator-Region:



**Abb. 36:** Einfügen einer Deletion in das upper-Operon durch Amplifizierung der Gene für den gesamten Abbauweg und anschließende Ligation in den Vektor pBBR1MCS.

Für die Deletion wurden Primer gewählt, bei denen ein Teil von der Sequenz für *xylB* und der andere Teil von der Sequenz für *benA* abgeleitet wurden. Der Sequenzbereich von *xylN* wurde bei der Konstruktion der Primer ausgespart (siehe auch Abb. 35). Die beiden Primer waren zueinander komplementär (Primer *xylBbenAfor* und *xylBbenArev*). Die Gegenprimer dazu wurden so gewählt, dass das gesamte upper-Operon (A) bzw. nur die für den Abbau relevanten Gene *xylCMAB* aus dem Operon (B) und die Benzoat-Dioxygenase-Gene *benABC* amplifiziert werden konnten. (Primer 5`-outside *xylR*: 5`-GCGACGAATTGGCGGATAAAGGGGAT-3`; Primer *benCrev*: 5`-TGAGTTAGTTGGCAGAG-3`, beide Primer ohne Überhänge für Schnittstellen. Sequenzen der übrigen Primer siehe Kapitel 4.22, Tab. 9).

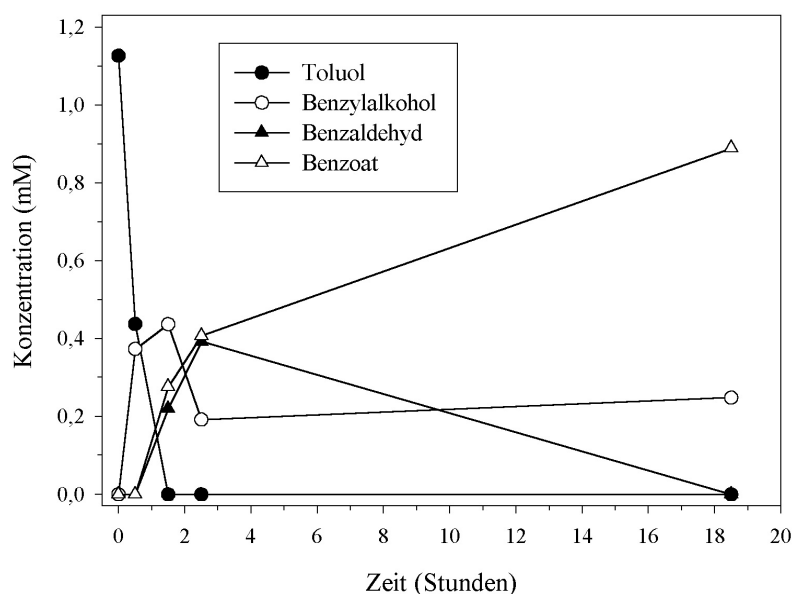
Die Benzoat-Dioxygenase-Gene *benABC* konnten mit allen möglichen Primerpaaren amplifiziert werden. Das 12 kb große Fragment, das das gesamte „catabolic segment *upp* TOL“ umfassen sollte, konnte nicht amplifiziert werden. Auch die Amplifikation des 5 kb großen Fragments war erschwert. Nur die Primerkonstellationen *xylCforPstI\_2/xylBbenArev\_3* und *xylCforPstI\_2/xylBbenArev\_4* lieferten ein Produkt in der richtigen Größe. Da bei der Amplifikation keine unspezifischen Produkte entstanden waren, konnten die Fragmente direkt aus dem PCR-Ansatz eluiert werden und mussten nicht über ein DNA-Gel aufgetrennt und gereinigt werden. Von den *ben*-Genen wurden nur die PCR-Produkte weiter bearbeitet, die mit den Primern *xylBbenAfor\_3* bzw. *\_4* amplifiziert werden konnten.

Im folgenden PCR-Ansatz wurden die aufgereinigten Fragmente als Template eingesetzt. Zur Amplifikation wurden nun die äußeren Primer verwendet. Die Temperatur zur Anlagerung („annealing temperature“) wurde stufenweise erhöht. Von jedem Ansatz (Ansatz\_3 und Ansatz\_4) konnte ein 8 kb großes Fragment amplifiziert werden. Die Ansätze enthielten allerdings noch eine große Menge an kleineren Fragmenten. Daher musste das 8 kb große Fragment über ein Agarosegel aufgereinigt werden. Anschließend wurden die Fragmente mit *PstI* und *SpeI* verdaut und in den ebenfalls mit *PstI* und *SpeI* geschnittenen Vektor pBBR1MCS ligiert. Die Ligationsansätze (Ansatz\_3 und Ansatz\_4) wurden in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert. Aus Ansatz 3 gingen keine Klone hervor. Dagegen konnten aus Ansatz 4 zwei positive Klone isoliert werden („Blau-Weiß-Selektion“). Die Plasmide wurden isoliert, und das Insert wurde teilweise sequenziert. Somit konnte das Plasmid pBBSG4 isoliert werden.

Um die Expression der Gene zu überprüfen, wurde das Plasmid wieder in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert. Die Zellen wurden auf LB-Medium kultiviert und mit IPTG drei bzw. sechs Stunden lang zur Induktion der Gene *xylCMABbenABC* inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in einen Ruhezellumsatz eingesetzt, der Toluol als Substrat enthielt (Abb. 37). Toluol wurde innerhalb von zwei Stunden vollständig abgebaut. Zunächst konnte nur Benzylalkohol im Medium nachgewiesen werden. Nach einer Stunde konnte dann auch Benzoat gemessen werden. Dieses wurde aber nicht weiter zu Benzoatdihydrodiol abgebaut. Nach zwanzig Stunden konnte neben Benzoat (75 %) immer noch Benzylalkohol (25 %) nachgewiesen werden.

Die Benzoat-Dioxygenase lag somit wieder nicht in einer aktiven Form vor. Zudem wurde Benzylalkohol ins Medium ausgeschieden und nicht weiter zu Benzoat umgesetzt. Ob die Akkumulation von Benzylalkohol im Medium mit dem Verlust der Gene *xylIU*, *xylIW* und *xylIN* oder mit dem Wegfall des Regulators *xylR* zusammenhing, wurde nicht weiter untersucht. Die Bildungsrate von Benzoat aus Toluol betrug  $0,26 \text{ mmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g C}_X^{-1}$  ( $8,5 \text{ U} \cdot \text{g Zellprotein}^{-1}$ ).





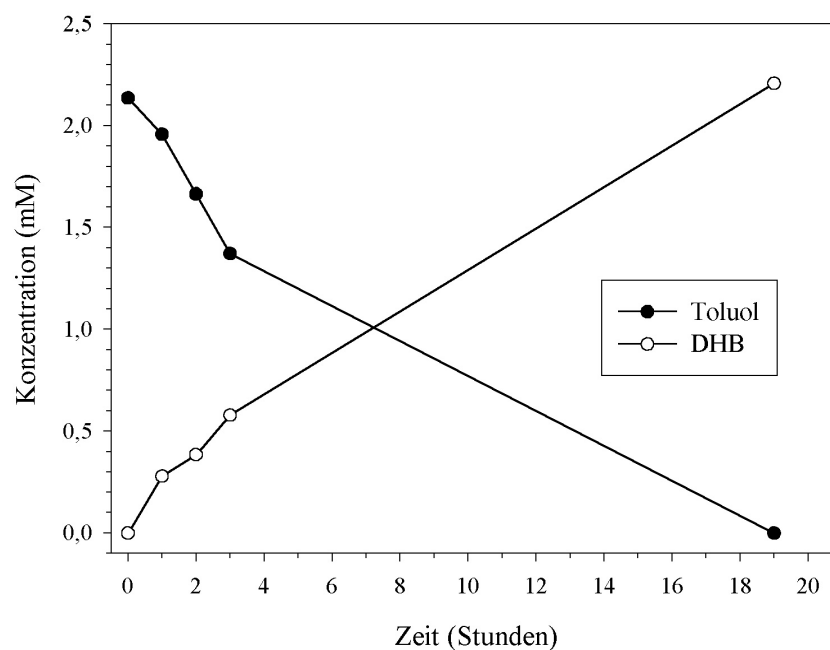
**Abb. 37:** Umsatz von Toluol durch *E. coli* DH5 $\alpha$  (pBBSG4).

Die Zellen wurden in LB-Medium mit  $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  Chloramphenicol bei  $37^\circ\text{C}$  über Nacht wachsen gelassen. Am nächsten Morgen wurden die Zellen 1:10 in frisches LB-Medium ( $V = 200 \text{ ml}$ ) mit Chloramphenicol überimpft. Nach Erreichen einer  $\text{OD}_{546\text{nm}}$  von ca. 0,4 wurde zur Induktion der Gene  $0,4 \text{ mM}$  IPTG ins Medium gegeben. Nach weiteren drei Stunden Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  wurden die Zellen abzentrifugiert, mit Phosphatpuffer gewaschen und anschließend in Phosphatpuffer resuspendiert. Die Ruhezellexperimente wurden in Phosphatpuffer mit einem Volumen von  $50 \text{ ml}$  ( $V_{\text{Gasphase}} = 315 \text{ ml}$ ) durchgeführt. Der Umsatz von Toluol wurde durch Zugabe von  $0,05 \text{ mmol}$  Toluol [entspr.  $0,01 \%$  (v/v) bzw.  $1,0 \text{ mM}$ , wenn die Menge komplett in der Flüssigphase gelöst wäre; so auch im Diagramm dargestellt] gestartet. Die optische Dichte der Zellsuspension wurde zu ca.  $\text{OD}_{546\text{nm}}$  von 2 ( $C_X = 0,8 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) eingestellt. Als Auxiliarsubstrat wurde den Ansätzen  $1 \text{ mM}$  Glukose zugefügt.

### 5.14.3 Umsatz von Toluol zu Benzoatdihydrodiol mit einer Mischkultur

Es war zwar gelungen, die Gene für den Abbau von Toluol zu Benzoatdihydrodiol auf einem Plasmid zu vereinigen (pBBSG3 und pBBSG4), ihre Expression war jedoch unvollständig. Dagegen konnten Plasmide konstruiert werden, mit deren Hilfe die Gene für den Abbau von Toluol zu Benzoat (pBBSG1 und pMMSG6) bzw. die der Benzoat-Dioxygenase (pBBSG2) aktiv exprimiert wurden. Daher wurde untersucht, ob eine Mischung der Zellen mit den unterschiedlichen Plasmiden in der Lage war, Toluol zu Benzoatdihydrodiol abzubauen. Da die Plasmide pMMSG6 und pBBSG2 unterschiedliche Antibiotikaresistenzen trugen und somit eine gemeinsame Kultivierung der plasmidtragenden *E. coli*-Stämme nicht möglich war, wurde der Versuch mit dem Plasmidpaar pBBSG1 und pBBSG2 durchgeführt, die beide eine Resistenz gegenüber Chloramphenicol trugen. Die Zellen wurden zunächst getrennt voneinander in LB-Medium kultiviert. Anschließend wurden sie im gleichen Verhältnis in frisches LB-

Medium überführt. Nach dreistündiger Induktion mit IPTG wurden die Zellen abzentrifugiert und der Umsatz von Toluol mit der Zellsuspension gestartet. Bereits nach einer Stunde konnte Benzoatdihydrodiol im Medium nachgewiesen werden. Benzoat wurde dagegen nicht nachgewiesen. Dies deutete auf eine schnelle Aufnahme des Benzoats durch die Zellen, welche die Benzoat-Dioxygenase exprimiert hatten, hin. Der Umsatz dauerte ca. fünf Stunden. Die Bildungsrate von Benzoatdihydrodiol aus Toluol war mit  $0,11 \text{ mmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g C}_X^{-1}$  relativ niedrig ( $3,8 \text{ U}\cdot\text{g Zellprotein}^{-1}$ ).



**Abb. 38:** Umsatz von Toluol zu Benzoatdihydrodiol (DHB) mit einer Mischkultur von *E. coli* DH5 $\alpha$  (pBBSG1) und *E. coli* DH5 $\alpha$  (pBBSG2).

Die Zellen wurden zunächst getrennt voneinander in LB-Medium mit  $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  Chloramphenicol bei  $37^\circ\text{C}$  über Nacht wachsen gelassen. Am nächsten Morgen wurden die Zellen jeweils 1:10 in frisches LB-Medium mit Chloramphenicol überimpft. Nach Erreichen einer  $\text{OD}_{546\text{nm}}$  von ca. 0,4 wurde zur Induktion der Gene  $0,4 \text{ mM}$  IPTG ins Medium gegeben. Nach weiteren drei Stunden Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  wurden die Zellen abzentrifugiert, mit Phosphatpuffer gewaschen und anschließend in Phosphatpuffer resuspendiert. Die Ruhezelleexperimente wurden in Phosphatpuffer mit einem Volumen von  $50 \text{ ml}$  ( $V_{\text{Gasphase}} = 315 \text{ ml}$ ) durchgeführt. Der Umsatz von Toluol wurde durch Zugabe von  $0,09 \text{ mmol}$  Toluol (entspr.  $0,02 \%$  (v/v) bzw.  $1,8 \text{ mM}$  Toluol, wenn die Menge komplett in der Flüssigphase gelöst wäre; so auch im Diagramm dargestellt) gestartet. Die optische Dichte der Zellsuspension wurde zu ca.  $\text{OD}_{546\text{nm}}$  von 4,0 ( $C_X = 1,6 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) eingestellt. Als Auxiliarsubstrat wurde den Ansätzen  $1 \text{ mM}$  Glukose zugefügt.

#### 5.14.4 Umsatz von Toluol zu Benzoatdihydrodiol mit einem Stamm

Die Mischkultur mit komplementären katabolen Plasmiden ermöglichte einen Umsatz von Toluol zu Benzoatdihydrodiol. Die Bildungsrate war allerdings sehr gering. Eine mögliche Ursache dafür bestand darin, dass das aus Toluol entstandene Benzoat erst aus den Zellen ausgeschleust wurde und dann für den Umsatz von Benzoat zu Benzoatdihydrodiol durch den komplementären Stamm wieder aufgenommen werden musste. Es war anzunehmen, dass die Transportprozesse zum einen viel Energie und damit Reduktionsäquivalente verschlungen hatten, die dann für den Umsatz nicht mehr zur Verfügung standen. Da der Abbau nacheinander in verschiedenen Zellen ablief, musste ohnehin zur Cofaktorregeneration ein zusätzliches Auxiliarsubstrat angeboten werden, da die interne Regeneration durch die Trennung des Abbauweges auf zwei verschiedene Organismen nicht funktionieren konnte. Zudem wird jede Transportbarriere die Kinetik der Reaktion negativ beeinflussen. Daher wurde überlegt, ob es nicht möglich wäre, beide Plasmide in einem Wirtsorganismus stabil zu integrieren.

Ob strukturell unterschiedliche Plasmide gemeinsam in einem Stamm stabilisiert werden können, hängt von den sogenannten Kompatibilitätsfaktoren ab. Plasmide mit einem breiten Wirtsspektrum („broad-host-range“) sind in verschiedene Gruppen eingeteilt. Aus der Gruppenzugehörigkeit ergibt sich, ob Plasmide zueinander kompatibel sind oder nicht. Der Vektor pBBR1MCS, der zur Klonierung des „catabolic segment *upp* TOL“ und zur Klonierung der Benzoat-Dioxygenase eingesetzt worden war, ist kompatibel mit Plasmiden aus den Gruppen IncP, IncW und IncQ (Kovach *et al.*, 1994). Der Vektor pMM66EH, der ebenfalls zur Klonierung des „catabolic segment *upp* TOL“ eingesetzt worden war, wird der Kompatibilitätsgruppe IncQ zugeordnet (Fürste *et al.*, 1986). Da beide Vektoren zusätzlich Gene für unterschiedliche Antibiotikaresistenzen trugen, wurde versucht, die Plasmide pBBSG2 (Träger der Benzoat-Dioxygenase-Gene, Abb. 33) und pMMSG6 (Träger des „catabolic segment *upp* TOL“, Abb. 16) in *E. coli* DH5 $\alpha$  zu integrieren. Dazu wurden die Plasmide nacheinander in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert. Selektiert wurde auf LB-Medium mit Ampicillin bzw. auf LB-Medium mit Ampicillin und Chloramphenicol. Von den Transformanten, die eine Resistenz gegen Ampicillin und Chloramphenicol zeigten, wurde ein Klon ausgewählt und für einen Umsatz mit Toluol als Substrat verwendet.

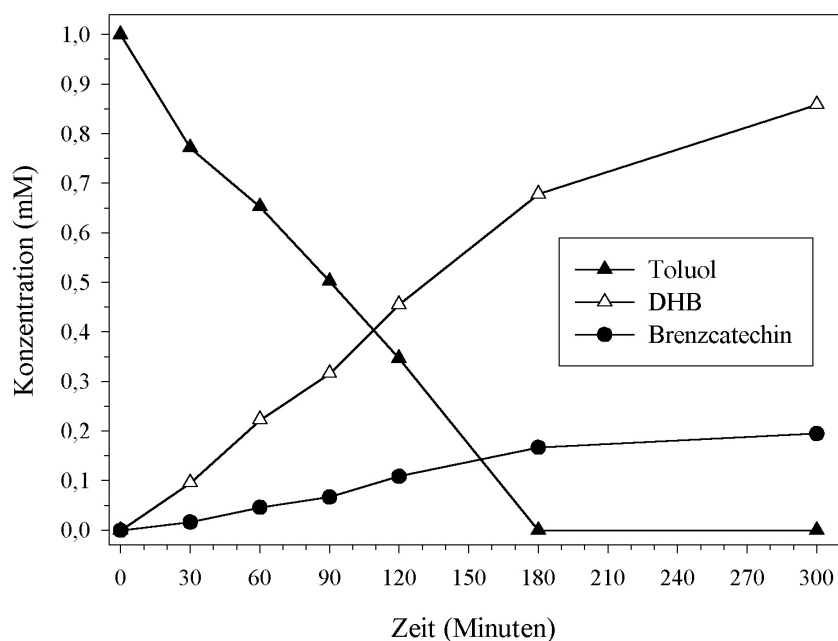
Zur Vorbereitung des Toluolumsatzes wurden die Zellen in LB-Medium mit den jeweiligen Antibiotika kultiviert und drei Stunden lang mit IPTG induziert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und die Umsatzaktivität bestimmt (Abb. 39). Die Zellen bildeten Ben-

zoatdihydrodiol aus Toluol mit einer Rate von  $0,16 \text{ mmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g C}_X^{-1}$  ( $5,3 \text{ U} \cdot \text{g Zellprotein}^{-1}$ ). Die Ausbeute betrug nach ca. drei Stunden 85 %.

Neben Benzoatdihydrodiol wurde eine weitere Substanz im Überstand nachgewiesen. Dabei handelte es sich um Brenzcatechin. Es wurde vermutet, dass das Brenzcatechin durch einen Abbau von Benzoatdihydrodiol entstanden war. Da aber keine Benzoatdihydrodiol-Dehydrogenase in *E. coli* DH5 $\alpha$  integriert worden war, musste die Bildung von Brenzcatechin aus Benzoatdihydrodiol durch eine Dehydrogenase von *E. coli* DH5 $\alpha$  erfolgt sein. Vergleicht man aber den Umsatz von Benzoat zu Benzoatdihydrodiol durch *E. coli* DH5 $\alpha$  (pBBSG2) (Abb. 32), so war eine Bildung von Brenzcatechin auszuschließen. Auch im Medium der Mischkultur war kein Brenzcatechin nachgewiesen worden (Abb. 38). Somit war die Bildung von Brenzcatechin nicht durch ein *E. coli* DH5 $\alpha$ -Enzym zu erklären, sondern musste von einem plasmidkodierten Enzym katalysiert worden sein. Es wurde vermutet, dass ein Enzym des „catabolic segment *upp* TOL“ für den Umsatz von Benzoatdihydrodiol verantwortlich sein könnte. Daher wurde versucht mit Zellen, die nur das Plasmid pMMSG6 enthielten (Abbau von Toluol zu Benzoat), Benzoatdihydrodiol umzusetzen. Zusätzlich wurde die Enzymaktivität dieser Zellen im Rohextrakt gemessen. Es zeigte sich, dass die Zellen Benzoatdihydrodiol nicht aufnehmen und auch nicht zu Brenzcatechin umsetzen konnten.

Die Bildung von Brenzcatechin konnte also nur bei Zellen beobachtet werden, die aus Toluol gebildetes Benzoat direkt weiter zu Benzoatdihydrodiol umsetzen konnten, ohne das Benzoat vorher aus der Zelle ausschleusen bzw. wieder in die Zelle aufnehmen zu müssen.

Trotz des unerwünschten Nebeneffektes war es gelungen, Toluol zu Benzoatdihydrodiol umzusetzen. Die Reaktionsrate konnte durch Stabilisierung der beiden Plasmide in einem Stamm gegenüber der Mischkultur nicht wesentlich verbessert werden. Immerhin gelang der Umsatz ohne Auxiliarsubstrat.



**Abb. 39:** Umsatz von Toluol zu Benzoatdihydrodiol (DHB) mit *E. coli* DH5 $\alpha$  (pBBSG2/pBBSG6).

Die Zellen wurden zunächst in LB-Medium mit  $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  Chloramphenicol und  $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  Ampicillin bei  $37^\circ\text{C}$  über Nacht wachsen gelassen. Am nächsten Morgen wurden die Zellen 1:10 in frisches LB-Medium ( $V = 200 \text{ ml}$ ) mit den beiden Antibiotika überimpft. Nach Erreichen einer  $\text{OD}_{546\text{nm}}$  von ca. 0,4 wurde zur Induktion der Gene  $0,4 \text{ mM}$  IPTG ins Medium gegeben. Nach weiteren drei Stunden Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  wurden die Zellen abzentrifugiert, mit Phosphatpuffer gewaschen und anschließend in Phosphatpuffer resuspendiert. Die Ruhezellexperimente wurden in Phosphatpuffer mit einem Volumen von  $50 \text{ ml}$  ( $V_{\text{Gasphase}} = 315 \text{ ml}$ ) durchgeführt. Der Umsatz von Toluol wurde durch Zugabe von  $0,05 \text{ mmol}$  Toluol [entspr.  $0,01 \%$  (v/v) bzw.  $1,0 \text{ mM}$ , wenn die Menge komplett in der Flüssigphase gelöst wäre; so auch im Diagramm dargestellt] gestartet. Die optische Dichte der Zellsuspension wurde zu ca.  $\text{OD}_{546\text{nm}}$  von 3,6 ( $C_X = 1,44 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) eingestellt. Der Umsatz enthielt kein Auxiliarsubstrat.

## 6 Diskussion

### 6.1 Biotechnische Herstellung von Phenol aus Toluol

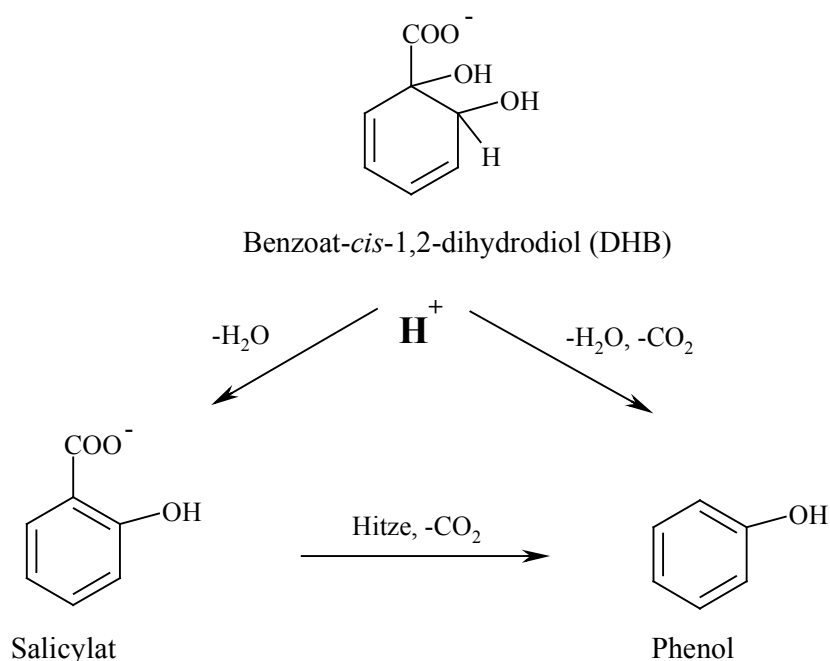
Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein biotechnisches Verfahren zur selektiven Hydroxylierung von Kohlenwasserstoffen zu entwickeln. Als Beispiel für einen derartigen Prozess sollte die Herstellung von Phenol aus Toluol letztlich unter Einsatz von lösungsmitteltoleranten Bakterienstämmen ermöglicht und in Hinblick auf eine großtechnische Realisierbarkeit untersucht werden. Um wirtschaftlich rentabel zu sein, sollte der Prozess die folgenden Kriterien erfüllen:

- hohe Umsatzraten,
- hohe Ausbeuten und Vermeidung von aufwendigen Aufreinigungsschritten,
- kostengünstige Herstellung des Biokatalysators,
- hohe Stabilität des Biokatalysators in Anwesenheit von Lösungsmitteln,
- genetische Stabilität des Biokatalysators,
- regulierbare Expression der relevanten Gene ohne Zugabe eines teuren Induktors,
- interne Cofaktorregeneration durch Verwendung minimaler Mengen eines Auxiliarsubstrates.

Die biotechnische Herstellung von Phenol ist theoretisch sowohl aus Benzol als auch aus Toluol möglich (siehe Kapitel 3.4). Benzol wird durch Monooxygenierung direkt zu Phenol oder durch Dioxygenierung zu Benzol-*cis*-dihydrodiol (*cis*-Cyclohexa-3,5-dien-1,2-diol) umgesetzt, das dann mit Hilfe von Säure zu Phenol rearomatisiert wird. Mit Toluol als Ausgangsverbindung wird über mehrere enzymatische Schritte, darunter eine Monooxygenierung und eine Dioxygenierung, Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol (*cis*-Cyclohexa-3,5-dien-1,2-diol-1-carboxylat, 1,2-Dihydro-*cis*-1,2-dihydroxybenzoat, DHB) hergestellt, das durch anschließende Decarboxylierung und Dehydratisierung in Phenol umgewandelt werden kann. Bei der sauren Umlagerung entsteht neben Phenol auch Salicylat in etwa gleichen Mengen (Abb. 40). Der Salicylatanteil der Mischung ist in einem weiteren chemischen Prozess durch Erhitzen zu Phenol umsetzbar (Tanger, persönliche Mitteilung).

Trotz der Notwendigkeit eines zweistufigen Verfahrens (Biotransformation von Toluol zu Benzoatdihydrodiol und Umlagerung von Benzoatdihydrodiol durch Säure und Hitze zu Phenol) zeigte der Einsatz von Toluol gegenüber dem Einsatz von Benzol mehrere Vorteile:

- Toluol wird von Bakterienstämmen besser toleriert als Benzol (Isken & de Bont, 1998). Eine hohe Lösungsmitteltoleranz beeinflusst die Biokatalysatorstabilität und vereinfacht damit die Prozessführung, da im Prinzip im Zwei-Phasen-Gemisch Toluol/H<sub>2</sub>O gearbeitet werden kann.
- Für die Umsetzung von Toluol zu Benzoatdihydrodiol sollte der Prozess theoretisch kein Auxiliarsubstrat benötigen, da dabei genauso viele Reduktionsäquivalente entstehen, wie für den gesamten Umsatz benötigt werden (siehe Kapitel 3.4, Abb. 4C). Dies würde die Kosten für den Prozess senken. Für den alternativen Syntheseweg der Oxidation von Benzol zu Phenol oder Benzol-*cis*-dihydrodiol müsste in jedem Fall ein Auxiliarsubstrat zugesetzt werden.
- Neben Benzol besitzt auch Phenol eine hohe Toxizität gegenüber Mikroorganismen. Für Phenole ist beschrieben, dass das Wachstum von Bakterien bereits bei einer Konzentration von 5 mmol·l<sup>-1</sup> inhibiert wird (Heipieper *et al.*, 1991). Bei einer direkten Oxygenierung von Benzol würde eine Akkumulation von Phenol während des Prozesses sehr schnell zu einer Inaktivierung des Biokatalysators führen. Der Umweg über die Produktion von Benzoatdihydrodiol, das weniger toxisch wirkt als Phenol (Produktion von ca. 300 mmol·l<sup>-1</sup>; Payer, 2002), trägt somit zur Stabilität des Biokatalysators bei.



**Abb. 40:** Umwandlung von Benzoatdihydrodiol zu Phenol.

Für die Biotransformation mussten Bakterienstämme konstruiert werden, die in der Lage waren, Toluol zu Benzoatdihydrodiol umzusetzen. Dabei wurden zwei Strategien verfolgt:

In einem toluoltoleranten Stamm, der gleichzeitig auch in der Lage war, Toluol abzubauen, sollte der katabole Stoffwechsel auf der Stufe des Benzoatdihydrodiols durch Deletion im Gen der Benzoatdihydrodiol-Dehydrogenase unterbrochen werden. Voraussetzung dafür war, dass der Ausgangsstamm Toluol über Benzoat abbaut. Für diese genetische Konstruktion wurde der Wildtypstamm *P. putida* Idaho (Cruden *et al.*, 1992) eingesetzt. Dieser Stamm zeichnete sich durch eine hohe Toleranz gegenüber Toluol und anderen Lösungsmitteln aus und war in der Lage, Toluol über eine initiale Methylgruppenoxidation zu verwerten. In diesem Stamm mussten die Gene zweier Enzyme, die für den Abbau von Benzoatdihydrodiol verantwortlich waren, deletiert bzw. inaktiviert werden: *benD*, das Gen der Benzoatdihydrodiol-Dehydrogenase, und *xylL*, das Gen der Toluatdihydrodiol-Dehydrogenase (Germer, 2002).

Für die zweite Strategie zur Konstruktion sollten in toluoltolerante Stämme, die nicht in der Lage waren, das Toluol auch gleichzeitig zu verwerten, die Gene für den katabolen Stoffwechsel von Toluol bis zum Benzoatdihydrodiol mit Hilfe von übertragbaren genetischen Modulen eingebaut werden. Dabei musste zusätzlich gewährleistet sein, dass Benzoatdihydrodiol nicht weiter verstoffwechselt werden konnte.

Als möglicher Rezipient für die Gene der Toluoloxidation konnte bei Anreicherungen zwar ein Stamm isoliert werden, der bis zu 5 % (v/v) Toluol tolerierte, ohne es abzubauen (siehe Kapitel 5.1). Dieser Stamm, der als *Pseudomonas stutzeri* charakterisiert worden war, konnte Benzoat und Benzoatdihydrodiol abbauen. Von diesem Stamm hätte zunächst eine Mutante hergestellt werden müssen, die Benzoatdihydrodiol nicht mehr als Wachstumssubstrat verwenden konnte, was der ersten Strategie entsprochen hätte. Diese Möglichkeit wurde in der vorliegenden Arbeit nicht weiter verfolgt.

Um die Funktionalität der konstruierten Module überprüfen zu können, wurden diese in die Stämme *R. eutropha* B9, *P. putida* U-JT103 und *E. coli* DH5 $\alpha$  übertragen. Von den Stämmen *R. eutropha* B9 und *P. putida* U-JT103 war bekannt, dass sie im Stoffwechsel von Benzoat auf der Stufe des Benzoatdihydrodiols bereits blockiert waren (Reiner & Hegemann, 1971; Morawski *et al.*, 1997). *E. coli* DH5 $\alpha$  wurde zunächst nur zur Transformation eingesetzt. Die getesteten Module sollten dann in einen toluoltoleranten Stamm übertragen werden. Da während der Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit kein geeigneter Stamm isoliert werden



konnte, wurde später zusätzlich die Expression der betreffenden Gene in *E. coli* DH5 $\alpha$  untersucht. Die Derivate von *R. eutropha* B9, *P. putida* U-JT103 und *E. coli* DH5 $\alpha$  werden in den folgenden Kapiteln mit ihren Eigenschaften als Biokatalysatoren dargestellt.

Für die Bereitstellung der Gene der Toluoloxidation auf einem übertragbaren Modul wurden Konstrukte der Arbeitsgruppe von de Lorenzo verwendet (Panke *et al.*, 1998), in denen die Struktur- und Regulatorgene für die Enzyme des Abbauweges von Toluol zu Benzoat aus dem TOL-Plasmid pWW0 von *P. putida* mt-2 als eine funktionsfähige Einheit („catabolic segment *upp* TOL“) vorlagen (siehe Kapitel 3.5, Abb. 5).

Mit Hilfe des zur Verfügung gestellten rekombinanten Plasmids pCK05 (Abb. 10), das das „catabolic segment *upp* TOL“ auf einem Transposon enthielt, konnten die Gene für die Toluoloxidation mittels Konjugation direkt in das bakterielle Chromosom von *R. eutropha* B9 und *P. putida* U-JT103 integriert werden (siehe Kapitel 5.3.2 und 5.8). Von *E. coli* DH5 $\alpha$  wurden keine Transkonjuganten mit Transposon hergestellt.

Zur Übertragung der Gene auf einem zusätzlichen Plasmid wurde das „catabolic segment *upp* TOL“ in spezielle Vektoren, sogenannte „broad-host-range“ Vektoren kloniert (siehe Kapitel 5.5.1). Als Quelle für das Insert diente das ebenfalls zur Verfügung gestellte Plasmid pCK04AxyIR („catabolic segment *upp* TOL“ in Vektor pCK01 ligiert). Die konstruierten Plasmide pBBSG1, mit einer zusätzlichen Resistenz gegen Chloramphenicol, und pMMSG6, mit einer zusätzlichen Resistenz gegen Ampicillin, wurden mittels Konjugation in die Stämme *R. eutropha* B9 und *P. putida* U-JT103 übertragen (siehe Kapitel 5.5.2 und 5.12). Zusätzlich wurde die Expression der Gene in *E. coli* DH5 $\alpha$  untersucht (siehe Kapitel 5.14.1).

Da die Stämme *R. eutropha* B9 und *P. putida* U-JT103 bereits die Gene für die Oxidation von Benzoat zu Benzoatdihydrodiol besaßen, war es für diese Rezipienten ausreichend, die Gene für die Toluoloxidation bis zur Stufe des Benzoats auf einem Modul zu vereinigen. Es wurde zusätzlich versucht, die Gene für den kompletten Abbauweg auf einem Modul zu integrieren, und in *E. coli* DH5 $\alpha$  zu exprimieren (siehe Kapitel 5.14.2).

## 6.2 Konstruierte Biokatalysatoren

In dieser Arbeit war es gelungen, Stämme zu konstruieren, die Toluol zu Benzoatdihydrodiol oxidieren konnten. Transkonjuganten von *P. putida* U-JT103, bei denen die Gene für die Toluoloxidation auf einem Transposon ins Chromosom (siehe Kapitel 5.9) oder auf einem Plas-

mid extrachromosomal (siehe Kapitel 5.13) integriert worden waren, waren in der Lage, Toluol zu Benzoatdihydrodiol umzusetzen.

Auch mit *E. coli* DH5 $\alpha$  standen zwei Konstruktionen zur Verfügung, mit denen der Umsatz von Toluol zu Benzoatdihydrodiol durchgeführt werden konnte. Da es nicht gelungen war, die Gene für den kompletten Abbauweg auf einem Plasmid zu integrieren, wurde das Gen der noch fehlenden Benzoat-Dioxygenase zusätzlich kloniert (siehe Kapitel 5.14.2.1). Somit standen zwei rekombinante *E. coli*-Stämme zur Verfügung, von denen der eine Toluol zu Benzoat (siehe Kapitel 5.14.1) und der andere Benzoat zu Benzoatdihydrodiol (siehe Kapitel 5.14.2.1) umsetzen konnte. Eine Mischkultur aus beiden Stämmen baute Toluol zu Benzoatdihydrodiol ab (siehe Kapitel 5.14.3). Des Weiteren war es gelungen, die beiden Plasmide zusammen in einen Stamm zu transformieren. Auch mit diesem Konstrukt konnte Toluol zu Benzoatdihydrodiol umgesetzt werden (siehe Kapitel 5.14.4).

Auch in *R. eutropha* B9 konnten die Gene für die Toluoloxidation sowohl chromosomal (siehe Kapitel 5.4) als auch extrachromosomal auf einem Plasmid (siehe Kapitel 5.5.2) integriert werden. Die isolierten Transkonjuganten waren aber nur in der Lage, Benzylalkohol, Benzaldehyd und Benzoat zu Benzoatdihydrodiol umzusetzen. Toluol wurde von diesen Konstrukten nicht abgebaut.

Neben den in dieser Arbeit konstruierten Stämmen konnten zwei weitere zum Vergleich herangezogen werden: Die Mutante des toluoltoleranten *P. putida* Idaho (*P. putida* Idaho BDH2), deren Gene für die Enzyme des Abbaus von Benzoatdihydrodiol deletiert bzw. inaktiviert worden waren (Germer, 2002), und die nicht toluoltolerante Mutante von *P. putida* BG1 (*P. putida* BGXM1), die ebenfalls in der Lage war, Toluol zu Benzoatdihydrodiol umzusetzen (Payer, 2002). Whited *et al.* (1986) reicherten den Stamm *P. putida* BG1 aus einer Bodenprobe mit 4-Methylbenzoat als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle an. Nach Behandlung mit Nitrosoguanidin wurde die Mutante BGXM1 isoliert, die nicht mehr allein mit 4-Methylbenzoat wachsen konnte. Diese Mutante akkumulierte beim Umsatz von Benzoat, 3-Methylbenzoat, 4-Methylbenzoat, 3-Ethylbenzoat und 3,4-Dimethylbenzoat die entsprechenden Dihydrodihydroxybenzoate. Da der Ausgangsstamm für die Mutation, *P. putida* BG1, mit *m*-Xylol und Toluol wachsen konnte, wurde vermutet, dass die Mutante auch Toluol zu Benzoatdihydrodiol umsetzen kann. Dies konnte von Payer (2002) bestätigt werden.

### 6.3 Umsatzraten

Von entscheidender Bedeutung für die Kosten eines biotechnischen Prozesses sind unter anderem die Raum-Zeit-Ausbeuten. Diese werden wesentlich von den Umsatzraten bestimmt, also der Effizienz des Biokatalysators.

Mit Ruhezellen von *R. eutropha* B9 konnten gute Bildungsraten von Benzoatdihydrodiol aus Benzoat gemessen werden. So betrug die Bildungsrate im Schüttelkolben mit Fruktose als Auxiliarsubstrat  $2,8 \text{ mmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g C}_X^{-1}$  (siehe Kapitel 5.2.4). Wurden Benzoatkonzentrationen von maximal  $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  eingesetzt, so konnten Raten von ca.  $0,8 \text{ mmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g C}_X^{-1}$  auch ohne Auxiliarsubstrat erreicht werden. In Fedbatch-Fermentationen mit Fruktose als Substrat lag die durchschnittliche Bildungsrate niedriger als im Schüttelkolben ( $1,6 \text{ mmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g C}_X^{-1}$ ). Die Umsatzrate während der Fermentation konnte aber über sieben Tage konstant gehalten werden (Payer, 2002). Nach Übertragung der Gene für den Abbau von Toluol auf einem Transposon ins Chromosom von *R. eutropha* B9 wurden mit den isolierten Transkonjuganten bei Umsätzen von Benzylalkohol zu Benzoatdihydrodiol die oben erwähnten Raten um das 10 - 25fache unterschritten ( $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g C}_X^{-1}$ ). Toluol wurde wie bereits erwähnt gar nicht umgesetzt.

Die Bildungsraten von Benzoatdihydrodiol aus Benzoat mit Ruhezellen von *P. putida* U-JT103 waren etwas geringer als mit Ruhezellen von *R. eutropha* B9 ( $2 \text{ mmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g C}_X^{-1}$  mit Glukose als Auxiliarsubstrat). Enthielt der Ansatz kein Auxiliarsubstrat, wurde praktisch kein Umsatz gemessen (siehe Kapitel 5.7.4). Die Produktbildungsraten der Transkonjuganten, mit den Genen auf einem Transposon im Chromosom lagen mit Toluol, Benzylalkohol und Benzoat als Substrate zwischen  $0,4$  und  $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g C}_X^{-1}$  (siehe Kapitel 5.9).

Hinsichtlich der Aktivitäten beim Umsatz von Toluol konnten keine großen Unterschiede zwischen den Stämmen, die den Abbauweg für Toluol bereits besaßen (*P. putida* Idaho BDH2 und *P. putida* BGXM1) und dem Stamm *P. putida* U\_TP10, bei dem die Gene auf einem Transposon ins Chromosom integriert worden waren, festgestellt werden. Allerdings mussten die Aktivitäten von *P. putida* Idaho BDH2 mit wachsenden Zellen bestimmt werden, da die Umsatzraten von Toluol bei Versuchen mit ruhenden Zellen viel zu gering waren (Germer, 2002; Payer, 2002). Da in den Ansätzen mit wachsenden Zellen keine konstanten Zellkonzentrationen vorlagen, konnten die spezifischen Bildungsraten für Benzoatdihydrodiol nur abgeschätzt werden (zwischen  $0,5$  und  $0,8 \text{ mmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g C}_X^{-1}$ ). Die Bildungsraten von Benzoatdihydrodiol aus Toluol mit dem Stamm *P. putida* BGXM1 wurden wie im Falle von

*P. putida* U\_TP10 mit ruhenden Zellen ermittelt ( $0,2 - 0,3 \text{ mmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g C}_X^{-1}$ ). Es war also möglich durch den Einbau der Gene für die Toluoloxidation Stämme zu konstruieren, die Toluol mit der gleichen Effektivität zu Benzoatdihydrodiol abbauen konnten, wie Stämme, die die Gene bereits besaßen.

Vergleicht man verschiedene Mono- und Dioxygenase-Reaktionen miteinander, so werden mit wachsenden Zellen offenbar bessere Aktivitäten erhalten als mit ruhenden Zellen. Die mit den konstruierten Stämmen erreichten Raten sind verglichen mit anderen Prozessen, in denen wachsende Zellen für die Biotransformation eingesetzt werden, ca. 10 - 20fach niedriger. Die Firma Lonza setzt mit wachsenden Zellen von *P. putida* mt-2 (*p*-Xylol als Kohlenstoffquelle) 2,5-Dimethylpyrazin (Cosubstrat) zu 5-Methylpyrazin-2-carboxysäure um. Die volumetrische Reaktorproduktivität für diesen Prozess liegt bei ca.  $2,3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  (Schmid *et al.*, 2001). Die Alkan-Hydroxylase aus *P. oleovorans* (wachsende Zellen) lieferte Umsatzaktivitäten von bis zu  $5 \text{ mmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g C}_X^{-1}$  bezogen auf das Substrat Octan (Witholt *et al.*, 1990). Hüsken *et al.* (2001) setzten mit einer Mutante von *P. putida* F1 (*P. putida* MC1) Toluol zu 3-Methylbrenzcatechin um. Die Produktbildungsraten mit wachsenden Zellen betragen dabei ca.  $6,3 \text{ mmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g C}_X^{-1}$ . Kieboom *et al.* (2001) waren in der Lage, mit ruhenden Zellen von *Nocardia* S3 aus Nitrobenzol und aus 3-Nitrophenol 3-Nitrobrenzcatechin herzustellen. Die dabei ermittelten Raten lagen zwischen  $0,14$  und  $0,47 \text{ mmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g C}_X^{-1}$ . Die Werte der zuletzt genannten Umsetzungen liegen in der gleichen Größenordnung wie die Produktbildungsraten von Benzoatdihydrodiol aus Toluol mit *P. putida* U\_TP10 oder *P. putida* BGXM1 (siehe oben), die ebenfalls mit ruhenden Zellen bestimmt worden waren.

Die eigentliche Idee für die Integration der Gene auf einem Plasmid war die Erhöhung der Gendosis, wodurch man sich eine Aktivitätssteigerung erhoffte. Plumeier *et al.* (2002) berichten, dass eine erhöhte Anzahl von Genen für den Abbau von Chlorbrenzcatechin (*tfd*<sub>I</sub> und *tfd*<sub>II</sub> auf dem Plasmid pJP4) in *Ralstonia eutropha* JMP 134 die Konzentration an aktiven Enzymen in der Zelle verstärkt und damit ein schnelleres Wachstum auf Chloraromaten ermöglicht wird. In einigen Fällen ist sogar die Anwesenheit mehrerer Kopien der Gene nötig, damit die Stämme überhaupt die Chloraromaten abbauen können. Wurden zum Beispiel einzelne Kopien der *tfd*<sub>I</sub>- bzw. der *tfd*<sub>II</sub>-Gene in das Chromosom von *R. eutropha* JMP222 integriert, so war dieser Stamm nicht in der Lage, mit 3-Chlorbenzoat zu wachsen. Im Gegensatz dazu zeigte der Stamm aber Wachstum auf Chloraromaten, wenn die Gene mit einem „medium copy“-Vektor in den Stamm integriert wurden.

Die Erhöhung der Gendosis durch Einbringen der Gene für die Oxidation von Toluol zu Benzoat auf einem Plasmid in *R. eutropha* B9 führte nicht dazu, dass die Transkonjuganten dieses Stammes doch noch Toluol umsetzen konnten (siehe Kapitel 5.6). Auch die Umsatzraten von Toluol mit den plasmidtragenden Transkonjuganten von *P. putida* U-JT103 konnten nicht durch eine Erhöhung der Konzentrationen der am Abbau beteiligten Enzyme über die Gendosis gesteigert werden (siehe Kapitel 5.13).

Eine Expression der Gene in *E. coli* DH5 $\alpha$  führte ebenfalls zu keinen signifikanten Aktivitätssteigerungen gegenüber den eingesetzten Pseudomonaden oder auch gegenüber *R. eutropha* B9. Beim Umsatz von Benzoat zu Benzoatdihydrodiol wurden Raten von ca.  $2,5 \text{ mmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g C}_X^{-1}$  erreicht (siehe Kapitel 5.14.2.1), beim Umsatz von Toluol zu Benzoat wurden Raten zwischen  $0,3$  und  $1 \text{ mmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g C}_X^{-1}$  ermittelt (siehe Kapitel 5.14.1). Wurden die Stämme gemeinsam für die Transformation von Toluol zu Benzoatdihydrodiol (Mischkultur) eingesetzt, so betrug die Bildungsrate ca.  $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g C}_X^{-1}$  (siehe Kapitel 5.14.3). Auch durch Transformation beider Plasmide in einen Stamm konnte die Bildungsrate nicht wesentlich verbessert werden (ca.  $0,16 \text{ mmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g C}_X^{-1}$ ) (siehe Kapitel 5.14.4).

Mit den bisher in *E. coli* klonierten Mono- und Dioxygenasen für den Abbau von Toluol konnten ähnliche aber teilweise auch bessere Umsatzraten erreicht werden. Whabi *et al.* (1996) klonierten die Toluol-Dioxygenase aus *P. putida* NCIMB 11767 in pUC18 als Klonierungsvektor. Die Expression der Gene, die dem Tod-Operon von *P. putida* F1 ähnelten, erfolgte in *E. coli* TG2. Mit diesem Stamm wurden in einem Batchverfahren, wobei Toluol über die Gasphase zugefüttert wurde, Produktionsraten von *cis*-Toluoldihydrodiol von  $2,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  ermittelt. Die Induktion der Abbaugene erfolgte über den eigenen Promotor mit Toluol als Induktor. Wubbolts *et al.* (1994) exprimierten die Xylol-Monooxygenase aus dem TOL-Plasmid pWW0 von *P. putida* mt-2 unter der Kontrolle des  $\lambda P_L$ -Promotors, durch den die Expression bei Erhöhung der Temperatur induziert wird. Mit den rekombinanten *E. coli*-Stämmen konnten verschiedene Substrate umgesetzt werden. Die dabei ermittelten Raten für den Abbau von Toluol zu Benzylalkohol oder von Styrol zu Styroloxid betragen  $0,8$  bzw.  $0,7 \text{ mmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g C}_X^{-1}$ . Panke *et al.* (1999) konnten durch Klonierung der Gene für diese Monooxygenase unter der Kontrolle des „*alk* regulatory system“ aus *Pseudomonas oleovorans* GPo1 die Umsatzaktivität für Styrol auf  $5,5 \text{ mmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g C}_X^{-1}$  steigern. Raschke *et al.* (2001) klonierten die Chlorbenzol-Dioxygenase aus *Pseudomonas sp.* P51 in *E. coli* DH5 $\alpha$ . Die rekombinanten Stämme setzten Chlorbenzol, Benzol, Toluol oder Naphtalin zu den ent-

sprechenden *cis*-Dihydrodiolen um. Mit Toluol als Substrat wurden dabei Raten von  $9,1 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg Zellprotein}^{-1}$  ( $0,3 \text{ mmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g C}_X^{-1}$ ) erreicht.

Die Klonierung der Gene unter der Kontrolle eines streng regulierbaren Promotors wie zum Beispiel das „*alk* regulatory system“ (siehe oben) ist besonders für die Stabilität von Plasmiden wichtig und führt daher auch zu besseren Aktivitäten. Die Plasmidinstabilität kann entweder durch den Verlust oder durch Veränderung der Plasmide hervorgerufen werden. Der Verlust kommt dabei durch häufige und unvollständige Zellteilungen zustande, bei denen die Plasmide nicht gleichmäßig auf die jeweiligen Tochterzellen verteilt werden. Durch Rekombinationen, Insertionen, Deletionen einzelner Gene auf dem Plasmid kommt es zu strukturellen Veränderungen desselben, die einen Verlust der katabolen Aktivität hervorrufen können (Sharp *et al.*, 1998).

Die meisten eingesetzten Promotoren in *E. coli* sind negativ reguliert. Hohe Expressionsraten zu Beginn des Wachstums, die aufgrund von schwach regulierten Promotoren (zum Beispiel *tac*-Promotor) auch ohne Induktion vorliegen können, führen zu Instabilitäten der Plasmide. Temperaturerhöhungen, die zu einer Induktion temperatursensitiver Promotoren ( $\lambda P_L$ ) notwendig sind, wirken sich ebenfalls negativ auf die Proteinsynthese (richtige Faltung) aus (Wilms *et al.*, 2001). Mittlerweile sind Systeme entwickelt, die positiv reguliert werden können wie der mit Arabinose induzierbare  $P_{BAD}$ -Promotor (Sawers & Jarsch, 1996) oder der mit Rhamnose induzierbare *rha* $_{BAD}$ -Promotor (Haldimann *et al.*, 1998).

Neben der regulierten Expression der Gene ist es aber auch wichtig, die Kopienzahl des Plasmids und damit die Gendosis überhaupt zu kontrollieren (Grabherr & Bayer, 2002). Im Prinzip muss ein Gleichgewicht zwischen Expressionsrate, Gendosis und dem Zellmetabolismus erreicht werden. Die Wirts-mRNA und die spezifische mRNA konkurrieren um die freien Ribosomen. Die Menge an spezifischer mRNA hängt zum einen von der Transkriptionsaktivität des Promotors ab und zum anderen von der vorhandenen Kopienzahl der Gene. Somit muss auch die Replikation des Plasmids kontrolliert werden. Bei einer hohen Replikationsrate wird der Transkriptions- und Translationsapparat der Zelle auf die Produktion des fremden Proteins konzentriert, wodurch der eigene Zellstoffwechsel vernachlässigt wird. Die Stabilisierung der Plasmidkopienzahl an einem bestimmten Punkt ist also sehr wichtig für den ausgewogenen Zellmetabolismus.

#### 6.4 Problem der Ausbeuten an Produkt

Die Stämme *R. eutropha* B9, *P. putida* U-JT103 und *E. coli* DH5 $\alpha$  (pBBSG2) waren alle in der Lage, Benzoat vollständig zu Benzoatdihydrodiol umzusetzen (siehe Kapitel 5.2.4, 5.7.4 und 5.14.2.1). Die erreichten Ausbeuten lagen bei diesen Umsätzen zwischen 95 und 100 %. Das entstandene Benzoatdihydrodiol wurde nicht weiter verstoffwechselt. Im Gegensatz dazu erlangte die Mutante *P. putida* Idaho BDH2, die zunächst ebenfalls Benzoat vollständig zu Benzoatdihydrodiol umgesetzt hatte, nach ca. vier Tagen die Fähigkeit zurück, das entstandene Produkt unter Bildung von Biomasse zu verwerten (Germer, 2002). Auch der Stamm *P. putida* BGXM1 lieferte in Fermentationen mit Benzoat als Cosubstrat weitaus geringere Ertragskoeffizienten (zwischen 0,5 und 0,6 g Produkt pro Gramm Cosubstrat) und in Umsätzen mit substituierten Benzoaten wurden nur maximale Ausbeuten von 72 % erreicht (Payer, 2002). Dies deutete daraufhin, dass auch dieser Stamm die Fähigkeit erwirbt, die eingesetzten Benzoate über einen anderen Weg abzubauen oder die bereits produzierten Dihydrodihydroxybenzoate wieder zu verwerten.

Bei den Biotransformationen von Toluol zeigte sich ebenfalls, dass mit Stämmen, die die Gene der Toluoloxidation auf einem Plasmid oder im Chromosom integriert hatten, höhere Ausbeuten ermittelt werden konnten, als mit den Stämmen, deren Ausgangsstämme Toluol a priori als Kohlenstoff- und Energiequelle verwerten konnten. Die höchsten Ausbeuten wurden mit den rekombinanten *E. coli* DH5 $\alpha$ -Stämmen erzielt (90 - 100 % mit einer Mischkultur und 80 - 90 % mit einem entsprechenden Hybrid).

Die Transkonjugante von *P. putida* U-JT103 (U\_TP10), bei der die Gene für die Toluoloxidation auf einem Transposon ins Chromosom integriert worden waren, setzte die Substrate Toluol, Benzylalkohol und Benzoat vollständig um, aber es wurden nur Ausbeuten von ca. 70 % an Benzoatdihydrodiol erzielt (siehe Kapitel 5.9, Abb. 23). Erstaunlich war dabei, dass die Transkonjugante im Gegensatz zum Ausgangsstamm (*P. putida* U-JT103) nicht in der Lage war, Benzoat vollständig zu Benzoatdihydrodiol umzusetzen. Die niedrigen Ausbeuten deuteten daraufhin, dass ein Teil des gebildeten Benzoatdihydrodiols bereits weiter abgebaut worden war. Wurde die Transkonjugante *P. putida* U\_TP10 mit Glukose als Kohlenstoff- und Energiequelle und mit Benzoat und Toluol als Transformationssubstrate kultiviert, so konnte gegen Ende der Wachstumsphase tatsächlich eine kontinuierliche Abnahme von Benzoatdihydrodiol bei einer gleichzeitigen schwachen Zunahme der optischen Dichte beobachtet werden (siehe Kapitel 5.9, Abb. 22A). In Rohextrakten dieser Zellen konnte entsprechend eine

schwache aber signifikante Aktivität ( $3,8 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) eines Enzyms nachgewiesen werden, das Benzoatdihydrodiol umsetzen konnte. Dies erklärt den Abbau des gebildeten Produkts. Wurde die Transkonjugante *P. putida* U\_TP10 dagegen in Anwesenheit von Glukose als C-Quelle und mit Benzoat als einzigem Transformationssubstrat kultiviert, so wurde Benzoat vollständig zu Benzoatdihydrodiol umgesetzt, und das gebildete Produkt wurde nicht weiter abgebaut (siehe Kapitel 5.9, Abb. 22B). Die Transkonjugante *P. putida* U\_TP10 hatte sich also in Anwesenheit von Toluol oder durch den Abbau von Toluol verändert (Induktion von Enzymaktivitäten, die eine weitere stoffliche Veränderung am Benzoatdihydrodiol bewirkten).

Der Ausbeuteverlust bei den Transformationen mit der Transkonjuganten *P. putida* U\_TP10 war wahrscheinlich durch die Bildung von Revertanten verursacht. Von *P. putida* U-JT103 konnten Revertanten isoliert werden, die in der Lage waren, Benzoat über Benzoatdihydrodiol zu verstoffwechseln, wenn keine andere Kohlenstoffquelle zur Verfügung stand. In diesen Revertanten konnte eine Rückmutation im Gen für die Benzoatdihydrodiol-Dehydrogenase BenD nachgewiesen werden, die wieder die Expression eines aktiven Enzyms ermöglichte (siehe Kapitel 5.10.2 und 6.7.1). In Rohextrakten dieser Zellen konnten entsprechende Aktivitäten für die Benzoatdihydrodiol-Dehydrogenase und die Brenzcatechin-1,2-Dioxygenase ermittelt werden. Zudem konnte die Bildung von Muconat nachgewiesen werden. Eine Aktivität für die Brenzcatechin-2,3-Dioxygenase wurde nicht gefunden, was daraufhin deutete, dass das Benzoat ausschließlich über den *ortho*-Weg abgebaut worden war.

Die ermittelte Aktivität der Benzoatdihydrodiol-Dehydrogenase aus Zellen der Revertante, die mit Benzoat kultiviert wurden, war allerdings 200fach stärker als die Aktivität, die in Zellen der Transkonjugante *P. putida* U\_TP10 bei Anzucht mit Glukose und Toluol und Benzoat als Transformationssubstrate gemessen werden konnte (siehe Kapitel 5.9, Tab. 15). Somit stellt sich die Frage, ob der Abbau von Benzoatdihydrodiol durch die Transkonjugante tatsächlich mit der Bildung von Revertanten zusammenhängt, oder ob es sich bei dem mit Benzoat bzw. mit Toluol und Benzoat induzierten Enzym um zwei unterschiedliche Enzyme handelt, die beide den Umsatz von Benzoatdihydrodiol katalysieren.

Das Vorhandensein von Isoenzymen ist nicht ungewöhnlich. So können zum Beispiel zwei Gencluster für den Abbau von Benzoat gleichzeitig vorliegen. *P. putida* mt-2 oder *P. putida* BG1 besitzen neben einem plasmidkodierten „*meta*-Weg“ (Toluatabbau) einen „*ortho*-Weg“ ( $\beta$ -Ketoacidweg) auf dem Chromosom (Whited *et al.*, 1986; Williams & Murray, 1974; Nakazawa & Yokota, 1973). Bei Versuchen, eine Mutante von *P. putida* Idaho herzustellen, die

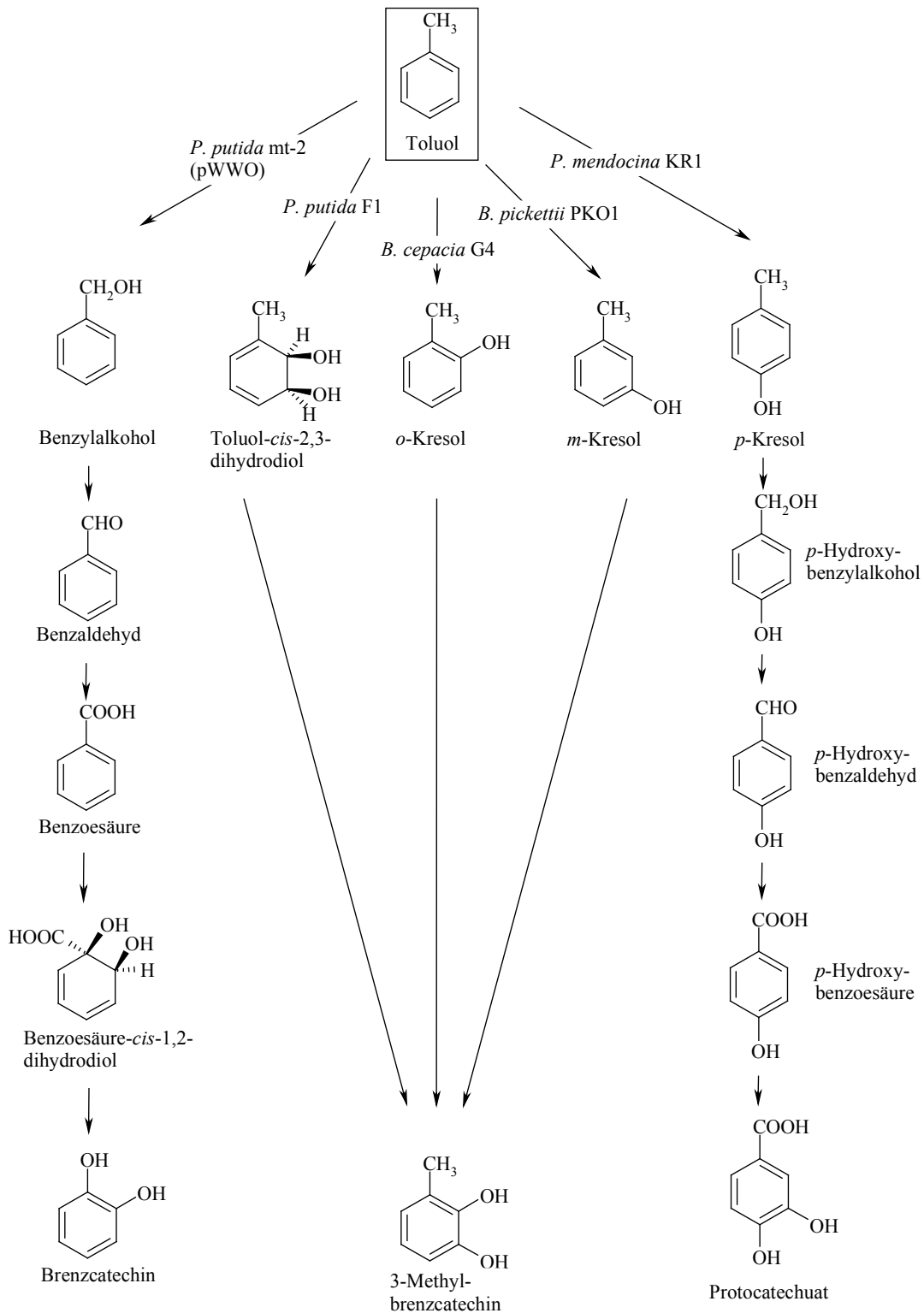


Toluol zu Benzoatdihydrodiol umsetzen sollte, mussten zwei Gene, die den Abbau von Benzoatdihydrodiol katalysierten, deletiert bzw. inaktiviert werden (Germer, 2002). Die Enzyme waren Bestandteile von verschiedenen Genclustern. Das sequenzierte Gencluster mit der Toluatdihydrodiol-Dehydrogenase XylL kodierte für den sogenannten „*meta*-Weg“ des Toluattabbaus. Das Gencluster mit der Benzoatdihydrodiol-Dehydrogenase BenD kodierte für den „*ortho*-Weg“. In *P. putida* Idaho liegen die beiden Gencluster chromosomal vor. Es sind weitere Pseudomonaden bekannt, bei denen auch der „*meta*-Weg“ chromosomal vorliegt (Sinclair *et al.*, 1986). Die Produkte der Gene des *meta*-Operons sind in der Lage, auch substituierte Benzoate wie *m*- und *p*-Toluat zu den entsprechenden Brenzcatechinen umzusetzen, während die Benzoat-Dioxygenase und die Benzoatdihydrodiol-Dehydrogenase spezifisch für Benzoat sind (Nakazawa & Yokota, 1973; Williams & Murray, 1974; Reineke & Knackmuss, 1978). Durch die Anwesenheit von zwei Genclustern für den Abbau von Benzoat kann die Funktion des deletierten Enzyms unter Umständen vom Isoenzym, das im anderen Cluster vorliegt, übernommen werden.

Die Doppelmutante *P. putida* BDH2 war allerdings trotz Inaktivierung der beiden Gene weiterhin in der Lage, Toluol als Wachstumssubstrat zu nutzen (Germer, 2002). Toluol wurde mit Ausbeuten zwischen 25 und 40 % zu Benzoatdihydrodiol umgesetzt, das allerdings nach ca. vier Tagen unter Bildung von Biomasse wieder abgebaut wurde. Wurde statt Toluol Benzylalkohol oder Benzoat als Umsatzsubstrat eingesetzt, so betrug die Ausbeuten an Benzoatdihydrodiol fast 100 %. Auch in diesen Ansätzen wurde das gebildete Produkt nach einigen Tagen als Kohlenstoff- und Energiequelle genutzt. Durch Enzymtests mit Rohextrakten der Doppelmutante konnte eine schwache Aktivität eines weiteren Enzyms, das Benzoatdihydrodiol umsetzen konnte, gemessen werden, was den Abbau des gebildeten Produkts erklärte (Germer, 2002).

Die niedrigen Benzoatdihydrodiol-Ausbeuten beim Umsatz von Toluol durch *P. putida* Idaho BDH2 im Vergleich zu den Umsätzen von Benzylalkohol oder Benzoat ließen vermuten, dass Toluol oder Zwischenprodukte der Oxidation über einen anderen Weg verstoffwechselt wurde. Besonders für Pseudomonaden sind verschiedene Abbauwege für Aromaten beschrieben, die zum Teil auch parallel in einem Stamm vorliegen können. So existiert im Stamm *P. putida* F1, der Toluol über eine initiale Dioxygenierung abbauen kann, ein zusätzlicher Abbauweg für *p*-Isopropyltoluol (*p*-Cymen), über den Toluol ebenfalls oxidiert werden kann. Der Abbau von *p*-Isopropyltoluol zu *p*-Isopropylbenzoat (*p*-Cumat) erfolgt dabei über eine Methylgruppenoxidation (Eaton, 1996; 1997). Für Toluol sind insgesamt fünf Wege für den

aeroben Abbau mit den folgenden initialen Schritten beschrieben (Mikesell *et al.*, 1993): die Hydroxylierung des aromatischen Ringes in *ortho*- (*B. cepacia* G4), *meta*- (*B. pickettii* PKO1) oder *para*-Stellung (*P. mendocina* KR), die Oxidation der Methylgruppe (*P. putida* mt-2, TOL-Plasmid pWW0) und die Dioxygenierung in 2,3-Position (*P. putida* F1) (Abb. 41).



**Abb. 41:** Verschiedene aerobe Abbauwege für Toluol (verändert nach Mikesell *et al.*, 1993).

Außer der Methylgruppenoxidation konnte in *P. putida* Idaho kein weiterer bekannter Abbauweg nachgewiesen werden (Germer, 2002). Dies schließt aber die Existenz eines bisher unbekanntes Weges nicht aus.

Wie bereits erwähnt, besitzt der Stamm *P. putida* BG1 neben einem plasmidkodierte (TOL-Plasmid pDTG501) auch einen im Chromosom kodierten Abbauweg für Benzoat. Die Mutante *P. putida* BGXM1 setzte Benzoat und methylsubstituierte Benzoate zu den entsprechenden Dihydrodihydroxybenzoaten um. Whited *et al.* (1986) vermuteten daher, dass sowohl die plasmidkodierte Toluatdihydrodiol-Dehydrogenase als auch die im Chromosom vorliegende Benzoatdihydrodiol-Dehydrogenase mutiert sein müssen. Sollte es sich bei diesem Stamm tatsächlich um eine Doppelmutante handeln, so existiert in diesem Stamm ebenfalls entweder ein drittes Isoenzym, das für die niedrigen Ausbeuten bei den Benzoat- und Toluolumsätzen verantwortlich ist, oder auch in diesem Stamm liegt ein weiterer Abbauweg für Toluol vor.

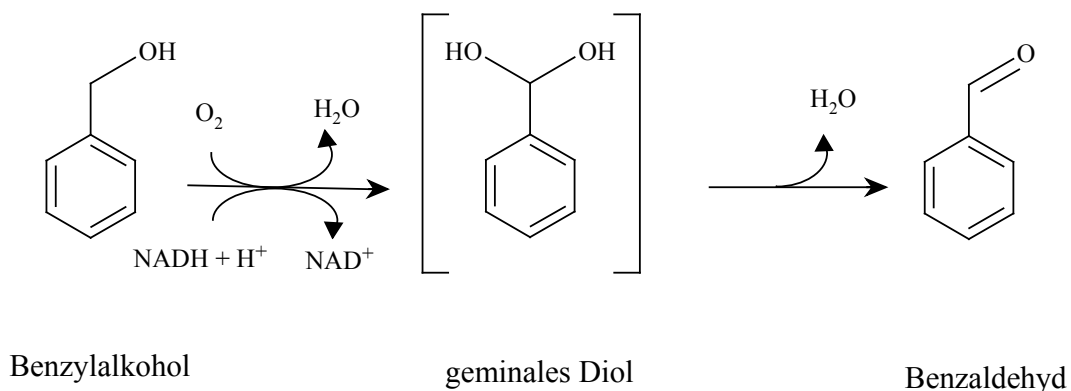
Aufgrund der großen Vielfalt mikrobieller Abbauwege von Aromaten kann es also vorkommen, dass bei Konstruktionen von Mutanten mehr Gene inaktiviert werden müssen als zunächst vorgesehen war. Mit dem Einsatz von Stämmen, die kein Toluol abbauen können, wie *R. eutropha* B9, *P. putida* U-JT103 oder insbesondere *E. coli* DH5 $\alpha$ , kann das Problem der vielen zu inaktivierenden Wege reduziert werden. Die Probleme, die mit der Transkonjuganten *P. putida* U\_TP10 aufgetreten waren und die ausgezeichneten Ausbeuten im Falle der rekombinanten *E. coli* DH5 $\alpha$ -Stämme verdeutlichen, dass ein idealer Stamm für die Konstruktion überhaupt keine Aromaten abbauen sollte.

Bei den Umsätzen mit den rekombinanten *E. coli* DH5 $\alpha$ -Stämmen tauchte dennoch ein weiteres Problem auf (siehe Kapitel 5.14.3 und 5.14.4). Die Umsätze wurden sowohl mit einer Mischkultur rekombinanter Stämme, von denen der eine Toluol zu Benzoat und der andere Benzoat zu Benzoatdihydrodiol umsetzen konnte, als auch mit einem Stamm, der den Abbauweg von Toluol zu Benzoatdihydrodiol auf getrennten Plasmiden integriert hatte, durchgeführt. In beiden Umsätzen wurde Toluol vollständig umgesetzt. Die Ausbeute betrug beim Umsatz mit der Mischkultur ca. 99 %, während die Ausbeute beim Umsatz mit dem Hybridstamm nur bei 85 % lag. Überraschenderweise wurde in letzterem Ansatz Brenzcatechin nachgewiesen, das Produkt der Reaktion der Benzoatdihydrodiol-Dehydrogenase mit Benzoatdihydrodiol. Die Menge an Brenzcatechin deckte sich mit den fehlenden 15 % an Benzoatdihydrodiol (Abb. 39). Beim Umsatz von Toluol zu Benzoatdihydrodiol mit der Mischkultur wurde kein Brenzcatechin nachgewiesen (Abb. 38). Auch beim Umsatz von Benzoat mit re-

kombinanten *E. coli* DH5 $\alpha$ -Zellen, die nur die Gene für die Benzoat-Dioxygenase enthielten, wurde keine Bildung von Brenzcatechin beobachtet (Abb. 32). Daher wurde ausgeschlossen, dass die Bildung von Brenzcatechin durch ein Enzym von *E. coli* DH5 $\alpha$  erfolgt war.

Aufgrund dieser Beobachtungen kam die Vermutung auf, dass ein Enzym des oberen Abbauweges von Toluol für die Bildung von Brenzcatechin aus Benzoatdihydrodiol verantwortlich sein könnte. Von Bühler *et al.* (2000, 2002) wurde beschrieben, dass die Xylol-Monooxygenase aus *P. putida* mt-2 nicht nur Toluol und Xylol, sondern auch die korrespondierenden Alkohole (Benzylalkohol, 4-Methylbenzylalkohol) und Aldehyde (Benzaldehyd, 4-Methylbenzaldehyd) oxidieren kann. Dabei handelt es sich um oxidative Nebenreaktionen einer Monooxygenase. Für die Oxidation der Alkohole wird die Bildung eines geminalen Diols als Zwischenstufe postuliert (Abb. 42). Allerdings ist eine Oxidation von Benzoatdihydrodiol mit einem Monooxygenase-Mechanismus eher unwahrscheinlich. Der Umsatz von Benzoatdihydrodiol zu Brenzcatechin ist aber durch Katalyse einer der Dehydrogenasen (Benzylalkohol- oder Benzaldehyd-Dehydrogenase) denkbar.

Um zu überprüfen, ob der Abbau von Benzoatdihydrodiol tatsächlich von einem Enzym des oberen Abbauweges katalysiert worden war, wurden Umsätze mit rekombinanten *E. coli* DH5 $\alpha$ -Stämmen durchgeführt, die nur die Gene für die Oxidation von Toluol zu Benzoat exprimieren konnten (siehe Kapitel 5.14.4). Die Experimente zeigten jedoch, dass Benzoatdihydrodiol von diesen Stämmen nicht oxidiert wurde. Die Ursache dafür könnte aber auch darin gelegen haben, dass die Zellen nicht in der Lage waren, das Benzoatdihydrodiol aufzunehmen, um es dann umzusetzen. Das würde auch erklären, warum beim Umsatz mit der Mischkultur kein Brenzcatechin entstanden war. Die Ursache der Bildung von Brenzcatechin konnte in dieser Arbeit nicht mehr geklärt werden.



**Abb. 42:** Oxidation von Benzylalkohol durch die Xylol-Monooxygenase aus *P. putida* mt-2 (Bühler *et al.*, 2000). Die Xylol-Monooxygenase wurde in *E. coli* JM101 (pSPZ3) exprimiert.

## 6.5 Berechnungen zur Reaktorproduktivität

Um die Wirtschaftlichkeit einer biotechnologischen Produktion von Phenol aus Toluol abzuschätzen, wurde die Transkonjugante *P. putida* U\_TP10 auf ihre Eigenschaften als Biokatalysator für einen großtechnischen Prozess näher untersucht. Mit Hilfe der Technik der Hochzell-dichtefermentation wurden in einem Reaktor mit einem Volumen von zwei Liter Zellkonzentrationen zwischen 130 und 150 g·l<sup>-1</sup> Biofeuchtmasse (entspr. einer Biotrockenmasse von 25 - 30 g·l<sup>-1</sup>) innerhalb von dreißig Stunden mit Glukose als Substrat erreicht (siehe Kapitel 5.11.1). Die Induktion der Gene für den Abbau von Toluol erfolgte dabei zwei bis drei Stunden vor Ende der Fermentation (siehe Kapitel 5.11.2).

Da kein Reaktorsystem zur Verfügung stand, das eine kontinuierliche explosions-sichere Prozessführung mit dem leicht flüchtigen Toluol ermöglichte, wurde die Aktivität des Biokatalysators aus der Hochzell-dichtefermentation in einem abgeschlossenen Batch-Versuch bestimmt. Es wurden Schikanenkolben mit einer Flüssigphase von 50 ml und einer Gasphase von 315 ml verwendet. Die Bildungsrate von Benzoatdihydrodiol wurde in Abhängigkeit verschiedener Toluolkonzentrationen und verschiedener Biomasse-mengen ermittelt (siehe Kapitel 5.11.3.1). Die in diesen Versuchen maximal erreichbaren Produktbildungs-raten lagen bei durchschnittlich 0,45 mmol·h<sup>-1</sup>·g Biomasse<sup>-1</sup> mit Toluolmengen von weniger als 0,091 mmol und Biomassekonzentrationen von weniger als 1 g·l<sup>-1</sup>. Daraus ergab sich eine spezifische Aktivität von 7,5 U·g Biotrockenmasse<sup>-1</sup> (BTM) bzw. von 1,5 U·g Biofeuchtmasse<sup>-1</sup> (BFM).

Die Stabilität des Biokatalysators wurde ebenfalls in einem abgeschlossenen System bestimmt (siehe Kapitel 5.11.3.2). In diesem System, in dem keine kontinuierliche Zugabe von Toluol und Sauerstoff möglich war, wurden Standzeiten zwischen ein und drei Tagen ermittelt. Die geringe Stabilität des Biokatalysators war auch durch die geringe Toluoltoleranz bedingt (siehe Kapitel 6.6). Aufgrund dieser kurzen Standzeiten ist eine Immobilisierung der Zellen aus Kostengründen nicht sinnvoll. Zudem würden sich durch die Immobilisierung der Zellen auftretende Limitationen im Transport von Sauerstoff und Toluol eher negativ auf die Biokatalysatoraktivität auswirken (Karau, 2001). Für die technische Durchführung der Biotransformation sollte daher aus dieser Perspektive ein Rührkesselreaktor mit den Zellen in suspensierter Form statt eines Festbettreaktors eingesetzt werden. Am Ende der Biotransformation müssen die Zellen durch Zentrifugation oder über Membranen aus der Produktlösung entfernt werden.

Zur theoretischen Berechnung der volumetrischen Reaktorproduktivität (Tab. 17) wurde ein Reaktorvolumen von 100 m<sup>3</sup> mit einer eingestellten Biomassekonzentration (Biofeuchtmasse)

von  $150 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  (siehe oben) angenommen. Ausgehend von einer spezifischen Biomasseaktivität von  $1,5 \text{ U}\cdot\text{g Biofeuchtmasse}^{-1}$  (siehe oben) lassen sich in einem  $100 \text{ m}^3$  Reaktor ca. 16200 Mol Benzoatdihydrodiol bzw. Phenol in zwölf Stunden produzieren, was ca. 1500 kg Phenol entspricht. Daraus ergibt sich eine volumetrische Reaktorproduktivität von ca.  $0,014 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . Die Produktivität bei den klassischen chemischen Verfahren liegt zur Zeit noch mindestens eine Größenordnung höher (Karau, 2001). In den Schüttelkolbenversuchen konnten dagegen maximal  $4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  Biofeuchtmasse eingesetzt werden, womit sich eine volumetrische Produktivität von  $0,07\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  ergibt. In den Kolben („Kolbenvolumen“ = 50 ml) war es somit möglich, maximal  $5\cdot 10^{-5}$  Mol in zwölf Stunden zu produzieren.

**Tab. 17:** Berechnung der volumetrischen Reaktorproduktivität

<u>Annahmen:</u>			
Biofeuchtmassekonzentration im Reaktor:	= 150	$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	
Reaktorvolumen:	= 100	$\text{m}^3$	
Prozesszeit:	= 12	h	
Temperatur:	= 30	$^{\circ}\text{C}$	
<u>Berechnung der volumetrischen Reaktorproduktivität:</u>			
Aktivität Biokatalysator:	= 1,5	$\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$	* 150 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
Aktivität Biokatalysator im Reaktor:	= 225	$\text{U}\cdot\text{l}^{-1}$	* 12 h
Produktkonzentration am Ende des Prozesses:	= 0,162	$\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	* $10^5$ l
Produktmenge pro Prozess:	= 16200	mol	
<b>Reaktorproduktivität:</b>	<b>= 0,014</b>	<b><math>\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}</math></b>	

Tabelle verändert nach Karau (2001)

Mit dem in Tab. 17 simulierten Prozess wären Fermentationsvolumina von 60 - 80 l pro kg Phenol erforderlich. Für eine Jahresproduktion von 150000 Tonnen Phenol wären somit  $10^7 \text{ m}^3$  Reaktorvolumen nötig. Für die Produktisolierung aus der wässrigen Phase wurde Isopropanol verwendet. Unter optimalen Bedingungen (Konzentration von Benzoatdihydrodiol zwischen 300 und 500 mM) werden sechs Liter Isopropanol pro Liter Fermentationsvolumen benötigt (Payer, 2002). Das Isopropanol muss nach der Fällung abdestilliert und rezykliert werden. Die benötigten Mengen an Isopropanol sind daher für einen technischen Einsatz viel zu hoch.

Könnte man die Stabilität des Biokatalysators auf mindestens hundert Tage erhöhen, würde dies die Fermentationsvolumina auf 0,6 - 0,8 l pro kg Phenol reduzieren. Mit Annahme von Fermentationskosten zwischen 0,5 und 5 Euro pro Liter Fermentationsvolumen (Karau, 2001) würden sich die Herstellungskosten für den Biokatalysator damit auf 0,3 - 4 Euro belaufen. Die Katalysatorkosten betragen aber normalerweise höchstens 1 % des Produktpreises, womit sich ein Produktpreis von 30 - 400 Euro pro kg Phenol errechnet.

Mit Erhöhung der Stabilität könnte man auch den Katalysatorverbrauch verringern, da dieser recycelt werden könnte. Im Schüttelkolben konnte die Biotransformation von Toluol zu Benzoatdihydrodiol durch *P. putida* U\_TP10 für ca. drei Tage aufrecht erhalten werden (siehe Kapitel 5.11.3.2). Geht man von einer zweimaligen Rezyklisierung der Zellen aus, so berechnet sich der spezifische Katalysatorverbrauch unter Annahme der Werte aus Tab. 17 ohne Erhöhung der Standzeit zu 5 kg Biokatalysator pro kg Phenol. Bei chemischen Reaktionen können dagegen mit 1 kg Katalysator 100 - 10000 kg Produkt hergestellt werden (Thomas *et al.*, 2002).

Neben der Verbesserung der Stabilität des Katalysators müsste auch die Biokatalysatoraktivität mindestens um den Faktor 50 - 100 erhöht werden, um einen wirtschaftlichen Produktpreis garantieren zu können. Betrachtet man allerdings den Sauerstoffverbrauch des in Tab. 17 dimensionierten Prozesses, so wird schnell deutlich, dass der Sauerstoffeintrag und die Sauerstofflöslichkeit bei der Konzeption des Reaktors zu den limitierenden Faktoren werden. Für die Produktion von  $1350 \text{ mol}\cdot\text{h}^{-1}$  Benzoatdihydrodiol braucht man ca.  $2700 \text{ mol}\cdot\text{h}^{-1}$  bzw.  $86,4 \text{ kg}\cdot\text{h}^{-1}$  Sauerstoff ( $\text{O}_2$ ) allein für die Transformation von Toluol zu Benzoatdihydrodiol. Allerdings benötigen die Zellen für ihren Erhaltungsstoffwechsel zusätzlichen Sauerstoff. Bei Erhöhung der Biokatalysatoraktivität müssen die Begasungsrate und die Rührerdrehzahl erhöht werden. Vermutlich wird der Sauerstoffeintrag ab einem bestimmten Punkt nicht mehr ausreichen. Zudem würden sich große Mengen des Toluols in der Abluft wiederfinden. Der Einsatz von sauerstoffangereicherter Luft ist aufgrund des explosiven Toluol-Luftgemisches nicht sehr sinnvoll. Es könnte aber auf eine indirekte Begasung über Membranen zurückgegriffen werden, wodurch sich der Verlust an Toluol durch Ausstrippen verringern lassen würde. Aufgrund des schlechten Übergangs von Sauerstoff aus der Membran in das Medium müssten allerdings sehr große Membranflächen eingesetzt werden.

## 6.6 Einfluss der Toleranz gegenüber Toluol

Nach Untersuchungen zur Toleranz gegenüber Toluol konnten die Stämme *R. eutropha* B9 und *P. putida* U-JT103 als nicht toluoltolerant eingestuft werden (siehe Kapitel 5.2.2 und 5.7.2). *R. eutropha* B9 tolerierte in einem System mit 50 ml Komplex- oder Mineralmedium und einer Gasphase mit einem Volumen von 315 ml Toluolmengen bis 0,34 mmol [entspr. 0,075 % (v/v) bzw. 6,8 mM, wenn die Menge komplett in der Flüssigphase gelöst wäre]. Das Wachstum von *P. putida* U-JT103 im gleichen System wurde ab Toluolmengen über 0,46 mmol [entspr. 0,1 % (v/v) bzw. 9,2 mM] gehemmt. Diese Toluolmengen lagen weit unter der maximalen Löslichkeitsgrenze von 0,91 mmol in diesem System [entspr. 0,2 % (v/v), siehe auch Kapitel 4.14]. Die Toluolmengen, die von beschriebenen lösungsmitteltoleranten Bakterien toleriert werden, überschreiten diese Mengen um ein vielfaches. *P. putida* IH2000 wächst in Anwesenheit von mehr als 50 % Toluol (Inoue *et al.*, 1991). Ramos *et al.* (1995) beschrieben einen Stamm, der sogar in Anwesenheit von 90 % Toluol Wachstum zeigte (*P. putida* DOT-T1). Die geringe Toleranz gegenüber Toluol wirkte sich im Falle von *R. eutropha* B9 besonders bei Wachstum in definiertem Medium mit einer verwertbaren C-Quelle aus. Es war häufig ein Agglomerieren der Zellen zu beobachten (siehe Kapitel 5.2.2).

Auch *E. coli* DH5 $\alpha$  tolerierte nur sehr geringe Mengen an Toluol. In den Umsätzen von Toluol konnte nicht mehr als 0,09 mmol Toluol [entspr. 0,02 % (v/v) bzw. 1,8 mM] eingesetzt werden. Einige *E. coli*-Stämme (meist *E. coli* K12-Derivate) und deren Mutanten sind auf ihre Toleranz gegenüber Lösungsmitteln untersucht worden. Diese Stämme zeigten Toleranzen gegenüber Lösungsmitteln wie *p*-Xylol oder Cyclohexan, nicht aber gegenüber Toluol oder gar Benzol (Aono & Kobayashi, 1997; Asako *et al.*, 1997; Rajagopal, 1996). Dabei wurden die Lösungsmittel in Mengen zwischen 10 und 20 % (v/v) eingesetzt.

Bei der Ermittlung der Umsatzraten von Toluol mit den Stämmen *P. putida* BGXM1 und *P. putida* BDH2 wurde Toluol ab einer zugegebenen Menge von 0,46 mmol [entspr. 0,1 % (v/v) bzw. 9,2 mM] nicht mehr umgesetzt (Payer, 2002). Hinsichtlich der einsetzbaren Toluolkonzentrationen zur Ermittlung der Umsatzraten war der als nicht toluoltolerant eingestufte *P. putida* BGXM1 mit den obigen Stämmen vergleichbar. Dagegen ist der nur begrenzt dossierbare Einsatz von Toluol im Falle des mutmaßlich toluoltoleranten *P. putida* BDH2 eher erstaunlich, da der Ausgangsstamm *P. putida* Idaho in der Lage ist, in Anwesenheit von 50 % (v/v) Toluol wachsen zu können (Cruden *et al.*, 1992). Es ist bekannt, dass toluoltolerante Bakterien sich an die gegebenen Verhältnisse adaptieren. Somit könnte es möglich sein, dass



der Stamm bzw. die Mutante für längere Zeit an Toluol adaptiert werden muss, bevor die Bio-transformation bei höheren Konzentrationen von Toluol durchgeführt werden kann.

Es sind verschiedene Adaptionsmechanismen von lösungsmitteltoleranten Bakterien beschrieben. So führt zum Beispiel eine Erhöhung des Anteils an gesättigten Fettsäuren oder eine vermehrte *cis-trans*-Isomerisierung der ungesättigten zu gesättigten Fettsäuren zu einer Reduktion der Fluidität der Cytoplasmamembran, die dem Lösungsmittel entgegenwirkt. (Ramos *et al.*, 1997; Pinkart *et al.*, 1996; Weber *et al.*, 1994; Heipieper *et al.*, 1992). Auch finden Änderungen in der Zusammensetzung des hydrophilen Teils der Membranen statt. Besonders bei Gram-negativen Bakterien, die eine äußere und eine innere Membran besitzen, macht sich dieser Effekt bei der äußeren Membran bemerkbar (Ramos *et al.*, 1997; Weber & de Bont, 1996). Bei *P. putida* IH-2000 wurde sogar eine Elimination von Toluol durch Bildung von Membranvesikeln der äußeren Membran beobachtet (Kobayashi *et al.*, 2000). Weiterhin existieren aktive Transportsysteme, mit denen Toluol wieder aus der Zelle transportiert werden kann (Kieboom *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1998; Ramos *et al.*, 1998; Isken & de Bont, 1996).

Toluoltolerante Bakterien schützen sich also durch Veränderungen in der Membran vor den toxischen Einflüssen der Lösungsmittel. Das bedeutet gleichzeitig, dass Bakterien ohne solche Mechanismen Zerstörungen in der Membran erdulden müssen (Sikkema *et al.*, 1995; Isken & de Bont, 1998). Die Lösungsmittel reichern sich aufgrund des hydrophoben Charakters in der Bakterienmembran an. Ringförmige Kohlenwasserstoffe wie Toluol interagieren dabei vorwiegend mit dem Innenbereich der Phospholipid-Doppelschicht. Dadurch wird die Wechselwirkung der Fettsäureketten der Phospholipide untereinander gestört, wodurch die Fluidität erhöht und damit die Stabilität der Cytoplasmamembran vermindert werden. Membranproteine (periphere und integrale) wie zum Beispiel die Enzyme der Atmungskette werden inhiert oder inaktiviert. Dabei werden die Wechselwirkungen hydrophober Aminosäuren mit den Kohlenwasserstoffketten der Fettsäuren in den Phospholipiden gestört, oder das Lösungsmittel reagiert direkt mit hydrophoben Bereichen im Protein. Die Membran verliert ihre Funktion als Barriere, wodurch es zu einem unspezifischen Austritt von Ionen und Makromolekülen kommt. Dies hat Veränderungen im Energiestatus der Zelle zur Folge, da die Zelle die protonenmotorische Kraft, die mit Hilfe des Protonengradienten und des Membranpotentials gebildet wird, verliert. Letztendlich führt der Verlust der Membranfunktionen zur Schädigung des Zellmetabolismus bis zum Zelltod.

Vermutlich liegt die Ursache der inaktiven Xylol-Monooxygenase in den Transkonjuganten von *R. eutropha* B9 in der schlechten Toleranz des Stammes gegenüber Toluol und den damit verbundenen Veränderungen in der Membran. Die Xylol-Monooxygenase setzt sich aus zwei Untereinheiten zusammen, die von *xylM* und *xylA* codiert werden. XylA, das Elektronentransportprotein, überträgt die Reduktionäquivalente von NADH auf XylM. XylM die Hydroxylasekomponente, ist membranständig. Die Aktivität dieser Komponente ist abhängig von Phospholipiden und Eisen (Bühler *et al.*, 2000). Vermutlich ist die Zerstörung der Membran durch Toluol in *R. eutropha* B9 so stark, dass die membranständige Komponente der Xylol-Monooxygenase XylM, die die Oxidation durchführt, durch falsche oder fehlende Wechselwirkungen mit den Phospholipiden in ihrer dreidimensionalen Struktur und damit in ihrer Aktivität beeinträchtigt wird. Ein Problem auf der Ebene der Transkription bzw. Translation konnte durch den Nachweis einer korrekten DNA-Sequenz für das Gen der Xylol-Monooxygenase in den Transkonjuganten mit Transposon ausgeschlossen werden (siehe Kapitel 5.4). Die Expression der verbleibenden Enzyme des Abbauweges, Benzylalkohol-Dehydrogenase und Benzaldehyd-Dehydrogenase, konnte sowohl in den das Transposon tragenden Transkonjuganten als auch in den plasmidtragenden Transkonjuganten bestätigt werden. Da die Expression aller Gene über dieselbe Promotor-Operator-Region gesteuert worden war, mussten auch die Untereinheiten der Xylol-Monooxygenase gebildet worden sein. Dies bestätigt die Vermutung, dass die Inaktivierung der Xylol-Monooxygenase vermutlich mit der Zerstörung der Membran durch Toluol zusammenhängt.

In den Transkonjuganten von *P. putida* U-JT103 sowie in den rekombinanten *E. coli* DH5 $\alpha$ -Stämmen lag dagegen trotz der geringen Toluoltoleranz eine aktive Xylol-Monooxygenase vor. Allerdings beeinflussten die geringen Toleranzeigenschaften die Umsatzaktivitäten sowie die Stabilität des Biokatalysators über einen längeren Zeitraum. Für *P. putida* U-JT103 konnte zwar in einem System mit 50 ml Flüssigphase und 315 ml Gasphase eine maximale Toleranzgrenze von 0,46 mmol Toluol (siehe oben) ermittelt werden, die höchsten Raten bei Umsätzen mit Toluol durch die Transkonjugante U\_TP10 des Stammes wurden aber nur bei Zugabe von 0,09 mmol Toluol erzielt (Abb. 28A).

Die Einflüsse des Lösungsmittels Toluol auf die Membran wirkten sich auch auf die Wiederverwendbarkeit des Biokatalysators aus. Da die Aktivitäten in geschlossenen Erlenmeyerkolben mit Schikanen bestimmt wurden, und damit keine kontinuierliche Zufuhr von Sauerstoff und Toluol gegeben war, konnten die Auswirkungen von Toluol auf die Langzeitstabilität des

Biokatalysators nur näherungsweise bestimmt werden. Bei der Transkonjugante U\_TP10 war es in diesem System möglich, die Reaktion ca. drei Tage aufrecht zu erhalten (siehe Kapitel 5.11.3.2). Damit ist auch unter optimalen Bedingungen nicht davon auszugehen, dass die Transkonjuganten von *P. putida* U-JT103 über mehrere Wochen die Reaktion ohne Verlust an Umsatzaktivität durchführen können. Die kontinuierliche Zerstörung der Membran in diesen Zellen, die keine Möglichkeiten der Abwehr besitzen, wird letztendlich zum Zelltod führen. Zwar kann die Reaktion theoretisch auch ohne Zellen ablaufen (interne Cofaktorregeneration), aber durch die Membranbindung von XylMA ist mit Problemen zu rechnen und eventuell könnten durch Zellyse auch Proteasen freigesetzt werden, die möglicherweise die notwendigen Proteine zerstören.

## 6.7 Problem der Stabilitäten

### 6.7.1 Stabilität der Mutationen

Die Stabilität eines Biokatalysators ist für die Dauer eines Prozesses entscheidend. Die Verluste in den Ausbeuten an Benzoatdihydrodiol (siehe Kapitel 6.4) machen deutlich, dass nicht nur die Stabilität gegenüber äußeren Einflüssen, wie zum Beispiel die Anwesenheit von toxischen Lösungsmitteln (siehe Kapitel 6.6), sondern auch die genetische Stabilität konstruierter Stämme sehr wichtig ist. In den Revertanten von *P. putida* U-JT103, die in der Lage waren, Benzoat als Wachstumssubstrat zu nutzen, konnte eine Rückmutation im Gen für die Benzoatdihydrodiol-Dehydrogenase BenD nachgewiesen werden (siehe Kapitel 5.10.2). Beim Vergleich der Sequenzen der Benzoatdihydrodiol-Dehydrogenase von *P. putida* U-JT103 und einer Revertante auf Aminosäureebene konnte ein Aminosäureaustausch von Serin gegen Glycin in Position 14 identifiziert werden (Abb. 24). Der Aminosäureaustausch war bedingt durch einen Basenaustausch (AGT → GGT).

Mutationen sind normalerweise spontan und ungerichtet. Der Basenaustausch, durch den der Stamm *P. putida* U-JT103 wieder in der Lage ist, mit Benzoat zu wachsen, müsste zufällig passieren. Dabei stellt sich die Frage, warum genau diese Mutation immer dann auftritt, wenn der Stamm nur Benzoat als Kohlenstoffquelle zur Verfügung hat. Die Wahrscheinlichkeit, dass die Mutation auch in Gegenwart von Glukose auftritt, müsste gleich groß sein. Es wurde aber beim Wachstum in Anwesenheit einer zusätzlichen C-Quelle keine Bildung von Revertanten beobachtet. Benzoat wurde vollständig zu Benzoatdihydrodiol abgebaut und nicht weiter als Substrat verwertet (siehe Kapitel 5.9). Mittlerweile wurden Mutationen entdeckt, die

durch Stress stimuliert dazu führten, dass sich die Organismen an die gegebenen Bedingungen anpassen konnten (Rosenberg, 2001; Janion, 2000). Die sogenannten „adaptive mutations“ sind bestimmte Vorgänge, durch die spontane Mutationen in langsam oder gar nicht wachsenden Zellen induziert werden (Hall, 1998). Es wird angenommen, dass diese „adaptive mutations“ hauptsächlich in der Phase des bevorstehenden Zelltods ausgelöst werden. In dieser Phase werden die Zellen also entweder mutiert und überleben, oder sie sterben. Hall (1999) widerlegte die Hypothese, dass wachstumsabhängige Mutationen und adaptive Mutationen von unterschiedlichen Mechanismen ausgelöst werden. So wird nicht die Mutation selber, was einer gerichteten Mutation entsprechen würde, sondern eher die Häufigkeit von ungerichteten Mutationen gesteuert. Letztendlich werden nur die Mutationen detektiert, die zur Erlangung eines Vorteils geführt haben (Hall, 1998).

Die Bildung von Revertanten des Stammes *P. putida* U-JT103 setzte erst nach einer lag-Phase von ca. zwei Tagen ein (siehe Kapitel 5.9). Der Abbau von Benzoatdihydrodiol durch die Transkonjugante *P. putida* U\_TP10, die mit Glukose als Substrat und Toluol und Benzoat als Transformationssubstrate kultiviert worden war, wurde erst in der stationären Phase des Wachstums beobachtet (siehe Kapitel 5.9, Abb. 22A). Der Verlust von Benzoatdihydrodiol in Anwesenheit einer zusätzlichen C-Quelle konnte nur beobachtet werden, wenn auch gleichzeitig Toluol abgebaut wurde. Bei Induktion der Transkonjuganten mit Benzoat ohne Toluol konnte keine Abnahme von Benzoatdihydrodiol gemessen werden. In beiden Fällen waren die Zellen extremen Bedingungen ausgesetzt: *P. putida* U-JT103 hatte nur eine C-Quelle zur Verfügung, die von diesem Stamm eigentlich nicht verwertet werden konnte. Die Transkonjugante U\_TP10 war dem toxischen Substrat Toluol ausgesetzt. Die Bildung von Revertanten durch eine Rückmutation (Punktmutation AGT → GGT) könnte durch die extremen Bedingungen begünstigt worden sein. Müssen in Stämmen die Gene bestimmter Enzyme mutiert werden, so sollte daher möglichst auf einzelne Basenaustausche verzichtet werden. Punktmutationen sind relativ instabil und leicht rückgängig zu machen. Bei Mutationen, die durch Insertion eines DNA-Fragments hervorgerufen worden sind, kann das eingefügte Element wieder verloren gehen. Eine Mutation durch Deletion eines größeren Sequenzbereichs garantiert erst die gewünschte genetische Stabilität.

### 6.7.2 Stabilität der Transkonjuganten mit Transposon bzw. mit Plasmid

In den Transkonjuganten von *R. eutropha* B9 und *P. putida* U-JT103, bei denen die Gene der Toluoloxidation auf einem Transposon integriert worden waren, konnte keine Instabilität

durch Verlust des Transposons beobachtet werden. Die Stabilität des Transposons war durch den Einsatz des sogenannten mini-Tn5-Transposons gegeben (de Lorenzo & Timmis, 1994; de Lorenzo *et al.*, 1990). Dieses Transposon ist so konstruiert, dass das für die Integration notwendige Enzym (Transposase) außerhalb des Transposons auf dem Trägerplasmid angeordnet ist und nach der Transposition verloren geht, da der Vektor sich nur in speziellen Stämmen replizieren kann. Zudem sind die für die Transposition notwendigen IS-Elemente auf ein Mindestmaß reduziert, so dass ein Verlust durch homologe Rekombination ebenfalls sehr unwahrscheinlich ist.

Die Stabilisierung der Plasmide in *E. coli* DH5 $\alpha$  stellte kein größeres Problem dar. Die Isolierung von stabilen Transkonjuganten der Stämme *R. eutropha* B9 und *P. putida* U-JT103 mit Plasmid wurde durch die natürlichen Resistenzen der Stämme gegenüber Ampicillin (*R. eutropha* B9 und *P. putida* U-JT103) und Chloramphenicol (*P. putida* U-JT103) erschwert. Mit Ampicillin gelang es bei beiden Stämmen nicht, das Plasmid bei Kultivierung in Flüssigkultur in den Zellen zu stabilisieren. Ampicillin inhibiert die Zellwandsynthese und ist eigentlich das klassische Antibiotikum, um *E. coli*-Zellen zu selektieren. Die  $\beta$ -Lactamase hydrolysiert das Ampicillin, bevor es in die Zelle eintreten kann. Durch den Abbau von Ampicillin durch *R. eutropha* B9 bzw. *P. putida* U-JT103 war es schwierig, den Selektionsdruck im flüssigen Medium aufrecht zu erhalten.

Transkonjuganten, die das Plasmid mit einer zusätzlichen Resistenz gegenüber Chloramphenicol erhalten hatten, konnten in beiden Fällen stabilisiert werden. In diesen Transkonjuganten gab es aber Probleme mit der Expression (siehe Kapitel 6.8), was dazu führte, dass keine besseren Aktivitäten erreicht werden konnten als mit den Stämmen, die die Gene auf einem Transposon erhalten hatten.

### 6.7.3 Lagerstabilität der Transkonjuganten

Zellen der Transkonjugante *P. putida* U\_TP10, die mit Hilfe der Hochzelldichtefermentation (siehe Kapitel 5.11.1) kultiviert worden waren, konnten für mindestens drei Monate ohne wesentlichen Aktivitätsverlust (maximal 5 %) in einer Glycerin-Phosphatpuffer-Lösung bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert werden (siehe Kapitel 5.11.3.3). Somit ist es möglich, den Biokatalysator zunächst in großen Mengen herzustellen und anschließend für die Biotransformation einzusetzen.

## 6.8 Induktion der Gene der Toluoloxidation

Die Stämme *R. eutropha* B9 und *P. putida* U-JT103 waren in der Lage, den bereits vorhandenen Abbauweg für Benzoat sofort zu induzieren (siehe Kapitel 5.2.3 und 5.7.3). Eine Ansammlung oder ein Ausschleusen von aus Toluol entstandenem Benzoat war somit ausgeschlossen und damit eine gute Voraussetzung für die Kombination aus noch fehlenden Enzymen für die Toluoloxidation mit den bereits vorhandenen Enzymen der Benzoatoxidation gegeben.

Das Modul („catabolic segment *upp* TOL“), mit dem die noch fehlenden Gene in die Stämme eingebracht wurden, verfügte über eine Promotor-Operator-Region sowie ein Regulatorgen, wodurch die Induktion mit dem Umsatzsubstrat Toluol möglich war (siehe Kapitel 5.9). Damit konnten die Kosten für einen speziellen Induktor gespart werden. Da dieses Modul auch zur Konstruktion der Plasmide verwendet wurde, konnte die Expression der Gene in *E. coli* DH5 $\alpha$  über den eingebauten Promotor ( $P_U$ ) der *xyl*-Gene anstatt über den Vektorpromotor reguliert werden (siehe Kapitel 5.14).

Ruhezellen der Transkonjugante von *P. putida* U-JT103 mit Plasmid (U\_PL1, siehe Kapitel 5.13), die mit Glukose als Substrat und Toluol als Induktor kultiviert worden waren, zeigten jedoch keine Umsatzaktivität für Toluol im Gegensatz zu Ruhezellen der Transkonjugante des Stammes, bei denen die Gene auf einem Transposon im Chromosom vorlagen (U\_TP10, siehe Kapitel 5.9). Bei Bestimmung der Konzentration von Toluol während des Wachstums zeigte sich, dass Toluol sehr langsam und nur zu 40 % zu Benzoatdihydrodiol abgebaut worden war. Dabei konnte Benzoat erst nach vier Stunden und Benzoatdihydrodiol nach weiteren 16 Stunden detektiert werden (Abb. 30). Dies erklärte, warum mit Ruhezellen, die aus der exponentiellen Phase (ca. drei Stunden Wachstum mit Glukose als Substrat und Toluol als Induktor) entnommen worden waren, keine Aktivitäten gefunden werden konnten, da der Abbauweg zu diesem Zeitpunkt noch nicht induziert war. Die Ursache der verzögerten Induktion und Expression lag wahrscheinlich in der hohen Dosis von Chloramphenicol (bis zu 200  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), die zur Selektion eingesetzt werden musste. Chloramphenicol hemmt die Proteinsynthese.

Die Probleme bei der Bestimmung von Umsatzraten mit ruhenden Zellen von *P. putida* Idaho BDH2 (Payer, 2002) deuteten ebenfalls daraufhin, dass die Gene für die Toluoloxidation schlecht induziert worden waren. Die Zellen waren mit Glukose als zusätzlicher Kohlenstoff- und Energiequelle kultiviert worden. Eine Katabolit-Repression durch Glukose ist für die Ge-

ne der Toluoloxidation auf dem TOL-Plasmid pWW0 beschrieben (Duetz *et al.*, 1996; Duetz *et al.*, 1994; Holtel *et al.*, 1994). Bei der Sequenzierung einzelner Gene aus dem *xyl*-Operon von *P. putida* Idaho (Germer, 2002), das die Gene für den Abbau von Toluol enthält, zeigten sich große Ähnlichkeiten mit den Genen aus dem TOL-Plasmid pWW0. Daher könnte in *P. putida* Idaho eine ähnliche Regulation wie bei pWW0 vorliegen und auch hier eine Katabolit-Repression durch Glukose stattfinden.

Auch bei der Transkonjugante von *P. putida* U-JT103, bei der die Gene aus dem TOL-Plasmid pWW0 auf einem Transposon im Chromosom vorlagen (U\_TP10), konnte eine Katabolit-Repression der integrierten Gene für den Abbau von Toluol in Anwesenheit von Glukose festgestellt werden. Während Benzoat sofort abgebaut wurde, konnte eine Toluolabnahme erst in der zweiten Hälfte der Wachstumsphase beobachtet werden (siehe Kapitel 5.9, Abb. 22A). Das Problem der Katabolit-Repression kann durch Einsatz einer anderen C-Quelle wie zum Beispiel Fruktose oder Succinat umgangen werden. Eine andere Möglichkeit besteht darin, die Induktoren erst gegen Ende der Wachstumsphase zuzugeben. Dieses Verfahren wurde zum Beispiel bei der Hochzelllichtfermentation von *P. putida* U\_TP10 angewendet (siehe Kapitel 5.11.2).

## 6.9 Aspekte zur Cofaktorregeneration

Coenzym-abhängige Reaktionen, wie zum Beispiel die Reaktionen mit Baeyer-Villiger-Monooxygenasen (Thomas *et al.*, 2002), benötigen Cofaktoren, deren Herstellung sehr teuer ist. Daher sind in den letzten Jahre vermehrt sogenannte *in vitro* Systeme zur Regeneration von Cofaktoren entwickelt worden (Ward & Young, 1990). Eine etablierte Methode ist dabei zum Beispiel der Einsatz der Formiat-Dehydrogenase, die bei der Oxidation von Formiat NAD zu NADH reduziert. Degussa produziert auf diese Weise in einem Membranreaktor L-*t*-Leucin, wobei die Formiat-Dehydrogenase an der Membran gebunden (immobilisiert) ist (Schmid *et al.*, 2001).

Die einfachste und billigste Art der Cofaktorregeneration ist aber der Einsatz von Zellen (*in vivo* System), bei denen durch Zugabe von Nährstoffen der Zellstoffwechsel die Bereitstellung und Regeneration der Cofaktoren übernimmt.

Mit Ausnahme der Mischkultur (siehe Kapitel 5.14.3) war die Transformation von Toluol zu Benzoatdihydrodiol aber auch ohne Zugabe eines Auxiliarsubstrates möglich. Für einen großtechnischen Prozess könnte daher auf die Zugabe von Auxiliarsubstraten verzichtet oder zu-

mindest die zuzugebene Menge auf ein Minimum beschränkt werden. Allerdings konnten mit Zugabe von Glukose bzw. Fruktose die Umsatzraten und Ausbeuten mit den Stämmen *P. putida* Idaho BDH2 und *P. putida* BGXM1 deutlich verbessert werden (Payer, 2002). Möglicherweise unterdrückte die Anwesenheit einer Energiequelle den Abbau des Produkts. Im Falle von *P. putida* U-JT103 (siehe Kapitel 5.9) konnte durch Zugabe von Glukose die Bildung von Revertanten zurückgedrängt werden. Dadurch wurden größere Verluste in der Ausbeute verhindert. Bei Durchführung der Transformation mit dem rekombinanten *E. coli* DH5 $\alpha$ -Stamm, bei dem die Gene für den Abbau auf zwei getrennten Plasmiden integriert worden waren, konnten mit und ohne Zugabe von Auxiliarsubstrat keine Unterschiede in den Umsatzraten und Ausbeuten ermittelt werden.

## 6.10 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es, ein biotechnologisches Verfahren zur selektiven Hydroxylierung von Toluol zu Benzoatdihydrodiol zu entwickeln, das letztendlich zu Phenol umgewandelt werden sollte. Es konnten Stämme konstruiert werden, die Toluol zu Benzoatdihydrodiol umsetzten. Mit diesen Biokatalysatoren wurden Umsatzraten von 0,3 - 0,5 mmol·h<sup>-1</sup>·g C<sub>X</sub><sup>-1</sup> (C<sub>X</sub> = Biotrockenmasse bzw. 0,06 - 0,1 mmol·h<sup>-1</sup>·g Biofeuchtmasse<sup>-1</sup>) ermittelt. Diese Aktivitäten sind durchaus vergleichbar mit den mittlerweile beschriebenen chemischen Verfahren der direkten Hydroxylierung von Benzol zu Phenol (0,1 - 0,3 mmol·h<sup>-1</sup>·g Katalysator<sup>-1</sup>) (Ehrich *et al.*, 2002). Die volumetrischen Umsatzraten der klassischen chemischen Verfahren (Cumol-Verfahren) liegen jedoch um mindestens den Faktor 1000 höher.

Die Nachteile der klassischen als auch der neueren chemischen Verfahren zur Herstellung von Phenol liegen in den geringen Selektivitäten (< 90 %) und den schlechten Ausbeuten (maximal 3 % der eingesetzten Ausgangsstoffe werden zu Phenol umgesetzt). Die in dieser Arbeit beschriebenen Biokatalysatoren zeigten zwar genetische Instabilitäten sowie besondere Eigenschaften, die Produkte über weitere Abbauewege als die bereits blockierten umsetzen zu können. Trotzdem war es möglich, Toluol zu 70 bis 90 % zu Benzoatdihydrodiol umzusetzen. Allerdings muss das entstandene Benzoatdihydrodiol anschließend noch zu Phenol umgewandelt werden. Dazu sind mindestens zwei Aufreinigungsschritte notwendig, während bei den chemischen Verfahren das Phenol durch einfache Destillation gewonnen werden kann (Jähnisch *et al.*, 2002).



Neben den genetischen Instabilitäten der Biokatalysatoren beeinflusste auch die geringe Toleranz gegenüber dem eingesetzten Lösungsmittel Toluol die Aktivität und Stabilität des Biokatalysators. Dies führt bei einer großtechnischen Durchführung des Prozesses zu einem hohen Biokatalysatorverbrauch, wodurch die Kosten für einen wirtschaftlichen Prozess noch viel zu hoch sind.

Die in dieser Arbeit zur Konstruktion möglicher Biokatalysatoren eingesetzten Stämme tolerierten keine Lösungsmittel. Daher konnten nur sehr geringe Mengen an Toluol für die Biotransformation eingesetzt werden. Die Biotransformation war auch nicht über einen längeren Zeitraum durchführbar. Der Einsatz lösungsmitteltoleranter Stämme könnte eventuell zu einer Verbesserung der Stabilität gegenüber Toluol führen. Gelänge es, Stämme zu isolieren, die eine hohe Toleranz gegenüber Lösungsmitteln zeigen und Aromaten a priori nicht verwerten können, würde die Ausbeute an Produkt durch einen möglichen Abbau desselben nicht beeinflusst werden.

Auch die bei den Umsätzen von Toluol zu Benzoatdihydrodiol erreichten Aktivitäten müssten noch gesteigert werden. Dabei muss allerdings darauf geachtet werden, dass in einer technischen Anlage der für den Oxidationsprozess notwendige Sauerstoff nicht limitiert ist.

Für eine Aktivitätssteigerung müssten entweder mehrere Kopien der Gene für den Abbau von Toluol zu Benzoatdihydrodiol auf einem Transposon oder auf einem Plasmid in einen geeigneten Stamm (siehe oben) integriert werden, oder die Expression der eingebrachten Gene müsste durch den Einsatz anderer Promotoren (Einsatz besser regulierbarer Promotoren wie zum Beispiel das „*alk*-regulatory system“; Panke *et al.*, 1999) gesteigert werden.

Für die Bereitstellung der Gene des Abbauweges von Toluol zu Benzoatdihydrodiol auf einem übertragbaren Modul wurden in dieser Arbeit bereits Ansätze gemacht (siehe Kapitel 5.14.2). Es wurde versucht das „catabolic segment *upp* TOL“, bestehend aus den Struktur- und Regulatorgenen für den Abbau von Toluol zu Benzoat, mit den Genen für die Benzoat-Dioxygenase aus *Acinetobacter sp.* ADP1 (Neidle *et al.*, 1991) auf einem Plasmid zu verbinden. Die Benzoat-Dioxygenase sollte dabei unter der Kontrolle des Promotors des „catabolic segment *upp* TOL“ stehen. Außerdem wurde versucht, nur die für den Abbau relevanten Strukturgene zu klonieren und unter die Kontrolle des Plasmidpromotors zu stellen. In den rekombinanten *E. coli*-Stämmen wurden zwar die Enzyme für den Abbau von Toluol zu Benzoat nicht aber die Benzoat-Dioxygenase exprimiert (siehe Kapitel 5.14.2.2 und 5.14.2.3).

Ein weiterer Ansatz könnte die Klonierung der Toluat-Dioxygenase XylXYZ aus dem TOL-Plasmid pWW0 zusammen mit den restlichen Genen für den Abbau von Toluol zu Benzoat (ebenfalls aus dem TOL-Plasmid pWW0) sein. Damit könnten auch substituierte Substrate zu den entsprechenden Dihydrodihydroxybenzoaten umgesetzt werden, was mit der Benzoat-Dioxygenase aus *Acinetobacter sp.* ADP1 aufgrund der begrenzten Substratspezifität nicht möglich ist. Payer (2002) untersuchte die Herstellung substituierter Dihydrodihydroxybenzoate (DHB) wie 4-Fluor-DHB, 3,5-Difluor-DHB, 3-Methyl-DHB, 4-Methyl-DHB, 3,4-Dimethyl-DHB und 4-Chlor-DHB. Von den substituierten Dihydrodihydroxybenzoaten wurden ein bis fünf Gramm im Labormaßstab hergestellt. Diese chiralen Diole können als Bausteine für die chemische Synthese eingesetzt werden.

Somit könnten die konstruierten Stämme für die Produktion von Feinchemikalien eingesetzt werden, bei denen die Wertschöpfung durch den selektiven Hydroxylierungsprozess wesentlich höher ist als bei dem Massenprodukt Phenol. Selbst das Zwischenprodukt Benzoatdihydrodiol ließe sich chemisch nur mit unvergleichlich hohem Aufwand synthetisieren. Hier wäre die Gewinnung durch Biotransformation mittels der beschriebenen Katalysatoren mit Sicherheit konkurrenzfähig. In naher Zukunft wird zumindest kein biologischer Prozess zur Verfügung stehen, mit dem Phenol billiger hergestellt werden kann, als mit den momentan eingesetzten chemischen Verfahren.

## 7 Literatur

**Aemprapa, S. und P. A. Williams.** 1998. Implications of the *xylQ* gene of TOL plasmid pWW102 for the evolution of aromatic catabolic pathways. *Microbiology* **144**: 1387-1396.

**Ampe, F. und N. D. Lindley.** 1996. Flux limitations in the ortho pathway of benzoate degradation of *Alcaligenes eutrophus*: metabolite overflow and induction of the meta pathway at high substrate concentrations. *Microbiology* **142**: 1807-1817.

**Aono, R. und H. Kobayashi.** 1997. Cell surface properties of organic solvent-tolerant mutants of *Escherichia coli* K-12. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3637-3642.

**Aono, R., M. Ito, A. Inoue und K. Horikoshi.** 1992. Isolation of novel toluene-tolerant strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**: 145-146.

**Asako, H., H. Nakajima, K. Kobayashi, M. Kobayashi und R. Aono.** 1997. Organic solvent tolerance and antibiotic resistance increased by overexpression of *marA* in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1428-1433.

**Assinder, S. J. und P. A. Williams.** 1990. The TOL plasmids: Determinants of the catabolism of toluene and the xylenes. *Advances in Microbial Physiology* **31**: 1-69.

**Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith und K. Struhl (Herausgeber).** 1987. *Current protocols in molecular biology*. Band 1, Kapitel 2.4. John Wiley & Sons, Inc., New York, USA.

**Bayly, R. C. und D. I. McKenzie.** 1976. Catechol oxygenases of *Pseudomonas putida* mutant strains. *J. Bacteriol.* **127**: 1098-1107.

**Benjamin, R. C., J. A. Voss und D. A. Kunz.** 1991. Nucleotide sequence of *xylE* from the TOL pDK1 plasmid and structural comparison with isofunctional catechol-2,3-dioxygenase genes from TOL, pWW0 and NAH7. *J. Bacteriol.* **173**: 2724-2728.

**Boyd, D. R. und G. N. Sheldrake.** 1998. The dioxygenase-catalysed formation of vicinal *cis*-diols. *Natural Product Reports*: 309-324.

- Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Bühler, B., B. Witholt, B. Hauer und A. Schmid.** 2002. Characterization and application of xylene monooxygenase for multistep biocatalysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 560-568.
- Bühler, B., A. Schmid, B. Hauer und B. Witholt.** 2000. Xylene monooxygenase catalyses the multistep oxygenation of toluene and pseudocumene to corresponding alcohols, aldehydes and acids in *Escherichia coli* JM101. *J. Bio. Chem.* **275**: 10085-10092.
- Bunch, A. W.** 1994. High cell density growth of microorganisms. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **12**: 535-561.
- Chung, C. T., S. L. Niemela und R. H. Miller.** 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli*. Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**: 2172-2175.
- Clark, J. M.** 1988. Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by prokaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucl. Acids Res.* **16**: 9677-9686.
- Collier, D. N., P. W. Hager und P. V. Phibbs, Jr.** 1996. Catabolite repression control in the *Pseudomonads*. 14<sup>th</sup> Forum in Microbiology: 551-561.
- Collier, L. S., G. L. Gaines III und E. L. Neidle.** 1998. Regulation of benzoate degradation in *Acinetobacter sp.* strain ADP1 by BenM, a LysR-type transcriptional activator. *J. Bacteriol.* **180**: 2493-2501.
- Cowles, C. E., N. N. Nichols und C. S. Harwood.** 2000. BenR, a XylS homologue, regulates three different pathways of aromatic acid degradation in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **182**: 6339-6346.
- Cruden, D. L., J. H. Wolfram, R. D. Rogers und D. T. Gibson.** 1992. Physiological properties of a *Pseudomonas* strain which grows with *p*-xylene in a two-phase (organic-aqueous) medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2723-2729.
- Dagley, S. und D. T. Gibson.** 1965. The bacterial degradation of catechol. *Biochem. J.* **95**: 466-474.

- Davis, D. H., M. Douderoff, R. Y. Stanier und M. Mandel.** 1969. Proposal to reject the genus *Hydrogenomonas*: taxonomic implications. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **19**: 375-390.
- de Bont, J. A. M.** 1998. Solvent-tolerant bacteria in biocatalysis. *Trends Biotech.* **16**: 493-499.
- de Lorenzo, V. und K. N. Timmis.** 1994. Analysis and construction of stable phenotypes in Gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol.* **235**: 386-405.
- de Lorenzo, V., M. Herrero, U. Jakubzik und K. N. Timmis.** 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in Gram-negative eubacteria. *J. Bacteriol.* **172**: 6568-6572.
- Dorn, E. und H.-J. Knackmuss.** 1978. Chemical structure and biodegradation of halogenated aromatic compounds. Substituent effects on 1,2-dioxygenation of catechol. *Biochem. J.* **174**: 85-94.
- Dorn, E., M. Hellwig, W. Reineke und H.-J. Knackmuss.** 1974. Isolation and characterization of a 3-chlorobenzoate degrading pseudomonad. *Arch. Microbiol.* **99**: 61-70.
- Duetz, W. A., S. Marques, B. Wind, J. L. Ramos und J. G. van Anandel.** 1996. Catabolite repression of the toluene degradation pathway in *Pseudomonas putida* harboring pWW0 under various conditions of nutrient limitation in chemostat culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 601-606.
- Duetz, W. A., S. Marques, C. de Jong, J. L. Ramos und J. G. van Anandel.** 1994. Inducibility of the TOL catabolic pathway in *Pseudomonas putida* (pWW0) growing on succinate in continuous culture: Evidence of carbon catabolite repression control. *J. Bacteriol.* **176**: 2354-2361.
- Eaton, R. W.** 1996. *p*-Cumate catabolic pathway in *Pseudomonas putida* F1: Cloning and characterization of DNA carrying the *cmt* operon. *J. Bacteriol.* **178**: 1351-1362.
- Eaton, R. W.** 1997. *p*-Cymene catabolic pathway in *Pseudomonas putida* F1: Cloning and characterization of DNA encoding conversion of *p*-cymene to *p*-cumate. *J. Bacteriol.* **179**: 3171-3180.

- Ehrich, H., H. Berndt, M.-M. Pohl, K. Jähnisch und M. Baerns.** 2002. Oxidation of benzene to phenol on supported Pt-VO<sub>x</sub> and Pd-VO<sub>x</sub> catalysts. *Applied catalysis A: General* **230**: 271-280.
- Ennis, M. D. und N. B. Ghazal.** 1992. The synthesis of (+)- and (-)-flesinoxan: application of enzymatic resolution methodology. *Tetrahedron Lett.* **33**: 6287-6290.
- Ensley, B. D. und D. T. Gibson.** 1983. Naphtalene dioxygenase: purification and properties of a terminal oxygenase component. *J. Bacteriol.* **155**: 505-511.
- Feinberg, A. P. und B. Vogelstein.** 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**: 6-13.
- Figurski, D. H. und D. R. Helinski.** 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 1648-1652.
- Fürste, J. P., W. Pansegrau, R. Frank, H. Blöcker, P. Scholz, M. Bagdasarian und E. Lanka.** 1986. Molecular cloning of the plasmid RP4 primase region in a multi-host-range *tacP* expression vector. *Gene* **48**: 119-131.
- Germer, A.** 2002. Herstellung von Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol aus Toluol: Konstruktion und Charakterisierung einer Mutante des Lösungsmittel tolerierenden *Pseudomonas putida* Idaho. Dissertation am Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart.
- Grabherr, R. und K. Bayer.** 2002. Impact of targeted vector design on *ColE1* plasmid replication. *Trends Biotech.* **20**: 257-260.
- Haldimann, A., L. D. Daniels und B. L. Wanner.** 1998. Use of new methods for construction of tightly regulated arabinose and rhamnose promoter fusions in studies of the *Escherichia coli* phosphate regulon. *J. Bacteriol.* **180**: 1277-1286.
- Hall, B. G.** 1999. Spectra of spontaneous growth-dependent and adaptive mutations at *ebgR*. *J. Bacteriol.* **181**: 1149-1155.
- Hall, B. G.** 1998. Adaptive mutagenesis at *ebgR* is regulated by PhoPQ. *J. Bacteriol.* **180**: 2862-2865.

- Haro, M.-A. und V. de Lorenzo.** 2001. Metabolic engineering of bacteria for environmental applications: construction of *Pseudomonas* strains for biodegradation of 2-chlorotoluene. *J. Biotech.* **85**: 103-113.
- Hartmann, J., W. Reineke und H.-J. Knackmuss.** 1979. Metabolism of 3-chloro-, 4-chloro- and 3,5-dichlorobenzoate by a pseudomonad. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**: 421-428.
- Hegeman, G. D.** 1966. Synthesis of the enzymes of the mandelate pathway by *Pseudomonas putida*. I. Synthesis of enzymes by wild type. *J. Bacteriol.* **91**: 1140-1154.
- Heipieper, H.-J., R. Diefenbach und H. Keweloh.** 1992. Conversion of *cis* unsaturated fatty acids to *trans*, a possible mechanism for the protection of phenol-degrading *Pseudomonas putida* P8 from substrate toxicity. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1847-1852.
- Heipieper, H.-J., H. Keweloh, H.-J. Rehm.** 1991. Influence of phenols on growth and membrane permeability of free and immobilized *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1213-1217.
- Held, M., W. Suske, A. Schmid, K.-H. Engesser, H.-P. E. Kohler, B. Witholt und M. G. Wubbolts.** 1998. Preparative scale production of 3-substituted catechols using a novel monooxygenase from *Pseudomonas azelaica* HBP 1. *J. Mol. Catal. B. Enzym* **5**: 87-93.
- Herrero, M., V. de Lorenzo und K. N. Timmis.** 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **172**: 6557-6567.
- Higuchi, R.** Recombinant PCR. In: Innis M. A. (Ed.) PCR Protocols: A guide to methods and applications. 177-183, Academic Press, San Diego.
- Holtel, A., S. Marques, I. Möhler, U. Jakubzik und K. N. Timmis.** 1994. Carbon source-dependent inhibition of *xyl* operon expression of the *Pseudomonas putida* TOL plasmid. *J. Bacteriol.* **176**: 1773-1776.
- Hudlicky, T. und A. J. Thorpe.** 1996. Current status and future perspectives of cyclohexadiene-*cis*-diols in organic synthesis: versatile intermediates in the concise design of natural products. *Chem. Commun.*: 1993-2000.

- Hudlicky, T., D. Gonzalez und D. T. Gibson.** 1999. Enzymatic dihydroxylation of aromatics in enantioselective synthesis: Expanding asymmetric methodology. *Aldrichimica Acta* **32**: 35-62.
- Hugo, N., J. Armengaud, J. Gaillard, K. N. Timmis und Y. Jouanneau.** 1998. A novel [2Fe-2S] Ferredoxin from *Pseudomonas putida* mt-2 promotes the reductive reactivation of catechol-2,3-dioxygenase. *J. Biol. Chem.* **273**: 9633-9629.
- Hüsken, L. E., R. Beeftink, J. A. M. de Bont und J. Wery.** 2001. High-rate 3-methylcatechol production in *Pseudomonas putida* strains by means of a novel expression system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**: 571-577.
- Inoue, A. und K. Horikoshi.** 1989. A *Pseudomonas* thrives in high concentrations of toluene. *Nature* **338**: 264-266.
- Inoue, A., M. Yamamoto und K. Horikoshi.** 1991. *Pseudomonas putida* which can grow in the presence of toluene. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1560-1562.
- Inoue, H., N. Nojima und H. Okoyama.** 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28.
- Inouye, S., A. Nakazawa und T. Nakazawa.** 1986. Nucleotide sequence of the regulatory gene *xylS* on the *Pseudomonas putida* TOL plasmid and identification of the protein product. *Gene* **44**: 235-242.
- Inouye, S., A. Nakazawa und T. Nakazawa.** 1988. Nucleotide sequence of the regulatory gene *xylR* of the TOL plasmid from *Pseudomonas putida*. *Gene* **66**: 310-306.
- Isken, S. und J. A. M. de Bont.** 1998. Bacteria tolerant to organic solvents. *Extremophiles* **2**: 229-238.
- Isken, S. und J. A. M. de Bont.** 1996. Active efflux of toluene in a solvent-resistant bacterium. *J. Bacteriol.* **178**: 6056-6058.
- Jaeger, K.-E. und M. T. Reetz.** 1998. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotech.* **16**: 396-403.



- Jähnisch, K., H. Ehrich, U. Lohse, K. Lemke, B. Lücke und M. Baerns.** 2002. Verfahren zur Herstellung von Hydroxyaromaten. Patentschrift: DE 10123121C1.
- Jakob, O. und W. Hoffmann.** 1988. Organische Verbindungen. C. C. Buchners Verlag, Bamberg.
- Janion, C.** 2000. A new look at adaptive mutations in bacteria. *Acta Biochimica Polonica* **47**: 451-457.
- Jones, J. B.** 1986. Enzymes in organic synthesis. *Tetrahedron* **42**: 3351-3403.
- Juni, E.** 1972. Interspecies transformation of *Acinetobacter*: Genetic evidence for a ubiquitous genus. *J. Bacteriol.* **112**: 917-931.
- Karau, A.** 2001. Betrachtungen zur technischen Umsetzung der biotechnologischen Phenolproduktion. Bericht erstellt für Phenolchemie. Degussa AG, Frankfurt.
- Kasai, Y., J. Inoue und S. Harayama.** 2001. The TOL plasmid pWW0 *xytN* gene product from *Pseudomonas putida* is involved in *m*-xylene uptake. *J. Bacteriol.* **183**: 6662-6666.
- Kieboom, J., H. van den Brink, J. Frankena und J. A. M. de Bont.** 2001. Production of 3-nitrocatechol by oxygenase-containing bacteria: optimization of the nitrobenzene biotransformation by *Nocardia* S3. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**: 290-295.
- Kieboom, J., J. J. Dennis, G. J. Zylstra und J. A. M. de Bont.** 1998. Active efflux of organic solvents by *Pseudomonas putida* S12 is induced by solvents. *J. Bacteriol.* **180**: 6769-6772.
- Kim, G. J., I. Y. Lee, D. K. Choi, S. C. Yoon und Y. H. Park.** 1996. High cell density cultivation of *Pseudomonas putida* BM01 using glucose. *J. Microbiol. Biotechnol.* **6**: 221-224.
- Kim, K., S. Lee, K. Lee und D. Lim.** 1998. Isolation and characterization of toluene-sensitive mutants from the toluene-resistant bacterium *Pseudomonas putida* GM73. *J. Bacteriol.* **180**: 3692-3696.
- Kobayashi, H., K. Uematsu, H. Hirayama und K. Horikoshi.** 2000. Novel toluene elimination system in a toluene-tolerant microorganism. *J. Bacteriol.* **182**: 6451-6455.

- Kok, R. G., D. M. Young und L. N. Ornston.** 1999. Phenotypic expression of PCR-generated random mutations in a *Pseudomonas putida* gene after its introduction into an *Acinetobacter* chromosome by natural transformation. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1675-1680.
- Kovach, M. E., R. W. Phillips, P. H. Elzer, R. M. Roop II und K. M. Peterson.** 1994. pBBR1MCS: A broad-host-range cloning vector. *BioTechniques* **16**: 800-802.
- Mackay D. und W. Y. Shiu.** 1981. Critical review of Henry's law constants for chemicals of environmental interest. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **10**: 1175-1199.
- Marchuk, D., M. Drumm, A. Saulino und F. S. Collins.** 1991. Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR-products. *Nucl. Acids Res.* **19**: 1154.
- Mikesell, M. D., J. J. Kukor und R. H. Olsen.** 1993. Metabolic diversity of aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from a petroleum-contaminated aquifer. *Biodegradation* **4**: 249-259.
- Miller, V. L. und J. J. Mekalanos.** 1988. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires toxR. *J. Bacteriol.* **170**: 2575-2583.
- Morawski B., G. Casy, C. Illaszewicz, H. Griengl und D. W. Ribbons.** 1997. Stereochemical course of two arene-*cis*-diol dehydrogenases specifically induced in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **179**: 4023-4029
- Moriya, K. und K. Horikoshi.** 1993 a. Isolation of a benzene-tolerant bacterium and its hydrocarbon degradation. *Journal of Fermentation and Bioengineering.* **76**: 168-173.
- Moriya, K. und K. Horikoshi.** 1993 b. A benzene-tolerant bacterium utilizing sulfur compounds isolated from deep sea. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **76**: 397-399.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn und H. Erlich.** 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51**: 263-273.

- Nakazawa, T. und T. Yokota.** 1973. Benzoate metabolism in *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: demonstration of two benzoate pathways. J. Bacteriol. **115**: 262-267.
- Neidle, E. L., C. Hartnett, L. N. Ornston, A. Bairoch, M. Rekik und S. Harayama.** 1991. Nucleotide sequences of the *Acinetobacter calcoaceticus* *benABC* genes for benzoate 1,2-dioxygenase reveal evolutionary relationships among multicomponent oxygenases. J. Bacteriol. **173**: 5385-5395.
- Neidle, E., C. Hartnett, L. N. Ornston, A. Bairoch, M. Rekik und S. Harayama.** 1992. *Cis*-diol dehydrogenases encoded by the TOL pWW0 plasmid *xyiL* gene and the *Acinetobacter calcoaceticus* chromosomal *benD* gene are members of the short chain alcohol dehydrogenase superfamily. Eur. J. Biochem. **204**: 113-120.
- Nozaki, M.** 1970. Metapyrocatechase (*Pseudomonas*), S. 522-525 in H. Tabor und C. W. Tabor (Hrsg.), Methods in Enzymology, Bd. 17A. Academic Press, Inc., New York.
- Ogino, H., K. Miyamoto und H. Ishikawa.** 1994. Organic-solvent-tolerant bacterium which secretes organic-solvent-stable lipolytic enzyme. Appl. Environ. Microbiol. **60**: 3884-3886.
- Onumonu, A. N., A. Colocoussi, C. Matthews, M. P. Woodland und D. J. Leak.** 1994. Microbial alkene epoxidation - Merits and limitations. Biocatalysis **10**: 211-218.
- Paje, M. L. F., A. Brett und I. Couperwhite.** 1997. A *Rhodococcus* species that thrives on medium saturated with liquid benzene. Microbiology **143**: 2975-2981.
- Panke, S., M. G. Wubbolts, A. Schmid und B. Witholt.** 2000. Production of enantiopure styrene oxid by recombinant *Escherichia coli* synthesizing a two-component styrene monooxygenase. Biotechnology and Bioengineering **69**: 91-100.
- Panke, S., A. Meyer, C. M. Huber, B. Witholt und M. G. Wubbolts.** 1999. An alkane-responsive expression system for the production of fine chemicals. Appl. Environ. Microbiol. **65**: 2324-2332.
- Panke, S., J. M. Sanchez-Romero und V. de Lorenzo.** 1998. Engineering of quasi-natural *Pseudomonas putida* strains for toluene metabolism through an *ortho*-cleavage degradation pathway. Appl. Environ. Microbiol. **64**: 784-751.

- Payer, E.** 2002. Mikrobielle Herstellung von *cis*-Dihydrodihydroxybenzoaten als Bausteine für die chemische Synthese. Dissertation am Fraunhofer Institut für Grenzflächen und Bioverfahrenstechnik, Stuttgart.
- Pfennig, M. und K. D. Lippert.** 1966. Über das Vitamin B<sub>12</sub>-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien. *Archiv für Mikrobiologie* **55**: 245-256.
- Pinkart, H. C., J. W. Wolfram, R. Rogers und D. C. White.** 1996. Cell envelope changes in solvent-tolerant and solvent-sensitive *Pseudomonas putida* strains following exposure to *o*-xylene. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1129-1132.
- Pirutko, L. V., V. S. Chernyavsky, A. K. Uriate und G. I. Panov.** 2002. Oxidation of benzene to phenol by nitrous oxide activity of iron in zeolite matrices of various composition. *Applied catalysis A: General* **227**: 143-157.
- Plumeier, I., D. Perez-Pantoja, S. Heim, B. Gonzalez und D. H. Pieper.** 2002. Importance of different *tfd* genes for degradation of chloroaromatics by *Ralstonia eutropha* JMP 134. *J. Bacteriol.* **184**: 4054-4064.
- Rajagopal, A. N.** 1996. Growth of gram-negative bacteria in the presence of organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology* **19**: 606-613.
- Ramos, J. L., E. Duque, P. Godoy und A. Segura.** 1998. Efflux pumps involved in toluene tolerance in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J. Bacteriol.* **180**: 3323-3329.
- Ramos, J. L. und S. Marques.** 1997. Transcriptional control of the *Pseudomonas* TOL plasmid catabolic operons is achieved through an interplay of host factors and plasmid-encoded regulators. *Annu. Rev. Rev. Microbiol.* **51**: 341-373.
- Ramos, J. L., E. Duque, J.-J. Rodriguez-Herva, P. Godoy, A. Haidour, F. Reyes und A. Fernandez-Barrero.** 1997. Mechanisms for solvent tolerance in bacteria. *J. Biol. Chem.* **272**: 3887-3890.
- Ramos, J. L., E. Duque, M.-J. Huertas und A. Haidour.** 1995. Isolation and expansion of the catabolic potential of a *Pseudomonas putida* strain able to grow in the presence of high concentrations of aromatic hydrocarbons. *J. Bacteriol.* **177**: 3911-3916.

**Raschke, H., M. Meier, J. G. Burken, R. Hany, M. D. Müller, J. R. van der Meer und H.-P. E. Kohler.** 2001. Biotransformation of various substituted aromatic compounds to chiral dihydrodihydroxy derivatives. *Appl. Environ. Microbiol.* **67** : 3333-3339.

**Reineke, W. und H.-J. Knackmuss.** 1978. Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. Substituent effects on 1,2-dioxygenation of benzoic acid. *Biochim. Biophys. Acta* **542**: 412-423.

**Reineke, W. und H.-J. Knackmuss.** 1978. Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. Substituent effects on dehydrogenation of 3,5-cyclohexadiene-1,2-diol-1-carboxylic acid. *Biochim. Biophys. Acta* **542**: 424-429.

**Reiner, A. M.** 1972. Metabolism of aromatic compounds in bacteria. *J. Biol. Chem.* **247**: 4960-4965.

**Reiner, A. M. und G. D. Hegeman.** 1971. Metabolism of benzoic acid by bacteria. Accumulation of (-)-3,5-cyclohexadiene-1,2-diol-1-carboxylic acid by a mutant strain of *Alcaligenes eutrophus*. *Biochemistry.* **13**: 2530-2536.

**Rosenberg, S. M.** 2001. Evolving responsively: Adaptive mutation. *Nature Reviews Genetics* **2**: 504-515.

**Sala-Trepat, J. M. und W. C. Evans.** 1971. The *meta* cleavage of catechol by *Azotobacter* species. *Eur. J. Biochem.* **20**: 400-413.

**Salter, G. J. und D. B. Kell.** 1995. Solvent selection for whole cell biotransformations in organic media. *Crit. Rev. Biotechnol.* **15**: 139-177.

**Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Vol. 2. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

**Sanger, F., S. Nicklen und A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.

**Sawers, G. und M. Jarsch.** 1996. Alternative regulation principles for the production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46**: 1-9.

- Schmid, A., J. S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts und B. Witholt.** 2001. Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* **409**: 258-268.
- Schmidt, K., S. Liaaen-Jensen und H. G. Schlegel.** 1963. Die Carotinoide der *Thiorhodaceae*. *Arch. Mikrobiol.* **46**: 117-126.
- Schwartz, D. R. und C. J. McCoy.** 1977. Epoxidation of 1,7-octadiene by *Pseudomonas oleovorans*: fermentation in the presence of cyclohexane. *Appl. Environ. Microbiol.* **34**: 47-49.
- Schwarzenbach, R. P., P. M. Gschwend und D. M. Imboden.** 1993. Environmental organic chemistry. John Wiley & Sons, Inc., 605 Third Avenue, New York, NY.
- Sharp, R. R., J. D. Bryers, W. G. Jones und M. S. Shields.** 1998. Activity and stability of a recombinant plasmid-borne TCE degradative pathway in suspended cultures. *Biotechnology and Bioengineering* **57**: 287-296.
- Shirai, K.** 1986. Screening of microorganisms for catechol production from benzene. *Agric. Biol. Chem.* **50**: 2875-2880.
- Sikkema, J., J. de Bont und B. Poolman.** 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews* **59**: 201-222.
- Simon, R., U. Priefer und A. Pühler.** 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Biotechnology* **1**: 784-791.
- Sinclair, M. I., P. C. Maxwell, B. R. Lyon und B. W. Holloway.** 1986. Chromosomal location of TOL Plasmid DNA in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **168**: 1302-1308.
- Thomas, S. M., R. DiCosimo und V. Nagarajan.** 2002. Biocatalysis: applications and potentials for the chemical industry. *Trends Biotech.* **20**: 238-242.
- Vollhardt, K. P. C.** 1990. Organische Chemie. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim. 1. korrigierter Nachdruck der 1. Auflage 1988.

- Wahbi, L. P., D. Gokhale, S. Minter und G. M. Stephens.** 1996. Construction and use of recombinant *Escherichia coli* strains for the synthesis of toluene *cis*-glycol. *Enzyme and Microbiol Technology* **19**: 297-306.
- Ward, O.P.** 1994. *Bioreaktionen*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Ward, O. P. und C. S. Young.** 1990. Reductive biotransformations of organic compounds by cells or enzymes of yeast. *Enzyme Microb. Technol.* **12**: 482-492.
- Weber, F. J. und J. A. de Bont.** 1996. Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1286**: 225-245.
- Weber, F. J., S. Isken und J. A. M. de Bont.** 1994. *Cis/trans* isomerization of fatty acids as a defence mechanism of *Pseudomonas putida* strains to toxic concentrations of toluene. *Microbiology* **140**: 2013-2017.
- Weber, F. J., L. P. Ooykaas, R. M. W. Schemen, S. Hartmans und J. A. M. de Bont.** 1993. Adaptation of *Pseudomonas putida* S12 to high concentrations of styrene and other organic solvents. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 3502-3504.
- Wery, J., D. I. Mendes da Silva und J. A. M. de Bont.** 2000. A genetically modified solvent-tolerant bacterium for optimized production of a toxic fine chemical. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**: 180-185.
- Whited, G. M., W. R. McCombie, L. D. Kwart und D. T. Gibson.** 1986. Identification of *cis*-diols as intermediates in the oxidation of aromatic acids by a strain of *Pseudomonas putida* that contains a TOL plasmid. *J. Bacteriol.* **166**: 1028-1039.
- Willetts, A.** 1997. Structural studies and synthetic applications of Baeyer-Villiger monooxygenases. *Trends Biotech.* **15**: 55-62.
- Williams, P. A., L. M. Shaw, C. W. Pitt und M. Vrecl.** 1997. *xyIUW*, two genes at the start of the upper pathway operon of TOL plasmid pWW0, appear to play no essential part in determining its catabolic phenotype. *Microbiology* **143**: 101-107.

- Williams, P. A. and K. Murray.** 1974. Metabolism of benzoate and the methylbenzoates by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: evidence for the existence of a TOL plasmid. *J. Bacteriol.* **120**: 416-423.
- Wilms, B., A. Hauck, M. Reuss, C. Syldatk, R. Mattes, M. Siemann und J. Altenbuchner.** 2001. High-cell-density fermentation for production of L-N-carbamoylase using an expression system based on the *Escherichia coli rhaBAD* promoter. *Biotechnology and Bioengineering* **73**: 95-103.
- Witholt, B., M.-J. de Smet, J. Kingma, J. B. Beilen, M. Kok, R. G. Lageveen und G. Eggink.** 1990. Bioconversions of aliphatic compounds by *Pseudomonas oleovorans* in multi-phase bioreactors: background and economic potential. *Trends Biotechnol.* **8**: 46-52.
- Wubbolts, M. G., P. Reuvekamp und B. Witholt.** 1994. TOL plasmid-specified xylene oxygenase is a wide substrate range monooxygenase capable of olefin epoxidation. *Enzyme Microb. Technol.* **16**: 608-615.
- Zylstra, G. J. und D. T. Gibson.** 1989. Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1. *J. Biol. Chem.* **264**: 14940-14946.



---

## Danksagung

Prof. Dr. H.-J. Knackmuss danke ich für die Überlassung des Themas, für sein Interesse am Fortgang der Arbeit und die mir stets gewährte Unterstützung.

Prof. Dr. M. Schlömann danke ich für die Diskussionen und Anregungen sowie die stetige Hilfsbereitschaft einschließlich der zahlreichen Reisen nach Stuttgart. Ich danke ihm auch für das Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit.

Ich danke PD Dr. Hiltrud Lenke, Dr. Edina Payer und Dr. Andrea Germer für die Zusammenarbeit im Rahmen des gemeinsamen Industrieprojektes.

Sibylle Bürger danke ich für die gute Zusammenarbeit im Labor.

Allen jetzigen sowie allen ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie danke ich für ihre stetige Hilfsbereitschaft und die gute Arbeitsatmosphäre.

Meiner Mutter möchte ich von ganzem Herzen dafür danken, dass sie trotz harter Zeiten nie aufgegeben hat, mich und meine Geschwister stets unterstützt und uns damit unseren Weg ermöglicht hat. Danke Mama.

Meiner Schwester Martina und meinem Bruder Achim danke ich für den guten Zusammenhalt in wichtigen und weniger wichtigen Zeiten.

Meinen Schwiegereltern Hella und Erich Gittinger möchte ich für die herzliche Aufnahme in die Familie danken.

Meinem Mann Heiko Gittinger danke ich von ganzem Herzen für seine Liebe, seine schier grenzenlose Geduld und seine moralische Unterstützung, ohne die diese Arbeit nie entstanden wäre:

*Werde mit mir alt,  
Das beste steht uns noch bevor,  
der Abend des Lebens,  
für den der Morgen ward gemacht.*

(Robert Browning)