

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik

**Reaktionstechnische Untersuchungen von  
rekombinanten *Saccharomyces cerevisiae* zur  
Bernsteinsäureherstellung**

**Gabi Gebhardt**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Maschinenwesen der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzende: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Sonja Berensmeier  
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz  
2. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. habil. Rudi F. Vogel

Die Dissertation wurde am 01.07.2010 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Maschinenwesen am 07.09.2010 angenommen.



## Danksagung

Diese Arbeit haben viele Personen auf vielseitige Art und Weise unterstützt und ich möchte mich an dieser Stelle bei allen herzlich bedanken!

Bei Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz für die hervorragende Betreuung, die stets konstruktive Kritik, die interessanten Diskussionen und für die Möglichkeit ein sehr aktuelles, anwendungsorientiertes und interdisziplinäres Thema mit viel vertrauensvoll eingeräumten Freiraum bearbeiten zu dürfen.

Bei Prof. Dr. rer. nat. Rudi Vogel (Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie, Technische Universität München) für die Übernahme des Korreferats.

Bei Prof. Dr. rer. nat. Sonja Berensmeier (Fachgebiet für Selektive Trenntechnik, Technische Universität München) für die Übernahme des Vorsitzes.

Bei der Deutschen Bundesstiftung Umwelt (DBU) für die Teilfinanzierung dieses Projekts (AZ 13180).

Bei den Projektpartnern Dr.-Ing. Matthias Arnold und Dipl.-Ing. Guido Ertel (DASGIP AG) und Dr.-Ing. Klaus Kaufmann (2mag AG) für die hervorragende Zusammenarbeit.

Bei Projektpartnern Prof. Dr. Christine Lang und Andreas Raab (ORGANOBALANCE GmbH) für die hervorragende Zusammenarbeit und sowie für die Bereitstellung der rekombinanten *Saccharomyces cerevisiae* Stämme.

Bei allen (ehemaligen) Kollegen am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik für die gute Zusammenarbeit und das ausgezeichnete Arbeitsklima.

Bei meinen Korrekturlesern Michael Weiner, Torben Höfel, Michael Hofinger, Martin Demler und Dirk Hebel für das gründliche Durchsehen meiner Dissertation und die ergiebigen Diskussionen.

Bei allen meinen Studenten für ihre fleißige und tatkräftigen Mitarbeit.

Bei meinen Eltern und meinem Lebensgefährten für ihre Unterstützung.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG</b> .....	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>THEORETISCHE GRUNDLAGEN</b> .....	<b>8</b>
3.1	Kultivierung von Mikroorganismen.....	8
3.1.1	Mikrobielles Wachstum .....	8
3.1.2	Massenbilanz des idealen Rührkesselreaktors.....	11
3.1.3	Satzverfahren.....	12
3.1.4	Zulaufverfahren.....	15
3.2	Die Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	16
3.3	Zentraler Kohlenstoffmetabolismus von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	18
3.3.1	Regulation des Zentralstoffwechsels durch Glucose .....	18
3.3.2	Crabtree-Effekt.....	18
3.3.3	Glycolyse und Pentosephosphat-Weg.....	19
3.3.4	Wege zum Abbau von Pyruvat: Respiration und Fermentation.....	19
3.3.5	Gluconeogenese und Glyoxylat-Zyklus .....	26
3.3.6	Überblick über die Haupt- und Nebenprodukte des anaeroben und aeroben Kohlenstoffstoffwechsels .....	28
3.4	Zentraler Stickstoffmetabolismus von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	30
3.5	Bernsteinsäure.....	32
3.5.1	Vorkommen und Eigenschaften .....	32
3.5.2	Industrielle Bedeutung und Produktion von Bernsteinsäure .....	33
3.5.3	Ansätze zur biotechnologischen Bernsteinsäureproduktion.....	36
<b>4</b>	<b>ANSÄTZE ZUR BERNSTEINSÄUREPRODUKTION MIT <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i></b> .....	<b>46</b>
4.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> als Kandidat für die mikrobielle Bernsteinsäureproduktion .....	46
4.2	Überblick über das gewählte Grundkonzept .....	46
4.3	Deletion der Succinat-Dehydrogenase .....	51
4.4	Deletion von Isocitrat-Dehydrogenasen.....	54
4.5	Überexpression der Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase.....	56

4.6	Überexpression der Acetyl-CoA-Synthetase .....	59
4.7	Überexpressionen des globalen Transkriptionsfaktor <i>HAP4</i> .....	59
4.8	Reprimierbares Promotorsystem .....	59
<b>5</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>61</b>
5.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Stämme.....	61
5.2	Medien .....	62
5.3	Analytische Methoden .....	63
5.3.1	Bestimmung der Optischen Dichte und der Biotrockenmasse .....	63
5.3.2	HPLC-Analytik des Kulturüberstandes .....	64
5.3.3	Bestimmung der Glutamatkonzentration .....	64
5.3.4	Bestimmung der Isocitrat-Lyase-Aktivität .....	64
5.4	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> .....	65
5.4.1	Kultivierung im Schüttelkolben .....	65
5.4.2	Parallele Satzkultivierungen im Bioreaktorblock im Milliliter-Maßstab.....	66
5.4.3	Satz- und Zulaufversuche im Laborrührkessel im Liter-Maßstab .....	69
5.4.4	Normierung auf das initiale Volumen.....	70
5.4.5	Ermittlung der Ethanolverdunstung .....	72
5.4.6	Kohlenstoffbilanz.....	74
5.5	Bestimmung intrazellulärer Metabolite aus dem Energiestoffwechsel.....	75
<b>6</b>	<b>CHARAKTERISIERUNG DES SACCHAROMYCES CEREVISIAE BASISSTAMMES</b>	<b>78</b>
6.1	Einfluss der Auxotrophien auf das Wachstum .....	78
6.2	Toleranz gegenüber organischen Säuren.....	81
<b>7</b>	<b>CHARAKTERISIERUNG VON SUCCINAT-DEHYDROGENASE- DELETIONSSTÄMMEN .....</b>	<b>85</b>
7.1	Satzverfahren mit Glucose als Kohlenstoffquelle.....	85
7.2	Satz- und Zulaufverfahren mit Glucose als Kohlenstoffquelle.....	88
7.3	Zulaufkultivierungen mit verschiedenen Dosieraten .....	97
7.4	Satzverfahren mit Galactose als Kohlenstoffquelle.....	99
7.5	Zulaufverfahren mit Zudosierung von Glucose und Glutamat .....	104
7.6	Evaluierung eines reprimierbaren Promotorsystems am Beispiel der Succinat- Dehydrogenase-Deletion .....	106
7.7	Fazit zu den SDH-Deletionsstämmen.....	109

<b>8</b>	<b>CHARAKTERISIERUNG VON <i>S. CEREVISIAE</i> STÄMMEN MIT DELETION DER SUCCINAT-DEHYDROGENASE UND ISOCITRAT-DEHYDROGENASE(N)</b> .....	<b>111</b>
8.1	Satzverfahren mit Glucose als Kohlenstoffquelle.....	112
8.2	Evaluierung der Succinattoleranz eines Deletionsstammes.....	116
8.3	Evaluierung der Glutamatauxotrophie des SDH-IDH-IDP-Deletionsstammes im Satzverfahren .....	117
8.4	Satz- und Zulaufverfahren mit Glucose als Kohlenstoffquelle.....	119
8.5	Zulaufkultivierungen mit verschiedenen Dosieraten .....	128
8.6	Satzverfahren mit Galactose als Kohlenstoffquelle.....	130
8.7	Bestimmung intrazellulärer Metabolite aus dem Energiestoffwechsel.....	134
8.8	Fazit zur parallelen Deletion der Succinat-Dehydrogenase und der Isocitrat-Dehydrogenase(n) .....	137
<b>9</b>	<b>CHARAKTERISIERUNG VON <i>S. CEREVISIAE</i> DELETIONSSTÄMMEN MIT ÜBEREXPRESSION VON ENZYMEN DES GLYOXYLAT-ZYKLUS</b> .....	<b>138</b>
9.1	Überexpression im SDH-IDH-IDP-Deletionsstamm .....	138
9.1.1	Satzverfahren.....	138
9.1.2	Satz- und Zulaufverfahren.....	141
9.1.3	Fazit zu den SDH-IDH-IDP-Stämmen mit Überexpressionen .....	142
9.2	Überexpression in den SDH-IDH-Deletionsstämmen .....	144
9.2.1	Bestimmung der Isocitrat-Lyase-Aktivität .....	144
9.2.2	Satzverfahren.....	146
9.2.3	Satz- und Zulaufverfahren.....	149
9.2.4	Fazit zu den SDH2-IDH-Deletionsstämmen mit Überexpressionen .....	152
9.3	Überexpression im SDH-Deletionsstamm .....	154
9.3.1	Satzverfahren.....	154
9.3.2	Satz- und Zulaufverfahren.....	156
9.3.3	Zulaufkultivierung mit verschiedenen Dosieraten .....	158
9.4	Bestimmung intrazellulärer Metabolite aus dem Energiestoffwechsel.....	159
9.5	Fazit zu den Deletionsstämmen mit Überexpressionen im Glyoxylat-Zyklus .....	160
<b>10</b>	<b>CHARAKTERISIERUNG VON STÄMMEN MIT ÜBEREXPRESSION DES TRANSKRIPTIONELLEN REGULATIONSFAKTORS <i>HAP4</i></b> .....	<b>163</b>
10.1	Satzverfahren.....	164
10.2	Satz- und Zulaufverfahren .....	167
10.3	Fazit zur <i>HAP4</i> -Überexpression .....	173

---

<b>11</b>	<b>FAZIT ZU DEN ANSÄTZEN ZUR BERNSTEINSÄUREPRODUKTION MIT SACCHAROMYCES CEREVISIAE.....</b>	<b>174</b>
<b>12</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....</b>	<b>179</b>
<b>13</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>185</b>
<b>14</b>	<b>ABKÜRZUNGS- UND SYMBOLVERZEICHNIS .....</b>	<b>214</b>
<b>15</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>219</b>
15.1	Nomenklatur.....	219
15.2	Stammliste .....	220
15.3	Medien, Medienzusätze und Puffer .....	222
15.4	HPLC-Methodik.....	229
15.5	Glutamat-Bestimmung.....	230
15.6	Isocitrat-Lyaseaktivitätstest .....	231
15.7	LC-MS-Methodik .....	233
15.8	Rührkesselreaktoren .....	235
15.9	Allgemeine Geräte und Materialien .....	237



# 1 Einleitung

Ein Großteil der Basis- und Feinchemikalien sowie der Energieträger werden gegenwärtig auf petrochemischem Weg ausgehend von Erdöl oder auch Erdgas und Kohle hergestellt. Auf Grund der Endlichkeit dieser fossilen Ressourcen und der daraus resultierenden ansteigenden Rohstoffkosten sowie steigender politischer und gesellschaftlicher Anforderungen bezüglich einer nachhaltigen, umweltfreundlichen industriellen Produktion wird weltweit an Alternativen zu Nutzung fossiler Rohmaterialien geforscht (Paster *et al.* 2003, Kircher 2006).

Während zur regenerativen Energiegewinnung vielfältige Möglichkeiten wie Sonnen-, Wind- oder Wasserkraft, Erdwärme und die energetische Nutzung von Biomasse zur Verfügung stehen, kann nur Biomasse als alternativer Rohstoff zur Produktion von Kraftstoffen, Grund- und Feinchemikalien dienen (Kamm *et al.* 2006). Abbildung 1.1 zeigt am Beispiel der USA, welche Marktanteile für aus Biomasse generierte Energie, Kraftstoffe und biobasierte Produkte ausgehend von dem im Jahr 2002 vorliegenden Zahlen angestrebt werden.

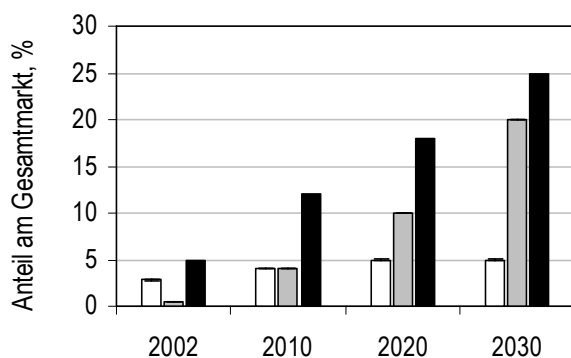


Abbildung 1.1: Angestrebte Anteile für aus Biomasse gewonnene Bioenergie (□), Biokraftstoffe (▒) und biobasierte Produkte (■) am jeweiligen Gesamtmarkt am Beispiel der USA (Daten nach Biomass R & D Technical Advisory Committee 2002).

Der Begriff biobasierte Produkte umfasst hierbei sowohl Feinchemikalien mit hoher Wertschöpfung (beispielsweise Pharmazeutika, Kosmetika und Lebensmittelzusatzstoffe) als auch Bulkchemikalien wie Biopolymere oder Chemierohstoffe (European Renewable Resources and Materials Association 2007). Besonders stark soll der Zuwachs bei den biobasierten Chemikalien ausfallen, für die beispielsweise in den USA bereits 2030 ein Marktanteil von 25 % erzielt werden soll. Auch in der Europäischen Union soll eine starke Erhöhung des Marktanteils von Energie aus nachwachsenden Rohstoffen, Biokraftstoffen und biobasierten Produkten erfolgen (Ehrenberg 2002, Kamm *et al.* 2006, Patel 2006).

Beim Ausgangsstoff Biomasse handelt es sich hauptsächlich um pflanzliche Biomasse wie beispielsweise Holz oder Pflanzenreste aus der Nahrungs- und Futtermittelherstellung. Analog zur petrochemischen Raffinerie wurden Bioraffinerie-Konzepte entworfen (Abbildung 1.2), in denen Rohstoffe aus Biomasse mit Hilfe von biotechnologischen und/oder chemischen Prozessen in ein Spektrum von wertvollen Produkten überführt werden (Kamm und Kamm 2004).

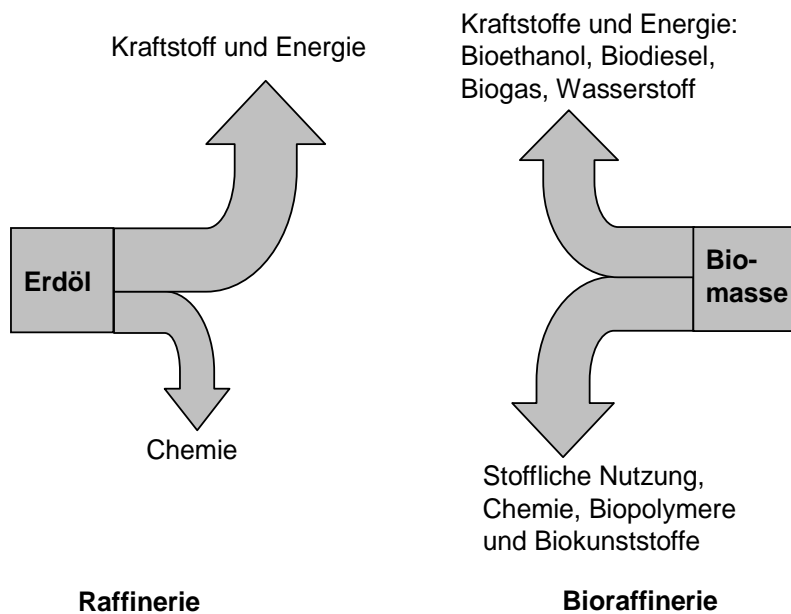


Abbildung 1.2: Prinzip der petrochemischen Raffinerie und der Bioraffinerie (nach Kamm *et al.* 2006).

Unter den verschiedenen Richtungen der Biotechnologie kommt der Weißen Biotechnologie, die als "industrielle Produktion von organischen Grund- und Feinchemikalien, sowie Wirkstoffen mit Hilfe optimierter Enzyme, Zellen oder Mikroorganismen" definiert wird (Fraunhofer-Gesellschaft 2005), eine Schlüsselrolle in der Umsetzung von Bioraffinerie-Konzepten zu.

Die heutige Vielfalt an Produkten der chemischen Industrie stützt sich auf einige wenige Plattformchemikalien, die auf petrochemischer Basis hergestellt werden. Dieses Prinzip soll im Rahmen von Bioraffinerie-Konzepten in Zukunft auf biobasierte Produkte übertragen werden.

Vom U.S. Department of Energy werden die in Tabelle 1.1 zusammengefassten Substanzen als die ökologisch und ökonomisch attraktivsten "grünen" Plattformchemikalien eingestuft (Werpy und Petersen 2004). Hierzu zählt auch die organische Dicarbonsäure Bernsteinsäure.

Tabelle 1.1: Kandidaten für biobasierte Plattformchemikalien (Werpy und Petersen 2004).

---

C <sub>3</sub>	Glycerin, 3-Hydroxypropionsäure, 3-Hydroxybutyrolacton
C <sub>4</sub>	Bernsteinsäure, Fumarsäure, Äpfelsäure, Asparaginsäure
C <sub>5</sub>	Xylitol/Arabit, Lävulinsäure, Itaconsäure, Glutaminsäure
C <sub>6</sub>	Sorbitol, Gluconsäure
C <sub>7</sub>	2,5-Furandicarbonsäure

---

## 2 Problemstellung und Zielsetzung

Binnen der letzten Jahre wurden bereits zahlreiche Studien zur mikrobiellen Bernsteinsäureproduktion publiziert, wobei zur Etablierung einer industriellen biotechnologischen Bernsteinsäureproduktion zwei verschiedene Ansätze verfolgt werden.

Der erste Ansatz beruht auf der Identifizierung und Isolation von natürlichen, stark Bernsteinsäure sekretierenden Mikroorganismen. Zu diesen natürlichen Bernsteinsäureproduzenten zählen ausschließlich Prokaryonten wie *Anaerobiospirillum succiniciproducens*, *Actinobacillus succinogenes*, *Mannheimia succiniproducens* oder *Basfia succiniciproducens* (Nghiem *et al.* 1997, Guettler *et al.* 1999, Lee *et al.* 2002, Scholten und Dägele 2008). Allerdings beschränken mehrere Faktoren den industriellen Einsatz der natürlichen Bernsteinsäureproduzenten. So fehlen die Erfahrungen bezüglich eines großtechnischen industriellen Einsatzes, das Wissen über die Physiologie und den Stoffwechsel dieser Mikroorganismen ist lückenhaft und es sind keine oder erst seit kurzem Genomsequenzen und erste gentechnische Methoden verfügbar (McKinlay *et al.* 2007, Lin *et al.* 2005c). Zudem fehlt der Nachweis der Apathogenität dieser Mikroorganismen.

Diese Nachteile umgeht der zweite Ansatz zur mikrobiellen Bernsteinsäureproduktion, der darauf beruht, den Stoffwechsel von bereits industriell etablierten und umfassend charakterisierten Plattformorganismen, deren natürliche Succinatbildung gering ist, durch "Metabolic Engineering" in Richtung Succinat umzulenken.

Bislang wurden rekombinante Stämme zur Succinatproduktion basierend auf den prokaryontische Plattformorganismen *Escherichia coli* und *Corynebacterium glutamicum* publiziert (Millard *et al.* 1996, Vemuri *et al.* 2002b, Sánchez *et al.* 2005, Lin *et al.* 2005b, Okino *et al.* 2008). Limitierend für eine industrielle Umsetzung einer Succinatproduktion mit *E. coli* bleibt die Empfindlichkeit dieses Mikroorganismus gegenüber organischen Säuren und die geringe Osmotoleranz (Warnecke und Gill 2005, Luli und Strohl 1990, Zeikus *et al.* 1999). Aus wirtschaftlichen Gründen soll die Produktion der Bulkchemikalie Bernsteinsäure bei niedrigen pH erfolgen, um das Kontaminationsrisiko zu vermindern und Kostensenkungen durch die Möglichkeit der direkten Aufarbeitung der undissoziierten Säure aus der Fermentationsbrühe und durch Einsparungen beim Titrationsmittel zu erzielen (Patel 2006, Werpy und Petersen 2004). Weder *E. coli* noch bei *C. glutamicum* sind ausreichend tolerant gegenüber einem niedrigen pH (Luli und Strohl 1990, Follmann *et al.* 2009).

Im Rahmen dieses Vorhabens wurde die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ausgewählt, um deren Potential für die Herstellung von Bernsteinsäure auszuloten. Der Eukaryont *S. cerevisiae* ist ein industriell etablierter, robuster Produktionsorganismus in der Weißen Biotechnologie und wird beispielsweise seit vielen Jahrzehnten zur Herstellung von

Bioethanol industriell eingesetzt. Prozesstechnisch vorteilhaft sind die hohe pH- und Osmotoleranz, die guten Wachstumseigenschaften, das breite Substratspektrum und die relative Unempfindlichkeit gegenüber organischen Säuren (Nevoigt 2008). Außerdem sind sämtliche Werkzeuge zur genetischen Optimierung etabliert und das Genom ist vollständig sequenziert. Daher ist *Saccharomyces cerevisiae* ein attraktiver Kandidat zur Entwicklung neuer biotechnologischer Prozesse zur Herstellung von Basischemikalien wie Succinat (Hansen und Kielland-Brandt 1996, Ostergaard *et al.* 2000b, Abbott *et al.* 2009).

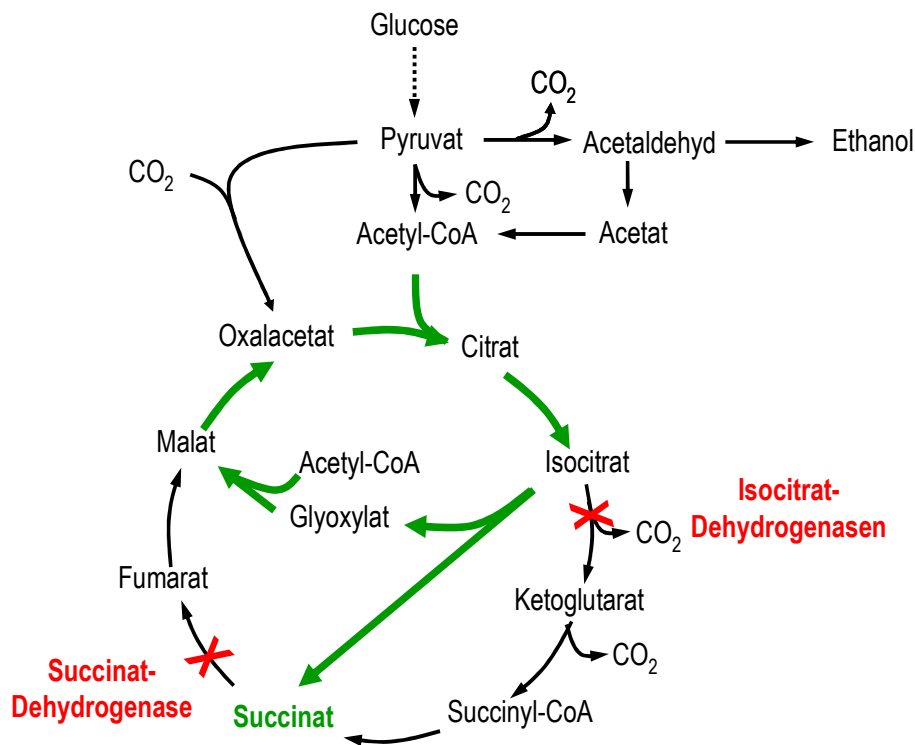


Abbildung 2.1: Zentraler Kohlenstoffmetabolismus von *S. cerevisiae* mit den geplanten Modifikationen zur Erzielung einer oxidativen Succinatbildung. Die auszuschaltenden Enzymaktivitäten sind durch rote Kreuze und die zu deregulierenden Enzymaktivitäten durch grüne Pfeile gekennzeichnet.

In Abbildung 2.1 ist das verfolgte Konzept zur oxidativen Produktion von Succinat über den Glyoxylat-Zyklus auf Basis des Rohstoffs Glucose dargestellt. Durch die Stammentwicklung soll die Verstoffwechslung von Succinat blockiert werden, sowie eine Umlenkung des Kohlenstoffflusses aus dem Citrat-Zyklus in den Glyoxylat-Zyklus erfolgen.

Dies erfordert die gentechnische Repression oder Ausschaltung der Succinat- und Isocitrat-Dehydrogenase-Aktivität. Zudem müssen die Kernenzyme des Glyoxylat-Zyklus dereguliert werden, da diese in Anwesenheit von Glucose transkriptionell stark reprimiert sind (DeRisi *et al.* 1997). Die schrittweise molekularbiologische Umsetzung dieser Strategie erfolgte bei der ORGANOBALANCE GmbH (Berlin).

Die Entwicklung von biotechnologischen Produktionsprozessen für industrielle Anwendungen erfolgt in drei ineinander greifenden Stufen (Weuster-Botz 1999). Als erster Schritt erfolgt die Entwicklung eines geeigneten Biokatalysators, sowie dessen Charakterisierung und Weiterentwicklung (Primärauswahl). In den nächsten beiden Schritten erfolgt die Bioprozessentwicklung im Labormaßstab (Sekundärauswahl) und anschließend der Übergang in den großtechnischen Produktionsmaßstab (Maßstabsvergrößerung).

Um Probleme bei der Maßstabsvergrößerung zu umgehen, sollte ein Biokatalysator bereits während der Phase der Primärauswahl unter technischen Bedingungen, das heißt unter Kontrolle wichtiger physiologischer Größen wie pH und  $pO_2$  und vergleichbaren Leistungseintrag und lokaler Energiedissipation wie im großtechnischen Maßstab, charakterisiert und optimiert werden.

Im Zuge dieser Arbeit sollen daher alle *S. cerevisiae* Stämme, die im Laufe der iterativen Stammentwicklung konstruiert werden, unter technischen Reaktionsbedingungen bezüglich Wachstum, Substrataufnahme- sowie Produktionsbildungsraten und Ausbeuten charakterisiert werden, um eine grundlegende Basis für eine Stamm- und Prozessentwicklung zur biotechnologischen Herstellung von Bernsteinsäure mit *S. cerevisiae* zu legen. Für Satzexperimente soll ein automatisiertes Bioreaktorsystem im Milliliter-Maßstab genutzt werden. Ergänzend sollen Zulaufversuche in einem Laborbioreaktor im Liter-Maßstab erfolgen. Folgende Arbeitspakete sollen für die reaktionstechnische Charakterisierung von einzelnen rekombinanten *S. cerevisiae* Stämmen bearbeitet werden:

- *S. cerevisiae* Basisstammes AH22ura3
  - Bestimmung von reaktionstechnischen Daten des Basisstammes
  - Bestimmung der Toleranz gegenüber Bernsteinsäure
  
- *S. cerevisiae* Stämme mit gentechnischen Modifikationen zur Unterbrechung des Citrat-Zyklus
  - Charakterisierung von Succinat-Dehydrogenase-Deletionsstämmen
  - Charakterisierung von Stämmen mit Blockade der Succinat- und Isocitrat-Dehydrogenase-Aktivität
  
- *S. cerevisiae* Stämme mit gentechnischen Modifikationen zur Umlenkung des Kohlenstoffflusses in den Glyoxylat-Zyklus
  - Charakterisierung von Deletionsstämmen mit Überexpression von Schlüsselenzymen des Glyoxylat-Zyklus
  - Charakterisierung von Stämmen mit Überexpression eines transkriptionellen Regulationsfaktors

Bei jedem der Arbeitspakete soll jeweils auf Basis der prozesstechnische Untersuchung der rekombinanten *S. cerevisiae* Stämme eine Betrachtung und Bewertung der eingeführten gentechnischen Modifikationen aus biochemischer und prozesstechnischer Sicht, sowie die Auswahl vielversprechender rekombinanter Stämme für die weitere Stammentwicklung erfolgen.

Abschließend soll die Stammentwicklung im Eukaryonten *S. cerevisiae* mit einem äquivalenten prokaryontischen Ansatz verglichen werden und es sollen Vorschläge für die weitere Stammentwicklung erfolgen.

## 3 Theoretische Grundlagen

Dieses Kapitel gibt einen Überblick über die Reaktionstechnik mikrobieller Prozesse und den Zentralstoffwechsel von *S. cerevisiae*. Der letzte Teil beschäftigt sich mit der organischen Säure Bernsteinsäure und stellt insbesondere die bislang veröffentlichten Konzepte zur mikrobiellen Succinatproduktion vor.

### 3.1 Kultivierung von Mikroorganismen

Biotechnologische Prozesse lassen sich durch mathematische Modelle, die auf der Kopplung von Massenbilanzen und formalkinetischen Ansätzen beruhen, beschreiben.

#### 3.1.1 Mikrobielles Wachstum

Medien zur Anzucht eines heterotrophen Mikroorganismus müssen organische Kohlenstoffverbindungen, organisch oder anorganisch Stickstoffverbindungen, Mineralsalze sowie Spurenelemente enthalten. Es wird zwischen definierten Mineralmedien, deren chemische Zusammensetzung sowohl qualitativ als auch quantitativ bekannt ist und Komplexmedien, die undefinierte Zusätze wie Hefeextrakt oder Pepton enthalten, unterschieden. Zudem erfolgt häufig der Zusatz weiterer Wuchsstoffe (Vitamine, Nukleotide, Aminosäuren,...). Mikroorganismen, die zum Wachstum keiner Wuchsstoffe bedürfen, werden als prototroph bezeichnet. Mikroorganismen, die den Zusatz eines oder mehrerer bestimmter Wuchsstoffe benötigen, werden als auxotroph für diese Substanz(en) bezeichnet.

#### Wachstumsphasen

Für das Wachstum von Mikroorganismen im Satzverfahren unter nicht limitierenden, jedoch begrenzten Nährstoffbedingungen ergibt sich eine typische Wachstumskurve (Abbildung 3.1). Nach der Adaption der Zellen an die neuen Bedingungen (Verzögerungsphase) beginnt in der Übergangsphase I das Wachstum mit ansteigender Wachstumsrate. In der anschließenden exponentiellen Wachstumsphase ist keine für das Wachstum benötigte Medienkomponente limitierend und es erfolgt ein exponentielles Wachstum mit der konstanten, maximalen Wachstumsrate  $\mu_{\max}$ . Werden ein oder mehrere Medienbestandteile limitierend, verlangsamt sich die Biomassezunahme (Substratlimitierungsphase).



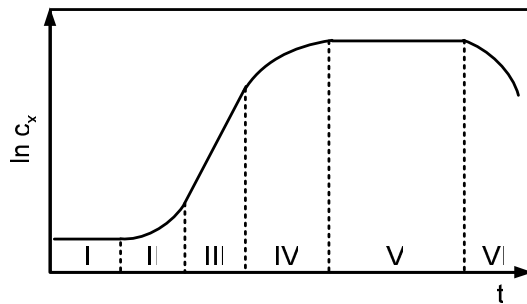


Abbildung 3.1: Wachstumskurve von Mikroorganismen im Satzverfahren unter nicht limitierenden, aber begrenzten Nährstoffbedingungen. I: Verzögerungsphase, II: Übergangsphase I, III: exponentielle Phase, IV: Übergangsphase II (auch als Substratlimitierungsphase bezeichnet), V: stationäre Phase, VI: Absterbephase

Nach der Substratlimitierungsphase wird die stationäre Phase erreicht, in der sich das Wachstum und das Absterben der Zellen ausgleichen. Die Absterbephase beginnt, wenn die Absterberate die Wachstumsrate übersteigt. Die Definition der Wachstumsrate lautet:

$$\mu \equiv \frac{1}{c_x} \cdot \frac{dc_x}{dt} \quad \text{Gleichung 3.1}$$

mit  $\mu$  spezifische Wachstumsrate,  $\text{h}^{-1}$   
 $c_x$  Biomassekonzentration,  $\text{g L}^{-1}$   
 $t$  Zeit, h

### Formalkinetische Beschreibung des Wachstums nach Monod

Die Wachstumsrate  $\mu$  während der exponentiellen Wachstums- und der Substratlimitierungsphase (Phase III und IV) kann durch einen formalkinetischen Ansatz nach Monod als Funktion der Konzentration des limitierenden Substrats  $c_s$  beschrieben werden.

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_s}{K_s + c_s} \quad \text{Gleichung 3.2}$$

mit  $\mu_{\max}$  maximale Wachstumsrate unter nicht limitierenden Bedingungen,  $\text{h}^{-1}$   
 $c_s$  Konzentration des limitierenden Substrats,  $\text{g L}^{-1}$   
 $K_s$  Sättigungskonstante des limitierenden Substrats,  $\text{g L}^{-1}$

Die Sättigungskonzentration  $K_S$  hat den Wert der Substratkonzentration, bei der die Wachstumsrate  $\mu$  der Hälfte der maximalen Wachstumsrate  $\mu_{\max}$  entspricht. Die spezifische Substrataufnahmerate  $q_S$  und die spezifische Produktbildungsrate  $q_P$  können analog zur Wachstumsrate  $\mu$  definiert werden:

$$q_S \equiv \frac{1}{c_X} \cdot \frac{dc_S}{dt} \quad \text{Gleichung 3.3}$$

$$q_P \equiv \frac{1}{c_X} \cdot \frac{dc_P}{dt} \quad \text{Gleichung 3.4}$$

mit  $c_P$  Konzentration des Produkts,  $\text{g L}^{-1}$

Die spezifische Substrataufnahmerate setzt sich aus der Substrataufnahme für die Biomassebildung  $q_{S,\mu}$ , für die Produktbildung  $q_{S,P}$  und für den Erhaltungsstoffwechsel  $q_{S,m}$  zusammen.

$$q_S = q_{S,\mu} + q_{S,m} + q_{S,P} \quad \text{Gleichung 3.5}$$

Mit dem Begriff Erhaltungsstoffwechsel werden grundlegende, überlebenswichtige Reaktionen der Zellen zusammengefasst, die nicht zur Bildung von Biomasse oder Produkt führen. Die Substrataufnahme für den Erhaltungsstoffwechsel kann durch eine Konstante beschrieben werden.

Über die Formalkinetik können auch differentielle Ausbeutekoeffizienten definiert werden:

$$Y_{X/S}^* \equiv \frac{\mu}{q_{S,\mu}} = \frac{dc_X / dt}{dc_S / dt} = \frac{dc_X}{dc_S} \quad \text{Gleichung 3.6}$$

$$Y_{P/S}^* \equiv \frac{q_P}{q_{S,P}} = \frac{dc_P / dt}{dc_S / dt} = \frac{dc_P}{dc_S} \quad \text{Gleichung 3.7}$$

mit  $Y_{X/S}^*$  Ertragskoeffizient für die Biomassebildung aus Substrat,  $\text{g}_{\text{BTM}} \text{g}^{-1}$

$Y_{P/S}^*$  Ertragskoeffizient für die Produktbildung aus Substrat,  $\text{g g}^{-1}$

Durch die Erweiterung der Gleichung 3.5 für die spezifische Substrataufnahmerate um die Ausbeutekoeffizienten und die Konstante für die Substrataufnahme des Erhaltungsstoffwechsels  $m_S$  ergibt sich:

$$q_S = \frac{\mu}{Y_{X/S}^*} + m_S + \frac{q_P}{Y_{P/S}^*} \quad \text{Gleichung 3.8}$$

mit  $m_S$  konstante Substrataufnahme für den Erhaltungsstoffwechsel,  $g \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$

Wird nur der Erhaltungsstoffwechsel aber keine Produktbildung berücksichtigt, ergeben sich folgende Gleichungen für die Wachstumsrate und Substrataufnahmerate:

$$\mu \equiv \mu_{\max} \cdot \frac{c_S}{K_S + c_S} - m_S \cdot Y_{X/S}^* \quad \text{Gleichung 3.9}$$

$$q_S = \frac{\mu}{Y_{X/S}^*} + m_S \quad \text{Gleichung 3.10}$$

Neben differentiellen Ausbeutekoeffizienten werden häufig integrale Ausbeuten biotechnologischer Prozesse berechnet. Hierbei wird die ab dem Start des Prozesses ( $t_0$ ) bis zu einem bestimmten Prozesszeitpunkt ( $t$ ) entstandene Biomasse- oder Produktkonzentration auf die in diesem Zeitraum verbrauchte Substratkonzentration bezogen.

$$Y_{X/S} = - \frac{\Delta c_X \Big|_{t_0}^t}{\Delta c_S \Big|_{t_0}^t} \quad \text{Gleichung 3.11}$$

$$Y_{P/S} = - \frac{\Delta c_P \Big|_{t_0}^t}{\Delta c_S \Big|_{t_0}^t} \quad \text{Gleichung 3.12}$$

### 3.1.2 Massenbilanz des idealen Rührkesselreaktors

Bei einem idealen Rührkesselreaktor wird angenommen, dass auf Grund des Rührens eine vollständige Durchmischung des Reaktors erzielt wird und somit räumlich konstante (isotrope) Bedingungen bezüglich der Prozessvariablen (Konzentrationen, physikalischen Eigenschaften des Reaktionsmediums, Reaktionsgeschwindigkeiten) erreicht werden. Die Prozessvariablen ändern sich hingegen zeitlich, abhängig von der Betriebsweise des idealen Reaktors, dem Verbrauch von Substraten, dem Wachstum und der Bildung von Produkten. Die Massenbilanz des idealen Rührkesselreaktors kann wie folgt berechnet werden:

$$\frac{d(c_i \cdot V_R)}{dt} = \dot{V}_{ein} \cdot c_{i,ein} - \dot{V}_{aus} \cdot c_{i,aus} + q_i \cdot c_x \cdot V_R \quad \text{Gleichung 3.13}$$

mit	$V_R$	Reaktorvolumen, L
	$\dot{V}_{ein}$	Volumenstrom in den Reaktor, L h <sup>-1</sup>
	$\dot{V}_{aus}$	Volumenstrom aus dem Reaktor, L h <sup>-1</sup>
	$c_{i,ein}$	Konzentration der Komponente i im Zulauf, g L <sup>-1</sup>
	$c_{i,aus}$	Konzentration der Komponente i im Ablauf, g L <sup>-1</sup>
	$q_i$	spezifische Aufnahme- oder Bildungsrate der Komponente i, g g <sub>BTM</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>

Da auch der Massenstrom in und aus den Zellen der Massenerhaltung unterliegt, müssen sich durch die Zellen umgesetzte Substrate in den Produkten wiederfinden lassen. Die Kohlenstoffbilanz wird über die spezifischen Aufnahme- und Bildungsraten von n Substraten und m Produkten formuliert:

$$\mu + \sum_{i=1}^m h_{P,i} \cdot q_{P,i} - \sum_{i=1}^n h_{S,i} \cdot q_{S,i} = 0 \quad \text{Gleichung 3.14}$$

mit	$h_{P,i}$	Kohlenstoffgehalt von Produkt i, mol <sub>C</sub> mol <sup>-1</sup>
	$h_{S,i}$	Kohlenstoffgehalt von Substrat i, mol <sub>C</sub> mol <sup>-1</sup>

### 3.1.3 Satzverfahren

Bei Satzkultivierungen werden nach Vorlage des Mediums und Beimpfen des Reaktors keine weiteren Medien bzw. Substrate zugeführt. Es erfolgt lediglich die Zugabe von Titrations- und Antischaummitteln, deren Einfluss auf das Reaktorvolumen vernachlässigbar ist, sodass das Reaktorvolumen konstant bleibt. Bei aeroben Prozessen muss auf Grund der schlechten Löslichkeit von Sauerstoff in wässrigen Medien (zwischen 6 - 8 mg L<sup>-1</sup>) zudem eine kontinuierliche Zufuhr an Sauerstoff bzw. Luft erfolgen (Schumpe *et al.* 1982, Schumpe 1993). Beim Satzverfahren handelt es sich um eine instationäre Betriebsweise, da es während der Reaktion zu einer zeitlichen Änderung der Edukt- und der Produktkonzentrationen kommt.

Für das Satzverfahren gelten die in Kapitel 3.1.1 dargestellten formalkinetischen Gleichungen und die Massenbilanz des idealen Rührkesselreaktors (Gleichung 3.13) vereinfacht sich zu:

$$\frac{dc_i}{dt} = q_i \cdot c_x \quad \text{Gleichung 3.15}$$

Für den Verlauf der Biomassekonzentration bzw. der Substratkonzentration über die Zeit in der exponentielle Wachstumsphase ergibt sich:

$$c_x(t) = c_{X,0} \cdot e^{\mu_{\max} \cdot t} \quad \text{Gleichung 3.16}$$

$$c_S(t) = c_{S,0} - \frac{c_{X,0}}{Y_{X/S}^*} \cdot (e^{\mu_{\max} \cdot t} - 1) \quad \text{Gleichung 3.17}$$

mit  $c_{X,0}$  Biomassekonzentration zu Beginn der exponentiellen Phase, g L<sup>-1</sup>

$c_{S,0}$  Substratkonzentration zu Beginn der exponentiellen Phase, g L<sup>-1</sup>

In aeroben Prozessen zählt auch Sauerstoff zu den Substraten und es gelten die Gleichungen für die spezifische Substrataufnahmerate (Gleichung 3.3) und die Ertragskoeffizienten (Gleichung 3.6). Da Sauerstoff über die Begasung kontinuierlich zugeführt wird, ergibt sich bei einem idealen Rührkesselreaktor im Satzverfahren (konstantes Reaktorvolumen) folgende Bilanz:

$$\frac{dc_{O_2}}{dt} = OTR - OUR = k_L a \cdot (c_{O_2}^* - c_{O_2}) - \frac{\mu}{Y_{X/O}^*} \cdot c_x \quad \text{Gleichung 3.18}$$

mit  $OTR$  Sauerstofftransferrate (oxygen transfer rate), g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>

$OUR$  Sauerstoffaufnahmerate (oxygen uptake rate), g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>

$k_L a$  volumetrischer Stoffübergangskoeffizient für Sauerstoff, s<sup>-1</sup>

$c_{O_2}^*$  Sättigungskonzentration von Sauerstoff im Medium, g L<sup>-1</sup>

$c_{O_2}$  Sauerstoffkonzentration im Medium, g L<sup>-1</sup>

$Y_{X/O}^*$  Ertragskoeffizient Biotrockenmasse aus Sauerstoff g<sub>BTM</sub> g<sup>-1</sup>

Ist die Sauerstoffkonzentration im Medium konstant, so entspricht der Sauerstoffeintrag (OTR) dem Sauerstoffverbrauch der Zellen (OUR). Über die Massenerhaltung des Inertgasanteils der zur Begasung eingesetzten Luft kann daher die Sauerstoffaufnahmerate der Zellen über Bilanzierung des Sauerstoffs im Prozessgas bestimmt werden.

$$OUR = \frac{V_{Gas, ein} \cdot \gamma_{O_2, ein} - V_{Gas, aus} \cdot \gamma_{O_2, aus}}{V_R \cdot V_M} \quad \text{Gleichung 3.19}$$

mit  $V_{Gas, ein}$  Zulaufstrom in den Reaktor, L h<sup>-1</sup>

$V_{Gas, aus}$  Abluftstrom aus dem Reaktor, L h<sup>-1</sup>

$\gamma_{O_2, ein}$  Stoffmengenanteile des Sauerstoffs in der Zuluft, %  
(20,95 % bei Begasung mit Luft)

$\gamma_{O_2, aus}$  Stoffmengenanteile des Sauerstoffs in der Abluft, %

$V_M$  Molvolumen idealer Gase, L mol<sup>-1</sup>  
(22,414 L mol<sup>-1</sup>)

Da Zu- und Abluftstrom als gleich angenommen werden können, vereinfacht sich Gleichung 3.19 zu:

$$OUR = \frac{V_{Gas, ein} \cdot (\gamma_{O_2, ein} - \gamma_{O_2, aus})}{V_R \cdot V_M} \quad \text{Gleichung 3.20}$$

Bei aeroben Prozessen entsteht als gasförmiges Produkt Kohlendioxid. Die Kohlendioxidbildungsrate (CER: carbon evolution rate) kann analog zur Sauerstoffaufnahme berechnet werden.

$$CER = \frac{V_{Gas, ein} \cdot (\gamma_{CO_2, ein} - \gamma_{CO_2, aus})}{V_R \cdot V_M} \quad \text{Gleichung 3.21}$$

mit  $\gamma_{CO_2, ein}$  Stoffmengenanteile des Kohlendioxids in der Zuluft, %  
(0 % bei Begasung mit Luft)

$\gamma_{CO_2, aus}$  Stoffmengenanteile des Kohlendioxids in der Abluft, %

Das molare Verhältnis von Kohlendioxidbildungsrate zu Sauerstoffaufnahme wird als Respiratorischer Koeffizient (RQ) bezeichnet.

$$RQ \equiv \frac{CER}{OUR} = \frac{\gamma_{CO_2, aus}}{\gamma_{O_2, ein} - \gamma_{O_2, aus}} \quad \text{Gleichung 3.22}$$

### 3.1.4 Zulaufverfahren

Beim Zulaufverfahren handelt es sich wie beim Satzverfahren um eine instationäre Betriebsweise, bei der dem Reaktor kontinuierlich ein oder mehrere Substrate zugeführt werden. Die Zufuhr kann nach Profilen oder durch Prozessparameter geregelt erfolgen. Durch die kontinuierliche Nachdosierung von Substrat im Zulaufverfahren kann die Substratkonzentrationen im Medium gering gehalten werden und somit Effekte wie ein Auftreten von Überschussmetabolismus oder eine Inhibierung des Wachstums oder der Produktbildung durch Substrate vermieden werden.

Die Formalkinetiken können auch im Zulaufverfahren angewendet werden, allerdings muss die Zunahme im Reaktorvolumen durch die kontinuierliche Substratzufuhr berücksichtigt werden. Die Bilanzen für Zellwachstum und Substrataufnahme im Zulaufverfahren ergeben sich zu:

$$\frac{dc_X}{dt} = -\frac{V_{ein}}{V_R} \cdot c_X + c_X \cdot \mu \quad \text{Gleichung 3.23}$$

$$\frac{dc_S}{dt} = \frac{V_{ein}}{V_R} \cdot (c_{S,ein} - c_S) - c_X \cdot q_S \quad \text{Gleichung 3.24}$$

Die Berechnung der Sauerstoffaufnahme- und der Kohlendioxidbildungsrate im Zulaufverfahren kann nach Gleichung 3.20 und Gleichung 3.21 erfolgen, wenn das Reaktorvolumen zum jeweiligen Zeitpunkt bekannt ist.

Sind die Volumenzunahme durch den Zulauf, der Erhaltungsstoffwechsel sowie die Substratkonzentration im Reaktor gegenüber der Substratkonzentration im Zulaufmedium vernachlässigbar, kann die benötigte exponentielle Dosierrate für eine konstante Wachstumsrate  $\mu_{opt}$  während des Zulaufs nach Gleichung 3.25 berechnet werden:

$$V_{ein} \cong \frac{V_R}{c_{S,ein}} \cdot c_{X0} \cdot e^{\mu_{opt} \cdot t} \cdot \frac{\mu_{opt}}{Y_{X/S}^*} \quad \text{Gleichung 3.25}$$

Exponentielles Wachstum während der Zulaufphase kann nur aufrechterhalten werden, solange keine weiteren Substrate im Medium limitierend werden und keine Produktinhibierung auftritt. In aeroben Prozessen ist der Sauerstoffeintrag häufig die limitierende Größe. In der Praxis werden daher oft konstante oder lineare ansteigende Zudosierprofile genutzt, bei denen die Wachstumsrate in der Zulaufphase kontinuierlich absinkt.

### 3.2 Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist ein einzelliger sich durch Knospung vermehrender Eukaryont. Es handelt sich um einen heterotrophen, fakultativ anaeroben Mikroorganismus mit einem breiten Substratspektrum. Verwertet werden Hexosen (zum Beispiel Glucose, Fructose oder Galactose), Pentosen (zum Beispiel Xylulose), Disaccharide und Oligosaccharide, Glycerin, Alkohole (zum Beispiel Ethanol), organische Säuren (zum Beispiel Acetat oder Lactat) und Fettsäuren (Barnett 1997, Walker 1998).

Bereits seit mehreren tausend Jahren wurde *S. cerevisiae* zur Herstellung der alkoholischen Getränke Bier, Wein und Sake und bei der Brotherstellung zum Teigtrieb eingesetzt. Heute werden in der Ernährungsindustrie jährlich mehrere Millionen Tonnen als Back- und Brauhefe oder zur Gewinnung von Hefeextrakt als Würz- oder Nahrungsergänzungsmittel produziert (Kurtzman 1998). Auf Grund ihrer Verwendung in traditionellen Prozessen im Lebensmittelbereich, wurde *S. cerevisiae* von der U.S. Food and Drug Administration der GRAS-Status (GRAS: Generally Recognized As Safe) verliehen, das heißt *S. cerevisiae* wurde als unbedenklich für den Einsatz im Lebensmittelsektor eingestuft.

*S. cerevisiae* stand bereits seit dem 19. Jahrhundert im Focus wissenschaftlicher Studien und zählt heute zu den bestuntersuchteten eukaryontischen Mikroorganismen, sowohl hinsichtlich der Physiologie und Biochemie als auch der Prozesstechnik. Es sind umfassende Werkzeuge zur genetischen Modifizierung von *S. cerevisiae* etabliert und seit 1996 ist das Genom sequenziert (Goffeau *et al.* 1996). Neben dem Einsatz in Lebensmittelprozessen wird *S. cerevisiae* heute auch für vielfältige andere biotechnologische Prozesse eingesetzt. Hierzu zählt die seit Jahrzehnten etablierte großtechnische Herstellung von "Bio"-Ethanol als Treibstoff, Lösungsmittel und Grundstoff für weitere Synthesen in der chemischen Industrie aus nachwachsenden, kostengünstigen Rohstoffen wie Mais- und Getreidestärke sowie Zuckerrohr- oder Zuckerrüben-Melasse (Otero *et al.* 2007, Octave und Thomas 2009). Zudem werden rekombinante *S. cerevisiae* Stämme zur industriellen heterologen Proteinexpression eingesetzt. Beispielsweise werden die pharmazeutischen Proteine Insulin, Glucagon, Hirudin und das Hepatitis-B-Oberflächenantigen mit *S. cerevisiae* produziert (Schmidt 2004).

Prozesstechnisch vorteilhaft sind die guten Wachstumseigenschaften, das breite Substratspektrum, der geringe Nährstoffbedarf, die hohe Osmo- und pH-Toleranz und die relative Unempfindlichkeit gegenüber Alkoholen und organischen Säuren (Nevoigt 2008). So ändert sich beispielsweise die Wachstumsrate von *S. cerevisiae* zwischen pH 3,5 und pH 7,5 um weniger als 5 % (Barnett 1997). *S. cerevisiae* kann bei einem extrazellulären pH zwischen pH 3 - pH 8 den intrazellulären pH zwischen pH 5,75 und 6,75 halten (Imai und Ohno 1995). Auf Grund dieser exzellenten pH-Toleranz können Hefeprozesse zur Verminderung des Kontaminationsrisikos im sauren pH-Bereich betrieben werden.



Tabelle 3.1: Toleranz von *S. cerevisiae* gegenüber hohen Zucker- und Ethanolkonzentrationen sowie organischen Säuren

Substanz	pK <sub>s</sub> , -	Maximale Konzentration, g L <sup>-1</sup>	Quelle
Glucose	-	> 250	Ciriacy und Reifenberger 1997
Ethanol	-	< 150	Pascual <i>et al.</i> 1988
Essigsäure	4,76	10 (pH 4,5)	Thomas <i>et al.</i> 2002
Milchsäure	3,87	50 (pH 4,5)	Thomas <i>et al.</i> 2002

Tabelle 3.1 gibt einen Überblick zur Toleranz von *S. cerevisiae* gegenüber Zuckerkonzentrationen, Ethanol und organischen Säuren. Zur Toleranz von *S. cerevisiae* gegenüber Bernsteinsäure sind keine Daten verfügbar.

Die Toleranz gegenüber schwachen organischen Säuren nimmt, wenn der pH des Mediums unterhalb des intrazellulären pH liegt, ab. Ein niedriger pH im Medium erhöht die Konzentration der undissoziierten Form der organischen Säure. Da die undissoziierte Form der organischen Säure ungeladen ist, kann sie über die Zellmembran diffundieren und die intrazelluläre Säurekonzentration erhöhen. In der Zelle dissoziiert die organische Säure auf Grund des höheren intrazellulären pH und säuert das Cytoplasma durch die freigesetzten Protonen an. Durch die Dissoziation der Säure zum korrespondierenden Anion entsteht ein Gradient bezüglich der undissoziierten Säure, der das weitere Einströmen fördert, was zu einer massiven Akkumulation von dissoziierter Säure und Protonen in der Zelle führt (Narendranath *et al.* 2001, Thomas *et al.* 2002). Als Folge muss die Zelle Protonen unter Energieverbrauch in Form von ATP in das Medium exportieren. Daher führen bereits subletale Konzentrationen an organischen Säuren zu einer verminderten Biomasseausbeute (Pons *et al.* 1996, Pampulha und Loureiro-Dias 2000, Abbott *et al.* 2007). Zu berücksichtigen ist, dass auch die Kultivierungsbedingungen (zum Beispiel Nährstoffverfügbarkeit) und stammabhängige Unterschiede die Säure- und Alkoholtoleranz beeinflussen können (Walker 1998, Thomas *et al.* 2002).

### 3.3 Zentraler Kohlenstoffmetabolismus von *Saccharomyces cerevisiae*

In heterotrophen Mikroorganismen wie *S. cerevisiae* sind Energie- und Kohlenstoffmetabolismus eng miteinander verknüpft, da die als Substrate genutzten organischen Verbindungen einerseits zur Energiegewinnung abgebaut werden (Katabolismus) und zum anderen als Kohlenstoffquellen für die Biosynthese dienen (Anabolismus).

#### 3.3.1 Regulation des Zentralstoffwechsels durch Glucose

*S. cerevisiae* kann eine Vielzahl von Kohlenstoffquellen zum Wachstum nutzen. Dabei werden abhängig von der verfügbaren Kohlenstoffquelle verschiedene Enzyme und Stoffwechselwege genutzt und die Zellen können ihre Genexpressionsmuster stark rekonfigurieren, um sich optimal an eine geänderte Nährstoffverfügbarkeit anzupassen.

Wenn Glucose im Medium vorhanden ist, erfolgt über verschiedene Signalkaskaden eine Hemmung der Transkription der Gene für die Nutzung alternativer Kohlenstoffquellen. Dieser Effekt wird als Katabolitrepression oder Glucoserepression bezeichnet und betrifft unter anderem die Enzyme der Gluconeogenese, des Glyoxylat-Zyklus, des Citrat-Zyklus und der Atmungskette (Duntze *et al.* 1969, Entian und Schüller 1997, Gancedo 1998). Zudem unterliegen einige Enzyme wie zum Beispiel Schlüsselenzyme der Gluconeogenese der so genannten Katabolitinaktivierung, das heißt sie werden durch Glucose induzierte Signalkaskaden zunächst phosphoryliert und anschließend in der Vakuole proteolytisch abgebaut (Duntze *et al.* 1969, Gancedo und Gancedo 1997, Gancedo 1998).

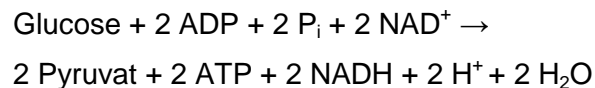
Glucoserepression und Katabolitinaktivierung werden durch ein komplexes und noch nicht vollständig aufgeklärtes Zusammenspiel einer Vielzahl von transkriptionell aktivierenden oder reprimierenden Regulationsfaktoren gesteuert. Zu diesen regulatorischen Proteinen zählen beispielsweise *SNF1*, *SNF4*, *MIG1*, *HAP4* und *TUP1* (Gancedo 1998).

#### 3.3.2 Crabtree-Effekt

Bei *S. cerevisiae* sind aerobe Kultivierungsbedingungen nicht ausreichend, um einen respirativen Zuckerabbau zu erzielen. Stattdessen zeigt *S. cerevisiae* unter aeroben Bedingungen einen respiro-fermentativen Metabolismus, wenn eine kritische Glucosekonzentration im Medium, die in der Literatur mit 50 - 150 mg L<sup>-1</sup> angegeben wird, überschritten wird (Aiba *et al.* 1976, Verduyn *et al.* 1983, Pons *et al.* 1996). Dies wird als Crabtree-Effekt bezeichnet und auf eine unzureichende Kapazität der respirativen Wege zum Pyruvatabbau zurückgeführt (Gancedo und Serrano 1989, Pronk *et al.* 1996).

### 3.3.3 Glycolyse und Pentosephosphat-Weg

Der Abbau von Zuckern zu Pyruvat über die Glycolyse oder den Pentosephosphatweg erfolgt im Cytosol. Nach Aufnahme von Glucose in die Zelle erfolgt der Abbau über Glucose-6-Phosphat als Intermediat zu 80 % über die Glycolyse (Embden-Meyerhof-Weg) zu Pyruvat, wobei Energie in Form von ATP (Substratkettenphosphorylierung) und NADH gewonnen wird (Fraenkel 1982):



Auch alternative Zucker werden über die Glycolyse abgebaut. Beispielsweise wird Galactose über Glucose-6-Phosphat in die Glycolyse eingeschleust. Alternativ zur Glycolyse können über den Pentosephosphat-Weg (Hexosemonophosphat-Weg) NADPH und Ribose-5-Phosphat als Vorstufen für anabole Prozesse der Zelle gewonnen werden.

### 3.3.4 Wege zum Abbau von Pyruvat: Respiration und Fermentation

Pyruvat bildet im Kohlenstoffmetabolismus von *S. cerevisiae* einen zentralen Knotenpunkt sowohl zwischen assimilatorischen und dissimilatorischen Reaktionen als auch zwischen der Veratmung und Vergärung von Zuckern (Abbildung 3.2). Pyruvat wird unter anaeroben Bedingungen über die alkoholische Gärung zu Ethanol reduziert, um das in der Glycolyse gebildete NADH zu regenerieren oder kann unter aeroben Bedingungen über das Zwischenprodukt Acetyl-CoA im Citrat-Zyklus zu Kohlendioxid oxidiert werden.

Unter aeroben Bedingungen kommt es beim Überschreiten der kritischen Glucosekonzentration auf Grund des Crabtree-Effekts zu einem respiro-fermentativen Metabolismus. Als Folge zeigt *S. cerevisiae* in Satzkultivierungen mit Glucose ein diauxisches Wachstum. In der ersten Phase wird Glucose respiro-fermentativ hauptsächlich zu Ethanol und Kohlendioxid bei nur geringer Biomassebildung umgesetzt. In der zweiten Phase wird das Ethanol bei deutlicher Biomassezunahme wieder verbraucht. Durch den Crabtree-Effekt beträgt die integrale Biomasseausbeute mit Glucose zunächst nur  $0,15 \text{ g}_{\text{Biomasse}} \text{ g}_{\text{Glucose}}^{-1}$ . Durch den anschließenden Ethanolverbrauch steigt die integrale Ausbeute auf  $0,4 \text{ g}_{\text{Biomasse}} \text{ g}_{\text{Glucose}}^{-1}$ . Nur bei Vermeidung des Crabtree-Effekts durch Zulaufbedingungen oder kontinuierliche Prozessführung kann eine Ausbeute von etwa  $0,5 \text{ g}_{\text{Biomasse}} \text{ g}_{\text{Glucose}}^{-1}$  erzielt werden (Mendoza-Vega *et al.* 1994, Pronk *et al.* 1996).

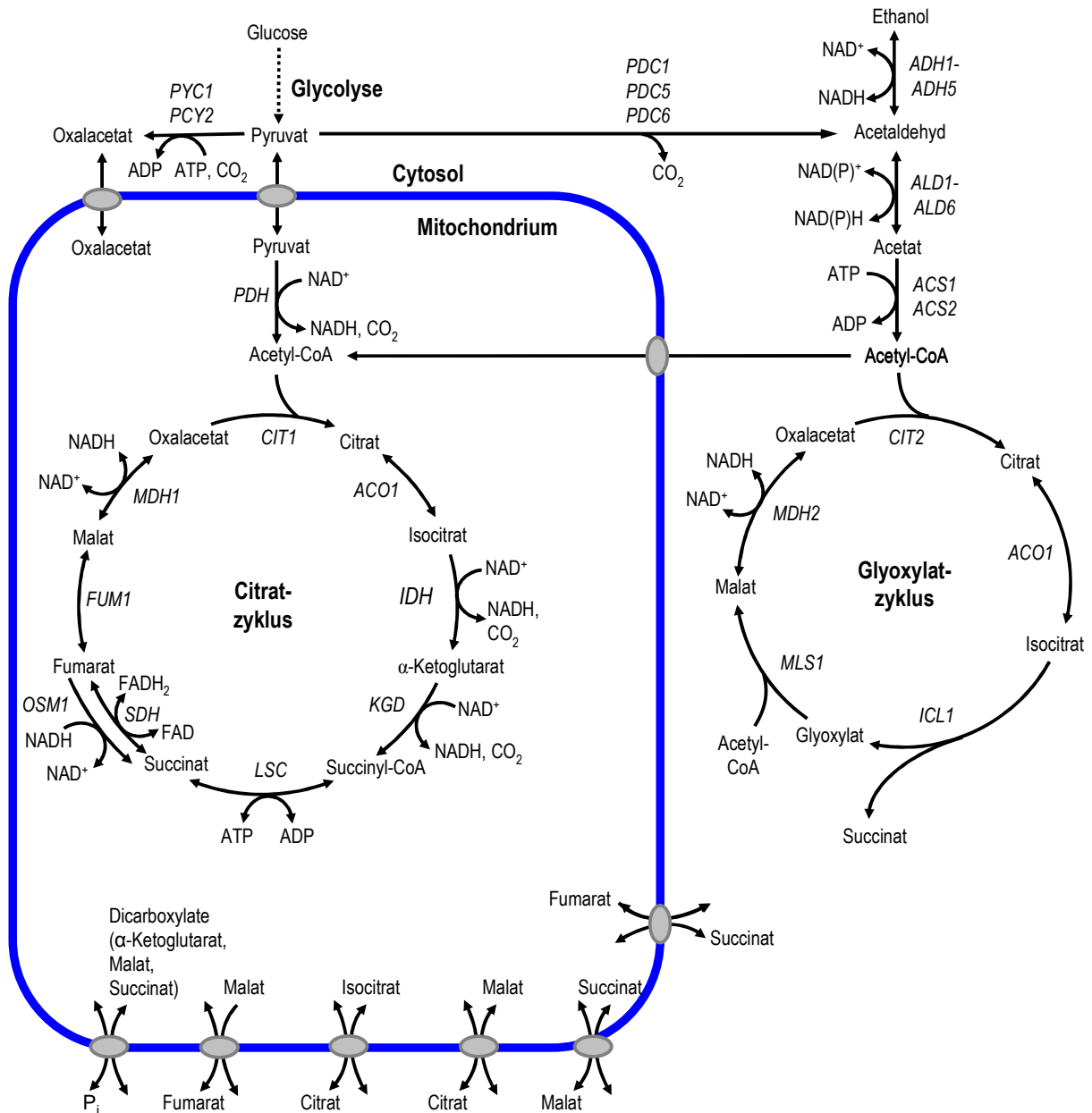
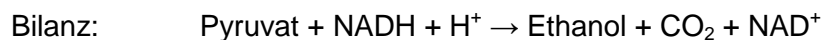
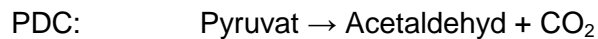


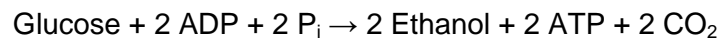
Abbildung 3.2: Zentraler Kohlenstoffmetabolismus von *S. cerevisiae* (nach Daten von Kaplan *et al.* 1995, Flikweert *et al.* 1996, Pronk *et al.* 1996, Kakhniashvili *et al.* 1997, Palmieri *et al.* 1997, Walker 1998, Pallotta *et al.* 1999, Palmieri *et al.* 1999, Akamatsu *et al.* 2000, McCammon *et al.* 2003, Duarte *et al.* 2004, Bonander *et al.* 2008). Über die Glycolyse wird Glucose zu Pyruvat abgebaut. Pyruvat kann über die alkoholische Gärung, die Carboxylierung zu Oxalacetat und den Citrat-Zyklus verstoffwechselt werden. Dienen C<sub>2</sub>-Körper als Kohlenstoffquelle wird der Glyoxylat-Zyklus als erster Schritt der Gluconeogenese genutzt. Transportprozesse zwischen Mitochondrien und Cytosol sind durch graue Ellipsen dargestellt. Neben den dargestellten Transportern existieren weitere Transporter beispielsweise für Aminosäuren.

### Alkoholische Gärung

Die alkoholische Gärung erfolgt im Cytosol (Abbildung 3.2). Pyruvat wird durch die Pyruvat-Decarboxylase (PDC) zu Acetaldehyd und Kohlendioxid gespalten. Acetaldehyd wird, um das in der Glycolyse gebildete NADH zu NAD<sup>+</sup> zu regenerieren und die Redoxbilanz zu schließen, durch eine Alkohol-Dehydrogenase zu Ethanol reduziert.



Bei der alkoholischen Gärung werden 2 mol ATP pro mol Glucose gewonnen:



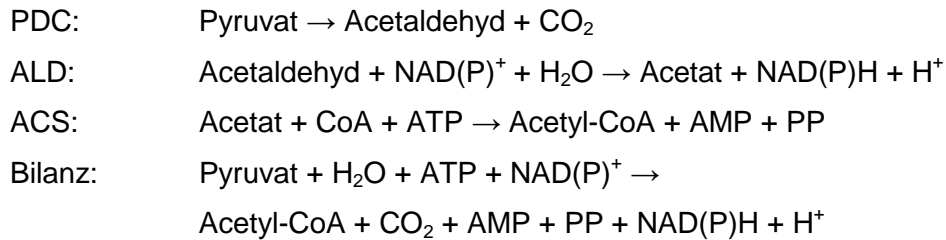
### Abbau von Pyruvat zu Acetyl-CoA

Unter aeroben Bedingungen dient Sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor, so dass Pyruvat nicht zum Schließen der Redoxbilanz zu Ethanol reduziert werden muss. In die Mitochondrien transportiertes Pyruvat durchläuft eine Decarboxylierung zu Acetyl-CoA durch den Pyruvat-Dehydrogenasekomplex (PDH).



Das in den Mitochondrien gebildete Acetyl-CoA wird in den ebenfalls in den Mitochondrien lokalisierten Citrat-Zyklus eingeschleust und unter Gewinnung von Reduktionsäquivalenten zu Kohlendioxid gespalten (Abbildung 3.2).

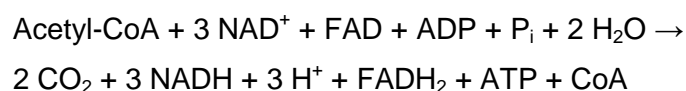
Neben der durch die PDH katalysierten Reaktion kann Pyruvat über das Zwischenprodukt Acetaldehyd durch eine der Aldehyd-Dehydrogenasen (ALD) zu Acetat als Zwischenprodukt oxidiert werden. Das Acetat wird im Cytosol über die Acetyl-CoA-Synthetase (ACS) unter ATP-Verbrauch in Acetyl-CoA umgewandelt. Dieses cytosolische Acetyl-CoA wird zur Fettsäurebiosynthese verwendet oder über den Carnitin-Shuttle in die Mitochondrien transportiert (Schmalix und Bandlow 1993, Kohlhaw und Tan-Wilson 1977). Ergebnisse von Flikweert *et al.* (1996) deuten darauf hin, dass unter physiologischen Bedingungen keine reverse Reaktion, also kein Transport von mitochondrialem Acetyl-CoA ins Cytosol erfolgt.



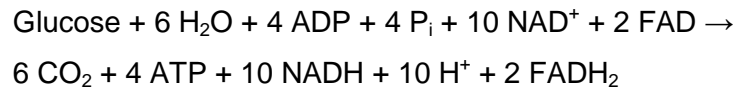
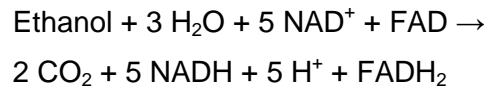
Da diese Reaktionsfolge wie die durch die PDH katalysierte Reaktion letztendlich Pyruvat zu Acetyl-CoA umsetzt und eine zur PDH konkurrierende Reaktion darstellt, wird sie als PDH-Bypass bezeichnet. Da die Substrataffinität der PDH zehnmal höher ist als die der PDC wird der PDH-Bypass bei geringen intrazellulären Pyruvatkonzentration kaum genutzt. Bei höheren Pyruvatkonzentrationen wird die Kapazität der PDH überschritten und es kommt zu einer verstärkten Nutzung des PDH-Bypasses, dessen Kapazität die der PDH deutlich übersteigt (Pronk *et al.* 1996, van Dijken *et al.* 1993).

### Citrat-Zyklus

Der Citrat-Zyklus (Abbildung 3.2) beginnt mit der durch die Citratsynthase katalysierten Kondensation von Acetyl-CoA und Oxalacetat zu Citrat. Dieses wird durch die Aconitase zu Isocitrat isomerisiert. Anschließend folgen die beiden Decarboxylierungsschritte mit Bildung von NADH, von Isocitrat zu  $\alpha$ -Ketoglutarat katalysiert durch die Isocitrat-Dehydrogenase (IDH) und von  $\alpha$ -Ketoglutarat zu Succinyl-CoA katalysiert durch die  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase. Die Succinyl-CoA-Ligase hydrolysiert Succinyl-CoA zu Succinat unter Gewinnung von ATP. Succinat wird unter Bildung von FADH<sub>2</sub> durch die Succinat-Dehydrogenase (SDH) zu Fumarat oxidiert. Der Cofaktor FAD liegt nicht wie NAD<sup>+</sup> frei, sondern stets als prosthetische Gruppe des Enzyms vor. Aus Fumarat wird durch die Fumarase Malat gebildet. Im letzten Schritt des Citrat-Zyklus wird katalysiert durch die Malat-Dehydrogenase aus Malat Oxalacetat gebildet und der Kreislauf geschlossen. Alle Reaktionen bis auf die Kondensation von Acetyl-CoA und Oxalacetat zu Citrat sowie die beiden Schritt mit Kohlendioxidabspaltung sind reversibel. Die Bilanz des Citrat-Zyklus ausgehend von Acetyl-CoA lautet:



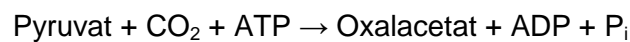
Als Bilanz für den Abbau von Ethanol oder Glucose über den Citrat-Zyklus ergibt sich daher:



### **Anaplerotische Carboxylierung von Pyruvat**

Intermediate des Citrat-Zyklus dienen auch als Vorstufen für die Synthese von Zellkomponenten und werden kontinuierlich durch den anabolen Stoffwechsel verbraucht. Beispielsweise werden die Aminosäuren Glutamat und Aspartat aus  $\alpha$ -Ketoglutarat und Oxalacetat durch Transaminierung gebildet und Succinyl-CoA wird zur Häm biosynthese verbraucht.

Um diesen Verlust auszugleichen, erfolgt die anaplerotische Carboxylierung von Pyruvat zu Oxalacetat durch Pyruvatcarboxylasen unter Verbrauch von ATP (Stucka *et al.* 1991):



Um den Citrat-Zyklus zur Biomassesynthese nutzen zu können, ist selbst unter anaeroben Bedingungen eine geringe Citrat-Zyklus-Aktivität vorhanden. Allerdings läuft kein kompletter Zyklus ab, sondern der Citrat-Zyklus ist in einen oxidativen Teil und einen reduktiven Teil aufgeteilt. Beide Zweige können bis zum Succinat laufen (Camarasa *et al.* 2003). Unter anaeroben Bedingungen ist die SDH nicht aktiv und die Reaktion von Fumarat zu Succinat wird durch zwei Fumaratreduktasen (*OSM1* und *FRD1*) katalysiert (Enomoto *et al.* 1996, Arikawa *et al.* 1998).

### **Atmungskette**

Die beim Abbau von Glucose in der Glycolyse, bei der Decarboxylierung von Pyruvat und im Citrat-Zyklus gebildeten reduzierten Cofaktoren NADH und FADH<sub>2</sub> werden über die in den Mitochondrien lokalisierte Atmungskette reoxidiert, wobei durch die schrittweise Übertragung von Elektronen und Protonen auf Sauerstoff Energie in Form von ATP gewonnen wird (oxidativen Phosphorylierung).

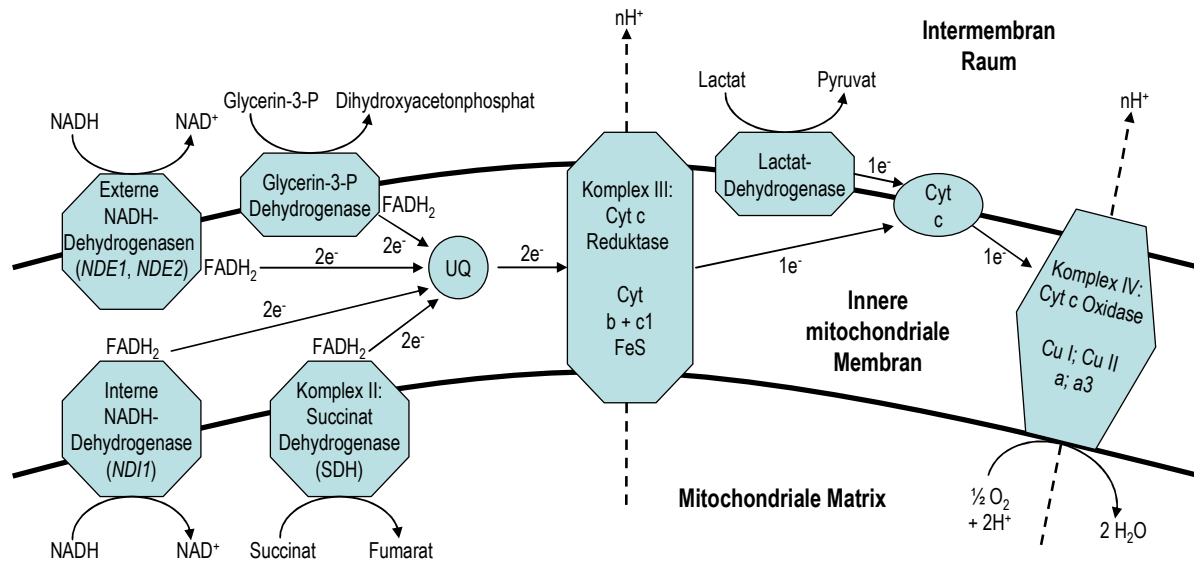
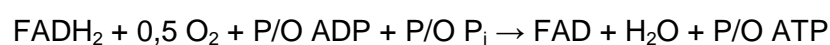
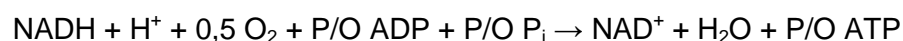


Abbildung 3.3: Aufbau der Atmungskette von *S. cerevisiae* (nach Rosenfeld und Beauvoit 2003)

Abbildung 3.3 zeigt den Aufbau der Atmungskette bei *S. cerevisiae*. Im Gegensatz zu vielen anderen Eukaryonten besitzt die Atmungskette von *S. cerevisiae* keine protonenpumpende integrale NADH:Ubichinon-Oxidoreductase (Komplex I). Die Oxidation von NADH erfolgt stattdessen über nichtintegrale mitochondriale NADH-Dehydrogenasen (*NDE1*, *NDE2* und *NDI1*). Diese liefern nur Elektronen für die Reduktion des lipophilen Elektronencarriers Ubichinon (UQ) zu Ubichinol (UQH<sub>2</sub>) ohne zum protonenmotorischen Gradienten beizutragen (de Vries und Marres 1987). Auch weitere mitochondriale Dehydrogenasen wie die SDH, die Succinat zu Fumarat oxidiert und als Komplex II der Atmungskette bezeichnet wird, oder die Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase übertragen über kovalent gebundenes FAD Elektronen auf Ubichinon.

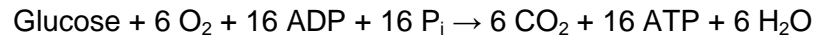
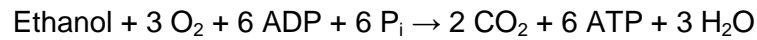
Durch Komplex III (Cytochrom c-Reduktase) wird Ubichinol reoxidiert und Cytochrom c reduziert. An Komplex IV (Cytochrom c-Oxidase) wird das Cytochrom c reoxidiert und Sauerstoff zu Wasser reduziert. Die bei den Reaktionen von Komplex III und VI freigesetzte Energie wird genutzt um Protonen vom Matrixraum in den Intermembranraum zu pumpen und einen Protonengradienten zu erzeugen. Dieser Protonengradient wird durch die ATP-Synthase zur Erzeugung von ATP genutzt. Die Anzahl der gewonnen Moleküle an ATP pro oxidiertem Atom Sauerstoff wird häufig durch das P/O-Verhältnis dargestellt:



Auf Grund des fehlenden protonenpumpenden Komplexes I liegt das P/O-Verhältnis für die Oxidation von NADH oder FADH<sub>2</sub> theoretisch bei 1,5 und praktisch bei Werten zwischen 0,9 und 1,2 (Verduyn *et al.* 1991, Jouhten *et al.* 2008). Für den kompletten respirativen Abbau



von Glucose (bei Nutzung der PDH) oder Ethanol ergeben sich mit einem auf 1,0 gesetzten P/O-Verhältnis folgende Bilanzgleichungen:



Aus den Konzentrationen der Adenosinphosphate AMP, ADP und ATP lässt sich der "Energy charge" (EC), der als Maß für den energetischen Zustand einer Zelle gilt, nach Gleichung 4.6 zu bestimmen (Atkinson 1968).

$$EC = \frac{[ATP] + 0,5 \cdot [ADP]}{[ATP] + [ADP] + [AMP]} \quad \text{Gleichung 3.26}$$

*S. cerevisiae* Zellen, die mit Glucose als Kohlenstoffquelle wachsen, besitzen einen EC zwischen 0,75 - 0,85 (Ball und Atkinson 1975).

### Redoxstoffwechsel

Während NAD(H) das vorherrschende Reduktionsäquivalent des Katabolismus darstellt, spielt NADP(H) im Anabolismus eine große Rolle, da viele Reaktionen der Aminosäure-, Lipid- und Nukleotid-Biosynthese NADPH als Reduktionsmittel nutzen (Bakker *et al.* 2001). Das intrazelluläre Redoxpotential wird hauptsächlich durch das NADH/NAD<sup>+</sup>-Verhältnis bestimmt (Bakker *et al.* 2001).

In *S. cerevisiae* wird der Großteil des NADPH im Cytosol über den oxidativen Part des Pentosephosphat-Wegs gebildet, der Glucose-6-Phosphat zu Ribose-5-Phosphat umwandelt. Mitochondriales NADPH wird hauptsächlich durch eine NADP<sup>+</sup>-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase generiert. Neben diesen Hauptreaktionen kann NADPH sowohl im Cytosol als auch in den Mitochondrien über die NADP<sup>+</sup>-abhängigen Acetaldehyd-Dehydrogenasen oder NADH-Kinasen, die NADH unter ATP-Verbrauch zu NADPH umsetzen, gebildet werden.

Bei Hefen besteht zwischen den beiden Coenzymssysteme NAD<sup>+</sup>/NADH und NADP<sup>+</sup>/NADPH keine Verbindung, da Hefen über keine Transhydrogenase verfügen. Zudem existieren auf Grund der Kompartimentierung und der Undurchlässigkeit der mitochondrialen Membran jeweils getrennte Coenzym-pools in den Mitochondrien und im Cytosol (Bruinenberg *et al.* 1983b, Bruinenberg *et al.* 1983a, van Dijken und Scheffers 1986).

### 3.3.5 Gluconeogenese und Glyoxylat-Zyklus

Da Glucose-6-Phosphat für die Synthese von Zellbestandteilen benötigt wird, erfolgt in Abwesenheit von Kohlenhydraten die Neusynthese von Glucose aus organischen Nicht-Kohlenhydrat-Vorstufen, hauptsächlich ausgehend von Pyruvat und Oxalacetat. Diese anaplerotischen Reaktionen werden unter dem Begriff Gluconeogenese zusammengefasst. Um eine Verschwendung von ATP durch eine gleichzeitig stattfindende Glycolyse und Gluconeogenese zu verhindern, sind sie getrennt und reziprok über die Glucoserepression und die Katabolitinaktivierung reguliert.

Zur Synthese von Glucose aus Pyruvat werden die sieben reversiblen Reaktionen der Glycolyse verwendet. Die drei praktisch irreversiblen Reaktionen der Glycolyse, die Reaktion von Glucose zu Glucose-6-phosphat, von Fructose-6-phosphat zu Fructose-1,6-bisphosphat und von Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat, werden durch alternative Enzyme übernommen. Pyruvat wird hierzu über Oxalacetat in Phosphoenolpyruvat umgewandelt, katalysiert durch die Pyruvat-Carboxylase und Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase. Die Fructose-1,6-bisphosphatase wandelt Fructose-6-phosphat in Fructose-1,6-bisphosphat und die Glucose-6-phosphat-Phosphatase Glucose-6-phosphat in Glucose um.

Zu den anaplerotischen Reaktionen zählt auch der Glyoxylat-Zyklus (Abbildung 3.2), eine verkürzte Variante des Citrat-Zyklus, der dessen Decarboxylierungsschritte umgeht. Die Bedeutung des Glyoxylat-Zyklus liegt in der Bereitstellung des C<sub>4</sub>-Körpers Succinat beziehungsweise aus Succinat gebildeter Metabolite des Citrat-Zyklus für Biosynthesen beim Wachstum auf Kohlenstoffquellen mit weniger als drei Kohlenstoffatomen. Hierzu zählen Ethanol, Acetat sowie Fettsäuren, da diese in Form des Abbauproduktes Acetyl-CoA in den Stoffwechsel eingeschleust werden.

Der Glyoxylat-Zyklus beginnt wie der Citrat-Zyklus mit der Kondensation von Acetyl-CoA mit Oxalacetat zu Citrat und der anschließenden Isomerisierung zu Isocitrat. Statt der oxidativen Decarboxylierungsschritte des Citrat-Zyklus wird Isocitrat im Glyoxylat-Zyklus katalysiert durch die Isocitrat-Lyase zu Glyoxylat und Succinat gespalten. Das Succinat wird zur Nutzung im Citrat-Zyklus über einen Antiport-Mechanismus in die Mitochondrien eingeschleust. Abbildung 3.2 zeigt einige der Proteine für den Transport organischer Säuren in und aus den Mitochondrien, daneben existieren weitere Transporter beispielsweise für Aminosäuren (Kakhniashvili *et al.* 1997, Dickinson und Schweizer 2004). In *S. cerevisiae* existieren mehrere mitochondriale Antiporter für Di- und Tricarboxylate. Daneben werden Pyruvat und Oxalacetat über Protonensymport transportiert (Pallotta *et al.* 1999, Palmieri *et al.* 1997, Palmieri *et al.* 1999, Kakhniashvili *et al.* 1997, Kaplan *et al.* 1995).

Glyoxylat kondensiert mit einem weiteren Molekül Acetyl-CoA katalysiert durch die Malat-Synthase zu Malat. Wie im Citrat-Zyklus wird Malat anschließend zu Oxalacetat oxidiert. Die Bilanz des Glyoxylat-Zyklus ausgehend von Acetyl-CoA lautet:



Damit gewinnt die Zelle nur 0,5 NADH pro Acetyl-CoA über den Glyoxylat-Zyklus gegenüber 3 NADH, 1 FADH<sub>2</sub> und 1 ATP pro Acetyl-CoA im Citrat-Zyklus. Wie Tabelle 3.2 und Abbildung 3.2 zeigen, unterscheiden sich Citrat- und Glyoxylat-Zyklus bezüglich der Isoenzyme sowie der Lokalisierung der Isoenzyme.

Tabelle 3.2: Isoenzyme des Citrat- und Glyoxylat-Zyklus (nach Saccharomyces Genome Database, <http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces>).

	Citrat-Zyklus		Glyoxylat-Zyklus	
	Isoenzym	Lokalisierung	Isoenzym	Lokalisierung
Citrat-Synthase	<i>CIT1</i>	Mitochondrien	<i>CIT2</i>	Peroxisomen, Mitochondrien
Aconitase	<i>ACO1</i>	Mitochondrien	<i>ACO1</i>	Cytosol
Isocitrat-Dehydrogenase	<i>IDH</i>	Mitochondrien		
$\alpha$ -Ketoglutarat- Dehydrogenase	<i>KGD</i>	Mitochondrien		
Succinyl-CoA-Synthetase	<i>LCS</i>	Mitochondrien		
Succinat-Dehydrogenase	<i>SDH</i>	Mitochondrien		
Fumarase	<i>FUM1</i>	Mitochondrien, Cytosol		
Malat-Dehydrogenase	<i>MDH1</i>	Mitochondrien	<i>MDH2</i>	Cytosol
Isocitrat-Lyase			<i>ICL1</i>	Cytosol
Malat-Synthase			<i>MLS1</i>	Cytosol, Peroxisomen*

\* Lokalisierung ist abhängig von der Kohlenstoffquelle (Ethanol: Cytosol, Fettsäuren: Peroxisomen) (Kunze *et al.* 2002)

### 3.3.6 Überblick über die Haupt- und Nebenprodukte des anaeroben und aeroben Kohlenstoffstoffwechsels

Abhängig von den Kultivierungsbedingungen und der Kohlenstoffquelle werden von *S. cerevisiae* neben den bisher vorgestellten Produkten Biomasse, Ethanol und Kohlendioxid auch weitere Metabolite gebildet. Tabelle 3.3 zeigt Wachstumsraten, Substrataufnahmeraten und die Stoffwechselprodukte beim anaeroben Wachstum mit Glucose und beim aeroben Wachstum von *S. cerevisiae* mit Glucose, Galactose und Ethanol.

Unter aeroben und anaeroben Satzbedingungen werden aus Glucose neben Ethanol auch Glycerin, Acetat und Succinat gebildet. Neben den in Tabelle 3.3 gezeigten Produkten kann *S. cerevisiae* auch in geringen Mengen weitere Nebenprodukte bilden. Dazu zählen organischen Säuren (zum Beispiel Pyruvat, Citrat) sowie Aldehyde (hauptsächlich Acetaldehyd) und Ketone wie beispielsweise Acetoin oder höhere Alkohole wie 2,3-Butandiol (Dantigny *et al.* 1989, Romano und Suzzi 1993, Walker 1998).

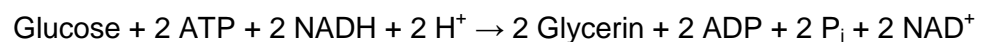
Tabelle 3.3: Produkte des aeroben und anaeroben Stoffwechsels von *S. cerevisiae* (nach Gancedo und Serrano 1989). n.a.: nicht angegeben

Kohlenstoffquelle	Anaerob		Aerob <sup>a</sup>	
	Glucose	Ethanol	Glucose	Galactose
Wachstumsrate	n.a.	0,1	0,35	0,25
Sauerstoffaufnahme- rate, $\mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$	0	130	45	90
Aufnahmerate der Kohlen- stoffquelle, $\mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$	n.a.	80	260	100
Prozentsatz der Kohlenstoffquelle genutzt zur				
Ethanolbildung	85 - 95	-	70 - 80	55
Glycerinbildung	3 - 5	< 0,5	7,5 - 11	2,5
Succinatbildung	0,5 - 1,5	-	0 - 0,4 <sup>b</sup>	-
Acetatbildung	0,2 - 0,5	< 0,5	0,5 - 1	2
Kohlendioxidbildung	-	55	3	15
Biomassebildung	0,4 - 2	40	10 - 13	25

<sup>a</sup> Minimalmedium mit Ammoniumsalz als Stickstoffquelle

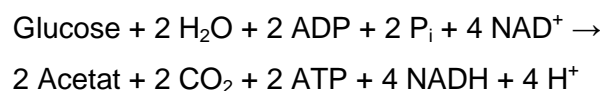
<sup>b</sup> Abhängig von der Stickstoffquelle

Das Gärprodukt Glycerin spielt eine wichtige Rolle beim Ausgleich der Redoxbilanz und der Osmoregulation und -toleranz der Hefe. Die Glycerinbildung erfolgt ausgehend von Dihydroxyacetonphosphat, einem Zwischenprodukt der Glycolyse. Dihydroxyacetonphosphat wird durch die  $\text{NAD}^+$ -abhängige Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase zu Glycerin-3-phosphat reduziert und diese durch die Glycerin-3-phosphatase dephosphoryliert (Prior und Hohmann 1997). Wie die Bilanzgleichung der Bildung von Glycerin aus Glucose zeigt, erfolgt bei der Glycerinbildung im Gegensatz zur alkoholischen Gärung eine Nettobildung von  $\text{NAD}^+$  für die allerdings ATP verbraucht wird:



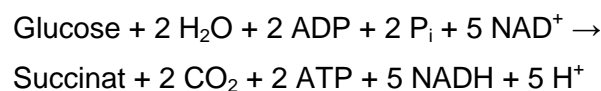
Eine Biomassebildung führt bei *S. cerevisiae* neben einem Nettoverbrauch von NADPH zu einer Nettoproduktion von NADH. Während dieser NADH Überschuss während dem respirativen Wachstum durch die Atmungskette regeneriert werden kann und so zur Energiegewinnung beitragen kann, erfolgt unter anaeroben Bedingungen der Ausgleich der Redoxbilanz über die Glycerinbildung (Bakker *et al.* 2001). Bei hoher extrazellulärer Osmolarität wirkt Glycerin als wichtigste osmoprotektive Verbindung (Nevoigt und Stahl 1997).

Das als Zwischenprodukt des PDH-Bypasses gebildete Acetat wird nur unter bestimmten Wachstumsbedingungen, beispielsweise beim Übergang von Glucoselimitierung zu Glucoseüberschuß, in größeren Mengen in das Medium sekretiert (van Urk *et al.* 1990). Die Bilanz der Acetatbildung aus Glucose lautet:

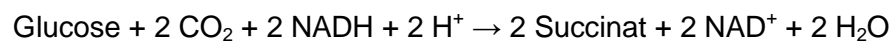


Die Succinatbildung aus Glucose kann über den oxidativen oder reduktiven Zweig des Citrat-Zyklus erfolgen (Heerde und Radler 1978, Oura 1977).

"Oxidativer" Zweig des Citrat-Zykluses:



"Reduktiver" Zweig des Citrat-Zykluses:



Es erfolgt keine Succinatbildung über den Glyoxylat-Zyklus, da die Isocitrat-Lyase durch Glucose reprimiert ist (Duntze *et al.* 1969). Die Stickstoffquelle besitzt einen deutlichen Einfluss auf die Succinatbildung (Heerde und Radler 1978, Kleinzeller 1941). Bezogen auf die anorganische Stickstoffquelle Ammoniumsulfat als Referenz erhöhte sich die Succinatbildung unter anaeroben Bedingungen bei organischen Stickstoffquellen wie Aspartat (Faktor 2,5) oder Glutamat (Faktor 14,2) (Heerde und Radler 1978). Unter aeroben Bedingungen erfolgt eine Succinatbildung nur in reichhaltigen Medien, wie beispielsweise Komplexmedien oder Medien mit Zusatz der Aminosäure Glutamat, über den oxidativen Zweig des Citrat-Zyklus (Gancedo und Serrano 1989).

Galactose als Kohlenstoffquelle löst einen geringeren Glucoserepressionseffekt als Glucose aus, wodurch sich im Vergleich zu Glucose eine Verschiebung des respiro-fermentativen Stoffwechsels in Richtung Respiration ergibt (Gancedo 1998, Gancedo und Serrano 1989). Dies resultiert in einer höheren Sauerstoffaufnahme und einer verbesserten Biomasseausbeute (Tabelle 3.3).

### **3.4 Zentraler Stickstoffmetabolismus von *Saccharomyces cerevisiae***

*S. cerevisiae* ist in der Lage, ein breites Spektrum an anorganischen und organischen Stickstoffquellen zu nutzen. Diese werden in Abhängigkeit der jeweils erreichbaren Wachstumsrate als gute Stickstoffquellen wie Ammonium, Glutamat, Glutamin und Asparagin und schlechte Stickstoffquellen wie Prolin und Harnstoff eingeteilt (Magasanik und Kaiser 2002). Neben der Katabolitrepression durch Glucose existiert ein analoges Phänomen, das als Stickstoff-Katabolitrepression bezeichnet wird. Stickstoffquellen können an Hand des Stickstoff-Repressionseffektes eingeordnet werden (Aufreihung mit ansteigendem Repressionseffekt, Hofman-Bang 1999):

Prolin < Harnstoff < Glutamat < Ammonium < Asparagin/Glutamin

Glutamat und Glutamin bilden die zentralen Knotenpunkte des Stickstoffmetabolismus über die alle weiteren Aminosäuren oder andere stickstoffhaltige Vorstufen für die Biosynthese gebildet werden. Wie Abbildung 3.4 zeigt, werden mit Ammonium als Stickstoffquelle beide Aminosäuren aus  $\alpha$ -Ketoglutarat synthetisiert (Magasanik und Kaiser 2002). Neben  $\alpha$ -Ketoglutarat werden auch weitere Verbindungen des zentralen Kohlenstoffmetabolismus zur Aminosäurebiosynthese genutzt.

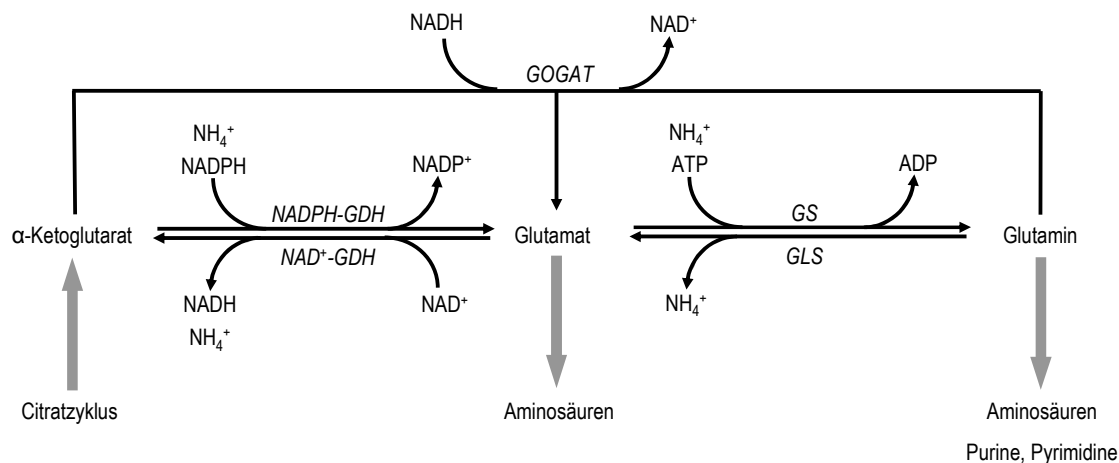
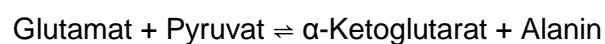


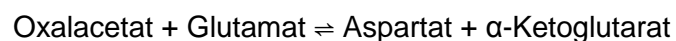
Abbildung 3.4: Zentraler Stickstoffmetabolismus in *S. cerevisiae* (ter Schure *et al.* 2000, Magasanik und Kaiser 2002). Die beiden zentralen Komponenten des Stickstoffmetabolismus, Glutamat und Glutamin, werden mit Ammonium als Stickstoffdonor aus  $\alpha$ -Ketoglutarat synthetisiert. GLS: Glutaminase, GOGAT: Glutamat-Synthase, GS: Glutamin-Synthetase, NAD<sup>+</sup>-GDH: NAD<sup>+</sup>-abhängige Glutamat-Dehydrogenase, NADPH-GDH: NADPH-abhängige Glutamat-Dehydrogenase.

Beispiele hierfür sind folgende Reaktionen, die Oxalacetat, Pyruvat oder Glyoxylat verwenden, und die enge Verknüpfung des zentralen Stickstoff- und Kohlenstoffmetabolismus zeigen (Walker 1998, Dickinson und Schweizer 2004, Villas-Boas *et al.* 2005, Usaite *et al.* 2006):

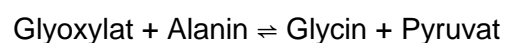
Biosynthese von Alanin aus Pyruvat durch die Alanin-Transaminase:



Synthese von Aspartat aus Oxalacetat katalysiert durch die Aspartat-Aminotransferase:



Biosynthese von Glycin aus Glyoxylat, beim Wachstum auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen, durch die Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase:



## 3.5 Bernsteinsäure

### 3.5.1 Vorkommen und Eigenschaften

Bernsteinsäure, eine aliphatische Dicarbonsäure, wurde erstmals 1546 von Georgius Agricola durch trockene Destillation von Bernstein dargestellt. Bernsteinsäure kommt natürlich in vielen Früchten, Gemüsen, Pilzen, Flechten, Hölzern, fossilen Harzen und Braunkohle vor. Gleichzeitig ist sie ein Zwischenprodukt des Citrat-Zyklus. Bei einigen Mikroorganismen ist Bernsteinsäure auch ein Endprodukt des anaeroben Stoffwechsels (Cornils und Lappe 2002).

Tabelle 3.4: Bernsteinsäure (Cornils und Lappe 2002)

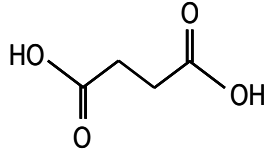
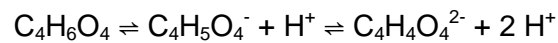
IUPAC Nomenklatur	1,2-Ethandicarbonsäure
Alternative Namen	Butandisäure Succinylsäure
Summenformel	$C_4H_6O_4$
Strukturformel	
CAS-Nummer	110-15-6
Aussehen	kristallin, farblos
Geschmack	sauer und salzig
Molekulargewicht	$118,09 \text{ g mol}^{-1}$
Dichte	$1,57 \text{ g cm}^3$
Schmelzpunkt	$188 \text{ }^\circ\text{C}$
Siedepunkt	$235 \text{ }^\circ\text{C}$
Löslichkeit in Wasser	$58 \text{ g L}^{-1}$ ( $20 \text{ }^\circ\text{C}$ )
$pK_S$	$pK_{S1} 4,21, pK_{S2} 5,62$

Tabelle 3.4 fasst alternative Bezeichnungen, sowie die Stoffeigenschaften der Bernsteinsäure zusammen. Die Bernsteinsäuresalze und -ester werden als Succinate bezeichnet.



Mehrwertige Carbonsäuren wie Bernsteinsäure dissoziieren stufenweise, wobei die Reaktionen im Gleichgewicht miteinander stehen:



Die pH-abhängige Verteilung der drei Formen ist Abbildung 3.5 dargestellt. Bei pH 4,21 ( $\text{pK}_{\text{S}1}$ ) liegt das Verhältnis der Konzentrationen an  $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4$  und  $\text{C}_4\text{H}_5\text{O}_4^-$  und bei pH 5,62 ( $\text{pK}_{\text{S}2}$ ) das Verhältnis der Konzentrationen an  $\text{C}_4\text{H}_5\text{O}_4^-$  und  $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4^{2-}$  bei annähernd 50 %.

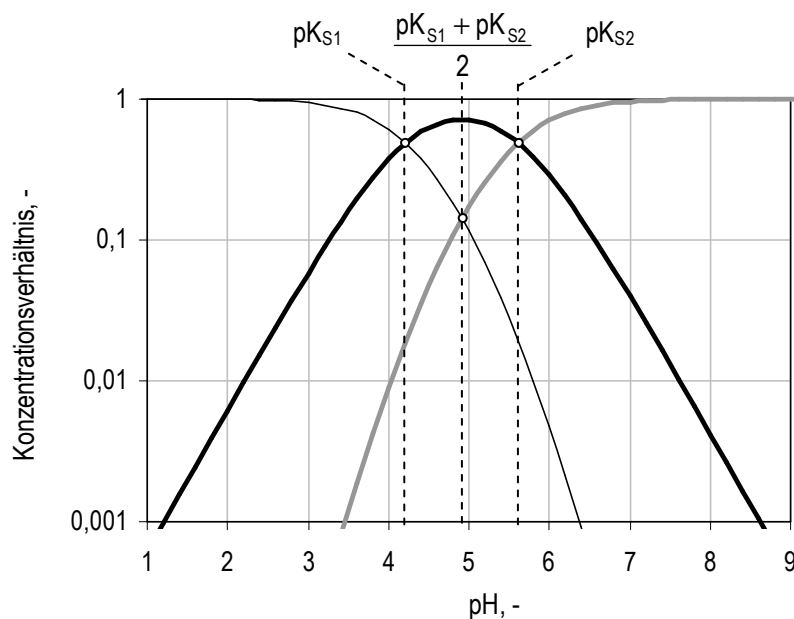


Abbildung 3.5: Verteilungsdiagramm der Bernsteinsäureformen  $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4$  (dünne schwarze Linie),  $\text{C}_4\text{H}_5\text{O}_4^-$  (dicke schwarze Linie) und  $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4^{2-}$  (dicke graue Linie) als Funktion des pH (25°C).

### 3.5.2 Industrielle Bedeutung und Produktion von Bernsteinsäure

Jährlich werden weltweit 15.000 Tonnen Bernsteinsäure hauptsächlich über chemische Katalyse über die Hydrierung von Maleinsäureanhydrid hergestellt (Zeikus *et al.* 1999). Bei Maleinsäureanhydrid handelt es sich um die zentrale  $\text{C}_4$ -Plattformchemikalie, die ausgehend vom fossilen Rohstoff Erdöl über die  $\text{C}_4$ -Fraktion von Naphtha (n-Butan/Butadien) gewonnen wird. Alternativ kann Bernsteinsäure auch über die Hydrierung von Maleinsäure oder Fumarat und die Oxidation von 1,4-Butandiol produziert werden (Cornils und Lappe 2002).

Bereits seit Robert Koch nachwies, dass Bernsteinsäure einen positiven Einfluss auf den menschlichen Metabolismus besitzt und nicht im menschlichen Körper akkumuliert, wird Bernsteinsäure häufig als Säuerungsmittel, Geschmacksverstärker und Konservierungsmittel

in der Lebensmittelindustrie verwendet. Zudem wird Bernsteinsäure heutzutage als Tensid, Detergenz, Chelator, Schaumbildner, Streckmittel und als Additiv im Pharma- und Agrarsektor eingesetzt. Der Marktwert für die genannten Einsatzgebiete von Bernsteinsäure als Spezialchemikalie liegt bei 400 Millionen US-\$ pro Jahr (McKinlay *et al.* 2007, Sauer *et al.* 2008).

Die petrochemische Synthese von Bernsteinsäure erfordert Schwermetallkatalysatoren, den Einsatz von Lösemitteln, hohe Temperaturen und hohe Drücke. Auf Grund von ökologischen und ökonomischen Vorteilen wurde Bernsteinsäure von der Europäischen Kommission und vom U.S. Department of Energy als einer der attraktivsten Kandidaten für nachhaltig produzierte Plattformchemikalien eingestuft (Werpy und Petersen 2004, Patel 2006).

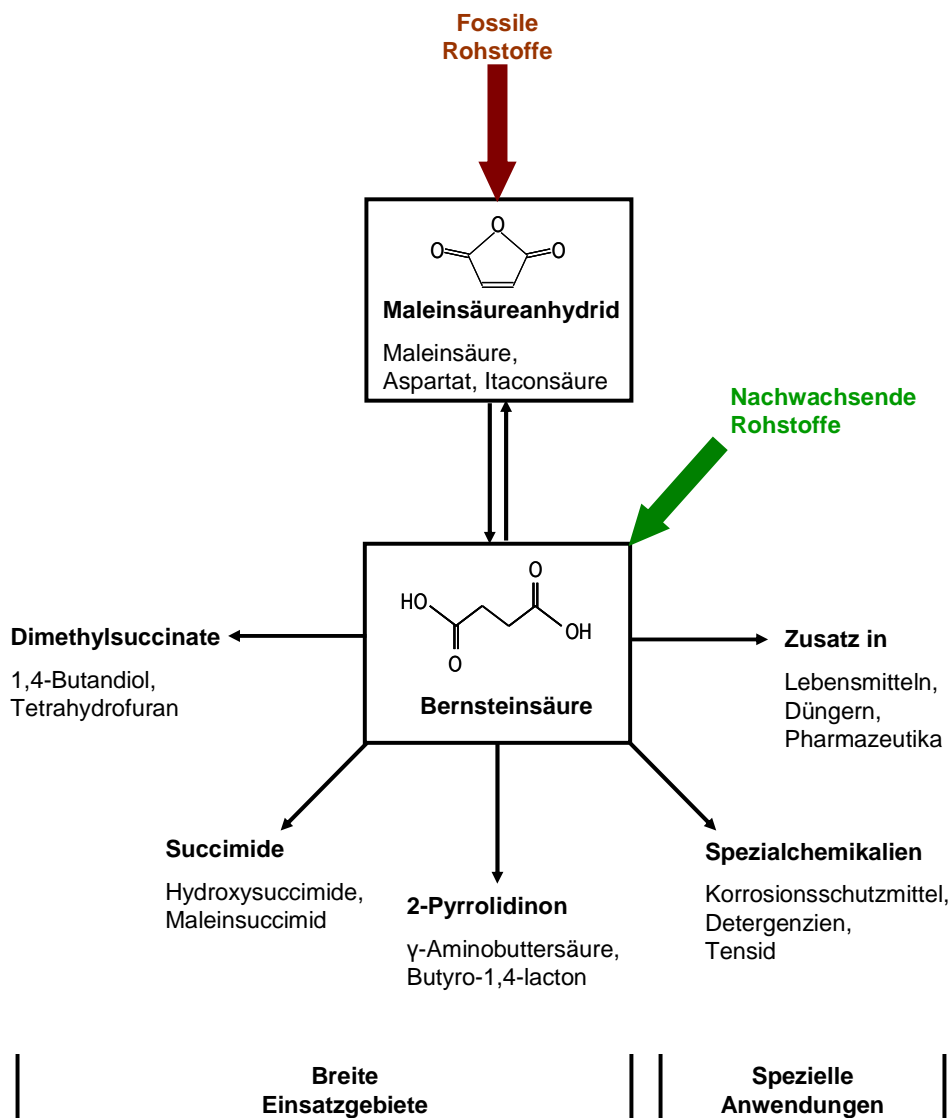


Abbildung 3.6: Herstellungswege und Einsatzmöglichkeiten von Bernsteinsäure (nach Song und Lee 2006 und nach Zeikus *et al.* 1999)

Es wird angestrebt den C<sub>4</sub>-Körper Bernsteinsäure über mikrobielle Produktionsverfahren aus erneuerbaren Rohstoffen zu produzieren, um das aus fossilen Rohstoffen gewonnene Maleinsäureanhydrid als C<sub>4</sub>-Plattformchemikalie durch "Bio-Bernsteinsäure" aus nachwachsenden Rohstoffen ablösen. Abbildung 3.6 zeigt einige Massen- und Spezialchemikalien für die Bernsteinsäure als Rohstoff dienen kann. Tabelle 3.5 gibt einen Überblick über einige ausgewählte Bernsteinsäurederivate.

Tabelle 3.5: Endprodukte ausgewählter Bernsteinsäurederivate (Zeikus *et al.* 1999, Paster *et al.* 2003, Werpys und Petersen 2004, McKinlay *et al.* 2007)

Chemikalie	Aktuelle Marktgröße, Tonnen pro Jahr	Anwendungen
1,4-Butandiol	309 000	Lösemittel, chemisches und pharmazeutisches Zwischenprodukt zur Herstellung von Tetrahydrofuran, $\gamma$ -Butyrolacton, Polybutylenterephthalat und Harzen
Tetrahydrofuran	166 000	Lösemittel, Hauptbestandteil von Druckertinten, magnetischen Filmen und bei der Elasthanfaserproduktion
$\gamma$ -Butyrolacton	48 000	Lösemittel, Herstellung von Pyrrolidonen, Pharmazeutika, Farben und Epoxylebstoffe
Salze der Bernsteinsäure	92 000	Enteiser, Inhaltsstoff von Herbiziden
Ester der Bernsteinsäure	> 40 000	Lösemittel wie Diethylester, Polymere wie Bionelle (4,4-Polyester)
Pyrrolidone	30 000	Lösemittel wie N-Methylpyrrolidon

Der Bedarf an "Bio-Bernsteinsäure" als neue Plattformchemikalie wird auf 270.000 Tonnen pro Jahr mit einem Marktwert der Produkte von 15 Milliarden US-\$ geschätzt (Zeikus *et al.* 1999, Willke und Vorlop 2004).

### 3.5.3 Ansätze zur biotechnologischen Bernsteinsäureproduktion

Eine biotechnologische Succinatproduktion basiert darauf, dass Succinat im Citrat-Zyklus als Intermediat des aeroben Stoffwechsels beziehungsweise bei einigen Mikroorganismen als ein Endprodukt des anaeroben Stoffwechsels auftritt. Basierend auf der Elektronenbilanz können theoretisch aus 1 mol Glucose 1,71 mol Succinat gebildet werden und bei der zusätzlichen Verwendung von Reduktionsmitteln wie Wasserstoff  $2 \text{ mol}_{\text{Succinat}} \text{ mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$  (McKinlay *et al.* 2007).

Zur Etablierung einer industriellen biotechnologischen Bernsteinsäureproduktion existieren zwei Ansätze. Der erste Ansatz ist die Suche nach natürlichen, stark Bernsteinsäure sekretierenden Mikroorganismen. Der zweite Ansatz ist die Konstruktion eines rekombinanten Bernsteinsäureproduzenten basierend auf einem in der Weißen Biotechnologie etablierten Plattformorganismus mittels "Metabolic Engineering" (McKinlay *et al.* 2007). Der Begriff "Metabolic Engineering", umfasst die sowohl gentechnische Modifikation von enzymatischen Prozessen als auch Transport- oder regulatorischen Prozessen der Zelle, um eine zielgerichtete Verbesserung zellulärer Eigenschaften, beispielsweise einer Produktbildung zu erzielen (Bailey 1991).

#### Natürliche Bernsteinsäureproduzenten

Die Mehrzahl der bislang isolierten und beschriebenen Mikroorganismen, die Bernsteinsäure natürlich unter anaeroben Bedingungen als Hauptgärprodukt in hoher Konzentration bilden, wurden aus dem Rumen von Wiederkäuern isoliert. Zu diesen Bernsteinsäureproduzenten zählen *Actinobacillus succinogenes*, *Mannheimia succiniproducens* oder *Basfia succiniciproducens* (Guettler *et al.* 1999, Lee *et al.* 2002, Scholten und Dägele 2008). Auch aus anderen tierischen Verdauungssystemen konnten Succinatproduzenten wie beispielsweise *Anaerobiospirillum succiniciproducens* isoliert werden (Davis *et al.* 1976, Nghiem *et al.* 1997).

Für *A. succiniciproducens* und die Rumenbakterien *A. succinogenes* und *M. succiniproducens* ist beschrieben, dass unter anaeroben Bedingungen eine Succinatbildung über den reduktiven Zweig des Citrat-Zyklus unter Kohlendioxidfixierung erfolgt (Abbildung 3.7) (Samuelov *et al.* 1991, McKinlay *et al.* 2005, Lee *et al.* 2006). Die Succinatproduktion wird durch hohe Kohlendioxid- und Wasserstoffkonzentrationen begünstigt (Samuelov *et al.* 1991). Auf Grund der engen Verwandtschaft von *B. succiniciproducens* zu *M. succiniproducens* kann auch für *B. succiniciproducens* der oben beschriebene Weg zur Succinatbildung angenommen werden (Scholten und Dägele 2008).

Das über Kohlendioxidfixierung aus Phosphoenolpyruvat (PEP) gebildete Oxalacetat wird über Malat und Fumarat zu Succinat umgesetzt, wobei 2 mol NADH pro mol Succinat

benötigt werden. Über die Glycolyse werden beim Abbau von 1 mol Glucose zu 2 mol PEP jedoch nur 2 mol NADH generiert. Daher können auf dem fermentativen Weg Ausbeuten von bis zu  $2 \text{ mol}_{\text{Succinat}} \text{ mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$  nur erzielt werden, wenn Wasserstoff als Reduktionsmittel verfügbar ist. Allerdings führt der Einsatz von Wasserstoff zu einem erhöhten Sicherheits- und Kostenaufwand. Praktisch reduziert sich die Ausbeute daher auf  $1 \text{ mol}_{\text{Succinat}} \text{ mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$ , wenn die Reduktionsäquivalente ausschließlich aus der Glycolyse stammen (McKinlay *et al.* 2007, Cox *et al.* 2006).

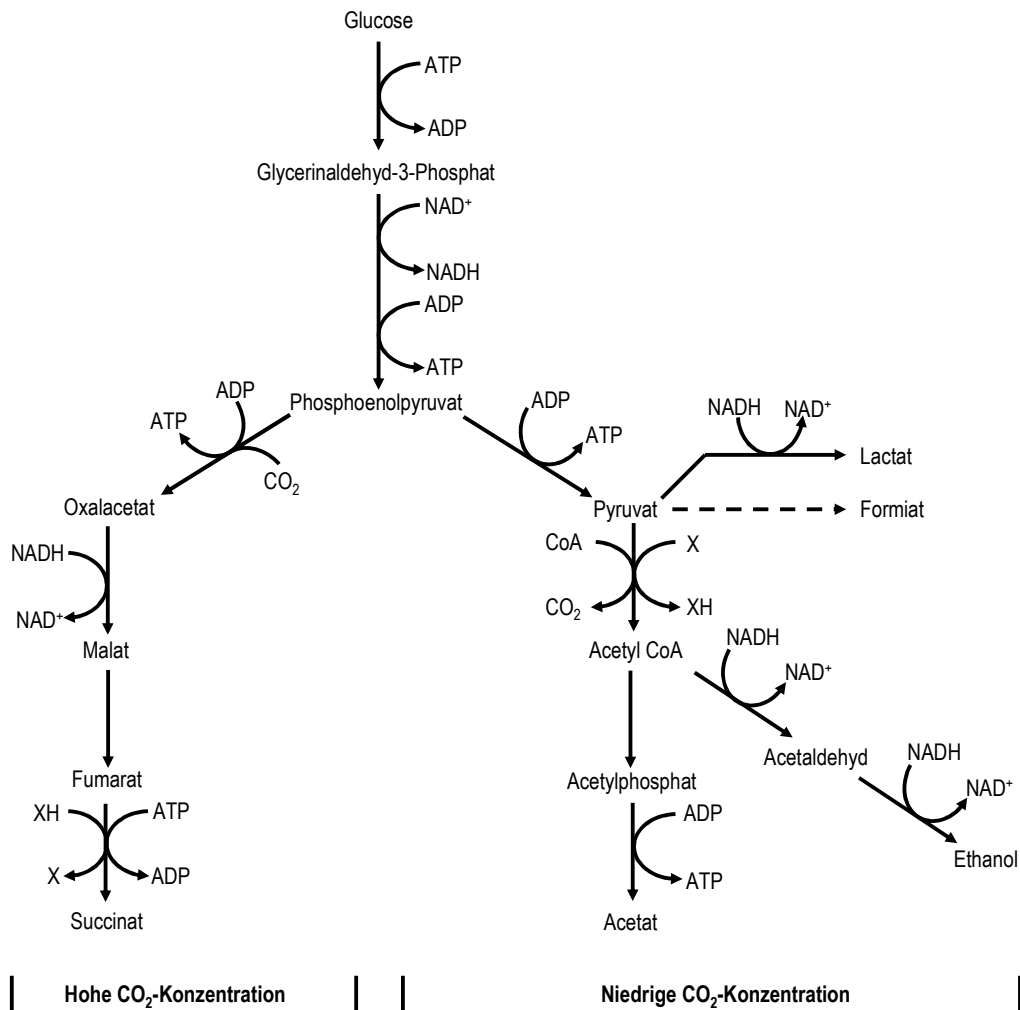


Abbildung 3.7: Reduktive Succinatbildung der natürlichen Bernsteinsäureproduzenten *Anaerobiospirillum succiniciproducens* und den Rumenbakterien *Actinobacillus succinogenes* und *Mannheimia succiniproducens* ausgehend von Glucose (Samuelov *et al.* 1991).

Tabelle 3.6 gibt einen Überblick über die erzielten Produktkonzentrationen, Produktivitäten und Ausbeuten der natürlichen Bernsteinsäureproduzenten.

Tabelle 3.6: Vergleich der Ansätze zur biotechnologischen Bernsteinsäureproduktion aus Glucose (wt: Wildtyp, m: durch Selektionsdruck erzeugte spontane Mutante, rek: rekombinant)

Mikroorganismus		End- konzentration, g L <sup>-1</sup>	Aus- beute, g g <sup>-1</sup> (mol mol <sup>-1</sup> )	Neben- produkte, g L <sup>-1</sup>	Kultivierungs- bedingungen	Quelle
<i>Anaerobiospirillum succiniciproducens</i> ATCC 53488	wt	50	0,90 (1,37)	Acetat: 14, Formiat: 1	anaerob, Satzverfahren, Komplexmedium	Glassner und Datta 1992
<i>Actinobacillus succinogenes</i> 130Z	wt	44	0,84 (1,28)	Pyruvat: 7, Acetat: 4, Formiat: 1,	anaerob, Satzverfahren, Komplexmedium	Guettler <i>et al.</i> 1996a
<i>Actinobacillus succinogenes</i> FZ53	m	106	0,83 (1,27)	Acetat: 18, Pyruvat: 2, Formiat: 1, Propionat: 2	anaerob, Satzverfahren, Komplexmedium	Guettler <i>et al.</i> 1996b
<i>Mannheimia succiniciproducens</i> MBEL55E	wt	14	0,68 (1,04)	Acetat: 7, Formiat: 7	anaerob, Satzverfahren, Komplexmedium	Lee <i>et al.</i> 2002
<i>Mannheimia succiniciproducens</i> LPK7; <i>ldhA::KmR</i> <i>fib::CmR</i> <i>ptaackA::SpR</i>	rek	52	0,76 (1,16)	Malat: 12, Pyruvat: 12	anaerob, Zulaufverfahren (intermittierend), Komplexmedium	Lee <i>et al.</i> 2006
<i>Basfia succiniciproducens</i> DD1	wt	6	0,60 (0,92)	Acetat:3, Formiat:1	anaerob, Satzverfahren, Komplexmedium	Scholten und Dägele 2008
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ; $\Delta$ <i>ldhA</i> - pCRA717	rek	146	0,92* (1,40*)	Acetat: 16	aerobe Anzucht, Satzverfahren, Komplexmedium, Zellaufkonzentrierung, anaerobe Produktion, Zulaufverfahren (intermittierend), definiertes Medium	Okino <i>et al.</i> 2008

Mikroorganismus	End- konzentration, g L <sup>-1</sup>	Aus- beute, g g <sup>-1</sup> (mol mol <sup>-1</sup> )	Neben- produkte, g L <sup>-1</sup>	Kultivierungs- bedingungen	Quelle
<i>Escherichia coli</i> JCL1208(pPC201); pepc+	rek 11	0,45 (0,69)	Ethanol: 7, Acetat: 5, Lactat: 4, Formiat: 1	anaerob, Satzverfahren, Komplexmedium	Millard <i>et al.</i> 1996
<i>Escherichia coli</i> AFP111/pTrc99A- pyc; $\Delta pflAB::CmR$ $\Delta dhA::$ $KmR$ ptsG- pyc+	rek 99	1,17* (1,78*)	Acetat: 10, Ethanol: 5	aerobe Anzucht, Zulaufverfahren, Komplexmedium: anaerobe Produktion, Zulaufverfahren, Komplexmedium	Vemuri <i>et al.</i> 2002b
<i>Escherichia coli</i> SBS550MG/pHL413; $\Delta adhE$ $\Delta dhA$ , $\Delta iclR$ $\Delta ack-pta::CmR$ pyc+	rek 40	1,05* (1,60*)	Formiat: 2, Acetat: 1	aerobe Anzucht, Satzverfahren Komplexmedium; Zellaufkonzentrierung; anaerobe Produktion, Zulaufverfahren, (intermittierend), Komplexmedium	Sánchez <i>et al.</i> 2005
<i>Escherichia coli</i> HL27659k/pKK313; $\Delta sdhAB$ $\Delta ackA-pta$ $\Delta poxB$ $\Delta iclR$ $\Delta ptsG$ pyc+	rek 58	0,66 (1,01)	Pyruvat: 6, Acetat: 3	aerob, Zulaufverfahren, Komplexmedium	Lin <i>et al.</i> 2005b

\* Bei zweistufigen Prozessen mit Anzuchtphase bezieht sich die angegebene Ausbeute nur auf die Produktionsphase.

*B. succiniciproducens* ist in der Lage Rohglycerin statt Glucose zur Succinatproduktion zu verwenden, wodurch auch die Nebenproduktbildung von Acetat und Lactat absinkt. Daher ist dieser Organismus trotz der geringen Succinatproduktion aus Glucose ein potentieller Kandidat zur industriellen Succinatproduktion (Scholten und Dägele 2008, Scholten *et al.* 2009).

Trotz hoher natürlicher Produkttiter und guter Produktivitäten beschränken mehrere Faktoren den industriellen Einsatz der natürlichen Bernsteinsäureproduzenten. Bei allen natürlichen Bernsteinsäureproduzenten werden unerwünschte Nebenprodukte erzeugt (Acetat, Formiat, ...). Organische Säuren als Nebenprodukte erschweren jedoch die Aufreinigung der Bernsteinsäure (Kurzrock und Weuster-Botz 2009). Eine gezielte Optimierung durch Metabolic Engineering bezüglich der Nebenproduktbildung durch Deletionen ist bislang lediglich für *M. succiniproducens* beschrieben (Lee *et al.* 2006).

*B. succiniciproducens* zeigt unerwünschtes Wandwachstum in Reaktoren (Scholten *et al.* 2009). *Anaerobiospirillum succiniciproducens* ist strikt anaerob und bereits geringste Mengen an Sauerstoff können zu genetischen Instabilitäten führen (Nghiem *et al.* 1997, Lin *et al.* 2005c). Strikt anaerobe Kultivierungen sind im industriellen Maßstab nur mit großem Aufwand umzusetzen. *A. succiniciproducens* wächst nur bis 70 g L<sup>-1</sup> Glucose im Medium und der Metabolismus wird bei 96 g L<sup>-1</sup> Natriumsuccinat im Medium vollständig inhibiert (Guettler *et al.* 1996a). Zudem kann *A. succiniciproducens* bei immunreprimierten Menschen zu Infektionen führen (McNeil *et al.* 1987). Die Rumenbakterien *A. succinogenes*, *M. succiniproducens* und *B. succiniciproducens* sind eng verwandt mit bekannten Pathogenen wie *Actinobacillus pleuropneumonia* und *Haemophilus influenza* (McKinlay *et al.* 2007). Für *A. succinogenes* und *M. succiniproducens* wird bei Hong *et al.* (2004) und McKinlay *et al.* (2007) beschrieben, dass viele Virulenzgene im Vergleich zu den pathogenen Verwandten modifiziert sind. Es wurden noch keine Erkrankungen durch diese Mikroorganismen beschrieben, dennoch fehlt der Beweis der Apathogenität.

Generell ist bei allen vier genannten natürlichen Succinatproduzenten das Wissen über die Physiologie und den Stoffwechsel gering und lückenhaft und es sind keine oder erst seit kurzem Genomsequenzen und erste gentechnische Methoden verfügbar. Zudem fehlen die Erfahrungen bezüglich eines großtechnischen industriellen Einsatzes (McKinlay *et al.* 2007).



### **Metabolic Engineering von industriellen Plattformorganismen**

Die oben genannten Nachteile umgeht der zweite Ansatz zur mikrobiellen Bernsteinsäureproduktion. Der Stoffwechsel von bereits industriell etablierten und umfassend charakterisierten Mikroorganismen, deren natürliche Succinatbildung gering ist, wird per Metabolic Engineering in Richtung Succinat umgelenkt. Bislang wurde dieser Ansatz für zwei prokaryontische Plattformorganismen publiziert: *Escherichia coli* und *Corynebacterium glutamicum*. Bei beiden wurden zunächst rekombinante Mikroorganismen für die anaerobe Succinatproduktion beschrieben, die wie die Rumenbakterien Succinat über den reduktiven Zweig des Citrat-Zyklus im Rahmen einer gemischten Säuregärung bilden. Im Gegensatz zu den Rumenbakterien konnte durch umfassende Kenntnisse der Stoffwechselwege, die Verfügbarkeit von gentechnischen Werkzeugen und der Genomsequenz eine Nebenproduktbildung in den Stämmen durch eine gezielte Deletion der entsprechenden Wege weitestgehend unterbunden und die für die reduktive Succinatbildung essentielle Kohlendioxidfixierung durch homo- und heterologe Überexpressionen gestärkt werden.

#### ***Corynebacterium glutamicum***

*C. glutamicum* ist ein aerobes Bakterium, das zur großtechnischen Produktion von Aminosäuren wie Glutamat und Lysin eingesetzt wird. Dass industrielle Stämme von *C. glutamicum* bis zu  $150 \text{ g L}^{-1}$  Natriumglutamat produzieren und tolerieren, zeigt die Unempfindlichkeit von *C. glutamicum* gegenüber hohen Ionenstärken (Zeikus *et al.* 1999, Pfefferle 2003, Ikeda 2003). Allerdings ist *C. glutamicum* empfindlich gegenüber einem niedrigen pH (Follmann *et al.* 2009). Unter anaeroben Bedingungen wurde kein Wachstum beschrieben, allerdings kann *C. glutamicum* unter anoxischen Bedingungen Glucose zu der organischen Säure Lactat als Hauptprodukt sowie geringen Mengen an Succinat und Acetat umsetzen (Inui *et al.* 2004). Mit einem Stamm mit Deletion der Lactat-Dehydrogenase und Überexpression der Pyruvat-Carboxylase erzielten Okino *et al.* (2008) eine Succinatkonzentration von  $146 \text{ g L}^{-1}$  unter anaeroben Bedingungen (Tabelle 3.6). Die Zellen wurden nach einer aeroben Anzucht abgetrennt und aufkonzentriert, um sie für die Produktionsphase zu nutzen. Die anaeroben Umsetzungen von Glucose zu Succinat sind bislang ausschließlich für pH-geregelte "leicht gerührte Flaschen" dokumentiert. Bislang sind für die Succinatproduktion mit *C. glutamicum* keine reaktionstechnischen Daten verfügbar.

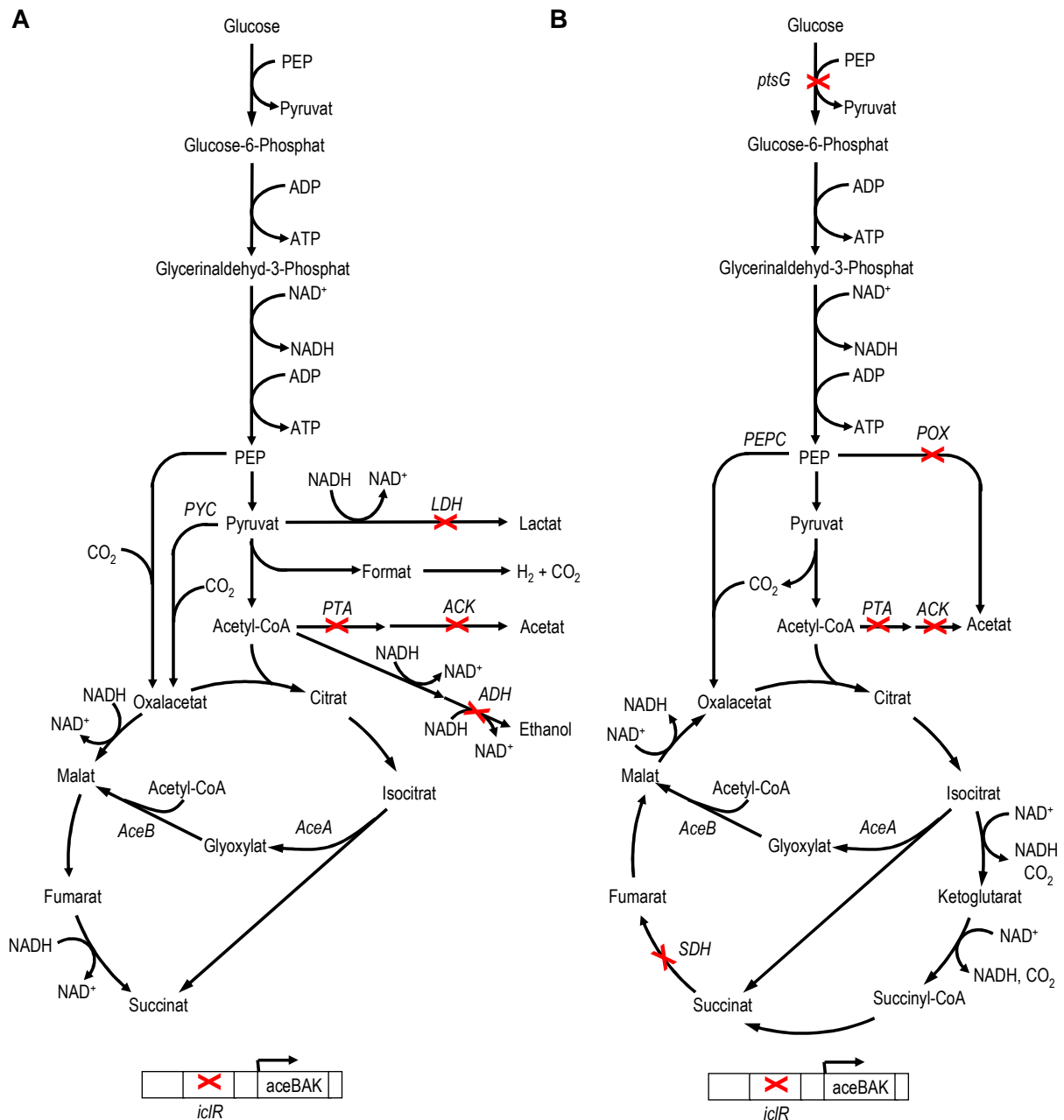
#### ***Escherichia coli***

*E. coli* bildet im Rahmen der gemischten Säuregärung unter anaeroben Bedingungen Lactat, Acetat, Ethanol und Succinat (Clark 1989). Eine Erhöhung der anaeroben Succinatproduktion wurde durch eine Verstärkung der Kohlendioxidfixierung zur Erhöhung

der intrazellulären Oxalacetatkonzentration erzielt, beispielsweise durch die Überexpression der homologen PEP-Carboxylase (PEPC) oder PEP-Carboxykinase (PEPCK) oder der heterologen Pyruvat-Carboxylase (PYC) aus *Lactococcus lactis* oder *Rhizobium etli*, der PEPC aus *Sorghum vulgare* oder der PEPCK aus *Actinobacillus succinogenes* (Millard *et al.* 1996, Lin *et al.* 2005e, Gokarn *et al.* 2001, Kim *et al.* 2004). Weitere Verbesserungen wurden durch Erhöhung der Konzentration an Pyruvat durch Deletion der Lactat-Dehydrogenase (LDH) und Pyruvat-Formiat-Lyase (PFL) und der Konzentration an PEP durch Blockade des glucosespezifischen Phosphotransferasesystems (ptsG) erzielt (Donnelly *et al.* 1998, Chatterjee *et al.* 2001).

Neben rein anaeroben Prozessen wurden bei *E. coli* wie bei *C. glutamicum* auch zweistufige Prozesse mit einer vorgeschalteten aeroben Phase zur Biomassegenerierung beschrieben (Chatterjee *et al.* 2001, Vemuri *et al.* 2002a, Vemuri *et al.* 2002b). Bei Untersuchungen zum Übergang aus der aeroben Anzucht- in die anaerobe Produktionsphase wurde der Glyoxylat-Bypass als Weg zur Succinatbildung entdeckt (Vemuri *et al.* 2002a). Wie in *S. cerevisiae* dient der Glyoxylat-Zyklus in *E. coli* nativ zum Wachstum auf C<sub>2</sub>-Körpern wie Acetat und ist in Gegenwart von Glucose reprimiert (Kornberg 1966). Die Enzyme des Glyoxylat-Bypasses, Isocitrat-Lyase (*AceA*) und Malat-Synthase (*AceB*) sind im *aceBAK*-Operon zusammengefasst. Zudem wird von diesem Operon auch das regulatorische Enzym Isocitrat-Dehydrogenase-Kinase/Phosphatase (*AceK*) codiert, das die Isocitrat-Dehydrogenase durch eine Phosphorylierung reversibel inaktivieren kann, um den Fluss zwischen Citrat- und Glyoxylat-Zyklus zu steuern. Die Expression des *aceBAK*-Operons wird über einen transkriptionellen Repressor (*iclR*) reguliert (Maloy und Nunn 1982, Chung *et al.* 1988, LaPorte 1993).

Die Succinatbildung über den reduktiven Zweig des Citrat-Zyklus ist auf Grund der Redoxbilanz wie oben beschrieben in Abwesenheit von externen Reduktionsmitteln wie Wasserstoff auf  $1 \text{ mol}_{\text{Succinat}} \text{ mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$  limitiert. Durch die zusätzliche Nutzung des Glyoxylat-Zyklus auch unter anaeroben Bedingungen werden weitere Reduktionsäquivalente bereitgestellt und die maximale theoretische Ausbeute erhöht sich auf  $1,7 \text{ mol}_{\text{Succinat}} \text{ mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$  (Cox *et al.* 2006). Über diesen Ansatz wurde wie Tabelle 3.6 zeigt mit  $99 \text{ g L}^{-1}$  die bislang höchste Succinatkonzentration bei *E. coli* erreicht (Vemuri *et al.* 2002b). Von Sánchez *et al.* (2005) wurde der Glyoxylat-Bypass durch Deletion des Repressors des Glyoxylat-Operons konstitutiv aktiviert und die Nebenproduktbildung des Stammes durch weitere Deletionen (Alkohol-Dehydrogenase (ADH), Phosphotransacetylase (PTA), Acetat-Kinase (ACK)) minimiert. Den resultierenden für eine anaerobe Succinatbildung ausgelegten Stoffwechsels dieses *E. coli* Stammes zeigt Abbildung 3.8A.

Abbildung 3.8: Succinatproduktion mit *E. coli* unter Nutzung des Glyoxylat-Bypasses

A: *E. coli* Stamm aus Sánchez *et al.* (2005) zur anaeroben Succinatproduktion unter Nutzung des Glyoxylat-Bypass. Deletiert sind die Lactat-Dehydrogenase (LDH), die Phosphotransacetylase (PTA) und Acetat-Kinase (ACK) zur Unterbrechung der Acetatbildung und die Alkohol-Dehydrogenase (ADH) zur Minimierung der Nebenproduktbildung. Der Glyoxylat-Bypass ist durch Deletion des Repressors des Glyoxylat-Operons (*iclR*) konstitutiv aktiviert und es ist eine heterologe Pyruvat-Carboxylase (PYC) überexprimiert.

B: *E. coli* Stamm aus Lin *et al.* (2005d) zur aeroben Succinatproduktion unter Nutzung des Glyoxylat-Bypasses. Deletiert sind PTA, ACK und die Pyruvat-Oxidase (POX) zur Unterbrechung der Acetatbildung und die Succinat-Dehydrogenase (SDH). Der Glyoxylat-Bypass ist durch Deletion des Repressors des Glyoxylat-Operons (*iclR*) konstitutiv aktiviert und es ist eine heterologe PEP-Carboxylase (PEPC) überexprimiert.

Die bislang beschriebene anaerobe Prozessführung führt zu hohen Succinatkonzentrationen, aber auf Grund langsamer Wachstums- und Glucoseaufnahmeraten zu geringen Produktivitäten (Lin *et al.* 2005c). Bei den zweistufigen aerob-anaeroben Prozessen ist gerade der Zeitpunkt des Umschaltens und der Zustand der Zellen beim Umschalten ein kritischer Faktor des Prozesses, dessen industrielle Umsetzung problematisch ist (Wu *et al.* 2007, Vemuri *et al.* 2002a, Vemuri *et al.* 2002b). Zudem können bei anaeroben Prozessen Probleme mit der Redox-, sowie Energiebilanz auftreten, weshalb Lin *et al.* (2005b), Lin *et al.* (2005c) und Lin *et al.* (2005d) aerobe Succinatproduktionsprozesse als überlegen gegenüber der anaeroben Varianten einstufen und rekombinante *E. coli* Stämme zur aeroben Succinatproduktion konstruierten (Abbildung 3.8B). Auch bei *C. glutamicum* wird inzwischen an Stämmen zur aeroben Succinatproduktion gearbeitet (Litsanov *et al.* 2009).

Bei dem von Lin *et al.* (2005d) für die aerobe Succinatbildung konstruierten *E. coli* wurde Succinat durch Deletion der Succinat-Dehydrogenase (SDH) zum Endprodukt des oxidativen Zweigs des Citrat-Zyklus und durch die Deletion des Repressors des Glyoxylat-Operons (*iclR*) wurde der Glyoxylat-Bypass als Route zur Succinatbildung etabliert.

Bei *E. coli* akkumuliert unter aeroben Bedingungen bei hohen Wachstumsraten Acetat als Nebenprodukt (Luli und Strohl 1990). Durch Deletion der Pyruvat-Oxidase (POX), Acetat-Kinase (ACK) und Phosphat-acetyltransferase (PTA) wurde die Acetatbildung unterbrochen. Zudem wurde eine PEPC zur Kohlendioxidfixierung überexprimiert (Lin *et al.* 2005d). Dieser Ansatz zur aeroben Succinatproduktion, der in Abbildung 3.8B zusammengefasst ist, war erfolgreich. Mit dem resultierenden Stamm wurde die unter aeroben Bedingungen maximale theoretische Ausbeute von  $1 \text{ mol}_{\text{Succinat}} \text{ mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$  und eine Succinatproduktion von  $58 \text{ g L}^{-1}$  erzielt (Lin *et al.* 2005b).

Limitierend für eine industrielle Umsetzung einer Succinatproduktion mit *E. coli* bleibt die geringe pH- und Osmotoleranz sowie Empfindlichkeit gegenüber organische Säuren dieses Mikroorganismus (Warnecke und Gill 2005, Luli und Strohl 1990, Zeikus *et al.* 1999).

### **Anforderungen an eine industrielle biotechnologische Bernsteinsäureproduktion**

Die Herausforderung bei der nachhaltigen biotechnologischen Produktion von Bernsteinsäure besteht in den nächsten Jahren vor allem darin, die Produktionskosten soweit zu senken, dass die großtechnische Herstellung von "Bio-Bernsteinsäure" als Plattformchemikalie wettbewerbsfähig wird. Der Marktpreis für petrochemisch produzierte Bernsteinsäure beträgt abhängig von der Reinheit 5,9 - 8,8 US-\$  $\text{kg}^{-1}$ , wobei die Herstellungskosten etwa 1 US-\$  $\text{kg}^{-1}$  betragen (Song und Lee 2006).

Ein entscheidender Faktor sind die Rohstoffkosten. Während bei der wissenschaftlichen Untersuchung der mikrobiellen Bernsteinsäureproduktion vor allem Glucose als Substrat genutzt wird und die reinen Materialkosten für die mikrobielle Succinatproduktion aus Glucose auf 0,4 US-\$  $\text{kg}^{-1}$  abgeschätzt wurden (Song und Lee 2006), müssten industrielle

Prozesse aus Kostengründen Hydrolysate Stärke-, Cellulose- oder Lignocellulosehaltiger Agrarrohstoffe als Substrate einsetzen. Die Produktionsorganismen müssen in der Lage sein, sich an diese billigen Substrate, die häufig inhibitorische Substanzen enthalten, zu adaptieren, zu wachsen und aus den darin enthaltenen Substraten Bernsteinsäure zu produzieren (Patel 2006, Palmqvist und Hahn-Hagerdal 2000). Publiziert ist beispielsweise bereits die Verwendung von Strohhydrolysaten bei *A. succinogenes* (Zheng *et al.* 2009) und von Lignocellulosehydrolysaten bei *E. coli* (Hodge *et al.* 2009).

Zudem muss die Produktivität der Bernsteinsäureherstellung auf bis zu  $2,5 - 5 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  erhöht werden (Patel 2006, McKinlay *et al.* 2007) und eine Produktkonzentration über  $100 \text{ g L}^{-1}$  bei minimierter Nebenproduktbildung erreicht werden, um eine effiziente Aufreinigung zu ermöglichen (Patel 2006, Werpy und Petersen 2004, McKinlay *et al.* 2007). Es wird aktuell geschätzt, dass über 60 % der Herstellungskosten von der Produktabtrennung und Aufreinigung verursacht werden (Bechthold *et al.* 2008). Wie Tabelle 3.6 verdeutlicht, zeigen die bislang zur Succinatproduktion isolierten oder konstruierten Mikroorganismen eine signifikante Nebenproduktbildung, wobei besonders die organischen Säuren als Nebenprodukte die Aufreinigung von Succinat erschweren (Kurzrock und Weuster-Botz 2009). Zudem erfordern alle Prozesse eine Neutralisation, da die eingesetzten Mikroorganismen nicht pH-tolerant sind, wodurch zusätzliche Kosten für das Titrationsmittel anfallen und in der Aufarbeitung ein zusätzlicher Schritt erforderlich wird, um das Succinatsalz zu Bernsteinsäure umzusetzen (Patel 2006).

## 4 Ansätze zur Bernsteinsäureproduktion mit *Saccharomyces cerevisiae*

Im Rahmen dieses Vorhabens wurde die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* als Kandidat für die mikrobielle Succinatproduktion evaluiert. Dieses Kapitel stellt das Metabolic Engineering Konzept vor, das von der Firma ORGANOBALANCE GmbH (Berlin) molekularbiologisch umgesetzt wurde.

### 4.1 *Saccharomyces cerevisiae* als Kandidat für die mikrobielle Bernsteinsäureproduktion

*S. cerevisiae* ist ein industriell etablierter, robuster Produktionsorganismus in der Weißen Biotechnologie und ein attraktiver Kandidat zur Entwicklung neuer biotechnologischer Prozesse zur Herstellung von Basischemikalien wie Succinat (Hansen und Kielland-Brandt 1996, Ostergaard *et al.* 2000b, Abbott *et al.* 2009). Im Gegensatz zu den bislang vorgestellten Ansätzen zur Bernsteinsäureproduktion mit Prokaryonten, die auf Grund der pH-Empfindlichkeit dieser Mikroorganismen pH-geregelt erfolgen müssen, kann bei *S. cerevisiae* eine Prozessführung auch bei niedrigem pH erfolgen. Dies ermöglicht zum einen eine Einsparung oder einen Verzicht auf Titrationsmittel und zum anderen eine einfache und somit kostengünstige Aufarbeitung der undissoziierten Säure. Eine Produktion bei niedrigem pH reduziert zudem das Kontaminationsrisiko. Zudem könnten billige Biomassehydrolysate als Substrate für die Bernsteinsäureproduktion mit *S. cerevisiae* eingesetzt werden, da *S. cerevisiae* als relativ tolerant gegenüber den in diesen Hydrolysaten enthaltenen Inhibitoren gilt (Nevoigt 2008, Abbott *et al.* 2009).

Succinat ist bei Wildtypstämmen von *S. cerevisiae* eines der Nebenprodukte des Gärstoffwechsels und tritt hierbei in Ausbeuten unter  $0,015 \text{ g}_{\text{Succinat}} \text{ g}_{\text{Glucose}}^{-1}$  auf. Da die Succinatbildung von *S. cerevisiae* Wildtypstämmen zu gering für eine industrielle Succinatproduktion ist, muss eine gezielte Umlenkung der Stoffflüsse in Richtung Succinat durch gentechnische Modifikationen erfolgen.

### 4.2 Überblick über das gewählte Grundkonzept

Dieses Kapitel stellt das gewählte Grundkonzept zur Succinatbildung vor und zieht einen Vergleich mit den bereits erfolgreich umgesetzten und in Kapitel 3.5.3 beschriebenen Metabolic Engineering Ansätzen zur aeroben und anaeroben Succinatproduktion mit Prokaryonten.

### **Anaerobe versus aerobe Prozessführung zur Succinatproduktion**

Die Mehrheit der bislang publizierten Succinatproduktionsprozesse läuft anaerob (McKinlay *et al.* 2007). Eine ausschließlich anaerobe Prozessführung zur Succinatproduktion kann allerdings auf Grund langsamer Wachstums- und Glucoseaufnahmeraten zu geringen Produktivitäten führen (Lin *et al.* 2005c). Zudem können Probleme mit der Redox-, sowie Energiebilanz auftreten.

Bei *S. cerevisiae* sprechen weitere Aspekte gegen eine anaerobe Succinatproduktion. So zeigen *C. glutamicum* und *E. coli* unter anaeroben Bedingungen eine gemischte Säuregärung, deren Produkte unter anderem Lactat, Succinat und Acetat sind. Bei der anaeroben Succinatproduktion mit diesen Organismen kann die Bildung unerwünschter organischer Säuren durch Deletion der entsprechenden Enzyme unterbrochen werden (Sánchez *et al.* 2005, Okino *et al.* 2008). Bei *S. cerevisiae* sind bei der anaeroben Verstoffwechslung von Glucose, wie Tabelle 3.3 zeigt, Ethanol gefolgt von Glycerin die Hauptprodukte des Stoffwechsels. Für eine effiziente Succinatbildung unter anaeroben Bedingungen müsste die Bildung von Ethanol und Glycerin unterbunden werden.

### **Ansätze zur Unterbindung der Ethanolbildung bei *S. cerevisiae***

In *S. cerevisiae* sind fünf Alkohol-Dehydrogenasen (*ADH1-ADH5*) bekannt, die die Reaktion von Acetaldehyd zu Ethanol katalysieren. Drewke *et al.* (1990) zeigten, dass bei einer simultanen Deletion von *ADH1*, *ADH2*, *ADH3* und *ADH4* in aeroben Satzexperimenten mit Glucose die Ethanolbildung nur verringert, aber nicht unterbunden ist. Zudem kam es hierbei zu einer Akkumulation von Glycerin und Acetaldehyd, welches toxisch für die Zellen ist. Eine Blockade der Ethanolbildung durch Deletion der Alkohol-Dehydrogenasen ist somit nicht zielführend.

Statt den zweiten Schritt der alkoholischen Gärung zu blockieren, besteht der zweite Ansatz darin bereits die Bildung von Acetaldehyd zu unterbinden. Dies blockiert allerdings auch den PDH-Bypass, über den auf Grund der beschränkten Kapazität der PDH in *S. cerevisiae* bei hohen Glucosekonzentrationen einen großer Teil der Bildung von Acetyl-CoA erfolgt.

*S. cerevisiae* besitzt drei Pyruvat-Decarboxylasen (*PDC1*, *PDC5* und *PDC6*). Flikweert *et al.* (1996) beschrieben eine simultane Deletion dieser drei Enzyme. Im Komplexmedium mit Glucose erfolgte ein um Faktor 3 geringeres Wachstum gegenüber dem Wildtyp und eine Pyruvatakkumulation. Allerdings wuchs dieser PDC-Deletionsstamm nicht in definierten Medien mit Glucose als Kohlenstoffquelle, so dass dieser Ansatz nicht zielführend war. Das fehlende Wachstum wurde auf die Rolle der Pyruvat-Decarboxylase bei der Bereitstellung von cytosolischen Acetyl-CoA für die Fettsäurebiosynthese zurückgeführt (Flikweert *et al.* 1996).

### Ansätze zur Unterbindung der Glycerinbildung

Das zweithäufigste Gärprodukt Glycerin spielt eine wichtige Rolle in der Redoxbilanz und der Osmoregulation und -toleranz der Hefe. Bei einer Unterbrechung der Glycerinbildung durch Deletion der beiden Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenasen, *GPD1* und *GPD2*, erfolgt kein Wachstum unter anaeroben Bedingungen und die Stämme sind osmosensitiv (Ansell *et al.* 1997). Auch eine Blockade der Glycerinbildung ist somit nicht zielführend im Hinblick auf eine Bernsteinsäureproduktion.

Auf Grund der oben genannten Problempunkte einer anaeroben Succinatproduktion mit *S. cerevisiae* und den generellen Vorteilen aerober Succinatproduktionsprozesse wurde im Rahmen dieses Forschungsvorhabens ein Konzept zur aeroben Succinatbildung mit *S. cerevisiae* verfolgt.

### Betrachtung der Stoffwechselwege zum Succinat in *S. cerevisiae*

Die Succinatbildung kann theoretisch über den reduktiven oder oxidativen Zweig des Citrat-Zyklus und über den Glyoxylat-Zyklus erfolgen (siehe Abbildung 3.2). Über den reduktiven Zweig des Citrat-Zyklus wurde eine aerobe Malatproduktion mit rekombinanten *S. cerevisiae* Stämmen beschrieben und patentiert (Zelle *et al.* 2008, Abbott *et al.* 2009, Winkler *et al.* 2008). Als Basis wurde eine zufällige Mutante des bei Flikweert *et al.* (1996) beschriebenen PDC-defizienten Stammes genutzt, die wieder in der Lage war in definierten Medien mit Glucose als Kohlenstoffquelle zu wachsen. In dieser wurden die Enzyme *PYC2* und *MDH3* überexprimiert. Auf diesem Weg konnten unter Kohlendioxidfixierung bis zu 40 g L<sup>-1</sup> der Dicarbonsäure Malat produziert werden. Die Redoxbilanz bei der reduktiven Malatbildung aus Glucose ist im Gegensatz zur Redoxbilanz der reduktiven Succinatbildung geschlossen. Aus Malat kann reduktiv über Fumarat Succinat gebildet werden. Im Gegensatz zu den Enzymen von *E. coli* oder *C. glutamicum* ist bei der Fumarase von *S. cerevisiae* (*FUM1*) die Affinität zu Fumarat 17-fach höher als zu Malat, wodurch das thermodynamische Gleichgewicht der durch die Fumarase katalysierten Reaktion auf Seiten des Malats liegt. So konnte in rekombinanten Malat überproduzierenden *S. cerevisiae* Stämmen bei Überexpression der Fumarase kein Fumarat oder Succinat nachgewiesen werden (Pines *et al.* 1996).

In einer theoretischen Arbeit zum Thema "in silico Metabolic Engineering" von *S. cerevisiae* von Patil *et al.* (2005) wurden durch Stoffflussberechnungen unter Nutzung genomweiter metabolischer Modelle Deletionsstrategien zur Konstruktion eines Bernsteinsäureproduzenten identifiziert. Es wurde unter anderem der *S. cerevisiae* Deletionsstamm  $\Delta sdh3 \Delta ser3 \Delta ser33$  als potentieller Produktionsstamm vorhergesagt. Die Succinatbildung soll in diesem Stamm zum einen über den oxidativen Zweig des durch Deletion der Untereinheit



*SDH3* der Succinat-Dehydrogenase unterbrochenen Citrat-Zyklus erfolgen. Zum anderen soll die von der Isocitrat-Lyase (ICL) katalysierte Reaktion aus dem Glyoxylat-Zyklus zur Succinatbildung genutzt werden. Hierzu soll die Bildung der Aminosäure Serin aus dem Zwischenprodukt 3-Phosphoglycerat der Glycolyse durch Deletion der 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenasen, die durch die Isoenzyme *SER3* und *SER33* codiert werden (Albers *et al.* 2003), blockiert werden. Serin könnte dann in dem Deletionsstamm nur noch über Glycin gebildet werden, wobei Glycin wiederum größtenteils über die durch die Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase katalysierte Reaktion von Glyoxylat und Alanin zu Glycin und Pyruvat gebildet wird. In dem von Patil *et al.* (2005) identifizierten *S. cerevisiae* Deletionsstamm  $\Delta sdh3 \Delta ser3 \Delta ser33$  wäre somit die Biomassebildung direkt mit einer Succinatbildung gekoppelt und die Succinatbildung würde laut der Vorhersage über den oxidativen Zweig des Citrat-Zyklus und die ICL erfolgen.

### Ansatz in diesem Forschungsvorhaben

Auf Grund der Schwierigkeiten der reduktiven Succinatbildung in *S. cerevisiae* wurde im Rahmen dieses Projektes ein Ansatz zur oxidativen Succinatbildung unter Nutzung des Glyoxylat-Zyklus gewählt. Abbildung 4.1 zeigt das Metabolic Engineering Konzept zur aeroben Bernsteinsäureproduktion mit *S. cerevisiae*.

Um Kohlenstoffverluste durch die Decarboxylierungsschritte des Citrat-Zyklus bei der Succinatbildung aus Glucose zu umgehen, soll die Succinatbildung über den Glyoxylat-Zyklus erfolgen. Die theoretische maximale Ausbeute auf diesem Weg liegt bei  $1 \text{ mol}_{\text{Succinat}} \text{ mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$ .

Vorteilhaft ist, dass die Reaktionen des Glyoxylat-Zyklus in *S. cerevisiae* im Gegensatz zum Citrat-Zyklus im Cytosol lokalisiert sind und somit eine Succinatbildung im Cytosol erzielt werden kann. Ergebnisse von Aliverdieva *et al.* (2006) weisen darauf hin, dass *S. cerevisiae* ein in der Plasmamembran lokalisiertes Transportprotein für Dicarboxylate besitzt, das nicht wie die meisten anderen Carboxylat-Transporter von Hefen protonengekoppelt, sondern Natrium-abhängig ist (Casal *et al.* 2008). Allerdings wurde dieser Transporter bei *S. cerevisiae* noch nicht identifiziert (Casal *et al.* 2008).

In anderen Hefen wie *Kluyveromyces lactis* oder *Schizosaccharomyces pombe* wurden bereits die Dicarboxylat-Permeasen, *KIJEN2* bzw. *SpMAE1*, identifiziert, die Succinat transportieren können (Casal *et al.* 2008). Die Überexpression von *SpMAE1* in den beschriebenen rekombinanten *S. cerevisiae* Stämmen zur Malat-Produktion erhöhte die Malatproduktion von  $40 \text{ g L}^{-1}$  auf über  $100 \text{ g L}^{-1}$  (Zelle *et al.* 2008). Da jedoch auch gezeigt wurde, dass auch ohne Überexpression eines Transporters für Dicarboxylate bis zu  $40 \text{ g L}^{-1}$  Malat sekretiert werden konnte, erfolgten im Rahmen dieses Projektes keine gentechnischen Modifikationen zur Erhöhung des Succinatexports.

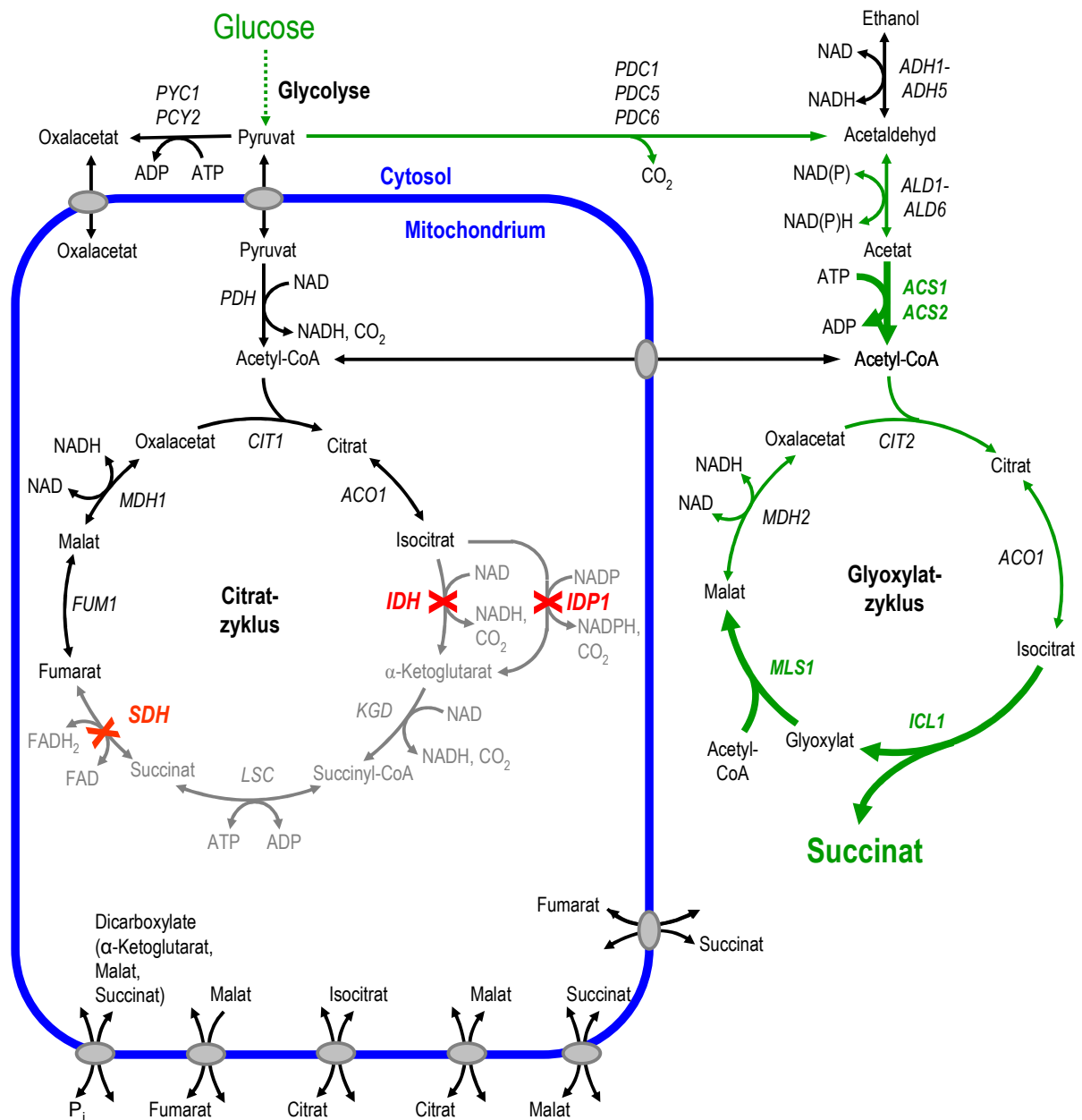


Abbildung 4.1: Ansatz zur aeroben Succinatproduktion mit der Hefe *S. cerevisiae*. Die Succinatbildung soll ausgehend von Glucose über den Glyoxylat-Zyklus erfolgen. Hierfür sollen die Schlüsselenzyme des Glyoxylat-Bypasses, *ICL1* und *MLS1*, dereguliert werden. Durch Überexpression der *ACS1* soll cytosolisches Acetyl-CoA für den Glyoxylat-Zyklus bereitgestellt werden. Der Kohlenstofffluss soll durch Blockade der Isocitratdehydrogenasereaktion (*IDH* und *IDP1*) in den Glyoxylat-Zyklus umgeleitet werden. Zudem soll der Abbau von Succinat durch Deletion der Succinat-Dehydrogenase (*SDH*) blockiert werden. Der angestrebte Weg zur Succinatbildung ist grün hervorgehoben. Deletionen sind mit roten Kreuzen und Überexpressionen durch dicke grüne Pfeile dargestellt.

Da der Glyoxylat-Zyklus wie die meisten anderen Gene des respirativen Zentralmetabolismus von *S. cerevisiae* in Anwesenheit von Glucose reprimiert ist (DeRisi *et al.* 1997), ist eine Deregulation des Glyoxylat-Zyklus erforderlich. Zu den Schlüsselenzymen des Glyoxylat-Zyklus zählen vor allem die beiden Enzyme Isocitrat-Lyase (ICL) und Malat-Synthase (MLS) die den Glyoxylat-Bypass bilden und zu denen keine Isoenzyme im Citrat-Zyklus existieren. Die ergänzende Deregulation einer Acetyl-CoA-Synthetase (ACS) soll effizient cytosolisches Acetyl-CoA für den Glyoxylat-Zyklus bereitstellen. Da Isocitrat-Dehydrogenasen eine deutlich höhere Affinität zu Isocitrat besitzen als die Isocitrat-Lyase (LaPorte 1993), muss neben der Überexpression der Schlüsselenzyme des Glyoxylat-Zyklus auch eine Ausschaltung der Isocitrat-Dehydrogenase-Aktivität erfolgen. Ein weiterer Ansatzpunkt ergänzend zur schrittweisen Deregulation durch einzelne Überexpressionen liegt in der Beeinflussung globaler Regulationsfaktoren wie beispielsweise *HAP4*. Um die Verstoffwechslung des gebildeten Succinats zu verhindern ist eine Deletion des abbauenden Enzyms Succinat-Dehydrogenase (SDH) aus dem Citrat-Zyklus notwendig. Da Deletionen im Zentralstoffwechsel zu deutlichen Wachstumseinbußen führen können (Zhao und McAlister-Henn 1996), wird auch die Möglichkeit einer zweistufigen Prozessführung mit Trennung von aerober Wachstums- und aerober Produktionsphase in Betracht gezogen.

### 4.3 Deletion der Succinat-Dehydrogenase

Die Succinat-Dehydrogenase (SDH) koppelt die Oxidation von Succinat zu Fumarat im Citrat-Zyklus mit der Reduktion von Ubichinon zu Ubichinol in die Atmungskette und ist somit ein Schlüsselenzym des Intermediärstoffwechsels und der aeroben Energiegewinnung. Der gesamte Citrat-Zyklus und somit auch die SDH sind in Abhängigkeit von Sauerstoff und der Kohlenstoffquelle transkriptionell reguliert.

Die SDH ist ein Heterotetramer, dessen Untereinheiten von den unabhängigen Genen *sdh1-sdh4* codiert werden. Die Untereinheiten *SDH1* und *SDH2* bilden das periphere membranassoziierte katalytische Dimer, das das aktive Zentrum, FAD und drei Eisen-Schwefel-Cluster enthält. Das katalytische Dimer wird durch das Membrandimer aus *SDH3* und *SDH4* an der inneren mitochondrialen Membran verankert (Lemire und Oyedotun 2002). Zu *sdh1* existiert ein homologes Gen (*sdh1b*), welches eine *sdh1*-Deletion teilweise kompensieren kann (Colby *et al.* 1998). Auch zu *sdh3* und *sdh4* existieren homologe, aber bislang nicht charakterisierte Gene (Lemire und Oyedotun 2002).

Zu den Effekten der Deletion einer oder mehrerer Untereinheiten existieren in der Literatur zahlreiche, allerdings wie im Folgendem dargestellt, zum Teil widersprüchliche Berichte.

### Wachstum auf fermentierbaren und nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen

Die Deletion einer oder mehrerer Untereinheiten der SDH führen zu geringen Auswirkungen bezüglich des respiro-fermentativen Wachstums mit Glucose (Kubo *et al.* 2000, Romano und Kolter 2005) und zu deutlichen Auswirkungen beim respirativen Wachstum auf nicht-fermentierbaren Substraten. So zeigen SDH-Deletionsstämme kein Wachstum auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen wie Ethanol, Acetat oder Pyruvat in definierten oder komplexen Medien (Przybyla-Zawislak *et al.* 1999, Dennis *et al.* 1999). Für Stämme mit Deletion der Untereinheit *SDH1*, *SDH2*, *SDH3* oder *SDH4* ist ein geringes Wachstum mit der nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle Glycerin bei Verwendung von Komplexmedium beschrieben (Ciriacy 1977, Robinson *et al.* 1991, Arikawa *et al.* 1999, Dennis *et al.* 1999, Daignan-Fornier *et al.* 1994, Kubo *et al.* 2000). *S. cerevisiae* Stämme mit Deletionen zweier katalytischer Untereinheiten ( $\Delta sdh2 \Delta sdh1$  oder  $\Delta sdh1 \Delta sdh1b$ ) zeigen kein Wachstum auf Glycerin in Komplexmedien (Kubo *et al.* 2000).

Dieses geänderte Wachstum der SDH-Deletionsstämme auf dem nicht vergärbaren Substrat Glycerin ist ein klassisches Verhalten von Stämmen mit Deletionen im Citrat-Zyklus, die sich zumeist nur im vollständig respirativen Stoffwechsel auswirken (Ciriacy 1977, McCammon 1996, Przybyla-Zawislak *et al.* 1999, Dennis *et al.* 1999).

Die einzige detaillierte reaktionstechnische Untersuchung von SDH-Deletionsstämmen befasst sich mit einem SDH3-Deletionsstamm (Cimini *et al.* 2009). Die SDH3-Mutante zeigte in einer aeroben Satzkultivierung mit Glucose in einem definierten Medium eine Wachstumsrate von 80 % des Wildtyps und eine um 80 % verminderte Sauerstoffaufnahme gegenüber dem Wildtyp.

Deletionen können auch das Expressionslevel anderer Gene beeinflussen. Bei Cimini *et al.* (2009) zeigte eine Transkriptionsanalyse einen repressiven Effekt der SDH3-Deletion auf Gene des Citrat-Zyklus und der Atmungskette. McCammon *et al.* (2003) wiesen mittels einer Transkriptomanalyse nach, dass sich bei einer Deletion einer der 4 Untereinheiten der SDH die Expressionslevel der übrigen drei Untereinheiten nicht ändern und die der übrigen Gene des Citrat-Zyklus um weniger als Faktor 2 beeinflusst werden.

Laut Arikawa *et al.* (1999) ist bei einer mit Glucose wachsenden SDH1-Deletionsmutante keine SDH-Aktivität nachzuweisen. Ciriacy (1977) wies bei einem SDH1-Deletionsstamm bei einer aeroben Kultivierung mit Ethanol in Komplexmedium weniger als 1 % der Wildtyp-SDH-Aktivität nach. Unter diesen Bedingungen wurde eine Sauerstoffaufnahme des SDH1-Deletionsstamm nachgewiesen und die Bestimmung der Aktivitäten einiger Enzyme des respirativen Stoffwechsels zeigte eine aktive Cytochrom c-Reductase (Komplex III der Atmungskette). Zudem waren in  $\Delta sdh1$  die Aktivitäten von ICL auf 64 % und von MLS auf 42 % reduziert (Ciriacy 1977). Robinson *et al.* (1991) zeigten, dass auch die Aktivität der

übrigen Enzyme der Atmungskette in  $\Delta sdh1$  Stämmen erhalten bleibt (aerober Satzversuch, Komplexmedium mit Glucose). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Atmung in  $\Delta sdh1$  oder  $\Delta sdh3$  Stämmen eingeschränkt, aber vorhanden ist.

Von Kubo *et al.* (2000) wurden systematisch alle Einzeldelationen der Untereinheiten der SDH erzeugt und verglichen (Abbildung 4.2). Laut Kubo *et al.* (2000) führt eine Deletion der SDH1-Untereinheit nicht zu einem vollständigen Aktivitätsverlust der SDH (Abbildung 4.2) und es ist erst bei Deletion beider katalytischer Untereinheiten keine SDH-Aktivität mehr nachweisbar.

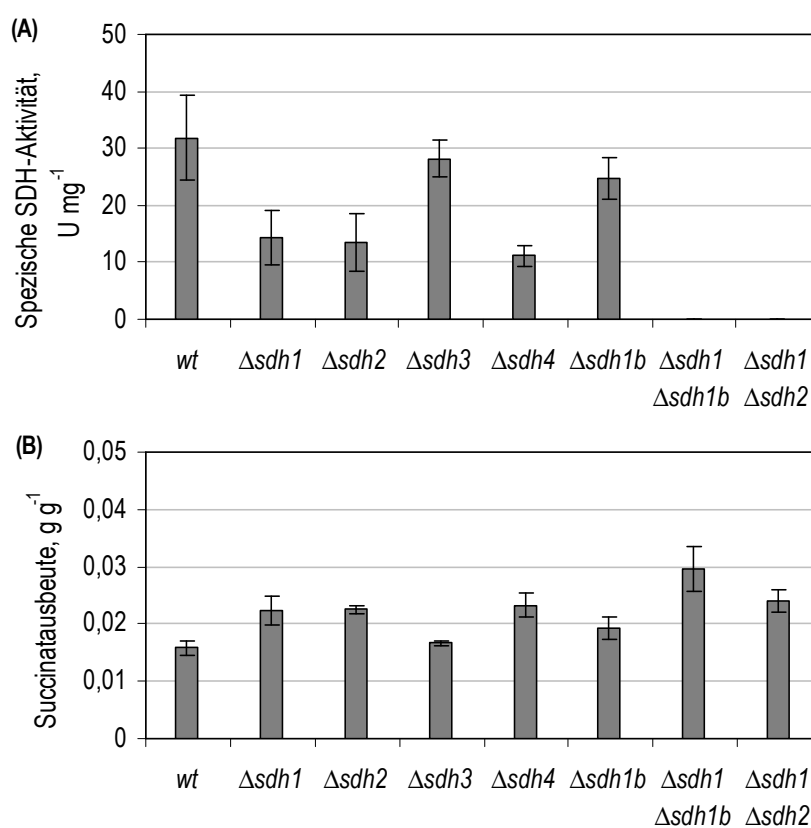


Abbildung 4.2: Auswirkung der Deletion verschiedener Untereinheiten der SDH auf die spezifische SDH-Aktivität und die Succinatausbeute bei *S. cerevisiae* (Daten aus Kubo *et al.* 2000). A: Dargestellt sind die spezifischen Aktivitäten in U mg<sub>Protein</sub><sup>-1</sup> nach Deletion verschiedener Untereinheiten der SDH. Die SDH-Aktivitätstests erfolgten mit auf Fructose angezogenen Zellen. B: Succinatausbeuten aus einer Kultivierung der SDH-Deletionsstämmen im aeroben Satzverfahren in Komplexmedium mit 10 g L<sup>-1</sup> Glucose.

Dies widerspricht den Ergebnissen von Arikawa *et al.* (1999) und Ciriacy (1977). Bei Kubo *et al.* (2000) erfolgten SDH-Aktivitätstests im Gegensatz zu Ciriacy (1977) bzw. Arikawa *et al.* (1999) mit Zellen, die auf Fructose statt auf dem Standardsubstrat Glucose angezogen waren, um Glucoserepressionseffekte auf die SDH zu vermindern. Zudem erfolgte der

Zellaufschluß nur bei Kubo *et al.* (2000) in Gegenwart von Proteaseinhibitoren. Dies könnte die unterschiedlichen Aussagen von Kubo *et al.* (2000) gegenüber Ciriacy (1977) bzw. Arikawa *et al.* (1999) zum Funktionsverlust bei Deletion einer einzelnen Untereinheit erklären. Auch das leichte Wachstum der Einzeldelentionsstämmen auf dem nicht fermentierbaren Substrat Glycerin spricht für eine verbliebene SDH-Aktivität in Einzeldelentionsstämmen.

### **Succinatbildung von Succinat-Dehydrogenase-Deletionenstämmen**

Bis auf die SDH3-Untereinheit führten alle Einzeldelentionen und die Doppeldeletion von *SDH1* und *SDH2* oder *SDH1* und *SDH1b* in den Untersuchungen von Kubo *et al.* (2000) zu einer Erhöhung der Succinatausbeute (Abbildung 4.2). Auch Arikawa *et al.* (1999) beschreiben in Komplexmedium mit Glucose unter aeroben Bedingungen eine Erhöhung der Succinatausbeute um den Faktor 1,6 bei  $\Delta sdh1$  im Vergleich zum Wildtyp. Cimini *et al.* (2009) beschreiben eine erhöhte Succinatbildung mit einer Ausbeute von  $0,003 \text{ g}_{\text{Glucose}}^{-1}$  der SDH3-Mutante im definierten Medium mit Glucose unter aeroben Satzbedingungen. Für einen Hefestamm mit einer SDH1- oder SDH4-Deletion wurde durch Romano und Kolter (2005) eine gegenüber dem Wildtyp erhöhte Succinat- und Acetatbildung beobachtet, allerdings nicht weiter diskutiert.

Im Rahmen dieses Projektes wurden bei der ORGANOBALANCE GmbH zunächst Stämme mit alleiniger Deletion einer der katalytischen SDH-Untereinheiten konstruiert. Deletiert wurde zunächst das Gen *sdh2*, da zum *sdh1* Gen das Isogen *sdh1b* existiert, das einen Verlust der SDH1-Untereinheit teilweise kompensieren kann (Colby *et al.* 1998). Auf Grund der unklaren Datenlage aus der Literatur erfolgte im Weiteren zusätzlich auch die Deletion des Gens für die zweite katalytische Untereinheit *sdh1*.

## **4.4 Deletion von Isocitrat-Dehydrogenasen**

Neben der Blockade des Succinatabbaus soll eine Umleitung des Kohlenstoffflusses aus dem Citrat- in den Glyoxylat-Zyklus erfolgen, um die beiden Decarboxylierungsschritte des Citrat-Zyklus zu vermeiden. Hierfür muss die Isocitrat-Dehydrogenase-Aktivität ausgeschaltet werden, um die oxidative Decarboxylierung von Isocitrat zu  $\alpha$ -Ketoglutarat zu unterbinden. Da  $\alpha$ -Ketoglutarat für die Synthese von Glutamat benötigt wird, sind Zellen mit einem vollständigen Verlust der Isocitrat-Dehydrogenase-Aktivität glutamatauxotroph.

In *S. cerevisiae* existieren vier verschiedene Isocitrat-Dehydrogenasen, die sich in der Struktur ihrer Untereinheiten, Cofaktor-Spezifität, Lokalisation und Regulation unterscheiden (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Eigenschaften der Isocitrat-Dehydrogenase-Isoenzyme in *S. cerevisiae*.

Enzym	Gen(e)	Co-faktor	Lokalisierung	Expression	Quellen
<i>IDH</i>	<i>idh1</i> , <i>idh2</i>	NAD <sup>+</sup>	Mitochondrien	Glucose: gering nicht fermentierbare Kohlenstoffquellen: erhöht	Cupp und McAlister- Henn 1991, Cupp und McAlister-Henn 1992, Haselbeck und McAlister-Henn 1991, Keys und McAlister- Henn 1990
<i>IDP1</i>	<i>idp1</i>	NADP <sup>+</sup>	Mitochondrien	konstitutiv	Haselbeck und McAlister-Henn 1991
<i>IDP2</i>	<i>idp2</i>	NADP <sup>+</sup>	Cytosol	nicht fermentierbare Kohlenstoffquellen	Loftus <i>et al.</i> 1994
<i>IDP3</i>	<i>idp3</i>	NADP <sup>+</sup>	Peroxisomen	Fettsäuren als Kohlenstoffquelle	Henke <i>et al.</i> 1998

### NAD<sup>+</sup>-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase (IDH)

Die NAD<sup>+</sup>-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase ist ein Heterooctamer aus zwei Untereinheiten. Beide Untereinheiten sind essentiell für die katalytische Aktivität, wobei die regulatorische Funktion hauptsächlich bei der Untereinheit *IDH1* und die katalytische bei *IDH2* liegt (Cupp und McAlister-Henn 1991, Cupp und McAlister-Henn 1992, Cupp und McAlister-Henn 1993, Zhao und McAlister-Henn 1997). Obwohl die IDH unter keinen Wachstumsbedingungen einen großen Beitrag zur gesamten Isocitrat-Dehydrogenase-Aktivität der Zelle leistet, führt verglichen mit der Einzeldelation einer IDP eine Deletion der IDH zu dem deutlichsten Phänotypen bezüglich des Wachstums (Zhao und McAlister-Henn 1996). Die IDH unterliegt wie die übrigen Enzyme des Citrat-Zyklus der Glucoserepression und weist im Satzversuch mit Glucose ein fünffach geringeres Expressionslevel als mit nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen auf (Contreras-Shannon *et al.* 2005). Zudem sinkt die Expression der IDH unter Satzbedingungen nochmals um den Faktor 2 ab, wenn dem Medium Glutamat zugesetzt wird.

IDH-Deletionsstämme wachsen nicht auf Acetat, was ein typisches Verhalten für Stämme mit Deletionen im Citrat-Zyklus darstellt, und zeigen eine reduzierte Wachstumsrate mit Glucose (Przybyla-Zawislak *et al.* 1999, Haselbeck und McAlister-Henn 1993). Im Gegensatz zu SDH-Deletionsstämmen sind sie jedoch in der Lage, mit Ethanol und Glycerin zu wachsen (Przybyla-Zawislak *et al.* 1999). McCammon *et al.* (2003) wiesen mittels einer

Transkriptomanalyse nach, dass sich die Deletion einer der beiden IDH-Untereinheiten auf über 70 Gene auswirkt. In IDH-Deletionsstämmen wurde neben der *IDP1* zudem eine konstitutive Expression der in Wildtypstämmen glucosereprimierten *IDP2* in Gegenwart von fermentierbaren Zuckern wie Glucose und Galactose nachgewiesen (McCammon und McAlister-Henn 2003, Lin *et al.* 2008).

### **Die NADP<sup>+</sup>-abhängige Isocitrat-Dehydrogenasen (IDP)**

Die NADP<sup>+</sup>-abhängigen Isocitrat-Dehydrogenasen sind Homodimere (Haselbeck und McAlister-Henn 1991, Loftus *et al.* 1994, Henke *et al.* 1998). Da die IDP-Isoenzyme im Gegensatz zur IDH NADP<sup>+</sup>-abhängig sind und *S. cerevisiae* keine Transhydrogenase besitzt, können sie eine IDH-Deletion nicht vollständig kompensieren (Bruinenberg *et al.* 1983b, Bruinenberg *et al.* 1983a, Haselbeck und McAlister-Henn 1993). Wie Tabelle 4.1 zeigt, ist bei der Kultivierung mit Glucose als Kohlenstoffquelle von den drei IDP-Isoenzymen nur die *IDP1* aktiv. Das Expressionslevel der *IDP1* wird weder durch die Kohlenstoffquelle noch einen Zusatz von Glutamat beeinflusst (Contreras-Shannon *et al.* 2005).

Bei den ersten Untersuchungen von IDH-IDP1-Deletionsstämmen bezüglich der Glutamatauxotrophie erfolgten Kultivierungen für drei Tage auf Agarplatten (Haselbeck und McAlister-Henn 1993) oder einem Tag in Flüssigkulturen in einem definierten Medium mit Glucose (Zhao und McAlister-Henn 1996). Unter diesen Bedingungen war kein Wachstum detektierbar. Dies führte zum Schluss, dass die IDH-IDP1-Deletionsstämme glutamatauxotroph sind. In einer neueren Publikation zeigte sich durch veränderte Versuchsbedingungen (unter anderem höhere Startzellichte) ein äußerst geringes Wachstum von IDH-IDP1-Deletionsstämmen nach drei Tagen (McCammon und McAlister-Henn 2003), das mit der Deregulation des Enzyms *IDP2* durch eine Deletion der IDH zu erklären ist. Auf Grund des nur minimalen Wachstums des IDH-IDP1-Deletionsstammes ohne Glutamat ist die Einstufung als glutamatauxotroph dennoch gerechtfertigt und wird auch im Laufe dieser Arbeit so beibehalten.

Im Rahmen dieses Projekts wurde zunächst das Gen *idh1* deletiert, da die IDH-Deletion den deutlichsten Phänotyp hervorruft, und im weiteren ergänzend *idp1*, um die Isocitrat-Dehydrogenase-Aktivität bei Nutzung von Glucose als Kohlenstoffquelle weiter zu vermindern.

## **4.5 Überexpression der Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase**

Die oxidative Succinatbildung aus Glucose mit *S. cerevisiae* soll über den Glyoxylat-Zyklus statt über den Citrat-Zyklus laufen, um Ausbeuteverluste durch die oxidative Decarboxylierungsschritte des Citrat-Zyklus zu vermeiden.



Über den Glyoxylat-Zyklus werden 2 Moleküle Acetyl-CoA zu einem Molekül Succinat umgesetzt. Das dafür benötigte cytosolische Acetyl-CoA entsteht aus Acetat katalysiert durch eine Acetyl-CoA-Synthetase (ACS). Da die Gene des Glyoxylat-Zyklus wie die meisten anderen Gene des respirativen Zentralmetabolismus von *S. cerevisiae* in Anwesenheit von Glucose reprimiert sind (DeRisi *et al.* 1997, Gancedo 1998), ist eine Deregulation von Schlüsselenzymen des Glyoxylat-Zyklus erforderlich. Zu diesen Schlüsselenzymen zählen die beiden Enzyme, die den Glyoxylat-Bypass bilden und zu denen keine Isoenzyme im Citrat-Zyklus existieren. Die ICL und MLS sind laut Lorenz und Fink (2001) und Duntze *et al.* (1969) die bei einer Umstellung der Zellen auf den Glyoxylat-Zyklus am stärksten induzierten Enzyme innerhalb des Glyoxylat-Zyklus.

### **Überexpression der Isocitrat-Lyase**

Die Isocitrat-Lyase katalysiert den ersten spezifischen Schritt des Glyoxylat-Zyklus, die Spaltung von Isocitrat zu Succinat und Glyoxylat. Die Isocitrat-Lyase von *S. cerevisiae* ist ein durch das Gen *icl1* codiertes Homotetramer (Fernandez *et al.* 1992). Das stark homologe Enzym *ICL2* kann eine Deletion von *ICL1* nicht komplementieren (Heinisch *et al.* 1996), sondern besitzt eine 2-Methylisocitrat-Lyase-Funktion im Propionyl-CoA-Stoffwechsel (Luttik *et al.* 2000). Daher wurde in diesem Projekt das Enzym *ICL1* überexprimiert.

Die native Expression der *ICL1* wird, wie auch die Aktivität der übrigen am Glyoxylat-Zyklus beteiligten Enzyme, durch die Kohlenstoffquelle des Mediums beeinflusst. Die Expression der *ICL1* wird durch C<sub>2</sub>-Körper wie Ethanol oder Acetat induziert und unterliegt bei fermentierbaren Kohlenstoffquellen wie Glucose im Medium der Katabolitrepression (Duntze *et al.* 1969, Fernandez *et al.* 1992, Fernandez *et al.* 1993a, Schöler und Schüller 1993). Zusätzlich kommt es auch, ausgelöst durch Glucose, zu einer Inaktivierung auf Proteinebene (Katabolitinaktivierung) durch reversible Phosphorylierung gefolgt von einer proteolytischen Inaktivierung des Enzyms (Ordiz *et al.* 1995).

### **Überexpression der homologen Malat-Synthase**

Es existieren in *S. cerevisiae* zwei verschiedene Isoenzyme der Malat-Synthase (MLS) (Fernandez *et al.* 1993b). Die *MLS1* ist das Isoenzym des Glyoxylat-Zyklus, während die *MLS2* (auch als *DAL7* bezeichnet) eine Rolle bei der Verstoffwechslung von Glyoxylat spielt, das im Rahmen des Allantoinabbaus in den Zellen gebildet wird (Yoo *et al.* 1985, Hartig *et al.* 1992, Fernandez *et al.* 1993b). Daher wurde in diesem Projekt die *MLS1* überexprimiert. Die *MLS1* katalysiert den zweiten spezifischen Schritt des Glyoxylat-Zyklus, die irreversible Kondensationsreaktion von Glyoxylat und Acetyl-CoA zu Malat, und unterliegt der Katabolitrepression durch Glucose (Duntze *et al.* 1969, Hartig *et al.* 1992, Caspary *et al.* 1997).

## Heterologe Überexpressionen

Statt der homologen Überexpression der *ICL1* und *MLS1* aus *S. cerevisiae* erfolgten alternativ heterologe Überexpressionen. Überexprimiert wurden die Isocitrat-Lyase aus *E. coli* (*AceA*) und die Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase aus der Hefe *Kluyveromyces lactis* (*KIICL1* und *KIMLS*). Wie Tabelle 4.2 zusammenfasst, unterliegen die heterologen Isocitrat-Lyasen keiner Katabolitinaktivierung.

Tabelle 4.2: Regulation und Lokalisierung der homologen und ausgewählter heterologer Isocitrat-Lyasen und Malat-Synthasen (n.b.: nicht bekannt).

Funktion	Enzym	Mikro-organismus	Glucose-repression	Katabolit-inaktivierung	Lokalisierung in Herkunftsorganismus
ICL	<i>ICL1</i>	<i>S. cerevisiae</i>	+ (Duntze <i>et al.</i> 1969, Schöler und Schüller 1993)	+ (Lopez-Boado <i>et al.</i> 1987)	Cytosolisch (Duntze <i>et al.</i> 1969, Taylor <i>et al.</i> 1996, Chaves <i>et al.</i> 1997)
ICL	<i>KIICL</i>	<i>K. lactis</i>	+ (Lopez <i>et al.</i> 2004)	- (Lopez <i>et al.</i> 2004)	n.b.
ICL	<i>AceA</i>	<i>E. coli</i>	+	-	cytoplasmatisch (Vanni <i>et al.</i> 1990)
MLS	<i>MLS1</i>	<i>S. cerevisiae</i>	+ (Duntze <i>et al.</i> 1969, Hartig <i>et al.</i> 1992)	n.b.	Abhängig von der Kohlenstoffquelle, Cytosolisch mit Ethanol, peroxisomal auf Ölsäure (Kunze <i>et al.</i> 2002)
MLS	<i>KIMLS</i>	<i>K. lactis</i>	+ (Lodi <i>et al.</i> 2001)	n.b.	n.b.

Die Lokalisierung der *KIICL1* und *KIMLS1* in *K. lactis* ist noch nicht aufgeklärt. Bezüglich der cytosolischen Lokalisierung der *ICL1* und der abhängig von den Bedingungen cytosolischen *MLS1* stellt *S. cerevisiae* eine Ausnahme dar, da diese Enzyme in den meisten Hefen peroxisomal sind (Flores *et al.* 2000, Piekarska *et al.* 2008).

## 4.6 Überexpression der Acetyl-CoA-Synthetase

Die Acetyl-CoA-Synthetase (ACS) katalysiert die Aktivierung von Acetat zu Acetyl-CoA. Es existieren in *S. cerevisiae* zwei Isoenzyme der Acetyl-CoA-Synthetase. Ein Isoenzym der Acetyl-CoA-Synthetase, *ACS1*, zeigt dieselben Regulationsmuster wie die beiden Enzyme des Glyoxylat-Bypass. Die *ACS1* wird nur während des respirativen Stoffwechsels gebildet und unterliegt der Glucoserepression und Katabolitrepression (Kratzer und Schuller 1995, de Jong-Gubbels *et al.* 1998).

Die *ACS2* ist konstitutiv unter aeroben und anaeroben Bedingungen aktiv, unterliegt keiner Glucoserepression und ist essentiell für das Wachstum der Zellen bei Glucoseüberschuß (de Jong-Gubbels *et al.* 1997, van den Berg *et al.* 1996). Die *ACS1* besitzt einen kleineren  $K_m$  für Acetat als die *ACS2* (van den Berg *et al.* 1996). Durch die Deregulation der *ACS1* soll effizient cytosolisches Acetyl-CoA für den Glyoxylat-Zyklus bereitgestellt werden.

## 4.7 Überexpressionen des globalen Transkriptionsfaktor *HAP4*

*HAP4* ist die regulatorische Untereinheit des transkriptionellen Aktivator-Komplex *Hap2/3/4/5*, der eine wichtige Rolle in der Kohlenstoff-abhängigen Regulation des respirativen Stoffwechsels spielt. Während *HAP4* der Glucoserepression unterliegt und nur auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen exprimiert wird, werden *HAP2*, *HAP3* und *HAP5* konstitutiv exprimiert (Forsburg und Guarente 1989, DeRisi *et al.* 1997).

Durch den *Hap2/3/4/5*-Komplex sind zahlreiche für die Succinatbildung benötigte Enzyme des Zentralstoffwechsels, wie zum Beispiel die Enzyme des Glyoxylat-Bypasses, *ICL1* und *MLS1*, und Enzyme der Atmungskette, Cytochrom c-Oxidase und Cytochrom c-Reduktase reguliert (Forsburg und Guarente 1989, de Winde und Grivell 1993, Rosenkrantz *et al.* 1994, DeRisi *et al.* 1997, Buschlen *et al.* 2003).

Von Blom *et al.* (2000) und van Maris *et al.* (2001) ist beschrieben, dass eine Überexpression von *HAP4* beim Wachstum im Satzverfahren mit Glucose zu einer Verschiebung des respiro-fermentativen Stoffwechsels in Richtung Respiration führt. Dies zeigte sich in einer Erhöhung der Wachstumsrate und der Biomasseausbeute bei reduzierter Ethanol- und Glycerinbildung, sowie einer erhöhten Bildung der organischen Säure Acetat.

## 4.8 Reprimierbares Promotorsystem

Da Deletionen im Citrat-Zyklus Wachstumseinschränkung hervorrufen können (Zhao und McAlister-Henn 1996, McCammon *et al.* 2003, Przybyla-Zawislak *et al.* 1999), wurde ein reprimierbares Promotorsystem zur Trennung des Prozesses in eine aerobe Wachstums- und aerobe Produktionsphase evaluiert. In der ersten Phase soll der Stoffwechsel in der Wildtypkonfiguration belassen werden, um eine optimale Biomassebildung zu erreichen. In

der zweiten Phase soll der Stoffwechsel auf die Succinatbildung umgeschaltet werden. Im Gegensatz zu den bei *E. coli* umgesetzten zweistufigen Prozessen mit einem Wechsel von aeroben auf anaerobe Bedingungen (Vemuri *et al.* 2002b, Vemuri *et al.* 2002a, Wu *et al.* 2007), die mit einer massiven Umstellung des Gesamtstoffwechsels einhergehen und daher als problematisch bezüglich der Prozessführung angesehen werden, erfolgt hier zur Zweiteilung des Prozesses nur eine gezielte Inaktivierung der Zielgene durch Zugabe eines Repressors.

Hierfür wurde ein als "Tet-Off"-System bezeichnetes Tetracyclin-reguliertes Promotorsystem evaluiert (Gari *et al.* 1997, Belli *et al.* 1998). Dieses Tetracyclin-System besteht aus zwei Teilen. Der native Promotor des Zielgens wird gegen den tetO-Promotor ersetzt. Dieser besteht aus dem Tetracyclin-Operator gekoppelt mit einem synthetischen Minimalpromoter und führt zu einer konstitutiven Expression. Den zweiten Teil des Systems bildet der sogenannte transcriptional Transaktivator (tTA). Der tTA ist ein Fusionsprotein aus der Tetracyclin-Repressor- und einer Aktivator-domäne, welche durch Bindung an den regulierbaren tetO-Promotor die Expression des nachgeschalteten Gens induziert. Antibiotika aus der Gruppe der Tetracycline binden an den tTA und führen zu einer Konformationsänderung, was zur Ablösung dieses Proteins von der Promotorregion führt. Da Tetracyclin direkt in die Zellen diffundieren kann, ist dieser Repressor auch unabhängig von geeigneten Transportsystemen (Berens und Hillen 2003).

Somit könnte durch dieses System gezielt die Expression einzelner Enzyme in der Wachstumsphase aufrecht erhalten werden und in der anschließenden Produktionsphase durch Zugabe eines Antibiotikums aus der Gruppe der Tetracycline unterbunden werden. Die Verwendung des Antibiotikums Tetracyclin im Rahmen des Prozesses zur Succinatproduktion erscheint auch unter ökologischen Aspekten unkritisch, da Tetracyclin durch Erhitzen und Lichteinstrahlung zersetzt wird (Kühne *et al.* 2000, Oka *et al.* 1989).

Das Tetracyclin-System wurde bereits in verschiedenen eukaryontischen System eingesetzt und ist auch in *S. cerevisiae* etabliert (Maya *et al.* 2008). Zum Einfluss von Tetracyclin auf den Stoffwechsel oder das Wachstum der Hefe liegen trotz zahlreichen Einsatzes des Tetracyclin-Systems keine detaillierten Untersuchungen vor, da beim Tetracyclin-System standardmäßig nicht Tetracyclin, sondern auf Grund der effektiven Wirkung bei gleicher zugesetzter Menge Doxycyclin als Repressor eingesetzt wird (Gari *et al.* 1997). Für Doxycyclin wurde gezeigt, dass die Genexpression der Hefe nicht beeinflusst wird (Wishart *et al.* 2005). Allerdings ist Doxycyclin um den Faktor 100 teurer als Tetracyclin und daher für den industriellen Einsatz nicht relevant.

## 5 Material und Methoden

Während an dieser Stelle vor allem auf die verwendeten Methoden eingegangen wird, sind die verwendeten Verbrauchsmaterialien (Tabelle 15.27), Bezugsquellen der Chemikalien (Tabelle 15.26) und die eingesetzten allgemeinen Geräte (Tabelle 15.25) im Anhang zusammengefasst.

### 5.1 *Saccharomyces cerevisiae* Stämme

Im Laufe dieses Projekts wurden im Rahmen der iterativen Stammentwicklung und -charakterisierung mehr als 25 rekombinante Stämme basierend auf dem Basisstamm *Saccharomyces cerevisiae* AH22ura3 (*MATa ura3 $\Delta$  leu2-3 leu2-112 his4-519 can1*), der bei Polakowski *et al.* (1998) beschrieben ist, konstruiert und charakterisiert. Diese Stämme werden zur besseren Übersicht jeweils direkt zu Beginn des Ergebniskapitels vorgestellt. Eine vollständige Übersicht aller *S. cerevisiae* Stämme inklusive der Angabe der Auxotrophien und Antibiotikaresistenz findet sich im Anhang (Tabelle 15.2).

Da die Stammkonstruktion nicht Teil dieser Arbeit war, sondern beim Projektpartner ORGANOBALANCE GmbH (Berlin) erfolgte, wird im Folgenden nur kurz das generelle Vorgehen beschrieben. Die Deletionen wurden sequenziell durch zielgerichtete Integration von Deletionskassetten in das Hefegenom erzeugt. Die Deletionskassetten bestanden aus den Selektionsmarker *KANMX4* und vor und nach dem Marker gesetzte *loxP*-Sequenzen. Die Deletionskassetten *loxP-kanMX-loxP* wurden jeweils von 40 Basenpaare langen, zum entsprechenden zu deletierenden Ziellocus homologen Sequenzbereichen flankiert. Nach der durch homologe Rekombination erfolgten Integration der Deletionskassetten am Ziellocus wurde der Selektionsmarker über das Rekombinations-System Cre/*loxP* wieder entfernt.

Die Überexpressionen erfolgten auf episomalen Plasmiden. Die eingesetzten pFlat-Plasmide, die bei Veen (2002) beschrieben sind, besitzen einen verkürzten ADH1-Promotor, der für eine konstitutive Genexpression sorgt, und einen TRP1-Terminator (Lang und Looman 1995). Der Basisstamm AH22ura3 ist auxotroph für das Nukleotid Uracil, sowie die Aminosäuren Leucin und Histidin (Polakowski *et al.* 1998). Allerdings ist die Histidinauxotrophie nicht stabil, sondern es treten spontane Revertanten auf. Daher konnten nur die Leucin und Uracil-Auxotrophien als Selektionsmarker für Plasmide genutzt werden. Die im Laufe der Arbeit konstruierten SDH-IDH-IDP-Stämme waren zudem noch glutamatauxotroph.

Tabelle 5.1: Selektionsmarker der Plasmide pFlat1, pFlat2 und pFlat3 (Veen 2002)

Plasmid	Markergen	Funktion
pFlat1	<i>URA3</i>	Komplementation der Uracil-Auxotrophie
pFlat2	<i>KANMX4</i>	Antibiotikaresistenz gegenüber Geneticin (G418)
pFlat3	<i>LEU2</i>	Komplementation der Leucin-Auxotrophie

Tabelle 5.1 zeigt die Selektionsmarker der Plasmide. Durch die verschiedenen Selektionsmarker der Plasmide pFlat1-3 sind bis zu drei parallele Überexpressionen möglich. Abhängig von den enthaltenen Plasmiden besitzen die Stämme verschiedene Auxotrophiemuster und eine bzw. keine Antibiotikaresistenz gegenüber Geneticin.

## 5.2 Medien

Die Medien sowie Medienzusätze sind im Anhang (Kapitel 15.3) zusammengefasst. An dieser Stelle wird nur auf die Besonderheiten der einzelnen Medien eingegangen.

### Kohlenstoffquelle und Medienzusätze

Als Kohlenstoffquelle wurden 50 g L<sup>-1</sup> Glucose oder in einigen Fällen 50 g L<sup>-1</sup> Galactose eingesetzt. Aufgrund der Auxotrophien bzw. zum Aufrechterhalten des Selektionsdrucks bezüglich der Plasmide wurden den Medien stammabhängig (siehe Tabelle 15.2) die essentiellen Zusätze Histidin, Leucin, Glutamat oder Uracil und das Antibiotikum Geneticin zugegeben (Tabelle 15.4).

### YNB-Medium

Das YNB-Medium (YNB: Yeast Nitrogen Base) ist ein häufig für *S. cerevisiae* eingesetztes definiertes Fertigmedium mit Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle. In dieser Arbeit wurde die Version ohne Aminosäuren verwendet (Tabelle 15.5).

### WM8G-Medium

Beim WMVIII-Medium nach Lang und Looman (1995) handelt es sich um ein reichhaltiges, definiertes Mineralmedium mit 7,8 g L<sup>-1</sup> der organischer Stickstoffquelle Glutamat (Tabelle 15.6). Zudem ist in deutlich geringerer Konzentration auch Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle enthalten. Statt 50 g L<sup>-1</sup> Saccharose wie im Originalrezept angegeben wurde 50 g L<sup>-1</sup> Glucose als Kohlenstoffquelle verwendet. Im Laufe dieser Arbeit wird das Medium als "WM8G"-Medium bezeichnet.

### **WM8A-Medium**

Das WM8A-Medium ist eine abgewandelte Version des WMVIII-Mediums (Lang und Looman 1995). Um ein Medium ohne eine organische Stickstoffquelle zu erhalten, wurde Glutamat äquimolar gegen Ammoniumsulfat (entsprechend  $3,53 \text{ g L}^{-1}$ ) ausgetauscht. Da nach dem Austausch der Stickstoffquelle die Pufferkapazität des Medium zu gering war, wurde ergänzend ein  $0,4$  molarer Kaliumphosphatpuffer (pH 6,5) zugesetzt.

### **YEPD-Medium**

Das YEPD-Medium (YEPD: Yeast Extract Peptone Dextrose) ist das komplexe Standardmedium für *S. cerevisiae* (Tabelle 15.9) und wird meist mit  $20 \text{ g L}^{-1}$  Glucose genutzt. Jedoch wurde im Laufe dieser Arbeit in allen Medien einheitlich mit  $50 \text{ g L}^{-1}$  Glucose gearbeitet.

Vorversuche, durchgeführt als parallele Satzversuche im Bioreaktorblock mit dem auxotrophen Wildtypstamm AH22ura3 wt in YEPD-Medium mit  $50 \text{ g L}^{-1}$  Glucose zeigten jedoch einen Einbruch der Wachstumsrate, nachdem etwa 60 % der vorgelegten Glucose verbraucht waren (Daten nicht gezeigt). In weiteren parallelen Satzexperimenten wurden verschiedene Kombinationen der essentiellen Substanzen als Zusatz zum YEPD-Medium evaluiert und Uracil als limitierende Größe identifiziert. Daher wurden dem Komplexmedium bei Kultivierungen aller nicht das pFlat1-Plasmid tragenden und somit uracilauxotrophen Stämme stets  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  Uracil zugeben.

### **Hoek-Medium**

Bei dem definierten Medium nach van Hoek *et al.* (2000) mit Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle handelt es sich um ein spezielles Medium für Zulaufversuche. Neben einem Satzmedium (Tabelle 15.10) beschreiben van Hoek *et al.* (2000) auch ein abgestimmtes Zulaufmedium (Tabelle 15.13), das neben Salzen und der Kohlenstoffquelle Glucose auch Vitamine und Spurenelemente enthält, um Limitierungen auch in Hochzelldichtekultivierungen zu vermeiden. Statt Saccharose wie im Originalrezept wurde Glucose als Kohlenstoffquelle verwendet.

## **5.3 Analytische Methoden**

### **5.3.1 Bestimmung der Optischen Dichte und der Biotrockenmasse**

Die optische Dichte (OD) von Zellsuspensionen wurde mit einem Einstrahlphotospektrometer bei einer Wellenlänge von 660 nm gemessen. Zur Bestimmung der Biotrockenmasse wurden 2 mL Zellsuspension in ein ausgewogenes 2 mL Reaktionsgefäß überführt, zentrifugiert

(10 min, 13000 rpm) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde anschließend bei 80 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und ausgewogen. Zwischen optischer Dichte und Biomassekonzentration besteht ein linearer Zusammenhang:

$$c_x = f_x \cdot OD \quad \text{Gleichung 5.1}$$

mit  $c_x$  Biomassekonzentration, g L<sup>-1</sup>  
 $f_x$  Korrelationsfaktor, g L<sup>-1</sup>  
 $OD$  Optische Dichte bei Wellenlänge von 660 nm, -

Der Korrelationsfaktor zwischen Biomassekonzentration und optischer Dichte wurde für jeden der rekombinanten Stämme bestimmt. Die Werte lagen zwischen 0,6 und 1,1 g L<sup>-1</sup>.

### 5.3.2 HPLC-Analytik des Kulturüberstandes

Zur Bestimmung des Substrates (Glucose oder Galactose) sowie der Metabolite (Succinat, Acetat, Glycerin und Ethanol) im Kulturüberstand wurden die Proben des Kulturüberstandes gefiltert (Porengröße 0,22 µm) und anschließend mit einer externen Kalibrierung mittels HPLC (High Performance Liquid Chromatographie) analysiert. Die Details zur Messmethode und die Gerätespezifikationen sind im Anhang (15.4) zusammengestellt.

### 5.3.3 Bestimmung der Glutamatkonzentration

Die Bestimmung der Glutamatkonzentration (siehe Anhang 15.5) erfolgte photometrisch bei 492 nm mit einem enzymatischen Test (Test Nr. 10139092035, R-Biopharm, Darmstadt) nach Angabe des Herstellers. Die eingesetzten Volumina des Tests wurden für den Einsatz in einer Mikrotiterplatte modifiziert.

### 5.3.4 Bestimmung der Isocitrat-Lyase-Aktivität

Die Bestimmung der Isocitrat-Lyase-Aktivität (Anhang 15.4) erfolgte photometrisch nach der Methode von Dixon und Kornberg (1959), die nach den Angaben von Förster (2006) modifiziert war.



## 5.4 Kultivierung von *S. cerevisiae*

### 5.4.1 Kultivierung im Schüttelkolben

Es wurden 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen mit Alukappen als Sterilbarriere eingesetzt. Diese waren soweit nicht anders beschrieben zu 10 % des Nominalvolumens mit Medium befüllt. Die Anzucht der Hefen erfolgte im Schüttelinkubator (Rundschüttler) bei 30°C, 250 min<sup>-1</sup> und einer Exzentrizität von 5 cm.

#### Stammhaltung

Zur Herstellung von Glyceringefrierkulturen erfolgte die Anzucht in Schüttelkolben im WM8G-Medium mit den entsprechenden Selektionsmarkern (Anhang Tabelle 15.2 und Tabelle 15.4) und 50 g L<sup>-1</sup> Glucose. Die Kulturen wurden in der exponentiellen Wachstum bei einer Biomassekonzentration zwischen 1 und 1,5 g L<sup>-1</sup> geerntet, mit sterilem Glycerin (Endkonzentration an Glycerin: 33 % v/v) versetzt, in 1,5 mL Reaktionsgefäße aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

#### Anzucht der Vorkulturen

Die Vorkulturen wurden in WM8A-Medium mit 50 g L<sup>-1</sup> Glucose und entsprechenden Selektionsmarkern ausgehend von Glyceringefrierkulturen angezogen bis die stationäre Phase erreicht war. Die Dauer der Vorkulturphase war stammabhängig und lag zwischen 2 und 5 Tagen. Vor dem Überimpfen in die jeweilige Hauptkultur wurden die Zellen stets einmal mit PBS-Puffer gewaschen, um eine Verschleppung von Metaboliten zu verhindern.

#### Satzkultivierungen im Schüttelkolben

Die Startzellichte in den Satzkultivierungen im Schüttelkolben betrug 0,1 g L<sup>-1</sup>. Mit Glucose als Kohlenstoffquelle wurden die 500 mL Kolben mit 50 mL Medium befüllt und die Versuche liefen über 6 Tage. Durch lange Versuchsdauer konnte auch der bei einigen rekombinanten Stämmen sehr langsame Ethanolverbrauch betrachtet werden. Wurde Galactose verwendet betrug die Versuchsdauer 16 Tage und das eingesetzte Volumen wurde auf 100 mL erhöht.

### 5.4.2 Parallele Satzkultivierungen im Bioreaktorblock im Milliliter-Maßstab

Zur effizienten Analyse der Vielzahl an rekombinanten Stämmen im aeroben Satzverfahren wurde ein automatisiertes, paralleles Milliliter-Bioreaktorsystem, das nachfolgend als Bioreaktorblock bezeichnet wird, eingesetzt (Abbildung 5.1).

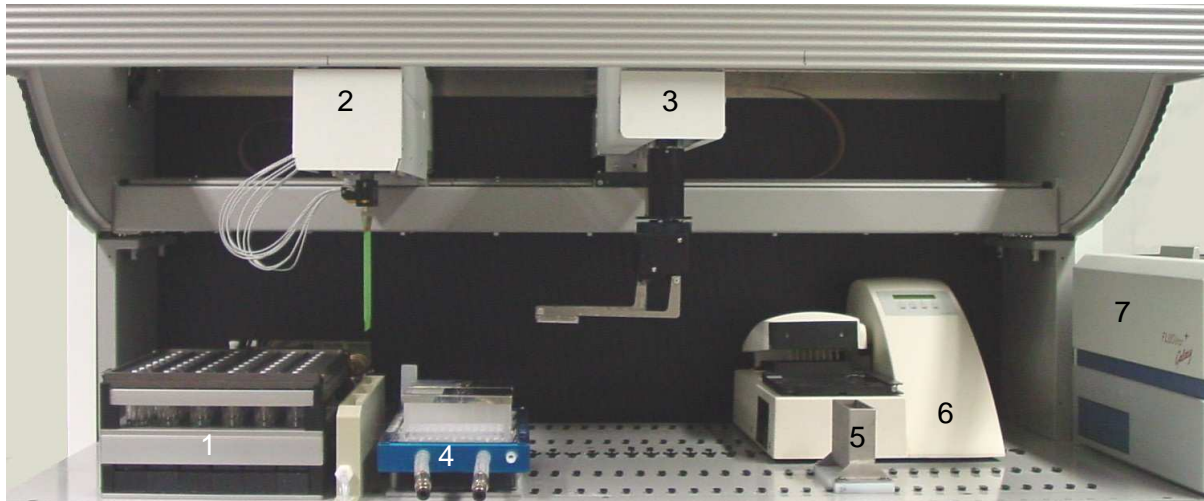


Abbildung 5.1: Aufbau für die parallelen Satzexperimente im Milliliter-Maßstab

Der Bioreaktorblock (1) wird durch einen Laborroboter, der mit einem Pipettierarm (2) und einen Greifarm für Mikrotiterplatten (3) ausgestattet ist, automatisiert betrieben. Auf der Arbeitsfläche sind zudem Mikrotiterplatten für Vorlagen und eine Platte für die Analytik (4), ein Desinfektionsmittelbehälter (5), eine Waschstation (6) sowie ein Photometer für Mikrotiterplatten (7) platziert.

#### Bioreaktorblock

Im Bioreaktorblock (2mag AG, München) sind 48 mL-Bioreaktoren (Arbeitsvolumen 8 - 16 mL) in acht Reihen mit jeweils sechs Reaktoren angeordnet. Jeder Reaktor besitzt einen auf einer Hohlachse gelagerten magnetischen Rührkörper. Zum Bioreaktorblock gehört eine Sterilgasabdeckung, durch die die Reaktoren abgedichtet sind. Zudem sind an dieser Abdeckung die Achsen der Rührorgane befestigt. Über die Sterilgasabdeckung wird gleichzeitig die Sauerstoffzufuhr realisiert, indem sterile Prozessluft über eine Gaszufuhr in den Kopfgasraum der Reaktoren geleitet wird. Durch eine weitere Bohrung, die auch als Probenahmeöffnung dient, kann das Abgas aus jedem Reaktor entweichen. Somit wird der Kopfraum jedes Reaktors kontinuierlich mit sterilem Gas gespült und der Luftstrom aus der Probenahmeöffnung erhält die Sterilität aufrecht. Direkt unterhalb der Sterilgasabdeckung befindet sich die Kühleinrichtung, die den Kopfraum des Reaktors und die

Sterilgasabdeckung abkühlt und somit dem Kondensator eines klassischen Laborreaktors entspricht. Über einen zweiten Wärmetauscher werden die Reaktoren im unteren Teil temperiert. Der magnetisch-induktive Antrieb des Bioreaktorblocks ermöglicht Rührerdrehzahlen von 500 - 4000  $\text{min}^{-1}$ . Durch die als gasansaugend konzipierten Rührkörper (Puskeiler 2004) wird über eine Bohrung in der Hohlachse Luft aus dem Kopfgasraum in das Medium eingesogen und vom Rührer im Medium dispergiert.

Unterhalb der Reaktoren befinden sich optosensorische Ausleseeinheiten (Presens GmbH, Regensburg), über die in Kombination mit in den Reaktoren immobilisierten chemischen Sensoren eine fluorometrische pH- und  $\text{pO}_2$ -Messung erfolgen kann (Kusterer 2007).

### **Automatisierung des Bioreaktorblocks**

Das Bioreaktorsystem ist, wie in Abbildung 5.1 gezeigt, über einen Laborroboter (Genesis Workstation 150, Tecan GmbH, Crailsheim) automatisiert. Der Laborroboter verfügt über acht festinstallierte, teflonbeschichtete Pipettiernadeln (Pipettiervolumen 0,5 - 480  $\mu\text{L}$ ), über die Probennahmen und Zudosierungen erfolgen können. Vor Probennahmen wurden die Pipettiernadeln mit 70 % Ethanol desinfiziert. Von den 48 Reaktoren wird jeweils eine 6er-Reihe von derselben Pipettiernadel bedient. Um Kreuzkontaminationen der Stämme untereinander grundsätzlich auszuschließen, wurden die rekombinanten Stämme reihenweise in den Bioreaktorblock angeordnet. Zusätzlich ist der Laborroboter mit einem Greifarm zum Transport von Mikrotiterplatten (MTP) ausgestattet. Zur Ausstattung des Gesamtsystems gehören weiterhin ein MTP-Photometer und ein MTP-Waschgerät. Das System wird über die Prozessleitsoftware fedbatch XP (DASGIP AG, Jülich) gesteuert. Diese übernimmt die Kommunikation mit der Sensorik, dem Laborroboter und den anderen Geräten. Details zu den Einzelkomponenten des Systems sind im Anhang (Tabelle 15.23) zusammengefasst.

### **Kultivierungen im Bioreaktorblock**

Die Versuche erfolgten mit einem Startvolumen von 12 mL, einer Temperatur von 30°C, einer Temperatur der Kühleinheit für den Kopfgasraum von 4°C, einer Rührerdrehzahl von 2800  $\text{min}^{-1}$  und einer Kopfraumbegasung des Bioreaktorblocks von 4,8  $\text{L h}^{-1}$ , entsprechend einer Kopfraumbegasung von 0,1  $\text{L h}^{-1}$  pro Reaktor. Der Ausgleich der Verdunstung von 70  $\mu\text{L h}^{-1}$  erfolgte durch Zugabe von sterilem VE-Wasser über den Pipettierroboter.

Alle Kultivierungen wurden mit einer Biomassekonzentration von 0,1  $\text{g L}^{-1}$  gestartet und liefen für 48 h mit automatisierter at-line Bestimmung der Optischen Dichte mit einer Abtastzeit von 1,5 h. Die rekombinanten Stämme wurden im definierten Medium WM8A mit Ammonium als Stickstoffquelle, im Medium WM8G mit Glutamat als Stickstoffquelle, sowie im Komplexmedium YEPD mit 50  $\text{g L}^{-1}$  Glucose als Kohlenstoffquelle untersucht. Es wurde im Parallelansatz mit je drei Reaktoren pro Bedingung gearbeitet.

Zur Bestimmung der OD wurden die vom Pipettierroboter genommenen Proben (je 20 µL) durch einen im MTP-Photometer integrierten Injektor unmittelbar vor der Messung 1/10 mit PBS-Puffer verdünnt. Die Messung der optischen Dichte erfolgte bei 650 nm, da das Gerät keinen Filter für 660 nm besaß. Die Mikrotiterplatte wurde nach jeder Messung in der MTP-Waschstation gespült und wieder verwendet. Am Ende der Kultivierung wurden zudem Proben für die Bestimmung von Metaboliten per HPLC genommen.

Bei der OD-Messung wurde der lineare Messbereich des Photometers bewusst überschritten da mit einer konstanten Verdünnung gearbeitet wurde. Zur Umrechnung der  $OD_{MTP}$ -Daten in die realen OD über Gleichung 5.2 wurde eine Korrelationskurve zwischen den OD im MTP-Photometer und dem Einstrahlphotometer aufgenommen und aus dieser die Faktoren a und b ermittelt.

$$OD_{MTP} = \frac{a \cdot OD}{b + OD} \quad \text{Gleichung 5.2}$$

mit	$OD_{MTP}$	OD im MTP-Photometer (Probe ist 1/10 verdünnt), -
	$OD$	OD im Einstrahlphotometer, -
	$a$	erster Korrelationsfaktor, -
	$b$	zweiter Korrelationsfaktor, -

Wird die im MTP-Photometer durchgeführte 1/10 Verdünnung der Probe als systemimmanente Konstante betrachtet und bei allen Berechnungen nicht explizit beachtet, ergab sich für Faktor a ein Wert von 2,54 und für b ein Wert von 26,9 für die Umrechnung der in der im MTP-Photometer gemessenen OD der 1/10 verdünnten Probe ( $OD_{MTP}$ ) in die reale OD.

Aus den in Kultivierungen im Bioreaktorblock mit einer Abtastzeit von 1,5 h at-line bestimmten der Optischen Dichten wurden über Gleichung 5.1 und Gleichung 5.2 die Biomassekonzentrationen errechnet und für jeden einzelnen Reaktor die logarithmierte Biomassekonzentration gegen die Zeit aufgetragen.

*S. cerevisiae* zeigt im aeroben Satzverfahren mit Glucose als Kohlenstoffquelle wegen des Crabtree-Effekts eine diauxische Wachstumskurve mit einer ersten exponentiellen Wachstumsphase mit Glucose und einer daran anschließenden zweiten Wachstumsphase auf Ethanol als Kohlenstoffquelle. Zur Bestimmung der Wachstumsrate mit Glucose oder Ethanol als Kohlenstoffquelle wurde in der jeweiligen Wachstumsphase der Bereich mit konstanter Steigung per linearer Regression ausgewertet. Anschließend wurde der Mittelwert der Wachstumsraten mit Glucose oder Ethanol als Kohlenstoffquelle für die drei im Parallelansatz betriebenen Reaktoren gebildet.

Die pH- und  $pO_2$ -Messung in den mL-Reaktoren erfolgte über die immobilisierten Sensoren. Unter den eingestellten Bedingungen lag der  $pO_2$  in allen Kultivierungen bei über 40 %. Der pH kann durch die optischen Sensoren im Bereich zwischen pH 5,5 bis pH 8,5 verfolgt werden (Kusterer 2007). Der Start-pH des WM8A- und YEPD-Medium bei Versuchsbeginn betrug pH 6,5. Der Start-pH des WM8G-Mediums betrug nur pH 6,0, da bei pH 6,5 das Glutamat im Medium ausfiel.

Bei den Kultivierungen der *S. cerevisiae* Wildtypstämmen in den mL-Reaktoren mit den Medien WM8A, WM8G und YEPD mit  $50 \text{ g L}^{-1}$  Glucose bewegte sich der pH während der gesamten Kultivierung stets zwischen pH 5,6 und pH 6,8. Bei den Deletionsstämmen sank der pH häufig unter das Detektionslimit der chemischen pH-Sensoren ab und es wurde daher bei Versuchsende nach 48 h der pH der Reaktoren manuell mit einer pH-Elektrode nachgemessen. In den Kultivierungen der Deletionsstämmen in den mL-Reaktoren bewegte sich der pH im einem Bereich zwischen pH 4,4 und pH 6,8.

Auf eine Regelung des pH während der Kultivierungen wurde daher verzichtet, da durch das Detektionslimit der chemischen pH Sensoren bei pH 5,5 keine Regelung auf den für Hefen optimalen pH von 5 möglich gewesen wäre und zudem *S. cerevisiae* ein äußerst pH-toleranter Mikroorganismus ist, dessen Wachstumsrate im Bereich zwischen pH 4,4 und pH 6,8 nicht durch den pH beeinflusst wird (Barnett 1997).

### 5.4.3 Satz- und Zulaufversuche im Laborrührkessel im Liter-Maßstab

Für aerobe Kultivierungen im Litermaßstab wurde ein Labor-Rührkesselreaktor (Labfors, Infors GmbH, Bottmingen) mit einem Nennvolumen von 2 L verwendet (Abbildung 5.2, Spezifikationen siehe Anhang Tabelle 15.24).

Der Reaktor war mit Sonden zur Messung von pH,  $pO_2$  und Temperatur ausgestattet. Sowohl zur Überwachung des Reaktorgewichts als auch der Zugabe von Zulauflösung über die Schlauchpumpe stand eine Waage zur Verfügung. Der Sauerstoff- und Kohlendioxidanteil der Abluft wurde über eine Abgasanalytik analysiert. Die Medientemperatur wurde auf  $30^\circ\text{C}$  geregelt, die Temperatur des Abluftkühlers betrug  $14^\circ\text{C}$ . Das Medium wurde über ein Tauchrohr mit  $1 \text{ L min}^{-1}$  begast und die Anfangsrührerdrehzahl betrug  $400 \text{ min}^{-1}$  und wurde in  $50 \text{ min}^{-1}$  Schritten automatisch erhöht, wenn der  $pO_2$  unter 40 % sank.

Es wurden hauptsächlich aerobe Satz- und Zulaufversuche mit einer Anfangsbiomassekonzentration von  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  mit einem Startvolumen von 1,2 L im Hoek-Medium mit  $50 \text{ g L}^{-1}$  Glucose durchgeführt. Die beidseitige pH-Regelung auf pH 5 erfolgte mit 12,5 %igen Ammoniak (w/w) und 14 % (w/w) Phosphorsäure als Titrationsmittel.

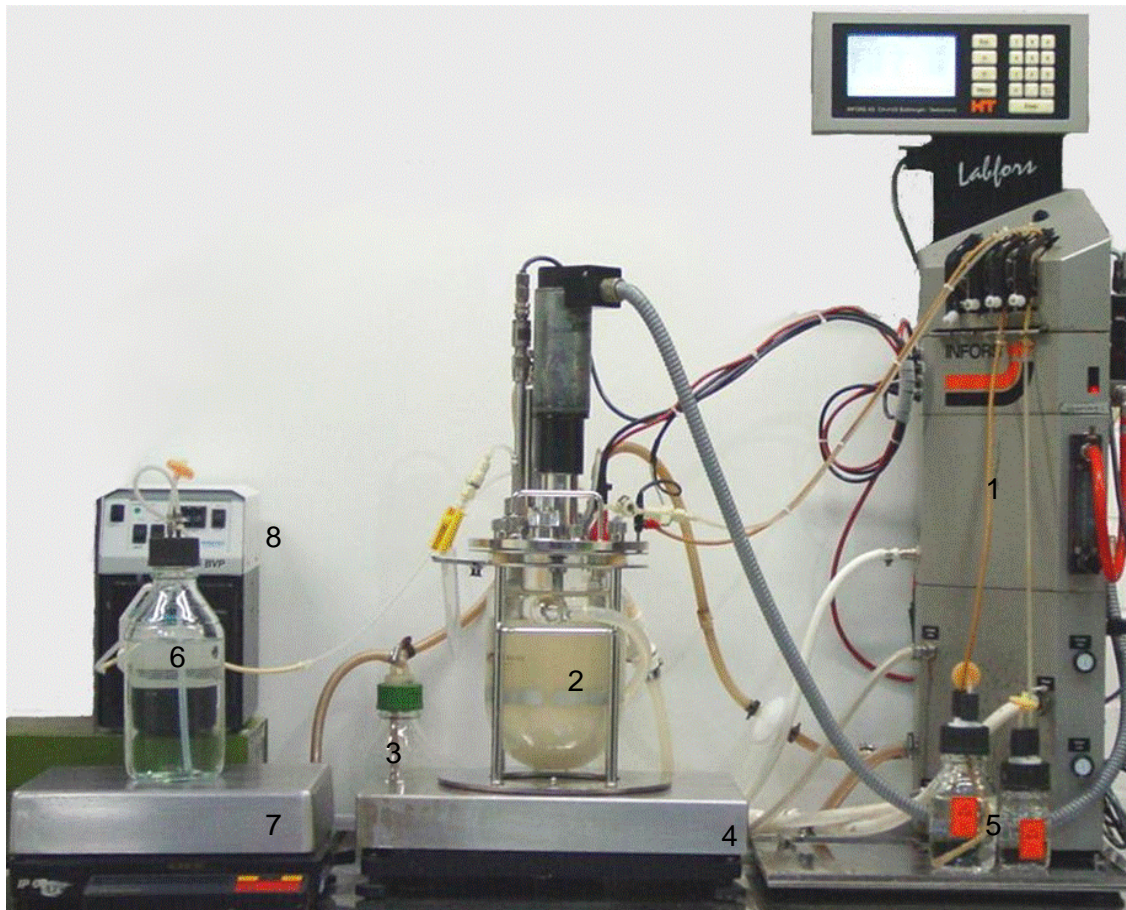


Abbildung 5.2: Aufbau für die Satz- und Zulaufexperimente im Laborrührkessel im L-Maßstab  
 (1) Steuerkonsole, (2) Bioreaktor (Nennvolumen 2 L), (3) Schaumfalle, (4) Reaktorwaage, (5) Titrationsmittel, (6) Vorlage für den Zulauf, (7) Waage für den Zulauf, (8) Zulaufpumpe

Nach zweitägiger Satzphase folgte eine eintägige Zulaufphase mit dem Hoek-Zulaufmedium und einer Dosierate von  $0,7 \text{ g}_{\text{Glucose}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Um Limitierungen zu vermeiden wurde direkt vor Start des Zulaufs nochmals dieselbe Konzentration an essentiellen Substanzen bzw. Geneticin zugegeben wie bei Versuchsbeginn (vergleiche Tabelle 15.4). Wurde von diesen Versuchsbedingungen abgewichen, ist dies entsprechend bei den Ergebnissen angegeben.

#### 5.4.4 Normierung auf das initiale Volumen

Alle Substrat- und Produktkonzentrationen in den eingesetzten Kultivierungssystemen Schüttelkolben, mL-Bioreaktor und Laborbioreaktor werden nicht nur durch die mikrobielle Umsetzung, sondern auch durch eine Verdunstung von Wasser beeinflusst. Diese Verdunstung konnte auf Grund der relativ kleinen Reaktionsvolumina (12 mL - 1,2 L) und den teilweise sehr langen Versuchsdauern (bis zu 16 Tage) nicht vernachlässigt werden. Dazu kommen im Laborreaktor noch Verdünnungseffekte durch die pH-Regelung und die Zulaufauflösungen.

Daher wurde beim Laborrührkessel und dem Schüttelkolben zu jeder Probennahme (i) das Volumen der Probe ( $V_{P,i}$ ) und das nach jeder Probennahme im Reaktionssystem verbliebene Volumen ( $V_{R,i}$ ) gravimetrisch erfasst. Die gemessenen Konzentrationen ( $c_i$ ) wurden mit dem über Gleichung 5.3 bestimmten Faktor  $f_{N,i}$  auf das Volumen bei Versuchsbeginn normiert (Gleichung 5.4). Für die erste Probe die bei  $t = t_0$  genommen wurde, wurde der Faktor  $f_{N,i}$  als 1 definiert. In der gesamten Arbeit sind ausschließlich die normierte Konzentration ( $\hat{c}_i$ ) dargestellt, um eine optimale Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten.

$$f_{N,i} = \prod_{j=1}^i \frac{V_{R,j-1}}{V_{R,j} + V_{P,j}} \quad \text{Gleichung 5.3}$$

$$\hat{c}_i = f_{N,i} \cdot c_i \quad \text{Gleichung 5.4}$$

Beispielhaft wird die Notwendigkeit der Normierung in Abbildung 5.3 an Hand der in Kapitel 5.4.1 beschriebenen 16-tägigen Satzversuche mit Galactose als Kohlenstoffquelle im Schüttelkolben gezeigt.

Dargestellt sind die Daten aus 3 Satzversuchen bei denen unbeimpftes WM8G-Medium mit  $50 \text{ g L}^{-1}$  Galactose in den Schüttelkolben vorgelegt wurde und unter den Standardbedingungen des Systems Probennahmen erfolgten. Allein durch Verdunstungseffekte stieg die gemessene Galactosekonzentration von der initialen Konzentration von  $50 \text{ g L}^{-1}$  auf über  $60 \text{ g L}^{-1}$  nach 16 d an. Dagegen bleibt bei Darstellung der normierten Konzentrationen die Galactosekonzentration während der gesamten Versuchsdauer in allen 3 Ansätzen bei  $51,3 \pm 0,6 \text{ g L}^{-1}$  konstant.

Der Normierfaktor  $f_{N,i}$  für die in Kapitel 5.4.1 beschriebenen Kultivierungen im Schüttelkolben lag bei allen Versuchen zwischen 0,8 und 1,0. Bei den in Kapitel 5.4.3 beschriebenen Kultivierungen mit zweitägiger Satzphase folgte von einer eintägige Zulaufphase (Dosierrate von  $0,7 \text{ g}_{\text{Glucose}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) im 1,2 L-Maßstab im Laborrührkessel lag der Normierfaktor  $f_{N,i}$  während der gesamten Kultivierungsdauer zwischen 0,9 und 1,1. Handelte es sich dagegen um reine dreitägige Zulaufversuche lag der Faktor auf Grund der stärkeren Verdünnung zwischen 1,0 und 1,4. Bei den mL-Reaktoren erfolgte mittels des Pipettierroboters ein automatischer Ausgleich der Verdunstung von Wasser (siehe Kapitel 5.4.2), so dass keine Normierung nötig war.

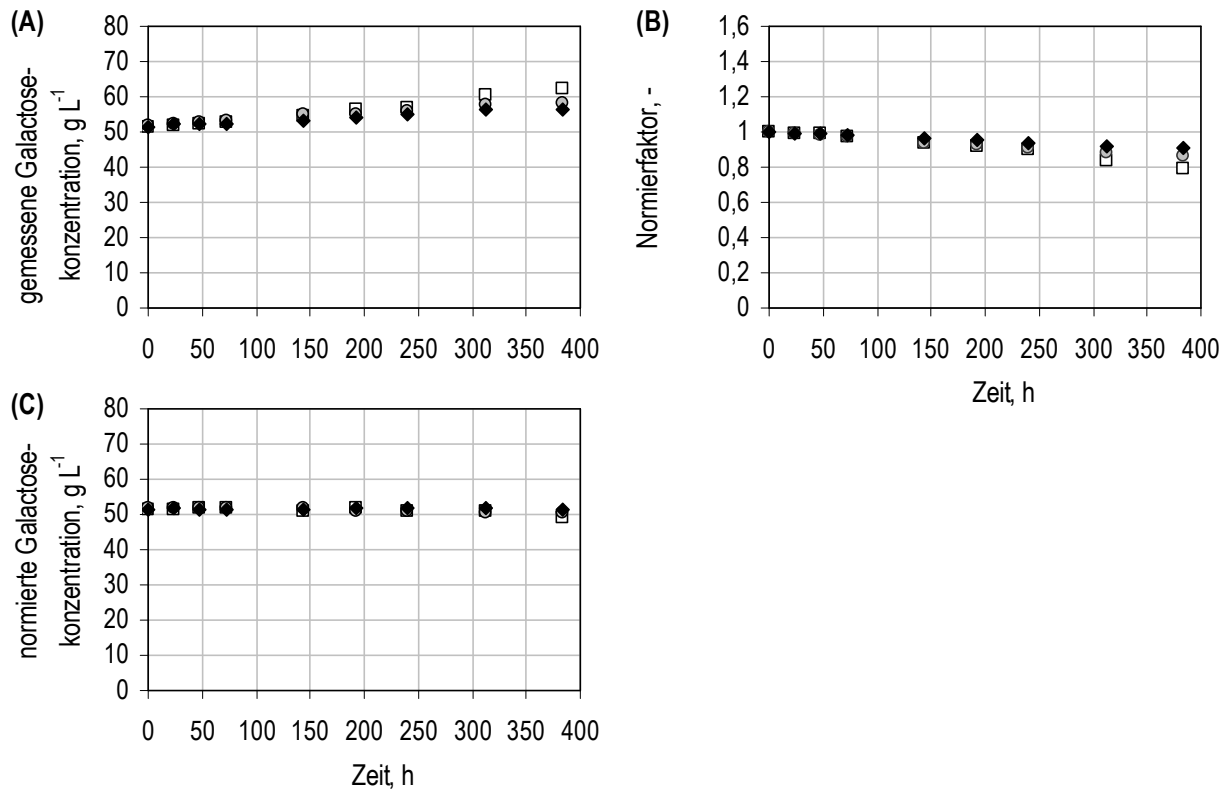


Abbildung 5.3: Effekt der Normierung der gemessenen Konzentrationen auf das initiale Volumen gezeigt am Beispiel der 16-tägigen Satzversuche mit Galactose als Kohlenstoffquelle im Schüttelkolben ( $V_0 = 100 \text{ mL}$ ). Dargestellt sind die Daten aus 3 Satzversuchen ( $\square$ ,  $\circ$  und  $\blacklozenge$ ) bei denen unbeimpftes WM8G-Medium mit  $50 \text{ g L}^{-1}$  Galactose im Schüttelkolben vorgelegt wurde und anschließend unter den Standardbedingungen des Systems Probenahmen erfolgten. A: Die gemessene Galactosekonzentration ( $c_i$ ) steigt durch die Verdunstung von Wasser aus dem Schüttelkolben kontinuierlich an. B: Der gravimetrisch bestimmte Normierfaktor ( $f_{N,i}$ ) sinkt als Folge der Verdunstung kontinuierlich ab. C: Die mit Hilfe von  $f_{N,i}$  normierte Galactosekonzentration ( $\hat{c}_i$ ) bleibt konstant.

### 5.4.5 Ermittlung der Ethanolverdunstung

Bezüglich des Metabolits Ethanol ist zu beachten, dass dieses auf Grund seiner Flüchtigkeit besonders in aktiv begasten Systemen hohe Verdunstungsraten aufweist. Die Ethanolverdunstung kann durch Gleichung 5.5 beschrieben werden.

$$\frac{dc_{Eth}}{dt} = -k \cdot c_{Eth}$$

Gleichung 5.5

mit  $k$  Ethanolverdunstungskonstante,  $\text{h}^{-1}$   
 $c_{Eth}$  Ethanolkonzentration im Reaktionssystem,  $\text{g L}^{-1}$



Die Ethanolverdunstung kann durch die Abgaskühlung der L- oder mL-Bioreaktoren lediglich vermindert, jedoch nicht unterbunden werden, da im Abgaskühler kondensiertes Ethanol dort die lokale Ethanolkonzentration erhöht, sodass nach Gleichung 5.5 zusätzlich eine deutliche Ethanolverdunstung aus dem Kondensat im Abgaskühler auftritt (Duboc und von Stockar 1998).

Um die Größenordnung der Ethanolverdunstung zu ermitteln, wurden alle drei eingesetzten Kultivierungssysteme durch Ethanolverdunstungsexperimente charakterisiert. Für diese Charakterisierung wurde Ethanol im definierten unbeimpften Medium vorgelegt und es erfolgte unter den jeweiligen Standardbedingungen des Systems Probennahmen. Laut Löser *et al.* (2005) ist die Ethanolverdunstung in Rührkesselreaktoren eine Funktion der Begasungsrate und des Reaktorvolumens, aber unabhängig von der Rührerdrehzahl. Dies gilt allerdings nur für klassische Rührkesselreaktoren wie den für die Kultivierungen im Liter-Maßstab eingesetzten Labor-Rührkessel (Labfors, Infors GmbH, Bottmingen), da in den mL-Bioreaktoren durch die gasinduzierenden Rührkörpern die Begasungsrate von der Rührerdrehzahl abhängt. Da bei den mL-Reaktoren die Rührerdrehzahl konstant bei 2800 rpm gehalten wurde und somit auch die Begasungsrate konstant blieb, ergibt sich für die Messungen zur Ethanolverdunstung jedoch kein weiterer Parameter. Auch die Begasungsrate bei den Kultivierungen im Liter-Maßstab wurde konstant gehalten und war somit kein Parameter.

Tabelle 5.2: Ethanolverdunstungskonstanten der Kultivierungssysteme

System	Volumen	Ethanolverdunstungs- konstante, h <sup>-1</sup>
Schüttelkolben im Rundschüttler	50 mL	0,013 ± 0,000
mL-Reaktor	12 mL	0,093 ± 0,002
Laborrührkessel	1,2 L	0,022 ± 0,000

Wie Tabelle 5.2 zeigt, ist die Ethanolverdunstungsrate im Schüttelkolben als unbegastes System erwartungsgemäß am geringsten und bei den mL-Reaktoren auf Grund des ungünstigen Oberflächen/Volumen-Verhältnis am höchsten.

Da es bei den Zulaufversuchen im L-Maßstab zu deutlichen Volumenänderungen kam, wurde für den Laborreaktor der Zusammenhang zwischen Füllvolumen des Reaktors und  $k$  experimentell bestimmt (Abbildung 5.4).

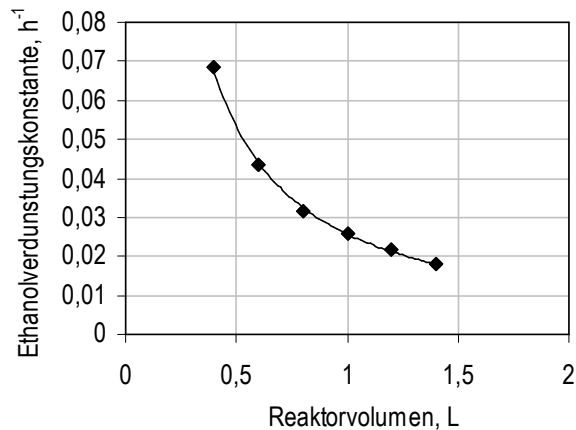


Abbildung 5.4: Empirischer Zusammenhang zwischen Reaktorvolumen ( $V_R$ ) und Ethanolverdunstungsrate ( $k$ ) für den Laborrührkessel. Dargestellt sind die Messdaten (◆), die durch die Korrelation  $k = 0,028 \cdot V_R^{-1,06}$  (Linie) wiedergegeben werden konnten.

Während bei den Kultivierungen im mL-Reaktorsystem mit Ausnahme der OD-Bestimmung nur eine Endpunktanalytik nach 48 h und bei den Schüttelkolbenexperimenten alle 24 h eine Probenahme erfolgte, war es auf Grund der häufigeren Probenahmen im Laborreaktor möglich, die Ethanolverdunstung rechnerisch auf Basis des in Abbildung 5.4 dargestellten Zusammenhangs zu berücksichtigen.

#### 5.4.6 Kohlenstoffbilanz

Für die Kultivierungen im Laborrührkesselreaktor konnten Kohlenstoffbilanzen aufgestellt werden, da ein definiertes Medium eingesetzt und die  $\text{CO}_2$ -Bildung über die Abgasanalytik erfasst wurde. Die Gesamtmenge des emittierten Kohlendioxids wurde für die Bilanzierung durch die Integration des zeitlichen Verlaufs der  $\text{CO}_2$ -Konzentration im Abgas ermittelt. Der Kohlenstoffgehalt der Biotrockenmasse wurde über die Summenformel  $\text{C}_{3,75}\text{H}_{6,6}\text{N}_{0,63}\text{O}_{2,10}$  berechnet (Verduyn *et al.* 1990). Für die Kohlenstoffbilanz wurden auch die Probenahmen und die Menge an bereits verdunsteten Ethanol aufsummiert und in der Berechnung berücksichtigt. Die Kohlenstoffbilanzen wurden nach Gleichung 3.14 berechnet und waren in allen Kultivierungen im Laborreaktor zu mindestens 90 % geschlossen. In dieser Arbeit werden daher beispielhaft nur einige der Bilanzen gezeigt.

## 5.5 Bestimmung intrazellulärer Metabolite aus dem Energiestoffwechsel

Zur Bestimmung des Energy charge (EC) und des NADH/NAD<sup>+</sup>-Verhältnisses wurden die intrazellulären Konzentrationen der Adenosinphosphate AMP, ADP und ATP und der Nicotinamid-Adenin-Dinukleotide NAD<sup>+</sup> und NADH bestimmt.

Das Vorgehen zur Bestimmung intrazellulären Metabolitkonzentrationen lässt sich allgemein in folgende Schritte einteilen (Weuster-Botz und de Graaf 1996, Mashego *et al.* 2007):

- Repräsentative Probenentnahme aus dem Reaktionssystem
- Inaktivierung des Stoffwechsels ("Quenchen")
- Quantitative Extraktion der Metabolite
- Analyse der Metabolite

Auf Grund der hohen intrazellulären Umsatzraten, die im Bereich von 1 mM s<sup>-1</sup> liegen und der geringe intrazellulären Metabolitkonzentrationen im Bereich von 1 mM ist eine schnelle Probennahme und Inaktivierung entscheidend für die Bestimmung der intrazellulären Metabolitkonzentrationen (de Koning und van Dam 1992).

### Probennahme und Inaktivierung

Die Probennahme aus dem Reaktor erfolgte mit dem von Hiller *et al.* (2007) beschriebenen System für schnelle Probenahmen. Vor der Probennahme wurde das Probengefäß mit 25 mL der Inaktivierungslösung befüllt und mittels Kryostat auf -70°C gekühlt. Für die Inaktivierung der Hefezellen wurde nach Canelas *et al.* (2008) reines Methanol eingesetzt. Jeweils direkt vor der Probennahme wurde das Probengefäß auf 200 mbar evakuiert und die Probe durch Ankoppeln des Gefäßes an die in den Reaktor eingebaute Probenahmesonde genommen.

Die Probe wurde sofort in ein durch ein Ethanol-Eis-Bad auf -20°C vorgekühltes 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert (4 min, 10000 min<sup>-1</sup>, -19°C). Vom Überstand wurde eine Probe zur Analyse des "Leakage-Effektes" genommen, gefiltert und bei -20°C gelagert. Der restliche Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 mL auf -20°C temperierten Resuspensionspuffer (60 % (v/v) Methanol, 30 mM Triethanolamin (pH = 7,0) resuspendiert. Während der gesamten beschriebenen Prozedur wurde die Probe in einem Ethanol-Eis-Bad (-20°C) gekühlt.

### Extraktion und Analyse mit Standardaddition

Die Extraktion der Metabolite erfolgte mit heißem wässrigen Puffer und die anschließende Analytik per LC-MS. Da die Quantifizierung per LC-MS stark durch die Probenmatrix beeinflusst wird und auch Effekte der Probenaufarbeitung auf die Metabolitkonzentrationen berücksichtigt werden müssen, erfolgte die Quantifizierung mittels Standardaddition nach DIN 32633. Bei der Standardaddition wird die Probe in mehrere Teile mit gleichen Volumina aufgeteilt, zu jedem Aliquot ein bestimmtes Volumen eines Standardgemisches in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt und die Proben gemessen. Zur Auswertung werden die Konzentrationen des zugesetzten Standards gegen die erhaltenen Messwerte aus der LC-MS-Messung aufgetragen (Abbildung 5.5).

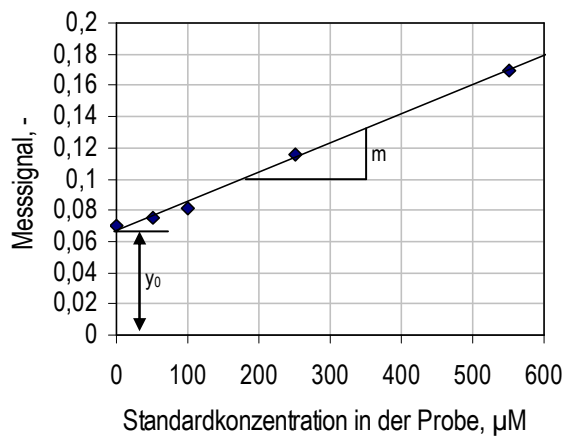


Abbildung 5.5: Kalibrierung über eine Standardaddition. Die Messpunkte (◆) werden durch lineare Regression ausgewertet.

Da der Beitrag der unbekanntes Konzentration der zu analysierenden Probe sich hierbei im Achsenabschnitt  $y_{0,i}$  widerspiegelt, kann die unbekanntes Konzentration  $c_i$  nach Gleichung 5.6 errechnet werden.

$$c_i = \frac{y_{0,i}}{m_i} \quad \text{Gleichung 5.6}$$

mit  $y_{0,i}$  Achsenabschnitt der linearen Regression für Komponente  $i$ , -  
 $m_i$  Steigung der linearen Regression für Komponente  $i$ ,  $M^{-1}$

Da die Quantifizierung der Metabolite mittels Standardaddition erfolgte, wurden parallel acht verschiedene Extrakte für jede Probe hergestellt. Es wurden je 100 µL der resuspendierten Zellsuspension und zeitgleich je 100 µL der Standardlösung (Konzentration 0, 5, 10, 20, 30, 50, 70 oder 100 µM der Standardsubstanzen gelöst in 50 % Methanol (v/v)) zu 300 µL in

einem 1,5 mL Reaktionsgefäß in einem Thermomixer vorgeheizten Puffer (30 mM Triethanolamin, 95°C, pH 7,5) gegeben. Nach einer 3-minütigen Inkubation bei 95°C und 1200 min<sup>-1</sup> wurden die Reaktionsgefäße für 2 min im Ethanol-Eis-Bad abgekühlt und zentrifugiert (10 min, -19°C, 23300 min<sup>-1</sup>).

Der Überstand wurde bis zur Analyse bei -20°C gelagert. Die Bestimmung von AMP, ADP, ATP, NAD<sup>+</sup> und NADH erfolgte per LC-MS nach einer Methode von Luo *et al.* (2007), die nach Link (2009) adaptiert war. Die Details zu Methode und Geräten sind im Anhang 15.7 zusammengestellt.

### **Kultivierung**

Die Experimente zur Bestimmung intrazellulärer Metabolite aus dem Energiestoffwechsel erfolgten ausschließlich im Laborrührkessel. Da Vorversuche zeigten, dass es bei Verwendung des definierten WM8A- und Hoek-Mediums auf Grund ihres hohen Salzgehaltes zu einer starken Ionisierungs-Unterdrückung an der LC-MS kam (Annesley 2003), wurde stattdessen auf das salzärmere YNB-Medium, das ein klassisches definiertes Fertigmedium für *S. cerevisiae* ist, zurückgegriffen.

Das Startvolumen lag bei 1,0 L und der Versuch wurde mit einer Biomassekonzentration von circa 8 g L<sup>-1</sup> in YNB-Medium mit 50 g L<sup>-1</sup> Glucose gestartet. Es erfolgte eine beidseitige pH-Regelung auf pH 6,5. Die übrigen Bedingungen entsprachen den in Kapitel 5.4.3 angegebenen. Die erste intrazelluläre Probe wurde genommen, wenn die Glucosekonzentration im Reaktor auf 15 - 20 g L<sup>-1</sup> abgesunken war. Eine zweite intrazelluläre Probe wurde genommen, nachdem an Hand der online erfassten Abgasdaten festgestellt wurde, dass die Zellen seit mindestens 2 h Ethanol verbrauchten.

## 6 Charakterisierung des *Saccharomyces cerevisiae* Basisstammes

Als Basisstamm für die Entwicklung eines rekombinanten Bernsteinsäure produzierenden *S. cerevisiae* Stammes wurde der Wildtypstamm AH22ura3 eingesetzt. In diesem Kapitel wird die Charakterisierung dieses Grundstammes bezüglich der als Selektionsmarker für die Plasmide genutzten Auxotrophien beschrieben. Zudem wird die Toleranz von *S. cerevisiae* AH22ura3 gegenüber organischen Säuren am Beispiel der Essigsäure- und Bernsteinsäuretoleranz betrachtet.

### 6.1 Einfluss der Auxotrophien auf das Wachstum

Der Basisstamm *S. cerevisiae* AH22ura3 besitzt Auxotrophien für Uracil, Leucin und Histidin. Alle Überexpressionen im Lauf der Stammentwicklung erfolgten auf Plasmiden. Als Selektionsmarker für die bei Veen (2002) beschriebenen pFlat-Plasmide wird die Komplementation der Uracil- und Leucin-Auxotrophie sowie die Resistenz gegen Geneticin genutzt (Tabelle 5.1). Hierdurch entstanden Stämme mit verschiedenen Kombinationen an Auxotrophien mit und ohne Antibiotikaresistenz. Da dies das Wachstum der Zellen signifikant beeinflussen kann (Pronk 2002, Çakar *et al.* 1999, Chopra *et al.* 1999), wurde der Basisstamm mit folgenden Plasmidkombinationen untersucht:

- *S. cerevisiae* AH22ura3 wt
- *S. cerevisiae* AH22ura3 wt pFlat3
- *S. cerevisiae* AH22ura3 wt pFlat1 pFlat3
- *S. cerevisiae* AH22ura3 wt pFlat1 pFlat2 pFlat3

Die vier *S. cerevisiae* AH22ura3 Stämme zeigten, wie in Abbildung 6.1 dargestellt, in aeroben Satzkultivierungen mit Glucose als Kohlenstoffquelle auf Grund des Crabtree-Effekts das typische diauxische Wachstum. Das heißt, es zeigt sich zunächst nach einer kurzen Verzögerungsphase eine erste exponentielle Wachstumsphase. In dieser wird die vorgelegte Kohlenstoffquelle Glucose respiro-fermentativ zu Ethanol und Biomasse verstoffwechselt. Ein kurzes Stagnieren des Wachstums, das sich beispielsweise bei den Kultivierungen im WM8A-Medium je nach Stamm nach 19,5 - 22,5 h zeigte (Abbildung 6.1A), gefolgt von einer zweiten exponentiellen Wachstumsphase zeigt an, dass die Glucose verbraucht ist und die Zellen nun Ethanol als Kohlenstoffquelle nutzen.

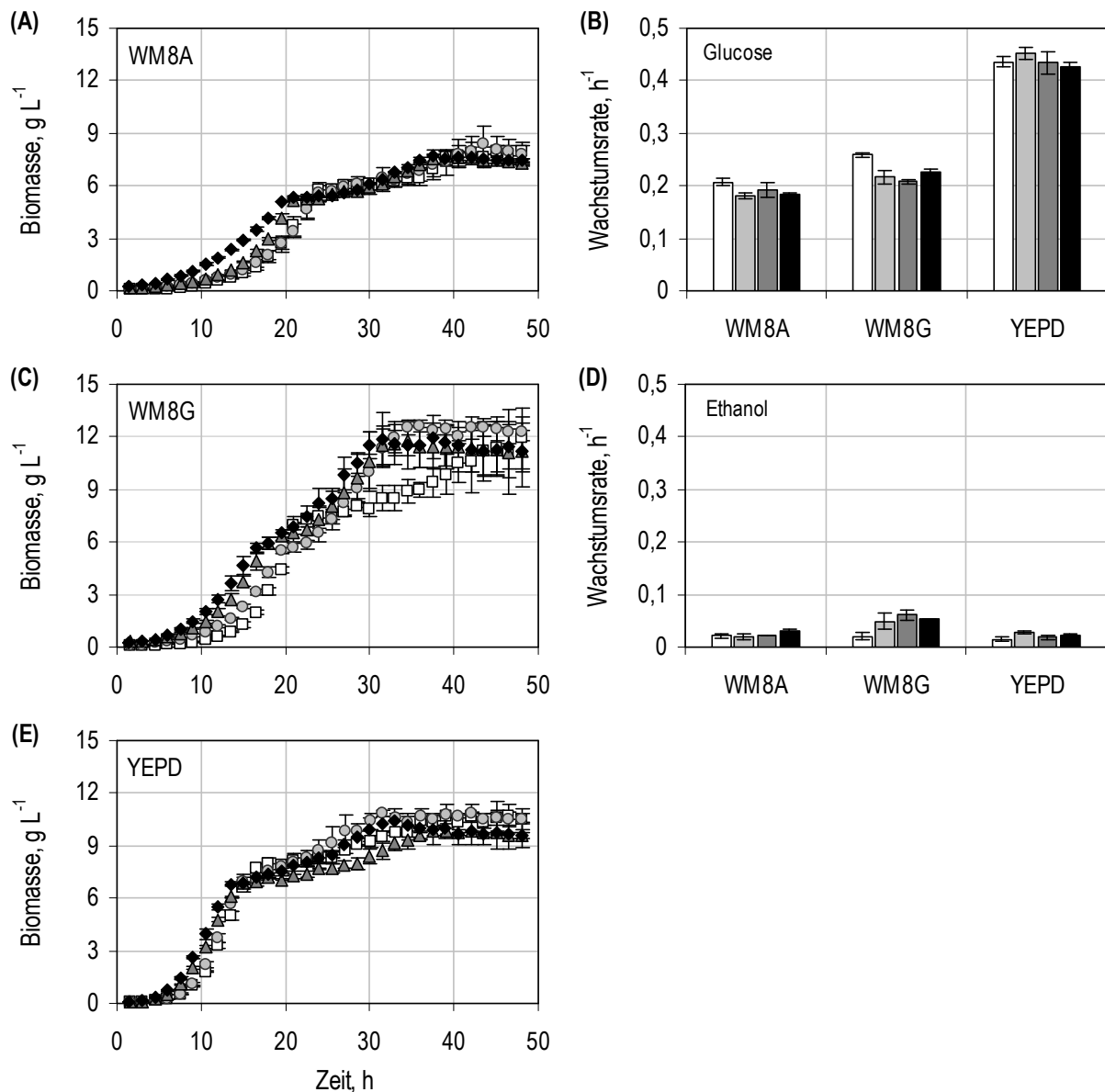


Abbildung 6.1: Evaluierung des Effekts der Leerplasmide auf das Wachstum des Basisstammes *S. cerevisiae* AH22ura3 (Parallele Satzversuche im Bioreaktorblock,  $V_0 = 12 \text{ mL}$ ,  $n = 3$ ). A, C und E: Wachstumskurven der Stämme *S. cerevisiae* AH22ura3 wt ( $\square$ ), wt pFlat3 ( $\circ$ ), wt pFlat1 pFlat3 ( $\triangle$ ) und wt pFlat1 pFlat2 pFlat3 ( $\blacklozenge$ ) in drei verschiedenen Medien. B und D: Wachstumsraten der Stämme *S. cerevisiae* AH22ura3 wt ( $\square$ ), wt pFlat3 ( $\square$ ), wt pFlat1 pFlat3 ( $\blacksquare$ ) und pFlat1 pFlat2 pFlat3 ( $\blacksquare$ ) mit Glucose und Ethanol als Kohlenstoffquelle.

Die Wachstumsraten der *S. cerevisiae* AH22ura3 Stämme mit Leerplasmiden in den definierten Medien WM8A und WM8G mit Glucose sind auf bis zu 80 % der Wachstumsrate des Referenzstammes ohne Leerplasmide vermindert. Die Wachstumsraten dieser vier Stämme im Komplexmedium mit Glucose unterschieden sich nicht signifikant. Die Unterschiede innerhalb der Gruppe der Stämme mit Leerplasmiden waren in allen drei Medien nicht signifikant. Bei allen vier Stämmen wurde die höchste Wachstumsrate mit

Glucose im reichhaltige Komplexmedium YEPD, das Pepton und Hefeextrakt als Stickstoffquelle zur Verfügung stellt, erreicht. Bei den definierten Medien wuchsen die Stämme schneller, wenn statt anorganischem Ammoniumsulfat die gute Stickstoffquelle Glutamat zur Verfügung stand.

Mit Ethanol zeigten alle vier Stämme nur geringe Wachstumsraten. Diese lagen im YEPD- und WM8A-Medium zwischen  $0,02-0,03 \text{ h}^{-1}$ . Im Medium mit Glutamat als Stickstoffquelle, WM8G, wurden bei den Stämmen mit Leerplasmiden Wachstumsraten bis  $0,06 \text{ h}^{-1}$  und bei dem Stamm ohne Plasmide ein Wert von  $0,02 \text{ h}^{-1}$  mit Ethanol erzielt.

Während der Kultivierung der vier Wildtypstämme, die mit einem pH von 6,5 gestartet wurde, fiel der pH, der durch die immobilisierten chemischen Sensoren online im Reaktor gemessen wurde, zunächst während der Phase des Glucoseverbrauchs auf bis zu pH 5,6 ab und stieg nach dem Verbrauch von Glucose wieder auf bis zu pH 6,8 nach 48 h an (Daten nicht gezeigt). In diesem pH-Bereich wird die Wachstumsrate von *S. cerevisiae* nicht durch den pH beeinflusst (Barnett 1997).

## Diskussion

Die Kultivierungen des Basisstammes *S. cerevisiae* AH22ura3 mit verschiedenen Plasmidkombinationen im Bioreaktorblock zeigten, dass die zugesetzten Konzentrationen an den essentiellen Substanzen Uracil, Leucin und Histidin ausreichend sind, um Limitierungen durch die Auxotrophien zu vermeiden. Da die Unterschiede zwischen den Stämmen mit Plasmiden nicht signifikant waren, konnten trotz unterschiedlicher Auxotrophiemuster im Laufe der weiteren Arbeiten die Wachstumsraten von Stämmen mit den Plasmiden pFlat3, pFlat1 und pFlat3 sowie pFlat1, pFlat2 und pFlat3 direkt miteinander verglichen werden.

Durch diese Versuche erfolgte bereits eine erste Charakterisierung des Ausgangsstammes für die weitere Stammentwicklung. Tabelle 6.1 vergleicht die Wachstumsraten von *S. cerevisiae* AH22ura3 und weiteren Hefestämmen in definierten Medien mit Glucose oder Ethanol als Kohlenstoffquelle.

Bei allen Stämmen ist die Wachstumsrate mit Glucose höher als mit Ethanol. Diese Übersicht zeigt, dass *S. cerevisiae* AH22ura3 wt auf beiden Kohlenstoffquellen zu den schlechter wachsenden Hefestämmen zählt. Dies gilt besonders für das Wachstum mit Ethanol, wo die Wachstumsrate von *S. cerevisiae* AH22ura3 auf nur 10 % der Wachstumsrate mit Glucose fällt.



Tabelle 6.1: Wachstumsraten ( $h^{-1}$ ) verschiedener *S. cerevisiae* Wildtypstämme in definierten Medien mit Glucose oder Ethanol als Kohlenstoffquelle und Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle.

Stamm	$\mu_{\text{Glucose}}$	$\mu_{\text{Ethanol}}$	$\mu_{\text{Ethanol}} \mu_{\text{Glucose}}^{-1}$	Quelle
AH22ura3	0,21 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,10	diese Arbeit
S173-6B	0,18	0,09	0,52	Zhao und McAlister-Henn 1996
CBS8066	0,44	0,12	0,27	van Dijken <i>et al.</i> 2000
BAY.17	0,42	0,08	0,19	van Dijken <i>et al.</i> 2000
X2180	0,34	0,13	0,38	van Dijken <i>et al.</i> 2000
CEN.PK122	0,41	0,12	0,29	van Dijken <i>et al.</i> 2000
RY601	0,21	0,10	0,47	Boubekeur <i>et al.</i> 1999

Trotz des relativ schlechten Wachstums von *S. cerevisiae* AH22ura3 wurde dieser Stamm in der weiteren Stammentwicklung eingesetzt, da durch die zu den Auxotrophien des Stammes passenden pFlat-Plasmide bis zu drei parallele und stabile Überexpressionen ermöglicht werden und beim Projektpartner ORGANOBALANCE GmbH (Berlin) bereits vielfältige Erfahrung bezüglich des Metabolic Engineering dieses Stammes vorlagen (beispielsweise Polakowski *et al.* 1999, Veen *et al.* 2003, Veen und Lang 2004).

## 6.2 Toleranz gegenüber organischen Säuren

Einer der größten prozesstechnischen Vorteile von *S. cerevisiae* ist die hohe Toleranz gegenüber hohen Ionenstärken, niedrigen pH-Werten sowie die Toleranz gegenüber organischen Säuren (Nevoigt 2008). Bezüglich der Toleranz gegenüber organischen Säuren sind Daten zu den Carbonsäuren Acetat, Lactat, Sorbat und Benzoat verfügbar (Narendranath *et al.* 2001, Thomas *et al.* 2002, Abbott *et al.* 2009), die im Lebensmittelsektor als Konservierungsmittel eingesetzt werden. Daten zur Toleranz gegenüber Succinat sind nicht publiziert. Daher wurde die Succinat- sowie als Referenz auch die Acetatoleranz des *S. cerevisiae* Wildtypstammes AH22ura3 wt pFlat3 bestimmt. Hierfür erfolgten Satzkultivierungen im Komplexmedium mit Glucose mit vorgelegtem Natriumsuccinat oder -acetat in verschiedenen Konzentrationen. Der Start-pH lag bei pH 6,5.

### Acetattoleranz

Wie Abbildung 6.2 zeigt, sinkt die Wachstumsrate bei *S. cerevisiae* AH22ura3 wt pFlat3 unter den gewählten Kultivierungsbedingungen bereits ab einer Konzentration von  $10 \text{ g L}^{-1}$  Acetat im YEPD-Medium signifikant. Bei  $75 \text{ g L}^{-1}$  zugesetztem Acetat war kein Wachstum mehr nachzuweisen, sondern die Zellen starben langsam ab ( $\mu = -0,01 \pm 0,00 \text{ h}^{-1}$ ). Bei einer Konzentration von  $25 \text{ g L}^{-1}$  Acetat im Medium wurde die eingesetzte Glucose bis zum Versuchsende komplett verbraucht und als Folge des durch Acetat ausgelösten osmotischen Stresses nahm die Glycerinbildung zu. Neben Glucose wurde bei den Ansätzen mit Acetatkonzentrationen bis zu  $10 \text{ g L}^{-1}$  auch das vorgelegte Acetat verbraucht. Dies führte dazu, dass bei den Ansätzen mit Acetatkonzentrationen von  $5$  und  $10 \text{ g L}^{-1}$  die maximal erreichte Biomassekonzentration die des Referenzansatzes übertraf.

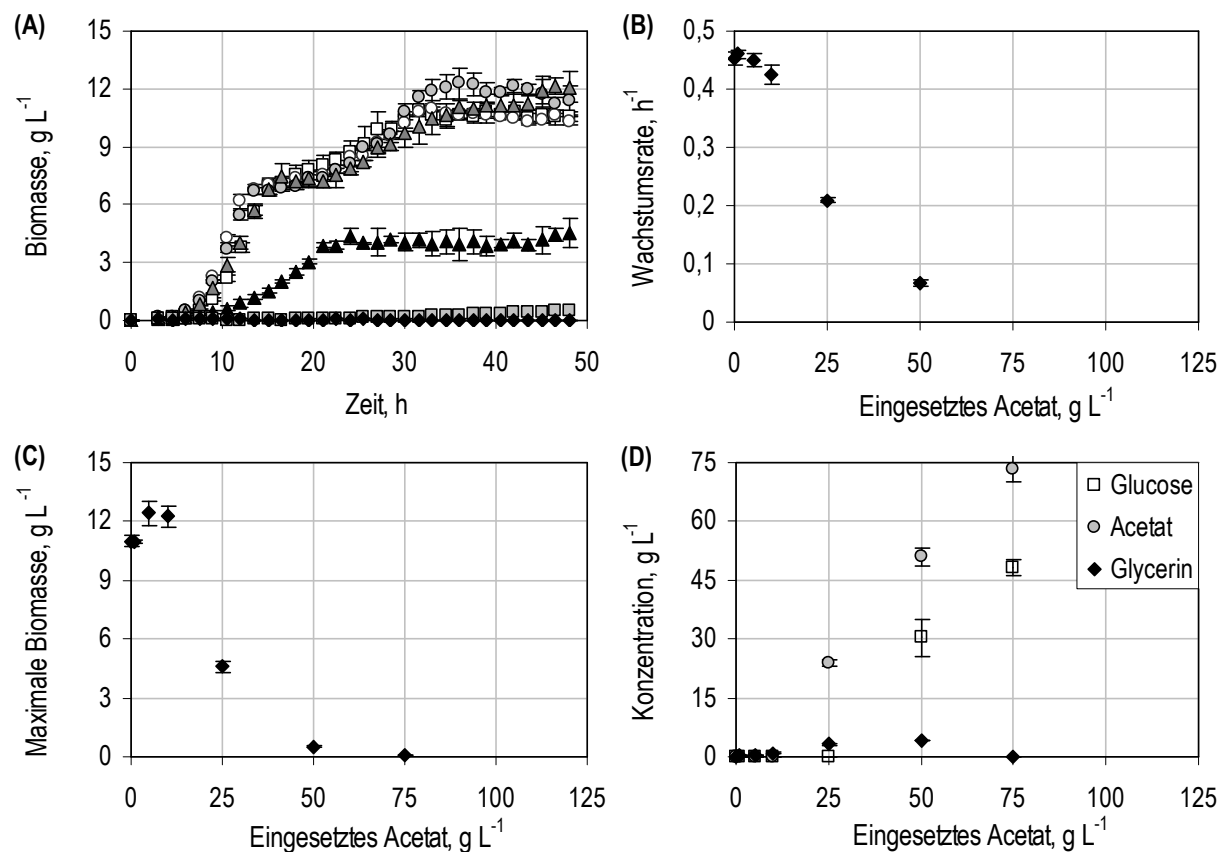


Abbildung 6.2: Untersuchung der Acetattoleranz des *S. cerevisiae* Basisstammes (Satzversuche im Bioreaktorblock,  $V_0 = 12 \text{ mL}$ ,  $n = 3$ ). A: Wachstumskurven des *S. cerevisiae* Wildtypstammes AH22ura3 wt pFlat3 in YEPD-Medium mit  $50 \text{ g L}^{-1}$  Glucose bei Vorlage von  $0 \text{ g L}^{-1}$  ( $\square$ ),  $1 \text{ g L}^{-1}$  ( $\circ$ ),  $5 \text{ g L}^{-1}$  ( $\odot$ ),  $10 \text{ g L}^{-1}$  ( $\triangle$ ),  $25 \text{ g L}^{-1}$  ( $\blacktriangle$ ),  $50 \text{ g L}^{-1}$  ( $\square$ ) und  $75 \text{ g L}^{-1}$  Natriumacetat ( $\blacklozenge$ ). B, C und D: Resultierende Wachstumsraten, maximale Biomassekonzentration und Endkonzentration von Glucose, Acetat und Glycerin nach 48 h jeweils aufgetragen gegen die eingesetzte Acetatkonzentration.

### Succinattoleranz

Wie bei Acetat sinkt auch mit ansteigendem Zusatz von Succinat die erreichte maximale Biomassekonzentration sowie die Wachstumsrate ab (Abbildung 6.3). Allerdings starben die Zellen im Gegensatz zu dem Versuch mit hohen Acetatkonzentrationen selbst bei  $120 \text{ g L}^{-1}$  Natriumsuccinat im Medium nicht ab, sondern die Wachstumsrate betrug noch  $0,01 \pm 0,00 \text{ h}^{-1}$ . Dementsprechend wurden selbst bei  $120 \text{ g L}^{-1}$  Succinat im Medium binnen 48 h Stunden etwa  $4 \text{ g L}^{-1}$  Glucose verbraucht. Bei bis zu  $60 \text{ g L}^{-1}$  Succinat im Medium wurde die eingesetzte Glucose binnen 48 h vollständig umgesetzt. Auf Grund der steigenden Ionenstärke durch Succinat stieg auch die Glycerinbildung.

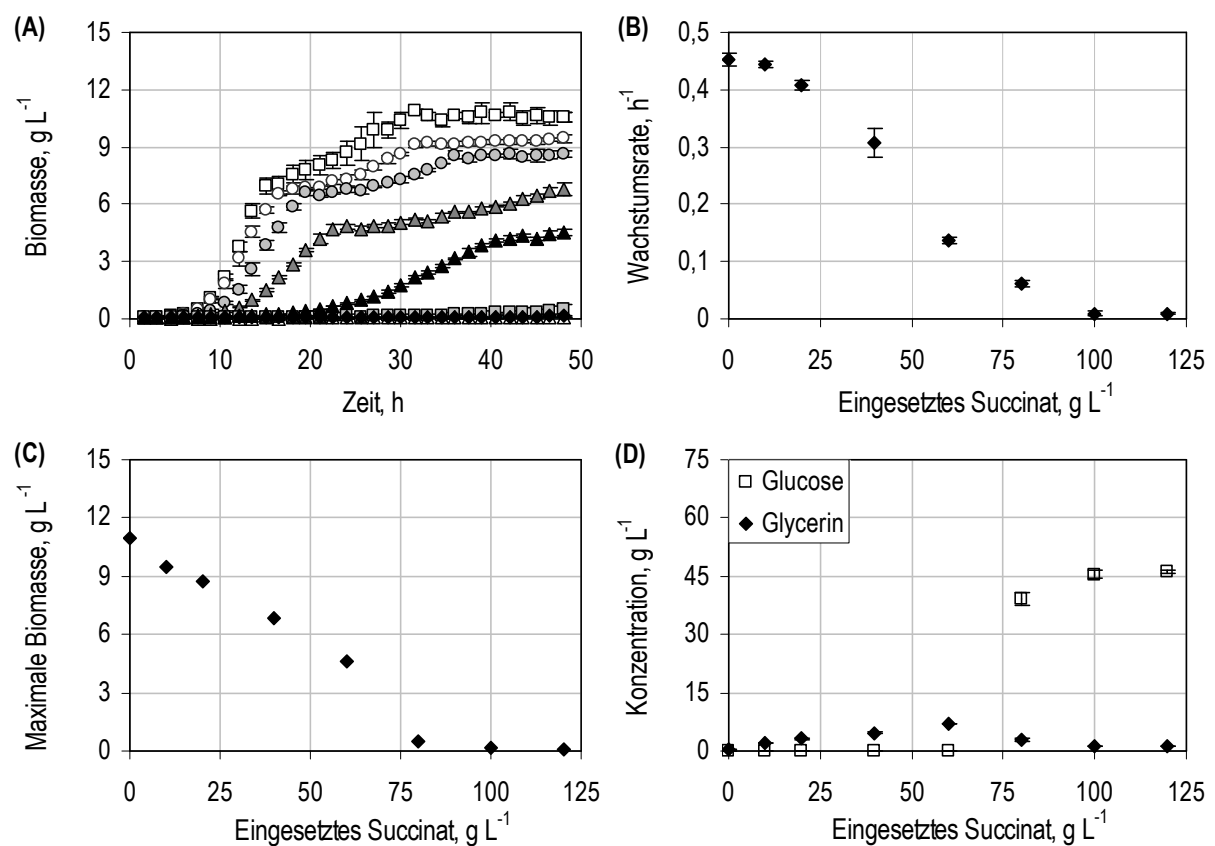


Abbildung 6.3: Untersuchung der Succinattoleranz des *S. cerevisiae* Basisstammes (Satzversuche im Bioreaktorblock,  $V_0 = 12 \text{ mL}$ ,  $n = 3$ ). A: Wachstumskurven von *S. cerevisiae* AH22ura3 wt pFlat3 in YEPD-Medium mit Glucose bei Vorlage von  $0 \text{ g L}^{-1}$  ( $\square$ ),  $10 \text{ g L}^{-1}$  ( $\circ$ ),  $20 \text{ g L}^{-1}$  ( $\odot$ ),  $40 \text{ g L}^{-1}$  ( $\triangle$ ),  $60 \text{ g L}^{-1}$  ( $\blacktriangle$ ),  $80 \text{ g L}^{-1}$  ( $\square$ ),  $100 \text{ g L}^{-1}$  ( $\blacklozenge$ ) und  $120 \text{ g L}^{-1}$  Natriumsuccinat ( $\triangle$ ). B, C und D: Resultierende Wachstumsraten, maximale Biomassekonzentration und Endkonzentration von Glucose und Glycerin nach 48 h jeweils aufgetragen gegen die eingesetzte Succinatkonzentration.

## Diskussion

Die Toleranz des Produktionsmikroorganismus gegenüber hohen Konzentrationen an Succinat ist ein entscheidender Faktor für eine wirtschaftliche Succinatproduktion. Tabelle 6.2 stellt die Succinattoleranz des Hefestammes AH22ura3 wt pFlat3 der Succinattoleranz der bislang publizierten Mikroorganismen zur biotechnologischen Succinatproduktion gegenüber. Nur für den natürlichen Succinatproduzenten *Actinobacillus succinogenes* wurde bislang ein Wachstum in Gegenwart von etwa 100 g L<sup>-1</sup> Natriumsuccinat gezeigt.

Tabelle 6.2: Succinattoleranz verschiedener Mikroorganismen angegeben als Fähigkeit zum Wachstum in Gegenwart von etwa 100 g L<sup>-1</sup> Dinatriumsuccinat.

	Mikroorganismus	Wachstum	Quelle
Natürliche Succinat- produzenten	<i>Anaerobiospirillum succiniciproducens</i>	nein	Zeikus <i>et al.</i> 1999
	<i>Actinobacillus succinogenes</i> Mutante	ja	Zeikus <i>et al.</i> 1999
	<i>Mannheimia succiniciproducens</i>	keine Angabe verfügbar	
	<i>Basfia succiniciproducens</i>	keine Angabe verfügbar	
Plattform- organismen	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	keine Angabe verfügbar	
	<i>Escherichia coli</i> Mutanten	nein	Zeikus <i>et al.</i> 1999
	<i>S. cerevisiae</i>	ja	diese Arbeit

Hervorzuheben ist, dass der per Metabolic Engineering am weitesten entwickelte Produktionsorganismus *Escherichia coli* sehr empfindlich gegenüber organischen Säuren ist. So halbiert sich die Wachstumsrate von *S. cerevisiae* bei Zusatz von 25 g L<sup>-1</sup> Natriumacetat zum Medium lediglich, wogegen bei *E. coli* bereits 10 g L<sup>-1</sup> Acetat diese Halbierung hervorrufen (Luli und Strohl 1990). Außer der Angabe, dass bei *E. coli* kein Wachstum in Gegenwart von 100 g L<sup>-1</sup> Natriumsuccinat existiert, sind keine Daten zur Succinattoleranz publiziert. Allerdings zeigen einige Publikationen zur Succinatproduktion mit *E. coli* ein Absinken der Biomassekonzentration und der zellspezifischen Produktivität während Kultivierungen ab Succinatkonzentrationen um 50 g L<sup>-1</sup> (beispielsweise bei Sánchez *et al.* 2005, Andersson *et al.* 2009a, Andersson *et al.* 2009b).

Die Charakterisierung des *S. cerevisiae* Stammes zeigte, dass die Zellen selbst bei 120 g L<sup>-1</sup> Succinat im Medium noch Glucose umsetzten und ein geringes Wachstum nachzuweisen war. Dies bestätigte, dass die Hefe *S. cerevisiae* auf Grund ihrer exzellenten Toleranz gegenüber Succinat ein interessanter Kandidat für die mikrobielle Bernsteinsäureproduktion ist.

## 7 Charakterisierung von Succinat-Dehydrogenase-Deletionsstämmen

Als erster Schritt der Stammentwicklung bei der ORGANOBALANCE GmbH erfolgte eine Deletion von Untereinheiten der Succinat-Dehydrogenase (SDH). Durch die Blockade des Succinat abbauenden Enzyms Succinat-Dehydrogenase, sollte eine erste Erhöhung der Succinatbildung der Hefezellen erzielt werden. Den Widersprüchen in der Literatur bezüglich der Notwendigkeit der Deletion einer bzw. beider katalytischen Untereinheiten, *SDH1* und *SDH2*, für einen vollständigen Aktivitätsverlust wurde durch die Evaluierung der folgenden Stämmen Rechnung getragen:

- *S. cerevisiae* AH22ura3 wt pFlat3 (als Referenz)
- *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2$  pFlat3
- *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1$  pFlat3

Im Folgenden wird bei den Stammnamen zur besseren Übersichtlichkeit auf die Nennung der pFlat-Plasmide verzichtet.

In diesem Kapitel wird neben den konstitutiven SDH-Deletionsstämmen auch die Evaluierung eines reprimierbaren Promotorsystems am Beispiel der SDH-Deletion beschreiben. Die hierzu betrachteten Stämme werden direkt im entsprechenden Unterkapitel vorgestellt.

### 7.1 Satzverfahren mit Glucose als Kohlenstoffquelle

Das Wachstum und die Succinatbildung der beiden SDH-Deletionsstämme AH22ura3  $\Delta sdh2$  und  $\Delta sdh2 \Delta sdh1$  und des zugehörigen Referenzstammes wurden im Satzversuch mit Glucose als Kohlenstoffquelle im Komplexmedium YEPD und in definierten Medien mit Glutamat (WM8G) oder Ammoniumsulfat (WM8A) als Stickstoffquelle reaktionstechnisch untersucht.

Abbildung 7.1 zeigt, dass nur der Referenzstamm ohne Deletionen das für *S. cerevisiae* typische diauxische Wachstum zeigt. Diese zweite Wachstumsphase fehlt bei den SDH-Deletionsstämmen in allen drei Medien. Zwischen den beiden SDH-Deletionsstämmen  $\Delta sdh2$  und  $\Delta sdh2 \Delta sdh1$  ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Wachstumsrate oder Succinatbildung.

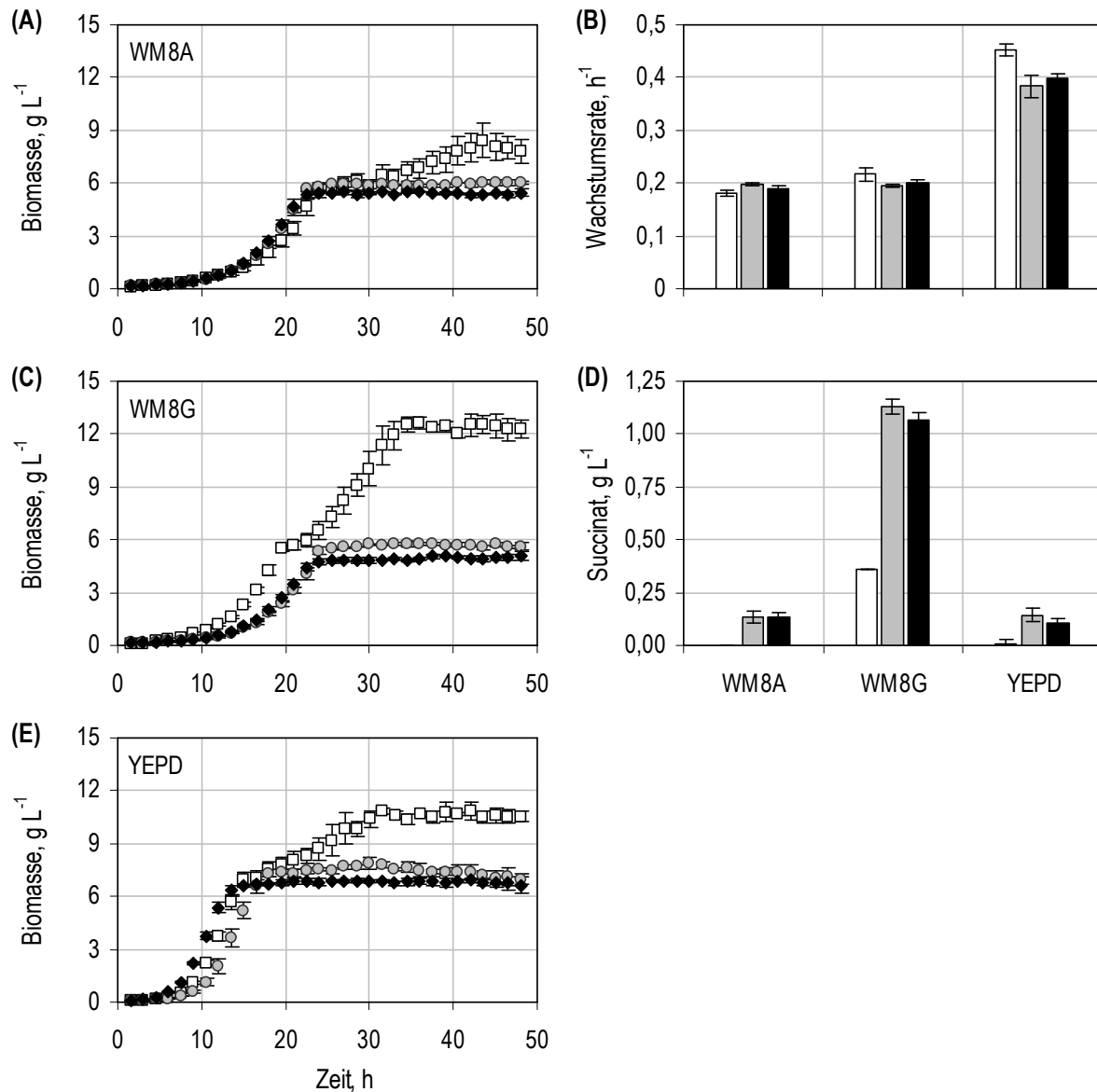


Abbildung 7.1: Evaluierung der *S. cerevisiae* SDH-Deletionsstämmen durch Satzversuche mit Glucose als Kohlenstoffquelle im Bioreaktorblock ( $V_0 = 12 \text{ mL}$ ,  $n = 3$ ). A, C und E: Wachstumskurven des *S. cerevisiae* AH22ura3 Wildtypstammes (□) und der beiden SDH-Deletionsstämmen  $\Delta sdh2$  (○) und  $\Delta sdh2 \Delta sdh1$  (◆) in drei verschiedenen Medien mit  $50 \text{ g L}^{-1}$  Glucose als Kohlenstoffquelle. B und D: Wachstumsraten mit Glucose und Succinatkonzentration nach 48 h Versuchsdauer von *S. cerevisiae* AH22ura3 wt (□),  $\Delta sdh2$  (○) und  $\Delta sdh2 \Delta sdh1$  (◆).

Während sich im definierten WM8A-Medium kein Effekt der Deletion(en) auf die Wachstumsrate mit Glucose zeigt, reduziert sich die Wachstumsrate in den beiden reichhaltigeren Medien YEPD und WM8G bei Deletion der Untereinheit *SDH2* oder beider katalytischer Untereinheiten auf bis zu 90 % bzw. 85 % bezogen auf den Wildtyp. Bei den beiden *S. cerevisiae* SDH-Deletionsstämmen sank der pH unter das Detektionslimit der chemischen pH-Sensoren ab und lag bei Versuchsende nach 48 h laut manueller Bestimmung über eine pH-Elektrode bei pH 4,4 (Daten nicht gezeigt). Laut Barnett (1997)

wird die Wachstumsrate von *S. cerevisiae* im Bereich bis pH 3,5 nicht durch den pH beeinflusst.

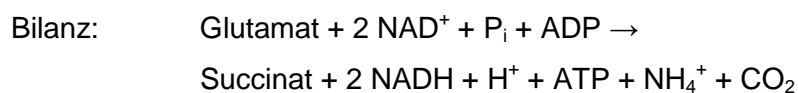
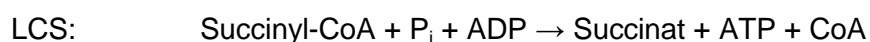
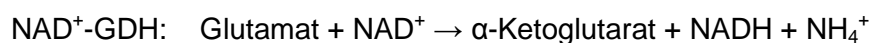
In allen untersuchten Medien erreichten die SDH-Deletionsstämme höhere Succinatendkonzentrationen nach 48 h als der Wildtyp. Im definierten Minimalmedium und im Komplexmedium lag die Succinatbildung der SDH-Deletionsstämme unter  $0,2 \text{ g L}^{-1}$ . Auf Glutamat wurde mit *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2$  mit  $1,1 \text{ g L}^{-1}$  Succinat die höchste Konzentration erreicht. Der Wildtyp bildete nur in den beiden reichhaltigen Medien WM8G und YEPD Succinat.

## Diskussion

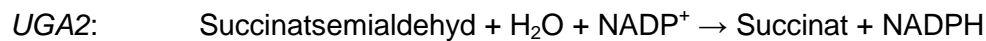
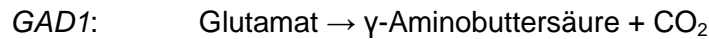
Bei der ersten vergleichenden Charakterisierung der *S. cerevisiae* SDH-Deletionsstämme unter aeroben Satzbedingungen mit Glucose zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den SDH-Deletionsstämmen. Unabhängig vom Medium hatte die Deletion einer oder beider katalytischer Untereinheiten nur geringe oder keine Auswirkungen auf die Wachstumsrate. Dies ist dadurch zu erklären, dass auf Grund der Glucoserepression des respirativen Stoffwechsels die Aktivität des Citrat-Zyklus und damit auch der SDH unter den untersuchten Bedingungen gering ist (Gombert *et al.* 2001, Blank *et al.* 2005) und der Kohlenstoff hauptsächlich vor dem Citrat-Zyklus in Richtung Ethanol abfließt.

Beim Wildtyp war unter aeroben Satzbedingungen mit Glucose nur in reichhaltigen Medien Succinat nachzuweisen. Dies deckt sich mit den Aussagen von Gancedo und Serrano (1989), dass Succinat unter aeroben Bedingungen nur in reichhaltigen Medien als Überschußmetabolit sekretiert wird, da unter diesen Bedingungen keine Intermediate des Citrat-Zyklus Richtung Biosynthese abgezogen werden.

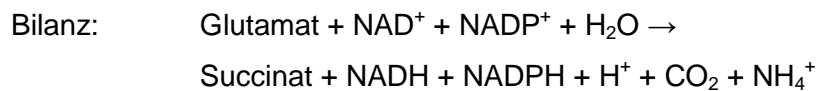
In den ersten Kultivierungen der SDH-Deletionsstämme im aeroben Satzverfahren im Bioreaktorblock konnte eine Anreicherung von Succinat gezeigt werden. Dass speziell die im WM8G enthaltene Stickstoffquelle Glutamat eine Succinatbildung fördert, wurde bereits in den Arbeiten von Kleinzeller (1941), Heerde und Radler (1978), Albers *et al.* (1996) und Camarasa *et al.* (2003) berichtet. Dies ist darauf zurückzuführen, dass Glutamat über  $\alpha$ -Ketoglutarat direkt in den Citrat-Zyklus eingeschleust und über nur zwei Reaktionsschritte zu Succinat umgewandelt werden kann:



Neben diesem Hauptweg kann Glutamat auch über die Glutamat-Decarboxylase (*GAD1*) zu  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) reagieren, das über die GABA-Transaminase (*UGA1*) und die Succinatsemialdehyd-Dehydrogenase (*UGA2*) zu Succinat umgewandelt wird (Miller und Magasanik 1990, Coleman *et al.* 2001):



Wird bei der Erstellung der Bilanz angenommen, dass das bei der von der Succinatsemialdehyd-Dehydrogenase katalysierten Reaktion verbrauchte  $\alpha$ -Ketoglutarat aus Glutamat stammt, ergibt sich:



Theoretisch kann somit auf beiden Wegen bis zu  $1 \text{ mol}_{\text{Succinat}} \text{ mol}_{\text{Glutamat}}^{-1}$  gebildet werden, wobei die Zelle auch 2 mol NADH und 1 mol ATP oder ein 1 mol NADH und 1 mol NADPH gewinnt. Eine industrielle Anwendung von Glutamat als Substrat für die Succinatproduktion ist aus Kostengründen auszuschließen, da Glutamat doppelt so teuer wie Succinat ist. Dennoch sind bei der wissenschaftlichen Untersuchung der Succinatproduktion und besonders zur Charakterisierung des Stoffwechsel rekombinanter Stämme auch Medien mit Glutamat von Interesse. *S. cerevisiae* ist nicht in der Lage die Stickstoffquelle Glutamat oder andere Aminosäuren als alleinige Kohlenstoffquellen zu nutzen (Cooper 1982), sodass Glutamat stets nur als Cosubstrat zur Succinatbildung eingesetzt werden kann.

## 7.2 Satz- und Zulaufverfahren mit Glucose als Kohlenstoffquelle

Die weitere Untersuchung der *S. cerevisiae* SDH-Deletionsstämme und des Referenzstammes erfolgte in einem standardisierten Kultivierungsschema bestehend aus einer zweitägigen Satzphase mit  $50 \text{ g L}^{-1}$  Glucose als Kohlenstoffquelle gefolgt von einer eintägigen Zulaufphase mit einer konstanten Zudosierung von  $0,7 \text{ g}_{\text{Glucose}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  im Rührkesselreaktor im Labormaßstab (Startvolumen 1,2 L). Es wurde ein spezielles definiertes Medium mit Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle nach van Hoek *et al.* (2000) genutzt, um Limitierungen auch bei höheren Zellkonzentrationen in der Zulaufphase zu vermeiden.

Durch die Verwendung des definierten Mediums wird das Erstellen einer Kohlenstoffbilanz möglich. Bezüglich des Produkts Ethanol ist zu beachten, dass dieses auf Grund seiner



leichten Flüchtigkeit mit dem Abgas aus dem Reaktor ausgetragen wird. Da die Nichtberücksichtigung des verdunsteten Ethanol die Berechnung von Ausbeuten und zellspezifischen Produktionsraten verfälschen kann (Duboc und von Stockar 1998, Löser *et al.* 2005), wurde die Ethanolverdunstung bei den Kultivierungen im Laborreaktor wie in Kapitel 5.4.5 beschreiben berücksichtigt. Dargestellt in den Diagrammen der Kultivierungen im Labormaßstab sind im Folgenden nur die um die Verdunstung korrigierten Ethanolwerte. Auch die Berechnung von zellspezifischen Raten und Ausbeuten erfolgte mit den korrigierten Ethanolwerten.

Abbildung 7.2 zeigt die zeitlichen Konzentrationsverläufe bei den Kultivierungen der beiden SDH-Deletionsstämme, AH22ura3  $\Delta sdh2$  und AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1$  und der Referenzstammes AH22ura3 wt. Zudem sind in Tabelle 7.1 die zellspezifischen Raten und in Tabelle 7.2 die differentiellen Ausbeuten der Kultivierungen in den verschiedenen Prozessphasen gezeigt. Da es sich bei den Kultivierungen im Laborreaktor um Einfachbestimmungen handelt, wurden Unterschiede über 10 % als signifikant betrachtet.

### Verbrauch von Glucose als Kohlenstoffquelle in der Satzphase

In der Satzphase zeigten sich bezüglich des Wachstums dieselben Effekte wie in den Kultivierungen im Bioreaktorsystem. Alle drei Stämme wuchsen exponentiell mit Glucose wobei sich die Wachstumsraten der SDH-Deletionsstämme nicht signifikant vom Wildtyp unterschieden (Tabelle 7.1). Auch die Glucoseaufnahmeraten unterschieden sich nicht signifikant. Es zeigt sich beim Wildtyp und den SDH-Deletionsstämmen der typische, durch den Crabtree-Effekt hervorgerufene respiro-fermentative Stoffwechsel mit dem Hauptprodukten Ethanol gefolgt von Biomasse. Der respiratorische Koeffizient RQ lag dementsprechend über 1 (Tabelle 7.2). Alle drei Stämme bildeten im Wachstum mit Glucose etwa 3 g L<sup>-1</sup> Glycerin zum Ausgleich des bei der Biomassessynthese anfallenden Überschusses an NADH. Zudem erfolgte auch eine geringe Acetatbildung von 0,3 mmol g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> beim Wildtyp und 0,1 mmol g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> bei den SDH-Deletionsstämmen. Nur bei den SDH-Deletionsstämmen wurde eine minimale Succinatbildung, die unter 0,01 mmol g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> lag, detektiert.

Tabelle 7.1: Wachstumsraten (h<sup>-1</sup>) und zellspezifische Substrataufnahme- sowie Produktbildungsraten (mmol g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) in der Satzphase der Kultivierung im definierten Hoek-Medium im Laborreaktor zur Evaluierung der *S. cerevisiae* SDH-Deletionsstämme. n.d.: nicht detektiert.

Stamm	$\mu_{\max}$	$q_{\text{Glu}}$	$q_{\text{Suc}}$	$q_{\text{Eth}}$	$q_{\text{Gly}}$	$q_{\text{Ace}}$	$q_{\text{CO}_2}$	$q_{\text{O}_2}$
wt	0,29	-14,4	n.d.	23,0	1,8	0,3	22,8	5,5
$\Delta sdh2$	0,27	-14,9	0,00	22,4	1,5	0,1	23,1	5,5
$\Delta sdh2 \Delta sdh1$	0,30	-15,7	0,00	25,3	2,4	0,1	22,7	4,5

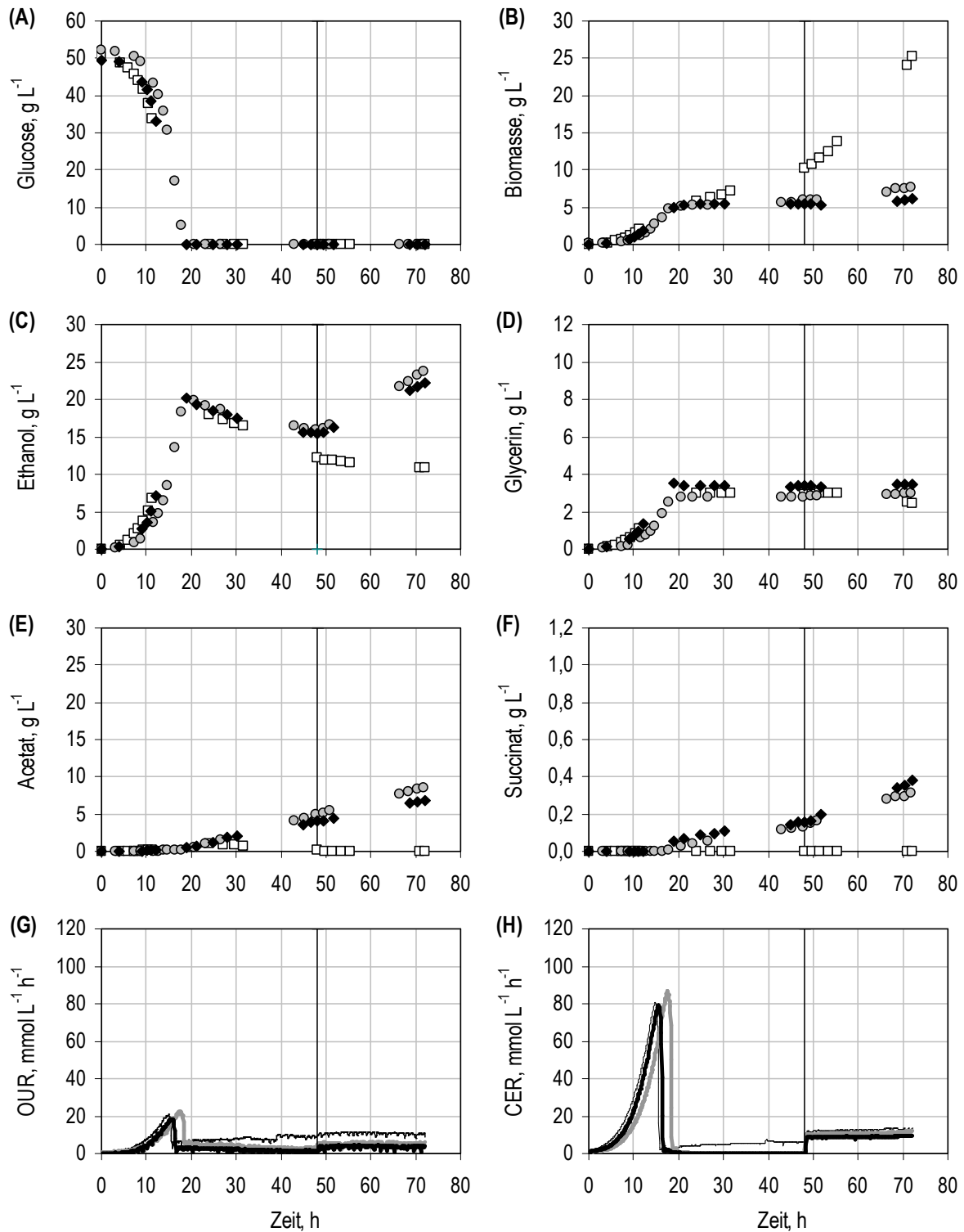


Abbildung 7.2: Satz- und Zulaufkultivierung im definierten Hoek-Medium mit 50 g L<sup>-1</sup> Glucose im Laborreaktor ( $V_0 = 1,2$  L) zur Evaluierung der *S. cerevisiae* SDH-Deletionsstämme. Dargestellt sind der Wildtypstamm AH22ura3 wt (□ oder dünne schwarze Linie), AH22ura3  $\Delta sdh2$  (○ oder dicke graue Linie) und AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1$  (◆ oder dicke schwarze Linie). Der Zulauf mit einer Dosierate von  $0,7 \text{ g}_{\text{Glucose}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  wurde nach 48 Stunden gestartet. Bei den dargestellten Ethanolkonzentrationen ist die Verdunstung von Ethanol berücksichtigt.

### Verbrauch von Ethanol als Kohlenstoffquelle in der Satzphase

Nach Verbrauch der Glucose erfolgte ein Wechsel zu Ethanol als Kohlenstoffquelle, wodurch sich beim Wildtyp eine diauxische Wachstumskurve ergab. Die Veratmung von Ethanol zeigte sich auch an einem  $RQ < 1$  (Tabelle 7.2). Wie in den vorangegangenen Kultivierungen in Bioreaktorblock ergab sich auch im Hoek-Medium beim Wildtypstamm mit Ethanol eine Wachstumsrate von nur  $0,02 \text{ h}^{-1}$ . Neben Ethanol wurde vom Wildtyp auch das während des Wachstums mit Glucose gebildete Acetat wieder verstoffwechselt (Abbildung 7.2). Die Glycerinkonzentration blieb zunächst konstant. In den letzten Proben, bevor der Zulauf gestartet wurde, zeigt eine Verringerung der Glycerinkonzentration um  $0,15 \text{ g L}^{-1}$ , dass die Zellen auch begonnen hatten neben Ethanol und Acetat Glycerin zu verstoffwechseln.

Tabelle 7.2: Ausbeuten ( $\text{mol mol}^{-1}$ ) im definierten Hoek-Medium im Laborreaktor bei der Evaluierung der *S. cerevisiae* SDH-Deletionsstämme.

Stamm	Phase	Substrat	$Y_{X/S}$	$Y_{\text{Suc}/S}$	$Y_{\text{Eth}/S}$	$Y_{\text{Gly}/S}$	$Y_{\text{Ace}/S}$	$Y_{\text{CO}_2/S}$	$Y_{\text{O}_2/S}$	RQ
wt	Satz	Glucose	0,2	n.d.	1,6	0,1	0,02	1,6	0,4	4,3
$\Delta sdh2$	Satz	Glucose	0,2	0,00	1,5	0,1	0,01	1,6	0,4	4,3
$\Delta sdh2 \Delta sdh1$	Satz	Glucose	0,2	0,00	1,6	0,1	0,03	1,5	0,3	4,5
wt	Satz	Ethanol Acetat Glycerin	0,3	n.d.	-	-	-	0,9	1,4	0,6
$\Delta sdh2$	Satz	Ethanol	0,1	0,01	-	0,0	0,85	0,0	0,8	-
$\Delta sdh2 \Delta sdh1$	Satz	Ethanol	0,0	0,01	-	0,0	0,66	0,0	0,6	-
wt	Zulauf	Glucose Ethanol Glycerin	1,0	n.d.	-	-	0,0	1,9	1,6	1,1
$\Delta sdh2$	Zulauf	Glucose	0,1	0,01	1,2	0,0	0,41	1,7	0,7	2,6
$\Delta sdh2 \Delta sdh1$	Zulauf	Glucose	0,1	0,02	1,2	0,0	0,37	1,7	0,7	2,5

Bei den SDH-Deletionsstämmen nahm die Biomassekonzentration mit Ethanol als Kohlenstoffquelle um weniger als  $1 \text{ g L}^{-1}$  zu. Obwohl nur beim Wildtyp ein deutlicher Zuwachs der Biomasse von mehreren Gram pro Liter mit Ethanol erzielt wurde, nahm die Ethanolkonzentration auch bei den SDH-Stämmen um mehrere Gramm pro Liter ab. Da die SDH-Deletionsstämme keine exponentielle Biomassebildung mit Ethanol aufwiesen, konnten in dieser Phase keine konstanten zellspezifischen Raten berechnet werden. Stattdessen wurden die molaren Ausbeuten bezogen auf Ethanol und die übrigen verbrauchten Substrate

betrachtet. Die Biomasse wurde hierfür mit einem Molekulargewicht von  $95,82 \text{ g mol}^{-1}$  entsprechend der Summenformel  $\text{C}_{3,75}\text{H}_{6,6}\text{N}_{0,63}\text{O}_{2,10}$  umgerechnet (Verduyn *et al.* 1990).

Die SDH-Deletionsstämme wandelten den  $\text{C}_2$ -Körper Ethanol hauptsächlich in den  $\text{C}_2$ -Körper Acetat um. Es wurden  $0,85 \text{ mol}_{\text{Acetat}} \text{ mol}_{\text{Ethanol}}^{-1}$  bei AH22ura3  $\Delta\text{sdh}2$  und  $0,66 \text{ mol}_{\text{Acetat}} \text{ mol}_{\text{Ethanol}}^{-1}$  bei AH22ura3  $\Delta\text{sdh}2 \Delta\text{sdh}1$  gebildet. Die Succinatausbeute betrug bei den SDH-Deletionsstämmen  $0,01 \text{ mol}_{\text{Succinat}} \text{ mol}_{\text{Ethanol}}^{-1}$ . Es wurde keine Kohlendioxidbildung (Detektionslimit der Abgassensorik  $0,01 \text{ \% CO}_2$ ) aber eine Sauerstoffaufnahme bei beiden SDH-Deletionsstämmen während des Verbrauchs von Ethanol gemessen (Abbildung 7.2).

### Zulaufphase

Durch den kontinuierlichen Zulauf von  $0,7 \text{ g}_{\text{Glucose}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , der in allen drei Kultivierungen nach 48 h gestartet wurde, wurde beim Wildtyp ein deutliches Wachstum von  $9,6 \text{ g L}^{-1}$  auf  $23,7 \text{ g L}^{-1}$  Biomasse erzielt. Parallel zur zudosierten Glucose wurde beim Wildtyp während des gesamten Zulaufs auch Ethanol verstoffwechselt. Dies und der RQ, der während der Zulaufphase nahe 1 lag, zeigt, dass bei der gewählten Dosierate Glucose während des Zulaufs limitierend war und vollständig veratmet wurde. Die Glycerinkonzentration stieg während der Zulaufphase zunächst leicht an. Erst in den letzten beiden Proben nach 70,8 h und 72 h zeigte sich ein Verbrauch von Glycerin. Der Wildtypstamm verbrauchte während des Zulaufs also mehrere Substrate gleichzeitig (Glucose, Ethanol und Glycerin).

Da es sich um keinen exponentiellen, sondern einen konstanten Zulauf handelt, sinkt die Wachstumsrate der Zellen während des Zulaufs ab und es können im Gegensatz zu den exponentiellen Wachstumsphasen keine konstante zellspezifische Produktbildungsraten für die Zulaufphase berechnet werden.

Auch bei den SDH-Deletionsstämmen stieg die Biomassekonzentration im Zulaufverfahren an. Bei AH22ura3  $\Delta\text{sdh}2$  wurden nochmals  $3 \text{ g L}^{-1}$ , bei AH22ura3  $\Delta\text{sdh}2 \Delta\text{sdh}1$   $0,7 \text{ g L}^{-1}$  Biomasse gebildet. Im Gegensatz zum Wildtyp erfolgte bei den SDH-Deletionsstämmen während des Zulaufs Ethanolbildung. Der RQ lag bei den SDH-Deletionsstämmen in der Zulaufphase über 1 (Tabelle 7.2). Die SDH-Deletionsstämme zeigten während des Zulaufs eine geringe aber kontinuierliche Succinatbildung ( $0,01$  bzw.  $0,02 \text{ mol}_{\text{Succinat}} \text{ mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$ ) und eine starke Acetatbildung. Wie bereits in der Satzphase war beim Wildtyp auch im Zulauf kein Succinat nachzuweisen (Nachweisgrenze Succinat:  $0,01 \text{ g L}^{-1}$ ).

Die Kultivierung des Stammes AH22ura3  $\Delta\text{sdh}2 \Delta\text{sdh}1$  wurde auch über 72 h hinaus fortgesetzt, wobei die konstante Zudosierung beibehalten wurde (Daten nicht gezeigt). Es konnte binnen einer Gesamtversuchsdauer von 144 h eine Succinatkonzentration von  $0,7 \text{ g L}^{-1}$  erzielt werden. Der Versuch wurde nach 144 h abgebrochen, da bereits ab 126 h Versuchsdauer Glucose im Medium akkumulierte und die Succinatbildung stagnierte.

## Kohlenstoffbilanzen

Die Kohlenstoffbilanzen der drei Kultivierungen sind in Abbildung 7.3 zusammengefasst. Sie war bei *S. cerevisiae* AH22ura3 wt im Durchschnitt zu  $97 \% \pm 3 \%$ , bei  $\Delta sdh2$  zu  $97 \% \pm 2 \%$  und bei  $\Delta sdh2 \Delta sdh1$  zu  $98 \% \pm 3 \%$  geschlossen.

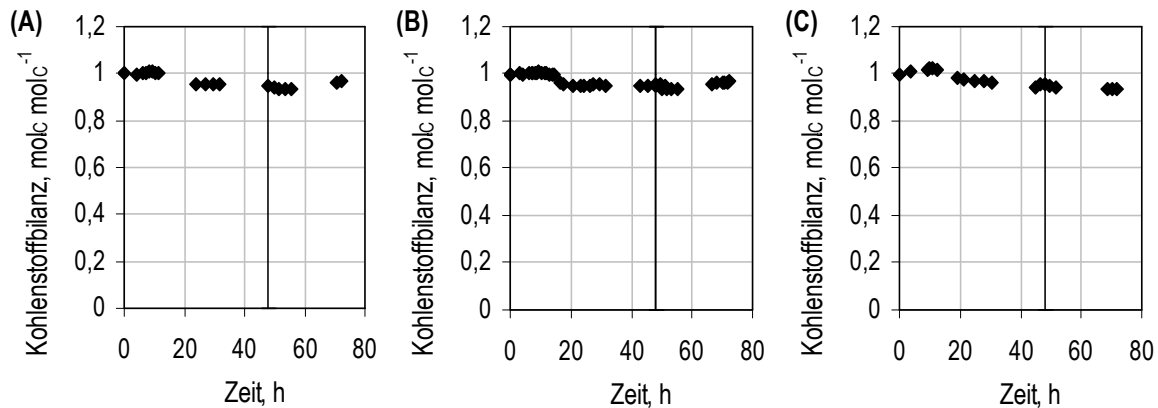


Abbildung 7.3: Integrale Kohlenstoffbilanzen der Satz- und Zulaufkultivierung im definierten Hoek-Medium im Laborreaktor zur Evaluierung der *S. cerevisiae* SDH-Deletionsstämmen. A: Bilanz des Referenzstammes AH22ura3 wt. B: Bilanz von AH22ura3  $\Delta sdh2$ . C: Bilanz von AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1$ .

## Diskussion

Die Kohlenstoffbilanzen konnten in den drei Kultivierungen zu über 95 % geschlossen werden, das heißt die eingesetzte Analytik ist ausreichend um alle relevanten Nebenprodukte zu detektieren. Auffällig ist dennoch, dass die verbliebene Bilanzlücke bei allen Stämmen vor allem gegen Ende des exponentiellen Wachstums mit Glucose und des Beginns des Ethanolverbrauchs entsteht. Dantigny *et al.* (1989) beschreiben, dass *S. cerevisiae* unter aeroben Satzbedingungen aus Glucose auch Pyruvat ( $< 0,1 \text{ g L}^{-1}$ ) und Acetaldehyd bildet. Acetaldehyd wäre wegen seiner hohen Flüchtigkeit nur durch direkte Messungen im Abgas quantifizierbar. Da die Bilanzen zu 95 % geschlossen waren, wurde hierauf verzichtet.

Bezüglich der Notwendigkeit der Deletion einer bzw. beider katalytischer Untereinheiten der SDH für einen vollständigen Funktionsverlust der SDH existieren in der Literatur zunächst widersprüchlich erscheinende Angaben. In Arbeiten von Kubo *et al.* (2000) war erst nach simultaner Deletion der Gene beider katalytischer Untereinheiten, *sdh1* und *sdh2*, oder alternativ von *sdh1* und *sdh1b* keine Succinat-Dehydrogenase-Aktivität mehr nachweisbar. Dagegen ist laut Arikawa *et al.* (1999) bereits die Deletion von *sdh1* für einen vollständigen Funktionsverlust der SDH ausreichend. Dass die Experimente von Arikawa *et al.* (1999) mit Glucose als Kohlenstoffquelle erfolgten und Kubo *et al.* (2000) mit Fruktose arbeitete, um die

Glucoserepression zu vermindern, kann diesen Unterschied jedoch erklären und deckt sich mit den an dieser Stelle erzielten Ergebnissen, dass in der Satzphase mit Glucose kaum Unterschiede zwischen AH22ura3  $\Delta sdh2$  und AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1$  zu erkennen waren. Diese traten erst unter glucosedereprimierten Bedingungen zu Tage. Die Erhöhung der Succinatbildung im Zulauf und die Verringerung der Biomassebildung mit Ethanol als Kohlenstoffquelle oder im Zulauf bei AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1$  sprechen für eine weitere Abnahme der SDH-Aktivität in diesem Stamm gegenüber AH22ura3  $\Delta sdh2$ .

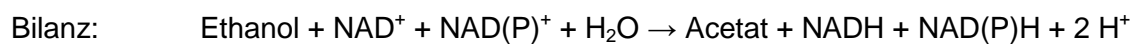
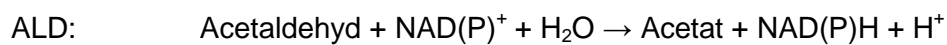
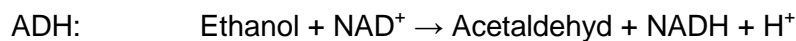
Auffällig in diesen Versuchen war die starke und für Hefen in dieser Größenordnung ungewöhnliche Bildung von Acetat bei beiden SDH-Deletionsstämmen aus Ethanol und im Zulauf. Die SDH-Reaktion ist neben der Funktion im Citrat-Zyklus auch als sogenannter Komplex II ein Teil der Atmungskette. Die Bildung des oxidierten Metaboliten Acetat aus Ethanol sowie die deutliche Sauerstoffaufnahme der beiden SDH-Stämme beweist, dass die Deletion der katalytischen Untereinheiten der SDH nicht zu einem Verlust der Atmungsfähigkeit der Zellen führt. Dies ist damit zu erklären, dass neben Komplex II auch noch NADH-Dehydrogenasen als Elektronendonatoren für den Ubichinonpool der Atmungskette dienen und daher die SDH nicht essentiell für die oxidative Phosphorylierung ist (de Vries und Marres 1987, Luttk *et al.* 1998, Robinson *et al.* 1991).

Eine Umwandlung von Ethanol zu Acetat war für einen Hefestamm mit einer Deletion von *sdh1* oder *sdh4* bereits in von Romano und Kolter (2005) publizierten Daten zu sehen. Allerdings wurde der Effekt von den Autoren nicht aufgegriffen und nicht diskutiert.

Auf Grund des geringen Wachstums der SDH-Deletionsstämmen mit Ethanol wäre ein relativ linearer Ethanolverbrauch zu erwarten. Wie Abbildung 7.2 zeigt, nahm aber der Ethanolverbrauch und somit auch die resultierende Acetat- und Succinatbildung kontinuierlich ab. Diese Abnahme ist auf die hemmende Wirkung der organischen Säure Acetat beziehungsweise die der korrespondierenden Essigsäure zurückzuführen, die den pH-Gradienten der Zelle stört, da Essigsäure in die Zellen diffundiert und dort deprotoniert wird (Narendranath *et al.* 2001, Thomas *et al.* 2002). Zudem steigt in Gegenwart von Acetat der ATP-Bedarf für die Aufrechterhaltung der Stoffwechsellhomöostase an, was sich in geringen Biomasseausbeuten niederschlägt (Pons *et al.* 1996, Pampulha und Loureiro-Dias 2000, Abbott *et al.* 2007). Daher kann die stark reduzierte Biomassebildung der SDH-Stämme aus Ethanol eine direkte Folge der Blockade der Synthese von Biomassevorstufen durch Unterbrechung der SDH-Reaktion sein oder vor allem ein Resultat der Hemmung durch die Acetatbildung beziehungsweise eine Kombination beider Effekte.

Acetat stellt bei Wildtyphefen nur ein Intermediat beim Verbrauch von Ethanol da. Der Wildtyp wandelt Ethanol über Acetaldehyd und Acetat zu Acetyl-CoA um und nutzt Acetyl-CoA dann zur Biomassesynthese über den durch die Gegenwart von C<sub>2</sub>-Körpern induzierten Glyoxylat-Zyklus. Über den Glyoxylat-Zyklus wird aus Acetyl-CoA Succinat gebildet und

dieses in den Citratzyklus oder die Gluconeogenese eingeschleust. Zudem wird Acetyl-CoA beim Wildtyp zur Energiegewinnung über den Citrat-Zyklus zu Kohlendioxid veratmet, was sich in einer CO<sub>2</sub>-Bildung beim Verbrauch von Ethanol zeigt (Abbildung 7.2). Daneben kann Acetyl-CoA auch direkt zur Fettsäurebiosynthese genutzt werden oder es können Intermediate des Glyoxylat-Zyklus direkt als Vorstufen der Biomassesynthese dienen. So kann Glyoxylat mit Alanin durch die Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase (AGX1), einem beim Wachstum mit Glucose reprimierten Enzym, zu Pyruvat und Glycin umgesetzt werden (Villas-Boas *et al.* 2005). Wie die folgenden Bilanzgleichungen zeigen, gewinnen die Zellen bei der Umwandlung von Ethanol zu Acetaldehyd und Acetat Energie in Form von NAD(P)H.

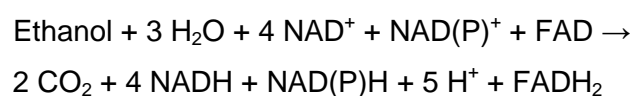


Ob Acetat aus Acetaldehyd mit NAD<sup>+</sup> oder NADP<sup>+</sup> als Cofaktor gebildet wird, ist abhängig vom verwendeten ALD-Isoenzym (Wang *et al.* 1998, Navarro-Avino *et al.* 1999). Laut Daran-Lapujade *et al.* (2004) laufen beim Verbrauch von Ethanol sowohl die NAD<sup>+</sup>- als auch NADP<sup>+</sup>-abhängigen Reaktionen ab. Abhängig von den verwendeten ALD-Isoenzymen wird zur Oxidation 0,5 oder 1 mol Sauerstoff benötigt, um 1 mol Ethanol zu 1 mol Acetat umzusetzen. Tabelle 7.2 zeigt, dass das Verhältnis zwischen  $Y_{\text{Acetat/Ethanol}}$  und  $Y_{\text{O}_2/\text{Ethanol}}$  bei beiden SDH-Stämmen einen Wert nahe 1 ergibt, allerdings wird auch zur Bildung von Succinat und Biomasse Sauerstoff verbraucht (Rosenfeld und Beauvoit 2003), sodass aus der Sauerstoffaufnahme nicht abgeschätzt werden kann, welchen Beitrag die NAD<sup>+</sup>- bzw. die NADP<sup>+</sup>-abhängigen Acetaldehyd-Dehydrogenasen an der Gesamtaktivität leistet.

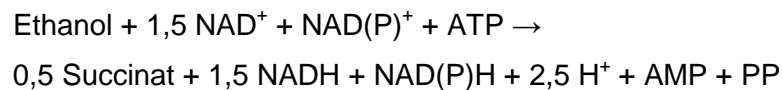
Wird Acetat weiter zu Acetyl-CoA umgesetzt, müssen die Zellen Energie in Form von ATP aufwenden:



Der energetisch günstige Weg zur Energiegewinnung aus Ethanol liegt im Abbau über den Citratzyklus und besitzt inklusive der Schritte des Umbaus von Ethanol zu Acetyl-CoA folgende Bilanz:



Bei Annahme eines P/O-Verhältnisses von 1 können je nach verwendetem ALD-Isoenzym 5 oder 6 mol<sub>ATP</sub> mol<sub>Ethanol</sub><sup>-1</sup> gewonnen werden. Durch die Deletion der SDH ist dieser Weg blockiert. Stattdessen können die Zellen den bei Ethanol dereprimierten Glyoxylatzklus nutzen, wodurch theoretisch 0,5 mol<sub>Succinat</sub> mol<sub>Ethanol</sub><sup>-1</sup> gewonnen werden könnten. Der Glyoxylat-Zyklus dient allerdings nativ nicht der Energiegewinnung sondern der Assimilation von Ethanol zu Biomasse und erlaubt nur eine geringe Energiegewinnung von einem NADH pro 2 mol eingeschleusten Acetyl-CoA. Die Bilanz für die Bildung von Succinat, dem Endprodukt der Glyoxylat-Zyklus, aus Ethanol lautet:



Dies bedeutet, dass Stämme mit einer Blockade der SDH bei Umsetzung von 1 mol Ethanol in Succinat je nach verwendeten ALD-Isoenzym(en) nur 1,5 beziehungsweise 0,5 mol ATP generieren. Wird lediglich Acetat gebildet, können die Zellen dagegen 2 bzw. 1 mol ATP gewinnen. Diese Betrachtung erklärt auch die in der Literatur beschriebene Tatsache, dass SDH-Deletionsstämme nicht mit Acetat als Kohlenstoffquelle wachsen können (McCammon 1996). Acetat besitzt einen noch niedrigeren Reduktionsgrad als Ethanol und die Zellen könnten Acetat bei Blockade der SDH lediglich in Succinat umsetzen, wobei keine Energie gewonnen, sondern sogar noch 0,5 mol ATP pro mol Acetat verbraucht würden.

Diese Betrachtung zeigt, dass es für die Zelle energetisch vorteilhaft ist, lediglich Acetat zu bilden, allerdings zeigen die Daten in Abbildung 7.2 auch, dass zumindest ein kleiner Teil des Ethanols zur Synthese von Succinat verwendet wurde.

An den Satzversuch wurde eine Zulaufphase mit konstanter Zudosierung von 0,7 g<sub>Glucose</sub> L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> angeschlossen. Unter Zulaufbedingungen konnte durch die dereprimierten Bedingungen erstmal aus Glucose eine kontinuierliche Succinatbildung beobachtet und ein Wachstum beider Stämme erzielt werden. Bei AH22ura3  $\Delta sdh2$   $\Delta sdh1$  wurde der Zulaufversuch nach 72 h fortgeführt und hierdurch 0,7 g L<sup>-1</sup> Succinat erreicht. Es stellt sich die Frage, ob Succinat im Zulauf nur über den oxidativen Zweig des Citrat-Zyklus gebildet werden kann oder unter diesen Bedingungen auch der Glyoxylat-Zyklus zur Verfügung steht. Da der Citrat-Zyklus auf Höhe der SDH blockiert ist, müssten die Zellen, sofern Succinat über den oxidativen Weg akkumuliert, Oxalacetat auf einem alternativen Weg regenerieren, um den Citrat-Zyklus zu schließen. Dies kann über die Pyruvat-Carboxylasen aus Pyruvat über CO<sub>2</sub>-Fixierung erfolgen.

Die Induktion der Expression der Glyoxylat-Zyklus-Enzyme erfolgt nur durch C<sub>2</sub>-Körper. Daran-Lapujade *et al.* (2004) beschreiben, dass in Wildtyphefen neben der Induktion des Glyoxylat-Zyklus durch C<sub>2</sub>-Körper bereits eine verminderte Glucoserepression durch



Zulaufbedingungen zu einem leichten Anstieg der Expression der ICL und MLS führt. Bei dem in Abbildung 7.2 gezeigten Zulaufversuch war der Glyoxylat-Zyklus bereits vor Beginn des Zulaufs durch den Verbrauch von Ethanol in der Satzphase induziert. McCammon *et al.* (2003) beschreiben zudem, dass sich auch die Transkription zahlreicher anderer Gene als Reaktion auf eine Deletion von Citrat-Zyklus-Enzymen änderte. In der Untersuchung, die mit im Komplexmedium mit Galactose angezogenen Zellen durchgeführt wurde, wurde als Reaktion auf eine Deletion der Gene *sdh1* oder *sdh2* eine erhöhte Transkription einiger gluconeogenetischer Gene nachgewiesen. Hierzu zählten beispielsweise die Gene *mdh2*, *pck1*, *icl2*, *mls1*. Von *mdh2* und *mls1* werden Enzyme des Glyoxylat-Zyklus codiert. Daher ist es möglich, dass die bei den SDH-Stämmen beobachtete kontinuierliche Succinatbildung auch bereits auf eine geringe Aktivität des Glyoxylat-Zyklus zurückzuführen ist.

### 7.3 Zulaufkultivierungen mit verschiedenen Dosierraten

Ein wichtiger Parameter in Zulaufverfahren ist die Wahl der Dosierrate. Ziel ist es im Allgemeinen die Dosierrate so zu wählen, dass der Crabtree-Effekt umgangen wird und eine vollständige Veratmung der Glucose mit maximaler Biomassebildung ohne Nebenproduktbildung erfolgt. Da in der ersten Kultivierung der SDH-Deletionsstämmen auch im Zulauf eine Ethanolbildung auftrat, wurde der Effekt verschiedener Dosierraten an Hand von *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2$   $\Delta sdh1$  untersucht. Hierfür wurde zu Versuchsbeginn bereits eine höhere Biomassekonzentration in das Hoek-Medium ohne Kohlenstoffquelle vorgelegt. Das Experiment wurde durch Beginn der ersten Zulaufphase gestartet. Der Zulauf wurde zweimal im 24 h Abstand erhöht, um die Effekte verschiedener Dosierraten zu charakterisieren.

Abbildung 7.4 zeigt, dass die Biomasse beim SDH-Deletionsstamm während des Experiments bei  $7 \text{ g L}^{-1}$  stagnierte. Die zudosierte Glucose wurde bei allen drei Dosierraten vollständig verbraucht. Bei den beiden niedrigen Dosierraten von  $0,15 \text{ g}_{\text{Glucose}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (D1) und  $0,33 \text{ g}_{\text{Glucose}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (D2) trat zunächst keine Ethanolbildung auf. Trotz Unterbindung der Ethanolbildung kam es zu keinem deutlichen Wachstum, stattdessen wurde Acetat gebildet. Nach der Erhöhung der Dosierrate auf  $0,83 \text{ g}_{\text{Glucose}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (D3) setzte die Ethanolbildung ein und es kam wie in der vorhergehenden Kultivierung mit *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2$   $\Delta sdh1$  zu einer parallelen Bildung von Acetat und Ethanol. Bei allen drei Dosierraten wurde Succinat gebildet, wobei die Succinatbildung in der dritten Phase mit Ethanolbildung am geringsten war.

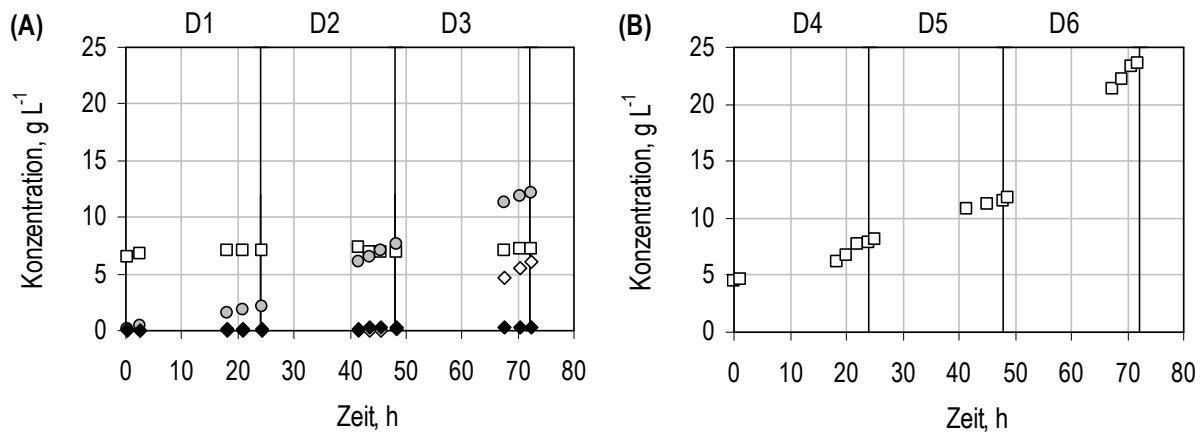


Abbildung 7.4: Einfluss verschiedener Dosierraten am Beispiel des *S. cerevisiae* SDH2-IDH-Deletionsstammes und des Wildtypstammes. Dargestellt sind reine Zulaufkultivierungen im Hoek-Medium im Laborrührkessel ( $V_0 = 1$  L) mit im 24 h Abstand ansteigenden Dosierraten. Es sind die um die Verdunstung korrigierten Ethanolverläufe dargestellt. A: Biomasse- (□), Acetat- (○), Ethanol- (▲) und Succinatkonzentration (◆) in einer reinen Zulaufkultivierung von *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ sdh1. Die im 24 h Abstand gewechselten Dosierraten betragen  $0,15 \text{ g}_{\text{Glucose}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (D1),  $0,33 \text{ g}_{\text{Glucose}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (D2) und  $0,83 \text{ g}_{\text{Glucose}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (D3). B: Biomassekonzentration (□) in einer reinen Zulaufkultivierung von *S. cerevisiae* AH22ura3 wt. Die im 24 h Abstand gewechselten Dosierraten betragen  $0,18 \text{ g}_{\text{Glucose}} \text{ h}^{-1}$  (D4),  $0,39 \text{ g}_{\text{Glucose}} \text{ h}^{-1}$  (D5) und  $0,97 \text{ g}_{\text{Glucose}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (D6).

Das gleiche Experiment mit den drei ansteigenden Dosierraten wurde auch mit dem Wildtyp durchgeführt (Abbildung 7.4B). Als einziges Nebenprodukt zur Biomasse wurde zu Beginn der Kultivierung Glycerin ( $< 0,2 \text{ g L}^{-1}$ ) nachgewiesen, dass im Lauf der Kultivierung wieder verbraucht wurde (Daten nicht gezeigt). Die Ausbeute lag in diesem Zulaufexperiment bei  $0,7 \text{ mol}_{\text{BTM}} \text{ mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$ . Die maximale theoretische Ausbeute für die Biomassebildung bei *S. cerevisiae* Wildtypstämmen unter nicht glucosereprimierten Bedingungen liegt bei  $0,5 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ g}_{\text{Glucose}}^{-1}$  bzw.  $0,96 \text{ mol}_{\text{BTM}} \text{ mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$ .

## Diskussion

Das Zulaufexperiment mit *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ sdh1 zeigte, dass bei den SDH-Deletionsstämmen selbst bei geringsten Glucose-Dosierraten eine Acetatbildung prozesstechnisch nicht zu unterbinden war. Abhängig von der Dosierrate erfolgte nur ein Umstellen zwischen der Bildung der C<sub>2</sub>-Körper Acetat und Ethanol. Dies zeigt, dass auch unter Zulaufbedingungen der Hauptteil des Kohlenstoffs auf Grund der vollständigen Blockade der SDH vor dem Citratzyklus abfließt.

Zur Vermeidung der Ethanolbildung bedingt durch den Crabtree-Effekt werden bei Wachstum von *S. cerevisiae* mit Glucose als Kohlenstoffquelle im Allgemeinen RQ-geregelte Zulaufprozesse eingesetzt (Aiba *et al.* 1976). Für die vollständige Veratmung von Glucose zu

Kohlendioxid ergibt sich  $RQ = 1$ . Um auch der Biomassebildung aus Glucose Rechnung zu tragen, wird in der Literatur bei *S. cerevisiae* nicht auf  $RQ = 1$  sondern auf  $RQ = 1,1$  geregelt (O'Connor *et al.* 1992, Cannizzaro *et al.* 2004).

Während eine Ethanolbildung aus Glucose zu  $CER > OUR$  und somit zu einem  $RQ > 1$  führt, ist bei der Acetatbildung aus Glucose der  $CER < OUR$  und somit der  $RQ < 1$  (Pons *et al.* 1996). Daher ist eine Regelung des Zulaufs über den  $RQ$  zur Vermeidung des Crabtree-Effekts bei stark Acetat sekretierende Stämme, wie den SDH-Deletionsstämmen, nicht möglich.

## 7.4 Satzverfahren mit Galactose als Kohlenstoffquelle

Ergänzend zu Arbeiten mit Glucose erfolgten auch Experimente mit Galactose als Kohlenstoffquelle, da diese Kohlenstoffquelle geringere Repressionseffekte als Glucose auslöst. Die Versuche erfolgten aus Kapazitätsgründen nicht im Rührkessel sondern im Schüttelkolben.

Eingesetzt wurde für die Satzversuche im Schüttelkolben zunächst das definierte WM8A-Medium mit  $50 \text{ g L}^{-1}$  Galactose. Allerdings war in diesem Medium reproduzierbar ein Wachstum des Wildtyps erst nach 10 Tagen zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Daher wurde stattdessen das glutamathaltige definierte Medium WM8G mit Galactose als Kohlenstoffquelle eingesetzt und bereits am zweiten Tag ein Wachstum beim Wildtyp erzielt. Deswegen wurde dieses Medium für die weiteren Untersuchungen mit Galactose eingesetzt und ergänzend entsprechende Referenzkultivierungen mit Glucose im WM8G-Medium im Schüttelkolben durchgeführt.

Bei der Kultivierung im Schüttelkolben im WM8G mit Glucose zeigten der *S. cerevisiae* Wildtyp und die SDH-Deletionsstämmen den typischen respiro-fermentativen Stoffwechsel (Abbildung 7.5). Die Unterschiede zwischen den Stämmen AH22ura3  $\Delta sdh2$  und AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1$  sind gering. Eine deutliche Zunahme der Biomassekonzentration wurde bei den SDH-Stämmen nur mit Glucose erzielt. Aus Ethanol wurde von den SDH-Deletionsstämmen Acetat als Hauptprodukt gebildet. Im Schüttelkolben konnte die Ethanolverdunstung auf Grund der wenigen Messpunkte nicht rechnerisch korrigiert werden, daher sollten die Ethanolkurven nur qualitativ betrachtet werden. Während der Wildtyp Glutamat sowohl mit Glucose als auch mit Ethanol als Kohlenstoffquelle nutzte und nach 144 h diese Stickstoffquelle komplett verbraucht hatte, nutzten die SDH-Deletionsstämmen Glutamat nur mit Glucose.

Die Succinatbildung betrug beim Wildtyp insgesamt  $0,8 \text{ g L}^{-1}$ . Die erste Hälfte dieses Succinats wurde gebildet, während Glucose verbraucht wurde, die zweite während des Verbrauchs der nicht fermentierbaren Metabolite Ethanol, Acetat und Glycerin.

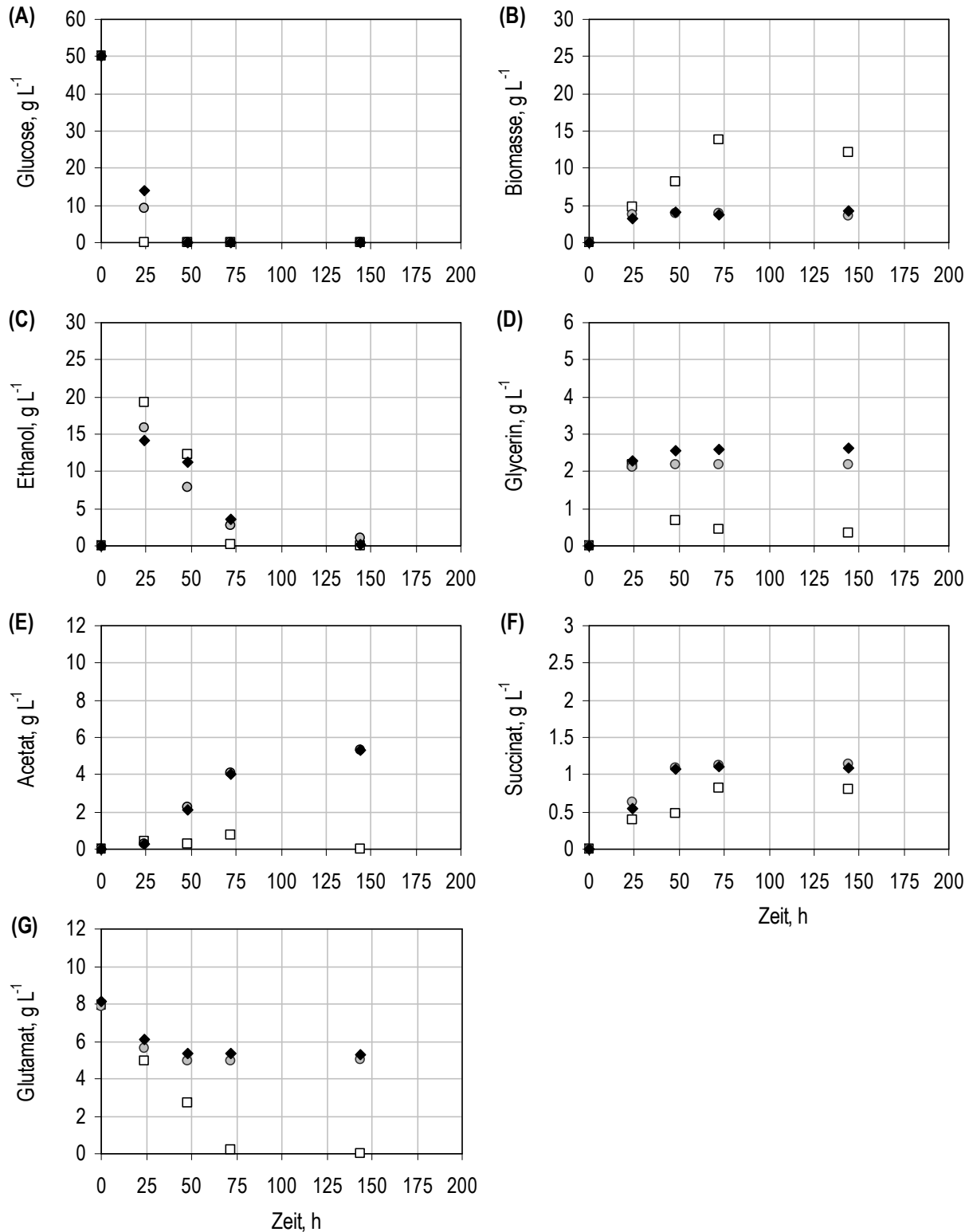


Abbildung 7.5: Untersuchung der *S. cerevisiae* SDH-Deletionsstämme im Satzversuch mit Glucose als Kohlenstoffquelle und Glutamat als Stickstoffquelle im Schüttelkolben ( $V_0 = 50$  mL). Die Kultivierungen des *S. cerevisiae* Wildtypstammes AH22ura3 wt (□) und der beiden SDH-Deletionsstämme AH22ura3  $\Delta sdh2$  (○) und AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1$  (◆) erfolgten im WM8G-Medium mit 50 g L<sup>-1</sup> Glucose über 144 h.

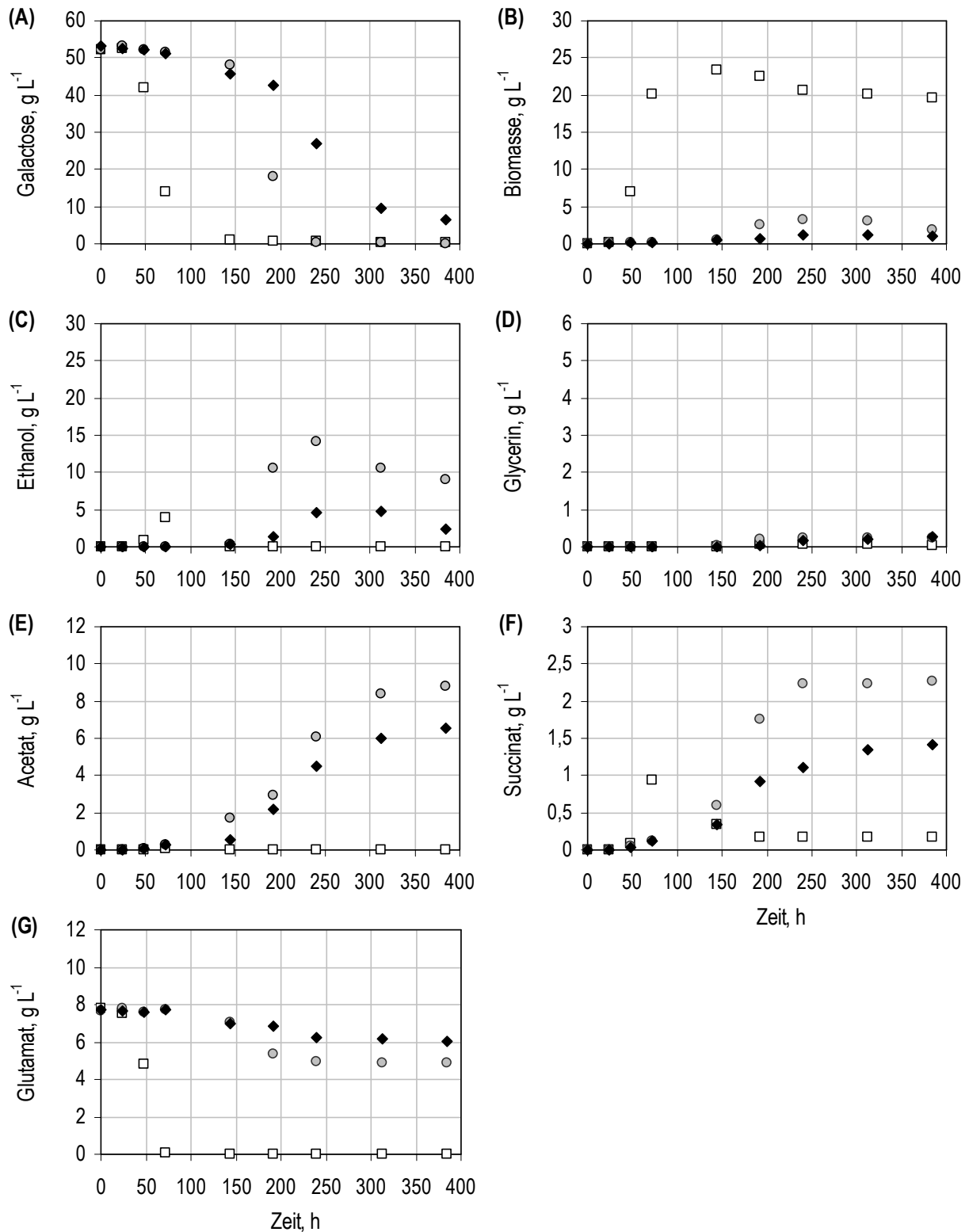


Abbildung 7.6: Untersuchung der *S. cerevisiae* SDH-Deletionsstämme im Satzversuch mit Galactose als Kohlenstoffquelle und Glutamat als Stickstoffquelle im Schüttelkolben ( $V_0 = 100$  mL). Die Kultivierungen des *S. cerevisiae* Wildtypstammes AH22ura3 wt (□) und der beiden SDH-Deletionsstämme AH22ura3  $\Delta sdh2$  (○) und AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1$  (◆) erfolgten im WM8G-Medium mit  $50$  g L<sup>-1</sup> Galactose über 384 h.

Bei den SDH-Deletionsstämmen war nach 24 h etwa  $0,6 \text{ g L}^{-1}$  Succinat nachzuweisen wobei beide Stämme bereits mehr als 70 % der eingesetzten Glucose verbraucht hatten. Dies zeigt, dass die Zunahme des Succinats auf etwa  $1,1 \text{ g L}^{-1}$  nach 48 h nicht allein auf den Verbrauch von Glucose beruhen kann, sondern die SDH-Deletionsstämmen auch eine geringe Succinatbildung aus Ethanol aufwiesen. Allerdings stagnierte die Succinatbildung aus Ethanol bereits ab 48 h. Der weitere Anstieg der Acetatkonzentration zwischen 48 und 144 h zeigt, dass Ethanol auch nach Stagnation der Succinatbildung weiterverbraucht wurde. Bei Durchführung desselben Experiments mit Galactose als Kohlenstoffquelle wurde die Versuchsdauer gegenüber dem sechstägigen Versuch mit Glucose verlängert, da zwar der Wildtyp bereits am zweiten Tag Galactoseverbrauch und Wachstum zeigte und die Galactose nach 72 h vollständig verbraucht hatte, aber bei den *S. cerevisiae* SDH-Deletionsstämmen auch an Tag 6 noch mehr als 80 % der eingesetzten Galactose vorlag.

Der Wildtyp zeigte mit Galactose eine deutlich erhöhte Biomasse- und Succinatbildung und eine geringere Bildung von Ethanol, Glycerin und Acetat gegenüber der Kultivierung mit Glucose. Der nach 48 h nach Verbrauch der Galactose gemessene Höchstwert lag bei  $1,0 \text{ g L}^{-1}$  Succinat. Im Lauf der weiteren Kultivierung wurde Succinat wieder verstoffwechselt und die Konzentration im Schüttelkolben sank auf  $0,2 \text{ g L}^{-1}$  ab.

Die SDH-Stämme wuchsen mit Galactose schlechter als mit Glucose und bildeten Ethanol, Acetat, Glycerin und Succinat und es zeigten sich auch deutliche Unterschiede zwischen den beiden SDH-Deletionsstämmen. Der Stamm AH22ura3  $\Delta sdh2$  verbrauchte Galactose binnen 240 h komplett und erreichte  $2,2 \text{ g L}^{-1}$  Succinat. Anschließend wurde Ethanol verbraucht, wobei Acetat das Hauptprodukt darstellte und die Succinatkonzentration auf  $2,3 \text{ g L}^{-1}$  anstieg. Dagegen lagen bei AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1$  auch bei Versuchsende noch  $6,5 \text{ g L}^{-1}$  Galactose vor und es wurden nur  $1,4 \text{ g L}^{-1}$  Succinat bei Versuchsende erzielt.

Die Stickstoffquelle Glutamat wurde vom Wildtyp vollständig verbraucht, bei den SDH-Deletionsstämmen wurde Glutamat nur simultan zur Galactose verstoffwechselt.

## Diskussion

Bei der Kultivierung im Schüttelkolben im WM8G bestätigten sich die in der zweitägigen Kultivierung im Bioreaktorsystem beobachteten Effekte. Die nach 48 h im Schüttelkolben und im Bioreaktorblock gemessenen Succinatkonzentrationen stimmen für alle drei Stämme gut über ein (Abweichung maximal  $0,1 \text{ g L}^{-1}$ ). Wie in allen vorangegangenen Kultivierungen zeigten sich mit Glucose als Substrat unter Satzbedingungen keine signifikanten Unterschiede zwischen den SDH-Deletionsstämmen. Auch im Schüttelkolben zeigte sich keine weitere Wachstumsphase mit Ethanol bei den SDH-Deletionsstämmen nachdem die Glucose verbraucht war.

Die Stickstoffquelle Glutamat wurde beim Wildtyp bei beiden Zuckern vollständig verbraucht, dagegen nutzten die SDH-Deletionsstämme Glutamat nur parallel zum Verbrauch der Zucker und nicht beim Verbrauch von Ethanol. Das zweite Substrat Galactose gilt als "schwierige" Kohlenstoffquelle, da es bei der Umstellung von Glucose auf Galactose bei Wildtyphefen zu verlängerten Verzögerungsphasen kommen kann (Otero 2009, Rubio-Teixeira 2005). In den durchgeführten Experimenten betrug die Verzögerungsphase beim Wildtypstamm mehr als 24 h und verlängerte sich bei den Deletionsstämmen deutlich.

Es wurde bereits vielfach in der Literatur beschrieben, dass im Satzversuch mit Galactose bei *S. cerevisiae* ein gegenüber der Verwendung von Glucose respirativer Stoffwechsel erzielt wird (beispielsweise Gancedo 1998, Gancedo und Serrano 1989, Ostergaard *et al.* 2000a, Lagunas 1976, Herrero *et al.* 1985). Dies zeigte sich bei der Kultivierung des *S. cerevisiae* Wildtypstammes in einer erhöhten Biomassebildung und reduzierten Bildung an Gärprodukten wie Ethanol und Glycerin bei Verwendung von Galactose statt Glucose.

Allerdings wirkt nicht nur Glucose sondern auch Galactose reprimierend auf den Glyoxylat-Zyklus (Polakis und Bartley 1965, Daran-Lapujade *et al.* 2004, Eraso und Gancedo 1984) und es ist daher keine Expression und Aktivität der ICL und MLS bei Galactose als Kohlenstoffquelle zu erwarten. Auch bei den SDH-Deletionsstämmen verschob sich unter den Bedingungen, die einen respirativen Stoffwechsel förderten, das Metabolitspektrum von den reduzierten Produkten Ethanol und Glycerin zu oxidierten Produkten wie Acetat. Die Biomassebildung der beiden SDH-Stämme war im Vergleich zum Wildtyp und im Vergleich zu den Kultivierungen mit Glucose reduziert. Bei den SDH-Deletionsstämmen erhöhte sich durch Verwendung von Galactose die integrale Succinatausbeute auf über  $0,04 \text{ mol}_{\text{Succinat}} \text{ mol}_{\text{Glucose+Glutamat}}^{-1}$  (Abbildung 7.7).

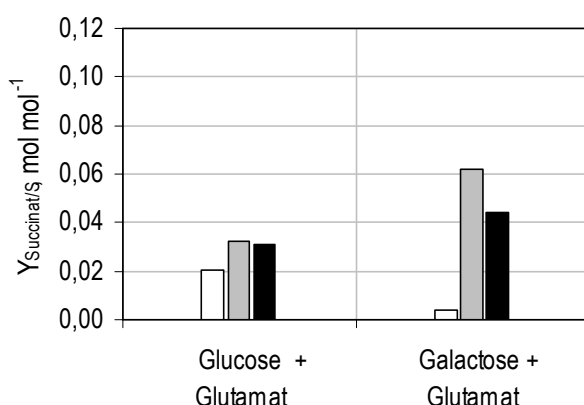


Abbildung 7.7: Integrale Ausbeuten der *S. cerevisiae* Stämme AH22ura3 wt (□), AH22ura3  $\Delta sdh2$  (◻) und AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1$  (■) in den Satzversuche im WM8G mit Glucose oder Galactose als Kohlenstoffquelle im Schüttelkolben.

Wurde die Ausbeute an Succinat nur auf das verbrauchte Glutamat bezogen ergab sich bei beiden SDH-Deletionsstämmen ein Wert von  $\sim 0,5 \text{ mol}_{\text{Succinat}} \text{ mol}_{\text{Glutamat}}^{-1}$  für die Kultivierung mit Glucose und mit Galactose ein Wert knapp über  $1 \text{ mol}_{\text{Succinat}} \text{ mol}_{\text{Glutamat}}^{-1}$ . Da die maximale theoretische Ausbeute für Succinat aus Glutamat bei  $1 \text{ mol}_{\text{Succinat}} \text{ mol}_{\text{Glutamat}}^{-1}$  liegt, wurden beim Wachstum mit Galactose und Glutamat beide Substanzen zur Succinatbildung verwendet. Die Succinatbildung im WM8G-Medien mit Glucose bei den SDH-Deletionsstämmen könnte rechnerisch komplett aus Glutamat erfolgt sein. Die vorangegangenen Versuche im definierten Medium ohne Glutamat deuten aber darauf hin, dass in den SDH-Deletionsstämmen auch aus Glucose Succinat gebildet wird (siehe Abbildung 7.1 und Abbildung 7.2).

In der Kultivierung mit Galactose bestätigten sich die Unterschiede zwischen den beiden *S. cerevisiae* SDH-Deletionsstämmen und somit die Aussagen von Kubo *et al.* (2000). Der Stamm mit Deletion von nur einer katalytischen Untereinheit der SDH, AH22ura3  $\Delta sdh2$ , konnte die Galactose vollständig verbrauchen und besaß eine höhere integrale Succinatausbeute  $Y_{\text{Succinat/S}}$  als AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1$ , während bei dem Stamm mit Deletion beider katalytischen Untereinheiten, AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1$ , der Galactoseverbrauch stagnierte.

## 7.5 Zulaufverfahren mit Zudosierung von Glucose und Glutamat

Nachdem die vorangegangenen Versuche zeigten, dass unter Zulaufbedingungen eine kontinuierliche, allerdings geringe Succinatbildung erfolgt und dass Glucose/Glutamatmischungen die Succinatbildung im Satzverfahren fördern, erfolgte ergänzend ein Zulaufversuch mit Glutamat als Stickstoffquelle mit *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1$ , dem Stamm mit der vollständigen Deletion der SDH. Hierbei wurden  $1 \text{ g L}^{-1}$  Biomasse in WM8G-Medium ohne Kohlenstoffquelle vorlegt und der Zulauf direkt bei Versuchsbeginn gestartet. Um Limitierungen auszuschließen, diente als Zulaufmedium doppelkonzentriertes WM8G Medium, wobei die Glucosekonzentration im Zulaufmedium auf  $200 \text{ g L}^{-1}$  erhöht war. Die Zudosierung betrug  $3,4 \text{ ml h}^{-1}$ , entsprechend einer Dosierate von  $0,7 \text{ g}_{\text{Glucose}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  bzw.  $0,05 \text{ g}_{\text{Glutamat}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Der pH wurde mit 2 M Natronlauge einseitig auf 6,0 geregelt. Während des gesamten Zulaufs stand den Zellen Glutamat im Überschuss zu Verfügung (Daten nicht gezeigt).

Wie Abbildung 7.8 zeigt, wurde durch den Zulauf über mehr als 100 h eine konstante Succinatbildung von  $0,08 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  erzielt. Binnen der ersten 26 h wurden im Zulauf sowohl Ethanol und Acetat gebildet und die Acetatbildungsrate betrug  $0,16 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Bei der nächsten Probe nach 42 h war keine Ethanolbildung mehr nachzuweisen und die Acetatbildung erhöhte sich auf  $0,45 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .



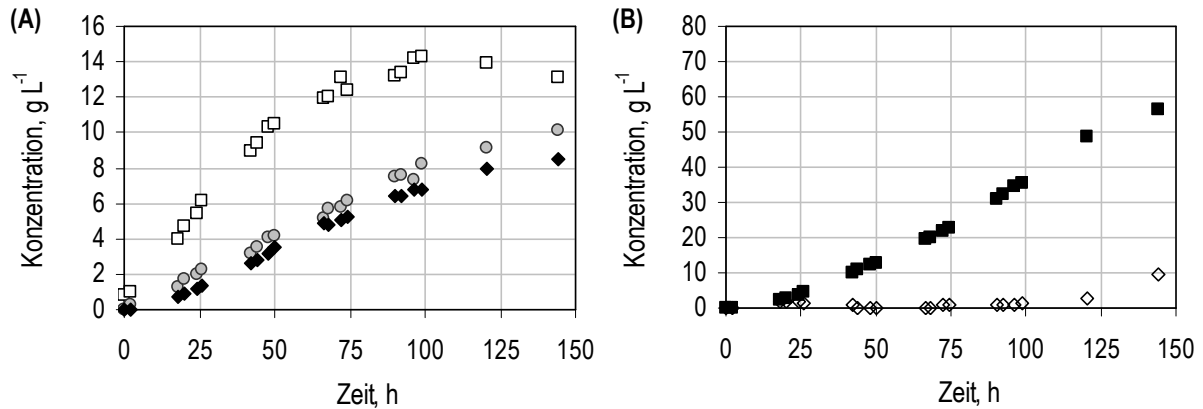


Abbildung 7.8: Zulaufexperiment unter Verwendung einer Glucose/Glutamatmischung mit *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2$   $\Delta sdh1$  im Laborreaktor ( $V_0 = 1,0$  L). In WM8G-Medium ohne Kohlenstoffquelle wurden ab Versuchsbeginn kontinuierlich  $0,7 \text{ g}_{\text{Glucose}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  bzw.  $0,05 \text{ g}_{\text{Glutamat}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  zudosiert. A: Biomasse- (□) und Succinatkonzentration (◆) sowie kumulativer Verbrauch von Glutamat (○). B: Acetat- (■) und Ethanolkonzentration (◇). Bei den dargestellten Ethanolkonzentrationen wurde die Verdunstung von Ethanol berücksichtigt.

Nach 120 h akkumulierte Glucose im Medium, es setzte wieder eine Ethanolbildung ein und die Acetat- und Succinatbildung stagnierte. Es wurde eine Endkonzentration von  $8,5 \text{ g L}^{-1}$  Succinat erzielt. Beim Verbrauch von Glutamat zeigten sich dieselben Tendenzen wie bei der Succinatbildung. Die Zellen wuchsen zunächst deutlich unter Zulaufbedingungen. Die Biomassebildung sank allerdings bereits nach 75 h deutlich ab und nach 100 h begannen die Zellen bereits abzusterben.

## Diskussion

Auch in diesem Zulaufversuch mit *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2$   $\Delta sdh1$  und den Einsatz einer Glucose/Glutamatmischung zeigte sich wieder die für die SDH-Deletionsstämme typische Acetatbildung, die lediglich in Phasen mit Ethanolbildung absank. Die starke Acetatbildung dieses Deletionsstammes ist unter Zulaufbedingungen auch bei Verwendung von Glutamat als Stickstoffquelle nicht vermeidbar und begrenzt somit die erreichbare Succinatkonzentration dieses SDH-Deletionsstammes. Im Gegensatz zu den bisherigen Zulaufversuchen mit Ammonium als Stickstoffquelle (Hoek-Medium) zeigte AH22ura3  $\Delta sdh2$   $\Delta sdh1$  unter Zulaufbedingungen mit Glutamat als Stickstoffquelle erstmal deutliches Wachstum. Die Umsetzung von Glutamat zu Succinat ist für die Zellen mit einem Gewinn von 2 mol NADH und einem mol ATP pro mol Glutamat verbunden. Zudem können die Zellen Glutamat direkt für die Aminosäurebiosynthese nutzen.

Es zeigte sich eine wachstumsgekoppelte Succinatbildung unter Zulaufbedingungen mit Glucose und Glutamat. Wird die integrale Ausbeute an Succinat ausschließlich auf Glutamat

bezogen ergäbe sich mit  $1,04 \text{ mol}_{\text{Succinat}} \text{ mol}_{\text{Glutamat}}^{-1}$  ein Wert über der theoretisch möglichen Ausbeute  $1 \text{ mol}_{\text{Succinat}} \text{ mol}_{\text{Glutamat}}^{-1}$ . Dies zeigt, dass für die Succinatbildung nicht nur Glutamat sondern auch Glucose verwendet wurde. Die integrale Ausbeute bezogen auf Glucose und Glutamat lag bei  $0,07 \text{ mol}_{\text{Succinat}} \text{ mol}_{\text{Glutamat+Glucose}}^{-1}$  und übertraf die Ausbeuten der Satzversuche mit Glucose bzw. Galactose im WM8G-Medium.

## 7.6 Evaluierung eines reprimierbaren Promotorsystems am Beispiel der Succinat-Dehydrogenase-Deletion

Der Ansatz zur aeroben Succinatproduktion mit *S. cerevisiae* umfasst die Deletion von zum respiratorischen Zentralstoffwechsel zugehörigen Genen. Diese Deletionen können, wie die vorangegangene Charakterisierung der SDH-Deletionsstämme bewies, unter bestimmten Bedingungen massive Wachstumseinschränkungen zur Folge haben.

Ein Prozess zur Succinatproduktion erfordert jedoch neben einer effizienten Produktionsphase auch eine effiziente Anzucht der Zellen beispielsweise im Zulaufverfahren. Um in der Anzuchtphase Wachstumseinbußen durch die Deletionen zu vermeiden, kann als Alternative zu konstitutiven Deletionen mit induzierbaren Deletionen gearbeitet werden.

Hierzu wurde ein Tetracyclin-reguliertes Promotorsystem evaluiert, das aus dem tetO-Promotor vor dem Zielgen und dem transcriptional Transaktivator (tTA) besteht. Nur wenn der transcriptional Transaktivator an den tetO-Promotor gebunden ist, erfolgt eine Expression des Zielgens. Der Repressor Tetracyclin bindet an den transcriptional Transaktivator und die daraus resultierende Konformationsänderung führt zum Ablösen vom Promotor (Berens und Hillen 2003).

Dieses Tetracyclin-Repressor-System wurde am Beispiel der Deletion des Gens *sdh2* aus prozesstechnischer Sicht evaluiert. Da der Stamm mit der induzierbaren SDH2-Deletion keine Leerplasmide besaß und daher bezüglich der Wachstumsrate nicht mit den rekombinanten Stämmen mit Plasmiden verglichen werden kann, wurde hier dementsprechend auch mit Referenzstämmen ohne Leerplasmide gearbeitet. Es wurden folgende Stämme untersucht:

- *S. cerevisiae* AH22ura3 wt  
Wildtypstamm
- *S. cerevisiae* AH22ura3 tTA  
Stamm mit alleiniger Überexpression des tTA (ins Genom integriert am Leu2-Locus)
- *S. cerevisiae* AH22ura3 tTA *sdh2prom::tetOprom*  
induzierbarer SDH2-Deletionsstamm durch Überexpression des tTA und Austausch des nativen *sdh2*-Promotors gegen den tetO-Promotor
- *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  
konstitutiver *sdh2*-Deletionsstamm

### **Einfluss von Tetracyclin auf das Wachstum**

Die Evaluierung des Tetracyclin-Repressor-Systems erfolgte an Hand von Satzversuchen im Bioreaktorblock. Untersucht wurde das Wachstum und die Metabolitbildung beispielhaft in einem definierten und einem komplexen Medium mit  $50 \text{ g L}^{-1}$  Glucose und Zusatz von  $20 \text{ mg L}^{-1}$  Tetracyclin als Repressor.

In der Satzkultivierung im Bioreaktorblock zeigt der mit  $20 \text{ mg L}^{-1}$  Tetracyclin induzierte Stamm *AH22ura3 tTA sdh2prom::tetOprom* das für SDH-Deletionsstämme typische Verhalten (Abbildung 7.9). So wurde wie bei einem konstitutiven SDH2-Deletionsstamm die Wachstumsrate mit Glucose kaum beeinflusst, aber es erfolgt kein diauxisches Wachstum. Der induzierte Stamm zeigt auch die typische Acetatbildung aus Ethanol. Wurde *AH22ura3 tTA sdh2prom::tetOprom* nicht induziert, verhält er sich dagegen wie der Wildtypstamm bezüglich der Acetatbildung und des Wachstums mit Ethanol. Durch die Induktion erhöhte sich die Succinatbildung von *AH22ura3 tTA sdh2prom::tetOprom* in beiden Medien um weniger als  $0,15 \text{ g L}^{-1}$  Succinat (Daten nicht gezeigt). Dies ist ebenfalls typisch für SDH-Deletionsstämmen im Satzverfahren.

Zudem wurde nachgewiesen, dass Tetracyclin bei Stämmen ohne das vollständige Tetracyclin-Repressor-System wie dem Wildtypstamm, *AH22ura3 tTA* oder dem konstitutiven Deletionsstamm *AH22ura3  $\Delta$ sdh2* keinen signifikanten Einfluss auf die Wachstumsrate besitzt. Generell war die Wachstumsrate von Stämmen mit der tTA-Überexpression allerdings unabhängig von der Tetracyclin-Zugabe auf 80 % des Wildtyps abgesenkt.

### **Optimierung der Induktorkonzentration**

Ergänzend zum Nachweis, dass das Tetracyclin-System geeignet ist, Stämme mit Deletionen im Citrat-Zyklus ohne Wachstumsverluste zu kultivieren, wurde auch die nötige Induktorkonzentration untersucht. Hierfür wurden die Repressorkonzentrationen bei *S. cerevisiae* *AH22ura3 tTA sdh2prom::tetOprom* im Satzversuch im WM8A-Medium mit  $50 \text{ g L}^{-1}$  Glucose variiert. Dieser Versuch in dem der Zusatz von 0, 1, 5, 10 und  $20 \text{ mg L}^{-1}$  Tetracyclin untersucht wurde, erfolgte aus Kapazitätsgründen im Schüttelkolben ( $V_0 = 50 \text{ mL}$ ,  $c_{X0} = 0,1 \text{ g L}^{-1}$ ,  $t = 72 \text{ h}$ ). Schon ab Zusatz von  $1 \text{ mg L}^{-1}$  Tetracyclin zeigte sich durch die Acetatbildung aus Ethanol und das fehlende Wachstum bei Ethanol als Kohlenstoffquelle das typische Verhalten von SDH-Deletionsstämmen. Zudem trat bei den Ansätzen mit Repressor-Zusatz eine Succinatbildung auf (Daten nicht gezeigt). Höhere Tetracyclin-Konzentrationen verstärkten weder die Succinat- noch die Acetatbildung.

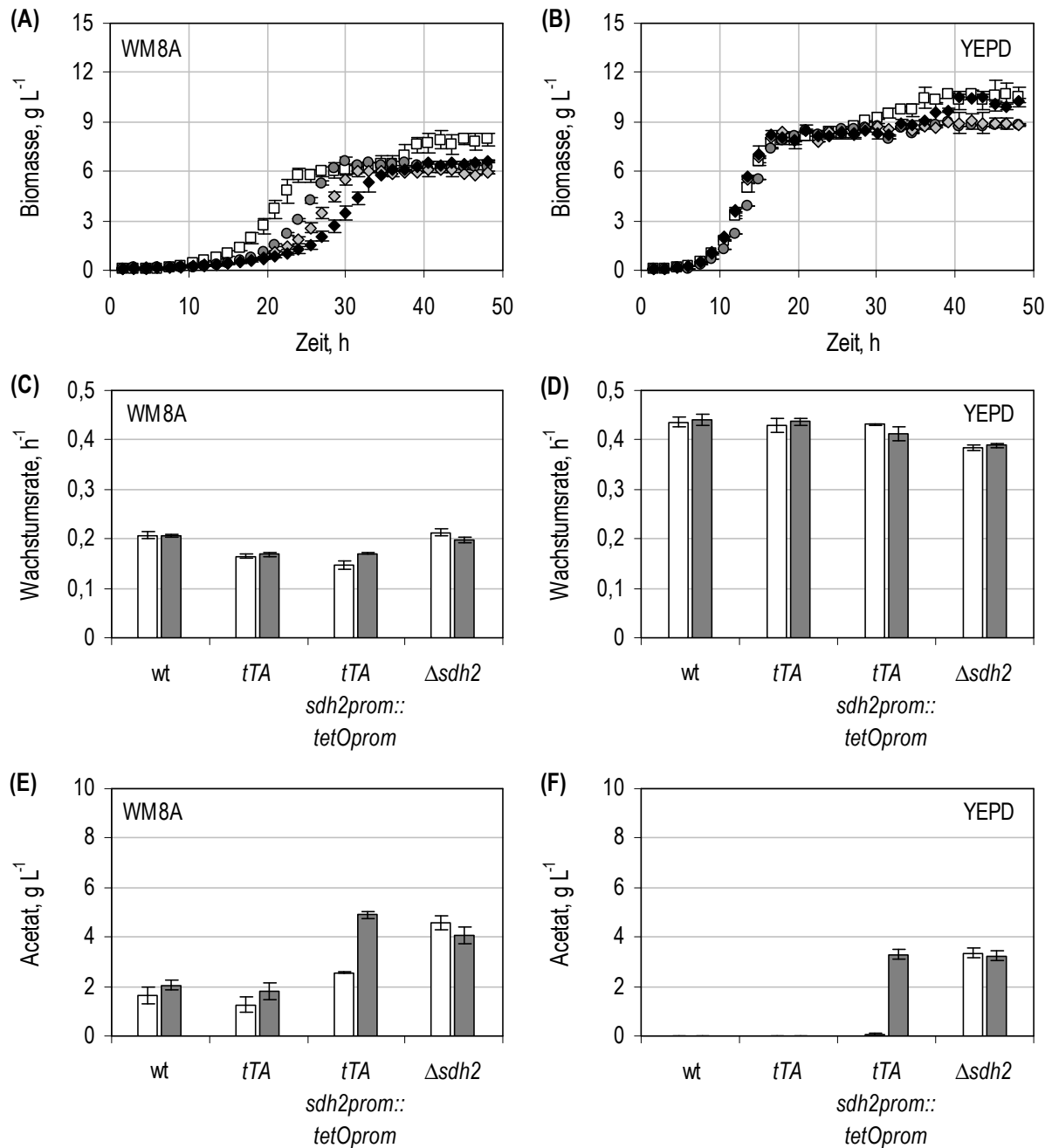


Abbildung 7.9: Evaluierung des Tetracyclin-Repressor-Systems in *S. cerevisiae* am Beispiel einer induzierbaren SDH2-Deletion in Satzkultivierungen im Bioreaktorblock ( $V_0 = 12 \text{ mL}$ ,  $n = 3$ ). A und B: Beispielhaft sind die Wachstumskurven des Stammes AH22ura3 *tTA sdh2prom::tetOprom* ohne (◆) und mit Zusatz von  $20 \text{ mg L}^{-1}$  Tetracyclin (◇) im WM8A und YEPD-Medium mit  $50 \text{ g L}^{-1}$  Glucose, sowie Daten der Referenzstämme AH22ura3 wt (□) und AH22ura3  $\Delta sdh2$  (●) jeweils aus der Kultivierung ohne Tetracyclinzugabe dargestellt. C, D, E und F: Wachstumsrate mit Glucose als Kohlenstoffquelle und Acetatbildung der Stämme nach 48 h in Medium ohne Tetracyclin (□) und mit  $20 \text{ mg L}^{-1}$  Tetracyclin (■).

## Diskussion

Die geplante Umlenkung des Kohlenstoffflusses aus dem Citrat- in den Glyoxylat-Zyklus im Rahmen des Konzepts zur aeroben Succinatproduktion mit *S. cerevisiae* erfordert mehrere Deletionen im Citrat-Zyklus. Konstitutive Deletionen können jedoch, wie die Charakterisierung der SDH-Deletionsstämme zeigte, unter vielen Bedingungen Wachstumseinschränkungen hervorrufen. Dieses Problem lässt sich durch den alternativen Einsatz von induzierbaren Deletion umgehen. Durch den tetO-Promotor würde zwar keine native, sondern bis zur Zugabe von Tetracyclin eine konstitutive Expression des Zielgens erzielt werden, dies ist aber für eine Anzucht der Zellen sogar als vorteilhaft zu bewerten, da es bei den Zielgenen um Schlüsselenzyme des respirativen Stoffwechsels handelt.

Bisherige Studien bezüglich des Tetracyclin-Repressor-System betrachteten lediglich den Zusatz des Tetracyclin-Derivats Doxycyclin, das aber für eine industrielle Anwendung zu teuer ist. Für Doxycyclin wurde nachgewiesen, dass der Zusatz von 10 mg L<sup>-1</sup> Doxycyclin keine Auswirkung auf das Wachstum von *S. cerevisiae* hat und dass selbst 40 mg L<sup>-1</sup> Doxycyclin keinen Effekt auf das globale Transkriptionslevel hervorrufen (Belli *et al.* 1998, Wishart *et al.* 2005).

Die Satzversuche im Bioreaktorblock zeigten, dass der Zusatz von 20 mg L<sup>-1</sup> Tetracyclin zum Medium keine signifikanten Auswirkungen auf das Wachstum oder die Produktbildung des Wildtyps oder rekombinanter Stämme ohne vollständiges Tetracyclin-Repressor-System verursachte. Allerdings führte die Überexpression des tTA generell zu einer Absenkung der Wachstumsrate auf 80 % des Wildtyps. Diese Absenkung erscheint aber im Vergleich zu den massiven Wachstumseinbrüchen von Stämmen mit Deletionen im Citrat-Zyklus unter nicht glucosereprimierten Bedingungen akzeptabel.

Zum Umschalten des Prozesses wird nur eine Repressor-Konzentration von 1 mg L<sup>-1</sup> Tetracyclin bzw. 0,2 mg<sub>Tetracyclin</sub> g<sub>BTM</sub> benötigt. Diese Ergebnisse bestätigen eine Eignung des Tetracyclin regulierten Promotorsystems zur Etablierung eines zweistufigen Prozesses zur Bernsteinsäureproduktion.

## 7.7 Fazit zu den SDH-Deletionsstämmen

In diesem Kapitel wurden die *S. cerevisiae* Stämme AH22ura3  $\Delta$ *sdh2* und AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *sdh1* mit Deletion einer oder beider katalytischer SDH-Untereinheiten reaktionstechnisch untersucht und die Aussage von Kubo *et al.* 2000, dass eine Deletion beider katalytischen Untereinheiten zur Blockade der SDH-Aktivität notwendig ist, bestätigt. Beide Stämme zeigten eine gegenüber dem Wildtyp erhöhte Succinatbildung, was zeigt, dass der Citrat-Zyklus wie gewünscht eingeschränkt bzw. blockiert wurde. Die Stämme besaßen - wie durch die Bildung oxidierter Produkte und die vorhandene Sauerstoffaufnahme trotz einer Blockade

im Citrat-Zyklus nachgewiesen wurde - einen respiratorischen Stoffwechsel. Dies ist essentiell für das Konzept zur aeroben Succinatproduktion, in dem Sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor genutzt werden soll. Welcher Stamm die besseren Ausbeuten lieferte, war stark von den Kultivierungsbedingungen abhängig. In der weiteren Stammentwicklung wurde daher auf Basis beider Stämme weitergearbeitet.

Dass in einem Zulaufexperiment (Zudosierung einer Glucose-/Glutamatmischung) mit AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1$  8,5 g L<sup>-1</sup> Succinat erreicht wurden, indem ein Teil der Kohlenstoffs in Form von Glutamat direkt in den Citrat-Zyklus eingebracht wurde, brachte den generellen Nachweis, dass mit *S. cerevisiae* eine Succinatbildung bis zu Konzentrationen im g/L-Bereich möglich ist. Die starke Acetatbildung im Zulaufverfahren begrenzte in diesen ersten Stämmen die erreichbaren Succinatkonzentrationen.

Die zur Umlenkung des Kohlenstoffflusses Richtung Succinat notwendigen Deletionen im zentralen respiratorischen Kohlenstoffmetabolismus können, wie die Charakterisierung der SDH-Deletionsstämmen zeigte, unter vielen Bedingungen Wachstumseinschränkungen zur Folge haben. Dieses Problem lässt sich durch den alternativen Einsatz von induzierbaren Deletionen und einer Trennung von Wachstums- und Produktionsphase umgehen. Daher wurde ein Tetracyclin-reguliertes Promotorsystem am Beispiel der SDH2-Deletion evaluiert. Bereits eine Repressor-Konzentration von 1 mg L<sup>-1</sup> Tetracyclin bzw. 0,2 mg<sub>Tetracyclin</sub> g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> erwies sich als ausreichend zur Repression des Zielgens.

## 8 Charakterisierung von *S. cerevisiae* Stämmen mit Deletion der Succinat-Dehydrogenase und Isocitrat-Dehydrogenase(n)

Nach der Blockade des Succinatabbaus, der bereits zu einer ersten Anreicherung von Succinat führte, sollte als nächster Schritt die Umleitung des Kohlenstoffflusses in den Glyoxylat-Zyklus erfolgen. Hierzu sollten die zur Isocitrat-Lyase konkurrierenden Reaktionen, die durch Isocitrat-Dehydrogenasen katalysiert werden, unterbrochen werden.

*S. cerevisiae* besitzt vier verschiedene Isocitrat-Dehydrogenasen *IDH*, *IDP1*, *IDP2* und *IDP3*. Während die *IDH* NAD<sup>+</sup> als Cofaktor nutzt, dient NADP<sup>+</sup> als Cofaktor bei den drei *IDP*-Isoenzymen. Auf Glucose, dem angestrebten Substrat für die Succinatproduktion, tragen in Wildtypstämmen nur die Enzyme *IDH* und *IDP1* zur Isocitrat-Dehydrogenase-Aktivität der Zelle bei.

Zunächst wurde die *IDH* deletiert, da sie die am Citrat-Zyklus beteiligte Isocitrat-Dehydrogenase darstellt (McCammon und McAlister-Henn 2003, Zhao und McAlister-Henn 1996). Die *IDH* ist ein Heterooctamer aus zwei Untereinheiten codiert durch die Gene *idh1* und *idh2*. Da beide Untereinheiten essentiell für die katalytische Aktivität sind, führt bereits die Deletion einer der beiden Untereinheiten zu einem vollständigen Funktionsverlust des Enzyms (Cupp und McAlister-Henn 1991, Cupp und McAlister-Henn 1992, Cupp und McAlister-Henn 1993, Zhao und McAlister-Henn 1997). Im Rahmen dieses Forschungsvorhabens wurde das Gen *idh1* deletiert, da eine Deletion von *idh2* einen bislang nicht näher untersuchten als "Open reading frame" (YOR135C) klassifizierten Bereich auf dem komplementären DNA-Strang unterbrochen hätte (persönliche Kommunikation mit Andreas Raab, ORGANOBALANCE GmbH, Berlin). Anschließend wurde ergänzend zur *IDH*-Deletion das Isoenzym *IDP1* deletiert, um die Isocitrat-Dehydrogenase-Aktivität auf Glucose vollständig zu blockieren. Es wurden folgende Stämme untersucht:

- *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* pFlat3
- *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *sdh1*  $\Delta$ *idh1* pFlat3
- *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *sdh1*  $\Delta$ *idh1*  $\Delta$ *idp1* (pFlat1) pFlat2 pFlat3

Beim dem *SDH-IDH-IDP*-Deletionsstamm lag zunächst nur der Stamm *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *sdh1*  $\Delta$ *idh1*  $\Delta$ *idp1* pFlat2 pFlat3 mit einer nicht in Kapitel 6 überprüften Plasmidkombination vor. Im Laufe der Arbeiten traf auch *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *sdh1*  $\Delta$ *idh1*  $\Delta$ *idp1* pFlat1 pFlat2 pFlat3. Die in Kapitel 8.6 gezeigten Experimente wurden

mit AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1$  pFlat2 pFlat3 durchgeführt, in allen übrigen Versuchen konnte bereits AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1$  pFlat1 pFlat2 pFlat3 eingesetzt werden.

## 8.1 Satzverfahren mit Glucose als Kohlenstoffquelle

Das Wachstum und die Succinatbildung der beiden *S. cerevisiae* SDH-IDH-Deletionsstämme und des SDH-IDH-IDP-Deletionsstammes wurde zunächst in den beiden definierten Medien WM8A und WM8G, sowie dem Komplexmedium YEPD im Satzversuch mit Glucose als Kohlenstoffquelle betrachtet.

Bei *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1$  zeigt die erste Kultivierung im Bioreaktorblock, dass dieser Stamm in allen Medium eine Verzögerungsphase von mindestens 30 h aufwies, wenn wie üblich bei den anderen Stämmen eine in der stationären Phase transferierte Vorkultur verwendet wurde (Daten nicht gezeigt). Daher wurden bei auf 48 h angesetzten Satzexperimenten bei diesem Stamm generell Zellen aus exponentiell wachsenden Vorkulturen überimpft.

Wie Abbildung 8.1 zeigt, halbierte sich die Wachstumsrate der SDH-IDH-Stämme mit Glucose im definierten WM8A-Medium im Vergleich zum Wildtyp. Beim Stamm mit der zusätzlichen IDP1-Deletion, *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1$ , sinkt die Wachstumsrate im WM8A auf nur 8 % der Wachstumsrate des Wildtyps ab, und von den eingesetzten  $50 \text{ g L}^{-1}$  Glucose waren bei Versuchsende nach 48 h noch  $43,6 \pm 1,0 \text{ g L}^{-1}$  Glucose nachzuweisen. In den beiden reichhaltigen Medien YEPD und WM8G betrug die Wachstumsrate im exponentiellen Wachstum bei allen drei Deletionsstämmen mindestens zwei Drittel der Wachstumsrate des Wildtyps. Im Komplexmedium wuchs der SDH-IDH-IDP-Stamm allerdings nur zwischen einer Prozesszeit von 6 und 12 h exponentiell. Danach war die Zunahme der Biomasse nur noch linear. Bei keinem der drei Deletionsstämme war ein diauxisches Wachstum zu erkennen.

Im definierten Minimalmedium WM8A und im Komplexmedium lag die Succinatkonzentration der SDH-IDH-Deletionsstämme unter  $0,2 \text{ g L}^{-1}$  und unterschied sich nicht signifikant von der der SDH-Stämme. Im Glutamat-haltigen WM8G-Medium war die Succinatbildung bezogen auf den jeweils zugehörigen SDH-Stamm bei AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta idh1$  auf 69 % und bei AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1$  auf 90 % reduziert.

Beim Stamm AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1$  lag die erzielte Succinatkonzentration in allen drei Medien unter der der SDH-IDH-Stämme. Die im WM8G-Medium erzielte Succinatkonzentration lag mit  $0,3 \pm 0,0 \text{ g L}^{-1}$  nicht nur unterhalb der der übrigen Deletionsstämme, sondern auch unter der mit dem Wildtyp erzielten Konzentration.



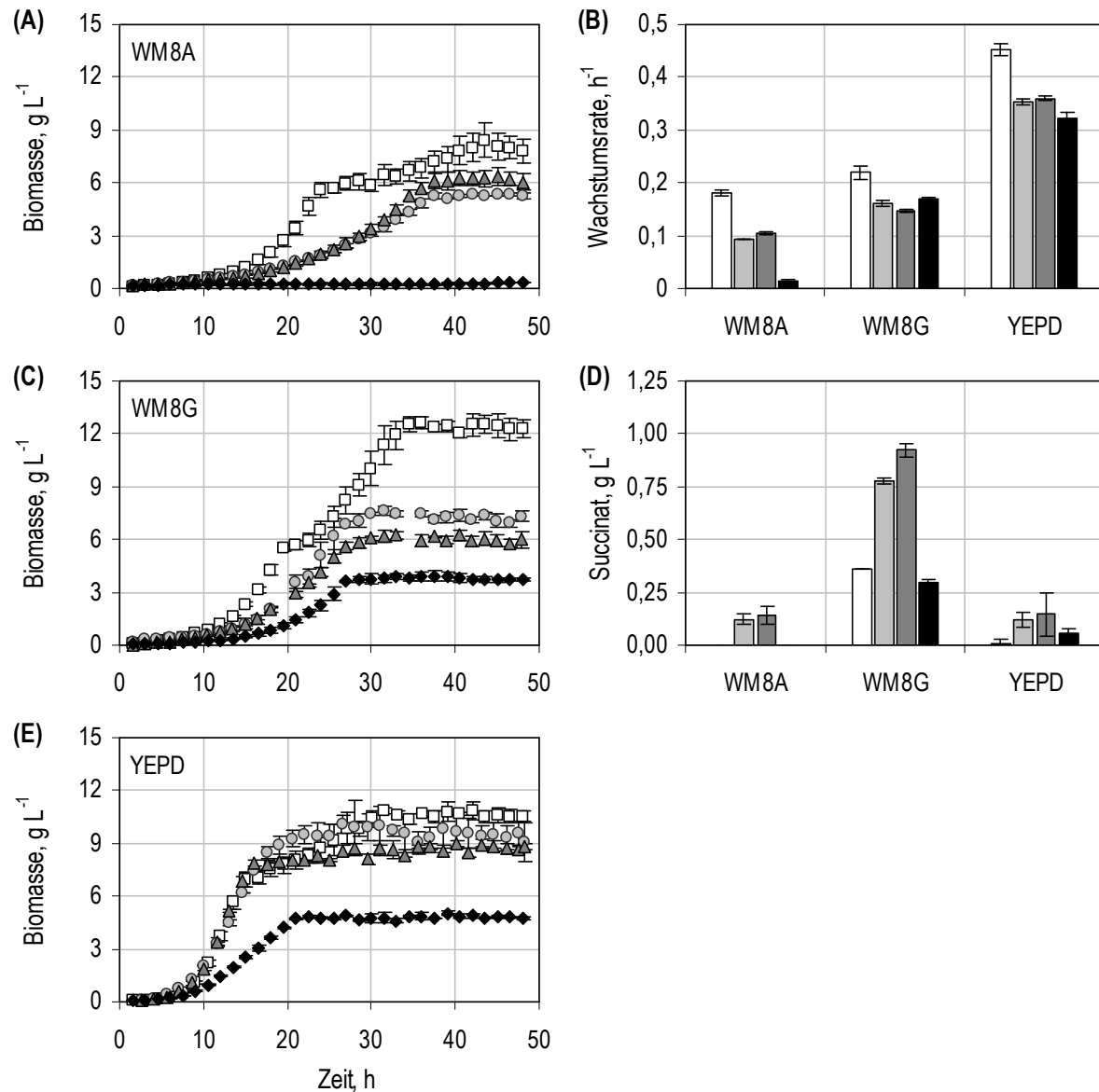


Abbildung 8.1: Evaluierung der *S. cerevisiae* SDH-IDH- und des SDH-IDH-IDP-Deletionsstammes durch Satzversuche mit Glucose als Kohlenstoffquelle im Bioreaktorblock ( $V_0 = 12 \text{ mL}$ ,  $n = 3$ ). A, C und E: Wachstumskurven des Wildtypstammes ( $\square$ ) und der Deletionsstämme AH22ura3  $\Delta\text{sdh2 } \Delta\text{idh1}$  ( $\circ$ ), AH22ura3  $\Delta\text{sdh2 } \Delta\text{sdh1 } \Delta\text{idh1}$  ( $\triangle$ ) und AH22ura3  $\Delta\text{sdh2 } \Delta\text{sdh1 } \Delta\text{idh1 } \Delta\text{idp1}$  ( $\blacklozenge$ ) in drei verschiedenen Medien mit  $50 \text{ g L}^{-1}$  Glucose als Kohlenstoffquelle. In den Wachstumskurven der Stämme AH22ura3  $\Delta\text{sdh2 } \Delta\text{idh1}$  und AH22ura3  $\Delta\text{sdh2 } \Delta\text{sdh1 } \Delta\text{idh1}$  im WM8G-Medium zeigen sich zwei Lücken, bei denen auf Grund von technischen Problemen keine automatisierte Messung der optischen Dichte erfolgte. B und D: Wachstumsraten mit Glucose und Succinatkonzentration nach 48 h Versuchsdauer der Stämme AH22ura3 wt ( $\square$ ), AH22ura3  $\Delta\text{sdh2 } \Delta\text{idh1}$  ( $\square$ ), AH22ura3  $\Delta\text{sdh2 } \Delta\text{sdh1 } \Delta\text{idh1}$  ( $\blacksquare$ ) und AH22ura3  $\Delta\text{sdh2 } \Delta\text{sdh1 } \Delta\text{idh1 } \Delta\text{idp1}$  ( $\blacksquare$ ).

## Diskussion

Wildtypstämme von *S. cerevisiae* besitzen insgesamt vier Isocitrat-Dehydrogenasen von denen nur *IDH* und *IDP1* beim Wachstum mit Glucose unter Satzbedingungen aktiv sind. Zu beachten ist aber, dass in *IDH*-Deletionsstämmen neben der mitochondrialen *IDP1* auch die cytoplasmatische *IDP2* konstitutiv exprimiert ist (McCammon und McAlister-Henn 2003, Lin *et al.* 2008).

Um den Effekt der zusätzlichen Isocitrat-Dehydrogenase-Deletion(en) in den *SDH*-Deletionsstämmen isoliert betrachten zu können, wurden in Tabelle 8.1 die Wachstumsraten der *SDH-IDH-(IDP-)*Deletionsstämmen jeweils auf den zugehörigen *SDH*-Deletionsstamm normiert. Für das YEPD-Medium sind aus Haselbeck und McAlister-Henn (1993) zudem noch Daten zum alleinigen Effekt *IDH*-Deletion oder *IDH-IDP1*-Deletion verfügbar und in Tabelle 8.1 ergänzt.

Tabelle 8.1: Einfluss der *idh*-Deletion oder *idh-idp1*-Deletionen auf die Wachstumsrate mit Glucose bei *S. cerevisiae*. Dargestellt sind die auf die Wachstumsrate des angegebenen Bezugsstammes normierten Wachstumsraten (Angaben in %).

Deletion(en) im Bezugsstamm	-	<i>sdh2</i>	<i>sdh1, sdh1</i>	-	<i>sdh1, sdh2</i>
zusätzliche Deletion(en)	<i>idh</i>	<i>idh</i>	<i>idh</i>	<i>idh, idp1</i>	<i>idh, idp1</i>
YEPD-Medium	94*	92 ± 6	90 ± 3	74*	81 ± 5
WM8G-Medium	-	82 ± 4	74 ± 3	-	85 ± 3
WM8A-Medium	-	48 ± 1	55 ± 3	-	8 ± 2

\* Daten aus Haselbeck und McAlister-Henn (1993) (Einfachbestimmung der Wachstumsrate in YEPD-Medium mit 20 g L<sup>-1</sup> Glucose im Schüttelkolben).

Der Vergleich mit den Daten von Haselbeck und McAlister-Henn (1993) zeigt, dass im Komplexmedium eine *IDH*-Deletion in einem Wildtypstamm eine vergleichbare Absenkung des Wachstums wie in *SDH*-Deletionsstämmen zur Folge hat. Dagegen hat eine *IDH*- und *IDP1*-Deletion in *SDH*-Stämmen geringere Auswirkungen als in den Wildtypen. Allerdings gilt dies nur für die kurze Phase in der *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1$  exponentiell wuchs.

Insgesamt sind Auswirkungen einer *IDH*-Deletion auf die Wachstumsrate mit Glucose im Komplexmedium oder auch WM8G-Medium gering. Dies ist damit zu erklären, dass die Zellen im Komplexmedium Precursor wie beispielsweise Glutamat und andere Aminosäuren und im WM8G-Medium Glutamat aus dem Medium aufnehmen, statt diese über den Citrat-Zyklus zu synthetisieren. Zudem ist die Expression der *IDH* unter diesen Bedingungen gering (McCammon und McAlister-Henn 2003, Lin *et al.* 2008). Der deutlichste Phänotyp der

zusätzlichen IDH-Deletion in den SDH-Stämmen, eine Halbierung der Wachstumsrate, wurde im definierten Medium mit anorganischer Stickstoffquelle (WM8A) beobachtet. Jedoch zeigt auch die Absenkung der Wachstumsrate in den glutamathaltigen Medien, WM8G und YEPD, dass das im Medium verfügbare Glutamat die IDH-Deletion nur teilweise kompensieren kann.

Die Succinatbildung der SDH-IDH-Stämme unterschied sich im WM8A und YEPD nicht signifikant von der der SDH-Stämme. Im WM8G-Medium lag die Succinatendkonzentration der SDH-IDH-Stämme gegenüber den SDH-Stämmen niedriger. Dies könnte damit erklärt werden, dass zur Kompensation der geringeren Isocitrat-Dehydrogenase-Aktivität Glutamat weniger in Richtung des Citrat-Zykluses bis zur SDH geschleust wurde, sondern verstärkt in Richtung Aminosäurebiosynthese.

Die IDH-IDP1-Deletion ergänzend zur vollständigen SDH-Deletion hatte in den drei Medien unterschiedliche Auswirkungen. Wie für IDH-IDP1-Deletionsstämme beschrieben (McCammon und McAlister-Henn 2003), wächst AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1$  nur minimal im definierten Medium ohne Glutamat ( $\mu = 0,01 \text{ h}^{-1}$ ). Dies beweist, dass die gewünschte Blockade der Isocitrat-Dehydrogenase-Aktivität, die eine Umlenkung des Kohlenstoffflusses in den Glyoxylat-Zyklus ermöglichen soll, erfolgreich war. Das minimale Wachstum dieses Deletionsstammes trotz Blockade der beiden Enzyme *IDH* und *IDP1* kann mit der durch die IDH-Deletion dereprimierten *IDP2* erklärt werden ((McCammon und McAlister-Henn 2003, Lin *et al.* 2008).

Im Komplexmedium verringerte sich die Wachstumsrate von AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1$  gegenüber den SDH- und SDH-IDH-Stämmen nur minimal, allerdings konnte diese Wachstumsrate bzw. das exponentielle Wachstum nur kurze Zeit aufrechterhalten werden. Dass ab einer Kultivierungsdauer von 12 h beobachtete lineare Wachstum des Stammes im YEPD-Medium (Abbildung 8.1E) deutet auf eine Limitierung hin. Denkbar ist beispielsweise, dass ab diesen Zeitpunkt das im Medium verfügbare freie Glutamat verbraucht war. Dies deckt sich damit, dass im WM8G-Medium keine Verringerung der Wachstumsrate gegenüber den SDH-Stämmen zu verzeichnen war. Im WM8G war die Succinatbildung von AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1$  aus Glucose und Glutamat geringer als die des Wildtyps. Durch den starken Abfall der Isocitrat-Dehydrogenase-Aktivität durch die IDH-IDP1-Deletion verstärkt sich wahrscheinlich der Effekt, dass Glutamat weniger in Richtung des Citrat-Zykluses bis zur SDH geschleust, sondern zur Aminosäuresynthese genutzt wird.

## 8.2 Evaluierung der Succinattoleranz eines Deletionsstammes

Die Succinattoleranz von *S. cerevisiae* wurde bereits in Kapitel 6.2 an Hand des Wildtypstammes evaluiert und wurde an dieser Stelle nochmals an Hand eines rekombinanten Deletionsstammes überprüft. Beispielhaft wurde *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta idh1$  verwendet.

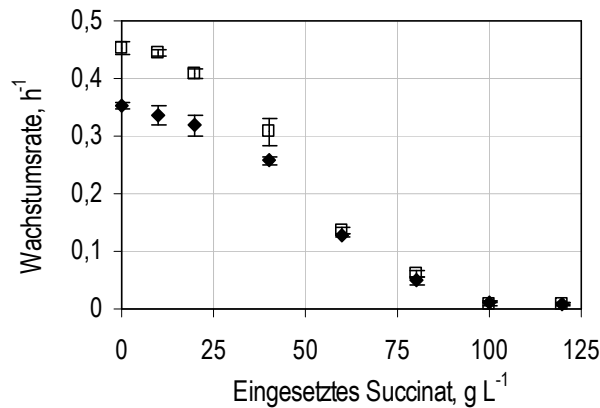


Abbildung 8.2: Succinattoleranz des rekombinanten *S. cerevisiae* Stammes AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta idh1$ . Dargestellt sind die Wachstumsraten mit Glucose aus Satzkultivierungen im Bioreaktorblock ( $V_0 = 12$  mL,  $n = 3$ ) von AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta idh1$  (◆) im Vergleich zum Wildtyp (□) bei Zusatz verschiedener Konzentrationen an Natriumsuccinat zum YEPD-Medium mit  $50$  g L<sup>-1</sup> Glucose.

Wie Abbildung 8.2 zeigt, sinkt auch bei *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta idh1$  wie beim Wildtyp die Wachstumsrate in Gegenwart von Succinat ab. Auch AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta idh1$  wächst selbst bei  $120$  g L<sup>-1</sup> Natriumsuccinat im Medium noch.

### Diskussion

Dieser Versuch bestätigte die exzellente Succinat- und Osmotoleranz selbst von *S. cerevisiae* Stämmen deren Wachstum und Stoffwechsel durch Deletionen im Citrat-Zyklus bereits reduziert ist. Mit zunehmender Succinatkonzentration verringerten sich zudem die Wachstumsunterschiede zwischen dem rekombinanten und dem Wildtypstamm.

### 8.3 Evaluierung der Glutamatauxotrophie des SDH-IDH-IDP-Deletionsstammes im Satzverfahren

Da das Wachstum des *S. cerevisiae* SDH-IDH-IDP-Deletionsstammes auf Grund der zusätzlichen Glutamatauxotrophie in definierten Medien ohne Glutamatzusatz kleiner als  $0,02 \text{ h}^{-1}$  ist, war es zur Anzucht notwendig, auch in den vollständig definierten Medien mit Ammoniumsulfat wie dem Hoek-Medium und dem WM8A-Medium die organische Stickstoffquelle Glutamat zuzusetzen. Da Glutamat als Stickstoffquelle die Succinatbildung von *S. cerevisiae* erhöht, sollte der Glutamatbedarf des SDH-IDH-IDP-Deletionsstammes und der Einfluss des Glutamatzusatzes auf die Succinatbildung bestimmt werden.

In der Kultivierung im Bioreaktorsystem wurde die Auswirkung des Zusatzes von Glutamat im definierten WM8A-Medium auf den SDH-IDH-IDP-Deletionsstamm und den Wildtypstamm evaluiert. Beide Stämme wurden in der Version mit drei Leerplasmiden verwendet, sodass in der Kultivierung dem definierten Medium neben Glutamat nur noch Histidin zugesetzt werden musste. Wie Abbildung 8.3 zeigt, erfolgt beim *S. cerevisiae* Wildtypstamm sowohl mit als auch ohne Glutamat das typische diauxische Wachstum zunächst mit Glucose und anschließend mit Ethanol. Durch Glutamat im Medium erhöht sich beim Wildtyp sowohl die Wachstumsrate mit Glucose von  $0,18$  auf  $0,20 \text{ h}^{-1}$  als auch die maximale Biomassekonzentration.

Bei *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1$  konnte die Wachstumsrate durch den Zusatz von Glutamat von  $0,01 \text{ h}^{-1}$  auf bis zu  $0,12 \text{ h}^{-1}$  gesteigert werden. Mit Ausnahme des Ansatzes ohne Glutamat, bei dem noch  $41,2 \pm 0,7 \text{ g L}^{-1}$  Glucose, und des Ansatzes mit  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  Glutamat bei dem noch  $5,7 \pm 2,3 \text{ g L}^{-1}$  Glucose vorhanden waren, wurde die Glucose vollständig verbraucht. Erst ab Zugabe von  $1 \text{ g L}^{-1}$  Glutamat wird in WM8A-Medium mit  $50 \text{ g L}^{-1}$  Glucose die maximale Biomassekonzentration erreicht und es ist noch Glutamat am Versuchsende nachzuweisen. Bei den Ansätzen mit  $0,1$  und  $0,25 \text{ g L}^{-1}$  Glutamat ist ein zweiphasiges Wachstum zu erkennen. In der ersten Phase wachsen die Zellen mit Glucose und Glutamat mit einer Wachstumsrate von  $0,12 \text{ h}^{-1}$ , während die Wachstumsrate nach Glutamatverbrauch auf  $0,02 \text{ h}^{-1}$  absinkt. Aus den beiden Ansätzen pro Stamm, bei denen noch Glutamat vorhanden war, konnte der Glutamatverbrauch bestimmt werden. Dieser lag beim Wildtyp und Deletionsstamm bei  $0,016 \text{ g}_{\text{Glutamat}} \text{ g}_{\text{Glucose}}^{-1}$  bzw.  $0,020 \text{ mol}_{\text{Glutamat}} \text{ mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$ . In den Ansätzen von AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1$  mit Glutamatzusatz wurden weniger als  $0,2 \text{ g L}^{-1}$  Succinat gebildet. Ohne Glutamatzusatz und bei allen Ansätzen des Wildtyps war kein Succinat nachzuweisen (Daten nicht gezeigt).

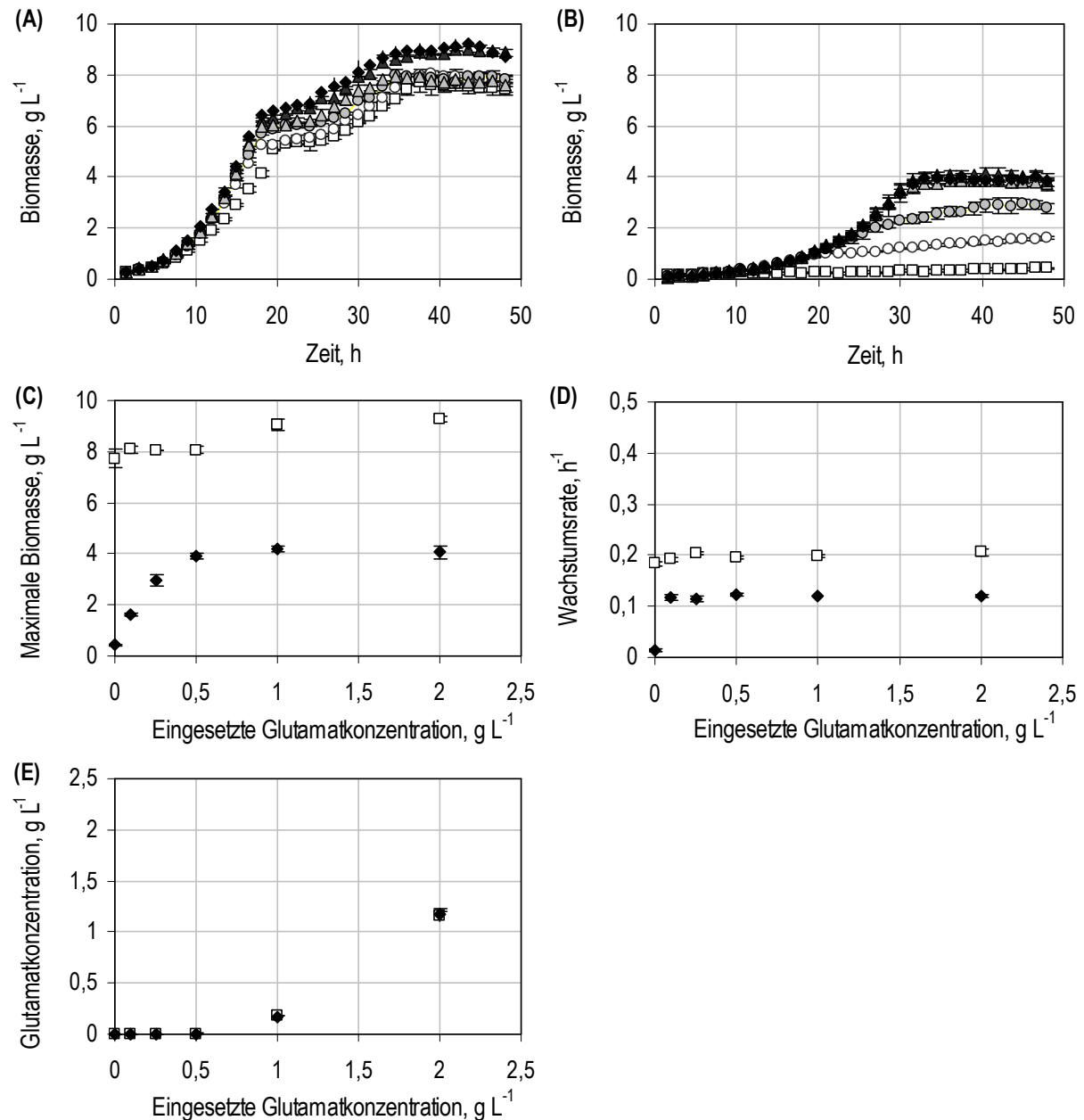


Abbildung 8.3: Evaluierung der Glutamatauxotrophie des *S. cerevisiae* SDH-IDH-IDP-Deletionsstammes (Satzversuche im Bioreaktorblock,  $V_0 = 12 \text{ mL}$ ,  $n = 3$ ). A und B: Wachstumskurven im Bioreaktorblock des Wildtyps (A) und des SDH-IDH-IDP-Deletionsstammes (B) im WM8A-Medium mit  $50 \text{ g L}^{-1}$  Glucose ohne Zusatz von Glutamat (□) und bei Zusatz von  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  (○),  $0,25 \text{ g L}^{-1}$  (◐),  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  (Δ),  $1 \text{ g L}^{-1}$  (▲) und  $2 \text{ g L}^{-1}$  (◆) Glutamat. C, D und E: Maximale Biomassekonzentration (C) des Wildtyps (□) und des Deletionsstammes (◆) sowie Wachstumsrate mit Glucose (D) und verbliebene Glutamatkonzentration der Ansätze nach 48 Stunden (E). Es wurden die Stämme *S. cerevisiae* AH22ura3 wt pFlat1 pFlat2 pFlat3 und AH22ura3  $\Delta\text{sdh2}$   $\Delta\text{sdh1}$   $\Delta\text{idh1}$   $\Delta\text{idp1}$  pFlat1 pFlat2 pFlat3 eingesetzt.

## Diskussion

Durch Zusatz von Glutamat wurde bei dem *S. cerevisiae* SDH-IDH-IDP-Stamm ein verbessertes Wachstum erzielt. Wie bereits im WM8G-Medium für diesen Stamm beobachtet, liegt die Wachstumsrate auch im WM8A mit Glutamatzusatz unter der des Wildtyps und es wurde eine geringere Biomassekonzentration mit Glucose erreicht.

Dass beim Wildtyp und SDH-IDH-IDP-Deletionsstamm am Ende der Kultivierung bei den Ansätzen mit 1 und 2 g L<sup>-1</sup> Glutamat noch Glutamat vorhanden war, obwohl Glutamat als Stickstoffquelle ein besseres Wachstum als Ammoniumsulfat ermöglicht, beruht auf dem Stickstoff-Katabolitrepressions-Effekt. Das WM8A-Medium enthält Ammonium als Stickstoffquelle und dieses inhibiert die Verwendung von Glutamat (Hofman-Bang 1999). Die Daten zeigen jedoch auch, dass die Inhibition nicht vollständig ist.

Bezogen auf die verbrauchte Glucose ergab sich bei beiden Stämmen ein identischer Glutamatverbrauch. Allerdings zeigten sich deutliche Unterschiede in der erzielten Biomassekonzentration der beiden Stämme. Wird dies berücksichtigt, zeigt sich der mit  $0,21 \pm 0,01 \text{ g}_{\text{Glutamat}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1}$  erhöhte Glutamatverbrauch von *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1$  gegenüber dem Wildtyp, der einen Wert von  $0,09 \pm 0,00 \text{ g}_{\text{Glutamat}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1}$  aufwies. Der theoretische Anteil von Glutamat an der Biomasse wird in der Literatur mit  $0,05 \text{ g}_{\text{Glutamat}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1}$  angegeben (Berechnung an Hand von Daten aus Oura 1977 und Pronk 2002) und liegt nahe an dem für den Wildtyp erzielten tatsächlichen Glutamatanteil.

## 8.4 Satz- und Zulaufverfahren mit Glucose als Kohlenstoffquelle

Wie die SDH-Stämme wurden auch die SDH-IDH-(IDP)-Deletionsstämme durch einen zweitägigen Satzversuch im Hoek-Medium mit 50 g L<sup>-1</sup> Glucose mit anschließender Zulaufphase weiter charakterisiert, wobei dem Medium bei *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1$  Glutamat im Überschuss zugesetzt wurde. Zudem erfolgte für den SDH-IDH-IDP-Stamm auch ein Experiment ohne Zusatz von Glutamat.

Abbildung 8.4 zeigt die Kultivierungen der beiden SDH-IDH-Deletionsstämme. Die Kultivierungen lassen sich wieder in die Satzphase mit Glucose oder Ethanol und die Zulaufphase unterteilen und die Ausbeuten der einzelnen Phasen sind in Tabelle 8.3 zusammengefasst.

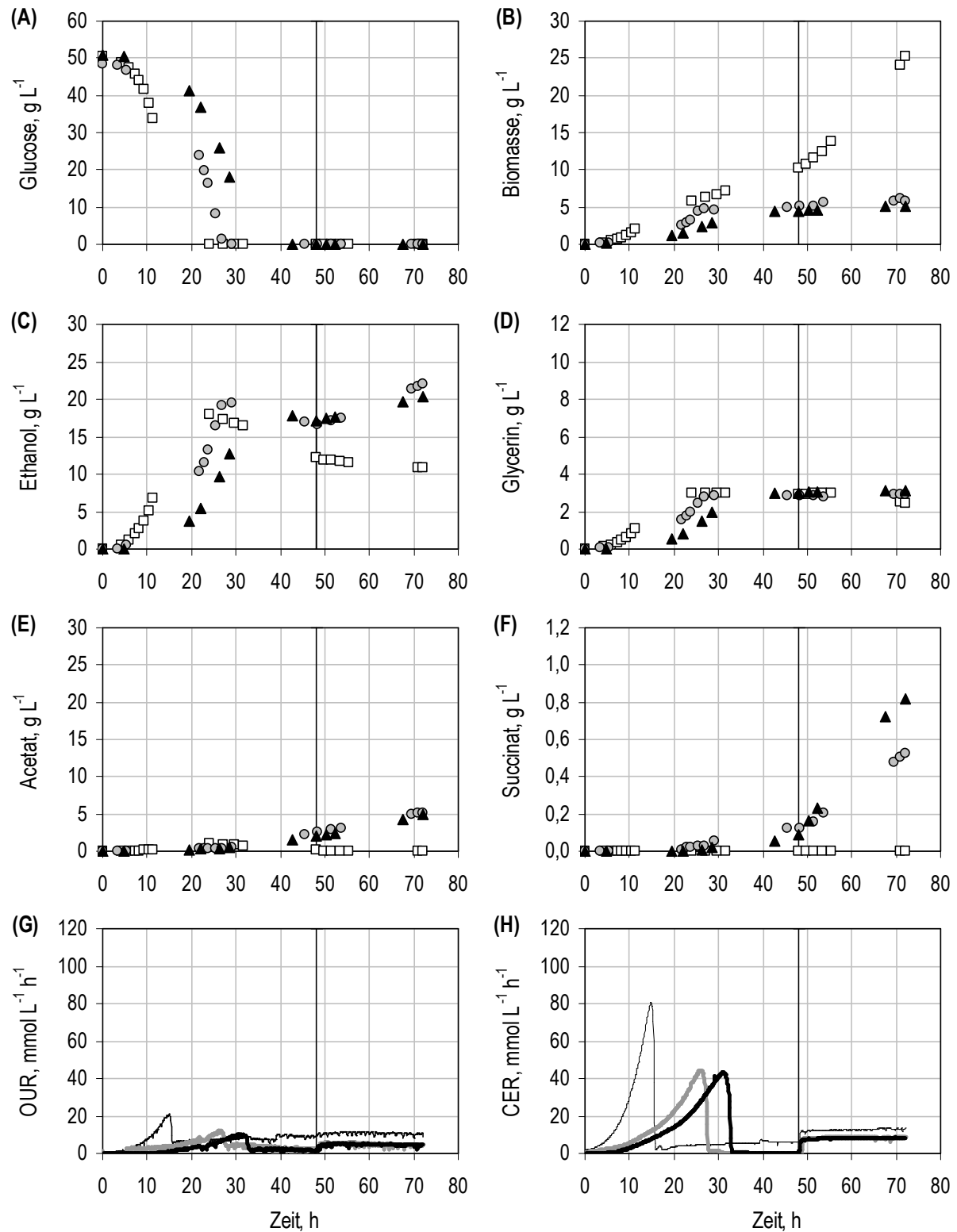


Abbildung 8.4: Satz- und Zulaufkultivierung im definierten Hoek-Medium mit 50 g L<sup>-1</sup> Glucose im Laborreaktor ( $V_0 = 1,2$  L) zur Evaluierung der *S. cerevisiae* SDH-IDH-Deletionsstämme. Dargestellt sind der Wildtypstamm als Referenz (□ oder dünne schwarze Linie), AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta idh1$  (○ oder dicke graue Linie) und AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1$  (◆ oder dicke schwarze Linie). Der Zulauf mit einer Dosierate von 0,7 g<sub>Glucose</sub> L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> wurde nach 48 Stunden gestartet. Bei den dargestellten Ethanolkonzentrationen wurde die Verdunstung von Ethanol berücksichtigt.



### Kultivierung der SDH-IDH-Stämme

In der Satzphase mit Glucose zeigten auch die SDH-IDH-Stämme den typischen respiratorischen Stoffwechsel von *S. cerevisiae* bei Glucoseüberschuß. Allerdings halbierte sich die zellspezifische Glucoseaufnahme, Wachstumsrate, Ethanol- Glycerin- und CO<sub>2</sub>-Bildungsrate und die Sauerstoffaufnahme gegenüber dem Wildtyp und den SDH-Stämmen. Dagegen war die zellspezifische Acetatbildungsrate gegenüber den SDH-Stämmen mehr als verdoppelt und auch die erreichte Succinatkonzentration gegenüber den SDH-Stämmen erhöht.

Nachdem die Glucose vollständig verbraucht war, wandelten die SDH-IDH-Stämme wie die SDH-Stämme Ethanol unter Sauerstoffverbrauch in Acetat um (Tabelle 8.3). Der Stamm mit der unvollständigen SDH-Deletion, AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta idh1$ , bildete wie auch AH22ura3  $\Delta sdh2$ , aus Ethanol auch Biomasse. Bei AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1$  stieg die Succinatausbeute aus Ethanol und es wurde keine Biomassebildung mehr nachgewiesen. Es war bei beiden SDH-IDH-Stämmen keine Bildung von Kohlendioxid aus Ethanol detektierbar. Beide Stämme hatten mit Ethanol eine Succinatausbeute vergleichbar zum korrespondierenden SDH-Stamm.

Tabelle 8.2: Wachstumsraten ( $h^{-1}$ ) und zellspezifische Substrataufnahme- sowie Produktbildungsraten ( $mmol g_{BTM}^{-1} h^{-1}$ ) in der Satzphase mit Glucose im definierten Hoek-Medium im Laborreaktor zur Evaluierung der *S. cerevisiae* SDH-IDH-(IDP-)Deletionsstämme.

Stamm	$\mu_{max}$	$q_{Glu}$	$q_{Suc}$	$q_{Eth}$	$q_{Gly}$	$q_{Ace}$	$q_{CO_2}$	$q_{O_2}$
wt	0,29	-14,4	n.d.	23,0	1,8	0,3	22,8	5,5
$\Delta sdh2$	0,27	-14,9	0,00	22,4	1,5	0,1	23,1	5,5
$\Delta sdh2 \Delta idh1$	0,16	-8,3	0,01	13,3	1,0	0,2	12,7	2,5
$\Delta sdh2 \Delta sdh1$	0,30	-15,7	0,00	25,3	2,4	0,1	22,7	4,5
$\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1$	0,14	-8,6	0,01	13,1	1,0	0,4	14,2	2,6
$\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1$	0,02	-4,3	0,03	6,2	1,0	0,1	6,7	n.a. <sup>b</sup>
$\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1^a$	0,14	-9,1	0,09	15,1	1,6	0,3	14,8	1,9

<sup>a</sup> Kultivierung mit Zusatz von Glutamat

<sup>b</sup> nicht ausgewertet. Es war eine Sauerstoffaufnahme messbar, jedoch lagen die Änderungen an der Meßgrenze des Sauerstoffsensors, wodurch die Berechnung der Ausbeuten stark verfälscht werden kann.

Wie Abbildung 8.4 zeigt, wuchsen beide SDH-IDH-Stämme wieder während des kontinuierlichen Zulaufes von  $0,7 g_{Glucose} L^{-1} h^{-1}$ , der nach 48 h Versuchsdauer gestartet wurde. In der Zulaufphase lag die Succinatausbeute mit  $0,03 mol_{Succinat} mol_{Glucose}^{-1}$  bei AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta idh1$  und  $0,05 mol_{Succinat} mol_{Glucose}^{-1}$  bei AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1$  über

der Ausbeute der SDH-Stämme. Als weitere Produkte wurde während des Zulaufs Acetat und Ethanol gebildet.

Tabelle 8.3: Ausbeuten ( $\text{mol mol}^{-1}$ ) im definierten Hoek-Medium im Laborreaktor bei der Evaluierung der *S. cerevisiae* SDH-IDH-(IDP-)Deletionsstämme.

Stamm	Phase	Substrat	$Y_{X/S}$	$Y_{\text{Suc}/S}$	$Y_{\text{Eth}/S}$	$Y_{\text{Gly}/S}$	$Y_{\text{Ace}/S}$	$Y_{\text{CO}_2/S}$	$Y_{\text{O}_2/S}$
wt	Satz	Glucose	0,2	n.d.	1,6	0,1	0,0	1,6	0,4
$\Delta\text{sdh}2$	Satz	Glucose	0,2	0,00	1,5	0,1	0,0	1,6	0,4
$\Delta\text{sdh}2 \Delta\text{idh}1$	Satz	Glucose	0,2	0,00	1,6	0,1	0,0	1,5	0,3
$\Delta\text{sdh}2 \Delta\text{sdh}1$	Satz	Glucose	0,2	0,00	1,6	0,1	0,0	1,5	0,3
$\Delta\text{sdh}2 \Delta\text{sdh}1 \Delta\text{idh}1$	Satz	Glucose	0,2	0,00	1,5	0,1	0,0	1,6	0,3
$\Delta\text{sdh}2 \Delta\text{sdh}1 \Delta\text{idh}1$	Satz	Glucose	0,0	0,01	1,5	0,2	0,0	1,6	n.a. <sup>b</sup>
$\Delta\text{sdh}2 \Delta\text{sdh}1 \Delta\text{idh}1^{\text{a}}$	Satz	Glucose <sup>b</sup>	0,2	0,01	1,7	0,2	0,0	1,7	0,2
wt	Satz	Ethanol Acetat Glycerin	0,4	n.d.	-	-	-	0,9	1,4
$\Delta\text{sdh}2$	Satz	Ethanol	0,1	0,01	-	0,0	0,8	0,0	0,8
$\Delta\text{sdh}2 \Delta\text{idh}1$	Satz	Ethanol	0,1	0,01	-	0,0	0,6	0,0	0,5
$\Delta\text{sdh}2 \Delta\text{sdh}1$	Satz	Ethanol	0,0	0,01	-	0,0	0,7	0,0	0,6
$\Delta\text{sdh}2 \Delta\text{sdh}1 \Delta\text{idh}1$	Satz	Ethanol	0,0	0,02	-	0,0	0,6	0,0	0,6
$\Delta\text{sdh}2 \Delta\text{sdh}1 \Delta\text{idh}1$	Satz	Ethanol			kein Verbrauch von Ethanol				
$\Delta\text{sdh}2 \Delta\text{sdh}1 \Delta\text{idh}1^{\text{a}}$	Satz	Ethanol <sup>b</sup>			kein Verbrauch von Ethanol				
wt	Zulauf	Glucose Ethanol Glycerin	1,0	n.d.	-	-	0,0	1,9	1,6
$\Delta\text{sdh}2$	Zulauf	Glucose	0,1	0,01	1,2	0,0	0,4	1,7	0,7
$\Delta\text{sdh}2 \Delta\text{idh}1$	Zulauf	Glucose	0,1	0,03	1,0	0,0	0,3	1,6	0,5
$\Delta\text{sdh}2 \Delta\text{sdh}1$	Zulauf	Glucose	0,1	0,02	1,2	0,0	0,4	1,7	0,7
$\Delta\text{sdh}2 \Delta\text{sdh}1 \Delta\text{idh}1$	Zulauf	Glucose	0,1	0,05	0,6	0,0	0,4	1,8	1,1
$\Delta\text{sdh}2 \Delta\text{sdh}1 \Delta\text{idh}1$	Zulauf	Glucose	0,0	0,01	1,6	0,1	0,0	1,6	n.a. <sup>c</sup>
$\Delta\text{sdh}2 \Delta\text{sdh}1 \Delta\text{idh}1^{\text{a}}$	Zulauf	Glucose <sup>b</sup>	0,1	0,01	1,6	0,1	0,0	1,6	n.a. <sup>c</sup>

<sup>a</sup> in Medium mit Glutamatzusatz

<sup>b</sup> Die Ausbeuten wurden nur mit Glucose bezogen, da es in der Literatur üblich ist auf Grund von Auxotrophien benötigten essentielle Substanzen zu vernachlässigen.

<sup>c</sup> nicht ausgewertet (Sauerstoffsignal lag an der Meßgrenze des Sauerstoffsensors)

### Kultivierung des *S. cerevisiae* SDH-IDH-IDP-Stammes

Beim *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1$  wurde im Laborrührkesselreaktor sowohl eine Satz- und Zulaufkultivierung ohne Glutamatzugabe mit entsprechend verlängerter Versuchsdauer und Dosierrate als auch ein 72-stündiges Experiment mit Zusatz von Glutamat im Überschuss durchgeführt. Basierend auf dem Experiment zur Glutamatauxotrophie im Bioreaktorblock wurden  $2 \text{ g L}^{-1}$  Glutamat zugesetzt.

Wie Abbildung 8.5 zeigt, benötigte der SDH-IDH-IDP-Stamm ohne Glutamat im Hoek-Medium über 186 h um  $50 \text{ g L}^{-1}$  Glucose zu verbrauchen. Die Ethanol- und Acetatausbeuten bezogen auf Glucose wichen um weniger als 10 % vom Wildtyp ab. Die Biomasseausbeute bezogen auf Glucose sank auf 17 % der des Wildtyps ab und die Glycerinausbeute stieg um 188 % gegenüber der des Wildtyps. Gegenüber dem Wildtyp und den SDH- und SDH-IDH-Stämmen stieg auch die Succinatausbeute an. Auch ohne Glutamat im Medium war eine geringe Sauerstoffaufnahme der Zellen messbar. Allerdings lag das Sauerstoffsignal während der Kultivierung meist nahe an der Messgrenze, sodass eine Rate bzw. Ausbeute bezogen auf Sauerstoff nicht ohne hohe Fehler ermittelt werden konnte.

Mit Glutamat im Medium erzielt *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1$  mit Glucose dieselbe Wachstumsrate und Biomasseausbeute wie *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1$  und eine gegenüber diesem Stamm erhöhte Glycerin- und Ethanolausbeute (Tabelle 8.3). Es wurden  $0,035 \text{ mol}_{\text{Glutamat}} \text{ mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$  beziehungsweise  $0,34 \text{ g}_{\text{Glutamat}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1}$  verbraucht. Die zellspezifische Succinatbildungsrate erhöhte sich in der Satzphase durch Glutamat im Medium bei AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1$  von  $0,03 \text{ mmol g}_{\text{BTM}} \text{ h}^{-1}$  auf  $0,09 \text{ mmol g}_{\text{BTM}} \text{ h}^{-1}$  beim Wachstum mit Glucose (Tabelle 8.2).

In beiden Kultivierung war kein Verbrauch von Ethanol zu erkennen, die Änderung in den gemessenen Ethanolkonzentrationen nach der Berücksichtigung der Ethanolverdunstung waren geringer als  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  und sind somit durch Messungenauigkeiten zu begründen.

Auf Grund des schlechten Wachstums des *S. cerevisiae* SDH-IDH-IDP-Stammes in der Satzphase mit Glucose ohne Glutamatzusatz wurde die Dosierrate auf  $0,07 \text{ g}_{\text{Glucose}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  abgesenkt. Während des Zulaufs kam es zur Bildung von Glycerin und Ethanol. Es war keine Biomassebildung oder Succinatbildung messbar und die Sauerstoffsignale der Abgasanalytik waren nicht auswertbar, da die Signale an der Meßgrenze des Sauerstoffsensors der Abgasanalytik lagen.

In der Zulaufphase bei Zudosierung von  $0,7 \text{ g}_{\text{Glucose}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  und Verfügbarkeit von Glutamat ist ein deutliches Wachstum und eine Sauerstoffaufnahme zu erkennen und es wurde kontinuierlich Succinat mit einer Ausbeute von  $0,01 \text{ mol}_{\text{Succinat}} \text{ mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$  gebildet. Als weitere Produkte wurden Ethanol und Glycerin gebildet. Unter beiden Bedingungen trat im Zulauf keine Acetatbildung auf.

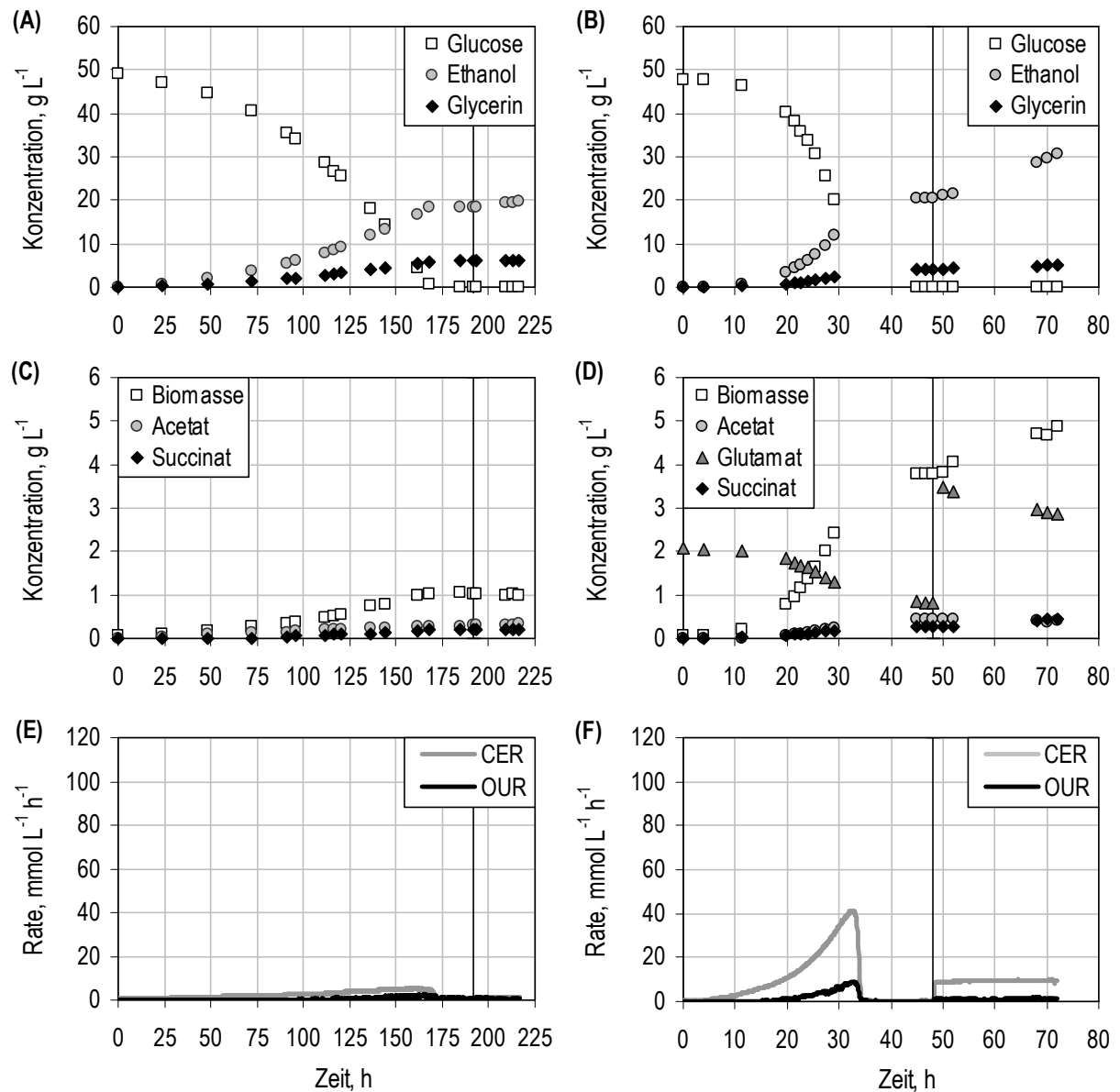


Abbildung 8.5: Satz- und Zulaufkultivierung des Deletionsstammes *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1$  im Laborreaktor ( $V_0 = 1,2 \text{ L}$ ) im Hoek-Medium mit  $50 \text{ g L}^{-1}$  Glucose. A, C und E: Verläufe der Kultivierung ohne Zusatz von Glutamat. Der Zulauf mit einer auf  $0,07 \text{ g}_{\text{Glucose}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  abgesenkten Dosierate wurde nach 192 Stunden gestartet. B, D und F: Verläufe der Kultivierung mit Zusatz von  $2 \text{ g L}^{-1}$  Glutamat bei Versuchsbeginn. Der Zulauf mit einer Dosierate von  $0,7 \text{ g}_{\text{Glucose}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  wurde nach 48 Stunden gestartet und bei Zulaufstart nochmals  $2,5 \text{ g L}^{-1}$  Glutamat zugesetzt. Bei den dargestellten Ethanolkonzentrationen wurde die Verdunstung von Ethanol berücksichtigt.

## Kohlenstoffbilanzen

Die Kohlenstoffbilanzen (Abbildung 8.6) waren in der Satz- und Zulaufkultivierung bei AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta idh1$  zu  $97 \% \pm 2 \%$ , bei AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta idh1$  zu  $95 \% \pm 3 \%$  und bei AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1$  in der Kultivierung ohne bzw. mit Glutamat zu  $101 \% \pm 1 \%$  und  $101 \% \pm 1 \%$  geschlossen.

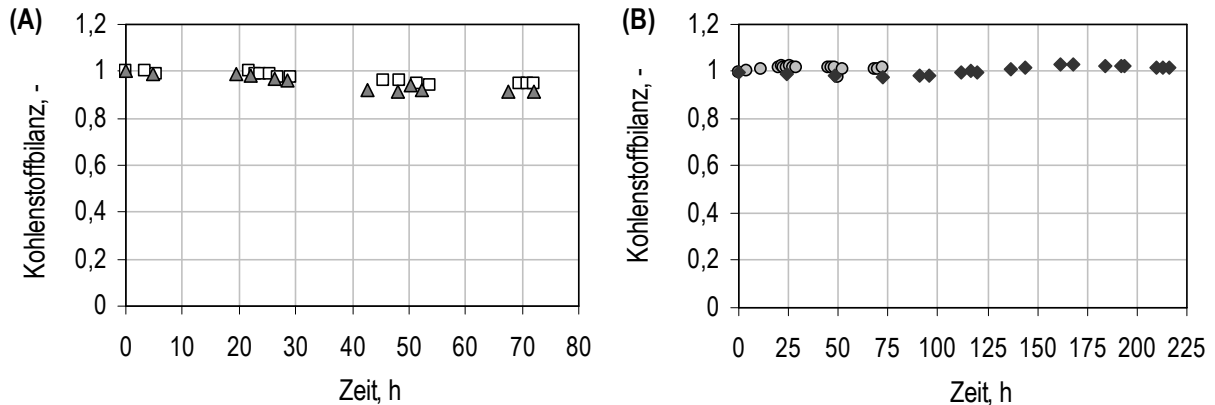


Abbildung 8.6: Kohlenstoffbilanzen ( $\text{mol}_C \text{mol}_C^{-1}$ ) der Satz- und Zulaufkultivierung im definierten Hoek-Medium im Laborreaktor zur Evaluierung der *S. cerevisiae* SDH-IDH-(IDP-)Deletionsstämme. A: Bilanzen der Kultivierung mit AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta idh1$  (□) und AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1$  (Δ). B: Bilanzen der Kultivierungen des Stammes AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1$  mit (○) und ohne Glutamatzusatz (◆). Der Verbrauch von Glutamat wurde in die Kohlenstoffbilanz miteinbezogen.

## Diskussion

Auch die Kultivierungen im Laborreaktor zeigten, dass sich die Metabolitbildung der *S. cerevisiae* SDH-IDH-Stämme phänotypisch kaum von der der SDH-Stämme unterschied. Lediglich die Wachstumsrate und daraus resultierend auch Produktbildungsraten mit Glucose sanken. Bei der Betrachtung der zellspezifischen Raten im exponentiellen Wachstum mit Glucose sticht die Erhöhung der Acetat- und Succinatbildungsrate heraus. Generell sollte die Deletion der IDH in den SDH-Stämmen dazu beitragen, den Citrat-Zyklus zu blockieren. Dass die Succinatbildung beider SDH-IDH-Stämme bereits in der Satzphase mit Glucose anstieg, könnte wie bei den SDH-Stämmen mit einer geringen Aktivität des Glyoxylat-Zyklus als Folge von Deletionen im Citrat-Zyklus zu erklären sein. Die von McCammon *et al.* (2003) beschriebene Transkriptionserhöhung der gluconeogenetischen Gene *mdh2*, *cit3*, *icl2*, *mIs1* als Reaktion auf eine alleinige Deletion des Gene *sdh1* oder *sdh2*, wurde auch als Reaktion auf eine Deletion von *idh1* beschreiben. Es könnten auch kooperative Effekte zwischen Deletionen auftreten. So führt beispielsweise eine Deletion der IDH zu einem deutlichen Absinken des Wachstums auf nicht fermentierbaren

Kohlenstoffquellen wie Ethanol. Wird zusätzlich eines der Citrat-Synthase-Gene, *cit1*, deletiert, wird dieser Wachstumsdefekt aufgehoben (McCammon *et al.* 2003, Gadde und McCammon 1997, McCammon und McAlister-Henn 2003).

Durch die IDH-Deletion kann bei vorhandener Aktivität des Glyoxylat-Zyklus eine Umleitung in den Glyoxylat-Bypass gefördert werden, denn die IDP-Isoenzyme können den Verlust der IDH nur teilweise kompensieren. Dies zeigt sich auch daran, dass die intrazelluläre Isocitratkonzentration bereits in reinen IDH-Mutanten unter Satzbedingungen mit Glucose 22-fach ansteigt und dass  $\alpha$ -Ketoglutarat um den Faktor 4 abfällt (Contreras-Shannon *et al.* 2005). Somit steht der Isocitrat-Lyase in SDH-IDH-Deletionsstämmen mehr Substrat zur Verfügung als in SDH-Deletionsstämmen. Die Erhöhung der zellspezifischen Acetatbildungsrate kann ebenfalls eine Folge des sich an zusätzlichen Deletion stauenden Kohlenstoffflusses darstellen.

Aus Ethanol bildeten auch die SDH-IDH-Deletionsstämme vor allem Acetat und geringe Mengen Succinat. Reine IDH-Deletionsstämme sind dagegen noch in der Lage mit Ethanol zu wachsen (Haselbeck und McAlister-Henn 1993, Zhao und McAlister-Henn 1996), da *IDP1* und *IDP2* den Verlust der IDH in diesen Stämmen ausreichend kompensieren. Auch für die SDH-IDH-Stämme gilt jedoch die in Kapitel 7.2 beschriebene Tatsache, dass bei einer Blockade der Ethanolveratmung über den Citratzyklus (durch Blockade von SDH oder SDH und IDH) die Bildung von Acetat aus Ethanol für die Zellen energetisch am günstigsten ist.

Unter Zulaufbedingungen wurde bei den SDH-IDH-Stämmen eine kontinuierliche Succinatbildung erzielt, deren Ausbeute jeweils über der des korrespondierenden SDH-Stammes lag. Auch dies weist auf eine teilweise Umlenkung des Kohlenstoffflusses in den Glyoxylat-Zyklus hin. Wie bei den SDH-Stämmen war auch bei den SDH-IDH-Stämmen unter Zulaufbedingungen eine vollständige Deletion beider katalytischen SDH-Untereinheiten vorteilhaft, da mit *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *sdh1*  $\Delta$ *idh1* die höchste Succinatausbeute im Zulauf erzielt wurde.

Bei den Kohlenstoffbilanzen der Versuche mit den SDH-IDH-Stämmen zeigte sich wie bei den SDH-Stämmen eine vertretbar kleine Bilanzlücke mit Glucose, die wahrscheinlich auf die Bildung von Acetaldehyd oder geringe Mengen anderer organischer Säuren zurückzuführen ist.

Durch die zusätzliche Deletion des Enzyms *IDP1* sollte zur Umleitung des Kohlenstoffflusses in den Glyoxylat-Zyklus die Isocitrat-Dehydrogenase-Aktivität auf Glucose blockiert werden. Dass der SDH-IDH-IDP-Stamm ohne Glutamat im Medium auf Glucose Sauerstoff verbrauchte, obwohl die durch den Crabtree-Effekt hervorgerufene Ethanolbildung zusammen mit der erhöhten Glycerinbildung auf einen eher fermentativen Stoffwechsel hinweist, muss nicht zwingend auf eine Aktivität der Atmungskette hindeuten. Neben der

Atmungskette existieren weitere Stoffwechselwege wie die Sterol- und Hämbiosynthese, die Sauerstoff verbrauchen (Rosenfeld und Beauvoit 2003).

Im Gegensatz zu dem Experiment mit *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1$  wurde in beiden Kultivierungen von *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1$  im Rahmen der Meßgenauigkeit kein Ethanolverbrauch nachgewiesen. Dies muss daher eine direkte Folge der zusätzlichen IDP1-Deletion und der weiteren Blockade der Isocitrat-Dehydrogenase-Aktivität sein. Der fermentative Stoffwechsel inklusive der reduzierten Succinatbildung und der fehlenden Oxidation von Ethanol zumindest zu Acetat weist darauf hin, dass durch die zusätzliche IDP1-Deletion zur IDH-Deletion nicht nur der Citratzyklus in dem Stamm blockiert ist, sondern als Folge auch weitere Einschränkungen des respirativen Stoffwechsels auftraten. Denn trotz einer kompletten Blockade des Citrat-Zyklus, sollte ohne Beschränkung der Respiration eine Umwandlung von Ethanol in Acetat möglich sein. Als zusammenwirkende Folge der vier Deletionen könnten aber auch andere Gene des respirativen Stoffwechsels wie beispielsweise der Atmungskette herabreguliert werden.

Ähnliche Effekte wurden in Hefestämmen mit anderen Deletionen im Citratzyklus beschrieben. Cimini *et al.* (2009) zeigten, dass bereits ein Hefestamm mit Deletion der Untereinheit *SDH3*, die die direkt in die Atmungskette eingebundene Cytochrom *c*-Untereinheit des SDH-Komplexes bildet, im Satzverfahren mit Glucose einen fermentativen Stoffwechsel zeigte. Cimini *et al.* (2009) wiesen per Transkriptomanalyse nach, dass zahlreiche andere Gene des respirativen Zentralstoffwechsels durch die *SDH3*-Deletion herabreguliert waren. Zudem führten die Deletion der Citrat-Synthase (beide Citratsynthase-Isoenzyme *CIT1* und *CIT2*) oder der Aconitase zu Stämmen, die nicht in der Lage sind respirativ zu wachsen und die glutamatauxotroph sind (Gangloff *et al.* 1990, Kim *et al.* 1986). Die Betrachtung der zellspezifischen Sauerstoffaufnahmeraten in Tabelle 8.2 zeigt, dass *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1$  bei Glutamatzugabe zumindest mit Glucose zu einem zu *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta idh1$  und  $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1$  vergleichbaren respirativen Stoffwechsel in der Lage ist. Glutamat kann die Blockade der Isocitrat-Dehydrogenase-Aktivität der Zellen teilweise kompensieren. Neben der direkten Verwendung von Glutamat für Biosyntheseprozesse kann durch den Abbau bis zu  $\alpha$ -Ketoglutarat ein NADH und beim Abbau bis zu Succinat 2 NADH und 1 ATP gewonnen werden.

Der Glutamatverbrauch war im Hoek-Medium mit  $0,029 \text{ g}_{\text{Glutamat}} \text{ g}_{\text{Glucose}}^{-1}$  bzw.  $0,34 \pm 0,01 \text{ g}_{\text{Glutamat}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1}$  höher als im WM8A-Medium. Dies zeigt, dass der Glutamatbedarf von *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1$  trotz vergleichbarer Wachstumsraten in beiden Medien keine konstante Größe ist, sondern auch von den Kultivierungsbedingungen wie beispielsweise der Medienzusammensetzung beeinflusst wird.

## 8.5 Zulaufkultivierungen mit verschiedenen Dosierraten

*S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ idh1 und *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ sdh1  $\Delta$ idh1  $\Delta$ idp1 wurden neben dem an den Satzversuch angeschlossenen Zulauf auch in je einem reinem Zulaufversuch mit erhöhter vorgelegter Biomassekonzentration im Hoek-Medium untersucht.

### Zulaufverfahren mit *S. cerevisiae* AH22ura3 $\Delta$ sdh2 $\Delta$ idh1

Wie Abbildung 8.7 zeigt, bildete *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ idh1 unter Zulaufbedingungen zunächst den C<sub>2</sub>-Körper Acetat. Nach den beiden Erhöhungen der Dosierrate änderte sich dies auf Ethanol als Hauptprodukt und die Zellen wuchsen leicht.

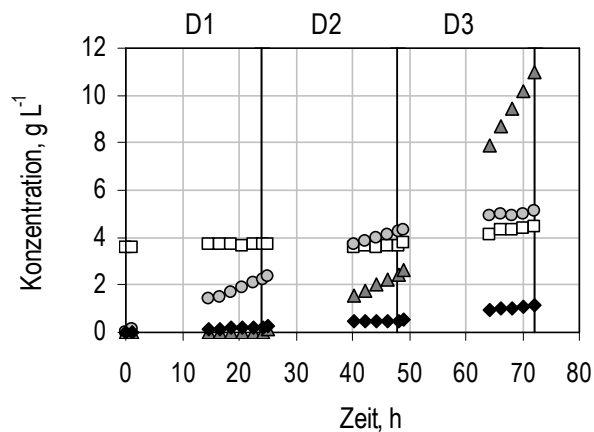


Abbildung 8.7: Einfluss verschiedener Dosierraten bei dem *S. cerevisiae* SDH-IDH-Deletionsstamm AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ idh1. Dargestellt ist der Verlauf der Biomasse- (□), Acetat- (○), Ethanol- (▲) und Succinatkonzentration (◆) in einer reinen Zulaufkultivierung im Hoek-Medium im Laborrührkessel ( $V_0 = 1$  L). Die im 24 h Abstand geänderten Dosierraten betragen  $0,16 \text{ g}_{\text{Glucose}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (D1),  $0,32 \text{ g}_{\text{Glucose}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (D2) und  $0,82 \text{ g}_{\text{Glucose}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (D3). Bei den dargestellten Ethanolkonzentrationen wurde die Verdunstung von Ethanol berücksichtigt.

Trotz des leichten Wachstums akkumulierte allerdings bereits nach 70 h Prozesszeit Glucose im Medium (Daten nicht gezeigt). Die Succinatkonzentration stieg während des Zulaufs kontinuierlich an, wobei die Ausbeuten von der Dosierrate abhingen. Tabelle 8.4 fasst die Ausbeuten zusammen und zeigt, dass die höchste Succinatausbeute mit  $0,07 \text{ mol}_{\text{Succinat}} \text{ mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$  bei der geringsten Dosierrate erzielt wurde.



Tabelle 8.4: Ausbeuten (mol mol<sup>-1</sup>) der Zulaufkultivierung vom *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ idh1 im definierten Hoek-Medium im Laborreaktor bei verschiedenen Dosieraten (g<sub>Glucose</sub> L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>).

Phase	Dosierate	Y <sub>Suc/S</sub>	Y <sub>Eth/S</sub>	Y <sub>Ace/S</sub>	Y <sub>CO2/S</sub>	Y <sub>O2/S</sub>	RQ
D1	0,16	0,07	0,0	1,4	2,2	2,8	0,8
D2	0,32	0,04	0,9	0,6	2,0	1,3	1,5
D3	0,82	0,03	1,0	0,1	1,7	0,9	1,9

### Zulaufverfahren mit *S. cerevisiae* AH22ura3 $\Delta$ sdh2 $\Delta$ sdh1 $\Delta$ idh1 $\Delta$ idp1

Im reinen Zulaufexperiment mit *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ sdh1  $\Delta$ idh1  $\Delta$ idp1 (Daten nicht gezeigt) wurde dem Hoek-Medium Glutamat im Überschuss zugesetzt und die Biomassekonzentration zu Versuchsbeginn betrug 2,8 g L<sup>-1</sup>. Nachdem in der im vorherigen Abschnitt beschriebenen Zulaufphase (Abbildung 8.5) bereits bei einer Zudosierung entsprechend einer zellspezifischen Glucoseaufnahme von 0,4 mmol g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> eine Ethanolbildung auftrat, wurde die Dosierate noch weiter abgesenkt. Bis 24 h betrug die Zudosierung 0,03 mmol g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> und wurde dann auf 0,06 mmol g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> erhöht. Bei beiden Dosieraten wuchsen die Zellen nicht, es war keine Bildung der organischen Säuren Succinat und Acetat nachzuweisen, sondern es wurden nur Ethanol als Hauptprodukt und geringe Konzentrationen an Glycerin nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

### Diskussion

Dass in der Zulaufkultivierung von *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ idh1 bei der Dosierate von 0,16 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> keine Ethanolbildung auftrat, zeigt, dass vollständig glucosedereprimierte Bedingungen vorlagen und Glucose vollständig zu oxidativen Produkten umgesetzt wurde. Bei Wildtypstämmen liegt der RQ unter Zulaufbedingungen durch die Glucoseveratmung und die Biomassebildung knapp über 1. Dagegen liegt bei *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ idh1 der RQ in der Phase D1 bedingt durch die starke Acetatbildung unter 1.

Die Succinatausbeute war unter vollständig glucosedereprimierten Bedingungen am höchsten, dennoch erfolge auch unter (durch die Ethanolbildung angezeigten) repressiveren Bedingungen eine weitere Succinatbildung mit abgesenkter Ausbeute. Auch für den SDH-IDH-Stamm zeigte sich der bereits bei den SDH-Stämmen beschriebene Effekt, dass die für die Zellen schädliche Acetatbildung prozesstechnisch nicht durch Zulaufbedingungen unterbunden werden kann.

Dass der Stamm *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ sdh1  $\Delta$ idh1  $\Delta$ idp1 selbst unter Zulaufbedingungen bei minimalen Dosieraten einen fermentativen Stoffwechsel aufweist, bestätigt dass durch die Blockade des Citrat-Zyklus auch der respirative Stoffwechsel blockiert wurde.

## 8.6 Satzverfahren mit Galactose als Kohlenstoffquelle

Wie bereits die *S. cerevisiae* SDH-Stämme wurden auch die *S. cerevisiae* SDH-IDH-(IDP)-Stämme im Satzversuch im WM8G-Medium mit Galactose und Glucose untersucht. Die Kultivierungen erfolgten aus Kapazitätsgründen erneut im Schüttelkolben.

Bei den in Abbildung 8.8 dargestellten Kultivierungen war bei den SDH-IDH-Stämmen nach 48 h  $50 \text{ g L}^{-1}$  Glucose bereits verbraucht. Der SDH-IDH-IDP-Stamm, der in diesem Versuch wie alle anderen Stämme aus einer stationären Kultur angeimpft worden war, wies eine Verzögerungsphase von 24 h auf und verbrauchte dann ebenfalls binnen der nächsten 48 h Glucose. Glutamat wurde von allen drei Deletionsstämmen nur parallel zur Glucose verstoffwechselt.

Die SDH-IDH-Deletionsstämme zeigten mit Glucose den typischen respiro-fermentativen Stoffwechsel und produzierten etwa  $1 \text{ g L}^{-1}$  Succinat. Die Unterschiede zwischen den Stämmen *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta idh1$  und  $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1$  bei der Kultivierung mit Glucose waren gering.

Beim SDH-IDH-IDP-Stamm war die Glycerinbildung aus Glucose im Vergleich zu den SDH- und SDH-IDH-Stämmen um etwa  $1 \text{ g L}^{-1}$  erhöht und die Succinatbildung war auf  $0,2 \text{ g L}^{-1}$  verringert. Da im Schüttelkolben keine Berücksichtigung der Ethanolverdunstung erfolgen konnte, kann die Verringerung der Ethanolkonzentration rein auf Verdunstung oder auf Verdunstung und Verbrauch zurückzuführen sein. Bei den SDH-IDH-Deletionsstämmen zeigte die Bildung von  $5,7 \text{ g L}^{-1}$  Acetat bei *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta idh1$  und  $5,8 \text{ g L}^{-1}$  Acetat bei *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1$ , dass Ethanol verstoffwechselt wurde. Bei Durchführung desselben Experiments mit Galactose als Kohlenstoffquelle zeigte sich bei beiden SDH-IDH-Stämmen ab der Messung bei 312 h ein Absinken des Galactose- und Glutamatverbrauchs. Bis zum Versuchsende nach 384 h wurden nur  $\sim 15 \text{ g L}^{-1}$  Galactose umgesetzt. Wie bei den beiden SDH-Deletionsstämmen wurde aus Galactose Biomasse, Ethanol, Acetat und Succinat gebildet. Es wurde eine Succinatendkonzentration von  $1,0 \text{ g L}^{-1}$  bei AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta idh1$  und von  $0,7 \text{ g L}^{-1}$  bei AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1$  erzielt. Beim Stamm *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1$  war binnen 16 Tage kein Verbrauch von Galactose messbar.

### Diskussion

Bei der Kultivierung der *S. cerevisiae* SDH-IDH-Stämme mit Glucose im WM8G-Medium war die Succinatendkonzentration bei den SDH-IDH-Stämmen gegenüber den reinen SDH-Stämmen abgesenkt. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Kultivierung im WM8G im Bioreaktorblock.

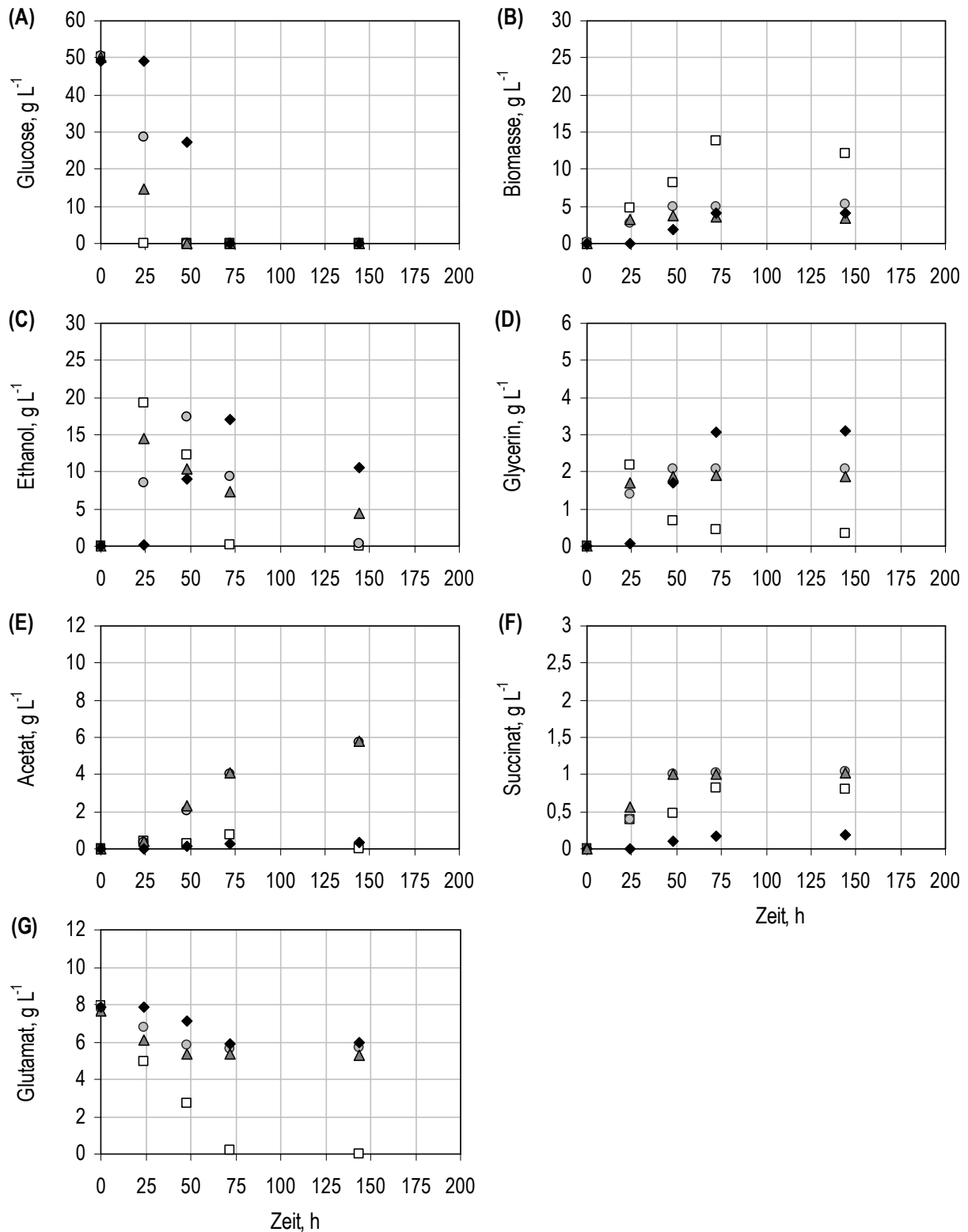


Abbildung 8.8: Satzkultivierung der *S. cerevisiae* SDH-IDH-(IDP-)Deletionsstämmen mit Glucose als Kohlenstoffquelle und Glutamat als Stickstoffquelle im Schüttelkolben ( $V_0 = 50$  mL). Die Kultivierungen des Wildtypstammes (□), AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ idh1 (○), AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ sdh1  $\Delta$ idh1 (△) und AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ sdh1  $\Delta$ idh1  $\Delta$ idp1 (◆) erfolgten im WM8G-Medium mit  $50 \text{ g L}^{-1}$  Glucose über 144 h.

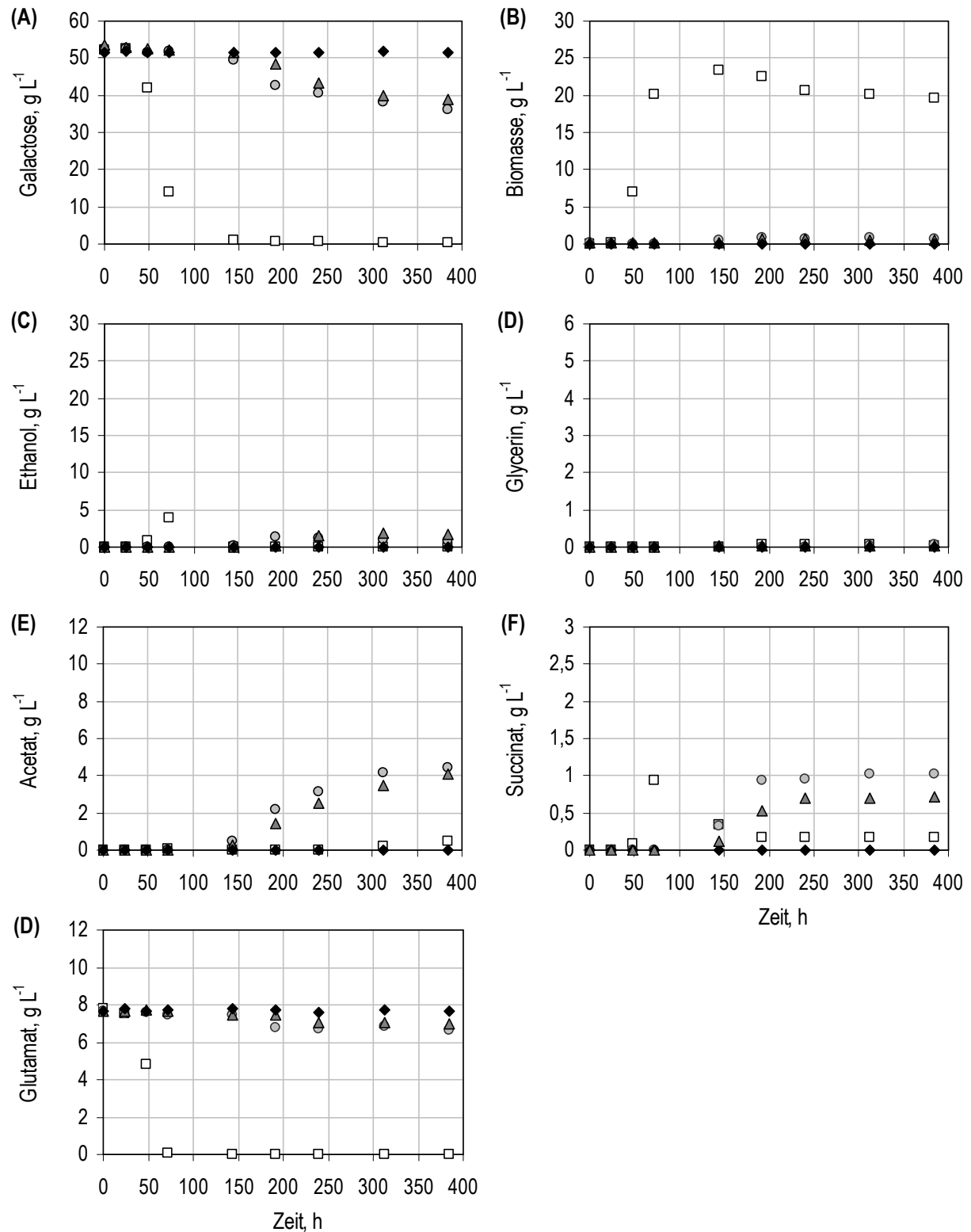


Abbildung 8.9: Satzkultivierung der *S. cerevisiae* SDH-IDH-(IDP-)Deletionsstämmen mit Galactose als Kohlenstoffquelle und Glutamat als Stickstoffquelle im Schüttelkolben ( $V_0 = 100 \text{ mL}$ ). Die Kultivierungen des Wildtypstammes (□), AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ idh1 (○), AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ sdh1  $\Delta$ idh1 (Δ) und AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ sdh1  $\Delta$ idh1  $\Delta$ idp1 (◆) erfolgten im WM8G-Medium mit  $50 \text{ g L}^{-1}$  Galactose über 384 h.

Wie in Abbildung 8.10 zusammengefasst, sinkt durch die zusätzliche IDH-Deletion in den SDH-Stämmen auch die integrale Succinatausbeute aus Glucose. Die Bildung der oxidierten Produkte Acetat und Succinat zeigte nochmals den respirativen Metabolismus der SDH-IDH-Stämme.

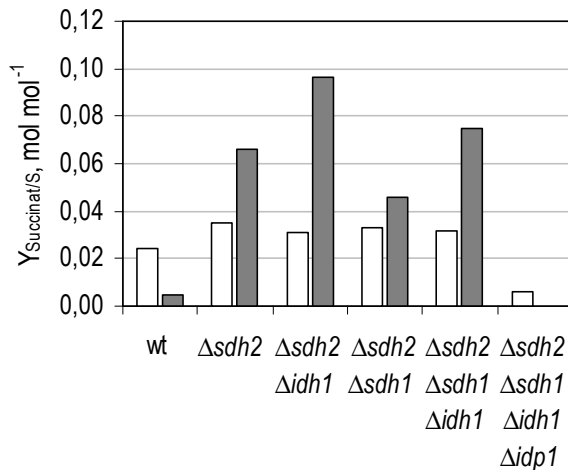


Abbildung 8.10: Integrale Succinatausbeuten der *S. cerevisiae* Deletionsstäme sowie des Wildtyps bezogen auf den Verbrauch von Glucose (□) oder Galactose (■) als Kohlenstoffquelle und Glutamat als Stickstoffquelle im Satzversuche im WM8G im Schüttelkolben.

Bei Verminderung der Glucoserepression durch Galactose konnten mit den SDH-IDH-Stämmen höhere Succinatausbeuten als mit den SDH-Stämmen erreicht werden. Zudem zeigten sich wie bei den SDH-Stämmen Unterschiede zwischen AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta idh1$ , mit der unvollständig deletierten SDH und dem Stamm AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1$  mit der vollständigen Deletion. Wieder führte eine unvollständig deletierte SDH zu einer höheren Succinatausbeute mit Galactose. Bereits bei den SDH-Stämmen hatten sich die leichten Unterschiede zwischen *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2$  gegenüber *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1$ , die sich bereits in der Kultivierungsphasen mit Ethanol angedeutet hatten, erst mit Galactose deutlicher gezeigt.

Allerdings wurde bei den SDH-IDH-Stämmen bis Versuchsende nur einen Bruchteil der eingesetzten Galactose verbraucht. Bereits die Bestimmung der Wachstumsraten der SDH-IDH-Deletionsstäme in Kultivierungen im WM8G mit Glucose im Bioreaktorblock (Abbildung 8.1) zeigte, dass selbst bei Verfügbarkeit von Glutamat das Wachstum verglichen mit den SDH-Stämmen reduziert ist. Auf dem "respirativeren" Substrat Galactose zeigten sich diese Effekte, deren Ursache in der weiteren Einschränkung der Energiegewinnung über den Citrat-Zyklus liegen muss, nun noch deutlicher.

Es überrascht, dass der Deletionsstamm *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *sdh1*  $\Delta$ *idh1*  $\Delta$ *idp1* keinen Galactoseverbrauch zeigt, da Galactose von *S. cerevisiae* sowohl respirativ als auch fermentativ verwertet werden kann (Fukuhara 2003). Da *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *sdh1*  $\Delta$ *idh1*  $\Delta$ *idp1* Glucose fermentativ verwertet, wurde dies auch für Galactose erwartet. Allerdings beschreibt eine Publikation von van den Brink *et al.* (2009), dass energetische Limitierungen bei *S. cerevisiae* bei der Umstellung von Glucose auf Galactose auftreten können. In den bei van den Brink *et al.* (2009) beschriebenen Experimenten wurden die Wildtyphefen im Chemostat anaerob mit Glucose kultiviert und direkt nach der Unterbrechung der Glucosezufuhr Galactose zugesetzt. Unter diesen Bedingungen konnten sich die Zellen nicht von Glucose mit Galactose umstellen und die Autoren wiesen nach, dass den Zellen nicht genug Energie in Form von ATP zur Verfügung stand, um die Enzyme für den Galactoseabbau zu exprimieren.

Zudem können auch einige respirationsdefiziente Stämme generell nicht mit Galactose wachsen (Bien *et al.* 1978).

## 8.7 Bestimmung intrazellulärer Metabolite aus dem Energiestoffwechsel

Als ergänzende und abschließende Untersuchung zu den Effekten der Deletionen im Zentralstoffwechsel von *S. cerevisiae* wurden der Energy Charge (EC) und das NADH/NAD<sup>+</sup>-Verhältnis als zwei Kenngrößen des Energiestoffwechsels bestimmt. Der Energy Charge (EC), der aus den Konzentrationen der Adenosinphosphate AMP, ADP und ATP berechnet wird, ist ein Maß für den energetischen Zustand einer Zelle. Das NADH/NAD<sup>+</sup>-Verhältnis wurde bestimmt, da NAD(H) das dominierende Reduktionsäquivalent des Katabolismus darstellt und bei *S. cerevisiae* das intrazelluläre Redoxpotential hauptsächlich durch dieses Verhältnis bestimmt wird.

Es erfolgte eine vergleichende Untersuchung von *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *sdh1*  $\Delta$ *idh1*  $\Delta$ *idp1*, AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *sdh1* und dem Wildtyp als Referenz, wobei im Satzverfahren im definierten YNB-Medium (Daten nicht gezeigt) jeweils der Zustand der Zellen mit Glucose (mittleres exponentielles Wachstum) und anschließend mit Ethanol betrachtet wurde. Generell erfolgte die zweite Probennahme etwa 3 h nach Beginn des Ethanolverbrauchs, welcher anhand der CO<sub>2</sub>- und O<sub>2</sub>-Onlinedaten bestimmt wurde. Da *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *sdh1*  $\Delta$ *idh1*  $\Delta$ *idp1* kein Ethanol verbraucht, erfolgte die zweite Probennahme 12 h nach Verbrauch der eingesetzten Glucose. Bei der Kultivierung von AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *sdh1*  $\Delta$ *idh1*  $\Delta$ *idp1* wurde zur besseren Vergleichbarkeit kein Glutamat zugesetzt. Auch ohne Glutamatzugabe ist ein (geringes) Wachstum dieses Stammes möglich ist (siehe Kapitel 8.4).

Abbildung 8.11 zeigt EC und NADH/NAD<sup>+</sup>-Verhältnis des Wildtyps und der Deletionsstämme. Auf Glucose unterscheiden sich der EC des Wildtyps und EC der beiden Deletionsstämme nicht signifikant. Beim Verbrauch von Ethanol als Substrat kann beim Wildtyp und bei *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *sdh1* eine leichte, nicht signifikante Absenkung des EC beobachtet werden. Bei AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *sdh1*  $\Delta$ *idh1*  $\Delta$ *idp1* lag der EC bei 0, da weder ATP noch ADP nachgewiesen werden konnte. Zwischen AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *sdh1* und dem Wildtyp ergaben sich auf den beiden Substraten Glucose und Ethanol auch keine signifikanten Unterschiede im NADH/NAD<sup>+</sup>-Verhältnis. Im Gegensatz zum EC unterschied sich das NADH/NAD<sup>+</sup>-Verhältnis von AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *sdh1*  $\Delta$ *idh1*  $\Delta$ *idp1* bereits mit Glucose vom Wildtyp und war gegenüber diesem abgesenkt. Mit Ethanol als Substrat war das NADH/NAD<sup>+</sup>-Verhältnis bei allen drei Stämmen geringer als mit Glucose. Bei AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *sdh1*  $\Delta$ *idh1*  $\Delta$ *idp1* war kein NADH mehr nachweisbar, weshalb das Verhältnis den Wert 0 annahm.

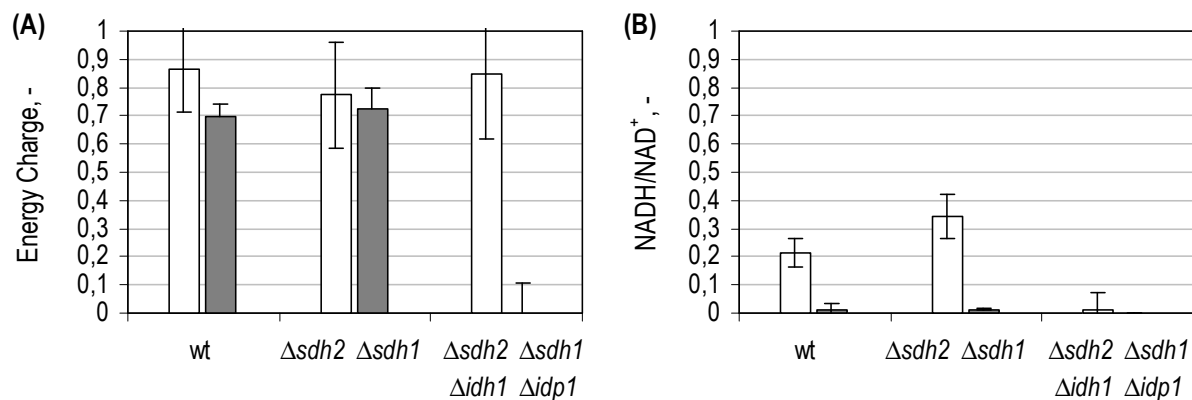


Abbildung 8.11: Bestimmung von Energy Charge und NADH/NAD<sup>+</sup> verschiedener *S. cerevisiae* Stämme im Satzverfahren mit Glucose (□) oder Ethanol (■) als Kohlenstoffquelle im definierten YNB-Medium mit 50 g L<sup>-1</sup> Glucose im Laborreaktor (V<sub>0</sub> = 1,0 L).

## Diskussion

Für Wildtyphefen wird für Kultivierungen mit Glucose als Substrat ein EC zwischen 0,75 und 0,90 angegeben (Ball und Atkinson 1975). Beim Verbrauch von Ethanol sinkt der EC laut Ball und Atkinson (1975) leicht ab. Auch das Verhältnis von NADH/NAD<sup>+</sup> sinkt mit Ethanol im Vergleich zu Glucose, da mit Ethanol der oxidative Stoffwechsel stärker ausgeprägt ist und NADH über die dereprimierte Atmungskette schnell oxidiert wird (Hou *et al.* 2009, Minard und McAlister-Henn 2009). Dies deckt sich gut mit den hier erzielten Ergebnissen des Wildtyps. Dass sich der EC der *S. cerevisiae* Deletionsstämme mit Glucose nicht signifikant von dem des Wildtyps unterscheidet, kann auf den Crabtree-Effekt zurückgeführt werden. Aufgrund dieses Effekt wird in allen drei Stämmen die Glucose primär über die alkoholische Gärung abgebaut. Die in den Deletionsstämmen blockierten Citrat-Zyklus-Enzyme IDH und

SDH sind unter Satzbedingungen mit Glucose auch im Wildtyp deutlich reprimiert. Nur die IDP1 unterliegt keiner Glucoserepression. Deren Verlust kann jedoch in *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1$  von der IDP2 kompensiert werden, welche als Folge der IDH-Deletion dereguliert ist. Allerdings sind die IDP-Isoenzyme NADP<sup>+</sup>-abhängig und können damit im Gegensatz zur IDH nicht zur Energiegewinnung der Zelle beitragen. Bei AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1$  lag das NADH/NAD<sup>+</sup>-Verhältnis daher bereits mit Glucose um Faktor 21 unter dem des Wildtyp und bei der zweiten Probe in der Ethanolphase war kein NADH mehr nachweisbar. Minard und McAlister-Henn (2009) zeigten einen vergleichbaren Effekt für einen reinen IDH-Deletionsstamm bei der Änderung der Kohlenstoffquelle von Glucose nach Acetat. Dieser IDH-Deletionsstamm verbrauchte Acetat nicht in messbarem Ausmaß, jedoch fiel das NADH/NAD<sup>+</sup>-Verhältnis nach Umstellung auf Acetat auf über 1/150 ab (Minard und McAlister-Henn 2009). Dieser reine IDH-Stamm hatte mit Glucose durch Nutzung der NADP<sup>+</sup>-abhängigen Isocitrat-Dehydrogenasen die Möglichkeit Acetyl-CoA vollständig zu veratmen. Dies ist bei AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1$  nicht mehr der Fall. Dieser Stamm könnte lediglich durch Umsetzung von  $\alpha$ -Ketoglutarat, welches über die IDP2 gewonnen wird, zu Succinyl-CoA NADH über den Citrat-Zyklus gewinnen. Wahrscheinlich wird  $\alpha$ -Ketoglutarat aber vor allem für die Aminosäurebiosynthese über Glutamat verwendet.

Bei *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1$  wirkte sich die Blockade der SDH, selbst wenn sich der Stoffwechsel auf Ethanol als Substrat umstellt, so dass die Enzyme aus Glyoxylat-Zyklus und Citrat-Zyklus induziert wurden, nicht auf den EC aus. AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1$  kann, wie bereits ausführlich diskutiert, über die Acetatbildung aus Ethanol Reduktionsäquivalente für die Energiegewinnung über die oxidative Phosphorylierung gewinnen und auch leicht mit Ethanol wachsen, bis die gebildete Acetatkonzentration toxisch wird und die Ethanolaufnahme dadurch stagniert. Bei AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1$  lagen zum Zeitpunkt der Probenahme nur circa 2,5 g L<sup>-1</sup> Acetat im Medium vor, sodass die Zellen kaum inhibiert wurden. Die EC-Daten und das im Vergleich zu Glucose nicht geänderte NADH/NAD<sup>+</sup>-Verhältnis mit Ethanol zeigen, dass für den SDH-Stamm der Energiegewinn über die Acetatbildung ausreicht, um das Redox-Verhältnis und Energy Charge des Wildtyps aufrecht zu erhalten und der respiratorische Stoffwechsel durch die SDH-Deletion nicht negativ beeinflusst wird.

Ball und Atkinson (1975) beschreiben, dass sich der EC bei der Lagerung von Wildtyphefen binnen der ersten 18 h nicht ändert und dann binnen 7 Tagen auf 0,03 abfällt, wobei noch über 60 % der Zellen lebensfähig waren. Im Gegensatz dazu war der EC bei AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1$  bereits nach 12 h auf 0 abgefallen. Denkbar ist, dass der Stamm versucht seinen Stoffwechsel auf Ethanol umzustellen, dazu jedoch energetisch nicht mehr in der Lage ist, hierbei aber das ATP verbraucht (vergleiche van den Brink *et al.* 2009).



Bezüglich des NADH/NAD<sup>+</sup>-Verhältnis ist zu beachten, dass dieses beim Wildtyp höher als die Literatur angegebenen Werte von 0,02 bis 0,1 lag (Vemuri *et al.* 2007, Hou *et al.* 2009). Diese Abweichung kann beispielsweise aus einem unterschiedlichen Zerfall von NAD<sup>+</sup> und NADH während der Probenaufarbeitung (Quenchschritt, Zentrifugieren, Resuspendieren) vor Zugabe des internen Standards resultieren. Da an dieser Stelle jedoch die relativen Unterschiede zwischen den Stämme im Vordergrund standen und nicht die Optimierung der Methodik, wurde dies nicht näher untersucht.

## 8.8 Fazit zur parallelen Deletion der Succinat-Dehydrogenase und der Isocitrat-Dehydrogenase(n)

In diesem Kapitel wurden Stämme betrachtet, in denen ergänzend zur SDH-Deletion auch die Isocitrat-Dehydrogenase-Aktivität der Zellen vermindert oder blockiert wurde, um Isocitrat als Substrat des Glyoxylat-Bypass bereitzustellen. Bei den Stämmen *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta idh1$  und *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1$  zeigte sich die zusätzliche Deletion in einer Verminderung der Wachstumsrate. Im Zulaufverfahren zeigten die beiden SDH-IDH-Deletionsstämme die bereits für die SDH-Deletionsstämme beobachtete Acetatbildung, aber auch eine Erhöhung der Succinatausbeute gegenüber den SDH-Stämmen. Die SDH-IDH-Stämme besaßen trotz einer Blockade im Citrat-Zyklus einen respiratorischen Stoffwechsel wie durch den Nachweis oxidierter Produkte und der vorhandene Sauerstoffaufnahme gezeigt wurde. Welcher der SDH-IDH-Deletionsstämme bessere Succinatausbeuten lieferte, hing stark von den Kultivierungsbedingungen ab.

Die Glutamatauxotrophie von *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1$  zeigt, dass die Deletion der Enzyme *IDH* und *IDP1* zu einem Verlust der Isocitrat-Dehydrogenase-Aktivität führt und somit ein Kohlenstofffluss durch den Citratzyklus verhindert wird. Allerdings war auch die Fähigkeit zu einem respirativen Stoffwechsel in diesem Stamm eingeschränkt.

## 9 Charakterisierung von *S. cerevisiae* Deletionsstämmen mit Überexpression von Enzymen des Glyoxylat-Zyklus

Im Rahmen des Konzepts zur oxidative Succinatbildung aus Glucose soll der Glyoxylat-Zyklus genutzt werden. Dieser ist in Anwesenheit von Glucose reprimiert (DeRisi *et al.* 1997, Gancedo 1998). Die in den vorangegangenen Kapiteln dargestellte Charakterisierung der Deletionsstämmen zeigte, dass bereits mit diesen eine erhöhte Succinatbildung erzielt werden kann. Es zeigte sich allerdings auch ein starker Kohlenstoffabfluss zu C<sub>2</sub>-Körpern, der nicht prozesstechnisch in den Glyoxylat-Zyklus umgelenkt werden konnte.

Somit muss eine gentechnische Deregulation des Glyoxylat-Zyklus erfolgen. Als Kandidaten zur Deregulation wurden v.a. die beiden Enzyme Isocitrat-Lyase, *ICL1*, und Malat-Synthase, *MLS1*, die den Glyoxylat-Bypass bilden und zu denen keine Isoenzyme im Citrat-Zyklus existieren, angesehen. Hinzu kam ein Isoenzym der Acetyl-CoA-Synthetase (*ACS1*), dessen Überexpression die Bereitstellung von cytosolisches Acetyl-CoA für den Glyoxylat-Zyklus fördern soll.

### 9.1 Überexpression im SDH-IDH-IDP-Deletionsstamm

Basierend auf dem Stamm mit Deletion beider SDH-Untereinheiten und der zwei Isocitrat-Dehydrogenasen, *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *sdh1*  $\Delta$ *idh1*  $\Delta$ *idp1*, stand je ein Stamm mit Überexpression der *ACS1* und der homologen Bypass-Enzyme oder der heterologen Bypass-Enzyme aus *Kluveromyces lactis* zur Verfügung:

- *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *sdh1*  $\Delta$ *idh1*  $\Delta$ *idp1* pFlat1-*ICL1* pFlat2-*MLS1* pFlat3-*ACS1*
- *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *sdh1*  $\Delta$ *idh1*  $\Delta$ *idp1* pFlat1-*ACS1* pFlat2-*KIICL1* pFlat3-*KIMLS1*

#### 9.1.1 Satzverfahren

Auf Grund der Glutamatauxotrophie des Grundstammes, AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *sdh1*  $\Delta$ *idh1*  $\Delta$ *idp1*, wurde neben den üblichen im Bioreaktorblock eingesetzten Medien auch WM8A-Medium mit Zusatz von 2 g L<sup>-1</sup> Glutamat verwendet. Unter allen betrachteten Bedingungen unterschied sich die Succinatbildung der beiden Stämme mit Überexpressionen nicht signifikant vom reinen Deletionsstamm (Abbildung 9.1).

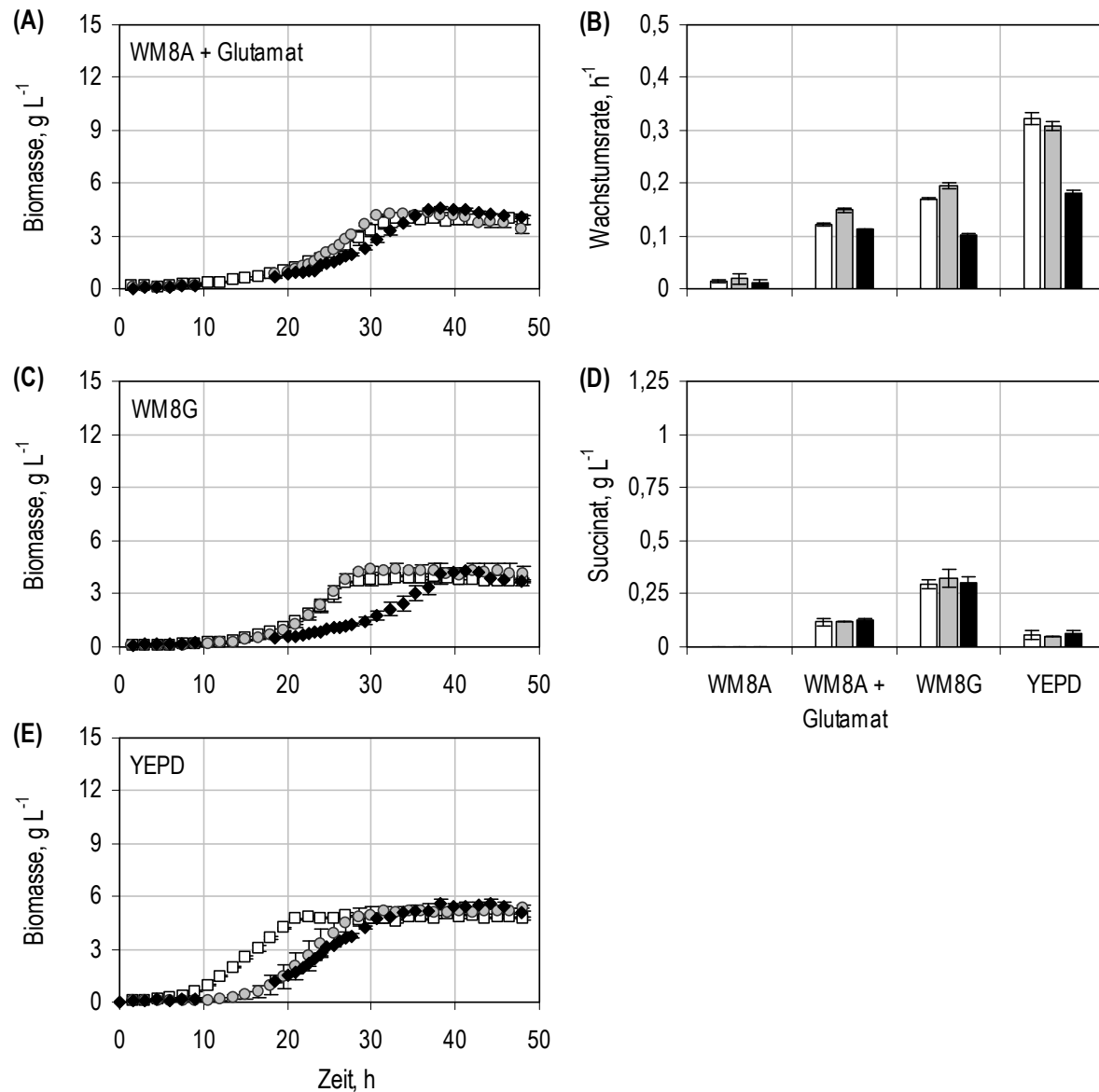


Abbildung 9.1: Charakterisierung der *S. cerevisiae* SDH-IDH-IDP-Deletionsstämmen mit Überexpressionen im Glyoxylat-Zyklus durch Satzversuche mit Glucose als Kohlenstoffquelle im Bioreaktorblock ( $V_0 = 12$  mL,  $n = 3$ ). A, C und E: Wachstumskurven des Referenzstammes AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ sdh1  $\Delta$ idh1  $\Delta$ idp1 (□), AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ sdh1  $\Delta$ idh1  $\Delta$ idp1 ICL1 MLS1 ACS1 (○) und AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ sdh1  $\Delta$ idh1  $\Delta$ idp1 KIICL1 KIMLS1 ACS1 (◆) beispielhaft gezeigt für drei der vier untersuchten Medien. B und D: Wachstumsrate mit Glucose und erzielte Succinatendkonzentration von AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ sdh1  $\Delta$ idh1  $\Delta$ idp1 (□), AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ sdh1  $\Delta$ idh1  $\Delta$ idp1 ICL1 MLS1 ACS1 (○) und AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ sdh1  $\Delta$ idh1  $\Delta$ idp1 KIICL1 KIMLS1 ACS1 (◆). Die Unterbrechungen in den Wachstumskurven wurden durch technische Probleme verursacht.

Dagegen zeigte sich eine Auswirkung der Überexpressionen auf die Wachstumsrate mit Glucose. Der Stamm *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ sdh1  $\Delta$ idh1  $\Delta$ idp1 ICL1 MLS1 ACS1 besaß in den definierten Medien eine höhere Wachstumsrate als der Deletionsstamm. Bei *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ sdh1  $\Delta$ idh1  $\Delta$ idp1 KIICL1 KIMLS1 ACS1 war die

Wachstumsrate in allen vier Medien geringer als beim Deletionsstamm. Wie bereits *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ sdh1  $\Delta$ idh1  $\Delta$ idp1 wiesen auch die beiden Stämme mit Überexpressionen im Komplexmedium nur eine kurze exponentielle Wachstumsphase auf, anschließend war die Zunahme der Biomasse nur noch linear.

### Diskussion

Das Konzept zur aeroben Succinatherstellung mit *S. cerevisiae* sah nach der Blockade des Citrat-Zyklus auf Höhe von Isocitrat durch Deletion der beiden Isocitrat-Dehydrogenasen eine Umlenkung des Kohlenstoffflusses durch Überexpression des Glyoxylat-Bypasses und ACS1 vor. Dass bei der Kultivierung der beiden Deletionsstämmen mit Überexpressionen keine erhöhte Succinatbildung auftrat, legt nahe, dass der Kohlenstoff auch in diesen Stämmen nicht in nennenswertem Ausmaß durch den Glyoxylat-Zyklus floss. Ein deutlicher Kohlenstofffluß über den Glyoxylat-Bypass oder zumindest die ICL-Reaktion müsste sich in diesem Stamm in einer höheren Succinatbildung äußern, da Succinat das direkte Produkt der überexprimierten ICL ist und die SDH blockiert ist. Bezüglich der Succinatbildung zeigte bereits die Charakterisierung des *S. cerevisiae* SDH-IDH-IDP-Stammes eine starke Einschränkung des respirativen Stoffwechsels und eine daraus folgende verminderte Succinatbildung. Durch die untersuchten heterologen oder homologen Überexpressionen konnte diese nicht aufgehoben werden.

Das Wachstumsverhalten weist auf unterschiedliche Effekte der homologen und heterologen Überexpressionen der ICL und MLS hin. Obwohl die homologe *ICL1* einer Katabolitinaktivierung in Gegenwart von Glucose unterliegt (Ordiz *et al.* 1995) und somit die Zelle durch die ständige Bildung und den gleichzeitigen Abbau der homologen *ICL1* gestresst werden könnte, wächst AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ sdh1  $\Delta$ idh1  $\Delta$ idp1 *ICL1* *MLS1* *ACS1* schneller als AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ sdh1  $\Delta$ idh1  $\Delta$ idp1 *KIICL1* *KIMLS1* *ACS1*, obwohl die *KIICL1* keiner Katabolitrepression unterliegt (Lodi *et al.* 2001).

Die Absenkungen der Wachstumsrate in Stämmen mit Überexpressionen kann generell eine Folge der verstärkten Proteinsynthese sein. Dies wird als "metabolic burden" oder "protein burden" bezeichnet (Görgens *et al.* 2001). Für *S. cerevisiae* wurde unter anderem eine Reduzierung der maximalen spezifischen Wachstumsrate, der Biomasseausbeute, der Atmungskapazität, des Flusses durch die Glycolyse und eine Erhöhung des Erhaltungsstoffwechsels als nicht spezifischer Folge der heterologen Proteinexpression beschrieben.

Durch die episomalen pFlat-Plasmide und den verwendeten ADH-Promotor erfolgt allerdings keine so massive Proteinüberexpression wie im allgemeinen zur heterologen Proteinproduktion verwendet, wobei das genau Expressionslevel der pFlat-Plasmide nicht bekannt ist. Dennoch kann auch eine niedrige zusätzliche Proteinexpression eine Beeinträchtigung in dem in seinem Stoffwechsel und der Energiegewinnung bereits stark

eingeschränkten *S. cerevisiae* SDH-IDH-IDP-Stamm hervorrufen und dies kann die Wachstumsratenabsenkung von AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1$  *KIICL1 KIMLS1 ACS1* erklären. Die Wachstumsverbesserung von AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1$  *ICL1 MLS1 ACS1* gegenüber dem Deletionsstamm muss hingegen eindeutig auf positive Effekte der überexprimierten Enzyme zurückzuführen sein.

### 9.1.2 Satz- und Zulaufverfahren

Die beiden SDH-IDH-IDP-Stämme mit Überexpressionen wurden auch noch detaillierter im Satzverfahren mit anschließender Zulaufphase betrachtet und mit *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1$  verglichen. Verwendet wurde das Hoek-Medium mit Glucose und Zusatz von 2 g L<sup>-1</sup> Glutamat. Bei Zulaufbeginn wurde nochmals Glutamat zugesetzt, sodass dieses während der gesamten Kultivierung im Überschuss vorlag (Daten nicht gezeigt). Wie *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1$  zeigten die Stämme mit Überexpressionen beim Verbrauch von Glucose in der Satz- und Zulaufphase einen geringen Verbrauch an Sauerstoff (Tabelle 9.1) und verbrauchten das gebildete Ethanol nicht.

Tabelle 9.1: Ausbeuten (mol mol<sup>-1</sup>) im definierten Hoek-Medium mit Glutamatzugabe im Laborreaktor bei der Evaluierung der *S. cerevisiae* SDH-IDH-IDP-Deletionsstämmen mit Überexpressionen. Die Ausbeuten wurden nur mit Glucose bezogen, da es in der Literatur üblich ist auf Grund von Auxotrophien benötigte essentielle Substanzen zu vernachlässigen.

$\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1$	Phase	Substrat	$Y_{X/S}$	$Y_{Gl/S}$	$Y_{Suc/S}$	$Y_{Eth/S}$	$Y_{Gly/S}$	$Y_{Ace/S}$	$Y_{CO2/S}$	$Y_{O2/S}$
-	Satz	Glucose	0,2	-0,04	0,01	1,7	0,2	0,0	1,7	0,2
<i>ICL1, MLS1, ACS1</i>	Satz	Glucose	0,2	-0,05	0,01	1,7	0,2	0,0	1,5	0,3
<i>KIICL, KIMLS1, ACS1</i>	Satz	Glucose	0,2	-0,04	0,01	1,6	0,2	0,0	1,6	0,2
-	Satz	Ethanol	kein Verbrauch von							
<i>ICL1, MLS1, ACS1</i>	Satz	Ethanol	Ethanol oder Glutamat							
<i>KIICL, KIMLS1, ACS1</i>	Satz	Ethanol	nachweisbar							
-	Zulauf	Glucose	0,1	-0,03	0,01	1,6	0,1	0,0	1,6	n.a.*
<i>ICL1, MLS1, ACS1</i>	Zulauf	Glucose	0,1	-0,04	0,01	1,7	0,1	0,0	1,5	n.a.*
<i>KIICL, KIMLS1, ACS1</i>	Zulauf	Glucose	0,1	-0,02	0,01	1,6	0,1	0,0	1,4	n.a.*

\* n.a.: nicht ausgewertet. Es war eine Sauerstoffaufnahme messbar, jedoch lagen die Änderungen an der Meßgrenze des Sauerstoffsensors, wodurch die Ausbeuten stark verfälscht werden können.

Die Wachstumsrate von *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ sdh1  $\Delta$ idh1  $\Delta$ idp1 KIICL1 KIMLS1 ACS1 war mit  $0,13 \text{ h}^{-1}$  leicht abgesenkt gegenüber dem reinen Deletionsstamm ( $0,14 \text{ h}^{-1}$ ), während *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ sdh1  $\Delta$ idh1  $\Delta$ idp1 KIICL1 KIMLS1 ACS1 auch im Hoek-Medium mit  $0,20 \text{ h}^{-1}$  schneller als der Deletionsstamm ohne die Überexpressionen wuchs.

Wie in den Satzexperimenten im Bioreaktorblock lagen die Succinatkonzentrationen bei beiden Überexpressionsstämmen am Ende der Satzphase nach 48 h unter  $0,3 \text{ g L}^{-1}$  (Daten nicht gezeigt). In der Zulaufphase wurde, wie Abbildung 8.5 für AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ sdh1  $\Delta$ idh1  $\Delta$ idp1 zeigt, auch mit den beiden Stämmen mit Überexpressionen eine kontinuierliche Succinatbildung erzielt, allerdings betrug die Succinatausbeute trotz Zulaufbedingungen und dem Zusatz von Glutamat nur  $0,01 \text{ mol}_{\text{Succinat}} \text{ mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$ . In der Zulaufphase wurde zudem Biomasse und die reduzierten Produkte Ethanol und Glycerin gebildet.

## Diskussion

Auch durch die Kultivierungen im Laborreaktor bestätigten sich die Effekte aus den Satzkultivierungen im Bioreaktorblock bezüglich Wachstum und Succinatbildung der *S. cerevisiae* SDH-IDH-IDP-Stämme mit Überexpressionen. Die Überexpressionen hatten keinen positiven Effekt auf die Succinatbildung um Zulauf. Selbst unter Zulaufbedingungen und mit Glutamatzugabe im Medium zeigte sich ein fermentativer Stoffwechsel und die Stämme sind damit nicht zur Succinatbildung geeignet. Auf Grund der Wachstumsvorteile sind die homologen Überexpressionen gegenüber den Enzymen aus *K. lactis* zu bevorzugen.

### 9.1.3 Fazit zu den SDH-IDH-IDP-Stämmen mit Überexpressionen

Die Charakterisierung von *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ sdh1  $\Delta$ idh1  $\Delta$ idp1 ICL1 MLS1 ACS1 und *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ sdh1  $\Delta$ idh1  $\Delta$ idp1 KIICL1 KIMLS1 ACS1 zeigte, dass diese Stämme auf Grund des stark fermentativen Stoffwechsels nicht zur Succinatproduktion eingesetzt werden können. Um den fermentativen Stoffwechsel zu umgehen, sollten Stämme mit weniger Deletionen als Basis für die Überexpressionen genutzt werden.

Es bietet sich an, die homologen Überexpression in den SDH-IDH-Deletionsstämmen zu untersuchen, da diese einen respiratorischen Stoffwechsel aufweisen. Auch die höchsten Succinatausbeuten aller Deletionsstämmen unter Zulaufbedingungen wurden mit den SDH-IDH-Deletionsstämmen erzielt. Bereits bei einer IDH-Deletion kommt es zu einer erhöhten intrazellulären Isocitratkonzentration (Contreras-Shannon *et al.* 2005), sodass mehr Substrat für die ICL zur Verfügung steht.

In den SDH-IDH-Stämmen stehen zwei Routen zur Succinatproduktion, nämlich über den Glyoxylat-Zyklus und den Citrat-Zyklus zur Verfügung. Dies kann sich wie an Hand der folgenden beiden Literaturstellen dargestellt sogar vorteilhaft auf die Succinatbildung auswirken.

So wurde in einer kürzlich veröffentlichten Publikation von Otero (2009) der von Patil *et al.* (2005) vorhergesagte *S. cerevisiae* Stammes  $\Delta sdh3 \Delta ser3 \Delta ser33$ , der zur Succinatbildung den oxidativen Zweig des Citrat-Zyklus und die von der ICL katalysierte Reaktion des Glyoxylat-Zyklus nutzen soll, konstruiert und mit diesem Stamm eine Succinatausbeute von  $0,03 \text{ mol}_{\text{Succinat}} \text{ mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$  erzielt. Der Stamm  $\Delta sdh3 \Delta ser3 \Delta ser33$  war auxotroph für Glycin, es konnte aber eine prototroph Mutante durch gerichtete Evolution (wiederholte Satzkultivierungen im Schüttelkolben mit schrittweise abgesenkter Glycinkonzentration) erzeugt werden. Durch die Überexpression von *ICL1* in der prototrophen Mutante wurde die Succinatausbeute auf  $0,07 \text{ mol}_{\text{Succinat}} \text{ mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$  gesteigert. Stämme mit Überexpression des gesamten Glyoxylat-Bypasses wurden bei Otero (2009) nicht untersucht.

Lin *et al.* 2005d verglichen einen rekombinanten *E. coli* mit beiden Routen zur Succinatbildung (siehe Abbildung 3.8B) mit einem Stamm, der vor ansonsten identischen Hintergrund zusätzlich eine Blockade der Isocitrat-Dehydrogenase-Aktivität besaß und ausschließlich den Glyoxylat-Zyklus nutzen konnte. Mit beiden Stämmen wurden vergleichbare Succinatausbeuten erzielt. Jedoch besaß der Stamm ohne Isocitrat-Dehydrogenase-Deletion höhere Glucoseaufnahmeraten und dadurch auch höhere Succinatproduktivitäten. Zu beachten ist, dass bei *E. coli* durch Deletion das Repressorgens *iclR* des Glyoxylat-Operons auch das regulatorischen Enzym Isocitrat-Dehydrogenase-Kinase/Phosphatase (*AceK*) exprimiert ist, das die Isocitrat-Dehydrogenase durch eine Phosphorylierung reversibel inaktivieren kann, um den Fluss zwischen Citrat- und Glyoxylat-Zyklus zu steuern ((LaPorte 1993, Chung *et al.* 1988). Somit ist in den *E. coli* Stämmen mit aktivierten Glyoxylat-Zyklus wahrscheinlich auch ohne IDH-Deletion die IDH-Aktivität zumindest vermindert.

## 9.2 Überexpression in den SDH-IDH-Deletionsstämmen

Da bei den *S. cerevisiae* SDH-IDH-Deletionsstämmen abhängig von den Versuchsbedingungen mit AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* oder AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *sdh1*  $\Delta$ *idh1* bessere Succinatausbeuten erzielt wurden, sind beide Deletionsstämme sinnvolle Plattformen für die Überexpression der Enzyme des Glyoxylat-Bypasses. Zunächst wurde AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* verwendet und schrittweise durch die ORGANOBALANCE GmbH ein Stamm mit bis zu drei Überexpressionen (*ICL1*, *MLS1* und *ACS1*) aufgebaut. Es standen folgende Stämme zur Verfügung:

- *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* pFlat3-*ACS1*
- *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* pFlat1-*ICL1* pFlat3
- *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* pFlat1-*ICL1* pFlat2-*MLS1* pFlat3
- *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* pFlat1-*ICL1* pFlat2-*ACS1* pFlat3
- *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* pFlat1-*ICL1* pFlat2-*MLS1* pFlat3-*ACS1*
- *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* pFlat1-*AceA* pFlat2-*MLS1* pFlat3-*ACS1*

In *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* pFlat1-*AceA* pFlat2-*MLS1* pFlat3-*ACS1* ist die Isocitrat-Lyase aus *E. coli* (*AceA*) überexprimiert, die keiner Glucosekatabolitinaktivierung unterliegt.

### 9.2.1 Bestimmung der Isocitrat-Lyase-Aktivität

Die *ICL1* stellt das Schlüsselenzym zur Succinatbildung aus Glucose über den Glyoxylat-Zyklus dar. Dieses Enzym unterliegt in *S. cerevisiae* nicht nur einer durch die Überexpression aufhebbarer Glucoserepression, sondern auch einer Regulation auf Proteinebene. Diese führt in Gegenwart von Glucose zunächst zu einer reversiblen Phosphorylierung gefolgt von einer proteolytischen Inaktivierung des Enzyms (Ordiz *et al.* 1995). Da eine Überexpression der *ICL1* somit nicht zwingend zu einem aktiven Enzym führen muss, wurde die ICL-Aktivität in ausgewählten *S. cerevisiae* SDH-IDH-Stämmen bestimmt. Eine erste Messung zeigte für den Wildtyp und den Deletionsstamm AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1*, dass nur eine minimale ICL-Aktivität von etwa 0,001 U g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> mit Glucose als Substrat nachweisbar war und ein deutlicher Anstieg der ICL-Aktivität erfolgte, sobald die Zellen Ethanol nutzten (Abbildung 9.2). Dies deckt sich mit der in der Literatur für *S. cerevisiae* beschriebenen strengen Repression der ICL durch Glucose sowie ihrer Induktion auf C<sub>2</sub>-Körpern (Lopez-Boado *et al.* 1987, Lorenz und Fink 2001, Schuller 2003, Schöler und Schüller 1993). Die ermittelte Größenordnung der ICL-Aktivität des Wildtyps mit Glucose und Ethanol deckt sich mit der Literatur (Duntze *et al.* 1969).



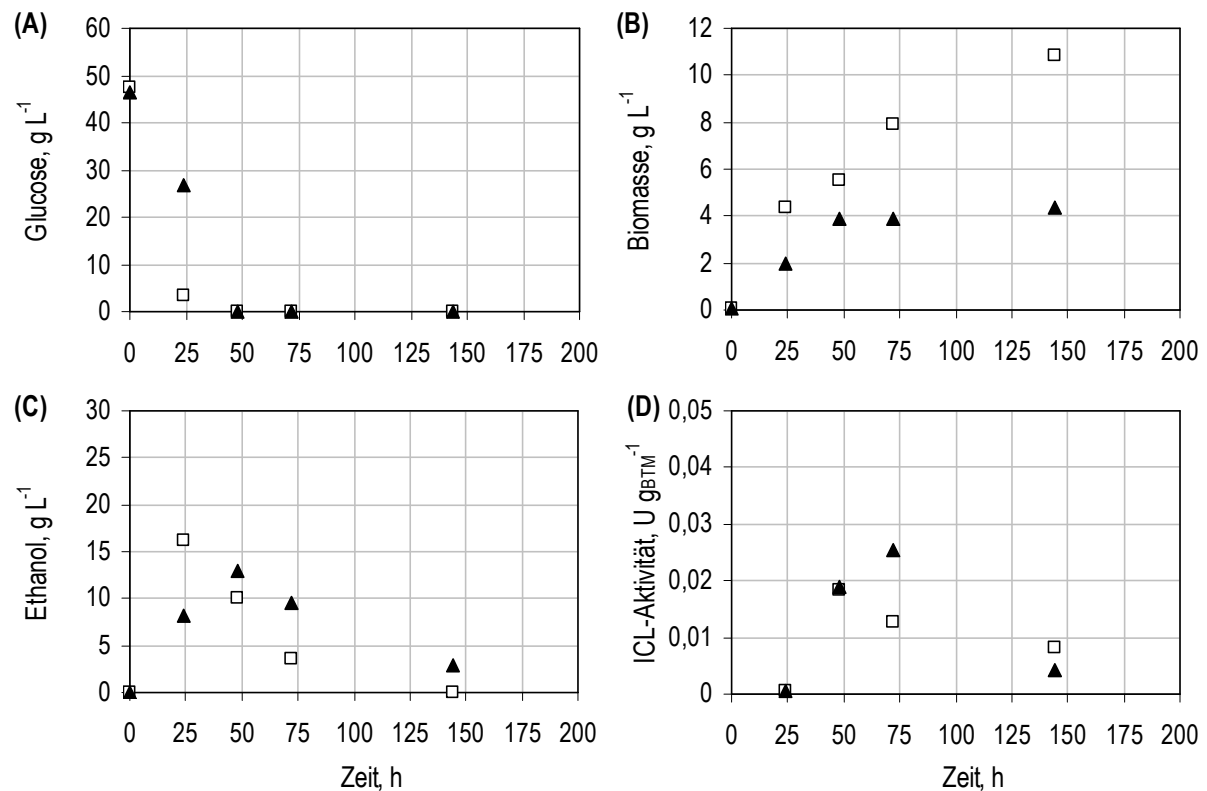


Abbildung 9.2: Bestimmung der Isocitratlyase-Aktivität des *S. cerevisiae* Wildtyps (□) und *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ idh1 (◆). Die Kultivierung erfolgte aus Zeit- und Kapazitätsgründen im Schüttelkolben ( $V_0 = 50$  mL) im WM8A-Medium mit  $50$  g L<sup>-1</sup> Glucose.

Auch die Literatur beschreibt, das hier bei dem Wildtyp und dem Deletionsstamm beobachtete Verhalten, dass die ICL-Aktivität mit Ethanol als Kohlenstoffquelle keine konstante Größe ist. Stattdessen wird die ICL bei der Umstellung der Zellen auf C<sub>2</sub>-Körper als Kohlenstoffquelle stark induziert und dann sinkt die ICL-Aktivität der Zellen wieder ab. Daher muss die Analyse der ICL-Aktivität der rekombinanten Stämme in der Satzphase mit Glucose erfolgen. Dementsprechend wurden zur Aktivitätsbestimmung Zellen aus der mittleren exponentiellen Wachstumsphase mit Glucose verwendet. Es wurde die ICL-Aktivität von zwei Stämmen mit ICL-Überexpression betrachtet. Bei *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ idh1 *ICL1* *MLS1* betrug die ICL-Aktivität mit Glucose  $0,012$  U g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup>, bei *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ idh1 *AceA* *MLS1* *ACS1*  $0,001$  U g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup>.

## Diskussion

Die Überexpression der homologen ICL führte, wie beispielhaft bei *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ idh1 *ICL1* *MLS1* gezeigt, zu einer Erhöhung der ICL-Aktivität trotz der unter Satzbedingungen mit Glucose auftretenden Glucosekatabolitrepression. Dass bei *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ idh1 *AceA* *MLS1* *ACS1* keine ICL-Aktivität mit Glucose nachzuweisen war, zeigt, dass das heterologe Enzym nicht funktional ist. In *E. coli* wird

dieses Enzym durch die Isocitrat-Dehydrogenase-Kinase/Phosphatase durch Phosphorylierung aktiviert und wahrscheinlich wurde dieser Schritt in *S. cerevisiae* nicht durchgeführt.

### 9.2.2 Satzverfahren

Abbildung 9.3 zeigt die Wachstumskurven aller *S. cerevisiae* SDH2-IDH-Stämme mit Überexpressionen im Bioreaktorblock. In den definierten Medien wuchsen die Überexpressionsstämme mindestens mit der Wachstumsrate des reinen Deletionsstammes AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta idh1$ . Im Komplexmedium wuchsen dagegen alle Stämme mit ICL-Überexpression schlechter als der Referenzstamm AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta idh1$ . Die ICL1-Überexpression hatte auch den deutlichsten Effekt aller Überexpression. Alle Stämme mit homologer ICL1 wuchsen nicht nur mit Glucose sondern auch (leicht) mit Ethanol. Bei allen Stämmen mit Überexpression der ICL1 war im WM8A-Medium kein Succinat nachzuweisen und die Succinatbildung im WM8G-Medium verringerte sich (Abbildung 9.4).

Mit dem Stamm *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta idh1 AceA MLS1 ACS1$  wurden in alle drei Medien höhere Succinatendkonzentrationen als beim Referenzstamm erzielt. Da bei AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta idh1 AceA MLS1 ACS1$  nachgewiesen wurde, dass die überexprimierte ICL nicht aktiv ist, kann an diesem Stamm untersucht werden, wie sich die Überexpression der MLS1 in Kombination mit der ACS1 auswirkt. Eine alleinige ACS1-Überexpression erhöhte die Wachstumsrate mit Glucose und es wurde in allen drei Medien mindestens die Succinatkonzentration des reinen Deletionsstammes erzielt.

### Diskussion

Bereits bei der Untersuchung von *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1 ICL1 MLS1 ACS1$  zeigten sich positive Einflüsse der Überexpressionen auf das Wachstum. Durch die Untersuchung der vielfältigen auf Basis von *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta idh1$  verfügbaren Überexpressionsstämme kann dieses verbesserte Wachstum von *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1 ICL1 MLS1 ACS1$  im WM8A- und WM8G-Medium nun besser eingeordnet werden.

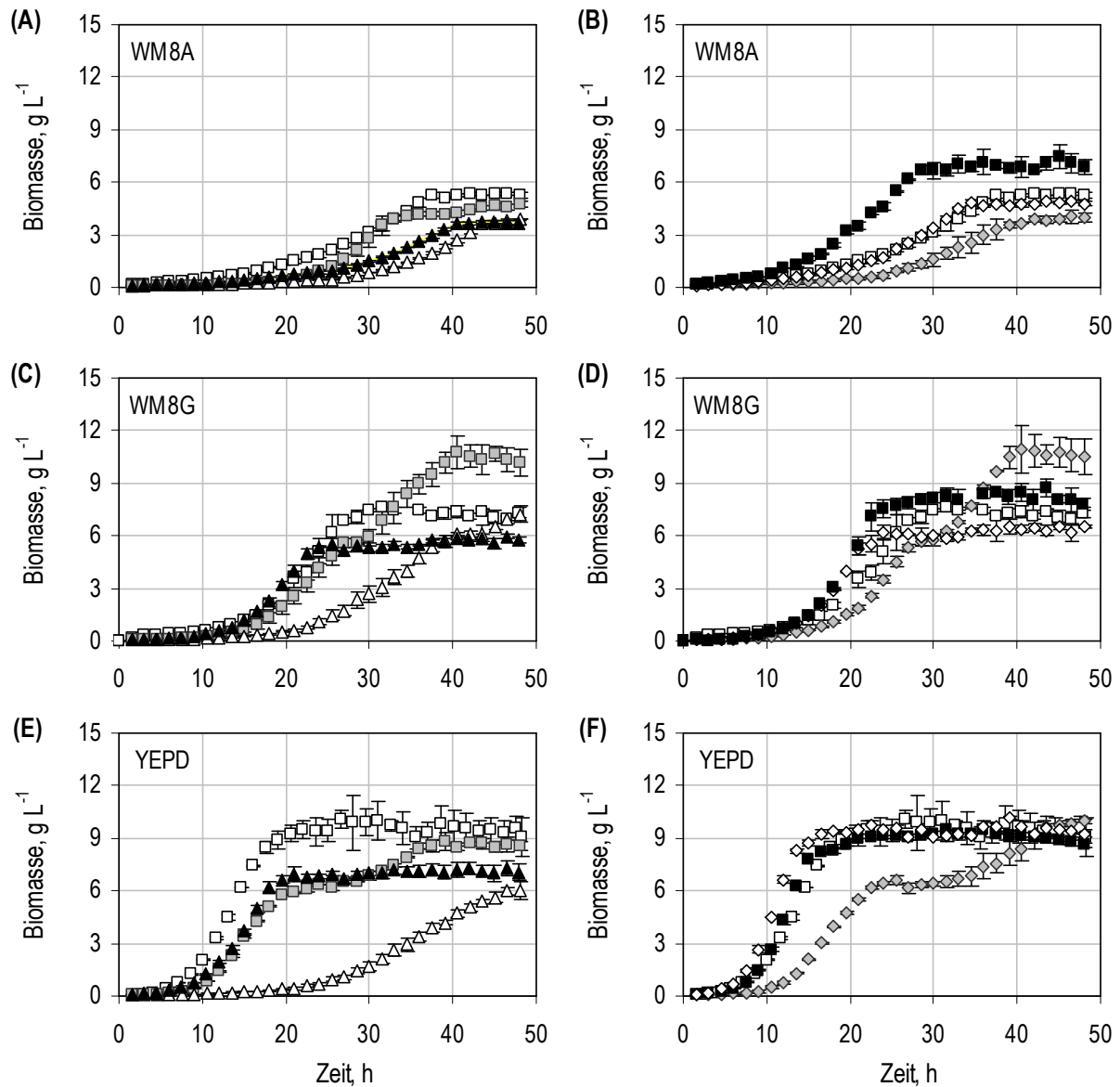


Abbildung 9.3: Wachstumskurven der Deletionsstämmen basierend auf *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ idh1 mit Überexpression von *ICL1*, *MLS1* und/oder *ACS1* in Satzversuchen mit Glucose als Kohlenstoffquelle im Bioreaktorblock ( $V_0 = 12$  mL,  $n = 3$ ). Dargestellt sind die Kurven des Basisstammes AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ idh1 (□) sowie der Stämme AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ idh1 *ICL1* (◻), AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ idh1 *ICL1* *MLS1* (Δ), AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ idh1 *ICL1* *MLS1* *ACS1* (▲), AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ idh1 *ACS1* (■), AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ idh1 *ICL1* *ACS1* (◊) und AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ idh1 *AceA* *MLS1* *ACS1* (◊) in drei verschiedenen Medien.

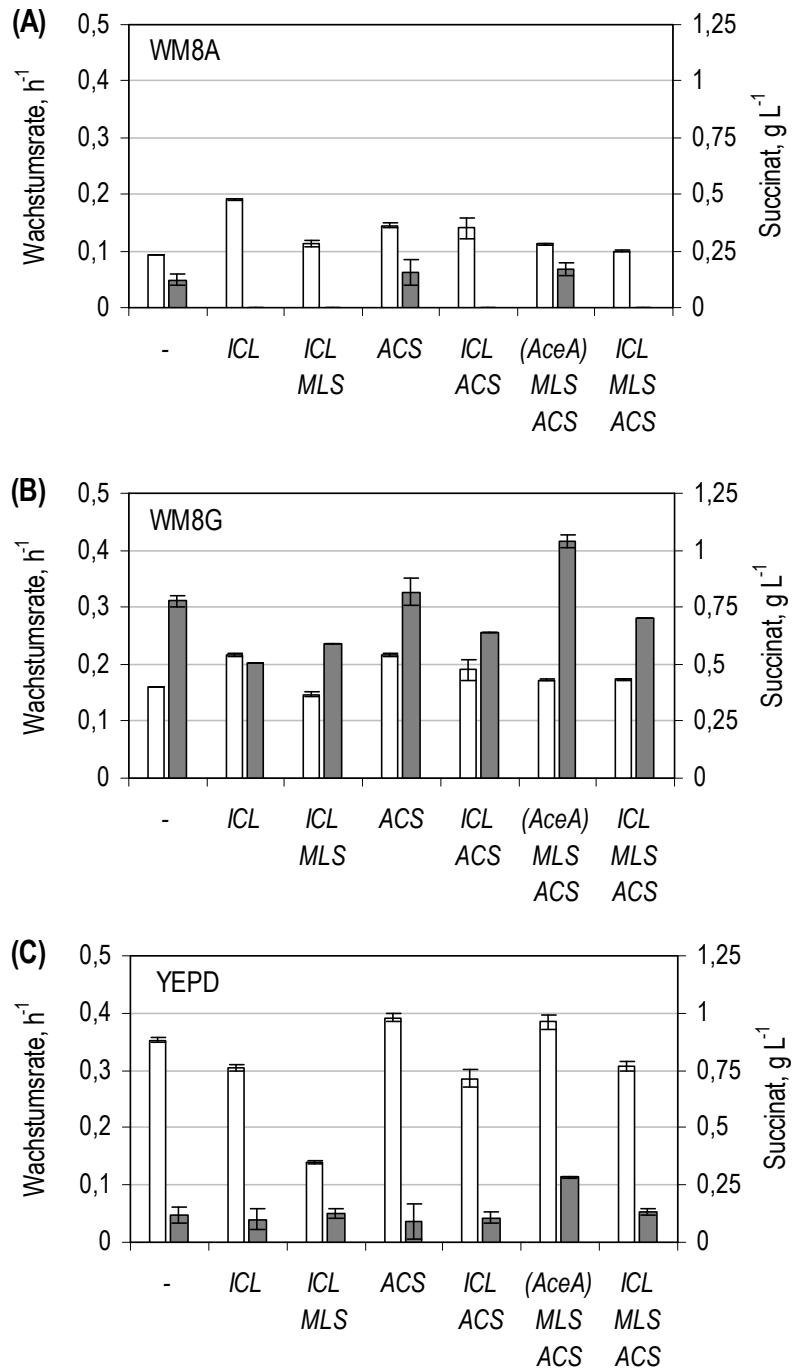


Abbildung 9.4: Wachstumsraten ( $\square$ ) sowie Succinatendkonzentration ( $\blacksquare$ ) der Deletionsstämme basierend auf *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ idh1 mit Überexpression von *ICL1*, *MLS1* und/oder *ACS1* in den Satzversuchen mit Glucose als Kohlenstoffquelle im Bioreaktorblock ( $V_0 = 12$  mL,  $n = 3$ ).

Es konnte nachgewiesen werden, dass eine *ICL1* oder *ACS1*-Überexpression das Wachstum verbessert. Während *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* in den beiden definierten Medien eine Reduzierung der Wachstumsrate gegenüber dem Wildtyp aufwies, erreicht *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* *ICL1* unter diesen Bedingungen Wachstumsraten, die sich vom Wildtyp nicht signifikant unterschieden. Der alleinige Effekt einer *MLS1*-Überexpression konnte auf Grund nicht vorhandener Stämme nicht betrachtet werden. In Kombination mit den anderen Überexpressionen führte die *MLS1*-Überexpression stets zu einer Absenkung der Wachstumsrate, wie der Vergleich von AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* *ICL1* mit AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* *ICL1* *MLS1* und AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* *ICL1* *ACS1* mit AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* *ICL1* *MLS1* *ACS1* zeigt.

Aus den Daten sticht die fehlende Succinatbildung aller Stämme mit *ICL1*-Überexpression hervor, sowie die Fähigkeit dieser Stämme wieder mit Ethanol zu wachsen. In den *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* ist der Verlust der SDH-Aktivität unvollständig, so dass über die Isocitrat-Lyase gebildetes Succinat über die SDH-Restaktivität über den Citrat-Zyklus verstoffwechselt werden kann.

Dass dieser Effekt ausschließlich in Deletionsstämmen mit *ICL1*-Überexpression auftrat und beim reinen Deletionsstamm AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* Succinat akkumulierte, spricht dafür, dass die *ICL1*-Überexpression einen Effekt auf die SDH-Aktivität hat. Als Folge dieser Überexpression könnte beispielsweise die Expression der verbliebenen Untereinheit *SDH2* steigen und/oder die des Isoenzym *SDH1b*.

### 9.2.3 Satz- und Zulaufverfahren

Ergänzend zu den Satzexperimenten im Bioreaktorblock erfolgten auch zweitägige Satzkultivierungen mit anschließender Zulaufphase im Laborbioreaktor. Die molaren Ausbeuten der einzelnen Kultivierungsphasen sind in Tabelle 9.2 zusammengestellt.

Beispielhaft für die Kultivierungen sind in Abbildung 9.5 die Metabolitverläufe für AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* *ACS1* und AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* *ICL1* *MLS1* herausgegriffen. Der Stamm AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* *ACS1* mit der *ACS1*-Überexpression zeigte wie auch AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* *AceA* *MLS1* *ACS1* ein durch die Acetatbildung aus Ethanol und im Zulauf zu  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* vergleichbares Verhalten. Dagegen steht AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* *ICL1* *MLS1* beispielhaft für die Stämme mit homologer *ICL1*-Überexpression, die auf Ethanol leicht wuchsen und im Zulauf neben der Glucose auch Glycerin, sowie teilweise Ethanol verbrauchten (Tabelle 9.2).

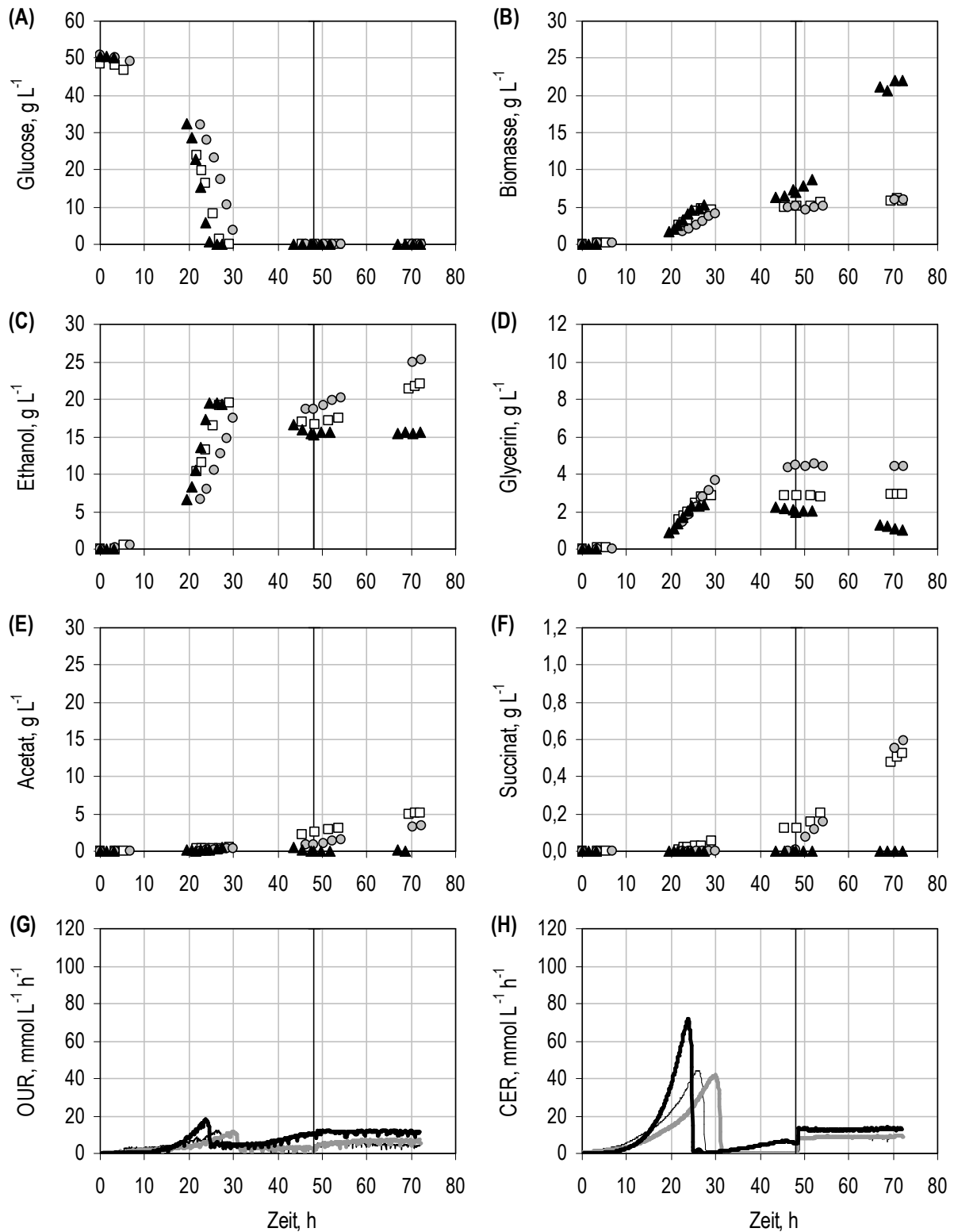


Abbildung 9.5: Satz- und Zulaufkultivierung im definierten Hoek-Medium mit 50 g L<sup>-1</sup> Glucose im Laborreaktor ( $V_0 = 1,2$  L) von *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ idh1 ACS1 ( $\circ$  oder dicke graue Linie) und *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ idh1 ICL1 MLS1 ( $\blacktriangle$  oder dicke schwarze Linie) und der Referenz *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ idh1 ( $\square$  oder dünne schwarze Linie). Der Zulauf mit einer Dosierate von 0,7 g<sub>Glucose</sub> L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> wurde nach 48 Stunden gestartet. Bei den dargestellten Ethanolkonzentrationen wurde die Verdunstung von Ethanol berücksichtigt.

Tabelle 9.2: Ausbeuten (mol mol<sup>-1</sup>) im definierten Hoek-Medium im Laborbioreaktor bei der Evaluierung der Deletionsstämmen basierend auf *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ idh1 mit Überexpression(en) von *ICL1*, *MLS1* und/oder *ACS1*. Für die Satzphase mit Ethanol waren bei einigen Stämmen (zum Beispiel AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ idh1 *AceA* *MLS1* *ACS1*, AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ idh1 *ICL1* *MLS1* oder AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ idh1 *ICL1* *MLS1* *ACS1*) auf Grund des langsamen Wachstums und ungünstig liegenden Probennahmezeitpunkten nur zwei Messpunkte verfügbar. Daher ist für diese Phase nur das Hauptprodukt angegeben.

$\Delta$ sdh2 $\Delta$ idh1	Phase	Substrat	Y <sub>X/S</sub>	Y <sub>Suc/S</sub>	Y <sub>Eth/S</sub>	Y <sub>Gly/S</sub>	Y <sub>Ace/S</sub>	Y <sub>CO2/S</sub>	Y <sub>O2/S</sub>
-	Satz	Glucose	0,2	0,00	1,6	0,1	0,0	1,5	0,3
<i>ICL</i>	Satz	Glucose	0,2	n.d.	1,6	0,1	0,0	1,6	0,3
<i>ICL, MLS</i>	Satz	Glucose	0,2	n.d.	1,5	0,1	0,0	1,5	0,3
<i>ACS</i>	Satz	Glucose	0,2	0,00	1,4	0,2	0,0	0,8	0,2
<i>ICL, ACS</i>	Satz	Glucose	0,2	n.d.	1,6	0,1	0,0	1,7	0,3
<i>ICL, MLS, ACS</i>	Satz	Glucose	0,1	n.d.	1,5	0,2	0,0	1,5	0,3
( <i>AceA</i> ), <i>MLS ACS</i>	Satz	Glucose	0,2	0,00	1,4	0,1	0,0	1,3	0,3
-	Satz	Ethanol	Acetat						
<i>ICL</i>	Satz	Ethanol + Glycerin	Biomasse						
<i>ICL, MLS</i>	Satz	Ethanol	Biomasse						
<i>ACS</i>	Satz	Ethanol	Acetat						
<i>ICL, ACS</i>	Satz	Ethanol	Biomasse						
<i>ICL, MLS, ACS</i>	Satz	Ethanol	Biomasse						
( <i>AceA</i> ), <i>MLS ACS</i>	Satz	Ethanol	Acetat						
-	Zulauf	Glucose	0,1	0,03	1,0	0,0	0,3	1,6	0,5
<i>ICL</i>	Zulauf	Glucose + Glycerin	0,8	n.d.	0,0	-	0,0	2,0	1,6
<i>ICL, MLS</i>	Zulauf	Glucose + Glycerin	1,0	n.d.	0,1	-	0,0	1,9	1,7
<i>ACS</i>	Zulauf	Glucose	0,1	0,04	1,1	-	0,3	1,6	1,1
<i>ICL, ACS</i>	Zulauf	Glucose + Glycerin + Ethanol	1,0	n.d.	-	-	-	2,2	1,7
<i>ICL, MLS, ACS</i>	Zulauf	Glucose	0,1	n.d.	2,0	0,1	0,0	1,7	0,7
( <i>AceA</i> ), <i>MLS ACS</i>	Zulauf	Glucose	0,2	0,05	0,7	-	0,4	1,5	1,1

Bei AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ idh1 *ICL1* *MLS1* sticht hervor, dass bei diesem Stamm die Ethanolkonzentration während des Zulaufs konstant blieb, aber Glycerin bereits verstoffwechselt wird. Der Wildtypstamm verbrauchte dagegen in den ersten Stunden der Zulaufphase zunächst nur Ethanol bevor dann sowohl Ethanol als auch Glycerin verwendet wurden (Abbildung 7.2). Bei den Stämmen mit *ICL1* hatte die Biomasseausbeute aus Glucose, Glycerin und gegebenenfalls Ethanol während des Zulaufs dieselbe Größenordnung wie die Ausbeute des Wildtyps (Tabelle 8.3 und Tabelle 9.2). Weder in der Satzphase noch im Zulauf bildeten die Stämme mit *ICL1*-Überexpression Succinat. Die Succinatausbeute von AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ idh1 *ACS1* oder AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ idh1 *AceA* *MLS1* *ACS1* erhöhte sich dagegen im Zulauf gegenüber AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ idh1.

### Diskussion

Bei der Kultivierung der sechs *S. cerevisiae* Stämme mit Überexpression der *ICL1*, *MLS* und/oder *ACS1* ergaben sich wie bereits im Bioreaktorblock zwei Gruppen. Die vier Stämme mit *ICL1*-Überexpression (AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ idh1 *ICL1*, AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ idh1 *ICL1* *MLS1*, AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ idh1 *ICL1* *ACS1* und AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ idh1 *ICL1* *MLS1* *ACS1*) bildeten kein Succinat. Gleichzeitig wuchsen die Stämme dieser Gruppe mit Ethanol statt dieses lediglich in Acetat umzuwandeln. Im Zulauf wuchsen sie zudem deutlich und zeigten einen Glycerinverbrauch. Dies bestätigte die Deregulationseffekte bezüglich der SDH durch die *ICL1*-Überexpression auch unter Zulaufbedingungen.

Die zweite Gruppe von Stämmen, die AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ idh1 *ACS1* und AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ idh1 *AceA* *MLS1* *ACS1* umfasst, bildete wie der Referenzstamm AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ idh1 aus Ethanol im Satzverfahren und im Zulaufverfahren Acetat als Hauptprodukt. Gleichzeitig wurde im Zulauf kein Glycerin verbraucht.

Es zeigte sich, dass in diesem Deletionsstamm sowohl die Überexpression der *ACS1*, als auch die *ACS1* und *MLS1*-Überexpression in Kombination die Succinatbildung im Zulauf fördern. Dies deutet darauf hin, dass durch die beiden Überexpressionen der Fluss durch den Glyoxylat-Zyklus erhöht wurde und da keine Deregulationseffekte bezüglich der SDH wie bei der *ICL1* auftraten das Succinat akkumulierte.

### 9.2.4 Fazit zu den SDH2-IDH-Deletionsstämmen mit Überexpressionen

Auf Basis von *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ idh1 wurden insgesamt sechs Stämme mit verschiedenen Kombinationen an Überexpressionen untersucht, um die Effekte bezüglich Wachstum und Succinatbildung besser eingrenzen zu können.

Zunächst wurde die Effizienz der *ICL1*-Überexpression betrachtet. Der beispielhafte Nachweis der homologen ICL-Aktivität in *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ idh1 *ICL1* *MLS1* hat erbracht, dass die *ICL1*-Überexpression trotz der Katabolitinaktivierung durch Glucose eine deutlich gesteigerte ICL-Aktivität zur Folge hat. Da angenommen wurde, dass diese



Ergebnisse auch auf die *ACS1*, die ebenfalls der Katabolitinaktivierung unterliegt (de Jong-Gubbels *et al.* 1997), übertragbar sind, wurde auf weitere Messungen der Enzymaktivität verzichtet.

Bei allen Deletionsstämmen die eine Überexpression der homologen *ICL1* besaßen, trat keine Succinatbildung auf. Daneben ist ein geringes Wachstum auf Ethanol statt der für Deletionsstämme typischen Acetatbildung zu erkennen.

Im Stamm *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* ist der Verlust der SDH-Aktivität unvollständig, so dass über die Isocitrat-Lyase gebildetes Succinat über die SDH-Restaktivität verstoffwechselt werden kann. Dass dieser Effekt ausschließlich in SDH2-IDH-Deletionsstämmen mit *ICL1*-Überexpression auftrat, spricht dafür, dass die Überexpression der *ICL1* neben ihrer katalytischen Funktion, wie bereits ausführlich für die Deletionsstämme beschrieben, regulatorische Effekte auslösen kann.

Einen interessanten Aspekt zu weiterführenden und relativ unerwarteten Effekten von Eingriffen in den respiratorischen Zentralstoffwechsel in diesem Zusammenhang neben den bereit erwähnten Transkriptomstudien von McCammon *et al.* (2003) und Cimini *et al.* (2009) beschreibt eine kürzlich veröffentlichte Publikation von Regev-Rudzki *et al.* (2009). In *S. cerevisiae* sind einige Enzyme des Zentralstoffwechsels in mehreren Kompartimenten zu finden. Beispielhaft sind die Aconitase oder Fumarase (Mitochondrien und Cytosol) und die Malat-Synthase (Peroxisomen oder Cytosol in Abhängigkeit der Kohlenstoffquelle) zu nennen. Regev-Rudzki *et al.* (2009) zeigten, dass die Lokalisierung der Fumarase von der Intaktheit des Glyoxylat-Zyklus beeinflusst wird. In *S. cerevisiae* Deletionsmutanten (untersucht wurden  $\Delta$ *cit2*,  $\Delta$ *icl1*,  $\Delta$ *cit2* oder  $\Delta$ *aco1*) oder einem *S. cerevisiae* Stamm mit Überexpression von *CIT2* wurde die Fumarase vollständig oder fast vollständig in den Mitochondrien nachgewiesen. Dies zeigt, wie groß und unerwartet die pleiotropen Effekte von gentechnischen Eingriffen in den Zentralstoffwechsel sind. Daher besteht die zwingende Notwendigkeit die Stammentwicklung von einer Stammcharakterisierung begleiten zu lassen. An Hand der Ergebnisse der Stämme mit bis zu drei Überexpressionen basierend auf *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* lässt sich schließen, dass zur Succinatproduktion ein Stamm mit einer vollständigen Blockade der SDH aber einem weniger eingeschränkten respiratorischen Stoffwechsel als bei *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *sdh1*  $\Delta$ *idh1*  $\Delta$ *idp1* eingesetzt werden sollte. Daher wurde beim Projektpartner ORGANOBALANCE GmbH im nächsten Schritt an der Stammentwicklung basierend auf *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *sdh1*  $\Delta$ *idh1* gearbeitet, allerdings konnte die Konstruktion von *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *sdh1* pFlat1-*ICL1* pFlat2-*MLS1* pFlat3-*ACS1* im Zeitraum dieses Forschungsvorhabens nicht erfolgreich abgeschlossen werden und es wurde stattdessen mit Stämmen basierend auf *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *sdh1* weitergearbeitet.

### 9.3 Überexpression im SDH-Deletionsstamm

Basierend auf dem *S. cerevisiae* Stamm mit Deletion beider SDH-Untereinheiten, AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1$ , wurde schrittweise durch die ORGANOBALANCE GmbH (Berlin) ein Stamm mit den drei Überexpressionen *ICL1*, *MLS1* und *ACS1* aufgebaut, so dass folgende Stämme zur Verfügung standen:

- *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1$  pFlat3-*ACS1*
- *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1$  pFlat1-*ICL1* pFlat3-*ACS1*
- *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1$  pFlat1-*ICL1* pFlat2-*MLS1* pFlat3-*ACS1*

#### 9.3.1 Satzverfahren

Abbildung 9.6 zeigt die Charakterisierung der SDH-Überexpressionsstämme im Satzversuch im Bioreaktorblock. Im Gegensatz zu den Deletionsstämmen basierend auf *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta idh1$  wuchsen die SDH-Überexpressionsstämme in allen untersuchten Medien langsamer als der reine Deletionsstamm AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1$ . Bereits die alleinige Überexpression der *ACS1* hatte in allen drei Medien eine deutliche Absenkung der Wachstumsrate zur Folge. Hingegen erhöhte sich in dem SDH2-IDH-Stamm die Wachstumsrate durch diese Überexpression.

Keiner der Überexpressionsstämme basierend auf *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1$  wuchs mit Ethanol als Kohlenstoffquelle. Für *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1$  *ICL1* *MLS1* *ACS1* konnte diese Phase im WM8G-Medium nicht mehr beobachtet werden, da nach 48 h noch ca. 0,5 g L<sup>-1</sup> Glucose im Medium vorlagen. Daher wurde dieser Aspekt in einem ergänzenden Schüttelkolbenversuch bestätigt (Daten nicht gezeigt).

Mit einer Ausnahme (*S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1$  *ICL1* *MLS1* *ACS1* im WM8G) erreichten die SDH-Deletionsstämme mit Überexpressionen stets die Succinatbildung der Referenz *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1$  oder übertrafen diese. Da die im Bioreaktorblock bestimmte Succinatbildung stets sowohl auf den Verbrauch von Glucose als auch zu einem geringeren Anteil auf den Verbrauch von Ethanol zurückzuführen ist und *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1$  *ICL1* *MLS1* *ACS1* im WM8G-Medium die eingesetzte Glucose noch nicht ganz umgesetzt hatte, wurde vermutet, dass dies die Ursache für die geringere Succinatendkonzentration darstellt. Dies konnte in einer 6 Tage laufenden Schüttelkolbenkultivierung im WM8G-Medium bestätigt werden, in der als Endkonzentration wieder etwa 1 g L<sup>-1</sup> Succinat erzielt wurden (Daten nicht gezeigt).

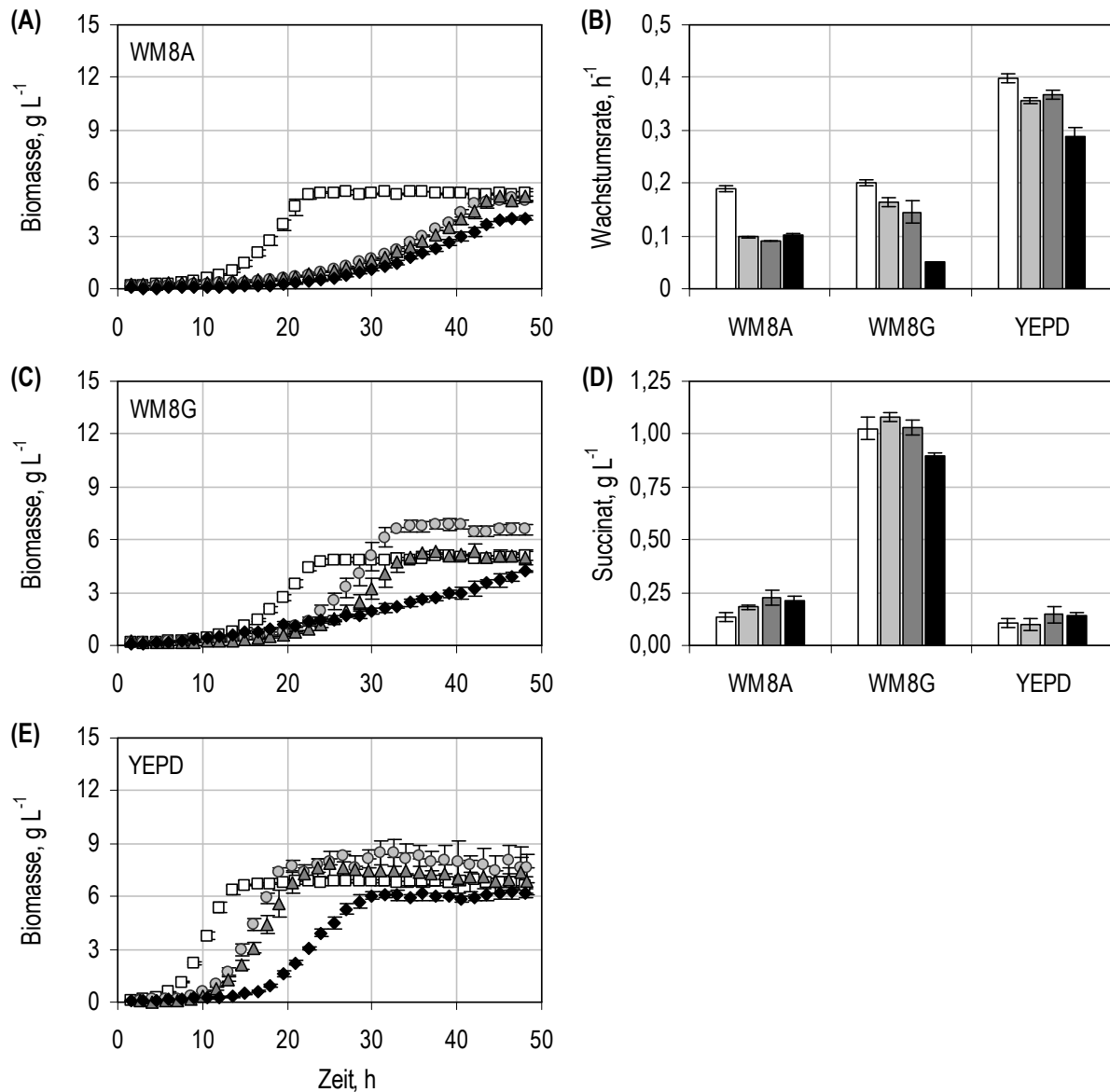


Abbildung 9.6: Evaluierung der *S. cerevisiae* SDH-Deletionsstämmen mit Überexpressionen im Glyoxylat-Zyklus durch Satzversuche mit Glucose als Kohlenstoffquelle im Bioreaktorblock ( $V_0 = 12 \text{ mL}$ ,  $n = 3$ ). A, C und E: Wachstumskurve des Referenzstammes AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ sdh1 (□) sowie der Stämmen AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ sdh1 ACS1 (◻), AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ sdh1 ICL1 ACS1 (◼) und AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ sdh1 ICL1 MLS1 ACS1 (◼) in drei verschiedenen Medien mit  $50 \text{ g L}^{-1}$  Glucose als Kohlenstoffquelle. B und D: Wachstumsraten mit Glucose und erzielte Succinatendkonzentration von AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ sdh1 (□), AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ sdh1 ACS1 (◻), AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ sdh1 ICL1 ACS1 (◼) und AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ sdh1 ICL1 MLS1 ACS1 (◼).

## Diskussion

Die erste Charakterisierung der Stämme auf Basis von *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ sdh1 mit Überexpressionen im Glyoxylat-Zyklus bestätigte die Vermutung, dass die Deregulationseffekte durch die *ICL1* nur bei einer unvollständigen SDH-Deletion Absenkung der Succinatbildung und Wachstum mit Ethanol zur Folge haben können.

### 9.3.2 Satz- und Zulaufverfahren

Von den drei SDH-Deletionsstämmen mit Überexpressionen wurde beispielhaft der Stamm mit der *ACS1*-Überexpression und mit allen drei Überexpressionen im Labormaßstab untersucht. Auch in diesen Experimenten zeigte sich die Verringerung der Wachstumsrate der beiden Stämme mit Überexpressionen gegenüber dem reinen Deletionsstamm (Abbildung 9.7). Im Hoek-Medium wurde mit *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1$  *ICL1* *MLS1* *ACS1* wie bereits im definierten WM8A-Medium 0,2 g L<sup>-1</sup> als höchste Succinatkonzentration in der Satzphase erreicht.

Tabelle 9.3: Ausbeuten (mol mol<sup>-1</sup>) im definierten Hoek-Medium im Laborreaktor bei der Evaluierung von *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1$  *ACS1* und *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1$  *ICL1* *MLS1* *ACS1*. Auf Grund des langsamen Wachstum der SDH-Stämme mit Überexpressionen und ungünstig liegenden Probennahmezeitpunkte ist für die "Ethanolphase" nur das Hauptprodukt angegeben.

$\Delta sdh2 \Delta sdh1$	Phase	Substrat	$Y_{X/S}$	$Y_{Suc/S}$	$Y_{Eth/S}$	$Y_{Gly/S}$	$Y_{Ace/S}$	$Y_{CO2/S}$	$Y_{O2/S}$
-	Satz	Glucose	0,2	0,00	1,6	0,1	0,0	1,5	0,3
<i>ACS1</i>	Satz	Glucose	0,2	0,00	1,5	0,1	0,0	1,5	0,3
<i>ICL1, MLS1, ACS1</i>	Satz	Glucose	0,1	0,00	1,6	0,1	0,1	1,5	0,2
-	Satz	Ethanol	Acetat						
<i>ACS1</i>	Satz	Ethanol	Acetat						
<i>ICL1, MLS1, ACS1</i>	Satz	Ethanol	Acetat						
-	Zulauf	Glucose	0,1	0,02	1,2	0,0	0,4	1,7	0,7
<i>ACS1</i>	Zulauf	Glucose	0,1	0,05	0,7	0,0	0,4	1,6	1,2
<i>ICL1, MLS1, ACS1</i>	Zulauf	Glucose	0,1	0,05	0,9	0,0	0,4	1,8	1,0

Wie *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1$  bildeten *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1$  *ACS1* und *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1$  *ICL1* *MLS1* *ACS1* aus Ethanol Succinat und Acetat (Abbildung 9.7). Während des Zulaufs wurden aus Glucose sowohl Biomasse, Ethanol, Acetat als auch Succinat gebildet. Die Succinatausbeuten von AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1$  *ACS1* und AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1$  *ICL1* *MLS1* *ACS1* waren im Zulauf gegenüber der von AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1$  erhöht (Tabelle 9.3). Die höchste zellspezifische Succinatbildung wurde mit 0,06 mmol g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> in der Satzphase und 0,012 mmol g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> in der Zulaufphase (bezogen auf die mittlere Zelldichte dieser Phase) bei *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1$  *ICL1* *MLS1* *ACS1* erzielt.

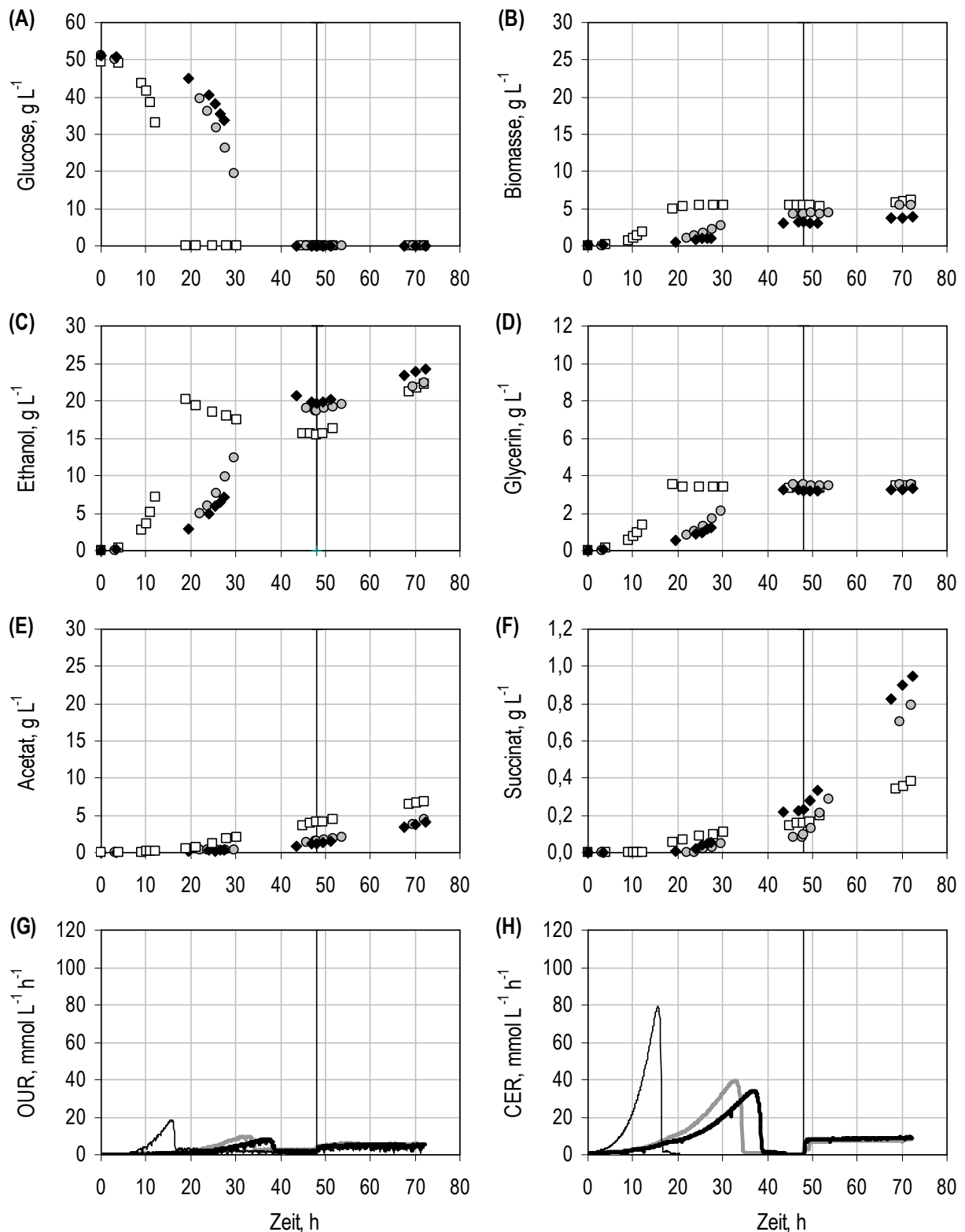


Abbildung 9.7: Satz- und Zulaufkultivierung von *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ sdh1 ACS1 (○) und *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ sdh1 ICL1 MLS1 ACS1 (◆) im definierten Hoek-Medium mit 50 g L<sup>-1</sup> Glucose im Laborreaktor ( $V_0 = 1,2$  L). Dargestellt ist auch *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ sdh1 als Referenz (□). Der Zulauf mit einer Dosierate von 0,7 g<sub>Glucose</sub> L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> wurde nach 48 Stunden gestartet. Bei den dargestellten Ethanolkonzentrationen wurde die Verdunstung von Ethanol berücksichtigt.

## Diskussion

Die Kultivierung im Labormaßstab bestätigte, dass bei vollständiger Deletion der SDH die Zellen mit *ICL1*-Überexpression Ethanol wieder zu Acetat als Hauptprodukt umwandeln. In der Zulaufphase konnte die Succinatausbeute durch Überexpression der *ACS1* mehr als verdoppelt werden. Durch die zusätzliche Überexpression von *ICL1* und *MLS1* gemeinsam mit der *ACS1* wurde keine Verbesserung der Succinatausbeute im Zulauf erreicht.

### 9.3.3 Zulaufkultivierung mit verschiedenen Dosieraten

Mit *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *sdh1* *ICL1* *MLS1* *ACS1* wurde ergänzend einer reiner Zulaufversuch mit verschiedenen Dosieraten durchgeführt. Wie Abbildung 9.8 zeigt, bildete *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *sdh1* *ICL1* *MLS1* *ACS1* unter Zulaufbedingungen zunächst den C<sub>2</sub>-Körper Acetat als Hauptprodukt und die Zellen wuchsen gering.

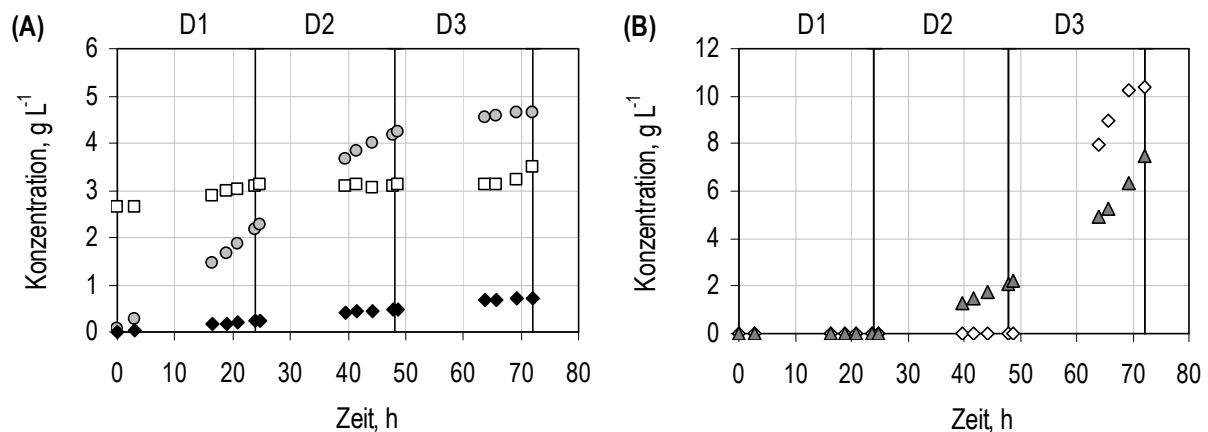


Abbildung 9.8: Zulaufverfahren bei verschiedenen Dosieraten mit dem Stamm *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *sdh1* *ICL1* *MLS1* *ACS1*. Dargestellt ist eine reine Zulaufkultivierung im Hoek-Medium im Laborrührkessel ( $V_0 = 1$  L) mit im 24 h Abstand ansteigenden Dosieraten. Verlauf der Biomasse- (□), Acetat- (○), Succinat- (◆) Ethanol- (▲) und Glucosekonzentration (◇) bei konstanten Dosieraten von  $0,16 \text{ g}_{\text{Glucose}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (D1),  $0,33 \text{ g}_{\text{Glucose}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (D2) und  $0,83 \text{ g}_{\text{Glucose}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (D3). Bei den dargestellten Ethanolkonzentrationen wurde die Verdunstung von Ethanol berücksichtigt.

Bereits nach einer Erhöhung der Zudosierung auf  $0,33 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (D2) wurde auch Ethanol gebildet. Ab diesem Zeitpunkt war kein Wachstum mehr messbar. Bei der letzten Dosierate (D3) akkumulierte Glucose im Medium. Die Succinatkonzentration stieg während des Experiments kontinuierlich an, wobei die Ausbeuten von der Dosierate abhingen (Tabelle 9.4). Unter vollständig glucosedereprimierten Bedingungen (D1) wurde mit  $0,08 \text{ mol}_{\text{Succinat}} \text{ mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$  die bislang höchste Succinatausbeute aus Glucose erreicht. Die Ausbeute bezogen auf die entsprechende Phase bei *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *sdh1* (Abbildung 7.4) verdoppelte sich.

Tabelle 9.4: Ausbeuten ( $\text{mol mol}^{-1}$ ) der Zulaufkultivierung vom *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta\text{sdh2}$   $\Delta\text{sdh1}$  *ICL1* *MLS1* *ACS1* im definierten Hoek-Medium im Laborreaktor bei verschiedenen Dosierraten ( $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ). Für die dritte Phase wurde auf die Berechnung der Ausbeuten verzichtet, da bereits Glucose im Medium akkumulierte.

Phase	Dosierrate	$Y_{\text{Suc/S}}$	$Y_{\text{Eth/S}}$	$Y_{\text{Ace/S}}$
D1	0,16	0,08	0,00	1,48
D2	0,33	0,04	0,84	0,58

## Diskussion

Dass in der Zulaufkultivierung von *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta\text{sdh2}$   $\Delta\text{sdh1}$  *ICL1* *MLS1* *ACS1* bei einer Dosierrate von  $0,16 \text{ g L}^{-1} \text{h}^{-1}$  keine Ethanolbildung auftrat, zeigt, dass in der Phase D1 vollständig glucosedereprimierte Bedingungen vorlagen und Glucose vollständig zu oxidativen Produkten umgesetzt wurde. Die Succinatausbeute war unter vollständig glucosedereprimierten Bedingungen am höchsten. Dennoch erfolgte wie beispielsweise bereits für *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta\text{sdh2}$   $\Delta\text{sdh1}$  und *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta\text{sdh2}$   $\Delta\text{idh1}$  beschrieben auch bei einem Auftreten des Crabtree-Effekts während des Zulaufs eine weitere Succinatbildung. Allerdings sank die Succinatausbeute unter diesen Bedingungen stets deutlich ab.

Durch die Überexpression der Glyoxylat-Bypass-Enzyme auf Basis von *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta\text{sdh2}$   $\Delta\text{sdh1}$  konnte die zellspezifische Succinatbildung gegenüber den bisherigen Stämmen erhöht werden und trotz *ICL1*-Überexpression wieder eine Succinatbildung erzielt werden. Allerdings trat stets eine starke prozesstechnisch nicht vermeidbare Acetatbildung auf, da die Überexpression von *ICL1* und *MLS1* in *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta\text{sdh2}$   $\Delta\text{sdh1}$  nicht ausreichte, um den gesamten Glyoxylat-Zyklus zu deregulieren.

## 9.4 Bestimmung intrazellulärer Metabolite aus dem Energiestoffwechsel

Auch bei *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta\text{sdh2}$   $\Delta\text{sdh1}$  *ICL1* *MLS1* *ACS1* wurden zudem in einer Satzkultivierung im YNB-Medium mit  $50 \text{ g L}^{-1}$  Glucose der EC und das NADH/NAD<sup>+</sup>-Verhältnis mit Glucose und Ethanol als Kohlenstoffquellen bestimmt. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zu *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta\text{sdh2}$   $\Delta\text{sdh1}$  (Daten nicht gezeigt). Dies deckt sich damit, dass durch die Überexpressionen nur eine minimale Zunahme der Succinatbildung erzielt wurde.

## 9.5 Fazit zu den Deletionsstämmen mit Überexpressionen im Glyoxylat-Zyklus

Tabelle 9.5 fasst abschließend die Ergebnisse aller *S. cerevisiae* Deletionsstämmen ohne und mit Überexpressionen von *ICL1*, *MLS1* und *ACS1*, die im Laborreaktor kultiviert wurden, bezüglich der Acetat- und Succinatbildung unter glucosedereprimierten Bedingungen zusammen.

Tabelle 9.5: Zusammenfassung des Verhaltens der *S. cerevisiae* AH22ura3 Deletionsstämmen basierend auf AH22ura3 mit und ohne Überexpressionen (*ICL1*, *MLS1*, *ACS1* oder heterologe Isoenzyme) in den zweitägigen Satzversuchen mit anschließender Zulaufphase im definierten Hoek-Medium mit Glucose als Kohlenstoffquelle.

Stamm	Überexpressionen	Acetat- bildung aus Ethanol	Acetat- bildung im Zulauf	Succinat- bildung im Zulauf
<i>wt</i>		-	-	-
$\Delta sdh2$		+	+	+
$\Delta sdh2 \Delta sdh1$		+	+	+
$\Delta sdh2 \Delta sdh1$	<i>ACS</i>	+	+	+
$\Delta sdh2 \Delta sdh1$	<i>ICL MLS ACS</i>	+	+	+
$\Delta sdh2 \Delta idh1$		+	+	+
$\Delta sdh2 \Delta idh1$	<i>ACS</i>	+	+	+
$\Delta sdh2 \Delta idh1$	<i>ICL</i>	-	-	-
$\Delta sdh2 \Delta idh1$	<i>ICL ACS</i>	-	-	-
$\Delta sdh2 \Delta idh1$	<i>ICL MLS</i>	-	-	-
$\Delta sdh2 \Delta idh1$	( <i>AceA</i> ) <i>MLS ACS</i>	+	+	+
$\Delta sdh2 \Delta idh1$	<i>ICL MLS ACS</i>	-	-	-
$\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1^a$		- <sup>b</sup>	-	+ <sup>c</sup>
$\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1^a$	<i>KIICL KIMLS ACS</i>	- <sup>b</sup>	-	+ <sup>c</sup>
$\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1^a$	<i>ICL MLS ACS</i>	- <sup>b</sup>	-	+ <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Kultivierung mit Glutamatzusatz

<sup>b</sup> kein Verbrauch von Ethanol

<sup>c</sup> Succinatbildung erfolgte wahrscheinlich vor allem aus Glutamat



Nur in *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ idh1 wirkte sich zumindest die *ICL1*-Überexpression deutlich aus. In diesem Stamm sind die IDH- und SDH-Deletion unvollständig, so dass der Glyoxylat- und Citrat-Zyklus genutzt werden können. Unter diesen Bedingungen wurde ein verbessertes Wachstum statt der angestrebten Succinatbildung erzielt. In den Überexpressionsstämmen basierend auf *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ sdh1 und *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ sdh1  $\Delta$ idh1  $\Delta$ idp1, mit vollständiger Blockade der SDH- und IDH-Enzymaktivitäten, wurde das generelle Verhalten der Stämme hinsichtlich Acetat- und Succinatbildung nicht mehr durch die Überexpressionen geändert und es wurde nur eine geringe oder keine Erhöhung der Succinatbildung erreicht.

Dies zeigt, dass der Weg bis zum Succinat weitere Engstellen aufweist beziehungsweise die Zelle noch stärker durch Überexpressionen gezwungen werden muss, den energetisch gegenüber der Acetatbildung unvorteilhaften Weg bis zum Succinat zu nutzen.

Es existieren mehrere potentielle Ansatzpunkte, um den Kohlenstofffluss zu Succinat zu steigern (Abbildung 9.9):

- Überexpression von *ACO1*, *CIT2* und *MDH2*  
Dies sind wie Abbildung 9.9 zeigt die übrigen am Glyoxylat-Zyklus beteiligten Enzyme, die wie die *ICL1* und *MLS1* der Glucoserepression und teilweise auch der Katabolitrepression unterliegen.
- Überexpression einer Acetaldehyd-Dehydrogenase (ALD)  
Die Überexpression einer ALD soll die Acetatbildung gegenüber der Ethanolbildung fördern und Substrat für die durch die ACS katalysierte Reaktion bereitstellen. Unter den fünf ALD-Isoenzymen würden sich hier vor allem die NAD<sup>+</sup>-abhängigen Enzyme (*ALD2* und *ALD3*) anbieten, um gleichzeitig die Energiegewinnung der Zelle zu fördern.
- Überexpression einer Pyruvat-Carboxylase (PYC) oder PEP-Carboxylase (PEPC)  
Ein weiterer Angriffspunkt, durch den effizient Kohlenstoff in den Citrat- und Glyoxylat-Zyklus eingespeist werden könnte, bietet die CO<sub>2</sub>-Fixierung. Durch die Überexpression einer homologen oder heterologen PYC oder PEPC kann die zellinterne Konzentration an Oxalacetat gesteigert werden. Die CO<sub>2</sub>-Fixierung bildet folglich den dritten möglichen Weg neben Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) und Pyruvat-Dehydrogenase-Bypass um Pyruvat (oder bereits PEP) in die beiden Zyklen einzuschleusen.

Eine Alternative oder Ergänzung zu dieser Vielzahl an weiteren Überexpressionen kann in der Beeinflussung kompletter Stoffwechselwege durch globale Regulationsfaktoren liegen.

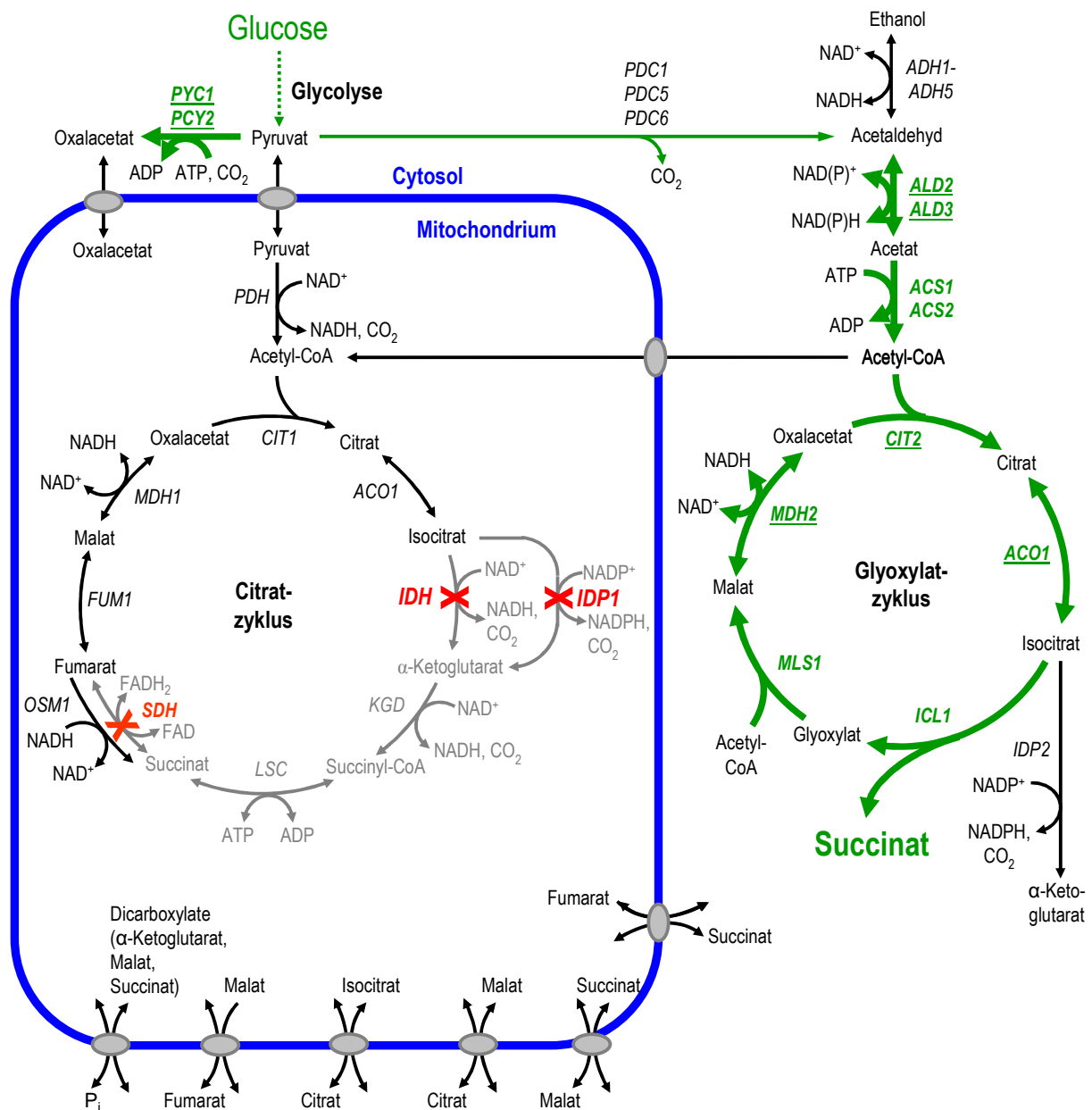


Abbildung 9.9: Zentraler Kohlenstoffmetabolismus von *S. cerevisiae* mit den im Rahmen des Metabolic Engineering in diesem Forschungsvorhaben vorgenommenen gentechnischen Modifikationen und den weiteren Ansatzpunkte für Überexpressionen (unterstrichene Enzyme), um den Kohlenstofffluss zu Succinat zu steigern. Deletionen sind durch rote Kreuze und Überexpressionen durch dicke grüne Pfeile dargestellt sind.

## 10 Charakterisierung von Stämmen mit Überexpression des transkriptionellen Regulationsfaktors *HAP4*

Die Charakterisierung der Deletionsstämmen mit Überexpressionen im vorhergehenden Kapitel zeigte, dass die gezielte Überexpression einzelner Enzyme des Glyoxylat-Zyklus zwar zu einer Erhöhung der Succinatbildung führen kann, aber die massive Bildung von C<sub>2</sub>-Körpern wie Acetat und Ethanol und die relativ geringen Succinatausbeuten weisen auf einen starken Abfluss des Kohlenstoffs vor dem Citrat-Zyklus und Glyoxylat-Zyklus hin. Eine Alternative zur schrittweisen Deregulation von Stoffwechselwegen zur Identifizierung potentiell geschwindigkeitsbestimmender Schritte und anschließenden Überexpression der entsprechenden Gene stellt die Beeinflussung kompletter Stoffwechselwege durch globale Regulationsfaktoren dar. Im Rahmen dieser Arbeit wird als letzter Aspekt zu den Ansätzen zur Succinatproduktion mit *S. cerevisiae* die Überexpression des transkriptionellen Regulationsfaktors *HAP4* untersucht. Eine *HAP4*-Überexpression in Wildtyphefen führte unter Satzbedingungen mit Glucose zu einer Erhöhung der Wachstumsrate und Biomasseausbeute bei reduzierter Ethanolbildung. Sie sorgte also für eine Verschiebung der respiro-fermentativen Stoffwechsels Richtung Respiration und somit zu höheren Flüssen durch den Citrat-Zyklus (Blom *et al.* 2000, van Maris *et al.* 2001, Lascaris *et al.* 2003, Lascaris *et al.* 2004). Im Rahmen dieser Arbeit standen folgenden Stämme mit einer *HAP4*-Überexpression zur Verfügung:

- *S. cerevisiae* AH22ura3 wt pFlat3-*HAP4*
- *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ *sdh2* pFlat3-*HAP4*
- *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* pFlat3-*HAP4*
- *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *sdh1*  $\Delta$ *idh1* pFlat3-*HAP4*

Zudem wurde die *HAP4*-Überexpression im Stamm *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* pFlat1-*ICL1* pFlat3-*HAP4* mit der Überexpression eines der Enzyme des Glyoxylat-Zyklus kombiniert.

## 10.1 Satzverfahren

Die erste Charakterisierung des Wachstums und der Succinatbildung des *S. cerevisiae* Wildtyps und der *S. cerevisiae* Deletionsstämme mit *HAP4*-Überexpression erfolgte im Satzversuch im Bioreaktorblock.

Abbildung 10.1 zeigt die Wachstumskurven des *S. cerevisiae* Wildtyps mit *HAP4*-Überexpression sowie beispielhaft für die Deletionsstämme die Daten von *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* *HAP4*. Im Komplexmedium hatte die Überexpression keinen Effekt auf das Wachstum. Die Überexpression von *HAP4* im Wildtyp oder den Deletionsstämmen AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*, AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* oder AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *sdh1*  $\Delta$ *idh1* führte in den beiden definierten Medien zu einer signifikanten Erhöhung der Wachstumsrate. Bei der Charakterisierung der Stämme im WM8A-Medium wurden für AH22ura3 wt *HAP4*, AH22ura3  $\Delta$ *sdh2* *HAP4* und AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *sdh1*  $\Delta$ *idh1* *HAP4* Wachstumsraten von 116-117 % des jeweiligen Referenzstammes erreicht. Bei *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* *HAP4* stieg die Wachstumsrate sogar auf 124 % des Referenzstammes.

Noch stärker fielen die Effekte im WM8G-Medium aus. Nur in diesem Medium mit Glutamat führte *HAP4* zu einer signifikant erhöhten Succinatkonzentration. Hier stieg die Wachstumsrate auf mindestens 130 % (AH22ura3 wt *HAP4*) und um maximal 191 % (AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* *HAP4*) im Bezug zum jeweiligen Referenzstamm. Alle *HAP4*-Deletionsstämme wiesen, wie in Abbildung 10.1 beispielhaft für AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* *HAP4* gezeigt, keine zweite Wachstumsphase mit Ethanol auf.

Eine *HAP4*-Überexpression soll den respiro-fermentativen Metabolismus von *S. cerevisiae* Richtung Respiration verschieben. Dies zeigt sich neben einer Erhöhung der Biomassekonzentration und der Bildung von organischen Säuren wie Succinat auch an einer Reduzierung der Gärprodukte Ethanol und Glycerin. Da auf Grund der Flüchtigkeit von Ethanol die aus dem Bioreaktorblock genommene Endpunktprobe nach 48 h keinen sinnvollen Vergleich der Ethanolkonzentrationen zulässt, wurde stattdessen nur die Glycerinendkonzentration betrachtet. Diese sank in allen Ansätzen, in denen durch *HAP4* Verbesserungen des Wachstums oder der Succinatbildung erzielt wurden, im Vergleich zum zugehörigen Referenzstamm ab (Abbildung 10.2).

Auf Basis von *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1*, in dem die *HAP4*-Überexpression die größten Effekte hervorrief, wurde *HAP4* mit *ICL1*, dem ersten Enzym des Glyoxylat-Bypasses, kombiniert. Wie in Abbildung 10.1 dargestellt, ändert sich die Auswirkung einer *ICL1*-Überexpression durch die zusätzliche *HAP4*-Überexpression in  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1*. So reduzierte sich die Wachstumsrate von *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* *ICL1* *HAP4* gegenüber den entsprechenden Stämmen nur mit *ICL1*- oder *HAP4*-Überexpression und sank etwa auf den Wert des reinen Deletionsstammes ab. Zudem wies *S. cerevisiae*

AH22ura3  $\Delta sdh2$   $\Delta idh1$  *ICL1 HAP4* trotz der *ICL1*-Überexpression kein diauxisches Wachstum auf und die Succinat- und Glycerinendkonzentrationen unterschieden sich nicht signifikant von *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2$   $\Delta idh1$  *HAP4*.

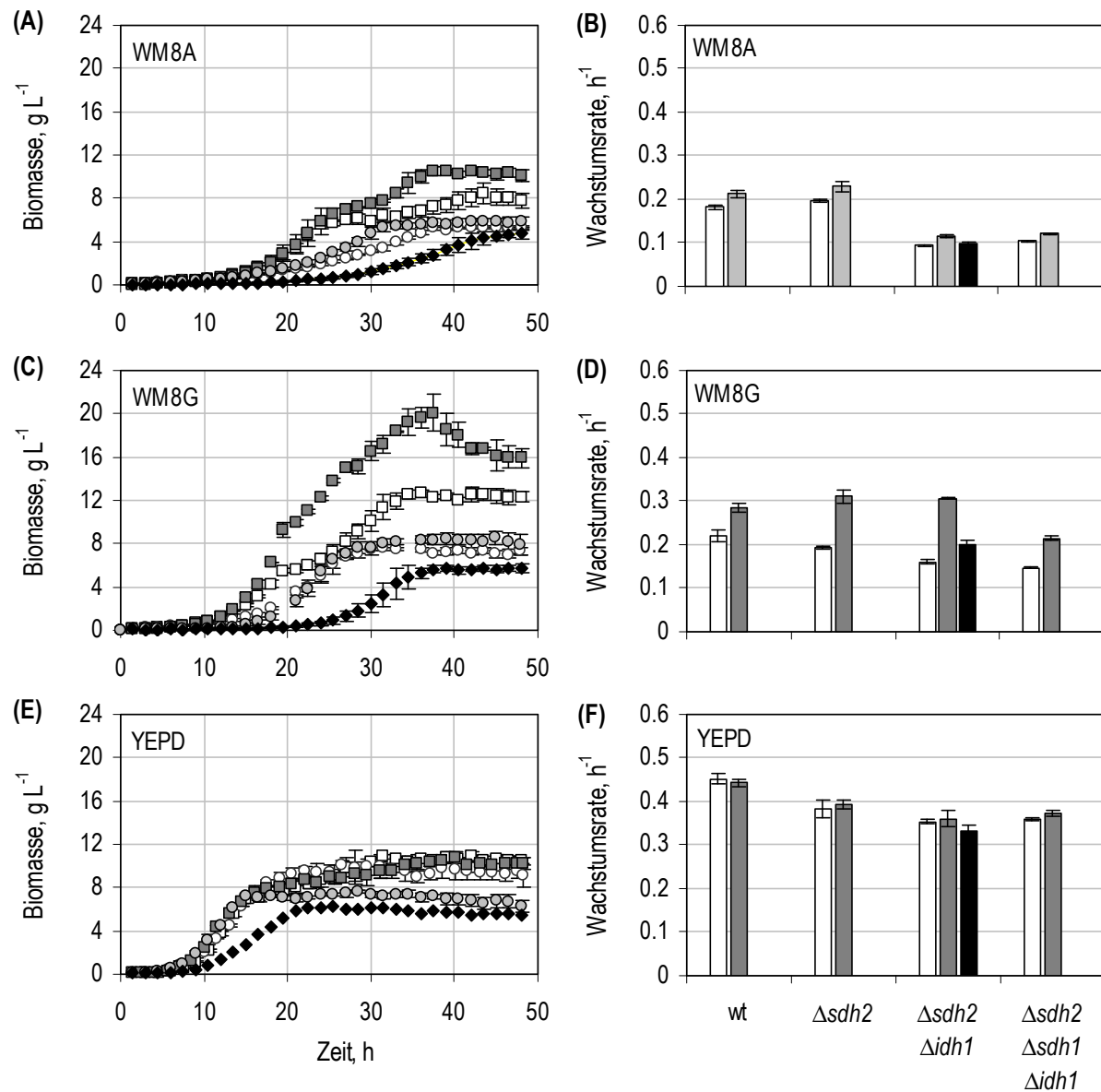


Abbildung 10.1: Wachstum der *S. cerevisiae* Stämme mit *HAP4*-Überexpression im Satzversuche mit Glucose als Kohlenstoffquelle im Bioreaktorblock ( $V_0 = 12$  mL,  $n = 3$ ). A, C und E: Wachstumskurven der Stämme AH22ura3 wt ( $\square$ ), AH22ura3 wt *HAP4* ( $\blacksquare$ ), AH22ura3  $\Delta sdh2$   $\Delta idh1$  ( $\circ$ ), AH22ura3  $\Delta sdh2$   $\Delta idh1$  *HAP4* ( $\odot$ ) sowie AH22ura3  $\Delta sdh2$   $\Delta idh1$  *HAP4 ICL1* ( $\blacklozenge$ ). B, D und F: Wachstumsraten der Stämme mit *HAP4*-Überexpression ( $\blacksquare$ ) und der jeweiligen Referenzstämme ( $\square$ ) mit Glucose in der Kultivierungen in drei verschiedenen Medien mit  $50$  g L $^{-1}$  Glucose als Kohlenstoffquelle. Zudem wurde noch der Stamm *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2$   $\Delta idh1$  *ICL1 HAP4* ( $\blacksquare$ ) untersucht.

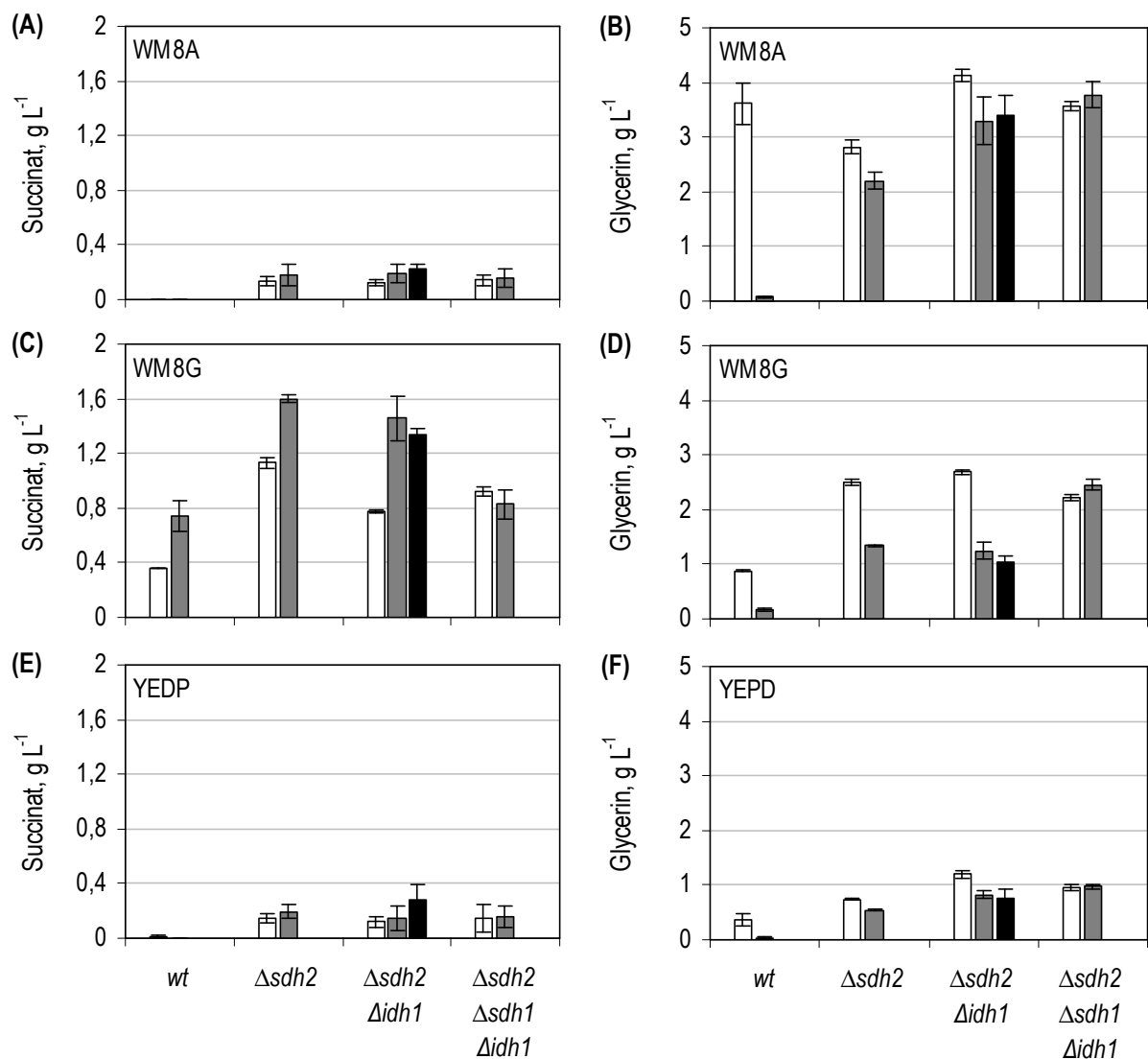


Abbildung 10.2: Glycerin- und Succinatendkonzentrationen der *S. cerevisiae* Stämme mit *HAP4*-Überexpression in den Satzversuchen mit Glucose als Kohlenstoffquelle im Bioreaktorblock ( $V_0 = 12$  mL,  $n = 3$ ). Dargestellt sind die resultierenden Glycerin- und Succinatendkonzentrationen am Versuchende nach 48 h der Stämme mit *HAP4*-Überexpression (■) und der jeweiligen Referenzstämme ohne Überexpression (□) in Kultivierungen in drei verschiedenen Medien mit  $50 \text{ g L}^{-1}$  Glucose als Kohlenstoffquelle. Zudem wurde der Stamm *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta idh1 ICL1 HAP4$  (■) mit Kombination von *HAP4*- und *ICL1*-Überexpression untersucht.

## Diskussion

Für die *HAP4*-Überexpression im Wildtypstamm konnte die von Blom *et al.* (2000) beschriebene Verschiebung des respiro-fermentativen Gleichgewichts unter vergleichbaren Bedingungen (Satzversuch im definierten Medium mit Glucose und der anorganischen Stickstoffquelle Ammoniumsulfat) bestätigt werden. Auch in den Deletionsstämmen führte die *HAP4*-Überexpression in den beiden definierten Medien zu einer erhöhten

Wachstumsrate und Succinatbildung bei reduzierter Glycerinbildung. Das heißt auch bei den Deletionsstämmen verschob sich der Stoffwechsel in Richtung Respiration, wobei die Effekte bei den beiden Stämmen mit unvollständiger SDH-Deletion besonders im WM8G-Medium größer ausfielen.

Der transkriptionelle Regulationsfaktor *HAP4* erhöht die Expression der Gene des Citrat-Zyklus (DeRisi *et al.* 1997, Lascaris *et al.* 2003, Costanzo *et al.* 2010). Betroffen sind auch alle vier SDH-Untereinheiten. Somit steigt durch die *HAP4*-Überexpression in den Stämmen mit unvollständiger SDH-Deletion die durch die verbliebene Untereinheit *SDH1* in Kombination mit *SDH1b* vorhandene Restaktivität der SDH wahrscheinlich an. Dass aber im Gegensatz zu den SDH2-IDH-Stämmen mit *ICL1*-Überexpression noch eine Succinatbildung nachzuweisen ist, zeigt, dass der Stofffluss durch die *SDH* weiterhin beschränkt wird, möglicherweise weil parallel zur steigenden SDH-Aktivität durch *HAP4* auch der Fluss durch den gesamten Citrat-Zyklus steigt. Die bei der Kultivierung auf Glutamat gewonnenen Daten legen nahe, dass *HAP4* nur dann effektiv wirkt, wenn der Citrat-Zyklus nicht wie bei *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1$  vollständig blockiert ist.

Bei den im Rahmen dieser Arbeit nicht betrachteten Stämmen *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1$  *HAP4* und *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1$  *HAP4* wären daher nur geringe positive Effekte durch *HAP4* zu erwarten.

Dass durch *HAP4* im Komplexmedium in allen Stämmen keine signifikanten Verbesserungen bezüglich Wachstum und Succinatbildung erzielt wurden, ist damit zu erklären, dass die Zelle im Komplexmedium Biomasseprecursor praktisch komplett aus dem Medium aufnimmt und somit ein erhöhter Fluss durch den Citrat-Zyklus wenig Effekte auf die Biomassebildung besitzt.

## 10.2 Satz- und Zulaufverfahren

Ergänzend zu den Experimenten im Bioreaktorblock wurde der Effekt der *HAP4*-Überexpression detaillierter beim Wildtyp und den Stämmen mit unvollständiger SDH-Deletion im Labormaßstab im Satzversuch mit angeschlossener Zulaufphase betrachtet (Abbildung 10.3 und Abbildung 10.4).

### Satzphase mit Glucose

Zunächst wird bei den *S. cerevisiae* Stämmen nur mit *HAP4*-Überexpression der Effekt der *HAP4*-Überexpression auf die zellspezifischen Raten in der Satzphase mit Glucose betrachtet. Wie Tabelle 10.1 zeigt, sinkt durch die *HAP4*-Überexpression im Wildtyp oder SDH2-Deletionsstamm  $q_{Eth}$  und  $q_{Gly}$ , während  $\mu_{max}$ ,  $q_{Ace}$  und  $q_{O_2}$  gegenüber dem zugehörigen Referenzstamm ansteigen.

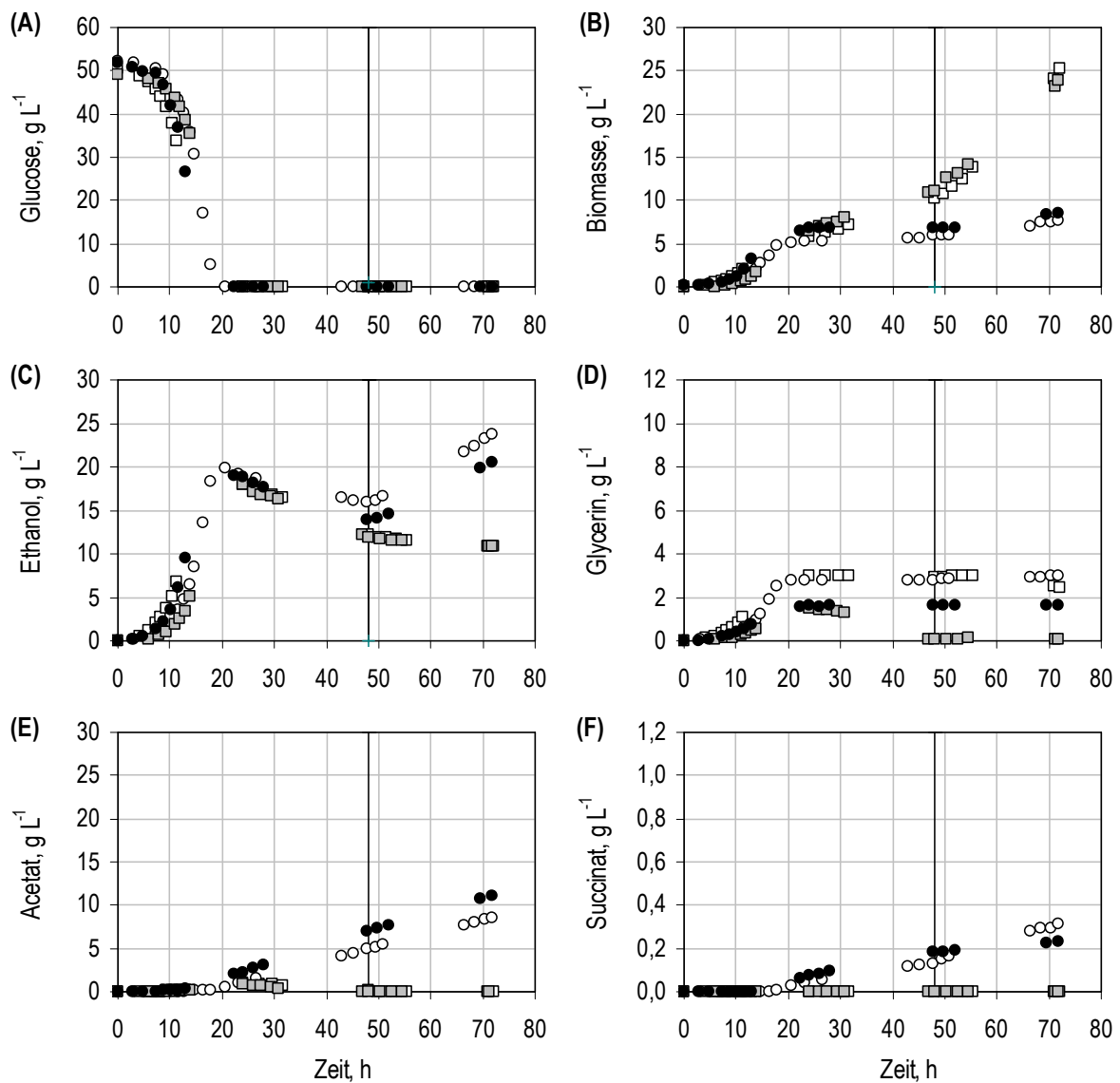


Abbildung 10.3: Satz- und Zulaufkultivierung im definierten Hoek-Medium mit 50 g L<sup>-1</sup> Glucose im Laborreaktor ( $V_0 = 1,2$  L) zur Untersuchung der *HAP4*-Überexpression im *S. cerevisiae* Wildtyp und *SDH2*-Deletionsstamm. Dargestellt sind der Wildtypstamm als Referenz (□) und AH22ura3 wt *HAP4* (▢), sowie AH22ura3  $\Delta$ *sdh2* (○) und AH22ura3  $\Delta$ *sdh2* *HAP4* (●). Der Zulauf mit einer Dosierate von 0,7 g<sub>Glucose</sub> L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> wurde nach 48 Stunden gestartet. Bei den dargestellten Ethanolkonzentrationen wurde die Verdunstung von Ethanol berücksichtigt.



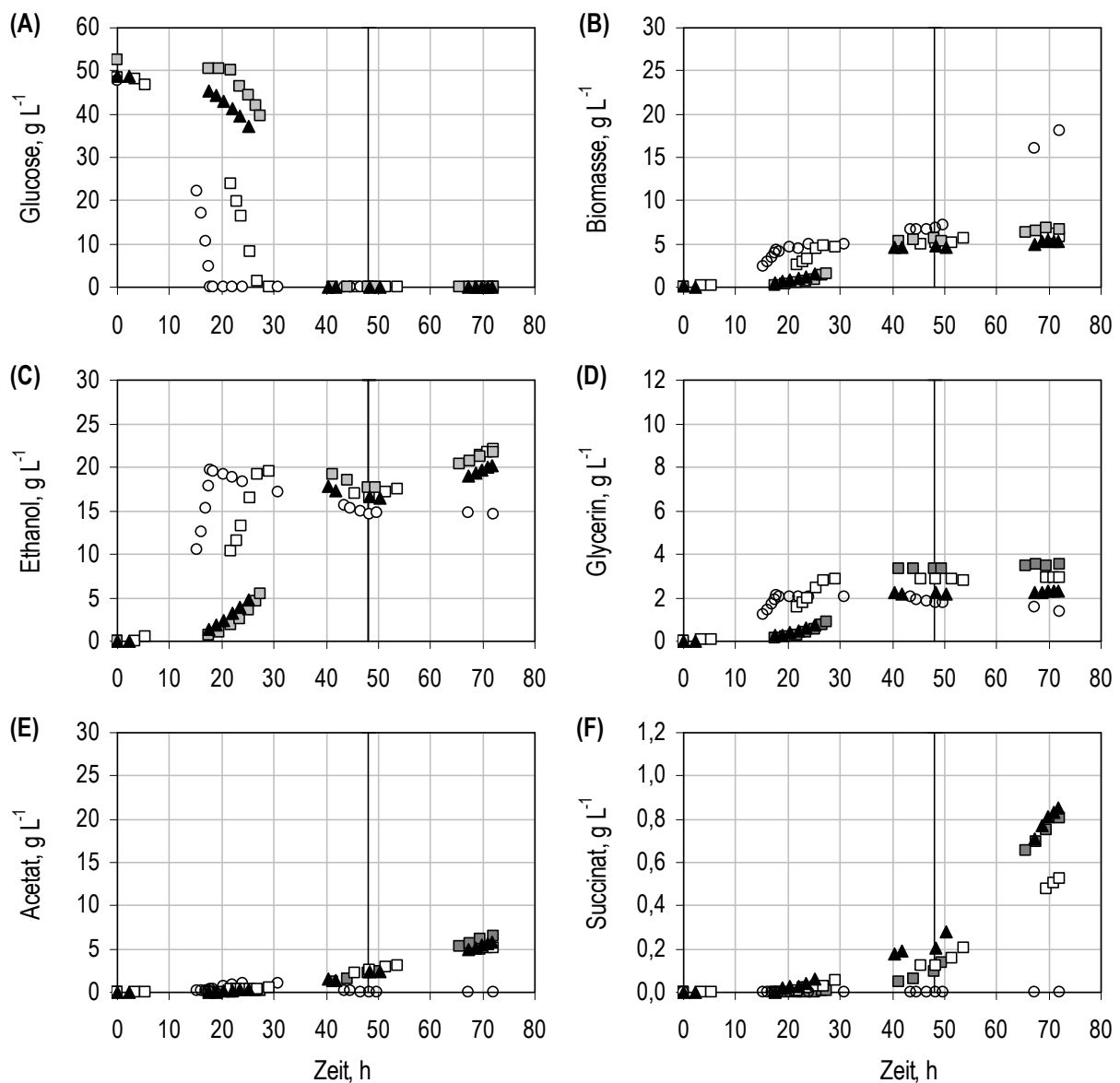


Abbildung 10.4: Satz- und Zulaufkultivierung im definierten Hoek-Medium mit 50 g L<sup>-1</sup> Glucose im Laborreaktor ( $V_0 = 1,2$  L) zur Evaluierung der *S. cerevisiae* SDH2-IDH-Deletionsstämme mit HAP4-Überexpression. Dargestellt sind die beidem Grundstämme AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ idh1 (□) und AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ idh1 pFlat1-ICL1 (○) sowie AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ idh1 HAP4 (◻) und AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ idh1 ICL1 HAP4 (▲). Der Zulauf mit einer Dosiertrate von 0,7 g<sub>Glucose</sub> L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> wurde nach 48 Stunden gestartet. Bei den dargestellten Ethanolkonzentrationen wurde die Verdunstung von Ethanol berücksichtigt.

Während bei AH22ura3 wt *HAP4* und AH22ura3  $\Delta$ *sdh2* *HAP4*  $q_{\text{Glu}}$  leicht gegenüber dem jeweiligen Referenzstamm absanken, stieg  $q_{\text{Glu}}$  bei AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* *HAP4* auf 134 % des Wertes von AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1*. Bei AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* *HAP4* erhöhten sich zudem auch  $\mu_{\text{max}}$ ,  $q_{\text{Eth}}$ ,  $q_{\text{Gly}}$ ,  $q_{\text{Ace}}$  und  $q_{\text{O}_2}$  auf mindestens 140 % der Werte von AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1*.

Tabelle 10.1: Wachstumsraten ( $\text{h}^{-1}$ ) und zellspezifische Substrataufnahme- sowie Produktbildungsraten ( $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) in der Satzphase mit Glucose als Kohlenstoffquelle in der Kultivierung im definierten Hoek-Medium im Laborreaktor zur Untersuchung der *S. cerevisiae* Stämme mit *HAP4*-Überexpression und der zugehörigen Referenzstämmen.

Stamm	$\mu_{\text{max}}$	$q_{\text{Glu}}$	$q_{\text{Suc}}$	$q_{\text{Eth}}$	$q_{\text{Gly}}$	$q_{\text{Ace}}$	$q_{\text{CO}_2}$	$q_{\text{O}_2}$
wt	0,29	-14,4	0,00	23,0	1,8	0,3	22,8	5,5
wt <i>HAP4</i>	0,32	-14,3	0,00	20,2	1,1	0,6	23,4	6,2
$\Delta$ <i>sdh2</i>	0,27	-14,9	0,00	22,4	1,5	0,1	23,1	5,5
$\Delta$ <i>sdh2</i> <i>HAP4</i>	0,31	-14,2	0,00	21,0	0,8	0,5	19,9	5,9
$\Delta$ <i>sdh2</i> $\Delta$ <i>idh1</i>	0,14	-7,9	0,02	11,8	0,9	0,1	10,8	2,0
$\Delta$ <i>sdh2</i> $\Delta$ <i>idh1</i> <i>HAP4</i>	0,20	-11,2	0,00	15,5	1,2	0,5	14,3	4,6
$\Delta$ <i>sdh2</i> $\Delta$ <i>idh1</i> ICL	0,22	-14,4	0,00	23,4	1,0	0,0	24,6	5,9
$\Delta$ <i>sdh2</i> $\Delta$ <i>idh1</i> ICL1 <i>HAP4</i>	0,14	-6,4	0,06	10,6	0,8	0,6	11,3	2,8

Durch die Überexpression von *HAP4* und *ICL1* im SDH2-IDH-Deletionsstamm, sank  $q_{\text{Glu}}$  unter den Wert von AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1*, obwohl sowohl eine alleinige *ICL1*- als auch eine alleinige *HAP4*-Überexpression  $q_{\text{Glu}}$  in diesem Deletionsstamm erhöht hatten. Die zellspezifischen Bildungsraten der organischen Säuren Succinat und Acetat erhöhten sich bei AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* ICL1 *HAP4* gegenüber AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1*, AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* *HAP4* und AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* ICL1.

### Satzphase mit Ethanol (und weiteren Substraten)

Nachdem Glucose verbraucht war, nutzte AH22ura3 wt *HAP4* Glycerin sofort parallel zu Ethanol und Acetat, während AH22ura3 wt zunächst Ethanol und Acetat nutzte (Abbildung 10.3). Weder AH22ura3  $\Delta$ *sdh2* *HAP4*, AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* *HAP4* noch AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* ICL1 *HAP4* verbrauchten Glycerin im Laufe der Kultivierung wieder und diese Stämme wandelten Ethanol vor allem in Acetat um und bildeten in geringen Konzentrationen auch Succinat (Abbildung 10.3 und Abbildung 10.4). Bereits im Bioreaktorblock hatte sich für AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* *HAP4* und AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* ICL1 *HAP4* anders als für AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* ICL1 kein diauxisches Wachstum gezeigt.

Tabelle 10.2: Ausbeuten (mol mol<sup>-1</sup>) im definierten Hoek-Medium im Laborreaktor bei der Evaluierung ausgewählter *S. cerevisiae* Stämme mit *HAP4*-Überexpression

Stamm	Phase	Substrat	Y <sub>X/S</sub>	Y <sub>Suc/S</sub>	Y <sub>Eth/S</sub>	Y <sub>Gly/S</sub>	Y <sub>Ace/S</sub>	Y <sub>CO2/S</sub>	Y <sub>O2/S</sub>
wt	Satz	Glucose	0,2	0,00	1,6	0,1	0,0	1,6	0,4
wt <i>HAP4</i>	Satz	Glucose	0,2	0,00	1,4	0,1	0,0	1,6	0,4
$\Delta$ <i>sdh2</i>	Satz	Glucose	0,2	0,00	1,5	0,1	0,0	1,6	0,4
$\Delta$ <i>sdh2 HAP4</i>	Satz	Glucose	0,2	0,00	1,5	0,1	0,0	1,4	0,4
$\Delta$ <i>sdh2</i> $\Delta$ <i>idh1</i>	Satz	Glucose	0,2	0,00	1,6	0,1	0,0	1,5	0,3
$\Delta$ <i>sdh2</i> $\Delta$ <i>idh1 HAP4</i>	Satz	Glucose	0,2	0,00	1,6	0,1	0,1	1,5	0,4
$\Delta$ <i>sdh2</i> $\Delta$ <i>idh1 ICL</i>	Satz	Glucose	0,2	0,00	1,6	0,1	0,0	1,6	0,3
$\Delta$ <i>sdh2</i> $\Delta$ <i>idh1 HAP4 ICL1</i>	Satz	Glucose	0,2	0,01	1,6	0,1	0,1	1,7	0,4
<hr/>									
wt	Satz	Ethanol + Acetat + Glycerin	0,3	n.d.	-	-	-	0,9	1,4
wt <i>HAP4</i>	Satz	Ethanol + Acetat + Glycerin	0,3	n.d.	-	-	-	0,9	1,3
$\Delta$ <i>sdh2</i>	Satz	Ethanol	0,1	0,01	-	0,00	0,8	0,0	0,8
$\Delta$ <i>sdh2 HAP4</i>	Satz	Ethanol	0,0	0,01	-	0,00	0,7	0,0	0,9
$\Delta$ <i>sdh2</i> $\Delta$ <i>idh1</i>	Satz	Ethanol	0,1	0,01	-	0,00	0,6	0,0	0,5
$\Delta$ <i>sdh2</i> $\Delta$ <i>idh1 HAP4</i>	Satz	Ethanol	0,1	0,01	-	0,00	0,5	0,0	0,9
$\Delta$ <i>sdh2</i> $\Delta$ <i>idh1 ICL</i>	Satz	Ethanol + Glycerin	0,2	n.d.	-	-	-	0,7	1,4
$\Delta$ <i>sdh2</i> $\Delta$ <i>idh1 HAP4 ICL1</i>	Satz	Ethanol	0,1	0,01	-	0,00	0,6	0,0	1,2
<hr/>									
wt	Zulauf	Glucose + Ethanol + Glycerin	1,0	n.d.	-	-	0,0	1,9	1,6
wt <i>HAP4</i>	Zulauf	Glucose + Ethanol	0,9	n.d.	-	0,02	0,0	2,3	2,0
$\Delta$ <i>sdh2</i>	Zulauf	Glucose	0,1	0,01	1,2	0,00	0,4	1,7	0,7
$\Delta$ <i>sdh2 HAP4</i>	Zulauf	Glucose	0,2	n.d.	0,0	-	0,0	2,0	1,6
$\Delta$ <i>sdh2</i> $\Delta$ <i>idh1</i>	Zulauf	Glucose	0,1	0,03	1,0	0,01	0,3	1,6	0,5
$\Delta$ <i>sdh2</i> $\Delta$ <i>idh1 HAP4</i>	Zulauf	Glucose	0,1	0,05	0,7	0,01	0,6	1,8	1,4
$\Delta$ <i>sdh2</i> $\Delta$ <i>idh1 ICL</i>	Zulauf	Glucose + Glycerin	0,8	n.d.	0,0	-	0,0	2,1	1,6
$\Delta$ <i>sdh2</i> $\Delta$ <i>idh1 HAP4 ICL1</i>	Zulauf	Glucose	0,0	0,04	0,6	0,01	0,4	1,5	1,1

### Zulaufphase

Während des Zulaufs wuchs AH22ura3 wt *HAP4* wie der Wildtyp und verbrauchte Ethanol parallel zur Glucose. Aus der Satzphase stammendes Glycerin hatte AH22ura3 wt *HAP4* bis zum Start des Zulaufs bereits verbraucht. Alle *S. cerevisiae* Deletionsstämme mit Überexpression von *HAP4* bildeten im Zulaufverfahren Ethanol, Acetat, Biomasse und Succinat. Während des Zulaufs wurden Ausbeuten von  $0,05 \text{ mol}_{\text{Succinat}} \text{ mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$  bei AH22ura3  $\Delta\text{sdh2} \Delta\text{idh1} \text{HAP4}$  und  $0,04 \text{ mol}_{\text{Succinat}} \text{ mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$  bei AH22ura3  $\Delta\text{sdh2} \Delta\text{idh1} \text{ICL1} \text{HAP4}$  erzielt.

### Diskussion

Der Vergleich der zellspezifischen Raten des Wildtyps und *S. cerevisiae* wt *HAP4* bestätigte in der Satzphase mit Glucose die Ergebnisse von Blom *et al.* 2000, dass die Überexpression von *HAP4* zu einer hinsichtlich der Produktion von organischen Säuren wie Succinat vorteilhaften Verschiebung Richtung oxidierter Produkte führt. Es ergaben sich vergleichbare Effekte wie von Blom *et al.* (2000) beschrieben, allerdings fielen diese Effekte geringer aus als in dem Stamm DL1 von Blom *et al.* (2000) beobachtet (Tabelle 10.3).

Tabelle 10.3: Relative Effekt der *HAP4*-Überexpression in den *S. cerevisiae* Stämmen DL1 (Blom *et al.* 2000), CEN.PK 113-7D (van Maris *et al.* 2001) und AH22ura3 wt im Satzverfahren mit Glucose. k.A.: keine Angabe

Stamm	$\mu_{\text{max}}$	$q_{\text{Glu}}$	$q_{\text{Suc}}$	$q_{\text{Eth}}$	$q_{\text{Gly}}$	$q_{\text{Ace}}$	$q_{\text{CO}_2}$	$q_{\text{O}_2}$
AH22ura3	109 %	99 %	n.d.	88 %	58 %	236 %	103 %	112 %
DL1	118 %	82 %	k.A.	75 %	27 %	229 %	100 %	209 %
CEN.PK 113-7D	95 %	82 %	k.A.	77 %	64 %	125 %	k.A.	k.A.

Auch van Maris *et al.* (2001) konnte in einem definierten Medium die Tendenzen bezüglich Ethanol-, Glycerin und Acetatbildung bestätigen. Jedoch sank in dieser Studie die Wachstumsrate als Folge der *HAP4*-Überexpression sogar leicht ab. Diese Unterschiede können neben dem Medium durch den Stammbhintergrund und Unterschiede in der Expression von *HAP4* (zum Beispiel hervorgerufen durch unterschiedliche Promotorsysteme) verursacht sein. Lascaris *et al.* (2003) beschreibt, dass sich Stämme mit *HAP4*-Überexpression in einem "neuen metabolischen Zustand" befinden, da *HAP4*-Stämme zwar einige Merkmale von dereprimierten Zellen aufweisen, dieser aber nicht identisch mit einem zum Beispiel durch das Wachstum auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen erhaltenen dereprimierten Zustand ist.

Während sich bei AH22ura3  $\Delta$ *sdh2* *HAP4* durch *HAP4* in der Satzphase mit Glucose dieselben Tendenzen bezüglich der zellspezifischen Raten wie beim Wildtyp ergaben, erhöhten sich bei AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* *HAP4* gegenüber AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* alle zellspezifischen Raten (auch  $q_{\text{Eth}}$  und  $q_{\text{Gly}}$ ). Die Ursache dafür lag in der auf 134 % des reinen Deletionsstammes erhöhten zellspezifischen Glucoseaufnahmerate. Dass der Stammhintergrund einen starken Einfluss auf die Auswirkungen von *HAP4* besitzt, zeigte sich an Hand von AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* *ICL1* *HAP4*. Während AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* *ICL1* eine gegenüber AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* fast verdoppelte zellspezifische Glucoseaufnahmerate und keine Succinatbildung aufwies (Tabelle 10.1), sank durch die ergänzende *HAP4*-Überexpression  $q_{\text{Glu}}$  auf ein ähnliches Niveau wie bei AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* ab und die Produktionsraten der organischen Säuren erhöhten sich.

Auch im Zulauf wurden durch *HAP4* bei AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* *HAP4* und AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* *ICL1* *HAP4* positive Effekte auf die Succinatbildung erzielt. Dies deckt sich mit den Aussagen von van Maris *et al.* 2001, dass Auswirkungen von *HAP4* auch unter glucosedereprimierten Bedingungen auftreten.

### 10.3 Fazit zur *HAP4*-Überexpression

Die Charakterisierung des *S. cerevisiae* Wildtyps und einiger Deletionsstämmen mit Überexpression des transkriptionellen Regulationsfaktor *HAP4* zeigte in allen untersuchten Stämmen eine für die Succinatbildung vorteilhafte Erhöhung der Respiration, der Wachstumsrate und einen Anstieg in der Bildung von organischen Säuren.

Neben diesen Effekten konnte mit *HAP4* sogar der unerwünschte Deregulationseffekt der *ICL1*, durch den keine Succinatbildung in den *S. cerevisiae* SDH2-IDH-Stämmen mit *ICL1* erzielt worden war, beeinflusst werden. Trotz unvollständiger SDH-Deletion akkumulierte in *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* *ICL1* *HAP4* wieder Succinat.

Die *HAP4*-Überexpression ist ein vielversprechender Ansatz für die mikrobielle Succinatproduktion mit *S. cerevisiae*. In weiteren Arbeiten sollte die parallele Überexpression von *ICL1*, *MLS*, *ACS1* und *HAP4* erfolgen. Da *HAP4* nur bei unvollständigen Citrat-Zyklus-Deletionen deutliche Effekte hatte, sollte *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* als Basis für diese Überexpressionen genutzt werden.

## 11 Fazit zu den Ansätzen zur Bernsteinsäureproduktion mit *Saccharomyces cerevisiae*

Im Laufe der iterativen Stammentwicklung und -charakterisierung wurde eine Vielzahl an rekombinanten Hefestämmen mit Deletionen und Überexpressionen im Zentralstoffwechsel konstruiert und umfassend reaktionstechnisch und metabolisch charakterisiert. Hierdurch konnte eine grundlegende Basis für eine weitere Stamm- und Prozessentwicklung zur biotechnologischen Herstellung von Bernsteinsäure in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gelegt werden. Allerdings blieben die mit den bislang untersuchten rekombinanten *S. cerevisiae* erzielten Produktkonzentrationen, Ausbeuten und Produktivitäten auf Grund der prozesstechnisch nicht unterdrückbaren Bildung von C<sub>2</sub>-Körpern weit hinter denen der besten natürlichen Succinatüberproduzenten und der beiden gentechnisch modifizierten prokaryontischen Plattformorganismen *E. coli* und *C. glutamicum* zurück (Tabelle 3.6).

Ein zu dem im Laufe dieser Arbeit untersuchten Konzept vergleichbarer Ansatz zur aeroben Succinatproduktion über den Glyoxylat-Zyklus wurde bereits mit Erfolg in *E. coli* umgesetzt (Lin *et al.* 2005b). Auch in dem rekombinanten *E. coli* Stamm wurde der Succinatabbau durch Deletion der Succinat-Dehydrogenase (Deletion der beiden Untereinheiten *SdhA* und *SdhB*) unterbunden und der Glyoxylat-Zyklus aktiviert (Abbildung 3.8B). Zur Aktivierung des Glyoxylat-Zyklus musste in *E. coli* nur das Gen, das den Repressor des aceBAK Operons codiert (*iclR*), deletiert werden. Zu beachten ist dabei, dass durch Deletion des Repressorgens auch das regulatorische Enzym Isocitrat-Dehydrogenase-Kinase/Phosphatase (AceK) exprimiert wird, das die Isocitrat-Dehydrogenase durch eine Phosphorylierung reversibel inaktivieren kann, um den Fluss zwischen Citrat- und Glyoxylat-Zyklus zu regulieren (LaPorte 1993, Chung *et al.* 1988). Somit ist dem *E. coli* Stamm mit aktiviertem Glyoxylat-Zyklus wahrscheinlich auch ohne IDH-Deletion die IDH-Aktivität vermindert.

Zur Vermeidung von Nebenprodukten waren in diesem *E. coli* die Pyruvat-Oxidase (POX) und die Phosphotransacetylase (PTA) und Acetat-Kinase (ACK) deletiert. Zusätzlich besaß der Stamm noch zwei Modifikationen um die CO<sub>2</sub>-Fixierung zu stärken. Durch Blockade des glucosespezifischen Phosphotransferasesystems (*ptsG*) wurde die PEP-Konzentration erhöht, um Substrat für die CO<sub>2</sub>-Fixierung über eine überexprimierte, heterologe PEP-Carboxylase (PEPC) bereitzustellen.

Die in dieser Arbeit vorliegenden rekombinanten Hefestämme besaßen keine gentechnischen Modifikationen um die CO<sub>2</sub>-Fixierung zu steigern. Jedoch wies ein vergleichbarer *E. coli* Deletionsstamm ohne Überexpression für die CO<sub>2</sub>-Fixierung (*E. coli*

$\Delta sdhAB \Delta ackA-pta \Delta poxB \Delta iclR \Delta ptsG$ ) bereits Ausbeuten von mindesten  $0,6 \text{ mol}_{\text{Succinat}} \text{ mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$  im Satzversuch mit Glucose auf und durch die PEPC-Überexpression wurden die Ausbeuten dann auf über  $0,75 \text{ mol}_{\text{Succinat}} \text{ mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$  gesteigert.

Der Vergleich mit *E. coli* macht die deutlich höhere Komplexität und Herausforderung beim Metabolic Engineering in einem Eukaryonten wie *S. cerevisiae* deutlich. Folgende Aspekte, die bei Prokaryonten keine oder eine untergeordnete Rolle spielen, erschweren die Stammentwicklung bei *S. cerevisiae*: die Kompartimentierung, die Vielzahl an Isoenzymen und das komplexere Regulationsnetzwerk.

Die Kompartimentierung von *S. cerevisiae* wurde nicht als grundsätzliches Problem für die angestrebte Succinatproduktion über den Glyoxylat-Zyklus eingeschätzt, da bei *S. cerevisiae* im Gegensatz zu vielen anderen Hefen der Glyoxylat-Zyklus mit Ausnahme des Wachstums auf Fettsäuren komplett cytosolisch lokalisiert ist (Flores *et al.* 2000, Piekarska *et al.* 2008, Duntze *et al.* 1969, Kunze *et al.* 2002, McCammon *et al.* 1990).

Allerdings existieren auch auf Grund der Kompartimentierung eine Vielzahl an Isoenzymen. Auch die Cofaktorspezifität der (Iso-)Enzyme spielt in *S. cerevisiae* eine größere Rolle, da *S. cerevisiae* anders als *E. coli* über keine Transhydrogenase verfügt. Beispielsweise besitzt *S. cerevisiae* insgesamt vier Isocitrat-Dehydrogenase-Isoenzyme, die sich in der Lokalisierung und im genutzten Cofaktor unterscheiden. *E. coli* besitzt dagegen nur eine Isocitrat-Dehydrogenase. Dementsprechend war es beispielsweise aufwendiger in *S. cerevisiae* die gewünschte Blockade der Isocitrat-Dehydrogenase-Aktivität zu erreichen.

Nachdem alle im Metabolic Engineering-Konzept für *S. cerevisiae* angestrebten Deletionen umgesetzt waren, zeigte sich, dass der resultierend Stamm *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1$  mit der vollständigen Blockade der Isocitrat-Dehydrogenase-Aktivität eine starke Einschränkung des respirativen Stoffwechsels aufwies und dadurch ungeeignet für die oxidative Succinatbildung war. In *E. coli* führte eine vollständige Deletion der SDH- und IDH-Aktivität der Zelle dagegen zu keinen Einschränkungen im respirativen Metabolismus (Lin *et al.* 2005a).

Für die beiden *S. cerevisiae* SDH-Deletionsstämme AH22ura3  $\Delta sdh2$  und AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1$  sowie für die *S. cerevisiae* SDH-IDH-Deletionsstämme AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta idh1$  und AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1$  konnte in der reaktionstechnischen Charakterisierung ein respiratorischer Stoffwechsel und somit die prinzipielle Eignung zur Succinatproduktion nachgewiesen werden. In diesen Stämmen stünden zwei Routen zur Succinatproduktion, der Glyoxylat-Zyklus sowie der Citrat-Zyklus, zur Verfügung. Die Verwendung beider Routen kann sich vorteilhaft auf die Succinatbildung auswirken (Lin *et al.* 2005d).

Zunächst wurde, nachdem die gewünschten Blockaden im Citrat-Zyklus durch Deletionen erreicht waren, eine prozesstechnische Deregulation des Glyoxylat-Zyklus angestrebt. Die Verwendung der nativen Substrate des Glyoxylat-Zyklus, Ethanol oder Acetat, für Citrat-

Zyklus-Mutanten ist auf Grund des geringen P/O-Verhältnisse bei *S. cerevisiae* energetisch ungünstig (siehe Kapitel 7.2). Aus Ethanol wurde dementsprechend bei den *S. cerevisiae* SDH- oder SDH-IDH-Deletionsstämmen nur eine geringe Succinatbildung begleitet von einer starken Acetatbildung erzielt. Da die Enzyme des Glyoxylat-Zyklus auch unter Zulaufbedingungen mit Glucose nicht induziert werden, wurde untersucht, ob durch ein Zulaufverfahren mit vorangegangener Induktionsphase des Glyoxylat-Zyklus durch das native Substrat Ethanol ein aktiver Glyoxylat-Zyklus erzielbar ist. Auch im Zulaufverfahren und unabhängig von einer vorangegangenen Ethanolinduktionsphase wurde eine geringe kontinuierliche Succinatbildung erzielt. Es blieb allerdings der C<sub>2</sub>-Körper Acetat das Hauptprodukt, was zeigte, dass keine prozesstechnische Deregulation des Glyoxylat-Zyklus möglich war. Auch bei *E. coli* akkumulierte als Folge der SDH-Deletion Acetat. Dies konnte durch Unterbrechung der beider Stoffwechselwege von Pyruvat zu Acetat durch Deletion der Pyruvat-Oxidase und der Phosphotransacetylase und Acetat-Kinase unterbunden werden (Lin *et al.* 2005c). In *S. cerevisiae* erfolgt die Acetatbildung auf einem anderen zweistufigen Reaktionsweg ausgehend von Pyruvat über Acetaldehyd zu Acetat. Dieser cytosolische Weg ist Teil des Pyruvat-Dehydrogenase-Bypasses, über den auf Grund der beschränkten Kapazität der Pyruvat-Dehydrogenase in *S. cerevisiae* bei hohen Glucosekonzentrationen ein großer Teil der Bildung von Acetyl-CoA erfolgt. Zudem stellt dieser Weg als einziger das für den Glyoxylat-Zyklus benötigte cytosolische Acetyl-CoA bereit, da unter physiologischen Bedingungen kein Transport von mitochondrialem Acetyl-CoA ins Cytosol erfolgt (Flikweert *et al.* 1996). Würde also der Pyruvat-Dehydrogenase-Bypass in *S. cerevisiae* deletiert, wäre die cytosolische Succinatbildung über den Glyoxylat-Zyklus nicht mehr möglich. Stattdessen müsste ein Teil des mitochondrialen Citrat-Zyklus verwendet werden, um Acetyl-CoA in Verbindungen wie Citrat oder Isocitrat umzuwandeln, die aus den Mitochondrien transportiert werden können. Nachteilig an diesem Weg ist neben den zusätzlich notwendigen Transportschritten, dass Stämme mit einer Unterbrechung des Pyruvat-Dehydrogenase-Bypasses wegen des Fehlens von cytosolischen Acetyl-CoA nicht mehr in definierten Medien mit Glucose wachsen (Flikweert *et al.* 1996). Somit ist eine Blockade der Acetatbildung in *S. cerevisiae* nicht wie bei *E. coli* über Deletionen möglich.

Letztendlich war die Acetatbildung in den *S. cerevisiae* SDH- und SDH-IDH-Stämmen auch vor allem die Folge des blockierten Zentralstoffwechsels und es wurde eine gentechnische Deregulation des Glyoxylat-Zyklus angestrebt. Zur Aktivierung des Glyoxylat-Zyklus musste in *E. coli* nur *iclR* deletiert werden. Bei *S. cerevisiae* müssen hingegen die einzelnen Enzyme überexprimiert werden.



Auf Basis des verwendeten Hefestammes AH22ura3 waren maximal drei simultane Überexpressionen möglich. Daher musste eine Auswahl für die Überexpressionen unter den fünf Glyoxylat-Zyklus-Enzymen getroffen werden. Gewählt wurden zunächst die beiden Enzyme des Glyoxylat-Bypasses, *ICL1* und *MLS1*, da zu diesen keine Isoenzyme im Citrat-Zyklus existieren und diese bei einer Umstellung der Zellen auf den Glyoxylat-Zyklus zu den am stärksten induzierten Enzyme innerhalb des Glyoxylat-Zyklus gehören (Lorenz und Fink 2001, Duntze *et al.* 1969). Zudem wurde ein Isoenzym der Acetyl-CoA-Synthetase, *ACS1*, ausgewählt, das dieselben Regulationsmuster wie die beiden Enzyme des Glyoxylat-Bypasses aufweist (DeRisi *et al.* 1997, Haurie *et al.* 2001). Dieses sollte die Acetatbildung vermindern und dem Glyoxylat-Zyklus effizient Acetyl-CoA zuführen.

Die Charakterisierung der Deletionsstämme mit einzelnen oder Kombinationen dieser drei Überexpression in Kapitel 9 wies jedoch nach, dass diese partielle Deregulation des Glyoxylat-Zyklus nicht ausreichend war, um eine industriell relevante Succinatproduktion zu erzielen. Zum Glyoxylat-Zyklus gehören neben den überexprimierten Enzymen auch die Enzyme *ACO1*, *CIT2* und *MDH2* (Abbildung 9.9). Auch deren Expression steigt bei einer Umstellung der Zellen auf den Glyoxylat-Zyklus an (Lorenz und Fink 2001, DeRisi *et al.* 1997). Daher sollten bei einer weiteren Stammentwicklung auch diese Enzyme überexprimiert werden. Für einen industriellen Produktionsstamm sollten die Überexpressionen auch nicht mehr, wie in dieser Arbeit, auf Plasmiden erfolgen, sondern ins Genom integriert werden.

Weiterhin sollte durch Überexpression von Acetaldehyd-Dehydrogenasen die Acetatbildung gegenüber der Ethanolbildung gefördert werden, um mehr Substrat für die bereits jetzt überexprimierte *ACS1* bereitzustellen. Unter den fünf Acetaldehyd-Dehydrogenasen würden sich vor allem die NAD<sup>+</sup>-abhängigen Enzyme (*ALD2* und *ALD3*) anbieten, um die Energiegewinnung der Zelle zu fördern.

Ein weiterer Angriffspunkt ergänzend zur vollständigen Deregulation des Glyoxylat-Zyklus ist die CO<sub>2</sub>-Fixierung (Abbildung 9.9). Durch die Überexpression homologer oder heterologer Pyruvat- oder PEP-Carboxylasen kann die zellinterne Konzentration an Oxalacetat gesteigert werden. Dies wurde beispielsweise schon durch Überexpression der homologen *PYC2* in *S. cerevisiae* umgesetzt (Zelle *et al.* 2008). Die CO<sub>2</sub>-Fixierung bildet neben dem Pyruvat-Dehydrogenase-Bypass einen zweiten Weg um Pyruvat (bzw. bereits PEP) in den Glyoxylat-Zyklus einzuschleusen. Zudem ist eine CO<sub>2</sub>-Fixierung zur Bernsteinsäureproduktion auch unter umweltpolitischen Aspekten sehr erstrebenswert.

In *S. cerevisiae* sind im Gegensatz zu *E. coli* nicht nur die Gene der Glyoxylat-Zyklus, sondern auch viele weitere Gene des respirativen Stoffwechsels beispielsweise Gene des Citrat-Zyklus oder der Atmungskette in Gegenwart von Glucose reprimiert (Entian und Schüller 1997, Gancedo 1998, DeRisi *et al.* 1997). Die Glucoserepression und

Katabolitinaktivierung werden durch ein komplexes und noch nicht vollständig aufgeklärtes Zusammenspiel einer Vielzahl von transkriptionell aktivierenden oder reprimierenden Regulationsfaktoren gesteuert (Gancedo 1998). Im Kapitel 10 wurde beispielhaft die Überexpression eines globalen transkriptionellen Regulationsfaktors untersucht. Die *HAP4*-Überexpression erhöhte die Wachstumsrate und Succinatbildung, da sie zu einer Verschiebung des respiro-fermentativen Stoffwechsels zu Gunsten der Respiration führte. Neben den angesprochenen Überexpressionen katalytischer Enzyme muss für eine industrielle Anwendung von *S. cerevisiae* zur Succinatproduktion vor allem auch der Aspekt der Glucosedereprimierung weiter verfolgt werden. Hier könnte beispielsweise eine Deletion der Regulationsfaktoren *mig1* bzw. *mig1* und *mig2*, die wie die Überexpression von *HAP4* zu einer Verschiebung des respiro-fermentativen Stoffwechsel in Richtung Respiration führen, erfolgen (Klein *et al.* 1999, Cortassa und Aon 1998). Zudem könnte eine Überexpression von *HAP1*, das wie *HAP4* als transkriptioneller Aktivator auf die Gene des respirativen Stoffwechsels wirkt (Kwast *et al.* 1998) oder von *SIP4*, das wie *HAP4* zu den positiven Regulationsfaktoren für gluconeogenetische Gene zählt (Vincent und Carlson 1998), in Erwägung gezogen werden.

## 12 Zusammenfassung und Ausblick

Biotechnologisch aus nachwachsenden Rohstoffen produzierte Bernsteinsäure besitzt das Potential Maleinsäureanhydrid, die bisher aus dem fossilen Rohstoff Erdöl gewonnene zentrale C<sub>4</sub>-Plattformchemikalie der chemischen Industrie, zu ersetzen. Statt bisher 15.000 Tonnen Succinat pro Jahr für Spezialanwendungen wird ein Anstieg der Produktion auf 270.000 Tonnen pro Jahr prognostiziert.

Binnen der letzten Jahre wurden bereits zahlreiche Studien zur mikrobiellen Bernsteinsäureproduktion publiziert. Zum einen wurden natürliche, stark Bernsteinsäure sekretierende prokaryontische Mikroorganismen wie beispielsweise *Mannheimia succiniproducens* oder *Basfia succiniciproducens* identifiziert. Die industrielle Nutzung dieser Mikroorganismen wird durch die fehlenden Erfahrungen bezüglich eines großtechnischen industriellen Einsatzes und fehlenden gentechnische Methoden zur Stammoptimierung behindert. Der zweite Ansatz zur mikrobiellen Bernsteinsäureproduktion strebt die Konstruktion eines rekombinanten Succinatproduzenten basierend auf industriell etablierten Plattformorganismen per Metabolic Engineering an. Es wurden bereits rekombinante Bernsteinsäureproduzenten basierend auf den prokaryontischen Plattformorganismen *Escherichia coli* und *Corynebacterium glutamicum* publiziert. Allerdings limitiert die Empfindlichkeit dieser Mikroorganismen gegenüber einem niedrigen pH eine industrielle Umsetzung, da die Produktion der Bulkchemikalie Bernsteinsäure aus Kostengründen bei niedrigen pH erfolgen sollte, um eine direkte Aufarbeitung der undissoziierten Säure aus der Fermentationsbrühe und Einsparungen beim Titrationsmittel zu ermöglichen.

Im Rahmen dieses Forschungsvorhabens wurde die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ausgewählt, um deren Potential für die Herstellung von Bernsteinsäure aus Zucker auszuloten und zu evaluieren. Prozesstechnisch vorteilhaft für die Succinatproduktion ist die hohe pH- und Osmotoleranz von *S. cerevisiae*. Zudem ist dieser exzellent charakterisierte eukaryontische Mikroorganismus bereits ein industriell etablierter, robuster Produktionsorganismus in der Weißen Biotechnologie und bietet sich daher zur Entwicklung neuer biotechnologischer Prozesse zur Herstellung von Basischemikalien wie Succinat an.

Nachdem erste Studien mit einem Wildtypstamm die Succinatoleranz von *S. cerevisiae* bestätigten, wurden anschließend während einer schrittweisen Stammentwicklung über 25 rekombinante *S. cerevisiae* Stämme mit Modifikationen im zentralen Kohlenstoffmetabolismus bei der ORGANOBALANCE GmbH (Berlin) konstruiert und im Rahmen dieser Arbeit umfassend reaktionstechnisch charakterisiert. Zur Analyse aller rekombinanten Stämme unter technischen Bedingungen wurden für aerobe Satzversuche parallele Rührkesselreaktoren im Milliliter-Maßstab genutzt. Für ausgewählte Stämme erfolgten ergänzend auch Zulaufversuche im Liter-Maßstab in einem Laborrührkesselreaktor.

### **Metabolic Design Konzept**

In diesem Forschungsvorhaben wurde das Konzept der aeroben Succinatproduktion mit *S. cerevisiae* als Produktionsorganismus verfolgt, analog zu den Arbeiten zur aeroben Succinatproduktion mit *E. coli* (Lin *et al.* 2005c). Dieses metabolische Konzept strebt eine Succinatbildung ausgehend von Glucose über den im Cytosol lokalisierten Glyoxylat-Zyklus an und erfordert die gentechnische Repression oder Ausschaltung der Aktivitäten der Succinat-Dehydrogenase und der Isocitrat-Dehydrogenasen. Zudem sollte der Glyoxylat-Zyklus durch Überexpression seiner Schlüsselenzyme Isocitrat-Lyase (*ICL1*) und Malat-Synthase (*MLS1*) dereguliert werden (Abbildung 12.1). Durch die weitere Überexpression einer Acetyl-CoA-Synthetase (*ACS1*) sollte cytosolisches Acetyl-CoA für den Glyoxylat-Zyklus bereitgestellt werden. Eine Deregulation kann neben der Überexpression einzelner Enzyme auch durch die Überexpression von globalen Regulationsfaktoren erfolgen.

### **Deletion der Succinat-Dehydrogenase**

Der erste Schritt der Stammentwicklung strebte die Blockade der einzigen succinatabbauenden Reaktion der Zelle an. Diese wird durch die Succinat-Dehydrogenase (SDH) katalysiert. Neben ihrer Funktion im Citrat-Zyklus dient die SDH auch als Komplex II der Atmungskette. Die vergleichende reaktionstechnische Untersuchung der *S. cerevisiae* Stämme mit Deletion einer bzw. beider katalytischen Untereinheiten der SDH, AH22ura3  $\Delta$ *sdh2* und AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *sdh1*, zeigte, dass sich in definierten Medien mit Glucose unter Satzbedingungen die Wachstumsrate der SDH-Deletionsstämme nicht signifikant vom Wildtyp unterschied. Allerdings wiesen die Stämme kein diauxisches Wachstum auf, da Ethanol von den Mutanten kaum in Biomasse sondern vor allem in organischen Säuren wie Acetat und Succinat umgesetzt wurde.

Nur der Verlust beider katalytischen Untereinheiten der Succinat-Dehydrogenase führte zu einem vollständigen Funktionsverlust der SDH. Auch bei Verlust der SDH-Aktivität waren die Zellen noch zur Atmung fähig. Dies ist essentiell für das Konzept zur aeroben Succinatproduktion bei dem Sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor zur Schließung der Redoxbilanz dienen muss.

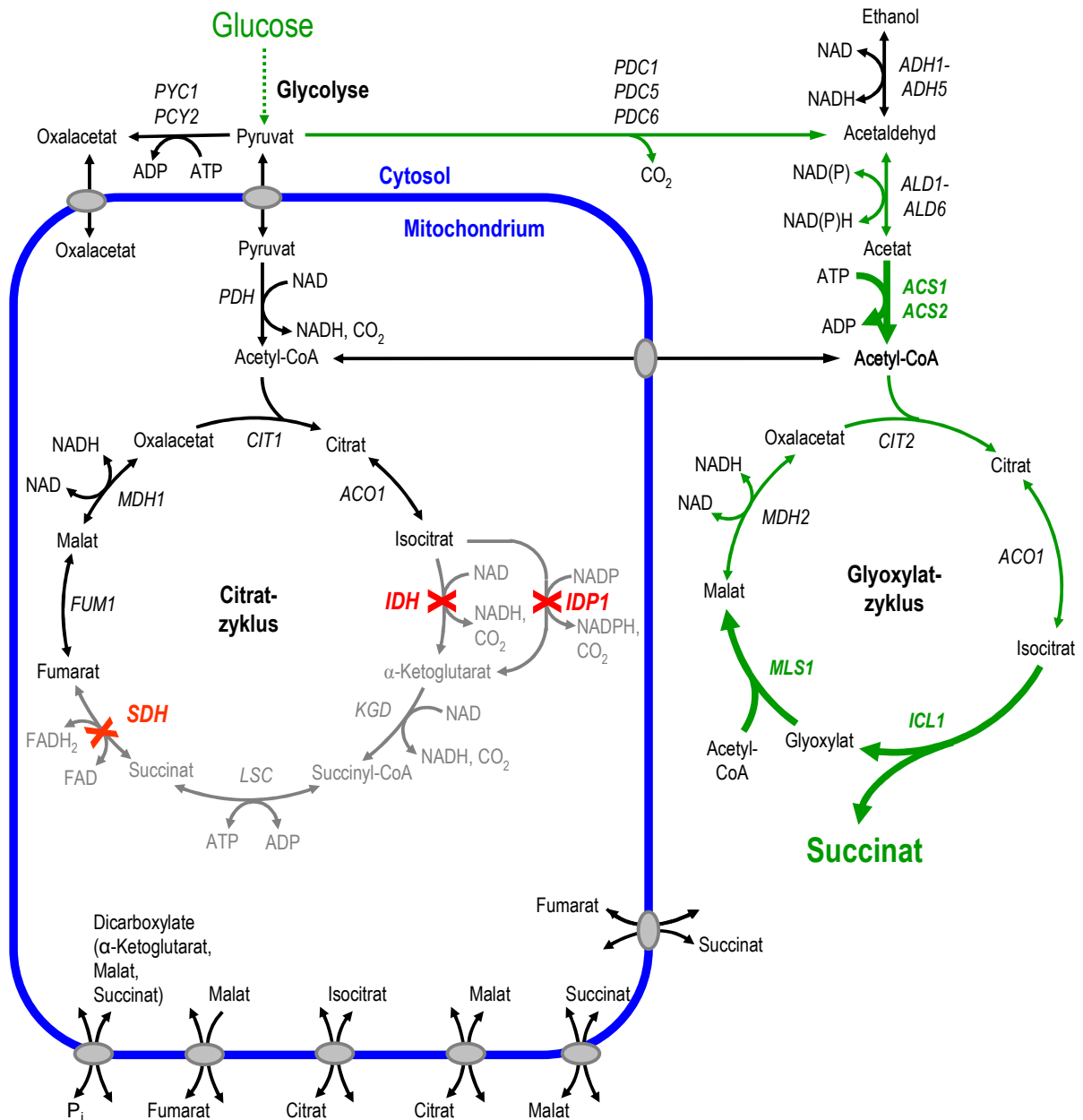


Abbildung 12.1: Zentraler Kohlenstoffmetabolismus von *S. cerevisiae* mit den im Rahmen des Metabolic Engineering vorgenommenen gentechnischen Modifikationen. Deletionen sind durch rote Kreuze und Überexpressionen durch dicke grüne Pfeile dargestellt sind.

Durch Einsatz einer Glucose/Glutamat-Mischung im Zulaufverfahren, durch die ein höherer Kohlenstofffluss durch den Citrat-Zyklus erzielt wurde, konnten mit *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *sdh1* bis zu  $8,5 \text{ g L}^{-1}$  Succinat erreicht werden (Abbildung 12.2). Die Succinatbildung erfolgte wachstumsgekoppelt. Begrenzt wurde die im Zulaufverfahren erzielbare Succinatkonzentration in diesen ersten Deletionsstämmen durch die parallel auftretende und prozesstechnisch nicht vermeidbare Acetatbildung ( $8 \text{ mol}_{\text{Acetat}} \text{ mol}_{\text{Succinat}}^{-1}$ ).

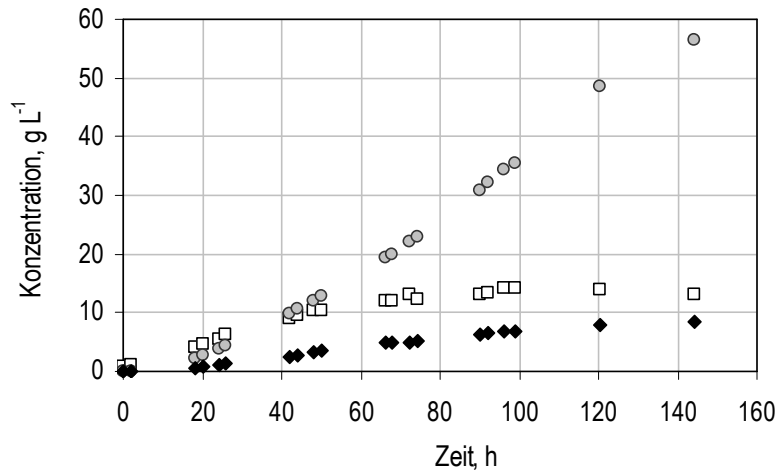


Abbildung 12.2: Herstellung von Succinat mit *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ sdh1 im Zulaufverfahren. Dargestellt sind die Biomasse- (□), Acetat- (○) und Succinatkonzentration (◆) während eines Zulaufexperiments im Laborrührkessel ( $V_0 = 1,0$  L,  $T = 30^\circ\text{C}$ ,  $p\text{O}_2 > 40\%$ ,  $\text{pH} = 6,0$ ,  $c_{\text{XO}} = 1 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ ,  $t = 148$  h). In ein definiertes glutamathaltiges Medium (WM8G-Medium) ohne Kohlenstoffquelle wurden ab Versuchsbeginn kontinuierlich  $0,7 \text{ g}_{\text{Glucose}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  als limitierendes Substrat und  $0,05 \text{ g}_{\text{Glutamat}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  zudosiert.

Da beide SDH-Stämme eine Anreicherung von Succinat unter glucosedereprimierten Bedingungen (Verwendung von Ethanol oder Galactose als Kohlenstoffquelle oder Zulaufverfahren mit Glucose) zeigten, wurden auch beide Stämme als Basis für die weitere Stammentwicklung verwendet.

### Deletion von Isocitrat-Dehydrogenasen

Um die Umlenkung des Kohlenstoffflusses in den Glyoxylat-Zyklus zu fördern, sollte die Isocitrat-Dehydrogenase-Aktivität ausgeschaltet werden. Auf dem angestrebten Substrat Glucose für die Succinatproduktion, tragen in *S. cerevisiae* Wildtypstämmen nur die Enzyme *IDH* und *IDP1* zur Isocitrat-Dehydrogenase-Aktivität der Zelle bei. Daher wurden die *S. cerevisiae* Stämme AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ idh1, AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ sdh1  $\Delta$ idh1 und AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ sdh1  $\Delta$ idh1  $\Delta$ idp1 bei der ORGANOBALANCE GmbH konstruiert und für die reaktionstechnischen Untersuchungen bereitgestellt.

Bei AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ idh1 und AH22ura3  $\Delta$ sdh2  $\Delta$ sdh1  $\Delta$ idh1 führte die zusätzliche Deletion in definierten Medien zur Halbierung der Wachstumsrate mit Glucose. Vor allem unter glucosedereprimierten Bedingungen reicherte sich Succinat gekoppelt mit einer starken Acetatbildung an. Im Zulaufverfahren wurde mit den SDH-IDH-Stämmen eine Erhöhung der Succinatausbeute auf bis zu  $0,05 \text{ mol}_{\text{Succinat}} \text{ mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$  gegenüber den SDH-Stämmen (maximal  $0,03 \text{ mol}_{\text{Succinat}} \text{ mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$ ) erzielt. Auch die SDH-IDH-Stämme waren trotz der weiteren Blockade im Citrat-Zyklus zur Atmung fähig.

Die zusätzliche Deletion des Gens *IDP1* führt zu einer praktisch vollständige Ausschaltung der Isocitrat-Dehydrogenase-Aktivität im Stamm *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2$   $\Delta sdh1$   $\Delta idh1$   $\Delta idp1$ , allerdings kam es gleichzeitig zu einer Verstärkung des fermentativen Metabolismus und zu einer Blockade des respirativen Stoffwechsels.

### Deregulation des Glyoxylat-Zyklus

Da die reaktionstechnische Untersuchung der Stämme mit Deletionen im zentralen Kohlenstoffstoffwechsel zeigte, dass diese neben der Succinatbildung eine starke, prozesstechnisch nicht vermeidbare Bildung von C<sub>2</sub>-Körpern (Acetat oder Ethanol) aufwiesen, sollte als nächster Schritt der Stammentwicklung eine gentechnische Deregulation des Glyoxylat-Zyklus erfolgen.

Bei der Charakterisierung von *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2$   $\Delta sdh1$   $\Delta idh1$   $\Delta idp1$  *ICL1* *MLS1* *ACS1* zeigte sich ein fermentativer Metabolismus und keine verbesserte Succinatbildung durch die Überexpressionen.

Daher wurde stattdessen auf Basis von *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2$   $\Delta idh1$  der Effekt verschiedener Kombinationen an Überexpressionen systematisch evaluiert. Eine Überexpression der *ACS1* oder *MLS1* und *ACS1* steigerte die Succinatkonzentration bereits unter Satzbedingungen. Alle Stämme mit *ICL1*-Überexpression bildeten kein Succinat. Im Stamm AH22ura3  $\Delta sdh2$   $\Delta idh1$  ist der Verlust der SDH-Aktivität unvollständig, so dass über die Isocitrat-Lyase gebildetes Succinat über die SDH-Restaktivität verstoffwechselt werden kann. Somit wurde eine partielle Deregulation des Glyoxylat-Zyklus nachgewiesen. Allerdings war als Folge dieser Deregulation in Kombination mit der unvollständigen SDH-Deletion das Wachstum statt der Succinatbildung erhöht.

Bei *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2$   $\Delta sdh1$  *ICL1* *MLS1* *ACS1* konnte die Succinatausbeute durch die Überexpressionen auf  $0,08 \text{ mol}_{\text{Succinat}} \text{ mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$  gesteigert werden. Allerdings floss auch in diesem Stamm trotz der drei Überexpression der Großteil des Kohlenstoffs vor dem Glyoxylat-Zyklus in C<sub>2</sub>-Körper ab.

Statt weiter einzelne Überexpressionen von Enzymen zu betrachten, wurden daher Deletionsstämme mit Überexpression des transkriptionellen Regulationsfaktors *HAP4* untersucht. Die *HAP4*-Überexpression führte in allen Deletionsstämmen zu einer erhöhten Wachstumsrate und Succinatbildung bei reduzierter Bildung von Gärprodukten wie Glycerin oder Ethanol. Abschließend wurde in *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2$   $\Delta idh1$  *ICL1* *HAP4* die *HAP4* Überexpression mit der Überexpression eines der Enzyme des Glyoxylat-Zyklus kombiniert, was sich ebenfalls vorteilhaft bezüglich der Succinatbildung auswirkte.

## Ausblick

Im Laufe der iterativen Stammentwicklung und -charakterisierung wurde eine Vielzahl an rekombinanten *S. cerevisiae* Stämmen mit Deletionen und Überexpressionen im Zentralstoffwechsel konstruiert und umfassend reaktionstechnisch und metabolisch charakterisiert. Hierdurch konnte eine grundlegende Basis für eine weitere Stamm- und Prozessentwicklung zur biotechnologischen Herstellung von Bernsteinsäure mit der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gelegt werden.

Zur Erhöhung der Succinatproduktion auf industriell relevantes Niveau muss vor allem der Abfluss vor dem Glyoxylat-Zyklus in die C<sub>2</sub>-Körper Ethanol und Acetat unterbunden werden und gleichzeitig der Kohlenstofffluss durch den Glyoxylat-Zyklus verstärkt werden.

Neben den bisher vorgenommen Überexpressionen sind weitere Überexpression von Enzymen des Glyoxylat-Zyklus wie *CIT2*, *ACO1*, und *MDH2* sinnvoll (Abbildung 12.1).

Die Überexpression einer oder mehrere Acetaldehyd-Dehydrogenasen könnte eine Acetatbildung gegenüber der Ethanolbildung fördern, um mehr Substrat für die Bildung von Acetyl-CoA bereitzustellen.

Einen weiteren Angriffspunkt, durch den effizient Kohlenstoff in den Glyoxylat-Zyklus eingespeist werden könnte, bietet die CO<sub>2</sub>-Fixierung. Diese kann durch die Überexpression homologer oder heterologer Pyruvat- oder PEP-Carboxylasen gesteigert werden.

Auch sollte die Deregulierung des respiratorischen Zentralstoffwechsels von *S. cerevisiae* durch Beeinflussung kompletter Stoffwechselwege über globale Regulationsfaktoren, wie in dieser Arbeit durch die Überexpression von *HAP4* gezeigt, weiterverfolgt werden. Beispielsweise könnten weitere Regulationsfaktoren wie *HAP1* oder von *SIP4* überexprimiert werden.

Nach den umfassenden in dieser Arbeit durchgeführten reaktionstechnischen Analysen könnte im Weiteren auch die metabolische Stoffflussanalyse zur Untersuchung der vorliegenden rekombinanten *S. cerevisiae* Stämme genutzt werden. Mit dieser Methodik könnten beispielsweise bei den *S. cerevisiae* Stämmen AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *sdh1* *ICL1* *MLS1* *ACS1* und AH22ura3  $\Delta$ *sdh2*  $\Delta$ *idh1* *ICL1* *MLS1* *ACS1*, die sowohl den oxidativen Zweig des Citrat-Zyklus als auch den Glyoxylat-Zyklus zur Succinatbildung nutzen können, der Beitrag der einzelnen Wege zur Succinatbildung ermittelt werden. Im Vergleich zu Prokaryonten wie beispielsweise *Escherichia coli* oder *Corynebacterium glutamicum* ist die Bestimmung der intrazellulären Stoffflüsse bei eukaryontischen Mikroorganismen wie *S. cerevisiae* wegen der Kompartimentierung und der höhere Anzahl an Reaktionen beispielsweise durch Isoenzyme oder Transporter allerdings deutlich komplexer und aufwendiger (Niklas *et al.* 2010).



### 13 Literaturverzeichnis

Abbott, DA; Knijnenburg, TA; de Poorter, LM; Reinders, MJ; Pronk, JT; van Maris, AJ (2007): Generic and specific transcriptional responses to different weak organic acids in anaerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research*, 7(6), 819-833.

Abbott, DA; Zelle, RM; Pronk, JT; van Maris, AJ (2009): Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of carboxylic acids: current status and challenges. *FEMS yeast research*, 9(8), 1123-1136.

Aiba, S; Nagai, S; Nishizawa, Y (1976): Fed batch culture of *Saccharomyces cerevisiae* - Perspective of computer control to enhance productivity in bakers-yeast cultivation. *Biotechnology and bioengineering*, 18(7), 1001-1016.

Akamatsu, S; Kamiya, H; Yamashita, N; Motoyoshi, T; Goto-Yamamoto, N; Ishikawa, T; Okazaki, N; Nishimura, A (2000): Effects of aldehyde dehydrogenase and acetyl-CoA synthetase on acetate formation in sake mash. *Journal of bioscience and bioengineering*, 90(5), 555-560.

Albers, E; Laize, V; Blomberg, A; Hohmann, S; Gustafsson, L (2003): Ser3p (Yer081wp) and Ser33p (Yil074cp) are phosphoglycerate dehydrogenases in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, 278(12), 10264-10272.

Albers, E; Larsson, C; Lidén, G; Niklasson, C; Gustafsson, L (1996): Influence of the nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation. *Applied and environmental microbiology*, 62(9), 3187-3195.

Aliverdieva, DA; Mamaev, DV; Bondarenko, DI; Sholtz, KF (2006): Properties of yeast *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane dicarboxylate transporter. *Biochemistry*, 71(10), 1161-1169.

Andersson, C; Helmerius, J; Hodge, D; Berglund, KA; Rova, U (2009a): Inhibition of succinic acid production in metabolically engineered *Escherichia coli* by neutralizing agent, organic acids, and osmolarity. *Biotechnology progress*, 25(1), 116-123.

- Andersson, C; Petrova, E; Berglund, KA; Rova, U (2009b): Maintaining high anaerobic succinic acid productivity by product removal. *Bioprocess and biosystems engineering*. DOI10.1007/s00449-009-0393-y
- Annesley, TM (2003): Ion suppression in mass spectrometry. *Clinical chemistry*, 49(7), 1041-1044.
- Ansell, R; Granath, K; Hohmann, S; Thevelein, JM; Adler, L (1997): The two isoenzymes for yeast NAD<sup>+</sup>-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by *GPD1* and *GPD2* have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *The EMBO journal*, 16(9), 2179-2187.
- Arikawa, Y; Enomoto, K; Muratsubaki, H; Okazaki, M (1998): Soluble fumarate reductase isoenzymes from *Saccharomyces cerevisiae* are required for anaerobic growth. *FEMS microbiology letters*, 165(1), 111-116.
- Arikawa, Y; Kuroyanagi, T; Shimosaka, M; Muratsubaki, H; Enomoto, K; Kodaira, R; Okazaki, M (1999): Effect of gene disruptions of the TCA cycle on production of succinic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bioscience and bioengineering*, 87(1), 28-36.
- Atkinson, DE (1968): The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry*, 7(11), 4030-4034.
- Bailey, JE (1991): Toward a science of metabolic engineering. *Science*, 252(5013), 1668-1675.
- Bakker, BM; Overkamp, KM; van Maris, AJ; Kötter, P; Luttik, MA; van Dijken JP; Pronk, JT (2001): Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS microbiology reviews*, 25(1), 15-37.
- Ball, WJ; Atkinson, DE (1975): Adenylate energy charge in *Saccharomyces cerevisiae* during starvation. *Journal of bacteriology*, 121(3), 975-982.
- Barnett, JA (1997): Sugar utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. In: Zimmerman, FK; Entian, KD (Hg.): *Yeast sugar metabolism*. *Biochemistry, genetics, biotechnology and applications*. Technomic Publishing, Lancaster, 35-43.

Bechthold, I; Bretz, K; Kabasci, S; Kopitzky, R; Springer, A (2008): Succinic acid: A new platform chemical for biobased polymers from renewable resources. *Chemical Engineering and Technology*, 31(5), 647-654.

Belli, G; Gari, E; Piedrafita, L; Aldea, M; Herrero, E (1998): An activator/repressor dual system allows tight tetracycline-regulated gene expression in budding yeast. *Nucleic Acids Research*, 26(4), 942-947.

Berens, C; Hillen, W (2003): Gene regulation by tetracyclines. Constraints of resistance regulation in bacteria shape *TetR* for application in eukaryotes. *FEBS Journal*, 270(15), 3109-3121.

Bien, M; Kolodynski, J; Lachowicz, TM (1978): Respiratory mutation and galactose metabolism in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta microbiologica Polonica*, 27(3), 193-202.

Biomass R & D Technical Advisory Committee (2002): Vision for Bioenergy and Biobased Products in the United States. Online verfügbar unter <http://www.bioproducts-bioenergy.gov>.

Blank, LM; Kuepfer, L; Sauer, U (2005): Large-scale <sup>13</sup>C-flux analysis reveals mechanistic principles of metabolic network robustness to null mutations in yeast. *Genome biology*, 6(6), R49.

Blom, J; de Mattos, MJ; Grivell, LA (2000): Redirection of the respiro-fermentative flux distribution in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of the transcription factor *Hap4p*. *Applied and environmental microbiology*, 66(5), 1970-1973.

Bonander, N; Ferndahl, C; Mostad, P; Wilks, MD; Chang, C; Showe, L; Gustafsson, L; Larsson, C; Bill, RM (2008): Transcriptome analysis of a respiratory *Saccharomyces cerevisiae* strain suggests the expression of its phenotype is glucose insensitive and predominantly controlled by *Hap4*, *Cat8* and *Mig1*. *BMC genomics*, 9), 365.

Boubekeur, S; Bunoust, O; Camougrand, N; Castroviejo, M; Rigoulet, M; Guérin, B (1999): A mitochondrial pyruvate dehydrogenase bypass in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, 274(30), 21044-21048.

Bruinenberg, PM; van Dijken, JP; Scheffers, WA (1983a): A theoretical-analysis of NADPH production and consumption in yeasts. *Journal of general microbiology*, 129(APR), 953-964.

Bruinenberg, PM; van Dijken, JP; Scheffers, WA (1983b): An enzymic analysis of NADPH production and consumption in *Candida utilis*. *Journal of general microbiology*, 129(4), 965-971.

Buschlen, S; Amillet, JM; Guiard, B; Fournier, A; Marcireau, C; Bolotin-Fukuhara, M (2003): The *S. cerevisiae* HAP Complex, a Key Regulator of Mitochondrial Function, Coordinates Nuclear and Mitochondrial Gene Expression. *Comparative and functional genomics*, 4(1), 37-46.

Çakar, ZP; Sauer, U; Bailey, JE (1999): Metabolic engineering of yeast: the perils of auxotrophic hosts. *Biotechnology Letters*, 21(7), 611-616.

Camarasa, C; Grivet, J; Dequin, S (2003): Investigation by <sup>13</sup>C-NMR and tricarboxylic acid (TCA) deletion mutant analysis of pathways for succinate formation in *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic fermentation. *Microbiology*, 149(Pt 9), 2669-2678.

Canelas, AB; Ras, C; Pierick, A ten; van Dam, JC; Heijnen, JJ; van Gulik, WM (2008): Leakage-free rapid quenching technique for yeast metabolomics. *Metabolomics*, 4(3), 226-239.

Cannizzaro, C; Valentinotti, S; Stockar, U von (2004): Control of yeast fed-batch process through regulation of extracellular ethanol concentration. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 26(6), 377-383.

Casal, M; Paiva, S; Queiros, O; Soares-Silva, I (2008): Transport of carboxylic acids in yeasts. *FEMS microbiology reviews*, 32(6), 974-994.

Caspary, F; Hartig, A; Schuller, HJ (1997): Constitutive and carbon source-responsive promoter elements are involved in the regulated expression of the *Saccharomyces cerevisiae* malate synthase gene *MLS1*. *Molecular & general genetics: MGG*, 255(6), 619-627.

Chatterjee, R; Millard, CS; Champion, K; Clark, DP; Donnelly, MI (2001): Mutation of the *ptsG* gene results in increased production of succinate in fermentation of glucose by *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, 67(1), 148-154.

Chaves, RS; Herrero, P; Ordiz, I; del Angeles, BM; Moreno, F (1997): Isocitrate lyase localisation in *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Gene*, 198(1-2), 165-169.

Chopra, R; Sharma, VM; Ganesan, K (1999): Elevated growth of *Saccharomyces cerevisiae* ATH1 null mutants on glucose is an artifact of nonmatching auxotrophies of mutant and reference strains. *Applied and environmental microbiology*, 65(5), 2267-2268.

Chung, T; Klumpp, DJ; LaPorte, DC (1988): Glyoxylate bypass operon of *Escherichia coli*: cloning and determination of the functional map. *Journal of bacteriology*, 170(1), 386-392.

Cimini, D; Patil, KR; Schiraldi, C; Nielsen, J (2009): Global transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to the deletion of *SDH3*. *BMC systems biology*, 3, 17.

Ciriacy, M (1977): Isolation and characterization of yeast mutants defective in intermediary carbon metabolism and in carbon catabolite derepression. *Molecular & general genetics: MGG*, 154(2), 213-220.

Ciriacy, M; Reifenberger, E (1997): Hexose transport. In: Zimmerman, FK; Entian, KD (Hg.): *Yeast sugar metabolism. Biochemistry, genetics, biotechnology and applications*. Technomic Publishing, Lancaster, 45-65.

Clark, DP (1989): The fermentation pathways of *Escherichia coli*. *FEMS microbiology reviews*, 5(3), 223-234.

Colby, G; Ishii, Y; Tzagoloff, A (1998): Suppression of *sdh1* mutations by the *SDH1b* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14(11), 1001-1006.

Coleman, ST; Fang, TK; Rovinsky, SA; Turano, FJ; Moye-Rowley, WS (2001): Expression of a glutamate decarboxylase homologue is required for normal oxidative stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, 276(1), 244-250.

Contreras-Shannon, V; Lin, A; McCammon, MT; McAlister-Henn, L (2005): Kinetic properties and metabolic contributions of yeast mitochondrial and cytosolic NADP<sup>+</sup>-specific isocitrate dehydrogenases. *The Journal of biological chemistry*, 280(6), 4469-4475.

Cooper, TG (1982): Nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. In: Strathern, JN; Jones, EW; Broach, JR (Hg.): *The molecular biology of the yeast Saccharomyces: Metabolism and Gene Expression*. Cold Spring Harbor, NY, 1-37.

Cornils, B; Lappe, P (2002): Dicarboxylic acids, aliphatic. *Ullmann's Enzyklopedia of industrial chemistry*. Wiley-VCH, Weinheim.

Cortassa, S; Aon, MA (1998): The onset of fermentative metabolism in continuous cultures depends on the catabolite repression properties of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and microbial technology*, 22(8), 705-712.

Costanzo, M; Baryshnikova, A; Bellay, J; Kim, Y; Spear, ED; Sevier, CS; Ding, H; Koh, JL; Toufighi, K; Mostafavi, S; Prinz, J; St Onge, RP; VanderSluis, B; Makhnevych, T; Vizeacoumar, FJ; Alizadeh, S; Bahr, S; Brost, RL; Chen, Y; Cokol, M; Deshpande, R; Li, Z; Lin, ZY; Liang, W; Marback, M; Paw, J; San, LB; Shuteriqi, E; Tong, AH; van, DN; Wallace, IM; Whitney, JA; Weirauch, MT; Zhong, G; Zhu, H; Houry, WA; Brudno, M; Ragibizadeh, S; Papp, B; Pal, C; Roth, FP; Giaever, G; Nislow, C; Troyanskaya, OG; Bussey, H; Bader, GD; Gingras, AC; Morris, QD; Kim, PM; Kaiser, CA; Myers, CL; Andrews, BJ; Boone, C (2010): The genetic landscape of a cell. *Science*, 327(5964), 425-431.

Cox, SJ; Shalel Levanon, S; Sanchez, A; Lin, H; Peercy, B; Bennett, GN; San, K (2006): Development of a metabolic network design and optimization framework incorporating implementation constraints: a succinate production case study. *Metabolic engineering*, 8(1), 46-57.

Cupp, JR; McAlister-Henn, L (1991): NAD(+)-dependent isocitrate dehydrogenase. Cloning, nucleotide sequence, and disruption of the *IDH2* gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, 266(33), 22199-22205.

Cupp, JR; McAlister-Henn, L (1992): Cloning and characterization of the gene encoding the *IDH1* subunit of NAD(+)-dependent isocitrate dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, 267(23), 16417-16423.

Cupp, JR; McAlister-Henn, L (1993): Kinetic analysis of NAD(+)-isocitrate dehydrogenase with altered isocitrate binding sites: contribution of *IDH1* and *IDH2* subunits to regulation and catalysis. *Biochemistry*, 32(36), 9323-9328.

Daignan-Fornier, B; Valens, M; Lemire, BD; Bolotin-Fukuhara, M (1994): Structure and regulation of *SDH3*, the yeast gene encoding the cytochrome b560 subunit of respiratory complex II. *The Journal of biological chemistry*, 269(22), 15469-15472.

Dantigny, P; Ninow, JL; Marc, I; Engasser, JM (1989): Representation of changes in the metabolic pattern of baker's yeast from measurements of extracellular pyruvate, acetate, acetaldehyde and ethanol. *Biotechnology Letters*, 11(7), 515-520.

Daran-Lapujade, P; Jansen, ML; Daran, JM; van, GW; de, WJ; Pronk, JT (2004): Role of transcriptional regulation in controlling fluxes in central carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. A chemostat culture study. The Journal of biological chemistry, 279(10), 9125-9138.

Davis, CP; Cleven, D; Brown, J; Balish, E (1976): *Anaerobiospirillum*, a New Genus of Spiral-Shaped Bacteria. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 26, 498-504.

de Jong-Gubbels, P; van den Berg, MA; Luttkik, MA; Steensma, HY; van Dijken, JP; Pronk, JT (1998): Overproduction of acetyl-coenzyme A synthetase isoenzymes in respiring *Saccharomyces cerevisiae* cells does not reduce acetate production after exposure to glucose excess. FEMS microbiology letters, 165(1), 15-20.

de Jong-Gubbels, P; van den Berg, MA; Steensma, HY; van Dijken, JP; Pronk, JT (1997): The *Saccharomyces cerevisiae* acetyl-coenzyme A synthetase encoded by the *ACS1* gene, but not the *ACS2*-encoded enzyme, is subject to glucose catabolite inactivation. FEMS microbiology letters, 153(1), 75-81.

de Koning W.; van Dam K. (1992): A method for the determination of changes of glycolytic metabolites in yeast on a subsecond time scale using extraction at neutral pH. Analytical biochemistry, 204(1), 118-123.

Dennis, RA; Rhodey, M; McCammon, MT (1999): Yeast mutants of glucose metabolism with defects in the coordinate regulation of carbon assimilation. Archives of biochemistry and biophysics, 365(2), 279-288.

DeRisi, JL; Iyer, VR; Brown, PO (1997): Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. Science, 278(5338), 680-686.

Dickinson, JR; Schweizer, M (2004): The metabolism and molecular physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. CRC Press, Boca Raton, 2. ed.

DIN 32633 (1998): Verfahren der Standardaddition. Deutsches Institut für Normung e.V., Beuth Verlag GmbH, Berlin.

Dixon, GH; Kornberg, HL (1959): Assay methods for key enzymes of the glyoxylate cycle,. Biochemical Journal, 72, 3P.

Donnelly, MI; Millard, CS; Clark, DP; Chen, MJ; Rathke, JW (1998): A novel fermentation pathway in an *Escherichia coli* mutant producing succinic acid, acetic acid, and ethanol. *Applied biochemistry and biotechnology*, 70-72), 187-198.

Drewke, C; Thielen, J; Ciriacy, M (1990): Ethanol formation in *adh0* mutants reveals the existence of a novel acetaldehyde-reducing activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology*, 172(7), 3909-3917.

Duarte, NC; Herrgård, MJ; Palsson, BØ (2004): Reconstruction and validation of *Saccharomyces cerevisiae* iND750, a fully compartmentalized genome-scale metabolic model. *Genome research*, 14(7), 1298-1309.

Duboc, P; Stockar, U von (1998): Systematic errors in data evaluation due to ethanol stripping and water vaporization. *Biotechnology and bioengineering*, 58(4), 428-439.

Duntze, W; Neumann, D; Gancedo, JM; Atzpodien, W; Holzer, H (1969): Studies on the regulation and localization of the glyoxylate cycle enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Journal*, 10(1), 83-89.

Ehrenberg, J (2002): Current situation and future prospects of EU industry using renewable raw materials. Online verfügbar unter [http://europa.eu.int/comm/enterprise/environment/reports\\_studies/reports/rrm\\_awarenessreport\\_2002.pdf](http://europa.eu.int/comm/enterprise/environment/reports_studies/reports/rrm_awarenessreport_2002.pdf).

Enomoto, K; Ohki, R; Muratsubaki, H (1996): Cloning and sequencing of the gene encoding the soluble fumarate reductase from *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA research*, 3(4), 263-267.

Entian, KD; Schüller, HJ (1997): Glucose repression (carbon catabolite repression) in yeast. In: Zimmerman, FK.; Entian, KD. (Hg.): *Yeast sugar metabolism*. Biochemistry, genetics, biotechnology and applications. Technomic Publishing, Lancaster, 409-434.

Eraso, P; Gancedo, JM (1984): Catabolite repression in yeasts is not associated with low levels of cAMP. *FEBS Journal*, 141(1), 195-198.



European Renewable Resources and Materials Association (2007): Accelerating the Development of the Market for Bio-based Products in Europe. Online verfügbar unter [http://ec.europa.eu/enterprise/policies/innovation/files/lead-market-initiative/bio\\_based\\_products\\_taksforce\\_report\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/enterprise/policies/innovation/files/lead-market-initiative/bio_based_products_taksforce_report_en.pdf).

Fernandez, E; Fernandez, M; Moreno, F; Rodicio, R (1993a): Transcriptional regulation of the isocitrate lyase encoding gene in *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS letters, 333(3), 238-242.

Fernandez, E; Fernandez, M; Rodicio, R (1993b): Two structural genes are encoding malate synthase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS letters, 320(3), 271-275.

Fernandez, E; Moreno, F; Rodicio, R (1992): The *ICL1* gene from *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Journal, 204(3), 983-990.

Flikweert, MT; van der Zanden, L; Janssen, WM; Steensma, HY; van Dijken, JP; Pronk, JT (1996): Pyruvate decarboxylase: an indispensable enzyme for growth of *Saccharomyces cerevisiae* on glucose. Yeast, 12(3), 247-257.

Flores, CL; Rodriguez, C; Petit, T; Gancedo, C (2000): Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. FEMS microbiology reviews, 24(4), 507-529.

Follmann, M; Ochrombel, I; Kramer, R; Trotschel, C; Poetsch, A; Ruckert, C; Huser, A; Persicke, M; Seiferling, D; Kalinowski, J; Marin, K (2009): Functional genomics of pH homeostasis in *Corynebacterium glutamicum* revealed novel links between pH response, oxidative stress, iron homeostasis and methionine synthesis. BMC Genomics, 10(1), 621.

Forsburg, SL; Guarente, L (1989): Identification and characterization of *HAP4*: a third component of the CCAAT-bound *HAP2/HAP3* heteromer. Genes & development, 3(8), 1166-1178.

Förster, A (2006): Die Nutzung der Hefe *Yarrowia lipolytica* zur Produktion von Citronensäure aus nachwachsenden Rohstoffen. Dissertation. Technischen Universität Dresden.

Fraenkel, DG (1982): Carbohydrate Metabolism. In: Strathern, JN; Jones, EW; Broach, JR (Hg.): The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*: Metabolism and Gene Expression. Cold Spring Harbor, NY, 1-37.

Fraunhofer-Gesellschaft (2005): Perspektiven für Zukunftsmärkte. Online verfügbar unter [http://www.hannover.ihk.de/fileadmin/pdf/ihk/themen/forschung\\_innovation/051101\\_perspektiven\\_zukunftsmärkte2005.pdf](http://www.hannover.ihk.de/fileadmin/pdf/ihk/themen/forschung_innovation/051101_perspektiven_zukunftsmärkte2005.pdf).

Fukuhara, H (2003): The Kluver effect revisited. *FEMS yeast research*, 3(4), 327-331.

Gadde, DM; McCammon, MT (1997): Mutations in the *IDH2* gene encoding the catalytic subunit of the yeast NAD<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase can be suppressed by mutations in the *CIT1* gene encoding citrate synthase and other genes of oxidative metabolism. *Archives of biochemistry and biophysics*, 344(1), 139-149.

Gancedo, C; Serrano, R (1989): Energy yielding metabolism. In: Rose, Anthony H; Harrison, JS (Hg.): *The Yeasts: Metabolism and Physiology of Yeasts*. Academic Press Inc, London, 2. Auflage), 205-259

Gancedo, JM (1998): Yeast carbon catabolite repression. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 62(2), 334-361.

Gancedo, JM; Gancedo, C (1997): Gluconeogenesis and Catabolite Inactivation. In: Zimmerman, FK; Entian, KD (Hg.): *Yeast sugar metabolism. Biochemistry, genetics, biotechnology and applications*. Technomic Publishing, Lancaster), 359-377.

Gangloff, SP; Marguet, D; Lauquin, GJ (1990): Molecular cloning of the yeast mitochondrial aconitase gene (*ACO1*) and evidence of a synergistic regulation of expression by glucose plus glutamate. *Molecular and cellular biology*, 10(7), 3551-3561.

Gari, E; Piedrafita, L; Aldea, M; Herrero, E (1997): A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 13(9), 837-848.

Glassner, DA; Datta, R (1992): Process for the production and purification of succinic acid. Veröffentlichungsnummer: US5143834.

Görgens, JF; van Zyl, WH; Knoetze, JH; Hahn-Hagerdal, B (2001): The metabolic burden of the *PGK1* and *ADH2* promoter systems for heterologous xylanase production by *Saccharomyces cerevisiae* in defined medium. *Biotechnology and bioengineering*, 73(3), 238-245.

Goffeau, A; Barrell, BG; Bussey, H; Davis, RW; Dujon, B; Feldmann, H; Galibert, F; Hoheisel, JD; Jacq, C; Johnston, M; Louis, EJ; Mewes, HW; Murakami, Y; Philippsen, P; Tettelin, H; Oliver, SG (1996): Life with 6000 genes. *Science*, 274(5287), 546, 563-7.

Gokarn, RR; Evans, JD; Walker, JR; Martin, SA; Eiteman, MA; Altman, E (2001): The physiological effects and metabolic alterations caused by the expression of *Rhizobium etli* pyruvate carboxylase in *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology*, 56(1-2), 188-195.

Gombert, AK; Moreira, dS; Christensen, B; Nielsen, J (2001): Network identification and flux quantification in the central metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* under different conditions of glucose repression. *Journal of bacteriology*, 183(4), 1441-1451.

Guettler, MV; Jain, MK; Soni B.K. (1996a): Process for making succinic acid, microorganisms for use in the process and methods of obtaining the microorganisms. Veröffentlichungsnummer: US5504004.

Guettler, MV; Rumler, D; Jain, MK (1999): *Actinobacillus succinogenes* sp. nov., a novel succinic-acid-producing strain from the bovine rumen. *International journal of systematic bacteriology*, 49(1), 207-216.

Guettler, MV; Jain, MK; Rumler, D (1996b): Method for making succinic acid, bacterial variants for use in the process, and methods for obtaining variants. Veröffentlichungsnummer: US5573931.

Hansen, J; Kielland-Brandt, MC (1996): Modification of biochemical pathways in industrial yeasts. *Journal of biotechnology*, 49, 1-12.

Hartig, A; Simon, MM; Schuster, T; Daugherty, JR; Yoo, HS; Cooper, TG (1992): Differentially regulated malate synthase genes participate in carbon and nitrogen metabolism of *S. cerevisiae*. *Nucleic acids research*, 20(21), 5677-5686.

Haselbeck, RJ; McAlister-Henn, L (1991): Isolation, nucleotide sequence, and disruption of the *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding mitochondrial NADP(H)-specific isocitrate dehydrogenase. *The Journal of biological chemistry*, 266(4), 2339-2345.

Haselbeck, RJ; McAlister-Henn, L (1993): Function and expression of yeast mitochondrial NAD- and NADP-specific isocitrate dehydrogenases. *The Journal of biological chemistry*, 268(16), 12116-12122.

Haurie, V; Perrot, M; Mini, T; Jenou, P; Saggiocco, F; Boucherie, H (2001): The transcriptional activator *Cat8p* provides a major contribution to the reprogramming of carbon metabolism during the diauxic shift in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, 276(1), 76-85.

Heerde, E; Radler, F (1978): Metabolism of the anaerobic formation of succinic acid by *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology*, 117(3), 269-276.

Heinisch, JJ; Valdes, E; Alvarez, J; Rodicio, R (1996): Molecular genetics of *ICL2*, encoding a non-functional isocitrate lyase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 12(13), 1285-1295.

Henke, B; Girzalsky, W; Berteaux-Lecellier, V; Erdmann, R (1998): IDP3 encodes a peroxisomal NADP-dependent isocitrate dehydrogenase required for the beta-oxidation of unsaturated fatty acids. *The Journal of biological chemistry*, 273(6), 3702-3711.

Herrero, P; Fernandez, R; Moreno, F (1985): Differential sensitivities to glucose and galactose repression of gluconeogenic and respiratory enzymes from *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of microbiology*, 143(3), 216-219.

Hiller, J; Franco-Lara, E; Papaioannou, V; Weuster-Botz, D (2007): Fast sampling and quenching procedures for microbial metabolic profiling. *Biotechnology Letters*, 29(8), 1161-1167.

Hodge, DB; Andersson, C; Berglund, KA; Rova, U (2009): Detoxification requirements for bioconversion of softwood dilute acid hydrolyzates to succinic acid. *Enzyme and microbial technology*, 44(5), 309-316.

Hofman-Bang, J (1999): Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biotechnology*, 12(1), 35-73.

Hong, SH; Kim, JS; Lee, SY; In, YH; Choi, SS; Rih, J; Kim, CH; Jeong, H; Hur, CG; Kim, JJ (2004): The genome sequence of the capnophilic rumen bacterium *Mannheimia succiniciproducens*. *Nature biotechnology*, 22(10), 1275-1281.

Hou, J; Lages, NF; Oldiges, M; Vemuri, GN (2009): Metabolic impact of redox cofactor perturbations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic engineering*, 11(4-5), 253-261.

Ikeda, M (2003): Amino acid production processes. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 79, 1-35.

Imai, T; Ohno, T (1995): Measurement of yeast intracellular pH by image processing and the change it undergoes during growth phase. *Journal of biotechnology*, 38(2), 165-172.

Inui, M; Murakami, S; Okino, S; Kawaguchi, H; Vertès, AA; Yukawa, H (2004): Metabolic analysis of *Corynebacterium glutamicum* during lactate and succinate productions under oxygen deprivation conditions. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 7(4), 182-196.

Jouhten, P; Rintala, E; Huuskonen, A; Tamminen, A; Toivari, M; Wiebe, M; Ruohonen, L; Penttila, M; Maaheimo, H (2008): Oxygen dependence of metabolic fluxes and energy generation of *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-1A. *BMC systems biology*, 2.

Kakhniashvili, D; Mayor, JA; Gremse, DA; Xu, Y; Kaplan, RS (1997): Identification of a novel gene encoding the yeast mitochondrial dicarboxylate transport protein via overexpression, purification, and characterization of its protein product. *The Journal of biological chemistry*, 272(7), 4516-4521.

Kamm, B; Kamm, M (2004): Principles of biorefineries. *Applied microbiology and biotechnology*, 64(2), 137-145.

Kamm, B; Gruber, PR; Kamm, M (2006): *Biorefineries - industrial processes and products. Status quo and future directions.* Wiley-VCH, Weinheim.

Kaplan, RS; Mayor, JA; Gremse, DA; Wood, DO (1995): High level expression and characterization of the mitochondrial citrate transport protein from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, 270(8), 4108-4114.

Keys, DA; McAlister-Henn, L (1990): Subunit structure, expression, and function of NAD(H)-specific isocitrate dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology*, 172(8), 4280-4287.

- Kim, KS; Rosenkrantz, MS; Guarente, L (1986): *Saccharomyces cerevisiae* contains two functional citrate synthase genes. *Molecular and cellular biology*, 6(6), 1936-1942.
- Kim, P; Laivenieks, M; Vieille, C; Zeikus, JG (2004): Effect of overexpression of *Actinobacillus succinogenes* phosphoenolpyruvate carboxykinase on succinate production in *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, 70(2), 1238-1241.
- Kircher, M (2006): White biotechnology: ready to partner and invest in. *Biotechnology journal*, 1(7-8), 787-794.
- Klein, CJ; Rasmussen, JJ; Ronnow, B; Olsson, L; Nielsen, J (1999): Investigation of the impact of *MIG1* and *MIG2* on the physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of biotechnology*, 68(2-3), 197-212.
- Kleinzeller, A (1941): The formation of succinic acid in yeast. *The Biochemical journal*, 35(4), 495-501.
- Kohlhaw, GB; Tan-Wilson, A (1977): Carnitine acetyltransferase: candidate for the transfer of acetyl groups through the mitochondrial membrane of yeast. *Journal of bacteriology*, 129(2), 1159-1161.
- Kornberg, HL (1966): The role and control of the glyoxylate cycle in *Escherichia coli*. *The Biochemical journal*, 99(1), 1-11.
- Kratzer, S; Schuller, HJ (1995): Carbon source-dependent regulation of the acetyl-coenzyme A synthetase-encoding gene *ACS1* from *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 161(1), 75-79.
- Kubo, Y; Takagi, H; Nakamori, S (2000): Effect of gene disruption of succinate dehydrogenase on succinate production in a sake yeast strain. *Journal of bioscience and bioengineering*, 90(6), 619-624.
- Kühne, M; Ihnen, D; Möller, G; Agthe, O (2000): Stability of Tetracycline in Water and Liquid Manure. *Journal of Veterinary Medicine, Series A*, 47(6), 379-384.
- Kunze, M; Kragler, F; Binder, M; Hartig, A; Gurvitz, A (2002): Targeting of malate synthase 1 to the peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae* cells depends on growth on oleic acid medium. *FEBS Journal*, 269(3), 915-922.

Kurtzman, CP (1998): The yeasts. A taxonomic study. Elsevier, Amsterdam, 4. rev. and enlarged ed.

Kurzrock, T; Weuster-Botz, D (2009): Recovery of succinic acid from fermentation broth. *Biotechnology Letters*. 32), 331-339.

Kusterer, A (2007): Reaktionstechnische Optimierung von Parallelreaktoren für kontrollierte Bioprozesse. Dissertation. Dissertation. Technischen Universität München.

Kwast, KE; Fau-Burke, PV; Burke PV (1998): Oxygen sensing and the transcriptional regulation of oxygen-responsive genes in yeast. *Journal of Experimental Biology*. 201(8), 1177-95.

Lagunas, R (1976): Energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* discrepancy between ATP balance and known metabolic functions. *Biochimica et biophysica acta*, 440(3), 661-674.

Lang, C; Looman, AC (1995): Efficient expression and secretion of *Aspergillus niger* RH5344 polygalacturonase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied microbiology and biotechnology*, 44(1-2), 147-156.

LaPorte, DC (1993): The isocitrate dehydrogenase phosphorylation cycle: regulation and enzymology. *Journal of cellular biochemistry*, 51(1), 14-18.

Lascaris, R; Bussemaker, HJ; Boorsma, A; Piper, M; van der Spek, H; Grivell, L; Blom, J (2003): *Hap4p* overexpression in glucose-grown *Saccharomyces cerevisiae* induces cells to enter a novel metabolic state. *Genome biology*, 4(1), R3.

Lascaris, R; Piwowarski, J; van der Spek, H; de Mattos, MJ; Grivell, L; Blom, J (2004): Overexpression of *HAP4* in glucose-derepressed yeast cells reveals respiratory control of glucose-regulated genes. *Microbiology*, 150(4), 929-934.

Lee, PC; Lee, SY; Hong, SH; Chang, HN (2002): Isolation and characterization of a new succinic acid-producing bacterium, *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E, from bovine rumen. *Applied microbiology and biotechnology*, 58(5), 663-668.

- Lee, SJ; Song, H; Lee, SY (2006): Genome-based metabolic engineering of *Mannheimia succiniciproducens* for succinic acid production. *Applied and environmental microbiology*, 72(3), 1939-1948.
- Lemire, BD; Oyedotun, KS (2002): The *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial succinate:ubiquinone oxidoreductase. *Biochimica et biophysica acta*, 1553(1-2), 102-116.
- Lin, A; Hakala, KW; Weintraub, ST; McAlister-Henn, L (2008): Suppression of metabolic defects of yeast isocitrate dehydrogenase and aconitase mutants by loss of citrate synthase. *Archives of biochemistry and biophysics*, 474(1), 205-212.
- Lin, H; Bennett, GN; San, K (2005a): Chemostat culture characterization of *Escherichia coli* mutant strains metabolically engineered for aerobic succinate production: a study of the modified metabolic network based on metabolite profile, enzyme activity, and gene expression profile. *Metabolic engineering*, 7(5-6), 337-352.
- Lin, H; Bennett, GN; San, K (2005b): Fed-batch culture of a metabolically engineered *Escherichia coli* strain designed for high-level succinate production and yield under aerobic conditions. *Biotechnology and bioengineering*, 90(6), 775-779.
- Lin, H; Bennett, GN; San, K (2005c): Genetic reconstruction of the aerobic central metabolism in *Escherichia coli* for the absolute aerobic production of succinate. *Biotechnology and bioengineering*, 89(2), 148-156.
- Lin, H; Bennett, GN; San, K (2005d): Metabolic engineering of aerobic succinate production systems in *Escherichia coli* to improve process productivity and achieve the maximum theoretical succinate yield. *Metabolic engineering*, 7(2), 116-127.
- Lin, H; San, K; Bennett, GN (2005e): Effect of *Sorghum vulgare* phosphoenolpyruvate carboxylase and *Lactococcus lactis* pyruvate carboxylase coexpression on succinate production in mutant strains of *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology*, 67(4), 515-523.
- Link, H (2009): Rapid MediaTransition for Metabolic Control Analysis of Fed-Batch Fermentation Processes. Dissertation. Technischen Universität München.
- Litsanov, B; Brocker, M; Bott, M (2009): Succinat-Produktion mit *Corynebacterium glutamicum*. *Chemie Ingenieur Technik*, 81(8), 1229.



Lodi, T; Saliola, M; Donnini, C; Goffrini, P (2001): Three target genes for the transcriptional activator Cat8p of *Kluyveromyces lactis*: acetyl coenzyme A synthetase genes KIACS1 and KIACS2 and lactate permease gene KIJEN1. *Journal of bacteriology*, 183(18), 5257-5261.

Loftus, TM; Hall, LV; Anderson, SL; McAlister-Henn, L (1994): Isolation, characterization, and disruption of the yeast gene encoding cytosolic NADP-specific isocitrate dehydrogenase. *Biochemistry*, 33(32), 9661-9667.

Lopez, ML; Redruello, B; Valdes, E; Moreno, F; Heinisch, JJ; Rodicio, R (2004): Isocitrate lyase of the yeast *Kluyveromyces lactis* is subject to glucose repression but not to catabolite inactivation. *Current genetics*, 44(6), 305-316.

Lopez-Boado, YS; Herrero, P; Gascon, S; Moreno, F (1987): Catabolite inactivation of isocitrate lyase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of microbiology*, 147(3), 231-234.

Lorenz, MC; Fink, GR (2001): The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. *Nature*, 412(6842), 83-86.

Löser, C; Schröder, A; Deponte, S; Bley, T (2005): Balancing the ethanol formation in continuous bioreactors with ethanol stripping. *Engineering in Life Sciences*, 5(4), 325-332.

Luli, GW; Strohl, WR (1990): Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. *Applied and environmental microbiology*, 56(4), 1004-1011.

Luo, B; Groenke, K; Takors, R; Wandrey, C; Oldiges, M (2007): Simultaneous determination of multiple intracellular metabolites in glycolysis, pentose phosphate pathway and tricarboxylic acid cycle by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1147(2), 153-164.

Luttik, MA; Kotter, P; Salomons, FA; van der Klei, IJ; van Dijken, JP; Pronk, JT (2000): The *Saccharomyces cerevisiae* *ICL2* gene encodes a mitochondrial 2-methylisocitrate lyase involved in propionyl-coenzyme A metabolism. *Journal of bacteriology*, 182(24), 7007-7013.

Luttik, MA; Overkamp, KM; Kotter, P; Vries, S de; van Dijken, JP; Pronk, JT (1998): The *Saccharomyces cerevisiae* *NDE1* and *NDE2* genes encode separate mitochondrial NADH dehydrogenases catalyzing the oxidation of cytosolic NADH. *The Journal of biological chemistry*, 273(38), 24529-24534.

Magasanik, B; Kaiser, CA (2002): Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 290(1-2), 1-18.

Maloy, SR; Nunn, WD (1982): Genetic regulation of the glyoxylate shunt in *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology*, 149(1), 173-180.

Mashego, MR; Rumbold, K; De, MM; Vandamme, E; Soetaert, W; Heijnen, JJ (2007): Microbial metabolomics: past, present and future methodologies. *Biotechnology Letters*, 29(1), 1-16.

Maya, D; Quintero, MJ; La Cruz Muñoz-Centeno, M de; Chávez, S (2008): Systems for applied gene control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, 30(6), 979-987.

McCammon, MT (1996): Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with defects in acetate metabolism: isolation and characterization of Acn-mutants. *Genetics*, 144(1), 57-69.

McCammon, MT; Veenhuis, M; Trapp, SB; Goodman, JM (1990): Association of glyoxylate and beta-oxidation enzymes with peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology*, 172(10), 5816-5827.

McCammon, MT; Epstein, CB; Przybyla-Zawislak, B; McAlister-Henn, L; Butow, RA (2003): Global transcription analysis of Krebs tricarboxylic acid cycle mutants reveals an alternating pattern of gene expression and effects on hypoxic and oxidative genes. *Molecular biology of the cell*, 14(3), 958-972.

McCammon, MT; McAlister-Henn, L (2003): Multiple cellular consequences of isocitrate dehydrogenase isozyme dysfunction. *Archives of biochemistry and biophysics*, 419(2), 222-233.

McKinlay, JB; Vieille, C; Zeikus, JG (2007): Prospects for a bio-based succinate industry. *Applied microbiology and biotechnology*, 76(4), 727-740.

McKinlay, JB; Zeikus, JG; Vieille, C (2005): Insights into *Actinobacillus succinogenes* fermentative metabolism in a chemically defined growth medium. *Applied and environmental microbiology*, 71(11), 6651-6656.

McNeil, MM; Martone, WJ; Dowell, VR (1987): Bacteremia with *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. *Reviews of infectious diseases*, 9(4), 737-742.

Mendoza-Vega, O; Sabatie, J; Brown, SW (1994): Industrial production of heterologous proteins by fed-batch cultures of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS microbiology reviews, 15(4), 369-410.

Millard, CS; Chao, YP; Liao, JC; Donnelly, MI (1996): Enhanced production of succinic acid by overexpression of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Escherichia coli*. Applied and environmental microbiology, 62(5), 1808-1810.

Miller, SM; Magasanik, B (1990): Role of NAD-linked glutamate dehydrogenase in nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of bacteriology, 172(9), 4927-4935.

Minard, KI; McAlister-Henn, L (2009): Redox responses in yeast to acetate as the carbon source. Archives of biochemistry and biophysics, 483(1), 136-143.

Narendranath, NV; Thomas, KC; Ingledew, WM (2001): Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. Journal of industrial microbiology & biotechnology, 26(3), 171-177.

Navarro-Avino, JP; Prasad, R; Miralles, VJ; Benito, RM; Serrano, R (1999): A proposal for nomenclature of aldehyde dehydrogenases in *Saccharomyces cerevisiae* and characterization of the stress-inducible ALD2 and ALD3 genes. Yeast, 15, 829-842.

Nevoigt, E; Stahl, U (1997): Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS microbiology reviews, 21(3), 231-241.

Nevoigt, E (2008): Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology and molecular biology reviews: MMBR, 72(3), 379-412.

Nghiem, NP; Davison, BH; Suttle, BE; Richardson, GR (1997): Production of succinic acid by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. Applied biochemistry and biotechnology, 63-65), 565-576.

Niklas, J; Schneider, K; Heinzle, E (2010): Metabolic flux analysis in eukaryotes. Analytical Biotechnology. Current Opinion in Biotechnology, 21(1), 63-69.

O'Connor, GM; Sanchez-Riera, F; Cooney, CL (1992): Design and evaluation of control strategies for high cell density fermentations. Biotechnology and bioengineering, 39(3), 293-304.

- Octave, S; Thomas, D (2009): Biorefinery: Toward an industrial metabolism. *Biochimie*, 91(6), 659-664.
- Oka, H; Ikai, Y; Kawamura, N; Yamada, M; Harada, K; Ito, S; Suzuki, M (1989): Photodecomposition products of tetracycline in aqueous solution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(1), 226-231.
- Okino, S; Noburyu, R; Suda, M; Jojima, T; Inui, M; Yukawa, H (2008): An efficient succinic acid production process in a metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* strain. *Applied microbiology and biotechnology*, 81(3), 459-464.
- Ordiz, I; Herrero, P; Rodicio, R; Moreno, F (1995): Glucose-induced inactivation of isocitrate lyase in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by an internal decapeptide sequence. *FEBS letters*, 367(3), 219-222.
- Ostergaard, S; Olsson, L; Johnston, M; Nielsen, J (2000a): Increasing galactose consumption by *Saccharomyces cerevisiae* through metabolic engineering of the GAL gene regulatory network. *Nature biotechnology*, 18(12), 1283-1286.
- Ostergaard, S; Olsson, L; Nielsen, J (2000b): Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR, 64(1), 34-50.
- Otero, JM (2009): Industrial systems biology and metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. A case study in succinic acid production. Dissertation. Chalmers University of Technology, Göteborg.
- Otero, JM; Panagiotou, G; Olsson, L (2007): Fueling industrial biotechnology growth with bioethanol. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 108), 1-40.
- Oura, E (1977): Reaction products of yeast fermentations. *Process Biochemistry*, 12), 19-22.
- Pallotta, ML; Fratianni, A; Passarella, S (1999): Metabolite transport in isolated yeast mitochondria: fumarate/malate and succinate/malate antiports. *FEBS letters*, 462(3), 313-316.
- Palmieri, L; Lasorsa, FM; de Palma, A; Palmieri, F; Runswick, MJ; Walker, JE (1997): Identification of the yeast *ACR1* gene product as a succinate-fumarate transporter essential for growth on ethanol or acetate. *FEBS letters*, 417(1), 114-118.

- Palmieri, L; Vozza, A; Hönlinger, A; Dietmeier, K; Palmisano, A; Zara, V; Palmieri, F (1999): The mitochondrial dicarboxylate carrier is essential for the growth of *Saccharomyces cerevisiae* on ethanol or acetate as the sole carbon source. *Molecular microbiology*, 31(2), 569-577.
- Palmqvist, E; Hahn-Hagerdal, B (2000): Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource technology*, 74(1), 25-33.
- Pampulha, ME; Loureiro-Dias, MC (2000): Energetics of the effect of acetic acid on growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS microbiology letters*, 184(1), 69-72.
- Pascual, C; Alonso, A; Garcia, I; Romay, C; Kotyk, A (1988): Effect of ethanol on glucose transport, key glycolytic enzymes, and proton extrusion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and bioengineering*, 32(3), 374-378.
- Paster, M; Pellegrino, J; Carole, T (2003): Industrial Bioproducts - Today and Tomorrow. Energetics Incorporated Columbia, Maryland. Online verfügbar unter [http://webdev.its.iastate.edu/webnews/data/site\\_biorenew\\_reading/30/webnewsfilefield\\_file/Industrial-Bioproducts-2003.pdf](http://webdev.its.iastate.edu/webnews/data/site_biorenew_reading/30/webnewsfilefield_file/Industrial-Bioproducts-2003.pdf).
- Patel, M (2006): BREW - Medium and long-term opportunities and risks of the biotechnological production of bulk chemicals from renewable resources. Online verfügbar unter <http://www.chem.uu.nl/brew/programme.html>.
- Patil, KR; Rocha, I; Förster, J; Nielsen, J (2005): Evolutionary programming as a platform for in silico metabolic engineering. *BMC bioinformatics*, 6), 308.
- Pfefferle, WM (2003): Biotechnological manufacture of lysine. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 79, 59-112.
- Piekarska, K; Hardy, G; Mol, E; van, dB; Strijbis, K; van, RC; van, dB; Distel, B (2008): The activity of the glyoxylate cycle in peroxisomes of *Candida albicans* depends on a functional beta-oxidation pathway: evidence for reduced metabolite transport across the peroxisomal membrane. *Microbiology*, 154(Pt 10), 3061-3072.
- Pines, O; Even-Ram, S; Elnathan, N; Battat, E; Aharonov, O; Gibson, D; Goldberg, I (1996): The cytosolic pathway of L-malic acid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of fumarase. *Applied microbiology and biotechnology*, 46(4), 393-399.

Polakis, ES; Bartley, W (1965): Changes in the enzyme activities of *Saccharomyces cerevisiae* during aerobic growth on different carbon sources. *The Biochemical journal*, 97(1), 284-297.

Polakowski, T; Bastl, R; Stahl, U; Lang, C (1999): Enhanced sterol-acyl transferase activity promotes sterol accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied microbiology and biotechnology*, 53(1), 30-35.

Polakowski, T; Stahl, U; Lang, C (1998): Overexpression of a cytosolic hydroxymethylglutaryl-CoA reductase leads to squalene accumulation in yeast. *Applied microbiology and biotechnology*, 49(1), 66-71.

Pons, M; Rajab, A; Engasser, J (1996): Influence of acetate on growth kinetics and production control of *Saccharomyces cerevisiae* on glucose and ethanol. *Applied biochemistry and biotechnology*, 24(3), 193-198.

Prior, BA; Hohmann, S (1997): Glycerol production and osmoregulation. In: Zimmerman, FK.; Entian, KD (Hg.): *Yeast sugar metabolism. Biochemistry, genetics, biotechnology and applications.* Technomic Publishing, Lancaster), 313-337.

Pronk, JT; Yde Steensma, H; van Dijken, JP (1996): Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 12(16), 1607-1633.

Pronk, JT (2002): Auxotrophic yeast strains in fundamental and applied research. *Applied and environmental microbiology*, 68(5), 2095-2100.

Przybyla-Zawislak, B; Gadde, DM; Ducharme, K; McCammon, MT (1999): Genetic and biochemical interactions involving tricarboxylic acid cycle (TCA) function using a collection of mutants defective in all TCA cycle genes. *Genetics*, 152(1), 153-166.

Puskeiler, R (2004): *Miniaturisierte Parallelreaktoren zur Hochdurchsatz-Bioprozessentwicklung.* Dissertation. Technischen Universität München.

Regev-Rudzki, N; Battat, E; Goldberg, I; Pines, O (2009): Dual localization of fumarase is dependent on the integrity of the glyoxylate shunt. *Molecular microbiology*, 72(2), 297-306.

Robinson, KM; Kieckebusch-Gück, A von; Lemire, BD (1991): Isolation and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant disrupted for the succinate dehydrogenase flavoprotein subunit. *The Journal of biological chemistry*, 266(32), 21347-21350.

Romano, JD; Kolter, R (2005): Pseudomonas-Saccharomyces interactions: influence of fungal metabolism on bacterial physiology and survival. *Journal of bacteriology*, 187(3), 940-948.

Romano, P; Suzzi, G (1993): Acetoin production in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS microbiology letters*, 108(1), 23-26.

Rosenfeld, E; Beauvoit, B (2003): Role of the non-respiratory pathways in the utilization of molecular oxygen by *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 20(13), 1115-1144.

Rosenkrantz, M; Kell, CS; Pennell, EA; Devenish, LJ (1994): The *HAP2,3,4* transcriptional activator is required for derepression of the yeast citrate synthase gene, *CIT1*. *Molecular microbiology*, 13(1), 119-131.

Rubio-Teixeira, M (2005): A comparative analysis of the GAL genetic switch between not-so-distant cousins: *Saccharomyces cerevisiae* versus *Kluyveromyces lactis*. *FEMS yeast research*, 5(12), 1115-1128.

Samuelov, NS; Lamed, R; Lowe, S; Zeikus, JG (1991): Influence of CO<sub>2</sub>-HCO<sub>3</sub> Levels and pH on Growth, Succinate Production, and Enzyme Activities of *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. *Applied and environmental microbiology*, 57(10), 3013-3019.

Sánchez, AM; Bennett, GN; San, K (2005): Novel pathway engineering design of the anaerobic central metabolic pathway in *Escherichia coli* to increase succinate yield and productivity. *Metabolic engineering*, 7(3), 229-239.

Sauer, M; Porro, D; Mattanovich, D; Branduardi, P (2008): Microbial production of organic acids: expanding the markets. *Trends in biotechnology*, 26(2), 100-108.

Schmalix, W; Bandlow, W (1993): The ethanol-inducible *YAT1* gene from yeast encodes a presumptive mitochondrial outer carnitine acetyltransferase. *The Journal of biological chemistry*, 268(36), 27428-27439.

Schmidt, FR (2004): Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Applied microbiology and biotechnology*, 65(4), 363-372.

Schöler, A; Schüller, HJ (1993): Structure and regulation of the isocitrate lyase gene *ICL1* from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Current genetics*, 23(5-6), 375-381.

Scholten, E; Dägele, D (2008): Succinic acid production by a newly isolated bacterium. *Biotechnology Letters*, 30(12), 2143-2146.

Scholten, E; Renz, T; Thomas, J (2009): Continuous cultivation approach for fermentative succinic acid production from crude glycerol by *Basfia succiniciproducens* DD1. *Biotechnology Letters*, 31(12), 1947-1951.

Schuller, H (2003): Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Current genetics*, 43(3), 139-160.

Schumpe, A (1993): The estimation of gas solubilities in salt solutions. *Chemical Engineering Science*, 48(1), 153-158.

Schumpe, A; Quicker, G; Deckwer, W (1982): Gas solubilities in microbial culture media. *Advances in Biochemical Engineering*. (24), 1-38.

Song, H; Lee, SY (2006): Production of succinic acid by bacterial fermentation. *Enzyme and microbial technology*, 39(3), 352-361.

Stucka, R; Dequin, S; Salmon, JM; Gancedo, C (1991): DNA sequences in chromosomes II and VII code for pyruvate carboxylase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of pyruvate carboxylase-deficient strains. *Molecular & general genetics: MGG*, 229(2), 307-315.

Taylor, KM; Kaplan, CP; Gao, X; Baker, A (1996): Localization and targeting of isocitrate lyases in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Biochemical journal*, 319, 255-262.

ter Schure, EG; van Riel, NA; Verrips, CT (2000): The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS microbiology reviews*, 24(1), 67-83.



Thomas, KC; Hynes, SH; Ingledew, WM (2002): Influence of medium buffering capacity on inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth by acetic and lactic acids. *Applied and environmental microbiology*, 68(4), 1616-1623.

Usaite, R; Patil, KR; Grotkjaer, T; Nielsen, J; Regenber, B (2006): Global transcriptional and physiological responses of *Saccharomyces cerevisiae* to ammonium, L-alanine, or L-glutamine limitation. *Applied and environmental microbiology*, 72(9), 6194-6203.

van den Berg, MA; de Jong-Gubbels, P; Kortland, CJ; van Dijken, JP; Pronk, JT; Steensma, HY (1996): The two acetyl-coenzyme A synthetases of *Saccharomyces cerevisiae* differ with respect to kinetic properties and transcriptional regulation. *The Journal of biological chemistry*, 271(46), 28953-28959.

van den Brink, J; Akeroyd, M; van der Hoeven, R; Pronk, JT; Winde, JH de; Daran-Lapujade, P (2009): Energetic limits to metabolic flexibility: responses of *Saccharomyces cerevisiae* to glucose-galactose transitions. *Microbiology*, 155, 1340-1350.

van Dijken, JP; Bauer, J; Brambilla, L; Duboc, P; Francois, JM; Gancedo, C; Giuseppin, ML; Heijnen, JJ; Hoare, M; Lange, HC; Madden, EA; Niederberger, P; Nielsen, J; Parrou, JL; Petit, T; Porro, D; Reuss, M; van Riel, N; Rizzi, M; Steensma, HY; Verrips, CT; Vindeløv, J; Pronk, JT (2000): An interlaboratory comparison of physiological and genetic properties of four *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Enzyme and microbial technology*, 26(9-10), 706-714.

van Dijken, JP; Scheffers, WA (1986): Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS microbiology letters*, 32(3-4), 199-224.

van Dijken, JP; Weusthuis, RA; Pronk, JT (1993): Kinetics of growth and sugar consumption in yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*, 63(3-4), 343-352.

van Hoek, P; de Hulster, EA; van Dijken, JP; Pronk, JT (2000): Fermentative capacity in high-cell-density fed-batch cultures of baker's yeast. *Biotechnology and bioengineering*, 68(5), 517-523.

van Maris, AJ; Bakker, BM; Brandt, M; Boorsma, A; de Mattos, MJ; Grivell, LA; Pronk, JT; Blom, J (2001): Modulating the distribution of fluxes among respiration and fermentation by overexpression of *HAP4* in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research*, 1(2), 139-149.

van Urk, H; Voll, WS; Scheffers, WA; van Dijken, JP (1990): Transient-State Analysis of Metabolic Fluxes in Crabtree-Positive and Crabtree-Negative Yeasts. *Applied and environmental microbiology*, 56(1), 281-287.

Vanni, P; Giachetti, E; Pinzauti, G; McFadden, BA (1990): Comparative structure, function and regulation of isocitrate lyase, an important assimilatory enzyme. *Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry*, 95(3), 431-458.

Veen, M (2002): Identifizierung von Regulationspunkten des Ergosterolbiosyntheseweges und Etablierung des 7-Dehydrocholesterolbiosyntheseweges in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation. Technische Universität Berlin.

Veen, M; Lang, C (2004): Production of lipid compounds in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied microbiology and biotechnology*, 63(6), 635-646.

Veen, M; Stahl, U; Lang, C (2003): Combined overexpression of genes of the ergosterol biosynthetic pathway leads to accumulation of sterols in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research*, 4(1), 87-95.

Vemuri, GN; Eiteman, MA; Altman, E (2002a): Effects of growth mode and pyruvate carboxylase on succinic acid production by metabolically engineered strains of *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, 68(4), 1715-1727.

Vemuri, GN; Eiteman, MA; Altman, E (2002b): Succinate production in dual-phase *Escherichia coli* fermentations depends on the time of transition from aerobic to anaerobic conditions. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 28(6), 325-332.

Vemuri, GN; Eiteman, MA; McEwen, JE; Olsson, L; Nielsen, J (2007): Increasing NADH oxidation reduces overflow metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(7), 2402-2407.

Verduyn, C; Postma, E; Scheffers, WA; van, DJ (1990): Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-limited chemostat cultures. *Journal of general microbiology*, 136(3), 395-403.

Verduyn, C; Stouthamer, AH; Scheffers, WA; van Dijken, JP (1991): A theoretical evaluation of growth yields of yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*, 59(1), 49-63.

Verduyn, C; Zomerdijk, TP; van Dijken, JP; Scheffers, WA (1983): Continuous measurement of ethanol production by aerobic yeast suspensions with an enzyme electrode. *Applied Microbiology*, 19(3), 181-185.

Villas-Boas, SG; Kesson, M; Nielsen, J (2005): Biosynthesis of glyoxylate from glycine in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research*, 5(8), 703-709.

Vincent, O; Carlson, M (1998): *Sip4*, a *Snf1* kinase-dependent transcriptional activator, binds to the carbon source-responsive element of gluconeogenic genes. *The EMBO journal*, 17(23), 7002-7008.

Vries, S de; Marres, CA (1987): The mitochondrial respiratory chain of yeast. Structure and biosynthesis and the role in cellular metabolism. *Biochimica et biophysica acta*, 895(3), 205-239.

Walker, GM (1998): *Yeast physiology and biotechnology*. Wiley, Chichester

Wang, X; Mann, CJ; Bai, Y; Ni, L; Weiner, H (1998): Molecular cloning, characterization, and potential roles of cytosolic and mitochondrial aldehyde dehydrogenases in ethanol metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology*, 180(4), 822-830.

Warnecke, T; Gill, RT (2005): Organic acid toxicity, tolerance, and production in *Escherichia coli* biorefining applications. *Microbial cell factories*, 4), 25.

Werpy, T; Petersen, G (2004): *Top Value Added Chemicals From Biomass Volume I: Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas*. US Department of Energy. Online verfügbar unter <http://www1.eere.energy.gov/biomass/pdfs/35523.pdf>.

Weuster-Botz, D; Graaf, AA de (1996): Reaction engineering methods to study intracellular metabolite concentrations. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 54), 75-108.

Weuster-Botz, D (1999): *Die Rolle der Reaktionstechnik in der mikrobiellen Verfahrensentwicklung*. Schriften des Forschungszentrums Jülich, Reihe Lebenswissenschaften/Life Sciences

Willke, T; Vorlop, K (2004): Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry. *Applied microbiology and biotechnology*, 66(2), 131-142.

Winde, JH de; Grivell, LA (1993): Global regulation of mitochondrial biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Progress in nucleic acid research and molecular biology, 46), 51-91.

Winkler, AA; de Hulster, EA; van Dijken, JP; Pronk, JT (2008): Malic acid production in recombinant yeast. Veröffentlichungsnummer: US20080090273.

Wishart, JA; Hayes, A; Wardleworth, L; Zhang, N; Oliver, SG (2005): Doxycycline, the drug used to control the tet-regulatable promoter system, has no effect on global gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 22(7), 565-569.

Wu, H; Li, Z; Zhou, L; Ye, Q (2007): Improved succinic acid production in the anaerobic culture of an *Escherichia coli* pflB ldhA double mutant as a result of enhanced anaplerotic activities in the preceding aerobic culture. Applied and environmental microbiology, 73(24), 7837-7843.

Yoo, HS; Genbauffe, FS; Cooper, TG (1985): Identification of the ureidoglycolate hydrolase gene in the DAL gene cluster of *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular and cellular biology, 5(9), 2279-2288.

Zeikus, JG; Jain, MK; Elankovan, P (1999): Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. Applied microbiology and biotechnology, 51(5), 545-552.

Zelle, RM; de Hulster, EA; van Winden, WA; Waard, P de; Dijkema, C; Winkler, AA; Geertman, JA; van Dijken, JP; Pronk, JT; van Maris, AJ (2008): Malic acid production by *Saccharomyces cerevisiae*: engineering of pyruvate carboxylation, oxaloacetate reduction, and malate export. Applied and environmental microbiology, 74(9), 2766-2777.

Zhao, WN; McAlister-Henn, L (1996): Expression and gene disruption analysis of the isocitrate dehydrogenase family in yeast. Biochemistry, 35(24), 7873-7878.

Zhao, WN; McAlister-Henn, L (1997): Affinity purification and kinetic analysis of mutant forms of yeast NAD<sup>+</sup>-specific isocitrate dehydrogenase. The Journal of biological chemistry, 272(35), 21811-21817.

---

Zheng, P; Dong, J; Sun, Z; Ni, Y; Fang, L (2009): Fermentative production of succinic acid from straw hydrolysate by *Actinobacillus succinogenes*. *Bioresource technology*, 100(8), 2425-2429.

## 14 Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

Tabelle 14.1: Abkürzungen

Abkürzung	Begriff
AAT	Aspartat-Aminotransferase
Ace	Acetat
ACO	Aconitase
ACS	Acetyl-CoenzymA-Synthetase
ADH	Alkohol-Dehydrogenase
ADP	Adenosindiphosphat
AGX	Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase
ALD	Acetaldehyd-Dehydrogenase
ALT	Alanin-Transaminase
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BTM	Biotrockenmasse
CER	Kohlendioxidbildungsrate (Carbon Evolution Rate)
CIT	Citrat-Synthase
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CoA	Coenzym A
Cyt c	Cytochrom c
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	Energy Charge
Eth	Ethanol
FAD	Flavinadenindinucleotid (oxidierte Form)
FADH	Flavinadenindinucleotid (reduzierte Form)
FRD	Fumaratreduktase
FUM	Fumarase
G418	Geneticin
GABA	γ-Aminobuttersäure
GDA	Glutamin-Deaminase
GLS	Glutaminase
Glt	Glutamat
Glu	Glucose
Gly	Glycerin

Abkürzung	Begriff
GOGAT	Glutamat-Synthase
GRAS	Generally Recognized As Safe
GS	Glutamin-Synthetase
H <sub>2</sub> O	Wasser
His	Histidin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatography)
ICL	Isocitrat-Lyase
IDH	NAD <sup>+</sup> -abhängige Isocitrat-Dehydrogenase
IDP	NADP <sup>+</sup> -abhängige Isocitrat-Dehydrogenase
<i>K. lactis</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>
KGD	α-Ketoglutarat-Dehydrogenase
Leu	Leucin
LSC	Succinyl-CoA-Ligase
MDH	Malat-Dehydrogenase
MLS	Malat-Synthase
MTP	Mikrotiterplatte
n.a.	nicht auswertbar
n.d.	nicht detektiert
NAD <sup>+</sup>	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (oxidierte Form)
NAD <sup>+</sup> -GDH	NAD <sup>+</sup> -abhängige Glutamat-Dehydrogenase
NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (reduzierte Form)
NADP <sup>+</sup>	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduzierte Form)
NADPH-GDH	NADPH-abhängige Glutamat-Dehydrogenase
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Ammonium
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate buffered saline
PDC	Pyruvat-Decarboxylase
PDH	Pyruvat-Dehydrogenase
PEP	Phosphoenolpyruvat
P <sub>i</sub>	anorganischem Phosphat
PP <sub>i</sub>	anorganisches Pyrophosphat.
ptsG	Phosphotransferasesystem
PYC	Pyruvat-Carboxylase

---

Abkürzung	Begriff
rek	rekombinant
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDH	Succinat-Dehydrogenase
Suc	Succinat
Suc	Succinat
Tet	Tetracyclin
tTA	transcriptional Transactivator
tTA	transcriptional Transaktivator
UQ	Ubichinon
UQH <sub>2</sub>	Ubichinol
Ura	Uracil
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
wt	Wildtyp
YEPD	Yeast Extract Peptone Dextrose,
YNB	Yeast nitrogen base

---



Tabelle 14.2: Symbole

Symbol	Begriff	Einheit
$A_{324}$	Absorption bei 324	-
$b$	Länge des Lichtwege	mm
$c_{i,aus}$	Konzentration der Komponente i im Ablauf	$\text{g L}^{-1}$
$c_{i,ein}$	Konzentration der Komponente i im Zulauf	$\text{g L}^{-1}$
$c_{O_2}$	Sauerstoffkonzentration im Medium	$\text{g L}^{-1}$
$c_{O_2}^*$	Sättigungskonzentration von Sauerstoff im Medium	$\text{g L}^{-1}$
$c_P$	Konzentration des Produkts	$\text{g L}^{-1}$
$c_S$	Konzentration des limitierenden Substrats	$\text{g L}^{-1}$
$c_{S,0}$	Substratkonzentration zu Beginn der exponentiellen Phase	$\text{g L}^{-1}$
$c_X$	Biomassekonzentration	$\text{g L}^{-1}$
$c_{X,0}$	Biomassekonzentration zu Beginn der exponentiellen Phase	$\text{g L}^{-1}$
$EA_X$	spezifische Enzymaktivität	$\text{U g}_{\text{BTM}}^{-1}$
$\varepsilon_{GP}$	molarer Extinktionskoeffizient für Glyoxylat-Phenylhydrazon	$\text{L mol}^{-1} \text{mm}^{-1}$
$f_X$	Korrelationsfaktor zur Umrechnung der optischen Dichte in die Biotrockenmassekonzentration	$\text{g L}^{-1}$
$k$	Ethanolverdunstungskonstante	$\text{h}^{-1}$
$k_L a$	volumetrischer Stoffübergangskoeffizient für Sauerstoff	$\text{s}^{-1}$
$K_S$	Sättigungskonstante des limitierenden Substrats	$\text{g L}^{-1}$
$h_{P,i}$	Kohlenstoffgehalt von Produkt i	$\text{mol}_C \text{mol}^{-1}$
$h_{S,i}$	Kohlenstoffgehalt von Substrat i	$\text{mol}_C \text{mol}^{-1}$
$\mu$	spezifische Wachstumsrate	$\text{h}^{-1}$
$\mu_{\max}$	maximale Wachstumsrate unter nicht limitierenden Bedingungen	$\text{h}^{-1}$
$m_S$	konstante Substrataufnahme für den Erhaltungsstoffwechsel	$\text{g g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$
$OD$	Optische Dichte bei Wellenlänge von 660 nm	-
$OUR$	Sauerstoffaufnahme (oxygen uptake rate)	$\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$

Symbol	Begriff	Einheit
$OTR$	Sauerstofftransferrate (oxygen transfer rate)	$\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$
$q_P$	spezifische Produktbildungsrate	$\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$
$q_i$	spezifische Aufnahme- oder Bildungsrate der Komponente i	$\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$
$q_S$	spezifische Substrataufnahmerate	$\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$
$q_{S,m}$	Substrataufnahme für den Erhaltungsstoffwechsel	$\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$
$q_{S,\mu}$	Substrataufnahme für das Zellwachstum	$\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$
$q_{S,P}$	Substrataufnahme für die Produktbildung	$\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$
$RQ$	Respiratorischer Koeffizient	-
$t$	Zeit	h
$T$	Temperatur	°C
$\gamma_{CO_2,aus}$	Stoffmengenanteile des Kohlendioxids in der Abluft	%
$\gamma_{CO_2,ein}$	Stoffmengenanteile des Kohlendioxids in der Zuluft	%
$\gamma_{O_2,aus}$	Stoffmengenanteile des Sauerstoffs in der Abluft	%
$\gamma_{O_2,ein}$	Stoffmengenanteile des Sauerstoffs in der Zuluft	%
$Y^*_{P/S}$	Ertragskoeffizient für die Produktbildung aus Substrat	$\text{g g}^{-1}$
$Y^*_{X/O}$	Ertragskoeffizient Biotrockenmasse aus Sauerstoff	$\text{g}_{\text{BTM}} \text{g}^{-1}$
$Y^*_{X/S}$	Ertragskoeffizient für die Biomassebildung aus Substrat	$\text{g}_{\text{BTM}} \text{g}^{-1}$
$V_0$	Reaktorvolumen bei Versuchsbeginn	L
$\dot{V}_{aus}$	Volumenstrom aus dem Reaktor	$\text{L h}^{-1}$
$\dot{V}_{ein}$	Volumenstrom in den Reaktor	$\text{L h}^{-1}$
$\dot{V}_{Gas,aus}$	Abluftstrom aus dem Reaktor	$\text{L h}^{-1}$
$\dot{V}_{Gas,ein}$	Zuluftstrom in den Reaktor	$\text{L h}^{-1}$
$V_M$	Molvolumen idealer Gase	$\text{L mol}^{-1}$
$V_R$	Reaktorvolumen	L

## 15 Anhang

### 15.1 Nomenklatur

Für viele Gene bzw. Proteine existieren mehrere Bezeichnungen. Die Bezeichnung der einzelnen Gene und Proteine in dieser Arbeit erfolgt nach der Saccharomyces Genome Database (<http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces>).

Wie in der Fachliteratur üblich sind Gennamen kursiv und in Kleinbuchstaben und Proteine kursiv und in Großbuchstaben geschrieben. Dient eine Proteinbezeichnung nur als Abkürzung für den gesamten Enzymnamen zum Beispiel bei "IDH" als Abkürzung für die "NAD<sup>+</sup>-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase" oder "IDP" für die "NADP<sup>+</sup>-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase" wird diese nicht kursiv geschrieben.

Tabelle 15.1 fasst noch die Besonderheiten der biotechnologischen Fachliteratur bezüglich Einheiten zusammen.

Tabelle 15.1: Besonderheiten der biotechnologischen Fachliteratur bezüglich Einheiten

g	In der biotechnologischen Fachliteratur wird für die Bezeichnung einer Masse üblicherweise die Einheit Gramm anstelle von Kilogramm verwendet
h	In der biotechnologischen Fachliteratur wird für die Bezeichnung einer Zeit in den Einheiten von OUR, OTR und q üblicherweise die Einheit Stunde anstelle von Sekunde verwendet
L	Bei Konzentrationen und Volumina ist es üblich, Liter anstelle von Kubikmeter zu verwenden. In der biotechnologischen Fachliteratur wird die Einheit Liter mit großem L geschrieben, um Verwechslungen mit der Zahl 1 in manchen Schrifttypen auszuschließen.
M	In der biotechnologischen Fachliteratur wird für die Bezeichnung einer Konzentration gleichwertig die Einheit M (Molarität) oder mol L <sup>-1</sup> verwendet
min	In der biotechnologischen Fachliteratur wird für die Bezeichnung einer Zeit gleichwertig die Einheit Minute oder Sekunde verwendet
Units	In der biotechnologischen Fachliteratur wird für die Bezeichnung einer Enzymaktivität häufig die Einheit Units verwendet. Die korrekte SI-Einheit lautet allerdings katal und ist definiert als mol s <sup>-1</sup> .

## 15.2 Stammliste

Tabelle 15.2 gibt einen Überblick über die beim Projektpartner ORGANOBALANCE GmbH (Berlin) im Laufe einer iterativen Stammentwicklung konstruieren und in dieser Arbeit charakterisierten rekombinanten *S. cerevisiae* Stämme. Die Stämme in Tabelle 15.2 sind sortiert nach den Kapiteln, in denen sie erstmals untersucht wurden. Die *S. cerevisiae* Stämme wurden auf Basis des Wildtypstammes AH22ura3 (Polakowski *et al.* 1998), der auxotroph für das Nukleotid Uracil (Ura), sowie die Aminosäuren Leucin (Leu) und Histidin (His) ist, konstruiert. Die SDH-IDH-IDP-Deletionsstämme waren zudem noch auxotroph für Glutamat (Glt).

Tabelle 15.2: Rekombinante *S. cerevisiae* Stämme basierend auf den Grundstamm AH22ura3.

Kapitel	Stamm	Auxotroph für				G 418	Kurzbezeichnung des Stammes
		His	Ura	Leu	Glt		
6	wt	x	x	x		wt <sup>a</sup>	
	wt pFlat3	x	x			wt <sup>a</sup>	
	wt pFlat1 pFlat3	x				wt <sup>a</sup>	
	wt pFlat1 pFlat2 pFlat3				x	wt <sup>a</sup>	
7	$\Delta sdh2$ pFlat3	x	x			$\Delta sdh2^b$	
	$\Delta sdh2 \Delta sdh1$ pFlat3	x	x			$\Delta sdh2 \Delta sdh1$	
	<i>tTa</i>	x	x	x		<i>tTa</i>	
	<i>tTA sdh2prom::tetOprom</i>	x	x	x		<i>tTA sdh2prom::tetOprom</i>	
	$\Delta sdh2$	x	x	x		$\Delta sdh2^b$	
8	$\Delta sdh2 \Delta idh1$ pFlat3	x	x			$\Delta sdh2 \Delta idh1$	
	$\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1$ pFlat3	x	x			$\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1$	
	$\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1$ pFlat2 pFlat3	x	x		x	$\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1^c$	
	$\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1$ pFlat1 pFlat2 pFlat3	x			x	$\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1^c$	
	9.1 $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1$ pFlat1- <i>ICL1</i> pFlat2- <i>MLS1</i> pFlat3- <i>ACS1</i>	x			x	$\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1$ <i>ICL1 MLS1 ACS1</i>	
9.1 $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1$ pFlat1- <i>ACS1</i> pFlat2- <i>KIICL1</i> pFlat3- <i>KIMLS</i>	x			x	$\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1$ <i>ACS1 KIICL1 KIMLS</i>		

Kapitel	Stamm	Auxotroph für				G 418	Kurzbezeichnung des Stammes
		His	Ura	Leu	Glt		
9.2	$\Delta sdh2 \Delta idh1$ pFlat1- <i>ICL1</i> pFlat3	x					$\Delta sdh2 \Delta idh1$ <i>ICL</i>
	$\Delta sdh2 \Delta idh1$ pFlat1- <i>ICL1</i> pFlat2- <i>MLS1</i> pFlat3	x				x	$\Delta sdh2 \Delta idh1$ <i>ICL1 MLS1</i>
	$\Delta sdh2 \Delta idh1$ pFlat3- <i>ACS1</i>	x	x				$\Delta sdh2 \Delta idh1$ <i>ACS1</i>
	$\Delta sdh2 \Delta idh1$ pFlat1- <i>ICL1</i> pFlat2- <i>ACS1</i> pFlat3	x				x	$\Delta sdh2 \Delta idh1$ <i>ICL1 ACS1</i>
	$\Delta sdh2 \Delta idh1$ pFlat1- <i>ICL1</i> pFlat2- <i>MLS1</i> pFlat3- <i>ACS1</i>	x				x	$\Delta sdh2 \Delta idh1$ <i>ICL1 MLS1</i> <i>ACS1</i>
	$\Delta sdh2 \Delta idh1$ pFlat1- <i>AceA</i> pFlat2- <i>MLS1</i> pFlat3- <i>ACS1</i>	x				x	$\Delta sdh2 \Delta idh1$ <i>AceA MLS1</i> <i>ACS1</i>
9.3	$\Delta sdh2 \Delta sdh1$ pFlat3- <i>ACS1</i>	x	x				$\Delta sdh2 \Delta sdh1$ <i>ACS1</i>
	$\Delta sdh2 \Delta sdh1$ pFlat1- <i>ICL1</i> pFlat3- <i>ACS1</i>	x					$\Delta sdh2 \Delta sdh1$ <i>ICL1 ACS1</i>
	$\Delta sdh2 \Delta sdh1$ pFlat1- <i>ICL1</i> pFlat2- <i>MLS1</i> pFlat3- <i>ACS1</i>	x				x	$\Delta sdh2 \Delta sdh1$ <i>ICL1 MLS1</i> <i>ACS1</i>
10	wt pFlat3- <i>HAP4</i>	x	x				wt <i>HAP4</i>
	$\Delta sdh2$ pFlat3- <i>HAP4</i>	x	x				$\Delta sdh2$ <i>HAP4</i>
	$\Delta sdh2 \Delta idh1$ pFlat3- <i>HAP4</i>	x	x				$\Delta sdh2 \Delta idh1$ <i>HAP4</i>
	$\Delta sdh2 \Delta idh1$ pFlat1- <i>ICL1</i> pFlat3- <i>HAP4</i>	x					$\Delta sdh2 \Delta idh1$ <i>ICL1 HAP4</i>
	$\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1$ pFlat3- <i>HAP4</i>	x	x				$\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1$ <i>HAP4</i>

<sup>a</sup> soweit im Ergebnisteil nicht anders angegeben wurde von diesen vier Stämmen stets der Stamm *S. cerevisiae* AH22ura3 wt pFlat3 als Referenz zu den Deletionsstämmen eingesetzt.

<sup>b</sup> *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2$  wurde ausschließlich in Kapitel 7.6 verwendet, ansonsten wurde *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2$  pFlat3 verwendet.

<sup>c</sup> *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1$  pFlat2 pFlat3 wurde ausschließlich in Kapitel 8.6 verwendet, ansonsten wurde *S. cerevisiae* AH22ura3  $\Delta sdh2 \Delta sdh1 \Delta idh1 \Delta idp1$  pFlat1 pFlat2 pFlat3 verwendet.

Durch die verschiedenen Selektionsmarker der Plasmide pFlat1-3 (siehe Tabelle 5.1) sind bis zu drei parallele Überexpressionen möglich und es ergeben sich wie Tabelle 15.2 zusammengefasst abhängig von den jeweiligen Plasmiden des Stammes verschiedene Auxotrophiemuster und eine bzw. keine Resistenz gegenüber Geneticin (G418). In dieser

Arbeit wird größtenteils bei den Stammmenamen zur besseren Übersichtlichkeit auf die Nennung der pFlat-Plasmide verzichtet. Diese daraus resultierenden Kurzbezeichnungen sind ebenfalls in Tabelle 15.2 angegeben.

### 15.3 Medien, Medienzusätze und Puffer

An dieser Stelle sind alle Rezepte aller eingesetzten Medien sowie der zugehörigen Zusätze und des PBS-Puffers zusammengefasst.

#### PBS-Puffer

Der PBS-Puffer (PBS: Phosphat buffered saline), dessen Zusammensetzung Tabelle 15.3 zeigt, wurde zum Verdünnen der Zellen bei der Bestimmung der Optischen Dichte und zum Waschen der Zellen beim Überimpfen aus der Vor- in die Hauptkultur eingesetzt.

Tabelle 15.3: PBS-Puffer, pH 7,4

Komponente	Konzentration, g L <sup>-1</sup>
KCl	0,2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24
NaCl	8
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,44

#### Essentielle Zusätze

Aufgrund der Auxotrophien der Stämme müssen den Medien stammabhängig (siehe Tabelle 15.2) essentielle Zusätze versetzt werden. Diese wurden wie Tabelle 15.4 zusammengestellt angesetzt, sterilfiltriert und bei 4°C gelagert. Leucin und Uracil lösten sich nur bei der Zugabe von Base.

Tabelle 15.4: Medienzusätze

Essentielle Substanz	Konzentration der Stammlösung, g L <sup>-1</sup>	Zugabe 6 M NaOH, mL L <sup>-1</sup>	Endkonzentration im Medium, g L <sup>-1</sup>
Histidin	10	-	0,04
Leucin	100	667	0,4
Uracil	25	67	0,1
Glutamat	250	-	2

### Antibiotika

Geneticin (G418) diente als Selektionsmarker für das pFlat2. Die Stammlösung wurde auf 50 g L<sup>-1</sup> angesetzt und sterilfiltriert. Die Arbeitskonzentration im Medium betrug 100 mg L<sup>-1</sup>.

Tetracyclin wurde in Kombination mit dem reprimierbaren Promotor-System eingesetzt. Die Stammlösung besaß eine Konzentration von 10 g L<sup>-1</sup> und wurde sterilfiltriert. Die Arbeitskonzentrationen im Medium lagen zwischen 1 und 20 mg L<sup>-1</sup>. Da Tetracyclin lichtempfindlich ist, wurde die Tetracyclinlösung lichtgeschützt aufbewahrt.

### Kohlenstoffquellen: Glucose oder Galactose

Als Kohlenstoffquelle wurden Glucose oder Galactose in einer Endkonzentration von 50 g L<sup>-1</sup> eingesetzt. Die Medium wurden prinzipiell ohne Kohlenstoffquelle autoklaviert und die Kohlenstoffquelle danach in Form einer 250 g L<sup>-1</sup> Stammlösung zugesetzt.

### YNB-Medium

Das YNB-Medium (YNB: Yeast Nitrogen Base) von Difco (Augsburg) ist ein definiertes Fertigmedium mit Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle. In dieser Arbeit wurde die Version ohne Aminosäuren verwendet (Tabelle 15.5). Der pH-Wert des Mediums wurde mit 10 % HCl (w/w) auf 6,5 eingestellt. Das Medium wurde aufgrund seiner Hitzelabilität durch Filtration sterilisiert.

Tabelle 15.5: YNB-Medium

Grundmedium	Konzentration, g L <sup>-1</sup>
YNB w/o Amino Acids	10
Glucosestammlösung 250 g L <sup>-1</sup>	200
Struktol J673 (Antischaummittel)	0 oder 0,3 <sup>a</sup>
Histidin-Stammlösung	4
Leucin-Stammlösung	4 oder 0 <sup>b</sup>
Uracil-Stammlösung	4 oder 0 <sup>b</sup>
Geneticin-Stammlösung	2 oder 0 <sup>b</sup>
Glutamat-Stammlösung	8 oder 0 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Zusatz erfolgte nur bei Verwendung des Mediums im Rührkesselreaktor

<sup>b</sup> abhängig von den Plasmiden des rekombinanten Stammes

<sup>c</sup> abhängig von den Deletionen des Stammes

### WM8G-Medium

Die Zusammensetzung des WMVIII-Medium nach Lang und Looman 1995, das in dieser Arbeit als "WM8G"-Medium bezeichnet wurde, ist in Tabelle 15.6 dargestellt. Die Stammlösungen an Glucose, Spurenelementen, Vitaminen, essentiellen Substanzen und das Antischaummittel wurden wie in Tabelle 15.6 gezeigt erst nach dem Autoklavieren dem Grundmedium zugesetzt. Der pH des WM8G-Mediums wurde auf pH 6,0 eingestellt, da bei pH 6,5 das Glutamat im Medium ausfiel.

Tabelle 15.6: WM8G-Medium nach Lang und Looman (1995)

Grundmedium	Konzentration, g L <sup>-1</sup>
C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> NNaO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	10
NH <sub>4</sub> Cl	2,8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,55
MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,25
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,25
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,10
Myo-Inositol	0,075
Zusätze nach dem Autoklavieren	Konzentration, mL L <sup>-1</sup>
Glucosestammlösung 250 g L <sup>-1</sup>	200
Spurenelement-Lösung (Tabelle 15.7)	4
Vitaminlösung (Tabelle 15.8)	4
Antischaummittel Polypropylenglykol	0 oder 0,1 <sup>a</sup>
Histidin-Stammlösung	4
Leucin-Stammlösung	4 oder 0 <sup>b</sup>
Uracil-Stammlösung	4 oder 0 <sup>b</sup>
Geneticin-Stammlösung	2 oder 0 <sup>b</sup>
Glutamat-Stammlösung	8 oder 0 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Zusatz erfolgte nur bei Verwendung des Mediums im Rührkesselreaktor

<sup>b</sup> abhängig von den Plasmiden des rekombinanten Stammes

<sup>c</sup> abhängig von den Deletionen des Stammes



Tabelle 15.7: Spurenelementlösung (250x Konzentrat) für das WM8G-Medium nach Lang und Looman (1995)

Spurenelemente	Konzentration, mg L <sup>-1</sup>
Natrium EDTA (Titrplex III)	3722,4
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	437,5
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	125,0
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	25,0
MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	25,0
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	25,0

Zum Ansetzen der Spurenelementstammlösung (Tabelle 15.8) wurde zunächst eine 10 mM Lösung des Chelators EDTA angesetzt und dieser dann die Spurenelemente zugegeben. Die Spurenelementlösung wurde sterilfiltriert. Bei dem Konzentrat der Vitaminlösung (Tabelle 15.8) muss zum Lösen der Vitamine der pH mit Natronlauge auf 5-6 angehoben werden. Die Vitaminlösung wurde sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

Tabelle 15.8: Vitaminlösung (250x Konzentrat) für das WM8G-Medium nach Lang und Looman (1995)

Vitamin	Konzentration, mg L <sup>-1</sup>
Biotin	0,625
Nicotinsäure	2,50
Thiamin	2,50
Pyridoxin	6,25
Calciumpanthotenat	12,50

### WM8A-Medium

Das WM8A-Medium ist eine abgewandelte Version des WMVIII-Medium (Lang und Looman 1995). Um ein Medium ohne eine organische Stickstoffquelle zu erhalten wurde das Glutamat äquimolar gegen Ammoniumsulfat (entsprechend 3,53 g L<sup>-1</sup>) ausgetauscht. Da nach dem Austausch der Stickstoffquelle die Pufferkapazität des Mediums zu gering war, wurde ergänzend ein 0,4 molarer Kaliumphosphatpuffer zugesetzt. Dieses gut puffernde definierte Medium, dessen Start-pH durch Zugabe von 4,5 mL L<sup>-1</sup> 6 M Natronlauge auf 6,5 eingestellt wurde, wurde für alle Vorkulturen eingesetzt.

### YEPD-Medium

Das YEPD-Medium (YEPD: Yeast Extract Peptone Dextrose) ist das komplexe Standardmedium für *S. cerevisiae* und wird meist mit  $20 \text{ g L}^{-1}$  Glucose genutzt. Jedoch wurde im Laufe dieser Arbeit in allen Medien einheitlich mit  $50 \text{ g L}^{-1}$  Glucose gearbeitet (Tabelle 15.9). Der pH des YEPD-Mediums wurde auf pH 6,5 eingestellt.

Da Vorversuche, durchgeführt als parallele Satzversuche im Bioreaktorblock mit dem auxotrophen Wildtypstamm ohne Leerplasmide (*S. cerevisiae* AH22ura3 wt) kultiviert in YEPD-Medium mit  $50 \text{ g L}^{-1}$  Glucose einen Einbruch der Wachstumsrate zeigten nachdem etwa 60 % der vorgelegten Glucose verbraucht waren (Daten nicht gezeigt), wurde mit Hilfe von parallelen Satzexperimenten Uracil als limitierende Größe identifiziert. Daher wurde bei allen nicht das pFlat1 tragenden und somit Uracilauxotrophen Stämmen, stets dem Komplexmedium  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  Uracil zugeben.

Tabelle 15.9: YEPD-Medium

Grundmedium	Konzentration, $\text{g L}^{-1}$
Pepton aus Casein	20
Hefeextrakt	10
Zusätze nach dem Autoklavieren	Konzentration, $\text{mL L}^{-1}$
Glucosestammlösung $250 \text{ g L}^{-1}$	200
Antischaummittel Struktol J633	$0,1^a$
Uracil	4 oder $0^b$
Geneticin	2 oder $0^b$

<sup>a</sup> Zusatz verfolgte nur bei Verwendung des Medium im Rührkesselreaktor

<sup>b</sup> abhängig von den Plasmiden des rekombinanten Stammes

### Hoek-Medium

Das definierten Medium nach van Hoek *et al.* (2000) mit Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle wurde in Kombination mit dem zugehörigen Zulaufmedium für Zulaufversuche im Laborbioreaktor eingesetzt. Neben einem Satzmedium (Tabelle 15.10) beschreiben van Hoek *et al.* (2000) auch ein abgestimmtes Zulaufmedium (Tabelle 15.13), das neben Salzen und der Kohlenstoffquelle Glucose auch Vitamine und Spurenelemente enthält, um Limitierungen auch in Hochzelldichtekultivierungen zu vermeiden. Statt Saccharose wie im Originalrezept wurde Glucose als Kohlenstoffquelle verwendet. Das Medium besitzt einen Soll-pH von 5 und ist kaum gepuffert. Daher kann es nicht ohne pH-Regelung eingesetzt werden.

Die Vitaminlösung (Tabelle 15.12) wurde sterilfiltriert, die Spurenelementlösung (Tabelle 15.11) autoklaviert.

Tabelle 15.10: Hoek-Medium (van Hoek *et al.* 2000)

Grundmedium	Konzentration, g L <sup>-1</sup>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	15
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8
MgSO <sub>4</sub>	3
ZnSO <sub>4</sub>	0,4
Zusätze nach dem Autoklavieren	Konzentration, mL L <sup>-1</sup>
Glucosestammlösung 250 g L <sup>-1</sup>	200
Spurenelementlösung (Tabelle 15.7)	40
Vitaminlösung (Tabelle 15.12)	12
Struktol J673 (Antischaummittel)	0,3
Histidin-Stammlösung	4
Leucin-Stammlösung	4 oder 0 <sup>a</sup>
Uracil-Stammlösung	4 oder 0 <sup>a</sup>
Glutamat-Stammlösung	8 oder 0 <sup>b</sup>
Geneticin-Stammlösung	2 oder 0 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> abhängig von den Plasmiden des rekombinanten Stammes

<sup>b</sup> abhängig von den Deletionen des Stammes

Tabelle 15.11: Spurenelementlösung (25-faches Konzentrat) für das Hoek-Medium (van Hoek *et al.* 2000)

Spurenelemente	Konzentration, g L <sup>-1</sup>
EDTA	3,75
ZnSO <sub>4</sub>	1,44
MnCl <sub>2</sub>	0,08
CuSO <sub>4</sub>	0,125
CoCl <sub>2</sub>	0,118
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,12
CaCl <sub>2</sub>	0,725
FeSO <sub>4</sub>	0,7

Die Stammlösungen von Glucose, Spurenelementen, Vitaminen und das Antischaummittel Struktol J673 wurden nach dem Autoklavieren dem Grundmedium zugesetzt. Essentielle Substanzen und das Antibiotikum Geneticin wurden dem Hoek-Medium (Tabelle 15.10) abhängig vom Stamm in den in Tabelle 5.1 angegebenen Konzentrationen zugesetzt.

Tabelle 15.12: Vitaminlösung (83,3-faches Konzentrat) für das Hoek-Medium (van Hoek *et al.* 2000)

Vitamine	Konzentration, g L <sup>-1</sup>
Biotin	0,05
Calcium-Pantothenat	1,0
Nicotinsäure	1,0
Myo-inositol	25,0
Thiamin-Hydrochlorid	1,0
Pyridoxin-Hydrochlorid	1,0
p-Aminobenzoessäure	0,2

Tabelle 15.13: Zulaufmedium nach van Hoek *et al.* 2000

Komponente	Konzentration, g L <sup>-1</sup>
Glucose	500
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	9
MgSO <sub>4</sub>	2,5
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3,5
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,28
ZnSO <sub>4</sub>	0,4
Zusätze nach dem Autoklavieren	Konzentration, mL L <sup>-1</sup>
Spurenelementlösung (Tabelle 15.7)	40
Vitaminlösung (Tabelle 15.12)	12

Das Zulaufmedium nach Tabelle 15.13 wurde stets ½ verdünnt eingesetzt, enthielt also 250 g L<sup>-1</sup> Glucose.

## 15.4 HPLC-Methodik

Über die HPLC (Tabelle 15.14) wurden mit den in Tabelle 15.15 angegebenen Bedingungen die Konzentrationen an Succinat, Acetat, Glycerin und Ethanol sowie Glucose oder Galactose im Kulturüberstand bestimmt.

Tabelle 15.14: HPLC-System

Komponente	Typ / Version	Hersteller
Autosampler	Midas Cool	Spark
Manager	Smartline 5000	Knauer
Ofen	Jet Stream	Knauer
Pumpe	Smartline 1000	Knauer
RI-Detektor	Smartline 2300	Knauer
UV/VIS-Detektor	LC 295	Perkin Elmer
Vorsäule	Micro-Guard Cation H Cartidge (125-0129)	Bio-Rad
Trennsäule	Aminex HPX-87H Column, 300x7,8 mm (125-0140)	Bio-Rad
Software	Chromgate 3.1	Knauer

Tabelle 15.15: HPLC-Methode

Parameter	Wert
Autosamplertemperatur	4 °C
Ofentemperatur	50 °C
Laufmittel	5 mM H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Flussrate	0,7 mL min <sup>-1</sup>
Injektionsvolumen	20 µL
Messdauer	30 min
UV/VIS-Detektor	210 nm

## 15.5 Glutamat-Bestimmung

Die Bestimmung der Glutamatkonzentration erfolgte photometrisch bei 492 nm mit einem enzymatischen Test (Nr. 10139092035) der Firma R-Biopharm (Darmstadt, Deutschland).

Der Test beruht darauf, dass L-Glutaminsäure bzw. L-Glutamat mit  $\text{NAD}^+$  durch das Enzym Glutamat-Dehydrogenase oxidativ unter Bildung von NADH zu  $\alpha$ -Ketoglutarat desaminiert wird. Das dabei gebildete NADH setzt Iodnitrotetrazoliumchlorid in Gegenwart des Enzyms Diaphorase von zu einem Formazan um, dessen Bildung bei 492 nm mittels eines Photometers gemessen werden kann. Das Gleichgewicht der von der Glutamat-Dehydrogenase katalysierten Reaktion liegt auf der Seite von L-Glutamat und wird durch das Abfangen des gebildeten NADH mit Iodnitrotetrazoliumchlorid auf die Seite von  $\alpha$ -Ketoglutarat verschoben.

Tabelle 15.16: Pipettierschema für die Glutamatbestimmung

Lösung	Komponente	Volumen, $\mu\text{L}$
Lösung 1	Kaliumphosphat/Triethanolamin-Puffer, pH 8,6, Triton X-100	60
Lösung 2	Lösung mit Diaphorase und $\text{NAD}^+$	20
Lösung 3	Iodnitrotetrazoliumchlorid-Lösung	20
VE		153
Probe		20

Hierfür wurden nach dem in Tabelle 15.16 angegebenen Pipettierschema Lösungen in einer Flachboden-Mikrotiterplatte zusammenpipettiert und nach 2 min die Extinktion ( $E_1$ ) gemessen. Die Messung wurde nach der Testvorschrift des Herstellers wiederholt bis Extinktionsänderung kleiner als 0,005 - 0,010 waren. Dann wurden 30  $\mu\text{L}$  einer 1/10 Verdünnung von Lösung 4 (Glutamat-Dehydrogenase-Lösung) zugeben, gemischt und der Stillstand der Reaktion abgewartet (15-30 min). Hierdurch ergab sich die Extinktion  $E_2$ . Nach Zugabe von Iodnitrotetrazoliumchlorid (Lösung 3) ist das Reaktionssystem lichtempfindlich, weshalb die Inkubationsschritte stets im Dunklen erfolgten. Die Extinktionsdifferenzen wurden nach Gleichung 15.1 berechnet.

$$\Delta E = (E_2 - E_1)_{\text{Probe}} - (E_2 - E_1)_{\text{Leerwert}} \quad \text{Gleichung 15.1}$$

Für den Leerwert wurde statt Probe VE-Wasser zugegeben.

## 15.6 Isocitrat-Lyaseaktivitätstest

Die photometrische Bestimmung der Isocitratlyase-Aktivität erfolgte mit dem in Tabelle 15.17 beschriebenen Ansatz und basiert auf der Methode von Dixon und Kornberg 1959. Diese wurde nach Förster (2006) modifiziert. Die Isocitrat-Lyase katalysiert die Spaltung von Isocitrat zu Glyoxylat und Succinat. Glyoxylat reagiert mit Phenylhydrazin zu Glyoxylat-Phenylhydrazon dessen Bildung bei 324 nm verfolgt werden kann.

Tabelle 15.17: Lösungen und Pipetierschema zur Bestimmung der Isocitratlyase-Aktivität

Komponente	Konzentration der Stammlösung, mM	Volumen, $\mu\text{L}$
Tris-HCl, pH 7,0	100	800
MgCl <sub>2</sub>	5	150
Cystein-HCl	20	150
D,L-Na-Isocitrat	16,7	150
Phenylhydrazin-HCl	33	150
Probe in Aufschlusspuffer	-	100

Die Zellen wurden zunächst abzentrifugiert (10 min, 4500  $\text{min}^{-1}$ , 4 °C) und das Zellpellet mit 1 mL eiskaltem Aufschlusspuffer (Tabelle 15.18) gewaschen und anschließend in 1 mL eiskaltem Aufschlusspuffer resuspendiert. Das abzentrifugierende Probenvolumen wurde so gewählt, dass die Biomassekonzentration nach dem Resuspendieren bei etwa 10  $\text{g L}^{-1}$  lag.

Tabelle 15.18: Aufschlusspuffer zur Bestimmung der Isocitratlyase-Aktivität

Komponente	Konzentration, mM
Tris-HCl, pH 7,0	100
MgCl <sub>2</sub>	5
Phenylmethylsulfonylfluorid	0,25

Der Zellaufschluss erfolgte mechanisch in einer Schwingarmmühle für 10 Minuten bei einer Schüttelfrequenz von 1800  $\text{min}^{-1}$  in auf 4°C vorgekühlten 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit 1 mL Glasperlen (Durchmesser 0,25-0,5 mm) und vorgekühlten Proben. Nach dem Aufschluss erfolgte die Abtrennung der Zelltrümmer und Glasperlen durch Zentrifugation (5 min, 10000  $\text{min}^{-1}$ , 4 °C).

Die Bestimmung der Isocitratlyase-Aktivität erfolgte direkt nach dem Aufschluss mit dem in Tabelle 15.17 zusammengefassten Ansatz photometrisch im UV-VIS-Photometer bei 324 nm und Raumtemperatur für 10 min in UV-geeigneten Küvetten.

Die Berechnung der spezifischen Aktivität erfolgte aus der linearen Änderung der Absorption unter Verwendung des Lambert-Beer'schen-Gesetzes nach Gleichung 15.2. Die spezifische Enzymaktivität wird üblicherweise in der Einheit Units (U) angegeben. Ein Unit ist dabei definiert als diejenige Enzymmenge, die unter den angegebenen Bedingungen 1  $\mu\text{mol}$  Substrat pro Minute umsetzt.

$$EA_x = \frac{\Delta A_{324}}{\Delta t} \cdot \frac{V_R}{b \cdot \epsilon_{GP} \cdot V_X \cdot c_X} \quad \text{Gleichung 15.2}$$

mit  $EA_x$  spezifische Enzymaktivität,  $\text{U g}_{\text{BTM}}^{-1}$

$\frac{\Delta A_{324}}{\Delta t}$  Änderung der Absorption bei 324 nm über die Zeit,  $\text{min}^{-1}$

$V_R$  Reaktionsvolumen,  $\mu\text{L}$   
(hier: 1500  $\mu\text{L}$ )

$V_X$  Volumen an Zellextrakt,  $\mu\text{L}$   
(hier: 100  $\mu\text{L}$ )

$b$  Länge des Lichtwege, mm  
(hier: 10 mm)

$\epsilon_{GP}$  molarer Extinktionskoeffizient für Glyoxylat-Phenylhydrazon,  $\text{L mol}^{-1} \text{mm}^{-1}$   
(17 000  $\text{L mol}^{-1} \text{mm}^{-1}$  bei 324 nm)

$c_X$  eingesetzte Biomassekonzentration zur Gewinnung des Zellextrakts,  $\text{g}_{\text{BTM}} \text{L}^{-1}$

Zeigte sich bei sehr hohen Enzymaktivitäten keine Linearität der Messwerte mehr, erfolgte eine Verdünnung der Probe im Aufschlusspuffer. Der Aufschlusspuffer diente auch als Blindprobe.



## 15.7 LC-MS-Methodik

Die Bestimmung von AMP, ADP, ATP, NAD<sup>+</sup> und NADH im Zellextrakt erfolgte mittels LC-MS (Tabelle 15.19) nach der von Luo *et al.* (2007) beschriebenen Methode die nach Link (2009) adaptiert wurde (Tabelle 15.20).

Tabelle 15.19: LC-MS-System

Komponente	Typ / Version	Hersteller
Autosampler	AS 1000	Thermo Spectronic, Dreieich
Entgaser	D 1100	Thermo Spectronic, Dreieich
Pumpe	P 1100	Thermo Spectronic, Dreieich
Vorsäule	Security Guard Catridges C18 Aq 4 x 2,00 mm	Phenomenex, Aschaffenburg
Trennsäule	Synergi 4 $\mu$ Hydro-RP (C18) 150mm 2.1mm I.D., 80 Å	Phenomenex, Aschaffenburg
ESI Massenspektrometer	LCQ-Advantage ion trap MS	Thermo Spectronic, Dreieich
Stickstoffgenerator	ESP 2	DWT, Essen
Software	Xcalibur 1.2	Thermo Finnigan

Tabelle 15.20: Standard-Betriebsparameter der LC-MS-Anlage

Parameter	Wert
Autosamplertemperatur	4°C
Säulentemperatur	35 °C
Laufmittel A	10 mM Tributylaminlösung, deren pH mit 15 mM Essigsäure pH 4,95 eingestellt war
Laufmittel B	Methanol
Gradientenprofil	Tabelle 15.21
Flussrate der Chromatographie	0,2 mL·min <sup>-1</sup>
Schutzgas	Stickstoff
"Damping Gas"	Helium 6.0
Injektionsvolumen	20 $\mu$ L
ESI-Parameter	Tabelle 15.22
Meßdauer	80 min

Tabelle 15.21: LC-MS-Gradientenprofil nach Luo *et al.* 2007

Zeit, min	Laufmittel A, % v/v	Laufmittel B, % v/v
0,1	100	0
15,0	100	0
25,0	80	20
55,0	80	20
60,0	65	35
65,0	65	35
70,0	40	60
75,0	40	60
75,1	10	90
80,0	10	90

Tabelle 15.22: ESI-Parameter

	Segment 1	Segment 2	Segment 3
Time	0-32 min	32-62 min	62-80 min
Capillary Temperatur, °C	330	290	350
ACC	on	on	on
Sheath Gas Flow, -	53	53	60
Aux Gas Flow, -	31	31	20
Source Voltage, kV	3	2,6	2,5
Capillary Voltage, V	-15	-5	-21
Tube Lens Offset, V	-4	-14,2	0
Multipole RF Amplifier, Vp-p	400	400	400
Multipole 1 Offset, V	7	7	3
Multipole 2 Offset, V	9,5	9,5	9,5
Inter Multipole Lens Voltage, V	17,4	17,4	14

## 15.8 Rührkesselreaktoren

Tabelle 15.23: Einzelkomponenten des mL-Reaktorsystems

Geräte	Hersteller
150 L Vorratsbehälter und Abwasserbehälter	Schubert Kunststoff GmbH, München
MULTIstar 400 W	Fryka Kältetechnik GmbH, Esslingen
Heizbad Gefäß Haake W15 mit Thermostat Haake C 10	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
thermischer Massendurchflussregler Brooks 5850S	Westphal Mess-und Regeltechnik GmbH, Ottobrunn
Bioreaktorblock mit Sterilgasabdeckung und Rührer	2mag, München
Optosensorik (MultiChannel Reader for pH and oxygen)	PreSens Precision Sensing GmbH, Regensburg
Mini-Reaktor HTBD	PreSens Precision Sensing GmbH, Regensburg
Genesis Workstation 150	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Software	Hersteller
Gemini 3.40 SP2	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim)
fedbatch XP 1.0.213	DASGIP AG, Jülich
fed-batchXP Server 1.0.21	DASGIP AG, Jülich
MTP-Photometer Fluostar Galaxy	BMG Laboratories, Offenburg
MTP-Waschstation Columbus	Tecan
Fluostar 4.31	BMG Laboratories, Offenburg

Tabelle 15.24: Labfors Klein-Fermenter-System inklusive Peripheriegeräte

Geräte	Hersteller
Kontrolleinheit	Infors, Einsbach
Reaktorgefäß mit Glasdoppelmantel zur Temperierung (Totalvolumen 2 L, Arbeitsvolumen 0,5-1,5 L), Schikanenkorb mit 3 Strömungsbrechern, 2 6-Blattscheibenrührer, mechanische Gleitringdichtung, Obenantrieb, Begasung über Begasungsrohr geregelt durch einen Massendurchflussmesser	Infors, Einsbach
Software Iris-NT Pro Version 4.11	Infors, Einsbach
pH-Elektrode HA405-DPA-SC-S8	Mettler-Toledo, Giessen
pO <sub>2</sub> -Sensor InPro 6000	Mettler-Toledo, Giessen
Reaktorwaage QC35EDE-S	Sartorius, Göttingen
Abgasanalytik EasyLine	ABB, Frankfurt
Gasanalysator: Exhaust Gas Analyzer Easy Line IR	
Messgasfördereinheit: Sample Gas Delivery Unit Advance SCC-F	
Messgaskühler : Sample Gas Cooler Advance SCC-C	
Peristaltische Zulaufpumpe BVP Standard mit Pumpenkopf	Ismatech
Masterflex Easy-Load MF 0313/738	Laboratoriumstechnik,
Pumpenschlauch: Marprene, 1,6 mm Innen-Durchmesser, 1,6 mm Wanddicke (Watson-Marlow, Rommerskirchen)	Wertheim-Mondfeld
Zulaufwaage I6800-D2	Sartorius, Göttingen

## 15.9 Allgemeine Geräte und Materialien

Tabelle 15.25: Allgemeine Laborgeräte

Geräte	Hersteller
Analytische Waage Explorer 10 mg - 210 g	Ohaus, Gießen
Analytische Waage Explorer 5 g - 32 kg	Ohaus, Gießen
Autoklav / Systec 5075 ELV	Systec, Wettenberg
Einstrahlphotospektrometer Spectronic Genesys 20	Thermo Electron, Dreieich
pH-Einstabmesskette N 6000 A	Schott, Mainz
pH-Elektrode BlueLine 14 pH	Schott, Mainz
pH-Meter CG 843	Schott, Mainz
Reagenzglasschüttler Reax Top	Heidolph Instruments, Schwabach
Schüttelinkubator Multitron	Infors, Einsbach
Schwingarmmühle MM200	Retsch, Haan
Standzentrifuge Rotixa 50 RS	Hettich, Tuttlingen
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Mikro 20	Hettich, Tuttlingen
Trockenschrank E 28	Binder, Tuttlingen
Mikropipetten 10 µL, 200 µL, 1000 µL und 10 mL	Brand, Wertheim
Transferpette S	
Kühlzentrifuge Biofuge Stratos	Kendro-Heraeus, Langenselbold
Photometer Genesys 20	Thermo Spectronic, Erlangen
Ultraschallbad Ultrasonic cleaner	VWR, Darmstadt
Ultra-Kryomat K90W	MGW Lauda, Lauda-Königshofen
MTP-Photometer Infinite M200	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim

Tabelle 15.26: Chemikalien

Reagenz	Artikelnummer	Hersteller
4-Aminobenzoesäure	8.22312.0250	Merck
Adenosin-5'-Diphosphat	A-2754	Sigma
Adenosin-5'-Monophosphat	A-1752	Sigma
Adenosin-5'-Triphosphat-Dinatriumsalz	A-2,620-9	Sigma
Ammoniak	1.05426.2500	Merck
Ammoniumchlorid	1.01145.0500	Merck
Ammoniumdihydrogenphosphat	1.01126.0500	Merck
Ammoniumsulfat	3746.1	Roth
Bernsteinsäure Dinatriumsalz-Hexahydrat	3195.1	Roth
Biotin	3822.2	Roth
Calciumchlorid-Dihydrat	1.02382.0500	Merck
Calcium-D(+)-panthotenat	3812.1	Roth
Chemikalie	Produktnummer	Hersteller
Cobalt(III)chlorid-Hexahydrat	1.02539.0250	Merck
D(+)-Galactose	4987.2	Roth
D(+)-Glucose-Monohydrat	6780.2	Roth
Dikaliumhydrogenphosphat	1.05104.1000	Merck
Dikaliumhydrogenphosphat-Trihydrat	419A863899	Merck
DL-Isocitrat-Trinatriumsalz	I1252-1G	Sigma
Eisensulfat-Heptahydrat	1.03965.0500	Merck
Essigsäure		
Ethanol	1.00983.1011	Merck
Geneticinsulfat G-418	11811	Gibco
Glycerin	8.18709.9025	Merck
Hefeextrakt	2363.2	Roth
Kaliumchlorid	6781.3	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	3904.3	Roth
Kaliumsulfat	1.05153.0500	Merck
Kupfersulfat-Pentahydrat	1.02790.0250	Merck
L-Histidin	3852.3	Roth

---

Reagenz	Artikelnummer	Hersteller
L-Leucin	3984.3	Roth
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	1.05833.1000	Merck
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	P027.3	Roth
Manganchlorid-Tetrahydrat	1.05927.0100	Merck
Methanol	Roth	7342.1
Myo-Inositol	4071	Calbiochem
NAD	127965	Roche
NADH	107735	Roche
Natriumacetat-Trihydrat	6779.2	Roth
Natriumchlorid	1.06404.5000	Merck
Natrium-EDTA (Triplex III)	1.59294.0025	Merck
Natriumglutamat-Monohydrat	1.06445.1000	Merck
Natriumglyoxylat-Monohydrat	022962	Sigma Aldrich
Natriumhydroxid	9356.2	Roth
Natriummolybdat-Dihydrat	1.06521.0250	Merck
Natriumsulfat	8.22286.1000	Merck
Nicotinsäure	1.06817.0100	Merck
Ortho-Phosphorsäure, 84 %	1.00563.1000	Merck
Pepton aus Casein	8986.1	Roth
Polypropylenglykol PPG	20,233-9	Sigma Aldrich
Pyridoxin-Hydrochlorid	T914.2	Roth
Salzsäure	4625.2	Roth
Schwefelsäure	Merck	1.00731.1000
Struktol J 633	J 633	Schill + Seilacher
Struktol J 673	J 673	Schill + Seilacher

---

Tabelle 15.27: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Typ	Hersteller
96-Well-Filterplatten	516-6896	VWR
Abluftfilter Labfors	Satobran 300 2 µm	Watson-Marlow
Aludeckel für Probenfläschchen HPLC	548-0010	VWR
Deckgläser	24x50 mm	Marienfeld Superior
Einwegküvetten	Halbmikro	A. Hartenstein
Falcon-Röhrchen	15 mL, 50 mL	Nunc
Glasperlen	A553.1	Roth
Mikrotiterplatte	Deepwell, 8 Streifen	Nunc
Mikrotiterplatte Deepwell, 8 Streifen	04.072.0380	Nunc
Mikrotiterplatte U-Form	734-2080	Nunc
Probenfläschchen HPLC 1,5 mL	548-0004	VWR
Spritzenfilter	0,2 µm, 25 mm, PET	Roth
Spritzenfilter	SPARTAN 13 / 0,2 RC	Schleicher & Schuell
UV-Küvetten	Mikro (759200)	Brand
Zuluftfilter	Midisart 2 µm	Watson-Marlow