

**Produktion von Basischemikalien in den
Modellorganismen *Escherichia coli* und
*Synechocystis sp. PCC 6803***

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

Karlsruher Institut für Technologie (KIT) – Universitätsbereich

genehmigte

DISSERTATION

von

Andreas Hartmut Förster

aus

Hildesheim

Dekan: Prof. Dr. Peter Roesky

Referent: Prof. Dr. Johannes Gescher

Korreferent: Prof. Dr. Tilman Lamparter

Tag der mündlichen Prüfung: 19. 12. 2014

Liste der Publikationen und Konferenzbeiträge

1. **Förster, AH** und Gescher J, 2014. Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for Production of Mixed-Acid Fermentation End Products. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2:16. doi: 10.3389/fbioe.2014.00016.
2. Dolch, K, Danzer J, Kabbeck, T, Bierer, B, Erben, J, **Förster, AH**, Maisch, J, Nick, P, Kerzenmacher, S und Gescher, J, 2014. Characterization of microbial current production as a function of microbe-electrode-interaction. *Bioresour. Technol.* 157: 284-292 doi: 10.1016/j.biortech.2014.01.112
3. **Förster, AH** und Gescher J, 2014. Modification of the anaerobic metabolism of *Escherichia coli*: Accumulation of Mixed Acid Fermentation End Products. Poster bei der VAAM Jahrestagung 2014 in Dresden

I Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis	II
II	Zusammenfassung.....	VIII
III	Abbildungsverzeichnis.....	IX
IV	Tabellenverzeichnis	X
V	Abkürzungsverzeichnis.....	XII
1.	Einleitung	1
1.1.	Der Modellorganismus <i>Escherichia coli</i>	1
1.1.1.	Kohlenstoff-Metabolismus von <i>E. coli</i>	1
1.1.2.	Der Regulator ArcA (<i>anaerobic respiration control</i>)	4
1.1.3.	<i>E. coli</i> als Produktionsstamm in der Industrie.....	6
1.2.	Übersicht über die 2,3-Butandiolgärung.....	7
1.3.	<i>Synechocystis sp.</i> PCC 6803 als Modellorganismus für Cyanobakterien.....	8
1.3.1.	Die Lichtreaktion der Photosynthese.....	9
1.3.2.	Zentralstoffwechsel von <i>Synechocystis sp.</i> PCC 6803	10
1.3.3.	<i>Synechocystis sp.</i> PCC 6803 als phototropher Produktionsstamm.....	13
1.4.	Glycerinfermentation in der Hefe	14
1.5.	Zielsetzung der Arbeit.....	15
2.	Material und Methoden	17
2.1.	Bakterienstämme.....	17

2.2. Plasmide.....	19
2.3. Medien	20
2.3.1. Bakterienmedien und fakultative Zusätze	21
2.3.2. Antibiotika.....	25
2.4. Allgemeine Methoden.....	26
2.5. Anzucht von Bakterien.....	26
2.5.1. Aerobes Wachstum von <i>E. coli</i> in M9-Medium oder BG11-Medium	27
2.5.2. Anaerobes Wachstum von <i>E. coli</i> in M9-Minimalmedium.....	27
2.5.3. Acetoinproduktion in <i>E. coli</i> während des Wachstums.....	28
2.5.4. Glycerinproduktion von <i>Synechocystis</i>	29
2.5.5. Glycerinproduktion im Photoreaktor.....	30
2.6. Transformation von Bakterienzellen.....	31
2.6.1. Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	31
2.6.2. Chemische Transformation von <i>E. coli</i>	32
2.6.3. Herstellung elektrisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	32
2.6.4. Transformation von <i>E. coli</i> mittels Elektroporation.....	33
2.6.5. Transformation und Mutation von <i>Synechocystis</i> 6803	33
2.6.6. Erzeugen der <i>Synechocystis</i> -Mutante	34
2.7. Präparation und Nachweis von DNA.....	35
2.7.1. Reinigung von Plasmid-DNA.....	35
2.7.2. Isolation chromosomaler DNA aus <i>Synechocystis</i>	36

2.7.3.	Quantifizierung von DNA und RNA mittels Nano Drop	37
2.7.4.	DNA-Gelelektrophorese	37
2.7.5.	Sequenzierung von DNA	38
2.7.6.	Restriktion und Ligation von DNA	38
2.7.7.	Dephosphorylierung von DNA	39
2.7.8.	Klonierung des Plasmids für die Acetoin-Produktion	40
2.7.9.	Verwendete Oligonukleotide	41
2.7.10.	PCR an <i>Synechocystis</i> -Zellen	46
2.7.11.	Polymerasekettenreaktion (PCR)	46
2.7.12.	Reinigung von PCR Produkten	48
2.7.13.	Phosphorylierung von PCR-Fragmenten	48
2.7.14.	Klonierungsmethode nach Gibson et al. (2009)	49
2.7.15.	Lösungen für das Arbeiten mit DNA	52
2.8.	Methoden für die Arbeiten mit RNA	52
2.8.1.	Isolierung der Gesamt-RNA aus <i>Synechocystis</i>	52
2.8.2.	Verwendung einer DNase-Reaktion in einer RNA-Probe	53
2.9.	Methoden für Arbeiten mit Proteinen	53
2.9.1.	Proteinbestimmung nach Bradford (1976)	53
2.9.2.	SDS-PAGE	54
2.9.3.	Western-Blot und Immunodetektion	57
2.9.4.	Isolation des Gesamtproteins aus <i>Synechocystis</i>	58

2.10. Generierung von <i>E. coli</i> Mutanten.....	59
2.10.1. Deletion von Genen nach Kolisnychenko et al. (2002)	59
2.10.2. Deletion der Alkoholdehydrogenase <i>adhE</i> aus dem Stamm JG11	62
2.10.3. Herstellung des linearen DNA-Fragments für die Deletion der löslichen Lactatdehydrogenase <i>ldhA</i>	63
2.10.4. Deletion von <i>ldhA</i> mit einem linearem DNA-Fragment.....	65
2.10.5. Deletion von Genen mittels <i>gene gorging</i> (Herring <i>et al.</i> , 2003) und <i>galk</i> -Selektion.....	66
2.10.6. Deletion der Phosphotransacetylase und der Acetatkinase (<i>pta-ack</i>) mittels <i>gene gorging</i>	69
2.10.7. Klonierung des Mutationsplasmids für die Deletion von <i>pta-ack</i>	69
2.10.8. Deletion von <i>pta-ack</i>	70
2.10.9. Klonierung des Plasmids für die Deletion des Regulators <i>arcA</i>	70
2.10.10. Deletion von <i>arcA</i> in den Stämmen JG472 und JG806	71
2.10.11. Integration des Cytochroms <i>stc</i> über eine Phagen-Integrationssequenz.....	71
2.11. Quantitative Analysen.....	72
2.11.1. Enzymatische Glucosebestimmung	72
2.11.2. Enzymatische Formiatbestimmung.....	73
2.11.3. Enzymatische Glycerinbestimmung	74
2.11.4. Quantifizierung organischer Säuren mittels HPLC	75
2.11.5. Quantifizierung von Ethanol mittels GC	76
2.11.6. Quantifizierung von Acetoin durch die Voges-Proskauer-Reaktion	77

3. Ergebnisse	79
3.1. <i>E. coli</i> : Modifikationen des Zentralstoffwechsels	79
3.1.1. Wachstum und Stoffakkumulation des Wildtyps und der Mutante JG11	79
3.1.2. Charakterisierung der <i>E. coli</i> Doppelmutante <i>frd/adhE</i> (Stamm JG369).....	83
3.1.3. Deletion der löslichen Lactatdehydrogenase <i>ldhA</i> und Erweiterung des Substratspektrums (Stamm JG472).....	87
3.1.4. Generierung eines Gärungsdefizienten <i>E. coli</i> Stamms	91
3.1.5. Deletion von <i>arcA</i> (<i>anaerobic respiration control</i>)	94
3.1.6. Zusammenfassung von Wachstumsverhalten und Stoffakkumulation der <i>E. coli</i> Mutanten.....	96
3.2. Acetoinproduktion im Stamm JG806	98
3.3. Produktion von Glycerin mit <i>Synechocystis sp.</i> PCC 6803	102
3.3.1. Überprüfung der Integration der Glyceringene	103
3.3.2. Glycerinproduktion im Batchversuch.....	103
3.3.3. Glycerinproduktion im Photoreaktor.....	107
3.4. Aerobe Acetoinproduktion in modifiziertem BG11 Medium mit Glycerin	109
4. Diskussion	112
4.1. Manipulation des Kohlenstoff-Metabolismus in <i>E. coli</i>	112
4.1.1. Wachstumsverhalten der <i>E. coli</i> Stoffwechselmutanten	112
4.1.2. Acetatakkumulation in Stamm JG472.....	116
4.1.3. Pyruvatakkumulation in Stamm JG806 (Δ <i>frd adhE ldhA pta-ack</i>)	117
4.1.4. Auswirkungen einer <i>arcA</i> -Deletion in einem Gärungs-defizienten Stamm.	119

4.2. Acetoinproduktion in <i>E. coli</i>	121
4.3. Glycerinproduktion in <i>Synechocystis</i>	123
4.4. Ausblick	126
5. Danksagung.....	128
6. Anhang	130
6.1. Errechnete p-Werte des Welch-Tests.....	130
7. Literaturverzeichnis.....	132

II Zusammenfassung

Die beiden in dieser Arbeit verwendeten Organismen *Escherichia coli* und *Synechocystis sp.* PCC 6803 sind als Modellorganismen weit verbreitet. Sie werden auch für die heterologe Expression von Proteinen zur Produktion von chemischen Produkten verwendet.

E. coli wurde bereits in früheren Arbeiten zur Produktionen von Molekülen der gemischten Säuregärung optimiert. So existieren z.B. Stämme für die Produktion von Lactat oder Ethanol (Ohta *et al.*, 1991, Zhou *et al.*, 2003). Den genannten Arbeiten ist gemeinsam, dass konkurrierende Stoffwechselrouten blockiert und gegebenenfalls heterologe Proteine zur Produktivitätssteigerung exprimiert wurden. Ein ähnlicher Ansatz wurde auch in dieser Arbeit verfolgt, indem die Gene der gemischten Säuregärung (*frd*, *adhE*, *ldhA*, *pta-ack*) deletiert wurden. Durch die Deletionen akkumulierte *E. coli* Pyruvat mit einer Ausbeute von 65-70% des theoretischen Maximums im Medium. Da Pyruvat ein wichtiger Verzweigungspunkt im Kohlenstoff-Metabolismus ist, wurde die Eignung als Plattformorganismus am Beispiel der Acetoin synthese gezeigt. So wurde ein Expressionsvektor mit den *Bacillus subtilis*-Genen *alsS* und *alsD* kloniert und der Pyruvat produzierende *E. coli* Stamm mit diesem Plasmid transformiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Acetoinproduktion unter Bedingungen der anaeroben Atmung im Vergleich zum Wildtyp verdoppelt (DMSO als Akzeptor) oder verdreifacht (Nitrat) werden konnte. Die maximale Ausbeute betrug 90%, was die bisher höchste gemessene Ausbeute einer anaeroben Acetoinproduktion darstellt.

Das Cyanobakterium *Synechocystis sp.* PCC6803 wurde bereits als Produktionsstamm für Lactat oder Fettsäuren veröffentlicht (Angermayr *et al.*, 2012, Liu *et al.*, 2010). Eine Glycerinproduktion ist bisher noch nicht beschrieben. Aus diesem Grund wurden die Gene *gpp2* und *cgGPD* aus *Saccharomyces cerevisiae* und *sthA* aus *E. coli* ins Genom integriert. Das Gen *sthA* codiert für eine Transhydrogenase und die Gene *gpp2* und *cgGPD* codieren für Enzyme, die Dihydroxyaceton in Glycerin umwandeln. Die generierte *Synechocystis*-Mutante produzierte durchschnittlich bis zu 5 μM Glycerin pro Stunde in einem Photoreaktor mit optimierten Bedingungen. Eine zukünftige Steigerung dieser Produktivität ist wahrscheinlich. Damit konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal die Glycerinproduktion in *Synechocystis* beschrieben und durch verbesserte Kultivierungsbedingungen gesteigert werden.

III Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Übersicht über den zentralen Kohlenstoff-Metabolismus in <i>E. coli</i> .	3
Abb. 2: Darstellung des ArcAB-Zweikomponentensystems.	5
Abb. 3: Übersicht der 2,3-Butandiolgärung in <i>B. subtilis</i> .	7
Abb. 4: Übersicht über die Lichtreaktion der Photosynthese in <i>Synechocystis</i> .	10
Abb. 5: Reaktionsschema des Calvin-Zyklus, Gluconeogenese und Glycolyse.	12
Abb. 6: Überblick der Glycerinfermentation in <i>S. cerevisiae</i> .	15
Abb. 7: Schematischer Aufbau des in der Arbeit verwendeten Reaktors.	30
Abb. 8: Ablauf der Klonierungsmethode nach Gibson (2009).	50
Abb. 9: Herstellung des so genannten Megaprimers.	59
Abb. 10: Überblick über die Deletionsmethode nach Kolisnychenko (2002).	61
Abb. 11: Ablauf der Mutation durch <i>gene gorging</i> .	68
Abb. 12: Glycerin-Reaktionsschema.	75
Abb. 13: Wachstumskonstante von <i>E. coli</i> DH5 α und JG11.	80
Abb. 14: Stoffakkumulation in den Stämmen DH5 α und JG11.	82
Abb. 15: Wachstumskonstanten WT, JG11 und JG369.	84
Abb. 16: Anaerobe Stoffproduktion der Stämme DH5 α , JG11 und JG369.	86
Abb. 17: Wachstumskonstanten der Stämme DH5 α , JG11, JG369 und JG472.	88
Abb. 18: Acetat-Akkumulation pro mol konsumierter Glucose.	90
Abb. 19: Wachstumskonstanten der Stämme DH5 α , JG11, JG369, JG472 und JG806.	92
Abb. 20: Pyruvatproduktion mol/mol verbrauchter Glucose in JG806.	94
Abb. 21: Aerobe Wachstumskonstanten der $\Delta arcA$ -Mutanten.	95
Abb. 22: Acetoinproduktion im Wildtyp und in JG806.	101
Abb. 23: Qualitativer Nachweis der Insertion von <i>sthA</i> , <i>gpp2</i> , <i>cgGPD</i> .	103
Abb. 24: Wachstum des Wildtyps in BG11-Glycerin Medium.	104
Abb. 25: Glycerinproduktion im Batchversuch.	105
Abb. 26: Wachstumskonstanten von <i>Synechocystis</i> im Batch-Versuch.	106
Abb. 27: Vergleich von Wachstum und Glycerintiter im Batch und im Reaktor.	108
Abb. 28: Wachstumskonstanten von <i>Synechocystis</i> im Reaktorversuch.	109
Abb. 29: Aerobe Acetoinproduktion in modifiziertem BG11-Medium.	110

IV Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verwendete <i>E. coli</i> Stämme.....	17
Tab. 2: Verwendete <i>Synechocystis sp.</i> 6803 Stämme.	18
Tab. 3: In der Arbeit verwendete Plasmide.....	19
Tab. 4: In der Arbeit verwendete Nährmedien und Medienzusätze.....	21
Tab. 5: Allgemeine Methoden.....	26
Tab. 6: Parameter für die Glycerinproduktion im Plattenreaktor.....	31
Tab. 7: In der Arbeit verwendete Oligonukleotide.....	41
Tab. 8: PCR-Programm.....	48
Tab. 9: Zusammensetzung des isothermalen Reaktionspuffers.	51
Tab. 10: Reaktionsansatz der isothermalen Klonierung.....	51
Tab. 11: Lösungen und Puffer für das Arbeiten mit DNA.....	52
Tab. 12: Bradford-Lösung.....	54
Tab. 13: Zusammensetzung der Puffer/Gele für eine SDS-PAGE.	56
Tab. 14: Puffer für die Durchführung eines Western-Blots.	58
Tab. 15: PBS-Puffer.	59
Tab. 16: Übersicht der in der Klonierung erzeugten Zwischenprodukte.	65
Tab. 17: Reaktionslösungen für die enzymatische Glucosebestimmung.....	73
Tab. 18: Verwendete Lösungen für die enzymatische Formiatbestimmung.....	74
Tab. 19: Verwendetes HPLC-System.	76
Tab. 20: Parameter für die Alkoholbestimmung mittels GC.	77
Tab. 21: Reaktionslösung für die Acetoin-Bestimmung und Reaktionsansatz.....	78
Tab. 22: Finale optische Zelldichten des Wildtyps und von JG11.....	80
Tab. 23: Zelldichte am Ende des Versuchs von DH5 α , JG11 und JG369.	84
Tab. 24: Zelldichte am Ende des Versuchs von DH5 α und den Mutanten.	89
Tab. 25: Zelldichte am Ende des Versuchs von DH5 α und den Deletionsmutanten.	92
Tab. 26: Finale Zelldichte der <i>arcA</i> -Mutanten und ihrer Vorgängerstämme.....	96
Tab. 27: Zusammenfassung der Wachstumsexperimente – Wachstumskonstante und Zelldichte.....	97
Tab. 28: Zusammenfassung der Wachstumsexperimente – Stoffumsätze.....	97
Tab. 29: Ermittelte Differenz des pH-Wertes am Ende der Kultivierung.....	98
Tab. 30: Finale Zelldichte und Wachstumskonstante bei der Acetoinproduktion.	99
Tab. 31: Kohlenstoffbilanz bei der Acetoinproduktion im Wildtyp und in JG806.....	102

Tab. 32: Wachstumskonstante und finale Zelldichte bei aerober Acetoinproduktion.	110
Tab. 33: Kohlenstoffbilanz der aeroben Acetoinproduktion.....	111
Tab. 34: Pyruvatproduktion in <i>E. coli</i>	119
Tab. 35: Vergleichende Werte für Acetoinproduktion in <i>E. coli</i> und <i>Bacillus subtilis</i>	123
Tab. 36: Durchschnittliche Konzentrationszunahme von Produkten in <i>Synechocystis</i>	126
Tab. 37: Errechnete p-Werte nach Welch-Test <i>E. coli</i>	130
Tab. 38: Errechnete p-Werte nach Welch-Test <i>Synechocystis</i>	131

V Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-Diphosphat
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosin-Triphosphat
Chl ^R	Chloramphenicol-Resistenz
DH	Dehydrogenase
DMSO	Dimethylsulfoxid
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Gent ^R	Gentamycin-Resistenz
Kan ^R	Kanamycin-Resistenz
LB	<i>lysogeny broth</i>
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidiert)
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduziert)
NADP ⁺	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (oxidiert)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduziert)
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
OD ₇₅₀	Optische Dichte bei 750 nm
PEP	Phosphoenolpyruvat
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
Tab.	Tabelle
% (V/V)	Volumenprozent pro Volumen
% (w/V)	Gewichtsprozent pro Volumen

1. Einleitung

1.1. Der Modellorganismus *Escherichia coli*

Escherichia coli wurde Ende des 19. Jahrhunderts von Theodor Escherich isoliert und als *bacterium coli commune* beschrieben. Es ist ein gramnegatives Stäbchen und kommt als natürlicher Bewohner des menschlichen Darms vor. Neben vielen nicht-pathogenen Stämmen sind nur wenige pathogene *E. coli* bekannt, wie beispielsweise *E. coli* O157 (Pennington, 2010). *E. coli* ist darüber hinaus einer der am besten untersuchten Organismen und genetisch sehr gut zugänglich. Das Genom wurde bereits 1997 vollständig sequenziert und die Funktion vieler Gene ist bereits aufgeklärt (Blattner *et al.*, 1997). Bisher sind zahlreiche Methoden für die genomische Manipulationen dieses Organismus beschrieben (Richter & Gescher, 2012). Aufgrund der überwiegend nicht-pathogenen Stämme und der einfachen, genetischen Zugänglichkeit hat sich *E. coli* als Modellorganismus in der Forschung, aber auch als Produktionsstamm verschiedener chemischer Verbindungen oder pharmazeutischer Produkte etabliert (Walsh, 2006). Dabei ist für die biotechnologische Nutzung dessen breites Substratspektrum von Vorteil: *E. coli* ist in der Lage Zuckerverbindungen, einige organische Säuren oder auch Glycerin zu verwerten (Leiby & Marx, 2014). Die beiden letztgenannten Verbindungen sind für gewöhnlich nur unter respiratorischen Bedingungen nutzbar. Eine Fermentation organischer Säuren, die als Endprodukte der gemischten Gärung entstehen ist nicht möglich. Glycerin dagegen kann unter bestimmten Voraussetzungen fermentativ genutzt werden (Dharmadi *et al.*, 2006, Gonzalez *et al.*, 2008, Trchounian & Trchounian, 2013). Darüber hinaus befassen sich verschiedene Forschungsgruppen damit, weitere Substanzen als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzbar zu machen. Besonders bei der Verwertbarkeit von Pflanzenabfallstoffen sind in letzter Zeit Fortschritte gemacht worden (Wang *et al.*, 2013c, Kim *et al.*, 2011, Saha & Cotta, 2011, Saha *et al.*, 2011, Layton *et al.*, 2011, Ryu & Karim, 2011).

1.1.1. Kohlenstoff-Metabolismus von *E. coli*

E. coli ist als fakultativ anaerober Organismus in der Lage, sowohl mit als auch ohne Sauerstoff als Elektronenakzeptor zu wachsen. Hierbei kann Glucose wie folgt aufgenommen werden: Einerseits über die beiden Phosphotransferasesysteme für Glucose und Mannose und

andererseits mithilfe des Galaktose:H⁺ Symporters. Die Aufnahme über ein Phosphotransferasesystem hat die direkte Phosphorylierung der Glucose zur Folge. Der Donor für die Phosphatgruppe ist das während der Glycolyse gebildete Phosphoenolpyruvat. Wurde Glucose über den Galaktose-Transporter aufgenommen, wird sie durch die Aktivität der Glucokinase phosphoryliert (Escalante *et al.*, 2012, Hunter & Kornberg, 1979, Steinsiek & Bettenbrock, 2012). Aerob wird Glucose durch Glycolyse und Zitronensäurezyklus vollständig zu Kohlendioxid oxidiert. Durch die hohe Differenz der Redoxpotentiale von Glucose zu Sauerstoff kann unter aeroben Bedingungen die meiste Energie gewonnen werden, die zur Ausbildung eines Protonengradienten zwischen dem periplasmatischen Raum und dem Cytoplasma genutzt wird. Der Rückfluss der Protonen ins Cytoplasma treibt die ATPase an, wodurch ATP aus ADP und Pyrophosphat gebildet wird (Erhardt *et al.*, 2014). Unter anoxischen Bedingungen betreibt *E. coli*, je nach Verfügbarkeit von alternativen Elektronenakzeptoren, Atmung oder Gärung. Bei der Vergärung von Glucose entstehen durch die gemischte Säuregärung Lactat, Acetat, Succinat, Formiat und Ethanol. Im Gegensatz zu aeroben Bedingungen, wird ATP anaerob überwiegend durch Substratkettenphosphorylierung in der Glycolyse und bei der Umsetzung der aktivierten Essigsäure Acetyl-CoA zu Acetat (Clark, 1989) gebildet. Die Synthese von Lactat wird durch die lösliche Lactatdehydrogenase (*ldhA*), eine von insgesamt drei Lactatdehydrogenasen, katalysiert (Bunch *et al.*, 1997). Die anderen zwei sind membrangebundene Enzyme, die für die Aufnahme und die Verwertung von extrazellulär vorkommender Milchsäure genutzt werden. Dabei steht jeweils ein Enzym für beide möglichen Enantiomere zur Verfügung (Kline & Mahler, 1965). *E. coli* ist demnach in der Lage, beide Lactat-Enantiomere zu verwerten, während es selbst nur die D-Form bilden kann (Tarmy & Kaplan, 1968). Die Produktion von Alkohol wird durch die Alkoholdehydrogenase (*adhE*) katalysiert, die Acetyl-CoA in zwei Reaktionsschritten zu Ethanol reduziert. Das Zwischenprodukt Acetaldehyd entsteht nach der ersten Reduktion und wird nicht freigesetzt. Es wird durch ein zweites NADH-Molekül erneut zu Ethanol reduziert. Acetyl-CoA ist auch der Ausgangsstoff für die Acetatbildung. Zunächst wird die CoA-Gruppe abgespalten und durch eine Phosphatgruppe ersetzt (Phosphotransacetylase *pta*). Das hier entstehende Acetylphosphat wird durch die Acetatkinase (*ack*) zu Acetat umgesetzt. Dabei wird die Phosphatgruppe auf ein ADP übertragen, was zur Bildung von ATP führt. Die Bildung von Succinat beginnt mit einer anaplerotischen Reaktion, einer Auffüllreaktion des Zitronensäurezyklus. Die PEP-Carboxylase katalysiert die Carboxylierung von Phosphoenolpyruvat zu Oxalacetat. Dieses wird nun durch die Malatdehydrogenase reduziert

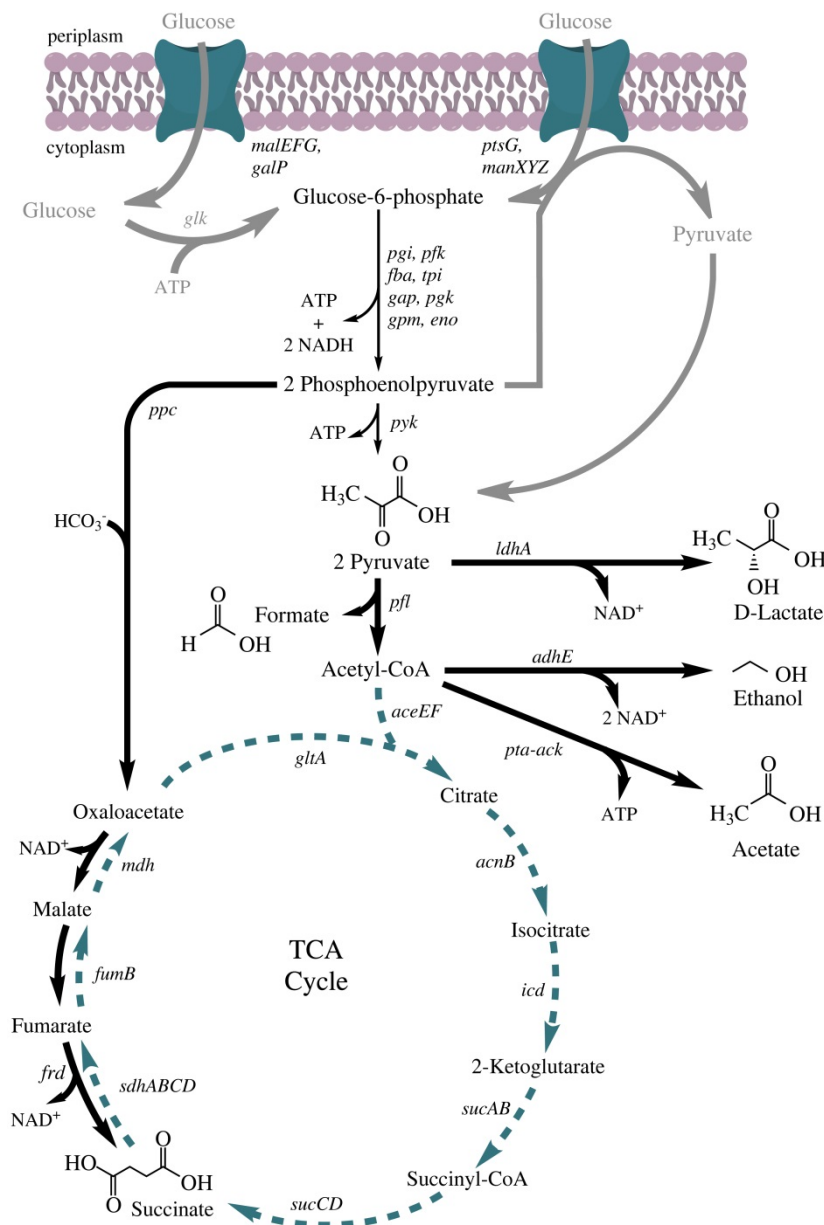


Abb. 1: Übersicht über den zentralen Kohlenstoff-Metabolismus in *E. coli*.

Glucose kann über drei verschiedene Systeme von der Zelle aufgenommen werden (dicke, graue Pfeile). Unter aeroben Bedingungen wird Glucose beim Durchlaufen der Glykolyse (dünne schwarze Pfeile) und des Zitronensäurezyklus (gestrichelte Linie) komplett oxidiert. Bei der anoxischen Verwertung ohne externen Elektronenakzeptor betreibt *E. coli* gemischte Säuregärung (dicke schwarze Pfeile). Die Strukturformeln sind für die fünf Gärprodukte angegeben. Gene: *malEFG* (Maltose ABC Transporter), *galP* (Galaktose: H^+ Symporter), *ptsG* (fusioniertes Glucose-spezifisches PTS Enzym: IIB und IIC Komponente), *manXYZ* (Mannose PTS Permease), *glk* (Glucokinase), *pgi* (Glucose-6-Phosphat Isomerase), *pfk* (6-Phosphofruktokinase), *fba* (Fructose-bisphosphat Aldolase), *tpi* (Triosephosphate Isomerase), *gap* (Glycerinaldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase), *pgk* (Phosphoglycerat Kinase), *gpm* (Phosphoglycerat Mutase), *eno* (Enolase), *pyk* (Pyruvat Kinase), *ppc* (Phosphoenolpyruvat Carboxylase), *ldhA* (Lactat Dehydrogenase), *pfl* (Pyruvat Formiat Lyase), *aceEF* (Pyruvat Dehydrogenase Komplex), *adhE* (Alkohol Dehydrogenase), *pta* (Phosphoacetyltransferase), *ack* (Acetat Kinase), *gltA* (Citratsynthase), *acnB* (Aconitase), *icd* (Isocitrate Dehydrogenase), *sucA* (α -Ketoglutarat Decarboxylase), *sucB* (α -Ketoglutarat Dehydrogenase), *sucCD* (Succinyl-CoA Synthetase), *sdhABCD* (Succinat Dehydrogenase), *fumB* (Fumarat Hydratase), *frd* (Fumarat Reductase), *mdh* (Malat Dehydrogenase) (Förster & Gescher, 2014).

und durch die Fumarase wird ein Wassermolekül abgespalten. Das dabei entstehende Fumarat wird durch die Fumaratreduktase (*frd*) zu Succinat reduziert. Es werden bei der Succinatbildung, wie bei der Alkoholgärung, zwei Moleküle NADH verbraucht. Formiat entsteht durch die Aufspaltung von Pyruvat in Formiat und Acetyl-CoA durch die Pyruvat-Formiat-Lyase (*pflA*). Formiat ist eine starke Säure und kann durch die Übertragung von Elektronen auf Menachinon zu CO₂ oxidiert werden. Für den Aufbau einer protonenmotorischen Kraft ist es entscheidend, welcher Elektronenakzeptor genutzt wird. Die Nitratatmung ist die Form der anaeroben Atmung, bei der am meisten Zellenergie gewonnen werden kann. Hierbei wird ATP neben der Substratkettenphosphorylierung auch durch oxidative Phosphorylierung gebildet (Yamamoto & Ishimoto, 1977, Ingledew & Poole, 1984). Bei der anaeroben Respiration entsteht überwiegend Acetat, was *E. coli* im Vergleich zu anderen Gärprodukten eine höhere ATP-Ausbeute ermöglicht (Trotter *et al.*, 2011). Die Produktion von Acetat hat allerdings eine nicht vollständige Oxidation des Substrats zur Folge, wodurch die Energieausbeute insgesamt niedriger ist. In Abb. 1 ist eine Zusammenfassung des zentralen Kohlenstoffwechsels dargestellt.

1.1.2. Der Regulator ArcA (*anaerobic respiration control*)

Das ArcAB Zweikomponentensystem besteht aus der membrangebundenen Sensorkinase ArcB und dem cytoplasmatischen Regulator ArcA (Iuchi & Lin, 1988, Iuchi *et al.*, 1990). ArcB besteht aus drei cytoplasmatischen Untereinheiten und zwei Segmenten, die als Membrananker fungieren (Iuchi *et al.*, 1990, Kwon *et al.*, 2000). Die H1-Domäne wird durch den Oxidationszustand von in der Cytoplasmamembran vorliegenden Quinonen reguliert, wobei ein oxidiertes Quinonpool die Phosphorylierung von H1 inhibiert (Bekker *et al.*, 2010, Georgellis *et al.*, 2001). Die Phosphorylierung wird durch Lactat, Acetat und Pyruvat stimuliert (Georgellis *et al.*, 1999). Wird H1 phosphoryliert, finden Transphosphorylierungsreaktionen statt, die letztendlich zu einer Aktivierung von ArcA führen. ArcA ist der *response regulator* des Systems und beeinflusst die Expression zahlreicher Gene (siehe Abb. 2). Vereinfacht lässt sich sagen, dass Gene, die für respiratorisches Wachstum nötig sind inhibiert werden, während Gene, die für Komponenten des fermentativen Wachstums kodieren aktiviert werden (Liu *et al.*, 2009, Malpica *et al.*, 2006, Salmon *et al.*, 2005, Georgellis *et al.*, 1997).

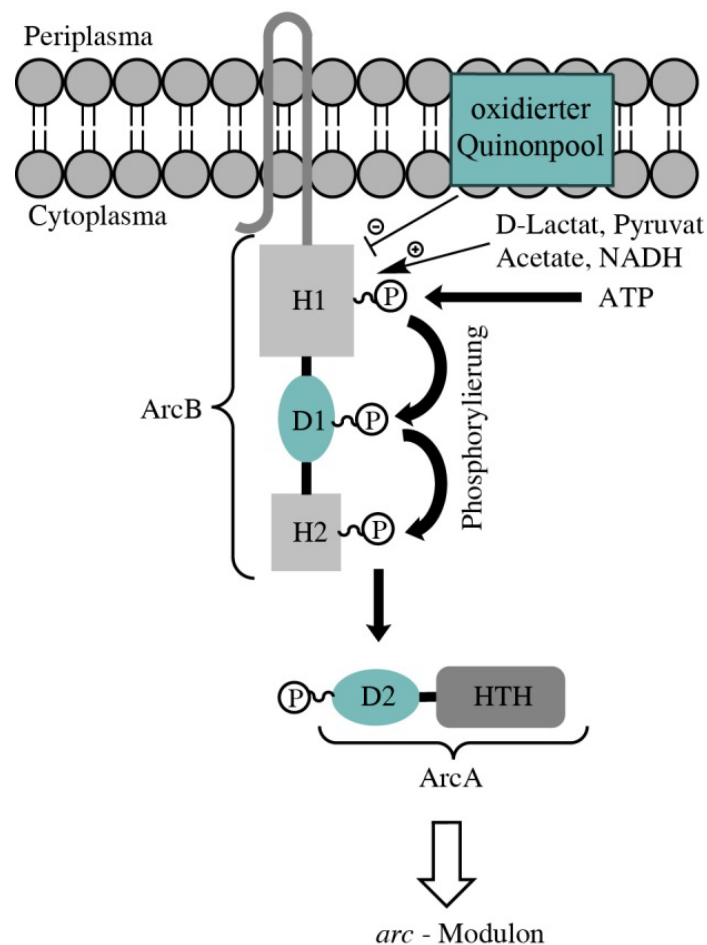


Abb. 2: Darstellung des ArcAB-Zweikomponentensystems.

Lactat, Acetat, Pyruvat oder NADH fördern die Phosphorylierung der cytoplasmatischen Domäne H1, ein oxidierter Quinonpool inhibiert die Aktivierung. Bei einer Phosphorylierung wird die Phosphatgruppe über die Domänen D1 und H1 letztendlich auf den *response regulator* ArcA übertragen, der dann die Expression verschiedener Gene reguliert. HTH: Helix Turn Helix Motiv. (Abbildung nach Liu et al., 2009).

So ist der Zitronensäurezyklus in einer *arcA*-Deletionsmutante, der unter anaeroben Bedingungen nur anabolische Funktionen hat, hochreguliert (Prohl *et al.*, 1998, Toya *et al.*, 2012). Aus diesem Grund werden *arcA*-Mutanten als vielversprechende Kandidaten für die Produktion reduzierter Biomoleküle, wie Polyhydroxyalkanoaten, angesehen (Pettinari *et al.*, 2008), da ein aktiverer Zitronensäurezyklus zu höheren intrazellulären NADH oder NADPH Konzentrationen führen könnte. Neben der Regulation im zentralen Kohlenstoffmetabolismus stehen auch die aerobe Peroxid-Resistenz und mikroaerobe Redox-Regulationen unter der Kontrolle von ArcAB (Alexeeva *et al.*, 2003, Loui *et al.*, 2009).

1.1.3. *E. coli* als Produktionsstamm in der Industrie

Der industrielle Einsatz von *E. coli* als Produktionsorganismus findet sowohl für pharmazeutische als auch chemische Produkte statt. Fast ein Drittel der rekombinant hergestellten, therapeutischen Proteine wird in *E. coli* produziert (Huang *et al.*, 2012). Die Produktion von Interferon- α (Babu *et al.*, 2000) oder Insulin (Schmidt *et al.*, 1999) findet beispielsweise bereits seit über zehn Jahren durch hitzeinduzierte Expression statt. Viele Forschungsarbeiten befassen sich auch mit der Produktion gemischter Säuregärungsprodukte, wo durch heterologe Expression und Gendelektionen hohe Produktionsausbeuten bei Lactat, Ethanol und Succinat erreicht wurden (Förster & Gescher, 2014). Prinzipiell wurden konkurrierende Stoffwechselwege blockiert, wodurch ein verstärkter Kohlenstofffluss durch den bevorzugten Produktionsweg geleitet wurde. Auf diese Weise konnten beispielsweise Lactat-Ausbeuten erreicht werden, die vergleichbar mit Ausbeuten von Milchsäurebakterien waren (Zhou *et al.*, 2005). Lactat ist Grundbaustein für das als Bioplastik verwendete Polylactat. Die Verwendung von *E. coli* erweitert dabei das Substratspektrum enorm und verringert gleichzeitig die Kosten für die Nährmedien. Milchsäurebakterien benötigen komplexe Medien (van Niel & Hahn-Hagerdal, 1999), während *E. coli* in einfachen Minimalmedien mit Kohlenstoffquelle zum Wachstum befähigt ist. *E. coli* scheint daher ein geeigneterer Produzent zu sein. Durch heterologe Expression einer Polyhydroxyalkanoat-Synthase ist auch die Akkumulation von 3-Hydroxyalkanoat möglich (Abedi *et al.*, 2012), welches im medizinischen Bereich bei Prothesen und Implantaten Verwendung findet (Philip *et al.*, 2007). Für die Produktion von Brenztraubensäure sind bisher nur wenige Arbeiten veröffentlicht worden. Dies liegt in der Tatsache begründet, dass fermentative Produktionen bevorzugt sind und es keinen Gärungsweg mit Pyruvat als Endprodukt gibt. Aus diesem Grund ist eine nicht stöchiometrische Gärung zum Pyruvat nötig. Einen solchen Ansatz verfolgte Causey *et al.* (2004), die eine Umsetzung von Glucose zu Pyruvat unter mikroaeroben Bedingungen zeigten. Es konnten Ausbeuten von 0,75 g Pyruvat /g Glucose erreicht werden. Andere Arbeiten nutzen aerobe Produktionsprozesse für die Pyruvatsynthese (Zelic *et al.*, 2003). Pyruvat ist ein universeller Ausgangsstoff für verschiedene Gärungswege: Milchsäuregärung, Alkoholgärung (Förster & Gescher, 2014) oder Butandiolgärung beginnen mit Pyruvat als Substrat (Xiao & Lu, 2014), weshalb ein Pyruvatproduktionsstamm als Plattformorganismus für anderweitige Produktionen ein interessante Option darstellen würde.

1.2. Übersicht über die 2,3-Butandiolgärung

Bacillus subtilis gehört zu den Organismen, die unter anaeroben Bedingungen eine gemischte Gärung betreiben. Ein Endprodukt der Gärung ist 2,3-Butandiol. Dabei wird Pyruvat durch die Aktivität von drei Enzymen zu 2,3-Butandiol umgesetzt: In der ersten Teilreaktion katalysiert die Acetolactat-Synthase (*alsS*) die Kondensation von zwei Pyruvatmolekülen zu Acetolactat. Dabei wird ein CO₂-Molekül freigesetzt. Die Acetolactat-Decarboxylase (*alsD*) erzeugt durch die Abspaltung eines weiteren CO₂-Moleküls Acetoin. Dieses wird dann zu 2,3-Butandiol reduziert. Die Acetoin-Reduktase / 2,3-Butandioldehydrogenase (*bdhA*) katalysiert diese Reaktion in *B. subtilis* unter Verbrauch von NADH (Cruz Ramos *et al.*, 2000, Renna *et al.*, 1993, Nicholson, 2008). Ein vereinfachtes Reaktionsschema zur 2,3-Butandiolgärung ist in Abb. 3 dargestellt.

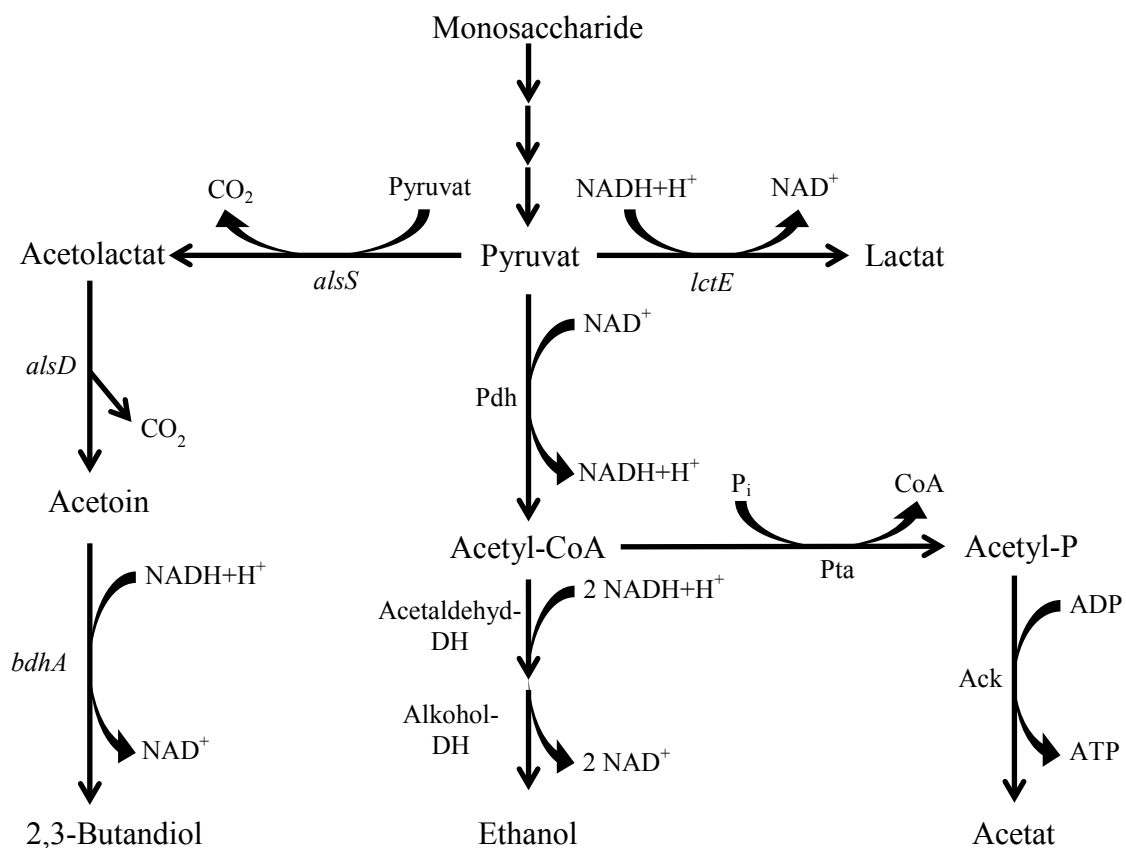


Abb. 3: Übersicht der 2,3-Butandiolgärung in *B. subtilis*.

Dargestellt ist eine Übersicht über die 2,3-Butandiolgärung in *B. subtilis*. Monosaccharide werden zu Pyruvat abgebaut, welches als Substrat für die verschiedenen Gärungswege fungiert. Abkürzungen und Gennamen: *lctE* (Lactat-Dehydrogenase), *alsS* (Acetolactat-Synthase), *alsD* (Acetolactat-Decarboxylase), *bdhA* (Acetoin-Reduktase/2,3-Butandioldehydrogenase), *Pdh* (Pyruvat-Dehydrogenase), *Pta* (Phosphotransacetylase), *Ack* (Acetatkinase), DH (Dehydrogenase). Abgewandelt nach Cruz Ramos (2000).

Butandiol gilt als Grundbaustein- und Treibstoffchemikalie, die für *E. coli* eine geringere Toxizität besitzt als andere geeignete Biokraftstoffe. Erst kürzlich wurde eine erfolgreiche Butandiolproduktion in *E. coli* mit hoher Ausbeute veröffentlicht. Die Ausbeute der aeroben Produktion betrug 0,45 g Butandiol /g konsumierter Glucose, was etwa 90% des maximal möglichen Wertes entspricht (Xu *et al.*, 2014b). Acetoin, die Vorstufe des Butandiols, findet unter anderem Verwendung als Geschmacksverstärker in der Lebensmittelindustrie und als Vorstufe für Pyrazine. Strategien für die fermentative Produktion von Acetoin wurden erst kürzlich zusammengefasst (Xiao & Lu, 2014). Die Produktion von Acetoin in *E. coli* ist bisher mit einer Ausbeute von ca. 85% beschrieben. Diese Ausbeuten konnten mit Glucose als Kohlenstoffquelle unter aeroben Bedingungen erreicht werden (Ui *et al.*, 1998, Oliver *et al.*, 2013).

1.3. *Synechocystis sp.* PCC 6803 als Modellorganismus für Cyanobakterien

Cyanobakterien sind die einzigen Prokaryoten, die zur oxidativen Photosynthese befähigt sind. Sie werden in der Endosymbiontentheorie als die Vorfahren von Chloroplasten in höheren Pflanzen angesehen (Sagan, 1967).

Synechocystis sp. PCC 6803 ist ein Süßwasser-Cyanobakterium, welches sowohl zur oxygenen Photosynthese, als auch zum heterologen Wachstum mit Glucose befähigt ist (Williams, 1988, Rippka *et al.*, 1979). Es wurde um 1971 in kalifornischem Süßwasser isoliert (Stanier *et al.*, 1971) und wird unter anderem als Modellorganismus für die Untersuchung der Photosynthese und der Kohlen- und Stickstoffassimilation verwendet. Phylogenetisch wird eine Verwandtschaft zu Gram-positiven Bakterien vermutet (Xiong *et al.*, 2000, Hansmann & Martin, 2000). Die vollständige Sequenzierung des Genoms, die gleichzeitig die erste komplette Sequenzierung eines Cyanobakteriums darstellt, wurde 1996 abgeschlossen (Kaneko *et al.*, 1996). Die Anzahl der Genomkopien wird in der Literatur unterschiedlich angegeben und scheint je nach Wachstumsphase stark zu variieren. Die Anzahl der veröffentlichten Genomkopien schwankt zwischen Werten von 12 (Labarre *et al.*, 1989) und 218. Dabei wurden 218 Kopien während des exponentiellen Wachstums nachgewiesen und in der stationären Phase noch knapp 60 Genome pro Zelle detektiert. Vorteile von polyploiden Organismen sind neben einer geringeren Rate von spontanen

Mutationen auch eine vergrößerte Zelle und eine erhöhte Redundanz (Griese *et al.*, 2011). Für die Verwendung als Modellorganismus können polyploide Zellen problematisch sein: Soll eine genomische Mutation eingefügt werden, ist es nötig, alle Genomkopien innerhalb der Zelle zu verändern, da sonst ein Verlust der Mutation durch homologe Rekombination von mutiertem Genom mit dem Wildtypgenom möglich ist. Dennoch bietet *Synechocystis* viele Vorteile: Neben dem vollständig sequenzierten Genom (Kaneko *et al.*, 1996) sind die natürliche Kompetenz und die dadurch einfache genetische Zugänglichkeit entscheidend. Die bisher zusammengetragenen genetischen Informationen können in einer Datenbank (Cyanobase) abgerufen und mit eigenen Ergebnissen ergänzt werden (Nakamura *et al.*, 1998, Nakao *et al.*, 2010). Es existieren insgesamt vier verschiedene Subtypen von *Synechocystis* („PCC“, „ATCC“, „GT“ und „Kazusa“), wovon lediglich der Kazusa-Stamm sequenziert wurde. Die vier Subtypen unterscheiden sich, bezogen auf Glucosetoleranz, Motilität und der natürlichen Kompetenz, phänotypisch zum Teil stark voneinander. Im Labor kultivierte Stämme unterliegen ebenfalls einer genetischen Variabilität und können trotz des polyploiden Genoms Eigenschaften wie Glucosetoleranz während der Kultivierung verlieren (Ikeuchi & Tabata, 2001).

Der Kohlenstoffmetabolismus und die Verwendung von *Synechocystis* als Produktionsstamm werden in den nachfolgenden Kapiteln behandelt.

1.3.1. Die Lichtreaktion der Photosynthese

Die Lichtreaktion stellt die für die Kohlenstofffixierung nötigen Cofaktoren, NADPH und ATP, zur Verfügung. Die gewonnene Lichtenergie wird durch das Zusammenwirken des photosynthetischen Apparats in biologisch nutzbare, chemische Energie umgewandelt. Die Reaktionen finden an der Thylakoidmembran statt:

Das Licht trifft auf das Photosystem II (PS II) und spaltet Wasser in Sauerstoff und Protonen. Die freigewordenen Elektronen werden über Plastoquinon und Plastocyanin auf das Photosystem I (PS I) übertragen, wobei mehrere Protonen aus dem Cytoplasma ins Thylakoid-Lumen transportiert werden. Am PS II werden Protonen durch die Wasserspaltung freigesetzt, während das PS I die Produktion von $\text{NADPH} + \text{H}^+$ im Cytoplasma, ebenfalls bei einfallendem Licht, katalysiert. Dadurch erhöht das PS II die Protonenkonzentration im

Lumen, während das PS I gleichzeitig die Protonenkonzentration im Cytoplasma senkt. Der so aufgebaute Protonengradient wird zur Synthese von ATP genutzt (Knoop *et al.*, 2010, Vermaas, 2001). Anders als in höheren Pflanzen, in denen gleiche Mengen an PS I und PS II vorliegen, liegt in *Synechocystis* das PS I fünfmal so häufig vor wie das PS II (Shen *et al.*, 1993). Dies liegt vermutlich daran, dass ein stark aktives PS I einen überwiegend oxidierten Plastoquinon Pool garantiert, was einer Schädigung durch zu starke Beleuchtung vorbeugt (Vermaas, 2001). Eine Zusammenfassung der Lichtreaktion ist in Abb. 4 dargestellt.

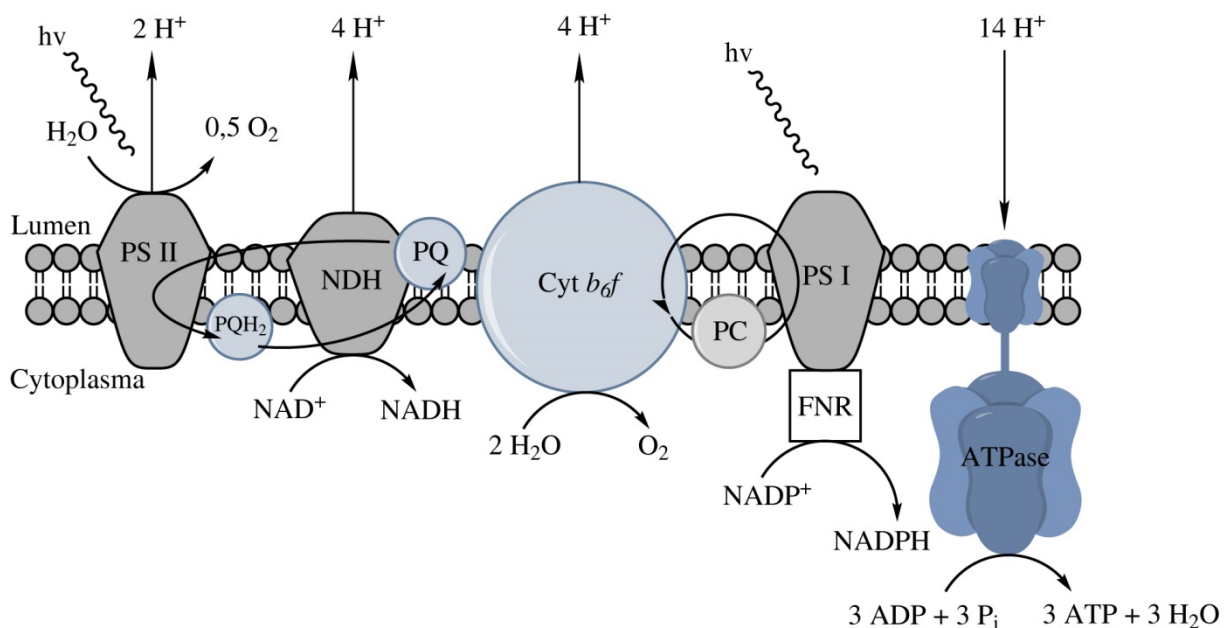


Abb. 4: Übersicht über die Lichtreaktion der Photosynthese in *Synechocystis*.

Im Photosystem II wird Wasser durch Lichtenergie in Sauerstoff und Protonen gespalten. Durch die Aktivität der NDH wird sowohl NAD⁺ zu NADH reduziert, als auch Protonen ins Lumen transportiert. Eine weitere Protonentranslokation findet wiederum durch Wasserspaltung durch das Cytochrom *b*₆f statt. Im Photosystem I wird das Licht genutzt, um Elektronen über FNR auf NADP⁺ zu übertragen. Letztendlich fließen die Protonen durch die ATPase zurück ins Cytoplasma, wodurch die ATP-Synthese betrieben wird. Abkürzungen: PS II (Photosystem II), NDH (NADPH-Dehydrogenase), Cyt *b*₆f (Cytochrom *b*₆f), PQ/PQH₂ (Plastoquinon), PC (Plastocyanin), PS I (Photosystem I). Verändert nach (Knoop *et al.*, 2010, Vermaas, 2001).

1.3.2. Zentralstoffwechsel von *Synechocystis* sp. PCC 6803

Der zentrale Kohlenstoffwechsel kann in zwei Pfade eingeteilt werden: (i) die Fixierung von CO₂ durch die Dunkelreaktion der Photosynthese und (ii) den Abbau von Glucose oder Glycogen via Glycolyse und oxidativen Pentosephosphatweg. Einige Subtypen von *Synechocystis* können nicht mit Glucose als alleiniger Kohlenstoffquelle wachsen und auch

glucosetolerante Stämme benötigen täglich eine kurze Belichtungszeit (Williams, 1988, Yu *et al.*, 2013).

Der Calvin-Zyklus, einer von bisher sechs bekannten CO₂-Fixierungswegen (Berg *et al.*, 2010), wird in *Synechocystis* für die Kohlenstofffixierung benutzt. Er wurde um 1950 von Melvin Calvin beschrieben (Bassham *et al.*, 1950) und ist der bisher einzig bekannte CO₂-Fixierungsweg in Pflanzen. Der Calvinzyklus wird in insgesamt drei verschiedene Phasen eingeteilt: die Kohlenstofffixierung, die Reduktion von Metaboliten und die Regeneration von Ribulose-1,5-bisphosphat. Die Fixierung von CO₂ wird durch das Enzym Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase (RuBisCo) katalysiert. In der ersten Reaktion des Calvin-Zyklus carboxyliert es Ribulose-1,5-bisphosphat in einen instabilen C₆-Körper, der dann in zwei Moleküle 3-Phosphoglycerat gespalten wird. RuBisCo ist ein sehr sauerstoffsensitives Enzym und muss dementsprechend geschützt lokalisiert sein. In *Synechocystis* kommt das Enzym aus diesem Grund in einem speziellen Organell, den Carboxysomen, vor (Kaplan *et al.*, 1991). Die Membran ist sehr schwach permeabel für Sauerstoff, während Kohlensäure relativ frei diffundieren kann. Die Trennung von CO₂-Fixierung und Sauerstoffproduktion ermöglicht eine hohe RuBisCo-Aktivität auch bei geringen Kohlensäurekonzentrationen (Pierce *et al.*, 1989) und ist damit ein wichtiger Bestandteil eines CO₂-Konzentrierungsmechanismus (Kaplan *et al.*, 1991). In der zweiten Phase folgt die Phosphorylierung zu 1,3-Bisphosphoglycerat (ATP-Verbrauch) und eine abschließende Reduktion zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat (NADPH-Verbrauch). Dabei stammen die Cofaktoren aus der Lichtreaktion der Photosynthese (siehe 1.3.1). Die entstehenden C₃-Moleküle werden nun durch sieben aufeinanderfolgende Reaktionen zur Bildung von Ribulose-1,5-bisphosphat verwendet. Durch die Fixierung von sechs CO₂-Molekülen können somit zwei C₃-Körper den Zyklus verlassen und in der Gluconeogenese für den Aufbau von Glucose verwendet werden. In der Gluconeogenese dienen die fixierten Kohlenstoffverbindungen dem Aufbau von Glucose, die dann wiederum für die Synthese von Speicherstoffen verwendet werden kann. Die Gluconeogenese ist in diesem Fall, da sie bei Glycerinaldehyd-3-Phosphat startet, bis auf zwei Reaktionen die Umkehr der Glycolyse: (i) die Dephosphorylierung von Fructose-1,6-Bisphosphat zu Fructose-6-Phosphat unter Einbau eines Wassermoleküls und (ii) der Dephosphorylierung von Glucose-6-Phosphat durch eine Phosphatase. Die erste Dephosphorylierungsreaktion ist auch Bestandteil der Reaktionsfolge zur Bildung von Ribulose-1,5-Bisphosphat im Calvinzyklus. Glucose-6-Phosphat ist das Substrat für die Phosphoglucomutase zur Bildung von

Glucose-1-Phosphat. Durch Adenylierung, katalysiert durch die Glucose-1-Phosphat Adenyltransferase (*glgC*), entsteht daraus ADP-Glucose (Iglesias *et al.*, 1991, Kakefuda *et al.*, 1992). Nun kann durch die Aktivität der Glycogen-Synthase (*sll1393* und *sll0945*) Glycogen gebildet werden (Diaz-Troya *et al.*, 2014). Das Reaktionsschema für den Calvin-Zyklus und die Glycogen-Synthese ist in Abb. 5 zusammengefasst.

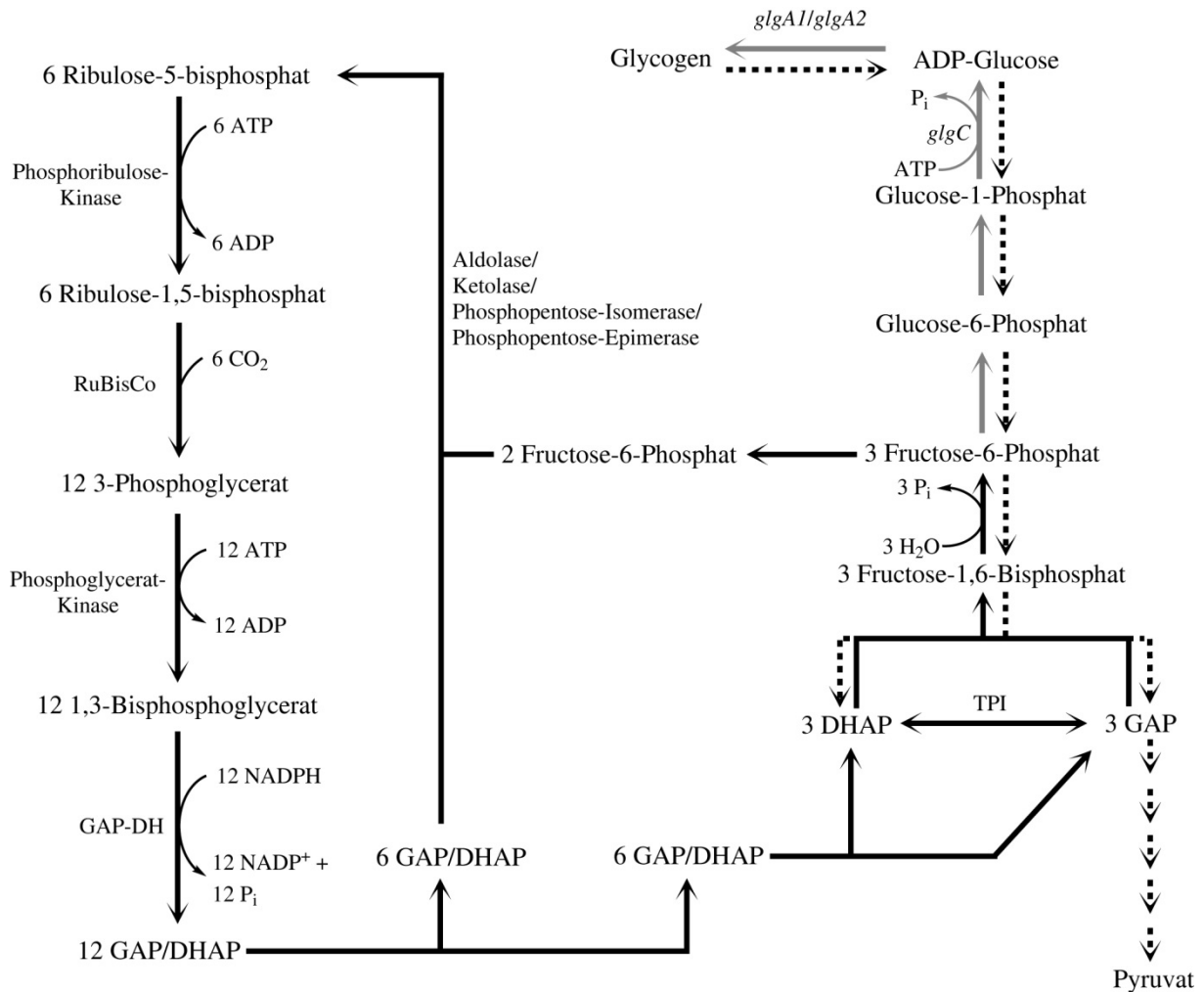


Abb. 5: Reaktionsschema des Calvin-Zyklus, Gluconeogenese und Glycolyse.

Schwarze Pfeile: Calvin-Zyklus, Graue Pfeile: Glycogenaufbau, Gepunktete Pfeile: Glycogenabbau.

Abkürzungen/Gennamen: *glgA1/glgA2* (Glycogensynthasen), *glgC* (Glucose-1-Phosphat Adenyltransferase), DHAP (Dihydroxyacetonphosphat), GAP (Glycerinaldehyd-3-Phosphat), GAP-DH (GAP Dehydrogenase), TPI (Triosephosphatisomerase).

Der Abbau von Glycogen findet durch die Glykolyse und den oxidativen Pentosephosphatweg statt (Yu *et al.*, 2013). In *Synechocystis* fehlt wie in anderen Cyanobakterien ein vollständiger Zitronensäurezyklus, da das Enzym α -Ketoglutarat-Dehydrogenase nicht vorhanden ist (Smith *et al.*, 1967). Knoop *et al.* (2013), haben durch metabolische Flussanalysen gezeigt,

dass der Zitronensäurezyklus durch verschiedene Ausweichreaktionen dennoch zyklisch ablaufen kann. Experimentell konnte in dieser Arbeit keine Aktivität über den bekannten Glyoxylat-Bypass nachgewiesen werden. Dennoch schließt nach Knopp et al. (2013) der von Zhang und Bryant (2011) postulierte Nebenweg und der so genannte GABA-Bypass (Knoop et al., 2010) die Lücke zu einem zyklisch stattfindenden Zitronensäurezyklus. Beide Wege starten bei α -Ketoglutarat und produzieren Succinat über ein Succinat-Semialdehyd. Bei dieser Reaktion wird NADPH gebildet und eine Substratkettenphosphorylierung zur Synthese von GTP findet nicht statt. Die Fehlende α -Ketoglutarat-Dehydrogenase kann allerdings auf diesem Weg umgangen werden.

1.3.3. *Synechocystis* sp. PCC 6803 als phototropher Produktionsstamm

Als Süßwasser-Bakterium ist für *Synechocystis* ein einfaches Minimalmedium ausreichend (Rippka et al., 1979). Die niedrigen Nährstoffvoraussetzungen machen *Synechocystis* zu einem interessanten phototrophen Produktionsstamm, der chemische Verbindungen durch CO₂-Fixierung herstellen kann. Problematisch bei der phototrophen Produktion ist die Abhängigkeit von einer guten Belichtung, die durch große, transparente Oberflächen gewährleistet werden muss. Darüber hinaus ist die Begasung mit Kohlendioxid von Bedeutung, die in den Produktionsprozess möglichst kostengünstig und effizient integriert ist. Trotz dieser Herausforderungen sind in den vergangenen Jahren viele Arbeiten veröffentlicht worden, die die Entwicklung von *Synechocystis* als phototrophe Zell-Fabrik voranbringen, was erst kürzlich von Yu et al. (2013) in einem Review zusammengefasst wurde. Die dort behandelten Arbeiten beziehen sich überwiegend auf Stoffe, die als Biokraftstoff verwendet werden könnten. Darunter unter anderem die Sekretion von Fettsäuren (Liu et al., 2010, Gao et al., 2012a) oder Alkanen (Wang et al., 2013b), die eine geringere Toxizität als die entsprechenden Alkohole besitzen (Kamarainen et al., 2012). Die Produktion von chemischen Bausteinen, wie Lactat oder 3-Hydroxybutyrat, ist ebenso in den Fokus gerückt. So haben Wang et al. (Wang et al., 2013a) einen *Synechocystis*-Stamm generiert, der 3-Hydroxybutyrat ohne Überexpression oder Transporter ins Medium sekretiert. Die Ausbeute betrug hier lediglich 530 mg/L in 21 Tagen. Milchsäure, Grundbaustein des Bioplastiks Polylactat, kann ebenfalls durch Cyanobakterien heterolog produziert werden. Dazu wurden Lactatdehydrogenasen aus Milchsäurebakterien (Joseph et al., 2013) oder *Bacillus*-Arten

(Angermayr *et al.*, 2012, Varman *et al.*, 2013) verwendet. Die Motivation dieser Arbeiten liegt darin, die Abhängigkeit von fossilen Brennstoffen zu verringern und alternative Produktionswege zu eröffnen. Die Verwendung von Kohlendioxid als Grundbaustein ist insbesondere in der Debatte über den Klimawandel und die nicht bestehende Konkurrenz zur Lebensmittelherstellung von Bedeutung. Letzteres fällt bei der Biodiesel-Produktion, für die große Agrarflächen für Biokraftstoff-Nutzpflanzen statt für Lebensmittel verwendet werden, ins Gewicht. Dabei entsteht als unerwünschtes Nebenprodukt sehr viel Glycerin (Tran & Kannangara, 2013). Dies könnte ein Grund dafür sein, dass nach unserer Kenntnis bisher keine Arbeiten über phototrophe Glycerinproduktion vorliegen. Da die Produktion von Biokraftstoffen der nächsten Generation auf Technologien beruht, bei denen keine großen Mengen an Glycerin mehr anfallen, werden in Zukunft alternative Wege zur Glycerinproduktion benötigt werden (Balzani & Armeroli, 2011).

1.4. Glycerinfermentation in der Hefe

Glycerin ist ein Fermentationsprodukt von *Saccharomyces cerevisiae* während der alkoholischen Gärung und unter osmotischen Stress (vgl. Abb. 6). Es ist ein weit verbreiteter Rohstoff, der momentan als Abfallstoff während der Biodieselproduktion anfällt (Tran & Kannangara, 2013). Die Synthese beginnt mit der Reduktion von Dihydroxyacetonphosphat zu Glycerin-3-Phosphat. Durch die Aktivität einer Phosphatase wird die Phosphatgruppe abgespalten und Glycerin entsteht. Glycerin-3-Phosphat ist auch Ausgangsstoff für die Synthese von Lipiden (Nevoigt & Stahl, 1997). Die anaerobe Glycerinproduktion wird für die Aufrechterhaltung des Redox-Gleichgewichts während der alkoholischen Gärung benötigt. Mutanten, die nicht mehr in der Lage sind Glycerin zu produzieren, können anaerob nicht wachsen (Ansell *et al.*, 1997). Unter aeroben Bedingungen kann Glycerin hingegen als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle genutzt werden (Nevoigt & Stahl, 1997). Glycerin ist darüber hinaus ein gut nutzbarer Rohstoff für *E. coli*. Es ist in der Lage Glycerin respiratorisch zu verwerten und als einzige Energie- und Kohlenstoffquelle zu nutzen.

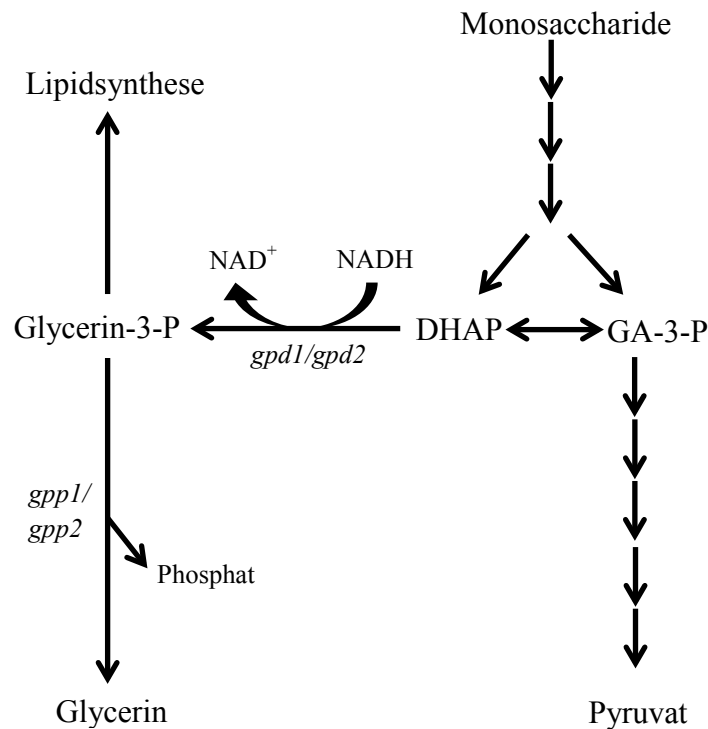


Abb. 6: Überblick der Glycerinfermentation in *S. cerevisiae*.

Die Glycerinproduktion startet mit Dihydroxyacetonphosphat. Dieses wird zunächst reduziert und dann dephosphoryliert. Das Dihydroxyacetonphosphat wird entweder durch Glykolyse oder durch Gluconeogenese bereitgestellt. Glycerin kann dann über einen spezifischen Transporter exportiert werden. Abkürzungen: *gpd1/gpd2* (Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase), *gpp1/gpp2* (Glycerin-3-Phosphatase), GA-3-P (Glycerinaldehyd-3-Phosphat), DHAP (Dihydroxyacetonphosphat). Verändert nach Nevoigt und Stahl (1997).

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit ist die Modifikation des Zentralstoffwechsels von *E. coli*. Durch die Deletionen der verschiedenen Gärungswege (Acetat, Alkohol, Succinat, Lactat) sollen die Produkte des Zentralstoffwechsels in die Richtung von Pyruvat verschoben werden. Dieses sollte anschließend auch unter anaeroben Bedingungen den Zitronensäurezyklus durchlaufen. Dadurch würden mehr nutzbare Elektronen entstehen, die beispielsweise auf einen regenerativen Elektronenakzeptor, wie eine Anode in einer mikrobiellen Brennstoffzelle, übertragen werden könnten. Die Übertragung von Elektronen durch Methylenblau als Elektronenshuttle ist bereits für einen *E. coli* Stamm bekannt, der noch in der Lage ist einen Gärungsstoffwechsel zu betreiben (Sturm-Richter, 2014). Der Ansatz in der hier vorliegenden Arbeit zielt die Erhöhung der potenziellen Elektronenausbeute ab, indem die Bildung von energiereichen Nebenprodukten gestoppt wird. Dazu sollen die Gene *pta-ack*, *ldhA*, *frdA* und *adhE* durch verschiedene Methoden deletiert werden. Anschließend werden die Stämme in

Wachstumsexperimenten in Minimalmedium mit unterschiedlichen Bedingungen untersucht. Dabei werden sowohl aerobe, als auch anaerobe Verhältnisse gewählt. Die anaeroben Wachstumsbedingungen werden in der Arbeit fermentativ und respiratorisch erfolgen. Als Elektronenakzeptor ist DMSO und Nitrat vorgesehen – ein Akzeptor mit relativ niedrigem Redoxpotential (DMSO) und einer mit einem hohen Redoxpotential (Nitrat). Die Umsetzung des Substrats und die daraus entstehenden Endprodukte können enzymatisch, chromatographisch (HPLC und GC) oder durch anderweitige Methoden quantifiziert werden. Auf diese Weise soll bestätigt werden, dass keine Gärprodukte mehr entstehen und ob sich bestimmte, organische Moleküle im Medienüberstand anreichern. Interessant wäre die Etablierung eines Plattformstamms, der beispielsweise einen Ausgangsstoff für die Produktion eines höherwertigen Moleküls sekretieren würde. Eine weiterführende Kopplung an einen regenerativen Elektronenakzeptor würde dann auch die Möglichkeit nicht-stöchiometrischer Gärungen ermöglichen, in dem überschüssige Elektronen auf diesen übertragen werden könnten. Ein solcher Akzeptor hätte im Gegensatz zu anderen anaeroben Elektronenakzeptoren den Vorteil, dass er in biotechnologischen Prozessen nicht nachgefüttert werden müsste.

Im zweiten Projektteil soll die Produktion eines einfachen Kohlenstoffkörpers im Cyanobakterium *Synechocystis sp.* PCC 6803 etabliert werden. *Synechocystis* ist nicht in der Lage Glycerin in detektierbaren Mengen zu bilden oder als Kohlenstoffquelle zu nutzen. Aus diesem Grund sollen die Gene *cgGPD* (Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase) und *gpp2* (Glycerinphosphat-Phosphatase) in den Stamm integriert werden. Durch die Integration ist gleichzeitig die Blockade der Glycogensynthese, Speicherstoff von Zuckermolekülen, vorgesehen. Aus diesem Grund wurde der Genlokus *glgC* (Glucose-1-Phosphat Adenyltransferase) gewählt, der für ein essentielles Enzym der Glycogensynthese codiert. Die Produktion soll in Wachstumsexperimenten im Schüttelkolben und in einem Plattenreaktor, der optimale Wachstumsbedingungen garantiert, erfolgen. Die Glycerinmenge wird gemessen und dabei mit der erreichten Zelldichte in Relation gesetzt.

2. Material und Methoden

2.1. Bakterienstämme

Alle in dieser Arbeit konstruierten und verwendeten Bakterienstämme sind in Tab. 1 und Tab. 2 aufgeführt.

Tab. 1: Verwendete *E. coli* Stämme.

Stamm	relevanter Genotyp	Referenz
JG22 (DH5 α Z1)	<i>aci^q</i> , <i>PN25-tetR</i> , <i>Sp^R</i> , <i>deoR</i> , <i>supE44</i> , Δ (<i>lacZYA-argFV169</i>), <i>Phi80</i> <i>lacZΔM15</i>	(Lutz & Bujard, 1997)
JG11 (AS443)	DH5 α Z1 Δ (<i>napC-F</i>) Δ (<i>frdA-D</i>) <i>4380508::</i> (<i>P_{tet} cymA</i>)	(Gescher <i>et al.</i> , 2008)
JG116	DH5 α Z1 <i>cymA mtrA rpsL*</i> , pAH121	Laborstammsammlung
JG144 (S17-1)	<i>hsdr17</i> , <i>endA</i> , <i>pro</i> , <i>recA</i> , NxS, integriertes RP4 2-Tc:: <i>Mu</i> ; Km:: <i>Tn7</i>	(Simon <i>et al.</i> , 1983)
JG187	JM109 pKJL 124	Laborstammsammlung
JG287	JG22 Δ (<i>napC-F</i>) (<i>frdA-D</i>) <i>4380508::</i> (<i>P_{tet} cymA-mtrA</i>) Δ <i>galK</i> , Δ (<i>gspC-gspO</i>):: <i>CP6-galK</i>	Laborstammsammlung
JG352	<i>E. coli</i> pAH122	Laborstammsammlung
JG369	JG11 Δ <i>adhE</i>	diese Arbeit
JG408	<i>E. coli</i> EPI300 pCCI Glycerin Operon	Laborstammsammlung (Gensynthese von Genscript, Piscataway, NJ, USA)

Stamm	relevanter Genotyp	Referenz
JG472	JG369 $\Delta dhA \Delta galk$	diese Arbeit
JG479	JG144 enthält pASK43+csc_ldh-RecSites	diese Arbeit
JG601	JG144 pAH95_P _{ara} _stc	Laborstammsammlung
JG648	JG472 $\Delta arcA::stc^{Ara}$	diese Arbeit
JG806	JG472 $\Delta pta-ack::galk$	diese Arbeit
JG808	JG648 $\Delta pta-ack::galk$	diese Arbeit
JG878	JG806 stc^{Ara} in pAH-Locus	diese Arbeit
JM 109	<i>endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17</i> (r_k^- , m_k^+), <i>relA1, supE44</i> , $\Delta(lac-proAB)$, [F' <i>traD36, proAB</i> , <i>laqI^qZ</i> Δ M15]	Promega, Madison, USA

Tab. 2: Verwendete *Synechocystis sp.* 6803 Stämme.

Stamm	relevanter Genotyp	Referenz
JG517	<i>Synechocystis sp.</i> 6803 Wildtyp	(Rippka <i>et al.</i> , 1979)
JG811	JG517 $\Delta glgC::sthA-Kan^R-CgGPD-Gpp2$	diese Arbeit

2.2. Plasmide

Alle in der Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tab. 3 aufgelistet.

Tab. 3: In der Arbeit verwendete Plasmide.

Plasmid	relevanter Genotyp	Referenz oder Quelle
p2e_P _{lac} <i>alsSD-budC</i>	Amp ^R , P _{lac} <i>alsSD-budC</i>	(Peschke, 2014)
p2e_P _{lac} _Acetoin	Amp ^R , P _{lac} <i>alsSD</i>	diese Arbeit
pACBSR	Chl ^R , p15A Ori, I-Sce-I ^{Ara} , λ Red Gene ^{Ara}	(Herring <i>et al.</i> , 2003)
pASK43+	Amp ^R , f1 Origin	IBA, Göttingen
pASK43+_arcA_Del_SceI_ZP	pASK43+, <i>galK</i>	diese Arbeit
pASK43+_arcA_Del_SceI	pASK43+, <i>galK</i> , homologe Sequenzen für <i>arcA</i> -Deletion in <i>E. coli</i>	diese Arbeit
pASK43+_csc_LguI	pASK43+, <i>cscRAKB</i>	diese Arbeit
pASK43+_csc_ldh-up	pASK43+, <i>cscRAKB</i>	diese Arbeit
pASK43+_csc_ldh-up_LguI	pASK43+, <i>cscRAKB</i>	diese Arbeit
pASK43+_csc_ldh-RecSites	pASK43+, <i>cscRAKB</i> , homologe Sequenzen für <i>ldhA</i> -Deletion in <i>E. coli</i>	diese Arbeit
pASK43+_pta-ack_Del_SceI-ZP	pASK43+, <i>galK</i>	diese Arbeit
pASK43+_pta-ack_Del_SceI	pASK43+, <i>galK</i> , homologe Sequenzen für <i>pta-ack</i> -Deletion in <i>E. coli</i>	diese Arbeit
pASK-IBA44	Amp ^R , f1 Origin	IBA, Göttingen
pAH95	Kan ^R , oriR6K, attP21	(Haldimann & Wanner, 2001)
pAH95_stc	Kan ^R , oriR6K, attP21, P _{ara} , <i>stc</i>	(Sturm-Richter, 2014)
pAH121	Amp ^R , ori101, intP21	(Haldimann & Wanner, 2001)
pAH122	Amp ^R , ori101, intP21, λpR-xis	(Haldimann & Wanner, 2001)

Plasmid	relevanter Genotyp	Referenz oder Quelle
pAH143	CRIM Plasmid, Gent ^R	(Haldimann & Wanner, 2001)
pEC86	Chl ^R , <i>ccmABCDEFGH</i> , P _{tet}	(Thony-Meyer <i>et al.</i> , 1995)
pMQ150	<i>cen6</i> , <i>r6k</i> , <i>ura3</i> , Kan ^R , <i>sacB</i> , oriT,	(Shanks <i>et al.</i> , 2006)
pSCVAM	Kan ^R , R6K Origin	diese Arbeit
pSTKST	Kan ^R , I-SceI ^{tet}	(Kolisnychenko <i>et al.</i> , 2002)
pSTKST_Gent	pSTKST ΔKan ^R ::Gent ^R	diese Arbeit
pKD46	Amp ^R , [tL3], oriR101, P _{araB} λ Red Gene ^{Ara}	(Datsenko & Wanner, 2000)
pKJL 124	Chl ^R <i>csc</i> ⁺ <i>cscKo124</i>	(Jahreis <i>et al.</i> , 2002)
pSG76-CSH	Chl ^R , flankiert von zwei I-SceI-Schnittstellen	(Kolisnychenko <i>et al.</i> , 2002)
pUC4K	Amp ^R , Kan ^R	Pharmacia, Uppsala, Schweden

2.3. Medien

Alle Medien wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt und 21 Minuten bei 121°C autoklaviert (Autoklav VE-150, Systec, Münster). Thermolabile Substanzen wurden gelöst und steril filtriert. Alle Angaben beziehen sich auf Wasser, bei Verwendung anderer Lösungsmittel sind diese angegeben. Den Grundmedien wurden zur Verfestigung bei Herstellung von Plattenmedien Agar in den Konzentrationen von 20 g/L (*E. coli*) oder 7,5 g/L (*Synechocystis sp.* PCC 6803) zugesetzt.

2.3.1. Bakterienmedien und fakultative Zusätze

In folgender Tabelle (Tab. 4) sind alle in dieser Arbeit verwendeten Nährmedien, Spurenelementlösungen und Medienzusätze aufgeführt.

Tab. 4: In der Arbeit verwendete Nährmedien und Medienzusätze.

Medium	Einwaage	Substanz	Konzentration
BG11 – Medium	7,5 g	NaNO ₃	1,77 mM
Stammlösungen (je 50 ml)	1,8 g	CaCl ₂ • 2 H ₂ O	0,25 mM
	2,0 g	K ₂ HPO ₄ • 3 H ₂ O	0,18 mM
	3,75 g	MgSO ₄ • 7 H ₂ O	0,30 mM
	1,0 g	Na ₂ CO ₃	0,19 mM
	0,05 g	Na ₂ -EDTA	2,70 µM
	0,3 g	Ammonium-Fe(III)-Citrat	0,03 mM
		Für die Herstellung von BG11-Medium wurden je 50 ml Stammlösung der oben aufgeführten Substanzen hergestellt und bei RT gelagert.	
BG11 – Medium (1 L, Verwendung der Stammlösungen)	4,58 g	TES	20 mM
	10 ml	NaNO ₃ - Stammlösung	17,70 µM
	1 ml	CaCl ₂ • 2 H ₂ O - Stammlösung	0,25 µM
	1 ml	K ₂ HPO ₄ • 3 H ₂ O - Stammlösung	0,18 µM
	1 ml	MgSO ₄ • 7 H ₂ O - Stammlösung	0,30 µM
	2 ml	Na ₂ CO ₃ - Stammlösung	0,38 µM
	1 ml	Na ₂ -EDTA - Stammlösung	2,70 nM
	1 ml	Spurenelementlösung <i>Synechocystis</i>	
		pH von 7,5 mit KOH einstellen	
	1 ml	Ammonium-Fe(III)-Citrat nach dem Autoklavieren steril zugeben	0,03 µM

Medium	Einwaage	Substanz	Konzentration
BG11-Medium (modifiziert, Verwendung der BG11-Stammlösungen 1 L)	4,58 g	TES	20 mM
	10 ml	NaNO ₃ - Stammlösung	17,70 µM
	1 ml	CaCl ₂ • 2 H ₂ O - Stammlösung	0,25 µM
	1 ml	K ₂ HPO ₄ • 3 H ₂ O - Stammlösung	0,18 µM
	1 ml	MgSO ₄ • 7 H ₂ O - Stammlösung	0,30 µM
	2 ml	Na ₂ CO ₃ - Stammlösung	0,38 µM
	1 ml	Na ₂ -EDTA - Stammlösung	2,70 nM
	1 ml	Spurenelementlösung <i>Synechocystis</i>	
	1 ml	Spurenelementlösung <i>E. coli</i>	
	1,50 g	Casaminosäuren	0,15 % (w/V)
1,84 g	Glycerin	20 mM	
		pH von 7,5 mit KOH einstellen	
	1 ml	Ammonium-Fe(III)-Citrat nach autoklavieren steril zugeben	0,03 µM
LB-Medium (1 L)	10,0 g	Trypton	1 % (w/V)
	5,0 g	Hefeextrakt	0,5 % (w/V)
	5,0 g	NaCl	0,5 % (w/V)
Minimalmedium M9 5x (1 L)	42,5 g	Na ₂ HPO ₄ • 2 H ₂ O	238 mM
	15,0 g	KH ₂ PO ₄	110 mM
	5,0 g	NH ₄ Cl	93 mM
	2,5 g	NaCl	43 mM
	11,9 g	Hepes	50 mM
	50 ml	Spurenelementlösung <i>E. coli</i>	
		pH 7,4 mit KOH einstellen	

Medium	Einwaage	Substanz	Konzentration
Minimalmedium M9 1x (1 L)	200 ml	Minimalmedium M9 5x	
	700 ml	H ₂ O	
		pH 7,4 mit KOH einstellen	
	100 ml	Komplementierungslösung, sterile Zugabe nach dem Autoklavieren	
	0,1 ml	0,5% Thiamin-Lsg. (Zugabe nachdem die Lösung sterilfiltriert wurde)	0,05 ‰ (w/V)
Minimalmedium M63 5x (1 L)	10,0 g	(NH ₄) ₂ SO ₄	75 mM
	68,0 g	KH ₂ PO ₄	500 mM
	2,5 mg	FeSO ₄ • 7 H ₂ O	9 µM
		pH 7 mit KOH einstellen	
Minimalmedium M63 1x (1 L)	200 ml	M63-Medium 5x	
	800 ml	H ₂ O	
		pH 7 mit KOH einstellen	
		nach dem autoklavieren folgt die Zugabe von:	
	1 ml	CaCl ₂ -Lsg. (0,1 M)	0,1 mM
	1 ml	MgSO ₄ -Lsg. (1 M)	1,0 mM
	100 µl	Thiamin (0,5%)	0,05 ‰ (w/V)
SOB – Medium (1 L)	20,00 g	Trypton	2 ‰ (w/V)
	5,00 g	Hefeextrakt	0,5 ‰ (w/V)
	0,58 g	NaCl	10,0 mM
	0,19 g	KCl	2,5 mM
SOC - Medium	47,2 ml	SOB-Medium	
	1,0 ml	1 M MgCl ₂ -Lsg.	20 mM
	1,0 ml	19 %ige Glucose-Lsg.	19 mM

Medium	Einwaage	Substanz	Konzentration
Spurenelementlösung	64,9 mg	CoCl ₂ • 6 H ₂ O	0,27 mM
<i>E. coli</i> (1 L)	5,0 mg	CuSO ₄ • 5 H ₂ O	0,02 mM
	350,0 mg	H ₃ BO ₃	5,66 mM
	107,4 mg	Fe(II)Cl ₂ • 4 H ₂ O	0,24 mM
	2501,5 mg	Na ₂ -EDTA	6,72 mM
	22,0 mg	MnSO ₄ • H ₂ O	0,13 mM
	94,4 mg	Na ₂ MoO ₄ • 2 H ₂ O	0,22 mM
	39,5 mg	Na ₂ SeO ₄ • 6 H ₂ O	0,13 mM
	58,4 mg	NaCl	1,00 mM
	118,9 mg	NiCl • 6 H ₂ O	0,50 mM
	28,8 mg	ZnSO ₄ • 7 H ₂ O	0,16 mM
		pH 7,0 mit NaOH einstellen	
	ad 1 L	mit dH ₂ O	
Spurenelementlösung	2,86 g	H ₃ BO ₃	46,26 mM
<i>Synechocystis</i> (1 L)	1,81 g	MnCl ₂ • 4 H ₂ O	9,14 mM
	0,222 g	ZnSO ₄ • 7 H ₂ O	1,24 mM
	0,390 g	Na ₂ MoO ₄ • 2 H ₂ O	0,91 mM
	0,079 g	CuSO ₄ • 5 H ₂ O	0,32 mM
	0,049 g	Co(NO ₃) ₂ • 6 H ₂ O	0,17 mM
Komplementierungslösung für 1x M9 (100 ml)	1,0 ml	CaCl ₂ -Lsg. (0,1 M)	1 mM
	1,0 ml	MgSO ₄ -Lsg. (1 M)	10 mM
	1,5 g	Casaminosäuren	1,5 % (w/V)
	2,0 g	C ₆ H ₁₂ O ₆ • H ₂ O	100 mM
Je nach Bedarf Zugabe bei Herstellung der Komplementierungslösung:	3,91 g	DMSO (100%-Lösung) (Anaerober e ⁻ -akzeptor)	500 mM
	1,26 g	KNO ₃ (Anaerober e ⁻ -akzeptor)	125 mM
	1,72 g	Saccharose (alt. C-Quelle)	50 mM

2.3.2. Antibiotika

Die verwendeten Antibiotika sind als 1000-fach konzentrierte Stammlösung angesetzt worden. Ampicillin, Kanamycin und Gentamycin wurden dazu in deionisiertem Wasser gelöst, Chloramphenicol in Ethanol oder 1-Propanol. Die Lösungen wurden daraufhin steril filtriert und bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Nach Abkühlung der Medien auf ca. 60°C konnten die Antibiotika in den entsprechend benötigten Endkonzentrationen zugegeben werden. Sind andere Antibiotika-Konzentrationen in Selektionsplatten verwendet worden, so ist dies gekennzeichnet (z.B. LB_{Chl6}).

Selektionskonzentrationen für *E. coli*:

Ampicillin	100 µg ml ⁻¹
Kanamycin	50 µg ml ⁻¹
Gentamycin	15 µg ml ⁻¹
Chloramphenicol	30 µg ml ⁻¹

Selektionskonzentrationen für *Synechocystis sp* 6803:

Kanamycin	10 – 250 µg ml ⁻¹
-----------	------------------------------

2.4. Allgemeine Methoden

Eine Zusammenfassung der allgemeinen Methoden, die in der Literatur beschrieben sind und in dieser Arbeit angewendet wurden, ist in Tab. 5 aufgeführt.

Tab. 5: Allgemeine Methoden.

Methode	Referenz
Absorptionsmessung	(Sambrook <i>et al.</i> , 1989)
Färbung von DNA	(Sambrook <i>et al.</i> , 1989)
Fällung von Nukleinsäuren	(Sambrook <i>et al.</i> , 1989)
Gelelektrophorese von DNA	(Sambrook <i>et al.</i> , 1989)
Gelelektrophorese von Proteinen (denaturierend)	(Laemmli, 1970)
Ligation von DNA-Fragmenten	(Sambrook <i>et al.</i> , 1989)
Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i>	(Sambrook <i>et al.</i> , 1989)
Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode	(Sanger <i>et al.</i> , 1977)

2.5. Anzucht von Bakterien

Soweit nicht anders angegeben, wurde *E. coli* in LB-Medium bei 37°C und 150 rpm in Reagenzgläsern oder Erlenmeyerkolben kultiviert. Die Inkubation erfolgte für gewöhnlich über Nacht. Inokuliert wurde von am Vortag beimpften Selektivplatten bzw. aus Übernachtkulturen.

Die anaerobe Kultivierung von *E. coli* startete stets aus einer aeroben LB-Vorkultur. Als Kulturgefäße wurden Laborflaschen mit einem Gummistopfen verschlossen und durch abwechselndes Befüllen mit Stickstoff und Abpumpen der Gasphase anaerobisiert. Die Anaerobisierung erfolgte bei Medien mit Autoklavier-beständigen Substanzen sowohl unsteril vor dem Autoklavieren als auch steril nach dem Autoklavieren, wenn das Medium zuvor steril komplementiert wurde, weil es Autoklaven-sensible Substanzen (z.B. Glucose) enthielt.

Auf Agarplatten ausgestrichene Bakteriensuspensionen wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Dann konnten die bewachsenen Agarplatten bei 4°C gelagert werden.

Synechocystis wurde, soweit nicht anders angegeben, in BG11 Medium (Rippka *et al.*, 1979) bei 30°C schüttelnd (125 rpm) und im Licht inkubiert. Beimpft wurde aus vorigen Kulturen 1%ig oder aus Gefrierkulturen. Wurde *Synechocystis* aus einer Gefrierkultur angeimpft,

wurden zunächst 5 ml BG11-Medium in einem Reagenzglas beimpft. Nach ca. 10 Tagen Inkubationszeit konnten größere Volumen mit dieser Vorkultur inokuliert werden.

2.5.1. Aerobes Wachstum von *E. coli* in M9-Medium oder BG11-Medium

Die aerobe Charakterisierung der erhaltenen *E. coli* Mutanten erfolgte in 1000 ml Erlenmeyerkolben mit 100 ml komplementierten M9-Minimalmedium. Glucose (M9) oder Glycerin (BG11) waren in den Versuchen Kohlenstoffquelle und Elektronendonator, Sauerstoff war der Elektronenakzeptor.

Die zu testenden *E. coli* Mutanten wurden im biologischen Triplikate zunächst in 50 ml LB-Medium inokuliert. Die Inkubation wurde bei 37°C über Nacht (150 rpm, Innova44 Inkubationsschüttler, Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (RT, 10 Minuten, 5000 rpm, *centrifuge* 5810R, Eppendorf, Hamburg) pelletiert und einmalig mit nicht komplementierten M9 Medium (1x) gewaschen. Für die Vergleichbarkeit der Wachstumseigenschaften musste die Hauptkultur stets mit der gleichen Zelldichte ($OD_{600}=0,05$) beimpft werden. Die Inkubation erfolgte schüttelnd bei 30°C für 24 Stunden und die erste Probennahme fand direkt nach der Inokulation ($t=0$) statt. Anschließend wurde die optische Dichte bei 600 nm stündlich bis zum Erreichen der stationäre Wachstumsphase gemessen. Die letzte Probe wurde nach 24 Stunden genommen, zentrifugiert (Tischzentrifuge, RT, 2 Minuten, 14000 rpm), filtriert (0,2 µm PTFE Membran, VWR International, Darmstadt) und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die Quantifizierung der Glucose, des Gesamtproteingehalts und möglicher Endprodukte wurde für den Start- und den Endzeitpunkt durchgeführt.

2.5.2. Anaerobes Wachstum von *E. coli* in M9-Minimalmedium

Die anaerobe Charakterisierung der *E. coli* Mutanten wurde in 500 ml Laborflaschen mit Gummistopfen und 250 ml komplementiertem M9-Medium durchgeführt. Glucose oder Saccharose waren stets die Kohlenstoffquelle und der Elektronendonator. Sollte *E. coli* unter fermentativen Bedingungen kultiviert werden, wurde kein Elektronenakzeptor ins Medium

zugegeben. Für die anaerobe Atmung dienten entweder Nitrat (12,5 mM) oder DMSO (50 mM) als terminaler Elektronenakzeptor.

Ausgangspunkt für die Anaerobe Kultivierung war stets eine aerobe Vorkultur. Drei einzelne Kolonien des zu testenden Stammes wurden in jeweils 50 ml LB-Medium überführt und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert (150 rpm, Innova44 Inkubationsschüttler, Eppendorf, Hamburg). Bestandteile des LB-Mediums konnten durch das Pelletieren der Zellen (5000 rpm, RT, *centrifuge* 5810R Eppendorf, Hamburg) und durch einmaliges Waschen mit 1x M9-Medium entfernt werden. Die Zelldichte (OD_{600}) zu Beginn des Versuchs betrug 0,05. Die Inkubation erfolgte schüttelnd bei 30°C für 2-4 Tage oder bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase, mindestens jedoch 48 Stunden. Die erste Probennahme fand direkt nach der Inokulation ($t=0$) statt. Das Wachstum wurde durch die regelmäßige Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm verfolgt.

Waren *E. coli* Mutanten nicht mehr in der Lage unter fermentativen oder respiratorischen Bedingungen zu wachsen, betrug die Inkubationszeit 72-96 Stunden. Diese lange Inkubationszeit garantierte die Detektion von langsam wachsenden *E. coli*-Stämmen. Die Proben zum Startzeitpunkt und am Ende des Versuchs wurden zentrifugiert (RT, 14000 rpm, 2 Minuten, Tischzentrifuge, Eppendorf, Hamburg), filtriert (0,2 μ m PTFE Membran, VWR International, Darmstadt) und bis zur Analyse bei -20°C gelagert. Die Quantifizierung der Glucose, des Gesamtproteingehalts und möglicher Endprodukte erfolgte für den Start- und den Endzeitpunkt.

2.5.3. Acetoinproduktion in *E. coli* während des Wachstums

Für die Produktion von Acetoin wurde das Acetoin-Produktionsplasmid (siehe 2.7.8) in den Stamm JG878 eingebracht. Der Stamm JG878 entspricht vom zentralen Kohlenstoff-Metabolismus dem Stamm JG806. Die Produktionsversuche wurden anaerob in Laborflaschen (500 ml) mit Glucose (10 mM) als Kohlenstoffquelle in M9-Medium oder aerob im Schüttelkolben mit Glycerin (20 mM) in BG11-Medium durchgeführt. Das Medium wurde mit Ampicillin versetzt um eine stabile Weitergabe des Plasmids an die Tochterzellen zu gewährleisten. Das Kulturvolumen betrug 250 bzw. 100 ml im anaeroben und 100 ml (1000 ml Erlenmeyerkolben) im aeroben Versuchsteil. Die Anzucht der Zellen erfolgte in

einem Schüttelinkubator bei 30°C (125 rpm, Innova44 Inkubationsschüttler, Eppendorf, Hamburg) für 24, 96 oder 192 Stunden. Als Anfangszelldichte wurde die OD₆₀₀ von 0,05 gewählt. War DMSO der Elektronenakzeptor, wurde aufgrund des geringen Wachstums der Kultur mit einer Start-OD₆₀₀ von 0,25 begonnen. Die Probennahme erfolgte entweder stündlich (aerob) oder täglich (anaerob), wobei die OD₆₀₀ regelmäßig bestimmt wurde. Ansonsten wurden zu geeigneten Zeitpunkten Proben entnommen und für weiterführende Analysen zentrifugiert (RT, 2 Minuten, 14000 rpm, Tischzentrifuge, Eppendorf, Hamburg), filtriert (0,2 µm PTFE Membran, VWR International, Darmstadt) und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

2.5.4. Glycerinproduktion von *Synechocystis*

Die Glycerinproduktion von *Synechocystis* wurde in 1000 ml Erlenmeyerkolben mit einem Kulturvolumen von 400 ml BG11-Medium (Rippka *et al.*, 1979) mit Kanamycin als Selektionsmarker (100 µg/ml) durchgeführt. Die Anzucht der Cyanobakterien erfolgte photoautotroph in einem belichteten Schüttelinkubator bei 30°C (125 rpm, Innova44 Inkubationsschüttler, Eppendorf, Hamburg).

Die zu testenden Stämme wurden zunächst in 25 ml BG11-Medium als Vorkultur inokuliert. Da die genomische Veränderung in dem Produktionsstamm nicht vollständig integriert werden konnte, musste dem Medium Kanamycin als Selektionsmarker zugegeben werden, was den Verlust der integrierten Gene verhinderte. Nach Erreichen einer geeigneten Zelldichte, konnten die Zellen durch Zentrifugation (RT, 5 Minuten, 4000 rpm, *centrifuge* 5810R Eppendorf, Hamburg) pelletiert und anschließend in frischem BG11-Medium resuspendiert werden. Die Zelldichte zum Beginn des Versuchs wurde auf 0,03 (OD₇₅₀) eingestellt. Alle 24 Stunden wurden 3 ml Probe entnommen. Diese mussten zunächst pelletiert (RT, 2 Minuten, 14000 rpm, Tischzentrifuge, Eppendorf, Hamburg) werden, um sie dann bis zur weiteren Verwendung bei -20°C lagern zu können. Nachdem die Kulturen eine optische Dichte von 2 (OD₇₅₀) erreicht hatten, wurde der Wachstumsversuch beendet. Die Glycerinkonzentration im Überstand wurde anschließend bestimmt (vgl. 2.11.3) und auf definierte optischen Dichten bezogen.

2.5.5. Glycerinproduktion im Photoreaktor

Die Inkubation im dargestellten Plattenreaktor (Dillschneider *et al.*, 2013) erfolgte als biologisches Triplikat für 10 Tage. Es wurde mit einer Vorkultur aus dem Schüttelinkubator inokuliert. Als Start-OD₇₅₀ wurde der Wert 0,075 gewählt und für gewöhnlich mit einem Volumen von 60 ml beimpft. Der Plattenreaktor enthielt BG11 mit Kanamycin (100 µg/ml).

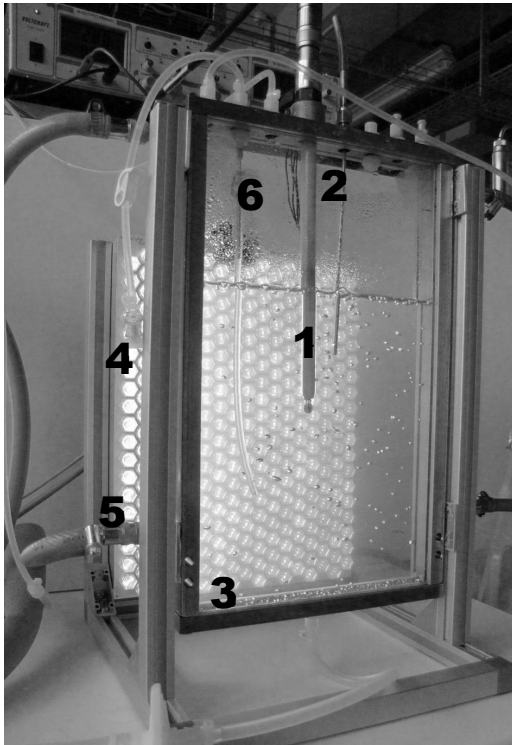


Abb. 7: Schematischer Aufbau des in der Arbeit verwendeten Reaktors.

Die Temperatur wurde durch einen Mantel mit Kühlwasser und Heizstäben stabil gehalten. Die einzelnen Komponenten sind: (1) pH-Sensor mit integriertem Termometer, (2) Thermometer (hier nicht verwendet), (3) Polytetrafluorethylen Membran für die Begasung mit Druckluft, (4) LED-Panel, (5) Anschluss für Kühlwasser, (6) Probenentnahme. Für die Zugabe von Antischaum, Antibiotika und KOH/HCl wurden noch entsprechende Anschlüsse am Deckel des Reaktors genutzt (Foto von M. Fresewinkel zur Verfügung gestellt, vgl. Dillschneider et al. (2013)).

Alle 2-3 Tage wurden 2 ml Kanamycin-Stocklösung (50 mg/ml) zugegeben, was den Selektionsdruck Aufrecht erhielt. Bei zu starker Schaumbildung ist den Reaktoren die gleiche Menge Antifoam A (Sigma, St. Louis, USA) zugegeben worden. Bei der regelmäßigen Probennahme wurden zunächst 3 ml Probe für die Spülung des Probenschlauchs verworfen und dann 5-7 ml für die Analytik entnommen. Die Probe wurde zentrifugiert und bei -20°C bis zur Verwendung gelagert. Die Konzentration des Glycerins im Medienüberstand wurde wie beschrieben (siehe 2.11.3) quantifiziert. Die OD₇₅₀ der Bakteriensuspension konnte photometrisch gemessen und die Transmission des Reaktors direkt am Aufbau (Li-250, Li-Cor, Lincoln, USA) bestimmt werden. Die Parameter sind in Tab. 6 zusammengefasst.

Tab. 6: Parameter für die Glycerinproduktion im Plattenreaktor.

Parameter	Einstellungen
Antifoam A	1:50 Verdünnung für direkte Zugabe 1:00 Verdünnung mit Kanamycin (50µg/ml)
automatische pH-Einstellung	3 M KOH oder 2 M HCl
Begasung	400 ml Druckluft/min
Belichtung	250 µE/m ² s
LEDs	Tageslicht-LEDs
Nährmedium	BG11-Medium
pH-Sonde	Polilyte Plus Arc225 (Hamilton, Höchst)
pH-Wert	7,45-7,55
Selektionsmarker	Kanamycin (100 µg/ml)
Temperatur	29,5 - 30,5°C

2.6. Transformation von Bakterienzellen

2.6.1. Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

E. coli ist von Natur aus nicht fähig extrazelluläre DNA aufzunehmen. Das Fehlen der natürlichen Kompetenz kann durch die Behandlung mit Calciumchlorid umgangen werden, um eine künstliche Kompetenz zu erzeugen. Dazu wurden zunächst 5 ml LB Medium mit dem zu transformierenden Stamm beimpft. Nach aerober Inkubation über Nacht bei 37°C wurde die Hauptkultur durch Zugabe vom 1% (V/V) der Vorkultur hergestellt. Die Zellen wurden schüttelnd bei 37°C bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{600} = 0,3-0,6$) inkubiert. Die Kultur wurde anschließend für 20 Minuten auf Eis gekühlt, was die Stoffwechselaktivität der Zellen senkt. Die durch Zentrifugation (4°C, 10 Minuten, 5000 rpm, *centrifuge* 5810R Eppendorf, Hamburg) pelletierten Zellen wurden in 15 ml einer CaCl₂-Lösung (0,1 M, vorgekühlt auf 4°C) aufgenommen. Die Suspension wurde erneut für 20 Minuten auf Eis inkubiert und daraufhin zentrifugiert (4°C, 10 Minuten, 5000 rpm, *centrifuge* 5810R Eppendorf, Hamburg). Abschließend wurde der Überstand verworfen und das Präzipitat in 500-1000 µl frischer CaCl₂-Lösung resuspendiert. Die Zellen konnten nun für die chemische Transformation verwendet werden.

2.6.2. Chemische Transformation von *E. coli*

Zu 150 µl kompetenten Zellen (Cohen *et al.*, 1972) erfolgte die Zugabe von 5-30 ng Plasmid-DNA. Der Ansatz ist gemischt und für 20 Minuten auf Eis inkubiert worden. Damit die Zellen die DNA aufnehmen konnten, wurde das Reaktionsgefäß 2,5 Minuten auf 42°C erwärmt und anschließend wieder für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Bei einer Ampicillin-Resistenz konnte der Transformationsansatz direkt auf einer entsprechenden LB-Selektionsplatte ausplattiert werden, da eine vorherige Expression der Resistenzgene nicht nötig ist. Ampicillin wirkt auf die Zellwand der Zelle, tötet die Zelle in den verwendeten Konzentrationen aber nicht direkt ab. Wurde ein anderes Antibiotikum als Selektionsmarker verwendet, musste zunächst 1 ml LB-Medium zugegeben und zur Expression der Resistenzgene 1 Stunde bei 37°C schüttelnd inkubiert werden. Vom Transformationsansatz wurden 150 µl direkt ausplattiert, die restliche Bakteriensuspension 2 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Präzipitat wurde anschließend in 150 µl frischem LB-Medium aufgenommen und auf einer Agarplatte mit Selektivmedium ausplattiert.

2.6.3. Herstellung elektrisch kompetenter *E. coli* Zellen

Die Transformation von *E. coli* kann durch das Einbringen von extrazellulärer DNA mittels elektrischen Schocks durchgeführt werden. Dazu müssen die Zellen für die Elektroporation von Salzen oder anderen leitenden Bestandteilen im Medium getrennt werden. Dafür wurden zunächst 50 ml SOB-Medium mit dem zu transformierenden Stamm beimpft. Bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,4-0,6 sind die Kulturen bei 37°C schüttelnd inkubiert worden. Die Kultivierung wurde gestoppt, indem der Kolben für 30 Minuten auf Eis inkubiert wurde. Die Zellen sind durch Zentrifugation (4°C, 5000 g) geerntet und anschließend 3-4 mal mit vorgekühltem, deionisiertem Wasser gewaschen worden. Das Pellet nach dem letzten Waschschrift wurde in 500-1000 µl Wasser resuspendiert und für die Elektroporation verwendet.

Enthielt *E. coli* pKD46, wurde der Kultur Ampicillin (Endkonzentration: 100 µg ml⁻¹) zugegeben. Die Zellen wurden dabei zunächst 1-2 Stunden bei 30°C inkubiert und dann mit 2 M Arabinose (Endkonzentration im Kolben: 1 mM) induziert. Die Induktion bewirkt die Expression von Rekombinationsgenen, die auf pKD46 vorhanden sind. Eine gute Expression

wird durch das Wachstum für weitere 3-5 Stunden bei 30°C erreicht. Anschließend wurden die Zellen geerntet und 3-4 mal mit sterilem, vorgekühltem Wasser gewaschen. Im letzten Schritt wurden die Zellen in 500-1000 µl Wasser resuspendiert und konnten für die Elektroporation verwendet werden.

2.6.4. Transformation von *E. coli* mittels Elektroporation

Für die Transformation von *E. coli* wurden 10-50 ng DNA in vorgekühlte Elektroporationsküvetten (Peqlab, Erlangen) gegeben. Sollten Ligationsansätze für die Transformation von *E. coli* verwendet werden, musste die DNA-Lösung zunächst mit Wasser dialysiert werden. Dazu wurde die Lösung auf eine auf Wasser schwimmende Filtermembran (Millipore VSWP, 0,025 µm, Millipore, Billerica, USA) pipettiert und 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Nach Zugabe von 150 µl elektrokompetenter Zellen, wurde elektrische Spannung an die Küvetten angelegt (1,75 kV, 5 ms, BioRad Micro Pulser, BioRad, München). Die Zellen wurden anschließend direkt in 800 µl SOC-Medium aufgenommen und bei 30°C (thermosensitive Plasmide) oder 37°C für eine Stunde inkubiert, um die Ausbildung der verwendeten Resistenzen zu gewährleisten. Abschließend wurden 100 µl der Suspension auf geeigneten Selektionsplatten ausplattiert. Die restliche Kultur wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und am Folgetag auf Selektionsplatten ausgestrichen.

2.6.5. Transformation und Mutation von *Synechocystis* 6803

Für die Transformation von *Synechocystis* wurden mindestens 25 ml BG11-Medium mit dem zu transformierenden Stamm beimpft. Die Kultur wurde nun bis zum Erreichen einer OD₇₅₀ von 0,8-1,0 bei 30°C schüttelnd im Licht inkubiert. Durch Zentrifugation (10 Minuten, 4000 rpm, 25°C) pelletierte Zellen konnten in 500-1000 µL frischem BG11-Medium aufgenommen werden. Von der ankonzentrierten Zellsuspension wurden 200 µL in ein steriles Reaktionsgefäß überführt und mit 3 µg Plasmid-DNA gemischt. Das Plasmid enthielt einen R6K Origin, der in *Synechocystis* nicht stabil repliziert und auf die Tochterzelle

weitergegeben werden kann. Aus diesem Grund sind nur stabile Integrationen ins Genom per Selektion detektierbar. Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur für 60 Minuten inkubiert und anschließend auf 0,75 %ige BG11-Agarplatten überführt. Es folgte eine mehrstündige Inkubation bei Raumtemperatur, in der die Zellsuspension in die Agarplatte einzog. Die Transformationsplatte konnte nun für 5-8 Tage bei 30°C im Lichtinkubator, bis zur Ausbildung eines Bakterienrasens, inkubiert werden. Für die Selektion auf Mutanten wurde die Agarfläche in der Petrischale mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum unterschichtet. Dabei war die initiale Hemmkonzentration auf 20% der üblicherweise verwendeten Antibiotikakonzentration abgesenkt. Nach 5-8 Woche Inkubation bei 30°C im Lichtinkubator wurden Einzelkolonien auf Selektionsplatten (20% der üblichen Arbeitskonzentration) überführt. Nach einer weiteren Woche konnten die Transformationskandidaten auf neue Selektionsplatten überimpft werden. Die Konzentration des Antibiotikums steigerte sich bei jeder Überführung ($\text{Kan}_{10} \rightarrow \text{Kan}_{20} \rightarrow \text{Kan}_{30} \rightarrow \text{Kan}_{50}$). Transformationskandidaten wurden abschließend in 5 ml $\text{BG11}_{\text{Kan50}}$ überimpft und für ca. 10 Tage im Licht inkubiert. Die Mutation konnte nun mittels PCR überprüft werden.

2.6.6. Erzeugen der *Synechocystis*-Mutante

Die Mutation von *Synechocystis* erfolgte durch das Ausnutzen der natürlichen Kompetenz des Organismus. Dazu wurde eine Plasmid, welches nicht in *Synechocystis* repliziert werden kann, für die Integration der Gene verwendet. Die zu integrierenden Gene wurden von zwei 1,5 kb großen homologen Sequenzbereichen umschlossen. Die Durchführung der Transformation wurde bereits im vorigen Kapitel beschrieben (siehe 2.6.5).

Zunächst wurde das Basisplasmid, pSCVAM, durch die Ligation zweier DNA-Fragmente zusammengesetzt. Als Template für die Amplifikation der Antibiotikaresistenz wurde das Plasmid pUC4K (Pharmacia, Uppsala, Schweden) verwendet. Die Amplifikation erfolgte mit den Primern 525 und 526 (enthielt eine *XbaI*-Schnittstelle). Der R6K-Ori konnte durch die Restriktion mit den Enzymen *EheI* und *XbaI* aus dem Vektor pMQ150 isoliert werden. Beide Fragmente wurden durch den Einsatz der T4-Ligase miteinander verknüpft. Die Richtigkeit des Plasmids konnte durch Sequenzierung (Primer 469, 573 und 574) bestätigt werden.

Die Klonierung in den Vektor pSCVAM erfolgte nach Gibson et al. (2009) in zwei Konstruktionsschritten. Das Gen *sthA* und der homologe Sequenzbereich *upstream* von *glgA* wurden durch eine PCR amplifiziert. Als Matrize für die Transhydrogenase *sthA* konnte chromosomale DNA von *E. coli* verwendet werden. Von den verwendeten Primern (1342 und 1343) enthielt der Primer 1343 die für die Klonierung nötige, homologe Sequenz. Der *upstream*-Bereich des *Synechocystis* Gens *glgC* konnte durch die Amplifikation mit den Primern 1340 und 1341 aus chromosomaler DNA gewonnen werden. Der Vektor wurde mit *EcoRV* linearisiert und dephosphoryliert. Anschließend folgte die Ligation der drei DNA-Fragmente nach Gibson et al. (2009). Die Selektion erfolgte auf LB_{Kan}-Agarplatten. Vor der Verwendung des erhaltenen Vektors für die folgende Ligation, wurde die korrekte Konstruktion durch Sequenzierung (Primer 573, 609, 1242, 1342 und 1692) bestätigt.

Darauf folgend wurde das erhaltene Konstrukt mit dem Enzym *SfoI* geschnitten und dephosphoyliert. Der *downstream* gelegene Homologiebereich konnte mit den Primern 1348 und 1349 aus dem *Synechocystis* Genom amplifiziert werden. Die Gene *cgGPD* und *gpp2* für die Glycerinproduktion wurden aus dem Stamm JG408 mit den Primern 1344, 1347 und einen zuvor aus den Primern 1344/1345 gewonnenen „Megaprimer“ (vgl. Abb. 9) amplifiziert. Mit Ausnahme des Primers 1348 enthielten alle verwendeten Primer die entsprechenden homologen Bereiche für die Klonierung. Nach der Ligation der drei DNA-Fragmente wurde auf LB_{Kan}-Agarplatten selektiert und abschließend das Plasmid sequenziert (Primer 469, 574, 1096, 1097, 1098 und 1099). Es konnte nun für die Mutation verwendet werden (siehe 2.6.5).

2.7. Präparation und Nachweis von DNA

2.7.1. Reinigung von Plasmid-DNA

Die Plasmidisolierung erfolgte über alkalische Lyse. Dazu wurden 2-4 ml einer Übernachtskultur eingesetzt und mit dem *Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega Corporation, Madison, USA) nach Anleitung des Herstellers isoliert. Typischerweise konnten aus 4 ml Kultur 2-2,5 µg Plasmid-DNA isoliert werden.

Bei der Plasmidisolierung mit dem *PureYield[™] Plasmid Midiprep System* (Promega Corporation, Madison, USA) wurden 200 ml Bakterienkultur verwendet. Die Durchführung

erfolgte gemäß den Angaben des Hersteller-Protokolls. Durch eine solche Midi-Prep wurden für gewöhnlich 100-250 µg Plasmid-DNA gewonnen.

2.7.2. Isolation chromosomaler DNA aus *Synechocystis*

Zur Isolation chromosomaler DNA aus *Synechocystis* wurden 300 ml Bakteriensuspension durch Zentrifugation (RT, 8000 rpm, 10 Minuten, Avanti J-26 XP, Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, USA) pelletiert, in 2 ml des Überstands resuspendiert und in ein neues Reaktionsgefäß übertragen. Das gelöste Pellet wurde nun erneut zentrifugiert (4°C, 8000 rpm, 10 Minuten, *centrifuge* 5810R Eppendorf) und der Überstand abschließend verworfen. Das Präzipitat ist nun in 1,5 ml SET-Puffer (Tris-HCl pH 7,5, 50 mM; EDTA pH 8, 1mM; Saccharose 25% (w/V)) resuspendiert, zweimal für 5-10 Minuten in flüssigen Stickstoff gefroren und im Wasserbad auf Raumtemperatur aufgetaut worden. Dieser Frost-Tau-Zyklus schwächt die stabile Zellstruktur von *Synechocystis*. Durch die Zugabe von 375 µl EDTA (0,5 M, pH 8,0), 208 µl 20% SDS und einer Spatelspitze Proteinase K wurde die Zellwand und vorhandene Proteine zerstört. Die Inkubation erfolgte für 4 Stunden bei 50°C. Zur Isolation der DNA folgte eine Phenol:Chloroform-Extraktion: Es wurde ein Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben und stark gemischt. Die Zentrifugation in einem *swing out* Rotor (RT, 5 Minuten, 6000 rpm, *centrifuge* 5810R Eppendorf, Hamburg) trennte die organische und die wässrige Fraktion voneinander. Die wässrige Phase enthielt die DNA und wurde in ein neues Gefäß überführt. Es wurde ein Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (25:1) zugegeben, mit der wässrigen Fraktion vermischt und zur Phasentrennung erneut zentrifugiert (RT, 5 Minuten, 6000 rpm, *centrifuge* 5810R Eppendorf, Hamburg). Die DNA wurde durch das Zufügen von einem Volumen Isopropanol gefällt, was bei -20°C über Nacht stattfand. Die DNA konnte durch Zentrifugation (4°C, 13000 rpm, 30 Minuten, *centrifuge* 5810R Eppendorf) pelletiert werden und wurde anschließend zwei Mal mit 70% Ethanol gewaschen. Der Alkohol wurde abgenommen und das Pellet an der Luft getrocknet. Zum Lösen der DNA wurden 200 µl DNase freies Wasser verwendet.

2.7.3. Quantifizierung von DNA und RNA mittels Nano Drop

Mit Hilfe des Nano Drops (Thermo Scientific, Nano Drop 2000 Spectrophotometer) wurde die DNA – Konzentration in einer Lösung bestimmt. Es wurde 1 µl der Probe auf den Sensor pipettiert und gegen Wasser als Nullwert gemessen. Über die Betriebssoftware wird dann ein Quotient aus der Absorption bei 260 nm und 280 nm gebildet, was eine Aussage über die Reinheit der DNA ermöglicht, und die DNA – Konzentration in ng/µl ermittelt. Für die Bestimmung der Reinheit der DNA wird ein 260/280 nm Quotient von ca. 1,8 als reine DNA angesehen. Ein Quotient von 2,0 oder höher entspricht dem erwarteten Wert für reine RNA. Der höhere Wert der RNA resultiert aus der stärkeren Absorption von Uracil, welches das schwächer absorbierende Thymin in der RNA ersetzt.

2.7.4. DNA-Gelelektrophorese

Zur Größenbestimmung und präparativen Auftrennung von DNA-Restriktionsfragmenten wurde eine Gelelektrophorese mit 1-2%igen (w/V) Agarosegelen durchgeführt. Dabei sind höherprozentige Gele für kleinere DNA-Fragmente (bei Fragmentgrößen unter 500 bp) verwendet worden. Die Agarosegele hatten eine Größe von ca. 8x8 cm und waren in der Regel 8-10 mm dick. Durch Aufkochen wurde zunächst die Agarose im TAE-Puffer gelöst und nach Abkühlen auf ca. 60°C konnte *Midori Green Advanced* (Nippon Genetics Europe, Dueren) nach Vorgaben des Herstellers zugegeben und das Gel gegossen werden. Nach dem Gießen (60°C) polymerisierten die Agarosegele durch Abkühlen bei Raumtemperatur. Die Proben wurden mit Farbmaler versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 120 V bis der Farbmaler etwa die Hälfte des Gels erreicht hatte. Danach sind die Gele unter UV Licht (254 nm) fotografiert worden (BioRad, Molecular Imager Chemi DocTM XRS⁺). Durch das UV-Licht fluoresziert *Midori Green Advanced*, was eine gute Detektion der erhaltenen DNA-Banden ermöglicht. Zur Abschätzung der Größe von DNA-Fragmenten wurde der *GeneRuler 1 kb DNA ladder* (Thermo Scientific, Schwerte) verwendet. Auf dem UV-Tisch konnten DNA-Banden aus präparativen Gelen ausgeschnitten und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt werden. Die Gelextraktion der DNA erfolgte mit dem *Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega Corporation, Madison, USA) nach Anleitung des Herstellers.

2.7.5. Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung erfolgte nach dem Prinzip der Kettenabbruchmethode nach Sanger et al. (1977) mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden. Die Sequenzierungen wurden von der Firma GATC (Konstanz) durchgeführt.

2.7.6. Restriktion und Ligation von DNA

Die Restriktionen mit Endonukleasen wurden in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer durchgeführt. Die Enzymmenge und Inkubationsdauer richteten sich nach der eingesetzten DNA-Menge und dem Reaktionsvolumen. Bei präparativen Reaktionen mit Endonucleasen wurden 20 u (analytisch 3-6 u) des jeweiligen Restriktionsenzym eingesetzt und für zwei Stunden bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur inkubiert. Analytische Restriktionsreaktionen wurden mit geringeren Volumen und mit geringerer DNA-Menge durchgeführt.

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde mit T4-DNA-Ligase unter Verwendung des vom Hersteller mitgelieferten Puffers durchgeführt. Es wurden zwischen 15 und 25 ng Vektor-DNA und ein 4-fach molarer Überschuss an DNA-Fragment eingesetzt. Für die Ligation von beispielsweise zwei DNA-Fragmenten muss zumindest ein Fragment phosphoryliert vorliegen, da die Ligase für die Verknüpfung von DNA-Fragmenten eine freie Phosphatgruppe am Ende eines Fragments benötigt. Als Kontrolle wurde ein Ansatz ohne Insert-DNA mitgeführt. Die Ligationsreaktion erfolgte für mindestens 2 Stunden oder über Nacht bei Raumtemperatur.

Standardansätze für Restriktion von DNA:

analytisch:

DNA:	5 µl (ca. 0,3-0,8 µg DNA)
Restriktionsenzym:	0,3 µl (3-6 u)
Puffer (10x):	1,5 µl
H ₂ O:	ad 15 µl Endvolumen

präparativ:

DNA:	1-4 µg
Restriktionsenzym:	1 µl (10-20 u)
Puffer (10x):	5 µl
H ₂ O:	ad 50 µl Endvolumen

Standardansätze für die Ligation

Vektor-DNA:	15-25 ng
DNA-Fragment:	4x molarer Überschuss
Ligasepuffer (10x):	2 µl
T4-DNA-Ligase:	1 µl (1 u)
H ₂ O:	ad 20 µl Endvolumen

Sind mehr als ein DNA-Fragment für die Vektorkonstruktion verwendet worden, wurden diese ebenfalls in einem 4-fach molaren Überschuss eingesetzt.

2.7.7. Dephosphorylierung von DNA

Die Dephosphorylierung des 5'-Endes von DNA-Fragmenten ist mit Hilfe einer Alkalischen Phosphatase (AP), der Fast-AP (Thermo Scientific, Schwerte), unter Einsatz des vom Hersteller mitgelieferten Puffers durchgeführt worden. Dabei wurde dem Restriktionsansatz die entsprechende Menge Puffer und 1 µl Phosphatase zugegeben. Anschließend wurde der Ansatz für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert und auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen. Das entsprechende Fragment wurde ausgeschnitten und mit dem *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega Corporation, Madison, USA) nach Anleitung des Herstellers gereinigt.

Standardansatz für die Dephosphorylierung:

DNA:	1-4 µg
Fast-AP:	1 µl (1 u)
Puffer (10x):	5 µl
H ₂ O:	ad 50 µl Endvolumen

2.7.8. Klonierung des Plasmids für die Acetoin-Produktion

Die Konstruktion des Plasmids p2E_Acetoin erfolgte durch eine PCR. Als Template wurde das Plasmid p2E_alsSD-budC (Peschke, 2014) verwendet und mit den Primern 1916 und 1917 amplifiziert. Durch die Amplifikation konnte die Acetoin-Reduktase (*budC*) aus dem Plasmid entfernt werden. Das PCR-Produkt wurde phosphoryliert und durch die T4-Ligase religiert. Der Ligationsansatz wurde anschließend für die chemische Transformation von *E. coli* verwendet. Zur Selektion wurden die Zellen auf LB_{Amp}-Agarplatten ausgestrichen und bei 37°C inkubiert. Kandidatenklone sind in 5 ml LB_{Amp} überführt und das Plasmid am Folgetag isoliert worden. Die Basenfolge konnte durch Sequenzierung (Primer 744, 745, 1873, 1874) bestätigt werden.

2.7.9. Verwendete Oligonukleotide

Alle in der Arbeit verwendeten Primer und Oligonukleotide sind in Tab. 7 aufgeführt. Angegeben sind die interne Primernummer (falls vorhanden), der Name des Primers und die Sequenz.

Tab. 7: In der Arbeit verwendete Oligonukleotide.

Interne Nr.	Name des Primers	Sequenz (5' → 3')
252	intern_galK_for	CAA ATG CGT TGG CAA ACA G
283	ldhA_cscR_rev	AGT AGC TTA AAT GTG ATT CAA CAT CAC TGG AGA AAG TCT TGC CAG TTG GCA TGT TTT ACC
386	Del_adhE_D	TGT TGT GGA AGC CGT TAT AG
387	Del_adhE_E	CAT AGG TTA AGC AAA TCA TCA C
407	Del_adhE_A	ATC GGC ATT GCC CAG AAG GGG CCG TTT ATG TTG CCA GAC AGC GCT ACT GAA ATG CTC TCC TGA TAA TG
408	Del_adhE_B	TGT TGA TAG TAC GTA CTA AGC ATT CGA GCA GAT GAT TTA CTA AAA AAG TTT AAC ATT ATC AGG AGA GCA TTT CA
409	Del_adhE_C	ATG GCT GTT ACT AAT GTC GCT GAA CTT AAC GCA CTC GTA GAG CGT GTA AAA GAA TAC AAG CTT GCA TGC C
469	KanR_end_for	GGA ACT GCC TCG GTG AG
489	Gent_XhoI_for	ATG GTA TTC TCG AGA CGA ACC CAG TTG ACA TAA G
490	Gent_XhoI_rev	ATG GTA CGC TCG AGG CCT TGA ACG AAT TGT TAG G
491	pSTKST_for	ATG GTA CTC GAG CGG ATA CAT ATT TGA ATG

Interne Nr.	Name des Primers	Sequenz (5'→3')
492	pSTKST_rev	ATG GTA CTC GAG GCG GGA CTC TGG GGT TC
503	P21_P4	TAG AAC TAC CAC CTG ACC
504	pSTKST_sce_Seq_for	CGA TTC CGA CCT CAT TAA G
505	pSTKST_sce_Seq_rev	CGT TCT CAT GGC TCA CGC
525	KanR_rev_SP	TTC GAA GGC GCC GAG CTC TAC GGA AGA GCT AGA CCT G
526	KanR_for_SP	AGT TGA TCC GTA ACT TCT AGA GCG GCC GCG ATA TCG GCG CGC CAC GTT GTG TCT CAA AAT C
573	pSCVAM_for_New	GCC GAA ATC GGC AAA ATC C
574	pSCVAM_rev	GGG CTT ACA TGG CGA TAG C
588	Csc_LguI_for	TAA CTG AGA AGA GCT AGG CAA TCA ACG GTA TAG TAT CTC AGG TCG AGC TCT TCA TTT CGT CTA TAT TGC TGA AGG TAC
589	ldhA_up_LguI_for	CGT GTG ATT CGA TAG CTC TTC ACT GCG CTG TAG CGA ACA GTC AC
590	ldhA_up_LguI_rev	TAC AGT CAG CAT TCA GCG CTC TTC GAA AGG CGA AAC CTG CCC G
601	slr0168_down_rev	CCG TCA GTG GAG ACA ATG
602	slr0168_int_for	CGG GAC GGA CAG TTA TCC
603	Csc_LguI-Xba_rev	CGT GAT GCT AGC TAG TTG ATC TAG ATG ACG CTG AAG AGC CCG ATG AGT AGC CCT GAG ATA TTG CCT AGC TCT TCA CTT GCC AGT TGG CAT GTT TTA CC
604	ldhA_up_XbaI_for	CCA CTC TAC ATC GAT CAC TCT AGA ACA CGC TGT AGC GAA CAG TCA C

Interne Nr.	Name des Primers	Sequenz (5'→3')
605	ldhA_dn_LguI_for	ATG GTA GTT AGT AGT GTA GAC ATG GCT CTT CGA AGA CTT TCT CCA GTG ATG TTG AA
606	ldhA_dn_LguI_rev	TCG ATC GAT CGA CTA CAC GTC AGC TCT TCT CGC CCT GAT AAC GCA GTT G
609	KanR_end_rev	AAC TCA CCG AGG CAG TTC C
641	CP6_for2	CAT GTG GGA GTT TAT TCT TG
683	Csc_test_for_new	CGC TTT ATT GTT GTC GGC G
684	Csc_test_rev_new	TAA CGT CGC AGT AGC ATG C
685	cscR_test_for	GCT GGC GGT TTG CTC AAT G
686	CscB_test_rev	TCC GTC TTC AAA TAC AGC G
744	pMAL_for	CCA GTC CGT TTA GGT GTT TTC
745	pMAL_rev	ACG TTG TAA AAC GAC GGC CAG T
1011	glgC_test_for	AAT AAC GTT TCA GGC TGG TG
1012	glgC_test_rev	GACT AAC GGG AGT TCC TGC
1061	galK_pASK_rev	TTC GAC AAA AAT CTA GAA ATA ATT TTG TTT AAC TTT AAG AAG GAG ATA TAC AAA AGC TTT CAG CAC TGT CCT GCT CC
1062	arcA_Down_for	CAG ACA AAA AAA ATG TCG CAC AAT GTG CGC CAT TTT TCA CTT CAC AGG TCA ATT ACC CTG TTA TCC CTA TGA CTT TTA TGG CGT TCT TTG
1063	arcA_Down_rev	CAG TTA TTA TAT CAT CCG GAA ATA TCT GTG TCA AGA ATA AAC TCC CAC ATG TCG GCT TTA CCA CCG TCA A

Interne Nr.	Name des Primers	Sequenz (5' → 3')
1064	arcA_Up_for	AAG AGA CTT TTT ACG TTT GTA AAC CAT CAC AAG GAG CAG GAC AGT GCT GAG TTT GCT ACC TAA ATT GCC AA
1065	arcA_Up_rev	TCG ACA AAA ATC TAG AAA TAA TTT TGT TTA ACT TTA AGA AGG AGA TAT ACA AAT TAC CCT GTT ATC CCT ACC TGA CTG TAC TAA CGG TTG
1082	arcA_test_rev	TGC TTC AGG CAA TGA TAC C
1083	arcA_test_for	CAC TGT CAA CTT ATT ACG CG
1096	glyc_seq1	CAC CCG CCA CGA AAA CGT G
1097	glyc_seq2	GTC ACG CGG CTA CTT TTA CCC
1098	glyc_seq3	CCC ACG GCT GGC GTA C
1099	glyc_seq4	CAA CGC CGA AAC CGA TGA AGT
1129	STC_for	ATG AGC AAA AAA CTA TTA AGT GTG C
1242	sthA-Int_rev	TTC AGC GTG CCC ACG TTC
1313	pta-Down_for	TAA AGA GAC TTT TTA CGT TTG TAA ACC ATC ACA AGG AGC AGG ACA GTG CTG ATC TCG TCA TCA TCC GCA G
1337	ack_UP-NheI_for	ATG TGA CTG AGC TAG CAT TAC CCT GTT ATC CCT ACG ATC GGC GGC ATA AAA C
1338	ack_UP-blunt_rev	*GGA AGT ACC TAT AAT TGA TAC
1339	pta_Down_rev_n	AGA CAA AAA AAA TGT CGC ACA ATG TGC GCC ATT TTT CAC TTC ACA GGT CAA TTA CCC TGT TAT CCC TAG ATC CTG AGG TTA ATC CTT C
1340	glgC_UP_for-V2	TGT TCC AGT TTG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG TCT AGA GCG GCC GCG ATT GCT GTG GCT TTA TAG GTG G

Interne Nr.	Name des Primers	Sequenz (5'→3')
1341	glgC_UP-sth_rev	CCG GGG CCG GAA CCT ATT ACT ATG GCA TCG TAA TCG TAG GAA TGT GGC ATT TCG AAG TCA AGT TTA GAA CC
1342	sthA_for	ATG CCA CAT TCC TAC GAT TAC
1343	sthA_rev	CTT GTG CAA TGT AAC ATC AGA GAT TTT GAG ACA CAA CGT GGC GCG CCG ATT TAA AAC AGG CGG TTT AAA CC
1344	CgGPD_A_for	GGC AAT CAA CGG TAT AGT ATC TCA GGT CTA GCT CTT CCG TAG AGC TCG GCT TGA CAA TTA ATC ATC CGG C
1345	CgGPD_B_rev	CGG CGG GGG ACA CCA TCA CAA TTC CAC ACA TTA TAC GAG CCG GAT GAT TAA TTG TCA AG
1347	Gly_short_rev	CTG CTT TAA CGG GAG CGG TCA TGG CTA TGG TGC GAG GAA AGA AAC TGG CCT TAC CAT TTC AAC AAA TCA TCT TTG
1348	glgC_Down_T_for	GGC CAG TTT CTT TCC TCG C
1349	glgC_Down_T_rev	GGT TTT ATG GAC AGC AAG CGA ACC GGA ATT GCC AGC TGG GGC TTC GAA GGC TTT GCC TGG GTT TCT GCT C
1350	sth_start_rev	GAC GGA GAG CTT TCG ACG
1377	ackpta_test_for	GGT AAA CTT AAG GCG AAC AG
1378	ackpta_test_rev	TTA TCA ATG GTT CCT GTA CG
1692	sth_start_rev	CGG AAC CTA TTA CTA TGG C
1873	als_seq_for_2	GCC ATA GCA AAA ATC CAA ACA
1874	als_seq_for_3	GCG CTT CAT TGG TGA AAC C
1916	Acetoin_for	ATG TTG ACA AAA GCA ACA AAA GAA C

Interne Nr.	Name des Primers	Sequenz (5' → 3')
1917	Acetoin_rev	ATG CTA TGG TCC TTG TTG GTG
	pASK_for	GAG TTA TTT TAC CAC TCC CT
	pASK_rev	CGC AGT AGC GGT AAA CG

*Phosphoryliertes Ende

2.7.10. PCR an *Synechocystis*-Zellen

Eine Kolonie-PCR an *Synechocystis*-Zellen erforderte eine Flüssigkultur des Stamms. Dazu wurden zunächst 300-1000 µl der Kultur geerntet (RT, 2 Minuten, 14000 rpm, Tischzentrifuge, Eppendorf, Hamburg) und anschließend zwei Mal mit DNase freiem Wasser gewaschen. Die Waschschrte entfernten das im BG11-Medium enthaltene EDTA, da es als Ionenfänger einen Störfaktor in einer PCR-Reaktion darstellt. Nach dem letzten Waschschrte wurde das Zellpellet in 100 µl DNase freiem Wasser aufgenommen und in flüssigem Stickstoff für zwei Minuten eingefroren und anschließend zwei Minuten bei 60°C im Wasserbad aufgetaut. Diese Prozedur wurde noch ein zwei weitere Male wiederholt. Dieser Gefrier-Tau-Zyklus destabilisiert die ansonsten sehr robuste Zellmembran von *Synechocystis*. Nun konnten 1-2 µl der *Synechocystis*-Suspension als PCR-Template (siehe 2.7.11) verwendet werden.

2.7.11. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion wurde mit zirkulärer Plasmid-DNA oder genomischer DNA als Matrize durchgeführt. Um mögliche Mutationen während der PCR-Reaktion zu verhindern, wurde bei präparativen PCRs die *iProof*-Polymerase (BioRad, München), die eine *proof-reading*-Funktion besitzt, verwendet. Sind ganze *E. coli* Zellen als Template verwendet worden, wurde der MangoMix (Bioline, Luckenwalde) genutzt. Die zweifach-konzentrierte Reaktionslösung enthält neben einer *Taq*-Polymerase auch dNTPs, Puffer, DMSO und Ladepuffer für die Gelelektrophorese. Da die *Taq*-Polymerase über keine *proof-reading* Funktion verfügt, war der MangoMix nur für analytische PCRs geeignet.

Reaktionsansatz für die *iProof*-Polymerase (50 µl):

12,5 µl Vorwärtsprimer (2 µM)
12,5 µl Rückwärtsprimer (2 µM)
X µl Plasmid-DNA (ca. 2 ng)
10 µl 5 x GC- Puffer mit Mg₂Cl₂
1 µl *iProof*-Polymerase (1 U µl⁻¹)
1 µl dNTPs (je 10 mM)
1-5 µl DMSO

Der Ansatz ist mit deionisiertem Wasser auf ein Endvolumen von 50 µl aufgefüllt und anschließend gemischt worden.

Reaktionsansatz für eine PCR mit MangoMix (100 µL Mastermix):

50 µl MangoMix
3 µl DMSO
23,5 µl Vorwärtsprimer (2 µM)
23,5 µl Rückwärtsprimer (2 µM)

Der Ansatz wurde anschließend in 15 µl Aliquots aufgeteilt, in die je Zellen von verschiedenen Kolonien gegeben wurden. Dazu wurde die zu testende Kolonie zunächst mit einer Pipettenspitze aufgenommen und dann auf einer Agarplatte ausgestrichen. Die restlichen Zellen auf der Pipettenspitze wurden anschließend ins Reaktionsgefäß gegeben.

Die Reaktionen wurden daraufhin im *Thermocycler* (C1000 oder S1000 Thermo Cylcer, BioRad, München) mit folgendem Programm durchgeführt.

Tab. 8: PCR-Programm.

Anzahl der Zyklen	Reaktion	Temperatur	Dauer
1	Denaturierung	95 °C	5 Minuten
29 - 34	Denaturierung	95 °C	30 Sekunden
	Primer-Hybridisierung	45 – 55 °C	30 Sekunden
	Primer Extension	72 °C	30 Sekunden pro 1000 bp des PCR-Produkts
1	abschließende Kettenverlängerung	72 °C	5 Minuten

Nach Abschluss des Programms wurde der Reaktionsansatz auf 12°C abgekühlt. Wurde die PCR nicht gleich auf ein Agarosegel aufgetragen, konnte der gesamte Ansatz bei -20°C gelagert werden.

2.7.12. Reinigung von PCR Produkten

Die Reinigung von PCR-Produkten wurde mit dem *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega Corporation, Madison, USA) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Elution der linearen DNA-Fragmente erfolgte für gewöhnlich in 30-50 µl Wasser.

2.7.13. Phosphorylierung von PCR-Fragmenten

Für die Klonierung von PCR-Fragmenten in einen Vektor über „*blunt ends*“ musste das PCR-Fragment phosphoryliert werden, damit die Ligase beide Fragmente miteinander verbinden kann. Für die Phosphorylierung wurde das „*Quick Blunting Kit*“ von NEB (Ipswich, MA, USA) verwendet. Der Enzymmix des Kits enthält eine T4 Polynukleotid Kinase für die Phosphorylierung der 5'-Enden eines ungeschnittenen, linearen DNA-Fragments. Dabei wurde das Protokoll entsprechend den Vorgaben des Herstellers durchgeführt.

2.7.14. Klonierungsmethode nach Gibson et al. (2009)

Die Klonierungsmethode nach Gibson et al. (2009) ist eine isothermale Reaktion, in der drei Enzyme die Verknüpfung von zwei oder mehreren DNA-Fragmenten herstellen. Im Reaktionsansatz befinden sich eine T5-Exonuclease (NEB, Ipswich, MA, USA), die *iProof* Polymerase (BioRad, München) und eine *Taq*-Ligase (NEB, Ipswich, MA, USA).

Die DNA-Fragmente wurden stets durch eine PCR-Reaktion und durch die Linearisierung des Zielvektors hergestellt. Den PCR-Produkten wurden die homologen Bereiche, die für die Verknüpfung der DNA-Moleküle nötig sind, durch Primer-Überhänge angefügt. Alle DNA-Moleküle, die miteinander verknüpft werden sollten, wurden in der isothermalen Reaktion in äquimolaren Mengen eingesetzt. Mit Beginn der einstündigen Reaktion bei 50°C im PCR-Cycler (C1000 oder S1000 Thermo Cycler, BioRad, München) schneidet die T5-Exonuclease den Doppelstrang vom 5'-Ende an. Durch das Abschneiden des einen DNA-Strangs entstehen so genannte *sticky ends*, Einzelstrangbereiche in einem DNA-Doppelstrang-Molekül. Die komplette Zerkleinerung der DNA-Moleküle wird durch die langsame Inaktivierung der Exonuclease bei 50°C verhindert. Die homologen Bereiche der *sticky ends* können sich nun aneinander anlagern. Die so entstehende Verbindung wird von der DNA-Polymerase als Bindestelle für die DNA-Replikation genutzt. Dabei dient der zweite DNA-Strang als Matrize für die Elongation. Für eine Verbindung des neu synthetisierten Stranges und des bereits existierenden Strangs ist die Funktion der *Taq*-Ligase entscheidend: Ligasen sind in der Lage zwei DNA-Fragmente miteinander zu verknüpfen, sofern ein Molekül in phosphorylierter Form vorliegt. Die im Reaktionsansatz enthaltene DNA-Polymerase kann eine solche Reaktion nicht katalysieren. Das Schema der Reaktion ist in Abb. 8 dargestellt.

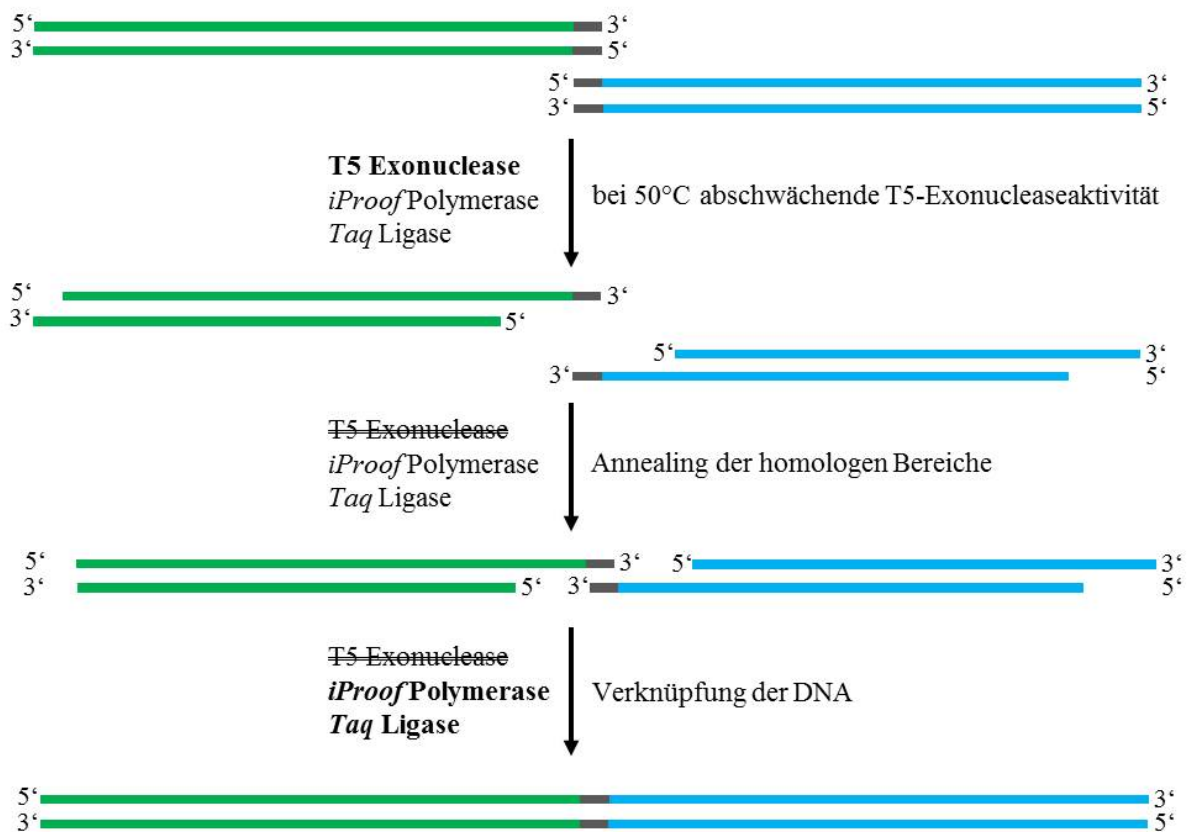


Abb. 8: Ablauf der Klonierungsmethode nach Gibson (2009).

Die isothermale Reaktion nach Gibson (2009) enthält drei Enzyme: *T5*-Exonuclease, *iProof* Polymerase und *Taq*-Ligase. Die DNA-Bereiche enthalten einen homologen Bereich zueinander (grau). Durch die Aktivität der *T5*-Exonuclease werden die beiden doppelsträngigen DNA-Moleküle am 5'-Ende anverdaut. Die Exonuclease wird durch die Hitze langsam inaktiviert. Die entstehenden Sticky-Ends lagern sich nun aneinander. Die DNA-Moleküle werden nun durch die Aktivität der Polymerase und der Ligase miteinander verknüpft.

Blau/Grün: Unterschiedliche DNA-Moleküle, Grau: homologer Bereich der beiden DNA-Moleküle, Fett gedruckte Enzyme: Aktiv; normal gedruckte Enzyme: nicht aktiv, aber noch funktionell; durchgestrichene Enzyme: inaktiviert.

In dieser Arbeit wurde die Methode für die Insertion von PCR-Fragmenten in linearisierte Vektoren verwendet. In diesem Fall enthalten die PCR-Produkte zwei homologe Bereiche für den gerichteten Einbau in den Zielvektor.

Sämtliche für die Reaktion nötigen Puffer und Enzyme sind in Tab. 9 und Tab. 10 aufgeführt. Der Reaktionspuffer wurde in 15 µl Aliquots aufgeteilt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Tab. 9: Zusammensetzung des isothermalen Reaktionspuffers.
Stammlösung (5x)

Substanz	Stammlösung	Einwaage	Konzentration im Reaktionsansatz
Tris/HCl, pH 7,5	1 M	125 µl	100 mM
MgCl ₂ • 6 H ₂ O	1 M	12,5 µl	10 mM
dNTPs	10 mM	25 µl	200 µM
DTT	1 M	12,5 µl	10 mM
NAD ⁺	100 mM	12,5 µl	1 mM
Polyethylenglycol 8 kDa	Feststoff	62,5 mg	5 % (w/V)
H ₂ O	--	62,5 µl	--

Isothermaler Reaktionspuffer (1x)

Substanz	spezifische Enzymaktivität	Volumen
Stammlösung (5x)	--	80 µl
<i>iProof</i> Polymerase	2 U/µl	5 µl
<i>Taq</i> DNA-Ligase	40 U/µl	40 µl
T5 Exonuclease	0,1 U/µl	16 µl
H ₂ O	--	239 µl

Tab. 10: Reaktionsansatz der isothermalen Klonierung.

Substanz	Volumen (Gesamt: 20 µl)	DNA-Menge im Reaktionsansatz (maximale Gesamtmenge: 100 ng)
Isothermaler Reaktionspuffer (1x)	15 µl	--
linearisierter Zielvektor	1-4 µl	10-30 ng
Insertionsfragmente	1-4 µl	je Fragment 10-20 ng

2.7.15. Lösungen für das Arbeiten mit DNA

Nachfolgend sind in Tab. 11 alle in dieser Arbeit verwendeten Lösungen und Puffer für die Arbeiten mit DNA aufgeführt.

Tab. 11: Lösungen und Puffer für das Arbeiten mit DNA.

	Einwaage	Substanz	Konzentration
50x TAE-Puffer (1 L)	242 g	Tris	2 M
	57,1 ml	Eisessig	1 M
	100 ml	EDTA (0,5 M)	50 mM
	ad 1000 ml	dH ₂ O	
1x TAE-Puffer (1 L)	40 ml	50x TAE-Puffer	
	ad 2000 ml	dH ₂ O	
6x Ladepuffer (10 ml)	6 g	Glycerin	60 % (V/V)
	1,2 ml	50x TAE-Puffer	
	1 ml	Bromphenolblau (0,5%)	0,05 % (w/V)
	2,8 ml	dH ₂ O	
Midori Green	200 µl	Midori Green	20 % (V/V)
	800 µl	ddH ₂ O	

2.8. Methoden für die Arbeiten mit RNA

2.8.1. Isolierung der Gesamt-RNA aus *Synechocystis*

Die Isolation der Gesamt-RNA aus *Synechocystis* erfolgte mit dem TRIzol[®] Plus RNA Purification Kit (*life technologies*, Carlsbad, Californien, USA).

Für die Isolation von RNA wurde *Synechocystis* in 400 ml BG11-Medium inokuliert. Die Start-OD₇₅₀ betrug 0,03. Die Kulturen wuchsen für zehn Tage schüttelnd (125 rpm, 30°C) in einem beleuchteten Inkubator. Anschließend wurden pro Kultur 50 ml geerntet und in 1 ml TRIzol[®] resuspendiert. Die Suspension wurde nun direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend für 15 Minuten bei 65°C aufgetaut. Alle nachfolgenden Schritte konnten entsprechend den Angaben des Herstellerprotokolls durchgeführt werden. Die Reinheit und

Konzentration der RNA wurde mit dem Nano Drop bestimmt (siehe 2.7.3). Zur Kontrolle der RNA-Isolation auf eine Kontamination mit genomischer DNA, wurde eine Test-PCR mit Genom-spezifischen Primern (601 und 602) durchgeführt. Als Positivkontrolle dienten vorbereitete Zelllösungen von *Synechocystis* (siehe 2.7.10). Die Detektion von genomischer DNA machte einen DNase Verdau nötig (siehe 2.8.2).

2.8.2. Verwendung einer DNase-Reaktion in einer RNA-Probe

Der DNase-Verdau einer RNA-Probe wurde nötig, wenn die Test-PCR auf genomische DNA positiv verlaufen ist. Für den DNase-Verdau wurde das *DNA-free* Kit von Ambion verwendet (*life technologies*, Carlsbad, Californien, USA). Zunächst wurde ein Zehntel des Volumens der RNA-Lösung an rDNase Puffer zugegeben. Der Verdau wurde dann durch Zugabe von 1 µl rDNase gestartet und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurden 0,1 Volumen *Inactivation Reagent* der Lösung zugefügt und zwei Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Zur Phasenseparation wurde der Ansatz für 90 Sekunden bei 10000 g zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase enthielt die RNA-Lösung.

Zum Ausschließen einer DNA-Kontamination der Probe wurde eine PCR mit Genom-spezifischen Primern (601 und 602) durchgeführt. Die Reinheit und Konzentration der RNA-Lösung ist mittels Nano Drop bestimmt worden (siehe 2.7.3).

2.9. Methoden für Arbeiten mit Proteinen

2.9.1. Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

Proteinkonzentrationen wurden mit der Methode nach Bradford (1976) bestimmt. Dabei bildet der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G250 in saurem Milieu mit unpolaren und kationischen Seitenketten der Aminosäuren einen blauen Komplex, der ein Absorptionsmaximum von 595 nm besitzt. Für die Bestimmung von Proteinen diente eine BSA-Eichreihe (0,1 mg/ml, 0,08 mg/ml, 0,06 mg/ml, 0,04 mg/ml, 0,02 mg/ml und 0 mg/ml) als Referenzwert. Über die Steigung der Eichgerade konnte die Proteinkonzentration in den

unbekannten Proben errechnet werden. Dafür wurden die Proteinproben entsprechend verdünnt, dass die erhaltenen Extinktionswerte im Detektionsbereich der Eichreihe lagen. Von den Referenzwerten und den Proben wurden 20 µl in eine Mikrotiterplatte pipettiert, wobei jede Verdünnung der Probe doppelt und die Eichwerte dreifach auf die Mikrotiterplatte pipettiert wurden. Anschließend ist in jede Vertiefung der Platte 180 µl Bradford-Lösung gegeben worden. Nach 5-10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur konnten die Platten bei 595 nm im *iMark Microplate Reader* (BioRad, München) ausgelesen werden.

Wurde der Proteingehalt in einer Bakteriensuspension bestimmt, sind 200 µl der Kultur mit 200 µl NaOH-Lösung (0,4 M) gemischt und für 10 Minuten bei 95°C gekocht worden. Die Probe konnte dann direkt gemessen oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt werden.

Tab. 12: Bradford-Lösung.

Substanz	Einwaage / Volumen	Konzentration
Coomassie Brilliant Blue G 250	100 mg	115 µM
konz. Phosphorsäure	100 ml	10% (V/V)
Ethanol (vergällt), ≥ 96%	50 ml	5% (V/V)
H ₂ O	ad 1000 ml	

Die Lösung muss in der Reihenfolge von oben nach unten angesetzt werden. Anschließend wird die Lösung durch Papierfaltenfilter filtriert und das Filtrat abgedunkelt im Kühlschrank gelagert.

2.9.2. SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteinen nach ihren Molekulargewicht erfolgte in diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelen (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli, 1970). Ein solches Gel ist durch die Verwendung von zwei verschiedenen Gelbereichen charakterisiert – ein Sammel- und ein Trenngel. Im Sammelgel liegt eine geringere Acrylamidkonzentration und ein niedrigerer pH vor. Durch die unterschiedlichen Eigenschaften der beiden Gele werden die aufgetragenen Proteine zunächst in einer Lauffront konzentriert, um dann im Trenngel nach

Molekulargewicht aufgetrennt zu werden. Dabei durchlaufen kleinere Proteine das Gel schneller als große. In dieser Arbeit wurden 10%ige Trenngele und 4%ige Sammelgele verwendet. Das Proteingemisch wurde vor dem Probenauftrag mit einem 6x-Probenpuffer versetzt, der Natriumdodecylsulfat (engl. sodium dodecyl sulfate, SDS) und β -Mercaptoethanol enthielt, und für 10 Minuten bei 95°C inkubiert. Die Inkubation bei hoher Temperatur denaturiert die Proteine. Eine weitere Denaturierung wird durch SDS, ein Detergens, erreicht, welches nichtkovalente Wechselwirkungen innerhalb nativer Proteine aufhebt. Zur Reduktion von Disulfidbrücken ist β -Mercaptoethanol hinzugegeben worden. Die SDS-Anionen binden an die Hauptketten mit ca. einem SDS-Molekül pro zwei Aminosäurereste. Der so entstandene Komplex aus SDS und denaturiertem Protein weist eine stark negative Ladung auf, die proportional zu der Masse des Proteins ist. Dabei überdecken SDS-Anionen weitestgehend die Eigenladung der Proteine, weshalb die ursprüngliche Ladung des nativen Proteins vernachlässigbar ist. Im elektrischen Feld wandern diese Komplexe nun durch die Polyacrylamid-Matrix.

Es wurden stets 25-35 μg Protein in einem Probenvolumen von 20-25 μl geladen. Als Referenzmarker wurde der PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas) verwendet. Die Elektrophorese ist bei Raumtemperatur im in Tab. 13 dargestellten Laufpuffer durchgeführt worden, bis die Lauffront die Unterseite des Gels erreichte. Die angelegte Spannung betrug dabei 120 V im Sammelgel- und 150 V im Trenngelbereich.

Tab. 13: Zusammensetzung der Puffer/Gele für eine SDS-PAGE.

4%iges Sammelgel, Volumina für 11 kleine Gele		
Substanz	Zusammensetzung	Volumen
dH ₂ O	---	35,89 ml
Sammelgelpuffer	2 M Tris-HCl pH 6,8	6,19 ml
Acrylamid-Lösung	30% (w/V) Acrylamid 0,8% (w/V) Bisacrylamid	6,81 ml
SDS	10% (w/V)	495 µl
TEMED	---	83 µl
Ammoniumpersulfat	10% (w/V)	330 µl
10% (w/V) Trenngel, Volumina für 11 kleine Gele		
Substanz	Zusammensetzung	Volumen
dH ₂ O	---	35,20 ml
Trenngelpuffer	2 M Tris-HCl pH 8,8	21,66 ml
Acrylamid-Lösung	30% (w/V) Acrylamid 0,8% (w/V) Bisacrylamid	28,88 ml
SDS	10% (w/V)	866 µl
TEMED	---	116 µl
Ammoniumpersulfat	10% (w/V)	578 µl
Laufpuffer		
Substanz	Einwaage (1L)	Konzentration
Tris-HCl	3,0 g	
Glycin	14,4 g	
SDS	1,0 g	
6x SDS-Ladepuffer		
Substanz	Einwaage (100 ml)	Konzentration
Tris-HCl	5,91 g	375 mM
SDS	6,00 g	6 % (w/V)
Glycerin (100 %)	60,48 g	60,48% (w/V)
β-Mercaptoethanol (14,7 M)	9 ml	9% (V/V)
Bromphenolblau	0,03 g	0,03% (w/V)

2.9.3. Western-Blot und Immunodetektion

Für die Detektion von Proteinen mit Affinitäts-*tag* kann das Protein auf eine Nitrocellulosemembran übertragen werden. Dazu wird die Proteinlösung zunächst in einer SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht voneinander aufgetrennt. Für die Übertragung auf eine Nitrocellulosemembran werden zunächst Whatman-Papiere (Schleicher und Schüll, Dassel) und eine Membran auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten und in Blotting Puffer eingelegt. Nun wird der Blot folgendermaßen im Trans-Blot Turbo Transfer System (BioRad, München) aufgebaut: sieben Whatman-Papiere, Nitrocellulosemembran, SDS-Gel und abschließend wieder sieben Whatman-Papiere. Eventuell vorhandene Luftblasen wurden entfernt und die Spannung für 7 Minuten angelegt (1,3 A, 25 V, 9 Minuten). Nach Ablauf der Zeit folgte die Immunodetektion. Dazu wurde die nun geblottete Nitrocellulosemembran zweimal 10 Minuten mit TBS-Puffer gewaschen. Es folgte die Zugabe der Blockier-Lösung für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Die Blockier-Lösung sättigt die Membran mit nicht detektierbaren Proteinen ab, damit spezifische Signale erzeugt werden können. Nach der Inkubationszeit wurde der primäre Antikörper (Maus-Anti-His, Serotec (BioRad, München)) in einer Verdünnung von 1:2000 direkt in die Blockier-Lösung zugegeben und erneut für eine Stunde inkubiert. Der Antikörper bindet spezifisch an einen am Protein befindlichen Histidin-*tag*. Zur Entfernung des Antikörpers folgten zwei Waschschriffe mit TBS-Tween-Triton-Puffer und ein Waschschriff mit TBS-Puffer für je 10 Minuten. Die Zugabe des sekundären Antikörpers (Ziege Anti Maus IgG-Alkaline Phosphatase, Sigma, St. Louis, USA) wurde in einer 1:7500 Verdünnung in 3% BSA oder Milchpulver durchgeführt. Erneut wurde der Blot für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurde viermal für 5 Minuten mit TBS-Tween-Puffer und fünfmal zwei Minuten mit deionisiertem Wasser gewaschen. Abschließend wurde der Blot mit dem *Immun-Blot Goat Anti-Mouse AP Assay Kit* (BioRad, München) entwickelt. Am sekundären Antikörper ist eine alkalische Phosphatase gekoppelt, die eine Farbreaktion bewirkt, in der 5-Brom-4-chlor-3-Indoxylphosphat (BCIP) zu 5-Brom-4-chlor-Indoxyl und Phosphat umgesetzt wird. Das 5-Brom-4-chlor-Indoxyl wird durch Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) zum tiefblauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-Indigo oxidiert. Die Entwicklung wurde solange durchgeführt, bis die mitgeführte Positivkontrolle eine gut erkennbare Farbbande ausgebildet hatte. Die Reaktion konnte durch abschütten der Reaktionslösung und dem Zufügen von Wasser gestoppt werden. Die Dokumentation der entwickelten Membran erfolgte mit dem ChemiDoc™ XRS+ System (BioRad, München).

Tab. 14: Puffer für die Durchführung eines Western-Blots.

Blotting Puffer		
Substanz	Einwaage (1 L)	Konzentration
Glycin	14,40 g	2192 mM
Tris-HCl	3,02 g	25 mM
Methanol	100 ml	10% (V/V)
TBS-Puffer		
Substanz	Einwaage (1 L)	Konzentration
Tris-HCl pH 7,5	1,21 g	10 mM
NaCl	8,77 g	150 mM
TBS-Tween-Puffer		
Substanz	Einwaage (1 L)	Konzentration
Tris-HCl pH 7,5	2,42 g	20 mM
NaCl	8,77 g	500 mM
Tween 20	500 µl	0,05% (V/V)
TBS-Tween-Triton-Puffer		
Substanz	Einwaage (1 L)	Konzentration
Tris-HCl pH 7,5	2,42 g	20 mM
NaCl	8,77 g	500 mM
Tween 20	500 µl	0,05% (V/V)
Triton X-100	2000 µl	0,2% (V/V)

2.9.4. Isolation des Gesamtproteins aus *Synechocystis*

Die Isolation des Gesamtproteins aus *Synechocystis* erfolgte im Eppendorf-Maßstab. Zunächst wurden 10 ml Kultur geerntet (4°C, 10 Minuten, 5000 rpm, *centrifuge* 5810R, Eppendorf, Hamburg) und das Pellet einmal mit 600 µl PBS-Puffer/Proteinaseinhibitor (cComplete EDTA-free, Roche, Risch, Schweiz) gewaschen. Nach Zentrifugation wurde das Präzipitat in 200 µl PBS-Puffer (enthielt Proteinaseinhibitor) aufgenommen. Nach Zugabe von ca. 200 µl Glasperlen (Durchmesser 0,25-0,3 mm) wurden die Zellen in der Zelmühle aufgeschlossen (150 Sekunden bei 30 Hz, Retsch MM400, Retsch, Haan). Anschließend wurde die Suspension dreimal in flüssigen Stickstoff für 2 Minuten eingefroren und bei Raumtemperatur aufgetaut. Nach einem abschließenden Zentrifugationsschritt konnte der Überstand mit dem Protein in ein neues Gefäß überführt werden. Die Quantifizierung erfolgte nach Bradford (1976).

Tab. 15: PBS-Puffer.

Substanz	Einwaage	Konzentration
NaCl	8,00 g	137 mM
KCl	0,20 g	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	1,42 g	10 mM
KH ₂ PO ₄	0,27 g	2 mM
H ₂ O	ad 1 l	
	pH 7,4	

2.10. Generierung von *E. coli* Mutanten

2.10.1. Deletion von Genen nach Kolisnychenko et al. (2002)

Bei der markerlosen Deletion nach Kolisnychenko et al. (2002) wird eine Resistenzkassette mittels homologer Rekombination ins Genom inseriert, wobei das Zielgen deletiert wird. Durch einen induzierten Doppelstrangbruch und anschließende DNA-Reparatur über eingebrachte homologe Bereiche kann das Resistenzgen wieder komplett aus dem Genom entfernt werden.

Zunächst wird das lineare DNA-Fragment für die Gendeletion vorbereitet. Dazu wird als erstes der so genannte Megaprimer designt (Abb. 9). Primer „a“ und „b“ dienen sich in einer PCR-Reaktion als Matrize, wodurch ein ca. 120 bp großes PCR-Fragment („ab“) entsteht. Dieses kann dann direkt in der nachfolgenden PCR für die Amplifikation der Antibiotikaresistenz in pSG76-CSH verwendet werden.

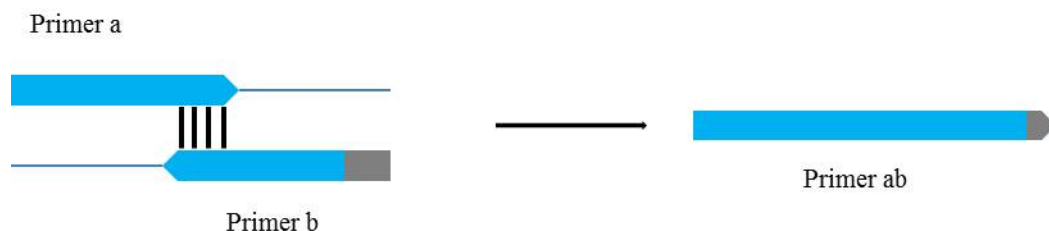


Abb. 9: Herstellung des so genannten Megaprimers.

Für die Herstellung des Megaprimers werden zwei kürzere Primer designt, die einen gemeinsamen Annealing-Bereich haben. Werden die Primer in einer PCR eingesetzt, lagern sie sich aneinander und dienen sich gegenseitig als Matrize. Der Primer B enthält den Annealing Bereich für den Vektor pSG76-CSH (grau). Das PCR-Produkt wird direkt als Primer für die PCR verwendet.

Der Megaprimer enthält die homologen Bereiche „A“ und „B“, der zweite Primer den homologen Bereich „C“ (vgl. Abb. 10). Die Antibiotikaresistenz ist an jeder Seite von einer Sce-I Erkennungssequenz umgeben, die für die spätere Entfernung der Resistenz aus dem Genom verwendet wird. Der zu mutierende Stamm wird zunächst durch pKD46 transformiert (vgl. 2.6.4) und anschließend für die Deletion vorbereitet. Dafür werden die Zellen für eine elektrische Transformation mit pKD46 (vgl. 2.6.3) kompetent gemacht und das lineare DNA-Fragment wird in die Zelle eingebracht. Das Plasmid pKD46 enthält die *red*-Gene, die die natürliche homologe Rekombination zwischen zwei DNA-Fragmenten in *E. coli* vervielfachen. Die Selektion erfolgt auf LB_{Chl6-10}-Agarplatten bei 37°C. Die Inkubation bei 37°C bewirkt dabei die Entfernung des thermosensitiven pKD46 aus den Zellen. Mittels PCR kann die erfolgreiche Insertion des Resistenzgens bestätigt werden. Die Insertion des linearen DNA-Fragments hat zunächst die Verdopplung der Sequenz der Homologiebox „B“ zur Folge. Nun wurden die Zellen mit dem Plasmid pSTKST transformiert. Die auf dem Plasmid enthaltene Meganuclease Sce-I erkennt spezifisch die eingebrachten Erkennungssequenzen und schneidet die Resistenzkassette aus dem Genom aus. Der dadurch entstehende Doppelstrangbruch wird durch die natürlichen DNA-Reparatursysteme von *E. coli* repariert. Dabei dient der homologe Bereich „B“ als Verknüpfungspunkt für die Reparatur. Die erfolgreiche Entfernung des Selektionsmarkers wurde durch die Primer „d“ und „e“ (vgl. Abb. 10) getestet.

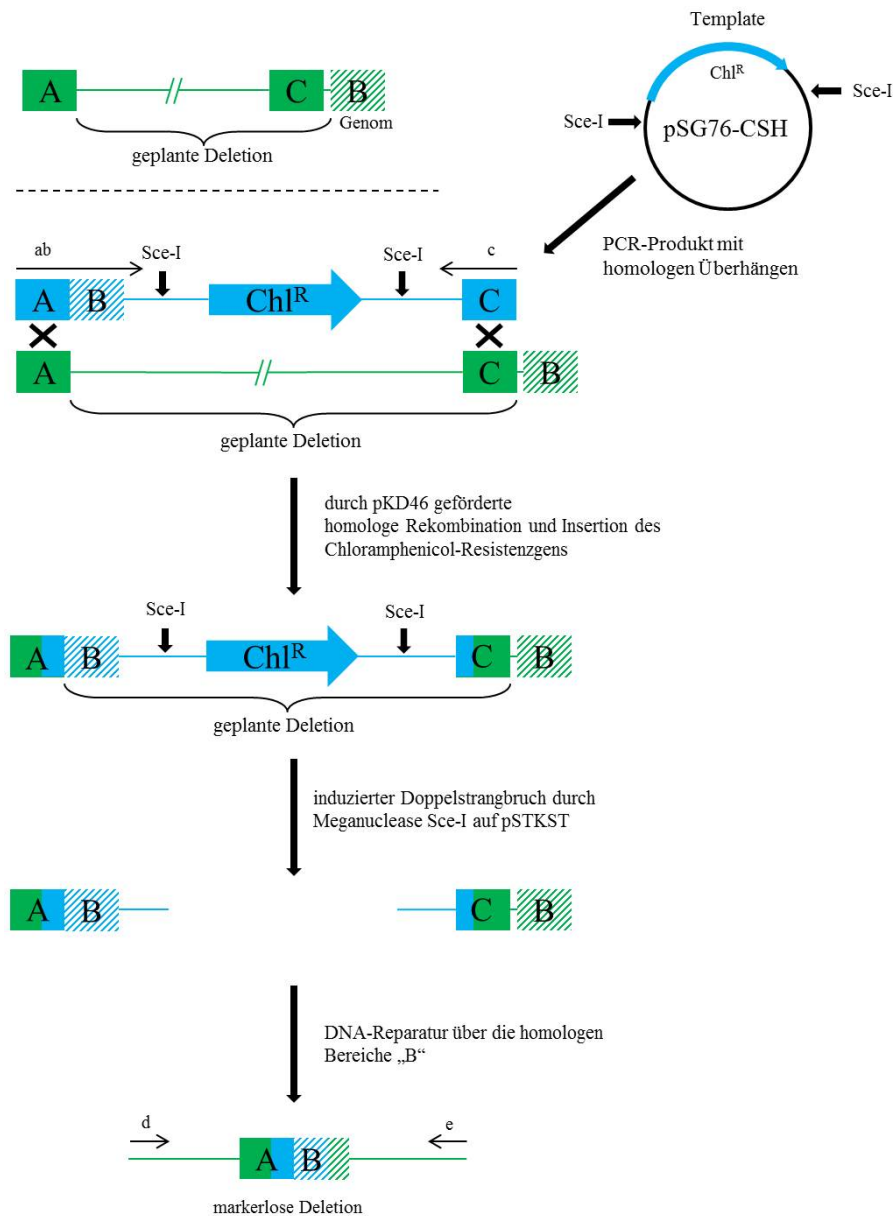


Abb. 10: Überblick über die Deletionsmethode nach Kolisnychenko (2002).

Zunächst werden Primer mit homologen Überhängen für die geplante Gendeletion designt. Dabei enthält ein Primer die homologen Bereiche „AB“ und der zweite Primer den homologen Bereich „C“. Als Template wird das Plasmid pSG76-CSH verwendet. Die Primer binden jeweils außerhalb der Sce-I Schnittstellen. Der zu mutierende Stamm enthält bereits pKD46. Durch die Induktion der *red*-Gene kann das in die Zellen eingebrachte PCR-Fragment über homologe Rekombination ins Genom inseriert werden. Das Plasmid pSTKST enthält die Meganuclease Sce-I. Nach Expression der Meganuclease wird durch die Restriktion an den beiden Sce-I Schnittstellen ein Doppelstrangbruch erzeugt. Über den homologen Bereich „B“ kann die *E. coli* Zelle den Doppelstrangbruch reparieren. Dabei werden sowohl die Sce-I Schnittstellen, als auch die Chloramphenicoresistenz aus dem Genom entfernt. Da die Rekombination innerhalb der homologen Bereiche an einer zufälligen Stelle stattfindet, stammen am Ende der Rekombination Bereiche aus dem linearen DNA-Fragment (Mutationsfragment) und aus dem Genom.

2.10.2. Deletion der Alkoholdehydrogenase *adhE* aus dem Stamm JG11

Zur Unterbindung der Produktion von Alkohol während der gemischten Säuregärung wurde das Gen der Alkoholdehydrogenase *adhE* deletiert. Die Deletion erfolgte entsprechend den Angaben nach Kolisychenko et al. (2002).

Für die Herstellung des Megaprimers Del_ *adhE*_AB wurden die Primer 407 und 408 in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Dabei lagerten sich die Primer aneinander und dienten sich gegenseitig als Matrize. Zur Überprüfung der PCR wurden 5 µl der PCR-Reaktion auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen. War eine Bande zu erkennen, wurde der restliche PCR-Ansatz direkt für die Produktion des Deletionsfragments verwendet. Dazu wurden die Primer 407, 409 und der hergestellte Del_ *adhE*_AB genutzt. Als Matrize diente das Plasmid pSG76-CSH. Das 1,5 kb große Deletionsfragment wurde gereinigt und für die Transformation elektrisch kompetenter JG11-Zellen eingesetzt. Es enthielt homologe Sequenzbereiche vor und hinter *adhE* und zwischen diesen Sequenzen eine von zwei *SceI*-Schnittstellen eingegrenzte Chloramphenicolresistenzkassette. Die Zellen trugen bereits das Plasmid pKD46 und wurden wie beschrieben für die Transformation vorbereitet (siehe 2.6.4). Die Selektion erfolgte auf LB_{Chl6}-Agarplatten bei 37°C. Durch die Inkubation bei 37°C konnte das thermosensitive pKD46 aus den Zellen entfernt werden. Erfolgreiche Transformanten wurden mittels Kolonie-PCR (siehe 2.7.11) mit den Primern 386 und 387 getestet. Die Deletion galt erst dann als gesichert, sobald ein entsprechendes Sequenzierungsergebnis vorlag.

Für die Entfernung des Selektionsmarkers wurde das Plasmid pSTKST_Gent verwendet. Das bei Kolisychenko et al. (2002) publizierte pSTKST enthält ein Kanamycinresistenzgen. Da der zu mutierende Stamm ebenfalls kanamycinresistent war, musste in pSTKST das Resistenzgen ausgetauscht werden. Dazu wurde zunächst pSTKST mit den Primern 491 und 492 ohne den Resistenzmarker amplifiziert. Das Gen für die Gentamycinresistenz konnte mit den Primern 489 und 490 aus dem Plasmid pAH143 entnommen werden. Das PCR-Produkt mit dem Resistenzgen wurde phosphoryliert und anschließend mit dem zweiten PCR-Fragment ligiert (siehe 2.7.6 und 2.7.13). Die Selektion erfolgte auf LB_{Gent}-Agarplatten bei 37°C. Das entstandene pSTKST_Gent wurde sequenziert (504 und 505) und konnte nun in die *adhE*-Deletionsmutante transformiert werden.

Das Helferplasmid pSTKST_Gent enthält die Meganuclease SceI unter der Kontrolle eines AHT-induzierbaren Promoters. Zur Entfernung des genomischen Selektionsmarkers wurde eine Kolonie der *adhE*-Mutante gepickt und in 5 ml LB_{Kan50} inokuliert. Die Induktion mit AHT (Endkonzentration: 200 µg/ml) erfolgte direkt nach der Inokulation. Die Inkubation fand über Nacht bei 30°C statt. Verschiedene Verdünnungen wurden am Folgetag auf LB-Agarplatten ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Die entstehenden Kolonien konnten nun mit einer Kolonie-PCR mit dem Primern 386 und 387 getestet werden. Die erfolgreiche Deletion des Selektionsmarkers konnte abschließend über Sequenzierung (Primer 386 und 387) bestätigt werden.

2.10.3. Herstellung des linearen DNA-Fragments für die Deletion der löslichen Lactatdehydrogenase *ldhA*

Die Deletion der löslichen Lactatdehydrogenase *ldhA* sollte mit einem linearen DNA-Fragment, angelehnt an Datsenko und Wanner (2000), erfolgen. Als Selektionsmarker wurden die Gene *cscRAKB* verwendet. Diese codieren für ein Proteinset, das *E. coli* die Verwendung von Saccharose als Kohlenstoff- und Energiequelle erlaubt. Die Möglichkeit der Übertragung der Saccharoseverwertbarkeit zwischen *E. coli* Stämmen wurde bereits von Shukla et al. (2004) gezeigt.

Für die Konstruktion des linearen DNA-Fragments wurde über mehrere Ligationsschritte das Mutationsfragment in den Vektor pASK43+ kloniert (siehe Tab. 16). Die *csc*-Gene konnten aus dem Vektor pKJ2 mit den Primern 588 und 283 amplifiziert werden. Das 5 kb große Fragment wurde phosphoryliert und blunt in das mit *SmaI* linearisierte pASK43+ inseriert. Die Selektion erfolgte auf LB_{Amp} Agarplatten. Durch Sequenzierung und analytische Restriktionsverdauung wurde die Richtigkeit des Zwischenprodukts ZP 1 betätigt. Der Primer 588 enthielt zwei *LguI* Schnittstellen, welches variable *sticky ends* erzeugen kann. Dies ermöglicht die gerichtete Integration von einem DNA-Fragment an diese Stelle.

Für die Integration ins Genom sind zwei homologe Sequenzbereiche vor und hinter den *csc*-Genen notwendig. Der erste homologe Sequenzbereich, *ldh_UP*, konnte mit den Primern 589 und 590 amplifiziert werden. Als Matrize dienten ganze *E. coli* Zellen. Die Primer enthielten die für die Klonierung nötigen *LguI*-Schnittstellen, wobei die durch Restriktion

erzeugten *sticky ends* für eine gerichtete Klonierung designt waren. Das DNA-Fragment *ldh*_UP konnte anschließend in den mit *LguI* linearisierten und dephosphorylierten Vektor ZP 1 ligiert werden. Mit dem Ligationsansatz transformierte *E. coli* Zellen wurden auf LB_{Amp} Agarplatten inkubiert. Die Sequenzierung des Ligationsprodukts bestätigte die erwartete Sequenz des Zwischenprodukts ZP 2.

Der Vektor ZP 2 wurde darauffolgend als Matrize verwendet. Das Insert (*ldh*_UP und *csc*-Gene) wurde mit dem Primern 603 und 604 amplifiziert. Der Primer 603 enthielt zwei *LguI*- und eine *XbaI*-Schnittstelle, der Primer 604 eine *XbaI*-Schnittstelle. Die *XbaI*-Erkennungssequenz wurde für die spätere Isolation des Mutationsfragments aus dem Vektor benötigt. Das PCR Fragment wurde phosphoryliert und in einer Ligationsreaktion mit einem *blunt* geschnittenen pASK43+ (*SmaI*) ligiert. Das so entstandene Zwischenprodukt ZP 3 wurde für die Transformation von *E. coli* Zellen verwendet und abschließend durch Sequenzierung überprüft.

Die finale Integration des homologen Sequenzbereiches *downstream* von *ldhA* erforderte zunächst die Herstellung des DNA-Fragments *ldh*_down. Für die Amplifikation wurden als Matrize *E. coli* Zellen und die Primer 605 und 606 verwendet. Beide Primer enthielten die entsprechenden *LguI*-Schnittstellen. Der Vektor ZP 3 und das PCR-Fragment wurden mit *LguI* geschnitten und miteinander ligiert. Die Selektion transformierter *E. coli* Zellen erfolgte auf LB_{Amp} Agarplatten. Zur Überprüfung des Vektors (FP) wurde das Plasmid sequenziert (Primer pASK_for und pASK_rev) und die Plasmid tragenden *E. coli* Zellen auf M63-Minimalagarplatten mit Saccharose als einziger Energie- und Kohlenstoffquelle ausplattiert.

Tab. 16: Übersicht der in der Klonierung erzeugten Zwischenprodukte.

Ligationsprodukt	Name	Erläuterung
ZP 1	pASK43+_csc_LguI	Enthält die <i>csc</i> -Gene und zwei <i>LguI</i> -Schnittstellen
ZP 2	pASK43+_csc_ldh-up	Enthält die <i>csc</i> -Gene und den homologen Sequenzbereich <i>ldh_UP</i>
ZP 3	pASK43+_csc_ldh-up_LguI	Entspricht ZP 2, enthält zusätzlich zwei <i>LguI</i> -Schnittstellen hinter den <i>csc</i> -Genen
FP	pASK43+csc_ldh-RecSites	Fertiges Plasmid, enthält <i>ldhA</i> -Deletionsfragment und <i>cscRAKB</i> als Selektionsmarker

2.10.4. Deletion von *ldhA* mit einem linearem DNA-Fragment

Die Deletion von *ldhA* erfolgte abgewandelt nach Datsenko und Wanner (2000). Das lineare Deletionsfragment wurde durch einen Restriktionsverdau mit *XbaI* aus dem Vektor pASK43+csc_ldh-RecSites (siehe 2.10.3) isoliert. Dieses enthält homologe Sequenzbereiche von je 500 bp Länge, die das Gen *ldhA* begrenzen. Der Stamm JG369 wurde zunächst mit dem Plasmid pKD46 transformiert. Daraufhin wurden die Zellen für die Elektroporation vorbereitet (siehe 2.6.3) und mit dem zuvor isolierten DNA-Fragment transformiert. Nach der Elektroporation wurden die Zellen in frischem SOC-Medium aufgenommen und für 1-2 Stunden bei 37°C inokuliert. Die Inkubation bei 37°C ermöglicht die Deletion von *ldhA* bei gleichzeitiger Insertion der *csc*-Gene. Darüber hinaus wird das thermosensitive Plasmid pKD46 aus den Zellen entfernt. Es folgten zwei Waschschrte mit je 1 ml M63-Medium um SOC-Rückstände zu entfernen. Nach dem letzten Waschschrte wurden die Zellen in 300 µl M63 Medium aufgenommen und auf M63-Saccharose Agarplatten übertragen. Die Inkubation erfolgte nun für mehrere Tage bei 37°C bis einzelne Kolonien sichtbar wurden. Für gewöhnlich sind 4-6 Kolonien in einer Kolonie-PCR (*iProof*, 65°C Anlagerungs Temperatur, 10% DMSO im Ansatz) mit den Primern 683 und 684 getestet worden. Das entstandene PCR-Produkt wurde abschließend isoliert und ca. 1500 bp je Seite sequenziert (Primer 683, 684, 685, 686) um die Insertion zu bestätigen.

2.10.5. Deletion von Genen mittels *gene gorging* (Herring *et al.*, 2003) und *galk*-Selektion

Für die Modifikation von *E. coli* wurde in dieser Arbeit überwiegend eine Kombination der Methoden nach Herring *et al.* (2003) und der Selektion mit *galk* verwendet.

Die Verwertung von Galaktose wird in *E. coli* durch Gene des *gal*-Operons codiert. Es besteht aus *galE* (Epimerase), *galT* (Transferase) und *galk* (Kinase) (Weickert & Adhya, 1993). Die durch *galk* codierte Galactokinase markiert durch die von ihr katalysierte Phosphorylierung der Galaktose den ersten Schritt. Es wurde bereits gezeigt, dass *galk*-Deletionen *E. coli* die Fähigkeit nehmen auf Galactose als einziger Kohlenstoff-Quelle zu wachsen. Darüber hinaus hat die *galk*-Selektion den Vorteil einer möglichen Doppelselektion: Die Verwendung des zur Galactose analogen 2-Desoxy-Galactose als Substrat hat die Produktion des toxisch wirkenden 2-Desoxy-Galactose-1-Phosphat zur Folge (Alper & Ames, 1975). *E. coli* Zellen mit funktionellem *galk* sterben hierdurch ab. Für die Verwendung der *galk*-Selektion ist ein $\Delta galk$ -Stamm nötig.

Die Deletion von Genen mittels *gene gorging* nutzt eine Kombination aus verstärkter homologer Rekombination durch die *red*-Gene und die Meganuclease Sce-I zur Generierung des linearen DNA-Fragments *in Vivo*. Hier wird das Plasmid pACBSR als Helferplasmid verwendet. Es enthält sowohl die *red*-Gene als auch die Meganuclease Sce-I unter der Kontrolle eines Arabinose induzierbaren Promoters. Ein zweites Plasmid enthält das lineare DNA-Fragment für die Mutation. Es enthält den für die Integration nötigen Selektionsmarker (*galk*) und zwei homologe DNA-Bereiche von 500 bp Länge, die das Zielgen einschließen. An beide Enden wird es durch die Schnittstellen Sce-I begrenzt. Die Verwendung eines zweiten Plasmids stellt das Vorhandensein des Mutationsfragments in den Zellen sicher, da die Transformation von *E. coli* mit beiden Plasmiden gleichzeitig stattfinden kann. Die Selektion erfolgt dabei auf LB-Platten mit zwei Antibiotika. Alle entstehenden Kolonien enthalten das Helferplasmid (pACBSR) und das Mutationsplasmid (A), welches zuvor mit bereits beschriebenen Methoden kloniert wurde (siehe 2.7.6, 2.7.7, 2.7.11 und 2.7.14).

Eine Kolonie des *E. coli* Stamms mit Helfer- und Mutationsplasmid (A) wurde in 1 ml LB-Medium inokuliert und eine Stunde bei 37°C schüttelnd inkubiert. Es folgte die Induktion des Helferplasmids mit 10 μ l einer 20%igen Arabinoselösung (Endkonzentration: 0,2%). Durch die Induktion werden die *red*-Gene (Verstärkung der natürlichen homologen

Rekombination) und die Meganuclease Sce-I exprimiert. Die Meganuclease schneidet nun das lineare Mutationsfragment aus dem Mutationsplasmid (A) heraus. Das dadurch entstehende Fragment wird durch die verstärkte Rekombination ins Genom integriert und das Zielgen deletiert. Nach weiteren 6-7 Stunden bei 37°C wurden die Zellen pelletiert (Tischzentrifuge, 14000 rpm, RT) und anschließend zwei Mal mit 1x M63-Medium gewaschen. Die Zellen wurden nun auf M63-Minimalagarplatten mit Galactose als einziger Kohlenstoffquelle ausplattiert und bei 37°C inkubiert. Entstandene Kolonien konnten dann mittels PCR getestet und die erfolgreiche Mutation durch Sequenzierung final bestätigt werden.

Analog zur Insertion von *galK* wurde für die *galK*-Deletion ein Mutationsplasmid (B) mit den gleichen homologen Bereichen verwendet. Der Einbau des neuen Fragments während der Induktion von pACBSR hat die markerlose Deletion von *galK* zur Folge. Die Selektion erfolgt hierbei auf M63-Minimalagarplatten mit 2-Desoxy-Galactose und Glycerin als Kohlenstoffquellen. Zellen, bei denen keine Integration stattgefunden hat, produzieren die toxische Substanz 2-Desoxy-Galactose-1-Phosphat und sterben ab. *E. coli* Zellen mit erfolgreicher Mutation verwenden Glycerin als Kohlenstoffquelle und können sich vermehren. Die Selektion mit 2-Desoxy-Galactose wird durch die bevorzugte Verwendung von Zucker als Kohlenstoffquelle möglich. Daher wird das Glycerin nur von Zellen verwendet, die kein *galK* mehr besitzen. Die entstehenden Kolonien wurden durch eine PCR getestet und die erfolgreiche Mutation abschließend durch Sequenzierung bestätigt. Die Deletion des Selektionsmarkers *galK* konnte auch für die gleichzeitige Integration anderer Gene ins Genom verwendet werden.

Für die Entfernung des Helferplasmids pACBSR werden die Zellen mit AHT induziert und für 3-4 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend werden geeignete Verdünnungen auf LB-Agarplatten ausplattiert. Einzelne Kopien werden am Folgetag auf LB_{chl⁻}- und LB-Platten ausgestrichen. Aus den Chloramphenicol sensitiven Zellen ist dann das Plasmid entfernt worden. In Abb. 11 ist die Mutation mittels *gene gorging* zusammenfassend dargestellt.

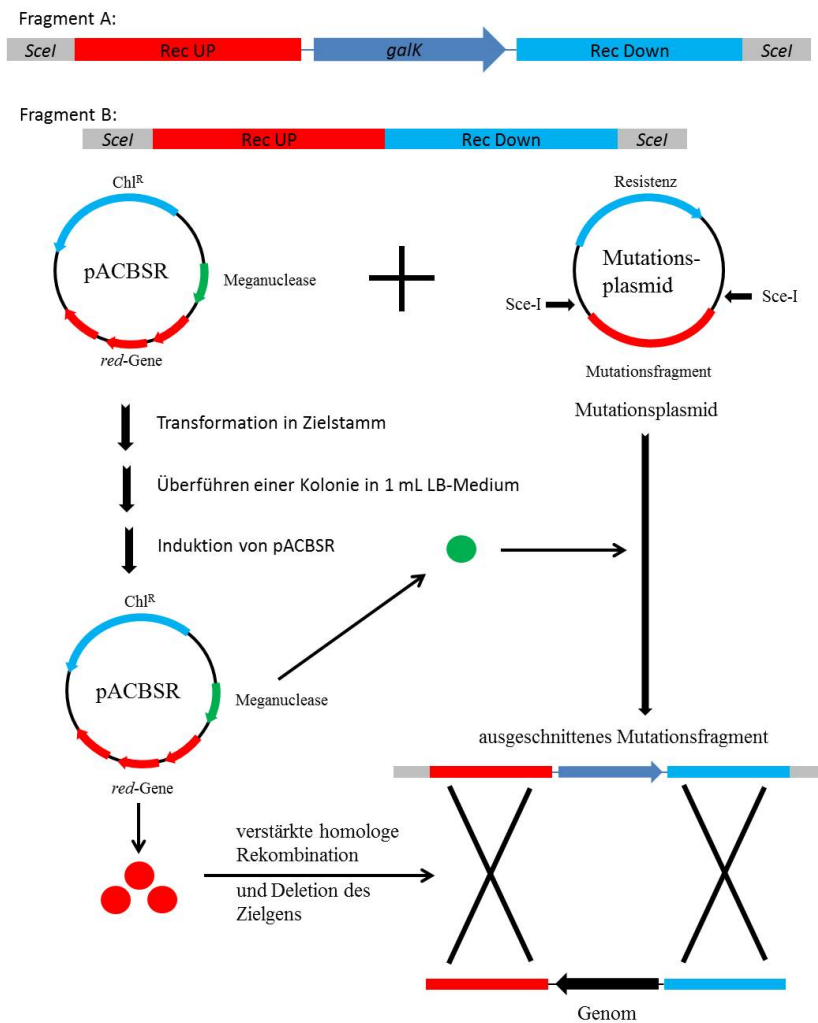


Abb. 11: Ablauf der Mutation durch *gene gorging*.

Es ist der Ablauf der markerlosen Gendeletion durch *gene gorging* dargestellt. Es werden zunächst die Mutationsplasmide kloniert. Dabei enthält das Fragment (A) den Selektionsmarker *galk*. Der *E. coli* Stamm wird mit dem Helferplasmid pACBSR und dem Mutationsplasmid cotransformiert und auf Selektionsplatten inokuliert. Eine einzelne Kolonie wird dann in LB-Medium gegeben und sowohl die Expression der *red*-Gene als auch der *Meganuclease* induziert. Die *Meganuclease* (grün) schneidet an den *Scel*-Erkennungssequenzen das Mutationsfragment heraus, die *red*-Gene (rot) verstärken die homologe Rekombination des linearen Fragments mit dem Genom. Dadurch wird das Zielgen (schwarz) deletiert und der Selektionsmarker (lila) integriert. Der Selektionsmarker kann durch die Wiederholung der Prozedur mit einem Mutationsplasmid, welches Fragment (B) trägt wieder aus dem Genom entfernt werden.

2.10.6. Deletion der Phosphotransacetylase und der Acetatkinase (*pta-ack*) mittels *gene gorging*

Die Deletion von Phosphotransacetylase und Acetatkinase wurde durch *gene gorging* durchgeführt. Dazu wurde zunächst das entsprechende Mutationsplasmid konstruiert.

2.10.7. Klonierung des Mutationsplasmids für die Deletion von *pta-ack*

Die Konstruktion des Mutationsplasmids für die Deletion von *pta-ack* wurde in zwei separaten Ligationsschritten durchgeführt: Zunächst wurde der Zielvektor pASK43+ mit den Endonucleasen *HindIII* und *NheI* linearisiert und dephosphoryliert. Durch PCR-Reaktionen konnten die Inserts amplifiziert werden. Dabei bestand das erste Insert (Ack_UP) aus einer 500 bp langen, homologen Sequenz *upstream* der zu deletierenden Gene. Für die Amplifikation wurden die Primer 1337 und 1338 mit chromosomaler *E. coli* DNA als Matrize verwendet. Der Primer 1337 enthielt die für die Ligation nötige Schnittstelle *NheI* und die für die Mutation nötige Erkennungssequenz *SceI*, Primer 1338 war am 5'-Ende phosphoryliert. Der anschließende Verdau mit *NheI* erzeugte ein PCR-Produkt mit einem *NheI*-Überhang und einem phosphorylierten *blunt end*. Das Zweite Amplifikat, welches das Gen *galk* unter der Kontrolle des konstitutiven Promoters CP6 enthielt, wurde mit den Primern 641 und 1061 erzeugt. Als Matrize diente Stamm JG287. Primer 1061 enthielt dabei die *HindIII*-Erkennungssequenz. Das entstehende PCR-Produkt wurde mit *HindIII* geschnitten und konnte anschließend für die Ligation (T4 Ligase) mit pASK43+ und Ack_UP verwendet werden. Die Selektion erfolgte auf LB-Mediumplatten mit Ampicillin als Selektionsmarker. Die Richtigkeit des Plasmids konnte durch Sequenzierung bestätigt werden. Für die Fertigstellung des Mutationsplasmids wurde das Zwischenprodukt mit *HindIII* linearisiert und anschließend dephosphoryliert. Für die Herstellung des 500 bp langen Inserts, des homologen Sequenzbereich *downstream* von *pta*, diente chromosomale *E. coli* DNA als Matrize. Die Primer 1313 und 1339 enthielten 50 bp lange homologe Überhänge zum zuvor gebildeten Zwischenprodukt, Primer 1339 enthielt zusätzlich noch eine *SceI*-Schnittstelle. Die Ligation erfolgte nach Gibson et al. (2009) (siehe 2.7.14). Für die Selektion von Transformanten sind LB_{Amp}-Agarplatten verwendet worden. Die korrekte Konstruktion konnte sowohl durch einen

analytischen Restriktionsverdau mit *Bsp*HI, als auch durch Sequenzierung (Primer pASK_for, pASK_rev, 252 und 641) bestätigt werden.

2.10.8. Deletion von *pta-ack*

Die Deletion von *pta-ack* wurde im *E. coli* Stamm JG472 durchgeführt. Dazu wurde JG472 mit dem zuvor erstellten Mutationsplasmid und dem Helferplasmid pACBSR chemisch transformiert. Die Selektion erfolgte auf LB-Agarplatten mit Ampicillin und Chloramphenicol als Selektionsmarker. Anschließend verlief die Mutation wie beschrieben (siehe 2.10.5). Einzelne Kolonien auf dem Selektionsmedium wurden in einer Kolonie-PCR mit den Primern 1377 und 1378 getestet. Entstehende DNA-Banden konnten isoliert und durch Sequenzierung analysiert werden. Die Sequenzierung (Primer 1377 und 1378) bestätigte die erfolgreiche Deletion von *pta-ack*.

2.10.9. Klonierung des Plasmids für die Deletion des Regulators *arcA*

Die Klonierung des Gens *arcA* erfolgte ebenfalls durch die Methode nach Herring et al. (2003). Dazu wurde zunächst das Plasmid für die Deletion in zwei aufeinander folgenden Ligationsschritten konstruiert: Als Zielvektor wurde das Plasmid pASK43+ mit den Endonucleasen *Hind*III und *Nhe*I geschnitten und zusätzlich dephosphoryliert. Die für den ersten Ligationsschritt nötigen DNA-Fragmente wurden durch eine PCR amplifiziert. Für den *upstream* gelegenen homologen Sequenzbereich wurde chromosomale DNA von *E. coli* als Matrize verwendet. Die Primer 1062 (enthielt *Sce*I-Schnittstelle und pASK43+-Homologiebox) und 1063 (enthielt homologen Bereich zu *galk*) sind für die PCR verwendet worden. Der Selektionsmarker *galk* konnte mit den Primern 641 und 1061 (enthielt Homologiebox zu pASK43+ und eine *Hind*III-Schnittstelle) aus Stamm JG287 amplifiziert werden. Die Ligation der drei Fragmente erfolgte nach Gibson et al. (2009). Auf Selektionsplatten entstandene Kolonien wurden mit Kolonie-PCR getestet und bei positivem Ergebnis sequenziert (Primer pASK_for und pASK_rev). Das fertige Zwischenprodukt konnte nun mit *Hind*III linearisiert und anschließend dephosphoryliert werden. Als Insert wurde das PCR-Produkt genommen, welches durch die Primer 1064 und 1065 mit

chromosomaler DNA von *E. coli* als Vorlage amplifiziert wurde. Die Primer enthielten die 50 Basenpaar langen, für die Klonierung nach Gibson nötigen, Überhänge, Primer 1065 zusätzlich noch eine ScaI-Erkennungssequenz. Die Selektion von Transformanten erfolgte auf LB_{Amp}-Platten bei 37°C. Aus durch Kolonie-PCR positiv getesteten Kolonien wurde das Plasmid isoliert und sequenziert (Primer pASK_for und pASK_rev).

2.10.10. Deletion von *arcA* in den Stämmen JG472 und JG806

Das im vorigen Kapitel klonierte Plasmid wurde für die Deletion des Regulators *arcA* in JG472 und JG806 verwendet. Beide Stämme wurden mit dem Mutationsplasmid und dem Helferplasmid pACBSR transformiert. Für die Selektion sind LB-Platten mit Ampicillin und Chloramphenicol verwendet worden. Die Mutation wurde nun wie beschrieben durchgeführt (siehe 2.10.5). Auf M63-Galaktose gewachsene Kolonien wurden durch Kolonie-PCR mit den Primern 1082 und 1083 getestet und bei positivem Ergebnis sequenziert.

2.10.11. Integration des Cytochroms *stc* über eine Phagen-Integrationssequenz

Die Integration von *stc* erfolgte über die Integrationssequenz des Phagen P21 unter Verwendung der CRIM-Plasmide (*Conditional-Replication, Integration and Modular plasmid*) (Haldimann & Wanner, 2001). Dabei können Gene in die Anlagerungssequenzen von Phagen stabil integriert werden. Ein ständiger Selektionsdruck ist bei der Verwendung der Methode nicht nötig. Zunächst wurde der zu mutierende Stamm mit dem Plasmid pAH121 transformiert. Die Selektion erfolgte auf LB_{Amp}-Agarplatten bei 30°C. Zellen, die das Plasmid aufgenommen hatten, wurden nun wieder für die chemische Transformation mit dem Plasmid pAH95_*stc* (Sturm-Richter, 2014) vorbereitet. Nach der Transformation erfolgte die Selektion auf LB-Agarplatten mit Kanamycin (10 µg/ml). Die beimpften Platten wurden eine Stunde bei 42°C zur Entfernung des Plasmids pAH121 und anschließend über Nacht bei 37°C inkubiert. Entstandene Kolonien wurden durch ausstreichen auf LB_{Kan10}- und LB-Platten auf die stabile Integration des Plasmids hin überprüft. Zur Validierung der Ergebnisse wurde die Integration durch Kolonie-PCR (Primer 503 und 1129) bestätigt.

2.11. Quantitative Analysen

2.11.1. Enzymatische Glucosebestimmung

Bei der enzymatischen Quantifizierung wird die Glucose zunächst durch die Hexokinase (HK) phosphoryliert, wobei ATP verbraucht wird. Glucose-6-Phosphat kann nun in einer irreversiblen Reaktion durch die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase (G6P-DH) zu Glukonat-6-Phosphat oxidiert werden. Die Elektronen werden auf den Cofaktor NADP^+ übertragen, wodurch NADPH entsteht. NADPH hat ein zusätzliches Absorptionsmaximum bei 340 nm. Dabei ist die entstehende Menge NADPH gleich der Menge der umgesetzten Glucose.

Die Quantifizierung fand im Mikrotiterplattenmaßstab statt. Die Proben wurden, je nach enthaltenem Glucosegehalt, unverdünnt oder in verschiedenen Verdünnungsstufen für die Glucosebestimmung eingesetzt. Als Referenz wurde eine Eichreihe mit bekannten Konzentrationen verwendet (1,5 mM, 1,2 mM, 0,9 mM, 0,6 mM, 0,3 mM und 0 mM Glucose). Die Verdünnungen und die Eichreihe wurden mit dH_2O angesetzt. Für die Messung wurde die Eichreihe im Triplikat in die Mikrotiterplatte pipettiert, die zu messenden Proben jeweils im Duplikat. Das Probenvolumen betrug 20 μl . Für den Start der Reaktion wurden 190 μl des Reaktionsmixes (0,75 M Triethanolamin, 10 mM Mg^{2+} , 1,1 mM NADP^+ , 8 mM ATP, pH 7,6, 2,1 u/ml HK, 2,1 u/ml G6P-DH) pro Vertiefung eingesetzt. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte abgedeckt und für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Absorptionmessung wurde in einem Mikrotiterplattenlesegerät (Infinite M200 Pro, Tecan, Männedorf, Schweiz) bei 340 nm durchgeführt. Abschließend konnte anhand der Eichreihe die Glucosekonzentration der Proben errechnet werden.

Tab. 17: Reaktionslösungen für die enzymatische Glucosebestimmung.

	Einwaage	Substanz	Konzentration	Konzentration im Assay
Reaktionspuffer (50 ml)	7,0 g	Triethanolamin hydrochlorid	0,75 M	0,25 M
	0,125 g	MgSO ₄ • 7 H ₂ O	10 mM	3,34 mM
	ad 40 ml	mit dH ₂ O		
		pH 7,6 mit NaOH einstellen		
	ad 50 ml	mit dH ₂ O		
Reaktionsmix (1 Mikrotiterplatte)	7 ml	Reaktionspuffer		
	12 ml	dH ₂ O		
	40 µl	HK/G6P-DH (je 1 u/µl)	je 2,1 u/ml	je 1,9 u/ml
	6 mg	NADP-Na ₂	1,1 mM	0,37 mM
	30 mg	ATP-Na ₂ H ₂	8 mM	2,67 mM

2.11.2. Enzymatische Formiatbestimmung

Ameisensäure ist die einfachste Carbonsäure. Das Enzym Formiat-Dehydrogenase koppelt die Oxidation der Säure an die Reduktion von NAD⁺ zu NADH + H⁺. Die bei der Reaktion gebildete Menge an NADH entspricht dabei der Menge an umgesetzten Formiat. NADH besitzt ein zusätzliches Absorptionsmaximum bei 340 nm, was für die photometrische Bestimmung der Formiatkonzentration genutzt wird.

Die Ermittlung der Formiatkonzentration erfolgte in Mikrotiterplatten unter Verwendung von Referenzwerten (1 mM, 0,8 mM, 0,6 mM, 0,4 mM, 0,2 mM und 0 mM Formiat). Proben wurden entsprechend verdünnt, um eine Absorption im Detektionsbereich innerhalb der Standardgerade zu erreichen. Das Probenvolumen betrug 20 µl pro Vertiefung. Der Probe wurden anschließend 190 µl der Reaktionslösung zugegeben (vgl. Tab. 18). Nach 20-30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur konnte die Extinktion bei 340 nm in einem Mikrotiterplattenlesegerät (Infinite M200 Pro, Tecan, Männedorf, Schweiz) gemessen werden.

Tab. 18: Verwendete Lösungen für die enzymatische Formiatbestimmung.

	Einwaage	Substanz	Konzentration	Konzentration im Assay
Lösung A	2,04 g	KH ₂ PO ₄	0,15 M	
	ad 100 ml	dH ₂ O		
Lösung B	3,42 g	K ₂ HPO ₄ • 3 H ₂ O	0,15 M	
	ad 100 ml	dH ₂ O		
Puffer	14 ml	Lösung A	0,15 M	50 mM
	86 ml	Lösung B	0,15 M	50 mM
	20 mg	Pyrazol	2,9 mM	1 mM
		pH 7,5 kontrollieren, evtl. mit Lösung A und B einstellen		
Reaktionslösung (pro Mikrotiterplatte)	7 ml	Puffer		
	90 mg	Na ₂ -NAD	7 mM	6,3 mM
	12 ml	dH ₂ O		
	50 µl	Formiat-DH (80 U/ml)	4 U/ml	3,6 U/ml

2.11.3. Enzymatische Glycerinbestimmung

Glycerin ist ein dreiwertiger Alkohol der enzymatisch bestimmt werden kann. Die Umsetzung des Glycerins erfolgte mit *Free Glycerol Reagent* (Sigma, St. Louis, USA) über gekoppelte Enzymreaktionen: In der ersten Reaktion wird Glycerin durch die Glycerokinase phosphoryliert. Das entstandene Glycerin-1-Phosphat dient als Substrat für die Glycerin-Phosphat Oxidase, wodurch Dihydroxyacetonphosphat und Wasserstoffperoxid entstehen. Eine abschließende Peroxidasereaktion koppelt das im Puffer enthaltene 4-Aminoantipyrin (4-AAP) und Natrium-*N-ethyl-N-(3-Sulfopropyl) m*-Anisidin (ESPA) mit dem Wasserstoffperoxid. Hierdurch entsteht eine Quinonimin-Färbung, die bei 540 nm photometrisch gemessen werden kann (siehe Abb. 12). Mitgeführte Referenzwerte (2,5 mM, 2 mM, 1,5 mM, 1 mM, 0,5 mM und 0 mM Glycerin) ermöglichten die Berechnung der im Medienüberstand enthaltenen Glycerinkonzentration. Die zu messenden Proben wurden wenn

nötig verdünnt, damit sich die Extinktion im Detektionsbereich der Referenzwerte befand. Es wurden 20 µl der Probe in eine Mikrotiterplatte gegeben und mit 180 µl der Reaktionslösung versetzt. Nach 15-20 Minuten konnte die Absorption gemessen werden.

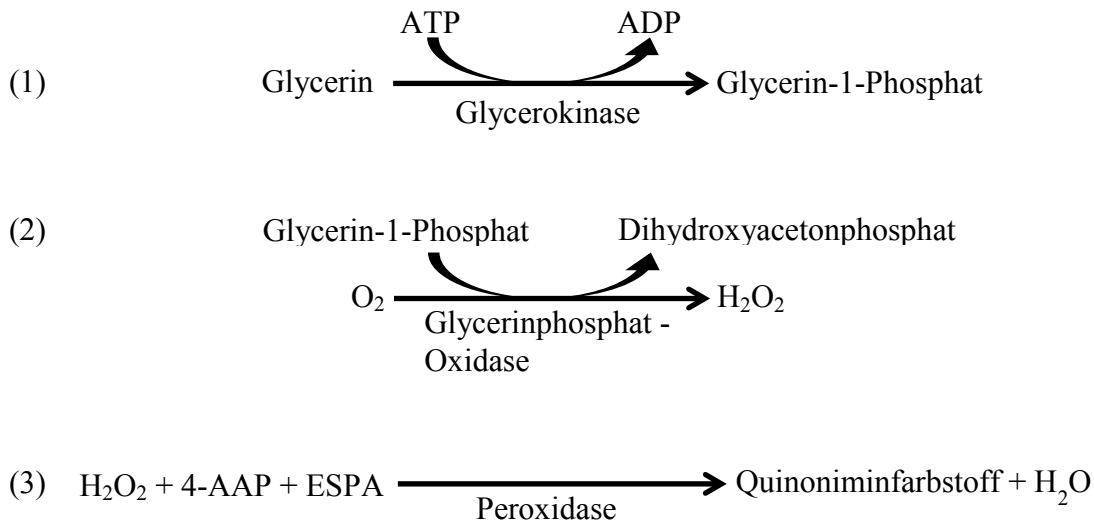


Abb. 12: Glycerin-Reaktionsschema.

Es sind die einzelnen Reaktionen dargestellt, die während der Glycerinbestimmung stattfinden. Zunächst wird das Glycerin durch die Umwandlung in Dihydroxyacetonphosphat aus der Reaktion entfernt (Reaktion 1 und 2). Dabei entsteht Wasserstoffperoxid, welches sich mit 4-Aminoantipyrin (4-AAP) und Natrium-*N-ethyl-N*-(3-Sulfopropyl) *m*-Anisidin (ESPA) zu dem Quinoniminfarbstoff verbindet (Reaktion 2 und 3). Dieser kann bei 540 nm photometrisch quantifiziert werden.

2.11.4. Quantifizierung organischer Säuren mittels HPLC

Für die Quantifizierung organischer Säuren (außer Formiat) wurde eine HPLC (High Performance Liquid Chromatographie, vgl. Tab. 19) verwendet. Bakterienproben wurden zunächst zentrifugiert (Tischzentrifuge, 14000 rpm, RT) und der Überstand anschließend mit Spritzenvorsatzfiltern (0,2 µm PTFE Membran, VWR International, Darmstadt) von mikroskopisch kleinen Partikeln gereinigt. Für die Messung der organischen Säuren wurden 10 µl 500 mM Schwefelsäure und 100 µl des Kulturüberstands vermischt und in die HPLC geladen. Die Ansäuerung des Mediums verhinderte eine Kontamination der Probe und einen damit verbundenen Verlust der zu messenden Substanzen. Das in der HPLC analysierte Probenvolumen betrug 90 µl. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte nach der externen Standard Methode, bei der anhand von Referenzwerten die Stoffkonzentration bestimmt

werden kann. Da Doppelbindungen der Carboxylgruppe bei 210 nm absorbieren, wurde bei dieser Wellenlänge die Extinktion bestimmt. In der verwendeten Säule (Aminex HPX-87H, Bio Rad, München) werden die Säuren anhand ihrer Größe und Ladung voneinander getrennt. Die Auftrennung erfolgte bei 60°C und einer Flussrate von 0,6 ml/min. Als Laufmittel diente Schwefelsäure (5 mM).

Tab. 19: Verwendetes HPLC-System.

Gerät	Verwendetes System
Detektor (DAD)	Elite La Chrome L-2455
Pumpe	Elite La Chrome L-2130
Autosampler	Elite La Chrome L-2200
Säulenofen	Elite La Chrome L-2300
Software	EZ Chrome Elite Version 3.3.2

2.11.5. Quantifizierung von Ethanol mittels GC

Ethanol wurde über Gaschromatographie (Clarus 480 Gas Chromatograph, PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA) bestimmt. Proben aus Wachstumsversuchen wurden zentrifugiert und der Überstand gefiltert (0,2 µm PTFE Membran, VWR International, Darmstadt). Insgesamt wurden mindestens 50 µl Probenvolumen in die GC-Probenröhrchen gefüllt. Davon sind 0,5 µl der Probe für die Analyse verwendet worden (die einzelnen Parameter sind in Tab. 20 aufgeführt). Die Bestimmung in den einzelnen Proben erfolgte nach der externen Standardmethode anhand einer Kalibrierungsgeraden. Für die Kalibrierung wurden Lösungen mit bekannter Alkoholkonzentration (10 mM, 7,5 mM, 5 mM, 2,5 mM und 0 mM Ethanol) im genutzten Medium verwendet.

Tab. 20: Parameter für die Alkoholbestimmung mittels GC.

Parameter	Einstellungen
System	Perkin Elmer, Clarus 480 Gas Chromatograph
Injektionsvolumen	0,5 µl
Injektor-Temperatur	150°C
Split	20:1
Säule	ZB-WAXplus (Phenomenex, Aschaffenburg)
Synthetische Luft	5,5 bar, entspricht ca. 450 ml/min
Stickstoff	Säulenanschluss Injektor: ca. 570 ml/min Säulenanschluss Detektor: 2,3 ml/min
Detektor	280°C
Ofentemperaturen	40°C für 5 Minuten Steigerung der Temperatur mit 5°C/min auf 150°C 150°C für 5 Minuten Steigerung der Temperatur mit 20°C/min auf 220°C 220°C für 5 Minuten
Software	EZ Chrome Elite Version 3.3.2

2.11.6. Quantifizierung von Acetoin durch die Voges-Proskauer-Reaktion

Die Bestimmung von Acetoin basiert auf der im Jahr 1898 entdeckten Reaktion von Acetoin mit Kreatin in alkalischem Medium durch Voges und Proskauer (1898), die zu einer Rotfärbung der Lösung führt. Die Reaktion dient in der so genannten „Bunten Reihe“ als Differenzierungsreaktion innerhalb der *Enterobacteriaceae*. Für die Bestimmung von Acetoin im Medienüberstand wurde die Methode auf einen Mikrotiterplattenmaßstab angepasst. Als Referenzwerte für die Messung dienten definierte Acetoinkonzentrationen (4 mM, 3,2 mM, 2,4 mM, 1,6 mM, 0,8 mM und 0 mM Acetoin) in einer Dreifachbestimmung. Die Proben wurden, sofern notwendig, verdünnt um Absorptionen im linearen Bereich der Kalbrierungsgeraden zu erhalten. Es sind 20 µl Probe pro Vertiefung eingesetzt worden. Anschließend wurden je 126 µl der Reaktionslösung (siehe Tab. 21) hinzupipettiert und die Reaktion mit 6 µl Barrittreagenz B (Sigma, St. Louis, USA) gestartet. Nach 20-30 Minuten

bei 37°C wurde die Absorption bei 490 nm gemessen (*iMark Microplate Reader* (BioRad, München)) und die Konzentration anhand der Kalibrierungswerte errechnet.

Tab. 21: Reaktionslösung für die Acetoin-Bestimmung und Reaktionsansatz.

	Einwaage	Substanz
Reaktionslösung (pro Vertiefung)	100 µl	dH ₂ O
	14 µl	L-Arginin (10 mg/ml)
	12 µl	Barrittreagenz A
Die Zugabe der Substanzen muss von oben nach unten erfolgen, da sich sonst ein weißer Niederschlag bildet und die Lösung nicht verwendbar ist.		
Reaktionsansatz (pro Vertiefung)	20 µl	Probe
	126 µl	Reaktionslösung
	6 µl	Barrittreagenz B (dient dem Start der Reaktion)

3. Ergebnisse

3.1. *E. coli*: Modifikationen des Zentralstoffwechsels

Ziel der Arbeit war die Modifikation des zentralen Kohlenstoff-Metabolismus von *E. coli* durch die gezielte Deletion von Genen der korrespondierenden Enzyme des Gärungsstoffwechsels. Dabei sollten die mutierten Stämme hinsichtlich ihres Wachstums mit verschiedenen Elektronenakzeptoren und der Akkumulation von Stoffwechselprodukten im Medienüberstand untersucht werden. Als Basis wurden der Wildtypstamm *E. coli* DH5 α (Lutz & Bujard, 1997) und die bereits existierende *frd*-Deletionsmutante JG11 (Gescher *et al.*, 2008) verwendet. Das *frd*-Gen codiert für die Fumaratreduktase und ist hauptverantwortlich für die Succinatproduktion während fermentativen Wachstums.

3.1.1. Wachstum und Stoffakkumulation des Wildtyps und der Mutante JG11

Das Wachstum des Wildtyps und der *frd*-Deletionsmutante JG11 wurde bei 30°C mit Sauerstoff, DMSO und Nitrat (anaerob) als Elektronenakzeptoren untersucht. Darüber hinaus sind fermentative Bedingungen gewählt worden. Neben der Wachstumskonstante wurde die Konzentration von akkumulierten Endprodukten, wie Lactat, Acetat, Succinat, Ethanol und Pyruvat bestimmt. Die jeweilige Wachstumskonstante μ ist in Abb. 13 dargestellt. Die Wachstumsrate in der Deletionsmutante war hierbei in allen Fällen leicht erhöht. So stieg das μ in Stamm JG11 unter aeroben Bedingungen auf $0,371 \pm 0,005 \text{ h}^{-1}$ (WT: $0,359 \pm 0,003 \text{ h}^{-1}$). Unter fermentativen Bedingungen (JG11 $0,338 \pm 0,003 \text{ h}^{-1}$, WT $0,307 \pm 0,001 \text{ h}^{-1}$) und bei anaerober Atmung mit DMSO als Elektronenakzeptor (JG11 $0,369 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$, WT $0,330 \pm 0,002 \text{ h}^{-1}$) war ebenfalls ein leichter Anstieg der Wachstumskonstante festzustellen. War Nitrat der Elektronenakzeptor konnte kein signifikanter Unterschied zwischen dem Wildtyp ($0,908 \pm 0,026 \text{ h}^{-1}$) und der *frd*-Deletionsmutante JG11 ($0,933 \pm 0,033 \text{ h}^{-1}$) gemessen werden.

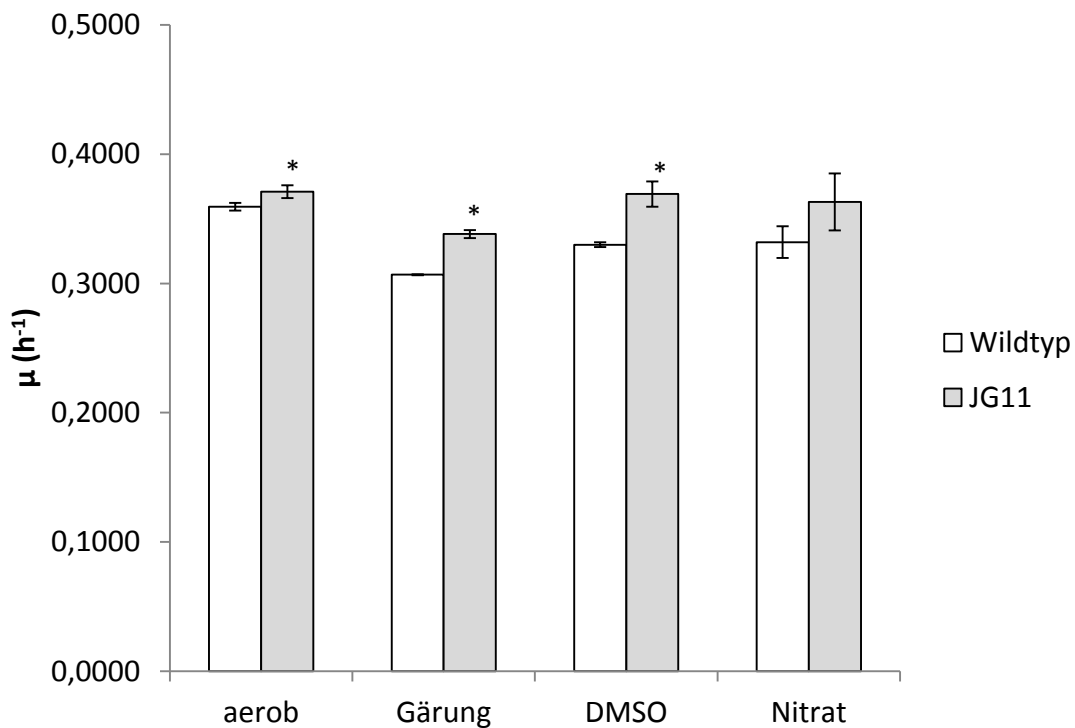


Abb. 13: Wachstumskonstante von *E. coli* DH5α und JG11.

Dargestellt sind die Wachstumskonstanten des Wildtyps und der *frd*-Deletionsmutante. Die Deletion der Fumaratreduktase bewirkt einen leichten Anstieg des Wachstums unabhängig von den verwendeten Wachstumsbedingungen. Dabei stehen die Bezeichnungen DMSO und Nitrat für anaerobe Inokulationsbedingungen mit dem entsprechenden Elektronenakzeptor. Die nach Welch-Test signifikanten Änderungen sind mit * markiert.

Weiterhin geht aus Tab. 22 hervor, dass die finale optische Dichte in beiden Stämmen vergleichbar war. Demnach wurde zwar die Wachstumsgeschwindigkeit an sich beeinflusst, die maximal erreichbare Zelldichte war davon jedoch nicht betroffen. Weiterhin wurde über einen Welch-Test die Signifikanz der unterschiedlichen Wachstumskonstanten im Vergleich zum Wildtyp getestet. Dieser zeigte, dass das aerobe Wachstum, das fermentative Wachstum und das Wachstum mit DMSO als Elektronenakzeptor signifikant unterschiedlich waren. Die finalen optischen Dichten waren bei anaerober Respiration etwas höher als unter aeroben bzw. fermentativen Bedingungen.

Tab. 22: Finale optische Zelldichten des Wildtyps und von JG11.

	O ₂	Gärung	DMSO	Nitrat
Wildtyp	2,498 ± 0,017	0,650 ± 0,000	0,838 ± 0,003	0,908 ± 0,026
JG11	2,403 ± 0,090	0,573 ± 0,024	0,875 ± 0,006	0,933 ± 0,033

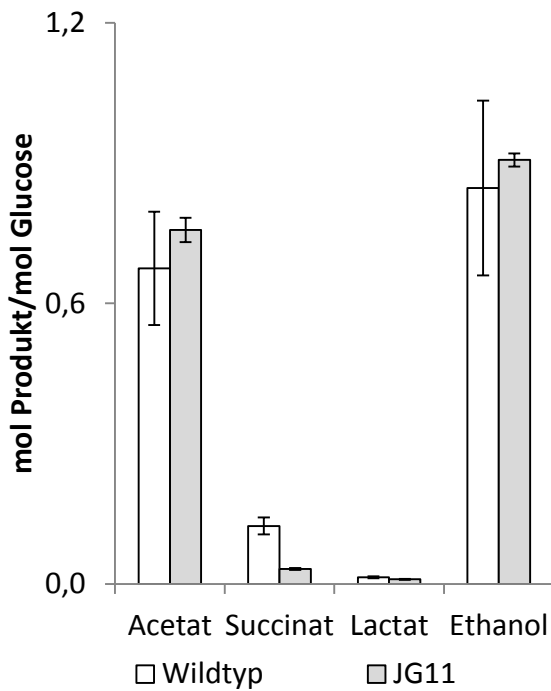
Die Analyse der anaerob sekretierten organischen Endprodukte (Abb. 14) zeigte, dass die Deletionsmutante unter fermentativen Bedingungen mit $0,032 \pm 0,002$ mol Succinat/mol konsumierter Glucose im Vergleich zum Wildtyp ($0,124 \pm 0,018$ mol Succinat / mol Glucose) eine deutlich verminderte Succinatproduktion aufwies. Ähnliche Ergebnisse konnten auch unter anaeroben, respirativen Bedingungen beobachtet werden. So produzierte JG11 mit DMSO als Elektronenakzeptor nur $0,064 \pm 0,013$ mol Succinat / mol Glucose im Vergleich zum Wildtyp ($0,152 \pm 0,01$ mol Succinat / mol Glucose). Auch mit Nitrat fiel die Succinatproduktion mit $0,081 \pm 0,011$ mol Succinat / mol Glucose geringer aus (WT $0,196 \pm 0,011$ mol Succinat / mol Glucose).

Die Produktion von Acetat konnte im Vergleich zum Wildtyp unter fermentativen Bedingungen (JG11 $0,757 \pm 0,026$ mol Acetat / mol Glucose; WT $0,675 \pm 0,121$ mol Acetat/mol Glucose) und mit DMSO als Elektronenakzeptor (JG 11 $0,908 \pm 0,045$ mol Acetat/mol Glucose; WT $0,839 \pm 0,055$ mol Acetat/mol Glucose) in der Tendenz leicht gesteigert werden. Mit Nitrat als Akzeptor blieb die Bildung von Acetat mit $0,651 \pm 0,065$ mol Acetat / mol Glucose in etwa auf dem Wert des Wildtyps ($0,707 \pm 0,057$ mol Acetat / mol Glucose).

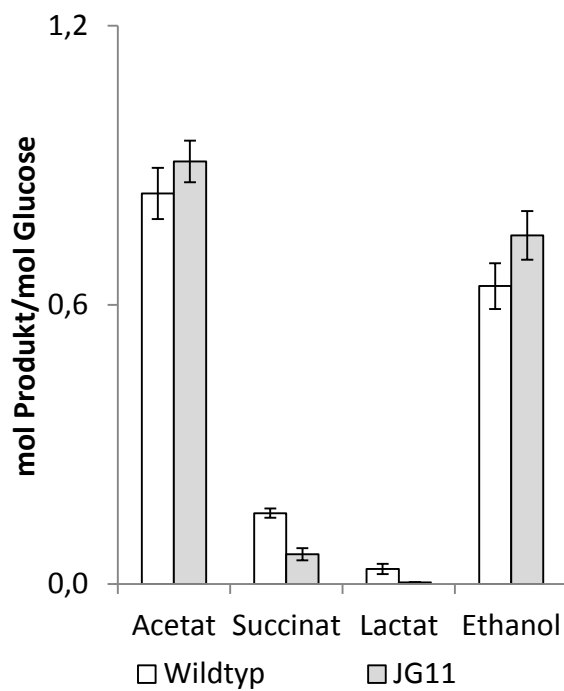
Die Lactatakkumulation war bei beiden untersuchten Stämmen recht ähnlich. So produzierte die Deletionsmutante unter fermentativen Bedingungen mit $0,01 \pm 0,001$ mol Lactat / mol Glucose fast die gleichen Menge an Lactat wie der Wildtyp ($0,014 \pm 0,002$ mol Lactat / mol Glucose). Mit DMSO als Elektronenakzeptor war die Lactatproduktion mit $0,003 \pm 0,001$ mol Lactat / mol Glucose etwas niedriger als die des Wildtyps ($0,032 \pm 0,011$ mol Lactat / mol Glucose). War Nitrat der Elektronenakzeptor, wurden im Wildtyp mit $0,075 \pm 0,019$ mol Lactat / mol Glucose und in JG11 mit $0,075 \pm 0,005$ mol Lactat / mol Glucose nur geringe Mengen an Milchsäure detektiert.

Weiterhin war die Produktion von Ethanol bei der Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp unter allen Bedingungen leicht erhöht. So lag die Ethanolproduktion unter fermentativen Bedingungen bei $0,907 \pm 0,014$ mol Ethanol / mol Glucose (JG11) bzw. $0,847 \pm 0,187$ mol Ethanol / mol Glucose (WT). Während des Wachstums mit DMSO als Elektronenakzeptor produzierte JG11 $0,749 \pm 0,052$ mol Ethanol / mol Glucose, wohingegen für den Wildtyp nur $0,64 \pm 0,049$ mol Ethanol / mol Glucose messbar waren. Im Falle von

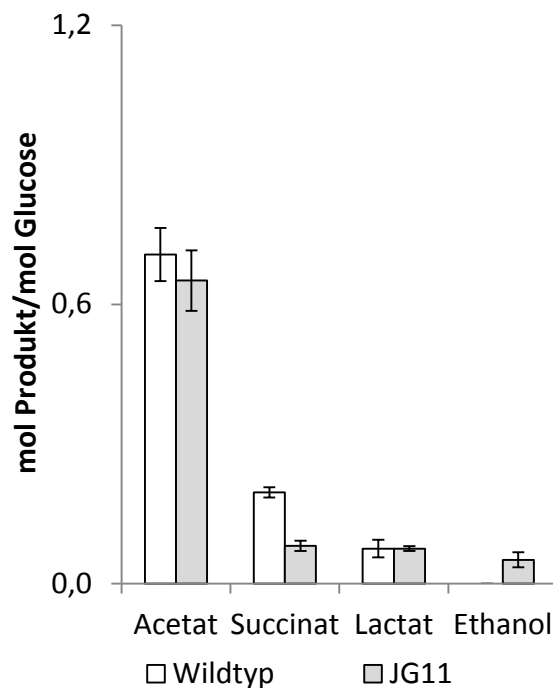
A) Fermentation



B) Anaerob - DMSO



C) Anaerob - Nitrat

**Abb. 14: Stoffakkumulation in den Stämmen DH5 α und JG11.**

Es ist die Stoffakkumulation der Produkte der gemischten Säuregärung im Wildtyp und der *frd*-Deletionsmutante JG11 unter verschiedenen Wachstumsbedingungen dargestellt. Es ist die Stoffmenge in mol pro mol verbrauchter Glucose angegeben. Die Deletion der Fumaratreduktase senkt die Menge an gebildetem Succinat. Die anderen Produkte werden in etwa zu gleichen Mengen gebildet. (A) fermentative Bedingungen, (B) anaerobe Atmung mit DMSO, (C) Anaerobe Atmung mit Nitrat.

Nitrat war die Ethanolproduktion insgesamt sehr niedrig und betrug nur $0,051 \pm 0,016$ mol Ethanol / mol Glucose für die Deletionsmutante, während im Wildtyp kein Ethanol detektiert wurde. Insgesamt waren Ethanol und Acetat unter diesen Bedingungen die häufigsten Gärprodukte. Weiterhin konnte keine Akkumulation organischer Säuren oder von Ethanol unter aeroben Bedingungen beobachtet werden.

Da Alkohol einen hohen Anteil an den produzierten Endprodukten hatte (fermentativ und mit DMSO zwischen 30 und 45% des theoretischen Maximums), wurde im nächsten Schritt die Alkoholdehydrogenase *adhE* deletiert und die erzeugte Mutante untersucht.

3.1.2. Charakterisierung der *E. coli* Doppelmutante *frd/adhE* (Stamm JG369)

Die Deletion der Alkoholdehydrogenase *adhE* wurde wie angegeben durchgeführt (siehe 2.10.2). Die Durchführung der Wachstumsversuche war zu der des Vorgängerstammes identisch. Die ermittelten Wachstumskonstanten sind in Abb. 15 dargestellt. Aus dem Graphen geht hervor, dass das aerobe Wachstum gesteigert wurde, während das anaerobe Wachstum geringer ausfiel. So konnte für die *frd/adhE*-Doppeldeletionsmutante JG369 unter aeroben Bedingungen eine Wachstumskonstante von $0,391 \pm 0,013 \text{ h}^{-1}$ bestimmt werden, die signifikant höher war als die des Wildtyps ($0,359 \pm 0,003 \text{ h}^{-1}$). Weiterhin konnte annähernd kein Wachstum unter fermentativen Bedingungen von JG369 ($\mu = 0,007 \pm 0,007 \text{ h}^{-1}$) im Gegensatz zum Wildtyp ($0,307 \pm 0,001 \text{ h}^{-1}$) detektiert werden. Die Wachstumskonstanten während anaerober Atmung mit DMSO (JG369 $0,057 \pm 0,001 \text{ h}^{-1}$; WT $0,330 \pm 0,002 \text{ h}^{-1}$) oder Nitrat (JG 369 $0,221 \pm 0,012 \text{ h}^{-1}$; WT $0,332 \pm 0,012 \text{ h}^{-1}$) waren signifikant niedriger als beim Wildtyp. In der Abbildung sind signifikante Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp markiert.

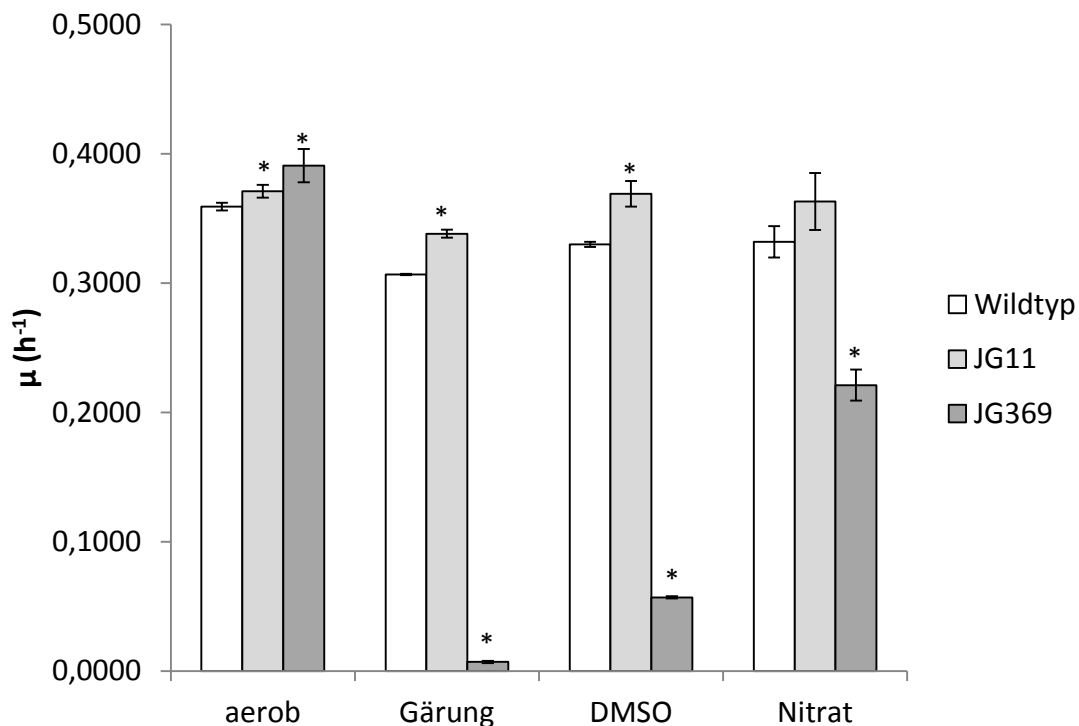


Abb. 15: Wachstumskonstanten WT, JG11 und JG369.

Dargestellt sind die Wachstumskonstanten von JG369 im Vergleich mit den beiden Vorgängerstämmen. Das aerobe Wachstum ist erhöht, während fermentatives Wachstum fast vollständig gestoppt ist. Das Wachstum während der anaeroben Respiration (DMSO und Nitrat als jeweiliger Elektronenakzeptor) ist stark verringert. Genotypen: JG11 (Δfrd) und JG369 ($\Delta frd adhE$). Mit * markierte Balken zeigen einen nach Welch-Test signifikanten Unterschied zum Wildtyp.

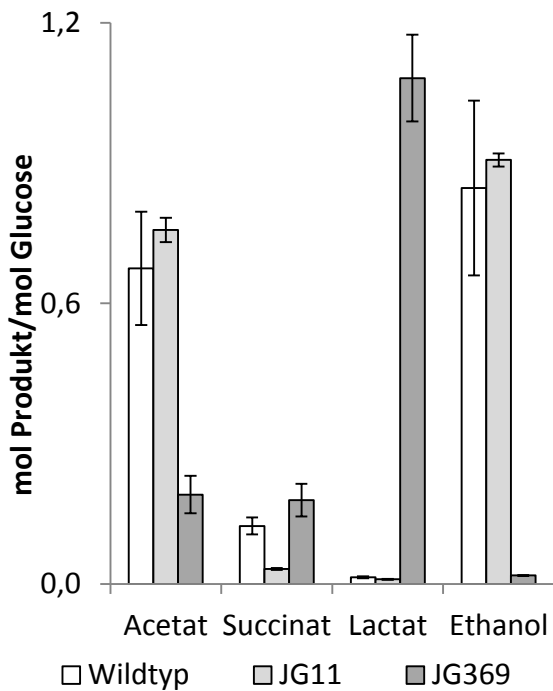
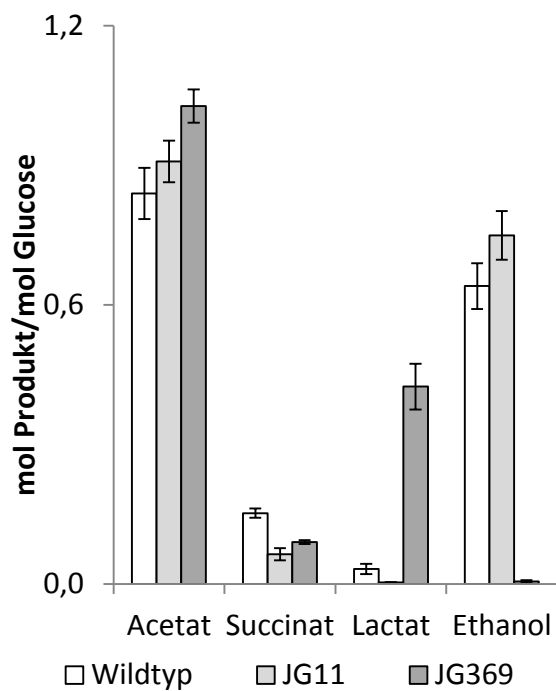
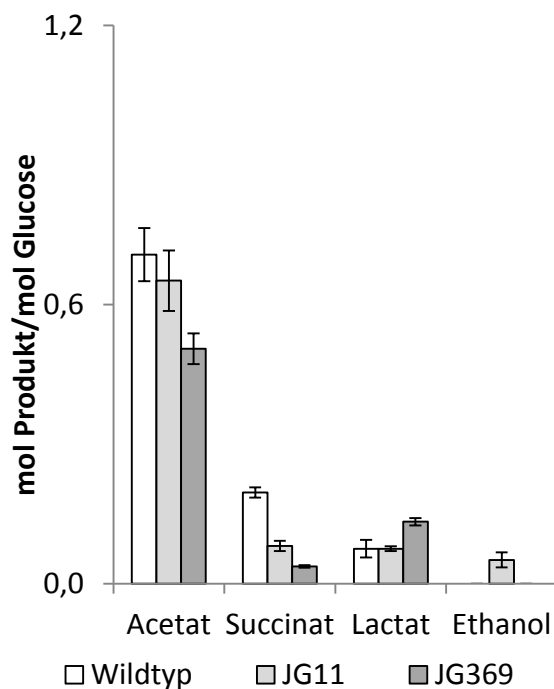
Der Einfluss auf das anaerob respiratorische Wachstum scheint abhängig vom energetischen Potential des Elektronenakzeptors zu sein: Die Verringerung ist bei Nitrat als terminalem Akzeptor schwächer als bei DMSO. Nitrat hat ein Redoxpotential von +420 mV, DMSO dagegen eines von +160 mV. Diese Tendenz zeigt sich auch in den erreichbaren finalen Zelldichten. In Tab. 23 sind die erreichten optischen Dichten von JG369 verglichen mit dem Wildtyp und JG11 dargestellt. Die Abnahme der finalen OD ist mit Elektronenakzeptoren hohen Potentials geringer als mit DMSO oder unter Gärungsbedingungen. Ist kein Elektronenakzeptor verfügbar ist eine nur geringe Zunahme der Zelldichte nachweisbar.

Tab. 23: Zelldichte am Ende des Versuchs von DH5 α , JG11 und JG369.

	O ₂	Gärung	DMSO	Nitrat
Wildtyp	2,498 ± 0,017	0,650 ± 0,000	0,838 ± 0,003	0,908 ± 0,026
JG11	2,403 ± 0,090	0,573 ± 0,024	0,875 ± 0,006	0,933 ± 0,033
JG369	2,340 ± 0,034	0,098 ± 0,003	0,547 ± 0,059	0,833 ± 0,026

Die Konzentrationsbestimmung von akkumulierten Endprodukten im Medium wurde anschließend durchgeführt (siehe Abb. 16). Pyruvat konnte in Stamm JG369, wie auch im Wildtyp, nicht detektiert werden. Darüber hinaus konnte unter aeroben Bedingungen keine Akkumulation von Endprodukten des Gärungsstoffwechsels gemessen werden. Succinat wurde bei fermentativen Wachstum in größeren Mengen ($0,179 \pm 0,035$ mol Succinat / mol Glucose) gebildet als im Wildtyp ($0,124 \pm 0,018$ mol Succinat / mol Glucose), obwohl die Fumaratreduktase *frd* deletiert war. Waren DMSO oder Nitrat als Elektronenakzeptoren zugegeben, produzierte JG369 (DMSO: $0,090 \pm 0,004$ mol Succinat / mol Glucose; Nitrat: $0,037 \pm 0,003$ mol Succinat / mol Glucose) im Vergleich zum Wildtyp (DMSO: $0,152 \pm 0,010$ mol Succinat / mol Glucose; Nitrat $0,196 \pm 0,011$ mol Succinat / mol Glucose) weniger Succinat. Erwartungsgemäß konnte die Produktion von Ethanol mit der Deletion von *adhE* in JG369 weitgehend unterbunden werden. So wurde unter aeroben und unter Bedingungen der anaeroben Atmung mit Nitrat kein Ethanol nachgewiesen, was der Situation im Wildtyp entsprach. Unter fermentativen Bedingungen und bei der anaeroben Atmung mit DMSO als Elektronenakzeptor wurden geringe Mengen an Ethanol gemessen. Fermentativ sind $0,018 \pm 0,001$ mol Ethanol / mol Glucose gebildet worden (WT: $0,847 \pm 0,187$ mol Ethanol / mol Glucose), und mit DMSO als Elektronenakzeptor $0,005 \pm 0,003$ mol Ethanol / mol Glucose (WT: $0,64 \pm 0,049$ mol Ethanol / mol Glucose).

Die Produktion von Acetat sank bei fermentativen Wachstum von $0,675 \pm 0,121$ mol Acetat / mol Glucose im Wildtyp auf $0,191 \pm 0,04$ mol Acetat / mol Glucose in JG369 ab. Eine Senkung der Acetatkonzentration konnte auch mit Nitrat als Elektronenakzeptor gemessen werden (WT $0,707 \pm 0,057$ mol Acetat / mol Glucose, JG369 $0,505 \pm 0,033$ mol Acetat / mol Glucose), während die Ausbeute mit DMSO als Elektronenakzeptor gesteigert werden konnte (WT $0,839 \pm 0,055$ mol Acetat / mol Glucose; JG369 $1,027 \pm 0,036$ mol Acetat / mol Glucose).

A) Fermentation**B) Anaerob - DMSO****C) Anaerob - Nitrat****Abb. 16: Anaerobe Stoffproduktion der Stämme DH5 α , JG11 und JG369.**

In der Abbildung sind die produzierten Gärungsendprodukte in mol/mol konsumierter Glucose dargestellt. Die Mutante JG369 bildet unter fermentativen Bedingungen (A) Lactat als Hauptgärprodukt. Die Produktion von Ethnaol wurde durch die Deletion der Alkoholdehydrogenase erfolgreich unterbunden. War DMSO (B) oder Nitrat (C) als Elektronenakzeptor im Medium enthalten, war Acetat das Hauptprodukt, Lactat die am zweithäufigsten gebildete Substanz. Genotypen: JG11 (Δfrd) und JG369 ($\Delta frd adhE$).

Demnach stieg die Ausbeute von Acetat auf 50%, bezogen auf die verwertete Glucose, mit DMSO als Elektronenakzeptor und sank auf 25% vom theoretischen Maximum, wenn Nitrat als Elektronenakzeptor verwendet wurde.

Die Produktion von Lactat konnte dagegen unter allen getesteten anaeroben Wachstumsbedingungen gesteigert werden. Unter fermentativen Bedingungen hat sich das Verhältnis der Produkte zum Lactat hin verschoben: Es wurden in JG369 $1,082 \pm 0,093$ mol Lactat / mol Glucose gebildet (WT $0,014 \pm 0,002$ mol Lactat / mol Glucose), was einer Ausbeute von über 50% entspricht. Lactat war damit das Hauptprodukt während fermentativen Wachstums. Auch unter respiratorischen Bedingungen mit DMSO (JG369 $0,424 \pm 0,049$ mol Lactat / mol Glucose; WT $0,032 \pm 0,011$ mol Lactat / mol Glucose) oder Nitrat (JG369 $0,133 \pm 0,049$ mol Lactat / mol Glucose; WT $0,075 \pm 0,011$ mol Lactat / mol Glucose) konnte die Lactatproduktion gesteigert werden (siehe Abb. 16).

Da sich Acetat in hohen Mengen im Medienüberstand anreicherte, war die Vermutung, dass sich die Ausbeute durch Deletion der löslichen Lactat-Dehydrogenase *ldhA* steigern lassen würde.

3.1.3. Deletion der löslichen Lactatdehydrogenase *ldhA* und Erweiterung des Substratspektrums (Stamm JG472)

Die Akkumulation von Milchsäure wird in *E. coli* hauptsächlich durch die lösliche Lactatdehydrogenase *ldhA* katalysiert, die Pyruvat unter Verbrauch von NADH reduziert. In dem in dieser Arbeit entwickelten Stamm katalysiert es gleichzeitig die letzte Gärungsreaktion, die für die Aufrechterhaltung des Redoxgleichgewichts verwendet werden kann. Die Deletion wurde wie in Kapitel 2.10.4 beschrieben durchgeführt. Als Selektionsmarker wurde das *csc*-Operon verwendet, welches in *E. coli* für die Saccharose-Verwertung benötigt wird. Durch die Deletion sollte demnach die Produktion von Lactat gestoppt und das Substratspektrum um das Disaccharid Saccharose erweitert werden. Die Charakterisierung der erzeugten Mutante JG472 ($\Delta frd adhE ldhA$) erfolgte analog zu den Vorgängerstämmen.

Die Wachstumskonstante von JG472 wurde durch die Deletion aerob noch einmal gesteigert (WT $0,359 \pm 0,003 \text{ h}^{-1}$; JG472 $0,452 \pm 0,004 \text{ h}^{-1}$). Der ermittelte Wert war 25% höher als der des Wildtyps, was eine signifikante Änderung der Wachstumskonstante darstellt. Wachstum unter Ausschluss von Sauerstoff und ohne terminalen Elektronenakzeptor war nicht mehr möglich. Wurde DMSO als Elektronenakzeptor zugesetzt, verringerte sich die Wachstumskonstante auf unter 10% des Wildtypstamms (WT $0,330 \pm 0,002 \text{ h}^{-1}$; JG472 $0,026 \pm 0,003 \text{ h}^{-1}$). Mit dem energetisch günstigeren Nitrat als Elektronenakzeptor entsprach die Wachstumskonstante der des Vorgängerstamms JG369, was ca. 70% des Wildtyp-Wertes entsprach (WT $0,332 \pm 0,012 \text{ h}^{-1}$; JG369 $0,221 \pm 0,012 \text{ h}^{-1}$; JG472 $0,236 \pm 0,003 \text{ h}^{-1}$). Die Wachstumskonstanten sind in Abb. 17 dargestellt.

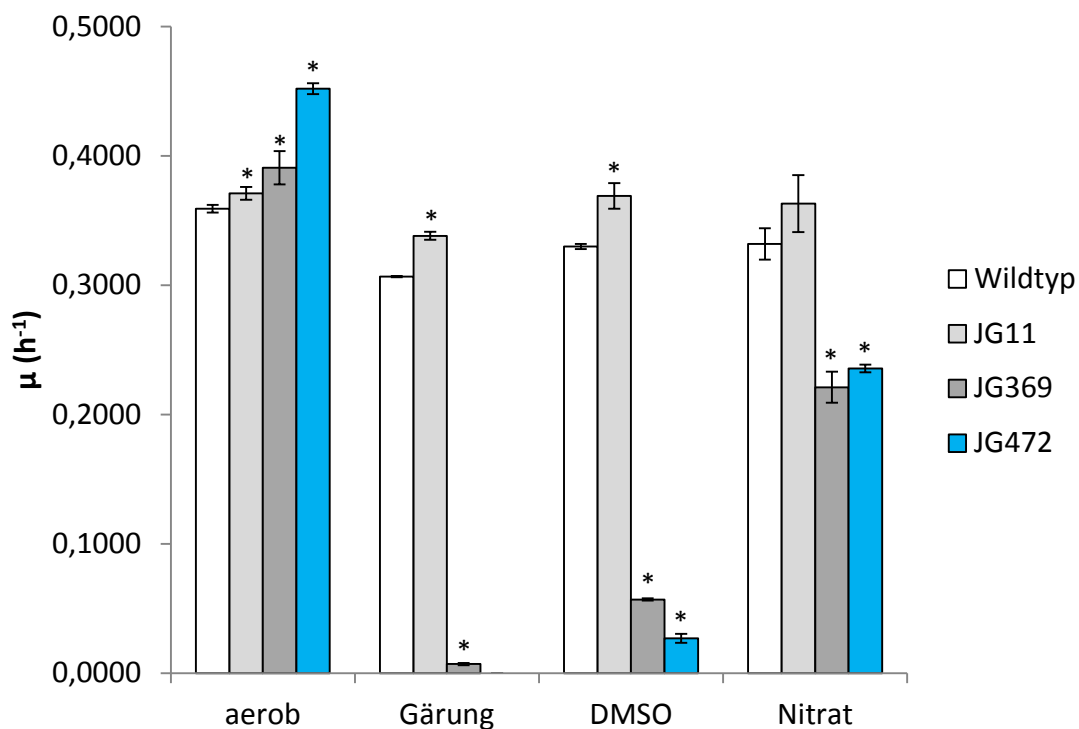


Abb. 17: Wachstumskonstanten der Stämme DH5 α , JG11, JG369 und JG472.

Das Wachstum von JG472 war anaerob ca. 25% höher als im Wildtypstamm. Fermentatives Wachstum war nicht mehr möglich und mit DMSO als Elektronenakzeptor auf 10% des Wildtypstamms gesunken. Die Deletion von *ldhA* hatte mit Nitrat als Elektronenakzeptor keinen weiteren Einfluss im Vergleich zum Stamm JG369. Genotypen: JG11 (Δfrd), JG369 ($\Delta frd adhE$) und JG472 ($\Delta frd adhE ldhA$). Die gekennzeichneten Balken (*) zeigen nach Welch-Test einen signifikanten Unterschied zum Wildtyp.

Die Insertion der *csc*-Gene ermöglicht dem Stamm JG472 nun auf Saccharose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle zu wachsen. Es wurde auf Minimalmedienplatten und anaerob in Laborflaschen mit DMSO als Elektronenakzeptor inokuliert. Dabei waren in den Flüssigkulturen Unterschiede zwischen dem Wachstum auf Saccharose oder Glucose

feststellbar: Die Wachstumskonstante war höher wenn Saccharose als Kohlenstoff- und Energiequelle verwendet wurde (JG472 Glucose $0,026 \pm 0,003 \text{ h}^{-1}$; JG472 Saccharose $0,048 \pm 0,004 \text{ h}^{-1}$). Der Wildtyp war nicht in der Lage Saccharose zu verwerten. Darüber hinaus waren die Stämme JG369 und JG472 weiterhin zu aeroben Wachstum mit Lactat als einziger Kohlenstoffquelle fähig. Allerdings war die Wachstumskonstante der *frd/adhE/ldhA*-Mutante JG472 geringer als beim Vorgängerstamm (JG369 $0,062 \pm 0,001 \text{ h}^{-1}$; JG472 $0,049 \pm 0,002 \text{ h}^{-1}$). Für die Nutzung von D- oder L-Lactat sind membrangebundene Lactatdehydrogenase, nicht die lösliche Dehydrogenase essentiell. Aus den Wachstumsraten in Minimalmedium mit Lactat lässt sich jedoch ein negativer Einfluss auf das Wachstum mit Lactat ablesen, wenn die lösliche Lactatdehydrogenase *ldhA* deletiert wurde.

Unterschiede bei der erreichten finalen optischen Dichte sind mit Sauerstoff oder Nitrat als Elektronenakzeptor nur marginal vorhanden. War DMSO als Akzeptor dem Medium zugesetzt, war die erreichte OD_{600} nur circa halb so hoch wie beim Wildtyp. Die Daten sind in Tab. 24 zusammengefasst.

Tab. 24: Zelldichte am Ende des Versuchs von DH5 α und den Mutanten.

	O ₂	Gärung	DMSO	Nitrat
Wildtyp	$2,498 \pm 0,017$	$0,650 \pm 0,000$	$0,838 \pm 0,003$	$0,908 \pm 0,026$
JG11	$2,403 \pm 0,090$	$0,573 \pm 0,024$	$0,875 \pm 0,006$	$0,933 \pm 0,033$
JG369	$2,340 \pm 0,034$	$0,098 \pm 0,003$	$0,547 \pm 0,059$	$0,833 \pm 0,026$
JG472	$2,348 \pm 0,057$	---	$0,439 \pm 0,052$	$0,916 \pm 0,026$

Anschließend wurde für JG472 eine Konzentrationsbestimmung von akkumulierten Endprodukten im Medium durchgeführt. Unter aeroben Wachstumsbedingungen wurden keine Endprodukte des Gärungsstoffwechsels im Medium akkumuliert. Die Produktion von Pyruvat konnte in geringen Mengen unter anaeroben Bedingungen nachgewiesen werden (anaerob mit DMSO: $0,037 \pm 0,025 \text{ mol Pyruvat / mol Glucose}$, anaerob mit Nitrat $0,018 \pm 0,008 \text{ mol Pyruvat / mol Glucose}$). Durch die Deletion von *ldhA* konnte die Produktion von Lactat fast vollständig unterbunden werden, dennoch waren noch geringe Mengen nachweisbar (aerob $0,017 \pm 0,002 \text{ mol Lactat / mol Glucose}$, anaerob mit DMSO $0,037 \pm 0,025 \text{ mol Lactat / mol Glucose}$, anaerob mit Nitrat $0,018 \pm 0,008 \text{ mol Lactat / mol Glucose}$). Succinat konnte in geringen Mengen nachgewiesen werden, wobei die erreichten Werte bei Wachstum mit DMSO (WT $0,152 \pm 0,01 \text{ mol Succinat / mol Glucose}$; JG472 $0,097 \pm 0,009 \text{ mol Succinat / mol Glucose}$) oder Nitrat (WT $0,196 \pm 0,011 \text{ mol Succinat / mol}$

Glucose; JG472 $0,059 \pm 0,009$ mol Succinat / mol Glucose) niedriger waren als im Wildtyp bestimmte Ausbeuten.

Im Gegensatz dazu wurde Acetat als Hauptprodukt ins Medium ausgeschieden. War DMSO als Elektronenakzeptor im Medium enthalten, stieg die Produktion von Acetat auf $1,504 \pm 0,047$ mol Acetat / mol Glucose (WT $0,839 \pm 0,055$ mol Acetat / mol Glucose), was einer Ausbeute von 75% des theoretischen Maximums entspricht. Wurde Nitrat als Elektronenakzeptor verwendet, entsprach die Ausbeute von $0,655 \pm 0,025$ mol Acetat / mol Glucose in etwa der des Wildtyps ($0,707 \pm 0,057$ mol Acetat/mol Glucose). Demnach konnte die Produktion von Acetat bei anaerober Respiration mit DMSO um 80% gesteigert werden. Im Gegensatz dazu blieb bei der Verwendung von Nitrat die Acetatproduktion konstant. In Abb. 18 ist die Zunahme von Acetat in mol / mol verbrauchter Glucose für alle Stämme zusammengefasst.

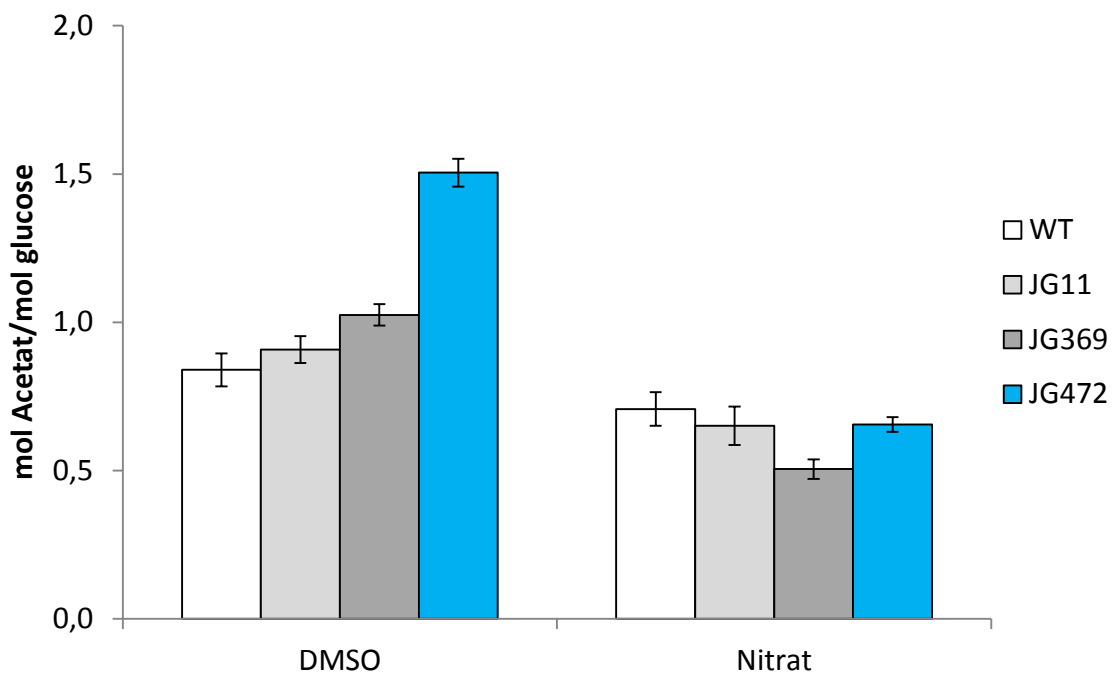


Abb. 18: Acetat-Akkumulation pro mol konsumierter Glucose.

Die Acetat-Produktion in mol pro mol verbrauchter Glucose ist angegeben. Mit DMSO als Elektronenakzeptor ist die Ausbeute auf einen Wert von 1,5 mol/mol gestiegen, was 75% des theoretischen Maximums entspricht. Ist Nitrat als Elektronenakzeptor verwendet worden, hat sich die Ausbeute von Acetat nicht verändert. Genotypen: JG11 (Δfrd), JG369 ($\Delta frd adhE$) und JG472 ($\Delta frd adhE ldhA$).

Acetat ist in der biotechnologischen Produktion von chemischen Verbindungen in der Regel ein unerwünschtes Nebenprodukt. Es wird durch die Aktivität der beiden Enzyme

Phosphotransacetylase und Acetatkinase (*pta-ack*) unter Bildung von einem Molekül ATP synthetisiert. Zur Reduktion der Bildung von Acetat, wurden im Folgenden die entsprechenden Gene deletiert.

3.1.4. Generierung eines Gärungsdefizienten *E. coli* Stamms

Die Acetat Knock-out Mutante JG806 wurde wie beschrieben generiert (siehe 2.10.6). Wie in den schon zuvor gezeigten Wachstumsexperimenten wurden die Wachstumskonstante und die Stoffakkumulation untersucht. Die Wachstumskonstanten sind in Abb. 19 zusammengefasst. Die erstellte vierfach-Deletionsmutante ($\Delta frd adhE ldhA pta-ack$) wies die geringsten Wachstumsraten aller getesteten Stämme auf. Sie war nicht in der Lage einen Gärungsstoffwechsel zu betreiben und zeigte unabhängig vom Elektronenakzeptor ein geringeres Wachstum als der Wildtyp. So war die anaerobe Wachstumskonstante auf $0,316 \pm 0,006 \text{ h}^{-1}$ im Vergleich zum Wildtyp ($0,359 \pm 0,003 \text{ h}^{-1}$) verringert. Bei anaeroben Wachstum mit DMSO als Elektronenakzeptor war nur ein sehr geringes Wachstum ($0,017 \pm 0,002 \text{ h}^{-1}$) nachweisbar, was etwa 5% des Wertes des Wildtyps ($0,330 \pm 0,002 \text{ h}^{-1}$) entsprach. Eine ebenfalls deutliche Verringerung der Wachstumskonstante konnte mit Nitrat als Elektronenakzeptor nachgewiesen werden (WT $0,332 \pm 0,012 \text{ h}^{-1}$; JG806 $0,037 \pm 0,002 \text{ h}^{-1}$), wobei der erreichte Wert etwa 10% des Wildtyp-Wertes entspricht.

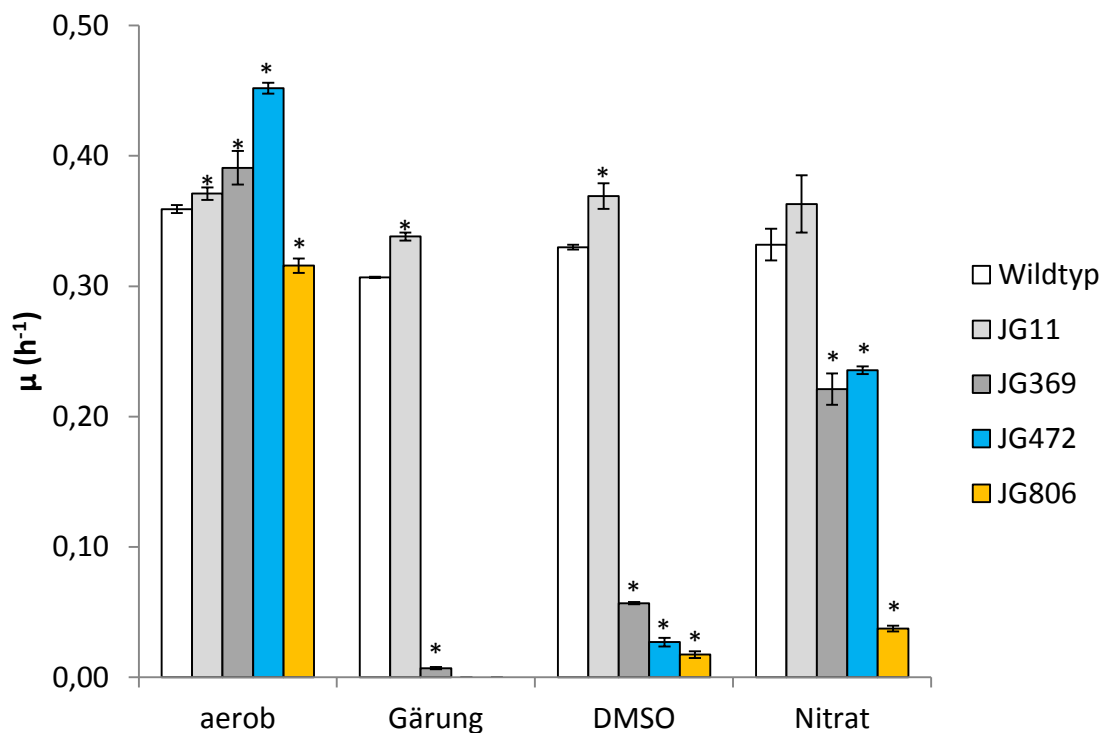


Abb. 19: Wachstumskonstanten der Stämme DH5α, JG11, JG369, JG472 und JG806.

Die Wachstumskonstante der Mutante JG806 ist im Vergleich mit den Vorgängerstämmen dargestellt. Sie zeigt die niedrigste Wachstumsrate von allen Stämmen bei allen getesteten Bedingungen. Wie bereits JG472 ist JG806 ebenfalls nicht in der Lage einen rein fermentativen Stoffwechsel zu betreiben. Genotypen: JG11 (Δfrd), JG369 ($\Delta frd adhE$), JG472 ($\Delta frd adhE ldhA$) und JG806 ($\Delta frd adhE ldhA pta-ack$). Balken, die mit einem Stern (*) markiert sind, zeigen nach einem Welch-Test im μ einen signifikanten Unterschied zum Wildtyp.

Die finale optische Dichte ist in Tab. 25 im Vergleich zum Wildtyp und den anderen Deletionsmutanten dargestellt. Unter aeroben Bedingungen erreicht Stamm JG806 nur die Hälfte der Zelldichte im Vergleich zum Wildtyp. Unter anaeroben respiratorischen Bedingungen wird eine Zelldichte von unter 20% des Wertes des Wildtyps erreicht.

Tab. 25: Zelldichte am Ende des Versuchs von DH5α und den Deletionsmutanten.

	O ₂	Gärung	DMSO	Nitrat
Wildtyp	2,498 ± 0,017	0,650 ± 0,000	0,838 ± 0,003	0,908 ± 0,026
JG11	2,403 ± 0,090	0,573 ± 0,024	0,875 ± 0,006	0,933 ± 0,033
JG369	2,340 ± 0,034	0,098 ± 0,003	0,547 ± 0,059	0,833 ± 0,026
JG472	2,348 ± 0,057	---	0,439 ± 0,052	0,916 ± 0,026
JG806	1,180 ± 0,042	---	0,134 ± 0,040	0,172 ± 0,041

Anschließend wurde für JG806 eine Konzentrationsbestimmung von akkumulierten Endprodukten im Medium durchgeführt. Die Acetatproduktion konnte hierbei unter anaeroben Bedingungen unterbunden werden. Unter aeroben Bedingungen ist Acetat mit einer Ausbeute von 15% basierend auf der konsumierten Glucose gemessen worden

($0,314 \pm 0,028$ mol Acetat / mol Glucose). Die anderen Produkte der gemischten Säuregärung, wie Lactat, Succinat und Ethanol, wurden nur in geringen Mengen nachgewiesen. Die Ausbeuten der genannten Produkte in JG806 waren 2,6% Succinat ($0,051 \pm 0,009$ mol Succinat / mol Glucose), 4,1% Lactat ($0,081 \pm 0,013$ mol Lactat / mol Glucose) und 2,4% Ethanol ($0,047 \pm 0,03$ mol Ethanol / mol Glucose), während im Wildtyp keine Produktion unter aeroben Bedingungen stattfand. Am Ende des Versuchs konnte Pyruvat im Medienüberstand mit einer Ausbeute von 22% ($0,445 \pm 0,063$ mol Pyruvat / mol Glucose) nachgewiesen werden. Pyruvat ist ein zentrales Stoffwechselfmolekül und Endprodukt der Glycolyse. Es ist Ausgangspunkt für die deletierten Gärungswege und wichtiger Verzweigungspunkt im zentralen Kohlenstoffmetabolismus. Da Pyruvat unter aeroben Bedingungen von *E. coli* abgebaut werden kann, lagen die gemessenen Ausbeuten bei anaeroben Bedingungen höher. So konnte während eines anaeroben, respiratorischen Wachstums Brenztraubensäure mit einer Ausbeute von 65% (DMSO $1,301 \pm 0,121$ mol Pyruvat / mol Glucose) und 70% (Nitrat $1,414 \pm 0,160$ mol Pyruvat / mol Glucose) des theoretischen Maximums im Medium nachgewiesen werden. Die Werte basieren darauf, dass maximal 2 mol Pyruvat pro mol konsumierter Glucose gebildet werden können. Endprodukte der gemischten Säuregärung liegen dagegen nur in geringen Mengen vor (vgl. Tab. 28): Acetat (DMSO $0,058 \pm 0,006$ mol Acetat / mol Glucose; Nitrat $0,087 \pm 0,039$ mol Acetat / mol Glucose), Succinat (DMSO $0,053 \pm 0,012$ mol Succinat / mol Glucose; Nitrat $0,023 \pm 0,023$ mol Succinat / mol Glucose), Lactat (DMSO $0,026 \pm 0,003$ mol Lactat / mol Glucose; Nitrat $0,075 \pm 0,044$ mol Lactat / mol Glucose) und Ethanol (DMSO $0,032 \pm 0,009$ mol Ethanol / mol Glucose; Nitrat $0,001 \pm 0,001$ mol Ethanol / mol Glucose) werden demnach kaum produziert.

Die anaerobe Pyruvatakkumulation ist in Abb. 20 dargestellt. Da *E. coli* in der Lage ist, das sekretierte Pyruvat bei verfügbarem Sauerstoff wieder zu verwerten, werden in dem Diagramm nur die anaeroben Daten von Stamm JG806 wiedergegeben.

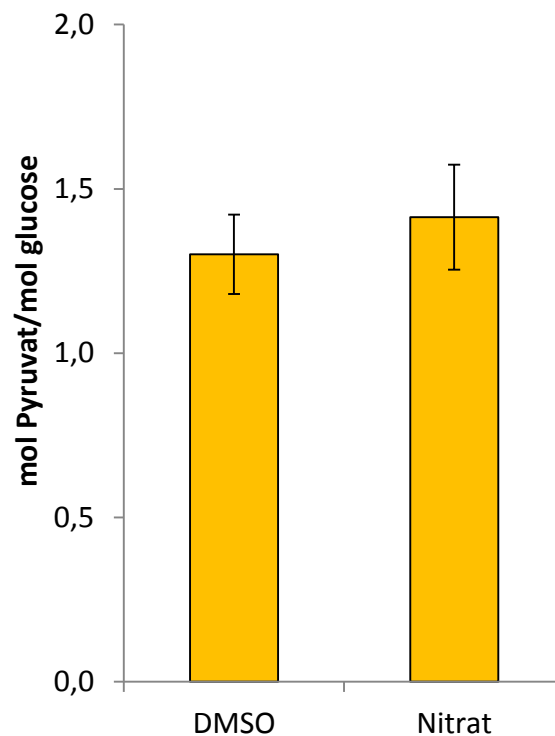


Abb. 20: Pyruvatproduktion mol/mol verbrauchter Glucose in JG806.

Pyruvat wird nur in der Mutante JG806 ($\Delta frd adhE ldhA pta-ack$) und unabhängig vom verwendeten Elektronenakzeptor in großen Mengen gebildet. Die Ausbeute beträgt 65% (DMSO) bzw. 70% (Nitrat) vom theoretischen Maximum.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war es, für eine mögliche Anwendung in einer mikrobiellen Brennstoffzelle den Zentralstoffwechsel anaerob durch den Zitronensäurezyklus zu leiten. Auf diese Weise sollte eine möglichst hohe Anzahl an Elektronen entstehen, die dann auf einen regenerativen Elektronenakzeptor, eine Anode, übertragen werden können. Nach der Arbeit von Prohl et al. (1998) lenkt *E. coli* unter anaerober Atmung mit Nitrat den Kohlenstoffmetabolismus durch den Zitronensäurezyklus, wenn der Regulator *Arca* (*anaerobic respiration control*) deletiert ist. Aus diesem Grund wurde das Gen *arca* im Folgenden deletiert.

3.1.5. Deletion von *arca* (*anaerobic respiration control*)

Die Deletion von *arca* erfolgte in den Stämmen JG472 und JG806, die Acetat oder Pyruvat ins Medium sekretieren, wie bereits beschrieben (siehe 2.10.10). Sie bewirkte, dass die neu generierten Stämme JG648 (aus JG472) und JG808 (aus JG806) nicht mehr unter Ausschluss von Sauerstoff wachsen konnten. Verglichen mit dem Wildtyp war die aerobe

Wachstumskonstante bei den beiden Stämmen ähnlich (WT $0,359 \pm 0,003 \text{ h}^{-1}$; JG648 $0,361 \pm 0,017 \text{ h}^{-1}$; JG808 $0,355 \pm 0,008 \text{ h}^{-1}$) und die finale optische Dichte verringert. Die Wachstumskonstanten der beiden Stämme im Vergleich mit dem Wildtyp und ihren jeweiligen Vorgängerstämmen sind in Abb. 21 dargestellt, die erreichten optischen Dichten in Tab. 26 zusammengefasst.

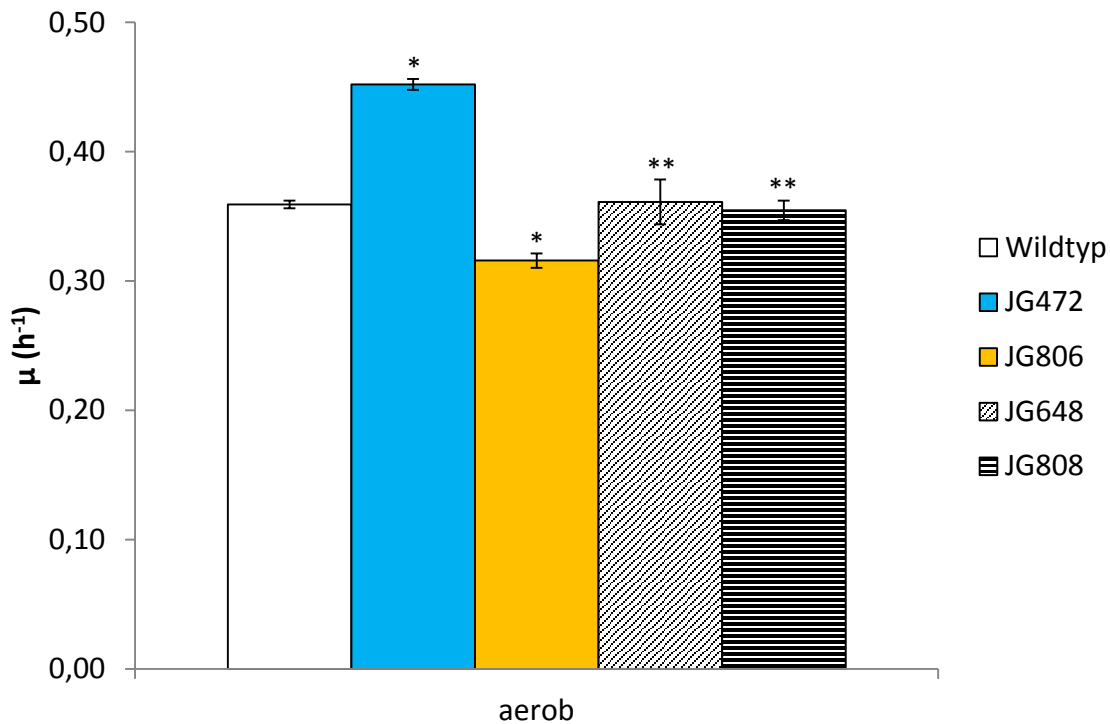


Abb. 21: Aerobe Wachstumskonstanten der $\Delta arcA$ -Mutanten.

Das Wachstum der *arcA*-Deletionsmutanten ist auf das Niveau des Wildtyps erhöht (JG808 im Vergleich zu JG806) oder erniedrigt (JG648 im Vergleich zu JG472) worden. Die Mutanten sind nicht mehr zu anaeroben Wachstum mit DMSO oder Nitrat in der Lage. Genotypen: JG472 ($\Delta frd adhE ldhA$), JG648 ($\Delta frd adhE ldhA arcA$), JG806 ($\Delta frd adhE ldhA pta-ack$) und JG808 ($\Delta frd adhE ldhA pta-ack arcA$). Balken, die mit einem Stern markiert sind (*) zeigen nach Welch-Test einen signifikanten Unterschied zum Wildtyp. Sind die Balken mit einem Doppelstern (**) markiert, zeigt das Wachstum nach Welch-Test einen signifikanten Unterschied zum jeweiligen Vorgängerstamm (JG472 \rightarrow JG648 und JG806 \rightarrow JG 808), während die Nullhypothese zum Wildtyp nicht widerlegt werden konnte.

Die beiden *arcA*-Deletionsstämme erreichten, unabhängig vom Vorgängerstamm, die gleiche finale OD_{600} und waren nicht in der Lage unter anaeroben Bedingungen zu wachsen. Eine Stoffakkumulation im Medienüberstand konnte nicht detektiert werden.

Tab. 26: Finale Zelldichte der *arcA*-Mutanten und ihrer Vorgängerstämme.

	O ₂	Gärung	DMSO	Nitrat
Wildtyp	2,498 ± 0,017	0,650 ± 0,000	0,838 ± 0,003	0,908 ± 0,026
JG472	2,348 ± 0,057	---	0,439 ± 0,052	0,916 ± 0,026
JG648	1,880 ± 0,042	---	---	---
JG806	1,180 ± 0,042	---	0,134 ± 0,040	0,172 ± 0,041
JG808	1,848 ± 0,054	---	---	---

Der zusätzliche Knock-out von *arcA* beseitigte die aerobe Pyruvatakkumulation von Stamm JG806 und normalisierte die aerobe Wachstumsrate auf den Wert des Wildtypstamms. Die finale optische Dichte war jedoch auf ca. $\frac{2}{3}$ des Wildtypstammes verringert. Die Ergebnisse aller untersuchten Mutanten sind im folgenden Kapitel noch einmal zusammengefasst.

3.1.6. Zusammenfassung von Wachstumsverhalten und Stoffakkumulation der *E. coli* Mutanten

In Tab. 27 und Tab. 28 sind die finale optische Dichten, die Wachstumskonstanten (h^{-1}) und die akkumulierten Endprodukte zusammengefasst. Letztere gibt den Stoffumsatz in mol pro mol konsumierter Glucose an. Basierend darauf ist die Ausbeute auf das theoretische Maximum bezogen. Dabei können pro Molekül Glucose maximal je 2 Moleküle Pyruvat, Lactat, Formiat, Ethanol, Succinat oder Acetat gebildet werden. Sind die Stämme nicht mehr in der Lage zu wachsen, sind die entsprechenden Bereiche durch ein „--“ ausgefüllt. Die ermittelten pH-Veränderungen sind als Differenzwert in Tab. 29 zusammengefasst.

Tab. 29: Ermittelte Differenz des pH-Wertes am Ende der Kultivierung.

Stamm	O ₂	Gärung	DMSO	NO ₃
Wildtyp	-0,11 ± 0,01	-0,32 ± 0,03	-0,30 ± 0,02	-0,38 ± 0,02
JG11	-0,11 ± 0,01	-0,32 ± 0,01	-0,25 ± 0,05	-0,07 ± 0,02
JG369	-0,11 ± 0,01	<i>-0,10 ± 0,01</i>	<u>-0,42 ± 0,03</u>	<u>-0,44 ± 0,03</u>
JG472	-0,11 ± 0,01	<i>-0,02 ± 0,02</i>	<u>-0,39 ± 0,07</u>	<u>-0,40 ± 0,09</u>
JG648	-0,10 ± 0,01	<i>-0,04 ± 0,01</i>	<i>-0,02 ± 0,01</i>	<i>-0,05 ± 0,01</i>
JG806	<u>-0,42 ± 0,04</u>	<i>-0,03 ± 0,01</i>	<u>-0,34 ± 0,05</u>	<u>-0,25 ± 0,06</u>
JG808	-0,10 ± 0,05	<i>-0,01 ± 0,01</i>	<i>-0,01 ± 0,01</i>	<i>-0,12 ± 0,12</i>

Der pH-Wert veränderte sich in der Tendenz immer zum saureren Milieu hin. Auffällig ist, dass bei aerober Kultivierung der pH-Wert immer um den gleichen Wert sank, mit der Ausnahme von Stamm JG806, der Pyruvat akkumulierte. Erwartungsgemäß nur kleine Veränderungen zeigen die pH-Werte bei Stämmen, die kein Wachstum zeigten (kursiv). Die unterstrichenen pH-Änderungen betreffen Stämme, die bei den angegebenen Bedingungen viel Acetat (JG369 und JG472) oder Pyruvat (JG806) ins Medium abgegeben haben. Die Anreicherung von Acetat oder Pyruvat senkt den pH-Wert deutlich.

3.2. Acetoinproduktion im Stamm JG806

Die Produktion von Acetoin startet mit zwei Pyruvatmolekülen, die durch die frei werdende Energie einer Carboxylierungsreaktion miteinander kondensiert werden. Eine zweite Decarboxylierung von Acetolactat führt zur Synthese von Acetoin (vgl. Abb. 3). Da der Stamm JG806 (*Δfrd adhE ldhA pta-ack*) Pyruvat in hohen Mengen im Medium akkumuliert, wurde er mit einem Plasmid, welches die Gene *alsS* und *alsD* aus *Bacillus subtilis* unter der Kontrolle eines IPTG induzierbaren Promoters enthält, transformiert. Die Gene codieren für die Acetolactat-Synthase (*alsS*) und die Acetolactat-Decarboxylase (*alsD*), die letztendlich die Bildung von Acetoin aus zwei Molekülen Pyruvat katalysieren. Dabei werden zwei CO₂-Moleküle freigesetzt. Das Plasmid ist wie beschrieben kloniert (siehe 2.7.8) und in den Stamm eingebracht worden. Anschließend wurde analog zu den vorher durchgeführten Wachstumsversuchen der erzeugte Stamm (JG806/Acetoin) auf Acetoinproduktion getestet. Die Induktion fand dabei zu Beginn der Inokulation statt. Für die Produktion waren anaerobe Bedingungen mit DMSO und Nitrat als Elektronenakzeptoren gewählt worden. Der Plasmid

tragende Wildtyp (WT/Acetoin) erreichte im Vergleich mit dem nicht transformierten Wildtyp eine geringere finale optische Dichte, wenn DMSO als Elektronenakzeptor verwendet wurde. War Nitrat der Elektronenakzeptor konnte kein Unterschied zwischen transformierten und nicht transformierten Wildtypstamm bei der finalen optischen Dichte festgestellt werden (DMSO: Wildtyp $0,838 \pm 0,003$; Wildtyp/Acetoin $0,668 \pm 0,102$; Nitrat: Wildtyp $0,908 \pm 0,026$; Wildtyp/Acetoin $0,906 \pm 0,032$). Im Gegensatz dazu sind die erreichte finale Zelldichte in JG806/Acetoin höher als bei JG806 (DMSO: JG806 $0,134 \pm 0,04$; JG806/Acetoin $0,286 \pm 0,111$; Nitrat: JG806 $0,172 \pm 0,041$; JG806/Acetoin $0,346 \pm 0,085$). Mit DMSO als terminalen Elektronenakzeptor konnte fast keine Biomassezunahme bei Stamm JG806/Acetoin gemessen werden. Ein Vergleich mit dem nicht transformierten Stamm ist aufgrund der fünffach höheren Start-OD während der Acetoinproduktion nicht möglich. Die höhere OD musste gewählt werden, da ansonsten keine ausreichende Umsetzung der Glucose stattfand. Die Daten der Acetoinproduktion sind in Tab. 30 zusammengestellt.

Tab. 30: Finale Zelldichte und Wachstumskonstante bei der Acetoinproduktion.

	Wildtyp (DMSO) [#]	Wildtyp (NO ₃) [#]	JG806 (DMSO) [#]	JG806 (NO ₃) [#]
Wachstumskonstante μ	$0,067 \pm 0,021$	$0,231 \pm 0,004$	$0,008 \pm 0,005$	$0,033 \pm 0,008$
Finale OD	$0,668 \pm 0,102$	$0,906 \pm 0,032$	$0,286 \pm 0,111$	$0,346 \pm 0,085$

[#]: Angegeben ist der verwendete Elektronenakzeptor unter anaeroben Bedingungen. Der Wildtyp und der Stamm JG806 wurden nur unter Bedingungen der anaeroben Atmung mit DMSO oder NO₃ in M9-Minimalmedium getestet, da Stamm JG806 nicht fermentativ wachsen kann.

Bei der Bestimmung von Produkten der gemischten Säuregärung, konnten bei der Mutante nur geringe Mengen der Nebenprodukte nachgewiesen werden. Die höchsten Produktmengen waren für Succinat (DMSO: $0,080 \pm 0,037$ mol Succinat / mol Glucose; Nitrat: $0,077 \pm 0,023$ mol Succinat / mol Glucose) und für Ethanol (DMSO: $0,118 \pm 0,028$ mol Ethanol / mol Glucose; Nitrat: $0,045 \pm 0,005$ mol Ethanol / mol Glucose) nachweisbar. Weiterhin wurde kein Pyruvat ins Medium sekretiert.

Die Nebenproduktbildung im Wildtyp während der Acetoin-Produktion entsprach in etwa den Werten ohne Plasmid. War DMSO als Elektronenakzeptor im Medium enthalten, wurde die Produktion von Lactat (WT: $0,032 \pm 0,011$ mol Lactat / mol Glucose; WT/Acetoin: $0,013 \pm 0,010$ mol Lactat / mol Glucose), Acetat (WT: $0,839 \pm 0,055$ mol Acetat / mol

Glucose; WT/Acetoin: $0,354 \pm 0,167$ mol Acetat / mol Glucose) und Succinat (WT: $0,152 \pm 0,010$ mol Succinat / mol Glucose; WT/Acetoin: $0,103 \pm 0,013$ mol Succinat / mol Glucose) verringert, während gleiche Mengen Ethanol (WT: $0,640 \pm 0,049$ mol Ethanol / mol Glucose; WT/Acetoin: $0,663 \pm 0,052$ mol Ethanol / mol Glucose) gebildet worden sind.

Wurde Nitrat als Elektronenakzeptor zugesetzt, wurde die Produktion von Succinat (WT: $0,196 \pm 0,011$ mol Succinat / mol Glucose; WT/Acetoin: $0,110 \pm 0,021$ mol Succinat / mol Glucose) und Lactat (WT: $0,075 \pm 0,019$ mol Lactat / mol Glucose; WT/Acetoin: $0,006 \pm 0,003$ mol Lactat / mol Glucose) gesenkt, die von Acetat (WT: $0,707 \pm 0,057$ mol Acetat / mol Glucose; WT/Acetoin: $1,005 \pm 0,062$ mol Acetat / mol Glucose) und Ethanol (WT: nicht detektierbar; WT/Acetoin: $0,136 \pm 0,027$ mol Ethanol / mol Glucose) leicht gesteigert. Die veränderten Produktionen der Endprodukte des Gärungsstoffwechsels sind vermutlich auf den Verbrauch von Pyruvat während der Acetoinproduktion zurückzuführen.

Die Acetoinproduktion konnte im Vergleich zum Wildtyp verdoppelt (DMSO) bzw. verdreifacht (Nitrat) werden. So wurde während der anaeroben Atmung mit DMSO vom Wildtyp $0,298 \pm 0,027$ mol Acetoin / mol Glucose hergestellt, während in der Mutante $0,582 \pm 0,027$ mol Acetoin / mol Glucose produziert wurden. War Nitrat der Elektronenakzeptor, wurden von JG806/Acetoin $0,898 \pm 0,059$ mol Acetoin / mol Glucose produziert (WT: $0,278 \pm 0,040$ mol Acetoin / mol Glucose). Die Acetoinproduktion ist in Abb. 22 dargestellt.

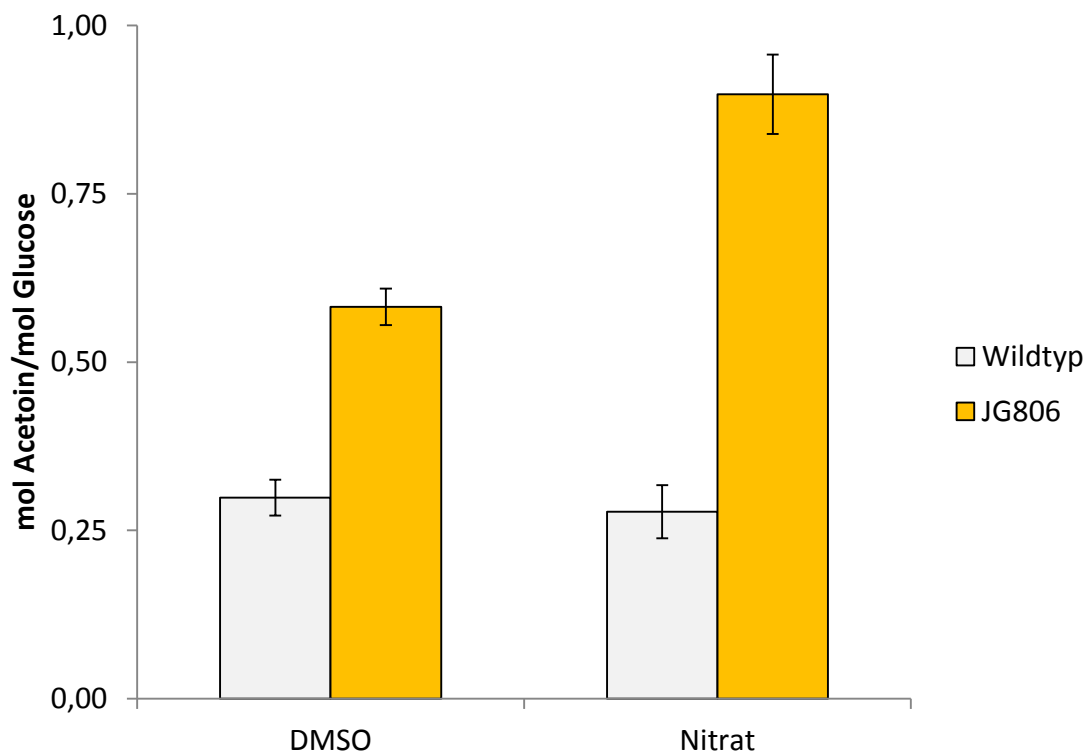


Abb. 22: Acetoinproduktion im Wildtyp und in JG806.

Gezeigt ist das Verhältnis von gebildetem Acetoin in mol zu konsumierter Glucose in mol. Die erreichten Ausbeuten im Wildtyp betragen unabhängig vom Elektronenakzeptor ca. 30%. In der Mutante wurden 58% (DMSO) und 90% (Nitrat) der Glucose zu Acetoin umgesetzt. Genotyp JG806: $\Delta frd adhE ldhA pta-ack$.

Insgesamt konnten die Hälfte bis zwei Drittel des Kohlenstoffs aus der Glucose in den gemessenen Endprodukten nachgewiesen werden. Bei der Produktion von einem Molekül Acetoin entstehen zwei Moleküle Kohlendioxid. Somit ist der nicht in den Endprodukten nachgewiesene Kohlenstoff als Kohlendioxid entwichen oder für die Bildung von Biomasse verwendet worden. Die Kohlenstoffbilanz mit und ohne Einberechnung des aus der Acetoinproduktion entstandenen CO_2 ist für die transformierten Stämme in Tab. 31 zusammengefasst. Dabei wurden die produzierten Endprodukte in mol Produkt / mol konsumierter Glucose angegeben.

Tab. 31: Kohlenstoffbilanz bei der Acetoinproduktion im Wildtyp und in JG806.

Stoff	Stamm	Wildtyp	Wildtyp	JG806	JG806
		(DMSO) [#]	(NO ₃) [#]	(DMSO) [#]	(NO ₃) [#]
Pyruvat	mol/mol	0,000 ± 0,0	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
	Aubeute %	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Acetat	mol/mol	0,354 ± 0,167	1,005 ± 0,062	0,014 ± 0,014	0,000 ± 0,000
	Aubeute %	17,7 ± 8,4	50,3 ± 3,1	0,7 ± 0,7	0,0 ± 0,0
Succinat	mol/mol	0,103 ± 0,013	0,110 ± 0,021	0,080 ± 0,037	0,077 ± 0,023
	Aubeute %	5,2 ± 0,7	5,5 ± 1,1	4,0 ± 1,7	3,9 ± 1,2
Lactat	mol/mol	0,013 ± 0,010	0,006 ± 0,003	0,000 ± 0,000	0,024 ± 0,011
	Aubeute %	0,7 ± 0,5	0,3 ± 0,2	0,0 ± 0,0	1,2 ± 0,6
Formiat	mol/mol	0,104 ± 0,104	0,014 ± 0,012	0,004 ± 0,002	0,002 ± 0,002
	Aubeute %	5,2 ± 5,2	0,7 ± 0,6	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1
Ethanol	mol/mol	0,663 ± 0,052	0,136 ± 0,027	0,118 ± 0,028	0,045 ± 0,005
	Aubeute %	33,2 ± 2,6	6,8 ± 1,4	5,9 ± 1,4	2,3 ± 0,3
Acetoin	mol/mol	0,298 ± 0,027	0,278 ± 0,040	0,582 ± 0,027	0,898 ± 0,059
	Aubeute %	29,8 ± 2,7	27,8 ± 4,0	58,2 ± 2,7	89,8 ± 5,9
C-Bilanz in % ohne CO ₂		63,1 ± 5,1	64,4 ± 3,7	48,6 ± 1,6	67,7 ± 5,6
C-Bilanz in % mit CO ₂		72,9 ± 5,2	73,7 ± 4,4	68,1 ± 1,3	97,6 ± 7,5

[#]: Angeben ist der verwendete Elektronenakzeptor unter anaeroben Bedingungen. Der Wildtyp und der Stamm JG806 wurden nur unter Bedingungen der anaeroben Atmung mit DMSO oder NO₃ getestet, da Stamm JG806 nicht fermentativ wachsen kann.

Im Fall der Acetoinproduktion in JG806 mit Nitrat als Elektronenakzeptor konnte demnach der gesamte Kohlenstoff rechnerisch dargestellt werden. Da dem Medium Casaminsäuren zugesetzt waren, ist eine komplette Erfassung des zugegebenen Kohlenstoffs nicht möglich, weshalb sich die hier berechnete Bilanz auf die verbrauchte Glucose bezieht.

3.3. Produktion von Glycerin mit *Synechocystis* sp. PCC 6803

Der Wildtypstamm *Synechocystis* sp. PCC 6803 wurde gemäß den Angaben (siehe 2.6.5 und 2.6.6) modifiziert. Dabei sollte das Gen *glgC* deletiert und die Gene für die Produktion von Glycerin (*sthA*, *gpp2*, *cgGPD*) integriert werden. Zur Überprüfung, ob *Synechocystis* Glycerin produziert und ins Medium ausscheidet, wurde zunächst ein Wachstumsversuch in einem belichteten Schüttelinkubator mit Erlenmeyerkolben durchgeführt.

3.3.1. Überprüfung der Integration der Glyceringene

Die korrekte Integration der Mutante konnte durch PCR und Sequenzierung bestätigt werden. Sind die Primer 1011 und 1012, die außerhalb der für die Integration nötigen homologen Sequenzbereiche liegen, für die qualitative Analyse verwendet worden, konnte sowohl das Wildtypgen als auch das integrierte Operon nachgewiesen werden (siehe Abb. 23). Demnach scheint eine Mischung der verschiedenen Genome innerhalb einer Zelle vorzuliegen. Diese konnte weder durch Vereinzeln auf Selektionsplatten noch durch mehrmalige Inkubation in Flüssigmedium mit steigenden Kanamycinresistenzen (bis zu 400 $\mu\text{g/ml}$) entfernt werden. Ein Nachweis der Proteine, für welche die inserierten Gene kodieren, war mittels Western Blot ebenfalls nicht möglich.

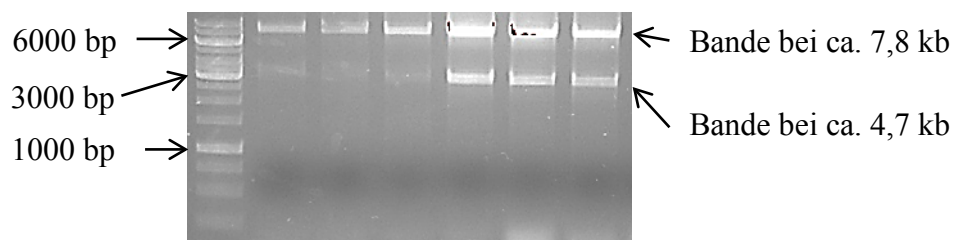


Abb. 23: Qualitativer Nachweis der Insertion von *sthA*, *gpp2*, *cgGPD*.

Die Insertion konnte in allen getesteten Stämmen nachgewiesen werden. Jede getestete Kultur ergab die charakteristische Bande bei 7,8 kb für die Mutante und die 4,7 kb Bande für den Wildtyp. Demnach konnten nicht alle Genomkopien pro Zelle mutiert werden.

Da die Gene qualitativ über PCR nachgewiesen und die Basenfolge durch Sequenzierung bestätigt werden konnte, wurden dennoch Wachstumsversuche in BG11-Medium mit Kanamycin als Selektionsmarker durchgeführt.

3.3.2. Glycerinproduktion im Batchversuch

Der Wildtypstamm wurde im belichteten Schüttelinkubator in BG11-Medium inokuliert. Dabei wurden dem Medium in einer Versuchsreihe 10 mM Glycerin zugegeben, in der anderen nicht. Dies diente der Überprüfung, ob Glycerin während des Wachstums von *Synechocystis* abgebaut werden kann. Die Ergebnisse sind in Abb. 24 dargestellt.

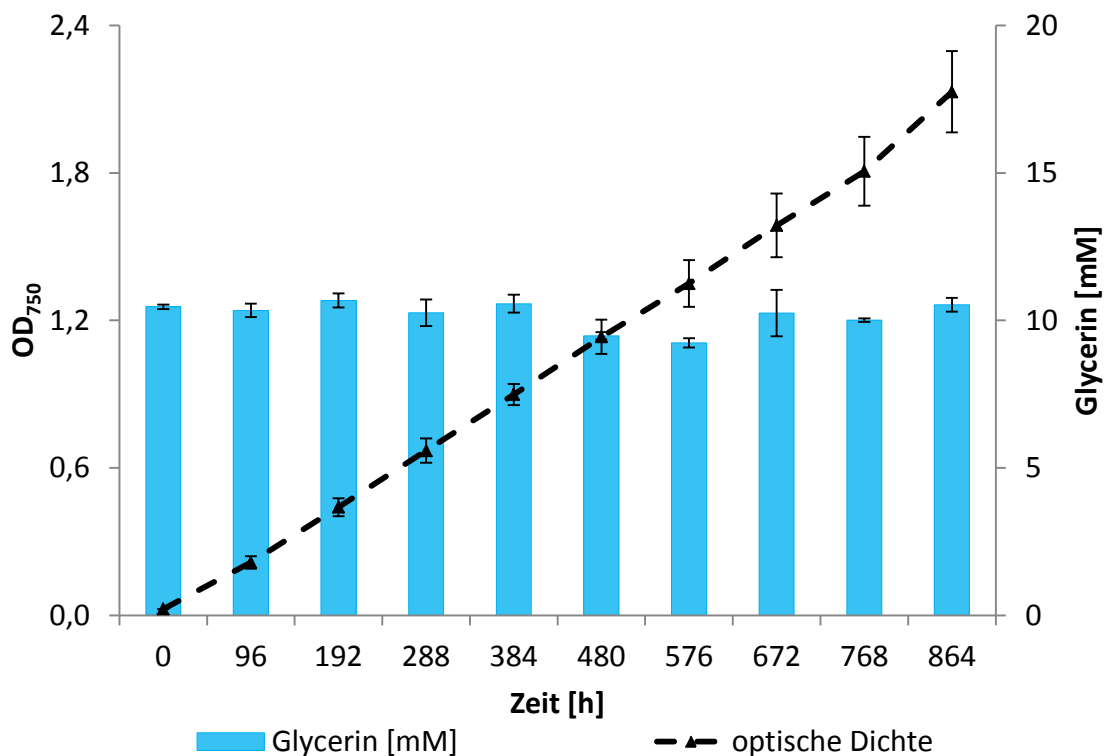


Abb. 24: Wachstum des Wildtyps in BG11-Glycerin Medium.

Die gestrichelte Linie gibt die optische Dichte bei 750 nm von *Synechocystis sp.* PCC 6803 wieder, die Glycerinkonzentration ist in blau dargestellt. Dem Medium wurden 10 mM Glycerin zugegeben. Die Menge des Glycerins blieb über den gesamten Versuch hinweg konstant.

Wie aus Abb. 24 hervorgeht, wird Glycerin in den gewählten Kulturbedingungen nicht abgebaut, sondern bleibt über die gesamte Versuchszeit annähernd konstant (Glycerin t_0 $10,46 \pm 0,07$ mM; t_{864} $10,53 \pm 0,24$ mM). Das Wachstum des Wildtyps ist linear, was auf eine Limitierung der Wachstumsbedingungen hindeutet. Die Begasung und die Beleuchtung waren im verwendeten Equipment nicht optimal, weshalb von einer Licht- und/oder CO₂-Limitierung ausgegangen werden kann. Da mit diesem Experiment gezeigt wurde, dass Glycerin nicht abgebaut werden kann, wurde unter gleichen Bedingungen das Wachstum des Wildtyps und der Glycerin produzierenden Mutante in BG11-Medium untersucht. Der JG811-Kultur wurde in regelmäßigen Abständen Kanamycin zugegeben, um einen konstanten Selektionsdruck aufrecht zu erhalten. Das Experiment wurde bis zum Erreichen einer optischen Dichte von 2,0 durchgeführt. Die Probennahme erfolgte täglich und die Glycerinkonzentration wurde zu definierten Zeitpunkten gemessen (siehe 2.11.3). In Abb. 25 sind die Ergebnisse der Wachstumsversuche zusammengefasst.

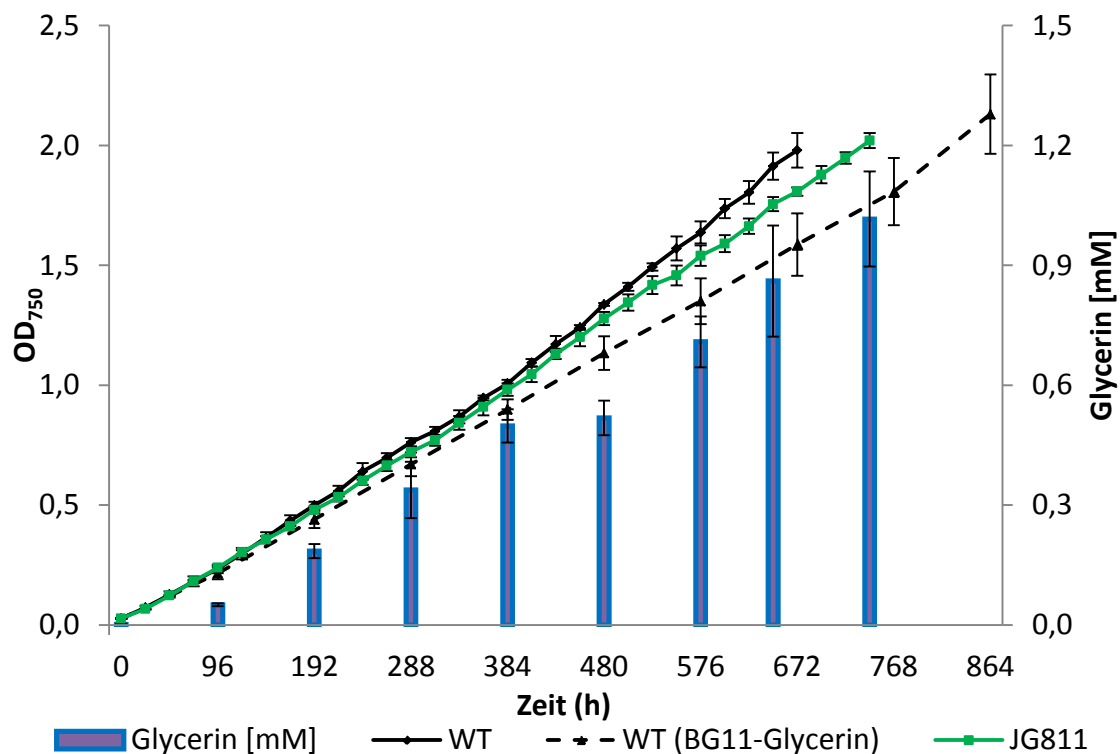


Abb. 25: Glycerinproduktion im Batchversuch.

Es sind die Wachstumsdaten des Wildtyps mit und ohne Glycerin im Medium und der Mutante dargestellt. Darüber hinaus ist in blau die Glycerinkonzentration (in mM) im Medienüberstand der Mutante gezeigt. Der Wildtyp (schwarz) erreichte bei den gewählten Bedingungen am schnellsten eine OD₇₅₀ von 2,0. Waren 10 mM Glycerin im Medium enthalten, war das Wachstum des Wildtyps verlangsamt (gestrichelt). Die Mutante (grün) wuchs langsamer als der Wildtyp. Die Glycerinkonzentration im Medienüberstand nahm dabei stetig zu.

Aus den Daten ist zu entnehmen, dass die Mutante ein etwas langsames Wachstum zeigt als der Wildtyp. Zum Erreichen der OD₇₅₀ von 2 waren drei Tage mehr nötig, was ca. 10% entspricht. Das Wachstum des Wildtyps in BG11-Medium mit Glycerin dauerte bis zur definierten Zelldichte am Längsten. Wird allerdings die Wachstumskonstante μ der drei Experimente verglichen, sind kaum Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der Mutante feststellbar. Da die Kultivierungsbedingungen keine optimalen Verhältnisse boten, kam es zu einem linearen Wachstumsverhalten. Aus diesem Grund wurde die Wachstumskonstante μ einmal im Bereich der maximalen Steigung und einem im linearen Wachstumsbereich errechnet. Das errechnete μ für die Mutante im linearen Bereich ($0,00255 \pm 0,0001 \text{ h}^{-1}$) ist nur geringfügig kleiner als das für den Wildtyp errechnete μ ($0,002725 \pm 0,0001 \text{ h}^{-1}$), wobei die Unterschiede nach einem Welch-Test als signifikant zu bewerten sind ($p = 0,026$). Die μ -Werte bei der maximalen Steigung hingegen sind gleich (Wildtyp $0,026 \pm 0,001 \text{ h}^{-1}$; Mutante $0,026 \pm 0,001 \text{ h}^{-1}$). Die unterschiedliche Dauer bis zum Erreichen der definierten OD₇₅₀ von 2 sollte demnach auf das leicht unterschiedliche Wachstum im linearen Bereich

zurückzuführen sein. Wurde dem Medium Glycerin zugesetzt, waren die beiden errechneten Wachstumskonstanten (exponentiell: $0,022 \pm 0,001 \text{ h}^{-1}$; linear $0,0021 \pm 0,0001 \text{ h}^{-1}$) für den Wildtyp am niedrigsten (siehe Abb. 26 A/B) Glycerin scheint hier einen negativen Effekt auf die Biomassezunahme zu haben. Die Glycerinkonzentration im Medienüberstand wurde für den Wildtyp und die Mutante bestimmt. Der mutierte Stamm zeigt einen stetigen Anstieg der Glycerinkonzentration im Überstand bis zu einer Konzentration von $1,02 \pm 0,12 \text{ mM}$. Diese Konzentration ist nach 740 Stunden mit einer Zelldichte von $OD_{750} 2$ erreicht worden. Im Medienüberstand der Wildtypzellen konnte hingegen kein Glycerin nachgewiesen werden.

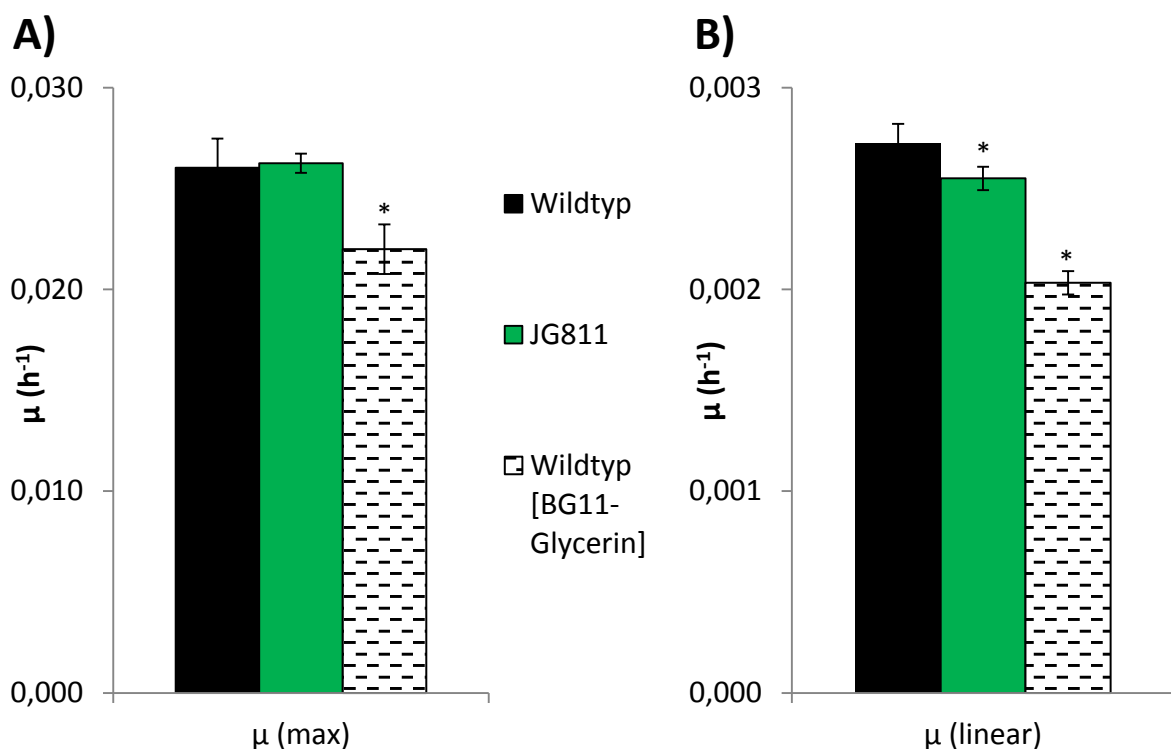


Abb. 26: Wachstumskonstanten von *Synechocystis* im Batch-Versuch.

Das Diagramm gibt die ermittelten Wachstumskonstanten μ für die drei durchgeführten Wachstumsversuche wieder. Dabei wird zwischen den Wachstumskonstanten unterschieden, die im exponentiellen Wachstumsbereich (A) und im linearen Bereich (B) ermittelt wurden. Es ist zu beachten, dass die Wachstumskonstanten während des linear verlaufenden Wachstums um den Faktor 10 kleiner waren. Der Wildtyp und der Stamm JG811 zeigen fast keine Unterschiede in den maximalen Wachstumskonstanten, aber einen geringen Unterschied während der linear verlaufenden Wachstumsphase. Wurde dem Medium Glycerin zugesetzt, sank die errechnete Wachstumskonstante. Die markierten Balken (*) zeigen ein nach Welch-Test signifikanten Unterschied zum Wachstum des Wildtyps in BG11-Medium.

Da die Bedingungen, wie Begasung und Belichtung, in diesem Versuchsaufbau nicht optimal eingestellt werden konnten, wurde mit dem mutierten Stamm ein weiterer Versuch in einem Photoreaktor (siehe Abb. 7) durchgeführt. Dieser bot die Möglichkeit einer stärkeren Belichtung und einer kontrollierten Begasung mit Druckluft.

3.3.3. Glycerinproduktion im Photoreaktor

Die Verwendung des belichteten Plattenreaktors verbesserte die Begasung und die Beleuchtung der *Synechocystis* Kultur. Auf diese Weise sollte zum einen das Wachstum und zum anderen die Glycerinproduktion in der Mutante JG811 beschleunigt werden. Die Reaktoren wurden zunächst äquilibriert. Dabei wurde der pH-Wert eingestellt und eine Sättigung des Mediums mit dem eingeleiteten Gas garantiert. Nun wurden die Inkubatoren im Triplikat mit je 60 ml der Vorkultur inokuliert. Die Probenahme erfolgte 1-2 mal täglich durch den dafür angebrachten Probenentnahmeschlauch. Während des Versuchs ist die Transmission bestimmt und von der genommenen Probe die optische Dichte gemessen worden. Die Zellsuspensionen wurden zentrifugiert und der Überstand ist in ein neues Gefäß überführt worden. Die Glycerinkonzentration im Medienüberstand wurde anschließend quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Abb. 27 A/B wiedergegeben.

Bei der Kultivierung von *Synechocystis* im Photoreaktor wurde eine OD_{750} von 2 in 168 Stunden erreicht, was weniger als ein Viertel der Inkubationszeit im Batchversuch entsprach. Durch die Verbesserung der Wachstumsbedingungen konnte demnach die Geschwindigkeit der Biomassezunahme vom mutierten Stamm vervierfacht werden (siehe Abb. 27 A). Dies ist auch an den Wachstumskonstanten abzulesen (vgl. Abb. 28): So ist die maximale Wachstumsrate der Mutante im Photoreaktor (Mutante Batch: $0,0263 \pm 0,001 \text{ h}^{-1}$; Mutante Photoreaktor: $0,033 \pm 0,001 \text{ h}^{-1}$) signifikant höher als im Batch-Versuch. Das gleiche Ergebnis wurde auch bei der Betrachtung des linearen Wachstums beobachtet (Mutante Batch: $0,0026 \pm 0,0001 \text{ h}^{-1}$; Mutante Photoreaktor: $0,0098 \pm 0,001 \text{ h}^{-1}$).

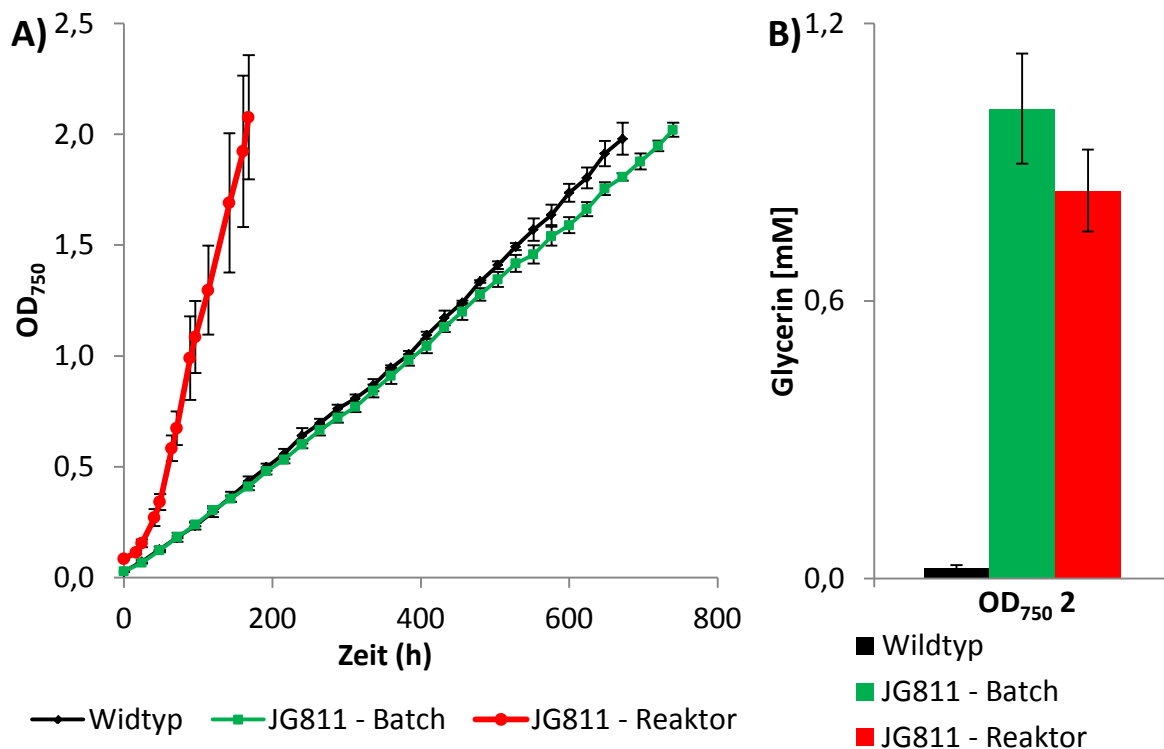


Abb. 27: Vergleich von Wachstum und Glycerintiter im Batch und im Reaktor.

A) Die Wachstumskurven von *Synechocystis* sind im Vergleich dargestellt. Im Batchversuch wurde die OD₇₅₀ 2 nach ca. 30 Tagen erreicht (schwarz und grün). Wurde die Mutante in einem Photoreaktor unter optimierten Bedingungen kultiviert, wurde die gleiche Zelldichte vier Mal schneller erreicht (rot).

B) Die Glycerinkonzentrationen des Wildtyps und der Mutante JG811 sind bei einer OD₇₅₀ von 2 wiedergegeben. Im Wildtyp (schwarz) war fast kein Glycerin detektierbar. Stamm JG811 produzierte Glycerin und sekretiert es ins Medium. Sowohl bei der Batch-Inkubation als auch im Photoreaktor wurden ähnlich hohe Glycerintiter erreicht.

Zur Überprüfung der Glycerinproduktion wurde die Glycerinkonzentration enzymatisch bestimmt. Im Batchversuch wurde $1,02 \pm 0,12$ mM Glycerin in 740 Stunden ins Medium sekretiert. Zu diesem Zeitpunkt betrug die OD₇₅₀ 2. Bei der gleichen Zelldichte im Photoreaktor konnte eine Glycerinkonzentration im Überstand von $0,84 \pm 0,09$ mM gemessen werden. Dies sind 16% weniger Glycerin als bei der gleichen Zelldichte im Batchversuch. Da die $0,84 \pm 0,09$ mM Glycerin in 168 Stunden gebildet worden sind, war die Produktion im Photoreaktor jedoch beschleunigt. Durchschnittlich betrug die Konzentrationszunahme im Batchversuch $1,35 \pm 0,16$ μ M Glycerin pro Stunde, im Photoreaktor $5 \pm 0,5$ μ M pro Stunde. Dies entspricht einer 370%igen Steigerung der Glycerinproduktion. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass durch optimierte Wachstumsbedingungen die Produktivität von JG811 verbessert werden konnte.

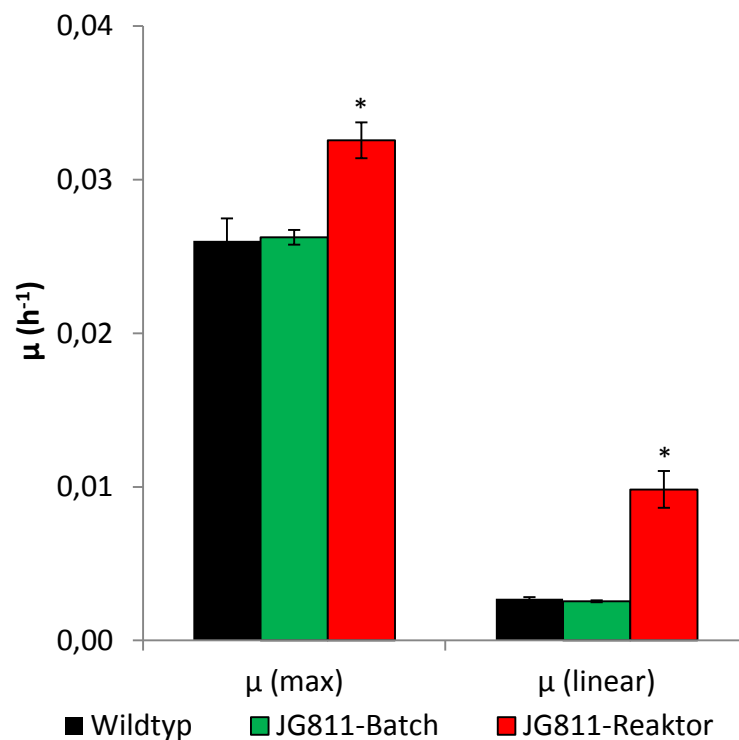


Abb. 28: Wachstumskonstanten von *Synechocystis* im Reaktorversuch.

Dargestellt ist die Wachstumsrate im exponentiellen und linearen Bereich des Wachstums. Wird der Stamm JG811 in einem Photoreaktor (rot) kultiviert, waren die gemessenen Wachstumskonstanten in beiden gemessenen Phasen größer als im Batchveruch (schwarz und grün). Der Unterschied zwischen den Kultivierungsbedingungen ist nach Welch-Test signifikant und zusätzlich markiert (*).

3.4. Aerobe Acetoinproduktion in modifiziertem BG11 Medium mit Glycerin

E. coli ist generell in der Lage Glycerin als einzige Kohlenstoffquelle zu verwerten. Eine Vergärung ist nur bedingt möglich. Da in dieser Arbeit ein *Synechocystis* Stamm generiert wurde, der phototroph Glycerin produzieren kann, liegt es nahe eine Co-Kultur herzustellen, in der das von *Synechocystis* produzierte Glycerin in ein höherwertiges Produkt umgesetzt werden kann. Aus diesem Grund wurde Stamm JG806 mit dem Acetoin-Produktionsplasmid aerob in BG11-Medium charakterisiert. Ziel dieses Versuches war es zu zeigen, dass *E. coli* in modifizierten BG11-Medium in der Lage ist aus Glycerin Acetoin herzustellen. Als Vergleichswert wurde JG806 ohne Produktionsplasmid ebenfalls getestet. Anaerobe Bedingungen wurden nicht untersucht, da in einer möglichen Co-Kultur Sauerstoff durch oxygene Photosynthese produziert werden würde. Strikt anaerobe Bedingungen wären demnach nicht möglich. Bestimmt wurde neben der Acetoinproduktion auch die Wachstumskonstante μ , die finale optische Dichte (bei 600 nm) und die Konzentration

möglicher Nebenprodukte. Der transformierte Stamm JG806/Acetoin erreichte eine geringere finale Zelldichte (JG806: $1,483 \pm 0,043$; JG806/Acetoin: $1,124 \pm 0,135$) als der nicht transformierte Stamm. Die Wachstumsrate war ebenfalls niedriger (JG806: $0,305 \pm 0,006 \text{ h}^{-1}$; JG806/Acetoin: $0,253 \pm 0,028 \text{ h}^{-1}$). Die Streuung der Messwerte ist durch die Induktion des Plasmids ebenfalls größer, als in JG806 (siehe Tab. 32).

Tab. 32: Wachstumskonstante und finale Zelldichte bei aerober Acetoinproduktion.

	JG806	JG806/Acetoin
Wachstumskonstant μ	$0,305 \pm 0,006$	$0,253 \pm 0,028$
Finale OD	$1,483 \pm 0,043$	$1,124 \pm 0,135$

Dies entspricht insofern den Erwartungen, da *E. coli* durch die Expression heterologer Proteine einem höheren Zellstress unterliegt. Die Produktion von Acetoin ist in Abb. 29 dargestellt.

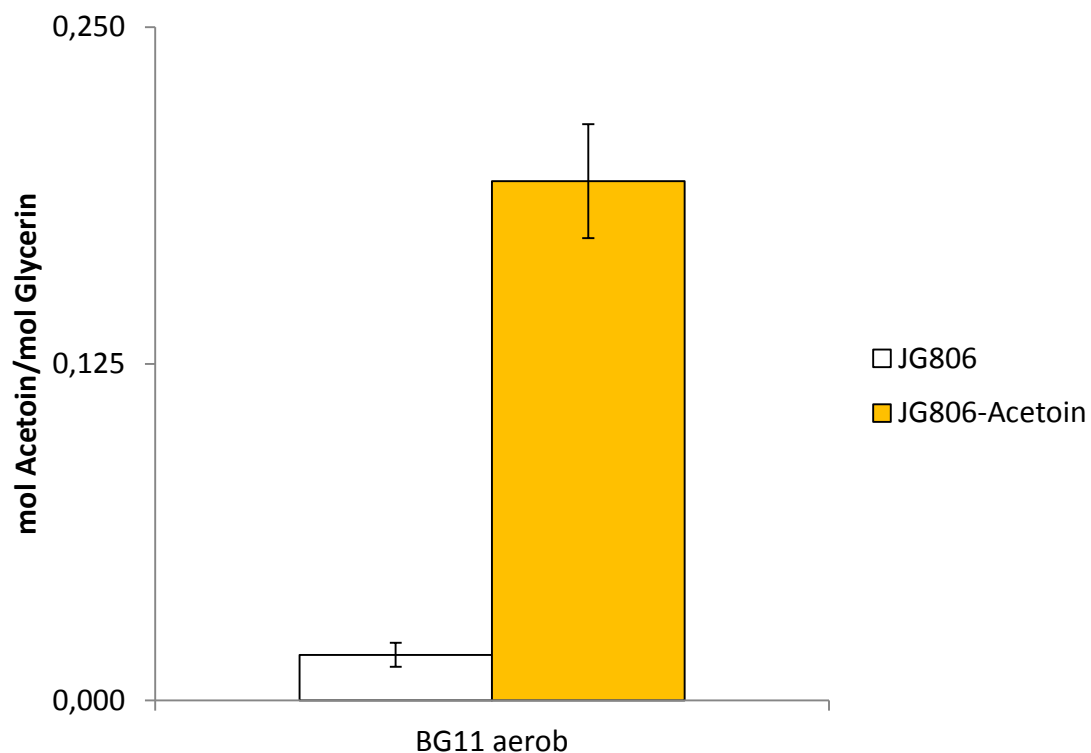


Abb. 29: Aerobe Acetoinproduktion in modifiziertem BG11-Medium.

Die gebildete Acetoinmenge in mol pro mol konsumiertem Glycerin ist angegeben. Insgesamt werden 0,193 mol Acetoin pro mol Glycerin gebildet. Dies entspricht einer Ausbeute von 38%. Verglichen werden der Stamm JG806 mit und ohne Acetoin-Produktionsplasmid.

Es wurden $0,193 \pm 0,02$ mol Acetoin pro verbrauchtem mol Glycerin gebildet (theoretisches Maximum: 0,5 mol Acetoin /mol Glycerin). Dies entspricht einer Ausbeute von ca. 38%. *E. coli* ist demnach prinzipiell in der Lage, in modifiziertem BG11 Medium mit Glycerin als Kohlenstoffquelle Acetoin ohne die Produktion von Nebenprodukten zu bilden. Die Kohlenstoffbilanz ist in Tab. 33 zusammengefasst. Da es sich um aerobe Wachstumsbedingungen handelt, konnte nur wenig des zugesetzten Kohlenstoffs in den Endprodukten nachgewiesen werden. Die aufgestellte Kohlenstoffbilanz berücksichtigt auch nicht die gebildete Biomasse. Der fehlende Kohlenstoff ist demnach sowohl für die Bildung von Biomasse verwendet worden, als auch in Form von CO_2 aus den Kulturgefäßen entwichen.

Tab. 33: Kohlenstoffbilanz der aeroben Acetoinproduktion.

Stoff		JG806	JG806/Acetoin
Stamm			
Pyruvat	mol/mol	$0,000 \pm 0,000$	$0,000 \pm 0,000$
	Aubeute %	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
Acetat	mol/mol	$0,000 \pm 0,0$	$0,039 \pm 0,039$
	Aubeute %	$0,000 \pm 0,0$	$2,0 \pm 2,0$
Succinat	mol/mol	$0,001 \pm 0,001$	$0,005 \pm 0,005$
	Aubeute %	$0,1 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,3$
Lactat	mol/mol	$0,000 \pm 0,000$	$0,000 \pm 0,000$
	Aubeute %	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
Formiat	mol/mol	$0,002 \pm 0,001$	$0,000 \pm 0,000$
	Aubeute %	$0,2 \pm 0,1$	$0,0 \pm 0,0$
Ethanol	mol/mol	$0,023 \pm 0,006$	$0,027 \pm 0,005$
	Aubeute %	$0,6 \pm 0,3$	$1,4 \pm 0,3$
Acetoin	mol/mol	$0,017 \pm 0,004$	$0,192 \pm 0,022$
	Aubeute %	$3,4 \pm 0,8$	$38,4 \pm 4,4$
C-Bilanz in %		$6,3 \pm 2,8$	$27,7 \pm 2,9$

Bei der aeroben Kultivierung mit Glycerin als Kohlenstoffquelle wurde nur wenig Pyruvat ins Medium sekretiert. Dies steht im Gegensatz zum aeroben Wachstum mit Glucose als Energie- und Kohlenstoffquelle, in dem fast ein Viertel der umgesetzten Glucose als Pyruvat nachweisbar war.

4. Diskussion

4.1. Manipulation des Kohlenstoff-Metabolismus in *E. coli*

4.1.1. Wachstumsverhalten der *E. coli* Stoffwechselmutanten

Ziel der Arbeit war die Modifikation des zentralen Kohlenstoff-Metabolismus. Dabei sollte der Stoffwechsel in Richtung des Pyruvats verschoben werden. Weiterhin sollte dieses unter anoxischen Bedingungen im Zitronensäurezyklus abgebaut werden. Um diese Ziele zu erreichen sind sowohl Pyruvat verbrauchende Reaktionen, wie auch die Bildung von Lactat und die von Acetyl-CoA ausgehende Stoffwechselwege deletiert worden. Dies sind zum einen die alkoholische Gärung sowie die Acetatbildung. Die Synthese dieser beiden Produkte beginnt mit der aktivierten Essigsäure Acetyl-CoA. Zum anderen wurde die Synthese von Succinat, einem weiteren Produkt der gemischten Säuregärung, unterbunden. Diese startet mit der Carboxylierung von Phosphoenolpyruvat und endet mit der Reduktion von Fumarat. Der Stoffwechselweg wurde durch die Deletion der Fumaratreduktase *frd* blockiert. Der Stamm JG472, eine Dreifach-Deletionsmutante ($\Delta frd adhE ldhA$), ist nicht mehr in der Lage unter fermentativen Bedingungen zu wachsen. Ein Verbrauch der Kohlenstoffquelle konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Die Wachstumsrate unter anaeroben, respiratorischen Bedingungen ist verringert jedoch unter aeroben Bedingungen gesteigert. Die Deletion von *frd*, *adhE* und *ldhA* hat erfolgreich die Bildung von Succinat, Alkohol und Lactat verringert. Dies ist im Einklang mit bereits veröffentlichten Arbeiten, in welchen die Stammoptimierungen für die industrielle Produktion gemischter Säuregärungsprodukte beschrieben wurde (Ohta *et al.*, 1991, Yomano *et al.*, 2008, Mazumdar *et al.*, 2013). Durch die Verwendung der *csc*-Gene als Selektionsmarker, konnte das Substratspektrum von JG472 um Saccharose erweitert werden. Die *csc*-Gene wurden als chromosomales System für die Saccharose-Verwertung identifiziert (Jahreis *et al.*, 2002) und sind bereits erfolgreich verwendet worden, um Melasse und Saccharose effizient in D-Lactat umzusetzen (Shukla *et al.*, 2004).

Die aerobe Wachstumskonstante μ konnte in Stamm JG472 ($\Delta frd adhE ldhA$) im Vergleich zum Wildtyp 1,25-fach gesteigert werden. Beim Vergleich mit vorhandener Literatur konnte ein solches Verhalten für diese Art von Mutante bisher nicht beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung liegt in den gegebenen Kulturbedingungen. Es wurden 100 ml Medium in

1000 ml Erlenmeyerkolben verwendet. *E. coli* ist zu einem sehr schnellen Wachstum und geringen Generationszeiten fähig (Plank & Harvey, 1979) und es ist durchaus wahrscheinlich, dass bei hohen Zelldichten eine Mischung aus aeroben und anaeroben Stoffwechsel stattfindet. Da die Gärungswege, die das Redoxgleichgewicht in der Zelle erhalten können, deletiert waren, bleibt als einzige anaerobe Route der Weg von Acetyl-CoA zum Acetat. Dieser Gärungsweg erlaubt die Synthese eines zusätzlichen Moleküls ATP, welches direkt für Synthesen benutzt werden kann. Wären die anderen Gärungswege noch aktiv, würde *E. coli* zum Teil gemischte Säuregärung betreiben und damit diesen ATP generierenden Schritt umgehen. Diese Theorie wird durch die Kenntnis der Bildung von Gärprodukten während des aeroben Wachstums gestützt (Andersen & von Meyenburg, 1980). Eine aerobe Sekretion von Nebenprodukten wird bei einer Sauerstofflimitierung beobachtet, die entweder durch die ausgeschöpfte Kapazität der Atmungskette oder durch eine unzureichende Sauerstoffverfügbarkeit in den verwendeten Kultivierungsbedingungen entsteht (Varma *et al.*, 1993). In der Dreifach-Mutante besteht die Möglichkeit der gemischten Säuregärung nicht mehr, weshalb mehr ATP für die Biomassezunahme zur Verfügung steht und damit ein schnelleres Wachstum ermöglicht. Da *E. coli* JG472 ($\Delta frd adhE ldhA$) nur Pyruvat zu Acetyl-CoA decarboxylieren kann, ist es ebenfalls möglich, dass die noch aktive Acetat-Gärung eine erhöhte Acetyl-CoA/Acetyl-Phosphat-Konzentration in der Zelle zur Folge hat. Dies könnte eine verstärkte Aktivierung von Wachstum fördernden Genen haben. Eine regulierende Funktion von Acetylphosphat in der Zelle ist bereits seit zwei Jahrzehnten bekannt. So werden verschiedene Antwortregulatoren, wie z.B. OmpR, *in vitro* durch die Anwesenheit von Acetyl-Phosphat phosphoryliert (McCleary & Stock, 1994). Für OmpR konnte Prüb (1998) zeigen, dass die Zugabe von Substraten, die zu Acetyl-CoA abgebaut werden, die Zellteilung von *E. coli* verstärken. Dabei verglich die Autorin den Wildtyp mit einer *pta*- und einer *ompR*-Deletionsmutante. Wurde Serin dem Medium zugegeben, stieg die Zellteilung des Wildtyps an, während die der Deletionsmutanten nicht beeinflusst wurde. Gleichzeitig konnte keine Flagellenbildung, reguliert durch die Gene *flhDC*, mehr nachgewiesen werden. In dem von Prüb erarbeiteten Modell aktiviert Acetyl-Phosphat den *response regulator* OmpR, der wiederum *flhDC* inhibiert. Sind die Gene *flhDC* exprimiert, inhibieren sie die Zellteilung. Die Aktivierung von OmpR durch einen hohen Acetyl-Phosphat-Pool bewirkt das Beenden der Inhibierung durch *flhDC*, was schlussendlich zu einer stärkeren Zellteilung führt (Pruss, 1998). Ein ähnlicher Effekt ist in der hier generierten Mutante JG472 ($\Delta frd adhE ldhA$) denkbar, was das schnellere aerobe Wachstum erklären

würde. Die große Bedeutung des zusätzlich gewonnenen ATPs durch Substratkettenphosphorylierung durch die Bildung von Acetat, ist bei der Verwertung von Xylose zu beobachten. Wird ein Pentosemolekül in *E. coli* zu Pyruvat oxidiert, entstehen netto 0,67 Moleküle ATP. Erst durch das zusätzliche ATP-Molekül, entstanden durch die Aktivität der Phosphotransacetylase und der Acetatkinase, ist *E. coli* in der Lage Pentosen fermentativ zu verwerten (Hasona *et al.*, 2004).

Um das Produktspektrum der Dreifachmutante weiter in die Richtung Pyruvat und Acetyl-CoA zu verschieben, wurden im nächsten Schritt die Gene für die Acetatproduktion in JG472 deletiert. Werden die Gene *pta* (Phosphotransacetylase) und *ack* (Acetatkinase) deletiert, wird die Acetatproduktion fast vollständig unterbunden. Es konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass die Acetat-Akkumulation durch die Deletion von *pta-ack* oder einem der beiden Gene abnimmt (Chang *et al.*, 1999b, Hahm *et al.*, 1994). Eine weitere Möglichkeit ist die Deletion von *pflA*, was für die Pyruvat-Formiat Lyase kodiert, um erfolgreich die Produktion von Acetyl-CoA abhängigen Gärungsendprodukten zu blockieren. Die Deletion von *pflA* hat allerdings zur Folge, dass *E. coli*-Zellen anaerob die Zugabe von Acetat benötigen, da keine Acetyl-CoA-Bildung mehr möglich ist (Varenne *et al.*, 1975, Mat-Jan *et al.*, 1989). Dies ist der Grund, dass in dieser Arbeit die einzelnen Gärungswege nacheinander deletiert und die resultierenden Stämme getestet wurden. Der durch die Deletion von *pta-ack* entstandene Stamm JG806 ($\Delta frd adhE ldhA pta-ack$) zeigt nur geringes Wachstum bei Sauerstoffausschluss. Eine Akkumulation von Gärprodukten konnte fast nicht mehr festgestellt werden. Dennoch wurde, trotz der erfolgreichen Deletion von *ldhA*, Lactat bis zu 1 mM im Medienüberstand nachgewiesen. *E. coli* verfügt insgesamt über drei Lactatdehydrogenasen, zwei membrangebundene und eine cytoplasmatische Form. Während die cytoplasmatische Dehydrogenase für die anaerobe Produktion von Lactat verwendet wird, sind die beiden membrangebundenen Lactat-Dehydrogenasen für die aerobe Verwertung von Milchsäure essentiell (Bunch *et al.*, 1997, Kline & Mahler, 1965). Dies erklärt, warum die Dreifach-Mutante JG472 ($\Delta frd adhE ldhA$) aerob Lactat fast genauso gut verwerten konnte, wie der Vorgängerstamm JG369. Das in diesem Fall gemessene Lactat könnte auf den Methylglyoxal-Nebenweg zurückzuführen sein. Zhou *et al.* (2006) stellten bei der Produktion von D-Lactat eine Kontamination des Produkts mit dem L-Enantiomer fest. Methylglyoxal ist eine Vorstufe für beide Enantiomere der Milchsäure und wurde als Ursache für die Lactat-Bildung ausgemacht. Die anschließende Deletion von *mgsA* verhinderte die Bildung von L-Lactat und hatte eine reine D-Lactat Produktion zur Folge (Grabar *et al.*, 2006). Ein

Knockout von *mgsA* sollte auch das in dieser Arbeit festgestellte Problem der Lactatkontamination lösen. Weitere Stoffkontaminationen sind nicht detektiert worden. Insgesamt zeigte Stamm JG806 nur sehr geringes Wachstum. Anaerob hat sich die Zelldichte in 96 Stunden ca. 1,5 Mal verdoppelt. War DMSO im Gegensatz zu Nitrat der Elektronenakzeptor, konnte Glucose in dieser Zeit nicht vollständig abgebaut werden. Die Bildung von Pyruvat ist für die Zelle weder durch eine balancierte Fermentation möglich, noch ist ein hoher Energiegewinn gewährleistet. Das in der Zelle gebildete ATP stammt anaerob überwiegend aus Substratkettenphosphorylierung, wobei mit Nitrat als Elektronenakzeptor auch ein Protonengradient gebildet wird (Ingledew & Poole, 1984). Substratkettenphosphorylierung kann unter den gegebenen Bedingungen nur während der Glykolyse stattfinden. Die Akkumulation von Pyruvat in einer *pta-ack*-Deletionsmutante wurde unter aeroben Bedingungen von Kakuda et al. (1994) beobachtet, wo ein diauxisches Wachstum stattfand. Die Diauxie kam durch die Sekretion von Nebenprodukten während des Glucoseverbrauchs und der anschließenden Verwertung der ausgeschiedenen Nebenprodukte zustande.

Eine Erklärung für das geringe Wachstum des Stamms JG806 ($\Delta frd adhE ldhA pta-ack$) könnte ein fallender pH-Wert durch die Sekretion von Pyruvat (vgl. Tab. 29) sein. Pyruvat hat einen pK_S -Wert von 2,49, der deutlich niedriger als der pK_S -Wert von Acetat (4,76) ist. Dennoch war die Senkung des pH-Werts weniger stark ausgeprägt als im Vorgängerstamm JG472 ($\Delta frd adhE ldhA$) unter den gleichen Bedingungen. Das pH-Optimum von *E. coli* liegt zwischen pH 6,4 und 7,2 (Manderson et al., 2006). Da die gemessenen pH-Werte innerhalb dieses Bereiches liegen, scheint der pH-Wert im Medium während des anaeroben Wachstums keine Auswirkungen zu haben. Die pH-Werte fallen bei den untersuchten Stämmen um einen ähnlichen Wert und sind demnach keine Erklärung für die unterschiedlichen Zelldichten am Ende der Versuche. Deshalb sind intrazelluläre pH-Veränderungen wahrscheinlicher. Es ist bekannt, dass *E. coli* sensibel auf sich ändernde, cytoplasmatische pH-Werte reagiert (Booth, 1985). Die Akkumulation von Pyruvat ist höchstwahrscheinlich auf eine hohe intrazelluläre Pyruvatkonzentration zurückzuführen, die Einflüsse auf den cytoplasmatischen pH und damit auf das Wachstumsverhalten von *E. coli* haben könnte. Der Transport von Pyruvat in und aus der Zelle heraus ist bisher im Detail nicht bekannt. Es gilt allerdings als sicher, dass *E. coli* einen spezifischen Transportmechanismus für Pyruvat besitzt. Dabei scheinen insgesamt drei Transportsysteme, zwei für den Import und eines für den Export, zu existieren (Kornberg & Smith, 1967, Lang et al., 1987, Kreth et al., 2013).

4.1.2. Acetatakkumulation in Stamm JG472

Der Stamm JG472 ($\Delta frd adhE ldhA$) akkumulierte weiterhin Acetat im Medienüberstand mit einer Ausbeute von 75% des theoretischen Maximums. Voraussetzung für die Acetatproduktion war die Verfügbarkeit von DMSO als terminalem Elektronenakzeptor. Diente Nitrat als Elektronenakzeptor, konnte kein Unterschied zwischen den einzelnen Stämmen bei der Acetatproduktion festgestellt werden. Vergleicht man die Redoxpotentiale der Elektronenakzeptoren DMSO und Nitrat, ist zu sehen, dass DMSO ein geringeres Redoxpotential besitzt. Es beträgt +160 mV (Wood, 1981), während das Potential von Nitrat +420 mV beträgt (Ingledeew & Poole, 1984). *E. coli* ist darüber hinaus in der Lage, das durch die Reduktion entstehende Nitrit zu Ammonium zu reduzieren, was einem Redoxpotential von +275 mV entspricht (Ingledeew & Poole, 1984). Vergleicht man die Potenziale mit dem von Sauerstoff (+816 mV), fällt auf, dass die Reduktion von Nitrat zu Ammonium nur etwas unter der des Sauerstoffs liegt. Daher ist *E. coli* bei Nitrat als Akzeptor weniger auf die ATP-Produktion durch Substratkettenphosphorylierung via Acetatweg angewiesen. Dies liegt auch darin begründet, dass *E. coli* einen Protonengradienten mit Nitrat als Akzeptor aufbauen und zur ATP-Synthese nutzen kann (Ingledeew & Poole, 1984). Das konnte mit den relativ stabilen Wachstumsraten der in dieser Arbeit erzeugten Mutanten gezeigt werden. So sinken die Wachstumsraten mit DMSO als Elektronenakzeptor stetig, während sie mit Nitrat als terminalem Akzeptor weniger stark abnehmen. Dies ist in der Tatsache begründet, dass die Reaktion von Succinat zu Fumarat im Zitronensäurezyklus Ubiquinon abhängig ist. Die Übertragung von Elektronen auf DMSO erfordert dagegen Menaquinon. Dieses hat ein Redoxpotential von -73 mV (Ingledeew & Poole, 1984), was für die Übertragung der Elektronen aus der Succinat-Oxidation nicht hoch genug ist. Ubichinon hat ein Redoxpotential von +65 mV (Urban & Klingenberg, 1969). Dies ermöglicht eine Übertragung der Elektronen von Succinat auf die oxidierte Form von Ubichinon. Da bei der anaeroben Nitratatmung die Nitratreduktase ihre Elektronen von Ubichinon erhält, können Elektronen der Ubichinon-abhängigen Succinatdehydrogenase letztendlich auf Nitrat übertragen werden. Dies verringert die Wirkung der einzelnen Deletionen auf die Wachstumskonstante μ , da mehr Energie aus dem Substrat gewonnen werden kann. Da die Potentialdifferenz von Ubichinon (+65mV) zum DMSO (+160 mV) zu gering für eine Reduktion von DMSO mit Ubichinon ist, ist die Übertragung von Elektronen auf DMSO Menachinon-abhängig. Daher ist ein stärkerer Einfluss der Deletionen für Gene, die für Enzyme des Gärungsstoffwechsels kodieren, zu beobachten.

Acetat gilt bei der industriellen Produktion von chemischen Grundbausteinen als unerwünschtes Nebenprodukt, weshalb einige Forschungsgruppen an Vermeidungsstrategien der Acetatakkumulation arbeiten (Bakhtiari *et al.*, 2014, Tao *et al.*, 2012). So existiert nur eine Arbeit, die sich mit der Produktion von Acetat in *E. coli* befasst. Causey *et al.* (2003) deletierten die Pyruvat-Formiat Lyase, Lactat-Dehydrogenase und die Fumaratreduktase um die Bildung von Gärungsprodukten zu verhindern. Anschließend entstand durch Deletionen von Untereinheiten der ATPase ein lösliches Enzym für die ATP-Hydrolyse. Der resultierende Stamm produzierte in Abhängigkeit von fermentierbaren Kohlenstoffquellen Acetat mit einer Ausbeute von 86%. Die Strategie, die Causey *et al.* (2003) wählten, kombinierte ein mikroaerobes Wachstum mit Fermentation. *E. coli* konnte ATP nur durch Substratkettenphosphorylierung synthetisieren und überschüssige Elektronen konnten durch die noch aktive Atmungskette auf Sauerstoff übertragen werden. Dies entspricht im Prinzip einer nicht-stöchiometrischen Fermentation und einem ähnlichen Ansatz wie hier beschrieben. In dieser Arbeit wurden konkurrierende Stoffwechselwege ebenfalls deletiert und überschüssige Elektronen auf einen terminalen Akzeptor, DMSO oder Nitrat, übertragen. Auf diese Weise konnte Acetat mit einer Ausbeute von 75% des theoretischen Maximums erzeugt werden. Im Gegensatz zu Causey *et al.* (2003), war die Ausbeute geringer. Der wesentliche Unterschied besteht jedoch darin, dass in dieser Arbeit Acetat komplett unter Ausschluss von Sauerstoff hergestellt und ins Medium abgegeben wurde.

Essigsäure, die momentan durch die Oxidation von Ethanol durch *Acetobacter* Stämme produziert wird (Raspor & Goranovic, 2008), ist ein wertvolles Produkt. Sie hat große Bedeutung als Geschmacks- und Konservierungsstoff und wird in der Industrie als Ausgangspunkt für die Synthese von beispielsweise Vinylacetaten verwendet (Cheung *et al.*, 2005).

4.1.3. Pyruvatakkumulation in Stamm JG806 ($\Delta frd adhE ldhA pta-ack$)

Pyruvat ist eines der wichtigsten Verzweigungsprodukte im Zentralstoffwechsel (Fell & Wagner, 2000) und findet in der Lebensmittelindustrie und der Biotechnologie als Ausgangsmaterial für chemische Substanzen Verwendung (Xu *et al.*, 2008). Eine biotechnologische Produktion erscheint daher lohnenswert zu sein.

Die Vierfach-Mutante JG806 produzierte je nach verwendetem Elektronenakzeptor 1,3 mol (DMSO) bis 1,4 mol (Nitrat) Pyruvat pro mol konsumierter Glucose. Dies entspricht einer Ausbeute von 65-70%. In der Arbeit von Causey et al. (2004) wurde in einer mikroaeroben Produktion Ausbeuten von 78% erreicht. Im Produktionsstamm wurden die Gene *focA-pflB* (Formiat Transporterprotein, Pyruvat-Formiat-Lyase), *frdBC* (Fumaratreduktase), *ldhA* (Lactat-Dehydrogenase), *adhE* (Alkohol-Dehydrogenase), *sucA* (α -Ketoglutarat-Dehydrogenase), *poxB* (Pyruvat-Oxidase), *ackA* (Acetatkinase) und *atpFH* deletiert. Durch die Modifikationen wurden sowohl die Stoffwechselrouten der gemischten Säuregärung als auch Reaktionen, die Pyruvat als Substrat benötigen, ausgeschaltet. Die Deletion in *sucA* unterbricht den Zitronensäurezyklus nach der Bildung von α -Ketoglutarat und die *atpFH*-Deletion erzeugt ein cytoplasmatisches, ATP hydrolysierendes Enzym. Der Stamm basiert auf einem zuvor entwickelten Homoacetat-Produzenten derselben Arbeitsgruppe (Causey et al., 2003). Die Pyruvat-Ausbeuten beider Stämme sind miteinander vergleichbar, wobei die in der hier vorliegenden Arbeit erreichte Produktion leicht niedriger war. Es ist jedoch anzunehmen, dass die Produktivität durch die Deletionen von *poxB* und *sucA* gesteigert werden kann. Die Deletion aller möglichen Stoffwechselrouten zum Acetyl-CoA (*aceEF*, *poxB* und *pflA*) hätte eine Acetat-Auxotrophie zur Folge. Diese Auxotrophie wird ausgebildet, obwohl noch weitere Acetat-Produktionswege in *E. coli* vermutet werden und selbst in *pta-ack poxB*-Doppeldeletionsmutanten eine Acetatbildung detektiert werden konnte (Phue et al., 2010). Die Auxotrophie konnte von Zelic et al. (2003) mit dem Pyruvat produzierenden *E. coli* YYC202 gezeigt werden. Der Stamm produzierte Pyruvat mit einer molaren Rate von 1,1 mol Pyruvat / mol Glucose, was einer Ausbeute von ca. 55% entspricht. Dieser Wert konnte durch optimierte Prozessbedingungen auf fast 90% gesteigert werden (Zelic et al., 2004). Diese Ausbeuten, die zum Teil höher sind als die in dieser Arbeit erreichten, sind unter mikroaeroben oder aeroben Bedingungen entstanden. Die Abspaltung einer C1-Einheit von Pyruvat wird aerob durch den Pyruvat-Dehydrogenasekomplex und anaerob durch die Pyruvat-Formiat Lyase katalysiert (Stephens et al., 1983a, Stephens et al., 1983b, Hasona et al., 2004). Beide Gene wurden in Stamm YYC202 deletiert, weswegen eine zweistufige Fermentation von Zelic (2004) durchgeführt wurde: Dabei wurde dem Minimalmedium in der Wachstumsphase Acetat und Glucose zugegeben um die Acetat-Auxotrophie auszugleichen. Anschließend wurde die Zugabe von Acetat gestoppt, wodurch die Produktionsphase gestartet wurde. Ein Vorteil der hier vorliegenden Arbeit liegt in der anaeroben Produktion von Pyruvat. *E. coli* ist unter anaeroben Bedingungen nicht in der Lage

Pyruvat abzubauen, wodurch sich das entstehende Produkt im Überstand anreichern kann. Die Produktion unter mikroaeroben Bedingungen, wie von Causey et al. (2004) oder Zelic et al. (2003 und 2004) gewählt, kann prinzipiell zu einem Abbau des Produkts und damit zu einer Verringerung der Ausbeute führen (Kakuda *et al.*, 1994). Daher sind anaerobe Prozesse zu bevorzugen.

Tab. 34: Pyruvatproduktion in *E. coli*.

Substrat	mol Pyruvat/ mol Substrat	Ausbeute	Bedingungen	Quelle
Glucose	1,30	65%	anaerob, DMSO	diese Arbeit
Glucose	1,41	70%	anaerob, NO ₃	diese Arbeit
Glucose	1,53	76%	mikroaerob	(Causey <i>et al.</i> , 2004)
Glucose	1,11	55%	aerob	(Zelic <i>et al.</i> , 2003)
Glucose	1,78	89%	aerob	(Zelic <i>et al.</i> , 2004)

Wegen der Akkumulation von Pyruvat im Medienüberstand wurde der Stamm JG806 ($\Delta frd adhE ldhA pta-ack$) für die anaerobe Produktion von Acetoin (siehe 4.2) verwendet.

4.1.4. Auswirkungen einer *arcA*-Deletion in einem Gärungs-defizienten Stamm

Der Regulator ArcA wurde deletiert, um den Kohlenstoffmetabolismus unter anaeroben Bedingungen in den Zitronensäurezyklus zu lenken. Prohl et al. (1998) konnten zeigen, dass eine *arcA*-Deletionsmutante von *E. coli* einen aktivierten Zitronensäurezyklus während der Nitratatmung aufweist. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde in den Stämmen JG472 ($\Delta frd adhE ldhA$) und JG806 ($\Delta frd adhE ldhA pta-ack$) das Gen *arcA* deletiert. Die Deletion bewirkte, dass *E. coli* nicht mehr in der Lage war ohne Sauerstoff zu wachsen oder die Kohlenstoffquelle zu verbrauchen. Bisher sind *arcA*-Deletionsstämmen stets unter anaeroben Bedingungen getestet worden, wenn noch Gene der gemischten Säuregärung im Organismus enthalten waren (Bidart *et al.*, 2012, Salmon *et al.*, 2005, Perrenoud & Sauer, 2005). Daher kann davon ausgegangen werden, dass in *arcA*-Deletionsstämmen ein fermentatives Wachstum möglich sein muss, was in den hier getesteten Stämmen JG472 und JG806 nicht der Fall war.

Exportierte der Vorgängerstamm JG806 unter aeroben Bedingungen noch Pyruvat ins Medium, zeigten die beiden *arcA*-Deletionsstämmen ein identisches, aerobes Wachstum ohne

die Produktion organischer Säuren im Überstand. Die Wachstumskonstante der Regulator-Mutante entsprach in etwa der des Wildtyps, wobei die finale optische Dichte unterhalb der des Wildtyps lag. War *arcA* noch vorhanden, wurde die Aktivität des Zitronensäurezyklus in JG472/JG806 stark gesenkt. JG806 ($\Delta frd adhE ldhA pta-ack$) akkumulierte Pyruvat im Medium, weswegen von einer hohen intrazellulären Pyruvatkonzentration ausgegangen werden kann. Pyruvat wirkt aktivierend auf das ArcAB-System (Liu *et al.*, 2009) und damit inhibierend auf den Zitronensäurezyklus. Darüber hinaus wird durch die *arcA*-Deletion eine Inhibierung des Pyruvat-Dehydrogenasekomplexes verhindert, woraus ein stärkerer Pyruvatverbrauch erzeugt werden sollte (Perrenoud & Sauer, 2005). In Stamm JG472 ($\Delta frd adhE ldhA$) wurde unter anaeroben Bedingungen Acetat akkumuliert. Eine Acetatproduktion findet auch unter aeroben Bedingungen statt (Chang *et al.*, 1999b, McCleary & Stock, 1994, Andersen & von Meyenburg, 1980). Da Acetat ebenfalls das ArcAB-Zweikomponentensystem aktiviert (Liu *et al.*, 2009), ist eine ähnliche Wirkung auf den Zitronensäurezyklus anzunehmen. Eine *arcA*-Deletion alleine hat fast keine Auswirkungen auf die Wachstumsrate oder die Biomasseproduktion in *E. coli*. Da in der hier vorliegenden Arbeit die Gärungswege deletiert waren, ist ein größerer Einfluss durch die *arcA*-Deletion zu beobachten. Der *response* Regulator ArcA inhibiert bei einer Überexpression den Glucosetransporter PtsG des Phosphotransferasesystems in *E. coli*. Eine Deletion von *arcA* führt zu einer stärkeren Expression von *ptsG* (Jeong *et al.*, 2004). Dadurch kann Glucose schneller aufgenommen werden, wodurch die α -Ketoglutarat-Dehydrogenase und die Succinat-Dehydrogenase inhibiert werden (Prohl *et al.*, 1998). Dies bewirkt wiederum eine Unterbrechung des Zitronensäurezyklus. In diesem Fall wiegt die Inhibierung durch das in dieser Arbeit verwendete Substrat stärker als die Aktivierung durch die *arcA*-Deletion. Die Folge ist ein Ungleichgewicht im NADH/NAD-Pool hin zur reduzierten Form. Da in den Stämmen JG472 ($\Delta frd adhE ldhA$) und JG806 ($\Delta frd adhE ldhA pta-ack$) die Gärungswege für die Regeneration des NAD^+ fehlen, kommt es nicht zum Wachstum. *E. coli* scheint nicht in der Lage zu sein, das Redoxgleichgewicht wiederherzustellen, obwohl die membrangebundene NADH-Dehydrogenase in einer *arcA*-Deletionmutante hochreguliert ist (Salmon *et al.*, 2005). Dementsprechend wäre die Erwartung, dass das Redoxgleichgewicht durch die Aktivität der NADH-Dehydrogenase wiederhergestellt und gleichzeitig der entstehende Protonengradient zur ATP-Synthese genutzt werden würde. Da unter anaeroben Bedingungen keine Stoffakkumulation und kaum Substratverbrauch stattfand, ist davon auszugehen, dass die NADH-Dehydrogenase nicht zur Aufrecht Erhaltung des

Redoxgleichgewichts beitragen kann und dass durch die Katabolitrepression der Zitronensäurezyklus unterbrochen wird. Dies führte letztendlich dazu, dass Glucose unter den getesteten Bedingungen nicht abgebaut werden konnte.

4.2. Acetoinproduktion in *E. coli*

Die Acetoin synthese startet mit der Kondensation von zwei Pyruvatmolekülen. Dabei wird ein Molekül CO_2 freigesetzt. Das dadurch entstehende Acetolactat wird durch eine Decarboxylierung zu Acetoin (vgl. Abb. 3), welches in der Lebensmittelindustrie als Geschmacks- und Geruchsstoff eingesetzt wird. Der in dieser Arbeit hergestellte Pyruvatproduzent JG806 ($\Delta frd adhE ldhA pta-ack$) wurde auf die Fähigkeit der Acetoin synthese getestet. Dazu wurden die Gene *alsSD* aus *Bacillus subtilis* in einen Expressionsvektor kloniert und JG806 mit diesem transformiert. Anschließend wurde das Wachstum und die Acetoinproduktion während der anaeroben Atmung untersucht. Wurde DMSO als Elektronenakzeptor verwendet, konnten nur geringe Veränderungen der Zelldichte im Batchversuch festgestellt werden. Dennoch wurde Glucose verwertet und Acetoin ohne die Bildung von Nebenprodukten ins Medium abgegeben. War Nitrat als Elektronenakzeptor im Medium enthalten, stieg die Zelldichte auf einen höheren Wert als im nicht transformierten JG806. Im Gegensatz zu JG806 stieg der pH-Wert in JG806/Acetoin um 0,15. Begründet liegt dies im hohen pK_s -Wert von Acetoin (13,72). Diese pH-stabilisierende Wirkung von Acetoin wurde erst kürzlich von Vivijns et al. (2014) untersucht und beschrieben. Da die Autoren die Experimente mit dem Wildtyp durchgeführt haben, konnte aufgrund der gleichzeitigen Produktion organischer Säuren keine pH-Zunahme detektiert werden. Dies liegt vermutlich darin begründet, dass sich die pH-Veränderungen durch die Produktion von Acetoin und organischen Säuren gegenseitig aufgehoben haben. Der nahezu konstante pH-Wert im Medium von JG806/Acetoin könnte die stärkere Biomassezunahme erklären und auf einen inhibierenden Effekt des sinkenden pH-Werts im Batchversuch hindeuten. Da JG806 ($\Delta frd adhE ldhA pta-ack$) viel Pyruvat ins Medium abgibt, ist eine hohe intrazelluläre Pyruvatkonzentration wahrscheinlich, was den cytoplasmatischen pH-Wert beeinflussen könnte. Die Produktion des Acetoin könnte dem entgegengewirkt haben. Dieser Effekt konnte durch die konstante Veränderung des pHs während der Charakterisierung der Stoffwechselmutanten nicht detektiert werden. Die Veränderung von Stoffwechselrouten zur

Produktion von Stoffen, die aus Pyruvat synthetisiert werden, ist bereits vielfach angewendet worden. So kann die Produktion von Milchsäure in *E. coli*, die durch Reduktion von Pyruvat entsteht, ebenfalls über heterologe Expression von Lactatdehydrogenasen aus anderen Organismen erfolgen, wobei optisch reine Produktionen der beiden Enantiomere möglich sind (Chang *et al.*, 1999a, Dien *et al.*, 2001, Zhou *et al.*, 2003). Wie in der hier vorliegenden Arbeit wurden konkurrierende Stoffwechselwege blockiert und die Ausbeuten durch heterologe Enzym-Expression gesteigert. Insbesondere die Inhibierung der Acetatproduktion durch Deletion der Acetatkinase führte bereits zu höheren Butandiol-Produktionen in *E. coli* (Shen *et al.*, 2012). In der hier vorliegenden Arbeit konnten je nach Elektronenakzeptor 58% (DMSO) oder 90% (NO₃) der konsumierten Glucose unter anaeroben Bedingungen in Acetoin umgesetzt werden (basierend auf mol gebildetes Acetoin pro mol konsumierter Glucose). Die erreichten Werte erscheinen zunächst niedriger als bei bisher veröffentlichten Daten (vgl. Tab. 35). Die gemessenen Ausbeuten in der Tabelle beruhen allerdings auf aerob hergestelltem Acetoin in LB-Medium oder Minimalmedium mit zugesetztem Hefeextrakt. Aus den Ausbeuten geht demnach nicht hervor, wieviel Acetoin aus Substanzen des Hefeextrakts oder dem zugegebenen Substrat gebildet worden ist. In der hier vorliegenden Arbeit wurde das Minimalmedium M9 verwendet, in dem Casaminosäuren, aber kein Hefeextrakt vorhanden war. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass das hier gebildete Acetoin aus der verwendeten Kohlenstoffquelle stammt. Die erreichten Ausbeuten sind aus diesem Grund nur bedingt vergleichbar. Vergleicht man die erzielten Ausbeuten mit der erreichten Produktion in *B. subtilis*, ist die Ausbeute mit Nitrat als Elektronenakzeptor 1,2-fach höher (Chen *et al.*, 2013). Dies ist insofern bemerkenswert, da *B. subtilis* zu einer natürlichen Butandiolgärung befähigt ist, und somit keine heterologe Proteinexpression benötigt (Chen *et al.*, 2013). Dies macht deutlich, dass *E. coli* einen geeigneter Produktionsstamm für Acetoin darstellt.

Wurde Acetoin aerob mit Glycerin als Kohlenstoffquelle in BG11-Medium produziert, betrug die Ausbeute 38,4%. Dieser Wert ist niedriger als ein vergleichbares Experiment in der Arbeit von Peschke (2014), wo eine Ausbeute von 94% erreicht wurde. Wie in anderen Acetoin-Produktionsexperimenten war dem Minimalmedium bei Peschke (2014) Hefeextrakt zugesetzt. Darüber hinaus wurde ein anderes Medium verwendet. Bei der Produktion von Acetoin aus Glycerin ist modifiziertes BG11-Medium verwendet worden, welches für das Cyanobakterium *Synechocystis sp.* optimiert ist (Rippka *et al.*, 1979). Die beiden genannten

Unterschiede könnten der Grund für die unterschiedlichen Ausbeuten in den beiden Arbeiten sein.

Tab. 35: Vergleichende Werte für Acetoinproduktion in *E. coli* und *Bacillus subtilis*.

Substrat	mol Acetoin/ mol Substrat	Ausbeute	Bedingungen / Medium(zusatz)	Quelle
<i>E. coli</i>				
Glucose	0,58	58%	anaerob, DMSO*	diese Arbeit
Glucose	0,90	90%	anaerob, NO ₃ *	diese Arbeit
Diacetyl/Glucose	0,87	87%	aerob, LB	(Gao <i>et al.</i> , 2013)
Glucose	0,80	80%	aerob, Hefeextrakt	(Xu <i>et al.</i> , 2014a)
Glucose	0,96	96%	aerob, LB	(Ui <i>et al.</i> , 1998)
Glycerin	0,47	94%	aerob, Hefeextrakt	(Peschke, 2014)
Glucose	0,86	86%	aerob, Hefeextrakt	(Oliver <i>et al.</i> , 2013)
Glucose	0,49	49%	aerob, LB	(Li <i>et al.</i> , 2010)
<i>B. subtilis</i>				
Glucose/Xylose	0,70	75%	aerob	(Chen <i>et al.</i> , 2013)

*: anaerobe Atmung mit DMSO oder Nitrat als terminalem Elektronenakzeptor.

4.3. Glycerinproduktion in *Synechocystis*

Glycerin fällt momentan als Abfallstoff bei der Produktion von Biotreibstoffen an (Tran & Kannangara, 2013). Da bei der Herstellung von Biodiesel der sogenannten zweiten Generation andere Verfahren angewendet werden, bei denen kein Glycerin mehr anfällt, wird die Verfügbarkeit von Glycerin in Zukunft zwangsläufig abnehmen (Balzani & Armeroli, 2011). Aus diesem Grund war es das Ziel in dieser Arbeit Glycerin durch einen phototrophen Stamm über CO₂-Fixierung zu erzeugen. Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* produziert Glycerin zur aufrecht Erhaltung des Redoxgleichgewichts (Ansell *et al.*, 1997). Die Sequenzen der Gene für die Glycerinproduktion wurden Codon optimiert und durch DNA-Synthese hergestellt. Die Anpassung der Codons auf den im Produktionsstamm vorliegenden *Codon Usage* ist bereits als prinzipielle, expressionssteigernde Maßnahme bekannt, wobei sich ein immer besseres Verständnis der Codon-Optimierung festigt (Liu *et al.*, 2014, Chung & Lee, 2012). Nach Integration der Gene wurde das Wachstum von der erzeugten Mutante mit dem Wildtyp verglichen. Dabei war festzustellen, dass die Mutante ein langsames Wachstum zeigte und dabei Glycerin ins Medium abgab. Der Ausgangsstamm konnte

dagegen weder Glycerin konsumieren noch produzieren. Das Wachstum des Wildtyps wurde verlangsamt, wenn dem Medium Glycerin zugesetzt wurde. Der Grund für die Inhibierung ist nicht geklärt. Es ist bekannt, dass hohe Konzentrationen von Glycerin einen negativen Einfluss auf die Phycobilisomen haben (Mao *et al.*, 2003). Phycobilisomen sind die wichtigsten Lichtsammelkomplexe in Cyanobakterien (Glazer, 1982) und obwohl die eingesetzte Glycerinkonzentration nach aktuellem Wissensstand zu gering für eine Beeinträchtigung ist, kann ein negativer Effekt nicht ausgeschlossen werden. Das schwächere Wachstum der Mutante im Vergleich zum Wildtyp könnte ebenfalls auf eine Inhibierung durch Glycerin oder die Herstellung von nicht nutzbarem Glycerin sein. Dieses entsteht über zwei Reaktionen aus Dihydroxyacetonphosphat (vgl. Abb. 6). Da das so verwertete Dihydroxyacetonphosphat nicht mehr für die Biomasseerzeugung zur Verfügung steht, könnte dies das Wachstum verlangsamen. Die Steigerung der Wachstumsgeschwindigkeit im Photoreaktor ist auf die verbesserten Bedingungen zurückzuführen: Die Belichtung war stärker und durch die aktive Begasung war mehr CO₂ im Medium gelöst und damit verfügbar. Auf diese Weise konnte die Zeit zum Erreichen der definierten OD₇₅₀ von 2,0 auf ein Viertel der Zeit aus dem Batchversuch reduziert werden. Die Verbesserung der Kulturbedingungen von Cyanobakterien oder Grünalgen ist ein anerkanntes Mittel für die Erhöhung der Produktion gewünschter Produkte (Lehr *et al.*, 2012, Ota *et al.*, 2011). Gleichzeitig blieb die Glycerinproduktion nur ca. 20% unter dem Wert des Batchversuchs. Dies spricht für eine Biomasseunabhängige Glycerinproduktion, da bei einer abhängigen Produktion die gleiche oder höhere Menge Glycerin produziert hätte werden müssen.

Synechocystis ist als Modellorganismus für phototrophes Wachstum etabliert. Aufgrund der relativ einfachen genetischen Zugänglichkeit ist es auch für die Produktion von nutzbaren chemischen Grundbausteinen, wie Fetten und Milchsäure geeignet. Dazu wurden verschiedene Gene heterolog exprimiert: Die Verwendung der Transhydrogenase *sth* aus *E. coli* dient der Umsetzung von NADPH, welches während der Lichtreaktion entsteht, zu NADH. NADH wird als Cofaktor für die Reduktion von Dihydroxyaceton zu Glycerin benötigt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Transhydrogenasen aus dem gramnegativen Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* (Varman *et al.*, 2013, Angermayr *et al.*, 2012) NADH-abhängige Prozesse unterstützen. In den beiden angegebenen Fällen konnte die Lactat-Produktion gesteigert werden. Die Produktion von Lactat in *Synechocystis* war in den letzten Jahren ein viel beachtetes Forschungsfeld: Es konnten mehrere Lactat-produzierende Stämme generiert werden, wobei die beste Produktion von Lactat mit der Kombination der Lactat-

Dehydrogenase aus *Bacillus subtilis*, der Transhydrogenase aus *Pseudomonas aeruginosa* unter der Kontrolle des *trc*-Promoters (Brosius *et al.*, 1985) erreicht werden konnte (Angermayr *et al.*, 2012). Die Produktion von Lactat war niedriger, wenn Lactatdehydrogenasen aus Milchsäurebakterien isoliert wurden (Joseph *et al.*, 2013). Dies liegt vermutlich in der näheren Verwandtschaft von *Synechocystis* zu Gram-positiven Bakterien begründet (Hansmann & Martin, 2000, Xiong *et al.*, 2000). Auch die Produktion anderer Chemikalien, die als Kraftstoffe oder so genanntes Bioplastik eingesetzt werden können, wurde in Cyanobakterien etabliert: So existieren Stämme für die Produktion von Fettsäuren (Liu *et al.*, 2010, Kamarainen *et al.*, 2012), Alkanen oder Alkenen (Wang *et al.*, 2013b), Butandiol (Oliver *et al.*, 2013), Wasserstoff (Baebprasert *et al.*, 2011), Ethanol (Gao *et al.*, 2012b) und 3-Hydroxybutyrat (Wang *et al.*, 2013a). Trotz dieser Fülle an Produktionsstämmen, existieren bis heute keine Arbeiten für die phototrophe Produktion von Glycerin in *Synechocystis*. Aus diesem Grund ist die hier vorliegende Arbeit die Erste, die einen Glycerin-Syntheseweg in *Synechocystis* beschreibt. Dabei werden gleiche oder höhere Glycerinkonzentrationen erreicht, als in Arbeiten, die das Ziel der Lactat- oder Butandiolproduktion hatten (vgl. Tab. 36), bezogen auf die jeweils erreichten Stoffkonzentrationen.

Tab. 36: Durchschnittliche Konzentrationszunahme von Produkten in *Synechocystis*.

Produkt	Produkt [#] h ⁻¹	Quelle
Glycerin	5 ± 0,5 µM 0,46 ± 0,046 mg/l	diese Arbeit
Lactat	2,92 µM 0,26 mg/l	(Angermayr <i>et al.</i> , 2012)
Lactat	0,02 µM [*] bzw. 0,04 µM ^{**} 0,0018 mg/l [*] bzw. 0,0036 mg/l	(Varman <i>et al.</i> , 2013)
Lactat	0,4 µM 0,036 mg/l	(Joseph <i>et al.</i> , 2013)
Fettsäuren	--- µM ^{***} 5,5 ± 0,5 mg/l	(Liu <i>et al.</i> , 2010)
Butandiol	0,22 µM 0,02 mg/l	(Oliver <i>et al.</i> , 2013)
Ethanol	192 µM 8,8 mg/l	(Gao <i>et al.</i> , 2012b)
3-Hydroxybutyrat	10,2 µM 1,1 mg/l	(Wang <i>et al.</i> , 2013a)

[#]: Angegeben ist die durchschnittliche Konzentrationszunahme im Medium, basierend auf der in der Publikation angegebenen Kultivierungsdauer und der Produktkonzentration

* / **: Unterschieden wird hier zwischen photoautotrophen Wachstum ([#]) und phototrophen (**) Wachstum mit Acetatzugabe.

***: Eine Angabe in µM ist aufgrund der Produktion verschieden langer Fettsäuren nicht möglich.

4.4. Ausblick

Die Produktion von Acetoin in *E. coli* konnte in der Arbeit mit der höchsten je gemessenen, anaeroben Ausbeute nachgewiesen werden. Da Lactat, trotz der Deletion der Lactat-Dehydrogenase weiterhin in geringen Mengen gebildet wird, sollte im nächsten Schritt der Methylglyoxal-Nebenweg durch Deletion von *mgsA* blockiert werden. Dies sollte die Ausbeute weiter erhöhen. Zur genetischen Stabilisierung ist eine genomische Integration des Acetoin-Operon unerlässlich. Dies würde den ständigen Selektionsdruck durch Antibiotika unnötig machen und würde Möglichkeiten zu einer Co-Kultivierung mit der Glycerin produzierenden *Synechocystis* Mutante eröffnen. Durch Arbeiten, die eine Elektronentransportkette zu unlöslichen Elektronenakzeptoren in *E. coli* etablieren sollen (Sturm-Richter, 2014), wäre die Möglichkeit gegeben, exoelektrische Eigenschaften in *E. coli* zu erzeugen. Auf diese Weise könnte *E. coli* unabhängig von Elektronenakzeptoren, wie NO₃

und DMSO, die durch die Reduktion verbraucht werden, wachsen. Ein sich selbst regenerierender Elektronenakzeptor wäre die Folge, der nicht-stöchiometrische Fermentationen ermöglichen würde. Durch solche könnte das Produktspektrum erweitert werden. Da Pyruvat einen zentralen Knotenpunkt im Kohlenstoff-Metabolismus darstellt, würde der in dieser Arbeit konstruierte Stamm JG806 ($\Delta frd adhE ldhA pta-ack$) als Kandidat für einen Plattformstamm eine vielversprechende Alternative bieten. Darüber hinaus sind neben den hier durchgeführten Experimenten noch weitere Versuche mit günstigen, leicht erhältlichen Kohlenstoffquellen sinnvoll. Ein Nachweis von Pyruvatproduktion durch das Verstoffwechseln von Rohglycerin oder Melasse wäre wünschenswert. Durch die in dieser Arbeit durchgeführte Erweiterung des Substratspektrums, die mit der Integration des *csc*-Operon erfolgte, wäre die Grundlage für solche Experimente bereitgestellt.

Der Glycerin produzierende *Synechocystis*-Stamm JG811 enthält trotz des stetig gestiegenen Selektionsdrucks noch immer Genkopien des Gens *glgC*. Aus nicht geklärten Gründen konnte das Wildtypgen nicht aus dem Organismus entfernt werden. Da eine Deletion generell möglich ist (Miao *et al.*, 2003), ist der Einfluss der Glycerin-Gene auf die Selektion noch unklar. Zur Klärung einer möglichen Toxizität der eingebrachten Gene, sollte eine Integration in einem neutralen Genlocus, beispielsweise *slr0168* (Gao & Xu, 2012), erfolgen. Dies würde den Kohlenstoffmetabolismus nicht beeinflussen und Möglichkeiten für weitere Genommanipulationen eröffnen. Da die Produktivität durch optimierte Kultivierungsbedingungen gesteigert werden konnte, wären weiterführende Experimente denkbar. So kann die Glycerinproduktion bei unterschiedlichen Lichtintensitäten oder Nährstoffmangel, wie Nitrat oder Phosphat, untersucht werden.

5. Danksagung

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Johannes Gescher für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren. Danke für die Unterstützung, das mir entgegengebrachte Vertrauen und dass ich an einem für mich sehr interessanten Thema arbeiten durfte.

Bei der Arbeitsgruppe bedanke ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die Geduld, die mir entgegengebracht wurde. Dies war wohl insbesondere in Zeiten von Stress als auch wenn ich Hunger habe nötig. Danke dafür.

Mein Dank gilt an dieser Stelle Thea Bursac für die Zeit, die Sie mir bei der Statistikauswertung geschenkt hat. Das hat mir sehr geholfen.

Meinen Büromitbewohnern, Francesca, Steffi und Kerstin, danke ich hier für die Unterstützung, die ich erfahren durfte. Es hat mir immer sehr geholfen in Diskussionen meine eigenen Gedanken zu ordnen und neue Ansätze mit auf den Weg bekommen zu haben.

Meinen Büronachbarn (Sibylle, Kadda, Anna, Susi und Quotenmann Fredi) danke für Eure Gastfreundschaft und Unterstützung.

Simon, du hast immer alle Ohren offen für Fragen rund um Proteinarbeiten und bist bereit Dein Wissen zu teilen: Danke!

Für die Photoreaktorversuche und die tatkräftige Unterstützung will ich auf diesem Weg auch Mark Fresewinkel der AG Posten danken. Es war spannend mit jemandem zu arbeiten, der sich mit Prozessoptimierungen beschäftigt und mir bei den Cyanobakterien sehr geholfen hat. Die schönen Ergebnisse im Reaktor wären ohne Dich nicht möglich gewesen. Danke!

Fredi. Dir gilt ein besonderer Dank für unsere Freundschaft und Deine Hilfsbereitschaft in sämtlichen Belangen: Ob bei Diskussionen (über Labor, Fußball oder Politik 😊), kochen im und außerhalb des Labors, private Ratschläge – auf Dich war Verlass! An dieser Stelle sollten auch Deine Lebensgefährtin Anna und unser wandelnder Fußball-Almanach Christian nicht unerwähnt bleiben. Ihr beide wart für mich ebenfalls eine große Hilfe und eine Bereicherung in letzter Zeit und in meiner Zeit in Karlsruhe. Danke.

Ein großer Dank gilt meiner Familie: Ihr habt mir mein Studium und damit meine Promotion erst ermöglicht. Ohne Euch wäre diese Arbeit niemals entstanden und ich weiß, dass ich mich immer und egal weswegen an Euch wenden kann. Danke Mama! Danke Papa! Dir, Simone, danke ich ebenfalls für alles, was Du bisher für mich getan hast. Eine bessere Schwester kann ich mir nicht vorstellen und es ist schön Euch drei zu haben.

Mein Letzter Dank gilt Dir: Du gibst mir Kraft, Geborgenheit, Liebe und hast einen wichtigen Platz in meinem Leben eingenommen. Einen Platz den ich nicht mehr unbesetzt sehen will. Danke Nane!

6. Anhang

6.1. Errechnete p-Werte des Welch-Tests

In den nachfolgenden Tabellen sind die errechneten p-Werte nach dem Welch-Test aufgeführt. Bei der Berechnung ist von einer Normalverteilung der einzelnen Stichproben ausgegangen worden. Die Nullhypothese wurde als verworfen gewertet, wenn der berechnete p-Wert kleiner als 0,05 ist.

Tab. 37: Errechnete p-Werte nach Welch-Test *E. coli*.

Vergleichstämme	Bedingungen [#]	p-Wert	Signifikanz
Wildtyp-JG11	aerob	$9,28 \cdot 10^{-3}$	WAHR
Wildtyp-JG11	anaerob, Gärung	$1,77 \cdot 10^{-4}$	WAHR
Wildtyp-JG11	anaerob, DMSO	$3,19 \cdot 10^{-3}$	WAHR
Wildtyp-JG11	anaerob, Nitrat	$5,89 \cdot 10^{-2}$	FALSCH
Wildtyp-JG369	aerob	$1,37 \cdot 10^{-2}$	WAHR
Wildtyp-JG369	anaerob, Gärung	$1,79 \cdot 10^{-8}$	WAHR
Wildtyp-JG369	anaerob, DMSO	$3,46 \cdot 10^{-7}$	WAHR
Wildtyp-JG369	anaerob, Nitrat	$1,31 \cdot 10^{-5}$	WAHR
Wildtyp-JG472	aerob	$1,25 \cdot 10^{-7}$	WAHR
Wildtyp-JG472	anaerob, DMSO	$5,22 \cdot 10^{-7}$	WAHR
Wildtyp-JG472	anaerob, Nitrat	$3,18 \cdot 10^{-4}$	WAHR
Wildtyp-JG806	aerob	$6,44 \cdot 10^{-5}$	WAHR
Wildtyp-JG806	anaerob, DMSO	$2,21 \cdot 10^{-8}$	WAHR
Wildtyp-JG806	anaerob, Nitrat	$9,85 \cdot 10^{-6}$	WAHR
Wildtyp-JG648	aerob	$8,42 \cdot 10^{-1}$	FALSCH
Wildtyp-JG808	aerob	$3,27 \cdot 10^{-1}$	FALSCH
JG472-JG648	aerob	$1,10 \cdot 10^{-3}$	WAHR
JG806-JG808	aerob	$0,30 \cdot 10^{-3}$	WAHR

[#]: Angegeben sind die Wachstumsbedingungen. Bei anaerobem Wachstum mit Elektronenakzeptor ist nur dieser (Nitrat oder DMSO) angegeben. Die Kohlenstoff- und Energiequelle war stets Glucose. Genotypen: JG11 (Δfrd), JG369 ($\Delta frd adhE$), JG472 ($\Delta frd adhE ldhA$), JG648 ($\Delta frd adhE ldhA arcA$), JG806 ($\Delta frd adhE ldhA pta-ack$) und JG808 ($\Delta frd adhE ldhA pta-ack arcA$).

Tab. 38: Errechnete p-Werte nach Welch-Test *Synechocystis*.

Vergleichstämme	Bedingungen [#]	p-Wert	Signifikanz
Wildtyp-JG811	Batch, max	$7,85 \cdot 10^{-1}$	FALSCH
Wildtyp-JG811	Batch, linear	$2,65 \cdot 10^{-2}$	WAHR
Wildtyp-Wildtyp	BG11-BG11 (Glycerin), max	$1,11 \cdot 10^{-2}$	WAHR
Wildtyp-Wildtyp	BG11-BG11 (Glycerin), linear	$8,66 \cdot 10^{-5}$	WAHR
JG811-JG811	Batch-Photoreaktor, max	$5,92 \cdot 10^{-3}$	WAHR
JG811-JG811	Batch-Photoreaktor, linear	$8,86 \cdot 10^{-3}$	WAHR
Wildtyp-JG811	Batch-Photoreaktor, max	$1,27 \cdot 10^{-3}$	WAHR
Wildtyp-JG811	Batch-Photoreaktor, linear	$9,13 \cdot 10^{-3}$	WAHR

[#]: Die Wachstumsbedingungen unterscheiden zwischen Wachstum in einem Erlenmeyerkolben oder Wachstum im Photoreaktor. Die Bezeichnung BG11 (Glycerin) beschreibt das Wachstum des Wildtyps in BG11-Medium, dem 10 mM Glycerin zugesetzt sind. Die Angabe „max“ und „linear“ differenziert zwischen der exponentiellen und der linearen Wachstumsphase während der Versuche. Genotyp JG811 ($\Delta glgC::sthA$ KanR *cgGPD gpp2*).

7. Literaturverzeichnis

- Abedi, D., M. Beheshti, A.J. Najafabadi, H.M. Sadeghi & V. Akbari, (2012) Optimization of the Expression of Genes Encoding Poly (3-hydroxyalkanoate) Synthase from *Pseudomonas aeruginosa* PTCC 1310 in *Escherichia coli*. *Avicenna journal of medical biotechnology* **4**: 47-51.
- Alexeeva, S., K.J. Hellingwerf & M.J. Teixeira de Mattos, (2003) Requirement of ArcA for redox regulation in *Escherichia coli* under microaerobic but not anaerobic or aerobic conditions. *Journal of bacteriology* **185**: 204-209.
- Alper, M.D. & B.N. Ames, (1975) Positive selection of mutants with deletions of the *gal-chl* region of the *Salmonella* chromosome as a screening procedure for mutagens that cause deletions. *Journal of bacteriology* **121**: 259-266.
- Andersen, K.B. & K. von Meyenburg, (1980) Are growth rates of *Escherichia coli* in batch cultures limited by respiration? *Journal of bacteriology* **144**: 114-123.
- Angermayr, S.A., M. Paszota & K.J. Hellingwerf, (2012) Engineering a cyanobacterial cell factory for production of lactic acid. *Applied and environmental microbiology* **78**: 7098-7106.
- Ansell, R., K. Granath, S. Hohmann, J.M. Thevelein & L. Adler, (1997) The two isoenzymes for yeast NAD⁺-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by GPD1 and GPD2 have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *The EMBO journal* **16**: 2179-2187.
- Babu, K.R., S. Swaminathan, S. Marten, N. Khanna & U. Rinas, (2000) Production of interferon-alpha in high cell density cultures of recombinant *Escherichia coli* and its single step purification from refolded inclusion body proteins. *Appl Microbiol Biotechnol* **53**: 655-660.
- Baebprasert, W., S. Jantaro, W. Khetkorn, P. Lindblad & A. Incharoensakdi, (2011) Increased H₂ production in the cyanobacterium *Synechocystis sp.* strain PCC 6803 by redirecting the electron supply via genetic engineering of the nitrate assimilation pathway. *Metabolic engineering* **13**: 610-616.
- Bakhtiari, N., M. Mirshahi, V. Babaeipour, N. Maghsoudi & A. Tahzibi, (2014) Down Regulation of *ackA-pta* Pathway in *Escherichia coli* BL21 (DE3): A Step Toward Optimized Recombinant Protein Expression System. *Jundishapur journal of microbiology* **7**: e8990.

- Balzani, V. & N. Armeroli, (2011) Energy for a Sustainable World: From the Oil Age to a Sun-powered future. *Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*.
- Bassham, J.A., A.A. Benson & M. Calvin, (1950) The path of carbon in photosynthesis. *The Journal of biological chemistry* **185**: 781-787.
- Bekker, M., S. Alexeeva, W. Laan, G. Sawers, J. Teixeira de Mattos & K. Hellingwerf, (2010) The ArcBA two-component system of *Escherichia coli* is regulated by the redox state of both the ubiquinone and the menaquinone pool. *Journal of bacteriology* **192**: 746-754.
- Berg, I.A., D. Kockelkorn, W.H. Ramos-Vera, R.F. Say, J. Zarzycki, M. Hugler, B.E. Alber & G. Fuchs, (2010) Autotrophic carbon fixation in *archaea*. *Nature reviews. Microbiology* **8**: 447-460.
- Bidart, G.N., J.A. Ruiz, A. de Almeida, B.S. Mendez & P.I. Nickel, (2012) Manipulation of the anoxic metabolism in *Escherichia coli* by ArcB deletion variants in the ArcBA two-component system. *Applied and environmental microbiology* **78**: 8784-8794.
- Blattner, F.R., G. Plunkett, 3rd, C.A. Bloch, N.T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J.D. Glasner, C.K. Rode, G.F. Mayhew, J. Gregor, N.W. Davis, H.A. Kirkpatrick, M.A. Goeden, D.J. Rose, B. Mau & Y. Shao, (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**: 1453-1462.
- Booth, I.R., (1985) Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiological reviews* **49**: 359-378.
- Bradford, M.M., (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**: 248-254.
- Brosius, J., M. Erfle & J. Storella, (1985) Spacing of the -10 and -35 regions in the tac promoter. Effect on its in vivo activity. *The Journal of biological chemistry* **260**: 3539-3541.
- Bunch, P.K., F. Mat-Jan, N. Lee & D.P. Clark, (1997) The *ldhA* gene encoding the fermentative lactate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Microbiology* **143 (Pt 1)**: 187-195.
- Causey, T.B., K.T. Shanmugam, L.P. Yomano & L.O. Ingram, (2004) Engineering *Escherichia coli* for efficient conversion of glucose to

- pyruvate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 2235-2240.
- Causey, T.B., S. Zhou, K.T. Shanmugam & L.O. Ingram, (2003) Engineering the metabolism of *Escherichia coli* W3110 for the conversion of sugar to redox-neutral and oxidized products: homoacetate production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 825-832.
- Chang, D.E., H.C. Jung, J.S. Rhee & J.G. Pan, (1999a) Homofermentative production of D- or L-lactate in metabolically engineered *Escherichia coli* RR1. *Applied and environmental microbiology* **65**: 1384-1389.
- Chang, D.E., S. Shin, J.S. Rhee & J.G. Pan, (1999b) Acetate metabolism in a *pta* mutant of *Escherichia coli* W3110: importance of maintaining acetyl coenzyme A flux for growth and survival. *Journal of bacteriology* **181**: 6656-6663.
- Chen, T., W.X. Liu, J. Fu, B. Zhang & Y.J. Tang, (2013) Engineering *Bacillus subtilis* for acetoin production from glucose and xylose mixtures. *Journal of biotechnology* **168**: 499-505.
- Cheung, H., R.S. Tanke & G.P. Torrence, (2005) Acetic Acid. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry Wiley-VCH, Weinheim*: 19-20.
- Chung, B.K. & D.Y. Lee, (2012) Computational codon optimization of synthetic gene for protein expression. *BMC systems biology* **6**: 134.
- Clark, D.P., (1989) The fermentation pathways of *Escherichia coli*. *FEMS microbiology reviews* **5**: 223-234.
- Cohen, S.N., A.C. Chang & L. Hsu, (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **69**: 2110-2114.
- Cruz Ramos, H., T. Hoffmann, M. Marino, H. Nedjari, E. Presecan-Siedel, O. Dreesen, P. Glaser & D. Jahn, (2000) Fermentative metabolism of *Bacillus subtilis*: physiology and regulation of gene expression. *Journal of bacteriology* **182**: 3072-3080.
- Datsenko, K.A. & B.L. Wanner, (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 6640-6645.

- Dharmadi, Y., A. Murarka & R. Gonzalez, (2006) Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: a new platform for metabolic engineering. *Biotechnology and bioengineering* **94**: 821-829.
- Diaz-Troya, S., L. Lopez-Maury, A.M. Sanchez-Riego, M. Roldan & F.J. Florencio, (2014) Redox regulation of glycogen biosynthesis in the cyanobacterium *Synechocystis sp.* PCC 6803: analysis of the AGP and glycogen synthases. *Molecular plant* **7**: 87-100.
- Dien, B.S., N.N. Nichols & R.J. Bothast, (2001) Recombinant *Escherichia coli* engineered for production of L-lactic acid from hexose and pentose sugars. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* **27**: 259-264.
- Dillschneider, R., C. Steinweg, R. Rosello-Sastre & C. Posten, (2013) Biofuels from microalgae: photoconversion efficiency during lipid accumulation. *Bioresour Technol* **142**: 647-654.
- Erhardt, H., F. Dempwolff, M. Pfreundschuh, M. Riehle, C. Schafer, T. Pohl, P. Graumann & T. Friedrich, (2014) Organization of the *Escherichia coli* aerobic enzyme complexes of oxidative phosphorylation in dynamic domains within the cytoplasmic membrane. *MicrobiologyOpen* **3**: 316-326.
- Escalante, A., A.S. Cervantes, G. Gosset & F. Bolivar, (2012) Current knowledge of the *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate-carbohydrate phosphotransferase system: peculiarities of regulation and impact on growth and product formation. *Appl Microbiol Biot* **94**: 1483-1494.
- Fell, D.A. & A. Wagner, (2000) The small world of metabolism. *Nature biotechnology* **18**: 1121-1122.
- Förster, A.H. & J. Gescher, (2014) Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for Production of Mixed-Acid Fermentation End Products. *Frontiers in bioengineering and biotechnology* **2**: 16.
- Gao, H. & X.D. Xu, (2012) The Cyanobacterial NAD Kinase Gene *sll1415* Is Required for Photoheterotrophic Growth and Cellular Redox Homeostasis in *Synechocystis sp* Strain PCC 6803. *Journal of bacteriology* **194**: 218-224.
- Gao, J., Y.Y. Xu, F.W. Li & G. Ding, (2013) Production of S-acetoin from diacetyl by *Escherichia coli* transformant cells that express the diacetyl reductase gene of *Paenibacillus polymyxa* ZJ-9. *Letters in applied microbiology* **57**: 274-281.

- Gao, Q., W. Wang, H. Zhao & X. Lu, (2012a) Effects of fatty acid activation on photosynthetic production of fatty acid-based biofuels in *Synechocystis* sp. PCC6803. *Biotechnology for biofuels* **5**: 17.
- Gao, Z.X., H. Zhao, Z.M. Li, X.M. Tan & X.F. Lu, (2012b) Photosynthetic production of ethanol from carbon dioxide in genetically engineered cyanobacteria. *Energ Environ Sci* **5**: 9857-9865.
- Georgellis, D., O. Kwon & E.C. Lin, (1999) Amplification of signaling activity of the *arc* two-component system of *Escherichia coli* by anaerobic metabolites. An in vitro study with different protein modules. *The Journal of biological chemistry* **274**: 35950-35954.
- Georgellis, D., O. Kwon & E.C. Lin, (2001) Quinones as the redox signal for the *arc* two-component system of bacteria. *Science* **292**: 2314-2316.
- Georgellis, D., A.S. Lynch & E.C. Lin, (1997) In vitro phosphorylation study of the *arc* two-component signal transduction system of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **179**: 5429-5435.
- Gescher, J.S., C.D. Cordova & A.M. Spormann, (2008) Dissimilatory iron reduction in *Escherichia coli*: identification of CymA of *Shewanella oneidensis* and NapC of *E. coli* as ferric reductases. *Molecular microbiology* **68**: 706-719.
- Gibson, D.G., L. Young, R.Y. Chuang, J.C. Venter, C.A. Hutchison, 3rd & H.O. Smith, (2009) Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature methods* **6**: 343-345.
- Glazer, A.N., (1982) Phycobilisomes: structure and dynamics. *Annual review of microbiology* **36**: 173-198.
- Gonzalez, R., A. Murarka, Y. Dharmadi & S.S. Yazdani, (2008) A new model for the anaerobic fermentation of glycerol in enteric bacteria: trunk and auxiliary pathways in *Escherichia coli*. *Metabolic engineering* **10**: 234-245.
- Grabar, T.B., S. Zhou, K.T. Shanmugam, L.P. Yomano & L.O. Ingram, (2006) Methylglyoxal bypass identified as source of chiral contamination in l(+) and d(-)-lactate fermentations by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology letters* **28**: 1527-1535.
- Griese, M., C. Lange & J. Soppa, (2011) Ploidy in cyanobacteria. *FEMS microbiology letters* **323**: 124-131.

- Hahm, D.H., J. Pan & J.S. Rhee, (1994) Characterization and evaluation of a *pta* (phosphotransacetylase) negative mutant of *Escherichia coli* HB101 as production host of foreign lipase. *Appl Microbiol Biotechnol* **42**: 100-107.
- Haldimann, A. & B.L. Wanner, (2001) Conditional-replication, integration, excision, and retrieval plasmid-host systems for gene structure-function studies of bacteria. *Journal of bacteriology* **183**: 6384-6393.
- Hansmann, S. & W. Martin, (2000) Phylogeny of 33 ribosomal and six other proteins encoded in an ancient gene cluster that is conserved across prokaryotic genomes: influence of excluding poorly alignable sites from analysis. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **50 Pt 4**: 1655-1663.
- Hasona, A., Y. Kim, F.G. Healy, L.O. Ingram & K.T. Shanmugam, (2004) Pyruvate formate lyase and acetate kinase are essential for anaerobic growth of *Escherichia coli* on xylose. *Journal of bacteriology* **186**: 7593-7600.
- Herring, C.D., J.D. Glasner & F.R. Blattner, (2003) Gene replacement without selection: regulated suppression of amber mutations in *Escherichia coli*. *Gene* **311**: 153-163.
- Huang, C.J., H. Lin & X. Yang, (2012) Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* **39**: 383-399.
- Hunter, I.S. & H.L. Kornberg, (1979) Glucose-Transport of *Escherichia coli* Growing in Glucose-Limited Continuous Culture. *Biochem J* **178**: 97-101.
- Iglesias, A.A., G. Kakefuda & J. Preiss, (1991) Regulatory and Structural Properties of the Cyanobacterial ADPglucose Pyrophosphorylases. *Plant physiology* **97**: 1187-1195.
- Ikeuchi, M. & S. Tabata, (2001) *Synechocystis* sp. PCC 6803 - a useful tool in the study of the genetics of cyanobacteria. *Photosynthesis research* **70**: 73-83.
- Ingledeu, W.J. & R.K. Poole, (1984) The respiratory chains of *Escherichia coli*. *Microbiological reviews* **48**: 222-271.
- Iuchi, S. & E.C. Lin, (1988) *arcA* (*dye*), a global regulatory gene in *Escherichia coli* mediating repression of enzymes in aerobic pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**: 1888-1892.

- Iuchi, S., Z. Matsuda, T. Fujiwara & E.C. Lin, (1990) The *arcB* gene of *Escherichia coli* encodes a sensor-regulator protein for anaerobic repression of the *arc* modulon. *Molecular microbiology* **4**: 715-727.
- Jahreis, K., L. Bentler, J. Bockmann, S. Hans, A. Meyer, J. Siepelmeier & J.W. Lengeler, (2002) Adaptation of sucrose metabolism in the *Escherichia coli* wild-type strain EC3132. *Journal of bacteriology* **184**: 5307-5316.
- Jeong, J.Y., Y.J. Kim, N. Cho, D. Shin, T.W. Nam, S. Ryu & Y.J. Seok, (2004) Expression of *ptsG* encoding the major glucose transporter is regulated by ArcA in *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* **279**: 38513-38518.
- Joseph, A., S. Aikawa, K. Sasaki, Y. Tsuge, F. Matsuda, T. Tanaka & A. Kondo, (2013) Utilization of lactic acid bacterial genes in *Synechocystis sp.* PCC 6803 in the production of lactic acid. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **77**: 966-970.
- Takefuda, G., Y.Y. Charng, A.A. Iglesias, L. McIntosh & J. Preiss, (1992) Molecular Cloning and Sequencing of ADP-Glucose Pyrophosphorylase from *Synechocystis* PCC 6803. *Plant physiology* **99**: 359-361.
- Kakuda, H., K. Shiroishi, K. Hosono & S. Ichihara, (1994) Construction of Pta-Ack pathway deletion mutants of *Escherichia coli* and characteristic growth profiles of the mutants in a rich medium. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **58**: 2232-2235.
- Kamarainen, J., H. Knoop, N.J. Stanford, F. Guerrero, M.K. Akhtar, E.M. Aro, R. Steuer & P.R. Jones, (2012) Physiological tolerance and stoichiometric potential of cyanobacteria for hydrocarbon fuel production. *Journal of biotechnology* **162**: 67-74.
- Kaneko, T., S. Sato, H. Kotani, A. Tanaka, E. Asamizu, Y. Nakamura, N. Miyajima, M. Hirosawa, M. Sugiura, S. Sasamoto, T. Kimura, T. Hosouchi, A. Matsuno, A. Muraki, N. Nakazaki, K. Naruo, S. Okumura, S. Shimpo, C. Takeuchi, T. Wada, A. Watanabe, M. Yamada, M. Yasuda & S. Tabata, (1996) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis sp.* strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes* **3**: 109-136.
- Kaplan, A., R. Schwarz, J. Lieman-Hurwitz & L. Reinhold, (1991) Physiological and molecular aspects of the inorganic carbon-concentrating mechanism in cyanobacteria. *Plant physiology* **97**: 851-855.

- Kim, N.J., H. Li, K. Jung, H.N. Chang & P.C. Lee, (2011) Ethanol production from marine algal hydrolysates using *Escherichia coli* KO11. *Bioresource Technol* **102**: 7466-7469.
- Kline, E.S. & H.R. Mahler, (1965) The lactic dehydrogenases of *E. coli*. *Annals of the New York Academy of Sciences* **119**: 905-919.
- Knoop, H., M. Grundel, Y. Zilliges, R. Lehmann, S. Hoffmann, W. Lockau & R. Steuer, (2013) Flux balance analysis of cyanobacterial metabolism: the metabolic network of *Synechocystis sp.* PCC 6803. *PLoS computational biology* **9**: e1003081.
- Knoop, H., Y. Zilliges, W. Lockau & R. Steuer, (2010) The metabolic network of *Synechocystis sp.* PCC 6803: systemic properties of autotrophic growth. *Plant physiology* **154**: 410-422.
- Kolisnychenko, V., G. Plunkett, 3rd, C.D. Herring, T. Feher, J. Posfai, F.R. Blattner & G. Posfai, (2002) Engineering a reduced *Escherichia coli* genome. *Genome research* **12**: 640-647.
- Kornberg, H.L. & J. Smith, (1967) Genetic control of the uptake of pyruvate by *Escherichia coli*. *Biochimica et biophysica acta* **148**: 591-592.
- Kreth, J., J.W. Lengeler & K. Jahreis, (2013) Characterization of pyruvate uptake in *Escherichia coli* K-12. *PloS one* **8**: e67125.
- Kwon, O., D. Georgellis, A.S. Lynch, D. Boyd & E.C. Lin, (2000) The ArcB sensor kinase of *Escherichia coli*: genetic exploration of the transmembrane region. *Journal of bacteriology* **182**: 2960-2966.
- Labarre, J., F. Chauvat & P. Thuriaux, (1989) Insertional mutagenesis by random cloning of antibiotic resistance genes into the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* strain PCC 6803. *Journal of bacteriology* **171**: 3449-3457.
- Laemmli, U.K., (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lang, V.J., C. Leystra-Lantz & R.A. Cook, (1987) Characterization of the specific pyruvate transport system in *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology* **169**: 380-385.
- Layton, D.S., A. Ajjarapu, D.W. Choi & L.R. Jarboe, (2011) Engineering ethanologenic *Escherichia coli* for levoglucosan utilization. *Bioresour Technol* **102**: 8318-8322.

- Lehr, F., M. Morweiser, R. Rosello Sastre, O. Kruse & C. Posten, (2012) Process development for hydrogen production with *Chlamydomonas reinhardtii* based on growth and product formation kinetics. *Journal of biotechnology* **162**: 89-96.
- Leiby, N. & C.J. Marx, (2014) Metabolic erosion primarily through mutation accumulation, and not tradeoffs, drives limited evolution of substrate specificity in *Escherichia coli*. *PLoS biology* **12**: e1001789.
- Li, Z.J., J. Jian, X.X. Wei, X.W. Shen & G.Q. Chen, (2010) Microbial production of meso-2,3-butanediol by metabolically engineered *Escherichia coli* under low oxygen condition. *Appl Microbiol Biotechnol* **87**: 2001-2009.
- Liu, G.L., G.Y. Fu, Z. Chi & Z.M. Chi, (2014) Enhanced expression of the codon-optimized exo-inulinase gene from the yeast *Meyerozyma guilliermondii* in *Saccharomyces sp.* W0 and bioethanol production from inulin. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**: 9129-9138.
- Liu, X., D. Brune, W. Vermaas & R. Curtiss, 3rd, (2010) Production and secretion of fatty acids in genetically engineered cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Liu, X., G.R. Pena Sandoval, B.L. Wanner, W.S. Jung, D. Georgellis & O. Kwon, (2009) Evidence against the physiological role of acetyl phosphate in the phosphorylation of the ArcA response regulator in *Escherichia coli*. *Journal of microbiology* **47**: 657-662.
- Loui, C., A.C. Chang & S. Lu, (2009) Role of the ArcAB two-component system in the resistance of *Escherichia coli* to reactive oxygen stress. *BMC microbiology* **9**: 183.
- Lutz, R. & H. Bujard, (1997) Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements. *Nucleic acids research* **25**: 1203-1210.
- Malpica, R., G.R.P. Sandoval, C. Rodriguez, B. Franco & D. Georgellis, (2006) Signaling by the arc two-component system provides a link between the redox state of the quinone pool and gene expression. *Antioxid Redox Sign* **8**: 781-795.
- Manderson, D., R. Dempster & Y. Chisti, (2006) A recombinant vaccine against hydatidosis: production of the antigen in *Escherichia coli*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* **33**: 173-182.

- Mao, H.B., G.F. Li, D.H. Li, Q.Y. Wu, Y.D. Gong, X.F. Zhang & N.M. Zhao, (2003) Effects of glycerol and high temperatures on structure and function of phycobilisomes in *Synechocystis sp.* PCC 6803. *FEBS letters* **553**: 68-72.
- Mat-Jan, F., K.Y. Alam & D.P. Clark, (1989) Mutants of *Escherichia coli* deficient in the fermentative lactate dehydrogenase. *Journal of bacteriology* **171**: 342-348.
- Mazumdar, S., M.D. Blankschien, J.M. Clomburg & R. Gonzalez, (2013) Efficient synthesis of L-lactic acid from glycerol by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Microbial cell factories* **12**: 7.
- McCleary, W.R. & J.B. Stock, (1994) Acetyl phosphate and the activation of two-component response regulators. *The Journal of biological chemistry* **269**: 31567-31572.
- Miao, X., Q. Wu, G. Wu & N. Zhao, (2003) Changes in photosynthesis and pigmentation in an *agp* deletion mutant of the cyanobacterium *Synechocystis sp.* *Biotechnology letters* **25**: 391-396.
- Nakamura, Y., T. Kaneko, M. Hirose, N. Miyajima & S. Tabata, (1998) CyanoBase, a www database containing the complete nucleotide sequence of the genome of *Synechocystis sp.* strain PCC 6803. *Nucleic acids research* **26**: 63-67.
- Nakao, M., S. Okamoto, M. Kohara, T. Fujishiro, T. Fujisawa, S. Sato, S. Tabata, T. Kaneko & Y. Nakamura, (2010) CyanoBase: the cyanobacteria genome database update 2010. *Nucleic acids research* **38**: D379-381.
- Nevoigt, E. & U. Stahl, (1997) Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS microbiology reviews* **21**: 231-241.
- Nicholson, W.L., (2008) The *Bacillus subtilis ydjL (bdhA)* gene encodes acetoin reductase/2,3-butanediol dehydrogenase. *Applied and environmental microbiology* **74**: 6832-6838.
- Ohta, K., D.S. Beall, J.P. Mejia, K.T. Shanmugam & L.O. Ingram, (1991) Genetic improvement of *Escherichia coli* for ethanol production: chromosomal integration of *Zymomonas mobilis* genes encoding pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase II. *Applied and environmental microbiology* **57**: 893-900.

- Oliver, J.W., I.M. Machado, H. Yoneda & S. Atsumi, (2013) Cyanobacterial conversion of carbon dioxide to 2,3-butanediol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: 1249-1254.
- Ota, M., Y. Kato, M. Watanabe, Y. Sato, R.L. Smith, Jr., R. Rosello-Sastre, C. Posten & H. Inomata, (2011) Effects of nitrate and oxygen on photoautotrophic lipid production from *Chlorococcum littorale*. *Bioresour Technol* **102**: 3286-3292.
- Pennington, H., (2010) *Escherichia coli* O157. *Lancet* **376**: 1428-1435.
- Perrenoud, A. & U. Sauer, (2005) Impact of global transcriptional regulation by ArcA, ArcB, Cra, Crp, Cya, Fnr, and Mlc on glucose catabolism in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **187**: 3171-3179.
- Peschke, T., (2014) Nicht stöchiometrische Fermentation in *Escherichia coli*. *Masterarbeit*.
- Pettinari, M.J., P.I. Nickel, J.A. Ruiz & B.S. Mendez, (2008) ArcA redox mutants as a source of reduced bioproducts. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* **15**: 41-47.
- Philip, S., T. Keshavarz & I. Roy, (2007) Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *J Chem Technol Biot* **82**: 233-247.
- Phue, J.N., S.J. Lee, J.B. Kaufman, A. Negrete & J. Shiloach, (2010) Acetate accumulation through alternative metabolic pathways in *ackA(-) pta(-) poxB(-)* triple mutant in *E. coli* B (BL21). *Biotechnology letters* **32**: 1897-1903.
- Pierce, J., T.J. Carlson & J.G. Williams, (1989) A cyanobacterial mutant requiring the expression of ribulose biphosphate carboxylase from a photosynthetic anaerobe. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**: 5753-5757.
- Plank, L.D. & J.D. Harvey, (1979) Generation time statistics of *Escherichia coli* B measured by synchronous culture techniques. *J Gen Microbiol* **115**: 69-77.
- Prohl, C., B. Wackwitz, D. Vlad & G. Uden, (1998) Functional citric acid cycle in an *arcA* mutant of *Escherichia coli* during growth with nitrate under anoxic conditions. *Archives of microbiology* **170**: 1-7.

- Pruss, B.M., (1998) Acetyl phosphate and the phosphorylation of OmpR are involved in the regulation of the cell division rate in *Escherichia coli*. *Archives of microbiology* **170**: 141-146.
- Raspor, P. & D. Goranovic, (2008) Biotechnological applications of acetic acid bacteria. *Critical reviews in biotechnology* **28**: 101-124.
- Renna, M.C., N. Najimudin, L.R. Winik & S.A. Zahler, (1993) Regulation of the *Bacillus subtilis* *alsS*, *alsD*, and *alsR* genes involved in post-exponential-phase production of acetoin. *Journal of bacteriology* **175**: 3863-3875.
- Richter, K. & J. Gescher, (2012) The molecular toolbox for chromosomal heterologous multiprotein expression in *Escherichia coli*. *Biochemical Society transactions* **40**: 1222-1226.
- Rippka, R., J. Deruelles, J.B. Waterbury, M. Herdman & R.Y. Stanier, (1979) Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *J Gen Microbiol* **111**: 1-61.
- Ryu, S. & M.N. Karim, (2011) A whole cell biocatalyst for cellulosic ethanol production from dilute acid-pretreated corn stover hydrolyzates. *Appl Microbiol Biotechnol* **91**: 529-542.
- Sagan, L., (1967) On the origin of mitosing cells. *Journal of theoretical biology* **14**: 255-274.
- Saha, B.C. & M.A. Cotta, (2011) Continuous ethanol production from wheat straw hydrolysate by recombinant ethanologenic *Escherichia coli* strain FBR5. *Appl Microbiol Biot* **90**: 477-487.
- Saha, B.C., N.N. Nichols & M.A. Cotta, (2011) Ethanol production from wheat straw by recombinant *Escherichia coli* strain FBR5 at high solid loading. *Bioresource Technol* **102**: 10892-10897.
- Salmon, K.A., S.P. Hung, N.R. Steffen, R. Krupp, P. Baldi, G.W. Hatfield & R.P. Gunsalus, (2005) Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12: effects of oxygen availability and ArcA. *The Journal of biological chemistry* **280**: 15084-15096.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch & T. Maniatis, (1989) Molecular Cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY* **2. Edition**.

- Sanger, F., S. Nicklen & A.R. Coulson, (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**: 5463-5467.
- Schmidt, M., K.R. Babu, N. Khanna, S. Marten & U. Rinas, (1999) Temperature-induced production of recombinant human insulin in high-cell density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *Journal of biotechnology* **68**: 71-83.
- Shanks, R.M., N.C. Caiazza, S.M. Hinsa, C.M. Toutain & G.A. O'Toole, (2006) *Saccharomyces cerevisiae*-based molecular tool kit for manipulation of genes from gram-negative bacteria. *Applied and environmental microbiology* **72**: 5027-5036.
- Shen, G., S. Boussiba & W.F. Vermaas, (1993) *Synechocystis* sp PCC 6803 strains lacking photosystem I and phycobilisome function. *The Plant cell* **5**: 1853-1863.
- Shen, X., Y. Lin, R. Jain, Q. Yuan & Y. Yan, (2012) Inhibition of acetate accumulation leads to enhanced production of (R,R)-2,3-butanediol from glycerol in *Escherichia coli*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* **39**: 1725-1729.
- Shukla, V.B., S. Zhou, L.P. Yomano, K.T. Shanmugam, J.F. Preston & L.O. Ingram, (2004) Production of D(-)-lactate from sucrose and molasses. *Biotechnology letters* **26**: 689-693.
- Simon, R., U. Priefer & A. Puhler, (1983) A Broad Host Range Mobilization System for In vivo Genetic-Engineering - Transposon Mutagenesis in Gram-Negative Bacteria. *Bio-Technol* **1**: 784-791.
- Smith, A.J., J. London & R.Y. Stanier, (1967) Biochemical basis of obligate autotrophy in blue-green algae and *thiobacilli*. *Journal of bacteriology* **94**: 972-983.
- Stanier, R.Y., R. Kunisawa, M. Mandel & G. Cohen-Bazire, (1971) Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriological reviews* **35**: 171-205.
- Steinsiek, S. & K. Bettenbrock, (2012) Glucose Transport in *Escherichia coli* Mutant Strains with Defects in Sugar Transport Systems. *Journal of bacteriology* **194**: 5897-5908.
- Stephens, P.E., M.G. Darlison, H.M. Lewis & J.R. Guest, (1983a) The pyruvate dehydrogenase complex of *Escherichia coli* K12. Nucleotide sequence

- encoding the dihydrolipoamide acetyltransferase component. *European journal of biochemistry / FEBS* **133**: 481-489.
- Stephens, P.E., M.G. Darlison, H.M. Lewis & J.R. Guest, (1983b) The pyruvate dehydrogenase complex of *Escherichia coli* K12. Nucleotide sequence encoding the pyruvate dehydrogenase component. *European journal of biochemistry / FEBS* **133**: 155-162.
- Sturm-Richter, K., (2014) Etablierung und Intensivierung von Mikroben-Anoden-Interaktionen in synthetischen und natürlichen exoelektrogenen Stämmen. *Doktorarbeit*.
- Tao, Y., Q. Cheng & A.D. Kopatsis, (2012) Metabolic engineering for acetate control in large scale fermentation. *Methods in molecular biology* **834**: 283-303.
- Tarmy, E.M. & N.O. Kaplan, (1968) Kinetics of *Escherichia coli* B D-lactate dehydrogenase and evidence for pyruvate-controlled change in conformation. *The Journal of biological chemistry* **243**: 2587-2596.
- Thony-Meyer, L., F. Fischer, P. Kunzler, D. Ritz & H. Hennecke, (1995) *Escherichia coli* genes required for cytochrome c maturation. *Journal of bacteriology* **177**: 4321-4326.
- Toya, Y., K. Nakahigashi, M. Tomita & K. Shimizu, (2012) Metabolic regulation analysis of wild-type and *arcA* mutant *Escherichia coli* under nitrate conditions using different levels of omics data. *Molecular bioSystems* **8**: 2593-2604.
- Tran, N.H. & G.S. Kannangara, (2013) Conversion of glycerol to hydrogen rich gas. *Chemical Society reviews* **42**: 9454-9479.
- Trchounian, K. & A. Trchounian, (2013) *Escherichia coli* multiple [Ni-Fe]-hydrogenases are sensitive to osmotic stress during glycerol fermentation but at different pHs. *FEBS letters* **587**: 3562-3566.
- Trotter, E.W., M.D. Rolfe, A.M. Hounslow, C.J. Craven, M.P. Williamson, G. Sanguinetti, R.K. Poole & J. Green, (2011) Reprogramming of *Escherichia coli* K-12 metabolism during the initial phase of transition from an anaerobic to a micro-aerobic environment. *PloS one* **6**: e25501.
- Ui, S., A. Mimura, M. Okuma & T. Kudo, (1998) The production of D-acetoin by a transgenic *Escherichia coli*. *Letters in applied microbiology* **26**: 275-278.

- Urban, P.F. & M. Klingenberg, (1969) On the redox potentials of ubiquinone and cytochrome b in the respiratory chain. *European journal of biochemistry / FEBS* **9**: 519-525.
- van Niel, E.W.J. & B. Hahn-Hagerdal, (1999) Nutrient requirements of lactococci in defined growth media. *Appl Microbiol Biot* **52**: 617-627.
- Varenne, S., F. Casse, M. Chippaux & M.C. Pascal, (1975) A mutant of *Escherichia coli* deficient in pyruvate formate lyase. *Molecular & general genetics : MGG* **141**: 181-184.
- Varma, A., B.W. Boesch & B.O. Palsson, (1993) Stoichiometric interpretation of *Escherichia coli* glucose catabolism under various oxygenation rates. *Applied and environmental microbiology* **59**: 2465-2473.
- Varman, A.M., Y. Yu, L. You & Y.J. Tang, (2013) Photoautotrophic production of D-lactic acid in an engineered cyanobacterium. *Microbial cell factories* **12**: 117.
- Vermaas, W.F.J., (2001) Photosynthesis and Respiration in Cyanobacteria. *In: Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publishing Group, London*: 1-7.
- Vivijs, B., P. Moons, A. Aertsen & C.W. Michiels, (2014) Acetoin Synthesis Acquisition Favors *Escherichia coli* Growth at Low pH. *Applied and environmental microbiology* **80**: 6054-6061.
- Voges, O. & B. Proskauer, (1898) Beitrag zur Ernährungsphysiologie und zur Differentialdiagnose der Bakterien der hämorrhagischen Septicämie. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten* **28**: 20-32.
- Walsh, G., (2006) Biopharmaceutical benchmarks 2006. *Nature biotechnology* **24**: 769-776.
- Wang, B., S. Pugh, D.R. Nielsen, W. Zhang & D.R. Meldrum, (2013a) Engineering cyanobacteria for photosynthetic production of 3-hydroxybutyrate directly from CO₂. *Metabolic engineering* **16**: 68-77.
- Wang, W., X. Liu & X. Lu, (2013b) Engineering cyanobacteria to improve photosynthetic production of alka(e)nes. *Biotechnology for biofuels* **6**: 69.
- Wang, X., L.P. Yomano, J.Y. Lee, S.W. York, H. Zheng, M.T. Mullinnix, K.T. Shanmugam & L.O. Ingram, (2013c) Engineering furfural tolerance in *Escherichia coli* improves the fermentation of lignocellulosic sugars into renewable chemicals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: 4021-4026.

- Weickert, M.J. & S. Adhya, (1993) The galactose regulon of *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* **10**: 245-251.
- Williams, J.G.K., (1988) Construction of Specific Mutations in Photosystem II Photosynthetic Reaction Center by Genetic-Engineering Methods in *Synechocystis* 6803. *Method Enzymol* **167**: 766-778.
- Wood, P.M., (1981) The redox potential for dimethyl sulphoxide reduction to dimethyl sulphide: evaluation and biochemical implications. *FEBS letters* **124**: 11-14.
- Xiao, Z. & J.R. Lu, (2014) Strategies for enhancing fermentative production of acetoin: a review. *Biotechnology advances* **32**: 492-503.
- Xiong, J., W.M. Fischer, K. Inoue, M. Nakahara & C.E. Bauer, (2000) Molecular evidence for the early evolution of photosynthesis. *Science* **289**: 1724-1730.
- Xu, P., J. Qiu, C. Gao & C. Ma, (2008) Biotechnological routes to pyruvate production. *Journal of bioscience and bioengineering* **105**: 169-175.
- Xu, Q., L. Xie, Y. Li, H. Lin, S. Sun, X. Guan, K. Hu, Y. Shen & L. Zhang, (2014a) Metabolic engineering of *Escherichia coli* for efficient production of (3R)-acetoin. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*: n/a-n/a.
- Xu, Y., H. Chu, C. Gao, F. Tao, Z. Zhou, K. Li, L. Li, C. Ma & P. Xu, (2014b) Systematic metabolic engineering of *Escherichia coli* for high-yield production of fuel bio-chemical 2,3-butanediol. *Metabolic engineering* **23**: 22-33.
- Yamamoto, I. & M. Ishimoto, (1977) Anaerobic growth of *Escherichia coli* on formate by reduction of nitrate, fumarate, and trimethylamine N-oxide. *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie* **17**: 235-242.
- Yomano, L.P., S.W. York, S. Zhou, K.T. Shanmugam & L.O. Ingram, (2008) Re-engineering *Escherichia coli* for ethanol production. *Biotechnology letters* **30**: 2097-2103.
- Yu, Y., L. You, D. Liu, W. Hollinshead, Y.J. Tang & F. Zhang, (2013) Development of *Synechocystis* sp. PCC 6803 as a phototrophic cell factory. *Marine drugs* **11**: 2894-2916.
- Zelic, B., T. Gerharz, M. Bott, D. Vasic-Racki, C. Wandrey & R. Takors, (2003) Fed-Batch Process for Pyruvate Production by Recombinant *Escherichia coli* YYC202 Strain. *Eng Life Sci* **3**: 299-305.

- Zelic, B., S. Gostovic, K. Vuorilehto, D. Vasic-Racki & R. Takors, (2004) Process strategies to enhance pyruvate production with recombinant *Escherichia coli*: from repetitive fed-batch to in situ product recovery with fully integrated electrodialysis. *Biotechnology and bioengineering* **85**: 638-646.
- Zhang, S. & D.A. Bryant, (2011) The tricarboxylic acid cycle in cyanobacteria. *Science* **334**: 1551-1553.
- Zhou, S., K.T. Shanmugam & L.O. Ingram, (2003) Functional replacement of the *Escherichia coli* D-(-)-lactate dehydrogenase gene (*ldhA*) with the L-(+)-lactate dehydrogenase gene (*ldhL*) from *Pediococcus acidilactici*. *Applied and environmental microbiology* **69**: 2237-2244.
- Zhou, S., K.T. Shanmugam, L.P. Yomano, T.B. Grabar & L.O. Ingram, (2006) Fermentation of 12% (w/V) glucose to 1.2 M lactate by *Escherichia coli* strain SZ194 using mineral salts medium. *Biotechnology letters* **28**: 663-670.
- Zhou, S., L.P. Yomano, K.T. Shanmugam & L.O. Ingram, (2005) Fermentation of 10% (w/V) sugar to D: (-)-lactate by engineered *Escherichia coli* B. *Biotechnology letters* **27**: 1891-1896.