

ulm university universität ulm

Effiziente Stärkeverwertung von *Corynebacterium glutamicum* für das Wachstum und die Produktion von organischen Säuren und Aminosäuren

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat. der Fakultät für Naturwissenschaften der Universität Ulm

vorgelegt von

Katrin Julia Breitinger

aus Biberach/Riß

Februar, 2013

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie der Universität Ulm unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Bernhard J. Eikmanns angefertigt.

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Joachim Ankerhold

1. Gutachter: Prof. Dr. Bernhard J. Eikmanns
2. Gutachter: Prof. Dr. Peter Dürre

Tag der Promotion: 22.05.13

The most exciting phrase to hear in science, the one that heralds new discoveries, is not 'Eureka!' but 'That's funny...'

Isaac Asimov (1919 – 1992), russisch-amerikanischer Biochemiker

Inhalt

Zusammenfassung **1**
Summary **3**
1. Einleitung **5**
2. Material und Methoden **11**
2.1 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide 11
2.2 Chemikalien, Enzyme, Materialien, Kits und Geräte 14
2.3 Nährmedien, Stammhaltung und Kultivierungsbedingungen 21
2.4 Zellaufschluss 27
2.4.1 Zellaufschluss im RiboLyser 27
2.4.2 Zellaufschluss mit der French Press 27
2.5 Arbeiten mit DNA 28
2.5.1 Transformation von Plasmid-DNA 28
2.5.2 Isolierung und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren 30
2.5.3 Sequenzierung von DNA 32
2.5.4 Überprüfung der gemeinsamen Codon-usage verschiedener Bakterien 32
2.5.5 Enzymatische Behandlung von DNA (Polymerasekettenreaktion) 33
2.5.6 Agarosegelelektrophorese 34
2.6 Arbeiten mit Proteinen 35
2.6.1 Inkubation von Kulturüberständen nach Wachstumsende mit stärkeabbauenden Enzymen 35
2.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 36
2.6.3 Konzentrieren von Proteinen in Kulturüberständen 37
2.6.4 Detektion von Proteinen in SDS-Polyacrylamid-Gelen 37
2.6.5 Westernblot 38
2.6.6 Proteinbestimmung mit dem „BCA Protein Assay“ 39
2.6.7 Bestimmung von Enzym-Aktivitäten 39
2.7 Chromatographische Trennverfahren 41
2.7.1 Quantitative Bestimmung von Aminosäuren 41
2.7.2 Quantitative Bestimmung von organischen Säuren 42
2.7.3 Detektion von Stärkeabbauprodukten auf Kieselgelplatten 42
2.7.4 Reinigen des Proteins GlgXHIS durch Affinitätschromatographie 43
2.8 Berechnung des Ertrages und der spezifischen Produktivität 44
2.9 Enzymatische Konzentrationsbestimmungen 45
2.10 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Stärke und Kulturproben 48
3. Ergebnisse **49**
3.1 Produktion der organischen Säuren Pyruvat und Succinat und der Aminosäure L-Lysin mit rekombinanten *C. glutamicum*-Stämmen aus Stärke 49

3.1.1 Produktion organischer Säuren mit *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke 49
3.1.1.1 Aerobe Produktion von Pyruvat mit *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) 49
3.1.1.2 Anaerobe Produktion von Succinat mit *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) 56
3.1.2 L-Lysinproduktion von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) mit verschiedenen Stärken als Substrate 60
3.1.2.1 Wachstumsverhalten und L-Lysinproduktion von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) mit unterschiedlichen Stärken 61
3.1.2.2 Dünnschichtchromatographische Analyse der nicht verwerteten Kohlenstoffe im Überstand der Wachstumsversuche mit *C. glutamicum* DM1729(pAmy) 66
3.1.2.3 L-Lysinerträge und spezifische Produktivität von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) mit unterschiedlichen Substraten 68
3.1.2.4 Fermentation von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) mit nicht aufgekochter Weizenstärke als Substrat im DASGIP-Fermenter 72
3.1.2.5 Elektronenmikroskopische Aufnahmen verschiedener Stärkepulver und einer Kulturprobe von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) mit Weizenstärke als Substrat 74
3.1.3 L-Lysinproduktion von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) mit Glykogen als Substrat 78
3.2 Vollständiger Stärkeabbau durch rekombinante *C. glutamicum*-Stämme 80
3.2.1 Stärkeabbau durch Expression von Genen stärkeabbauender Enzyme in *C. glutamicum* 81
3.2.1.1 Homologe, stärkeabbauende Enzyme aus *C. glutamicum* 81
3.2.1.2 Amylopullulanase ApuB aus *B. breve* S27 82
3.2.1.3 Inkubation verbliebener Kohlenstoffverbindungen im Überstand von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) mit Amyloglukosidase aus *Aspergillus niger*, Isoamylase aus *Pseudomonas sp.* bzw. Pullulanase aus *Klebsiella pneumoniae* 90
3.2.1.4 Pullulanase aus *Klebsiella pneumoniae* 92
3.2.1.5 Optimierung von *C. glutamicum*-Stämmen zum vollständigen Abbau der nicht verbrauchten Kohlenhydrate im Überstand 97
3.3 Einfluss stärkeabbauender Enzyme auf die Glykogenbildung während der exponentiellen Wachstumsphase 114
4. Diskussion 117
4.1 Produktion der organischen Säuren Pyruvat und Succinat und der Aminosäure L-Lysin mit rekombinanten *C. glutamicum*-Stämmen aus Stärke 117
4.2 Vollständiger Stärkeabbau durch rekombinante *C. glutamicum*-Stämme 125
5. Literaturverzeichnis 131
Abkürzungen 143
Publikationen 147
Danksagung 148
Abgrenzung der Eigenleistung 150
Lebenslauf 153

Zusammenfassung

Corynebacterium glutamicum ist ein fakultativ anaerobes, Gram-positives Bodenbakterium, das verschiedene Kohlenhydrate und organische Säuren als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen kann und dessen wesentlicher Einsatzschwerpunkt in der biotechnologischen Produktion von Aminosäuren, wie L-Glutamat und L-Lysin liegt. Neben der Aminosäureproduktion konnte *C. glutamicum* ebenfalls erfolgreich als Biokatalysator für die biobasierte Produktion chemischer Grundbausteine, wie Pyruvat und Succinat, eingesetzt werden. Als Ausgangssubstrat diente dafür Glukose, die durch eine relativ aufwendige und kostenintensive Aufbereitung von Stärke gewonnen wird.

In dieser Arbeit wurde durch das Einbringen des Plasmides pAmy, welches das Gen für die α-Amylase aus *Streptomyces griseus* trägt, in den Acetat-auxotrophen, Pyruvat- und Succinat-Produzenten *C. glutamicum* ELB-P ein Stamm zur effizienten Produktion von Pyruvat aus löslicher Kartoffelstärke entwickelt. *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) produzierte im Schüttelkolben 160 mM Pyruvat, mit einem Kohlenstoff-normierten Pyruvatertrag von 0,45 mol C pro mol C. Unter Berücksichtigung der nicht verbrauchten Menge an Substrat erhöhte sich der Ertrag auf 0,53 mol C pro mol C. Bei der anaeroben Produktion von Succinat verblieb beinahe die Hälfte des eingesetzten Substrats im Medium zurück, dennoch produzierte der Stamm 64 mM Succinat, mit einem Succinatertrag von 0,38 mol C pro mol C bzw. 0,82 mol C pro mol C unter Berücksichtigung der nicht verbrauchten Substratmenge.

In einer weiteren Untersuchung wurde gezeigt, dass neben löslicher Kartoffelstärke auch Kartoffel-, Mais-, Reis-, und Weizenstärke als Substrate für pAmy-tragende *C. glutamicum*-Stämme in Frage kommen. Durchgeführt wurden diese Versuche mit dem L-Lysinproduzenten *C. glutamicum* DM1729(pAmy). Die Substrate wurden in aufgekochter und in roher Form als Kohlenstoff- und Energiequelle getestet. Dabei zeigte sich, dass dieser Stamm alle verwendeten Stärken, bis auf die nicht aufgekochte, lösliche Kartoffelstärke als Substrat für Wachstum und L-Lysinproduktion verwerten konnte. Mit nicht aufgekochter Weizenstärke erreichte der Stamm mit 17 mM die höchste L-Lysinkonzentration im Medium. Ebenfalls erzielte *C. glutamicum* DM1729(pAmy) mit nicht aufgekochter Weizenstärke mit 0,16 mmol L-Lysin pro mmol Glukose den höchsten substratspezifischen Ertrag. Dieser Ertrag ist vergleichbar zu dem erreichten L-Lysinertrag des Stammes mit einer vergleichbaren Menge an Glukose als Substrat. Durch eine kontrollierte Versuchsdurchführung im Fermenter konnte der Ertrag noch um 56 % gesteigert werden. Neben den bisher erwähnten Stärken konnte auch gezeigt werden, dass *C. glutamicum* DM1729(pAmy) das stärkeähnliche Glykogen als Kohlenstoffquelle nutzen kann.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten deutliche Unterschiede in der Morphologie und der Anordnung von Knollenstärkekörner (lösliche Kartoffel- und Kartoffelstärke) und Getreidestärkekörner (Mais-, Reis- und Weizenstärke). Die Form variierte zwischen rund bei den Knollenstärken, kantig, quaderähnlich bei den Mais- und Reisstärkekörner und rund-oval bis scheibenförmig bei den Weizenstärkekörner. Elektronenmikroskopische Aufnahmen des in CgC-Minimalmedium inkubierten Weizenstärkepulvers zeigten rundliche Körner mit herausstehenden Stärkeketten. Aufnahmen von Kulturproben von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit Weizenstärke zeigten eine Anlagerung der Bakterien an diese Stärkeketten.

Dünnschichtchromatographische Analysen zeigten nach Versuchsende sowohl bei der Produktion von Pyruvat und Succinat als auch bei der Produktion von L-Lysin mit *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) bzw. *C. glutamicum* DM1729(pAmy) nicht verwertete Kohlenhydrate im Medium. Dies ist der Eigenschaft der sezernierten α-Amylase aus *Streptomyces griseus* zuzuschreiben, die lediglich die α-1,4-glykosidischen Verknüpfungen der Stärke spalten kann. Untersuchungen verschiedener, stärkeabbauender Enzyme zeigten, dass die Pullulanase aus *Klebsiella pneumoniae* die nicht verwerteten Kohlenhydrate im Überstand von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) beinahe vollständig zu Maltose abbaut. Die Zugabe von Pullulanase in das Medium während des Wachstums von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) mit aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke führte zu einer Verdopplung der maximal erreichten L-Lysinkonzentration. Ausserdem wurde annähernd die gesamte Menge an Substrat durch *C. glutamicum* verwertet. Zudem wurden *C. glutamicum*-Stämme entwickelt, die eine aktive Pullulanase sezernieren.

Die Plasmid-gesteuerte Expression des *pulA*-Gens aus *K. pneumoniae* mit vorgelagerter Signalsequenz sowohl für das Sec- als auch für das Tat-Sekretionssystem führten zu einer aktiven Pullulanase im Zelllysat und in der Zellmembran von *C. glutamicum* DM1729. Die Zugabe von α-Amylase in das Medium dieser Stämme führte zu einem annähernd vollständigen Abbau der eingesetzten Stärke. Die Abbauprodukte wurden von *C. glutamicum* DM1729 effizient für das Wachstum und zur L-Lysinproduktion genutzt. Die Konstruktion eines Stammes, der sowohl die α-Amylase als auch die Pullulanase sezerniert und damit die Stärke noch effizienter umsetzt, wurde ebenfalls durchgeführt.

Summary

Corynebacterium glutamicum is a facultative anaerobic, Gram-positive soil bacterium, capable to use a variety of carbohydrates and organic acids as carbon and energy source. It is widely used in the industrial production of amino acids, particularly L-glutamate and L-lysine. In addition *C. glutamicum* was successfully used as a biocatalyst for the production of bio-based chemical building blocks, such as pyruvate and succinate. In general, for these purposes glucose is used as substrate, which has to be produced from the renewable resource starch in a time consuming and cost intensive process.

In this work, the acetate auxotrophic mutant *C. glutamicum* ELB-P, a pyruvate and succinate producing strain, was engineered to become an efficient producer of pyruvate from boiled soluble potato starch, by transformation with plasmid pAmy, carrying the gene of the α-amylase from *Streptomyces griseus*. In shake flask experiments, *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) produced up to 160 mM pyruvate in a growth-decoupled manner, with a maximum pyruvate yield of 0.45 mol C per mol C of substrate, carbon-normalized. Considering the remaining amount of substrate the yield increased to 0.53 mol C per mol C of substrate. However, during anaerobic production of succinate, the cells showed remaining carbohydrates half of the beginning amount. Nevertheless, this strain produced up to 64 mM succinate with a maximum yield of 0.38 mol C per mol C or 0.82 mol C per mol C considering the remaining amount of substrate.

In addition to soluble potato starch also potato, corn, rice and wheat starch were tested as substrate for *C. glutamicum* strains carrying pAmy. These starches were tested boiled as well as raw in CgC-minimal medium as carbon and energy source for the L-lysine producer *C. glutamicum* DM1729(pAmy). This strain was able to utilize all the starches with growth and L-lysine production, except the raw potato starch. With raw wheat starch, the strain reached the highest L-lysine concentration with 17 mM. Similarly, the highest L-lysine yield with 0.16 mmol L-lysine per mmol glucose units was achieved with raw wheat starch. This was in the same range of the yield observed with a comparable amount of glucose as substrate. A fermentation system was established leading to an increase of the L-lysine yield up to 56 %. In addition to the starches, the starch-like compound glycogen was also used by *C. glutamicum* DM1729(pAmy) as carbon and energy source.

Electron microscopy showed distinct differences in morphology and arrangement of tuber starch grains (soluble potato starch and potato starch) and cereal starch grains (corn, rice and wheat starch). The shape varied from round shaped (tuber starch grains) to edged and rectangular shaped (corn and rice starch grains) or round-oval to disk shaped (wheat starch grains). Electron microscopic images of wheat starch grains incubated in CgC minimal

medium showed round shapes sticking out starch chains. Images of culture samples of *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in CgC minimal medium with raw wheat starch showed an attachment of the bacteria to the starch chains.

Both for production of pyruvate and succinate as well as for production of L-lysine with *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) and *C. glutamicum* DM1729(pAmy), respectively, not utilized carbohydrates in the medium were detected by thin layer chromatography analyses in the medium at the end of the experiments. This is attributed to the property of the secreted α-amylase from *Streptomyces griseus* to cleave only the α-1,4-glycosidic linkages of starch. During in vitro analysis of different starch degrading enzymes, the combination of α-amylase and pullulanase from *Klebsiella pneumoniae* showed an almost complete degradation of the remaining carbohydrates to maltose. The addition of pullulanase to the medium during the production of L-lysine with *C. glutamicum* DM1729(pAmy) with boiled soluble potato starch as substrate led to a doubling of the concentration of L-lysine. Furthermore, the substrate was consumed almost completely by *C. glutamicum*. Additionally, *C. glutamicum* strains were constructed able to release active pullulanase in the medium.

The plasmid-driven expression of the *pulA*-gene from *K. pneumoniae* with upstream signal sequence for both the Sec and the Tat secretion system resulted in an active pullulanase in cell lysate and in the cell membrane of *C. glutamicum* DM1729. Adding α-amylase to the medium of these strains resulted in an almost complete degradation of the starch. The degradation products could be utilized efficiently by *C. glutamicum* DM1729 for growth and L-lysine production. The construction of a strain secreting both the α-amylase and the pullulanase to degrade starch more efficiently was also performed.

1. Einleitung

Corynebacterium glutamicum (Abbildung 1) ist ein unbewegliches, Gram-positives, fakultativ anaerobes und nicht-sporulierendes Bodenbakterium, das erstmals 1957 im Zuge eines „Screenings“ nach L-Glutamat-ausscheidenden Mikroorganismen isoliert wurde (Kinoshita et al., 1957; Nishimura et al., 2007; Takeno et al., 2007). Namensgebend waren zum einen die keulenförmige Morphologie (griechisch coryne = Keule) und zum anderen die Eigenschaft, dass bereits der Wildtyp signifikante Mengen an L-Glutamat ausscheiden kann. Phylogenetisch wird die Gattung *Corynebacterium* zusammen mit den Gattungen *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* und *Gordonia* in die Gruppe der Actinomyceten eingeteilt (Minnikin et al., 1978; Ochi, 1995; Stackebrandt et al., 1997; Liebl, 2005). Diese Bakterien zeichnen sich durch eine mykolsäurehaltige Zellwandzusammensetzung aus, welche die komplette Zelle vermutlich als Doppelschicht umgibt (Minnikin et al., 1978). Diese Mykolsäureschicht ist der Grund für die außerordentlich niedrige Permeabilität der Zellhülle (Nikaido, 1994).

Da *C. glutamicum* als GRAS-Organismus („Generally Recognized As Safe“) geführt wird, dient das Bakterium in der aktuellen Forschung als Modellorganismus für seine humanpathogenen Verwandten, wie z. B. *C. diphtheriae* und *Mycobacterium tuberculosis* (Funke et al., 1997; Dover et al., 2004; Micklinghoff et al., 2009). Jedoch liegt der wesentliche Einsatzschwerpunkt von *C. glutamicum* im Bereich der biotechnologischen

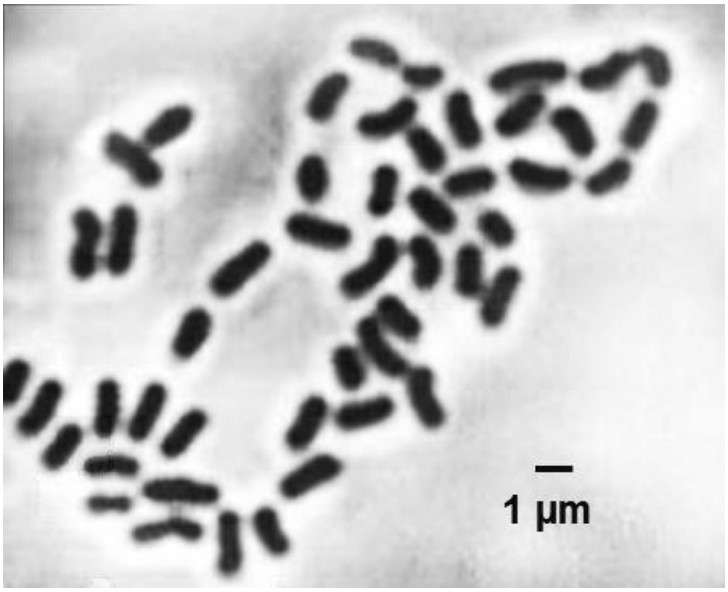

Abbildung 1: Mikroskopische Aufnahme von *C. glutamicum* WT während der frühen exponentiellen Wachstumsphase.

Produktion von Aminosäuren wie L-Glutamat, L-Lysin, L-Valin, L-Threonin, L-Alanin und L-Isoleucin (Cremer et al., 1988; Sahm et al., 1996; Leuchtenberger et al., 2005; Rademacher & Eggeling, 2007; Takors, 2007; Jojima et al., 2010) und organischen Säuren wie D-Laktat, Acetat, Pyruvat und Succinat (Yasuda et al., 2007; Okino et al., 2008a,b; Litsanov et al., 2012; Wieschalka et al., 2012a,b). Dieses breite Produktspektrum zeigt die wirtschaftliche Bedeutung von *C. glutamicum* für die Lebensmittel-, Futtermittel-,Pharma-, Kosmetik- und Gesundheitsindustrie (Food-Oct2010, Ajinomoto; Food-Oct2011, Ajinomoto; Leuchtenberger et al., 2005; Li et al., 2001; McKinlay et al., 2007). In neuen Studien wird auch die Herstellung von Biokraftstoffen wie Isobutanol durch *C. glutamicum* beschrieben (Smith et al., 2010; Blombach et al., 2011). Die in der Industrie eingesetzten Produktionsstämme wurden durch Mutagenese- und Selektionsverfahren bzw. durch eine gezielte genetische Manipulation bestimmter Stoffwechselwege erhalten. Die genetische Manipulation wurde durch die vollständige Entschlüsselung des Wildtypgenoms von *C. glutamicum* ermöglicht (Ikeda & Nakagawa, 2003; Kalinowski et al., 2003). Das Genom umfasst 3,25 MBp und weist einen G/C-Gehalt von über 50 % auf, wodurch *C. glutamicum* zu den G/C-reichen Bakterien gehört.

Ein Vorteil bei der Verwendung von *C. glutamicum* als Produktionsstamm ist die Eigenschaft des Bakteriums, auf kostengünstigen Minimalmedien wachsen zu können, wodurch die Produktionskosten gering gehalten werden können. Als Kohlenstoff- und Energiequelle kann *C. glutamicum* WT für das Wachstum und die Produktion eine ganze Reihe niedermolekularer Zucker wie Glukose, Maltose, Fructose, Saccharose, und Maltotriose sowie Ethanol und verschiedene organische Säuren nutzen (Udaka, 1959; Liebl, 1991; Gerstmeir et al., 2003; Liebl, 2005; Arndt & Eikmanns, 2007; Seibold & Blombach, 2010). Das Glukosepolymer Stärke kann von *C. glutamicum* WT nicht als Substrat genutzt werden (Seibold et al., 2006). Um Stärke für *C. glutamicum* zugänglich zu machen werden in der biotechnologischen Industrie größtenteils Stärkehydrolysate, Maisquellwasser sowie Rübenzuckermelasse als Substrat eingesetzt, die durch die Hydrolysierung von Rohstärke gewonnen werden (Hermann, 2003; Ikeda & Nakagawa 2003; Kelle et al., 2005).

Stärke besteht aus Amylose und Amylopektin und ist nach Cellulose der am häufigsten vorkommende polymere Zucker in der Natur. Sie stellt das wesentliche Sekundärprodukt der Photosynthese in Pflanzen dar und kommt ausschließlich in Plastiden vor. Durch die Anhäufung der Stärke entstehen dort die sogenannten Stärkekörner (Martin & Smith, 1995). Je nach pflanzlicher Herkunft variieren die Anteile der beiden Glukosepolymere Amylose und Amylopektin in den Stärkekörnern. Abbildung 2 zeigt die Grundstrukturen dieser beiden Polymere.

Die meisten Stärken natürlich vorkommender Pflanzen weisen eine Zusammensetzung von etwa 25 % Amylose und 75 % Amylopektin auf (Schopfer & Brennike, 2006). Die spiralförmige Amylose ist ein linear aufgebautes Molekül und besteht aus α-1,4-glykosidisch verknüpften Glukoseeinheiten. Das Amylopektin setzt sich ebenfalls aus α-1,4-glykosidischen Glukoseverknüpfungen zusammen, wobei zusätzlich noch α-1,6-glykosidische Verknüpfungen auftreten. Diese α-1,6-glykosidische Verknüpfungen sind nach etwa allen 24 bis 30 α-1,4-glykosidisch verknüpften Glukoseeinheiten zu finden, wodurch ein verzweigtes Glukosepolymer entsteht. Dadurch ist der Anteil an α-1,6-glykosidischen Verknüpfungen etwa 4 % der glykosidischen Verbindungen in der Stärke (Swinkels, 1985; Warren, 1996).

Stärke als Substrat besitzt in der biotechnologischen Industrie den Vorteil, dass sie als nachwachsender Rohstoff in großem Umfang zur Verfügung steht. Das Einsatzgebiet verschiedener Stärkearten als Substrat korreliert dabei mit den geographischen, meteorologischen und traditionellen Voraussetzungen der jeweiligen Produktionsstandorte. Zudem wird die Auswahl des Rohstoffes insbesondere auf Grund des Preises, der technologischen Eignung und der Wirtschaftlichkeit des Gewinnungsverfahrens getroffen. Genaue Angaben über die industrielle Produktionsmengen von Rohstärken bzw. Stärkederivate sind sehr schwer zu erhalten. Weltweit wurde 2005 die Produktionsmenge an Rohtärke auf 58 Mio. t geschätzt (Zuckerforschung Tulln [ZFT] GmbH, 2012), mit steigender

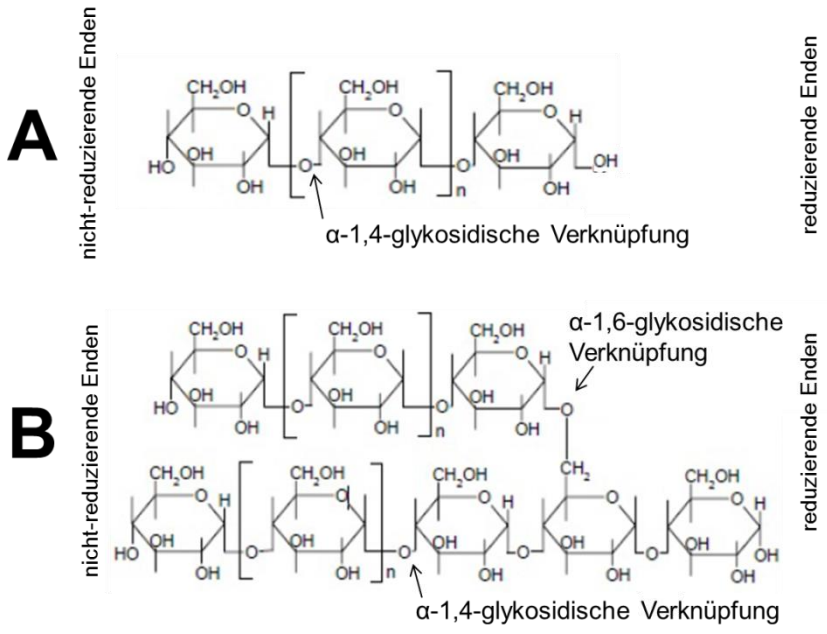

Abbildung 2: Grundstruktur von Amylose (A) und Amylopektin (B). Nach Seibold, 2007.

Tendenz. Der Anteil in der EU produzierter Rohstärke lag im Jahr 2010 bei etwa 22 Mio. t, wovon 4,7 Mio. t in Deutschland produziert wurden (Fachverband der Stärke-Industrie, 2012). Weltweit basiert die produzierte Stärke zu 81 % auf Mais, 9 % auf Weizen, 5 % auf Kartoffel und 5 % auf Maniok und Reis. Die wichtigste Maisproduktionsfläche ist der sogenannte „Corn belt“ in Nordamerika (Kimura, 2005). Innerhalb Europas ist Mais mit 46 % ebenfalls der wichtigste Rohstärkelieferant, jedoch kommt in Europa dem Weizen mit 33 % und der Kartoffel mit 21 % Anteil an der Stärkeproduktion eine viel größere Bedeutung zu als in der restlichen Welt (Zuckerforschung ZFP Tulln [ZFT] GmbH, 2012). Zur biotechnologischen Nutzung wird die Stärke durch verschiedene Aufbereitungsverfahren aus den Pflanzenteilen extrahiert. Die erhaltene Rohstärke wird dann durch eine enzymatische bzw. säurekatalytische Hydrolyse zu Stärkehydrolysat verzuckert, was mit einem hohen Zeitaufwand verbunden ist (Tegge, 2004a). Durch die anschließenden Reinigungsverfahren der Stärkehydrolysate zur Entfernung der eingesetzten Säuren entstehen zudem hohe Kosten. Da die Substratkosten einen wichtigen variablen Faktor in der biotechnologischen Produktion darstellen, ist das Ziel der Industrie, die Rohstärke direkt zu nutzen um die kostenintensive Aufbereitung der Stärke zu vermeiden. Ein Ansatz ist die Nutzung von Produktionsstämmen, die in der Lage sind, stärkeabbauende Enzyme zu exportieren, welche die Rohstärke dann zu Produkten abbauen, die von dem eingesetzten Stamm als Energie- und Kohlenstoffquelle genutzt werden können. Die bisher am besten untersuchten stärkeabbauenden Enzyme sind die sezernierten Amylasen aus der Gattung *Bacillus*, die die α-1,4-glykosidischen Verknüpfungen der Stärke spalten (Manning & Campbell, 1961; Welker & Campbell, 1967; Saito, 1973; Buonocore et al., 1976; Vihinen & Mäntsälä, 1989). Ebenfalls liegen Studien zu den äußerst stabilen extrazellulären Amylasen von extremophilen Bakterien (Liebl et al., 1997; Mijts & Patel, 2002) und Archaeen (Kobayashi et al., 1992; Dong et al., 1997; Worthington et al., 2003) vor. Auch wurden die Amylasen der Gattung *Streptomyces*, die der Ordnung *Actinomycetales* angehören, näher charakterisiert (Simpson & McCoy, 1953; Hoshiko et al., 1987; Virolle et al., 1988; Virolle & Bibb, 1988). Mit promoterlosen Amylase-Genen aus *Bacillus subtilis* und *Staphylococcus griseus* konnten bereits Plasmide konstruiert werden, die eine heterologe Expression in *Nocardiaceae* (Chary et al., 1997) und in *Corynebacteriacea* (Cadenas et al., 1992, 1996; Ugorcakova et al., 1996, 2000) von Amylasen ermöglichen. Seibold et al. 2006 konnten zum ersten Mal einen *C. glutamicum* Stamm konstruieren, der das heterologe Gen *amyA* für die α-Amylase aus *S. griseus* auf dem Plasmid pAmy exprimierte und das entstandene Enzym ausschleusen konnte. Dieser Stamm war dadurch in der Lage, aufgekochte lösliche Kartoffelstärke effektiv als Substrat zum Wachstum und zur L-Lysinproduktion zu nutzen. Ein Vorteil bei der Verwendung von *C. glutamicum* zur Produktion heterologer Exoproteine ist, dass dieses Bakterium bis auf eine bereits identifizierte DNase, keine weiteren Proteine mit hydrolytischer

enzymatischer Aktivitäten wie Nukleasen, Glukanasen oder Proteasen sezerniert (Liebl & Sinskey, 1988). Dadurch muss nicht befürchtet werden, dass, im Gegensatz zu den klassischen Proteinproduzenten wie *B. subtilis,* die sekretierten Proteine durch *C. glutamicum* sofort wieder abgebaut werden (Palva, 1989; Priest, 1977). Andere Arbeitsgruppen zeigten, dass auch Amylasen aus *S. bovis* und *B. subtilis* erfolgreich zum Stärkeabbau und damit zur Aminosäureproduktion durch rekombinante *C. glutamicum* Stämmen eingesetzt werden können (Tateno et al., 2007a,b; Yao et al., 2009). Die verwendeten Substrate waren aufgekochte, lösliche Kartoffelstärke bzw. rohe Mais-, Weizen-, Kartoffel- und Süßkartoffelstärke. Unabhängig von der verwendeten α-Amylase zeigten dünnschichtchromatographische Analysen bzw. die Bestimmung der Restglukose-Einheiten im Medium nach Wachstumsende bei allen auf Stärkeabbau untersuchten rekombinanten *C. glutamicum* Stämmen noch nicht verbrauchte Kohlenhydrate im Überstand (Seibold et al., 2006; Tateno et al., 2007a,b; Yao et al., 2009). Dies wird der Eigenschaft der α-Amylasen zugeschrieben, nur die α-1,4-glykosidischen Verknüpfungen der Stärke abbauen zu können wodurch Verbindungen mit α-1,6-glykosidischen Verknüpfungen im Medium verbleiben. Das Ausschleusen der gebildeten α-Amylase erfolgte bei allen bisher beschriebenen rekombinanten *C. glutamicum* Stämmen mit Signalsequenzen, die das Ausschleusen über das sogenannte Sec-System ermöglichen. Die Bezeichnung „Sec“ ist abgeleitet vom englischen Ausdruck „general secretory (Sec) pathway“. Die Proteintranslokation geschieht bei diesem System im entfalteten Zustand (Dalbey & Von Heijne, 1992; Economou, 1999) und ist das weitverbreitetste System zum Ausschleusen von Exoproteinen und Transmembranproteinen. Es ist in vergleichbarer Form in allen Organismen zu finden (Paetzel et al., 2002). Neben diesem System besitzt *C. glutamicum* zur Sekretion von Proteinen auch das Tat-System, dessen Namen sich von der spezifischen Lokalisation zweier Arginin-Moleküle in der Signalsequenz herleitet (twin-arginine translocator). Das Ausschleusen von Proteinen erfolgt mit diesem System in gefalteter Form und ist Sec-unabhängig (Berks et al., 1996; Yen et al., 2002).

Kernthema dieser Arbeit war die effiziente Stärkeverwertung von *C. glutamicum* für das Wachstum und die Produktion von organischen Säuren und Aminosäuren. Dabei war ein Themenschwerpunkt die Produktion der organischen Säuren Pyruvat und Succinat mit *C. glutamicum* in CgC-Minimalmedium mit aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke als Substrat. Hierfür wurden dem Pyruvat- und Succinatproduzenten *C. glutamicum* Δ*aceE* Δ*pqo* Δ*ldhA* ΔC-T *ilvN* Δ*alaT* Δ*avtA* (kurz: *C. glutamicum* ELB-P) das Plasmid pAmy eingebracht (Seibold et al., 2006; Wieschalka et al., 2012a,b). Der neu generierte Stamm *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) wurde hinsichtlich seines Wachstumsverhalten sowie der Produktion von Pyruvat und Succinat mit aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke untersucht.

Ein weiterer Schwerpunkt war die Produktion von L-Lysin mit dem neu generierten, L-Lysin-produzierenden Stamm *C. glutamicum* DM1729(pAmy) mit verschiedenen aufgekochten bzw. nicht aufgekochten pflanzlichen Rohstärken bzw. mit dem stärkeähnlichen Glykogen als Substrat. Dabei wurden das Wachstum sowie die L-Lysinproduktion als Anhaltspunkte für die Verwertung der verschiedenen Stärken verwendet. Mit elektronenmikroskopischen Bildern der verschiedenen Stärkekörner wurde der Frage nachgegangen, ob die Unterschiede im Wachstumsverhalten und in der L-Lysinproduktion von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) mit den getesteten Stärken als Substrat in einem Zusammenhang mit den unterschiedlichen Morphologien der Stärkekörner stehen.

Ein weiterer Themenschwerpunkt dieser Arbeit war die Reduktion der nicht verbrauchten Kohlenhydrate im Überstand des Stammes *C. glutamicum* DM1729(pAmy) bei Wachstum in CgC-Minimalmedium mit aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke als Substrat. Die nicht verbrauchten Kohlenhydrate zeigten dabei das ungenutzte Potential der eingesetzten Stärke, die somit nicht vollständig zum Wachstum bzw. zur Produktion von L-Lysin genutzt wurde. Für den vollständigen Abbau der eingesetzten Stärke wurden Enzyme getestet, die alleine oder in Kombination mit der α-Amylase aus *S. griseus* die Stärke vollständig zu Produkten abbauen können, die *C. glutamicum* dann als Energie- und Kohlenstoffquelle nutzen kann. Ziel war es dabei, den Ertrag bezogen auf die gesamt eingesetzte Substratmenge zu erhöhen und die nicht verwertbaren Kohlenhydrate im Medium stark zu reduzieren. Die Sekretion der in Frage kommenden Enzyme wurde sowohl mit einer Signalsequenz für das Sec- als auch das Tat-System in *C. glutamicum* getestet. Des Weiteren wurde untersucht, ob die Bildung dieser stärkeabbauenden Enzyme in rekombinanten *C. glutamicum* DM1729-Stämmen einen Einfluss auf den Glykogengehalt im Zelllysat während der exponentiellen Wachstumsphase haben.

2. Material und Methoden

2.1 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

Bakterienstämme

Tabelle 1 enthält die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme.

Tabelle 1: Alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme. Angaben über Stämme, die Plasmide tragen finden sich in den entsprechenden Versuchsbeschreibungen.

Stamm	Eigenschaften	Referenz
Bifidobacterium breve MB226	*B. breve* Typ MB226	Stammsammlung des Institutes für Pharmazie, Universität Bologna, Italien
B. breve S9	Isolat aus Stuhlprobe eines gestillten Säuglings	Staudt, 2002
B. breve S27	Isolat aus Stuhlprobe eines gestillten Säuglings	Staudt, 2002
C. glutamicum ATCC13032	Wildtyp	Abe et al., 1967
C. glutamicum Δ*glgX*	*C. glutamicum* ATCC 13032 mit deletiertem Gen für das Glykogenentweigungsenzym	Von Zaluskowski, unveröffentlicht
C. glutamicum DM1729	*pyc*^{P458S}, *hom*^{V59A}, *lysC*^{T311I}, abstammend von *C. glutamicum* WT	Georgi et al., 2005
C. glutamicum ELB-P	Δ*ace*E, Δ*pqo*, Δ*ldh*A, ΔC-T *ilv*N, Δ*ala*T, Δ*avt*A	Wieschalka et al., 2012a
E. coli DH5α	F-, λ-, *end*A1, *rec*A1, *gln*V44, *thi*-1, *hsd*R17(r-, m+), *sup*E44, *rel*A1, *gyr*A96, *deo*R, Φ80d*lac*ZΔM15, Δ(*lac*ZYA-*arg*F)U169, *pho*A	Hanahan, 1985
E. coli BL21(DE3)	*E. coli* B, F$^-$, *dcm, omp*T, *hsd*S(r_{B^-} m_{B^-}), *gal* λ(DE3)	Invitrogen GmbH, Darmstadt

Plasmide

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

Tabelle 2: Alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide und deren wichtigsten Eigenschaften.

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pAmy	Tet^R, *lac*Iq, *trc*P, oriV, *amy*A-Gen aus *Streptomyces griseus* IMRU 3570	Seibold et al., 2006
pCHAP231	Amp^R, ori colE1, *pul*A-Gen und Gene des PulA-Sekreton aus *K. pneumoniae*	d'Enfert et al., 1987
pEKEx2	Km^R, *lac*Iq, *tac*P, ori pBL1, ori colE1	Eikmanns et al., 1994
pEKEx2-Hyl-Prepro	pEKEx2 mit Pre-Pro Sequenz aus *Staphylococcus hyicus*	Lausberg & Freudl, unveröffentlicht
pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA	pHPP mit *pul*A-Gen aus *Klebsiella pneumonia* UNF5023	diese Arbeit
pEKEx2-SC	pEKEx2 mit Signalsequenz von Cg0955 aus *C. glutamicum* ATCC13032	diese Arbeit
pEKEx2-SC-pulA	pSC mit *pulA*-Gen aus *K. pneumoniae* UNF5023	diese Arbeit
pET28a-glgXHIS	Überepressionsplasmid, trägt das Gen *glgX* mit einer eingebrachten Sequenz für einen 6 x Histidin-Rest	Seibold & Eikmanns, 2007

Oligonukleotide

In Tabelle 3 sind die in dieser Arbeit eingesetzten Oligonukleotide gezeigt. Im Verlauf der Arbeit werden die Oligonukleotide als „Primer" bezeichnet. Sie wurden generell von der Firma „biomers" (www.biomers.net; Ulm) bezogen. Die Konzentrationen der Primer wurde mit sterilem H_2O_{demin} auf 100 pmol/µl eingestellt und die gelösten Primer bei -20 °C gelagert.

Tabelle 3: Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer mit deren DNA-Sequenzen.

Primer	DNA-Sequenz (5‘ – Sequenz – 3‘)[1]	Beschreibung
ApuBforKpnI	ggggtacCCCAGGAGACACAACATGGCCGTACGACGATTCAGCTC	Herstellung *apuB*-Fragment
ApuBrevKpnI	ggGGTACCCCCTACTGTTCGGAGCCCTCCTT	Herstellung *apuB*-Fragment
pEKEx2for (Insertcontrol)	TTTGCGCCGACATCATAACG	Sequenzierprimer für *apuB*, Cg0955, *pulA* in pEKEx2
pEKEx2rev (Insertcontrol)	CAGACCGCTTCTGCGTTCTG	Sequenzierprimer für *apuB*, Cg0955, *pulA* in pEKEx2
apuBfor2	ACATCACCGACGCTAGCAAG	Sequenzierprimer für *apuB*
apuBrev2	GCTTGTCGTACAAGGTCAGG	Sequenzierprimer für *apuB*
apuB3413-3433i	AACCGTAGTCGTAGACGGGCA	Sequenzierprimer für *apuB*
apuB4608-4624	TGTTCAACGCCAACGAA	Sequenzierprimer für *apuB*
apuB1716-1736	CAAGTTCACGGTCGATCCGAA	Sequenzierprimer für *apuB*
pulAforSnaBIoS	gatctacgtaCTGGTTTTACTT	Herstellung *pulA*-Fragment in pEKEx2-Hyl-Prepro
pulArevSnaBI	atcgtacgtatactCTTACCGGCAGCC	Herstellung *pulA*-Fragment in pEKEx2-Hyl-Prepro
sigCg0955forPstI	CTGCAGAGGAGACACAACATGCAAATAAACCACG	Herstellung Cg0955-Fragment in pEKEx2
sigCg0955revEcoRI	ggGAATTCATTGCTCCAAGGGCGTTG	Herstellung Cg0955-Fragment in pEKEX2

Fortsetzung siehe nächste Seite.

Fortsetzung Tabelle 3

Primer	DNA-Sequenz (5‘ – Sequenz – 3‘)[1]	Beschreibung
pulApEKEx2sigseqforEcoRI	cggaattCTGCGATAACGGATCCTCTTC	Herstellung *pulA*-Fragment in pEKEx2-SC
pulApEKEx2sigseqrevEcoRI	gaattCTTACTTACTTACTGCTTACCG	Herstellung *pulA*-Fragment in pEKEx2-SC
pulA4	GCACGTCGGTACTGGATAAG	Sequenzierprimer für *pulA*
pulAfor1	GTCGACGCTCCTA	Sequenzierprimer für *pulA*
pulAfor3	GGATGTGGTGGTCTAC	Sequenzierprimer für *pulA*
pulAfor4	TGACGGCAGCAACTATGAGG	Sequenzierprimer für *pulA*
pulArev4	CCGTTATAGTCAA	Sequenzierprimer für *pulA*

[1]Die komplementären Basen sind in Großbuchstaben dargestellt, die Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

2.2 Chemikalien, Enzyme, Materialien, Kits und Geräte

Chemikalien

Folgende Chemikalien wurden in dieser Arbeit verwendet. Die Firma Fluka Chemie GmbH ist eine Untergruppe der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH. Die Firma MBI Fermentas GmbH ist mittlerweile eine Untergruppe der Firma Thermo Fisher Scientific.

α-D(+)-Glukose-Monohydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
1-Butanol	Merck KGaA; Darmstadt
2-Propanol	Merck KGaA; Darmstadt
6x DNA Loading Dye	MBI Fermentas GmbH; St. Leon-Rot
10x T4-DNA-Ligasepuffer	MBI Fermentas GmbH; St. Leon-Rot
10x EcoRI-Puffer mit BSA	MBI Fermentas GmbH; St. Leon-Rot
10x Orange-Puffer mit BSA	MBI Fermentas GmbH; St. Leon-Rot

10x Red-Puffer mit BSA	MBI Fermentas GmbH; St.Leon-Rot
10x Tango-Puffer mit BSA	MBI Fermentas GmbH; St. Leon-Rot
Acrylamid	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Adenosintriphosphat (ATP)	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim
Agarose	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
L-Alanin	Fluka Chemie GmbH; Buchs, Schweiz
Ammoniumsulfat ($(NH_4)_2SO_4$)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München
ATP	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim
Bacto-Agar	Becton Dickinson GmbH; Heidelberg
Bacto-Hefeextrakt	Becton Dickinson GmbH; Heidelberg
Bacto-Trypton	Becton Dickinson GmbH; Heidelberg
Biotin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München
Bovine-Serum-Albumin (BSA)	Thermo Fisher Scientific; Dreieich
Brain-Heart-Infusion (BHI)	Becton Dickinson GmbH; Heidelberg
Bromphenolblau	Merck KGaA; Darmstadt
Calciumchlorid-Dihydrat ($CaCl_2$ x 2 H_2O)	Merck KGaA; Darmstadt
Chloroform-Isoamylalkohol	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Coomassie (CBB-G250)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München
Desoxynukleotidtriphosphat-Mix (dNTP-Mix, je 2 mM)	MBI Fermentas GmbH; St. Leon-Rot
Diethylether	Fluka Chemie GmbH; Buchs, Schweiz
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KGaA; Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Eisen(II)sulfat - Heptahydrat ($FeSO_4$ x 7 H_2O)	Merck KGaA; Darmstadt
Essigsäure	Merck KGaA; Darmstadt
Ethanol, abs.	VWR International GmbH; Darmstadt
Ethanol, abs., vergällt	Öl-Fabrik Schmidt; Lahr
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe

Formaldehyd	Fluka Chemie GmbH; Buchs, Schweiz
Glycerin (99 %, wasserfrei)	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
L-Glycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München
Glykogen	Merck KGaA; Darmstadt
Isopropanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München
Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranosid (IPTG)	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Harnstoff	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München
Hefeextrakt	Becton Dickinson; Heidelberg
Kaliumacetat	Merck KGaA; Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Fluka Chemie GmbH; Buchs, Schweiz
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München
di-Kaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München
Kaliumhydroxid (KOH)	Riedel-de-Haën AG; Seelze
Kaliumphosphat	Fluka Chemie GmbH; Buchs, Schweiz
Kanamycin	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Kartoffelstärke	Fluka Chemie GmbH; Buchs, Schweiz
Kupfersulfat-Pentahydrat ($CuSO_4$ x 5 H_2O)	Merck KGaA; Darmstadt
Lösliche Stärke	Merck KGaA; Darmstadt
L-Lysin	Fluka Chemie GmbH; Buchs, Schweiz
Magnesiumsulfat-Heptahydrat ($MgSO_4$ x 7 H_2O)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München
Maisstärke	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München
Mangansulfat-Monohydrat ($MnSO_4$ x H_2O)	Merck KGaA; Darmstadt
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München
Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
NADH Monohydrat	Fluka Chemie GmbH; Buchs, Schweiz
di-Natrium-$NADP^+$	GERBU Biotechnik GmbH; Heidelberg
Natriumacetat	Merck KGaA; Darmstadt

Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Merck KGaA; Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München
di-Natrium-Ethylendiamintetraessigsäure (Na_2EDTA)	VWR International GmbH; Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Applichem GmbH; Darmstadt
Natriumhydroxid-Plätzchen (NaOH)	Applichem GmbH; Darmstadt
Natriumsulfat ($Na_2S_2O_3$)	Merck KGaA; Darmstadt
Nickelchlorid-Hexahydrat ($NiCl_2$ x 7 H_2O)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München
Ornithin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München
Ortho-Phthaldialdehyd (OPA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Reisstärke	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München
Salzsäure (32 %) (HCl)	Merck KGaA; Darmstadt
Schwefelsäure (95 - 97 %) (H_2SO_4)	Merck KGaA; Darmstadt
Silbernitrat ($AgNO_2$)	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Sodium-Dodecyl-Sulfat (SDS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München
D-Sorbitol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München
Struktol Antischaummittel	Schill + Seilacher „Struktol“ GmbH; Hamburg
Tetracyclin Hydrochlorid	Fluka Chemie GmbH; Buchs, Schweiz
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Fluka Chemie GmbH; Buchs, Schweiz
Trichloressigsäure	Fluka Chemie GmbH; Buchs, Schweiz
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München
Wasser für HPLC (H_2O_{HPLC})	VWR International GmbH; Darmstadt
Weizenstärke	Merck KGaA; Darmstadt
Zinksulfat-Heptahydrat ($ZnSO_4$ x 7 H_2O)	Merck KGaA; Darmstadt

Enzyme

Folgende Enzyme wurden in dieser Arbeit verwendet.

Alkalische Phosphatase	Thermo Fisher Scientific; Dreieich
α-Amylase aus *B. subtilis*	Fluka Chemie GmbH; Buchs, Schweiz
Amyloglukosidase aus *Aspergillus niger*	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim
Genaxxon Taq-Polymerase (1U/µl)	Quiagen; Hilden
Hexokinase (340 U/ml)/ Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (170 U/ml)	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim
Immuno Pure® Antibody (Antigen rabbit)	Thermo Fisher Scientific; Dreieich
Isoamylase aus *Pseudomonas sp.*	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München
KOD DNA-Polymerase	Millipore; Darmstadt
L-Lactat-Dehydrogenase (L-LDH)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München
Lysozym	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim
Phusion-Polymerase	Eigenherstellung von Prof. Dr. D. Reinscheid
Polyclonal Antibody to Pullulanase/ pulA	Acris Antibodies; Herford
Pullulanase aus *Klebsiella pneumoniae*	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Mannheim
Restriktionsendonukleasen *Kpn*I, *EcoR*I, *SnaB*I (*Eco105*I), *Pst*I, *EcoR*V (*Eco32*I) (je 10 U/µl)	MBI Fermentas GmbH; St. Leon-Rot
RNase A (DNase-frei)	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim
T4-DNA-Ligase (5 U/µl)	MBI Fermentas GmbH; St. Leon-Rot

Materialien

Folgenden Materialien wurden in dieser Arbeit verwendet.

96-well ELISA microplates	Greiner Bio-One GmbH; Frickenhausen
AGFA Cronex 5 (medical x-ray film)	AGFA-Gevaert NV; Mortsel, Belgien
DC-Fertigplatten SIL G-25	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG; Düren
DC-Kammer	De Saga; Heidelberg
Einmal-Mikro Pipetten mit Ringmarke	Hirschmann® Laborgeräte GmbH & Co. KG; Eberstadt

Glasperlen (0,2 mm)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München
HPLC-Vials	CS-Chromatographie Service GmbH; Langerwehe
Elektroporationsküvetten (Elektrodenabstand 0,2 cm)	Peqlab Biotechnologie GmbH; Erlangen
Einmalküvetten (Halbmikro)	Brand GmbH & Co. KG; Wertheim
Filterpapier	Pressel International, Oberthulba
Mikroröhre 2 ml mit Verschluss	Sarstedt; Nümbrecht
Porablot NCP Nitrocellulose Membran	Marchery-Nagel GmbH & Co. KG; Düren
PCR-Eppendorf Tubes (0,2 ml)	Eppendorf AG; Hamburg
Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt; Nümbrecht
Röhre 15 ml (Falkon-Tube)	Sarstedt; Nümbrecht
Röhre 50 ml (Falkon-Tube)	Sarstedt; Nümbrecht
Sterilfilter (0,2 µm)	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Vivaspin	Sartorius Stedim Biotech GmbH; Göttingen

Kits

Die in dieser Arbeit verwendeten Kits sind nachfolgend aufgelistet.

„NucleoSpin® Gel and PCR Clean Up"	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG; Düren
„Plasmid Mini Kit I"	Omega Bio-Tek, Inc.; Norcross, USA
„BCA Protein Assay"	Thermo Fisher Scientific; Dreieich
„CloneJET" PCR-Klonierungskit	Thermo Fisher Scientific; Dreieich
„Pierce® ECL Western Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific, Dreieich

Geräte

Im Folgenden sind die Geräte aufgeführt, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Inkubationsschüttler

- Certomat® SII (Sartorius AG; Göttingen)
- Certomat® SII (B. Braun Biotech International; Melsungen)
- Certomat® S (B. Braun Biotech International; Melsungen)
- HT (Infors GmbH; Einsbach)
- 3020 (GFL mbH; Burgwedel)

Photometer

- Ultrospec 3000 (Amersham Pharmacia Biotech GmbH; Freiburg)
- Anthos htIII ELISA-Platten-Leser (Anthos Labtec Instruments; Cambridge, US)

Pipetten

- Einkanalpipette Labmate 10 µl (Abimed GmbH, Langenfeld)
- Einkanalpipette Pipetman® 20 µl (Gilson International B.V.; Limburg-Offheim)
- Einkanalpipette Pipetman® 100 µl (Gilson International B.V.; Limburg-Offheim)
- Einkanalpipette Pipetman® 200 µl (Gilson International B.V.; Limburg-Offheim)
- Einkanalpipette Pipetman® 1000 µl (Gilson International B.V.; Limburg-Offheim)
- Mehrkanalpipette Discovery comfort 300 µl (Abimed GmbH; Langenfeld)
- Pipettierhilfe accu-jet® (Brand GmbH & Co. KG; Wertheim)

RP-HPLC

- LC 1100 Anlage mit einem Fluoreszenzdetektor HP G1321A (Agilent Technologies Deutschland GmbH; Böblingen)
- Vorsäule: C18-Hypersil, ODS- 5µ, 40 x 4 mm (CS- Chromatographie Service GmbH; Langerwehe)
- Vorsäule : Organic acid, 40 x 8 mm (CS- Chromatographie Service GmbH; Langerwehe)
- Hauptsäule: C18-Hypersil, ODS- 5µ, 125 x 4 mm (CS- Chromatographie Service GmbH; Langerwehe)
- Hauptsäule : Organic acid, 300 x 8 mm (CS- Chromatographie Service GmbH; Langerwehe)
- HP- Chemstation for LC Rev. A.06.01 (Agilent Technologies Deutschland GmbH; Böblingen)

Waagen

- BP 8100 (Sartorius AG; Göttingen)
- BP 2100 S (Sartorius AG; Göttingen)
- Feinwaage AE 163 (Mettler-Toledo GmbH; Giessen)

Zentrifugen

- Kühlzentrifuge 5804 R (Eppendorf AG; Hamburg)
- ZK 401 (Hermle AG; Gosheim)
- Kühlzentrifuge Universal 320R (Hettich GmbH & Co. KG; Tuttlingen)
- Tischzentrifuge 5418 (Eppendorf AG; Hamburg)
- Heraeus Pico 17 Centrifuge (Thermo Fisher Scientific; Dreieich)

weitere Geräte

- AGFA Curix 60 (Filmentwickler, AGF-Gevaert NV; Mortsel, Belgien)
- Autoklav (MMM Münchner Medizin Mechanik GmbH; Planegg)
- Brutschrank B 5050 T (Heraeus Holding GmbH; Hanau)
- Brutschrank (Memmert; Schwabach)
- Eismaschine Scotsman AF-200 (Scotsman Ice Systems; Mailand, Italien)

- Elektrophorese Power Supply EPS-300 (Amersham Pharmacia Biotech GmbH; Freiburg)
- Elektroporator 2510 (Eppendorf AG; Hamburg)
- Fermentationsanlage DASGIP (DASGIP AG; Jülich)
- Fotodokumentationsanlage Mitsubishi P93D (Eurofins MWG Operon; Ebersberg)
- French Press (SLM AMINCO Instruments Inc; Urbana, USA)
- Gene-Pulser (Bio-Rad Laboratories GmbH; München)
- Magnetrührer IKAMAG® RCT (IKA® Werke GmbH & Co. KG; Staufen)
- Mikrowelle Severin 900 & grill (Severin Elektrogeräte GmbH; Sundern)
- Nanotrop (Thermo Fisher Scientific; Dreieich)
- PCR-Maschine (Biometra GmbH; Göttingen)
- pH-Meter WTW pH521 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten; Weilheim)
- RiboLyser (Thermo Hybaid GmbH; Garching)
- Speed Vac Concentrator (Bachofer GmbH; Reutlingen)
- Thermomixer compact (Eppendorf AG; Hamburg)
- Thermostat 5320 (Eppendorf AG; Hamburg)
- SpeedVac (Eppendorf AG; Hamburg)
- UV-Schirm, 312nm (Bachhofer GmbH; Reutlingen)
- Vortexer Reax 2000 (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG; Schwabach)
- Wasserbad (Köttermann; München)

2.3 Nährmedien, Stammhaltung und Kultivierungsbedingungen

Nährmedien

Die folgenden Medienkomponenten wurden in H_2O_{demin} gelöst und für 20 min bei 121 °C und bei 1 bar Wasserdampfüberdruck autoklaviert. Hitzelabile Komponenten wie Antibiotika und Kohlenstoffquellen wurden nach dem Lösen steril filtriert und dem abgekühlten, autoklavierten Medium vor Benutzung steril zugegeben.

2x TY-Komplexmedium (Sambrook & Russell, 2001)

Trypton	16 g/l
Hefeextrakt	10 g/l
NaCl	5 g/l

Zur Herstellung von 2x TY-Komplexmediumplatten wurden dem Vollmedium vor dem Autoklavieren

Agar	18 g/l

zugegeben.

BHIS-Medium (Liebl et al., 1989)

Brain-Heart-Infusion	37 g/l
Sorbitiol	91 g/l

Die Lösungen wurden getrennt voneinander autoklaviert und anschließend vereinigt.

TB-Medium (Terrific Broth Medium) (Tartof & Hobbs, 1987)

Trypton	12 g/l
Hefeextrakt	34 g/l
Glycerin	0,4 % (v/v)

Die Substanzen wurden in 90 % (v/v) des Endvolumens gelöst und autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurde dieser Lösung pro Liter 100 ml einer autoklavierten Lösung aus KH_2PO_4 (23,1 g/l) und K_2HPO_4 (125,4 g/l) zugegeben.

MRSC-Medium (Nebra & Blanch, 1999)

Lactobacilli MRS Broth	55 g/l
L-Cystein	0,5 g/l

Zur Herstellung von MRSC-Mediumplatten wurden dem Vollmedium vor dem Autoklavieren

Agar	18 g/l

zugegeben.

CgC-Minimalmedium (modifiziert nach Kase & Nakayama, 1972)

$(NH_4)_2SO_4$	5 g/l
MOPS	21 g/l
Harnstoff	5 g/l
K_2HPO_4	1 g/l
KH_2PO_4	1 g/l
$MgSO_4$	0,25 g/l
$CaCl_2$	0,01 g/l
Spurenelemente-Stammlösung (1000 x)	1 ml/l (steril filtriert)
Biotin-Stammlösung (200 mg/ml)	1 ml/l (steril filtriert)
Kohlenstoffquelle	0,5 – 3 % (w/v)
(D-Glukose, Maltose, Acetat, Stärke)	

Vor dem Autoklavieren wurde der pH-Wert mit KOH (5 M) auf 6,5 eingestellt. Nach dem Autoklavieren wurde ein pH-Wert von 6,8 erhalten. Die steril filtrierten Medienzusätze sowie die Zellen wurden nach dem Autoklavieren zugegeben. Dafür wurde das entsprechende Volumen bei der Medienherstellung berücksichtigt.

Spurenelemente-Stammlösung (1000 x)

$FeSO_4$ x 7 H_2O	16,4	g/l
$MnSO_4$ x H_2O	10	g/l
$CuSO_4$ x 5 H_2O	0,2	g/l
$ZnSO_4$ x 7 H_2O	1	g/l
$NiCl_2$ x 6 H_2O	0,02	g/l

Die Lösung wurde mit 32 %-iger HCl auf einen pH-Wert von 1 eingestellt. Beim Wachstum von *C. glutamicum* ELB-P wurde eine $MnSO_4$ x H_2O Konzentration von 0,1 g/l in der Spurenelemente-Stammlösung eingesetzt (Wieschalka et al., 2012a).

Kohlenstoffquellen

D-Glukose, Maltose, Kaliumacetat

D-Glukose, Maltose und Kaliumacetat wurden jeweils (unter Berücksichtigung des Wassers bei D-Glukose und Maltose) als 50 %-ige Stammlösung angesetzt.

Pflanzliche Stärken

Als pflanzliche Stärken wurden lösliche Karoffel- und jeweils unbehandelte Kartoffel-, Mais-, Reis- und Weizenstärke als Substrat verwendet. Die Stärken wurden sowohl aufgekocht als auch nicht aufgekocht eingesetzt. Für die Untersuchung von aufgekochter Stärke als Substrat wurde dem CgC-Minimalmedium die abgewogene Menge an Stärke vor dem Autoklavieren zugegeben und die Stärke durch Aufkochen mit dem Bunsenbrenner gelöst. Eingesetzt wurde die Stärke in Konzentrationen von 2 % (w/v) bzw. 3 % (w/v). Für die Untersuchung von nicht aufgekochter Stärke wurde das abgewogene Stärkepulver im Trockenschrank bei 120 °C für 30 min sterilisiert und dem autoklavierten Medium steril zugegeben. Durch das Ausplattieren einer Stärkeprobe auf einer 2x TY-Komplexmediumplatte und einer anschließender Inkubation bei 28 °C wurde die Sterilität überprüft. Um den Wachstumsbeginn bei Wachstum mit Stärke als Substrat nicht zu verzögern wurden 0,025 % D-Glukose (w/v) zugegeben um die Produktion der α-Amylase, der Amylopullulanase bzw. der Pullulanase zu ermöglichen.

Tierische Stärken

Glykogen wurde in einer Konzentration von 1 % (w/v) in aufgekochter Form eingesetzt.

Weitere Medienzusätze

Zusatz	Stammlösung	Arbeitskonzentration
Kanamycin	50 mg/ml	50 µl/ml
Tetracyclin	10 mg/ml	10 µg/ml
IPTG	0,1 M	0,1 mM
L-Alanin	2 M	2 mM

Die Medienzusätze wurden steril filtriert. Die zur Selektion eingesetzten Antibiotika wurden dem autoklavierten und abgekühlten Medium (< 50 °C) steril zugegeben, IPTG wurde zur Induktion bereits in die Vorkultur und dann zu Beginn des eigentlichen Wachstumsversuchs zugegeben. Das lichtsensitive Tetracyclin wurde in 70 %-igem Ethanol gelöst.

Stammhaltung und Kultivierungsbedingungen

Die Bakterienstämme von *E. coli* und *C. glutamicum* wurden in 2x TY-Komplexmedium mit 30 % Glycerin (Gesamtvolumen 1 ml) bei - 80 °C in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen mit Schraubdeckel konserviert. Die Glycerinkulturen von *B. breve* wurden von der Arbeitsgruppe Riedel bereitgestellt. Ausgehend von diesen Glycerinkulturen wurden Stammplatten hergestellt. Die Inkubationszeit der Stammplatten von *B. breve* und *E. coli* betrug 24 h und die von *C. glutamicum* 48 h. Die Inkubation erfolgte bei *B. breve* anaerob, bei *E. coli* und *C. glutamicum* aerob. Einzelkulturen dieser Platten wurden als Inokulum für die Vorkultur eingesetzt.

Kultivierung von *B. breve*

Zur Anzucht von *B. breve* diente MRSC-Medium. Die Züchtung erfolgte in 5 ml MRSC-Medium (in 10 ml-Reagenzgläsern) unter anaeroben Bedingungen. Um den gelösten Sauerstoff aus dem MRSC-Medium zu entfernen wurde dieses vor der Inokulation aufgekocht und nach dem Abkühlen mit *B. breve* beimpft. Das anaerobe Wachstum erfolgte bei 37 °C in Anaerob-Töpfen mit Anaerocult A, welches eine anaerobe Atmosphäre mit 18 Vol% CO_2 und 12 Vol% H_2 erzeugt.

Kultivierung von *E. coli* DH5α

Das Wachstum von *E. coli* DH5α erfolgte bei 37 °C unter aeroben Bedingungen. Die Sauerstoffversorgung wurde durch die Inkubation auf einem Rotationsschüttler bei 130 rpm gewährlistet. Als Vorkultur dienten 5 ml 2x TY-Komplexmedium in 10 ml-Reagenzgläsern, die mit einer Einzelkolonie einer Stammplatte angeimpft wurden. Mit einer geeigneten Menge dieser 15 h inkubierten Vorkultur wurde das Medium für die Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen angeimpft. Mit den beimpften 5 ml 2x TY-Komplexmedium wurde auch die Präparation der Plasmid-DNA durchgeführt.

Kultivierung von *E. coli* BL21(DE3)(pET28a-glgXHIS)

Für die Überproduktion von GlgXHIS wurde der Stamm *E. coli* BL21(DE3) jedesmal neu mit dem Plasmid pET28a-glgXHIS transformiert. Die Inkubation der erhaltenen Kolonien erfolgte bei 37 °C unter aeroben Bedingungen auf einem Rotationsschüttler bei 130 rpm. Als Vorkultur dienten 5 ml 2x TY-Komplexmedium in 10 ml-Reagenzgläsern, die mit einer Einzelkolonie einer Stammplatte angeimpft wurden. Mit einer geeigneten Menge dieser 15 h inkubierten Vorkultur wurde das TB-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin für die Überproduktion von GlgXHIS angeimpft. Die Induktion erfolgte nach 2 h Wachstum mit 1 mM IPTG. Nach weiteren 4 h Wachstum wurden die Zellen durch einen Zentrifugationsschritt (4.500 g, 4 °C, 8 min) geerntet und die Pellets zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

Kultivierung von *C. glutamicum*

Die aerobe Kultivierung von *C. glutamicum* erfolgte grundsätzlich bei 28 °C. Die Sauerstoffversorgung wurde durch eine Inkubation auf einem Rotationsschüttler bei 120 rpm gewährleistet. Als erste Vorkultur dienten 5 ml 2x TY-Komplexmedium, welches mit einer Einzelkolonie einer Stammplatte angeimpft wurde. Nach 6 h Inkubation wurde mit dieser Vorkultur die zweite Vorkultur (50 ml 2x TY-Komplexmedium in einem 500 ml-Erlenmeyerkolben mit Schikanen) angeimft. Die Inkubation der zweiten Vorkultur erfolgte über Nacht. In die 50 ml-Vorkulturen der plasmidtragenden Stämme wurden 100 µM IPTG zugegeben. In beiden Vorkulturen des Stammes *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) wurde zusätzlich 2 mM L-Alanin und 0,5 % (w/v) Kaliumacetat zugegeben. Mit dieser zweiten Vorkultur wurde die Hauptkultur inokuliert. Als Medium der Hauptkultur wurden 50 ml CgC-Minimalmedium in 500 ml-Erlenmeyerkolben mit Schikanen verwendet. Bei CgC-Minimalmedium mit Stärke als Substrat wurden 0,025 % Glukose zugegeben. Beim Wachstum des Stammes *C. glutamicum* ELB-P wurden 2 mM L-Alanin ins Medium zugegeben. Bei allen Wachstumsversuchen unter aeroben Bedingungen wurde mit einer Anfangs-OD_{600nm} von 1 angeimpft. Die anaerobe Inkubation erfolgte nach einer Inokulation des CgC-Minimalmediums mit einer Anfangs-OD_{600nm} von 10. Die benötigte Menge der Übernachtkultur wurde dafür sedimentiert (4.500 g, 4 °C, 8 min) und einmal mit 0,9 %-iger

Saline (9 g/l NaCl (w/v)) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (4.500 g, 4 °C, 8 min) wurde das Zellpellet in 1 ml 0,9 %-iger Saline suspendiert und damit die Hauptkultur angeimpft. Für die Verfolgung des Wachstums und zur Probenanalytik wurden zu bestimmten Zeitpunkten Kulturproben entnommen.

Kultivierung von *C. glutamicum* im DASGIP-Fermenter

Für die Kultivierung von *C. glutamicum* im DASGIP-Fermenter wurden 5 ml 2x TY-Komplexmedium mit einer Kolonie einer frischen Stammplatte angeimpft und für 8 h auf einem Rotationsschüttler (120 rpm) bei 28 °C inkubiert. Diese Vorkultur wurde in einen 500 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen überführt und über Nacht unter den gleichen Bedingungen kultiviert. Eine geeignete Menge dieser zweiten Vorkultur wurde mit 0,9 %-Saline (w/v) gewaschen (4.500 g, 4 °C, 8 min) und das Startvolumen von 250 ml CgC-Minimalmedium im Fermenter mit einer OD_{600nm} von etwa 2,25 inokuliert. Die Fermentationen wurden in einer Vierfach-Parallelfermentationsanlage von DASGIP durchgeführt. Die Belüftung erfolgte mit Druckluft (80 % N_2 und 20 % O_2) und einem anfänglichen Belüftungsgrad von 3. Dies entsprach 0,75 Volumen Luft pro Volumen Medium pro Minute (vvm) (Blombach et al., 2011). Die Belüftungsrate wurde für die Fermentation von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit 3 % nicht aufgekochter Weizenstärke konstant gehalten. Um den Sauerstoffpartialdruck pO_2 konstant bei 30 % halten zu können wurde die Rührerdrehzahl abhängig vom pO_2 in der Kultur gesteuert. Bei der Fermentation von *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit 0,2 % Kaliumacetat und 3 % aufgekochter löslicher Kartoffelstärke wurde die Belüftungsrate nach etwa 6 h auf eine Rate von 1 % mittels der Rührerdrehzahl und einer Reduktion des Belüftungsgrads herunterreguliert um eine semianaerobe Bedingung in den Medien zu erhalten. Der pH-Wert lag bei allen Fermentationsdurchführungen bei 7,0 ± 0,05 und wurde durch eine automatische Dosierung von 4 M KOH und 4 M H_2SO_4 konstant gehalten. Die Antischaumregelung erfolgte durch die Zugabe des Antischaummittels Struktol per Hand. In regelmäßigen Abständen wurden Kulturproben für die Aufzeichnung des Wachstums, die anschließende Produktanalytik und die dünnschichtchromaographischen Analysen steril entnommen.

Anaerobe Kultivierung von *C. glutamicum*

Die anaerobe Kultivierung von *C. glutamicum* erfolgte bei 28 °C in 100 ml Schottglasflaschen mit Ummantelung. Die sauerstoffhaltige Gasphase in den Schottglasflaschen wurde vor dem Autoklavieren durch ein Gasgemisch aus 80 % N_2 und 20 % CO_2 ausgetauscht. Als erste Vorkultur dienten 5 ml 2x TY-Komplexmedium, welches mit einer Einzelkolonie einer Stammplatte angeimpft wurde. Nach 6 h Inkubation wurde mit dieser Vorkultur die zweite

Vorkultur (50 ml 2x TY-Komplexmedium in einem 500 ml-Erlenmeyerkolben mit Schikanen) angeimft und über Nacht bei 28 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die OD_{600nm} der zweiten Vorkultur bestimmt und die benötigte Animpfmenge für eine OD_{600nm} von 10 der Hauptkultur berechnet. Das errechnete Volumen wurde zweimal mit 0,9 %-iger Saline gewaschen (4.500 g, 4 °C, 8 min) und der Überstand jeweils verworfen. Abschließend wurde das Zellpellet in 2 ml kalter 0,9 %-igen Saline suspendiert und damit das Medium in ummantelten Schottglasflaschen inokuliert. Für die Messung der OD_{600nm} und zur Probenanalytik wurden zu bestimmten Zeitpunkten Kulturproben entnommen.

Verfolgung des Wachstums

Das Wachstum der Kulturen auf Glukose bzw. Kaliumacetat, aufgekochter löslicher Kartoffelstärke sowie aufgekochter Kartoffelstärke wurde anhand der OD_{600nm} über die Zeit verfolgt und protokolliert. Beim Wachstum mit den anderen Stärken erfolgte die Überprüfung des Wachstums auf Grund der Trübung des Mediums zusätzlich bzw. nur über eine Proteinbestimmung.

2.4 Zellaufschluss

2.4.1 Zellaufschluss im RiboLyser

Zum mechanischen Aufschluss von *C. glutamicum*-Zellen wurde der RiboLyser verwendet. Hierfür wurden Zellpellets einer 50 ml-Kultur in einem geeigneten Puffer gelöst und zu 800 µl-Portionen zusammen mit je 250 mg Glaskügelchen in verschließbare Reaktionsgefäße überführt. Die Proben wurden im RiboLyser heftig geschüttelt und die Zellen durch die entstandenen Scherkräfte zwischen den Glasperlen aufgebrochen. Der Aufschluss erfolgte mit drei Durchgängen à 30 s auf Stufe 6,5. Zwischen den Durchgängen wurden die Proben auf Grund der entstandenen Reibungswärme für 5 min auf Eis gekühlt. Nach dem Aufschluss wurden nicht aufgeschlossene Zellen, Zelltrümmer und Glaskügelchen abzentrifugiert (20.600 g, 4 °C, 20 min). Mit einer anschließenden Zentrifugation des Überstands in einer Ultrazentrifuge wurde die Membranfraktion vom Zelllysat abgetrennt (235.000 g, 4 °C, 1,5 h).

2.4.2 Zellaufschluss mit der French Press

Beim Aufschluss von Bakterienzellen mittels French Press wird die Zellsuspension mit einem hohen Druck durch eine enge Öffnung gepresst, wobei die Zellen durch den plötzlichen Druckabfall nach der Öffnung platzen. Zum Aufschluss wurde die Mini-Zelle (maximaler interner Druck 20.000 psi, maximales Volumen 3,7 ml) verwendet. Der Aufschluss erfolgte

3-5 mal bei einem Kolben-Druck von 700-900 psi. Zwischen den Aufschlüssen wurden die Proben auf Eis gekühlt. Zelltrümmer und nicht aufgeschlossene Zellen wurden im Anschluß für 20 min bei 20.600 g, 4 °C sedimentiert.

2.5 Arbeiten mit DNA

2.5.1 Transformation von Plasmid-DNA

Transformation von *E. coli*

Die Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte in 250 ml TY-Komplexmedium in einem 1 l-Schikanenkolben, angeimpft mit 500 µl einer 5 ml-TY-Vorkultur (herangezogen über Nacht bei 37 °C und 120 rpm auf einem Rotationsschüttler in einem 10 ml-Reagenzglas). Dadurch wurde eine Anfangs-OD_{600nm} von etwa 0,01 erreicht. Die Kultur wurde unter Schütteln und bei 37 °C bis zu einer OD_{600nm} von 0,3 bis 0,5 kultiviert. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis bzw. die Zentrifugationsschritte bei 4 °C durchgeführt. Die geernteten Zellen wurden 30 min auf Eis inkubiert und anschließend in vorgekühlte 50 ml-Falkon-Tubes aufgeteilt und sedimentiert (4.500 g, 4 °C, 15 min). Die sedimentierten Zellen wurden in insgesamt 250 ml eiskaltem H_2O_{demin} gewaschen. Nach dem darauf folgenden Zentrifugationsschritt wurden die Sedimente in insgesamt 100 ml gelöst und die suspendierten Zellen in zwei 50 ml-Falkon-Tubes vereinigt und erneut zentrifugiert (4.500 g, 4 °C, 15 min). Die Zellpellets wurden in je 25 ml 10 %-igem, eiskaltem Glycerin gelöst und erneut sedimentiert (4.500 g, 4 °C, 20 min). Die erhaltenen Zellpellets wurden in 0,5 ml eiskaltem 10 %-igem Glycerin gelöst und in 50 µl Aliquots aufgeteilt. Die Konservierung erfolgte bei - 80 °C.

Für die Transformation wurden die elektrokompetenten *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut und zusammen mit der Plasmid-DNA (0,1 – 10 µg) für 10 min in einer vorgekühlten Elektroporationsküvette auf Eis inkubiert. Durch eine vorangegangene Bestrahlung der Küvette mit UV-Licht von 312 nm für 45 min wurden DNA-Rückstände zerstört. Der Hochspannungspuls (2,5 kV, 25 µF, 200 Ω) erfolgte in einem Gene-Pulser. Der Ansatz wurde komplett in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, welches 200 µl auf 37 °C vorgewärmtes 2x TY-Komplexmedium ohne Antibiotikum enthielt. Die Regeneration, sowie die Ausbildung der Antibiotikaresistenz erfolgten bei 37 °C für 45 min auf einem Rotationsschüttler. Zur Selektion wurden die Zellen auf Platten mit 2x TY-Komplexmedium mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert.

Transformation von *C. glutamicum* (Liebl, et al., 1989)

Auf Grund der stabileren Mureinschicht Gram-positiver Bakterien wie *C. glutamicum* ist das Einbringen von Fremd-DNA im Vergleich zu Gram-negativen Bakterien mittels Elektroporation schwieriger. Zur Herstellung elektrokompetenter *C. glutamicum*-Zellen wurde eine Methode entwickelt, bei der die Bakterien eine sehr hohe Teilungsrate erreichen und die Zellwände nur unvollständig ausgebildet werden. Dadurch wird das Einbringen von Fremd-DNA erleichtert. Das schnelle Wachstum wird durch das sehr reichhaltige BHIS-Medium erreicht. Zur Herstellung elektrokompetenter *C. glutamicum*-Zellen wurden mit einer Einzelkolonie einer frischen Stammplatte 5 ml 2x TY-Komplexmedium angeimpft und 6 h unter Schütteln bei 28 °C inkubiert. Diese Vorkultur wurde in 50 ml BHIS-Medium in einem 500 ml-Erlenmeyerkolben mit Schikanen überführt. Die Kultur wurde über Nacht auf einem Rotationsschüttler (120 rpm) bei 28 °C kultiviert. Mit 5 ml dieser Vorkultur wurden 250 ml auf 28 °C vorgewärmtes BHIS-Medium in einem 1 l-Schikanenkolben inokuliert und die Zellen bei 28 °C auf einem Rotationsschüttler bis zu einer OD_{600nm} von 1,75 inkubiert. Die geernteten Zellen wurden auf fünf 50 ml-Falkon Tubes aufgeteilt und für 20 min bei 4 °C und 4.500 g zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in je 20 ml eiskaltem TG-Puffer (1 mM Tris, 10 % Glycerin (v/v), mit 2 M HCl auf pH 7,5 eingestellt) gelöst, in zwei 50 ml-Falkon Tubes vereinigt und für 10 min bei 4500 g und 4 °C zentrifugiert. Es folgten drei Waschschritte mit je 20 ml eiskaltem 10 %-igem Glycerin. Die erhaltenen Sedimente wurden im Rückfluss des abgenommenen Überstandes gelöst und in 150 µl-Portionen aliquotiert. Die elektrokompetenten Zellen wurden bei - 80 °C bis zur Verwendung gelagert.

Zur Vorbereitung der Transformation von elektrokompetenten *C. glutamicum*-Zellen wurden 15 ml-Falkon Tubes mit je 4 ml BHI bei 46 °C vorgewärmt und die Elektroporationsküvetten (0,2 cm Elektrodenabstand) auf einem UV-Schirm sterilisiert. Die elektrokompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 1 – 10 µl Plasmid-DNA vermischt und 10 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde in die vorgekühlten, UV-behandelten Küvetten überführt. Die Transformation erfolgte durch einen Hochspannungsimpuls (2,5 kV, 25 µF und 200 Ω) in einem Gene-Pulser). Der Ansatz wurde in 4 ml vorgewärmtes BHI-Medium überführt und einem Hitzeschock im Wasserbad bei 46 °C für 6 min ausgesetzt um die Produktion der zelleigenen Abwehrproteine zu unterdrücken. Nach dem Hitzeschock wurden die Zellen für 45 min bei 28 °C und 120 rpm auf einem Rotationsschüttler zur Ausbildung der Antibiotikumresistenz regeneriert. Zur Selektion wurden die Zellen auf 2x TY-Komplexmediumplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert.

2.5.2 Isolierung und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* (Birnboim, 1983, modifiziert)

Um Plasmide aus *E.coli*-Zellen zu isolieren, wurde eine Mini-Plasmidpräparation nach dem Prinzip der alkalischen Lyse durchgeführt. Für die Präparation wurden 5 ml-Übernachtkultur aus 2x TY-Komplexmedium mit entsprechendem Antibiotikum durch Zentrifugation (16.060 g, RT, 1 min) sedimentiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in 100 µl Lösung A (50 mM Glukose, 25 mM Tris, 10 mM EDTA, mit 2 M HCl auf pH 8,0 eingestellt) gelöst. Diesem Ansatz wurden 1 µl einer RNAse-Lösung (50 µg/ml) sowie 15 mg/ml Lysozym zugegeben. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden 200 µl frisch angesetzte Lösung B (1 % SDS (w/v), 0,2 M NaOH) zugegeben. Bei diesem Schritt erfolgt die alkalische Lyse der Zellen durch die Denaturierung der Membranproteine. Freigesetzte Proteine und Nukleinsäuren werden ebenfalls denaturiert. Durch kurzes, leichtes Schütteln wurde die Denaturierung unterstützt. Nach Zugabe von 150 µl der sauren Lösung C (5 M Kaliumacetat, 1,8 M Eisessigsäure) und mehrmaligem (10 – 20 Mal) Invertieren wurde die Neutralisation des pH-Wertes herbeigeführt, um die DNA wieder in ihrer ursprünglichen Form zu erhalten. Durch Zentrifugation wurden die Zelltrümmer und Zellbestandteile abgetrennt (16.060 g, RT, 15 min). Die Fällung der Plasmid-DNA im Überstand erfolgte durch die Zugabe von 0,8 Vol. Isopropanol und sofortigem Zentrifugieren (16.060 g, RT, 20 min). Um das erhaltene DNA-Pellet zu entsalzen, wurde die Probe mit 500 µl 70 %-igem Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 50 µl H_2O_{demin} bei 37 °C gelöst und bei – 20 °C konserviert.

In seltenen Fällen, z. B. bei Plasmidaufreinigungen für Sequenzierreaktionen wurde auch auf einen Plasmidpräparations-Kit der Firma Omega Bio-Tex Inc. zurückgegriffen.

Isolierung von Plasmid-DNA aus *C. glutamicum* (Eikmanns et al., 1994, modifiziert)

Die Plasmid-DNA aus *C. glutamicum* erfolgte in Anlehnung an die Methode der Plasmid-DNA Präparation aus *E. coli*. Für die Isolierung der Plasmid-DNA aus *C. glutamicum* wurde eine Übernachtkultur aus 5 ml 2x TY-Komplexmedium bei 16.060 g, RT, 1 min zentrifugiert und das Zellpellet mit 1 ml TES-Puffer (50 mM Tris, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl, mit HCl auf pH 8,0 eingestellt) gewaschen. Mit dem erhaltenen Pellet wurde die DNA-Plasmidpräparation wie für *E. coli* beschrieben durchgeführt. Allerdings wurden die Mengen an den Lösungen A, B und C verdoppelt, sowie die Inkubationszeit in Lösung A auf bis zu 3 h ausgeweitet.

Isolierung von Plasmid-DNA aus *C. glutamicum* mit dem „PerfectPrep Spin Mini Kit“ von 5 Prime

Um besonders saubere Plasmid-DNA aus *C. glutamicum* zu gewinnen, kam der kommerziell erhältliche „PerfectPrep Spin Mini Kit“ von 5 Prime zur Verwendung. Da dieser Plasmidpräparations-Kit vom Hersteller nicht für Gram-positive Bakterien konzipiert wurde, wurde das vom Hersteller mitgelieferte Protokoll leicht abgeändert, indem die Inkubation des Zellpellets mit „Solution A“ auf 3 h ausgeweitet wurde. Zusätzlich wurde bei diesem Schritt 15 mg Lysozym pro ml zugegeben um die stabile Zellwand anzugreifen. Die weiteren Schritte wurden analog zum Protokoll des Herstellers durchgeführt. Durch die Anwesenheit chaotroper Salze bindet die Plasmid-DNA am die Matrix des Säulenmaterials, während die RNA sowie verbliebende Proteine durch die Waschschritte entfernt werden. Durch einen ethanolhaltigen Puffer werden Salze und lösliche makromolekulare Komponenten entfernt. Mit H_2O_{demin} wurde die DNA nach der Reinigung von der Säule eluiert.

Isolierung chromosomaler DNA aus *B. breve*

Die Isolierung chromosomaler DNA aus *B. breve* erfolgte in Anlehnung an die Methode von Eikmanns et al., (1994). Die Zellen einer 10 ml-Übernachtkultur in MRSC-Medium wurden durch Zentrifugieren (16.060 g, RT, 1 min) sedimentiert und zweimal mit TE-Puffer gewaschen (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,6 eingestellt mit 2 M HCl). Das Zellpellet wurde in 1 ml Lysozym-TE-Pufferlösung (15 mg/ml) resuspendiert und 3 h bei 37 °C inkubiert. Es wurden 3 ml Lysis-Puffer (10 mM Tris, 400 mM NaCl, 2 mM Na_2EDTA, pH 8,2 mit HCl eingestellt), 220 µl 10 % SDS (w/v) und 150 µl Proteininase K-Lösung (20 mg Proteinase K/ml H_2O) zugegeben und der Ansatz über Nacht bei 37 °C inkubiert. Durch die Zugabe von 2 ml gesättigter NaCl-Lösung wurden Proteine und die Membran gefällt. Nach Zentrifugation (16.060 g, RT, 15 min) erfolgte die Fällung der chromosomalen DNA im abgenommenen Überstand durch Zugabe von 2,5 Vol. abs. EtOH (- 20 °C). Die DNA wurde mit einer über der Flamme gebogenen Pasteurpipette aus der Lösung genommen und in 70 % EtOH (v/v) (- 20 °C) gewaschen. Die DNA wurde getrocknet und 2 h bei 37 °C in 500 µl TE-Puffer gelöst.

Isolierung chromosomaler DNA aus *C. glutamicum* (Tanja Laslo, unveröffentlicht)

Die chromosomale DNA aus *C. glutamicum* wurde aus einer 50 ml-Übernachtkultur (2x TY-Komplexmedium) isoliert. Die Kultur wurde zentrifugiert (4.500 g, 4 °C, 7 min) und das Zellpellet in 2 ml TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,6, eingestellt mit HCl) gelöst. Die Suspension wurde auf zwei Schraubdeckelgefäße mit jeweils 250 µg Glasbeads aufgeteilt. Es folgten ein mechanischer Aufschluss im RiboLyser (4 Durchgänge, je 45 sec, Stufe 6,5) und ein Zentrifugationsschritt (20.820 g, RT, 20 min). Um noch vorhandene Proteine aus der

Probe zu entfernen wurde der Überstand mit 1 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1) versetzt und 30 s gut durchmischt. Nach erfolgreicher Phasentrennung durch Zentrifugation (20.820 g, 4 °C, 20 min) wurde die obere, DNA-haltige, wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die phenolhaltige Phase sowie die proteinhaltige Interphase verworfen. Die Extraktion wurde so oft wiederholt, bis keine Proteininterphase mehr zu erkennen war. Durch Zugabe von 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24/1) und erneuter Phasentrennung durch Zentrifugation wurde das Phenol aus der Nukleinsäurelösung entfernt. Zur DNA-Fällung wurde dem Überstand 0,8 Vol. Isopropanol und 0,1 Vol. Natriumacetat (3 M) zugegeben. Die Probe wurde zentrifugiert (20.820 g, 4 °C, 15 min) und das entstandene Pellet mit 70 %-igem EtOH gewaschen. Die anschließende Trocknung des DNA-Pellets erfolgte in der SpeedVac. Das Pellet wurde dann in 100 µl H_2O gelöst und bei - 20 °C konserviert.

Konzentration- und Reinheitsbestimmungen von Nukleinsäurelösungen

Die Konzentrationsbestimmung wässriger DNA-Lösungen erfolgte mit einem NanoDrop von Thermo Fisher Scientific oder in einer Quarzküvette in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm mittels Doppelbestimmung. Eine Absorption von 1,0 entspricht dabei 50 µl doppelsträngiger DNA/ml. Die Reinheit ergibt sich aus dem Quotienten A_{260} und A_{280}. Reine DNA-Lösungen erreichen einen A_{260}/A_{280}-Quotienten von 1,8 – 2,0. Eine durch Proteine verunreinigte Probe erreichte einen geringeren Wert.

2.5.3 Sequenzierung von DNA

Die durchgeführten Sequenzierungen der Gene *apuB* und *pulA* in den Plasmiden, sowie der eingebrachten Siqnalsequenz von Cg0955 in das Plasmid pEKEx2 wurden durch die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) durchgeführt. Die Kontrolle der erhaltenen Sequenzen auf Mutationen wurde am Computer mit Hilfe des Programms Clone Manager 7 von SCi Ed Central (Cary, USA) durchgeführt.

2.5.4 Überprüfung der gemeinsamen Codon-usage verschiedener Bakterien

Eine Überprüfung der gemeinsamen Codon-usage von *C. glutamicum* mit *B. breve* bzw. *K. pneumoniae* wurde mit dem über das Internet zugänglichen Programm „graphical codon usage analyser“ durchgeführt (http://gcua.schoedl.de).

2.5.5 Enzymatische Behandlung von DNA (Polymerasekettenreaktion)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR, „polymerase chain reaction“; Saiki et al., 1988) wird als Standardmethode zur Amplifikation von DNA-Fragmenten genutzt. In dieser Arbeit wurde die PCR zur DNA-Fragmentherstellung für Klonierungsarbeiten und für die Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente zum Nachweis von erfolgreichen Transformationen im Zuge einer Kolonie-PCR verwendet. Das Prinzip der PCR ist die Vervielfältigung eines DNA-Abschnitts, der durch zwei gegenläufige Startermoleküle, umgangssprachlich als „Primer“ bezeichnet, definiert ist. Die Primer binden an spezifische, zu ihnen komplementären Nukleotide der DNA. Sie dienen der DNA-Polymerase als Startpunkte, die dann an die 3‘-OH-Enden der Primer komplementär zum Matrizenstrang Oligonukleotide anfügt und somit aus dem DNA-Einzelstrang einen Doppelstrang synthetisiert. Je nach Zielsetzung wurden verschiedene DNA-Polymerasen verwendet. Für die Klonierung von Gensequenzen in Plasmide bzw. Signalpeptide wurde die Phusion (Eigenproduktion der Arbeitsgruppe Dr. Reinscheid) oder für die Gensequenz *apuB* die KOD DNA-Polymerase (Novagen; Darmstadt) verwendet, da diese Polymerasen eine 3‘ – 5‘-Exonuklease-Aktivität (proof reading) besitzen und somit eine geringere Fehlerrate aufweisen. Zum Nachweis einer erfolgreichen Transformation durch das Amplifizieren eines spezifischen Genabschnitts auf dem eingebrachten Plasmid wurde die Taq-Polymerase der Firma Genaxxon eingesetzt. PCR-Ansätze wurden generell nach dem gleichen Schema angesetzt und betrugen stets 50 µl in einem 500 µl-Eppendorf-PCR-Reaktionsgefäß. Das verwendete Standard-PCR-Programm bestand aus einem Anfangsdenaturierungsschritt (95 °C, 10 min) und einem anschließenden Denaturierungsschritt (95 °C, 1 min) zur Trennung der doppelsträngigen DNA. Es folgte der Anlagerungsschritt (48 – 55 °C, 1 min), bei dem sich die Primer an die komplementäre Sequenz der einzelsträngigen DNA anlagern. Die Elongation erfolgte für 1 min pro 1 kBp bei 68 °C (Phusion DNA-Polymerase) bzw. bei 72 °C (Taq-DNA-Polymerase, KOD DNA-Polymerase). Denaturierung, Annealing und Elongation wurden 33-mal wiederholt. Die finale Elongation erfolgte bei der optimalen Arbeitstemperatur der eingesetzten DNA-Polymerase für 10 min, um die vollständige Synthese der Doppelstränge zu gewährleisten. Die Ansätze wurden auf 4 °C abgekühlt und bei - 20 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Alle Ansätze enthielten 1/10 Vol. des 10x Reaktionspuffers GC von Genaxxon (Genaxxon DNA-Polymerase) bzw. von Merck (KOD DNA-Polymerase) oder von BioLabs (Phusion DNA-Polymerase), 0,2 mM dNTP-Mix, etwa 1 – 100 ng DNA, 20 pmol jeden Primers, 6 % (v/v) DMSO, 1 U Genaxxon DNA-Polymerase bzw. 1 U KOD DNA-Polymerase oder 1 µl der 1:100 verdünnten Phusion DNA-Polymerase. Auf das Endvolumen von 50 µl wurde mit H_2O_{demin} aufgefüllt. Für eine Kolonie-PCR wurde eine Kolonie in 50 µl H_2O gekocht (99 °C, 5 min), der Ansatz abzentrifugiert (16.060 g, RT, 10 min) und 5 µl des Überstandes in die PCR eingesetzt.

Die in dieser Arbeit eingesetzten Primer wurden mit Hilfe des Programms Clone Manager 7 von Sci Ed Central (Cary, USA) entworfen. Als Annealingtemperatur wurde stehts ein um 3 °C tiefere Temperatur gewählt als durch den Clone Manager vorhergesagt. Bei PCR-Durchläufen ohne Produkt wurde bei Wiederholung die Annealingtemperatur erniedrigt.

Restriktionsverdau und Dephosphorylierung linearisierter Plasmid-DNA

Um Plasmide und PCR-Produkte spezifisch zu schneiden, wurden diese mit Restriktionsenzymen nach Herstellerangaben verdaut. Dafür wurden Restriktionsenzyme sowie die geeigneten Reaktionspuffer von Fermentas verwendet. Reaktionen erfolgten in 20 µl Ansätzen für 1 h bei 37 °C in einem Heizblock. Das Ergebnis der Restriktionsverdaue wurde anhand einer Agarosegelelektrophorese analysiert. Die geschnittenen PCR-Fragmente oder Plasmide wurden vor der Ligation mit dem „NucleoSpin® Gel and PCR Clean Up“-Kit von Marchery-Nagel nach Herstellerangaben gereinigt. Linearisierte Plasmide wurden zur Vermeidung von Religationen nach dem Restriktionsverdau mit alkalischer Phosphatase (SAP) nach Herstellerangaben behandelt.

Ligation von PCR-Fragmenten mit Plasmid-DNA

Die Ligation geschnittener, dephosphorylierter Plasmid-DNA mit geschnittenem DNA-Fragment (Insert) erfolgte in 20 µl-Ansätzen. Dazu wurden die Komponenten in den Verhältnissen 1:5; 1:7,5 und 1:10 eingesetzt. Zusätzlich wurden 2 µl 10x Ligationspuffer und 1 U bzw. bei „blunt-End“-Ligationen 5 U T4-DNA-Ligase verwendet. Die Ligation erfolgte bei 22 °C für 1,5 h. Durch eine Hitzeinaktivierung bei 68 °C für 10 min wurde die Ligase inaktiviert. Der Ligationsansatz wurde direkt in elektrokompetente *E.coli*-Zellen transformiert.

2.5.6 Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe von Agarosegelen lassen sich DNA-Fragmente ihrer Größe nach auftrennen (Aaij & Borst, 1972). Dies geschieht auf Grund der negativen Phosphatgruppen der Nukleinsäuren, die beim Anlegen eines elektrischen Feldes zur Anode wandern. Kürzere DNA-Fragmente wandern schneller durch die Gelmatrix der Agarose als längere DNA-Fragmente, da letztere im molekularen Netz des Agarosegels stärker zurückgehalten werden (Sambrook & Russell, 2001). Für DNA-Fragmente größer als 1000 Bp wurden 0,8 % (w/v)-Agarosegeleeingesetzt, bei kleineren DNA-Fragmente wurden Agarosegele mit einer Agarosekonzentration von 2 % (w/v) verwendet. Zur Herstellung der Gelmatrix wurde die entsprechende Menge an Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA, pH 7,5, eingestellt mit HCl) durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst, bei 60 °C gelagert und die flüssige Agarose zum Aushärten in Gelkammern gegossen. Als Laufpuffer wurde TAE-Puffer auf das ausgehärtete

Gel gegeben. Von den zu analysierenden Proben wurden 5 – 10 µl mit 0,25 Vol. Loading Dye versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Zur Bestimmung der Länge der DNA-Fragmente der Proben wurde zusätzlich ein Größenstandard (GeneRulerTM 1 kb ladder bzw. MassRuler™ Low Range DNA Ladder, beide MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) aufgetragen. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte bei 70 – 120 V. Zum Sichtbarmachen der aufgetrennten Nukleinsäuren wurde das Agarosegel 5 bis 15 min in eine wässrige Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) gelegt und danach mit Wasser gespült. Mit Hilfe von UV-Licht (λ = 312 nm) wurde das in die DNA-Fragmente interkalierte Ethidiumbromid zur Fluoreszenz angeregt. Mit einer Fotodokumentationsanlage wurden die Banden auf dem Agarosegel dokumentiert.

2.6 Arbeiten mit Proteinen

2.6.1 Inkubation von Kulturüberständen nach Wachstumsende mit stärkeabbauenden Enzymen

Für die Inkubation von Kulturüberständen nach Wachstumsende mit stärkeabbauenden Enzymen wurde der Überstand 3:4 mit 4-fache angesetztem optimalen Puffer des jeweiligen Enzyms bzw. in 4-fach angesetztem CgC-Minimalmedium verdünnt. Nach Zugabe des entsprechenden Enzyms erfolgte die Inkubation bei optimaler Arbeitstemperatur des entsprechenden Enzyms für 2 h. Die Ansätze hatten jeweils ein Reaktionsvolumen von 1 ml.

Amyloglukosidase aus *A. niger*

Von der Amyloglukosidase wurden 0,6 U beim Einsatz in 1 ml Reaktionsvolumen eingesetzt. Als Puffer wurde 40 mM Kaliumacetatpuffer mit einem pH-Wert von 4,2 verwendet. Die optimale Arbeitstemperatur der Amyloglukosidase liegt bei 28 °C.

Isoamylase aus Pseudomonas sp.

Von der Isoamylase wurden bei einem Reaktionsvolumen von 1 ml 2,5 U eingesetzt. Als Puffer diente wie beim Einsatz von Amyloglukosidase 40 mM Kaliumacetatpuffer mit einem pH-Wert von 4,2. Die optimale Arbeitstemperatur dieses Enzyms liegt bei 40 °C.

Pullulanase aus *K. pneumoniae*

Von der Pullulanase wurden 0,3 U beim Einsatz in 1 ml Reaktionsvolumen eingesetzt. Als Puffer wurde 0,1 M Natriumacetatpuffer mit einem pH-Wert von 5,5 eingesetzt (in Anlehnung an Dinadalyala et al., 2008). Die optimale Arbeitstemperatur dieses Enzyms liegt bei 40 °C.

2.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wird zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer molekularen Masse genutzt. Es basiert auf einem diskontinuierlichen Puffer-System, wobei alle Komponenten 0,1 % SDS (w/v) enthalten (Laemmli, 1970). Das anionische Detergens SDS lagert sich an die Proteine an und überdeckt die Eigenladung der Proteine. Die resultierenden Komplexe zeigen durch die Sulfaltgruppen des angelagerten SDS eine konstante Ladung pro Masseneinheit der Proteine. Auf Grund dessen wird durch das Anlegen eines elektrischen Feldes die Laufgeschwindigkeit der Proteine im Gel nur von der relativen Molekülmasse bestimmt und nicht auf Grund von Ladungsunterschieden der Proteine. Das Gel setzte sich aus einem 10 %-igen Trenngel und einem 5 %-igen Sammelgel zusammen, pro Tasche wurden etwa 10 µg Protein geladen. Das engporige Trenngel bestand aus 10 % Acrylamid/Bisacrylamid (w/v), 375 mM Tris, 0,1 % SDS und wurde mit HCl auf einen pH-Wert von 8,8 eingestellt. Die Polymerisierung wurde durch die Zugabe von 0,1 % APS erreicht, als Katalysator wurde 0,04 % TEMED (v/v) eingesetzt. Zur Minimierung der Sauerstoffaufnahme wurde das frisch gegossene Trenngel mit 1 ml H_2O_{demin} überschichtet. Nach vollständiger Polymerisierung wurde das Wasser vollständig entfernt und mit dem Sammelgel überschichtet. Dieses setzte sich aus 5 % Acrylamid/Bisacryamid (w/v), 125 mM Tris, 0,1 % SDS (w/v). Wie beim Trenngel erfolgte die Polymerisierung des Sammelgels durch Zugabe von 0,1 % APS (v/v), die Reaktion wurde wieder durch 0,04 % TEMED (v/v) initiiert. Sofort nach dem Gießen des Sammelgels wurde der Kamm eingesetzt. Das Sammelgel gewährleistet den zeitgleichen Übergang der Proteine in das Trenngel. Das vollständig polymerisierte Gel wurde in eine SDS-Gel-Elektrophoresekammer (Thermo Scientific Owl Separation System) eingesetzt und mit SDS-Laufpuffer (25 mM Tris, 250 mM Glycerin, 0,1 % SDS (w/v), eingestellt mit HCl auf pH 8,3) überschichtet. Die aufzutragenden Proben wurden mit 5x SDS-Probenauftragspuffer (50 mM Tris, 100 mM DTT, 2 % SDS, 0,1 % Bromphenolblau, 10 % Glycerin, mit HCl eingestellt auf einen pH-Wert von 6,8) im Verhältnis 5:1 gemischt, bei 99 °C für 5 min gekocht und in die Taschen pipettiert. Als Größenvergleich wurde ein Protein-Standard aufgetragen (Unstained bzw. Prestained Protein Ladder, Fermentas). Die Gelelektrophorese erfolgte bei einer Stromstärke von 20 mA pro Gel. Der Lauf wurde beendet sobald die sichtbare Bande des Bromphenols das Ende des Gels erreichte. Die Proteinbanden wurden entweder mit einer Coomassie-Lösung oder durch Silberfärbung sichtbar gemacht.

2.6.3 Konzentrieren von Proteinen in Kulturüberständen

Konzentrieren von Proteinen mit Vivaspin

Zur effizienten Konzentrierung von Proteinen im Kulturüberstand wurden Vivaspin 2 ml-Säulen nach Herstellerangaben verwendet. Es wurden 6 ml Kulturüberstand in 200 µl konzentriert.

Ammoniumsulfatfällung

Zur Fällung von Proteinen im Kulturüberstand wurde die Methode nach Cluff et al. (1990) durchgeführt. Eine 50 ml Kultur wurde zentrifugiert (4.500 g, 4 °C, 15 min) und der Überstand mit 100 mM PMSF und 500 mM EDTA versetzt. Die Proteinfällung wurde durch die Zugabe von 53 g Ammoniumsulfat pro 100 ml Überstand erreicht. Der Ansatz wurde über Nacht bei 4 °C gelagert und die ausgefallenen Proteine mit einer Pipette abgenommen. Die Probe wurde zentrifugiert (20.600 g, 4 °C, 1 h) und das Proteinpellet in 0,9 %-iger Saline gelöst.

2.6.4 Detektion von Proteinen in SDS-Polyacrylamid-Gelen

Detektion von Proteinen in SDS-Polyacrylamid-Gelen mit Coomassie

Für die Detektion von Banden mit einer Proteinmenge von etwa 20 – 100 ng in SDS-Polyacrylamid-Gelen wurde eine schnelle Coomassie-Färbung ohne organische Löungsmittel und Essigsäure durchgeführt (Wondrak, 2001a,b,c). Für die eingesetzte Lösung wurden 80 mg CBB G-250 in 1 l H_2O_{demin} 2 – 4 h unter Rühren gelöst und mit 35 mM 37 %-iger HCl angesäuert. Das zu färbende SDS-Polyacrylamid-Gel wurde vollständig mit H_2O_{demin} (ca. 20 – 30 ml) bedeckt und in einer Mikrowelle für ca 30 s erhitzt ohne das Wasser aufkochen zu lassen. Auf einem Taumler wurde das Gel mit dem heißen Wasser für 5 min inkubiert. Dieser Waschschritt wurde zweimal mit frischem H_2O_{demin} wiederholt. Zum Anfärben der Proteine wurde das Gel vollständig mit der Färbelösung bedeckt (15 – 20 ml) und für 15 s in der Mikrowelle ohne aufzukochen erhitzt. Nach einer Inkubation von 10 – 15 min auf einem Taumler zeigten sich die ersten Banden, die nach 20 – 25 min ausreichend in ihrer Intensität waren. Der Hintergrund wurde zur Verbesserung des Kontrastes mit H_2O_{demin} entfärbt.

Detektion von Proteinen in SDS-Polyacrylamid-Gelen mit Silberfärbung

Mit einer Silberfärbung kann man in einem SDS-Polyacrylamid-Gel Banden ab etwa 2 ng Protein nachweisen. Das Gel wurde über Nacht in Fixierlösung (30 % EtOH (v/v), 12 % Eisessig (v/v)) geschwenkt und anschließend dreimal für 10 min mit 50 %-igem $EtOH_{abs}$ (v/v) gewaschen. Nach einer Inkubation in Thiosulfat-Lösung (0,02 % $Na_2S_2O_3$) für 1 min folgten drei Waschschritte mit H_2O_{demin} für jeweils 20 s. Der Inkubation in einer Silbernitrat-Lösung (0,2 % $AgNO_3$ (w/v), 25,9 ‰ Formaldehyd (v/v)) für 15 min folgten zwei Waschschritte mit H_2O_{demin} für jeweils 20 s. Im Anschluss folgte die Inkubation in Entwickler-Lösung (6 % Na_2CO_3 (w/v), 18 ‰ Formaldehyd (v/v), 0,4 % $Na_2S_2O_3$ (w/v)) bis zur gewünschten Intensität und ein kurzer Waschschritt mit H_2O_{demin}. Die Reaktion wurde durch eine 15 minütige Inkubation des Gels in Stop-Lösung (50 mM Na_2EDTA, pH 8,0, eingestellt mir HCl) gestoppt.

2.6.5 Westernblot

Der Transfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen erfolgte im „semi dry"- Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran mittels einer Biometra-Elektrophoreseeinheit. Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Trenngel vom Sammelgel abgetrennt und für 10 min in Transferpuffer (48 mM Tris, 40 mM Glycin, 12 mM SDS, 20 % (v/v) Methanol, pH 9, eingestellt mit NaOH) equilibriert. Vor dem Proteintransfer wurden die Graphitelektroden der Transfereinheit mit Transferpuffer angefeuchtet. Anschließend wurden drei Lagen, auf Gelgröße zugeschnittenes Filterpapier in Transferpuffer getränkt und auf die Anode gestapelt. Darauf folgte eine zugeschnittene Nitrocellulosemembran, das Trenngel selbst und schlussendlich drei weitere Lagen feuchtes Filterpapier. Bei jeder Schicht wurde darauf geachtet, dass sie luftblasenfrei auf die anderen Schichten gestapelt wurde. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte nach Auflegen der Kathode durch Anlegen einer Stromstärke von 3,5 mA pro cm^2 Gel für 1 h. Der erfolgreiche Transfer wurde durch ein reversibles Anfärben der Proteine auf der Membran mit Ponceau-S-Lösung überprüft. Dafür wurde die Membran mit Ponceau-S-Lösung benetzt und der überschüssige Farbstoff wieder mit H_2O_{demin} abgewaschen. Dabei wurden die übertragenen Proteine als rote Banden sichtbar. Durch weiteres Waschen mit H_2O_{demin} konnte der Farbstoff vollständig entfernt werden.

Die Pullulanase aus *K. pneumoniae* wurden mit einem polyklonalen Antikörper gegen die Pullulanase von *Enterobacter aerogenes* nachgewiesen. Hierfür wurden, nach der Übertragung der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran unspezifische Proteinbindungsstellen blockiert. Dazu wurde die Membran für 1 h in Blockmilch (0,1 M PBS (0,8 g NaCl, 0,02 g KCl, 0,144 g Na_2HPO_4, 0,024 g KH_2PO_4, pH mit NaOH auf 7,4 eingestellt) mit 5 % (w/v) fettarmer Trockenmilch) bei RT auf einem Taumler inkubiert. Die

Blockmilch wurde entfernt und 5 ml 0,1 M PBS mit 250 ng Polyclonal Anibody to Pullulanase zugegeben. Die Inkubation erfolgte 1 h unter Schütteln. Die Membran wurde dreimal mit je 5 ml 0,1 M PBS für 15 min gewaschen. Anschließend wurde die Membran in 5 ml 0,1 M PBS mit 5 % (w/v) fettarmer Trockenmilch und Immuno Pure® Antikörper für 1 h unter Schütteln bei RT inkubiert. Der Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit 0,1 M PBS entfernt. Der Nachweis dieses Antikörpers erfolgte mit dem Kit Pierce® ECL Western Blotting Substrate und der anschließenden Detektion der Fluoreszenz mit einem entwickelten Röntgenfilm.

2.6.6 Proteinbestimmung mit dem „BCA Protein Assay“

Zur Proteinbestimmung wurde der „BCA Protein Assay“ von Thermo Fisher Scientific verwendet. Die zu untersuchenden Proben wurden in geeigneten Verdünnungen eingesetzt und die Bestimmung nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Proteinbestimmung erfolgte auf Microtiter-Platten (96 well plates) in einem Anthos hat III Platereader bei 562 nm. Aus dem mitgelieferten Rinderserumalbumin (BSA)-Standard (2000 µg/ml) wurde eine Verdünnungsreihe gemäß der dem Kit beiliegenden Anleitung hergestellt und ebenfalls der Proteinbestimmung unterzogen. Die Methode basiert auf die Reduktion von Kupfer Cu^{2+} zu Cu^{+} durch die Proteine im alkalischen Bereich und der anschließenden colorimetrischen Detektion des gebildeten, purpurfabenen Cu^{+}-BCA-Komplexes.

2.6.7 Bestimmung von Enzym-Aktivitäten

Bestimmung der Amylopullulanase-Aktivität

Die Bestimmung der Amylopullulanase-Aktivität erfolgte durch die Bestimmung von entstehenden reduzierenden Enden, die bei Inkubation des Enzyms mit löslicher Kartoffelstärke entstehen (O’Connell Motherway et al., 2008, modifiziert). Die Zellen wurden in CgC-Minimalmedium mit 1 % Glukose gezüchtet und in der späten exponentiellen Phase bei OD_{600nm} 8 zu 25 ml-Portionen geerntet (4.500 g, 4 °C, 10 min). Der Überstand wurde gekühlt gelagert (4 °C), die Zellpellets wurden zweimal mit Lysispuffer (50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol; pH 8,0 eingestellt mit NaOH) gewaschen und eingefroren. Zur Verwendung wurden die Zellpellets auf Eis aufgetaut und in 1 ml Lysispuffer suspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte im RiboLyser. Die aufgebrochenen Zellen wurden anschließend zentrifugiert (20.600 g, 4 °C, 20 min) um Zelltrümer und nicht aufgeschlossene Zellen zu entfernen. Im erhaltenen Überstand wurde die Proteinkonzentration gemessen. Der

Testansatz zum Abbau der löslichen Kartoffelstärke setzte sich für das Zelllysat wie folgt zusammen:

- 50 mM NaH_2PO_4, pH 6,0
- lösliche Kartoffelstärke (10 mg/ml)
- Protein (0,3 mg/ml)
- ad 40 ml H_2O_{demin}

Der Testansatz des Probenüberstandes setzte sich wie folgt zusammen:

- 50 mM NaH_2PO_4, pH 6,0
- lösliche Kartoffelstärke (10 mg/ml)
- 15 ml Überstand
- ad 20 ml H_2O_{demin}

Die Ansätze wurden bei 37 °C inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h wurden je 1 ml Probe entnommen und eingefroren.

Für das Messen der entstandenen reduzierenden Enden wurden die Proben aufgetaut und 10 min bei 99 °C auf dem Heizblock gekocht und anschließend zentrifugiert (20.600 g, RT, 5 min). Der Ansatz für die Bestimmung der reduzierenden Enden setzte sich wie folgt zusammen:

- 225 µl BCA-Lösung
- 9 µl Probe (1:10 verdünnt)
- ad 450 µl H_2O_{demin}

Der Ansatz wurde bei 80 °C für 10 min inkubiert um die Reaktion des Kupfers mit den reduzierenden Enden einzuleiten. Nach Abkühlen der Probe wurden je 225 µl in einer Microtiter-Platten (96 well plates) in einem Anthos hat III Platereader (Anthose Mikrosysteme GmbH, Krefeld) bei 562 nm gemessen. Mit den erhaltenen Werten und einer Glukosestandardlösung konnte die spezifische Aktivität des Zelllysats (mU/mg) bzw. die spezifische Aktivität des Überstandes (mU/ml) berechnet werden.

Bestimmung der Pullulanase-Aktivität

Die Bestimmung der Pullulanase-Aktivität erfolgte mit dem Kit „Assay of Pullulanase using Red-Pullulan“ von Megazyme, International Ireland 2008. Der Versuch basiert auf dem Abtrennen eines an Pullulan gebundenen roten Farbstoffes durch die Pullulanase, der dann im Überstand bei 510 nm detektiert werden kann. Durch einen Vergleich mit einer Standardkurve des Farbstoffes kann die Aktivität der eingesetzten Pullulanase bestimmt werden. Mit der eingesetzten Proteinmenge konnte dann sie spezifische Aktivitäten der Probe berechnet werden. Zur Bestimmung der Pullulanaseaktivität wurden Pellets einer 50 ml CgC-Minimalmediumkultur des entsprechenden Stammes in 1 ml Natriumacetatpuffer

(0,2 M, pH 5,0; nach Herstellerangaben zubereitet) gelöst und die Zellen in einem RiboLyser durch drei Durchgänge (35 s, 4 °C, Stufe 6,5) aufgeschlossen. Zwischen den Durchgängen wurden die Proben gekühlt. Nach dem Aufschluss wurden die nicht aufgeschlossenen Zellen, Zelltrümmer und Glaskügelchen abzentrifugiert (20.600 g, 4 °C, 20 min). Mit einer anschließenden Zentrifugation des Überstands in einer Ultrazentrifuge wurde die Membranfraktion vom Zelllysat abgetrennt (235.000 g, 4 °C, 1,5 h). Das Zelllysat wurde abgenommen und direkt in den Versuch eingesetzt. Die Membran wurde in 500 µl Natriumacetatpuffer gelöst und ebenfalls in den Versuch eingesetzt. Dabei wurden 125 µl Probe mit 125 µl RED-Pullulanlösung (RED-Pullulan-Pulver nach Herstellerangaben in 0,5 M KCL-Lösung gelöst) gut vermischt und 10 min bei 40 °C inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 1,5 ml 95 % Ethanol und 10 s starkes Mischen mit Hilfe eines Vortexers. Die Probe wurde 10 min bei RT inkubiert und der nicht abgespaltene Farbstoff durch Zentrifugieren (3.000 g, RT, 10 min) abgetrennt. Der Überstand wurde bei 510 nm gemessen und mit einer Standardgeraden von 400 mU/ml bis 4000 mU/ml verglichen.

2.7 Chromatographische Trennverfahren

2.7.1 Quantitative Bestimmung von Aminosäuren

Die Identifizierung und Quantifizierung von L-Lysin in Überständen aus Kulturproben von Wachstumsversuchen erfolgte über eine „Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography“ (RP-HPLC). Das Prinzip der RP-HPLC beruht auf der Wechselwirkung des Analyts mit einer polaren, mobilen Phase und einer unpolaren, stationären Phase. Durch die unterschiedlich starken Wechselwirkung der Analyten mit den zwei Phasen ergibt sich für jeden Analyt eine spezifische Retentionszeit an der unpolaren, stationären Phase und kann nach dem Übergang in die polare, mobile Phase letztendlich detektiert und quantifiziert werden. Die in dieser Arbeit angewandte Methode zur Detektion und zur Quantifizierung beruht auf einer Derivatisierung der zu messenden Aminosäuren zu fluoreszierenden Produkten (Lindroth and Mooper, 1979). Dies erfolgt durch die Vorsäulenderivatisierung mit Ortho-Phthaldialdehyd (OPA), durch die alle primären Aminosäuren zu fluoreszierenden Isoindol-Derivate umgesetzt werden. Um eine identische Bildung der Aminosäurederivate zu garantieren wurde ein automatisches Derivatisierungsprogramm verwendet (May and Brown, 1989). Zur Trennung der Aminosäuren und für Detektion wurde eine Agilent LC 1100 Anlage mit Fluoreszenzdetektor eingesetzt. Die zu untersuchenden Kulturüberstände wurden mit H_2O_{HPLC} entsprechend verdünnt (Messbereich: 5 – 100 µM) und mit 100 µM Ornithin als

internem Standard gemischt. Vor jedem Verdünnungsschritt wurde die Probe zum Abtrennen der restlichen Stärke zentrifugiert (16.060 g, 20 min, RT). Die Trennung der Aminosäuren erfolgte über eine Vor- und eine Hauptsäule bei 40 °C mit einem Gradientenbetrieb mit Lösungsmittel A (100 mM Natriumacetat, pH 7,2) und Lösungsmittel B (Methanol) und einer Durchflussrate von 0,35 – 0,6 ml/min. Die Fluoreszenz wurde bei einer Anregungswellenlänge von 230 nm und einer Emissionswellenlänge von 455 nm gemessen. Um die Aminosäuren durch eine Regressionsgerade identifizieren und quantifizieren zu können, wurde von den zu untersuchenden Aminosäuren bekannte Konzentrationen (5 – 100 µM, externer Standard) als einzelne Proben mitgeführt. Zur Erstellung der Regressiongeraden und zur Auswertung der Chromatogramme wurde das Programm HP-Chemstation for LC Rev. A.06.01 verwendet.

2.7.2 Quantitative Bestimmung von organischen Säuren

Die Bestimmung der organischen Säuren Pyruvat und Succinat erfolgte analog wie bei Wieschalka et al. (2012a,b) beschrieben. Mit einer RP-HPLC wurden die organischen Säuren aufgetrennt. Die entsprechend verdünnten Proben wurden über eine 40 x 8 mm „organic acid Vorsäule“ geleitet und anschließend über eine 300 x 8 mm „organic acid Hauptsäule“ (Polystroldivinylbenzol Copolymer) aufgetrennt. Als Laufmittel wurde 100 mM Schwefelsäure verwendet, die Flussgeschwindigkeit betrug 0,4 ml/min bei 40 °C. Detektiert wurden die organischen Säuren bei 215 nm mit einem Agilent 1100 VWD (variable wavelength detector). Die Quantifizierung erfolgte durch einen externen Standard mit Pyruvat bzw. Succinat in bekannten Konzentrationen. Die Auswertung der Chromatogramme wurde das Programm HP-Chemstation for LC Rev. A.06.01 verwendet.

2.7.3 Detektion von Stärkeabbauprodukten auf Kieselgelplatten

Für die dünnschichtchromatographischen Analysen wurden Normal-Kieselgel-DC-Platten verwendet. Die Hydroxylgruppen an den Siliziumatomen auf den Platten ermöglichen eine Auftrennung von polaren Stoffen wie z.B. Kohlenhydraten. Die Probenaufbereitung erfolgte nach Seibold et al. (2006). Jeweils 1 ml der eingefrorenen Überstände aus den Wachstumsversuchen wurden für 15 min bei 99 °C in einem Heizblock aufgekocht und anschließend zentrifugiert (16.060 g, RT, 20 min). Aus der zentrifugierten Probe wurden 950 µl des Überstandes entnommen und zur Proteinfällung mit 170 µl Trichloressigsäure vermischt. Die Proteine wurden durch einen Sedimentationsschritt (16.060 g, RT, 20 min) entfernt. Zum Entfernen der Trichloressigsäure wurde der Überstand zweimal mit Diethylether gewaschen (20.820 g, RT, 5 min). Der verbliebene Diethylether wurde in einer

SpeedVac entfernt (ca. 1 h). Von den aufbereiteten Proben wurden 5 µl mit Hilfe von Einmal-Mikropipetten auf eine DC-Platte aufgetragen. Zusätzlich wurden 5 µl eines Standards, bestehend aus Glukose, Maltose, Maltotriose, Maltoheptaose und lösliche Kartoffelstärke (je 5 µg/ml) aufgetragen. Die Kieselgel-Platte wurde zwei Mal ca. 6 h in einer DC-Kammer inkubiert. Das Laufmittelgemisch setzte sich aus 1-Butanol/2-Propanol/Ethanol/H_2O_{demin} im Verhältnis 3:2:3:2 zusammen. Die Detektion der Kohlenhydrate erfolgte durch Besprühen der DC-Platte mit Schwefelsäure (4 % H_2SO_4 (v/v) in Methanol) und einer Inkubation der besprühten Platte bei 140 °C für 10 min. Durch das Erhitzen wird die Flüssigkeit aus der Probe entfernt und die zurückgebliebenen Kohlenstoffe durch die Schwefelsäure verkohlt. Die entwickelten DC-Platten wurden fotographisch festgehalten.

2.7.4 Reinigen des Proteins GlgXHIS durch Affinitätschromatographie

Bei der Affinitätschromatographie wird die biospezifische aber reversible Wechselwirkung zwischen einem Molekül und einem individuellen Bindungspartner genutzt, um das Molekül selektiv aus einem Molekülgemisch zu selektionieren. Der Bindungspartner ist dafür kovalent an eine Matrix gebunden und dient als immobilisierter Ligand. Nach dem Binden des Moleküls wird die Elution durch eine kompetitive Verdrängung durch Änderung der Ionenstärke erreicht. Die Reinigung des Proteins GlgXHIS aus dem Rohextrakt von *E. coli* BL21(DE3)(pET28a-glgXHIS) nach Überexpression erfolgte wie in Seibold & Eikmanns (2007) beschrieben, durch eine Affinitätschromatographie mit dem ÄKTA-Purifier 100 (GE Healthcare Europe GmbH; Freiburg). Der Einbau der „HisTrap FF crude“ Säule (GE Healthcare Europe GmbH; Freiburg) erfolgte bei einem Fluss von 1 ml/min. Zum Schutz der Säule wurde das „variable max press level“ auf den angegeben Maximaldruck der Säule (0,3 MPa) eingestellt. Die Äquilibrierung der Anlage und der Säule erfolgte mit dem Bindepuffer (20 mM Natriumphosphat, 0,5 M NaCl, 20 mM Imidazol, pH 7,5). Das Laden der Säule mit dem Rohextrakt geschah automatisch über eine Probenauftragspumpe. Die Elution der nicht gebundenen Proteine erfolgte mit einem Waschpuffer (20 mM Natriumphosphat, 0,5 M NaCl, 75 mM Imidazol, pH 7,5). GlgX-His wurde mit einem Waschpuffer mit einer höheren Imidazolkonzentration (250 mM) eluiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden einzeln gesammelt und GlgX-His durch eine Western Blot Analyse mit einem His-tag spezifischen Antikörper identifiziert.

2.8 Berechnung des Ertrages und der spezifischen Produktivität

Ertrag

Der Ertrag wird definiert als Verhältnis der gebildeten Produktmenge zur eingesetzten Substratmenge:

$$\text{Ertrag} = \frac{\text{Produkt [g]}}{\text{Substrat [g]}} \text{ bzw. } \frac{\text{Produkt [mmol]}}{\text{Substrat [mmol]}}$$

Für die Bestimmung des Ertrages aus Stärkeexperimenten wurden die zu Beginn des Wachstums eingesetzten Glukoseeinheiten der jeweiligen Stärke bestimmt. Dazu wurden Kulturüberstände zum Zeitpunkt t = 0 h mit dem Enzym Amyloglukosidase in ihre einzelnen Glukosemoleküle gespalten und diese anschließend quantifiziert. Um den Betrag bezogen auf die tatsächlich verbrauchte Substratmenge berechnen zu können, wurden die Glukosemoleküle der nicht verwerteten Kohlenhydrate nach Ende des Wachstumsversuchs mit der selben Vorgehensweise bestimmt und diese von den zu Beginn eingesetzten Glukoseeinheiten abgezogen. Als Produktonzentration wurde jeweils die maximal ausgeschiedene Produktkonzentration des Stammes verwendet.

Spezifische Produktivität

Die spezifische Produktivität definiert sich als Verhältnis der gebildeten Produktmenge zur Produktionszeit und zur Biomasse:

$$\text{spezifische Produktivität} = \frac{\text{Produkt [mmol]}}{\text{Biomasse [gZTM]} * \text{Produktionszeit [h]}}$$

Die Produktionszeit ist bei den jeweiligen Versuchen angegeben, die Biomasse setzte sich aus dem Produkt der OD_{600nm} und dem Faktor der Zelltrockenmasse (ZTM) mit 0,3 g/l (Blombach et al., 2007) zusammen. Bei Stämmen, die während der Produktion eine variierende OD_{600nm} aufwiesen, wurde der Mittelwert der optischen Dichte während der Produktionszeit eingesetzt. Aufgrund der starken Trübung des Mediums durch die Stärke konnte das Wachstum teilweise nur über eine Proteinbestimmung verfolgt werden. Da sich eine Korrelation der optischen Dichte zur Proteinkonzentration von 100 µg/ml pro OD_{600nm}-Einheit zeigte, wurde die Biomasse basierend auf dieser Korrelation berechnet.

2.9 Enzymatische Konzentrationsbestimmungen

Abbau von Stärke mit Amyloglukosidase

In dieser Arbeit wurden fünf verschiedene pflanzliche Stärken (lösliche Kartoffel-, Kartoffel-, Mais-, Reis- und Weizenstärke) sowie Glykogen in Wachstumsversuche mit *C. glutamicum*-Stämmen eingesetzt. Um die Glukosekonzentrationen der Stärke und des Glykogens zu bestimmen, wurden die stärke- bzw. glykogenhaltigen Medien mit dem Enzym Amyloglukosidase aus *A. niger* inkubiert. Dieses Enzym spaltet sowohl α-1,4- als auch α-1,6-glykosidische Bindungen von Polysacchariden. Für die Bestimmung der Glukoseeinheiten in 1 % Stärke bzw. Glykogen wurden 0,6 U Amyloglukosidase eingesetzt. Als Puffer wurde Kaliumacetat-Puffer (Arbeitskonzentration 40 mM, pH 4,2) verwendet. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 56 °C. Die Inkubationsansätze hatten jeweils ein Gesamtvolumen von 400 µl. Nach dem Verdau der Stärke- bzw. Glykogenlösungen durch die Amyloglukosidase wurde die Glukosekonzentration enzymatisch bestimmt und der vollständige Verdau mit Hilfe einer dünnschichtchromatographischen Analyse überprüft.

Glukosebestimmung

Die Bestimmung der Glukosekonzentration in den mit Amyloglukosidase verdauten Stärke- und Glykogenlösungen erfolgte enzymatisch durch die Enzyme Hexokinase und Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase. Glukose wird dabei durch die Hexokinase mit ATP zu Glukose-6-Phosphat umgesetzt. Das gebildete Glukose-6-Phosphat wird in einer Folgereaktion unter Verbrauch von $NADP^+$ durch die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase zu 6-Phosphogluconolacton und NADPH + H^+ umgesetzt. Auf Grund der äquivalenten stöchometrischen Umsetzung von $NADP^+$ zu NADPH + H^+ und Glukose zu 6-Phosphogluconolacton kann durch die Detektion des gebildeten NADPH + H^+ bei 365 nm auf die Ausgangsmenge an Glukose geschlossen werden. Zur Quantifizierung der Glukose wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

- 500 µl Reaktionspuffer (0,4 M Tris, 0,4 mM $MgSO_4$, mit HCl auf pH 7,6 eingestellt)
- 100 µl $NADP^+$-Lösung (4,4 mg/ml)
- 100 µl ATP-Lösung (9,6 mg/ml)
- 100 µl Probe (max. 1,65 mM Glukose)
- ad 990 µl H_2O

Der Ansatz wurde gemischt und die Extinktion E1 der Lösung bei 365 nm bestimmt. Anschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe von 10 µl Enzymgemisch [Hexokinase (340 mU/1 µl)/Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (170 mU/1 µl)] gestartet. Der Ansatz

wurde gut gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Die Extrinktion E2 wurde bei 365 nm gemessen und die Konzentration der Glukose wie folgt berechnet:

$$c_{\mathrm{Glukose}} = \frac{\mathrm{Vgesamt} * \Delta \mathrm{E}}{\varepsilon * \mathrm{d} * \mathrm{VProbe}}$$

d = 1 cm

ΔE = E2 – E1

ε_{365nm} = 3,4 $(mM*cm)^{-1}$

V_{Probe} = eingesetztes Probenvolumen [ml]

V_{gesamt} = Volumen des gesamten Testansatzes [ml]

Glykogenbestimmung

Die Glykogenbestimmung im Zelllysat verschiedener *C. glutamicum* DM1729-Stämme wurde nach Seibold et al. (2007) durchgeführt. Zu bestimmten Zeitpunkten des Wachstums von verschiedenen *C. glutamicum* DM1729-Stämmen wurden Proben entnommen (5 ml nach 4 h, 6 h, 8 h), zentrifugiert (4.500 g, 4 °C, 5 min) und zweimal mit Kaliumacetatpuffer (40 mM, pH 4,2) gewaschen. Die Pellets wurden bei - 20 °C gelagert. Für den Zellaufschluss wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und in einem Gesamtvolumen von 1 ml mit Kaliumacetatpuffer gelöst und in Schraubdeckelröhrchen mit jeweils 250 µl Glaskügelchen aufgeteilt. Der Ansatz wurde bei 99 °C für 30 min inkubiert um die Inaktivierung der Enzyme, die am Glykogenaufbau bzw. –abbau beteiligt sind zu gewährleisten. Die Zellen wurden mechanisch in einem RiboLyser für 3 x 30 s bei einer Geschwindigkeitseinstellung von 6,5 aufgebrochen. Zellfragmente und Glaskügelchen wurden durch Zentrifugieren (20.820 g, 25 min, 4 °C) entfernt. Jeweils zweimal 200 µl der erhaltenen Probe wurden zur Weiterverarbeitung verwendet. Zu Probe A wurden 2 µl Amyloglukosidase (140 mU/µl) hinzugegeben um die Hydrolyse der α-1,4- und α-1,6-glykosidischen Bindungen des Glykogens zu katalysieren. Probe B diente als Referenz, um die Anzahl an Glukosemonomeren zu quantifizieren, die ohne die Zugabe an Amyloglukosidase freigesetzt wurden. Die Proben wurden über Nacht bei 56 °C inkubiert. Die Messung des Leerwertes E1 erfolgte in einem ELISA-plate-reader bei 340 nm in folgender Zusammensetzung:

- 100 µl Reaktionspuffer (siehe Glukosebestimmung)
- 20 µl $NADP^+$-Lösung (4,4 mg/ml)
- 20 µl ATP-Lösung (9,6 mg/ml)
- 20 µl Probe (max. 1,65 mM Glukose)
- ad 190 µl H_2O

Es folgte die Zugabe von 10 µl Enzymgemisch [Hexokinase (68 mU/µl)/Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (34 mU/µl) (Originalgemisch von Roche Diagnostics; Mannheim 1:5 verdünnt in 3,2 M Ammoniumsulfatlösung)] und eine Inkubation bei RT für 10 min. Die Extinktion E2 wurde bei 365 nm gemessen und die Konzentration der Glukose wie folgt berechnet:

$$c_{\mathrm{Glukose}} = \frac{V_{\mathrm{gesamt}} * \Delta E}{\varepsilon * d * V_{\mathrm{Probe}}}$$

d = 0,66 cm

ΔE = E2 – E1

ε_{340nm} = 6,22 $(mM*cm)^{-1}$

V_{Probe} = eingesetztes Probenvolumen [µl]

V_{gesamt} = Volumen des gesamten Testansatzes [µl]

Die Menge an Glykogen pro g ZTM wurde anschließend berechnet, indem die Glukosekonzentration mit der molaren Masse von Glukose multipliziert und durch das Trockengewicht der Zellen dividiert wurde. Das Zelltrockengewicht setzte sich aus dem Produkt der OD_{600nm} und des Faktors 0,3 g/l zusammen (Blombach et al., 2007).

Pyruvatbestimmung

Neben der Identifizierung und der Quantifizierung von Pyruvat mit Hilfe der RP-HPLC wurde die Pyruvatkonzentration in den Proben zur schnelleren Analyse auch enzymatisch bestimmt. Durch den Umsatz von Pyruvat und NADH + H^+ durch die L-LDH entstehen äquivalente Mengen an NAD^+ und Lactat. Die Absorption von NADH + H^+ bei 365 nm wird dann vor und nach der Inkubation der Probe mit L-LDH bei 365 nm gemessen. Da das entstehende NAD^+ keine Absorption bei 365 nm zeigt, kann Rückwirkend über das Lambert-Beersche Gesetz die Pyruvatkonzentration bestimmt werden. Zu Beginn der Messung wurde der Leerwert bei 365 nm bestimmt, der sich wie folgt zusammensetzte:

- 500 µl 100 mM Tris (pH 7,4, eingestellt mit HCl)
- 100 µl 3 mM NADH
- 290 µl H_2O_{demin}
- 100 µl Überstand von Wachstumsversuchen in geeigneter Verdünnung

Anschließend wurden 10 µl L-LDH in einer 1:10 Verdünnung mit 2,5 M Ammoniumsulfatlösung hinzugegeben (20 kU), gut gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Abschließend wurde erneut die Absorption bei 356 nm im Photometer gemessen. Die

Konzentration der Pyruvats wurde auf Grund der stöchiometrischen Übereinstimmung mit NAD^+ berechnet. Der Extinktionskoeffizient von NADH + H^+ entspricht bei 365 nm 3,4 $(mM*cm)^{-1}$.

2.10 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Stärke und Kulturproben

Die in dieser Arbeit gezeigten elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden in der zentralen Einrichtung Elektronenmikroskopie der Universität Ulm durchgeführt (Leiter: Prof. Dr. P. Walter). Die Bilder wurden mit einem Rasterelektronenmikroskop (Hitachi S-5200 FE-SEM) aufgenommen. Um eine genaue Abbildung der Probenoberflächen zu erhalten, wird diese durch einen fein fokusierten Elektronenstrahl (0,5 – 10 nm) punktweise und zeilenförmig abtastet (Reimer, 1989). Als Elektronenquelle dient eine Feldemissionskathode. Eine Anode beschleunigt den Elektronenstrahl, der durch eine Kondensorlinse so gebündelt uns ausgerichtet wird, dass der Strahl Punkt für Punkt über das Präparat rastert. Beim Zusammentreffen der Primärelektronen und der Probenoberfläche werden Sekundärelektronen durch Energieübertragung aus der Oberfläche heraus gelöst, die dann detektiert werden können. Auf einem Bildschirm werden die Signale dann verstärkt dargestellt. Für die Aufnahmen erzeugte die Feldemissionskathode einen Elektronenstrahl mit einer Beschleunigungsspannung von 5 kV und einer Stromstärke von 10 µA. Die Aufnahmen wurden mit einer Graustufe von 8 Bit aufgenommen. Die Präparatherstellung sowie die Fixierung der Proben wurden von Eberhard Schmid, Technischer Angestellter der zentralen Einrichtung Elektronenmikroskopie der Universität Ulm, durchgeführt. Für die elektonenmikroskopischen Aufnahmen der verschiedenen Stärkepulver wurden diese direkt als Pulver abgegeben, die Kulturproben bzw. die inkubierten 2 % nicht aufgekochte Weizenstärke wurden als frische 1 ml Proben übergeben. Die elektonenmikroskopischen Bilder wurden von Heiko Gregorius aufgenommen.

3. Ergebnisse

3.1 Produktion der organischen Säuren Pyruvat und Succinat und der Aminosäure L-Lysin mit rekombinanten *C. glutamicum*-Stämmen aus Stärke

3.1.1 Produktion organischer Säuren mit *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke

Der Stamm *C. glutamicum* Δ*aceE* Δ*pqo* Δ*ldhA* ΔC-T *ilvN* Δ*alaT* Δ*avtA* (*C. glutamicum* ELB-P) produziert unter aeroben Bedingungen Pyruvat (Wieschalka et al., 2012a), während er unter Sauerstoffmangelbedingungen in der Lage ist, Succinat zu produzieren (Wieschalka et al., 2012b). In diesen Stamm wurde das Plasmid pAmy eingebracht, welches das Gen *amyA* für die α-Amylase aus *Streptomyces griseus* trägt. Versuche von Seibold et al. (2006) zeigten bereits, dass das Einbringen des Plasmids pAmy in den L-Lysinproduzenten *C. glutamicum* DM1730 zu einer heterologen Überproduktion der α-Amylase führt und diese durch ein Signalpeptid über das sogenannte Sec-System ins Medium sezerniert wird. Dabei konnte gezeigt werden, dass die sezernierte α-Amylase aufgekochte, lösliche Kartoffelstärke extrazellulär abbauen und die Abbauprodukte zum größten Teil von *C. glutamicum* DM1730(pAmy) für das Wachstum sowie für die Produktion von L-Lysin verwendet werden konnten. Im Folgenden wurde untersucht, ob das Einbringen des Plasmids pAmy in den Stamm *C. glutamicum* ELB-P auch dazu führt, unter aeroben Bedingungen Pyruvat und unter anaerober Inkubation des Stammes Succinat zu produzieren.

3.1.1.1 Aerobe Produktion von Pyruvat mit *C. glutamicum* ELB-P(pAmy)

Für die aerobe Produktion von Pyruvat mit *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) wurde das Plasmid pAmy in den Stamm *C. glutamicum* ELB-P transformiert. Auf diese Weise wurden tetracyclinresistente Transformanten erhalten. Nach Kultivierung der rekombinanten *C. glutamicum* ELB-P(pAmy)-Zellen wurde das Plasmid isoliert und mit einem Restriktionsverdau überprüft. Es zeigte sich, dass alle überprüften Klone das Plasmid pAmy aufgenommen hatten. Die aerobe Produktion von Pyruvat erfolgte mit *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit 3 % aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke (w/v) bzw. als Kontrolle mit 3 % Glukose (w/v). Durch die Deletion des *aceE*-Gens der E1-Untereinheit des Pyruvatdehydrogenasekomplexes ist der Stamm

C. glutamicum ELB-P nicht mehr in der Lage, Pyruvat zu Acetyl-CoA umzuwandeln. Um den Acetyl-CoA-Pool aufrechtzuerhalten ist auf Grund dessen die Zugabe von Acetat ins Medium für das Wachstum von *C. glutamicum* ELB-P essentiell. In den hier durchgeführten Wachstumsversuchen wurde Acetat in Form von Kaliumacetat zugeführt. Vorversuche zeigten einen Wachstumsvorteil des Stammes *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) beim Einsatz von aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke gegenüber dem Einsatz von Glukose im Medium. Dies resultierte darin, dass der Stamm *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) mit 3 % aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke und 0,2 % Kaliumacetat (w/v) die gleiche Pyruvatkonzentration ausschied, wie mit 3 % Glukose und 0,5 % Kaliumacetat (w/v) im Medium (ca. 70 mM Pyruvat in 24 h, bzw. 160 mM Pyruvat in 48 h) (Abbildung 3). Der Stamm zeigte sowohl mit aufgekochter, löslicher Kartoffelstäre und Acetat als auch mit Glukose und Acetat exponentielles Wachstum. Die Wachstumsrate von *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) betrug in CgC-Minimalmedium mit 3 % aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke und 0,2 % Kaliumacetat $\mu = 0{,}30\ h^{-1}$, die maximale OD_{600nm} von etwa 15 erreichte der Stamm nach 12 h. Die OD_{600nm}

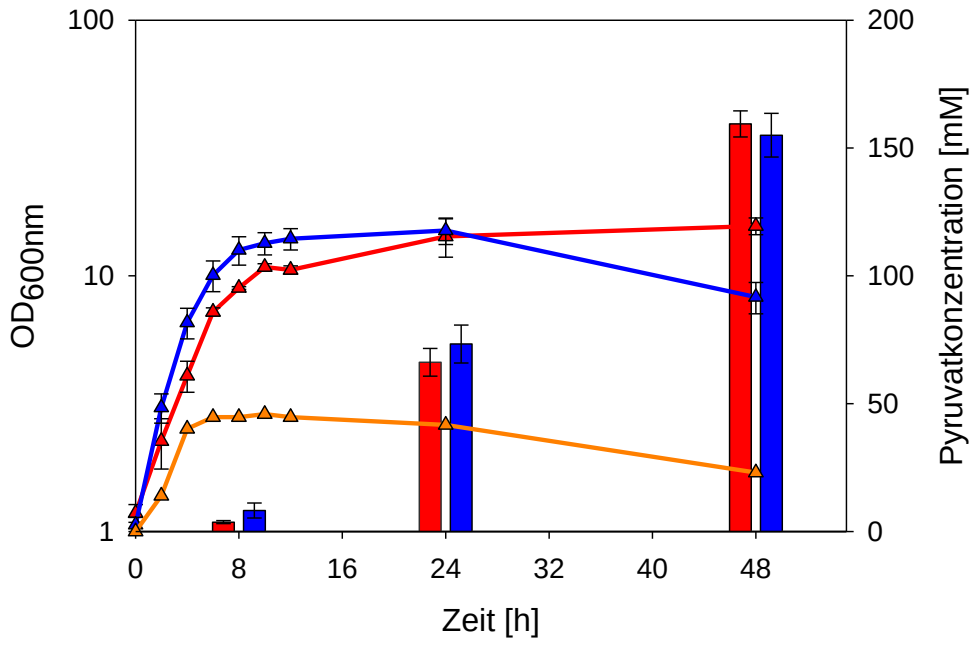

Abbildung 3: Wachstum (Δ: OD_{600nm}) und Pyruvatkonzentration (Balken) von *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit 3 % Glukose und 0,5 % Kaliumacetat (rot), *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) mit 3 % aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke und 0,2 % Kaliumacetat (blau) und *C. glutamicum* ELB-P(pCE-XT99A) mit 3 % aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke und 0,2 % Kaliumacetat (gelb). Die erreichten Pyruvatkonzentrationen von *C. glutamicum* ELB-P(pEC-XT99A) in CgC-Minimalmedium mit 3 % aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke und 0,2 % Kaliumacetat lagen unter 1 mM und sind auf Grund dessen nicht im Schaubild zu sehen. Die Abbildung zeigt den Durchschnitt von mindestens drei unabhängigen Einzelversuchen.

blieb bis zum Zeitpunkt t = 24 h konstant, sank dann bis zum Zeitpunkt t = 48 h um 6 OD_{600nm}-Einheiten auf eine OD_{600nm} von etwa 9. Im Gegensatz dazu erreichteder Stamm in CgC-Minimalmedium mit 3 % Glukose und 0,5 % Kaliumacetat eine etwas geringere Wachstumsrate (μ = 0,29 h^{-1}) und die maximale OD_{600nm} von 15 nach 24 h. Diese blieb bis zum Zeitpunkt t = 48 h konstant.

Diese Ergebnisse zeigen, dass bei Wachstum von *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) zum Erlangen der gleichen Pyruvatkonzentration mit 3 % aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke weniger Kaliumacetat benötigt wird als bei Wachstum mit 3 % Glukose.

Um diese Beobachtung bzw. den Effekt zu verdeutlichen, wurde auch ein Wachstumsversuch mit *C. glutamicum* ELB-P(pCE-XT99A) in CgC-Minimalmedium mit 3 % aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke und 0,2 % Kaliumacetat durchgeführt, der das Ursprungsplasmid von pAmy, den sogenannten Leervektor trägt. Dieser Stamm zeigte ebenfalls ein exponentielles Wachstum mit einer Wachstumsrate von μ = 0,30 h^{-1}, erreichte jedoch lediglich eine maximale OD_{600nm} von etwa 3 und produzierte kein Pyruvat (Abbildung 3). Vergleicht man diese Werte mit den Werten des Stammes *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) zeigt dies deutlich den Wachstumsvorteil, den der letztgenannte Stamm durch den Abbau der Stärke im Medium erhält.

Um auszuschließen, dass beim Einsatz von 3 % aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke mehr Kohlenstoffatome bzw. mehr Substrat für die Pyruvatproduktion zur Verfügung stehen als beim Einsatz von 3 % reiner Glukose, wurde die zu Beginn des Versuches eingesetzte Konzentration an Glukoseäquivalente bestimmt. Dies erfolgte theoretisch als auch praktisch. Gleichung A zeigt die Berechnung der Glukosekonzentration einer 3 %-igen Glukoselösung, Gleichung B die einer 3 %-igen Lösung aus aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke. Für die

Gleichung A $$c[M] = \frac{3\ g}{0{,}1\ l * 180{,}16 \frac{g}{mol}} = 0{,}1665\ M = 166{,}5\ mM$$

Gleichung B $$c[M] = \frac{2{,}7\ g}{0{,}1\ l * 162{,}16 \frac{g}{mol}} = 0{,}1665\ M = 166{,}5\ mM$$

Berechnung der Glukosekonzentration der Glukoselösung wurde das Molekulargewicht von reiner Glukose mit 180,16 g*mol^{-1} verwendet. Daraus ergab sich eine Konzentration von 166,5 mM. Für die Berechnung der Konzentration von Glukoseeinheiten in einer 3 %-igen löslicher Kartoffelstärkelösung wurde das Molekulargewicht der hydrolytisch verknüpften

Glukoseeinheiten mit 162,16 g*mol^{-1} verwendet. Dabei entspricht die Differenz der Molekulargewichte dem des abgespaltenen Wassermoleküls mit 18 g*mol^{-1}. Die hydrophile Eigenschaft des Stärkepulvers, die nach Herstellerangaben bis zu 10 % betragen kann, wurde berücksichtigt, indem die Stärkeausgangsmenge auf 2,7 g gesetzt wurde. Die nicht abgespaltenen Wassermoleküle an den Enden der Stärkeketten wurden bei dieser Berechnung nicht berücksichtigt. Der berechnete Wert der 3 %-igen lösliche Kartoffelstärkelösung ergab ebenfalls eine Konzentration von 166,5 mM. Die experimentelle Analyse der Glukosekonzentrationen in den eingesetzten Medien erfolgte durch eine enzymatische Glukosebestimmung. Hierfür konnte das CgC-Minimalmedium mit 3 % Glukose in geeigneter Verdünnung direkt in den Versuchsansatz eingesetzt werden. Das CgC-Minimalmedium mit 3 % aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke musste zuerst mit dem Enzym Amyloglukosidase aus *A. niger* inkubiert werden, um einen kompletten Abbau der eingesetzten Stärke zu Glukosemoleküle zu erreichen. Der vollständige Verdau der löslichen Kartoffelstärke zu Glukose wurde mit Hilfe einer dünnschichtchromatographischen Analyse bestätigt (Abbildung 4).

Die experimentell ermittelte Glukosekonzentrationen der eingesetzten 3 %-igen Glukoselösung lag bei 165,87 ± 3,33 mM, während die Glukosekonzentration der verdauten 3 %-igen löslichen Kartoffelstärke bei 164 ± 4,08 mM lag. Die experimentell gemessenen

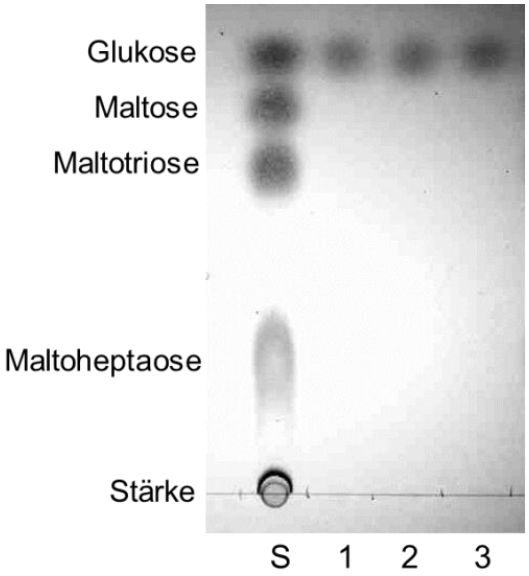

Abbildung 4: Dünnschichtchromatographische Analyse des vollständigen Abbaus einer 3 %-igen (w/v) Lösung aufgekochter, lösliche Kartoffelstärke. S: Standard aus Glukose, Maltose, Maltotriose, Maltoheptaose und Stärke zu je 5 µg/ml. 1, 2, 3: Überstande aus drei unabhängigen Proben.

Werte stimmen somit mit den berechneten Werten überein. Damit kann ausgeschlossen werden, dass *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit 3 % aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke mehr Glukoseeinheiten zur Pyruvatproduktion zur Verfügung stehen als in CgC-Minimalmedium mit 3 % reiner Glukose.

Dünnschichtchromatographische Analysen der Überstände von *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit 3 % Glukose und 0,5 % Kaliumacetat zeigten keine Kohlenhydratrückstände (nicht gezeigt). Die dünnschichtchromatographischen Analysen der Überstände von *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit 3 % aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke und 0,2 % Kaliumacetat zu den Zeitpunkten 0 h, 8 h, 12 h, 24 h und 48 h zeigten hingegen Kohlenhydratrückstände (Abbildung 5). Dabei zeigten sich zu den Zeitpunkten 24 h und 48 h Fraktionen in der Größenordnung von Stärke, Maltoheptaose und Maltose. Diese nicht verwertete Glukosekonzentration in Form der verbliebenen Kohlenhydrate in den Medien nach 48 h wurde bestimmt. Dazu wurden die Medien mit Amyloglukosidase inkubiert und die entstandene Glukosekonzentration enzymatisch bestimmt. Im Medium mit 3 % Glukose und 0,5 % Kaliumacetat blieb keine Glukose zurück. Im Medium mit 3 % aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke hingegen verblieb eine Glukosekonzentration von 28,23 ± 2,03 mM. Das bedeutet, dass von der eingesetzten Stärke (164 mM Glukoseeinheiten) nur 136 mM verbraucht wurden. Dies wurde bei der

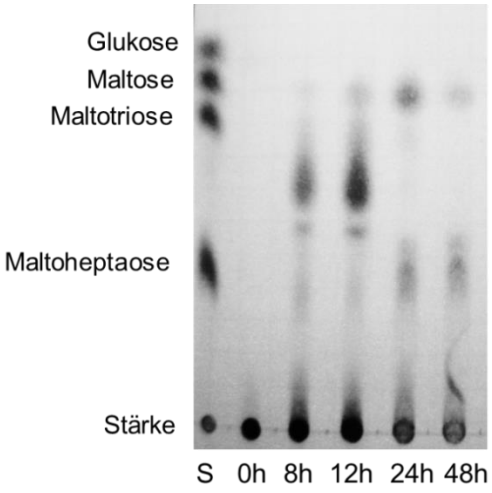

Abbildung 5: Dünnschichtchromatographische Analyse von Proben aus dem Überstand von *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit 3 % aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke und 0,2 % Kaliumacetat. S: Standard aus Glukose, Maltose, Maltotriose, Maltoheptaose und Stärke zu je 5 µg/ml. Analysierte Proben zu den Zeitpunkten 0h, 8h, 12h, 24h und 48h.

Tabelle 4: Kohlenstoff-normierte Pyruvaterträge $Y_{P/S}$ und spezifische Pyruvatproduktivität von *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) mit CgC-Minimalmedium mit 3 % Glukose und 0,5 % Kaliumacetat bzw. 3 % aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke und 0,2 % Kaliumacetat.

	Erträge $Y_{P/S}$[a]		Produktivitäten[d]
Substrate	**[mol C/mol C][b]**	**[mol C/mol C][c]**	**[mmol/g ZTM*h]**
3 % Glukose und 0,5 % Kaliumacetat	0,43 ± 0,01	0,43 ± 0,01	0,96 ± 0,01
3 % aufgekochte, lösliche Kartoffelstärke und 0,2 % Kaliumacetat	0,45 ± 0,02	0,53 ± 0,03	1,15 ± 0,03

[a] [(mol C gebunden in Pyruvat)/(mol C verbraucht von Glukose + Acetat)] zum Zeitpunkt der maximalen Pyruvatkonzentration, [b] bezogen auf das insgesamt eingesetzte Substrat, [c] bezogen auf das tatsächlich verbrauchte Substrat, [d] berechnet für die Produktionsdauer 8 h bis 48 h, ZTM berechnet mit Faktor 0,3 g Trockengewicht pro Liter und OD_{600nm}-Einheit (Blombach et al., 2007), als OD_{600nm}-Einheit wurde der Mittelwert der optischen Dichten der Zeitpunkte 8 h und 48 h verwendet, siehe Abbildung 3

Berechnung des Pyruvatertrags berücksichtigt, indem der Pyruvatertrag sowohl auf die gesamt eingesetzte als auch auf die tatsächlich verbrauchte Menge an Glukoseeinheiten berechnet wurde. Kaliumacetat war nach 24 h in keinem der Medien mehr nachweisbar. Die unterschiedlichen Kaliumacetatkonzentrationen der beiden Medien wurden bei der Berechnung der Pyruvatertrage berücksichtigt, indem der Ertrag Kohlenstoff-normiert berechnet wurde (Tabelle 4). In CgC-Minimalmedium mit 3 % Glukose und 0,5 % Kaliumacetat lag der Pyruvatertrag von *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) bei 0,43 ± 0,01 mol C in Pyruvat/mol C aus Glukose und Acetat. In CgC-Minimalmedium mit 3 % aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke und 0,2 % Kaliumacetat erreichte der Stamm einen Pyruvatertrag von 0,45 ± 0,02 mol C in Pyruvat/mol C aus Glukose und Acetat bezogen auf die zu Beginn eingesetzte Kohlenstoffmenge. Bezogen auf die tatsächlich verbrauchte Kohlenstoffmenge erreichte der Stamm in diesem Medium mit 0,53 ± 0,03 mol C in Pyruvat/mol C aus Glukose und Acetat einen um 18 % höheren Pyruvatertrag. Dieser Ertrag ist zudem um 23 % höher als der erreichte Pyruvatertrag von *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit 3 % Glukose und 0,5 % Kaliumacetat.

In Tabelle 4 sind zudem die berechneten spezifischen Produktivitäten von *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) aufgeführt. Im Vergleich erreichte der Stamm *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit 0,2 % Kaliumacetat und 3 % aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke eine um 20 % höhere spezifische Produktivität als in CgC-Minimalmedium mit 0,5 %

Kaliumacetat und 3 % Glukose (1,15 ± 0,03 gegenüber 0,96 ± 0,01 mmol Pyruvat/g Zelltrockenmasse (ZTM)*h). Die spezifischen Produktivitäten von *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) liegen mit beiden Substraten etwas höher, als beim Ausgangsstamm *C. glutamicum* ELB-P in fed-batch Fermentationen (0,92 mmol/g ZTM*h) (Wieschalka et al., 2012a).

Die Ergebnisse zeigen, dass der Stamm *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) sowohl Glukose als auch aufgekochte, lösliche Kartoffelstärke zur Pyruvatproduktion nutzen kann. Zudem konnte gezeigt werden, dass der Abbau der löslichen Kartoffelstärke durch die α-Amylase zu einer deutlichen Verbesserung des Wachstums führt. Ebenso erreichte der Stamm *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit löslicher Kartoffelstärke einen höheren Pyruvatertrag bezogen auf die tatsächlich verbrauchte Kohlenstoffmenge und eine höhere spezifische Pyruvatproduktivität als mit einer vergleichbaren Menge an Glukose als Substrat.

In einem weiteren Versuch wurde geprüft, ob der Ertrag und die spezifische Produktivität des Stammes durch kontrollierte Bedingungen weiter gesteigert werden könnten. Die Wachstums- und Pyruvatproduktionsexperimente wurden in einer Parallelfermentation mit vier Bioreaktoren durchgeführt. Als Substrate wurden 0,2 % Kaliumacetat und 3 % aufgekochte, lösliche Kartoffelstärke in CgC-Minimalmedium eingesetzt. Die Luftzufuhr

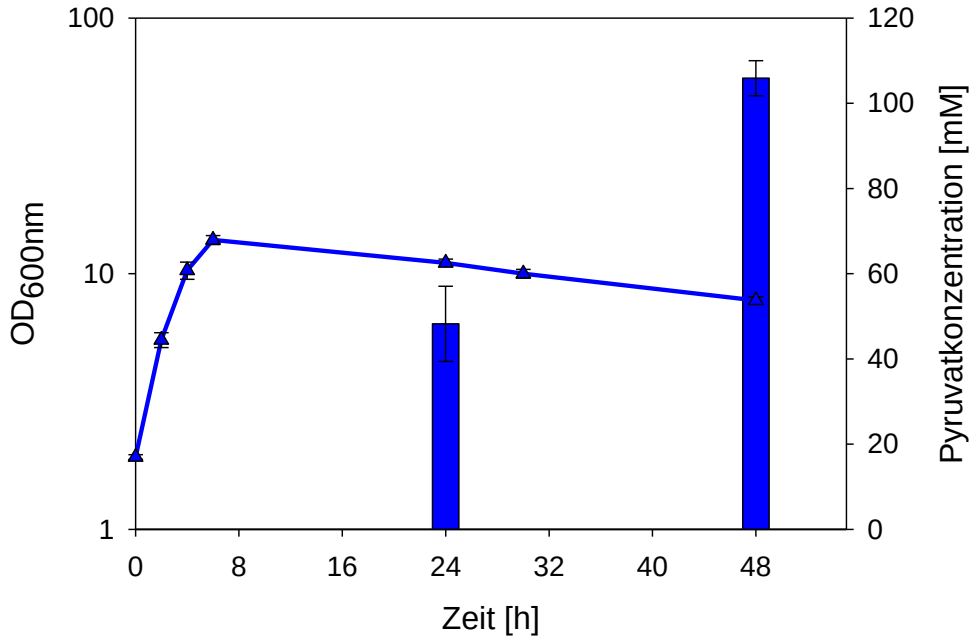

Abbildung 6: Wachstum (Δ: OD_{600nm}) und Pyruvatkonzentration (Balken) von *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit 0,2 % Kaliumacetat und 3 % aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke unter kontrollierten Bedingungen im DASGIP-Fermenter. Die Abbildung zeigt den Durchschnitt von drei unabhängigen Einzelversuchen.

wurde zu Beginn auf 0,75 vvm eingestellt und nach 6 h auf 0,25 vvm reduziert um eine semi-anaerobe Bedingung mit einer Sauerstoffsättigung pO_2 von etwa 1 % im Medium zu erreichen. Beimpft wurde das Medium mit einer OD_{600nm} von 2 zum Zeitpunkt t = 0 h. Das Wachstum wurde durch die Messung der OD_{600nm} zu bestimmten Zeitpunkten kontrolliert (Abbildung 6). Zum Zeitpunkt t = 6 h erreichte der Stamm *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) eine OD_{600nm} von etwa 14, was in etwa der maximal erreichten OD_{600nm} des Stammes im Schüttelkolbenexperiment entsprach. Bis zum Zeitpunkt t = 48 h sank die optische Dicht auf eine OD_{600nm} von 8 ab. Die maximale L-Lysinkonzentration während des Versuches konnte nach 48 h mit etwa 106 mM Pyruvat detektiert werden. Bezogen auf die insgesamt eingesetzte Kohlenstoffmenge ergab sich dadurch ein Pyruvatertrag von 0,31 ± 0,01 mol C/mol C. Dieser Ertrag ist um etwa ein Drittel geringer als der Ertrag, der im Schüttelkolbenexperiment erzielt wurde (siehe oben). Die spezifische Pyruvatproduktivität von *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) lag im DASGIP-Fermenter in CgC-Minimalmedium mit 0,2 % Kaliumacetat und 3 % aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke bei 0,69 ± 0,03 mmol/g ZTM*h. Die Berechnung erfolgte im Produktionszeitraum 6 h bis 48 h. Als OD_{600nm} wurde der Mittelwert der optischen Dichten zu den Zeitpunkten 6 h und 48 h gewählt. Die im Fermenter erreichte spezifische Pyruvatproduktivität ist somit um 40 % geringer als die erreichte spezifische Produktivität des Stammes im Schüttelkolben. Eine Erhöhung an Kaliumacetat auf 1,5 % führte ebenso wie eine frühere Sauerstoffminimierung zu noch geringeren Erträgen und spezifischen Produktivitäten (hier nicht gezeigt). Weitere Versuche müssten durchgeführt werden, um die optimalen Bedingungen zur Pyruvatproduktion von *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) im DASGIP-Fermenter zu finden.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass durch das Einbringen des Plasmids pAmy in einen *C. glutamicum*-Stamm neben L-Lysin auch sehr effizient Pyruvat aus aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke produziert werden kann.

3.1.1.2 Anaerobe Produktion von Succinat mit *C. glutamicum* ELB-P(pAmy)

Der Stamm *C. glutamicum* ELB-P produziert unter aeroben Wachstumsbedingungen Pyruvat, während er unter Sauerstoffmangelbedingungen Succinat produziert (Wieschalka et al., 2012b). Durch Einbringen des Plasmids pAmy in den Stamm *C. glutamicum* ELB-P konnte bereits gezeigt werden, dass der neu generierte Stamm *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) mit aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke Pyruvat produzieren kann (siehe 3.1.1.1). Im Folgenden wurde untersucht, ob dieser Stamm unter Sauerstoffmangelbedingungen Succinat aus aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke produziert. Die anaerobe Inkubation erfolgte in CgC-Minimalmedium mit 3 % Glukose bzw. 3 % aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke als Substrat. Als Vergleichsstamm diente dabei der Stamm *C. glutamicum*

ELB-P mit dem Leerplasmid pEC-XT99A. Um eine ausreichend hohe Zelldichte der Stämme für die anaerobe Succinatproduktion zu gewährleisten, wurde das Medium mit einer OD_{600nm} von etwa 10 angeimpft. Die untersuchten Stämme zeigten während der anaeroben Kultivierung leicht variierende optische Dichten (Abbildung 7). Der Stamm *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) zeigte einen Anstieg der OD_{600nm} in CgC-Minimalmedium mit 3 % Glukose bzw. 3 % löslicher Kartoffelstärke um 5 bzw. 2 OD_{600nm}-Einheiten in den ersten 6 h. In CgC-Minimalmedium mit 3 % Glukose sank die OD_{600nm} des Stammes sank dann bis zum Inkubationsende nach 48 h auf einen Wert von 12. Im stärkehaltigen Medium erreichte der Stamm *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) nach 24 h eine maximale OD_{600nm} von 17, die bis zum Inkubationsende wieder um 4 OD_{600nm}-Einheiten absank. Im Gegensatz dazu sank die OD_{600nm} des Stammes mit dem Leerplasmid *C. glutamicum* ELB-P(pEC-XT99A) in CgC-Minimalmedium mit 3 % löslicher Kartoffelstärke bereits in den ersten 10 h um 4 OD_{600nm}-Einheiten auf eine OD_{600nm} von 6 ab und blieb dann während der restlichen Inkubationzeit konstant. Die erreichte, höhere optische Dichte von *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) in CgG-Minimalmedium mit löslicher Kartoffelstärke zeigt einen Vorteil dieses Stammes gegenüber dem Ausgangsstamm *C. glutamicum* ELB-P(pCE-XT99A) durch den α-Amylase-bedingten

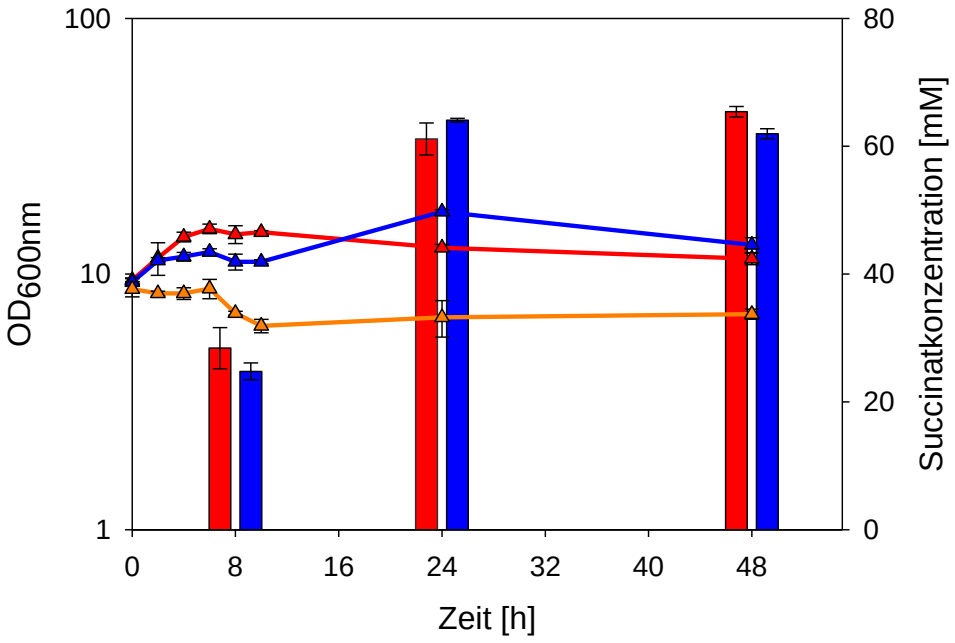

Abbildung 7: Wachstum (Δ: OD_{600nm}) und Succinatkonzentration (Balken) von *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit 3 % Glukose (rot), *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) mit 3 % aufgekochte, lösliche Kartoffelstärke (blau) und *C. glutamicum* ELB-P(pEC-XT99A) mit 3 % aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke (gelb). Die erreichten Succinatkonzentrationen von *C. glutamicum* ELB-P(pEC-XT99A) lagen unter 1 mM und sind deshalb nicht im Schaubild zu sehen. Die Abbildung zeigt den Durchschnitt von mindestens drei unabhängigen Einzelversuchen.

Stärkeabbau. Diese Beobachtung konnte bereits bei der Pyruvatproduktion gemacht werden (siehe 3.1.1.1). Der Stamm *C. glutamicum* ELB-P(pCE-XT99A) war zudem nicht in der Lage, Succinat aus 3 % löslicher Kartoffelstärke zu produzieren. Im Gegensatz dazu bildete der

Stamm *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) sowohl mit 3 % Glukose als auch mit 3 % aufgekochter, löslicher Stärke erhebliche Mengen Succinat. Die Konzentration lag nach 24 h Produktionzeit mit 3 % Glukose bei etwa 61 mM, mit 3 % aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke mit etwa 64 mM leicht höher. Im Zeitraum bis 48 h änderte sich die Konzentration in beiden Medien nicht mehr signifikant.

Um zu prüfen, ob die eingesetzte Stärke vollständig verbraucht wurde, wurde eine dünnschichtchromatographische Analyse der Überstande von *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit 3 % Glukose bzw. 3 % aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke und *C. glutamicum* ELB-P(pEC-XT99A) durchgeführt. Wie in Abbildung 8 zu sehen ist, blieben in allen drei Versuchsansätzen Kohlenhydrate in den Überständen zurück. Dabei trat im Überstand des Referenzstammes *C. glutamicum* ELB-P(pEC-XT99A) zum Zeitpunkt

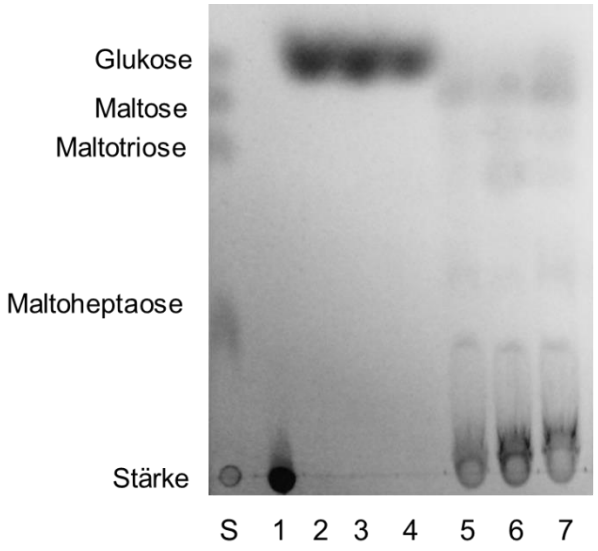

Abbildung 8: Dünnschichtchromatographische Analyse von Proben aus dem Überstand nach 24 h von *C. glutamicum* ELB-P(pEC-XT99A) in CgC-Minimalmedium mit 3 % aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke und von *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) mit 3 % aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke bzw. 3 % Glukose. S: Standard aus Glukose, Maltose, Maltotriose, Maltoheptaose und Stärke zu je 5 µg/ml. 1: Überstand *C. glutamicum* ELB-P(pEC-XT99A) in CgC-Minimalmedium mit 3 % aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke zum Zeitpunkt t = 24 h; 2,3,4: drei unabhängige Überstande von *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit 3 % Glukose zum Zeitpunkt 24 h; 5,6,7: drei unabhängige Überstande von *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit 3 % aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke zu den Zeitpunkten 24 h.

Tabelle 5: Succinaterträge $Y_{P/S}$ und spezifische Produktivitäten von *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit 3 % Glukose bzw. 3 % aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke als Substrat.

	Erträge $Y_{P/S}$[a]		Produktivitäten[d]	
Substrate	**[mmol/mmol][b]**	**[mmol/mmol][c]**	**[mmol/gZTM*h][e]**	**[mmol/gZTM*h][f]**
3 % Glukose	0,39 ± 0,01	0,93 ± 0,01	1,00 ± 0,11	0,62 ± 0,12
3 % aufgek., lösliche Kartoffelstärke	0,38 ± 0,00	0,82 ± 0,00	1,00 ± 0,05	0,57 ± 0,02

[a] [mmol Succinat/mmol Glukoseeinheiten] zum Zeitpunkt der maximalen Succinatkonzentration, [b] bezogen die insgesamt eingesetzte Kohlenstoffmenge, [c] bezogen auf die tatsächlich verbrauchte Kohlenstoffmenge, [d] (mmol Succinat/g ZTM*h), ZTM berechnet mit Faktor 0,3 g Trockengewicht pro Liter und OD_{600nm}-Einheit (Blombach et al., 2007), als OD_{600nm}-Einheit wurde der Mittelwert der optischen Dichten der Zeitpunkte 0 h und 8 h bzw. 8 h und 24 h verwendet, [e] im Produktionszeitraum 0h bis 8h, [f] im Produktionszeitraum 8h bis 24h, siehe Abbildung 7

t = 24 h nur eine Fraktion mit hoher Intensität auf Höhe von Stärke auf. In den Überstanden von *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit 3 % Glukose zum Zeitpunkt t = 24 h konnte ebenfalls nur eine Fraktion mit hoher Intensität detektiert werden, die auf Höhe von Glukose lag. Dagegen traten in den Überständen dieses Stammes in CgC-Minimalmedium mit löslicher Kartoffelstärke mehrere Fraktionen geringerer Intensität auf. Diese lagen auf Höhe von Stärke, Maltoheptaose, Maltotriose und Maltose. Dieses Abbaumuster der Stärke lässt, im Vergleich zum Referenzstamm, auf eine aktive α-Amylase im Überstand von *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) schließen.

Eine quantitative Analyse ergab, dass im Überstand von *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit 3 % Glukose nach 48 h noch 96,0 ± 2,2 mM Glukose verblieben. Im Überstand des Stammes in CgC-Minimalmedium mit 3 % aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke blieb eine Substratmenge in der Größenordnung von 88,2 ± 2,1 mM Glukose zurück. Die verbliebene Kohlenstoffmenge des Referenzstammes wurde nicht bestimmt. Der Succinatertrag bezogen auf die insgesamt eingesetzte Kohlenstoffmenge lag von *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit 3 % Glukose bei 0,39 ± 0,01 mmol Succinat/mmol Glukoseeinheiten, während der Ertrag mit löslicher Kartoffelstärke ebenfalls in dieser Größenordnung lag (0,38 ± 0,00 mmol Succinat/mmol Glukoseeinheiten) (Tabelle 5). Bezogen auf die tatsächlich verbrauchte Glukosemenge erreichte der Stamm bei Inkubation mit 3 % Glukose als Kohlenstoffquelle mit 0,93 ± 0,01 mmol Succinat/mmol

Glukoseeinheiten einen etwa 13 % höheren Ertrag als mit 3 % löslicher Kartoffelstärke als Substrat (0,82 ± 0,00 mmol Succinat/mmol Glukoseeinheiten).

Da der Stamm bereits in den ersten 8 h eine große Menge an Succinat ins Medium ausschied, wurde die spezifische Produktivität von *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit 3 % Glukose bzw. 3 % aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke zum einen im Produktionszeitraum von 0 h bis 8 h und zum anderen im Produktionszeitraum von 8 h bis 24 h berechnet (Tabelle 5). Die berechneten spezifischen Produktivitäten des Stammes *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit Glukose bzw. löslicher Kartoffelstärke entsprachen sich sowohl in der ersten Produktionsphase von 0 h bis 8 h (1,0 ± 0,1 mmol Succinat/g ZTM*h mit Glukose und 1,0 ± 0,05 mmol Succinat/g ZTM*h mit aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke) als auch in der zweiten Produktionsphase von 8 h bis 24 h (0,62 ± 0,12 mmol Succinat/g ZTM*h mit Glukose und 0,57 ± 0,02 mmol Succinat/g ZTM*h mit löslicher Kartoffelstärke). Dabei waren die spezifisch Produktivitäten in der ersten Produktionsphase etwa doppelt so hoch wie in der zweiten Produktionsphase.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Produktion von Succinat mit dem Stamm *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit 3 % Glukose bzw. 3 % aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke möglich ist. Mit beiden Substraten war der Ertrag, bezogen auf die gesamt eingesetzte Kohlenstoffmenge, gleich. Die spezifische Produktivitäten des Stammes waren ebenfalls sehr ähnlich. Dennoch zeigte sich, dass etwa die Hälfte des eingesetzten Substrates (Glukose bzw. aufgekochte, lösliche Kartoffelstärke) nicht durch den Stamm *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) genutzt wurde.

3.1.2 L-Lysinproduktion von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) mit verschiedenen Stärken als Substrate

Stärke ist ein Polymer aus verknüpften D-Glukosemonomeren. Sie setzt sich aus der über α-1,4-glykosidische Bindungen aufgebauten Amylose (Gesamtanteil in der Stärke: etwa 20 – 30 %) und dem über zusätzliche α-1,6-glykosidische Bindungen verzweigte Amylopektin (Gesamtanteil der Stärke: etwa 70 – 80 %) zusammen. Auf Grund des hohen Verzweigungsgrades des Amylopektins ist Stärke in Wasser weitgehend unlöslich. Experimente zeigten, dass Stärke durch eine Behandlung mit Glycerin und reinem Ethanol in eine Form übergeht, die besser in Wasser löslich ist (Zulkowsky, 1880). Die durch dieses Verfahren entstandene Stärke wird dann als „lösliche Stärke“ bezeichnet. Dabei zeigt lösliche Kartoffelstärke mit 50 g/l die beste Löslichkeit. Vorhergehende Untersuchungen zeigten, dass *C. glutamicum* DM1730(pAmy) aufgekochte, lösliche Kartoffelstärke extrazellulär abbauen und diese Stärke als Substrat für Wachstum und zur L-Lysinproduktion

nutzen kann (Seibold et al., 2006). In diesem Teil der Arbeit wurde geprüft, ob die L-Lysinproduktion mit aufgekochter löslicher Kartoffelstärke auch mit einem weiteren L-Lysin Produzenten möglich ist. Dazu wurde das Plasmid pAmy in den L-Lysinproduzenten *C. glutamicum* DM1729 transformiert. Mit dem erhaltenen Stamm *C. glutamicum* DM1729(pAmy) wurden Wachstumsversuche durchgeführt und die produzierte Menge an L-Lysin bestimmt. Des Weiteren wurde geprüft, ob der rekombinante Stamm *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in der Lage ist auch weitere Stärken, wie Kartoffel-, Mais-, Reis- und Weizenstärke als Energie- und Kohlenstoffquellen zu nutzen. Diese Stärken, sowie die lösliche Kartoffelstärke wurden in einer Konzentration von 2 % (w/v) in CgC-Minimalmedium als Substrat eingesetzt. Die Stärken wurden sowohl aufgekocht als auch nicht aufgekocht eingesetzt. Das Aufkochen der Stärken erfolgte im CgC-Minimalmedium vor dem Autoklavieren. Die Zugabe der nicht aufgekochten Stärke erfolgte steril vor Versuchsbeginn in Pulverform. Das Stärkepulver wurde zuvor im Trockenschrank bei 120 °C für 10 min sterilisiert und dann dem Medium zugegeben. Die Wachstumsversuche mit nicht aufgekochter Stärke sollten Aufschluss darüber geben, ob der Stamm auch direkt die Pulverform der Rohstärke zum Wachstum und zur L-Lysinproduktion verwenden kann. Wäre dies der Fall, könnte auf das Aufkochen der Stärken und den damit verbundenen hohen Energieverbrauch in der Vorbereitung der L-Lysinproduktion verzichtet werden.

3.1.2.1 Wachstumsverhalten und L-Lysinproduktion von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) mit unterschiedlichen Stärken

Der neu generierte Stamm *C. glutamicum* DM1729(pAmy) wurde auf das Wachstumsverhalten und die L-Lysinproduktion in CgC-Minimalmedium mit je 2 % verschiedener Stärken untersucht. Eingesetzt wurden aufgekochte bzw. nicht aufgekochte lösliche Kartoffel-, Kartoffel-, Mais-, Reis- und Weizenstärke. Das Kulturmedium wurde auf eine Anfangs-OD_{600nm} von 1 angeimpft. Die Kulturen wurden unter aeroben Bedingungen auf einem Rotationsschüttler kultiviert. Das Wachstum wurde beim Einsatz von aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke und aufgekochter Kartoffelstärke durch das Messen der optischen Dichte und durch Bestimmung der Proteinkonzentration in regelmäßigen Abständen verfolgt. Beim Einsatz von aufgekochter Mais-, Reis- und Weizenstärke sowie bei allen nicht aufgekochten Stärken wurde das Wachstum nur über die Proteinbestimmung verfolgt, das das Messen der optischen Dichte auf Grund der Trübung des Mediums durch das Stärkepulver nicht möglich war.

Wie aus Abbildung 9 A hervorgeht, zeigte *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit 2 % aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke exponentielles Wachstum im Zeitraum 0 h bis 8 h mit einer Wachstumsrate von $\mu = 0{,}28\ h^{-1}$ bezogen auf die OD_{600nm}-

Werte bzw. μ = 0,31 h^{-1} bezogen auf die Proteinkonzentrationen. Die maximale OD_{600nm} von 26 erreichte der Stamm nach 12 h, die höchste Proteinkonzentration von 2600 μg/ml erreichte der Stamm nach 24 h. Dennoch konnte eine Korrelation zwischen den gemessenen OD_{600nm}-Einheiten und der Proteinkonzentration erkannt werden. Dabei entsprach eine OD_{600nm}-Einheit einer Proteinkonzentration von etwa 100 μg/ml. Die maximale L-Lysinkonzentration von 9,5 mM erreichte der Stamm *C. glutamicum* DM1729(pAmy) mit aufgekochter löslicher Kartoffelstärke als Substrat nach 24 h. Nach 48 h sank die Konzentration leicht ab. Im Vergleich dazu wuchs und produzierte der Stamm *C. glutamicum* DM1729(pAmy) mit nicht aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke deutlich schlechter. Dies

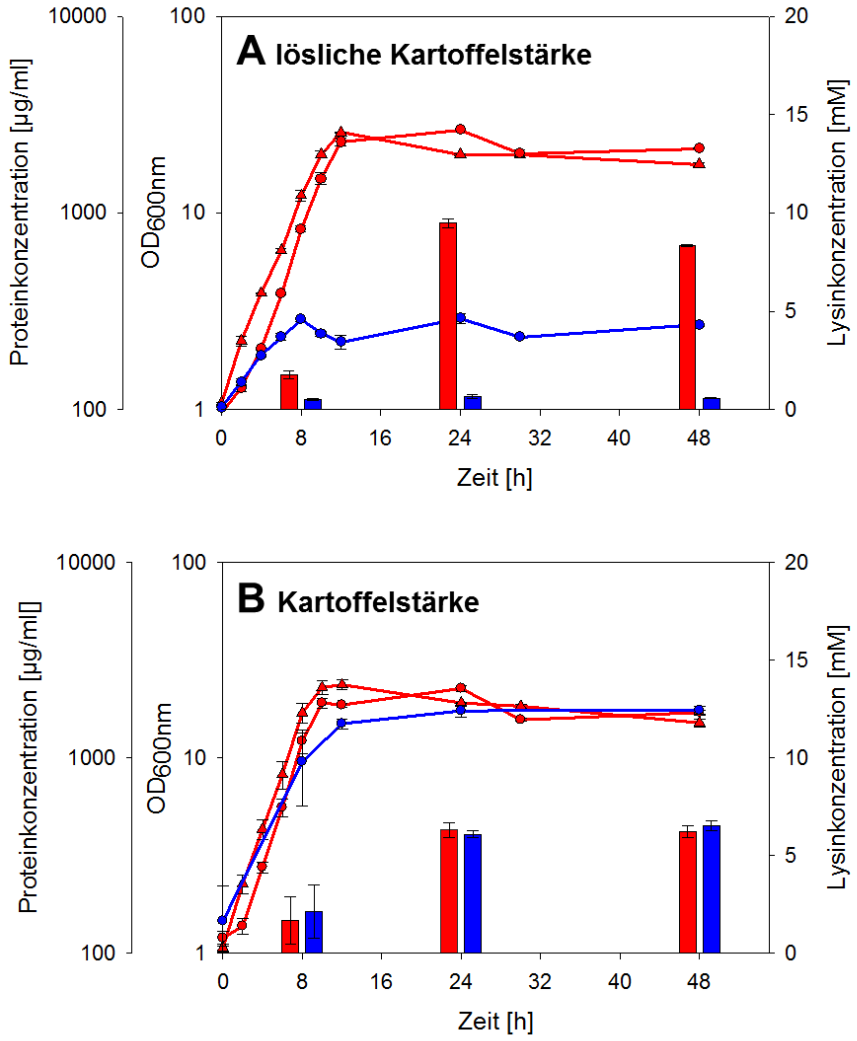

Abbildung 9: Wachstum (Δ: OD_{600nm}; o: Proteinkonzentration [μg/ml]) und L-Lysinkonzentration (Balken) von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit (A) 2 % löslicher Kartoffel- und (B) 2 % Kartoffelstärke. (rot) Stärke im Medium aufgekocht, (blau) Stärke im Medium nicht aufgekocht. Die Abbildungen zeigen den Durchschnitt von mindestens drei unabhängigen Einzelversuchen.

spiegelt sich in der Wachstumsrate von $\mu = 0{,}21\ h^{-1}$ im Zeitraum 0 h bis 8 h wider, zudem erreichte der Stamm bereits nach 8 h die höchste Proteinkonzentration mit nur 290 µg/ml in CgC-Minimalmedium mit nicht aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke, was etwa einemZehntel der erreichten Proteinkonzentration des Stammes in CgC-Minimalmedium mit 2 % aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke erreichte. Das geringe Wachstum war zudem mit einer sehr niedrigen maximalen L-Lysinkonzentration von etwa 0,9 mM nach 48 h verbunden.

In CgC-Minimalmedium mit aufgekochter Kartoffelstärke zeigte der Stamm *C. glutamicum* DM1729(pAmy) exponentielles Wachstum mit einer Wachstumsrate von $\mu = 0{,}33\ h^{-1}$, im Zeitraum 0 h bis 8 h, sowohl bezogen auf die OD_{600nm}-Werte als auch auf die Proteinkonzentrationen (Abbildung 9 B). Die maximale OD_{600nm} erreichte der Stamm nach 12 h (etwa OD_{600nm} 23), die maximale Proteinkonzentration betrug 2300 µg/ml. Wiederum korrelierten die beiden Wachstumsparameter sowohl in der exponentiellen, als auch in der stationären Phase mit einem Faktor von etwa 100 µg/ml pro OD_{600nm}-Einheit. *C. glutamicum* DM1729(pAmy) zeigte auch in CgC-Minimalmedium mit nicht aufgekochter Kartoffelstärke exponentielles Wachstum. Jedoch erreichte der Stamm mit diesem Substrat eine deutlich geringere Wachstumsrate im Zeitraum 0 h bis 8 h ($\mu = 0{,}23\ h^{-1}$). Zudem lag die maximal erreichte Proteinkonzentration mit 1750 µg/ml nach 48 h unter der Proteinkonzentration, die der Stamm in CgC-Minimalmedium mit aufgekochter Kartoffelstärke zeigte. Im Gegensatz dazu lagen die L-Lysinkonzentrationen von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) mit aufgekochter und mit nicht aufgekochter Kartoffelstärke zu allen gemessenen Zeitpunkten in der gleichen Größenordnung. Mit beiden Kohlenstoffquellen konnte in der Kultur nach 24 h eine maximale L-Lysinkonzentration von etwa 6 mM L-Lysin gemessen werden.

In Abbildung 10 A sind die Wachstumsverläufe und die produzierten L-Lysinkonzentrationen von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit aufgekochter bzw. nicht aufgekochter Maisstärke als Substrat gezeigt. Der Stamm *C. glutamicum* DM1729(pAmy) zeigte mit aufgekochter Maisstärke als Substrat ein exponentielles Wachstum mit einer Wachstumsrate von $\mu = 0{,}34\ h^{-1}$, im Zeitraum 0 h bis 8 h. Die maximale Proteinkonzentration erreichte der Stamm mit ca. 2230 µg/ml nach 12 h. Die höchste L-Lysinkonzentration erreichte der Stamm nach 48 h mit 13,4 mM L-Lysin. Im Gegensatz dazu zeigte *C. glutamicum* DM1729(pAmy) mit nicht aufgekochter Maisstärke ein deutlich verzögertes Wachstum. So lag die Wachstumsrate bei $\mu = 0{,}03\ h^{-1}$ im Zeitraum 8 h bis 48 h. Zudem erreichte der Stamm nach 48 h eine Proteinkonzentration von 1250 µg/ml, was noch nicht seiner maximalen erreichbaren Konzentration entspricht, was Wachstumsexperimente bis 144 h zeigten. Nach 48 h konnte in der Kultur eine L-Lysinkonzentration von 12 mM L-Lysin gemessen werden.

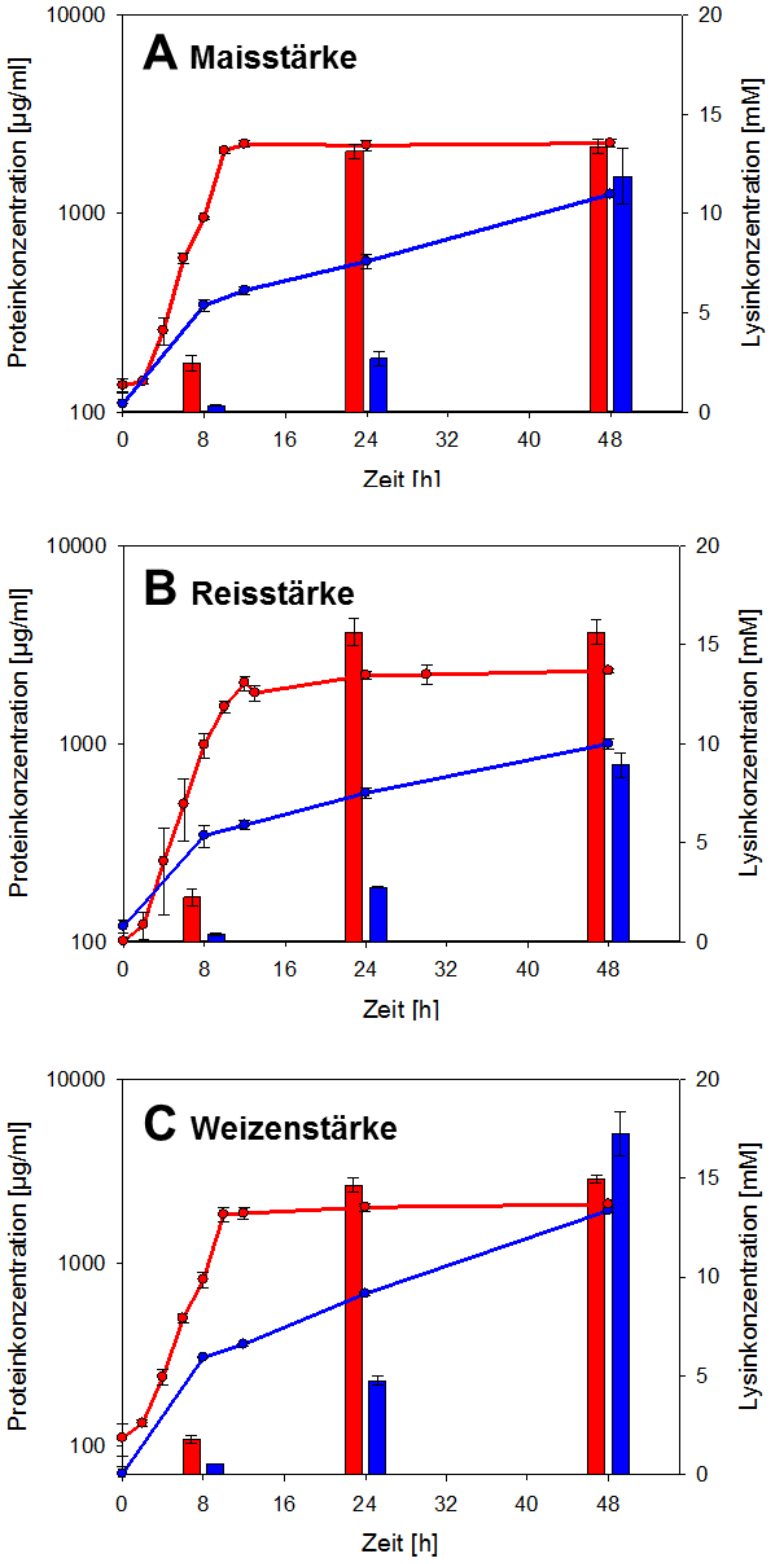

Abbildung 10: Wachstum (o: Proteinkonzentration [µg/ml]) und L-Lysinkonzentration (Balken) von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit (A) 2 % Mais-, (B) 2 % Reis- und (C) 2 % Weizenstärke. (rot) Stärke aufgekocht im Medium, (blau) Stärke nicht aufgekocht im Medium. Die Abbildungen zeigen den Durchschnitt von mindestens drei unabhängigen Einzelversuchen.

Bei Wachstum in CgC-Minimalmedium mit aufgekochter bzw. nicht aufgekochter Reisstärke zeigte *C. glutamicum* DM1729(pAmy) mit beiden Substraten ein exponentielles Wachstumsverhalten (Abbildung 10 B). Dennoch zeigte sich eine deutliche Wachstumsverzögerung in CgC-Minimalmedium mit nicht aufgekochter Reisstärke. Die im Zeitraum 8 h bis 48 h erreichte Wachstumsrate von $\mu = 0{,}03\ h^{-1}$ entspricht nur etwa einem Zehntel der Wachstumsrate, die der Stamm mit aufgekochter Reisstärke erreichte ($\mu = 0{,}32\ h^{-1}$, Zeitraum 0 h bis 8 h). Mit aufgekochter Reisstärke erreichte *C. glutamicum* DM1729(pAmy) nach 12 h eine maximale Proteinkonzentration von 2220 µg/ml, während der Stamm in CgC-Minimalmedium mit nicht aufgekochter Reisstärke nach 48 h mit einer Proteinkonzentration von 1000 µg/ml noch nicht seinen maximalen Wert erreicht hatte, was Wachstumsexperimente bis 144 h zeigten. Dies entspricht lediglich der Hälfte der erreichten Proteinkonzentration des Stammes bei Wachstum mit aufgekochter Reisstärke nach 12 h. Das schwache Wachstum korreliert mit einer geringeren maximalen L-Lysinkonzentration (8,9 mM L-Lysin nach 48 h). Dieser Wert entspricht etwa der Hälfte der L-Lysinkonzentration, die im Medium des Stamm *C. glutamicum* DM1729(pAmy) mit aufgekochter Reisstärke als Substrat schon nach 12 h im Medium gemessen werden konnte (16 mM L-Lysin nach 24 h).

Mit aufgekochter Weizenstärke wuchs *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in den ersten 8 h des Versuchs mit einer Wachstumsrate von $\mu = 0{,}32\ h^{-1}$ und erreichte eine maximale Proteinkonzentration von 2000 µg/ml nach 10 h (Abbildung 10 C). Nach 24 h erreichte der Stamm eine maximale L-Lysinkonzentration von etwa 15 mM L-Lysin. Mit nicht aufgekochter Weizenstärke zeigte der L-Lysinproduzent ein deutlich langsameres Wachstum als mit aufgekochter Weizenstärke. Die Wachstumsrate von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) lag mit nicht aufgekochter Weizenstärke bei $\mu = 0{,}05\ h^{-1}$ im Zeitraum von 8 h bis 48 h. Nach 48 h erreichte der Stamm in diesem Medium ebenfalls eine maximale Proteinkonzentration von 2000 µg/ml, was Wachstumsexperimente bis 144 h zeigten. Die höchste L-Lysinkonzentration erreichte *C. glutamicum* DM1729(pAmy) mit nicht aufgekochter Weizenstärke nach 48 h mit 17,2 mM L-Lysin. Diese liegt etwa 15 % höher als die maximal erreichte L-Lysinkonzentration des Stammes mit aufgekochter Weizenstärke als Substrat.

Vergleicht man das Wachstum von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit den aufgekochten bzw. nicht aufgekochten Stärken als Substrat, so wird deutlich, dass das Wachstum des Stammes mit aufgekochten Stärken in allen Fällen deutlich besser war. Eine Ausnahme zeigten nur die Wachstumskurven von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit aufgekochter Kartoffelstärke bzw. nicht aufgekochter Kartoffelstärke, die nahezu identisch waren. Beim Vergleich der maximal erreichten L-Lysinkonzentrationen von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit den aufgekochten bzw. den nicht aufgekochten Stärken zeigt sich, dass sich diese nahezu

entsprechen. Jedoch wurde die maximale L-Lysinkonzentration mit den nicht aufgekochten Stärken meist mit einer Verzögerung von 24 h erreicht. Lediglich die maximal erreichten L-Lysinkonzentrationen mit aufgekochter bzw. nicht aufgekochter Kartoffelstärke waren bereits nach 24 h identisch. Mit nicht aufgekochter Reisstärke konnte *C. glutamicum* DM1729(pAmy) auch nach 48 h nur die Hälfte der maximalen L-Lysinkonzentration mit aufgekochter Reisstärke als Substrat erreichen.

3.1.2.2 Dünnschichtchromatographische Analyse der nicht verwerteten Kohlenstoffe im Überstand der Wachstumsversuche mit *C. glutamicum* DM1729(pAmy)

Mit einer dünnschichtchromatographischen Analyse wurden die Überstände von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) nach Wachstumsende mit den unterschiedlichen Stärken als Substrat nach nicht verwerteten Kohlenhydratreste untersucht. Dafür wurden Proben aus den Kulturüberstanden der beschriebenen Wachstumsversuche (siehe 3.1.2.1) entnommen (8h, 12h, 24h und 48h), entsprechend behandelt und auf Kieselgelplatten analysiert. Abbildung 11 zeigt die Analyse der Kulturüberstände aus Wachstumsversuchen in CgC-Minimalmedium mit je 2 % der aufgekochten, löslichen Kartoffel-, Kartoffel-, Reis-, Mais- und Weizenstärke. Dabei traten in allen Kulturüberständen nach 8 h mehrere Fraktionen auf Höhe von Glukose, Maltose, Maltotriose und Maltoheptaose, sowie auf Höhe von Stärke auf. Zu den späteren Zeitpunkten (12 h, 24 h und 48 h) zeigten sich nur noch Fraktionen auf Höhe von Maltopentaose und Stärke. Zusätzlich zu diesen Fraktionen waren unterhalb der Maltoheptaose noch „schmierartige“ Fraktionen zu erkennen. Bei den Kulturüberständen von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) mit aufgekochter, löslicher Kartoffel-, Kartoffel- und

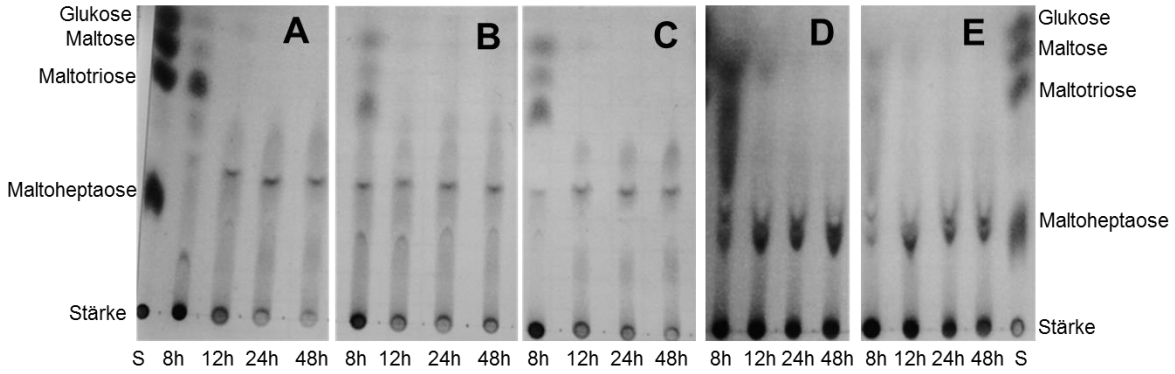

Abbildung 11: Dünnschichtchromatographische Analyse von Kulturüberständen aus Wachstumsversuchen von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit 2 % verschiedenen aufgekochten Stärken als Substrate. Spur S: Standard mit je 5 µg/ml Kartoffelstärke, Maltoheptaose, Maltotriose, Maltose, Glukose; die Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen (8h, 12h, 24h und 48h). (A) lösliche Kartoffelstärke, (B) Kartoffelstärke, (C) Reisstärke, (D) Maisstärke und (E) Weizenstärke.

Reisstärke war zudem zu beobachten, dass die Intensität der Fraktionen auf der Höhe von Stärke im Verlauf des Wachstums abnahm. Die Überstände aus Wachstumsversuchen mit nicht aufgekochter Kartoffel-, Mais-, Reis- und Weizenstärke zeigten nahezu identische Muster weshalb auf eine Abbildung dieser Analysen in dieser Arbeit verzichtet wurde. Ein Unterschied des Abbaumusters bestand lediglich darin, dass in den Überständen mit nichtaufgekochten Stärken zum Zeitpunkt t = 8 h nur Fraktionen auf Höhe von Maltose, Maltoheptaose und Stärke auftraten und keine Fraktionen auf Höhe von Glukose und Maltotriose zu erkennen waren.

Eine Ausnahme zu den bisher beschriebenen Abbaumustern zeigte die Analyse des Überstandes von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) mit 2 % nicht aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke (Abbildung 12). Dort war zu jedem Zeitpunkt das gleiche Fraktionsmuster zu sehen, mit einer leichten Fraktion auf Höhe von Maltoheptaose und eine sich in der Intensität nicht verändernden Fraktion auf Höhe von Stärke. Dies lässt darauf schließen, dass die α-1,6-glykosidischen Bindungen dieser Stärke nicht von der α-Amylase gespaltet werden können, und somit keine Kohlenstoffverbindungen entstehen, die von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) als Kohlenstoff- und Energiequelle genutzt werden können. Dies deckt sich mit dem geringen Wachstums dieses Stammes mit nicht aufgekochter Kartoffelstärke als Substrat (siehe 3.1.2.1).

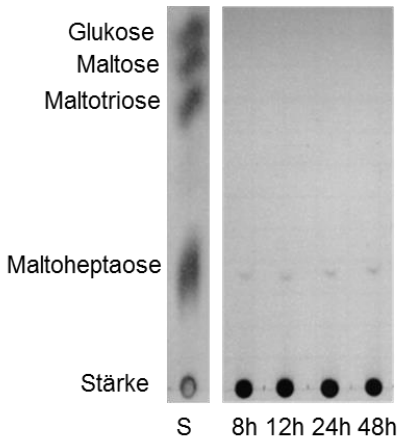

Abbildung 12: Dünnschichtchromatographische Analyse eines Kulturüberstandes aus einem Wachstumsversuch von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit 2 % nicht aufgekochter löslicher Kartoffelstärke als Substrate. Spur S: Standard mit je 5 µg/ml Kartoffelstärke, Maltoheptaose, Maltotriose, Maltose, Glukose; die Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen (8h, 12h, 24h und 48h).

Zusammengefasst zeigen die dünnschichtchromatographischen Analysen, dass *C. glutamicum* DM1729(pAmy) die eingesetzten aufgekochten und nicht aufgekochten Stärken abbauen und einen Großteil der Abbauprodukte aufnehmen konnte. Allerdings blieben bei allen eingesetzten Stärken Abbauprodukte in den Größenordnungen von Maltoheptaose und größeren Polysacchariden im Überstand zurück. Eine Ausnahme zeigte die Analyse des Überstands mit nicht aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke als Substrat, die zeigte dass diese Stärke nur sehr schlecht verwertet wird.

3.1.2.3 L-Lysinerträge und spezifische Produktivität von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) mit unterschiedlichen Substraten

L-Lysinerträge

Um die L-Lysinerträge von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit unterschiedlichen Stärken als Substrat berechnen zu können, musste zunächst die zu Beginn des Wachstums zur Verfügung stehende Menge an Glukoseeinheiten der eingesetzten Stärken bestimmt werden. Dies sollte zudem Aufschluss darüber geben, ob sich in den abgewogenen Mengen der einzelnen Stärken die Glukoseeinheiten entsprechen. Die ermittelten Glukosekonzentrationen der aufgekochten Stärken sind in Tabelle 6 zusammengefasst dargestellt. Daraus geht hervor, dass die experimentell ermittelten Glukosekonzentrationen der verschiedenen Stärken zwischen 100 mM und 112 mM lagen. Eine Referenz mit 2 % Glukose zeigte eine enzymatisch gemessene Glukosekonzentration

Tabelle 6: Konzentrationen der Glukoseäquivalente in den Kulturüberständen zu Beginn der Wachstumsversuche von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit 2 % aufgekochter löslicher Kartoffel-, Kartoffel-, Mais-, Reis- und Weizenstärke. Die Überstände wurden mit Amyloglukosidase aus *A. niger* behandelt.

CgC-Minimalmedium mit	Glukosekonzentration [mM]
2 % aufgekochte lösliche Kartoffelstärke	111,8 ± 4,2
2 % aufgekochte Kartoffelstärke	100,4 ± 1,5
2 % aufgekochte Maisstärke	104,5 ± 4,0
2 % aufgekochte Reisstärke	100,8 ± 4,0
2 % aufgekochte Weizenstärke	107,6 ± 7,1

Tabelle 7: L-Lysinerträge von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit 2 % verschiedener Stärken als Substrat.

	Erträge $Y_{P/S}$[a]	
Stärke	**[mmol/mmol][b]**	**[mmol/mmol][c]**
lösliche Kartoffelstärke	0,08 ± 0,00	0,01 ± 0,00
Kartoffelstärke	0,06 ± 0,00	0,06 ± 0,00
Maisstärke	0,13 ± 0,00	0,11 ± 0,01
Reisstärke	0,16 ± 0,01	0,09 ± 0,01
Weizenstärke	0,14 ± 0,00	0,16 ± 0,01

[a] [mmol L-Lysin/mmol Glukoseeinheiten] zum Zeitpunkt der maximalen L-lysinkonzentration, [b] aufgekochte Stärke als Substrat, [c] nicht aufgekochte Stärke als Substrat

von 111,8 ± 4,2 mM Glukose, die dem theoretisch berechneten Wert einer 2 %-iger Glukoselösung entspricht (111 mM Glukose). Die Glukosekonzentrationen der aufgekochten Kartoffel-, Mais- und Reisstärke lagen etwas unter diesem Wert. Die Glukosekonzentrationen der nicht aufgekochten Stärken konnten nicht expreimentell bestimmt werden, da die Amyloglukosidase die nicht aufgekochten Stärken nicht vollständig zu Glukose umsetzen konnte. Da zu Beginn des Wachstums die gleiche Menge an Stärkepulver für die Herstellung des CgC-Minimalmediums mit aufgekochter bzw. nicht aufgekochter Stärke eingesetzt wurde, erfolgte die Berechnung der L-Lysinerträge für beide Stärkeverabreichungsformen mit den experimentell bestimmten Glukosekonzentrationen der aufgekochten Stärken.

Der Stamm *C. glutamicum* DM1729(pAmy) erreichte in CgC-Minimalmedium mit 2 % nicht aufgekochter löslicher Kartoffelstärke und 2 % aufgekochter Reisstärke mit jeweils 0,16 mmol L-Lysin/mmol Glukoseeinheiten die höchsten Erträge (Tabelle 7). Den geringsten Ertrag (0,01 mmol L-Lysin/mmol Glukoseeinheiten) erzielte der Stamm in CgC-Minimalmedium mit 2 % nicht aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke. Wie sich herausstellte, erreichte *C. glutamicum* DM1729(pAmy) mit den aufgekochten Stärken höhere Erträge als mit den nicht aufgekochten Stärken als Substrat. Eine Ausnahme bildeten die Erträge mit Weizenstärke. Mit diesem Substrat wurde in CgC-Minimalmedium mit nicht aufgekochter Weizenstärke ein höherer Ertrag erzielt als mit aufgekochter Weizenstärke (0,16 mmol L-Lyin/mmol Glukoseeinheiten gegenüber 0,14 mmol L-Lysin/mmol Glukoseeinheiten). Zum Vergleich erreichte der Stamm *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit 4 % Glukose einen L-Lysinertrag von 0,12 mmol L-Lysin/mmol Glukose (Daten nicht gezeigt).

Da aus vorhergehenden Untersuchungen (siehe 3.1.2.1) bekannt war, dass nach Wachstums- bzw. Produktionsende noch Kohlenstoffverbindung im Kulturüberstand verblieben, wurden die verbliebenen Glukoseäquivalente im Überstand nach 24 h quantifiziert. Dafür wurden die Überstände mit Amyloglukosidase über Nacht inkubiert und die entstandene Glukosekonzentration experimentell bestimmt. Der vollständige Abbau der Stärke wurde mit einer dünnschichtchromatographischen Analyse überprüft (hier nicht gezeigt). Dabei zeigte sich, dass die Amyloglukosidase die Kohlenhydratverbindungen im Überstand nach 24 h bzw. 48 h von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) bei Wachstum mit den nicht aufgekochten Stärken nicht vollständig zu Glukose abbauen konnte. Bei den aufgekochten Stärken konnte zum Zeitpunkt t = 24 h in den Kulturüberständen noch eine Glukosekonzentration von etwa 20 mM gemessen werden (Tabelle 8). Mit Hilfe dieser Werte wurden die L-Lysinerträge des Stammes *C. glutamicum* DM1729(pAmy) bezogen auf die tatsächlich verbrauchte Menge an Glukoseeinheiten berechnet. Dazu wurde die verbliebene Glukosekonzentration von der Glukosekonzentration zu Beginn des Wachstums abgezogen und mit der Differenz als Substrat der Ertrag berechnet. Da es nicht möglich war, die verbliebene Glukosekonzentration in den Überständen von Wachstumsversuchen mit nicht aufgekochten Stärken zu bestimmen, wurden für die Berechnung der Erträge bezogen auf die tatsächlich verbrauchte Kohlenstoffmenge die verbliebene Glukosekonzentrationen in den Medien mit den entsprechenden aufgekochten Stärken eingesetzt. Wichtig ist, dass es sich dann bei den erhaltenen Erträgen nur um Annahmen handelt. Wie man in Tabelle 9 sehen kann, erhöhten sich durch die Berücksichtigung der tatsächlich verbrauchten Glukosemenge die L-Lysinerträge des Stammes *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit unterschiedlichen Stärken als Substrat. Dabei erreichte der Stamm

Tabelle 8: Konzentrationen der Glukoseäquivalente in den Kulturüberständen nach Wachstumsende (24 h) von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit je 2 % aufgekochter Stärke als Substrat. Die Überstände wurden mit Amyloglukosidase aus *A. niger* behandelt.

Stärke	Glukosekonzentration [mM]
lösliche Kartoffelstärke	21,37 ± 1,94
Kartoffelstärke	20,00 ± 0,83
Maisstärke	20,00 ± 0,48
Reisstärke	21,76 ± 0,48
Weizenstärke	21,37 ± 0,73

Tabelle 9: L-Lysinerträge bezogen auf die tatsächlich verbrauchte Glukosemenge von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit 2 % verschiedener Stärken als Substrat.

	Erträge YP/S[a]	
Stärke	**[mmol/mmol][b]**	**[mmol/mmol][c]**
lösliche Kartoffelstärke	0,11 ± 0,00	0,01 ± 0,00
Kartoffelstärke	0,08 ± 0,00	0,08 ± 0,00
Maisstärke	0,16 ± 0,04	0,13 ± 0,01
Reisstärke	0,20 ± 0,01	0,11 ± 0,01
Weizenstärke	0,17 ± 0,00	0,20 ± 0,01

[a] [mmol L-Lysin/mmol Glukoseeinheiten] zum Zeitpunkt der maximalen L-lysinkonzentration, [b] aufgekochte Stärke als Substrat, [c] nicht aufgekochte Stärke als Substrat

sowohl mit 2 % aufgekochter Reisstärke, als auch mit 2 % nicht aufgekochter Weizenstärke den höchsten L-Lysinertrag von 0,2 mmol L-Lysin/mmol Glukoseeinheiten, der etwa dem doppelten Ertrag in CgC-Minimalmedium mit reiner Glukose entspricht (0,12 mmol L-Lysin/mmol Glukose) Den geringsten Ertrag wies der Stamm mit nicht aufgekochter löslicher Kartoffelstärke auf (0,01 mmol L-Lysin/mmol Glukoseeinheiten).

Spezifische Produktivitäten

In Tabelle 10 sind die berechneten spezifischen L-Lysinproduktivitäten von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) mit unterschiedlichen Stärken als Kohlenstoffquellen dargestellt. Der Produktionszeitraum wurde mit den aufgekochten Stärken und mit nicht aufgekochter Kartoffelstärke zwischen 8 h und 24 h gewählt. Auf Grund des verzögerten Wachstums in CgC-Minimalmedium mit nicht aufgekochter Mais-, Reis- und Weizenstärke im Medium wurde hier der Produktionszeitraum zwischen 24 h und 48 h gewählt. Bei den Substraten, mit denen *C. glutamicum* DM1729(pAmy) die stationäre Phase nicht innerhalb der 48 h erreichte, wurde zur Berechnung der ZTM der Durchschnitt der OD_{600nm}-Werte zu Beginn und zum Ende des Produktionszeitraums eingesetzt, ansonsten wurde die OD_{600nm} zum Zeitpunkt t = 24 h verwendet. Erfolgte der Wachstumsverlauf auf Grund der Trübung des Mediums mit Hilfe der Proteinkonzentration, wurde zur Berechnung der spezifischen L-Lysinproduktivität eine Proteinkonzentration von 100 µg/ml mit einer OD_{600nm}-Einheit gleichgesetzt. Relativ hohe spezifische Produktivitäten erreichte *C. glutamicum*

Tabelle 10: Spezifische L-Lysinproduktivität von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) mit CgC-Minimalmedium mit 2 % verschiedener Stärken als Substrat.

	Produktivitäten[a]	
Stärke	**[mmol/g ZTM*h][b]**	**[mmol/g ZTM*h][c]**
lösliche Kartoffelstärke	0,10 ± 0,00[d]	< 0,01
Kartoffelstärke	0,05 ± 0,01[d]	0,04 ± 0,02[d]
Maisstärke	0,10 ± 0,01[d]	0,15 ± 0,03[e]
Reisstärke	0,13 ± 0,01[d]	0,11 ± 0,01[e]
Weizenstärke	0,13 ± 0,01[d]	0,13 ± 0,01[e]

[a] (mmol L-Lysin/g ZTM*h), ZTM berechnet mit Faktor 0,3 g Trockengewicht pro Liter und OD_{600nm}-Einheit (Blombach et al., 2007), [b] aufgekochte Stärken als Substrat, [c] nicht aufgekochte Stärken als Substrat, [d] Produktionszeitraum: 8 h bis 24 h, als OD_{600nm}-Einheit wurde die OD_{600nm} zum Zeitpunkt t = 24 h verwendet, [e] Produktionszeitraum: 24 h bis 48 h, als OD_{600nm}-Einheit wurde der Mittelwert der optischen Dichte zu den Zeitpunkten 24 h und 48 h verwendet, siehe Abbildungen 9 und 10

DM1729(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit nicht aufgekochter Maisstärke, aufgekochter und nicht aufgekochter Reisstärke, sowie mit aufgekochter und nicht aufgekochter Weizenstärke (zwischen 0,11 ± 0,01 mmol/g ZTM*h und 0,15 ± 0,03 mmol/g ZTM*h) (Tabelle 10). Mit aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke bzw. aufgekochter Maisstärke zeigte der Stamm eine etwas geringere spezifische Produktivität mit 0,1 mmol/g ZTM*h und 0,1 ± 0,01 mmol/g ZTM*h. Dies entspricht ungefähr der spezifischen Produktivität, die der Stamm in CgC-Minimalmedium mit 4 % Glukose zeigte (Daten nicht gezeigt). Mit aufgekochter und nicht aufgekochter Kartoffelstärke erzielte der Stamm eine relativ geringe spezifische Produktivität (0,05 ± 0,01 mmol/g ZTM*h und 0,04 ± 0,02 mmol/g ZTM*h). Da der Stamm mit nicht aufgekochter Kartoffelstärke kaum L-Lysin ins Medium ausschied, konnte für dieses Medium keine spezifische Produktivität berechnet werden.

3.1.2.4 Fermentation von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) mit nicht aufgekochter Weizenstärke als Substrat im DASGIP-Fermenter

Die in dieser Arbeit durchgeführten Wachstums- und L-Lysinproduktionsversuche mit *C. glutamicum* DM1729(pAmy) zeigten, dass nicht aufgekochte Weizenstärken neben aufgekochter Reisstärke als Substrat zu den höchsten L-Lysinerträgen führten. Da beim Einsatz von nicht aufgekochter Weizenstärke das energiereiche Aufkochen bei der Vorbereitung der Medien gegenüber aufgekochter Reisstärke entfällt, wurde diese Stärke in

Fermentationsversuche eingesetzt. In diesen Versuchen sollte geprüft werden, ob unter kontrollierten Bedingungen der Ertrag sowie die Produktivität noch gesteigert werden kann. Die Wachstums- und L-Lysinproduktionsversuche wurden in einer Parallelfermentationsanlage von DASGIP durchgeführt. Als Substrat wurden 2 % nicht aufgekochte Weizenstärke in CgC-Minimalmedium eingesetzt. Während der Fermentation wurde sowohl die Belüftungsrate (0,75 vvm) als auch der pH-Wert (pH 7) konstant gehalten. Während der Fermentation wurde die Rührerdrehzahl so gesteuert, dass der pO_2 konstant bei 30 % lag. Das CgC-Minimalmedium wurde auf eine Proteinkonzentration von 225 µg/ml angeimpft (entspricht einer Anfangs-OD_{600nm} von 2,25). Abbildung 13 zeigt den Wachstumsverlauf und die L-Lysinproduktion von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit 2 % nicht aufgekochter Weizenstärke als Substrat. Nach 24 h zeigte der Stamm die höchste Proteinkonzentration von 2200 µg/ml und ging anschließend in die stationäre Phase über. Die maximale L-Lysinkonzentration wurde nach 48 h mit 27,4 mM L-Lysin detektiert. Bezogen auf die insgesamt eingesetzte Stärke ergab sich ein L-Lysinertrag von 0,25 ± 0,03 mmol L-Lysin/mmol Glukoseeinheiten. Dieser Ertrag ist um 56 % höher, als der Ertrag, der im Schüttelkolbenexperiment erzielt wurde (0,16 ± 0,01 mmol L-Lysin/mmol Glukoseeinheiten). Da die im Überstand noch vorhandenen Kohlenhydratreste nicht vollständig durch die Amyloglukosidase zu Glukosemolekülen abgebaut wurde, konnte der Ertrag bezogen auf die tatsächlich verbrauchte Glukosemenge nicht bestimmt werden.

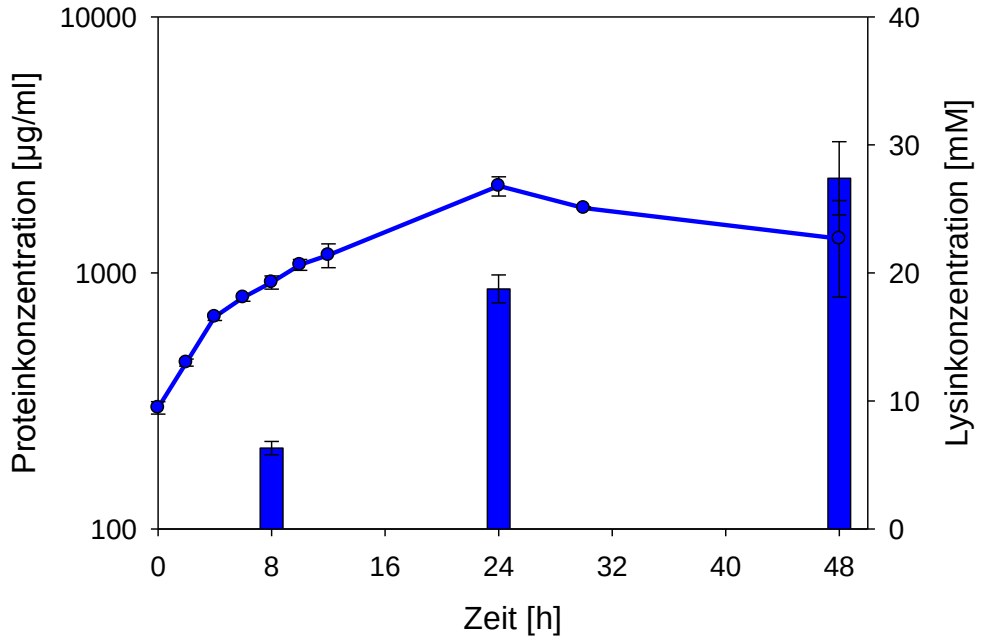

Abbildung 13: Wachstum (o: Proteinkonzentration [µg/ml]) und L-Lysinkonzentration (Balken) von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit 2 % nicht aufgekochter Weizenstärke unter kontrollierten Bedingungen im DASGIP-Fermenter. Die Abbildung zeigt den Durchschnitt von drei unabhängigen Einzelversuchen.

Die spezifische L-Lysinproduktivität von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) lag bei 0,17 ± 0,02 mmol/g ZTM*h. Die Berechnung erfolgte im Produktionszeitraum 8 h bis 24 h. Als OD_{600nm} wurde der Mittelwert der optischen Dichten zu diesen Zeitpunkten gewählt. Die im Fermenter erreichte spezifische L-Lysinproduktivität ist somit 30 % höher als die erreichte spezifische Produktivität des Stammes in CgC-Minimalmedium mit nicht aufgekochter Weizenstärke im Schüttelkolben.

Diese Ergebnisse zeigen, dass im Vergleich zum Schüttelkolbenexperiment durch kontrollierte Wachstumsbedingungen im Fermenter der L-Lysinertrag von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) mit 2 % nicht aufgekochter Weizenstärke als Substrat um 56 % gesteigert werden kann. Die Produktivität des Stammes konnte unter kontrollierten Bedingungen um 30 % gesteigert werden.

3.1.2.5 Elektronenmikroskopische Aufnahmen verschiedener Stärkepulver und einer Kulturprobe von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) mit Weizenstärke als Substrat

In Wachstums- und Produktionsversuchen zeigte sich, dass *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit unterschiedlichen Stärken auch unterschiedliches Wachstumsverhalten und verschiedene Produktionseigenschaften aufwies. Da Stärke grundsätzlich aus α-1,4- und α-1,6-glykosidischen Bindungen aufgebaut ist, war die Vermutung, dass die unterschiedlichen Stärken jeweils eine unterschiedliche Zusammensetzung dieser Bindungen aufweisen. Ein Hinweis darauf könnte vielleicht eine unterschiedliche Morphologie der Körner der Stärkepulver geben. Deshalb wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen des löslichen Kartoffel-, Kartoffel-, Mais-, Reis- bzw. Weizenstärkepulvers durchgeführt. Abbildung 14 zeigt exemplarisch Ausschnitte der Aufnahmen der genannten Stärkepulver. In Abbildung 14 A ist ein Ausschnitt einer Aufnahme des Pulvers der löslichen Kartoffelstärke abgebildet. Zu sehen ist ein rundliches Stärkekorn in der Bildmitte mit einer Korngröße von etwa 20 µm. In der Probe konnten jedoch auch Körner mit einer Größe von bis zu 65 µm gefunden werden. Grundsätzlich lagen die Körner der löslichen Kartoffelstärke einzeln und nicht im Verbund vor. Abbildung 14 B zeigt eine Aufnahme des Kartoffelstärkepulvers. Dabei zeigen die einzeln liegenden Körner eine rundliche Form im Größenbereich von 10 – 30 µm. Andere Aufnahmen zeigten auch Körner mit einer Größe bis zu 70 µm. Deutlich ist die große Ähnlichkeit zwischen den Stärkekörnern der löslichen Kartoffelstärke und der Kartoffelstärke zu erkennen. Abbildung 14 C zeigt die Aufnahme des Pulvers der Maisstärke. Die Aufnahme zeigt unregelmäßig geformten, rundlichen Körner die in einem Körnerverbund zusammen liegen. Auf anderen Aufnahmen lagen die Körner auch einzeln vor. Die Durchmesser der einzelnen Körner variierten zwischen 2 µm und 10 µm. Eine Aufnahme des Reisstärkepulvers ist in Abbildung

14 D gezeigt. Die einzelnen Reisstärkekörner zeigen kantige, quaderähnliche Formen mit einer Größe von bis zu 5 µm, die sich zu einem Verbund zusammen lagern. Der Körnerverbund selbst hat einen Durchmesser von etwa 60 µm. Auch andere Aufnahmen zeigten solche Körnerverbünde und kaum einzeln vorkommende Stärkekörner. Abbildung 14 E zeigt eine Aufnahme des Pulvers der Weizenstärke. Die Form der Körner variiert von rundlich-oval bis scheibenförmig. Die Korngrößen liegen im Bereich von 5 µm bis 40 µm.

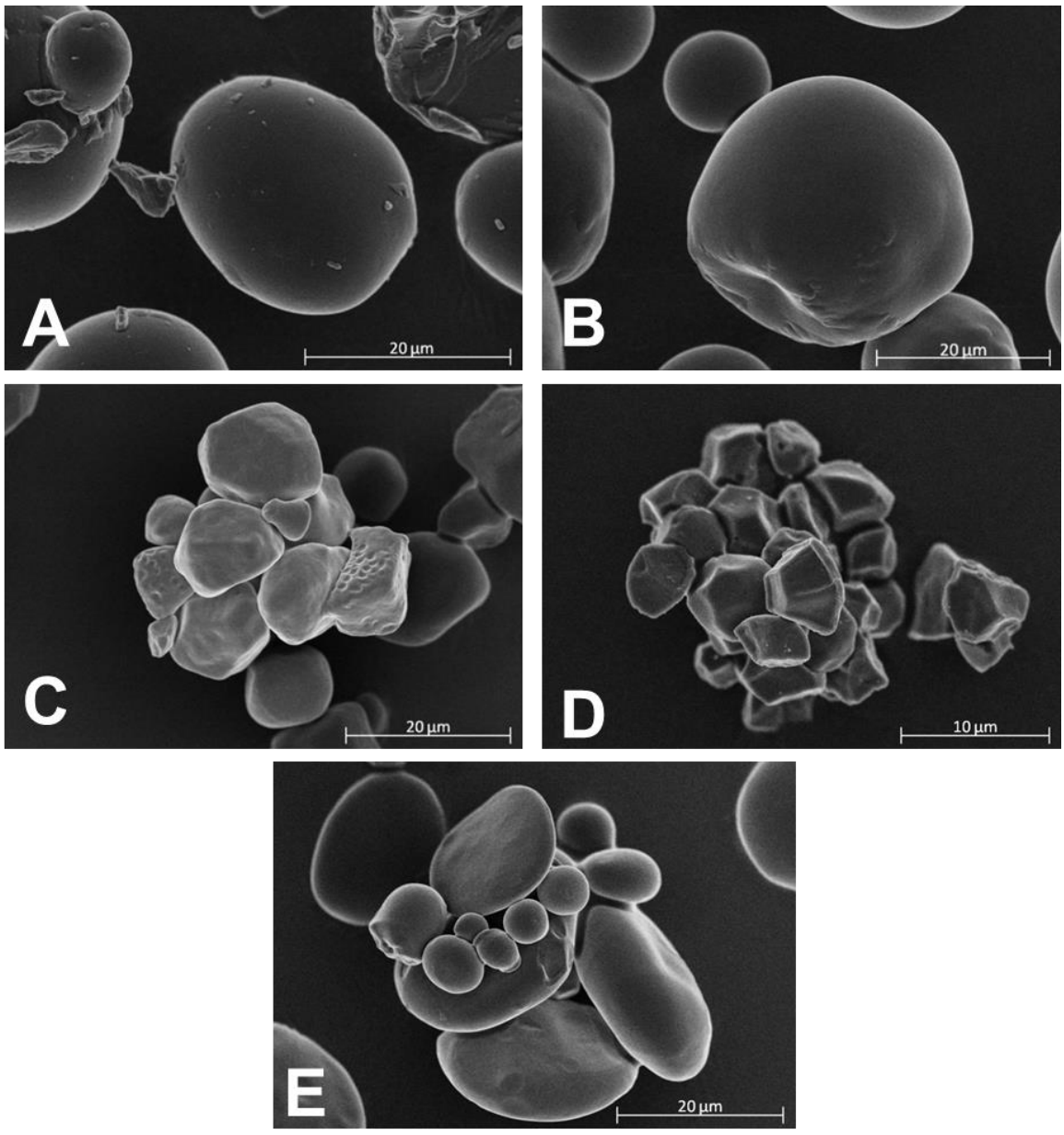

Abbildung 14: Elektronenmikroskopische Aufnahme unterschiedlicher Stärkepulver. Der Größenstandard ist in den jeweiligen Bildern dargestellt. (A) lösliche Kartoffelstärkepulver, Pixelgröße: 40 nm; (B) Kartoffelstärkepulver, Pixelgröße: 50 nm; (C) Maisstärkepulver, Pixelgröße: 50 nm; (D) Reisstärkepulver, Pixelgröße: 28 nm; (E) Weizenstärkepulver, Pixelgröße: 50 nm.

In Abbildung 15 sind elektronenmikroskopische Aufnahmen einer Kulturprobe eines Wachstumsversuchs von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit nicht aufgekochter Weizenstärke als Substrat gezeigt. Die Probe wurde nach 24 h Inkubationszeit entnommen. Abbildung 15 A zeigt mehrere *C. glutamicum* DM1729(pAmy)-Zellen, die sich

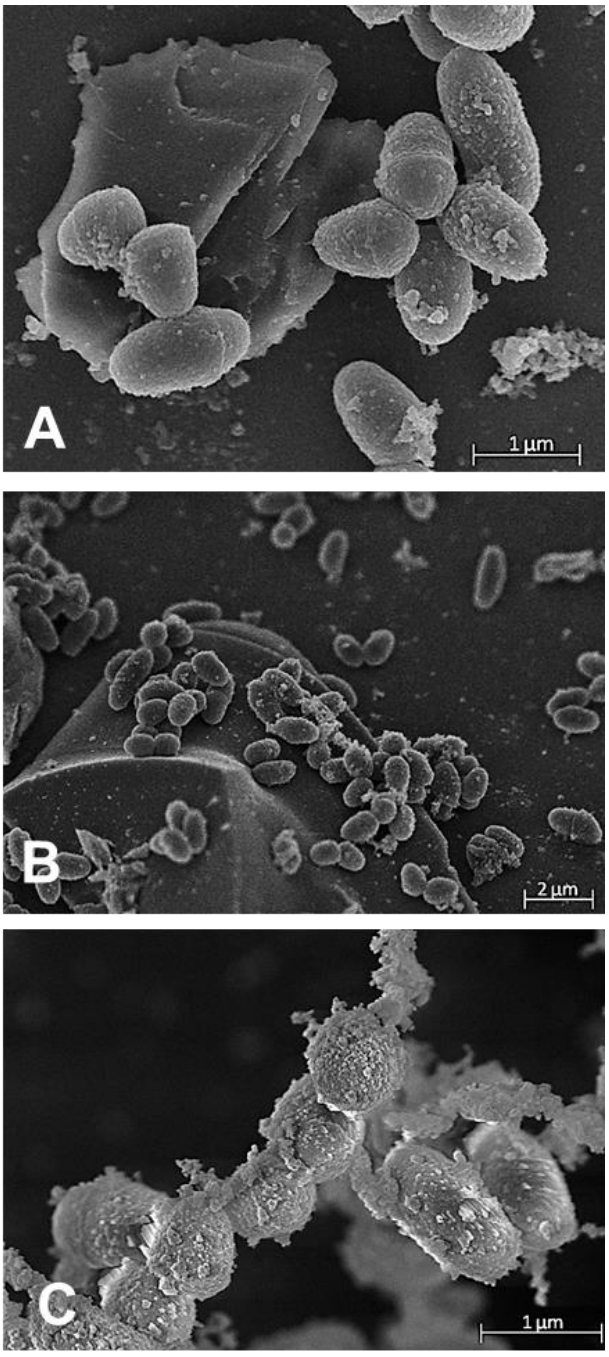

Abbildung 15: Elektronenmikroskopische Aufnahmen einer Kulturprobe eines Wachstumsversuchs von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit nicht aufgekochter Weizenstärke nach 24 h Inkubationszeit. Pixelgrößen: (A) 5 nm; (B) 14 nm; (C) 4 nm.

an ein Weizenstärkekorn anlagern. Dabei weisen die rundlichen, teilweise länglichen Bakterienzellen eine Größe von bis zu 1,5 µm auf, wohingegen das Weizenstärkekorn mit einer Fläche von etwa 3 µm * 4 µm deutlich größer ist und scharfe Kanten aufweist. Die Oberflächen der Bakterien zeigen teilweise aufgelagerte, kleine Körnchen. In Abbildung 15 B sind ebenfalls Ansammlungen von *C. glutamicum* DM1729(pAmy)-Zellen auf einem Weizenstärkekorn zu sehen. Dabei ist deutlich zu erkennen, dass sich in den stärkefreien Bereichen kaum zusammengelagerte Bakterienzellen befinden. In Abbildung 15 C ist eine Zusammenlagerung von *C. glutamicum* DM1729(pAmy)-Zellen an eine kettenartige Struktur zu erkennen.

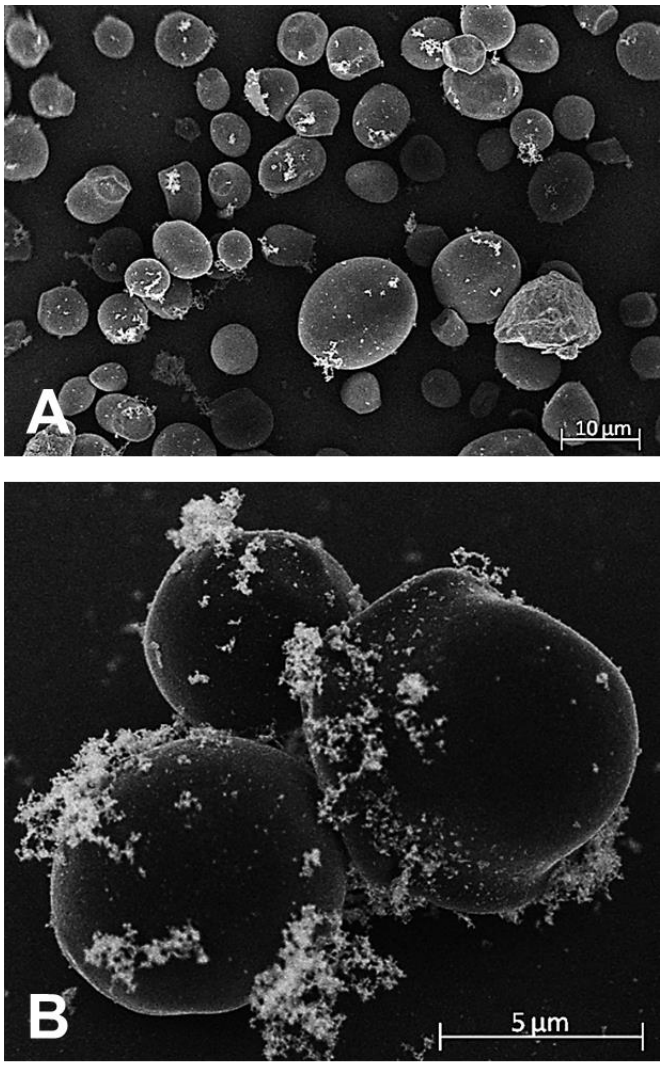

Abbildung 16: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von CgC-Minimalmedium mit 2 % nicht aufgekochter Weizenstärke nach 24 h Inkubationszeit. Pixelgrößen: (A) 66 nm; (B) 17 nm.

Als Referenz zu den Kulturproben wurden zudem elektronenmikroskopische Aufnahmen eines nicht beimpften CgC-Minimalmediums mit nicht aufgekochter Weizenstärke gemacht (Abbildung 16). Das Medium wurde dafür unter den Wachstumsbedingungen von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) für 24 h inkubiert. Sowohl in Abbildung 16 A, als auch in Abbildung 16 B sind rundlich-ovale Stärkekörner mit Größen zwischen 5 µm und 15 µm zu sehen. Auffallend sind die Fasern bzw. Ketten, die aus den Körnern der Weizenstärke herausragen. Diese gleichen den Ketten, an die sich die Bakterien in Abbildung 15 C anlagern. Es ist anzunehmen, dass diese Stärkeketten aus dem Aufquellen der Stärkekörner im CgC-Minimalmedium resultieren.

Zusammengefasst zeigen die Aufnahmen deutliche Unterschiede in der Morphologie und in der Anordnung von Knollenstärkekörner (lösliche Kartoffel- und Kartoffelstärke) und Getreidestärkekörner (Mais-, Reis- und Weizenstärke) der untersuchten Stärken. Die Form variierte zwischen rund bei den Knollenstärkekörner, rund-oval bis scheibenförmig bei den Weizenstärkekörner und kantig quaderähnlich bei den Mais- und Reisstärkekörnern. Die runden Körner der untersuchten Knollenstärke waren deutlich größer als die Körner der untersuchten Getreidestärken. Als weiterer Unterschied konnte beobachtet werden, dass die Körner der löslichen Kartoffel- und Kartoffelstärke einzeln vorlagen, während sich die Mais-, Reis und Weizenstärkekörner in kleinen Gruppen zusammenlagerten. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen des in CgC-Minimalmedium inkubierten Weizenstärkepulvers zeigte rundliche Körner mir herausstehenden Stärkeketten. Die Aufnahmen der Kulturproben von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit nicht aufgekochter löslicher Weizenstärke lassen erkennen, dass sich die Bakterien an solche Stärkeketten in Gruppen anlagern.

3.1.3 L-Lysinproduktion von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) mit Glykogen als Substrat

Bei Glykogen handelt es sich wie bei Amylopektin der Stärke um ein α-1,4- und α-1,6-glykosidisch verzweigtes Polysaccharid (Manners, 1991). Es dient in Prokaryoten (Preiss & Romeo, 1994), Hefen (François & Parrou, 2001) und Säugetieren (Roach, 2002) zur kurz- bis mittelfristige Speicherung und Bereitstellung der energiereichen Glukose. Auf Grund der strukturellen Ähnlichkeit des Glykogens mit dem Amylopektin der Stärke wurde untersucht, ob *C. glutamicum* DM1729(pAmy) neben den verschiedenen pflanzlichen Stärken auch Glykogen als Energie- und Kohlenstoffquelle verwenden kann. Als Kohlenstoffquelle wurde 1 % aufgekochtes Glykogen in CgC-Minimalmedium in Wachstums- und L-Lysinproduktionsversuche eingesetzt. In Abbildung 17 ist die Wachstumskurve, sowie die produzierte Menge an L-Lysin zu den Zeitpunkten 24 h und 48 h dargestellt. Der Stamm

erreichte in der exponentiellen Wachstumsphase eine Wachstumsrate von μ = 0,32 h^{-1}. In die stationäre Phase ging der Stamm nach 8 h mit dem Erreichen seiner maximalen OD_{600nm} von 9 über. Nach 24 h hatte *C. glutamicum* DM1729(pAmy) eine L-Lysinkonzentration von 4 mM ins Medium ausgeschieden, die bis zum Zeitpunkt t = 48 h konstant blieb. Der L-Lysinertrag lag bei 0,07 ± 0,00 mmol L-Lysin/mmol Glukoseeinheiten, bezogen auf die insgesamt eingesetzte Glykogenmenge. Die spezifische Produktivität lag bei 0,06 ± 0,00 mmol/g ZTM*h, dabei wurde als Produktionszeitraum die ersten 24 h gewählt. Wie in Abbildung 18 zu sehen, blieben nach 48 h noch nicht verwertete Kohlenstoffverbindungen mit einer Größe von Stärke bzw. Maltoheptaose im Kulturüberstand zurück.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der Stamm *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit Glykogen als Substrat wachsen und L-Lysin produzieren kann. Der Ertrag und die spezifische Produktivität waren nahezu identisch zum erreichten Ertrag bzw. zu erreichten spezifischen Produktivität, die der Stamm mit aufgekochter Kartoffelstärke erreichte.

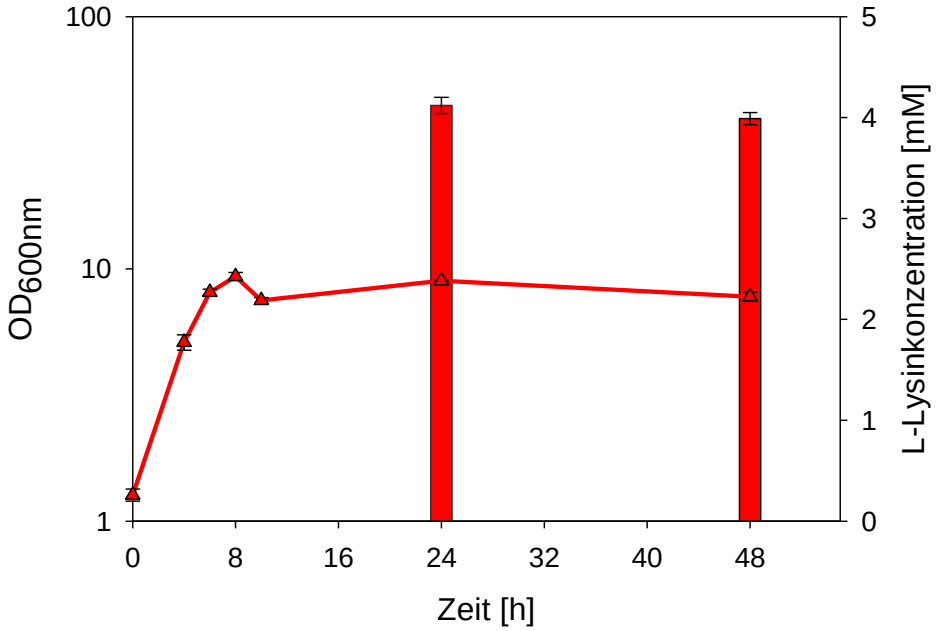

Abbildung 17: Wachstum (Δ: OD_{600nm}) und L-Lysinkonzentration (Balken) des Stammes *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit 1 % aufgekochtem Glykogen. Die Abbildung zeigt den Durchschnitt von drei unabhängigen Einzelversuchen.

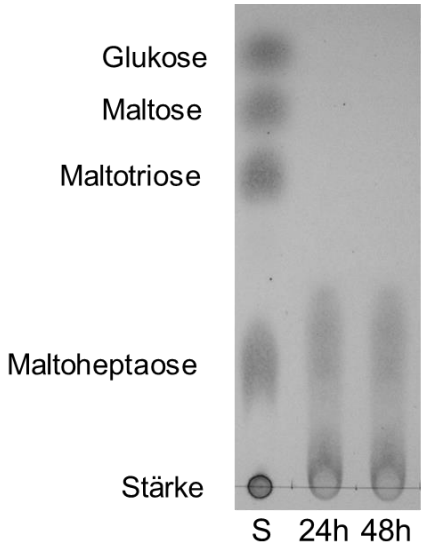

Abbildung 18: Dünnschichtchromatographische Analyse des Kulturüberstandes aus einem Wachstumsversuch von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit 1 % aufgekochtem Glykogen als Substrate. Spur S: Standard mit je 5 µg/ml Kartoffelstärke, Maltoheptaose, Maltotriose, Maltose, Glukose; die Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen (24h und 48h).

3.2 Vollständiger Stärkeabbau durch rekombinante *C. glutamicum*-Stämme

Das Einbringen des *amyA*-Gens für die α-Amylase aus *S. griseus* auf dem Expressionsplasmid pAmy in die Stämme *C. glutamicum* DM1729 und *C. glutamicum* ELB-P führte dazu, dass sie in der Lage waren, die α-1,4-glykosidischen Bindungen der Stärke extrazellulär abzubauen. Der größte Teil der gebildeten Abbauprodukte (Glukose, Maltose, Maltotriose) konnten von diesen Stämmen zum Wachstum und zur Produktion von Pyruvat und Succinat bzw. L-Lysin verwendet werden (siehe Kapitel 3.1). Dennoch blieben im Überstand nach der Kultivierung dieser Stämme Maltodextrine und kleinere Kohlenstoffverbindungen zurück. Dies konnte auch bei dem L-Lysinproduzenten *C. glutamicum* DM1730(pAmy) beobachtet werden (Seibold et al., 2006). Auf Grund der Eigenschaft der α-Amylase, nur α-1,4-glykosidische Bindungen spalten zu können, war anzunehmen, dass die nicht verwerteten Kohlenhydratverbindungen α-1,6-glykosidische Bindungen aufweisen. Im Folgenden wurden verschiedene Enzyme darauf hin untersucht, ob sie die verbliebenen α-1,6-glykosidische Bindungen bzw. sowohl α-1,4-glykosidische als auch α-1,6-glykosidische Bindungen spalten können. Durch die Klonierung des Gens für eines der in Frage kommenden Enzyme hinter eine Signalsequenz in ein Expressionsplasmid und das Einbringen dieses Plasmids in *C. glutamicum* bzw. in

C. glutamicum(pAmy) sollten Stämme erhalten werden, die sowohl die α-1,4-glykosidischen als auch α-1,6-glykosidischen Bindungen der Stärke im Überstand hydrolysieren. Dadurch sollten Produkte entstehen, die vollständig von den rekombinanten *C. glutamicum*-Stämme aufgenommen und verstoffwechselt werden.

3.2.1 Stärkeabbau durch Expression von Genen stärkeabbauender Enzyme in *C. glutamicum*

3.2.1.1 Homologe, stärkeabbauende Enzyme aus *C. glutamicum*

Seibold (2007) konnte zeigen, dass die Vorbehandlung aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke mit dem gereinigten, als Glykogen-Entzweigungs-Enzym annotierten GlgX aus *C. glutamicum* in 40 mM Acetatpuffer (pH 5,3) zu einem deutlich weiteren Abbau der Stärke durch die α-Amylase führte, als dies bei nicht vorbehandelter aufgekochter löslicher Kartoffelstärke der Fall war. Um zu untersuchen, ob auch die direkte Zugabe von gereinigtem GlgX in das CgC-Minimalmedium mit aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke zu einem Wachstumsvorteil von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) führt, wurde zunächst das Gen *glgX*HIS im Stamm *E. coli* BL21(DE3)(pET29a-glgX[HIS]) überexprimiert und das gebildete Protein GlgXHIS mit Hilfe des HIS-Tags mit einer Äkta-Anlage gereinigt Die erhaltenen

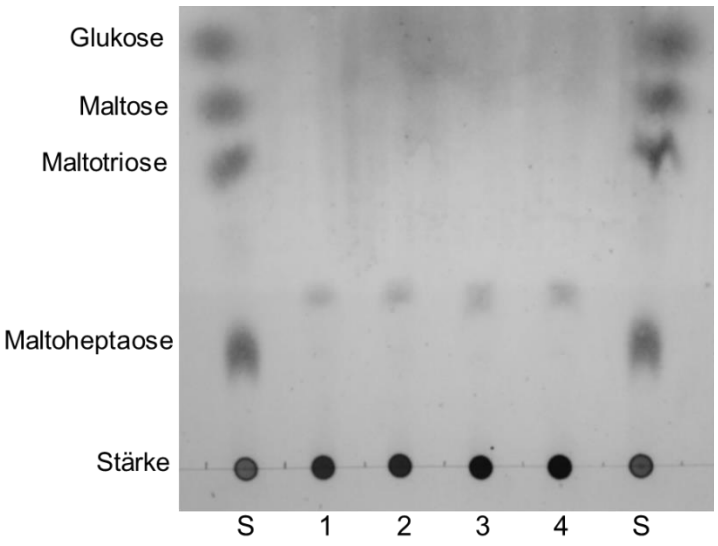

Abbildung 19: Dünnschichtchromatographische Analyse von Zelllysaten von *C. glutamicum* WT bzw. *C. glutamicum* Δ*glgX* inkubiert in CgC-Minimalmedium mit 0,5 % aufgekochter löslicher Kartoffelstärke bei 28 °C. S: Standard aus Glukose, Maltose, Maltotriose, Maltoheptaose und Stärke zu je 5 µg/ml. 1: Zelllysat von *C. glutamicum* WT 24 h inkubiert; 2: Zelllysat von *C. glutamicum* WT 48 h inkubiert; 3: Zelllysat von *C. glutamicum* Δ*glgX* 24 h inkubiert; 4: Zelllysat von *C. glutamicum* Δ*glgX* inkubiert 48 h inkubiert.

Proben aus dem Reinigungsverfahren wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die Detektion von GlgXHIS erfolgte durch ein Anfärben der Proteine im SDS-Gel mit einer Coomassie-Lösung bzw. durch einen Antikörpernachweis des HIS-Tags des GlgX-Enzyms in einem inkubierten Zelllysaten von *C. glutamicum* WT und *C. glutamicum* Δ*glgX* in CgC-Minimalmedium mit 0,5 % aufgekochter löslicher Kartoffelstärke festgestellt werden. Westernblot. Von dem gereinigten Enzym wurden 15 µg in 50 ml CgC-Minimalmedium mit 3 % aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke zugegeben und das Wachstum von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) verfolgt. Dabei zeigte der Stamm keinen Wachstums- oder Produktionsvorteil gegenüber dem selben Stamm ohne GlgX im Medium (Daten nicht gezeigt). Dies lässt darauf schließen, dass GlgX in CgC-Minimalmedium nicht aktiv ist bzw. dass das gereinigte GlgX nicht aktiv war. Aktivitätsuntersuchungen mit RED-Pullulan als Substrat bestätigten diese Beobachtung (Daten nicht gezeigt). Auf Grund dessen wurde nach weiteren homologen Enzymen gesucht, die für den extrazellulären Abbau der α-1,6-glykosidischen Bindungen in Frage kommen. Dies erfolgte durch Inkubation von Zelllysaten von *C. glutamicum* WT und *C. glutamicum* Δ*glgX* in CgC-Minimalmedium mit 0,5 % aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke in CgC-Minimalmedium bei 28 °C und einer anschließenden Dünnschichtchromatographie der Proben zur Analyse der entstandenen Abbaumuster. In allen untersuchten Proben trat eine blasse Fraktion auf der Höhe zwischen Maltoheptaose und Maltotriose auf und eine intensive Fraktion auf der Höhe von Stärke (Abbildung 19). Damit konnten keine Unterschiede im Abbaumuster zwischen deninkubierten Zelllysaten von *C. glutamicum* WT und *C. glutamicum* Δ*glgX* in CgC-Minimalmedium mit 0,5 % aufgekochter löslicher Kartoffelstärke festgestellt werden.

Dieses Ergebnis bestätigt die Beobachtung, dass GlgX in CgC-Minimalmedium nicht aktiv ist. Zumdem lässt es darauf schließen, dass *C. glutamicum* unter den hier angewandten Versuchsbedingungen keine Enzyme aufweist, die in CgC-Minimalmedium Stärke zu Maltotriose, Maltose und Glukose abbauen können.

3.2.1.2 Amylopullulanase ApuB aus *B. breve* S27

Das Enzym ApuB aus *B. breve* UCC2003 ist als extrazelluläre Amylopullulanase beschrieben (O´Connell Motherway et al., 2008). Wie dem Namen zu entnehmen ist, besitzt dieses Enzym eine α-Amylase- sowie eine Pullulanasedomäne. Die α-Amylasedomäne spaltet die α-1,4-glykosidische Bindungen der Stärke und produziert so verschieden große, teilweise noch verzweigte Maltooligosaccharide. Im Gegensatz dazu hydrolisiert die Pullulanasedomäne die α-1,6-glykosidische Bindungen der Stärke bzw. der Abbauprodukte der α-Amylasedomäne. In Zusammenarbeit dieser Domänen entstehen schlussendlich Maltotriose, Maltose und Glukose, welche von *C. glutamicum* als Substrate genutzt werden

können (Udaka, 1960; Tropis et al., 2005; Henrich (2011)). Durch das Einbringen des Gens *apuB* aus *B. breve* mit eigener Signalsequenz auf einem Expressionsplasmid in *C. glutamicum* sollte ein rekombinanter Stamm erhalten werden, der ApuB in den Überstand sezerniert. Dieses Enzym könnte dann effektiv extrazellulär Stärke zu Maltotriose, Maltose und Glukose abbauen, die dann von *C. glutamicum* als Kohlenstoffquelle genutzt werden könnten. Um diesen Gedankenansatz zu realisieren, wurde ein *C. glutamicum*-Stamm konstruiert, der das *apuB*-Gen auf dem Expressionsplasmid pEKEx2 enthielt. Als Signalsequenz wurde das Signalpeptid von ApuB beibehalten, das durch die ersten 34 Aminosäuren gebildet wird. Die Sekretion des Proteins erfolgt damit in nicht gefalteter Form über das Sec-Sekretionssystem (Dalbey & Von Heijne, 1992; Economou, 1999). Da der beschriebene Stamm *B. breve* UCC2003 nicht zur Verfügung stand, wurden drei *B. breve* Stämme der Stammsammlung der Arbeitsgruppe von Dr. Christian Riedel auf das Vorhandensein des Gens *apuB* untersucht (*B. breve* S9, *B. breve* S27 und *B. breve* MB226). Zur Amplifikation des *apuB*-Gens wurden Oligonukleotide verwendet, die auf die Gensequenz von *apuB* aus *B. breve* UCC2003 abgestimmt waren, da die Genome der drei Stämme zu Beginn dieser Arbeit noch nicht sequenziert und annotiert waren. Diesen Oligonukleotiden wurden Sequenzen an den entsprechenden Enden eingefügt, die für *Kpn*I eine Schnittstelle darstellen (verwendete Primer: ApuBforkpnI, ApuBrevkpnI). Der Primer ApuBforkpnI enthät zudem die Sequenz der Ribosomenbindestelle des Gens für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GapA). Die Amplifikation des *apuB*-Gens

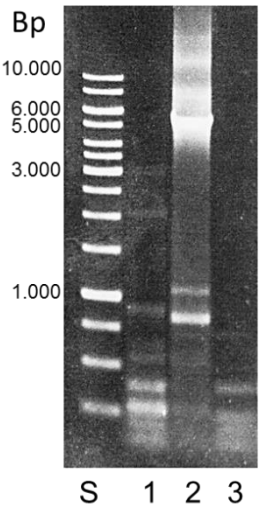

Abbildung 20: Gelelektrophoretische Auftrennung (0,8 % Agarose) der PCR-Amplifikate aus Ansätzen mit chromatischer DNA der Stämme *B. breve* S9, *B. breve* S27 und *B. breve* MB226 als Templates mit den Oligonukleotiden apuBhin und apuBrev. S: Standard „GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder“ von Fermentas; PCR Amplifikate mit chromosomaler DNA von 1: *B. breve* S9; 2: *B. breve* S27; 3: *B. breve* MB226.

erfolgte mit einer PCR und der jeweiligen chromosomalen DNA der Stämme *B. breve* S9, *B. breve* S27 und *B. breve* MB226 als Template. Erwartet wurde ein Amplifikat mit einer Größe von 5159 Bp. Die erhaltenen Amplifikate wurden mit einem 0,8 %-igem Agarosegel analysiert. Der Ansatz mit chromosomaler DNA von *B. breve* S27 als Template zeigte unter den gewählten Bedingungen ein PCR-Produkt der erwarteten Größe (Abbildung 20). Die Ansätze mit chomosomaler DNA der Stämme *B. breve* S9 und *B. breve* MB226 enthielten keine Produkte dieser Größe. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass der Stamm *B. breve* S27 ein Gen für die Amylopullulanase ApuB besitzt. Mit chromosomaler DNA dieses Stammes wurde eine erneute PCR durchgeführt. Dabei wurde neben den bereits erwähnten Oligonukleotiden die KOD-Polymerase für die Amplifikation verwendet. Diese Polymerase besitzt die Eigenschaft des „proof-readings“ und minimiert somit die Mutationsrate des Amplifikats deutlich. Mit dem erhaltenen Produkt wurde das Plasmid pEKEx2-apuB konstruiert. Als Ausgangsplasmid diente das Expressionsplasmid pEKEx2 (Eikmanns et al., 1994). Dieses wurde mit dem Restriktionsenzym *Kpn*I verdaut und anschließend dephosphoryliert, um eine Religation zu vermeiden. Das geschnittene Plasmid wurde anschließend mit dem ebenfalls mit *Kpn*I geschnittenen PCR-Fragments des vermeintlichen *apuB*-Gens aus *B. breve* S27 ligiert. Das entstandene Plasmid pEKEx2-apuB (Abbildung 21) wurde in kompetente *E. coli* DH5α-Zellen transformiert. Nach der Transformation wurde das Plasmid pEKEx2-apuB aus einer Auswahl der erhaltenen,

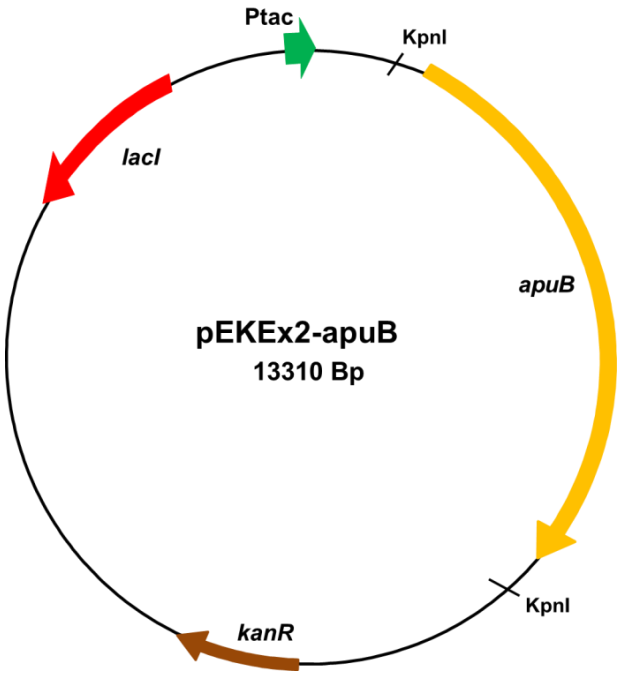

Abbildung 21: Plasmidkarte pEKEx2-apuB. Ptac: Promoter; *apuB* (5127 Bp): codiert für Amylopullulanase aus *B. breve*; *kanR* (861 Bp): codiert für eine Kanamycinzesistenz; *lacI* (974 Bp): codiert für den Repressor LacI.

kanamycinresistenten Klone isoliert und die korrekte Integration von *apuB* in das Plasmid pEKEx2 mit einem Restriktionsverdau überprüft. Es wurde mit den Plasmiden weitergearbeitet, in denen das *apuB*-Gen in gewünschter Orientierung vorlag. Zusätzlich wurde die *apuB*-Region auf dem Plasmid sequenziert. Daraus ergab sich, dass das amplifizierte PCR-Fragment aus *B. breve* S27 eine 98,4 %-ige Identität zu dem Gen *apuB* aus *B. breve* UCC2003 aufwies. Dies zeigte, dass der Stamm *B. breve* S27 eine zum *apuB*-Gen aus *B. breve* UCC2003 homologe Gensequenz enthält.

Anschließend erfolgte die Transformation des Plasmids pEKEx2-apuB in *C. glutamicum* WT Zellen. Auf diese Weise wurden kanamycinresistente Transformanten von *C. glutamicum* erhalten. Nach Kultivierung des rekombinanten Stammes *C. glutamicum* WT(pEKEx2-apuB) wurde das Plasmid isoliert und mit einem Restriktionsverdau überprüft. Dabei zeigte sich, dass alle überprüften Klone das Plasmid pEKEx2-apuB aufgenommen hatten. Um einen Referenzstamm zu erhalten wurde in den Stamm *C. glutamicum* WT das Ausgangsplasmid pEKEx2 eingebracht und die erfolgreiche Transformation ebenfalls über einen Restriktionsverdau bestätigt.

Wachstum und Stärkeabbau des Stammes *C. glutamicum* WT(pEKEx2-apuB)

Zur Charakterisierung des Stammes *C. glutamicum* WT(pEKEx2-apuB) wurden zunächst Wachstumsversuche auf CgC-Minimalmediumplatten mit 0,25 % aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke als Substrat durchgeführt. Als Referenz diente der Stamm *C. glutamicum* WT(pEKEx2). Abbildung 22 A zeigt das Wachstum der Stämme *C. glutamicum* WT(pEKEx2) und *C. glutamicum* WT(pEKEx2-apuB) auf CgC-Minimalmediumplatten mit 0,25 % aufgekochter löslicher Kartoffelstärke als Substrat. Deutlich ist zu sehen, dass der Stamm *C. glutamicum* WT(pEKEx2) nach einer zweitägigen Inkubation bei 28 °C keine Kolonien bildete. Im Gegensatz dazu zeigte der Stamm *C. glutamicum* WT(pEKEx2-apuB) ganz klar Wachstum auf der CgC-Minimalmediumplatte mit aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke. Um einen Abbau der Stärke nachzuweisen, wurde die Platte anschließend mit einer Iod-Iodid-Lösung (1,5 g Iod/l, 15 g Kaliumiodid/l) geflutet. Wie in Abbildung 22 B zu sehen, bildeten sich in der Wachstumszone des Stammes *C. glutamicum* WT(pEKEx2-apuB) deutlich klare Höfe. Dies zeigt, dass die α-1,4-glykosidischen Bindungen der Stärke soweit abgebaut wurden, dass sie nicht mehr durch die Iod-Iodid-Lösung angefärbt werden konnten.

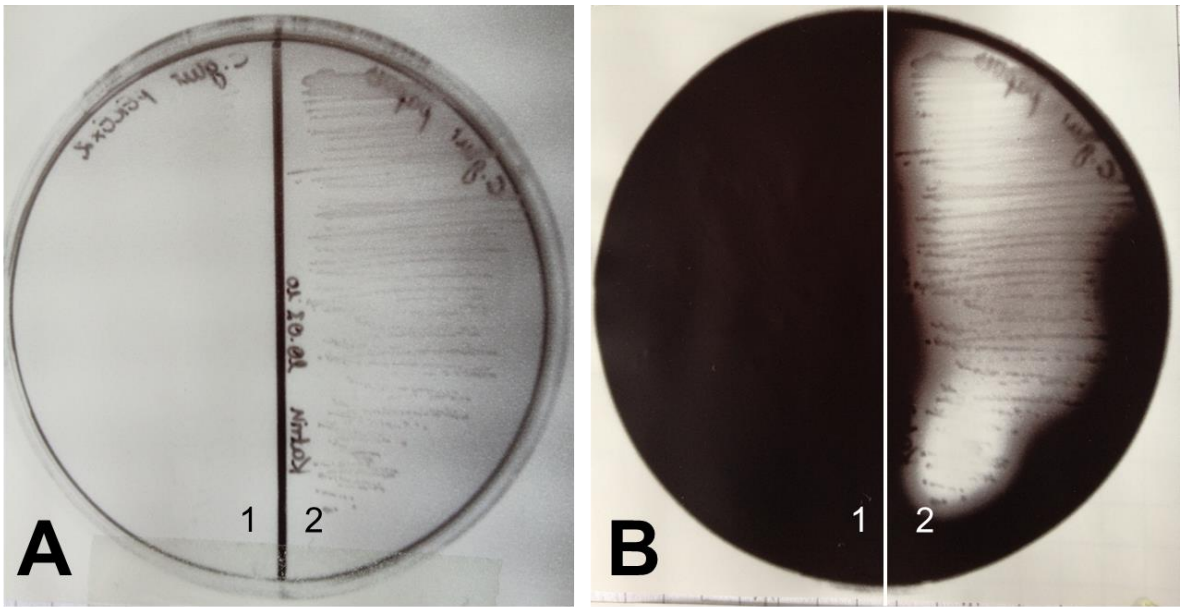

Abbildung 22: Wachstum (A) und Stärkeabbau (B) der Stämme *C. glutamicum* WT(pEKEx2) (1) und *C. glutamicum* WT(pEKEX2-apuB) (2). Die Stämme wurden auf CgC-Minimalmediumplatten mit 0,25 % aufgekochter löslicher Kartoffelstärke ausgestrichen und bei 28 °C für 48 h inkubiert. Das Anfärben der verbliebenen Stärke erfolgte durch ein Fluten der Platten mit einer Iod-Iodid-Lösung (1,5 g Iod/l, 15 g Iod/l) und einer 2 min Inkubation.

Sowohl das Wachstum auf den CgC-Minimalmediumplatten mit aufgekochter löslicher Kartoffelstärke als auch die Hofbildung im Umfeld der Kolonien von *C. glutamicum* WT(pEKEx2-apuB) lassen darauf schließen, dass das heterologe *apuB*-Gen exprimiert wird und das gebildete Enzym ApuB aktiv im Überstand vorliegt.

Spezifische Aktivität von ApuB in *C. glutamicum* WT(pEKEx2-apuB)

Um die spezifische Aktivität von ApuB zu bestimmen, wurde *C. glutamicum* WT(pEKEx2-apuB) aus der exponentiellen Wachstumsphase (OD_{600nm} von 6) nach Wachstum in CgC-Minimalmedium mit 1 % Glukose geerntet und die Zellen aufgeschlossen. Die Aktivität von ApuB wurde im Zelllysat und im Kulturüberstand bei 37 °C bestimmt. Im Zelllysat des Stammes *C. glutamicum* WT(pEKEx2-apuB) konnte mit 9,15 mU/mg eine etwa doppelt so hohe spezifische Aktivität nachgewiesen werden wie im Zelllysat des Referenzstammes *C. glutamicum* WT(pEKEx2) (5,61 mU/mg) (Tabelle 11). Im Überstand zeigte der Stamm *C. glutamicum* WT(pEKEx2-apuB) sogar eine um den Faktor 13 höhere spezifische Aktivität als *C. glutamicum* WT(pEKEx2) (2,39 mU/ml gegenüber 0,18 mU/ml). Dies zeigt, dass das Enzym ApuB sowohl im Zelllysat als auch im Überstand aktiv vorliegt.

Tabelle 11: Spezifische Aktivität von ApuB im Zellextrakt und im Kulturüberstand von *C. glutamcium* WT(pEKEx2) bzw. *C. glutamicum* WT(pEKEx2-apuB).

	Spezifische Aktivitäten von ApuB	
Stämme	**[mU/mg][a]**	**[mU/ml][b]**
C. glutamicum WT(pEKEx2)	5,61 ± 1,35	0,18 ± 0,07
C. glutamicum WT(pEKEx2-apuB)	9,15 ± 0,84	2,39 ± 0,14

[a] im Zellextrakt, [b] im Kulturüberstand

Stärkeabbauprodukte des Stammes *C. glutamicum* WT(pEKEx2-apuB)

Zur qualitativen Analyse der entstandenen Abbauprodukte der Stärke durch *C. glutamicum* WT(pEKEx2-apuB) wurde sowohl das Zelllysat, als auch der Kulturüberstand des Stammes in CgC-Minimalmedium mit 0,5 % aufgekochter Kartoffelstärke 24 h bzw. 48 h bei 28 °C inkubiert. Das Abbaumuster der aufgekochten, löslichen Kartoffelstärke wurde mit einer Dünnschichtchromatographie analysiert. Als Kontrolle wurde der gleiche Versuch mit dem Referenzstamm *C. glutamicum* WT(pEKEx2) durchgeführt. In Abbildung 23 sind die Abbaumuster der aufgekochten löslichen Kartoffelstärke mit Kulturüberstand bzw. mit Zelllysat der Stämme *C. glutamicum* WT(pEKEx2) und *C. glutamicum* WT(pEKEx2-apuB) zu sehen. Die mit aufgekochter Kartoffelstärke inkubierten Zelllysate beider Stämme zeigten eine schwache Fraktion auf der Höhe zwischen Maltoheptaose und Maltotriose und eine intensive Bande auf der Höhe von Stärke und wiesen damit das gleiche Abbaumuster auf (Abbildung 23). Die Erhöhung der Inkubationstemperatur auf die optimale Arbeitstemperatur des Enzyms ApuB von 37 °C führte in beiden Proben zu einer weiteren Fraktion auf Höhe von Maltotriose (Daten nicht gezeigt). Die Proben der inkubierten Überstände zeigten dagegen Unterschiede im Abbaumuster. In den bei 28 °C inkubierten Proben des Referenzstammes *C. glutamicum* WT(pEKEx2) konnten nach 24 h und 48 h jeweils eine Fraktion auf der Höhe von Maltose und Glukose detektiert werden. Diese Fraktionen traten auch im inkubierten Überstand von *C. glutamicum* WT(pEKEx2-apuB) auf. Zusätzlich waren hier jedoch noch zu beiden Zeitpunkten Fraktionen auf der Höhe von Maltotriose sehen. Die zusätzliche Fraktion im inkubierten Überstand von *C. glutamicum* WT(pEKEx2-apuB) mit aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke lässt darauf schließen, dass das Gen *apuB* auf dem Plasmid pEKEx2-apuB exprimiert wird und zu einem aktiven Enzym ApuB im Überstand des Stammes *C. glutamicum* WT(pEKEx2-apuB) führt. Allerdings blieb auch eine deutliche Menge an nicht abgebauter Stärke zurück.

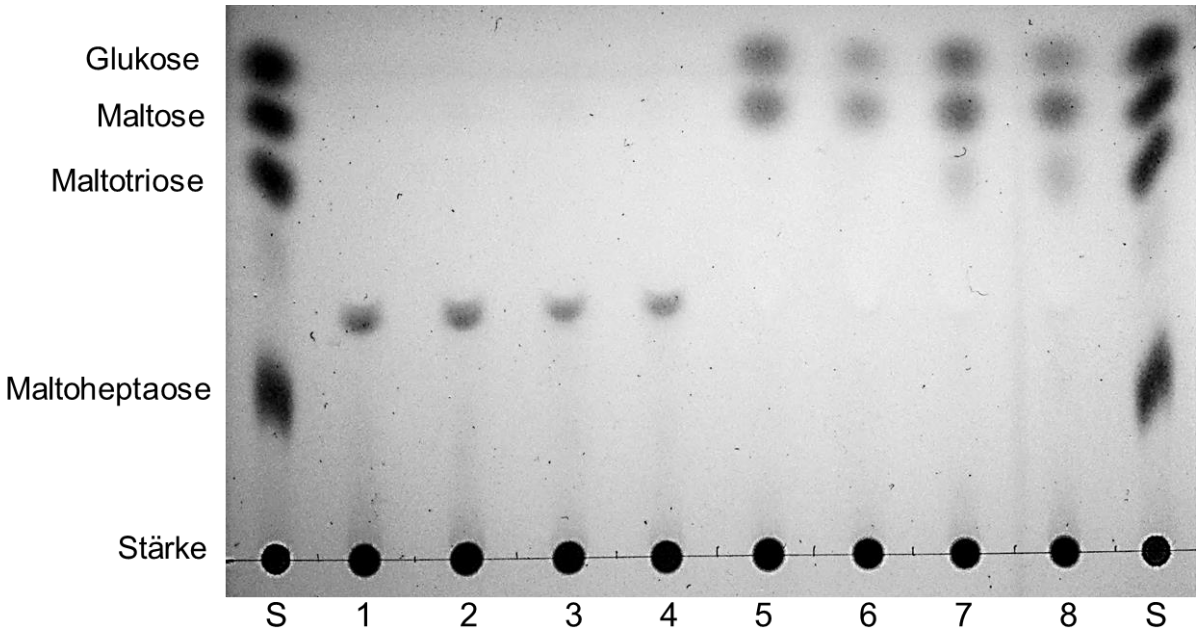

Abbildung 23: Dünnschichtchromatographische Analyse von Zelllysaten bzw. von Kulturüberständen von *C. glutamicum* WT(pEKEx2) bzw. *C. glutamicum* WT(pEKEx2-apuB) inkubiert in CgC-Minimalmedium mit 0,5 % aufgekochter löslicher Kartoffelstärke. S: Standard aus Glukose, Maltose, Maltotriose, Maltoheptaose und Stärke zu je 5 µg/ml. 1: Zelllysat von *C. glutamicum* WT(pEKEx2) 24 h inkubiert; 2: Zelllysat von *C. glutamicum* WT(pEKEx2) 48 h inkubiert; 3: Zelllysat von *C. glutamicum* WT(pEKEx2-apuB) 24 h inkubiert; 4: Zelllysat von *C. glutamicum* WT(pEKEx2-apuB) inkubiert 48 h inkubiert; 5: Überstand von *C. glutamicum* WT(pEKEx2) 24 h inkubiert; 6: Überstand von *C. glutamicum* WT(pEKEx2) 48 h inkubiert; 7: Überstand von *C. glutamicum* WT(pEKEx2-apuB) 24 h inkubiert; 8: Überstand von *C. glutamicum* WT(pEKEx2-apuB) inkubiert 48 h inkubiert.

Wachstum von *C. glutamicum* WT(pEKEx2-apuB) in CgC-Minimalmedium mit 3 % aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke

Da *C. glutamicum* WT(pEKEx2-apuB) ApuB-Aktivität im Überstand zeigte, wurde untersucht, ob der Stamm in der Lage ist, Stärke effektiv als Substrat zu nutzen. Dafür wurde ein Wachstumsexperiment mit *C. glutamicum* WT(pEKEx2-apuB) und dem Leerplasmid-tragenden Stamm *C. glutamicum* WT(pEKEx2) in CgC-Minimalmedium mit 3 % aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke durchgeführt. Die Stämme erreichten beide nach 2 h bereits ihre maximale OD_{600nm} (Abbildung 24). Dabei lag die OD_{600nm} des Referenzstammes bei 1,42 und die des Stammes *C. glutamicum* WT(pEKEx2-apuB) etwas höher bei 1,72. Nach 24 h zeigte der Stamm mit dem Plasmid pEKEx2-apuB eine End-OD_{600nm} in der gleichen Größenordnung (1,69) während die OD_{600nm} des Leerplasmid-tragenden Stammes nach 24 h auf eine End-OD_{600nm} von 1,05 sank. Zwar hatte der Stamm *C. glutamicum* WT(pEKEx2-apuB) durch das plasmidcodierte *apuB*-Gen einen Wachstumsvorteil gegenüber dem Referenzstamm, dennoch erreichte der Stamm nicht annähernd die OD_{600nm},

die der stärkeabbauende Stamm *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit 2 % aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke erreichte (max. OD_{600nm} von 26, siehe 3.1.2.1). In CgC-Minimalmedium mit 1 % Glukose zeigte *C. glutamicum* WT(pEKEx2-apuB) ein exponentielles Wachstum einer maximalen OD_{600nm} von 16 (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse des Inkubationsversuchs, des Wachstumsversuchs auf CgC-Minimalmediumplatten mit Stärke sowie der Bestimmung der spezifischen Aktivität lassen darauf schließen, dass das plasmidcodierte Gen *apuB* in *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-apuB) exprimiert wird und zu dem sezernierenden und aktiven Enzym ApuB translatiert wird. Wachstumsexperimente in CgC-Minimalmedium mit Kartoffelstärke als Kohlenstoffquelle zeigten einen Wachstumsvorteil von *C. glutamicum* WT(pEKEx2-apuB), jedoch erreichte der Stamm, verglichen mit dem ebenfalls stärkeabbauenden *C. glutamicum* DM1729(pAmy) Stamm nur einen Bruchteil von dessen maximaler OD_{600nm}. Höchstwahrscheinlich reicht die sehr geringe spezifische Aktivität von ApuB im Überstand nicht aus, um die Kartoffelstärke in einem angemessenen Zeitraum zu Produkten abzubauen, die von *C. glutamicum* für den Baustoffwechsel verwendet werden können.

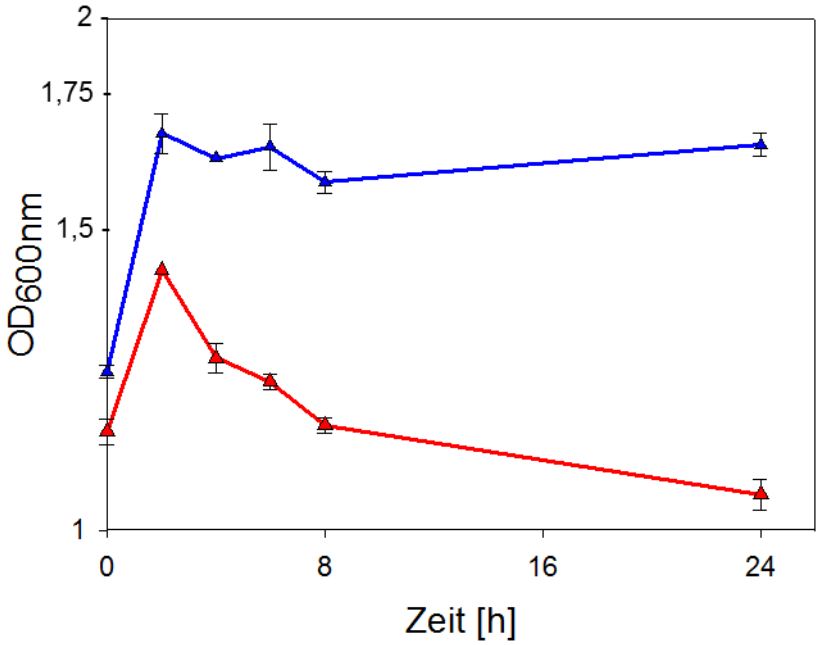

Abbildung 24: Wachstum (Δ: OD_{600nm}) von *C. glutamicum* WT(pEKEx2) (rot) und *C. glutamicum* WT(pEKEx2-apuB) (blau) in CgC-Minimalmedium mit 3 % aufgekochte lösliche Kartoffelstärke. Die Abbildung zeigt den Durchschnitt von mindestens drei unabhängigen Einzelversuchen.

3.2.1.3 Inkubation verbliebener Kohlenstoffverbindungen im Überstand von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) mit Amyloglukosidase aus *Aspergillus niger*, Isoamylase aus *Pseudomonas sp.* bzw. Pullulanase aus *Klebsiella pneumoniae*

Neben ApuB aus *B. breve* wurde nach weiteren stärkeabbauenden Enzyme gesucht. In Literatur- und Datenbankanalysen wurden unter anderem die Enzyme Amyloglukosidase aus *A. niger*, Isoamylase aus *Pseudomonas sp*. und Pullulanase aus *Klebsiella pneumoniae* als stärkeabbauende Enzyme gefunden. Von der Amyloglukosidase aus *A. niger* ist bekannt, dass sie sowohl α-1,4- als auch α-1,6-glykosidische Bindungen spalten kann. Dadurch kann sie Stärke, Amylose, Amylopektin sowie Amylodextrine nahezu vollständig zu Glukose umsetzen (Pazur & Ando, 1959). Die Isoamylase aus *Pseudomonas sp*. sowie die Pullulanase aus *K. pneumoniae* spalten nur α-1,6-glykosidische Bindungen. Als Substrat dient der Isoamylase Amylopektin, durch das Spalten der α-1,6-glykosidische Bindungen entstehen dann lineare Polysaccharide (Harada et al., 1968). Die Pullulanase kann in Oligo- und Polysacchariden sowie im Pullulan die α-1,6-glykosidische Bindungen spalten

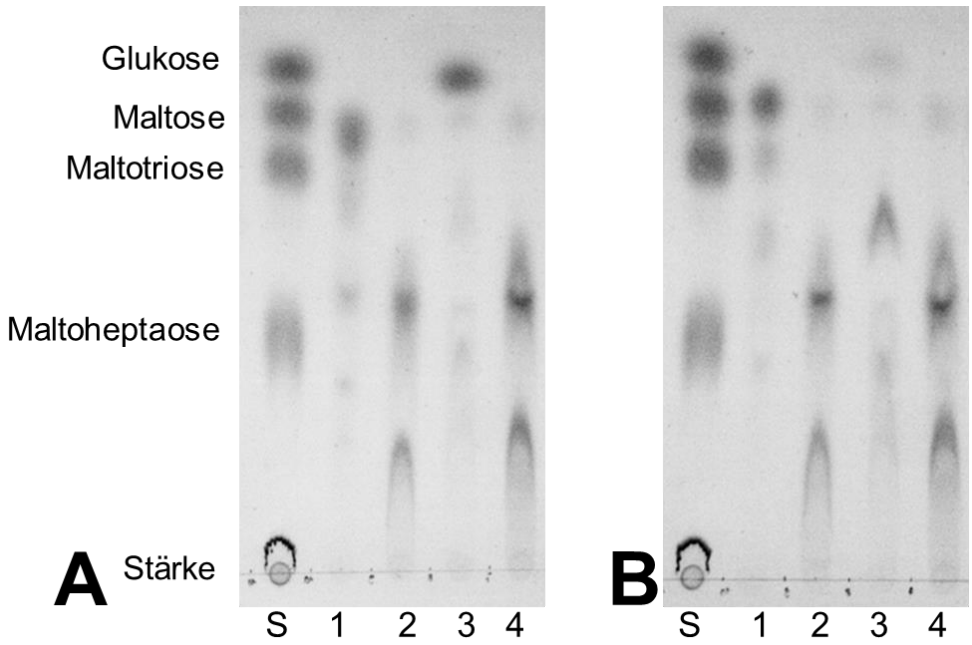

Abbildung 25: Inkubation des Kulturüberstandes von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit 3 % aufgekochter löslicher Kartoffelstärke und 1 % Glukose nach 48 h mit verschiedenen, stärkeabbauenden Enzymen. Die Inkubationsdauer betrug 2 h. Eingesetzte Enzyme: 1: 0,3 U Pullulanase, 2: 2,5 U Isoamylase, 3: 0,3 U Amyloglukosidase, 4: ohne Enzymzugabe, S: Standard aus Glukose, Maltose, Maltotriose, Maltoheptaose und Stärke zu je 5 µg/ml; (A) Inkubation in optimalem Puffersystem der Enzyme, 1: 0,1 M Natriumacetatpuffer, pH 5,5; 40 °C, 2: 0,04 M Kaliumacetatpuffer, pH 4,2; 40 °C, 3: 0,04 M Kaliumacetatpuffer, pH 4,2; 28 °C, 4: 0,1 M Natriumacetatpuffer, pH 5,5; 40 °C; (B) Inkubation in CgC-Minimalmedium, 1: 40 °C, 2: 40 °C, 3: 28 °C, 4: 40 °C .

(Michaelis et al., 1985). Da diese drei Enzyme aufgereinigt kommerziell erworben werden konnten, wurden sie direkt in Versuche zum Stärkeabbau eingesetzt. Dazu wurden Inkubationsversuche mit den verbliebenen Kohlenstoffverbindungen im Überstand von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit 3 % aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke und 1 % Glukose durchgeführt. Der Überstand wurde dafür mit optimalem Puffer des jeweiligen Enzyms verdünnt und das entsprechende Enzym zugegeben. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Enzymzugabe. Hierfür wurde der Puffer für die Pullulanase verwendet. Wie in Abbildung 25 A zu erkennen ist, zeigte der Kontrollansatz (Spur 4) ohne Enzymzugabe zwei Fraktionen. Eine Fraktion lag etwas oberhalb, die andere Fraktion lag etwas unterhalb der Höhe von Maltoheptaose. Der mit Isoamylase inkubierte Kulturüberstand (Spur 2) zeigte das gleiche Fraktionsmuster. Bei dem mit Amyloglukosidase inkubiertem Kulturüberstand (Spur 3) war eine kompakte Fraktion auf Höhe von Glukose zu erkennen. Der Kulturüberstand, der mit Pullulanase inkubiert wurde (Spur 1) zeigte bei der Analyse eine schwache Fraktion etwas oberhalb der Höhe von Maltoheptaose und eine deutlich stärkere Fraktion auf Höhe von Maltose. Eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 24 h der einzelnen Proben führte zu keinem veränderten Fraktionsmuster (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurde untersucht, ob die Enzyme auch in CgC-Minimalmedium aktiv sind. Die Inkubation erfolgte bei den optimalen Arbeitstemperaturen der jeweiligen Enzyme. Abbildung 25 B zeigt die chromatographische Auftrennung der inkubierten Kulturüberstände. Die Kontrollprobe in CgC-Minimalmedium ohne Enzym zeigte das gleiche Fraktionsmuster wie die Kontrollprobe in Abbildung 25 A. Die Inkubation des Kulturüberstandes mit Isoamylase in CgC-Minimalmedium zeigte auch unter diesen Versuchsbedingungen das gleiche Abbaumuster wie der Kontrollansatz, d.h. dieses Enzym hatte keinen Einfluss auf den Stärkeabbau. Im Vergleich zur Inkubation im optimalen Puffersystem zeigte der inkubierte Kulturüberstand in CgC-Minimalmedium mit Amyloglukosidase die stärkste Veränderung im Fraktionsmuster. Die Analyse zeigte nur eine schwache Fraktion auf Höhe von Maltoheptaose und eine intensivere Fraktion etwas unterhalb der Höhe von Maltotriose. Die Inkubation des Kulturüberstandes mit Pullulanase zeigte bei der chromatographischen Analyse eine kompakte Fraktion größerer Intensität auf Höhe von Maltose. Zudem waren kleinere Fraktionen auf der Höhe von Maltotriose sowie zwischen Maltotriose und Maltoheptaose zu sehen. Dieses Fraktionsmuster stimmt mit dem Fraktionsmuster des inkubierten Kulturüberstands mit Pullulanase im optimalen Puffersystem überein (Abbildung 25 A). Dies lässt darauf schließen, dass das CgC-Minimalmedium die Aktivität der Pullulanase nicht beeinträchtigt. Neben der zweistündigen Inkubation wurde auch untersucht, ob eine Verlängerung der Inkubationszeit des Überstandes in CgC-Minimalmedium und entsprechendem Enzym zu einem anderen Fraktionsmuster führt. Die

zeitliche Ausdehnung der Inkubation auf 24 h zeigte jedoch kein anderes Muster der inkubierten Überstände.

Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl die Amyloglukosidase aus *A. niger* als auch die Pullulanase aus *K. pneumoniae* unter optimalen Arbeitsbedingungen der Enzyme die nicht verwerteten Kohlenstoffverbindungen im Überstand von Wachstumsversuchen von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) nach 48 h in CgC-Minimalmedium mit aufgekochter löslicher Kartoffelstärke und Glukose zu Produkten der Größenordnungen von Maltoheptaose, Maltose und Glukose abbauen konnten. Die verwendete Isoamylase aus *Pseudomonas sp*. zeigte hingegen keinen Abbau der Kohlenstoffverbindungen unter optimalen Bedingungen. Beim Abbau der verbliebenen Kohlenstoffverbindungen in CgC-Minimalmedium zeigte die Pullulanase den effizientesten Abbau der höhermolekularen Kohlenstoffe. Hierbei entstanden Kohlenstoffverbindungen in den Größenordnungen von Maltotriose und Maltose. Kohlenstoffe dieser Größenordnung können von *C. glutamicum* als Energie- und Kohlenstoffquelle genutzt werden.

3.2.1.4 Pullulanase aus *Klebsiella pneumoniae*

Im vorangegangenen Kapitel wurde gezeigt, dass die nicht verwerteten Kohlenhydrate im Überstand von Kulturen von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit aufgekochter löslicher Kartoffelstärke und 1 % Glukose durch Zugabe von Pullulanase aus *K. pneumoniae* in CgC-Minimalmedium beinahe vollständig zu Maltotriose und Maltose abgebaut wurden. Dies lässt vermuten, dass die nicht verwerteten höhermolekularen Kohlenhydrate hauptsächlich α-1,6-glykosidische Bindungen aufweisen. In den folgenden Experimenten wurde untersucht, ob es möglich ist, durch Zugabe von Pullulanase aus *K. pneumoniae* in CgC-Minimalmedium mit aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke, die nicht verwertbaren Kohlenhydrate für den Stamm *C. glutamicum* DM1729(pAmy) als Kohlenstoffquelle zugänglich zu machen. Hierfür wurden 10 U Pullulanase von *K. pneumoniae* nach vier Stunden Wachstum in das Medium zugegeben. In Abbildung 26 sind die Wachstumskurven des Stammes *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit 2 % aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke und 1 % Glukose bzw. mit 2 % aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke, 1 % Glukose und 10 U Pullulanase gezeigt. Als Kontrollstamm wurde zusätzlich *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit 3 % Glukose mitgeführt. Auf die Zugabe der Pullulanase wurde in diesem Fall verzichtet.

Mit dem stärkehaltigen Medium erreichte der Stamm sowohl ohne als auch mit Zugabe der Pullulanase eine Wachstumsrate von $\mu = 0{,}31\ h^{-1}$. Somit hatte die Zugabe der Pullulanase ins Medium keinen Einfluss auf die Wachstumsrate. Im Kontrollmedium mit 3 % Glukose als

Substrat zeigte der Stamm eine etwas geringere Wachstumsrate von μ = 0,30 h^{-1}. Die höchste OD_{600nm} von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) wurde in allen Medien nach etwa 14 h erreicht. Die maximal erreichte OD_{600nm} des Stammes lag in CgC-Minimalmedium mit 2 % Kartoffelstärke und Glukose ohne Pullulanase bei 32, mit Pullulanase in diesem Medium erreichte der Stamm eine deutlich höhere OD_{600nm} von etwa 37. Im Kontrollmedium mit 3 % Glukose erreicht der Stamm dagegen nach 14 h die höchste maximale OD_{600nm} mit 39. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass die aufgekochte lösliche Kartoffelstärke durch die Pullulanase im Medium während des Wachstums des Stammes weitgehend komplett zu Kohlenhydraten abgebaut wurde, die von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) für das Wachstum verwertet werden konnten.

Bei den gebildeten L-Lysinkonzentrationen von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) ist ebenfalls ein deutlicher Unterschied in den verschiedenen Medien zu erkennen (Abbildung 26). Der Stamm ohne Pullulanase im CgC-Minimalmedium mit Kartoffelstärke und Glukose erreichte nach 48 h eine maximale L-Lysinkonzentration von 13 mM. Im Gegensatz dazu erreichte *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit 10 U Pullulanase schon nach

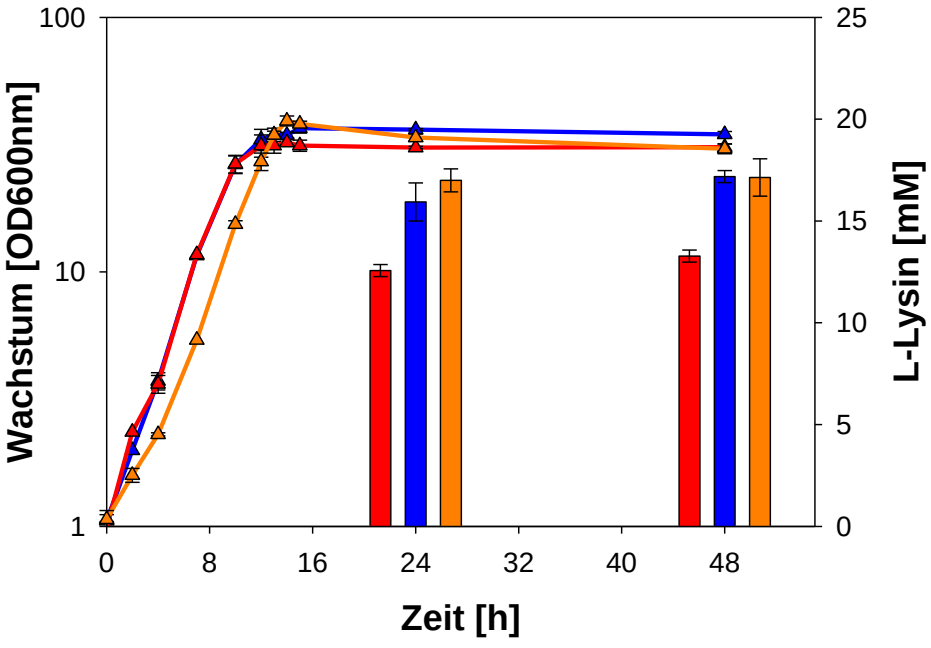

Abbildung 26: Wachstum (Δ: OD_{600nm}) und L-Lysinproduktion (Balken) von *C. glutamicum* DM1729(pAMY) in CgC-Minimalmedium mit 2 % aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke und 1 % Glukose bzw. 2 % aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke, 1 % Glukose und 10 U Pullulanase bzw. 3 % Glukose. (rot) *C. glutamicum* DM1729(pAMY), 2 % Stärke, 1 % Glukose, (blau) *C. glutamicum* DM1729(pAMY), 2 % Stärke, 1 % Glukose, 10 U Pullulanase, (gelb) *C. glutamicum* DM1729(pAMY), 3 % Glukose. Die Abbildung zeigt den Durchschnitt von mindestens drei unabhängigen Einzelversuchen.

24 h eine maximale L-Lysinkonzentration von 17 mM. Die gleiche L-Lysinkonzentration erreichte der Stamm in CgC-Minimalmedium mit Glukose zum gleichen Zeitpunkt. Dies zeigt, dass die Zugabe von Pullulanase zu einer um etwa 30 % gesteigerten maxialen L-Lysinkonzentration führt. Zudem zeigen diese Ergebnisse, dass der Stamm in CgC-Minimalmedium mit Kartoffelstärke, Glukose und 10 U Pullualanase die gleiche L-Lysinkonzentration erreicht, wie in CgC-Minimalmedium mit 3 % Glukose, einer vergleichbaren Ausgangskonzentration an Kohlenstoffeinheiten.

Um zu untersuchen, ob die höhere OD_{600nm} sowie die höhere L-Lysinkonzentration des Stammes *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit Glukose bzw. mit Pullulanase im stärkehaltigen Medium mit weniger verbleibenden Kohlenstoffverbindungen im Überstand korreliert, wurden die Überstände des Wachstumsversuchs zum Zeitpunkt t = 48 h auf nicht verbrauchte Kohlenstoffverbindungen untersucht. Hierfür wurde mit den Proben eine Dünnschichtchromatographie durchgeführt (Abbildung 27). Der Kulturüberstand von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit Kartoffelstärke, Glukose und 10 U Pullulanase nach 48 h Wachstum zeigte zwei sehr schwache Fraktionen. Eine Fraktion lag auf Höhe von Maltoheptaose, eine weitere auf Höhe von Maltose. Im

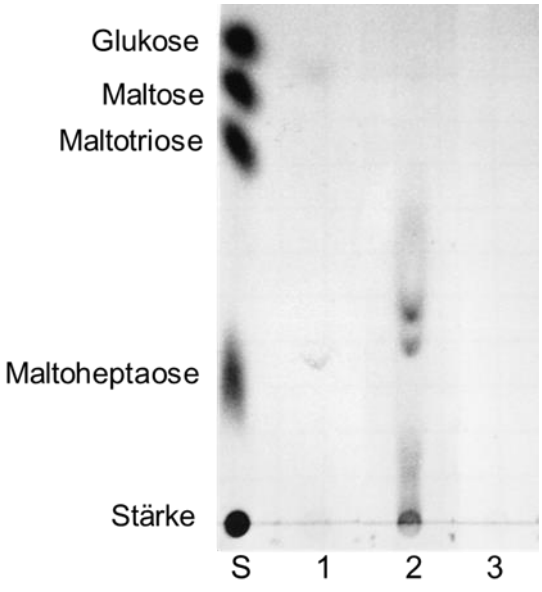

Abbildung 27: Dünnschichtchromatographische Analyse der nicht verbrauchten Kohlenstoffverbindungen im Kulturüberstand von *C. glutamicum* DM1729 (pAMY) nach 48 Stunden in CgC-Minimalmedium mit verschiedenen Kohlenstoffquellen.
S: Standard aus Glukose, Maltose, Maltotriose, Maltoheptaose und Stärke zu je 5 µg/ml, 1: Kulturüberstand beim Wachstum auf CgC-Minimalmedium mit 2 % Stärke, 1 % Glukose und 10 U Pullulanase, 2: Überstand beim Wachstum auf CgC-Minimalmedium mit 2 % Stärke und 1 % Glukose, 3: Überstand beim Wachstum auf CgC-Minimalmedium mit 3 % Glukose.

Kulturüberstand des Stammes im gleichen Medium ohne Pullulanasezugabe waren dagegen drei deutliche Fraktionen zu sehen. Eine lag auf der Höhe von Stärke, die zweite auf Höhe von Maltoheptaose und die dritte Fraktion lag etwas oberhalb der Höhe von Maltoheptaose. Im Überstand von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) beim Wachstum in CgC-Minimalmedium mit 3 % Glukose als Substrat waren keine Kohlenhydrate zu sehen.

Die Fraktionsmuster des Stammes in den unterschiedlichen Medien lässt darauf schließen, dass die Pullulanase im Wachstumsmedium die nicht verwertbaren Kohlenstoffverbindungen von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) weiter zu kleineren Kohlenhydraten abbaut, die der Stamm nutzen kann.

Die in der chromatographischen Analyse detektierten, nicht verbrauchten Kohlenstoffverbindungen in den Überständen von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke und Glukose mit und ohne Pullulanase wurden anschließend quantifiziert. Dazu wurden die Überstände mit Amyloglukosidase inkubiert und die entstandenen Glukoseeinheiten enzymatisch bestimmt. Daneben wurde auch der Überstand des Stammes in CgC-Minimalmedium mit Glukose analysiert. Es zeigte sich, dass im Überstand von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit Kartoffelstärke und Glukose 17,3 ± 0,13 mM nicht verbrauchte Glukoseeinheiten zurückblieben. Im Gegensatz dazu wies der Stamm im gleichen Medium mit Pullulanasezugabe eine unverbrauchte Menge an Glukoseeinheiten von nur 0,49 ± 0,05 mM auf. Das bedeutet, dass *C. glutamicum* DM1729(pAmy) im stärkehaltigen Medium durch die Pullulanasezugabe etwa 16,5 mM mehr Glukoseeinheiten verwerten konnte als im Experiment ohne Pullulanasezugabe. Im Überstand von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit Glukose konnte nach 48 h Wachstum keine Glukose mehr detektiert werden. Dies stimmt mit der Beobachtung der Dünnschichtchromatographie überein, die keine Kohlenstofffraktion in dieser Probe zeigte (Abbildung 27).

Um die L-Lysinproduktion des Stammes in den unterschiedlichen Medien vergleichen zu können, wurden die L-Lysinerträge sowie die spezifischen L-Lysinproduktivitäten des Stammes *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in den unterschiedlichen Medien berechnet. Der Ertrag wurde zum einen auf die gesamt eingesetzte und zum anderen auf die tatsächlich verbrauchte Kohlenstoffmenge berechnet. Die L-Lysinerträge sind in Tabelle 12 aufgeführt. Es zeigte sich, dass der Stamm *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit 2 % aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke, Glukose und Pullulanase mit 0,103 mmol L-Lysin/mmol Glukoseeinheiten einen um 30 % höheren L-Lysinetrag, bezogen auf die gesamt eingesetzte Kohlenstoffmenge erreichte als ohne Pullulanase im Medium (0,079 mmol L-Lysin/mmol Glukoseeinheiten). Bezogen auf die tatsächlich verbrauchte

Tabelle 12: L-Lysinerträge und spezifische L-Lysinproduktivitäten von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in verschiedenen Medien.

	Erträge $Y_{P/S}$[a]		Produktivitäten[d]
Medien	**[mmol/mmol][b]**	**[mmol/mmol][c]**	**[mmol/g ZTM*h]**
2 % aufgekochte, lösliche Kartoffelstärke, 1 % Glukose	0,079 ± 0,001	0,089 ± 0,002	0,05 ± 0,00
2 % aufgekochte, lösliche Kartoffelstärke, 1 % Glukose, 10 U Pullulanase	0,103 ± 0,001	0,103 ± 0,002	0,06 ± 0,00
3 % Glukose	0,103 ± 0,001	0,103 ± 0,001	0,07 ± 0,00

[a] [mmol L-lysin/mmol Glukoseeinheiten] zum Zeitpunkt der maximalen L-Lysinkonzentration, [b] bezogen auf die insgesamt eingesetzten Glukoseeinheiten, [c] bezogen auf die tatsächlich verbrauchte Glukoseeinheiten, [d] [mmol L-Lysin/g ZTM*h], ZTM berechnet mit Faktor 0,3 g Trockengewicht pro Liter und OD_{600nm}-Einheit (Blombach et al., 2007), als OD_{600nm}-Einheit wurde die OD_{600nm} zum Zeitpunkt t = 24 h verwendet, siehe Abbildung 26

Kohlenstoffmenge erreichte der Stamm mit Pullulanase im Medium ebenfalls einen um 15 % höheren L-Lysinertrag (0,103 mmol L-Lysin/mmol Glukoseeinheiten) als ohne Pullulanase im Medium (0,089 mmol L-Lysin/mmol Glukoseeinheiten). Vergleicht man die L-Lysinerträge des Stammes *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit löslicher Kartoffelstärke, Glukose und Pullulanase mit den Erträgen desselben Stammes in CgC-Minimalmedium mit einer vergleichbaren Menge an Glukose, so zeigte der Stamm in beiden Medien einen L-Lysinertrag von 0,103 mmol L-Lysin/mmol Glukoseeinheiten, sowohl bezogen auf die gesamt eingesetzte Kohlenstoffmenge, als auch auf die tatsächlich verbrauchte Kohlenstoffmenge. Neben den L-Lysinerträgen wurden auch die spezifischen L-Lysinproduktivitäten für den Produktionszeitraum der ersten 24 h berechnet. In Tabelle 12 sind die spezifischen L-Lysinproduktivitäten des Stammes *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke und Glukose mit und ohne Pullulanasezugabe aufgeführt. In CgC-Minimalmedium mit löslicher Kartoffelstärke, Glukose und Pullulanase wies *C. glutamicum* DM1729(pAmy) eine etwas höhere spezifische L-Lysinproduktivität (0,06 mmol L-Lysin/g ZTM*h) auf als ohne Pullulanase im gleichen Medium (0,05 mmol L-Lysin/g ZTM*h). Die höchste spezifische L-Lysinproduktivität zeigte der Stamm mit 0,07 mmol L-Lysin/g ZTM*h in CgC-Minimalmedium mit Glukose.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse einen deutlichen Vorteil durch die Zugabe der Pullulanase in das Medium von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) mit aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke und Glukose beim Wachstum und bei der L-Lysinproduktion. Daraus kann geschlossen werden, dass die zugegebene Pullulanase aus *K. pneumoniae* die eingesetzte Kartoffelstärke in Kombination mit der sezernierten α-Amylase durch *C. glutamicum* DM1729(pAmy) zu Produkten abbaut, die sowohl für das Wachstum als auch für die Produktion von L-Lysin genutzt werden können.

3.2.1.5 Optimierung von *C. glutamicum*-Stämmen zum vollständigen Abbau der nicht verbrauchten Kohlenhydrate im Überstand

Bei der Inkubation von Überstanden aus Wachstumsversuchen von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) mit aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke als Substrat mit Pullulanase aus *K. pneumoniae* verblieben nur noch Abbauprodukte in der Größenordnung von Maltose und Maltotriose (3.2.1.3). In Wachstumsversuchen von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in stärkehaltigem Medium konnte dann gezeigt werden, dass durch eine Zugabe von Pullulanase aus den nicht verwertbaren Kohlenhydraten Abbauprodukte entstehen, die als Energie- und Kohlenstoffquelle genutzt wurden (siehe 3.2.1.4). Um auf die externe Zugabe der Pullulanase ins Medium verzichten zu können, wurde das *pulA*-Gen, welches für die Pullulanase aus *K. pneumoniae* codiert, mit einer vorgelagerten Signalsequenz in ein Plasmid eingebracht werden, um einen damit transformierten *C. glutamicum*-Stamm zu erhalten, der eine aktive Pullulanase ins Medium sezerniert. Dafür wurden zwei Plasmide konstruiert, die das Gen *pulA* der Pullulanase enthielten. Als Signalsequenz wurde zum einen eine für das Sec-System notwendige Signalsequenz vor das Gen eingebracht, zum anderen wurde eine für das Tat-System notwendige Signalsequenz verwendet.

***C. glutamicum DM1729*(pEKEX2-Hyl-Prepro-pulA)**

Für die Konstruktion eines Plasmids, welches die Sekretion der Pullulanase in *C. glutamicum* über das Sec-System ermöglicht, wurde als Ausgangsplasmid pEKEx2-Hyl-Prepro gewählt (erhalten von Roland Freudl, Forschungszentrum Jülich). Dieses Plasmid enthält eine Nukleotidsequenz, die für das Pre- und das Pro-Peptid einer *Staphylococcus hyicus*-Lipase codiert. Die Kombination der Peptide ermöglicht ein effizientes Ausschleusen des gewünschten Proteins im ungefalteten Zustand über das Sec-System in Gram-positiven Bakterien (Demleitner & Götz 1994; Götz et al., 1998; Meens et al., 1993; Kouwen et al., 2010). Das Pre-Peptid übernimmt die Aufgabe eines Signalpeptids, das Pro-Peptid fungiert als Chaperon. Auch bei *C. glutamicum* konnte diese Sequenz bereits erfolgreich zur Enzymsekretion verwendet werden (Lausberg F. & Freudl R., unveröffentlicht). Durch Einbringen des Strukturgens der Pullulanase aus *K. pneumoniae* sollte das Plasmid

pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA entstehen. In Abbildung 28 ist das gewünschte Plasmid pEKEx-Hyl-Prepro-pulA dargestellt. Das Gen der Pullulanase (PulA) aus *K. pneumoniae* wurde durch eine symmetrische Klonierung unter Verwendung der im Plasmid direkt hinter der Prepro-Sequenz vorhanden Restriktionsschnittstelle des Enzyms *SnaB*I eingefügt. Für die Amplifikation des Pullulanase-Gens mit entsprechenden Schnittstellen an den Enden wurde das Plasmid pCHAP231 (d'Enfert et al., 1987) als Template sowie die Primer pulAhinoS und pulArück eingesetzt. Die Lage der beiden Primer wurde so gewählt, dass das *pulA*-Gen ohne eigene Signalsequenz amplifiziert wurde (Kornacker et al., 1989). Das gebildete Enzym enthält eine Ankersequenz, was bei *K. pneumoniae* zu einer Verankerung des Enzyms in der Zellmembran führt (d'Enfert et al., 1987). Da die direkte Klonierung des entsprechend geschnittenen *pulA*-Amplifikat in den geschnittenen Vektor auch nach mehrmaligen Versuchen nicht gelang, wurde ein Klonierungsschritt im Zwischenvektor pJET von Fermentas durchgeführt. Dabei werden die Enden des Amplifikats durch das „DNA Blunting Enzyme" zu stumpfen Enden (blunt-ends) aufgefüllt und anschließend durch eine Ligase in den Vektor pJET, der ebenfalls blunt-ends aufweist, kloniert. Dieser Ansatz wurde in kompetente *E. coli* DH5α-Zellen transformiert. Die sechs erhaltenen Klone wurden auf das Vorhandensein des *pulA*-Gens im Plasmid pJET-pulA durch eine Kolonie-PCR mit den

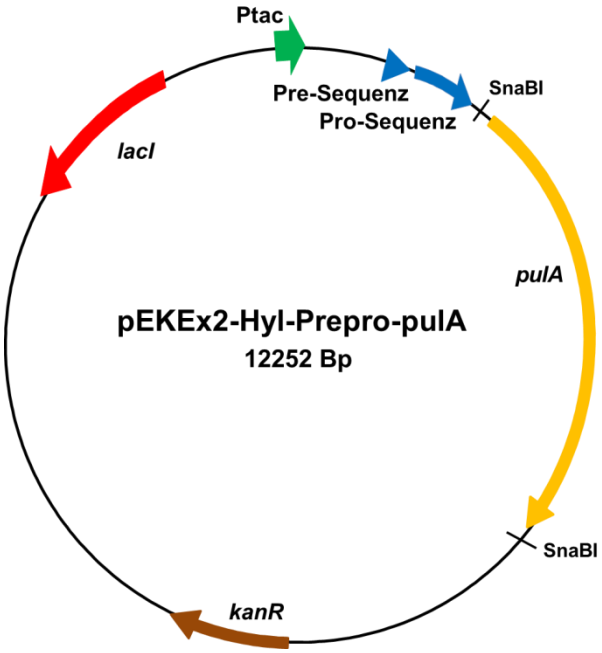

Abbildung 28: Plasmidkarte pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA. Ptac: Promoter; Pre-Sequenz (114 Bp) und Pro-Sequenz (621 Bp): codieren zusammen als Signalpeptid; *pulA* (3228 Bp): codiert für Pullulanase aus *K. pneumoniae*; *kanR* (861 Bp): codiert für eine Kanamycinzesistenz; *lacI* (975 Bp): codiert für den Repressor LacI.

Primern pulAhinoS und pulArück überprüft. Dabei wiesen drei untersuchte Kolonien den gewünschten Genabschnitt auf. Anschließend wurde aus einer positiven Kolonie das Plasmid pJET-pulA isoliert und der gewünschte Genabschnitt mit dem Restriktionsenzym *SnaB*I ausgeschnitten. Der Restriktionsverdau wurde auf ein 0,8 %-iges Agarosegel aufgetragen. Die erwartete *pulA*-Gensequenz mit der Größe von etwa 3300 Bp wurde ausgeschnitten und gereinigt. Anschließend erfolgte die Klonierung in den ebenfalls mit *SnaB*I geschnittenen Vektor pEKEx2-Hyl-Prepro. Nach der Ligation erfolgte die Transformation in *E. coli* DH5α-Zellen. Das neue Plasmid pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA wurde aus einem der erhaltenen Transformanten isoliert und durch einen Restriktionsverdau mit dem Enzym *EcoR*V identifiziert. Dabei zeigte sich, dass das *pulA*-Gen in gewünschter Orientierung in das Plasmid eingebracht werden konnte. Anschließend wurde das Plasmid pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA in *C. glutamicum* DM1729 transformiert. Die Sequenzierung des Plasmids pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA ergab keine Mutationen im Prepro-Teil sowie im *pulA*-Gen. Ebenfalls konnte der korrekte Übergang der Prepro-Sequenz zum Strukturgen *pulA* nachgewiesen werden.

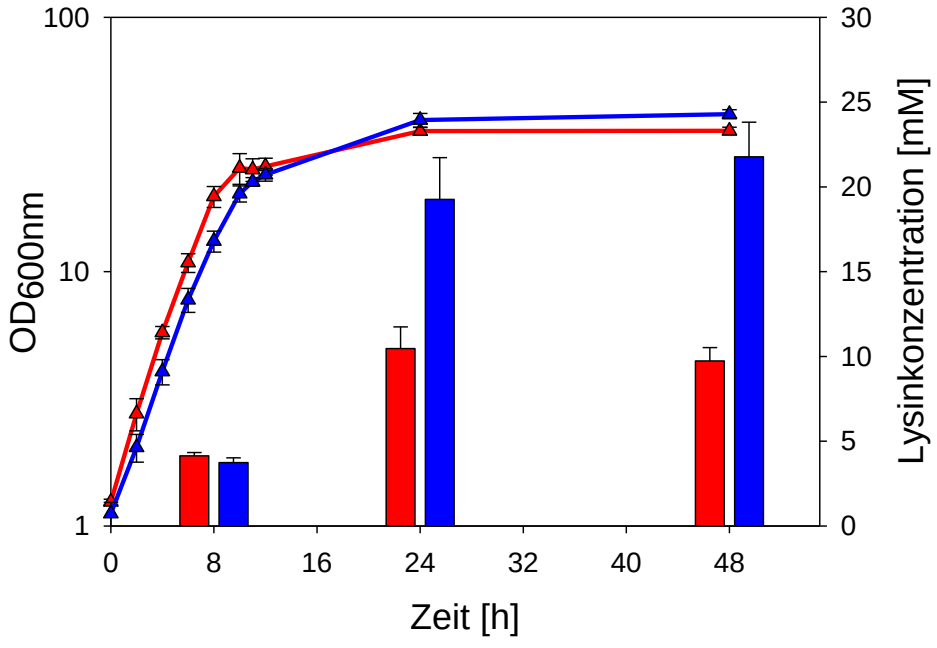

Abbildung 29: Wachstum (Δ: OD_{600nm}) und L-Lysinproduktion (Balken) von *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-Hyl-Prepro) und *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA) in CgC-Minimalmedium mit 3 % aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke und 6 U α-Amylase. (rot) *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-Hyl-Prepro), (blau) *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA). Die Abbildung zeigt den Durchschnitt von mindestens drei unabhängigen Einzelversuchen.

Der neu generierte Stamm *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA) wurde in Wachstums- und Produktionsversuchen in CgC-Minimalmedium mit 3 % aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke und 6 U α-Amylase aus *B. subtilis* eingesetzt. Die α-Amylase wurde eingesetzt um auch den Abbau der α-1,4-glykosidischen Verbindungen der Stärke zu ermöglichen. Als Kontrolle wurde der Versuch mit dem Leerplasmid-tragenden Stamm *C. glutamicum*(pEKEx2-Hyl-Prepro) durchgeführt. In Abbildung 29 ist das Ergebnis des Wachstums- und Produktionsversuchs dargestellt. *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA) erreichte in CgC-Minimalmedium mit löslicher Kartoffelstärke und α-Amylase eine Wachstumsrate von $\mu = 0{,}31\ h^{-1}$ und nach 24 h eine maximale OD_{600nm} von 38. Der Leerplasmid-tragende Stamm *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-Hyl-Prepro) zeigte eine vergleichbare Wachstumsrate ($\mu = 0{,}30\ h^{-1}$), jedoch eine etwas geringere maximale OD_{600nm} von 36 zum Zeitpunkt t = 24 h.

Um zu testen, ob das Einbringen des Gens der Pullulanase in *C. glutamicum* DM1729 zu einer Steigerung der L-Lysinproduktion in CgC-Minimalmedium mit löslicher Kartoffelstärke führt, wurden die gebildeten L-Lysinkonzentrationen dieses und des Leerplasmid tragenden Stammes zu den Zeitpunkten 8 h, 24 h und 48 h bestimmt. Die ausgeschiedenen L-Lysinmengen der Stämme sind in Abbildung 29 zu sehen. *C. glutamicum* DM1729(pEKEX2-Hyl-Prepro-pulA) wies bei Wachstum in CgC-Minimalmedium mit löslicher Kartoffelstärke und α-Amylase zu den Zeitpunkten 24 h und 48 h eine etwa doppelt so hohe L-Lysinkonzentration auf (ca. 20 mM) wie der Stamm mit dem Leerplasmid im gleichen Medium (ca. 10 mM).

Anschließend wurden die verbliebenen Kohlenstoffverbindungen nach 8 h, 12 h, 24 h und 48 h im Überstand der Stämme *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-Hyl-Prepro) und *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-Hyl-PrepropulA) qualitativ mit einer Dünnschichtchromatographie analysiert (Abbildung 30). In den Überständen des Leerplasmid-tragenden Stammes *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-Hyl-Prepro) waren zu den Zeitpunkten 24 h und 48 h noch deutlich Kohlenstoffverbindungen sichtbar. Im Gegensatz dazu war in den Überständen des Stammes *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA) zu den Zeitpunkten 24 h und 48 h nur noch eine leichte Fraktion auf Höhe von Maltoheptaose zu sehen. Eine quantitative Analyse ergab, dass im Überstand von *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-Hyl-Prepro) nach 48 h noch insgesamt 45,1 ± 2,0 mM Glukoseeinheiten verblieben. Im Gegensatz dazu wies der Überstand des Stammes mit dem *pulA*-Gen auf dem Plasmid nach 48 h lediglich 3,92 ± 0,73 mM Glukoseeinheiten auf, was einer etwa zehnfach geringeren Menge an Kohlenstoffverbindungen im Überstand entspricht.

Tabelle 13 zeigt die berechneten L-Lysinerträge der Stämme bezogen auf die insgesamt eingesetzte Kohlenstoffmenge bzw. auf die tatsächlich verbrauchte Kohlenstoffmenge. Der Leerplasmid tragende Stamm *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-Hyl-Prepro) zeigte, bezogen auf die gesamt eingesetzte Kohlenstoffmenge mit 0,06 mmol L-Lysin/mmol Glukoseeinheiten den geringsten L-Lysinertrag in CgC-Minimalmedium mit aufgekochter löslicher Kartoffelstärke und 6 U α-Amylase. Bezogen auf die tatsächlich verbrauchte Kohlenstoffmenge erhöhte sich der L-Lysinertrag auf 0,08 mmol L-Lysin/mmol Glukose. Der Stamm *C. glutamicum* (pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA) hingegen zeigte sowohl bezogen auf die insgesamt eingesetzte Kohlenstoffmenge als auch bezogen auf die tatsächlich eingesetzte Kohlenstoffmenge (jeweils 0,12 mmol L-Lysin/mmol Glukose) einen fast doppelt so hohen Ertrag wie der Referenzstamm.

Auch bei der spezifischen Produktivität zeigte *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-Hyl-Prepro) durch das Tragen des *pulA*-Gens einen deutlichen Vorteil gegenüber dem Leerplasmid-tragenden Stamm (Tabelle 13). In CgC-Minimalmedium mit löslicher Kartoffelstärke und α-Amylase erreichte der Stamm mit 0,1 mmol L-Lysin/g ZTM*h eine etwa 2,5-fach höhere spezifische Produktivität wie der Kontrollstamm mit Leerplasmid (0,04 mmol L-Lysin/g ZTM*h).

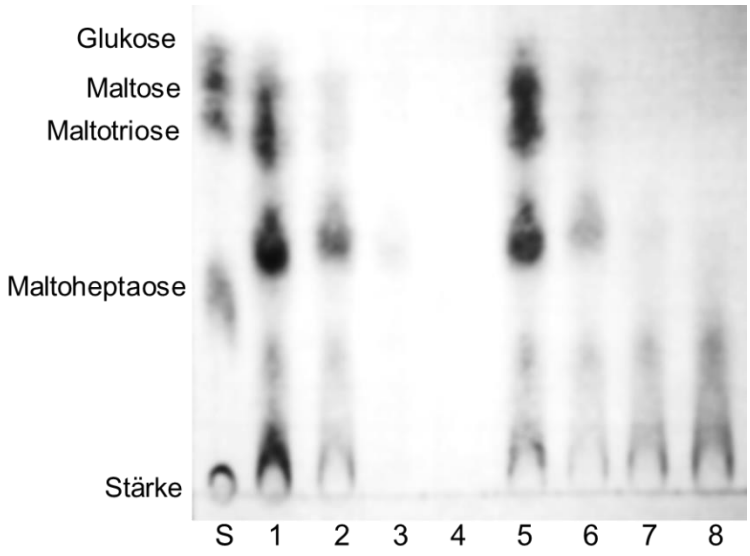

Abbildung 30: Dünnschichtchromatographische Analyse von Kulturüberständen von *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA) und *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-Hyl-Prepro)in CgC-Minimalmedium mit 3 % aufgekochter löslicher Stärke und 6 U α-Amylase. S: Standard aus Glukose, Maltose, Maltotriose, Maltoheptaose und Stärke zu je 5 µg/ml. 1, 2, 3, 4: Überstände von *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA) in CgC-Minimalmedium mit 3 % aufgekochter löslicher Kartoffelstärke zu den Zeitpunkten 8 h, 12 h, 24 h, 48 h; 5, 6, 7, 8: Überstände von *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-Hyl-Prepro) in CgC-Minimalmedium mit 3 % aufgekochter löslicher Kartoffelstärke zu den Zeitpunkten 8 h, 12 h, 24 h, 48 h.

Tabelle 13: L-Lysinerträge und L-Lysinproduktivitäten von *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-Hyl-Prepro) und *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA) in CgC-Minimalmedium mit 3 % aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke und 6 U α-Amylase.

	Erträge $Y_{P/S}$[a]		Produktivitäten[d]
Stämme	**[mmol/mmol][b]**	**[mmol/mmol][c]**	**[mmol/g ZTM*h]**
C. glutamicum DM1729(pEKEx2-Hyl-Prepro)	0,06 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,04 ± 0,01
C. glutamicum DM1729(pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA)	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,1 ± 0,01

[a] [mmol L-lysin/mmol Glukoseeinheiten] zum Zeitpunkt der maximalen L-Lysinkonzentration, [b] bezogen auf die insgesamt eingesetzten Glukoseeinheiten, [c] bezogen auf die tatsächlich verbrauchten Glukoseeinheiten, [d] [mmol L-Lysin/g ZTM*h], ZTM berechnet mit Faktor 0,3 g Trockengewicht pro Liter und OD_{600nm}-Einheit (Blombach et al., 2007), als OD_{600nm}-Einheit wurde die OD_{600nm} zum Zeitpunkt t = 24 h verwendet, siehe Abbildung 29, der Produktionszeitraum erstreckte sich zwischen 8 h und 24 h

Um zu prüfen, welchen L-Lysinertrag und welche L-Lysinproduktivität der neu konstruierte Stamm *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-Hyl-PrepropulA) mit entsprechender Menge an Glukose erreicht, wurden die bisher beschriebenen Versuche ebenfalls in CgC-Minimalmedium mit Glukose durchgeführt. Bei Wachstum in CgC-Minimalmedium mit 3 % Glukose zeigte *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA) überraschenderweise ein stark verzögertes Wachstums in der exponentiellen Wachstumsphase (μ = 0,13 h^{-1}). Nach 24 h erreichte der Stamm dennoch wie in CgC-Minimalmedium mit löslicher Kartoffelstärke eine maximale OD_{600nm} von 38 (Daten nicht gezeigt). Jedoch konnte zum Zeitpunkt t = 24 h im Kulturüberstand lediglich eine L-Lysinkonzentration von 14,37 ± 0,12 mM gemessen werden. Im Vergleich zu der Konzentration, die der Stamm zum Zeitpunkt 24 h in stärkehaltigem Medium mit α-Amylase erreichte sind dies 25 % weniger (etwa 20 mM). Dennoch schied *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA) nach 48 h in CgC-Minimalmedium mit Glukose mit ca. 24 mM eine etwas höher Menge an L-Lysin aus, als der Stamm in CgC-Minimalmedium mit löslicher Kartoffelstärke und α-Amylase (ca. 20 mM). Dadurch ergab sich ein L-Lysinertrag von *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA) in CgC-Minimalmedium mit 3 % Glukose von 0,15 ± 0,01 mmol L-Lysin/mmol Glukose bezogen auf das gesamt eingesetzte Substrat. Da *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA) in CgC-Minimalmedium die eingesetzte

Glukose vollständig verbrauchte, entspricht dieser L-Lysinertrag ebenfalls dem, auf die tatsächlich verbrauchte Substratmenge bezogenen Ertrag. Dieser ist nur leicht erhöht zum berechneten Ertrag des Stammes in CgC-Minimalmedium mit löslicher Kartoffelstärke und α-Amylase (0,12 ± 0,01 mmol L-Lysin/mmol Glukoseeinheiten). Die spezifische Produktivität, die *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA) mit Glukose im Medium erreichte, lag bei 0,07 ± 0,00 mmol L-Lysin/g ZTM*h und somit etwas niedriger als mit löslicher Kartoffelstärke und α-Amylase im CgC-Minimalmedium (0,1 ± 0,01 mmol L-Lysin/g ZTM*h). Dies korreliert damit, dass die maximale L-Lysinkonzentration des Stammes erst nach 48 h erzielt wurde.

Die bisher durchgeführten Versuche zeigten, dass der Stamm *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA) im Vergleich zum Leerplasmid-tragenden Stamm eine höhere OD_{600nm} sowie eine höhere L-Lysinkonzentration, einen höheren L-Lysinertrag und eine höhere spezifische L-Lysinproduktivität erreichte. Dies lässt darauf schließen, dass das *pulA*-Gen auf dem Plasmid pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA in *C. glutamicum* DM1729 exprimiert wird und das sezernierte Enzym im Überstand zusammen mit der α-Amylase die aufgekochte, lösliche Kartoffelstärke zu Produkten abbaut, die weitestgehend von *C. glutamicum* DM1729 verwertet werden können. Um die spezifische Enzymaktivität der gebildeten Pullulanase zu bestimmen, wurde ein Enzymtest mit dem Substrat Red-Pullulan durchgeführt. Die Zellen wurden dafür in CgC-Minimalmedium mit 0,5 % Glukose und 0,5 % Maltose gezüchtet. Dadurch konnte das verzögerte Wachstum, das *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA) in CgC-Minimalmedium mit Glukose zeigte, stark vermindert werden.

In Tabelle 14 sind die spezifischen Pullulanase-Aktivitäten der Zelllysate sowie der Membranfraktionen der Stämme *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-Hyl-Prepro) und *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA) dargestellt. Die Messungen wurden auch mit den Überständen durchgeführt. Dort konnte jedoch mit dieser Methode keine Aktivität festgestellt werden. Auch nach Konzentrieren des Überstandes um das 30-fache konnte keine Aktivität beobachtet werden. *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA) wies sowohl im Zelllysat als auch in der Membranfraktion Enzymaktivität auf (141,73 mU/mg bzw. 184,34 mU/mg). Im Gegensatz dazu besaß der Referenzstamm weder im Zelllysat noch in der Membranfraktion eine nachweisbare Pullulanaseaktivität. Dies lässt schlußfolgern, dass das Gen der Pullulanase im Stamm *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA) abgelesen wird und das Enzym aktiv ist.

Tabelle 14: Spezifische Enzymaktivität der Pullulanase (PulA) von *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-Hyl-Prepro) und *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA) im Zelllysat bzw. in der Membranfraktion.

	Spezifische Aktivität von PulA	
Stämme	**[mU/mg][a]**	**[mU/mg][b]**
C. glutamicum DM1729(pEKEx2-Hyl-Prepro)	n. b.[c]	n. b.[c]
C. glutamicum DM1729(pEKEx2-Hyl-PrepropulA)	141,73 ± 35,87	184,34 ± 30,48

[a] spezifische Aktivität von PulA im Zelllysat, [b] spezifische Aktivität von PulA in der Membranfraktion, [c] n. b.: nicht bestimmbar, d.h. unter der Nachweisgrenze

Die Konzentrierung des Überstandes mit Vivaspin und eine anschließende Auftrennung des 30-fach konzentrierten Zelllysats auf einem SDS-Gel mit einer anschließenden Färbung mit Coomassie zeigte keine Bande auf der Höhe von 140 kDa des Standards, was der Größe der Pullulanase PulA aus *K. pneumoniae* entsprechen würde. Nach einer Proteinfällung des Überstandes (Cluff et al., 1990) der Stämme war ebenfalls nach Auftrennung der gefällten Proteine keine Bande mit dieser Größe auf einem SDS-Gel mit anschließender Silberfärbung zu erkennen (Bilder hier nicht gezeigt). Auch ein Nachweis der Pullulanase mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers gegen die Pullulanase von *Enterococcus aerogenes*, die eine 87 %-ige Homologie zur Pullulanase aus *K. pneumoniae* aufweist mit einem Western Blot war nicht erfolgreich, was für eine Verankerung der Pullulanase in der Zellmembran spricht.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der Wachstum- und Produktionsexperimente einen deutlichen Vorteil in der L-Lysinproduktion des Stammes *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA) gegenüber dem Referenzstamm in stärkehaltigem Medium mit zugegebener α-Amylase. Dies lässt darauf schließen, dass das eingebrachte *pulA*-Gen auf dem Plasmid exprimiert und zu einer aktiven Pullulanase translatiert wird. Die Pullulanase spaltet zusammen mit der α-Amylase effektiv die aufgekochte lösliche Kartoffelstärke im Überstand. Die entstandenen Produkte sind dabei effizienter von *C. glutamicum* DM1729 nutzbar als die Produkte, die entstehen, wenn lediglich die α-Amylase zum Abbau der Stärke zur Verfügung steht. Zudem konnte gezeigt werden, dass der Stamm *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA) den gleichen Produktionsertrag erreicht wie der Stamm in CgC-Minimalmedium mit entsprechender Menge an Glukose.

***C. glutamicum DM1729*(pAmy)(pEkEx2-Hyl-Prepro-pulA)**

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass die Kombination der Enzyme α-Amylase und Pullulanase zu einem effektiven Abbau der eingesetzten aufgekochten löslichen Kartoffelstärke führt. Dabei wurden Stämme eingesetzt, die entweder das Gen der α-Amylase oder das Gen der Pullulanase codiert auf einem Plasmid enthielten. Während der Wachstumsversuche musste zur effizienten Nutzung der eingesetzten Stärke das entsprechend andere Enzym in die Kultur zugegeben werden. Im Folgenden wurde geprüft, ob ein Stamm, der beide Gene plasmidcodiert enthält, in der Lage ist, sowohl die α-1,4- als auch die α-1,6-glykosidische Bindungen der Stärke im Überstand komplett abzubauen und die Abbauprodukte dann vollständig zum Wachstum und zur L-Lysinproduktion zu verwenden. Hierfür wurde das Plasmid pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA durch Transformation in den Stamm *C. glutamicum* DM1729(pAmy) eingebracht. Auf Selektionsplatten mit Tetracyclin und Kanamycin wurden Klone erhalten. Eine anschließende Plasmidisolation und ein spezifischer Restriktionsverdau mit dem Restriktionsenzym *Sal*I bestätigte das Vorhandensein der beiden Plasmide im Stamm *C. glutamicum* DM1729(pAmy)(pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA). Auch nach 48 h Wachstum des Stammes konnte das Vorhandensein beider

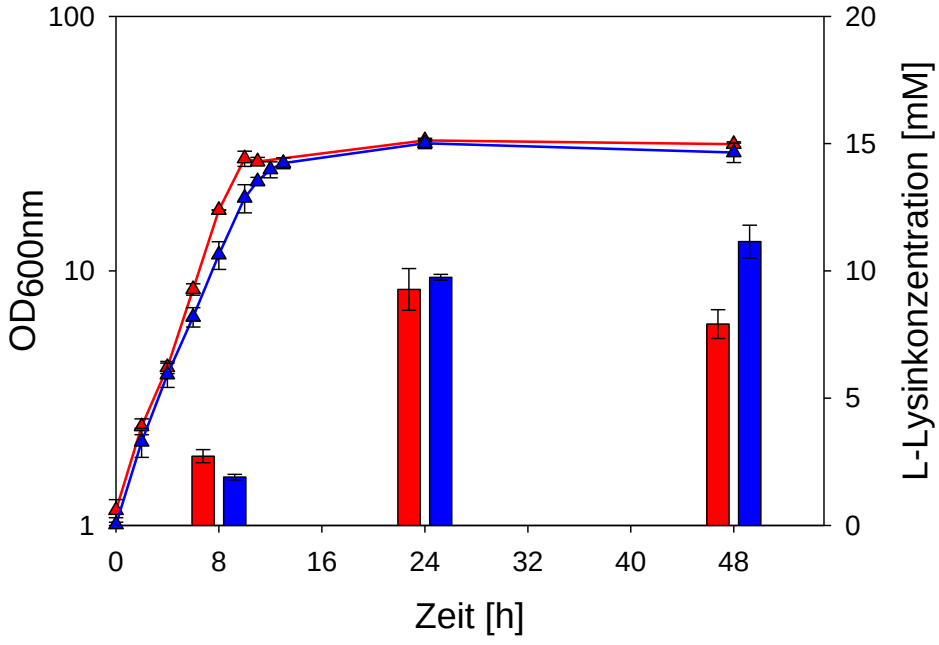

Abbildung 31: Wachstum (Δ: OD_{600nm}) und L-Lysinproduktion (Balken) von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) bzw. *C. glutamicum* DM1729(pAmy)(pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA) in CgC-Minimalmedium mit 3 % aufgekochter löslicher Kartoffelstärke. (rot) *C. glutamicum* DM1729(pAmy), (blau) *C. glutamicum* DM1729(pAmy)(pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA). Die Abbildung zeigt den Durchschnitt von drei (*C. glutamicum* DM1729(pAmy)) bzw. zwei (*C. glutamicum* DM1729(pAmy)(pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA) unabhängigen Einzelversuchen.

Plasmide mit diesem Restriktionsverdau und einer anschließenden Anylase der entstandenen Fragmente auf einem Agarosegel bestätigt werden. Mit dem neu konstruierten Stamm wurden Wachstums- und Produktionsversuche durchgeführt. Als Substrat diente 3 % aufgekochte lösliche Kartoffelstärke in CgC-Minimalmedium. Als Kontrolle diente der Ursprungsstamm *C. glutamicum* DM1729(pAmy). Wie in Abbildung 31 zu erkennen, resultierte das Einbringen des Plasmids pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA in den Stamm *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in einer etwas geringeren Wachstumsrate (μ = 0,28 h^{-1}) im Vergleich zur Wachstumsrate des Ausgangsstammes *C. glutamicum* DM1729(pAmy) mit μ = 0,3 h^{-1}. Allerdings führte das eingebrachte Plasmid zu einer deutlichen Erhöhung der L-Lysinkonzentration nach 48 h Produktionszeit im Vergleich zum Ausgangsstamm. So schied der Stamm *C. glutamicum* DM1729(pAmy)(pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA) bis zu diesem Zeitpunkt etwa 11 mM L-Lysin aus, der Stamm *C. glutamicum* DM1729(pAmy) dagegen nur 8 mM L-Lysin. Dennoch erreichte der Stamm mit pAmy und pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA nicht die L-Lysinkonzentration, die Stamm *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA) mit Zugabe von α-Amylase im gleichen Medium erreichte (20 mM L-Lysin). Dies deutete darauf hin, dass noch unverbrauchtes Substrat im Medium zurückblieb.

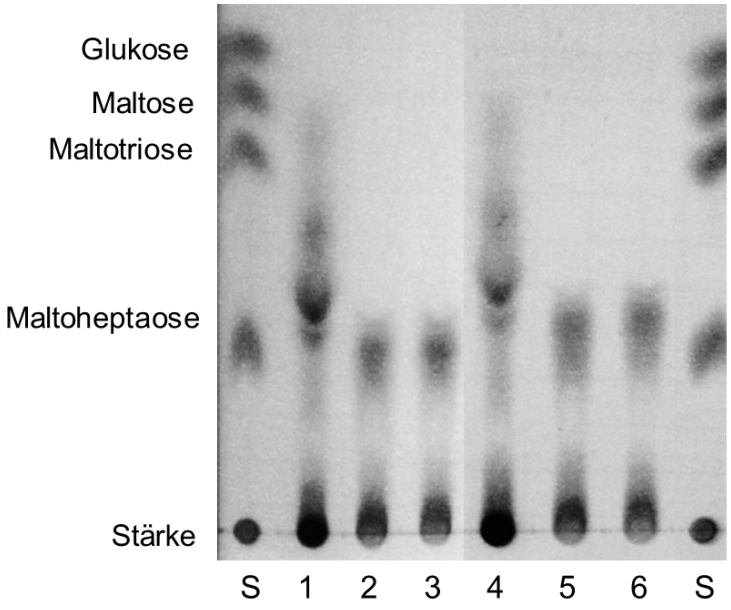

Abbildung 32: Dünnschichtchromatographische Analyse von Kulturüberständen von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) und *C. glutamicum* DM1729(pAmy)(pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA)in CgC-Minimalmedium mit 3 % aufgekochter löslicher Stärke. S: Standard aus Glukose, Maltose, Maltotriose, Maltoheptaose und Stärke zu je 5 µg/ml. 1, 2, 3: Überstande von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) zu den Zeitpunkten 8 h, 24 h, 48 h; 4, 5, 6: Überstande von *C. glutamicum* DM1729(pAmy)(pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA) zu den Zeitpunkten 8 h, 24 h, 48 h.

Tabelle 15: L-Lysinerträge und L-Lysinproduktivitäten von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) bzw. von *C. glutamicum* DM1729(pAmy)(pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA) in CgC-Minimalmedium mit 3 % aufgekochter löslicher Kartoffelstärke.

	Erträge $Y_{P/S}$[a]		Produktivitäten[d]
Stämme	**[mmol/mmol][b]**	**[mmol/mmol][c]**	**[mmol/g ZTM*h]**
C. glutamicum DM1729(pAmy)	0,05 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,04 ± 0,01
C. glutamicum DM1729(pAmy)(pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA)	0,07 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,05 ± 0,00

[a] [mmol L-lysin/mmol Glukoseeinheiten] zum Zeitpunkt der maximalen L-Lysinkonzentration, [b] bezogen auf die insgesamt eingesetzten Glukoseeinheiten, [c] bezogen auf die tatsächlich verbrauchten Glukoseeinheiten, [d] [mmol L-Lysin/g ZTM*h], ZTM berechnet mit Faktor 0,3 g Trockengewicht pro Liter und OD_{600nm}-Einheit (Blombach et al., 2007), als OD_{600nm}-Einheit wurde die OD_{600nm} zum Zeitpunkt t = 24 h verwendet, siehe Abbildung 31, der Produktionszeitraum erstreckte sich zwischen 8 h und 24 h

Dünnschichtchromatographische Analysen der Überstände der getesteten Stämme *C. glutamicum* DM1729(pAmy) und *C. glutamicum* DM1729(pAmy)(pEKEx-2Hyl-Prepro-pulA) bestätigten dass noch unverbrauchtes Substrat im Medium zurückblieb (Abbildung 32). In den Überständen beider Stämme waren nach 8 h noch deutliche Kohlenstoffverbindungen auf Höhe von Stärke und etwas oberhalb der Höhe von Maltoheptaose sichtbar. Nach 24 h verringerten sich zwar die Intensitäten dieser Kohlenstofffraktionen, dennoch blieben bis zum Zeitpunkt t = 48 h in den Überständen beider Stämme Kohlenstoffverbindungen auf der Höhe von Stärke und Maltoheptaose zurück.

Die anschließende Quantifizierung der nicht verbrauchten Glukosepolymere zeigte, dass im Überstand von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) nach 48 h 32,75 ± 1,54 mM Glukoseäquivalente und im Überstand von *C. glutamicum* DM1729(pAmy)(pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA) noch 33,14 ± 1,94 mM Glukoseäquivalente verblieben waren. Daraus ergaben sich beim Stamm *C. glutamicum* DM1729(pAmy) Produktionserträge von 0,05 mmol L-Lysin/mmol Glukoseeinheiten bezogen auf die gesamt eingesetzte Substratmenge bzw. 0,06 mmol L-Lysin/mmol Glukoseeinheiten bezogen auf die tatsächlich verbrauchte Substratmenge (Tabelle 15). Im Vergleich dazu erreichte der neu konstruierte Stamm *C. glutamicum* DM1729(pAmy)(pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA) höhere L-Lysinerträge sowohl bezogen auf die gesamt eingesetzte Substratmenge als auch bezogen auf die tatsächlich

Tabelle 16: Spezifische Enzymaktivität der Pullulanase von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) und *C. glutamicum* DM1729(pAmy)(pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA) im Zelllysat bzw. in der Membranfraktion.

	Spezifische Aktivität	
Stämme	**[mU/mg][a]**	**[mU/mg][b]**
C. glutamicum DM1729(pAmy)	37,59 ± 2,23	77,82 ± 19,16
C. glutamicum DM1729(pAmy)(pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA)	41,18 ± 13,00	79,97 ± 14,22

[a] spezifische Aktivität im Zelllysat, [b] spezifische Aktivität in der Membranfraktion

verbrauchte Substratmenge (0,07 mmol L-Lysin/mmol Glukose bzw. 0,08 mmol L-Lysin/mmol Glukose).

Die spezifischen Produktivitäten der untersuchten Stämme lagen dagegen in der gleichen Größenordnung mit 0,04 ± 0,01 mmol L-Lysin/g ZTM*h bei *C. glutamicum* DM1729(pAmy) und 0,05 ± 0,00 mmol L-Lysin/g ZTM*h bei *C. glutamicum* DM1729(pAmy)(pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA) (Tabelle 15).

Messungen der Pullulanaseaktivitäten in den Zelllysaten bzw. der Membranfraktion der Stämme *C. glutamicum* DM1729(pAmy) und *C. glutamicum* DM1729(pAmy)(pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA) ergaben, dass sowohl in den Zelllysat als auch in den Membranfraktionen der untersuchten Stämmen Enzymaktivität vorhanden war. Diese lag im Zelllysat bei etwa 38 mU/mg und in der Membranfraktion bei 80 mU/mg (Tabelle 16). Da dieselbe Enzymaktivität bei beiden Stämmen auftritt, ist davon auszugehen, dass diese Aktivität durch die α-Amylase bedingt ist und die Pullulanase keine oder nur geringe Aktivität aufweist.

Die Ergebnisse der Wachstums- und Produktionsexperimente zeigen, dass der Stamm *C. glutamicum* DM1729(pAmy)(pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA) in der maximal erreichten Konzentration von L-Lysin und im Produktertrag einen Vorteil gegenüber dem Referenzstamm *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit aufgekochter löslicher Kartoffelstärke hatte. Allerdings führte die Pullulanase in Verbindung mit der α-Amylase nicht zum vollständigen Abbau der Kohlenstoffverbindungen im Überstand und konnte in Enzymaktivitätsuntersuchungen nicht eindeutig nachgewiesen werden. Dies könnte eventuell an einer Expressionsdominanz des Plasmids pAmy gegenüber pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA liegen.

***C. glutamicum DM1729*(pEKEx2-SC-pulA)**

Das Plasmid pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA ermöglichte das Ausschleusen der Pullulanase im nichtgefalteten Zustand über das Sec-System. Da die gleichzeitige Sekretion von α-Amylase und Pullulanase über das Sec-System zu Engpässen führen kann, wurde ein Plasmid konstruiert welches das Ausschleusen der Pullulanase im gefalteten Zustand über das sogenannte Tat-System von *C. glutamicum* ermöglicht. Für die Konstruktion dieses Plasmids wurde als Ausgangsplasmid pEKEx2 gewählt. Watanabe et al. (2009) zeigten, dass die Signalsequenz des Gens CgR0949 aus *C. glutamicum* R eine sehr hohe Sekretionseffizienz für das grün fluoreszierende Protein (GFP) über das Tat-System aufweist. Die Suche nach dieser Signalsequenz im Genom von *C. glutamicum* WT zeigte eine zu 95 % homologe Sequenz im 5'-Bereich des nicht näher beschriebenen Gens Cg0955. Der Genabschnitt wies dabei die für die zwei charakteristischen Argininreste des Tat-Sekretionssystem codierenden sechs Basenpaare auf. Die im Genom von *C. glutamicum* WT gefundene Signalsequenz sollte in Kombination mit dem Gen der Pullulanase in das Plasmid pEKEx2 eingebracht werden, um die Sekretion der gebildeten Pullulanase über das Tat-System ins Medium zu ermöglichen. Für die Konstruktion des gewünschten Plasmids pEKEx2-SC-pulA wurde zunächst der Genabschnitt des Gens Cg0955, der für die vermeintliche Signalsequenz codiert, mittels PCR amplifiziert. Dafür wurden die Primer sigCg0955hinPstI und

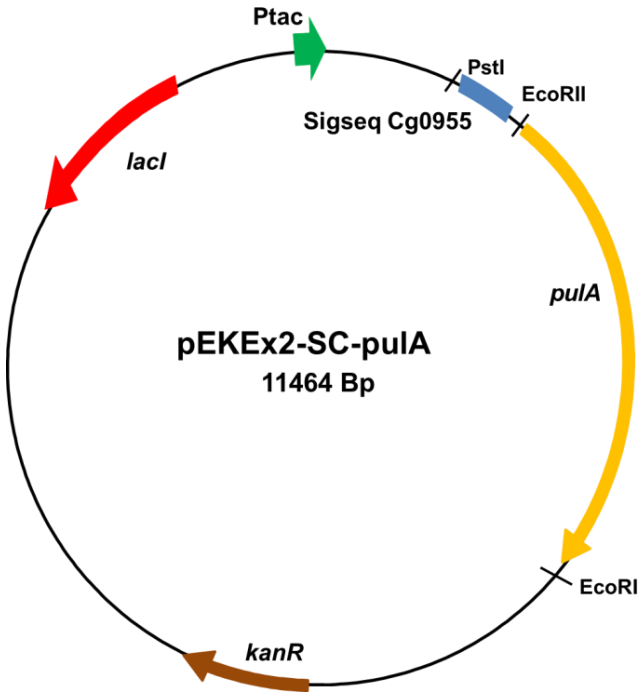

Abbildung 33: Plasmidkarte pEKEx2-SC-pulA. Ptac: Promoter; Sigseq Cg0955 (99 Bp): codiert für Signalpeptid; *pulA* (3228): codiert für Pullulanase aus *K. pneumoniae*; *kanR* (861 Bp): codiert für eine Kanamycinzesistenz; *lacI* (974 Bp): codiert für den Repressor LacI.

sigCg0955revEcoRI eingesetzt. Der Primer sigCg0955hinPstI enthält zudem die Ribosomenbindestelle der GapA. Das Amplifikat sowie das Expressionsplasmid wurden anschließend mit den Restriktionsenzymen *Pst*I und *EcoR*I geschnitten und miteinander ligiert. Das entstandene Plasmid pEKEx2-SC wurde durch einen spezifischen Restriktionsverdau mit dem Enzym *Xba*I überprüft. Dabei ergab sich die erwartete Bande von ca. 8200 Bp. Für die Amplifikation des *pulA*-Gens durch PCR wurden Primer konstruiert, die spezifisch an die 5‘- bzw. 3‘-Enden des Strukturgens *pulA* im Plasmid pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA binden. Als Primer wurden die Oliginukleotide pulApEKEx2sigseqforEcoRI und pulApEKEx2sigseqrevEcoRI in der PCR verwendet. Das erhaltene DNA-Fragment wurde anschließend mit dem Restriktionsenzym *Eco*RI verdaut und in das ebenfalls mit *Eco*RI geschnittene Plasmid pEKEx2-SC ligiert. Der Ligationsansatz wurde in elektrokompetente *E. coli* DH5α-Zellen eingebracht und die Transformanten auf Selektionsplatten mit Kanamycin ausplattiert. Aus den erhaltenen Kolonien wurden die Plasmide isoliert und diese mit einem spezifischen Restriktionsverdau mit dem Enzym *EcoR*V überprüft. Dabei wurden Banden mit den Größen von etwa 8100 und 3400 Bp erhalten, was auf einen korrekten Einbau des Gens der Pullulanase in das Plasmid pEKEx2-SC schließen ließ. Das erhaltene Plasmid pEKEx2-SC-pulA (Abbildung 33) wurde in *C. glutamicum* DM1729 transformiert und

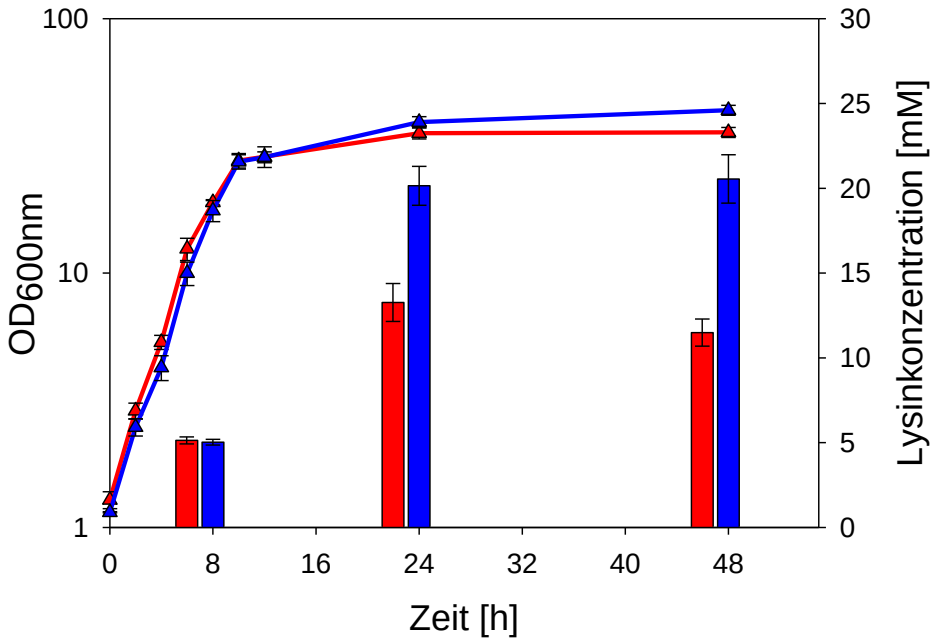

Abbildung 34: Wachstum (Δ: OD_{600nm}) und L-Lysinproduktion (Balken) von *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-SC) bzw. *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-SC-pulA) in CgC-Minimalmedium mit 3 % aufgekochter löslicher Kartoffelstärke und 6 U α-Amylase. (rot) *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-SC), (blau) *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-SC-pulA). Die Abbildung zeigt den Durschnitt aus je drei unabhängigen Einzelversuchen.

das erfolgreiche Einbringen durch die Isolierung und einen spezifischen Restriktionsverdaus des Plasmids bestätigt. Eine Sequenzierung des Gens *pulA* ergab, dass das Gen der Pullulanase mutationsfrei im Genom vorlag. Der neu konstruierte Stamm *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-SC-pulA) wurde dann in Wachstums- und Produktionsversuchen charakterisiert. Als Kontrolle wurde der Leerplasmid-tragende Stamm *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-SC) eingesetzt. Das Wachstum erfolgte in CgC-Minimalmedium mit 3 % aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke und 6 U α-Amylase um die α-1,4-glykosidische Bindungen der eingesetzten Stärke zu spalten. In CgC-Minimalmedium mit löslicher Kartoffelstärke erreichte sowohl der Leerplasmid-tragende Stamm *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-SC) als auch der Stamm *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-SC-pulA) in der exponentiellen Wachstumsphase eine Wachstumsrate von $\mu = 0{,}34\ h^{-1}$. Beide Stämme erreichten nach 48 h ihre maximale OD_{600nm}. Dabei erreichte *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-SC-pulA) mit 45 eine um 10 OD_{600nm}-Einheiten höhere OD_{600nm} als der Leerplasmid-tragende Stamm (OD_{600nm} von 35) (Abbildung 34). Bei den gemessenen L-Lysinkonzentrationen erreichte der Stamm *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-SC-pulA)

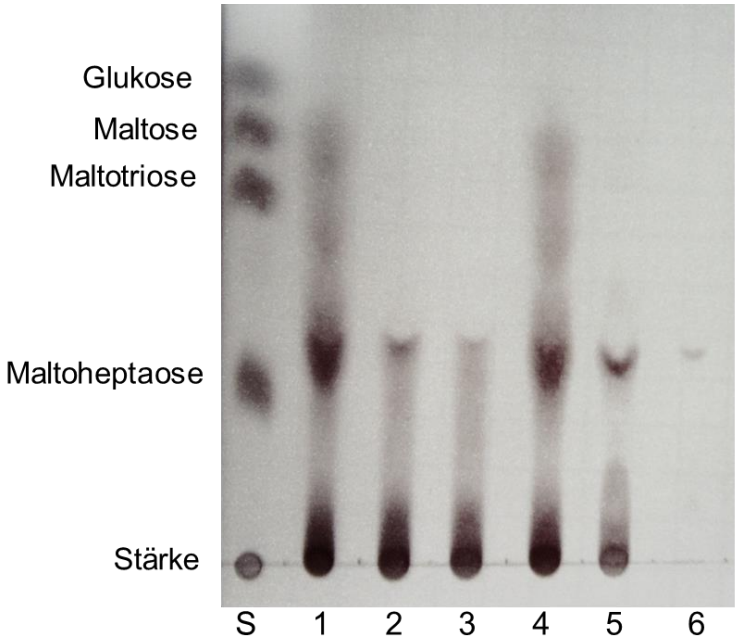

Abbildung 35: Dünnschichtchromatographische Analyse von Kulturüberständen von *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-SC) und *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-SC-pulA)in CgC-Minimalmedium mit 3 % aufgekochter, löslicher Stärke und 6 U α-Amylase. S: Standard aus Glukose, Maltose, Maltotriose, Maltoheptaose und Stärke zu je 5 µg/ml. 1, 2, 3: Überstande von *C. glutamicum* WT(pEKEx2-SC) in CgC-Minimalmedium mit 3 % aufgekochter löslicher Kartoffelstärke zu den Zeitpunkten 8 h, 24 h, 48 h; 4, 5, 6: Überstande von *C. glutamicum* WT(pEKEx2-SC-pulA) in CgC-Minimalmedium mit 3 % aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke zu den Zeitpunkten 8 h, 24 h, 48 h.

sowohl nach 24 h, als auch nach 48 h mit etwa 20 mM L-Lysin eine etwa doppelt so hohe L-Lysinkonzentration wie der Referenzstamm mit 13 mM (24 h) bzw. 11 mM (48 h) L-Lysin (Abbildung 34).

Die dünnschichtchromatographische Analyse der verbliebenen Kohlenstoffverbindungen im Überstand der Stämme *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-SC) und *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-SC-pulA) zeigte, dass der Überstand des Leerplasmid-tragenden Stammes zum Zeitpunkt t = 48 h noch deutliche Kohlenstoffverbindungen auf Höhe von Stärke und von Maltoheptaose aufwies (Abbildung 35). Im Gegensatz dazu war im Überstand des Stammes *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-SC-pulA) zum Zeitpunkten 48 h nur noch eine leichte Fraktionen auf Höhe von Maltoheptaose zu sehen. Die quantitative Analyse ergab, dass im Überstand von *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-SC) nach 48 h Verbindungen mit insgesamt 40,1 ± 2,94 mM Glukoseeinheiten verblieben. Im Gegensatz dazu wies der Überstand des *pulA*-Gen tragenden Stammes nach 48 h mit insgesamt 6,67 ± 4,93 mM Glukoseeinheiten eine etwa fünffach geringere Menge an nicht verwerteten Kohlenstoffverbindungen im Überstand auf.

Tabelle 17 zeigt die berechneten L-Lysinerträge der Stämme bezogen auf die gesamt eingesetzte Kohlenstoffmenge bzw. auf die tatsächlich verbrauchte Kohlenstoffmenge. Der Referenzstamm *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-SC) erreichte, bezogen auf die gesamt eingesetzte Kohlenstoffmenge mit 0,08 mmol L-Lysin/mmol Glukose einen deutlich geringeren L-Lysinertrag als der Stamm mit dem Pullulanase-Gen auf dem Expressionsplasmid (0,12 mmol L-Lysin/mmol Glukose). Bezogen auf die tatsächlich verbrauchte Kohlenstoffmenge erhöhte sich der L-Lysinertrag des Referenzstammes zwar auf 0,11 mmol L-Lysin/mmol Glukose, dennoch lag dieser Ertrag ebenfalls unter dem L-Lysinertrag, den der Stamm *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-SC-pulA) erreichte (13 mmol L-Lysin/mmol Glukose). Die spezifische Produktivität der Stämme ist ebenfalls in Tabelle 17 aufgeführt. In CgC-Minimalmedium mit aufgekochter löslicher Kartoffelstärke und 6 U α-Amylase erreichte der Stamm *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-SC-pulA) eine spezifische L-Lysinproduktivität von 0,11 mmol L-Lysin/g ZTM*h. Der Referenzsstamm zeigte im gleichen Medium eine um etwa 30 % geringere spezifische L-Lysinproduktivität mit 0,08 mmol L-Lysin/g ZTM*h.

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen deutlich, dass der Stamm *C. glutamicum* DM1729(pEKEx-SC-pulA) einen Vorteil beim Wachstum sowie bei der L-Lysinproduktion gegenüber dem Referenzstamm aufweist. Dies lässt vermuten, dass das Gen der Pullulanase exprimiert wird und das sezernierte Enzym im Überstand aktiv ist.

Tabelle 17: L-Lysinerträge und spezifische L-Lysinproduktivitäten von *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-SC) bzw. von *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-SC-pulA) in CgC-Minimalmedium mit 3 % aufgekochter löslicher Kartoffelstärke und 6 U α-Amylase.

	Erträge $Y_{P/S}$[a]		Produktivitäten[d]
Stämme	**[mmol/mmol][b]**	**[mmol/mmol][c]**	**[mmol/g ZTM*h]**
C. glutamicum DM1729(pEKEx2-SC)	0,08 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,08 ± 0,01
C. glutamicum DM1729(pEKEx2-SC-pulA)	0,12 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,11 ± 0,01

[a] [mmol L-lysin/mmol Glukoseeinheiten] zum Zeitpunkt der maximalen L-Lysinkonzentration, [b] bezogen auf die insgesamt eingesetzten Glukoseeinheiten, [c] bezogen auf die tatsächlich verbrauchten Glukoseeinheiten, [d] [mmol L-Lysin/g ZTM*h], ZTM berechnet mit Faktor 0,3 g Trockengewicht pro Liter und OD_{600nm}-Einheit (Blombach et al., 2007), als OD_{600nm}-Einheit wurde die OD_{600nm} zum Zeitpunkt t = 24 h verwendet, siehe Abbildung 34, der Produktionszeitraum erstreckte sich zwischen 8 h und 24 h

Die spezifische Enzymaktivität der gebildeten Pullulanase wurde ebenfalls gemessen. In Tabelle 18 sind die spezifischen Aktivitäten in den Zelllysaten sowie in den Membranfraktionen der Stämme *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-SC) und *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-SC-pulA) aufgeführt. *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-SC-pulA) zeigte sowohl im Zelllysat als auch in der Membranfraktion Aktivität (137,73 mU/mg bzw. 191,63 mU/mg). Im Überstand konnte bei diesem Stamm auch nach einer Konzentrierung des Überstands um das 100-fache keine Aktivität gemessen werden. Der Referenzstamm zeigte weder im Zelllysat noch in der Membranfraktion und im Überstand eine detektierbare Pullulanase-Aktivität. Wie beim Stamm *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA) konnte jedoch auch hier die gebildete Pullulanase nicht durch eine Coomassie- bzw. Silberfärbung des aufgetrennten Überstandes auf einer SDS-PAGE nachgewiesen werden, was ebenfalls auf eine Verankerung der Pullulanase in der Zellmembran hinweist.

Die erzielten Ergebnisse aus den Wachstums- und Produktionsexperimenten lassen darauf schließen, dass das Gen der Pullulanase im Stamm *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-SC-pulA) abgelesen wird und das gebildete Enzym funktionell ist. Die Pullulanase spaltet zusammen mit der α-Amylase effektiv die aufgekochte, lösliche Kartoffelstärke im Überstand. Die dabei entstandenen Abbauprodukte sind effizienter nutzbar für *C. glutamicum* DM1729 als die Abbauprodukte, die durch den alleinigen Abbau der Stärke durch die α-Amylase entstehen. Dies spiegelt sich sowohl in der höhere Wachstumsrate sowie in einem höheren

Tabelle 18: Spezifische Enzymaktivität der Pullulanase von *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-SC) und *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-SC-pulA) im Zelllysat bzw. in der Membranfraktion.

	Spezifische Aktivität von PulA	
Stämme	**[mU/mg][a]**	**[mU/mg][b]**
C. glutamicum DM1729(pEKEx2-SC)	n. b.[c]	n. b.[c]
C. glutamicum DM1729(pEKEx2-SC-pulA)	137,73 ± 27,51	191,63 ± 31,00

[a] spezifische Aktivität von PulA im Zelllysat, [b] spezifische Aktivität von PulA in der Membranfraktion, [c] n. b.: nicht bestimmbar, d.h. unter der Nachweisgrenze

L-Lysinetrag und einer höheren L-Lysinproduktivität des Stammes *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-SC-pulA) im Gegensatz zum Stamm *C. glutamicum* DM1729(pEKE2-SC) wieder.

3.3 Einfluss stärkeabbauender Enzyme auf die Glykogenbildung während der exponentiellen Wachstumsphase

Um zu untersuchen, ob die α-Amylase bzw. die Pullulanase Einfluss auf den Glykogenspiegel in den rekombinanten *C. glutamicum*-Stämmen haben, wurden die gebildeten Glykogenmengen während des exponentiellen Wachstums der Stämme *C. glutamicum* DM1729(pAmy), *C. glutamicum* DM1729(pEKEX2-Hyl-Prepro-pulA) und *C. glutamicum* DM1729(pAmy)(pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA) bestimmt. Als Medium wurde CgC-Minimalmedium mit 0,5 % Glukose und 0,5 % Maltose eingesetzt, da *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA) in CgC-Minimalmedium mit reiner Glukose ein stark verzögertes Wachstum zeigte (μ = 0,13 h^{-1}). Als Vergleichsstämme dienten *C. glutamicum* DM1729(pCE-XT99A), *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-Hyl-Prepro) bzw. *C. glutamicum* DM1729(pAmy). Der Stamm *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA) zeigte in CgC-Minimalmedium mit 0,5 % Glukose und 0,5 % Maltose dennoch ein leicht verzögertes Wachstum (μ = 0,26 h^{-1}) und erreichte die stationäre Phase erst nach 10 h (Abbildung 36). Die anderen Stämme erreichten die stationäre Phase bereits nach 8 h mit Wachstumsraten von μ = 0,3 h^{-1}. Der Vergleich der gebildeten Glykogenkonzentration in der exponentiellen Wachstumsphase zeigte keine deutlichen Unterschiede zwischen den Stämmen, welche die Gene für die stärkeabbauenden Enzyme auf Plasmiden enthielten und den entsprechenden

Referenzstämmen. Alle Stämme zeigten nach 4 h Wachstum einen Glykogenspiegel von etwa 30 mg Glykogen/g ZTM. Nach 8 h sank die intrazelluläre Glykogenkonzentration bei allen Stämmen auf einen Wert von etwa 20 mg Glykogen/ g ZTM ab. Am Versuchsende nach 24 h zeigten die Stämme eine Glykogenkonzentration von ca. 3 mg Glykogen/ g ZTM.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die gebildeten Enzyme keinen Einfluss auf die gebildete Glykogenkonzentration im Zelllysat der Stämme während der exponentiellen Phase haben.

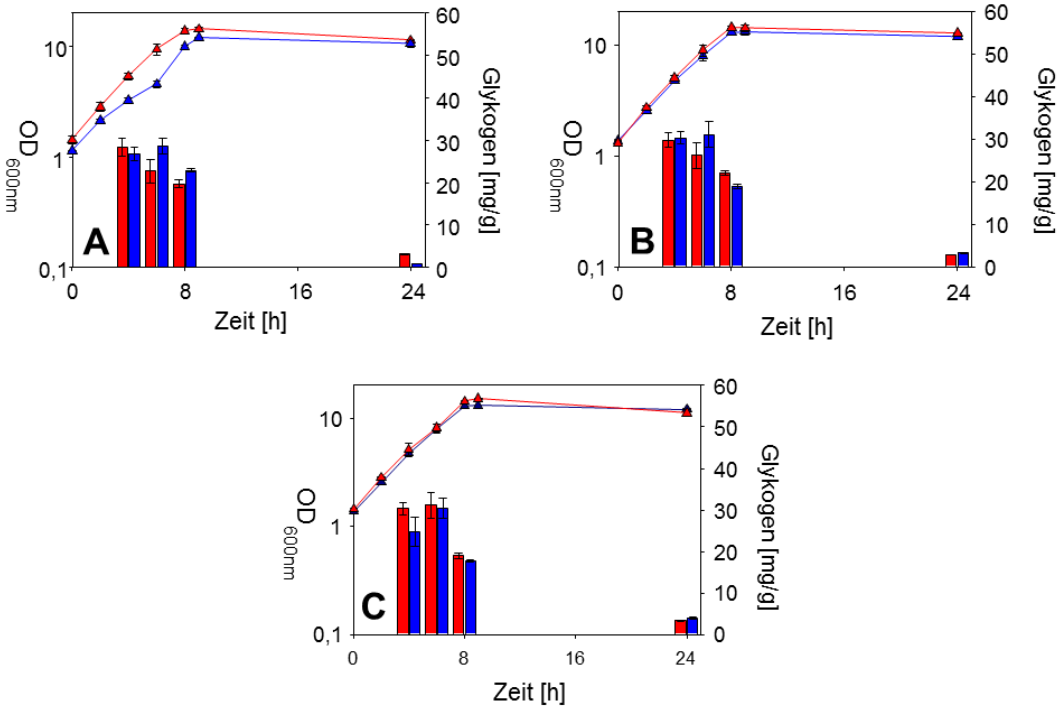

Abbildung 36: OD_{600nm} (Δ) und Glykogenmenge (□) verschiedener *C. glutamicum* DM1729-Stämme. (A) (rot) *C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-Hyl-Prepro), (blau) *C. glutamicum* DM1729(pEKEx-Hyl-Prepro-pulA); (B) (rot) *C. glutamicum* DM1729(pCE-XT99A), (blau) *C. glutamicum* DM1729(pAmy); (C) (rot) *C. glutamicum* DM1729(pAmy), (blau) *C. glutamicum* DM1729(pAmy)(pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA). Die Abbildungen zeigen den Durchschnitt aus drei unabhängigen Einzelversuchen.

4. Diskussion

4.1 Produktion der organischen Säuren Pyruvat und Succinat und der Aminosäure L-Lysin mit rekombinanten *C. glutamicum*-Stämmen aus Stärke

Auf Grund der sich verknappenden fossilen Ressourcen spielen nachwachsende Rohstoffe als Ausgangssubstrate in der industriellen Nutzung eine immer größer werdende Rolle. Die mengenmäßig am verbreitetsten nachwachsenden Rohstoffe unserer Erde sind die Kohlenhydrate Cellulose und Stärke. Beide Polysaccharide setzen sich aus glykosidisch verknüpften Glukosemolekülen zusammen (McMurray & Begley, 2006). Cellulose besteht dabei aus Hunderten von ß-1,4-glykosidisch verknüpften Glukoseeinheiten. Im Gegensatz dazu setzt sich Stärke aus den beiden Polymeren Amylose und Amylopektin zusammen, die aus α-1,4- bzw. α-1,4- und α-1,6-glykosidisch verknüpfter Glukose bestehen. Zur extrazellulären Nutzung dieser Polysaccharide durch Bakterien und Pilze müssen zunächst cellulolytische bzw. amylolytisch und Amylopektin abbauende Enzyme exportiert und die resultierenden Abbauprodukte anschließend zur weiteren Verstoffwechslung in die Zellen aufgenommen werden. Beim Abbau von Cellulose durch Endoglukanasen (EC 3.2.1.4) und Exoglukanasen (EC 3.2.1.91) entstehen Cellodextrine und Cellobiose, die durch β-Glukosidasen (EC 3.2.1.21) weiter zu β-Glukose abgebaut werden. Bakterien bzw. Pilze, die Cellulose als Kohlenstoff- und Energiequellen nutzen können, sind unter anderem *Fusarium solani* (Wood, 1971), *Trichoderma viride* (Berghem & Pettersson, 1974), *Bacillus polymyxa*, *B. circulans* (Baird et al., 1990), *Clostridium cellulovorans* (Sleat et al., 1984) und *C. thermocellum* (Weimer & Zeikus, 1977). Bei Stärke können die α-1,4-glykosidischen Verbindungen zwischen den Glukosemolekülen durch α-Amylasen (EC 3.2.1.1), β-Amylasen (EC 3.2.1.2) und maltogene Amylasen (EC 3.2.1.133) gespalten werden, wodurch teilweise verzweigte Maltodextrine, Maltose- und Glukosemoleküle freigesetzt werden. Die verbliebenen α-1,6-glykosidischen Verbindungen der Maltodextrine können durch Isoamylasen (EC 3.2.1.68), Oligo-1,6-glukosidasen (EC 3.2.1.10) und Pullulanasen des Typs I (EC 3.2.1.41) gespalten werden. Daneben gibt es mit Amyloglukosidasen (EC 3.2.1.3), α-Glukosidasen (EC 3.2.1.20) und Amylopullulanasen (EC 3.2.1.135) auch Enzyme, die sowohl die α-1,4- als auch die α-1,6-glykosidischen Verbindungen spalten können. Bakterien und Pilze, die in der Lage sind Stärke extrazellulär abzubauen sind unter anderem *A. niger* (Pazur & Ando, 1959), *S. griseus* (Shirato & Nagatsu, 1965), *B. breve* (O'Connell Motherway et al., 2008) und *K. pneumoniae* (Pugsley et al., 1986). Der Wildtyp von *C. glutamicum* hingegen kann weder Stärke noch Cellulose als Kohlenstoff- und

Energiequelle nutzen (Seibold et al., 2006; Hyeon et al., 2011). Die Aufbereitung dieser Polymere zu Substraten, die von *C. glutamicum* genutzt werden können, ist jedoch sehr zeit- und kostenintensiv. Um dennoch mit *C. glutamicum* verschiedenste chemische Grundbaustoffe direkt aus diesen erneuerbaren Rohstoffen zu produzieren, wurden entsprechende Stämme entwickelt. Um Cellulose als Ausgangssubstrat zu nutzen, wurde ein *C. glutamicum*-Stamm entwickelt, der ein funktionelles Minicellulosom exprimiert (Hyeon et al., 2011). Dieses besteht aus dem katalytischen Teil der Endoglucanase E aus *C. thermocellum*, der „dockerin"-Domäne der Endonuklease B sowie dem Proteinkomplex miniCbpA, die beide aus *C. cellulovorans* stammen. Um den Export des Komplexes zu gewährleisten, wurde das Signalpeptid des Proteins Cg0955 aus *C. glutamicum* gewählt. Der rekombinante Stamm *C. glutamicum* (pMTIs-ME) war dadurch in der Lage Cellulose effektiv im Medium abzubauen. Allerdings wurde kein Wachstum in Medium mit Cellulose als Kohlenstoffquelle gezeigt. Im Gegensatz dazu konnte Seibold et al. bereits 2006 einen *C. glutamicum*-Stamm entwickeln, der effektiv aufgekochte lösliche Kartoffelstärke als Kohlenstoffquelle für das Wachstum und die L-Lysinproduktion nutzen konnte. Dies wurde durch Einbringen des Plasmids pAmy in den Stamm *C. glutamicum* DM1730 erreicht. Dieses Plasmid enthält das Gen *amyA* aus *S. griseus* unter der Kontrolle des IPTG induzierbaren Promotors *trc*. Durch das Einbringen desselben Plasmids in den Stamm *C. glutamicum* ELB-P konnte in dieser Arbeit ein Stamm entwickelt werden, der effektiv aufgekochte, lösliche Kartoffelstärke zur Pyruvat- bzw. Succinatproduktion verwenden konnte. Der eingesetzte Stamm *C. glutamicum* ELB-P bildet aus Glukose unter aeroben Bedingungen Pyruvat und unter Sauerstoffmangelbedingungen Succinat (Wieschalka et al., 2012a,b). Beide Produkte werden als Zusätze in der Pharma- bzw. der Futtermittelindustrie eingesetzt (Li et al., 2001; Zhu et al., 2008; McKinlay et al., 2007). Pyruvat findet darüber hinaus Anwendung in Diätprodukten, Nahrungsergänzungsmittel für Sportler, Anti-Ageing- und Anti-Akne-Produkten und wird zusätzlich als Antioxidant eingesetzt (Stanko et al. 1992a; Stanko et al., 1992b; Roufs, 1996; Stanko et al., 1990; Cotellessa et al., 2004; Ghersetich et al., 2004; DeBoer et al., 1993). Zudem wird ihm ein positiver Effekt bei der Reduktion der Transplantatabstoßung nach Operationen zugesprochen (Cicalese et al., 1997; Cicalese et al., 1999). Succinat dient noch als Vorstufe von heute meist petrochemisch hergestellter Produkte, wodurch der Bedarf an dieser Vorstufe in den nächsten Jahren noch steigen wird (zusammengefasst in Wieschalka et al., 2012b). Generiert wurde der Stamm *C. glutamicum* ELB-P durch eine schrittweise Deletion der Gene für die Pyruvat-Chinon-Oxidoreduktase (Δ*pqo*), einer Einheit des Pyruvatdehydrogenasekomplexes (Δ*aceE*), der Lactatdehydrogenase (Δ*ldhA*) und der Transferasen zur Alanin-Synthese (Δ*alaT*, Δ*avtA*) aus *C. glutamicum* ATCC13032 (Abbildung 37). Durch die Deletion der Gene *ldhA* und *alaT* bzw.

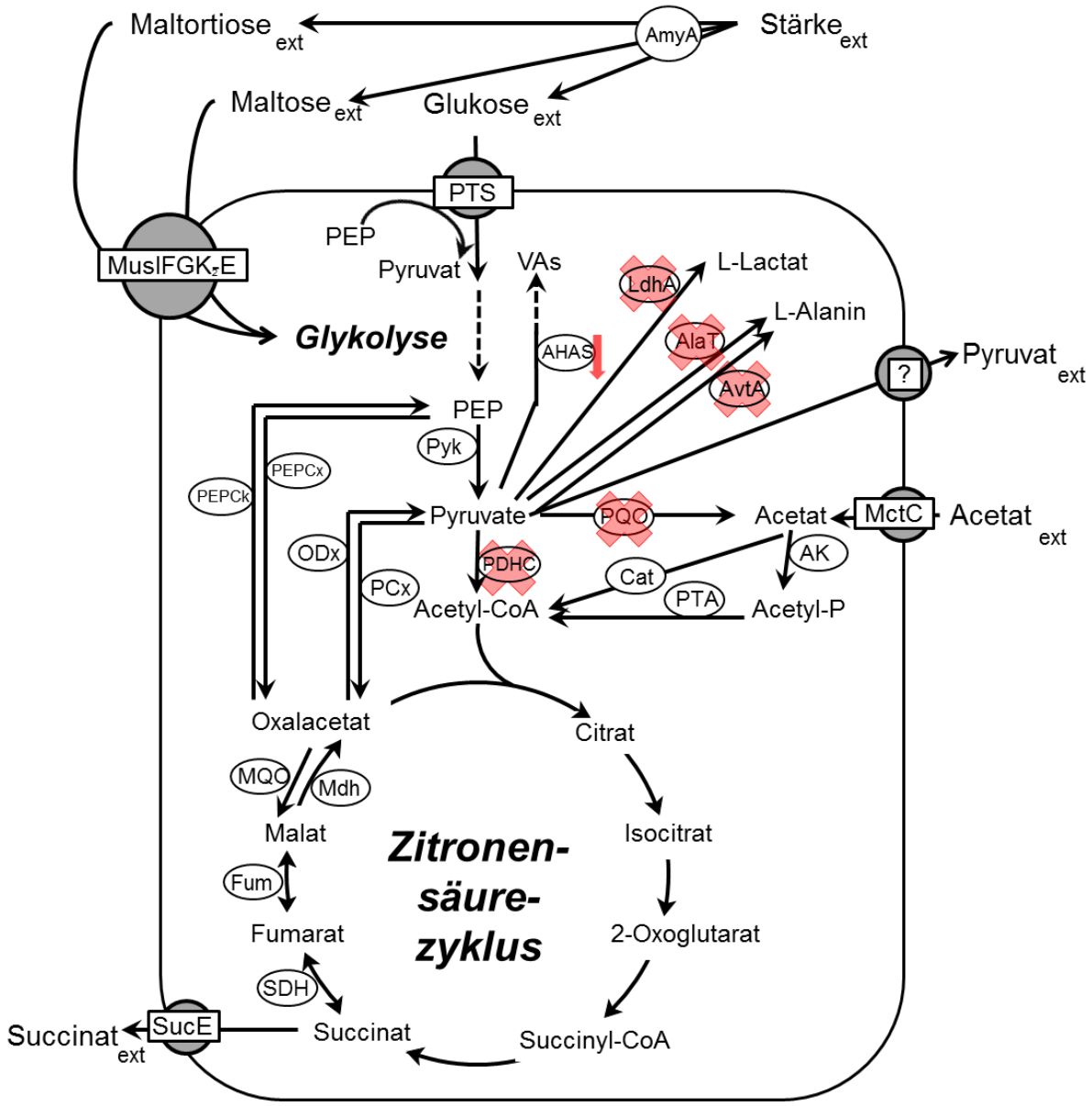

Abbildung 37: Schematische Darstellung des zentralen Kohlenstoffmetabolismus von *C. glutamicum* ELB-P bei der Produktion von Pyruvat bzw. Succinat mit den daran beteiligten, wichtigsten Enzymen. Die Gene der deletierten Gene sind rot markiert, die Abschwächung der AHAS ist durch einen Pfeil markiert. AHAS, Aceto-Hydroxyacid-Synthase; AK, Acetatkinase; AlaT, Alanin-Aminotransferase; AvtA, Valin-Pyruvat-Aminotransferase; Cat, CoA-Transferase; CoA, Coenzym A; Fum, Fumarase; LdhA, NAD+-abhängige L-Lactat-Dehydrogenase; MctC, Monocarbonsäure-Transporter; Mdh, Malat-Dehydrogenase; MQO, Malat:Quinon-Oxidoreduktase; MusIFGK$_2$-E, Maltose/Maltodextrin Aufnahme-System; ODx, Oxalacetat-Decarboxylase; PCx, Pyruvat-Carboxylase; PDHC, Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex; PEP, Phosphoenolpyruvat; PEPCk, PEP-Carboxykinase; PEPCx, PEP-Carboxylase; PQO, Pyruvat:Quinon-Oxidoreduktase; PTA, Phosphotransacetylase; PTS, Phosphotransferase-System; Pyk, Pyruvat-Kinase; SDH, Succinat-Dehydrogenase; SucE, Succinat-Exporter; VAs, verzweigte Aminosäuren.

avtA konnten die Nebenprodukte L-Lactat sowie L-Alanin stark reduziert werden. Zusätzlich wurde die Acetohydroxysäuresynthase IlvN durch eine Punktmutation des entsprechenden Gens abgeschwächt (ΔC-T *ilvN*). Diese Punktmutation hatte eine stark verminderte L-Valinproduktion zur Folge. Die Deletionen sowie die Abschwächung der Acetohydroxysäuresynthase führten unter aeroben Bedingungen zu einer Akkumulation von Pyruvat (Wieschalka et al., 2012a). Zur Aufrechterhaltung des Bausstoffwechsels wurde dem Stamm Acetat zugeführt, welches über den Monocarbonsäure Transporter MctC aufgenommen wird (Jolkver et al., 2008). Auf Grund der Deletion der Gene *alaT* und *avtA* in *C. glutamicum* ELB-P musste zusätzlich die essentielle Aminosäure L-Alanin supplementiert werden. Berechnet auf die insgesamt eingesetzte Menge an Kohlenstoffmolekülen aus Glukose und Acetat erreichte der Stamm *C. glutamicum* ELB-P einen Ertrag von ca. 0,5 mol C in Pyruvat pro mol C aus Glukose und Acetat (vgl. Wieschalka et al., 2012a). Bezogen auf die tatsächlich verbrauchte Kohlenstoffmenge konnte derselbe Ertrag mit dem Stamm *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke erzielt werden (Tabelle 4). Damit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Produktion von Pyruvat mit *C. glutamicum* mit aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke als Substrat möglich ist und die gleiche Effizienz aufweist wie mit Glukose als Substrat. In Fermentationsversuchen konnte unter den gewählten Bedingungen die Effizienz nicht verbessert werden. Bezogen auf die insgesamt eingesetzte Kohlenstoffmenge erzielte der Stamm einen 10 % geringeren Ertrag, da nicht verbrauchte Stärkeabbauprodukte im Medium zurück blieben. Die Unterscheidung in Erträge bezogen auf die tatsächlich eingesetzte und auf die tatsächlich verbrauchte Kohlenstoffmenge wurde durchgeführt, um zu zeigen, dass die eingesetzten Stämme mit Stärke als Substrat durch die nicht verwerteten Kohlenhydrate niedrigere Erträge erreichen, als sie eigentlich in der Lage wären. Die Erträge bezogen auf die tatsächlich verbrauchte Kohlenstoffmenge geben somit die maximal erreichbaren Erträge des Stammes an, während die Erträge bezogen auf die gesamt eingesetzte Kohlenstoffmenge die Erträge unter den tatsächlich gewählten Bedingungen zeigen. In der industriellen Produktion kommt dabei dem Ertrag bezogen auf die gesamt eingesetzte Kohlenstoffmenge eine größere Rolle zu, da dabei das nicht verbrauchte Substrat berücksichtigt wird, das nicht in das gewinnbringende Endprodukt umgesetzt wird. Mit Glukose und Acetat in CgC-Minimalmedium erreichte der Stamm *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) überraschenderweise einen geringeren Pyruvatertrag. Eine Erklärung gibt es dafür bislang nicht. Dass dem Stamm mit Glukose im Medium weniger Kohlenstoffmoleküle zur Verfügung standen als mit Stärke konnte ausgeschlossen werden. Allerdings konnte in einem anderen Zusammenhang bereits gezeigt werden, dass Maltose in Gegenwart von Glukose im Medium zu einer verstärkten Glukoseaufnahme führt, da das Gen *ptsG* der Glukose-spezifischen EII-Permease des Phosphotransferasesystems stärker exprimiert wird

(Krause et al., 2009). Dies zeigte sich in einer höheren Wachstumsrate, was auch bei *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit Stärke der Fall war. Dies ist darauf zurückzuführen, dass durch die α-Amylase aus der aufgekochten, löslichen Kartoffelstärke unter anderem auch Maltose entsteht. Nach der Aufnahme der Maltose über das Maltose/Maltodextrin Aufnahme-System MusIFGK$_2$-E wird diese über die Katalyse der Enzyme MalQ (4-α-Glukanotransferase), MalZ (Maltodextrin-Glukosidase), MalP (Maltodextrin-Phosphorylase), Glk (Glukokinase) und α-Pgm (α-Phospho-Glukomutase) zu Glukose-6-P abgebaut und dann über die Glykolyse bzw. den Pentosephosphatweg zu Pyruvat abgebaut (Henrich, 2011; Seibold et al., 2009; Glykolyse und Pentosephosphatweg zusammengefasst in Yokota & Lindley, 2005). Jedoch kann mit diesen Wissen nicht gänzlich geklärt werden, welcher Zusammenhang zwischen dem Wachstum auf Acetat und der Anwesenheit von Maltose im Medium besteht. Dennoch zeigte sich, dass der Stamm bei Anwesenheit von Stärke eine geringere Menge an Acetat im Medium benötigte um annähernd die gleiche optische Dichte zu erreichen wie der Stamm in Medium mit Glukose und Acetat (Abbildung 3). Auf Grund dieser möglichen Reduktion von Acetat sowie des direkten Einsatzes von Stärke als Substrat ist der Stamm *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) ein vielversprechender Ansatzpunkt zur Reduktion von Substrat- und somit Produktionskosten bei der Herstellung chemischer Grundbausteine mit *C. glutamicum*-Stämmen.

Wieschalka (2012) konnte auch zeigen, dass *C. glutamicum* ELB-P unter Sauerstoffmangel Succinat akkumulierte. Dieses wird aus Glukose über die Glykolyse, die Carboxylierung des Phosphoenolpyruvats (PEP) bzw. des Pyruvat zu Oxalacetat (OAA) durch die PEP-Carboxylase (PEPCx) bzw. durch die Pyruvat-Caboxylase (PCx) und schließlich durch die Umwandlung des OAA durch die Malat-Dehydrogenase (Mdh), die Fumarase (Fum) und die Succinat-Dehydrogenase (SDH) gebildet (Inui et al., 2004; Wieschalka et al., 2012b; Abbildung 37). Der Stamm erreichte in einem Zwei-Stufen-Prozeß (aerobes Wachstum der Vorkultur und anschließender Inokulation der anaeroben Hauptkultur; Okino et al., 2008a) einen Ertrag von 0,78 mmol Succinat/mmol Glukose und eine Produktivität von 0,81 mmol Succinat pro g ZTM*h (Wieschalka, 2012). Im Vergleich dazu konnte in dieser Arbeit, unter gleichen Bedingungen mit dem Stamm *C. glutamium* ELB-P(pAmy) ein um 5 % höherer Ertrag bezogen auf die tatsächlich verbrauchte Kohlenstoffmenge und eine 24 % höhere spezifische Produktivität von Succinat mit aufgekochter löslicher Kartoffelstärke als Substrat erzielt werden. Allerdings erreichte dieser Stamm nur etwa 60 % der maximalen Succinatkonzentration im Medium, die der Stamm *C. glutamicum* ELB-P mit Glukose als Substrat erzielte. Die hohe spezifische Produktivität wurde für die ersten 8 Stunden berechnet Die spezifische Produktivität entspricht der Produktivität, die in diesen Zeiträumen für *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) mit Glukose als Substrat berechnet wurde. Interessanterweise blieb sowohl im Medium mit Stärke als auch mit Glukose etwa die Hälfte

der eingesetzten Kohlenstoffmenge unverbraucht im Medium zurück. Da dies bei *C. glutamicum* ELB-P in CgC-Minimalmedium mit Glukose nicht der Fall war (Wieschalka, 2012) kann davon ausgegangen werden, dass das Plasmid pAmy unter anaeroben Bedingungen einen negativen Effekt auf den Glukoseverbrauch und somit auf die Succinatproduktion hat. Eventuell könnte eine Steigerung der Glukoseaufnahme bzw. des Glukoseverbrauchs zu einer Reduktion der zurückbleibenden Kohlenhydrate und zu einer Steigerung der gebildeten Succinatkonzentration führen. Durch die Überexpression der Gene für die GapA, der Pyruvat-Kinase (Pyk), der Phospho-Fruktokinase (Pfk) und der Glukose-6-Phosphat-Isomerase (Gpi) konnte in einem anderen *C. glutamicum*-Stamm bereits unter Sauerstoffmangelbedingungen die Glukoseaufnahme gesteigert werden (Yamamoto et al., 2012).

Neben der α-Amylase aus *S. griseus* (Seibold et al., 2006) wurden in späteren Arbeiten auch Gene der α-Amylasen aus *S. bovis* bzw. *B. subtilis* plasmidcodiert in *C. glutamicum* eingebracht. Dies führte ebenfalls zu einem Stärkeabbau im Medium und zur Aminosäureproduktion mit *C. glutamcium* (Tateno et al., 2007a,b; Yao et al., 2009). Tateno et al. (2007a,b) integrierten zum einen das Gen der α-Amylase von *S. bovis* 148 mittels homologer Rekombination in das Genom, zudem entwickelten sie ein System mit dem die α-Amylase mit Hilfe eines Ankerproteins an der Zelloberfläche präsentiert wurde. Als Ankerprotein wurde PgsA aus *B. subtilis* verwendet, dessen Gen an den N-Terminus des α-Amylase-Gens fusioniert wurde. Das Gen des Fusionsproteins wurde durch eine homologe Rekombination in den Genlocus der Homoserin-Dehydrogenase integriert. Yao et al. (2009) entwickelten ebenfalls ein System zur Präsentation der α-Amylase auf der Zelloberfläche. Sie verwendeten dafür die α-Amylase aus *B. subtilis* und das Ankerprotein NCgl1221 aus *C. glutamicum*. Wird der Ertrag des von Tateno et al. (2007a) entwickelten *C. glutamicum*-Stammes mit löslicher Stärke bzw. nicht aufgekochter Maisstärke als Substrat berechnet, ergibt sich ein L-Lysin Ertrag von etwa 0,1 mmol L-Lysin pro mmol Glukose, wenn der Ertrag auf das gesamt eingesetzte Substrat bezogen wird. Wird die nicht verbrauchte Menge an Kohlenhydraten berücksichtigt, so ergibt sich bei Wachstum mit löslicher Kartoffelstärke ein L-Lysinertrag von 0,14 mmol L-Lysin/mmol Glukoseeinheiten bzw. 0,18 mmol L-Lysin/mmol Glukoseeinheiten bei Wachstum mit nicht aufgekochter Maisstärke. Der Stamm *C. glutamicum* DM1729(pAmy), der in dieser Arbeit beschrieben wurde, zeigte mit nicht aufgekochter Maisstärke, bezogen auf die gesamt eingesetzten Glukoseeinheiten ebenfalls einen Ertrag von 0,1 mmol L-Lysin/mmol Glukoseeinheiten. Im Gegensatz dazu konnte mit nicht aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke kaum L-Lysin produziert werden, womit sich ein Ertrag ergab, der nur ein Zehntel des Ertrages von Tateno et al. (2007a) entspricht. Mit aufgekochter löslicher Kartoffelstärke konnte mit *C. glutamicum* DM1729(pAmy) dagegen ein Ertrag in dieser Größenordnung erzielt werden. Unter Berücksichtigung des tatsächlich

verbrauchten Substrates waren die Erträge von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) um 20 % geringer als die berechneten Erträge mit den Werten aus Tateno et al. (2007a). Interessanterweise verblieben bei dem System von Tateno et al. (2007a) noch bis zu 45 % der Ausgangsmenge an Substrat unverbraucht im Medium zurück, während der Stamm *C. glutamicum* DM1729(pAmy) nur etwa 20 % des eingesetzten Substrates nicht verwerten konnte.

Neben löslicher, aufgekochter Kartoffelstärke und nicht aufgekochter Maisstärke konnte in dieser Arbeit auch gezeigt werden, dass ein rekombinanter *C. glutamicum*-Stamm, der das Gen einer α-Amylase exprimiert auch Kartoffel-, Reis- und Weizenstärke als Substrat nutzen kann. Dabei konnte der Stamm *C. glutamicum* DM1729(pAmy) die Stärken sowohl in aufgekochter als auch in nicht aufgekochter Form verwerten. Mit nicht aufgekochter Weizenstärke erreichte der Stamm dabei den höchsten L-Lysinertrag von 0,16 ± 0,01 mmol L-Lysin/mmol Glukoseeinheiten, bezogen auf die gesamt eingesetzte Substratmenge bzw. von 0,20 ± 0,01mmol L-Lysin/mmol Glukoseeinheiten. Die höchste spezifische Produktivität mit 0,13 ± 0,01 mmol L-Lysin/g ZTM*h konnte der Stamm mit aufgekochter Reisstärke und nicht aufgekochter Weizenstärke erzielen. Unter geregelten Bedingungen im Fermenter konnte der Ertrag mit nicht aufgekochter Weizenstärke noch verdoppelt werden (0,25 mmol L-Lysin/mmol Glukoseeinheiten, bezogen auf die gesamt eingesetzte Menge an Substrat). Dies zeigt das große Potential der Weizenstärke in Bezug auf die Produktion von L-Lysin, welches auch die Evonik Industries gemeinsam mit dem russischen Unternehmen RusBiotech International nutzen will. Im Jahr 2014 soll in Volgodonsk in der Region Rostov (Russland) eine biotechnologische Anlage in Betrieb genommen werden, die pro Jahr etwa 300.000 t Weizen mit *C. glutamicum* zu L-Lysin umsetzen wird (Evonik Industries, 2011). Dass *C. glutamicum* DM1729(pAmy) die verschiedenen Stärken unterschiedlich effizient nutzen konnte, liegt höchstwahrscheinlich an der unterschiedlichen Zusammensetzung und den unterschiedlichen Eigenschaften der verwendeten Stärken. Durch die verschiedenen Röntgenbeugungsmuster der Stärkearten unterscheidet man zwischen Stärketyp A (vorwiegend Getreidestärken) und Stärketyp B (Wurzelstärken) (Gallant et al., 1997). Die A-Typ-Stärkekörner weisen eine dichtere Struktur der Amylose und des Amylopektins auf und können dadurch weniger Wassermoleküle einlagern. Im Gegensatz dazu können B-Typ-Stärkekörner Wassermoleküle besser aufnehmen (Imberty et al., 1991). Die Körnerformen der verschiedenen Stärken unterscheiden sich ebenfalls. Weizenstärkekörner sind meist linsenförmig bzw. länglich oval. Die Körner der Maisstärke sind dagegen polyedrisch oder rundlich-kantig, während Reisstärke ebenfalls eine polyedrische Form zeigt, jedoch mit scharfen Kanten. Kartoffelstärkekörner sind sowohl in Rohform, als auch in löslicher Form kugelförmig (Tegge, 2004b). Dies konnte in elektronenmikroskopischen Aufnahmen bestätigt werden (Abbildung 14). Je nach Stärkeart variiert die Zusammensetzung der Stärkekörner

aus 14 bis 27 % Amylose und 73 bis 86 % Amylopektin (Tegge, 2004c). Dies hat Einfluss auf die Quelleigenschaft der verschiedenen Stärken. Dabei weist jede Stärkeart ihren eigenen Temperaturbereich auf, ab denen die Stärkekörner zu quellen bzw. zu verkleistern beginnen und ihre Kristallstruktur verlieren (Tegge, 2004d). In dieser Arbeit wurde durch Aufkochen der Stärken bei 99 °C die Verkleisterungstemperaturen aller Stärken erreicht (Kartoffelstärke: 56 °C; Maisstärke: 75 °C; Reisstärke: 61 °C; Weizenstärke: 80 °C). Dadurch wurde die Angriffsfläche für die sezernierten α-Amylose stark vergrößert, was sich in einem verbesserten Wachstum von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit den aufgekochten Stärken im Vergleich zum Wachstum mit den nicht aufgekochten Stärken zeigte. Eine Ausnahme bildete das gute Wachstum von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit nicht aufgekochter Kartoffelstärke, was der niedrigeren Quelltemperatur der Knollenstärke zuzuschreiben sein könnte. Diese besitzen im Vergleich zu Getreidestärken weniger kompakte Strukturen, sodass die Bindungskräfte durch geringere Temperaturen zerstört werden können (Tegge, 2004d). Zwar wurde die Verkleisterungstemperatur von Kartoffelstärke während des Wachstumsversuchs von *C. glutamicum* DM1729 (pAmy) nicht erreicht (Inkubationstemperatur 28 °C), allerdings könnte die Inkubationstemperatur und –zeit ausgereicht haben, um einen Effekt zu zeigen. Mit Abbildung 16 wurde zum ersten Mal das Aufquellen von Weizenstärkekörnern gezeigt, deren Gestalt sich dabei von scheibenförmig, elliptisch zu rundlich veränderte. Dabei waren deutliche Stärkeketten zu erkennen, die aus dem Weizenstärkekorn herausragten. Das Anlagern von *C. glutamicum*-Zellen an diese Ketten, wie in Abbildung 15 C zu sehen, wurden ebenfalls zuvor noch nicht dokumentiert. Über eine aktive Adhäsion von *C. glutamicum* an Stärke kann nur spekuliert werden, da über Adhäsion bei *C. glutamicum* bisher nichts bekannt ist.

Neben dem Wachstum und der Produktion von L-Lysin mit *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit unterschiedlichen Stärken als Substrat, konnte in dieser Arbeit auch gezeigt werden, dass der Stamm das stärkeähnliche Polysaccharid Glykogen als Kohlenstoff- und Energiequelle für Wachstum und Produktion nutzen kann. Allerdings konnte damit kein höherer Ertrag und keine höhere spezifische Produktivität erreicht werden als mit nicht aufgekochter Weizenstärke als Substrat.

Bei allen bisher eingesetzten Stärken und stärkeähnlichen Polymere als Substrate für α-Amylose-sezernierenden *C. glutamicum*-Stämmen, blieben unverbrauchte Kohlenhydrate im Medium zurück (Seibold et al., 2006; Tateno et al., 2007a,b; Yao et al., 2009; diese Arbeit). Dies kann der Eigenschaft der α-Amylase zugeschrieben werden, nur die α-1,4-glykosidischen Verknüpfungen der Stärke bzw. des Glykogens spalten zu können.

Zusammenfassend konnte in diesem Teil der Arbeit gezeigt werden, dass die Produktion der organischen Säuren Pyruvat und Succinat mit aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke als Substrat mit *C. glutamicum* möglich ist. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass durch das Einbringen des Plasmids pAmy rohe Kartoffel-, Mais-, Reis- und Weizenstärke von *C. glutamicum* als Kohlenstoff- und Energiequelle zur L-Lysinproduktion genutzt werden kann.

4.2 Vollständiger Stärkeabbau durch rekombinante *C. glutamicum*-Stämme

Seibold (2007) konnte zeigen, dass die Vorbehandlung aufgekochter löslicher Kartoffelstärke mit dem gereinigten, α-1,6-glykosidische Verknüpfungen spaltende Enzym GlgX aus *C. glutamicum* in geeignetem Puffer zu einem deutlich weiteren Abbau der Stärke durch die α-Amylase führte. Daraus kann geschlossen werden, dass für den weiteren Abbau der verbliebenen Kohlenhydrate im Medium ein Enzym eingesetzt werden muss, welches in der Lage ist, die α-1,6-glykosidischen Verbindungen zu spalten und so, unter Berücksichtigung der gesamt eingesetzten Substratmenge, zu einer Verbesserung des Wachstums sowie des Ertrags und der Produktivität von L-Lysin führt. Eine effektive Umsetzung von Stärke durch die Kombination der stärkeabbauenden Enzyme α-Amylase, Amylopullulanase bzw. Glukoamylose konnte in biotechnologischen Prozessen bereits mit rekombinanten Hefezellen, dem thermophilen Pilz *Thermomucor indicae-seudaticae* bzw. dem thermophilen Bakterium *Geobacillus thermoleovorans* gezeigt werden (Murai et al., 1999; Satyanarayana et al., 2004). Das in dieser Arbeit gereinigte und getestete Enzyme GlgX zeigte keine Verbesserung beim Wachstum von *C. glutamicum* mit aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke in CgC-Minimalmedium. Die Zugabe von GlgX hatte keinen Einfluß auf das Wachstum und die L-Lysin Produktion unter den getesteten Bedingungen. Durch Analysen der gebildeten Abbauprodukte konnte gezeigt werden, dass GlgX nicht in der Lage war, in CgC-Minimalmedium die α-1,6-glykosidischen Verbindungen der Stärke abzubauen, im Gegensatz zum Ansatz in geeignetem Puffer (Seibold, 2007). Analysen gebildeter Abbauprodukte durch Zelllysate von *C. glutamicum* WT und *C. glutamicum* Δ*glgX* zeigten, dass *C. glutamicum* generell keine Enzyme aufweist, die in CgC-Minimalmedium bei 28 °C aufgekochte lösliche Kartoffelstärke abbauen können.

Mit dem Enzym ApuB aus *B. breve* UCC2003 konnte ein rekombinanter *C. glutamicum*-Stamm generiert werden, der fähig war, das stärkeabbauende, als Amylopullulanase annotierte Enzym zu sezernieren und Stärke im Medium abzubauen. Dieses Enzym spaltet sowohl α-1,4- als auch α-1,6-glykosidische Verknüpfungen (O´Connell Motherway et al.,

2008) und könnte somit als alleiniges, stärkeabbauendes Enzym eingesetzt werden. Die entstandenen Abbauprodukte dienten dem Stamm als Kohlenstoff- und Energiequelle. Allerdings zeigte ApuB im Überstand nur eine sehr geringe Aktivität und konnte die Stärke in einem Zeitraum von 48 h nur zu einem Bruchteil abbauen und verwerten. Somit konnte mit *C. glutamicum* WT (pEKEx2-apuB) nicht die Effizienz im Stärkeabbau erreicht werden, die der Stamm *C. glutamicum* DM1729(pAmy) zeigte.

Neben GlgX und ApuB wurden weitere Enzyme getestet, die die verbliebenen Abbauprodukte des Stammes *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in CgC-Minimalmedium zu niedermolekularen Kohlenhydraten spalten. Dabei zeigte die Pullulanase PulA aus *K. pneumoniae* durch einen beinahe vollständigen Abbau der verbliebenen Abbauprodukte zu Maltose und Maltotriose das beste Ergebnis. Von dieser Pullulanase ist bekannt, dass sie in Oligo- und Polysachariden sowie im Pullulan die α-1,6-glykosidische Bindungen spaltet (Michaelis et al., 1985). Durch die Zugabe der Pullulanase während des Wachstums von *C.glutamicum* DM1729(pAmy) mit aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke konnte der L-Lysinertrag um 60 % gesteigert werden, was dem Ertrag entspricht, den der Stamm mit einer vergleichbaren Menge an Glukose erzielte. Dies wies deutlich auf eine Aktivität der Pullulanase von *K. pneumoniae* in CgC-Minimalmedium hin.

In *K. pneumoniae* erfolgt die Sekretion der Pullulanase über das Typ-II Sekretions-System, welches sich aus zwei sich ergänzenden Transportwegen zusammensetzt. Dieses Transportsystem der Pullulanase ist in *K. oxytoca* am besten untersucht (Pugsley, 1993; Abbildung 38). Dabei besteht die Sec-Translokationsmaschinerie aus einer ATPase (SecA), einigen in der inneren Membran lokalisierten Proteinen (SecD-G, SecY), einem Proteinexportprotein (SecB) und einer Signalpeptidase (LspA). Das Protein wird damit im ungefalteten Zustand durch die innere Membran geschleust. SecA stellt mit zwei ATP-bindenden Domänen die Energie für die Proteintranslokation zur Verfügung (Mitchell & Oliver, 1993; Economou et al., 1995). Zusätzlich besitzt dieses Protein eine Domäne, die für die Interaktion mit SecY verantwortlich ist (Kunioka et al., 1998; Manting et al., 1997). Die Membranpore wird durch die essentiellen Proteine SecY und SecE, sowie durch das nicht essentielle Protein SecG gebildet (Duong & Wickner,1997a). Die Translokase-Untereinheiten SecD und SecE unterstützen den Proteinexport indem sie den Insertionszyklus in die Membran von SecA regulieren, sie sind jedoch nicht essentiell für die Proteintranslokation oder das Überleben der Zelle (Duong & Wickner, 1997b; Matsuyama et al., 1992). Das SecB Protein ist ein Preprotein-spezifisches Chaperon und hat eine SecA-Bindedomäne (Fekkes et al., 1998). Die Signalpeptidase LspA entfernt das Signalpeptid des zu sezernierenden Proteins (Pugsley et al., 1991). PulA wird durch angelagerte Fettsäuren zunächst in der inneren Membran verankert. Die Translokation über die äußere Membran in das Medium

wird dann von dem Pullulanase-spezifischen Pul-Sekreton realisiert (zusammengefasst in Pugsley, 1993). Auch in *C. glutamicum* konnte das Sec-Sekretionssystem wie oben beschrieben gefunden werden (Abbildung 39 A). Allerdings fehlt hier, wie bisher in allen untersuchten Gram-positiven Bakterien, das Preprotein-spezifische Chaperon SecB (Fekkes et al., 1998; Abbildung 39 A). Neben dem Sec-Sekretionsweg, bei dem das Protein im nicht gefalteten Zustand durch die Zellmembran geschleust wird, besitzt *C. glutamicum* auch einen Tat-Sekretionsweg, bei dem die Translokation des Proteins durch die Membran im gefaltenen Zustand erfolgt (Abbildung 39 B). Namensgebend sind dabei zwei benachbarte konservierte Argininreste im Signalpeptid (Twin arginine translocation, Sargent et al., 1998). Für *C. glutamicum* konnte bereits gezeigt werden, dass heterologe Proteine mit einer Tat-Signalsequenz ausgeschleust werden können (Meissner et al., 2007). Der Tat-Sekretionsweg besteht in *C. glutamicum* nur aus den Proteinen TatA und TatC und verfügt damit, da das Protein TatB nicht vorhanden ist über eine sogenannte Tat-Minitranslokase (Meissner, 2005). TatC bildet dabei den Rezeptor für die Tat-Signalpeptide, mehrere Kopien

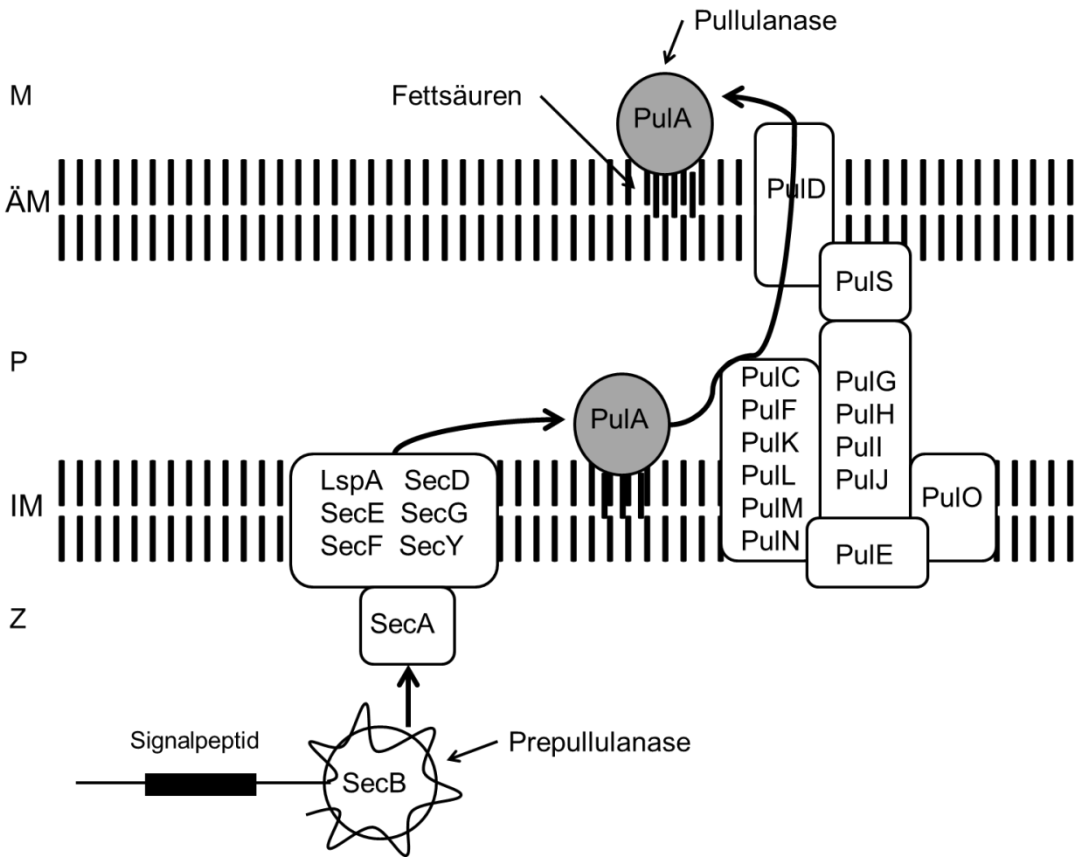

Abbildung 38: Exportmodel für die Pullulanase aus *K. oxytoca*. Abbildung verändert nach Pugsley, 1993. PulA: Pullulanase A; LspA: Signalpeptidase; SecA-B, SecD-F, SecY: Sec-Translokationsmaschinerie; PulC-O, PulS: Pul-Sekreton; Z: Zytoplasma; IM: innere Membran; P: Periplasma; ÄM: äußere Membran; M: Medium.

von TatA bilden die Translokationspore (Berks et al., 2000). Der Tat-Weg wird über den elektrochemischen Protonengradienten der Membran (ΔpH) angetrieben und benötigt somit im Gegensatz zum Sec-Weg keine Energie in Form von NTP (Cristobal et al., 1999).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, sowohl durch die Verwendung der Sec-spezifischen Signalsequenz Hyl-Prepro aus *S. griseus* als auch durch Verwendung der Tat-spezifischen Signalsequenz des Proteins Cg0955 aus *C. glutamicum*, eine aktive Pullulanase aus *K. pneumoniae* mit einem rekombinanten *C. glutamicum*-Stamm zu sezernieren. Schon in vorangegangenen Arbeiten führten diese Signalsequenzen zu einem erfolgreichen Ausschleusen von Proteinen mit *C. glutamicum* (Lausberg F. & Freudl R., unveröffentlicht; Hyeon et al., 2011). Die beiden in dieser Arbeit getesteten Stämme wiesen eine hohe spezifische PulA-Aktivität sowohl im Zelllysat als auch in der Zellmembran auf, während die Leerplasmid-tragenden Stämme keine Aktivitäten zeigten. In den Überständen waren dagegen keine Enzymaktivitäten detektierbar, was darauf schließen lässt, dass wie bei *K. pneumoniae* auch bei *C. glutamicum* die sezernierte Pullulanase durch gebildete Fettsäureketten in der Membran verankert ist (Pugsley, 1993).

Die Kombination der verschiedenen Signalsequenzen mit dem Pullulanase-Gen auf einem Plasmid beim Wachstum der damit transformierten *C. glutamicum*-Stämme in CgC-Minimalmedium mit aufgekochter, löslicher Kartoffelstärke und α-Amylase, führte zudem zu einer Ertragserhöhung von 100 % (*C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA) bzw.

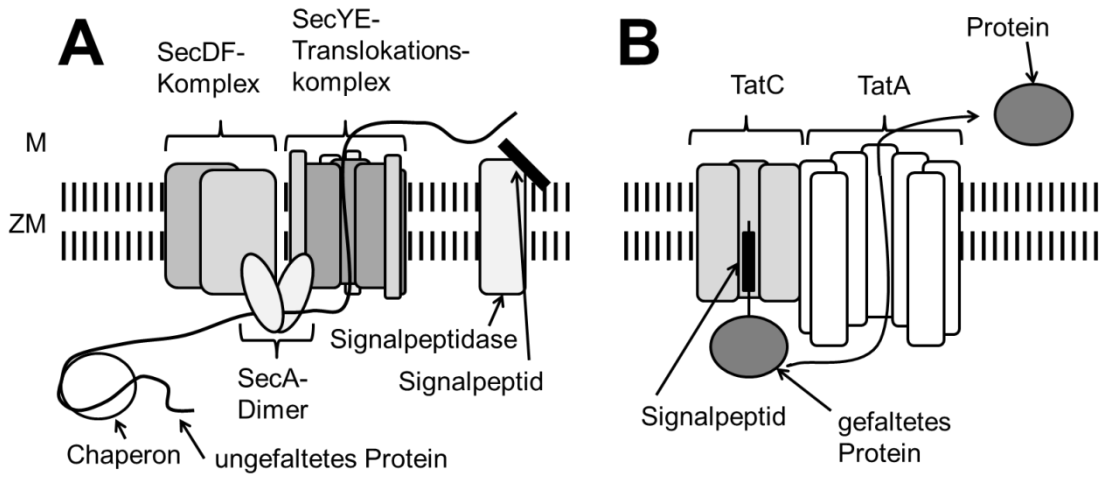

Abbildung 39: (A) Exportmodel für den Sec-Sekretionsweg in *C. glutamicum*. Abbildung verändert nach Berens, 2000. (B) Exportmodel für den Tat-Sekretionsweg in *C. glutamicum*. Abbildung verändert nach Meissner, 2005. SecA, SecD-F, SecY: Sec-Translokationsmaschinerie; TatA, TatC: Tat-Translokationsmaschinerie; ZM: Zellmembran; M: Medium.

40 % (*C. glutamicum* DM1729(pEKEx2-SC-pulA) im Vergleich zum jeweiligen Leerplasmid-tragenden Stamm. Die Stämme, die die Kombination der beiden Signalsequenzen und des Pullulanase-Gens plasmidcodiert enthielten, zeigten zudem deutlich weniger Kohlenhydratreste in den Überständen nach Wachstumsende. Dies zeigt deutlich, dass durch die Kombination der Enzyme α-Amylase und Pullulanase während Produktionsprozesse von *C. glutamicum* in CgC-Minimalmedium mit aufgekochter löslicher Kartoffelstärke die Stärke effizient zu Produkten abgebaut wird, die durch den Produktionsstamm annähernd vollständig genutzt werden können. Dies wäre somit eine Lösung, durch den direkten Einsatz von Stärke statt Stärkehydrolysate bzw. Glukose, die Kosten in der Produktion zu senken. Der Versuch, durch das Einbringen der beiden Plasmide pAmy und pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA in *C. glutamicum* einen Stamm zu erhalten, der dadurch die Stärke im Überstand vollständig verstoffwechselt führte ebenfalls zu einem Stärkeabbau. Dieser Stamm erzielte allerdings kaum höhere Erträge als ein Vergleichsstamm, der in der Lage war, nur die α-1,4-glykosidischen Verknüpfungen der Stärke zu spalten. Außerdem blieb eine große Menge an Kohlenhydraten im Überstand zurück (Abbildung 32). Bei der Messung der spezifischen Pullulanaseaktivität im Zelllysat bzw. in der Zellmembran zeigte neben dem Stamm mit den zwei Plasmiden auch der Vergleichsstamm *C. glutamicum* DM1729(pAmy) überraschenderweise Aktivität, obwohl das eingesetzte Substrat durch das Vorhandensein einer α-1,6-glykosidchen Verknüpfung zum messbaren Farbstoff eigentlich Pullulanase-spezifisch ist. Da die Struktur des Substrates nicht zugänglich ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die freigesetzte α-Amylase eine andere Verknüpfung trennen kann und dadurch ebenfalls den Farbstoff freisetzt. Dies müsste geklärt werden. Nichtsdestotrotz zeigte der Stamm mit der Möglichkeit beide stärkeabbauenden Enzyme zu sezernieren keine signifikant höhere Aktivität im Zelllysat oder in der Zellmembran als der Vergleichsstamm mit der Möglichkeit nur die α-Amylase zu sezernieren. Dies lässt darauf schließen, dass auch keine aktive Pullulanase am Stärkeabbau des Stammes beteiligt ist. Als möglicher Grund könnte eine Expressionsdominanz des Plasmids pAmy in Betracht gezogen werden. Es wäre auch möglich, dass es beim Ausschleusen beider Enzyme, die mit diesem Stamm jeweils über das Sec-System erfolgt, zu einer Überlastung der Poren bzw. der Chaperone zum Falten der Enzyme, speziell bei der Pullulanase kommt. Aktuell wird bereits an der Entwicklung eines *C. glutamicum*-Stammes gearbeitet, der die α-Amylase über den Sec- und die Pullulanase über den Tat-Weg sezerniert. Dafür werden die Plasmide pAmy und pEKEx-SC-pulA in einem Stamm kombiniert. Ebenfalls ist angedacht, auf Grund der möglichen Expressionsdominanz des Plasmids pAmy gegenüber pEKEx2-Hyl-Prepro-pulA, diese durch eine Integration des Gens der α-Amylase mit entsprechender Signalsequenz ins Genom von *C. glutamicum* zu umgehen. Grundsätzlich konnte jedoch mit den bisherigen Ergebnissen

gezeigt werden, dass es möglich ist durch eine Kombination der stärkeabbauenden Enzyme α-Amylase und Pullulanase in CgC-Minimalmedium Stärke soweit abzubauen, dass sie von *C. glutamicum* annähernd komplett als Kohlenstoff- und Energiequelle für das Wachstum und die Produktion genutzt werden kann. Die Translokation der Pullulanase war dabei sowohl über den Sec- als auch über den Tat-Weg erfolgreich. Um die Stärke wirklich vollständig abzubauen, wäre es denkbar, weitere Signalsequenzen mit dem Gen der α-Amylase bzw. der Pullulanase zu kombinieren, da dadurch eventuell ein Anstieg der Hydrolyse-Aktivität erreicht werden könnte. Da im Voraus keine Aussagen über die Effizienz einer solchen Kombination getroffen werden kann, müssten sämtliche Kombinationen experimentell untersucht werden. Um diesen Aufwand stemmen zu können, wäre ein Einsatz eines Biolectors denkbar, der bis zu 96 unterschiedliche Stämme auf ihre Effizienz testen könnte (Rohe et al., 2012). Damit könnte ebenfalls die optimale IPTG-Konzentration zur Induktion der Genexpression bestimmt werden, die ebenfalls Einfluß auf die Aktivität des Enzyms hat.

Zusammenfassend konnte in diesem Teil der Arbeit gezeigt werden, dass aufgekochte, lösliche Kartoffelstärke in CgC-Minimalmedium vollständig durch die Enzyme α-Amylase und Pullulanse abgebaut wird und die entstandenen Produkte annähernd vollständig von *C. glutamicum* für Wachstum und die Produktion von L-Lysin genutzt werden können. Dabei ist *C. glutamicum* selbst in der Lage die Enzyme über das Sec- bzw- das Tat-Sekretionssystem zu sezernieren. Da die gebildeten stärkeabbauenden Enzyme zudem keinen Einfluß auf den Glykogenspiegel des Stammes haben, ist dies ein vielversprechender Ansatz Stärke direkt als Substrat in der Industrie zur Produktion verschiedener chemischer Grundbausteine mit *C. glutamicum* zu nutzen. Damit könnten die hohen Produktionskosten, die größtenteils durch die Herstellung hydrolysierter Stärke als Substrat entstehen, deutlich verringert werden.

5. Literaturverzeichnis

Aaij C., Borst P. 1972. The gel electrophoresis of DNA. *Biochimica et Biophysica Acta* **269**: 192-200.

Abe S., Takayama K.-I., Kinoshita S. 1967. Taxonomical studies on glutamic acid producing bacteria. *Journal of General and Applied Microbiology* **13**: 279-301.

Ajinomoto Co. 2010. Food products business. URL: http://www.ajinomoto.com/ir/pdf/Food-Oct2010.pdf

Ajinomoto Co. 2011. Feed-use amino acid business. URL: http://www.ajinomoto.com/ir/pdf/Feed-useAA-Oct2011.pdf

Arndt A., Eikmanns B.J. 2007. The alcohol dehydrogenase gene *adhA* in *Corynebacterium glutamicum* is subject to carbon catabolite repression. *Journal of Biotechnology* **189**: 7408-7416.

Baird S.D., Johnson D.A., Seligy V.L. 1990. Molecular cloning, expression, and characterization of endo-β-1,4-glucanase genes from *Bacillus polymyxa* and *Bacillus circulans*. *Journal of Bacteriology* **172**: 1576-1586.

Berghem L.E., Pettersson L.G. 1974. The mechanism of enzymatic cellulose degradation. Isolation and some properties of a β-glucosidase from *Trichoderma viride. European Journal of Biochemistry* **46**: 295-305.

Berks B.C. 1996. A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? *Molecular Microbiology* **22**: 393-404.

Berks B.C., Sargent F., Palmer T. 2000. The Tat protein export pathway. *Molecular Microbiology* **35:** 260-274.

Birnboim H.C. 1983. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods in Enzymology* **100**: 243-255.

Blombach B., Schreiner M.E., Moch M., Oldiges M., Eikmanns B.J. 2007. Effect of pyruvate dehydrogenase complex deficiency on L-lysine production with *Corynebacterium glutamicum. Applied Microbiology and Biotechnology* **76**: 615-623.

Blombach B., Seibold G.M. 2010. Carbohydrate metabolism in *Corynebacterium glutamicum* and applications for the metabolic engineering of L-lysine production strains. *Applied Microbiology and Biotechnology* **86**: 1313-1322.

Blombach B., Riester T., Wieschalka S., Ziert C., Youn J.W., Wendisch V.F., Eikmanns B.J. 2011. *Corynebacterium glutamicum* tailored for efficient isobutanol production. *Applied and Environmental Microbiology* **77**: 3300-3310.

Buonocore V., Caporale C., De Rosa M., Gambacorta A. 1976. Stable, inducible thermoacidophilic α-amylase from *Bacillus acidocaldarius.Journal of Bacteriology* **128**: 515-521.

Cadenas R.F., Gil J.A., Martín J.F. 1992. Expression of *Streptomyces* genes encoding extracellular enzymes in *Brevibacterium lactofermentum*: secretion proceeds by removal of the same leader peptide as in *Streptomyces lividans*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **38**: 362-369.

Cadenas R.F., Fernández-González C., Martín J.F., Gil J.A. 1996. Construction of new cloning vectors for *Brevibacterium lactofermentum*. *FEMS Microbiology Letters* **137**: 63-68.

Chary V.K., de la Fuente J.L., Liras P., Martin J.F. 1997. Amy as a reporter gene for promoter activity in *Nocardia lactamdurans*: comparison of promoters of the cephamycin cluster. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 2977-2982.

Cicalese L., Hierholzer C., Subbotin V., Iyengar A., Rao A.S., Stanko R.T. 1997. Protective effect of pyruvate during acute rejection of intestinal allografts: accompanied by up-regulation of inducible nitric oxide synthase mRNA. *Transplantation Proceedings* **29**: 1813-1814.

Cicalese L., Subbotin V., Rastellini C., Stanko R.T., Rao A.S. Fung J.J. 1999. Preservation injury and acute rejection of rat intestinal grafts: protection afforded by pyruvate. *Journal of Gastrointestinal Surgery* **3**: 549-554.

Cluff C.W., Garcia M., Ziegler H.K. 1990. Intracellular hemolysin-producing *Listeria monocytogenes* strains inhibit macrophage-mediated antigen processing. *Infection and Immunity* **58**: 3601-3612.

Cotellessa C., Manunta T., Ghersetich I., Brazzini B., Peris K. 2004. The use of pyruvic acid in the treatment of acne. *Journal of The European Academy of Dermatology and Venereology* **18**: 275-278.

Cremer J., Treptow C., Eggeling L., Sahm H. 1988. Regulation of enzymes of lysine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum. Journal of General Microbiology* **134**: 3221-3229.

Cristobal S., de Gier J.W., Nielsen H., von Heijne G. 1999. Competition betweenSec- and Tat-dependent protein translocation in *Escherichia coli. EMBO Journal* **18:** 2982-2990.

Dalbey R.E., Von Heijne G. 1992. Signal peptidases in prokaryotes and eukaryotes – a new protease family. *Trends in Biochemical Sciences* **17**: 474-478.

Datta P.K., Hanson K.R., Whitaker D.R. 1963. Improved procedures for preparation and characterization of Myrothecium cellulose. 3. Molecular weight, amino acid composition, terminal residues, and other properties. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* **41**: 697-705.

DeBoer L.W., Bekx P.A., Han L., Steinke L. 1993. Pyruvate enhances recovery of rat hearts after ischemia and reperfusion by preventing free radical generation. *Journal of Physiology* **265**: 1571-1576.

Demleitner G., Götz F. 1994. Evidence for importance of the *Staphylococcus hyicus* lipase pro-peptide in lipase secretion, stability and activity. FEMS *Microbiology Letters* **121**: 189-197.

d'Enfert C., Ryter A., Pugsley A.P. 1987. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Klebsiella pneumonia* genes for production, surface localization and secretion of the lipoprotein pullulanase. *EMBO Journal* **6**: 3531-3538.

Dinadalyala P., Sambou T., Daffé M., Lemassu A. 2008. Comparative structural analyses of the α-glucan and glycogen from *Mycobacterium bovis. Glycobiology* **18**: 502-508.

Dong G., Vieille C., Savchenko A., Zeikus J.G. 1997. Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding extracellular α-amylase from *Pyrococcus furiosus* and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 3569-3576.

Dover L.G., Cerdeño-Tárraga A.M., Pallen M.J., Parkhill J., Besra G.S. 2004. Comparative cell wall core biosynthesis in the mycolated pathogens, *Mycobaterium tuberculosis* and *Corynebacterium diphtheriae*. *FEMS Microbiology Reviews* **28**: 225-250.

Duong F., Wickner W. 1997a. Distinct catalytic roles of the SecYE, SecG and SecDFyajC subunits of preprotein translocase holoenzyme. *EMBO Journal* **10**: 2756-2768.

Duong F., Wickner W. 1997b. The SecDFyajC domain of preprotein translocase controls preprotein movement by regulating SecA membrane cycling. *EMBO Journal* **17**: 696-705.

Eikmanns B.J., Kleinertz E., Liebl W., Sahm H. 1991. A family of *Corynebacterium glutamicum/Escherichia coli* shuttle vectors for cloning, controlled gene expression, and promoter probing. *Gene* **102**: 93-98.

Eikmanns B.J., Thum-Schmitz N., Eggeling L., Ludtke K., Sahm H. 1994. Nucleotide sequence, expression and transcriptional analysis oft he *Corynebacterium glutamicum gltA* gene encoding citrate synthase. *Microbiology* **140**: 1817-1828.

Economou A., Pogliano J.A., Beckwith J., Oliver D.B., Wickner W. 1995. SecA membrane cycling at SecYEG is driven by distinct ATP binding and hydrolysis events and is regulated by SecD and SecF. *Cell* **83:** 1171-1181.

Economou A. 1999. Following the leader: bacterial protein export through the Sec pathway. *Trends in Microbiology* **7**: 315-320.

Evonik Industries. 2011. Pressemitteilung: Evonik gründet in Russland Joint Venture zur Produktion der Futtermittelaminosäure L-Lysin. URL: http://corporate.evonik.com/de/presse/pressearchiv/pages/news-details.aspx?newsid=22386

Fachverband der Stärke-Industrie. 2012. Zahlen und Fakten zur Stärke-Industrie 2012. URL: http://www.staerkeverband.de/downloads/FSI_zahlen2012.pdf

Fekkes P., de Witt J.G., van der Wolk J.P.W., Kimsey H.H., Kumamoto C.A., Driessen A.J.M. 1998. Preprotein transfer to the *Escherichia coli* translocase requires the co-operative binding of SecB and the signal sequence to SecA. *Molecular Microbiology* **29:** 1179-1190.

Funke G., von Graevenitz A., Clarridge J.E., Bernard K.A. 1997. Clinical microbiology of *coryneform* bacteria. *Clinical Microbiology Reviews* **10**: 125-159.

François J., Parrou J.L. 2001. Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae. FEMS Microbiology Reviews* **25**: 125-145.

Gerstmeir R., Wendisch V.F., Schnicke S., Ruan H., Farwick M., Reinscheid D., Eikmanns B.J. 2003. Acetate metabolism and its regulation in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology* **104:** 99-122.

Gallant D.J., Bouchet B., Baldwin P.M. 1997. Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization. *Carbohydrate Polymers* **32:** 177-191.

Georgi T., Rittmann D., Wendisch V.F. 2005. Lysine and glutamate production by *Corynebacterium glutamicum* on glucose, fructose and sucrose: role of malic enzyme and fructose-1,6-bisphosphatase. *Metabolic Engineering* **7**: 291-301.

Ghersetich I., Brazzini B., Peris K., Cotellessa C., Manunta T., Lotti T. 2004. Pyruvic acid peels for the treatment of photoaging. *Dermatologic Surgery* **30**: 32-36.

Götz F., Verheij H.M., Rosenstein R. 1998. *Staphylococcus* lipases: molecular characterization, secretion, and processing. *Chemistry and Physics of Lipids* **93**: 15-25.

Haas K.A. 2010. Untersuchungen von Stärke-abbauenden Enzyme für den Einsatz in *Corynebacterium glutamicum*. Bachelorarbeit, Universität Ulm.

Hahn T. 2012. L-Lysinproduktion von *Corynebacterium glutamicum* mit verschiedenen pflanzlichen Stärken. Masterarbeit, Universität Ulm.

Hanahan D. 1985. Techniques for transformation of *Escherichia coli*. *DNA cloning (Vol.1)*. IRL-Press, Oxford, Washington DC, USA, S. 109-135.

Harada T., Yokobayashi K., Misaki A. 1968. Formation of isoamylase by *Pseudomonas. Applied Microbiology* **16**: 1439-1444.

Henkel V. 2012. Succinatproduktion aus Stärke mit *Corynebacterium glutamicum*. Bachelorarbeit, Universität Ulm.

Henrich A.W. 2011. Characterization of maltose and trehalose transport in *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation, Universität zu Köln.

Hermann T. 2003. Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. *Journal of Biotechnology* **104**: 155-172.

Hoshiko S., Makabe O., Nojiri C., Katsumata K., Satoh E., Nagaoka K. 1987. Molecular cloning and characterization of the *Streptomyces hygroscopicus* α-amylase gene. *Journal of Bateriology* **169**: 1029-1036.

Hyeon J.E., Jeon W.J., Whang S.Y., Han S.O. 2011. Production of minicellulosomes for the enhanced hydrolysis of cellulosic substrates by recombinant *Corynebacterium glutamicum*. *Enzyme and Microbial Technology* **48**: 371-377.

Ikeda M., Nakagawa. 2003. The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes. *Applied Microbiology and Biotechnology* **62**: 99-109.

Imberty A., Buléon A., Tran V., Péerez S. 1991. Recent advances in knowledge of starch structure. *Starch-Stärke* **43**: 375-384.

Inui M., Murakami S., Okino S., Kawaguchi H., Vertès A.A., Yukawa H. 2004. Metabolic analysis of *Corynebacterium glutamicum* during lactate and succinate productions under oxygen deprivation conditions. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **7**: 182-196.

Jojima T., Fujii M., Mori E., Inui M., Yukawa H. 2010. Engineering of sugar metabolism of *Corynebacterium glutamicum* for production of amino acid L-alanine under oxygen deprivation. *Applied Microbiology and Biotechnology* **87**: 159-165.

Jolkver E., Emer D., Ballan S., Krämer R., Eikmanns B.J., Marin K. 2008. Identification and characterization of a bacterial transport system for the uptake of pyruvate, propionate, and acetate in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Bacteriology* **191**: 940-948.

Kalinowski J., Bathe B., Bartels D., Bischoff N., Bott M., Burkovski A., Dusch N., Eggeling L., Eikmanns B.J., Gaigalat L., Goesmann A., Hartmann M., Huthmacher K., Kramer R., Linke B., McHardy A.C., Meyer F., Mockel B., Pfefferle W., Puhler A., Rey D. A., Ruckert C., Rupp O., Sahm H., Wendisch V.F., Wiegrabe I., Tauch A. 2003. The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. *Journal of Biotechnology* **104**: 5-25.

Kase H., Nakayama K. 1972. Production of L-threonine by analogue-resistant mutants. *Agricultural and Biological Chemistry* **36**: 1611-1621.

Kelle R., Hermann T., Bathe B. 2005. L-lysine production. *Handbook of Corynebacterium glutamicum (Vol. 10).* Boca Raton, USA, CRC Press, 465-488.

Kinoshita S., Udaka S., Shimono M. 1957. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *The Journal of General and Applied Microbiology* **3**: 193-205.

Kimura E. 2005. L-glutamate production. *Handbook of Corynebacterium glutamicum (Vol. 10)*. Boca Raton, USA, CRC Press, 439-463.

Kobayashi T., Kanai H., Hayashi T., Akiba T., Akaboshi R., Horikoshi K. 1992. Haloalkaliphilic maltotriose-forming α-amylase from the archaebacterium *Natronococcus sp.* strain Ah-36. *Journal of Bacteriology* **174**: 3439-3444.

Kornacker M.G., Pugsley A.P. 1990. Molecular characterization of *pulA* and its product, pullulanase, a secreted enzyme of *Klebsiella pneumonia* UNF5023. *Molecular Microbiology* **4**: 73-85.

Kouwen T.R.H.M., Nielsen A.K., Denham E.L., Dubois J.-Y.F., Dorenbos R., Rasmussen M.D., Quax W.J., Freudl R., van Dijl J.M. 2010. Contributions of the Pre- and Pro-region of a *Staphylococcus hyicus* lipase to secretion of a heterologous protein by *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 659-669.

Kunioka E., Matsuyama S., Tokuda H. 1998. Cloning and expression of the secA gene of a marine bacterium, *Vibrio alginolyticus*, and analysis of its function in *Escherichia coli*. *Gene* **216**: 303-309.

Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Leuchtenberger W., Huthmacher K., Drauz K. 2005. Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* **69**: 1-8.

Li Y., Chen J., Lun S.Y. 2001. Biotechnological production of pyruvic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology* **57**: 451-459.

Liebl W. 1991. The genus *Corynebacterium*-nonmedical. *The procaryotes*. New York, USA: Springer, 1157-1171.

Liebl W. 2005. *Corynebacterium* Taxonomy. *Handbook of Corynebacterium glutamicum (Vol. 10).* Boca Raton, USA: CRC Press, 9-34.

Liebl W., Bayerl A., Schein B., Stillner U., Schleifer K.H. 1989. High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum* cells. *FEMS Microbiology Letters* **65**: 299-304.

Liebl W., Sinskey A.J. 1988. Molecular cloning and nucleotide sequence of a gene involved in the production of extracellulare DNase by *Corynebacterium glutamicum. Genetics and Biotechnology of Bacilli, Academic Press, New York* S. 383-388.

Liebl W., Stemplinger I., Ruile P. 1997. Properties and gene structure of the *Thermotoga maritima* α-amylase AmyA, a putative lipoprotein of a hyperthermophilic bacterium. *Journal of Bacteriology* **179**: 941-948.

Lindroth P., Mopper K. 1979. High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthaldialdehyde. *Analytical Chemistry* **51**: 1667-1674.

Litsanov B., Kabus A., Brocker M., Bott M. 2012. Efficient aerobic succinate production from glucose in minimal medium with *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology and Biotechnology* **5**:116-128.

Manners D.J. 1991. Recent developments in our understanding of glycogen structure. Carbohydrate polymers (Vol. 16). *Heriot-Watt University, Edinburgh, UK,* S. 37-82.

Manning G.B., Campbell L.L. 1961. Thermostable α-amylase of *Bacillus stearothermophilus*. I. Crystallization and some general properties. *The Journal of Biological Chemistry* **236**: 2952-2957.

Manting E.H., van der Does C., Driessen A.J.M. 1997. In vivo cross-linking of SecA and SecY subunits of the *Escherichia coli* preprotein translocase. *Journal of Bacteriology* **179**: 5699-5704.

Martin C., Smith A.M. 1995. Starch biosynthesis. *The Plant Cell* **7**: 971-985.

Matsuyama S., Fujita Y., Sagara K., Mitzushima S. 1992. Overproduction, purification and characterization of SecD and SecF, integral membrane components of the protein translocation machinery of *Escherichia coli. Biochimica et Biophysica Acta* **1122**: 77-84.

McKinlay J.B., Vieille C., Zeikus J.G. 2007. Prospects for a bio-based succinate industry. *Applied Microbiology and Biotechnology* **76**: 727-740.

McMurry J., Begley T.2006. Organische Chemie der biologischen Stoffwechselwege (1. Auflage). *Spektrum Akademischer Verlag, München*.

Meens J., Frings E., Klose M., Freudl. 1993. An outer membrane protein (OmpA) of *Escherichia coli* can be translocated across the cytoplasmic membrane of *Bacillus subtilis. Molecular Microbiology* **9**: 847-855.

Meissner D. 2005. Vergleichende Analyse der Sec- und Tat-abhängigen sekretorischen Proteingewinnung mit Gram-positiven Bakterien als Wirtsorganismen. Dissertation, Heinrich Heine Universität Düsseldorf.

Meissner D., Vollsteft A., van Dijl J.M., Freudl R. 2007. Comparative analysis of twin-arginine (Tat)-dependent protein secretion of a heterologous modelprotein (GFP) in three different Gram-positive bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* **76**: 633–642.

Michaelis S., Chapon C., D'Enfert, Pugsley A.P. Schwartz M. 1985. Characterization and expression of the structural gene for pullulanase, a maltose-inducible secreted protein of *Klebsiella pneumoniae. Journal of Bacteriology* **164**: 633-638.

Micklinghoff J.C., Breitinger K.J., Schmidt M., Geffers R., Eikmanns B.J., Bange F.C. 2009. Role of the transcriptional regulator RamB (Rv0465c) in the control oft he glyoxylate cycle in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology* **191**: 7260-7269.

Mijts B.N., Patel B.K. 2002. Cloning, sequencing and expression of an α-amylase gene, *amyA*, from the thermophilic halophile *Halothermothrix orenii* and purification and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Microbiology* **148**: 2343-2349.

Minnikin D.E., Goodfellow M., Collins M.D. 1978. Lipid composition in the classification and identification of *coryneform* and related taxa. *Coryneform Bacteria*. London, UK:Academic Press, 85-160.

Murai T., Ueda M., Shibasaki Y., Kamasawa N., Osumi M., Imanaka T., Tanaka A. 1999. Development of an arming yeast strain for efficient utilization of starch by co-display of sequential amylolytic enzymes on the cell surface. *Applied Microbiology and Biotechnology* **51**: 65-70.

Mitchell C., Oliver D. 1993. Two distindt ATP-binding domains are needed to promote protein export by *Escherichia coli* SecA ATPase. *Molecular Microbiology* **10**: 483-497.

Nebra Y., Blanch A.R. 1999. A new selective medium for *Bifidobacterium spp*. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 5173-5176.

Nikaido H. 1994. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active flux. *Science* **364**: 382-388.

Nishimura T., Vertès A.A., Shinoda Y., Inui M., Yukawa H. 2007. Anaerobic growth of *Corynebacterium glutamicum* using nitrate as a terminal electron acceptor. Applied *Microbiology and Biotechnology* **75**: 889-897.

Ochi K. 1995. Phylogenetic analysis of mycolic acid-containing wall-chemotype IV *actinomycetes* and allied taxa by partial sequencing of ribosomal protein AT-L30. *International Journal of Systematic Bacteriology* **81**: 459-464.

O'Connell Motherway M., Fitzgerald G.F., Neirynck S., Ryan S., Steidler L., van Sinderen D. 2008. Characterization of ApuB, an extracellular type II amylopullulanase from *Bifidobacterium breve* UCC2003. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 6271-6279.

Okino S., Suda M., Fujikura K., Inui M., Yukawa H. 2008a. Production of L-lactic acid by *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation. *Applied Microbiology and Biotechnology* **78**: 449-454.

Okino S., Noburyu R., Suda M., Jojima T., Inui M., Yukawa H. 2008b. An efficient succinic acid production process in a metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* strain. *Applied Microbiology and Biotechnology* **81**: 459-464.

Paetzel M., Karla A., Strynadka N.C., Dalbey R.E. 2002. Signal peptidases. *Chemical Reviews* **102**: 4549-4580.

Palva I. 1989. Engineering for secretion of proteins by bacteria. *Society for general Microbiology. Symposium 44. Microbioal Products: New Approaches, Cambridge University Press, Cambridge,* S. 255-270.

Pazur J.H., Ando T. 1959. The action of an amyloglucosidase of *Aspergillus niger* on starch and malto-oligosaccharides. *The Journal of Biological Chemistry* **234**: 1966-1970.

Preiss J., Romeo T. 1994. Molecular biology and regulatory aspects of glycogen biosynthesis in bacteria. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* **47**: 299-329.

Priest F.G. 1977. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriological Reviews* **41**: 711-753.

Pugsley A.P. 1993. The complete general secretory pathway in Gram-negative Bacteria. *Microbiological Reviews* **57**: 50-108.

Pugsley A.P., Chapon C., Schwartz M. 1986. Extracellular pullulanase of *Klebsiella pneumoniae* is a lipoprotein. *Journal of Bacteriology* **166**: 1083-1088.

Pugsley A.P., Kornacker M.G., Poquet I. 1991. The general protein-export pathway is directly required for extracellular pullulanase secretion in *Escherichia coli* K12. *Molecular Microbiology* **5**: 343-352.

Radmacher E., Vaitsikova A., Burger U., Krumbach K., Sahm H., Eggeling L. 2002. Linking central metabolism with increased pathway flux: L-valine accumulation by *Corynebacterium glutamicum. Applied and Environmental Microbiology* **68**: 2246-2250.

Reimer L., 1989. Transmission electron microscopy: physics of image formation and microanalysis. 2. Auflage, *Springer Verlag*, Berlin.

Roach P.J. 2002. Glycogen and its metabolism. Review. *Current Molecular Medicine* **2**: 101-120.

Rohe P., Venkanna D., Kleine B., Freudl R., Oldiges M. 2012. An automated workflow for enhancing microbial bioprocess optimization on a novel microbioreactor platform. *Microbial Cell Factories* 2012, **11**:144

Roufs J.B. 1996. Pyruvate: does it amp endurance and burn more fat? *Muscle Fitness* **57**: 195-197.

Sahm H., Eggeling L. Eikmanns B.J., Krämer R. 1996. Construction of L-lysine-, L-threonine-, and L-isoleucine-overproducing strains of *Corynebacterium glutamicum*. *Annals of the New York Academy of Sciences* **782**: 25-39.

Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.

Saito N. 1973. A thermophilic extracellular α-amylase from *Bacillus licheniformis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **155**: 290-298.

Sambrook J., Russell D.W. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3. Auflage). Cold Spring Harbor Laboratory.

Sargent F., Bogsch E.G., Stanley N.R., Wexler M., Robinson C., Berks B.C., Palmer T. 1998. Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway. *EMBO Journal* **17**: 3640-3650.

Satyanaryana T., Noorwez S.M., Kumar S., Rao J.L.U.M., Ezhilvannan M., Kaur P. 2004. Development of an ideal starch saccharification process using amylolytic enzymes from thermophiles. *Biochemical Society Transaction* **32**: 276-278.

Schopfer P., Brennicke A. 2006. *Pflanzenphysiologie (6. Auflage)*. Spektrum Akademischer Verlag. S. 237.

Seibold G.M. 2007. Charakterisierung des Glycogen- und Maltosestoffwechsels von *Corynebacterium glutamicum.* Dissertation, Universität Ulm.

Seibold G., Auchter M., Berens S., Kalinowski J., Eikmanns B.J. 2006. Utilization of soluble starch by a recombinant *Corynebacterium glutamicum* strain: Growth and lysine production. *Journal of Biotechnology* **124**: 381-391.

Seibold G., Dempf S., Schreiner J., Eikmanns B.J. 2007. Glycogen formation in *Corynebacterium glutamicum* and role of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Microbiology* **153**: 1275-1285.

Seibold G.M., Eikmanns B.J. 2007. The *glgX* gene product of *Corynebacterium glutamicum* is required for glycogen degradation and for fast adaptation to hyperosmotic stress. *Microbiology* **153**: 2212-2220.

Seibold M., Wurst M., Eikmanns B.J. 2009. Roles of maltodextrin and glycogen phosphorylases in maltose utilization and glycogen metabolism in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology* **155**: 347-358.

Shirato S., Nagatsu C. 1965. Fermentation Studies with *Streptomyces griseus*. *Applied Microbiology* **13**: 669-672.

Simoson F.J., McCoy E. 1953. The amylases of five streptomycetes. *Applied Microbiology* **1**: 228-236.

Sleat R., Mah R.A., Robinson R. 1984. Isolation and Characzerization of an anaerobic, cellulolytic bacterium, *Clostridium cellulovorans* sp. nov. *Applied Environmental Microbiology* **48**: 88-93.

Smith K., Cho K., Liao J. 2010. Engineering *Corynebacterium glutamicum* for isobutanol production. *Applied Microbiology and Biotechnology* **87**: 1045-1055.

Stackebrandt E., Rainey F.A., Ward-Rainey N.L. 1997. Proposal for a new hierarchic classification System, *Actinobacteria* class nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**: 479-491.

Stanko R.T., Tietze D.L., Arch J.E. 1992a. Body composition, energy utilization, and nitrogen metabolism with a severely restricted diet supplemented with dihydroxyacetone and pyruvate. *The American Journal of Clinical Nutrition* **55**: 771-776.

Stanko R.T., Tietze D.L., Arch J.E. 1992b. Body composition, energy utilization, and nitrogen metabolism with a 4.25-MJ/d low-energy diet supplemented with pyruvate. *The American Journal of Clinical Nutrition* **56**: 630-635.

Staudt C. 2002. Wechselwirkungen von Bifidobakterien mit Darmepithelzellen und mit extrazellulären Matrix- und Plasmaproteinen. Dissertation, Universität Ulm.

Swinkels, J.J.M. 1985. Composition and properties of commercial native starches. *Starch-Stärke* **37**: 1-5.

Takeno S., Ohnishi J., Komatsu T., Masaki T., Sen K., Ikeda M. 2007. Anaerobic growth and potential for amino acid production by nitrate respiration in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **75**: 1173-1182.

Takors R., Bathe B., Rieping M., Hans S., Kelle R., Huthmacher K. 2007. Systems biology for industrial strains and fermentation processes – example: amino acids. *Journal of Biotechnology* **129**: 181-190.

Tartof K.D., Hobbs C.A. 1987. Improved media for growing plasmid and cosmid clones. *Bethesda Research Laboratories Focus* **9**: 12–14.

Tateno T., Fukuda H., Kondo A. 2007a. Production of L-lysine from starch by *Corynebacterium glutamicum* displaying α-amylase on its cell surface. *Applied Microbiology and Biotechnology* **74**: 1213-1220.

Tateno T., Fukuda H., Kondo A. 2007b. Direct production of L-lysine from raw corn starch by *Corynebacterium glutamicum* secreting Streptococcus bovis α-amylase using *cspB* promoter and signal sequence. *Applied Microbiology and Biotechnology* **77**: 533-541.

Tegge. 2004a. Stärke und Stärkehydrolysate (3. Auflage). Kapitel: Säurekatalysierte Hydrolyse. B.Behr's Verlag GmbH & Co. KG.

Tegge. 2004b. Stärke und Stärkehydrolysate (3. Auflage). Kapitel: Übermolekulare Struktur. B.Behr's Verlag GmbH & Co. KG.

Tegge. 2004c. Stärke und Stärkehydrolysate (3. Auflage). Kapitel: Konstitution, Struktur. B.Behr's Verlag GmbH & Co. KG.

Tegge. 2004d. Stärke und Stärkehydrolysate (3. Auflage). Kapitel: Physikalische Eigenschaften. B.Behr's Verlag GmbH & Co. KG.

Tropis M., Meniche X., Wolf A., Gebhadt H., Strelkov S., Chami M., Schomburg D., Krämer R., Morbach S., Daffe M. 2005. The crucial role of trehalose and structurally related oligosaccharides in the biosynthesis and transfer of mycolic acids in *Corynebacterineae. The Journal of Biological Chemistry* **28**: 26573-26585.

UdakaShigezo, 1960. Sreening Method for Microorganisms accumulating metabolites and its use in the isolation of *Micrococcus glutamicus. Journal of Bacteriology* **79:** 754-755.

Ugorcáková J., Jucovic M., Bukovská G., Timko J. 1996. Construction and characterization of new corynebacterial plasmids carrying the α-amylase gene. *Folia Microbiologica (Praha)* **41**: 10-14.

Ugorcáková J., Bukovská G., Timko J. 2000. Construction of promoter-probe shuttle vectors for *Escherichia coli* and *corynebacteria* on the basis of promoterless α-amylase gene. *Folia Microbiologica (Praha)* **45**: 114-120.

Vihinen M., Mäntsälä P. 1989. Microbial amylolytic enzymes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **24**: 329-418.

Virolle M.J., Bibb M.J. 1988. Cloning, characterization and regulation of an α-amylase gene from *Streptomyces limosus. Molecular Microbiology* **2**: 197-208.

Virolle M.J., Long C.M., Chang S., Bibb M.J. 1988. Cloning, characterization and regulation of an α-amylase gene from *Streptomyces venezuelae*. *Gene* **74**: 321-334.

Warren R.A.J. 1996. Microbial hydrolysis of polysacchrarides. *Annual Review of Microbiology* **50**: 183-212.

Watanabe K., Tsuchida Y., Okibe N., Teramoto H., Suzuki N., Inui M., Yukawa H. 2009. Scanning the *Corynebacterium glutamicum* R genome for high-efficiency secretion signal sequences. *Microbiology* **155**: 741-750.

Weimer P.J., Zeikus J.G. 1977. Fermentation of cellulose and cellobiose by *Clostridium thermocellum* in the absence of *Methanobacterium thermoautotrophicum. Applied Environmental Microbiology* **33**: 289-297.

Welker N.E., Campbell L.L. 1967. Comparison of the α-amylase of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens. Journal of Bacteriology* **94**: 1131-1135.

Wieschalka S., Blombach B., Eikmanns B.J. 2012a. Engineering *Corynebacterium glutamicum* for the production of pyruvate. *Applied Microbiology and Biotechnology* **94**: 449-459.

Wieschalka S., Blombach B., Bott M., Eikmanns B.J. 2012b. Bio-based production of organic acids with *Corynebacterium glutamicum. Microbiology and Biotechnology.* [Epub ahead of print].

Wieschalka S. 2012. Engineering *Corynebacterium glutamicum* as a designer-bug for the bio-based production of chemical building blocks and biofuel. *Dissertation, Universität Ulm*.

Wondrak E. M. 2001a. Solution for fast visualization of protein. *United States Patent* US2001046709 (A1).

Wondrak E. M. 2001b. Process for fast visualization of protein. *United States Patent* US6319720 (B1).

Wondrak E. M. 2001c. Solution for fast visualization of protein. *United States Patent* US6555382 (B2).

Wood T.M. 1971. The cellulose of *Fusarium solani*. Purification and specificity of the β-1,4-glucanase and the β-D-glucosidase components. *Biochemistry Journal* **121**: 353-362.

Worthington P., Hoang V., Perez-Pomares F., Blum P. 2003. Targeted disruption of the α-amylase gene in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Journal of Bacteriology* **185**: 482-488.

Wronkowska M., Soral-Smietana M., Krupa-Kozak U. 2009. Native wheat, potato and pea starches and their physically modified preparations tested in vitro as the substrates for selected *Bifidobacterium* strains. *International Journal of Food Science and Nutrition* **4**: 191-204.

Yokota A., Lindley N.D. 2005. Central metabolism: sugar uptake and conversion. *Handbook of Corynebacterium glutamicum (Vol. 10).* Boca Raton, USA, CRC Press, 215-240.

Yamamoto S., Gunji W., Suzuki H., Toda H., Suda M., Jojima T., Inui M., Yukawa H. 2012. Overexpression of genes encoding glycolytic enzymes in *Corynebacterium glutamicum* enhabces glucose metabolism and alanine production under oxygen deprivation conditions. *Applied Environmental Micobiology* **78**: 4447-4457.

Yao W., Chu C., Deng X., Zhang Y., Liu M., Zheng P., Sun Z. 2009. Display of α-amylase on the surface of *Corynebacterium glutamicum* cells by using NCgl1221 as the anchoring protein, and production of glutamate from starch*. Archives of Microbiology* **191**: 751-759.

Yasuda K., Jojima T, Suda M., Okino S., Inui M., Yukawa H. 2007. Analyses of the acetate-producing pathways in *Corynebacterium glutamicum* under oxygen-deprived conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **77**: 853-860.

Yen M.R., Tseng Y.H., Nguyen E.H., Wu L.F., Saier M.H. Jr. 2002. Sequence and phylogenetic analysies of the twin-arginine targeting (Tat) protein export system. *Archieves of Microbiology* **177**: 411-450.

Zhu Y., Eiteman M.A., Altman R., Altman E. 2008. High glycolytic flux improves pyruvate production by a metabolically engineered *Escherichia coli strain. Applied Environmental Microbiology* **74**: 6649-6655.

Zuckerforschung Tulln (ZFT) GmbH. 2012. URL: http://www.zuckerforschung.at/inhalt.php?titel=ST%C4RKETECHNOLOGIE&nav=nstaerkeinfo&con=cist

Zulkowsky K. 1880. Verhalten der Stärke gegen Glycerin. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, S. 1395.

Abkürzungen

A	Adenosin; Ampere
abs.	absolut
AG	Aktiengesellschaft
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BCA	engl. für Bicinoninsäure
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
c	Zenti (10^{-2})
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Co.	Company
d	Schichtdicke in cm
DC	Dünnschichtchromatographie
Δ	Deletion
d.h.	das heißt
DNA	engl. für Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid-5'-Triphosphat
ε	Extinktionskoeffizient
engl.	englisch
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Eds.	Herausgeber (engl. editors)
et al.	et alii (und andere)
F	Farrad
G	Guanin
g	Gramm; Gravitation
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung

h	Stunde
H_2O_{demin}	demineralisiertes Wasser
Inc.	Incorporated Company; eingetragenes Unternehmen
k	Kilo- (10^3)
KG	Kommanditgesellschaft
KGaA	Kommanditgesellschaft auf Aktien
l	Liter
µ	Mikro- (10^{-6})
m	Meter; Milli- (10^{-3})
M	molar; Mega (10^6)
max.	maximal
min	Minute
Mio.	Millionen (10^6)
mol	Mol (6,023 * 1023 Teilchen)
n	Nano (10^{-9})
NAD^+	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
$NADP^+$	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
NTP	Nukleosidtriphosphat
O$D_{x\ nm}$	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
Ω	Ohm
p	Plasmid; Pico (10^{12})
pO_2	Sauerstoffdruck
PCR	“Polymerase chain reaction”
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
R	“resistant”
®	“registered”
rev	“reverse”
RNA	engl. für Ribonukleinsäure
rpm	engl. für Umdrehungen pro Minute

RT	Raumtemperatur
S.	Seite
s	Sekunde
St.	Sankt
T	Thymin
t	Tonnen (10^3)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
TY	Trypton-Yeast
U	Unit
USA	United States of America
UV	Ultraviolett
V	Volt; Volumen
Vol.%	Volumenprozent
v/v	Volumen pro Volumen (engl. für volume/ volume)
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen (engl. für wight/ volume)
ZTM	Zelltrockenmasse [g/l]

Publikationen

Paper

Seibold G.M., Breitinger K.J., Kempkes R., Both L., Krämer M., Dempf S., Eikmanns B.J. 2011. The *glgB* encoded glycogen branching enzyme is essential for glycogen accumulation in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology* **157**:3232-3242.

Micklinghoff J.C., Breitinger K.J., Schmidt M., Geffers R., Eikmanns B.J., Bange F.-C. 2009. The role of the transcriptional regulator RamB (Rv0465c) in control of the glyoxylate cycle in *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Bacteiology* **191**:7260-7269.

Poster

Breitinger K.J., Eikmanns B.J., Seibold G.M. 2011. The glycogen branching enzyme GlgB is essential for the glycogen accumulation in *Corynebacterium glutamicum*. Jahrestagung VAAM, 03.04 - 06.04.2011, Karlsruhe.

Micklinghoff J.C., Breitinger K.J., Schmidt M., Horst S., Geffers R., Eikmanns B.J., Bange F.-C. 2010. $RamB_{MT}$ (Rv0465c) represents a specific control factor of the glyoxylate cycle in *Mycobacterium tuberculosis*. Jahrestagung VAAM, 28.03 – 31.03.2010, Hannover.

Vorträge

Breitinger K.J., Eikmanns B.J. 2010a. Effiziente Stärke- und Maltodextrinverwertung von *Corynebacterium glutamicum* für die Optimierung der Produktion von Aminosäuren. FlexFit Projekttagung, 15.03.2010, Jülich.

Breitinger K.J., Eikmanns B.J. 2010b. Effiziente Stärke- und Maltodextrinverwertung von *Corynebacterium glutamicum* für die Optimierung der Produktion von Aminosäuren. FlexFit Projekttagung, 08.11.2010, Blaubeuren.

Breitinger K.J., Eikmanns B.J. 2011a. Efficient utilization of starch by *Corynebacterium glutamicum* for optimization of product formation. FlexFit Projekttagung, 28.03.11, Köln.

Breitinger K.J., Eikmanns B.J. 2011b. Efficient utilization of starch by *Corynebacterium glutamicum* for optimization of product formation. FlexFit Projekttagung, 05.10.2011, Bielefeld.

Breitinger K.J., Eikmanns B.J. 2012a. Efficient utilization of starch by *Corynebacterium glutamicum* for optimization of product formation. FlexFit Projekttagung, 06.03.2012, Marl.

Breitinger K.J., Hahn T.M., Eikmanns B.J. 2012. Raw starch utilization and L-lysine formation by a recombinant *Corynebacterium glutamicum* strain. 5th Croatian Congress of Microbiology with International Participation, 26.09.2012, Primošten, Kroatien.

Danksagung

Aus Gründen des Datenschutzes wurden die Inhalte der Seiten 148 und 149 entfernt.

Abgrenzung der Eigenleistung

An der Generierung und der Charakterisierung des Stammes *C. glutamicum* DM1729(pAmy) war Karina Haas im Rahmen ihrer Bachelorarbeit beteiligt (Haas, 2010). Die Wachstumsversuche von *C. glutamicum* DM1729(pAmy) in CgC-Minimalmedium mit den aufgekochten bzw. nicht aufgekochten Stärken sowie die Zusammenarbeit mit der Elektronenmikroskopie wurden hauptsächlich von Tobias Hahn im Rahmen seiner Masterarbeit durchgeführt (Hahn, 2012). Die Untersuchungen zur Succinatproduktion des Stammes *C. glutamicum* ELB-P(pAmy) wurden durch Vanessa Henkel im Rahmen ihrer Bachelorarbeit unterstützt (Henkel, 2012).

Ich versichere, dass ich die Arbeit selbständig und ohne Benutzung anderer als die hier angegebenen Quellen angefertigt habe. Alle Ausführungen, die wörtlich oder sinngemäß übernommen wurden, sind mit bestem Wissen und Gewissen als solche gekennzeichnet.

Weiterhin erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit weder vollständig noch in Auszügen einer anderen Fakultät mit dem Ziel vorgelegt wurde, einen akademischen Titel zu erwerben. Ich bewerbe mich hiermit erstmalig um den Doktorgrad der Naturwissenschaften der Universität Ulm.

Ulm, den

Katrin Julia Breitinger

Lebenslauf

	Katrin Julia Breitinger
06.11.1982	geboren in Biberach/Riß

Studium/ Promotion

08/2009 bis vrs. 05/2013	Promotion am Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie, Universität Ulm; Thema: **Effiziente Stärkeverwertung durch *Corynebacterium glutamicum* für das Wachstum und die Produktion von organischen Säuren und Aminosäuren**
12/2008 bis 07/2009	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie, Universität Ulm
11/2008	**Diplom (Abschlussnote 1,1)**
01/2008 bis 11/2008	Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie, Universität Ulm; Thema: **Vergleichende Funktionsanalyse der Proteine RamB aus *Corynebacterium glutamicum* und Rv0465c aus *Mycobacterium tuberculosis***
10/2003 – 11/2008	Biologiestudium an der Universität Ulm; Schwerpunkt: **Mikrobiologie**; weitere Vertiefungen: **Pharmakologie, Neurobiologie, Informatik**

Schule/ Freiwilligendienst

09/2002 bis 08/2003	Freiwilligendienst bei der evangelischen Kirchengemeinde Seißen und beim Jugend- und Familienwerk Blaubeuren
09/1993 bis 07/2002	Gymnasium Blaubeuren; **Abitur (Note 2,0)**
09/1989 bis 07/1993	Grundschule Blaubeuren