

**Die Beeinflussung der Succinatproduktion durch die veränderte Aktivität  
der Succinyl-CoA Synthetase und der Pyruvat-Carboxylase in**

*Yarrowia lipolytica*

**Dissertation**

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften

der Technischen Universität Dresden

von

Anne Kretschmar

geboren am 9. Juli 1982 in Dresden

Gutachter:

Prof. Dr. G. Barth

Prof. Dr. I. Röske

Eingereicht am: 13.04.2010

Verteidigung am: 16.09.2010

## Zusammenfassung

Das Anion der Bernsteinsäure, Succinat, und ihre Derivate werden in vielfältiger Weise in den Bereichen Tenside, Lebensmittel, Pharmazeutika und Polymere angewendet. Gegenwärtig umfasst der weltweite Markt für industrielles Succinat 15.000 t/Jahr. Diese Butandisäure besitzt jedoch ein Marktpotential von bis zu 270.000 t/Jahr, da die Derivate von Succinat wichtige Grundchemikalien, beispielsweise für die Herstellung von Kunststoffen, darstellen. Die Herstellung von Succinat erfolgt meist mittels petrochemischer Synthese von Butan. Vor dem Hintergrund der steigenden Erdölpreise sowie der Erschöpfung der fossilen petrochemischen Rohstoffvorkommen weist eine biotechnologische Succinatsynthese aus nachwachsenden Rohstoffen eine interessante Alternative auf.

Für die biotechnologische Succinatsynthese von großem Interesse ist die aerobe nicht-konventionelle Hefe *Yarrowia (Y.) lipolytica* aufgrund ihrer Fähigkeit große Mengen organischer Säuren in das extrazelluläre Medium zu sekretieren, ihrer Apathogenität, ihres breiten Substratspektrums, ihrer genetischen Stabilität sowie ihrer problemlose Kultivierung im großem Maßstab. In der vorliegenden Arbeit wurde das Potential dieser Hefe für eine industrielle Succinatproduktion unter Betrachtung des Einflusses der enzymatischen Aktivitäten von Succinyl-CoA Synthetase und Pyruvat-Carboxylase auf die Succinatsynthese untersucht. Dabei konnte eine Steigerung der Succinatmenge um ca. 40 % durch die Erhöhung der Pyruvat-Carboxylase Aktivität um den Faktor 7-8 gemeinsam mit der Deletion des Gens der  $\beta$ -Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase im genetisch veränderten *Y. lipolytica* Stamm H222-AK10 (*mcPYC  $\Delta$ scs2*) erzielt werden. Unter Verwendung von Glycerol als C-Quelle wurde eine Erhöhung der Succinatbildung der Transformante H222-AK10 im Vergleich zum Wildtyp von  $5,1 \pm 0,7$  g/l auf  $8,7 \pm 1,6$  g/l nachgewiesen. Die Raum-Zeit-Ausbeute dieses Hefestammes verdoppelte sich von  $11,9 \pm 1,3$  mg/l\*h auf  $21,9 \pm 2,5$  mg/l\*h. Es wurde jedoch nicht nur eine erhöhte Succinatausbeute für H222-AK10 nachgewiesen, sondern allgemein ein gesteigerter Gesamtsäuregehalt. Dementsprechend wurde für die Bildung von Malat,  $\alpha$ -Ketoglutarat und Pyruvat ebenfalls eine 40 %ige Steigerung im Vergleich zu H222 bestimmt. Eine Erhöhung der Sekretion organischer Säuren gelang hingegen nicht durch den alleinigen Verlust der Succinyl-CoA Synthetase Aktivität in den Stämmen H222-AK4 (*scs1::URA3*), H222-AK8 (*scs2::URA3*) und H222-AK9 (*scs1::URA3  $\Delta$ scs2*) oder durch die alleinige Aktivitätserhöhung der Pyruvat-Carboxylase in H222-AK1 (*mcPYC*), sondern nur durch eine Kombination der beiden genetischen Veränderungen in dem Stamm H222-AK10 (*mcPYC  $\Delta$ scs2*). Letzterer zeigte neben der

erhöhten Pyruvat-Carboxylase Aktivität ebenfalls eine Verdopplung der Isocitrat-Lyase Aktivität verglichen mit dem Wildtyp H222. Die erhöhte Isocitrat-Lyase Aktivität in H222-AK10 weist auf eine gesteigerte Aktivität des Glyoxylatzyklus hin, da die Isocitrat-Lyase das Schlüsselenzym des Glyoxylatzyklus ist. Durch die fünffach erhöhte Pyruvat-Carboxylase Aktivität wurde vermutlich zusätzlich die Succinatsynthese über den Glyoxylatzyklus gesteigert. Eventuell wurde durch die erhöhte Pyruvat-Carboxylase Aktivität gemeinsam mit der Deletion von *SCS2* vermehrt C<sub>4</sub>-Körper sowohl in den TCC als auch in den Glyoxylatzyklus eingeschleust, in Folge dessen eine verstärkte Succinatsynthese begünstigt wurde.

Des Weiteren wurde ein *Y. lipolytica* Stamm erzeugt, der durch die Überexpression der für die Succinyl-CoA Synthetase kodierenden Gene *SCS1* und *SCS2* charakterisiert ist. Diese Veränderung führte jedoch nicht zu einer Erhöhung der Succinatproduktion. Die Transformante H222-AK2 (*mcSCS1 mcSCS2*) bildete unter den gleichen Kultivierungsbedingungen durchschnittlich 2 g/l weniger Succinat als der Wildtyp ( $5,1 \pm 0,7$  g/l). Folglich betrug die Succinatausbeute von H222-AK2  $2,8 \pm 0,4$  g/l. Auch die zusätzliche Erhöhung der Pyruvat-Carboxylase Aktivität um den Faktor 4 in der Transformante H222-AK3 (*mcPYC mcSCS1 mcSCS2*) konnte den negativen Effekt der erhöhten Gen-Dosen von *SCS1* und *SCS2* auf die Succinatsynthese nicht aufheben. Dementsprechend wurden für H222-AK3 eine Succinatausbeute von  $3,1 \pm 0,3$  g/l bestimmt. Da für diese Transformanten (H222-AK2:  $0,08 \pm 0,01$  g/h\*OD<sub>600</sub>; H222-AK3:  $0,09 \pm 0,01$  g/h\*OD<sub>600</sub>) eine mit dem Wildtyp ( $0,11 \pm 0,02$  g/h\*OD<sub>600</sub>) vergleichbare Produktivität für Succinat nachgewiesen wurde, wurde vermutet, dass das verlangsamte Wachstum von H222-AK2 und H222-AK3 Ursache für die verringerte Succinatausbeuten war. Das verlangsamte Wachstum dieser Hefestämme ist wahrscheinlich durch einen Glutamatmangel, bedingt durch einen erhöhten  $\alpha$ -Ketoglutaratbedarf des TCC, begründet. Eine erhöhte Succinyl-CoA Synthetase Aktivität führte eventuell zu einem gesteigerten Succinyl-CoA-Verbrauch und resultierte somit in einem erhöhten Succinyl-CoA- und  $\alpha$ -Ketoglutaratbedarf.

Mit dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Succinatsynthese in *Y. lipolytica* durch die Erhöhung der Pyruvat-Carboxylase Aktivität gemeinsam mit der Deletion des Gens der  $\beta$ -Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase um 40 % erhöht werden kann. Des Weiteren wurde der negative Einfluss der erhöhten Gen-Dosen von *SCS1* und *SCS2* auf die Succinatbildung dargestellt. Für eine industrielle biotechnologische Anwendung der Transformante H222-AK10 müssten zukünftige Arbeiten eine genetische Optimierung für

eine weitere Steigerung der Succinatsynthese verbunden mit der gleichzeitigen Reduktion des Nebenproduktspektrums beinhalten. Am vielversprechenden ist die Reduktion der Succinat-Dehydrogenase Aktivität, wodurch die Succinatausbeute erhöht und das Nebenproduktspektrum reduziert werden könnte. Ebenfalls interessant sind die Einflüsse der Plasmamembrantransporter und der mitochondrialen Transporter auf die Produktion organischer Säuren von *Y. lipolytica*. Des Weiteren müsste in weiterführenden Arbeiten die Übertragung des Produktionsprozesses in den Bioreaktor verbunden mit der Optimierung der Kultivierungsbedingungen erfolgen.

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	VI
Tabellenverzeichnis .....	IX
Abkürzungsverzeichnis .....	XI
1. Einleitung .....	1
1.1. Bernsteinsäure, Succinat .....	1
1.2. Succinat als Zwischenprodukt des Tricarbonsäurezyklus .....	3
1.2.1. Die Enzyme des TCC in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	5
1.2.2. Succinatbildung im TCC durch die Succinyl-CoA Synthetase .....	6
1.2.3. Pyruvat-Carboxylase .....	7
1.3. Succinat als Endprodukt des Glyoxylatzyklus .....	9
1.4. Biotechnologische Herstellung von Succinat .....	10
1.4.1. Succinatproduktion mit <i>Actinobacillus succinogenes</i> und <i>Anaerobiospirillum succiniproducens</i> .....	11
1.4.2. Succinatproduktion mit <i>Corynebacterium glutamicum</i> .....	12
1.4.3. Succinatproduktion mit <i>Escherichia coli</i> .....	12
1.4.4. <i>Yarrowia lipolytica</i> als potentieller Succinatproduzent .....	15
1.5. <i>Yarrowia lipolytica</i> .....	15
1.6. Zielstellung .....	18
2. Material und Methoden .....	20
2.1. Geräte .....	20
2.2. Chemikalien, Biochemikalien und Nukleinsäuren .....	21
2.2.1. Feinchemikalien .....	21
2.2.2. Enzyme .....	22
2.2.3. Verbrauchsmaterialien und Kitsysteme .....	23
2.3. Verwendete Plasmide .....	23

2.4. Konstruierte Plasmide .....	24
2.5. Oligonukleotide .....	25
2.6. Mikroorganismen .....	26
2.6.1. <i>Escherichia coli</i> .....	26
2.6.2. <i>Yarrowia lipolytica</i> .....	27
2.7. Kultivierung.....	27
2.7.1. Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> .....	27
2.7.2. Kultivierung von <i>Yarrowia lipolytica</i> .....	28
2.8. Gentechnische Methoden .....	29
2.8.1. Genomische DNA-Isolierung.....	29
2.8.2. Agarose-Gelelektrophorese .....	29
2.8.3. Polymerase Kettenreaktion.....	30
2.8.4. Verdau der DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	31
2.8.5. DNA-Aufreinigung.....	31
2.8.6. Plasmidisolierung aus <i>Escherichia coli</i> .....	31
2.8.7. Dephosphorylierung .....	31
2.8.8. Ligation.....	32
2.8.9. Transformation elektrokompenter <i>Escherichia coli</i> Zellen.....	32
2.9. Plasmidkonstruktion.....	33
2.9.1. Konstruktion der Expressionskassette für die Überexpression des Pyruvat-Carboxylase kodierenden Gens .....	33
2.9.2. Konstruktion der Expressionskassetten für die Überexpression der Gene der $\alpha$ - und $\beta$ - Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase.....	34
2.9.3. Konstruktion der Deletionskassette des für die $\alpha$ -Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase kodierenden Gens.....	35
2.9.4. Konstruktion der Deletionskassette des für die $\beta$ -Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase kodierenden Gens.....	36
2.9.5. Sequenzierung konstruierter Plasmide .....	36

2.10. Transformation von <i>Yarrowia lipolytica</i> Zellen.....	37
2.10.1. Transformation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mittels der LiAc-Methode .....	37
2.10.1.1. Herstellung chemisch kompetenter <i>Yarrowia lipolytica</i> Zellen .....	37
2.10.1.2. Transformation chemisch kompetenter Hefezellen .....	37
2.10.2. Herstellung elektrokompenter <i>Yarrowia lipolytica</i> Zellen.....	38
2.10.3. Elektrotransformation von <i>Yarrowia lipolytica</i> .....	38
2.11. Southern Blot.....	39
2.11.1. Transfer der DNA auf eine Nylonmembran.....	39
2.11.2. Sondenherstellung .....	39
2.11.3. Immunologische Detektion .....	40
2.11.4. Strippen der Southern Blot Membran.....	40
2.12. Biochemische Methoden .....	41
2.12.1. Ernte und Aufschluss der Hefezellen .....	41
2.12.2. Aktivitätsbestimmung der Citrat-Synthase.....	41
2.12.3. Aktivitätsbestimmung der Aconitase .....	41
2.12.4. Aktivitätsbestimmung der NADP-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase .....	42
2.12.5. Aktivitätsbestimmung der NAD-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase.....	42
2.12.6. Aktivitätsbestimmung der $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase.....	43
2.12.7. Aktivitätsbestimmung der Succinyl-CoA Synthetase .....	43
2.12.8. Enzymatische Mitochondrienpräparation.....	46
2.12.9. Aktivitätsbestimmung der Succinat-Dehydrogenase .....	47
2.12.10. Aktivitätsbestimmung der Fumarase .....	47
2.12.11. Aktivitätsbestimmung der Malat-Dehydrogenase .....	48
2.12.12. Aktivitätsbestimmung der Isocitrat-Lyase.....	48
2.12.13. Aktivitätsbestimmung der Pyruvat-Carboxylase .....	48
2.12.14. Proteinbestimmung .....	49
2.13. Mikroskopische Bestimmung der Zellmorphologie.....	49
2.14. Kultivierung.....	49

2.14.1. Bestimmung der optischen Dichte.....	50
2.14.2. Animpfen der Hauptkultur .....	50
2.14.3. Succinatproduktionsmedium .....	50
2.14.4. Kultivierung unter Thiaminlimitation .....	51
2.14.5. Kultivierung unter Stickstofflimitation .....	52
2.14.6. Bestimmung organischer Säuren mittels Ionenchromatographie.....	52
2.15. Bioinformatik .....	53
3. Ergebnisse.....	54
3.1. Überexpression des Pyruvat-Carboxylase kodierenden Gens .....	54
3.2. Überexpression der Succinyl-CoA Synthetase kodierenden Gene .....	58
3.2.1. Bestimmung der Succinyl-CoA Synthetase Enzymaktivität.....	61
3.2.2. Bestimmung der spezifischen Aktivität weiterer Enzyme .....	61
3.3. Überexpression der für die Pyruvat-Carboxylase und Succinyl-CoA Synthetase kodierenden Gene .....	63
3.3.1. Bestimmung der spezifischen Aktivitäten der Enzyme des TCC und der PYC sowie der ICL.....	66
3.4. Deletion der Succinyl-CoA Synthetase Gene.....	68
3.4.1. Bestimmung der Succinyl-CoA Synthetase Enzymaktivität.....	72
3.4.2. Bestimmung weiterer spezifischer Enzymaktivitäten .....	73
3.5. Überexpression des Gens der Pyruvat-Carboxylase gemeinsam mit der Deletion des Gens für die $\beta$ -Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase.....	74
3.5.1. Bestimmung der spezifischen Aktivitäten von Enzymen des TCC, sowie der PYC und ICL.....	76
3.6. Morphologische Veränderungen der Transformanden.....	78
3.7. Produktion organischer Säuren im Succinatproduktionsmedium .....	80
3.9.1 Bestimmung der PYC-, ICL- und SDH-Aktivitäten während der Kultivierung im Succinatproduktionsmedium .....	87
3.8. $\alpha$ -Ketoglutarat-, Pyruvat- und Fumaratproduktion unter Thiaminlimitation .....	90
3.9. Citrat- und Isocitratproduktion unter Stickstofflimitation.....	96

4.	Diskussion .....	100
4.1.	Auswahl einer geeigneten C-Quelle für die Succinatproduktion .....	101
4.2.	Reduktion der Succinatproduktion von <i>Yarrowia lipolytica</i> .....	102
4.3.	Genetische Veränderungen, für die kein Einfluss auf die Succinatproduktion von <i>Yarrowia lipolytica</i> nachgewiesen wurde .....	106
4.3.1.	Überexpression des Pyruvat-Carboxylase kodierenden Gens .....	107
4.3.2.	Deletion der Succinyl-CoA Synthetase Gene .....	108
4.4.	Erhöhung der Succinatproduktion von <i>Yarrowia lipolytica</i> .....	112
4.5.	Auswirkungen auf die Produktion anderer organischer Säuren .....	119
4.5.1.	$\alpha$ -Ketoglutarat-, Pyruvat- und Fumaratproduktion unter Thiaminlimitation .....	119
4.5.2.	Citrat- und Isocitratproduktion unter Stickstofflimitation .....	121
4.6.	Morphologische Veränderungen .....	122
4.6.1.	Koloniemorphologie .....	122
4.6.2.	Zellmorphologie .....	124
	Literaturverzeichnis .....	126

**Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1. 1: Schematische Darstellung des Tricarbonsäurezyklus.....	4
Abbildung 1. 2: Schematische Darstellung des Glyoxylatzyklus. ....	10
Abbildung 2.1: Aufbau der multicopy Plasmide p64PT und p64T.....	33
Abbildung 3. 1: Nachweis der Überexpression des <i>PYC</i> kodierenden Gens in H222-S4 mittels Southern Hybridisierung.....	55
Abbildung 3. 2: Wachstum der Transformanden mit einer Mehrfachintegration der <i>PYC</i> - Expressionskassette verglichen mit dem Wachstum von H222.. ....	55
Abbildung 3. 3: Kinetik der spezifischen Pyruvat-Carboxylase Aktivität der Transformanden mit einer Mehrfachintegration der <i>PYC</i> -Expressionskassette im Vergleich zu dem Wildtyp H222.....	56
Abbildung 3. 4: Darstellung der spezifischen Aktivitäten der Enzyme des TCC sowie der ICL und der <i>PYC</i> für die Transformande H222-AK1 ( <i>mcPYC</i> ) im Vergleich zu den jeweiligen Enzymaktivitäten des Wildtyps. ....	57
Abbildung 3. 5: Southern Hybridisierung als Nachweis für die Überexpression der Gene der $\alpha$ - und der $\beta$ -Untereinheit der SCS in H222-S4.....	60
Abbildung 3. 6: Wachstum der Transformande H222-AK2 ( <i>mcSCS1 mcSCS2</i> ) im Vergleich zu dem Wildtyp H222 während der Kultivierung im Minimalmedium mit 1 % Glucose.....	62
Abbildung 3. 7: Darstellung der spezifischen Aktivitäten der Enzyme des TCC sowie der ICL und der <i>PYC</i> für die Transformande H222-AK2 ( <i>mcSCS1 mcSCS2</i> ) im Vergleich zum Wildtyp H222.....	62
Abbildung 3.8: Southern Hybridisierung der Transformande H222-AK3 mit der Überexpression von <i>PYC</i> , <i>SCS1</i> und <i>SCS2</i> .....	64
Abbildung 3.9: Charakteristisches Wachstum der Transformanden H222-AK3-3, H222-AK3- 4 und H222-AK3-7 im Vergleich zu dem Wildtyp H222.....	64
Abbildung 3.10: Spezifische <i>PYC</i> Aktivitäten der Transformanden H222-AK3-3, H222-AK3- 4, H222-AK3-7 im Vergleich zu dem Wildtyp H222.....	65
Abbildung 3.11: Darstellung der spezifischen Aktivitäten verschiedener Enzyme der Transformande H222-AK3 ( <i>mcPYC mcSCS1 mcSCS2</i> ) im Vergleich zum Wildtyp H222.....	67

---

Abbildung 3. 12: Southern Hybridisierung für den Nachweis der Deletion des Gens der $\alpha$ -Untereinheit der SCS ( <i>SCS1</i> ) durch die homologe Rekombination der Deletionskassette.....	68
Abbildung 3. 13: Nachweis der Deletion des Gens der $\beta$ -Untereinheit der SCS ( <i>SCS2</i> ) in dem Ausgangsstamm H222-41 mittels Southern Hybridisierung..	70
Abbildung 3. 14: Southern Hybridisierung für den Nachweis der <i>SCS2</i> Deletion in H222-S4. .....	71
Abbildung 3. 15: Southern Hybridisierung für den Nachweis der zusätzlichen Deletion des Gens der $\alpha$ -Untereinheit der SCS in dem Stamm H222-AK7 ( $\Delta$ <i>scs2</i> )..	72
Abbildung 3. 16: Darstellung der spezifischen Enzymaktivitäten der Transformanden H222-AK4 ( <i>scs1::URA3</i> ), H222-AK8 ( <i>scs2::URA3</i> ) und H222-AK9 ( <i>scs1::URA3</i> $\Delta$ <i>scs2</i> ) im Vergleich zu dem Wildtyp H222. ....	74
Abbildung 3. 17: Southern Blot Analyse der Überexpression von <i>PYC</i> in dem <i>SCS2</i> deletierten Stamm H222-AK7..	75
Abbildung 3.18: Verlauf der spezifischen Pyruvat-Carboxylase Aktivität der Transformanden H222-AK10-1 und H222-AK10-2 im Vergleich zum Wildtyp H222.....	76
Abbildung 3.19: Darstellung der spezifischen Enzymaktivitäten der Transformande H222-AK10 ( <i>mcPYC</i> $\Delta$ <i>scs2</i> ) im Vergleich zu dem Wildtyp H222. ....	77
Abbildung 3.20: Mikroskopie der Zellen aus dem mittleren Bereich sowie dem Randbereich der Kolonien von H222 und H222-AK9 ( <i>scs1::URA3</i> $\Delta$ <i>scs2</i> )..	78
Abbildung 3.21: Mikroskopie der Zellen der konstruierten Transformanden und des Wildtyps H222.....	79
Abbildung 3. 22: Wachstum und Succinatproduktion des Wildtyps H222 im Succinatproduktionsmedium mit 10% Glucose und 10 % Glycerol als C-Quellen.....	81
Abbildung 3. 23: Charakteristisches Wachstum sowie Basenverbrauch der Transformanden und des Wildtyps H222 im Succinatproduktionsmedium mit 10 % Glycerol.. .....	82
Abbildung 3.24: Repräsentatives Wachstum und Succinatproduktion der Transformande H222-AK10 ( <i>mcPYC</i> $\Delta$ <i>scs2</i> ) im Vergleich zu dem Wildtyp H222.....	84
Abbildung 3.25: Darstellung der spezifischen <i>PYC</i> Aktivität der ausgewählten Transformanden sowie des Wildtyps während der Kultivierung mit Succinatproduktionsmedium.....	88

---

Abbildung 3.26: Darstellung der spezifischen Isocitrat-Lyase Aktivitäten während der Kultivierung von <i>Y. lipolytica</i> Stämmen in 100 ml Succinatproduktionsmedium mit 10 % Glycerol.....	89
Abbildung 3.27: Darstellung der spezifischen Succinat-Dehydrogenase Aktivitäten der konstruierten <i>Y. lipolytica</i> Stämme in 100 ml Succinatproduktionsmedium mit 10 % Glycerol.....	90
Abbildung 3.28: Charakteristisches Wachstum der Transformanden H222-AK4 ( <i>scs1::URA3</i> ), H222-AK8 ( <i>scs2::URA3</i> ), H222-AK9 ( <i>scs1::URA3 Δscs2</i> ) und H222-AK10 ( <i>mcPYC Δscs2</i> ) verglichen mit dem Wildtyp H222 unter thiaminlimitierten Bedingungen bestimmt mittels OD <sub>600</sub> und der Zellzahl. ....	91
Abbildung 3.29: Basenverbrauch der Transformanden H222-AK4 ( <i>scs1::URA3</i> ), H222-AK8 ( <i>scs2::URA3</i> ), H222-AK9 ( <i>scs1::URA3 Δscs2</i> ) und H222-AK10 ( <i>mcPYC Δscs2</i> ) gegenüber dem Wildtyp H222 im thiaminlimitiertem Medium mit 10 % Glucose.....	92
Abbildung 3.30: Wachstumskinetik und Basenverbrauch der Transformanden H222-AK1 ( <i>mcPYC</i> ), H222-AK2 ( <i>mcSCS1 mcSCS2</i> ) und H222-AK3 ( <i>mcPYC mcSCS1 mcSCS2</i> ) im Vergleich zum Wildtyp H222.....	93
Abbildung 3. 31: Wachstum und Basenverbrauch der Transformanden sowie des Wildtyps H222 unter stickstofflimitierten Bedingungen.....	97
Abbildung 4. 1: 2-Methylcitrat Weg in <i>Y. lipolytica</i> .....	111
Abbildung 4. 2: Hypothetische Succinatsynthese in dem <i>Y. lipolytica</i> Stamm H222-AK10 ( <i>mcPYC Δscs2</i> ).....	115

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1. 1: Anwendungsbereiche der Hauptderivate von Succinat.....	2
Tabelle 1. 2: Succinatproduzenten, die von industriellem Interesse sind..	14
Tabelle 2. 1: Überblick über die verwendeten Plasmide.....	23
Tabelle 2. 2: Übersicht über alle in dieser Arbeit konstruierten Plasmide.....	24
Tabelle 2. 3: Aufstellung der verwendeten Oligonukleotide..	25
Tabelle 2. 4: Verwendete und konstruierte <i>Y. lipolytica</i> Stämme.....	27
Tabelle 2. 5: Zusammenfassung der Komponenten der jeweiligen Reaktionsansätze für die PCR, abhängig von der verwendeten Polymerase. ....	30
Tabelle 2. 6: Darstellung der Reaktionsbedingungen der PCR in Abhängigkeit von der verwendeten Polymerase.....	31
Tabelle 2. 7: Reaktionsansatz für die Aktivitätsbestimmung der NADP-abhängigen Isocitrat-Dehydrogenase.....	42
Tabelle 2. 8: Reaktionsansatz für die Aktivitätsbestimmung der NAD-abhängigen Isocitrat-Dehydrogenase.....	42
Tabelle 2. 9: Reaktionsansatz für die Aktivitätsbestimmung der $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase.....	43
Tabelle 2. 10: Reaktionsansatz für die Aktivitätsbestimmung der Succinyl-CoA Synthetase mittels der Messung von TNB .....	43
Tabelle 2. 11: Reaktionsansatz für die direkte Aktivitätsbestimmung der SCS .....	44
Tabelle 2. 12: Reaktionsansatz für die Aktivitätsbestimmung der Succinyl-CoA Synthetase mittels der Messung der entstehenden Esterbindung zwischen Succinat und CoA.....	44
Tabelle 2. 13: Reaktionsansatz für die Aktivitätsbestimmung der Rückreaktion der SCS gekoppelt mit den Enzymaktivitäten der Pyruvat-Kinase und der Lactat-Dehydrogenase.....	45
Tabelle 2. 14: Reaktionsansatz für die Aktivitätsbestimmung der SCS beruhend auf der Hydroxamat-Methode.....	45
Tabelle 2. 15: Reaktionsansatz für die Aktivitätsbestimmung der Isocitrat-Lyase.....	48
Tabelle 2. 16: Reaktionsansatz für die Aktivitätsbestimmung der Pyruvat-Carboxylase.....	49
Tabelle 2. 17: Zusammensetzung des Succinatproduktionsmediums.....	51
Tabelle 2. 18: Zusammensetzung des thiaminlimitierten Mediums .....	51

Tabelle 2. 19: Zusammensetzung des stickstofflimitierten Kultivierungsmediums .....	52
Tabelle 2. 20: Trennparameter der IC-Quantifizierung organischer Säuren, einschließlich der jeweiligen Retentionszeiten (min). .....	53
Tabelle 3. 1: Darstellung der maximalen Konzentration von Succinat, Malat und $\alpha$ -Ketoglutarat sekretiert von den konstruierten <i>Y. lipolytica</i> Stämmen während der Kultivierung in 100 ml Succinatproduktionsmedium mit 10 % Glycerol. ....	83
Tabelle 3. 2: Darstellung der maximal sekretierten Mengen von Pyruvat und Fumarat von den konstruierten <i>Y. lipolytica</i> Stämme während der Kultivierung in 100 ml Succinatproduktionsmedium mit 10 % Glycerol. ....	86
Tabelle 3. 3: Produktion organischer Säuren der konstruierten <i>Y. lipolytica</i> Transformanden im Vergleich zu dem Wildtyp H222 während der Kultivierung unter Thiaminmangel. ....	94
Tabelle 3. 5: Darstellung der von den konstruierten <i>Y. lipolytica</i> Stämme unter Stickstoffmangel produzierten organischen Säuren, Citrat und Isocitrat. ....	98
Tabelle 4. 1: Enzymaktivitäten der Transformanden H222-AK1 ( <i>mcPYC</i> ), H222-AK9 ( <i>scs1::URA3 <math>\Delta</math>scs2</i> ) und H222-AK10 ( <i>mcPYC <math>\Delta</math>scs2</i> ) im Vergleich mit H222 während der Kultivierung für die Succinatproduktion mit 10 % Glycerol nach 312 h.....	113
Tabelle 4. 2: Wachstumsparameter und Succinatproduktion von H222-AK10 ( <i>mcPYC <math>\Delta</math>scs2</i> ) im Vergleich zum Wildtyp H222.....	113

**Abkürzungsverzeichnis**

Abb.	Abbildung
ACO	Aconitase
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
AKG-DH	$\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase
bp	Basenpaar
BSA	Bovine Serum Albumin, Rinderserumalbumin
ca.	circa
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CoA	Coenzym A
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
CS	Citrat-Synthase
DCIP	2,6-Dichlorphenol-indophenol-natrium
dH <sub>2</sub> O	einfach entionisiertes Wasser
ddH <sub>2</sub> O	zweifach entionisiertes Wasser
DTNB	5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)
EtOH	Ethanol
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FUM	Fumarase
GBL	$\gamma$ -Butyrolaceton
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HK	Hauptkultur
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IC	Ionenchromatograph
ICL	Isocitrat-Lyase

---

IDH	NAD-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase
IDP	NADP-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase
kb	Kilobasen
KKP	Kalium/Dikaliumphosphatpuffer
LB-Medium	Luria-Bertani medium
LDH	Lactat-Dehydrogenase
mc	multicopy
MDH	Malat-Dehydrogenase
MG	Minimalmedium mit Glucose als C-Quelle
MS	Malat-Synthase
$\mu$	Wachstumsrate ( $\text{h}^{-1}$ )
NAD	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NMP	N-Methylpyrrolidon
N-Quelle	Stickstoffquelle
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFL	Pyruvat-Formiat-Lyase
ptsG	Glucose spezifische Phosphotransferase
PEP	Phosphoenolpyruvat
PEPC	Phosphoenolpyruvat-Carboxylase
PET	Polyethylenterephthalat
PMS	Phenazinmethosulfat
PT	Promotor-Terminator
PUT	Promotor- <i>loxR-URA3-loxP</i> -Terminator
PYC	Pyruvat-Carboxylase
r	Produktbildungsgeschwindigkeit ( $\text{g/h} \cdot \text{OD}_{600}$ )
RT	Raumtemperatur

RZA	volumenspezifische Raum-Zeit-Ausbeute (g/l*h)
SCS	Succinyl-CoA Synthetase
SDH	Succinat-Dehydrogenase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOC	Super Optimal Broth
Tab.	Tabelle
TCC	Tricarbonsäurezyklus
TNB	5-Thio-2-Nitrobenzoesäure
UE	Untereinheit
VK	Vorkultur
z.B.	zum Beispiel
ZNG	Zellnassgewichtes

## 1. Einleitung

### 1.1. Bernsteinsäure, Succinat

Bernsteinsäure, auch Succinylsäure genannt, ist eine farblose, kristalline, aliphatische Butandisäure. Sie wurde erstmals 1546 von Georgius Agricola bei der trockenen Destillation von Bernstein entdeckt. Diese Säure ist nicht nur in Bernstein zu finden sondern auch in geringen Mengen im Terpentin einiger Nadelhölzer, in manchen Braunkohlen, Lattich, Wermut sowie in Mohn. Das Anion der Bernsteinsäure ( $^-\text{OOC}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$ ) wird als Succinat bezeichnet.

Gegenwärtig erfolgt die Herstellung von Succinat zur Verwendung als Ausgangsstoff für Tenside, Polyesterharze, Farbstoffe, Pharmazeutika und Lebensmittel (Lebensmittelzusatzstoff E363) ausschließlich auf petrochemischer Basis ausgehend von Butan. Aufgrund der kostenintensiven Herstellung umfasst der spezielle chemische Markt für Succinat nur 15.000 t/Jahr (Zeikus *et al.*, 1999; McKinlay *et al.*, 2007). Es besteht allerdings die Möglichkeit einer Marktausweitung auf bis zu 270.000 t/Jahr durch eine kostengünstige biotechnologische Synthese von Succinat (Zeikus *et al.*, 1999). Succinat und deren Derivate könnten somit auf den vier Hauptmärkten der Tenside und Detergenzien, der Polymere, der Lebensmittelindustrie sowie der Pharmazeutika einen Jahresumsatz von \$ 400.000.000 erwirtschaften (Zeikus *et al.*, 1999). Aufgrund der gesättigten linearen Dicarbonsäurestruktur besitzt diese Butandisäure das Potential als Grundchemikalie für eine Vielzahl von Substanzen, die derzeit auf Grundlage von Benzen oder anderen Petrochemikalien synthetisiert werden, eingesetzt zu werden. Diese Derivate von Succinat wie 1,4-Butandiol, N-Methylpyrrolidon, Adipinsäure,  $\gamma$ -Butyrolaceton, Diethylsuccinat, lineare kettenförmige Ester oder Tetrahydrofuran sind mit ihren Anwendungsbereichen in Tabelle 1.1 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 1. 1: Anwendungsbereiche der Hauptderivate von Succinat (Zeikus *et al.*, 1999; McKinlay *et al.*, 2007).

Derivat von Succinat	Anwendungsbereich
Lineare kettenförmige Ester	Bestandteil von Ionenaustauschern Plastik (PET) Aromastoffe medizinische Anwendung Tenside für Kosmetika (Natriumlaurylsulfat)
1,4-Butandiol	Lösungsmittel Rohmaterial für Epoxidharze, Polyamide, Polyurethane Ersatz für Glycerol in der Textil- und Papierindustrie
N-Methylpyrrolidon (NMP)	Lösungsmittel in geringen Mengen in medizinischen Produkten wie in aushärtende Knochenersatzmaterialien oder dentale Membranen
Adipinsäure	Nylonvorläufer Rohmaterial für Schmiermittel, Schaumstoff und Lebensmittel
$\gamma$ -Butyrolaceton (GBL)	Lösungsmittel Ausgangsstoff für Pharmazeutika sowie für Chemikalien für die Landwirtschaft
Diethylsuccinat	kann Methylchlorid als Lösungsmittel ersetzen
Tetrahydrofuran	Lösungsmittel Schlüsselbestandteil von Klebern, Druckfarben und Magnetbändern

Vor dem Hintergrund der steigenden Erdölpreise sowie der Erschöpfung der fossilen petrochemischen Rohstoffvorkommen weist eine biotechnologische Succinatsynthese aus nachwachsenden Rohstoffen eine interessante Alternative auf. Eine konkurrenzfähige Succinatsynthese durch Mikroorganismen ist aber nur dann möglich, wenn durch Optimierung eines Produktionsstammes sowie des Kultivierungsmediums eine hohe Succinatkonzentration verbunden mit einer hohen Bildungsrate sowie einer Reduktion bis Eliminierung der Nebenproduktbildung gewährleistet werden kann.

## 1.2. Succinat als Zwischenprodukt des Tricarbonsäurezyklus

Succinat wird im Stoffwechsel von Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen gebildet. Viele anaerobe Mikroorganismen produzieren Succinat als Endprodukt des Energiestoffwechsels. Die aliphatische Butandisäure stellt hingegen während des aeroben Stoffwechsels ein Zwischenprodukt des Tricarbonsäurezyklus dar.

Der Tricarbonsäurezyklus (TCC), auch Citratzyklus oder nach seinem Entdecker Hans Krebs Krebs-Zyklus genannt, dient als amphiboler Stoffwechselweg. Die primäre katabolische Funktion des TCC in aeroben Organismen ist die Oxidation von Acetyl-CoA zu  $\text{CO}_2$ , die Bildung von NADH und weiteren energiereichen Zwischenprodukten für die oxidative Phosphorylierung. Über den anabolischen Stoffwechselweg werden Aminosäuren wie Glutamin, Asparagin und Alanin aus den Zwischenprodukten  $\alpha$ -Ketoglutarat und Oxalacetat des TCC synthetisiert. Lokalisiert ist der TCC in Eukaryonten im Mitochondrium und in Prokaryonten im Cytoplasma.

Dieser Zyklus (Abb. 1.1) kann als der Dritte von vier Schritten im Kohlenhydrat-Katabolismus betrachtet werden. Er findet nach der Glycolyse und der oxidativen Decarboxylierung von Pyruvat statt. Die oxidative Decarboxylierung des aus der Glycolyse stammenden Pyruvats katalysiert die Pyruvat-Dehydrogenase. Dieser Schritt dient der Herstellung von Acetyl-CoA aus Pyruvat und Coenzym A (CoA). Anschließend katalysiert die Citrat-Synthase (CS) die Kondensation von Acetyl-CoA mit Oxalacetat zu Citrat, wobei Coenzym A irreversibel abgespalten wird. Die nachfolgende Isomerisierung von Citrat zu Isocitrat wird von der Aconitase (ACO) katalysiert. Die oxidative Abspaltung von zwei Wasserstoff-Atomen von Isocitrat und die Übertragung dieser auf  $\text{NAD}^+$  werden durch die NAD-abhängige oder durch die NADP-abhängige Isocitrat-Dehydrogenasen (IDH, IDP) durchgeführt. Das dabei entstandene Oxalglutarat bleibt am Enzym gebunden und durchläuft eine Decarboxylierung. Das resultierende  $\alpha$ -Ketoglutarat erfährt eine der Pyruvat-Dehydrogenase Reaktion analoge, irreversible oxidative Decarboxylierung katalysiert durch die  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase (AKG-DH). Das entstandene Succinyl-CoA wird durch die Succinyl-CoA Synthetase (SCS) in einer gekoppelten Reaktion unter Phosphorylierung von GTP oder ATP in Succinat und CoA gespalten. Succinat wird anschließend durch den Membranproteinkomplex der Succinat-Dehydrogenase (SDH) zu Fumarat oxidiert, wobei FAD als Wasserstoffakzeptor fungiert. Diese Reaktion erfolgt unter anaeroben Bedingungen reduktiv, wobei die Fumarat-Reduktase die Umsetzung von Fumarat zu Succinat katalysiert.

Die Fumarase (FUM) lagert in einer stereospezifischen Hydratisierung, die zur Bildung von L-Malat führt, Wasser an das Fumarat an. In dem abschließenden Schritt des TCC katalysiert die Malat-Dehydrogenase (MDH) die Regenerierung von Oxalacetat durch die Oxidation von Malat unter Entstehung von NADH. Dementsprechend lässt sich für den TCC folgende Gesamtbilanz erstellen:

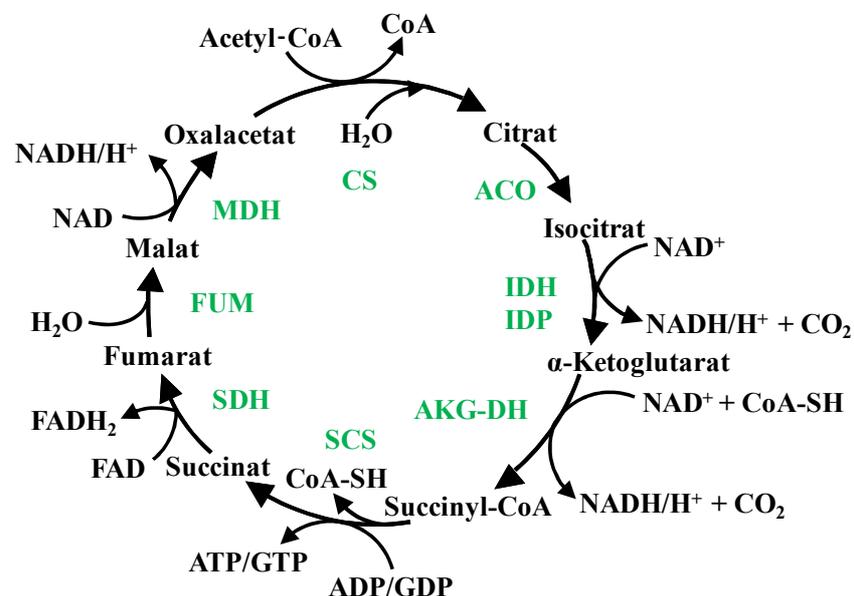


Abbildung 1. 1: Schematische Darstellung des Tricarbonsäurezyklus. Grün sind die Enzyme des TCC hervorgehoben: CS Citrat-Synthase; ACO Aconitase; IDH NAD-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase; IDP NADP-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase; AKG-DH α-Ketoglutarat-Dehydrogenase; SCS Succinyl-CoA Synthetase; SDH Succinat-Dehydrogenase; FUM Fumarase; MDH Malat-Dehydrogenase.

Die Enzyme des TCC übernehmen auch eine wichtige Rolle in den biosynthetischen Prozessen wie der Gluconeogenese, der Aminosäuresynthese sowie der Hämsynthese (Srere *et al.*, 1997; Velot *et al.*, 1997).

### 1.2.1. Die Enzyme des TCC in *Saccharomyces cerevisiae*

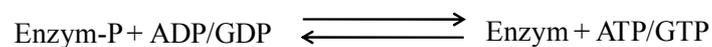
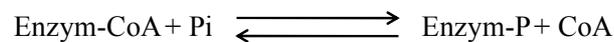
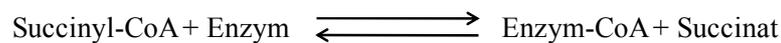
Die neun Enzyme des TCC werden in *Saccharomyces (S.) cerevisiae* durch 17 Gene kodiert (Przybyla-Zawislak *et al.*, 1999). Die Citrat-Synthase, die Aconitase, die NADP-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase, die Fumarase sowie die Malat-Dehydrogenase werden jeweils nur durch ein Gen kodiert (Suissa *et al.*, 1984; McAlister-Henn & Thompson, 1987; Wu & Tzagoloff, 1987; Gangloff *et al.*, 1990; Haselbeck & McAlister-Henn, 1991). Die anderen Enzyme werden durch eine Mehrzahl von Genen kodiert. Die NAD-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase bildet einen Oktamer, bestehend aus je 4 Idh1p und Idh2p Untereinheiten, welche durch *IDH1* und *IDH2* kodiert werden (Cupp & McAlister-Henn, 1991; Cupp & McAlister-Henn, 1992). Aus drei verschiedenen Untereinheiten setzt sich hingegen die  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase zusammen, kodiert durch *KGD1*, *KGD2* und *LPD1* (Ross *et al.*, 1988; Repetto & Tzagoloff, 1989; Repetto & Tzagoloff, 1990). Dabei bildet die Untereinheit Lpd1p ebenfalls eine Komponente der Pyruvat-Dehydrogenase. Die heterodimere Succinyl-CoA Synthetase besitzt eine  $\alpha$ -Untereinheit (*LSC1*) und eine  $\beta$ -Untereinheit (*LSC2*) (Przybyla-Zawislak 1998). Die fünf Gene *SDH1*, *SDH2*, *SDH3*, *SDH4* und *SDH5* kodieren die Untereinheiten der Succinat-Dehydrogenase (Lombardo *et al.*, 1990; Chapman *et al.*, 1992; Bullis & Lemire, 1994; Daignan-Fornier *et al.*, 1994; Hao *et al.*, 2009).

Die einzelne Deletion jedes Gens der Enzyme des TCC in *S. cerevisiae* zeigte, dass die Enzyme des TCC nicht essentiell für das Wachstum auf fermentierbaren C-Quellen sind. Jedoch wiesen fast alle Transformanden einen Wachstumsdefekt auf nicht fermentierbaren C-Quellen auf (McAlister-Henn & Small, 1997; Przybyla-Zawislak *et al.*, 1998; Przybyla-Zawislak *et al.*, 1999; McCammon *et al.*, 2003). Interessanterweise variierte der Wachstumsphänotyp mit der Deletion des betreffenden Gens. Zellen mit einer Deletion von *ACO1*, *SDH1*, *SDH2*, *SDH3*, *SDH4* oder *FUM1* zeigten kein oder nur ein sehr schwaches Wachstum auf nicht fermentierbaren C-Quellen, wie Glycerol, Ethanol, Pyruvat, Lactat und Acetat. Stämme mit einer Deletion von *IDH1*, *IDH2*, *KGD1*, *KGD2* oder *LPD1* waren hingegen fähig Ethanol, Glycerol und Pyruvat zu verwerten. Das Wachstum auf allen untersuchten nicht fermentierbaren C-Quelle, außer Acetat, wurde für die Stämme mit einer Deletion von *CIT1* oder *MDH1* beobachtet. Die Mutanten mit einem Verlust von *SCS1* oder *SCS2* wuchsen hingegen auf allen untersuchten nicht fermentierbaren C-Quellen (Przybyla-Zawislak *et al.*, 1999). Zwei wesentliche Gründe wurden für das unterschiedliche Wachstum der Transformanden angeführt. Zum einen wurde die unterschiedliche Umsetzung der verschiedenen C-Quellen, besonders bezogen auf die Entstehung (z. B. von AMP oder

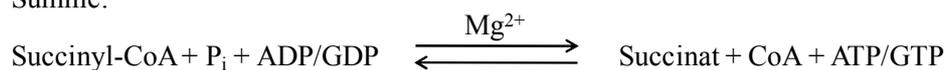
NADH) oder auf den Verbrauch (z. B. CoA) verschiedener Zwischenprodukten angegeben (Przybyla-Zawislak *et al.*, 1999). Durch die Deletion entsprechender Gene des TCC wurden vermutlich diese Unterschiede verstärkt. Zum anderen wurde in Betracht gezogen, dass einige Transformanten fähig waren, den entstandenen Defekt durch einen alternativen Stoffwechselweg zu umgehen und dadurch die entsprechenden C-Quelle zu verwerten (Przybyla-Zawislak *et al.*, 1999).

### 1.2.2. Succinatbildung im TCC durch die Succinyl-CoA Synthetase

Die Succinyl-CoA Synthetase, auch als Succinat Thiokinase oder Succinyl-CoA Ligase beschrieben, katalysiert die Bildung von NTP unter aeroben Bedingungen und die Synthese von Succinyl-CoA für anabole Reaktionen. Dieses mitochondriale heterodimere Enzym wurde erstmals aus dem Schweineherzen isoliert (Hift *et al.*, 1953; Cha & Parks, 1964) und vermittelt die Hydrolyse von Succinyl-CoA zu Succinat in drei Teilreaktionen (Ramaley *et al.*, 1967):



Summe:



Die eukaryontische SCS kann sowohl ATP als auch GTP abhängig sein. Es wurde postuliert, dass die ATP-abhängige SCS (A-Form) in den TCC involviert ist, wohingegen das GTP-abhängige Enzym (G-Form) während des Ketokörperabbaus und der Hämsynthese aktiv wird (Jenkins & Weitzman, 1986; Jenkins & Weitzman, 1988; Studart-Guimaraes *et al.*, 2007). Die A-Form wurde erstmals aus *Escherichia (E.) coli* isoliert (Ramaley *et al.*, 1967; Gibson *et al.*, 1967) und die GTP-abhängige SCS wurde zuerst aus Schweineherzen und Rattenleber gereinigt (Cha & Parks, 1964; Ball & Nishimura, 1980). Die SCS Aktivität in *E. coli* wird unabhängig von der NTP-Abhängigkeit durch Guanin- und Adenin-Nukleotide reguliert (Birney *et al.*, 1996). Die Phosphorylierung der  $\alpha$ -Untereinheit wird stimuliert durch ATP/GTP, Succinyl-CoA und  $\text{P}_i$  in der Gegenwart geringer Konzentrationen von ADP/GDP (Birney *et al.*, 1997). Bei hohen ADP/GDP Konzentrationen bindet ADP/GDP an das

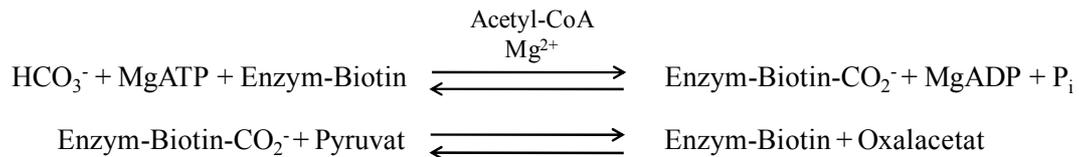
katalytische Zentrum. Die Belegung mit ADP/GDP hemmt die Phosphoenzymbildung und erhöht gleichzeitig die Dephosphorylierung des Phosphoenzyms und somit die Bildung von ATP/GTP (Birney *et al.*, 1996). Aufgrund der allosterischen ADP/GDP-Regulierung wird dieses Enzym als vierter Kontrollpunkt des TCC betrachtet. Folglich nimmt die SCS neben der Citrat-Synthase, der Isocitrat-Dehydrogenase und der  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase eine Schlüsselrolle im TCC ein (Birney *et al.*, 1997).

Mittels Gelfiltration gelang es, die  $\alpha$ - und die  $\beta$ -Untereinheit der SCS aus *E. coli* zu isolieren (Pearson & Bridger, 1975a). Ein Dimer, zusammengesetzt aus den beiden Untereinheiten bildet gemeinsam mit einem weiteren Dimer die tetramere SCS in *E. coli* (Mann *et al.*, 1991). Das katalytische Zentrum des Enzyms konnte in verschiedenen Untersuchungen zwischen den beiden Untereinheiten lokalisiert werden (Pearson & Bridger, 1975a; Pearson & Bridger, 1975b; Nishimura, 1986; Majumdar *et al.*, 1991). Ein Verlust der Enzymaktivität wurde durch die Modifizierung des Histidinrestes der  $\alpha$ -Untereinheit oder der Modifizierung einer der drei Tryptophanreste der  $\beta$ -Untereinheit verursacht. Als endgültiger Beweis für die Lokalisation des katalytischen Zentrums diente, dass durch das Zusammenbringen der jeweiligen modifizierten Untereinheit mit einer intakten zweiten Untereinheit keine SCS Aktivität gemessen wurde (Nishimura, 1986; Majumdar *et al.*, 1991). Des Weiteren wurde eine ATP-Phosphorylierung der  $\alpha$ -Untereinheit unabhängig von der Anwesenheit der  $\beta$ -Untereinheit nachgewiesen. Die Phosphorylierung der  $\alpha$ -Untereinheit wurde jedoch durch die Anwesenheit der  $\beta$ -Untereinheit, wahrscheinlich aufgrund einer resultierenden Konformationsänderung, verstärkt (Pearson & Bridger, 1975b).

### 1.2.3. Pyruvat-Carboxylase

Aufgrund der anabolischen Funktion des TCC, kommt es zu einem Verlust von Zwischenprodukten. Ausgeglichen wird dieser Verlust zum einen durch anaplerotische Reaktionen katalysiert durch die Pyruvat-Carboxylase (PYC) oder die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PEPC) und zum anderen über die Reaktionen des Glyoxylatzyklus.

Utter und Keech (1960) beschrieben zuerst das Enzym, welches die Umsetzung von Pyruvat zu Oxalacetat katalysiert. Die PYC katalysiert diese Reaktion in zwei Schritten. Diese zwei Schritte beinhalten eine ATP-abhängige Carboxylierung des an das Enzym kovalent gebundenen Biotins und die anschließende Übertragung der Carboxylgruppe auf ein Pyruvatmolekül (Branson & Attwood, 2000):



Als katalytisches Enzym liegt die Pyruvat-Carboxylase als Tetramer, Dimer oder Monomer vor, wobei vier identische Untereinheiten die häufigste Form darstellen (Warren & Tipton, 1974). Dieses hochkonservierte Enzym ist in Pilzen, Bakterien, Pflanzen und höheren Organismen zu finden. Es agiert zum einen als Schlüsselenzym der Regulation der Gluconeogenese von Lactat und Alanin und zum anderen nimmt dieses Enzym eine anaplerotische Rolle in Verbindung mit dem TCC ein (Morris *et al.*, 1987; Warren & Tipton, 1974). Lokalisiert ist die PYC in *S. cerevisiae* und *Aspergillus (A.) nidulans* im Cytosol und in Wirbeltieren im Mitochondrium (Rohde *et al.*, 1986). Unterschiede zeigen sich ebenfalls in der Wirkung von Acetyl-CoA auf die PYC (Rohde *et al.*, 1986). Zum einen weist Acetyl-CoA einen stabilisierenden Effekt auf die quartäre Struktur der PYC der Hühnerleber (Mayer *et al.*, 1980) sowie auf das Enzym in *A. nidulans* auf (Osmani *et al.*, 1984). Zum anderen ist eine vollständig aktive PYC in *S. cerevisiae* in Abwesenheit von Acetyl-CoA zu finden. Ihre Reaktionsgeschwindigkeit wird jedoch in der Gegenwart von Acetyl-CoA verdoppelt (Cazzulo *et al.*, 1968; Branson & Attwood, 2000). Eine Hemmung des Enzyms auf Grund einer Konformationsänderung kann durch Aspartat oder Oxalacetat erzielt werden (Rohde *et al.*, 1986).

In *S. cerevisiae* wurden zwei Isoenzyme (PYC1, PYC2) der PYC nachgewiesen, deren Aktivität durch das Wachstum sowie durch die C-Quelle beeinflusst wird (Walker *et al.*, 1991; Brewster *et al.*, 1994; Branson & Attwood, 2000). Es wurde eine konstante Aktivität der PYC1 während der exponentiellen Wachstumsphase gemessen, wohingegen eine hohe PYC2 Aktivität nur in der frühen Wachstumsphase beobachtet wurde (Brewster *et al.*, 1994). Außerdem wurde ein deutlicher Einfluss der genutzten N-Quelle auf die PYC1 Aktivität nachgewiesen, wohingegen die PYC2 Aktivität durch die eingesetzten N-Quellen nicht beeinflusst wurde (Huet *et al.*, 2000). PYC1 wurde durch Aspartat, Glutamat und Glutamin gehemmt. Arginin, Threonin, Leucin und Methionin führten hingegen zu einer Erhöhung der PYC1 Aktivität (Huet *et al.*, 2000). Eine Nullmutationen einer der beiden Isoenzyme resultierte nur in eine Reduktion der PYC Aktivität um 10-20 % (Walker *et al.*, 1991). Transformanden mit den Deletionen beider Isoenzyme konnten, aufgrund der fehlenden anaplerotischen Funktion für den TCC, keine Glucose verwerten (Huet *et al.*, 2000). Bisher

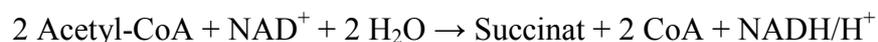
wurde nur das Isoenzym PYC2 in *S. cerevisiae* überexprimiert. Dies führte während der Kultivierung in glucoselimitiertem Medium zu einer erhöhten Malatproduktion (Bauer *et al.*, 1999).

### 1.3. Succinat als Endprodukt des Glyoxylatzyklus

Succinat wird ebenfalls im Glyoxylatzyklus gebildet und anschließend durch cytosolische Enzyme der Gluconeogenese umgesetzt oder in den TCC als Intermediat eingeschleust.

Der Glyoxylatzyklus wurde in Pflanzen, Pilzen, diversen Mikroorganismen, Protozoen, Mollusken und Insekten nachgewiesen (Vanni *et al.*, 1990). Weitere Untersuchungen zeigten das Vorhandensein des Glyoxylatzyklus auch bei Säugern, jedoch begrenzt auf spezielle Organe oder bestimmte Entwicklungsstadien (Davis *et al.*, 1990; Popov *et al.*, 1998). Dieser anaplerotische Stoffwechselweg wird bei der Verwertung von C<sub>2</sub>-Körpern (Acetat, Ethanol) oder anderen Substraten (Fettsäuren, n-Alkane), die über Acetyl-CoA abgebaut werden, induziert.

Innerhalb des Glyoxylatzyklus wird die Synthese von Succinat aus Acetyl-CoA und Oxalacetat ermöglicht (Abb. 1.2). Zunächst wird Acetyl-CoA, analog zu dem TCC, mit Hilfe der Citrat-Synthase durch Kondensation mit Oxalacetat in Citrat umgewandelt. Die Aconitase katalysiert die Umsetzung von Citrat zu Isocitrat. Anschließend wird Isocitrat durch die Isocitrat-Lyase (ICL) in Succinat und Glyoxylat gespalten. Letzteres wird abschließend durch die Malat-Synthase (MS) mit einem weiteren Molekül Acetyl-CoA zu Malat und CoA umgesetzt. Succinat fließt nach dem Transport in das Mitochondrium in den TCC ein. Der Glyoxylatzyklus umgeht die beiden Decarboxylierungsreaktionen des TCC und weist folgende Gesamtbilanz auf:



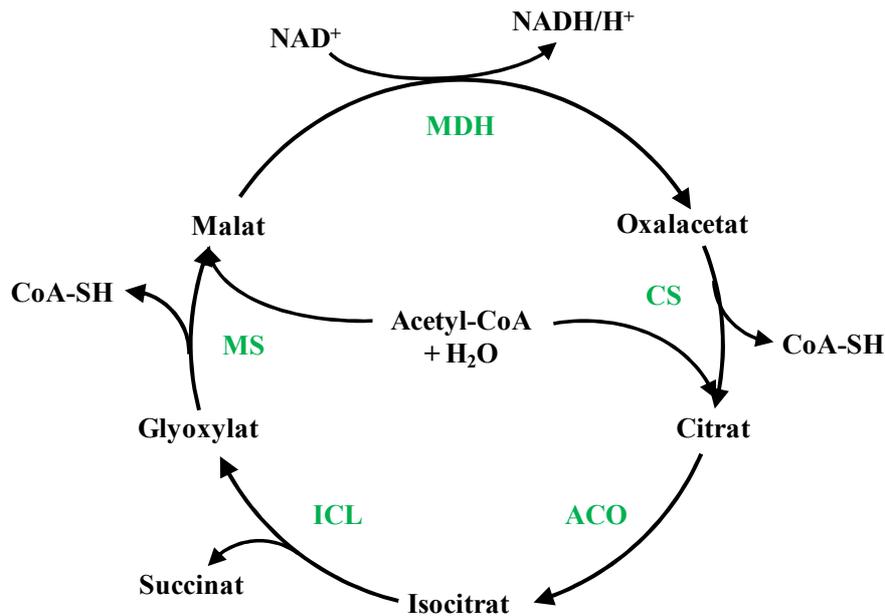


Abbildung 1. 2: Schematische Darstellung des Glyoxylatzyklus. Grün sind die einzelnen Enzyme des Zyklus gekennzeichnet. MDH Malat-Dehydrogenase; CS Citrat-Synthase; ACO Aconitase; ICL Isocitrat-Lyase; MS Malat-Synthase. (Darstellung modifiziert nach Richter (1998))

Die Enzyme des Glyoxylatzyklus sind bei Eukaryonten in den Peroxisomen lokalisiert. Eine Ausnahme bilden dabei die Enzyme von *S. cerevisiae*. Diese befinden sich nicht wie bei anderen Hefen (*Candida tropicalis* und *Ashbya gossypii* (Kawachi *et al.*, 1996; Maeting *et al.*, 1999) in den Peroxisomen, sondern im Cytosol (Chaves *et al.*, 1997).

#### 1.4. Biotechnologische Herstellung von Succinat

Bereits 1980 wurde das Potential der mikrobiellen Succinatsynthese für die Industrie entdeckt. Die erste fermentative Produktion von Succinat aus Kohlenhydraten wurde mit anaeroben Bakterien für chemische Ausgangsmaterialien der petrochemischen Industrie, durchgeführt. Unter anaeroben Bedingungen erfolgt die Succinatbildung auf dem reduktiven Weg. Dieser Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Weg führt ausgehend von Phosphoenolpyruvat über Oxalacetat zu Fumarat und abschließend zu Succinat. Die maximale Succinatausbeute ist unter streng anaeroben Bedingungen abhängig von der Anzahl der Reduktionsäquivalente, welche abhängig vom Substrat ist. Ein mol Glucose liefert z. B. zwei mol NADH, wobei zwei mol NADH für ein mol Succinat benötigt werden.

Eine Vielzahl von Bakterien und Pilzen produzieren Succinat, jedoch meist in einem Gemisch mit Ethanol, Lactat, Acetat, Formiat oder Propionat. Succinat stellt nur bei wenigen Produzenten das Hauptprodukt des Stoffwechsels dar. Ein Beispiel sind die aus den Pansen von Rindern isolierten Gram-negativen Bakterien *Anaerobiospirillum (A.) succiniproducens* und *Actinobacillus (A.) succinogenes*.

#### 1.4.1. Succinatproduktion mit *Actinobacillus succinogenes* und *Anaerobiospirillum succiniproducens*

Zu den vielversprechendsten Succinatproduzenten für die industrielle Produktion zählen derzeit *A. succiniproducens* und *A. succinogenes*. Die Succinatausbeute von 50,3 g/l und eine Produktionsrate von 2,1 g/l\*h wurde für *A. succiniproducens* bestimmt (Glassner & Datta, 1992). Für *A. succinogenes* wurde hingegen eine gesteigerte Succinatausbeute von 94-106 g/l nachgewiesen, welche jedoch eine mit *A. succiniproducens* vergleichbare Produktionsrate von 2-2,8 g/l\*h aufwies (Guettler *et al.*, 1996). Die Übertragung der Batch-Fermentation in einen Membran basierenden Bioreaktor resultierte in einer deutlichen Steigerung der Produktionsrate auf bis zu 6,63 g/l\*h für *A. succinogenes* (Kim *et al.*, 2009). Die Kultivierung mit diesem Bioreaktor wies jedoch durch Kontaminationen sowie bei der Wahl der geeigneten Membran erhebliche Probleme auf. Für *A. succiniproducens* wurde hingegen die höchste Succinatausbeute von 50,3 g/l durch die Steigerung der Wachstumsrate, resultierend aus einer Begasung mit CO<sub>2</sub>, erzielt. Die erhöhte CO<sub>2</sub>-Konzentration ermöglichte eine höhere PEPC Aktivität und resultierte in einer erhöhten Succinatkonzentration (Samuelov *et al.*, 1991; Glassner & Datta, 1992). Ein weiterer positiver Effekt der CO<sub>2</sub>-Begasung stellte die Hemmung der Lactat-Dehydrogenase und der Ethanol-Dehydrogenase dar. Diese Hemmungen der Enzyme verhinderten die Lactat- und Ethanolbildung in dem betreffenden Stamm.

*A. succiniproducens* und *A. succinogenes* bilden jedoch nicht nur Succinat, sondern ebenfalls Acetat, wodurch negative Auswirkungen auf die Reinigungsprozesse von Succinat entstehen. Ebenfalls nachteilig für die industrielle Succinatproduktion ist die Vergiftung von *A. succiniproducens* und *A. succinogenes* mit erhöhten Glucosemengen, sowie die giftige Wirkung von mehr als 96 g/l Dinatriumsuccinat oder 130 g/l Magnesiumsuccinat auf *A. succiniproducens* (McKinlay *et al.*, 2007). Zudem verursacht *A. succiniproducens* im Menschen eine Bakteriämie, wodurch ein spezieller Umgang mit diesem Bakterium nötig wird. Gegen eine großtechnische Produktion mit diesen Bakterien spricht neben dem streng

anaeroben Charakter von *A. succiniproducens* ebenfalls die bei Pansenbakterien bereits nach kurzer Zeit eintretende Lyse der Zellen (Wells & Russell, 1996; Nghiem *et al.*, 1999).

#### 1.4.2. Succinatproduktion mit *Corynebacterium glutamicum*

Als Alternative zu den Pansenbakterien plant das japanische Research Institute of Innovative Technology for the Earth and Showa Highpolymer das apathogene Gram-positive Bodenbakterium *Corynebacterium (C.) glutamicum* für eine Succinatproduktion von 50.000 t/Jahr einzusetzen (Okino *et al.*, 2008; McKinlay *et al.*, 2007). *C. glutamicum* bildet Succinat unter anaeroben Bedingungen durch die Aktivität der anaplerotischen Enzyme, wie die PYC und die PEPC, verbunden mit der Aktivität der Enzyme des reduktiven TCC. Eine Succinatproduktion zusammen mit Lactat und geringen Mengen Acetat wurde unter anaeroben Bedingungen unter Zugabe von Bicarbonat und Glucose nachgewiesen (Okino *et al.*, 2005; McKinlay *et al.*, 2007). Bicarbonat, das Cosubstrat für die anaplerotische PEPC, bewirkte eine Steigerung des Glucoseverbrauchs. Die erhöhte Verwertung von Glucose resultierte zum einen in einer gesteigerten Produktionsrate organischer Säuren und zum anderen verschob sich das Säureverhältnis von Succinat und Lactat zugunsten von Succinat. Eine Verdopplung der Succinatproduktionsrate auf 3,2 g/l\*h und eine Succinatkonzentration von 146 g/l wurde zusätzlich durch die Deletion des Gens der Lactat-Dehydrogenase und die Überexpression des Pyruvat-Carboxylase kodierenden Gens erzielt (Okino *et al.*, 2008). Somit ist *C. glutamicum* derzeit der vielversprechendste Succinatproduzent für die industrielle Produktion.

#### 1.4.3. Succinatproduktion mit *Escherichia coli*

Erste Untersuchungen für die industrielle mikrobielle Herstellung von Succinat wurden ebenfalls für *E. coli* durchgeführt. *E. coli* produziert geringe Succinatmengen auf dem reduktiven Weg des TCC in einem Gemisch mit Acetat, Ethanol, Lactat und Formiat. *E. coli* wurde erst für die Succinatproduktion in Betracht gezogen, nachdem dessen Succinatsynthese durch genetische Veränderungen deutlich erhöht wurde. Das Einbringen des PYC kodierenden Gens aus *Rhizobium etli* sowie die Deletion der Gene der Lactat-Dehydrogenase (*ldhA*), der Glucose spezifischen Phosphotransferase (*ptsG*) und der Pyruvat-Formiat-Lyase (*pflAB*) ermöglichten es, mit *E. coli* unter anaeroben Bedingungen auf Glucose eine Succinatausbeute von 99,2 g/l verbunden mit einer Produktionsrate von 1,3 g/l\*h zu erreichen

(Vemuri *et al.*, 2002). Die PYC Aktivität erhöhte die Bildung von Oxalacetat, ein wichtiger Ausgangsstoff für die Succinatsynthese (Vemuri *et al.*, 2002). Durch die Deletion der Lactat-Dehydrogenase wurde ein NADH-konkurrierender Weg inaktiviert und somit die NADH-Zufuhr für die Succinatproduktion deutlich gesteigert (Sanchez *et al.*, 2005). Die zusätzliche Deletion der Pyruvat-Formiat-Lyase verhinderte die Formiat-Bildung in *E. coli* (Chatterjee *et al.*, 2001). Die Deletion einer Glucose-spezifischen Phosphotransferase führte zu einem verminderten Phosphoenolpyruvat-Verbrauch während des Glucosetransportes, wodurch dieses für die Succinatsynthese zur Verfügung stand. Ein weiterer positiver Effekt dieser Deletion zeigte sich in einer verringerten Acetatbildung (Donnelly *et al.*, 1998).

Unter aeroben Bedingungen wurden für *E. coli* mit 58,3 g/l deutlich geringere Succinatausbeuten verglichen mit der anaeroben Kultivierung nachgewiesen (Lin *et al.*, 2005). Die Produktionsraten für Succinat unter den jeweiligen Bedingungen waren jedoch vergleichbar mit 1,1 g/l\*h für aerobes und 1,3 g/l\*h für anaerobes Wachstum von *E. coli* (Vemuri *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2005). Die erhöhte aerobe Succinatproduktion wurde ebenfalls mit einem genetisch optimierten *E. coli* Stamm ermöglicht. Die Integration des PEPC kodierenden Gens aus *Sorghum vulgare* führte in *E. coli* zu einer gesteigerten Oxalacetatsynthese für den TCC (Lin *et al.*, 2005). Außerdem wurde die NADH-Limitierung durch eine zusätzliche Aktivierung des Glyoxylatzyklus verringert. Die Expression der Enzyme des Glyoxylatzyklus (Isocitrat-Lyase, Malat-Synthase) wird in *E. coli* während des Wachstums auf Acetat induziert. Nach der Induktion wird der Fluss des Isocitrats durch den Glyoxylatzyklus teilweise durch die Phosphorylierung der NAD-abhängigen Isocitrat-Dehydrogenase reguliert. Die Phosphorylierung der IDH wird von der IDH-Kinase/Phosphatase katalysiert. Das Gen der IDH-Kinase/Phosphatase (*aceK*) ist zusammen mit den für die Isocitrat-Lyase (*aceA*) und für die Malat-Synthase (*aceB*) kodierenden Gene auf einem Operon (*aceBAK*) lokalisiert. Das Repressorprotein, kodiert durch das *iclR* Gen, kontrolliert die Expression des Operons (Sunnarborg *et al.*, 1990). Folglich wurde die Aktivierung des Glyoxylatzyklus durch die Deletion des ICLR-Transkriptionsrepressors erzielt (Sanchez *et al.*, 2006). Zusätzlich wurde durch die Deletion der Succinat-Dehydrogenase erreicht, dass Succinat das Endprodukt des TCC bildet. Ferner bewirkte die Deletion der kodierenden Gene für die Pyruvat-Oxidase (*poxB*), der Acetat-Kinase (*ackA*) sowie der Phosphotransacetylase (*pta*) eine Unterdrückung der Acetatproduktion. Wie in dem *E. coli* Stamm für die anaerobe Succinatproduktion wurde ebenfalls in diesem Stamm für die aerobe Succinatproduktion eine Glucose spezifische Phosphotransferase zerstört.

Der Einsatz von *E. coli* Stämmen für die industrielle Herstellung von Succinat unter anaeroben Bedingungen weist jedoch einige Nachteile auf. Zum einen ist eine Zwei-Phasen-Kultivierung für das Erreichen der maximalen Succinatausbeute notwendig. Diese Zwei-Phasen-Kultivierung umfasst eine zu Beginn aerobe Wachstumsphase, für die Biomassegewinnung, mit anschließender anaerober Produktionsphase. Die zusätzliche CO<sub>2</sub>-Begasung des Mediums verursacht weitere Kosten (Vemuri *et al.*, 2002). Zum anderen erfolgt die Kultivierung der *E. coli* Stämme im Medium mit Hefeextrakt und Trypton, welche in großen Mengen sehr teuer sind. Des Weiteren benötigen alle Stämme, in denen Gene überexprimiert werden, Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid als Induktor der Expression des jeweiligen Gens, wodurch die Produktionskosten zusätzlich erhöht werden.

Tabelle 1. 2: Succinatproduzenten, die von industriellem Interesse sind. Dargestellt sind die erzielten maximalen Succinatausbeuten sowie die zugehörigen Produktionsraten bezogen auf eine Succinatbildung des betreffenden Produzenten auf Glucose.

Produzent	Ausbeute (g/l)	Produktionsrate (g/l*h)	Referenz
<b>anaerobe Bedingungen</b>			
<i>A. succiniproducens</i>	50,3	2,1	(Glassner & Datta, 1992)
<i>A. succinogenes</i>	94-106	2,0-2,8	(Guettler <i>et al.</i> , 1999)
<i>C. glutamicum (mcPYC Aldh)</i>	146	3,2	(Okino <i>et al.</i> , 2008)
<i>E. coli (<math>\Delta</math>pflAB <math>\Delta</math>ldhA <math>\Delta</math>ptsG mcPYC)</i>	99,2	1,3	(Vemuri <i>et al.</i> , 2002)
<b>aerobe Bedingungen</b>			
<i>E. coli (<math>\Delta</math>sdhAB <math>\Delta</math>ack-pta <math>\Delta</math>poxB <math>\Delta</math>iclR <math>\Delta</math>ptsG mcPEPC)</i>	58,3	1,1	(Lin <i>et al.</i> , 2005)

Zusammenfassend wird deutlich, dass nur eine geringe Anzahl von Bakterien derzeit für eine industrielle Succinatproduktion in Betracht gezogen wird (Tab. 1.2). Außerdem wurde eine hohe Succinatausbeute gemeinsam mit einer hohen Produktionsrate nur für die kostenintensive anaerobe Kultivierung gezeigt. Die aerobe Succinatproduktion mit *E. coli* weist hingegen eine zu geringe Succinatausbeute verbunden mit hohen Produktionskosten auf. Da die bisherigen Succinatsynthesen sehr kostenintensiv sind, wird nach weiteren potentiellen aeroben Succinatproduzenten gesucht, deren Succinatausbeute durch genetische Veränderungen und Optimierung der Kultivierung deutlich steigerbar ist.

#### 1.4.4. *Yarrowia lipolytica* als potentieller Succinatproduzent

Die aerobe nicht-konventionelle Hefe *Yarrowia (Y.) lipolytica* besitzt die Eigenschaft hohe Mengen von organischen Säuren wie Citrat, Isocitrat,  $\alpha$ -Ketoglutarat und Pyruvat zu sekretieren (Stottmeister *et al.*, 1982; Barth & Gaillardin, 1997; Fickers *et al.*, 2005; Förster *et al.*, 2007a). Eine Succinatbildung von bis zu 0,5 g Säure/g Biotrockenmasse mit *Y. lipolytica* ist bereits für das stickstofflimitierte Wachstum mit Ethanol als C-Quelle nachgewiesen worden (Kamzolova *et al.*, 2009). Allein durch die Optimierung der Kultivierungsbedingungen konnte in vorangegangenen Arbeiten die Produktion der entsprechenden organischen Säuren von *Y. lipolytica* erheblich gesteigert werden (Chernyavskaya *et al.*, 2000; Fickers *et al.*, 2005; Förster *et al.*, 2007a). So wurde die Citratausbeute von *Y. lipolytica* auf Saccharose durch eine Stickstofflimitierung des Mediums verbunden mit der Überexpression des Gens der Isocitrat-Lyase auf bis zu 140 g/l mit einer Produktivität von 0,73 g/l\*h gesteigert (Förster *et al.*, 2007a). Die höchste Citratausbeute von 250 g/l wurde mit Sonnenblumenöl als C-Quelle nachgewiesen (Stottmeister & Hoppe, 1991; Kruse *et al.*, 2004). Ein Thiaminmangel im Produktionsmedium bewirkte hingegen eine erhöhte Sekretion von  $\alpha$ -Ketoglutarat von 49 g/l mit einer Produktivität von 0,0045 g/g\*h während des Wachstums mit Ethanol als C-Quelle (Chernyavskaya *et al.*, 2000). Durch den Einsatz von Alkanen als C-Quelle wurde die  $\alpha$ -Ketoglutaratausbeute auf 195 g/l gesteigert (Weissbrodt *et al.*, 1989; Fickers *et al.*, 2005). Dies zeigt, dass *Y. lipolytica* ein großes Potential für die gesteigerte Succinatproduktion besitzt und somit für die industrielle Succinatproduktion von großem Interesse ist.

#### 1.5. *Yarrowia lipolytica*

Die dimorphe hemiascomycetale Hefe *Yarrowia lipolytica* (van der Walt & von Arx, 1980) ist ebenfalls unter dem Namen *Saccharomycopsis* (Yarrow & Ahearn, 1971), *Endomycopsis* (Wickerham *et al.*, 1970) oder *Candida lipolytica* (Skipton *et al.*, 1974) bekannt. Sie gilt als eine intensiv studierte nicht-konventionelle Hefe, deren biotechnologische Bedeutung vor allem für die chemische Industrie und die Nahrungsmittelproduktion stark gestiegen ist.

*Y. lipolytica* nimmt unter den Ascomyceten eine Sonderrolle ein, da sie den höheren Eukaryonten in einigen Eigenschaften näher steht als anderen Hefen (Barth & Gaillardin, 1997; Barns *et al.*, 1991; Ohkuma *et al.*, 1993; Kurtzman & Robnett, 1998). Sie unterscheidet

sich in einem höheren GC-Gehalt von 49 % (Casaregola *et al.*, 2000), in einer hohen Anzahl von Intronsequenzen (Gellissen *et al.*, 2005), einer ungewöhnlichen Struktur der rDNA (Clare *et al.*, 1986), durch eine fehlenden RNA-Polymerase I Consensussequenz (van Heerikhuizen *et al.*, 1985) sowie durch die den höheren Eukaryonten ähnlichen 7S RNA und small nuclear RNA (Poritz *et al.*, 1988; Roiha *et al.*, 1989) von anderen Hefen.

Als dimorphe Hefe ist *Y. lipolytica* fähig, sowohl Hefezellen, Pseudohyphen und Septumhyphen auszubilden (van der Walt & von Arx, 1980; Barth & Gaillardin, 1996). Die Hefezellen sind sphäroid, ellipsoid bis länglich geformt. Echtes Mycel besteht aus septierten Hyphen mit bis zu mehreren  $\mu\text{m}$  Längen. Die Mycelentwicklung kann durch einen Mangel an Magnesiumsulfat oder Eisenchlorid, ebenso wie durch die Zugabe von Cystein und reduziertem Glutathion gehemmt werden (Barth & Gaillardin, 1996). Die Koloniemorphologie ist stark abhängig von den Wachstumsbedingungen, wie Belüftung, C- und N-Quelle oder dem pH-Wert sowie dem genetischen Hintergrund des kultivierten Stammes (Rodriguez & Dominguez, 1984; Barth & Gaillardin, 1996). Die Sporulation diploider *Y. lipolytica* Zellen wird durch den Glucoseverbrauch induziert und durch Citrat verstärkt (Barth & Weber, 1985).

Die Entwicklung einer Vielzahl von gentechnischen und molekularbiologischen Methoden sowie die vollständige Sequenzierung des Genoms von *Y. lipolytica* vereinfachten die genetische Veränderung dieser Hefe (<http://www.genolevures.org/>, (Casaregola *et al.*, 2000; Dujon *et al.*, 2004). So wurden bereits verschiedene integrative und replikative Vektoren für *Y. lipolytica* beschrieben (Heslot, 1990; Barth & Gaillardin, 1996; Le Dall *et al.*, 1994; Juretzek *et al.*, 2001). Als Markergene (*LEU2*, *URA3*, *TRP1*) finden meist Gene der Biosynthese in *Y. lipolytica* Anwendung, die die entsprechende chromosomale Mutation komplementieren (Barth & Gaillardin, 1996; Cheon *et al.*, 2003; Madzak *et al.*, 2004; Madzak *et al.*, 2005).

Aufgrund der zunehmenden Entwicklung genetischer Methoden, der hohen genetischen Stabilität, der evolutionären Ähnlichkeit zu höheren Eukaryonten sowie der ausschließlich aeroben Lebensweise wird *Y. lipolytica* zunehmend als Modellorganismus genutzt. Neben der generellen Untersuchung des Metabolismus von Triglyceriden, n-Alkanen und Fettsäuren (Wang *et al.*, 1999; Mauersberger *et al.*, 2001; Wache *et al.*, 2001; Wache *et al.*, 2003; Fickers *et al.*, 2005) sowie der Morphologie (Rodriguez & Dominguez, 1984; Richard *et al.*, 2001) wird auch die Sekretion von extrazellulärer Proteine und des generellen

Sekretionsweges (Nicaud *et al.*, 2002; Barth *et al.*, 2003; Swennen & Beckerich, 2007) von einer Vielzahl von Gruppen näher charakterisiert. Des Weiteren stellt *Y. lipolytica* ein attraktives System für die Studien der mitochondrialen Atmungskette (Kerscher *et al.*, 2004; Abdrakhmanova *et al.*, 2004; Brandt *et al.*, 2005), der Regulation des Glyoxylatzyklus und des TCC dar (Akiyama *et al.*, 1973; Finogenova *et al.*, 1986; Finogenova *et al.*, 2005).

Die große biotechnologische Bedeutung von *Y. lipolytica* ist durch ihr Vermögen große Mengen von Metaboliten und Proteine sekretieren zu können, durch eine gute Verwertung eines breiten Substratspektrums, insbesondere lipophiler Substrate, eine problemlose Kultivierung im großen Maßstab, ihre hohe mechanische Widerstandsfähigkeit sowie durch ihre Apathogenität zu begründen (Barth & Gaillardin, 1997; Madzak *et al.*, 2004). Neben dem biotechnologischen Einsatz der Hefe für die Sekretion von komplexen Proteinen, wie z.B. homologe alkalische und saure extrazelluläre Proteasen (Matoba *et al.*, 1997; Nicaud *et al.*, 2002; Madzak *et al.*, 2004), eignet sich *Y. lipolytica* besonders für die Gewinnung organischer Säuren (Chernyavskaya *et al.*, 2000; Finogenova *et al.*, 2005; Fickers *et al.*, 2005; Förster *et al.*, 2007a). Weiterhin wird *Y. lipolytica* zur Biotransformation, wie die Hydroxylierung von Lactonen (Aromastoffe; z.B.  $\gamma$ -Decalacton) aus Fettsäuren, eingesetzt (Wache *et al.*, 2001; Wache *et al.*, 2003). Diese Hefe zeigt außerdem das Potential zur Aufbereitung unterschiedlicher industrieller Bei- und Abfallprodukte (Papanikolaou *et al.*, 2002; Lanciotti *et al.*, 2005).

## 1.6. Zielstellung

Eine verwendete biotechnologische Succinatproduktion mit der hohen Ausbeute von 146 g/l findet derzeit unter kostenintensiven anaeroben Bedingungen mit *C. glutamicum* statt. Im Gegensatz dazu wird nur die Hälfte der anaeroben Succinatausbeute (58,3 g/l) unter aeroben Kultivierungsbedingungen mit *E. coli* erzielt. Aufgrund der hohen Kosten der gegenwärtigen biotechnologischen Herstellung von Succinat wird nach weiteren aeroben Succinatproduzenten gesucht. Vor dem Hintergrund, dass die aerobe nicht-konventionelle Hefe *Y. lipolytica* die Fähigkeit besitzt organische Säuren in großen Mengen in das extrazelluläre Medium zu sekretieren, war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, Einflüsse der veränderten Aktivitäten der Succinyl-CoA Synthetase sowie der Pyruvat-Carboxylase auf die Succinatproduktion von *Y. lipolytica* zu untersuchen. Darüber hinaus sollten die Auswirkungen des Verlustes der Succinyl-CoA Synthetase Aktivität sowie der erhöhten Aktivität der Succinyl-CoA Synthetase und der Pyruvat-Carboxylase auf die Produktion anderer organischer Säuren von *Y. lipolytica* überprüft werden. Im Einzelnen waren folgende Aufgabenstellungen zu bearbeiten:

1. Untersuchungen zur Identifizierung eines Einflusses der erhöhten Aktivität der Pyruvat-Carboxylase auf die Produktion organischer Säuren von *Y. lipolytica*. Zu diesem Zweck sollte das für das Enzym kodierende Gen über einen Gen-Dosis Effekt in der Hefe überexprimiert werden. Der Hintergrund zur Auswahl der Pyruvat-Carboxylase als ein möglicher beeinflussender Faktor für die Succinatsynthese war die Überlegung, dass durch eine erhöhte Aktivität des Enzyms vermehrt Oxalacetat in den TCC eingeschleust werden könnte, womit eine verstärkte Sekretion von Succinat in das extrazelluläre Medium erreicht werden sollte.
2. Es sollte überprüft werden, ob durch die Überexpression der für die Succinyl-CoA Synthetase kodierenden Gene gezielt auf die Succinatproduktion der untersuchten Hefe eingewirkt werden kann. Die erhöhte Gen-Dosis der Gene der Succinyl-CoA Synthetase hatte eine Aktivitätssteigerung zum Ziel, in Folge dessen eine erhöhte Hydrolyse von Succinyl-CoA zu Succinat erreicht werden sollte.

3. Aufklärung des Einflusses erhöhter Aktivitäten der Succinyl-CoA Synthetase und der Pyruvat-Carboxylase auf die Succinatproduktion von *Y. lipolytica*. Hierbei sollten die für die Enzyme kodierenden Gene in dieser Hefe überexprimiert werden.
4. Überprüfung der Succinatproduktion von *Y. lipolytica* Stämmen, die einen Verlust der Succinyl-CoA Synthetase Aktivität aufweisen. Zu diesem Zweck sollten die für das Enzym kodierenden Gene sowohl einzeln als auch gemeinsam in dieser Hefe deletiert werden. Durch den Aktivitätsverlust der Succinyl-CoA Synthetase sollte die Succinatsynthese durch den Glyoxylatzyklus untersucht werden.
5. Es sollte nachgewiesen werden, ob eine fehlende Succinyl-CoA Synthetase Aktivität gemeinsam mit einer erhöhten Pyruvat-Carboxylase Aktivität Auswirkungen auf die Produktion von Succinat von *Y. lipolytica* hat. Dafür sollte ein für die Succinyl-CoA Synthetase kodierendes Gen deletiert und das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende Gen durch einen Gen-Dosis Effekt in *Y. lipolytica* überexprimiert werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Geräte

Autoklaven und Sterilisatoren: Tuttnauer Autoclave – Steam Sterilizer Model 2540 EL (Systec), Modell 500 Heißluftsterilisator (Mettler), Varioklav Dampfsterilisator (H+P), Hiclave HV-85L Laboratory Use (HMC)

Brutschränke und Schüttler: Memmert BE500, Heraeus Kühlbrutschrank BK 600, Infors HT Novotron® AK82, Infors HT Multitron®

Elektrophoresesysteme: HE 99X (Hoefer), Maxigel Gelelektrophoresesystem (Biometra), PROT-Resolv MINI-LC Gelelektrophorese-System (Phase), Sub-Cell® GT Electrophoresis Systems (BioRad)

Elektroporationsgeräte: Micropulser™ (BioRad), Easy-Cast Electrophoresis System B1A, Elektrophoresekammer (Peqlab)

pH-Messgeräte: WTW pH526 (für pH4–7) und WTW pH537 (für pH7–10)

Thermocycler: Primus (MWG-Biotech), Primus 96 PLUS (MWG-Biotech), T1-Thermocycler (Biometra), EP Gradient S Thermal Cycler (Eppendorf)

Spektrophotometer: UVIKON 943 Double Beam UV/VIS Spektrophotometer (Kontron Instruments), Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech)

Stromversorgungsgeräte: Electrophoresis Power Supply EPS 3500 (Pharmacia Biotech), PowerNPac 300 (BioRad), Power Pack P25 (Biometra), Electrophoresis Power Supply EV231 (Comsert)

Zentrifugen: Heraeus Biofuge fresco, Heraeus Biofuge fresco pico, Heraeus Sepatech Biofuge 28RS mit den Rotoren HFA 22.2 und HFA 28.1, Heraeus Sepatech Biofuge 15R mit dem Rotor HFA 5.50, Sorvall RC 5C mit den Rotoren SS-34, SLA-1500, SLA-3000, Beckman Optima™ MAX Ultrazentrifuge mit Rotor MLS 50, Sigma 1-15 K, Sigma 3-18 K

Waagen: Sartorius ATICON (0,02g – 620 g), Sartorius TE214S (0,1 mg – 210 g), Kern 770 (0,1 mg – 120 g)

Mikroskope: Olympus Provis, Olympus BX 40

Weitere Geräte: DNA Speed Vac® (Savant), Eppendorf Thermomixer comfort, Kühlthermostat (Techne Tempcold), Blockthermostat BT 100 Kleinfeld Labortechnik, Heidolph Duomax 1030 Kippschüttler, Heidolph Reax 2000 Vortexer, Heidolph MR

3001 Heizplatte, Heraeus HS12/2 Sicherheitswerkbank, Kleinfeld Labortechnik  
 Blockthermostat BT100, Hybridisierungsöfen OV5, Biometra, HB-1000 Hybridizer  
 UVP Laboratory Products, Heizrührer IKAMAG® RH, IKA Labortechnik, Fluor  
 Chem™ SP Alpha Innotech Biozym Scientific GmbH, Ultraviolet Radiation BLX-E  
 254 Fuse Type T, GFL Wasserbad, Tecan Sunrise, Biostep Dunkelhaube DH-30/32,  
 Retsch MM 200 Schwingmühle

## 2.2. Chemikalien, Biochemikalien und Nukleinsäuren

### 2.2.1. Feinchemikalien

Die in dieser Arbeit genutzten Chemikalien und Biochemikalien sind kommerziell erhältlich.

1 kb Leiter	MBI Fermentas
Acetyl-CoA Na-Salz 94 % (HPLC)	Sigma Aldrich
Adenosin 5-Monophosphat von Hefen $\geq 97$ %	Sigma Aldrich
ADP von Bakterien 97 %	Sigma Aldrich
Agar	Roth
Agarose	Biozym
Ampicillin	Roth
4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonylfluoridhydrochlorid	Sigma Aldrich
ATP	Roche
BSA	Roth
Cis-Aconitat $\geq 90$ % (HPLC)	Fluka
Citronensäure-Monohydrat	Applichem
CoA Hydrat von Hefen 85 %	Sigma Aldrich
Cystein-HCl	Merck
2,6-Dichlorphenol-Indophenol-Natrium $\geq 97$ %	Fluka
D,L-Na-Isocitrat	Sigma Aldrich
5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)	Sigma Aldrich
1,4-Dithiothreit	Roth
6-fach Ladepuffer	MBI Fermentas
$\beta$ -Nicotinamid Adenin Dinukleotid Phosphat Natriumsalz 97 %	Sigma Aldrich

NADH 98 %	Roche
dNTP's	MBI Fermentas
Ethidiumbromid	Roth
Glucose-Teststreifen	Kallies Feinchemie AG
GTP Hydratsalz 95 %	Sigma Aldrich
Hering-Sperma DNA	Roche
Hydroxylamin Hydrochlorid 99,99 %	Sigma Aldrich
L-Äpfelsäure $\geq 99$ %	Roth
Malat	Roth
NADH	Roche
Na-Pyruvat $\geq 99$ %	Sigma Aldrich
Na-Succinat	Fluka
2-Ketoglutar säure	Merck
$\alpha$ -Ketoglutarat Na-Salz 98%	Sigma Aldrich
Oxalacetat $\geq 98$ %	Fluka
pH Indikatorstreifen pH 0 – 6 Acilit®	Merck
Phenazinmethosulfat 90 %	Sigma Aldrich
Phenylhydrazin-HCl	Merck
Phosphoenolpyruvat Monokaliumsalz $\geq 98$ %	Fluka
Protease-Inhibitoren-Cocktail (complete™)	Roche
Pyruvat	Sigma Aldrich
Succinyl-CoA Na-Salz $\geq 85$ %	Sigma Aldrich
TEMED	Serva
Thiaminpyrophosphat	Sigma Aldrich
Tween 20	Serva

### 2.2.2. Enzyme

Alkalische Phosphatase	MBI Fermentas
CombiZyme DNA Polymerase	Invitex
Glusulase	Perkin Elmer (Boston)
Lactat-Dehydrogenase	Fluka
Pfx-Polymerase	Invitrogen

Pyruvat-Kinase aus Hasenmuskeln	Fluka
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas
RNaseA	Roth
T4-DNA Ligase	MBI Fermentas
Taq-Polymerase	MBI Fermentas
Zymolyase 20T	ICN

### 2.2.3. Verbrauchsmaterialien und Kitsysteme

JETQUICK Gel Extraction Spin Kit	Genomed
Invisorb spin DNA Extraction Kit 250	Invitek
JETQUICK PCR Purification Spin Kit	Genomed
MSB Spin PCRapace 250	Invitek
JETQUICK Plasmid Miniprep Spin Kit	Genomed
Invisorb Spin Plasmid Mini Two 250	Invitek
JETSORB Gel Extraction Kit	Genomed
JETSTAR Plamid Midiprep Kit	Genomed

## 2.3. Verwendete Plasmide

Die in dieser Arbeit genutzten Plasmide stammten aus der Stammsammlung des Institutes der Allgemeinen Mikrobiologie der TU Dresden.

Tabelle 2. 1: Überblick über die verwendeten Plasmide.

Plasmid	Genotyp	Referenz
pUCBM21	<i>amp<sup>R</sup></i>	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
p64PT	rDNA <i>ura3d4 amp<sup>R</sup> pICL1-ICL1t</i>	(Gerber, 1999)
JMP113	<i>amp<sup>R</sup> URA3</i>	(Fickers <i>et al.</i> , 2003)
pUB4-CRE	<i>hp4d-cre hph ARS68/CEN</i>	(Fickers <i>et al.</i> , 2003)
pINA443	<i>ARS68/CEN URA3 amp<sup>R</sup></i>	(Barth & Gaillardin, 1996)
p64T	rDNA <i>ura3d4 amp<sup>R</sup> verkürzter pICL1-ICL1t</i>	(Holz, 2010)
p65ICL1	rDNA <i>ura3d1 pICL1-ICL1-ICL1t amp<sup>R</sup></i>	Juretzek und Mauersberger, 1998 (unveröffentlicht); (Kruse <i>et al.</i> , 2004)

## 2.4. Konstruierte Plasmide

Die konstruierten Plasmide wurden in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert und sind als Glycerol-Konserve Bestandteil der Stammsammlung des Institutes für Allgemeine Mikrobiologie (Tab. 2.2). Bei allen Plasmiden handelte es sich um integrative Plasmide. Die Expression von plasmidkodierten Proteinen in *Y. lipolytica* erfolgte unter der Kontrolle des jeweiligen authentischen Promotors aus dem Stamm H222.

Tabelle 2. 2: Übersicht über alle in dieser Arbeit konstruierten Plasmide. Die nicht als fehlerfrei deklarierten Plasmide wurden nicht sequenziert.

Plasmid	Genotyp
<b>Überexpression der PYC</b>	
p64PYCa T22	rDNA <i>ura3d4 amp<sup>R</sup> pPYC-PYC-PYc</i> (mit fehlerfreiem <i>PYC</i> )
p64PYCa T97	rDNA <i>ura3d4 amp<sup>R</sup> pPYC-PYC-PYc</i> (mit fehlerfreien <i>pPYC</i> und <i>PYc</i> )
p64PYC	rDNA <i>ura3d4 amp<sup>R</sup> pPYC-PYC-PYc</i> (fehlerfrei)
<b>Überexpression der Gene der <math>\alpha</math>- und <math>\beta</math>-UE der SCS</b>	
p64LSC1	rDNA <i>ura3d4 amp<sup>R</sup> pSCS1-SCS1-SCS1t</i> (fehlerfrei)
p64LSC2 T40	rDNA <i>ura3d4 amp<sup>R</sup> pSCS2-SCS2-SCS2t</i> (mit fehlerfreien <i>pSCS2</i> und <i>SCS2t</i> )
p64LSC2 T28	rDNA <i>ura3d4 amp<sup>R</sup> pSCS2-SCS2-SCS2t</i> (mit fehlerfreien <i>SCS2</i> )
p64LSC2	rDNA <i>ura3d4 amp<sup>R</sup> pSCS2-SCS2-SCS2t</i> (fehlerfrei)
p64LSC	rDNA <i>ura3d4 amp<sup>R</sup> pSCS1-SCS1-SCS1t pSCS2-SCS2-SCS2t</i> (fehlerfrei)
<b>Deletion der Gene der <math>\alpha</math>-UE der SCS</b>	
pLSC1PT	<i>amp<sup>R</sup> pSCS1-SCS1t</i>
pLSC1PUT	<i>amp<sup>R</sup> pSCS1-URA3-SCS1t</i>
<b>Deletion der Gene der <math>\beta</math>-UE der SCS</b>	
pLSC2PT	<i>amp<sup>R</sup> pSC2-SCS2t</i>
pLSC2PUT	<i>amp<sup>R</sup> pSCS2-URA3-SCS2t</i>

## 2.5. Oligonukleotide

Alle eingesetzten Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech bezogen und in Tabelle 2.3 dargestellt.

Tabelle 2. 3: Aufstellung der verwendeten Oligonukleotide. Die Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme sind unterstrichen.

Primer	5' → 3' Sequenz	Restriktions-schnittstelle
<b>Überexpression von <i>PYC</i></b>		
PYCa_for	ATATATAG <u>CATGC</u> CATACGACGACGCGGTTAGTG	<i>PaeI</i>
PYCa_rev	AGGGTCCTCGGTTGTGATTC	
PYCb_for	TGCTGCACAGATCCAGATTG	
PYCb_rev	ATATATA <u>AGATCT</u> AGAGATGCCGTGTCCATTTC	<i>BglII</i>
Sequenzierung:		
S1	GAGACATGTACGCGTGATTC	
S2	GTGCCAGTTACAGCATAGTG	
S3	TTGGCATGATAGTGGTAGGG	
S4	CTCTATGCACCGATTCAAGG	
S5	CCAGAAGGTGGTTGAGATTG	
S6	CTCTGGTTGAGTTCCGAATC	
S7	CTGATAACGCCATTGACCAC	
S8	CAAGGATATGGCTGGTACTC	
S9	CTGGCCCAGTTTATGGTTTC	
S10	CTGGTCTACGAGAGGTCTAC	
S11	CCAAGAGCCCTCATTGTAAC	
S12	CACCCTCTACTCTTCATGTC	
Southern Blot:		
PYC_ORF_for	CGAGCGATT <u>CCTCG</u> AATAAC	
PYC_ORF_rev	CATAAACTGGGCCAGATCAC	
<b>Überexpression von <i>SCS1</i></b>		
092_LSC1_for	ATATAGGAT <u>CCATC</u> ACCGGCGTTAAATTGGG	<i>BamHI</i>
LSC1_r	ATATGGAT <u>CCG</u> CCCAGAGCTGAAAGTAATC	<i>BamHI</i>
Kolonie-PCR:		
09_pLSC1_for	GACGGTATCAGCGTAGCTTC	
09_pLSC1_rev	CTGGATGCTGTAGGCATAGG	
09_p64_for	CTAACGGCAGACTCTACTCC	
Sequenzierung:		
LSC1_S2	AGGTAGAAGGGACGTATAGC	
LSC1_S3	ACCTCCATAGCTCCCTCAAC	
LSC1_S4	CCTTACCACCGGAGATGATG	
LSC1_S5	CTCAATGGCCTCCTCGATAG	
LSC1_S6	AACCCGTGGAGCTGTCATGG	
LSC1_S7	GAATGGCGGAGTACATCTTG	
LSC1_S8	ATGGTCGTTGCCGATTCTTG	
Southern Blot:		
LSC1_ORF_for	GACCGTTGCTACGTTCACTC	
LSC1_ORF_rev	CCCTCTATCGTTGGCCTTTC	

Primer	5' → 3' Sequenz	Restriktions-schnittstelle
<b>Überexpression von <i>SCS2</i></b>		
LSC2_PvuII_for	ATAT <u>CAGCTG</u> AGTAGTGCCCGTAGGAGTAG	<i>PvuII</i>
LSC2_PvuII_rev	ATAT <u>CAGCTG</u> GTAGCTCCTCCGGTCTTTC	<i>PvuII</i>
Kolonie-PCR		
LSC2_r	TTCTGGGCAGCCTCATCAAG	
LSC2_f	TGTTACCCGGCAGTCAACAC	
Sequenzierung:		
LSC2_S2	ATTGCGGTCCGCAGATTTCC	
LSC2_S3	AGTAGTGCGGTGGCAATGAG	
LSC2_S4	CCGTGCTCGTACTATTACAG	
LSC2_S5	CACCACAGTCGAGGAAGTTG	
LSC2_S6	CATGAGGATGGCAACGTAGG	
LSC2_S7	AAGGGACGGCTCAAGAGAAC	
LSC2_S8	GTTGACTGCCGGGTAACAGC	
LSC2_S9	GTACCACCTGCCTCATACTG	
LSC2_S10	CGCCGCTCCAATAATCACTC	
Southern Blot		
LSC2_ORF_for	CCGTGCTCGTACTATTACAG	
LSC2_ORF_rev	TTAGACCGCCAAAGTAGGAC	
<b>Deletion von <i>SCS1</i></b>		
LSC1_Pfor	<u>TAGGGATAACAGGGTAATGTTGCAATGTCGTCGCTCTG</u>	<i>I-SceI</i>
LSC1_Prev	<u>ATCCGCGGAATCGGCAACGACCATAGGG</u>	<i>SacII</i>
LSC1_Tfor	<u>ATCCGCGGATCACC</u> GGCGTTAAATTGGG	<i>SacII</i>
LSC1_Trev	<u>ATTACCCTGTTATCCCTA</u> AAGCGAGACCTGCTCTAGAC	<i>I-SceI</i>
<b>Deletion von <i>SCS2</i></b>		
P1	<u>TAGGGATAACAGGGTAATGACAGCACCAACATGTACAC</u>	<i>I-SceI</i>
P2b	<u>ATATCCGCGGTTGAA</u> ACTCTGCGCATTGGG	<i>SacII</i>
T1	<u>ATTACCCTGTTATCCCTA</u> -ACGAGCACGGGTACATACAG	<i>I-SceI</i>
T2b	ATAT <u>GGGCCCAATGCGACCAACGGAGTCAC</u>	<i>Apal</i>
Southern Blot:		
LSC2_for	TTCTGGGCAGCCTCATCAAG	
LSC2_rev	TGTTACCCGGCAGTCAACAC	

## 2.6. Mikroorganismen

### 2.6.1. *Escherichia coli*

In dieser Arbeit wurde für die Transformationen der konstruierten Plasmide der *E. coli* DH5 $\alpha$  (*supE44*  $\Delta$ *lac U169* ( $\phi$  80 *lacZ*  $\Delta$ *M15*) *hsdR17 recA1end A1 gyrA96 thi-1 relA1*; Gibco-BRL) Stamm verwendet.

### 2.6.2. *Yarrowia lipolytica*

Der *Y. lipolytica* Stamm H222 diente in dieser Arbeit als Wildtyp und deren uracilautotrophen Derivate H222-S4 sowie H222-41 wurden für die Deletion oder Überexpression der verschiedenen Gene eingesetzt. Die konstruierten Stämme sind in Tabelle 2.4 aufgeführt und als Glycerol-Konserven in die Stammsammlung der Allgemeinen Mikrobiologie der TU Dresden überführt.

Tabelle 2. 4: Verwendete und konstruierte *Y. lipolytica* Stämme. Abkürzung: mc – multicopy

Stamm	Genotyp	Referenz
H222	<i>MATA</i> Wildtypstamm	(Barth & Gaillardin, 1996)
H222-41	<i>MATA ura3-41</i>	(Mauersberger <i>et al.</i> , 2001)
H222-S4	<i>MATA ura3-302 SUC2</i>	(Mauersberger <i>et al.</i> , 2001)
Überexpression von <i>PYC</i>		
H222-AK1	<i>MATA ura3-302 SUC2 ura3d4 mcPYC</i>	diese Arbeit
Überexpression von <i>SCS1</i> und <i>SCS2</i>		
H222-AK2	<i>MATA ura3-302 SUC2 ura3d4 mcSCS1 mcSCS2</i>	diese Arbeit
Überexpression von <i>SCS1</i> , <i>SCS2</i> und <i>PYC</i>		
H222-AK3	<i>MATA ura3-302 SUC2 ura3d4 mcPYC mcSCS1 mcSCS2</i>	diese Arbeit
Deletion von <i>SCS1</i>		
H222-AK4	<i>MATA ura3-302 SUC2 scs1::URA3</i>	diese Arbeit
H222-AK5	<i>MATA ura3-302 SUC2 scs1Δ889</i>	diese Arbeit
Deletion von <i>SCS2</i>		
H222-AK6	<i>MATA ura3-41 scs2::URA3</i>	diese Arbeit
H222-AK7	<i>MATA ura3-41 Δscs2</i>	diese Arbeit
H222-AK8	<i>MATA ura3-302 SUC2 scs2::URA3</i>	diese Arbeit
Deletion von <i>SCS1</i> und <i>SCS2</i>		
H222-AK9	<i>MATA ura3-41 scs1::URA3 Δscs2</i>	diese Arbeit
Deletion von <i>SCS2</i> und Überexpression von <i>PYC</i>		
H222-AK10	<i>MATA ura3-41 ura3d4 mcPYC Δscs2</i>	diese Arbeit

## 2.7. Kultivierung

### 2.7.1. Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Kultivierung der *E. coli* Kulturen erfolgte im flüssigem als auch auf festem LB-Medium bei 37 °C.

LB-Medium (Sambrook <i>et al.</i> , 1989):	1 % (w/v)	Bakterienpepton
	0,5 % (w/v)	Hefeextrakt
	1 % (w/v)	NaCl

Ampicillin resistente *E. coli* Stämme wurden durch die Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin zu dem jeweiligen Medium selektiert.

### 2.7.2. Kultivierung von *Yarrowia lipolytica*

Die Hefe *Y. lipolytica* wurde im YPD-Medium bei 28 °C kultiviert. Die Kultivierung wurde sowohl im Flüssigmedium in Erlenmeyerkolben bei 220 rpm als auch auf Festmedium durchgeführt.

YPD (Barth & Gaillardin, 1996):	1 % (w/v)	Hefeextrakt
	2 % (w/v)	Pepton
	2 % (w/v)	Glucose

Des Weiteren fand eine Kultivierung mit Minimalmedium im Schüttelkolben und auf Agarplatten statt. Das Minimalmedium (MG) setzte sich mit einem pH-Wert von 5,0-5,5 aus einfachen Readersalzen, 1 %iger Glucose, 6 mg/l FeSO<sub>4</sub>, 0,3 µg/l Thiamin/HCl und einfachen Spurenelementen zusammen. Für die Komplementierung vorhandener Uracilautotrophie der kultivierten Hefe wurden zu dem Minimalmedium 20 mg/l Uracil zugegeben.

10-fach Readersalze	Spurenelemente
modifiziert nach Mauersberger <i>et al.</i> (1996):	(Stammlösung 1000-fach):
30 g/l (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	500 µg/l H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
10 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	40 µg/l CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O
1,6 g/l K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3 H <sub>2</sub> O	100 µg/l KI
7 g/l MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	400 µg/l MnSO <sub>4</sub> x 4 H <sub>2</sub> O
5 g/l NaCl	200 µg/l Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
4 g/l Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	400 µg/l ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
	6000 µg/l FeCl <sub>3</sub> x 6 H <sub>2</sub> O

FeCl<sub>3</sub> extra zugesetzt, 3 g/100 ml in Ethanol gelöst

0,3 mg/l Thiamin/HCl (Stammlösung 1000-fach)

## 2.8. Gentechnische Methoden

Die grundlegenden gentechnischen Methoden wurden nach Sambrook (1989) durchgeführt.

### 2.8.1. Genomische DNA-Isolierung

Die genomische DNA-Isolierung wurde modifiziert nach Hoffman & Winston (1987) angewendet. Für diese Isolierung wurde der betreffende Hefestamm über Nacht in 10 ml YPD bei 28°C bis zum Erreichen der stationären Phase kultiviert. Nachdem die Zellen zentrifugiert (3.500 rpm, 5 min, Raumtemperatur (RT)) und mit destilliertem Wasser gewaschen wurden, erfolgte für den mechanischen Aufschluss die Zugabe von Glaskügelchen (Ø 0,25-0,5 mm, Roth). Der Ansatz wurde mit 200 µl TEST-Puffer und 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) ergänzt und 3 min geschüttelt. Anschließend wurden 200 µl TE-Puffer hinzugefügt und der gesamte Ansatz zentrifugiert (13.000 rpm, 5 min, RT). Die wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und 400 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol hinzugegeben. Nach einer guten Durchmischung und der Zentrifugation (13.000 rpm, 5 min, RT) erfolgte das zweimalige Versetzen der wässrigen Phase mit 400 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1). Anschließend wurde zu der wässrigen Phase 1 ml 99 %ige Ethanol und 40 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) gegeben und die genomische DNA bei -20 °C für mindestens 20 min gefällt. Das getrocknete Pellet wurde in HPLC-Wasser gelöst. Für den RNA-Abbau wurden 100 µg/ml RNaseA (10 mg/ml) hinzugegeben und bei 37 °C für mindestens 1 h inkubiert. Abschließend erfolgte die Konzentrationsbestimmung mittels Gelelektrophorese.

TEST-Puffer:	10 mM Tris/HCl	TE-Puffer:	10 M Tris/HCl
	1 mM EDTA		1 mM EDTA
	2 % (v/v) TritonX-100		pH 8
	1% (v/v) SDS		

### 2.8.2. Agarose-Gelelektrophorese

Die Bestimmung der DNA-Konzentration sowie die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgten mittels Agarose-Gelelektrophorese. Die Elektrophorese wurde mit 0,8 %igem Agarosegel versetzt mit 2 µl/100 ml Ethidiumbromid in einfachem TAE-Puffer bei 10 V/cm<sup>2</sup>

durchgeführt. Die Proben wurden mit einfachem Ladebuffer oder 8 % Glycerol versetzt, bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden. Als Molekulargewichtsmarker diente ein 1 kb DNA-Marker von MBI Fermentas.  $\lambda$ -DNA in entsprechenden Verdünnungen wurde für die Bestimmung der Konzentration der DNA eingesetzt. Nach der Elektrophorese wurde der DNA-Ethidiumbromid Komplex mit einem UV-Transilluminator (Biostep) bei einer Wellenlänge von 312 nm detektiert. Die Konzentration wurde dabei durch den Vergleich der Fluoreszenzintensität der  $\lambda$ -DNA mit der Intensität der Probe ermittelt.

50-facher TAE-Puffer:	242 g/l	Tris
	57,1 ml/l	Eisessig
	100 ml/l	0,5 M EDTA pH 8

### 2.8.3. Polymerase Kettenreaktion

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Dafür wurden verschiedene Oligonukleotide als Primer eingesetzt (Tab. 2.3). Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen wurden durch entsprechende Primer an die gewünschten Enden des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes angefügt. Für analytische Reaktionen wie die Kolonie-PCR wurde die Taq-Polymerase eingesetzt. Polymerasen mit 3'-5'-Korrekturlesefunktion (CombiZyme- und Pfx-Polymerase) wurden für präparative Ansätze angewendet, um die Fehlerrate beim Einbau von Nukleotiden zu verringern. Als Ausgangsmaterial wurde sowohl aufgereinigte genomische DNA aus dem Wildtypstamm H222 als auch Plasmid-DNA eingesetzt. Die Komponenten der jeweiligen Reaktionsansätze unterschieden sich in Abhängigkeit von der ausgewählten Polymerase und sind in Tabelle 2.5 dargestellt. Die jeweiligen Reaktionszeiten, Temperaturen und Volumen wurden je nach Bedarf modifiziert (Tab. 2.6).

Tabelle 2. 5: Zusammenfassung der Komponenten der jeweiligen Reaktionsansätze für die PCR, abhängig von der verwendeten Polymerase.

CombiZyme Polymerase	Pfx-Polymerase	Taq-Polymerase
1-fach OptiPerformPuffer	1-fach PCR-Puffer	1-fach PCR-Puffer
2,5 mM MgCl <sub>2</sub>	2 mM MgSO <sub>4</sub>	1-4 mM MgCl <sub>2</sub>
0,25 mM dNTP	0,4 mM dNTP	0,2 mM dNTP
1 fach PCR-Enhancer	0,5 fach PCR-Enhancer	
0,1 $\mu$ mol/ $\mu$ l Primer I	0,1 $\mu$ mol/ $\mu$ l Primer I	0,1 $\mu$ mol/ $\mu$ l Primer I
0,1 $\mu$ mol/ $\mu$ l Primer II	0,1 $\mu$ mol/ $\mu$ l Primer II	0,1 $\mu$ mol/ $\mu$ l Primer II
50 – 100 ng DNA	50 - 100 ng DNA	50 – 100 ng DNA
4 U CombiZyme Polymerase	2,5 U Pfx-Polymerase	2,5 U Taq-Polymerase

Tabelle 2. 6: Darstellung der Reaktionsbedingungen der PCR in Abhängigkeit von der verwendeten Polymerase. Die Annealingtemperatur wurde in Abhängigkeit von den eingesetzten Oligonukleotiden gewählt.

	CombiZyme Polymerase	Pfx-Polymerase	Taq-Polymerase
Initiale Denaturierung	94 °C 2 min	94 °C 2 min	94 °C 2 min
Zyklen	25	25	25
Denaturierung	94 °C 1 min	94 °C 15 sec	94 °C 1 min
Annealing	55-65 °C 1,5 min	57-57 °C 30 sec	57-60 °C 1 min
Elongation	72 °C 3 kb/min	68 °C 2 kb/min	72 °C 1 kb/min
Terminale Synthese	72 °C 7 min	68 °C 7 min	72 °C 7 min

#### 2.8.4. Verdau der DNA mit Restriktionsendonukleasen

Der enzymatische Verdau von DNA wurde mit den kommerziell erhältlichen Restriktionsendonukleasen von MBI Fermentas (Deutschland) durchgeführt. Die Reaktionspuffer sowie die Inkubationszeiten wurden entsprechend der Herstellerangaben gewählt.

#### 2.8.5. DNA-Aufreinigung

Die Aufreinigung der DNA, erhalten durch eine PCR, einen enzymatischen Verdau oder einer Gelelektrophorese, wurde zu Beginn der Arbeiten mit dem „JETQUICK PCR Purification Spin Kit“ oder dem „JETQUICK Gel Extraction Spin Kit“ und anschließend mit dem „MSB Spin PCRapace 250“ oder dem „Invisorb spin DNA Extraction Kit 250“ durchgeführt.

#### 2.8.6. Plasmidisolierung aus *Escherichia coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde mit Hilfe des „JETSTAR Plasmid Midiprep Kit“ oder dem „JETQUICK Plasmid Miniprep Spin Kit“ sowie dem „Invisorb Spin Plasmid Mini Two 250 Kit“ durchgeführt.

#### 2.8.7. Dephosphorylierung

Um die Religation der verdauten DNA zu vermeiden, wurde die 5'-Phosphatgruppe des betreffenden geschnittenen Plasmides vor der Ligation entfernt. 1 µl der alkalischen Phosphatase sowie einfacher Puffer der Phosphatase wurden zu dem verdauten Plasmid gegeben. Der Ansatz wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die

Phosphatase bei 65 °C für 15 min inaktiviert. Dieser Ansatz wurde direkt für die Ligation genutzt.

#### 2.8.8. Ligation

Für die Ligation des Inserts mit dem betreffenden Vektor wurde die T4-DNA-Ligase eingesetzt. Das Verhältnis Insert:Vektor wurde 3:1 gewählt. Der 10 µl große Reaktionsansatz umfasste einen einfachen T4-DNA-Ligase Puffer sowie 1 µl der T4-DNA-Ligase und wurde mindestens 1 h bei RT inkubiert. Vor der Transformation von elektrokompetenter *E. coli* Zellen wurde der Ligationsansatz mit einer Millipore Membran (Porendurchmesser 0,025 µm) für mindestens 10 min gegen destilliertes Wasser dialysiert.

#### 2.8.9. Transformation elektrokompetenter *Escherichia coli* Zellen

Elektrokompetente *E. coli* Zellen wurden nach Shigekawa & Dower (1988) hergestellt und deren Transformationseffizienz mit dem 2,7 kb großen Vektor pUCBM21 überprüft. Für die Transformation wurden 40 µl kompetente Zelle mit 5 µl DNA gemischt. Nach einem elektrischen Impuls (1,8 kV; Micropulser<sup>TM</sup>, BioRad) wurde der gesamte Ansatz sofort mit 1 ml SOC (Super Optimal Broth) Medium versetzt. Nach kurzer Inkubationszeit wurden die Zellen auf LB<sub>amp</sub> Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

SOC-Medium:	2 % (w/v)	Pepton von Casein
	0,5 % (w/v)	Hefeextrakt
	10 mM	NaCl
	10 mM	MgCl <sub>2</sub>
	2,5 mM	KCl
	20 M	Glucose

## 2.9. Plasmidkonstruktion

### 2.9.1. Konstruktion der Expressionskassette für die Überexpression des Pyruvat-Carboxylase kodierenden Gens

Für die Überexpression des Gens der Pyruvat-Carboxylase wurde der multicopy Expressionsvektor p64T genutzt. Dieser Vektor entstand durch die Verkürzung des Promotorbereiches des Isocitrat-Lyase kodierenden Gens *ICL1* um 1945 bp aus dem p64PT (Abb. 2.1) (Holz, 2010). Die multicopy Vektoren p64PT sowie p64T besitzen als Selektionsmarker ein *ura3d4* Allel mit verkürztem Promotor für die multiple Integration. Durch den auf 8 bp verkürzten Promotor des *URA3* Gens werden 10-12 Kopien der Expressionsvektoren benötigt, um die *ura3* Mutation vollständig zu komplementieren und somit ein normales Wachstum zu erhalten. Neben dem *ura3d4* Allel weisen diese Vektoren eine rDNA Region auf, die für die Integration in die rDNA Cluster von *Y. lipolytica* genutzt wird (Le Dall *et al.*, 1994; Gerber, 1999). Des Weiteren ist in den Vektoren eine Klonierungskassette für die Genintegration zu finden. Für die Selektion in *E. coli* dient eine Ampicillinresistenz der Vektoren. Zusätzlich sind sowohl der Promotor- als auch der Terminatorbereich der Isocitrat-Lyase aus *Y. lipolytica* auf dem p64PT Vektor zu finden.

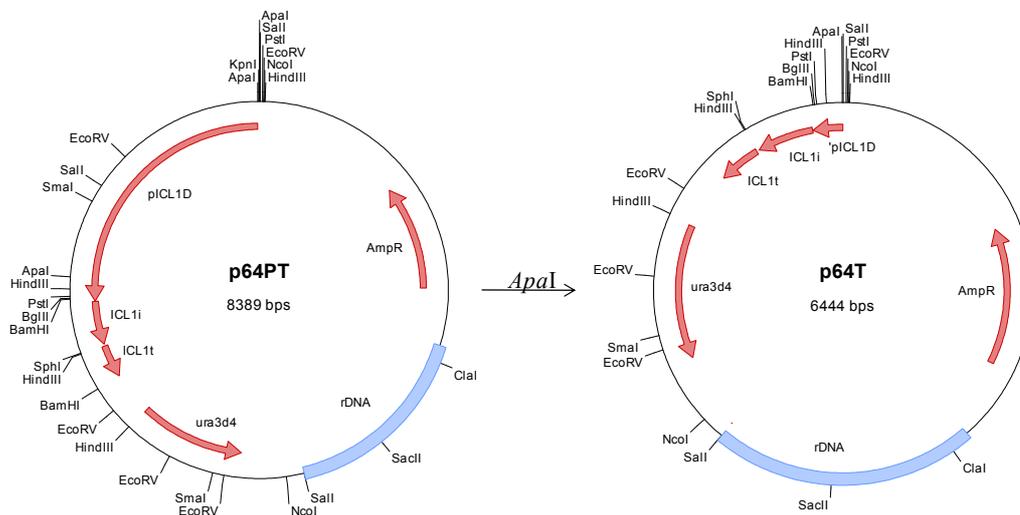


Abbildung 2.1: Aufbau der multicopy Plasmide p64PT und p64T. Das Plasmid p64T entstand durch den *ApaI*-Verdau des Ausgangsplasmides p64PT, in Folge dessen weist p64T einen um 1945 bp verkürzten Promoterbereich des *ICL1* Gens aus *Y. lipolytica* auf. *pICL1D* – Promotorbereich von *ICL1*, *ICL1i* – Insert von *ICL1*, *ICL1t* – Terminatorbereich von *ICL1*, *ura3d4* – multicopy Selektionsmarker, rDNA – Integrationssequenz aus *Y. lipolytica*, *AmpR* – Ampicillin-Resistenzgen, weitere Erläuterungen siehe Text

Die Pyruvat-Carboxylase wird in *Y. lipolytica* durch ein Gen (*PYC*) kodiert (Flores & Gancedo, 2005). Da der Bereich, des ORFs von *PYC* (3844 bp) gemeinsam mit den zugehörigen jeweils 1 kb großen Promotor- und 0,3 kb großen Terminatorbereich eine Größe von 5149 bp umfasste, wurde diese Expressionskassette in zwei Schritten amplifiziert, um das Einbringen von eventuellen Sequenzfehlern durch die Polymerase zu verringern. Die Oligonukleotide *PYCa\_for* und *PYCa\_rev* amplifizierten den 2442 bp großen Bereich, welcher den 1 kb großen Promotorbereich und einen Teil des ORFs von *PYC* beinhaltete. Der 2822 bp große Bereich, des restlichen ORFs von *PYC* gemeinsam mit dem 300 bp großen Terminatorbereich, wurde durch die Oligonukleotide *PYCb\_for* und *PYCb\_rev* amplifiziert. Für die vereinfachte Integration in den Expressionsvektor p64T wurden durch die Oligonukleotide *PYCa\_for* eine *PaeI* und durch *PYCb\_rev* eine *BgIII*-Schnittstelle angefügt, außerdem wurde die in dem ORF enthaltene *BgIII* Schnittstelle für die Vektorintegration und die Fusion der zwei Fragmente genutzt. Das 2442 bp große *PYCa*-Fragment (Promotorbereich mit einem Teil des *PYC*-ORFs) wurde mit *PaeI* und *BgIII* verdaut und in den ebenfalls mit *PaeI* und *BgIII* verdauten p64T Vektor kloniert. Der entstandene p64PYCa Vektor wurde sequenziert. Die Sequenzierung des Plasmides des Klons T22 ergab einen fehlerfreien *PYC*-ORF und für das Plasmid des Klons T97 wurde ein fehlerfreier Promotorbereich nachgewiesen. Ein fehlerfreier p64PYCa Vektor wurde durch die Integration des fehlerfreien *PaeI*-*BamHI*-Promotorbereiches aus p64PYCa von dem Klon T97 in den mit *PaeI* und *BamHI* verdauten p64PYCa Vektor von dem Klon T22 erzielt. In den resultierenden p64PYCa Vektor wurde das *BgIII*-*PYCb*-Fragment (Teil des *PYC*-ORFs und der Terminatorbereich) kloniert und anschließend sequenziert. Es wurde der Vektor p64PYC erhalten, der eine fehlerfreie Expressionskassette (*pPYC-PYC-PYCb*) für die Überexpression des Pyruvat-Carboxylase kodierenden Gens enthielt. Für die Transformation in die *Y. lipolytica* Stämme H222-S4 und H222-AK7 (*Δscs2*) wurde dieser Vektor mit *SacII* linearisiert.

### 2.9.2. Konstruktion der Expressionskassetten für die Überexpression der Gene der $\alpha$ - und $\beta$ -Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase

Für eine optimale Überexpression der Gene der Succinyl-CoA Synthetase wurden beide Gene gemeinsam auf einen multicopy Vektor kloniert.

Ein 3521 bp großes Fragment, das den 1174 bp großen *SCS1*-ORF sowie 1089 bp des Promotorbereiches und 1258 bp des Terminatorbereiches umfasste, wurde mit den

Oligonukleotiden 092\_LSC1\_for und LSC1\_r von der genomischen DNA von H222 amplifiziert. Für die erleichterte Integration in den p64PT Vektor wurde mit dem Oligonukleotid 092\_LSC1\_for eine *Bam*HI Schnittstelle angefügt und die in dem Promotorbereich vorhandene *Age*I Schnittstelle genutzt. Die Sequenz des resultierenden p64LSC1 Vektors wurde durch Sequenzierung überprüft.

Für die Überexpression von *SCS2* wurde eine Expressionskassette konstruiert, die sich aus dem 1768 bp großen *SCS2*-ORF sowie dem zugehörigen 1210 bp großen Promotor- und 1504 bp großen Terminatorbereich zusammensetzte. Das 4482 bp große Promotor-ORF-Terminator Fragment von *SCS2* wurde mit den Oligonukleotiden LSC2\_PvuII\_for und LSC2\_PvuII\_rev amplifiziert. In den *Pvu*II-verdauten dephosphorylierten p64PT Vektor wurde das ebenfalls mit *Pvu*II verdaute DNA-Fragment kloniert. Durch die anschließende Sequenzierung des erhaltenen Vektors p64LSC2 ergaben sich zwei Klone, T28 und T40, die entweder Plasmide mit einem in der Sequenz richtigen ORF oder Promotor- und Terminatorbereich aufwiesen. Der fehlerfreie *SCS2*-ORF aus dem Plasmid des Klons T28 wurde durch einen Verdau mit *Hpa*I und *Nru*I gewonnen und in den ebenfalls mit *Hpa*I und *Nru*I verdauten p64LSC2 Vektor von dem Klon T40 kloniert, wodurch eine fehlerfreie Promotor-ORF-Terminatorkassette von *SCS2* entstand.

Die beiden Überexpressionskassetten (Promotor-ORF-Terminator) der jeweiligen Gene der Untereinheiten der SCS wurden auf einen p64PT Vektor vereinigt. Das aus dem Vektor p64LSC2 stammende 4470 bp große *Pvu*II-Fragment wurde in den *Pvu*II-verdauten dephosphorylierten p64LSC1 Vektor kloniert. Somit wurde der Expressionsvektor p64LSC erhalten, der sowohl den ORF von *SCS1* mit den eigenen 1089 bp und 1258 bp umfassenden Promotor- und Terminatorbereich als auch den ORF von *SCS2* mit den zugehörigen 1210 bp und 1504 bp großen Promotor- und Terminatorbereich enthielt. Der mit *Sac*II linearisierte Vektor p64LSC wurde in den *Y. lipolytica* Stamm H222-S4 transformiert.

### 2.9.3. Konstruktion der Deletionskassette des für die $\alpha$ -Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase kodierenden Gens

Für die Deletion des Gens der  $\alpha$ -Untereinheit der SCS (*SCS1*) wurde eine Deletionskassette entsprechend des *Cre-lox* Rekombinationssystems konstruiert (Fickers *et al.*, 2003). Ein 1168 bp großes DNA-Fragment, das dem Promotorbereich der *SCS1* entsprach, wurde von der genomischen Hefe-DNA (H222) unter Verwendung der Oligonukleotide LSC1\_Pfor und

LSC1\_Prev amplifiziert. Der 1106 bp große Terminatorbereich von *SCS1* wurde mit den Oligonukleotiden LSC1\_Tfor und LSC1\_Trev amplifiziert. Durch die Oligonukleotide LSC1\_Prev und LSC1\_Tfor wurde eine 18 bp große *I-SceI* Schnittstelle, welche während der folgenden Overlap-PCR als homologer Bereich diente, an die DNA-Fragmente angefügt. Das durch die Overlap-PCR mit den Oligonukleotiden LSC1\_Tfor und LSC1\_Prev erhaltene und mit *SacII* verdaute Promotor-Terminator-(PT)-Fragment, wurde anschließend in den ebenfalls *SacII*-verdauten und dephosphorylierten Vektor pUCBM21 kloniert. In das resultierende Plasmid pLSC1PT wurde die aus JMP113 durch *I-SceI* Verdau gewonnene *loxR-URA3-loxP* Kassetten kloniert. Die entstandene 2847 bp große Deletionskassette Promotor-*loxR-URA3-loxP*-Terminator (PUT) wurde durch einen *Eco91I* und *BglI* Verdau aus dem Plasmid pLSC1PUT gewonnen und in die *Y. lipolytica* Stämme H222-S4 und H222-AK7 (*Δscs2*) transformiert.

#### 2.9.4. Konstruktion der Deletionskassette des für die $\beta$ -Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase kodierenden Gens

Die Deletion des  $\beta$ -Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase (*SCS2*) kodierenden Gens wurde ebenfalls mit dem *Cre-lox* Rekombinationssystem durchgeführt (Fickers *et al.*, 2003). Der entsprechende Promotor- (1054 bp) und Terminatorbereich (1104 bp) wurde durch die Oligonukleotide P1 und P2b sowie T1 und T2b amplifiziert. Die durch die Oligonukleotide P1 und T1 eingebrachte 18 bp große *I-SceI* Schnittstelle diente während der Overlap-PCR (Primer: P2b/T2b), für das Verbinden des Promotor- und Terminatorbereich, als homologer Bereich. Das entstandene 2188 bp große PT-Fragment wurde mit den Restriktasen *SacII* und *ApaI* verdaut und in den ebenfalls mit *SacII* und *ApaI* verdauten pUCBM21 kloniert. In das resultierende Plasmid pLSC2PT wurde die *loxR-URA3-loxP* Kassetten aus JMP113 über die *I-SceI* Schnittstelle kloniert. Die Oligonukleotide P2b und T2b nutzten das resultierende Plasmid pLSC2PUT als Template für die Amplifizierung der 3485 bp großen PUT-Deletionskassette von *SCS2*, die anschließend in den Stamm H222-S4 und H222-41 transformiert wurde.

#### 2.9.5. Sequenzierung konstruierter Plasmide

Konstruierte Plasmide, die ein für die Überexpression bestimmtes Gen kodierten, wurden von MWG-BIOTECH sequenziert.

## 2.10. Transformation von *Yarrowia lipolytica* Zellen

### 2.10.1. Transformation von *Yarrowia lipolytica* mittels der LiAc-Methode

Die Hefezellen wurden mit der Lithium-Acetat Methode, modifiziert nach Barth & Gaillardin (1996) und Mauersberger & Nicaud (2003), transformiert.

#### 2.10.1.1. Herstellung chemisch kompetenter *Yarrowia lipolytica* Zellen

Drei 10 ml YPD-Hauptkultur (HK) des betreffenden *Y. lipolytica* Stammes wurden mit verschiedenen Zelldichten zwischen  $1 \cdot 10^5$  und  $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml aus einer mehrere Stunden kultivierten 5 ml YPD-Vorkultur (VK) angeimpft. Das Ernten der HK erfolgte nach einer Kultivierung über Nacht, nachdem eine Zelldichte zwischen  $9 \cdot 10^7$  und  $1,2 \cdot 10^8$  Zellen/ml erreicht wurde. Die HK wurde bei 3.500 rpm, 5 min und 28 °C zentrifugiert und das entstandene Pellet zweimal mit 10 ml TE-Puffer (pH 8) gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 0,1 M LiAc-Puffer (pH 6) resuspendiert und eine Zelldichte von  $5 \cdot 10^7$  Zellen/ml eingestellt. Nachdem dieser Ansatz eine Stunde bei 28 °C und 100 rpm inkubiert, wurde die Kultur zentrifugiert (3.500 rpm, 5min, 28 °C) und in 1/10 Volumen der zuvor eingesetzten 0,1 M LiAc-Puffermenge resuspendiert. Die entstandenen elektrokompetenten Hefezellen wurden sofort transformiert.

#### 2.10.1.2. Transformation chemisch kompetenter Hefezellen

1 µg der betreffenden *SacII*-linearisierten Plasmid-DNA oder 400 ng der betreffenden Deletionskassette wurden für die Inaktivierung der Restriktasen 5 min bei 95 °C inkubiert. Die ebenfalls denaturierte Carrier-DNA (5 µl Hering-Sperma-DNA, 10 mg/ml) wurde zu der jeweiligen DNA gegeben. Nachdem zu diesem Ansatz 100 µl kompetente Hefezellen gegeben wurden, erfolgte eine 15-minütige Inkubation bei 28 °C. Anschließend wurden 700 µl 40 %ige PEG4000 Lösung, gelöst in 0,1 M LiAc-Puffer, zugegeben. Eine einstündige Inkubation bei 28 °C und 100 rpm folgte. Der anschließende Hitzeschock wurde durch 10 min im 39 °C Wasserbad erzielt. Die Zellen wurden abschließend mit 1,2 ml 0,1 M LiAc-Puffer versetzt und auf Selektivagarplatten ausplattiert. In dieser Arbeit wurde ausschließlich auf die angestrebte Uracilprototrophie mit MG ohne Uracil selektiert.

---

YPD (pH 4):	1 % Hefeextrakt
	1 % Pepton
	1 % Glucose
	50 mM Citronensäure/Na-Citrat pH 4
Citronensäure/Na-Citrat:	0,5 M Tri-Natriumcitrat mit Citronensäure auf pH 4 eingestellt
TE-Puffer:	10 mM Tris/HCl pH 8
	1 mM EDTA pH 8
LiAc-Puffer:	0,1 M Lithiumacetat mit Essigsäure auf pH 6 eingestellt
Carrier-DNA:	Hering-Sperma 10 mg/ml in 50 mM Tris und 5 mM EDTA pH 8

### 2.10.2. Herstellung elektrokompetenter *Yarrowia lipolytica* Zellen

Für die Transformation des zirkulären pUB4-CRE Vektors wurden nach Shigekawa & Dower (1988) modifizierte elektrokompetente *Y. lipolytica* Zellen hergestellt.

Die 250 ml große YPD-HK wurde mit einer OD<sub>600</sub> von 0,3 aus einer über Nacht kultivierten 50 ml YPD-VK angeimpft. Die Kultivierung der HK erfolgte bis eine OD<sub>600</sub> zwischen 1,3 und 1,5 erreicht wurde. Anschließend wurden die Zellen bei 4.000 g, 5 min und 4 °C zentrifugiert und das resultierende Pellet mit 250 ml sowie mit 125 ml eiskaltem destilliertem Wasser gewaschen. Nachdem erneut das Pellet durch Zentrifugieren gebildet wurde, wurde dieses in 10 ml eiskaltem 1 M Sorbitol resuspendiert. Das nach wiederholten Zentrifugieren resultierende Pellet wurde in 250 µl 1 M Sorbitol aufgenommen und sofort für die Transformation eingesetzt.

### 2.10.3. Elektrotransformation von *Yarrowia lipolytica*

40 µl der elektrokompetenten Hefezellen wurden mit 400 ng von pUB4-CRE gemischt und einen elektrischen Impuls von 2,49 kV (Micropulser<sup>TM</sup>, BioRad) ausgesetzt. Anschließend wurden die Zellen sofort in 1 ml 1 M Sorbitol aufgenommen und auf Selektivagarplatten ausplattiert. Für die Selektion des *Cre* exprimierenden Plasmides wurden die Transformanden auf den Phänotyp *ura*<sup>-</sup> und *Hyg*<sup>R</sup> gesichtet. Die Zellen wuchsen anfänglich für die Selektion der Hygromycinresistenz auf YPD-Platten mit 800 µg/ml Hygromycin. Anschließend wurden die gewachsenen Kolonien auf deren Uracilauxotrophie auf Minimalmedium mit und ohne Uracil überprüft.

## 2.11. Southern Blot

### 2.11.1. Transfer der DNA auf eine Nylonmembran

Die betreffende genomische DNA wurde mit der ausgewählten Restriktionsendonuklease fragmentiert. 1 µg dieser genomischen DNA sowie 20 ng der betreffenden λ-Marker-DNA wurden auf ein 0,8 %iges Agarosegel aufgetragen und bei 100 V aufgetrennt. Der Transfer der DNA auf eine Nylonmembran (Hybond-N, GE Healthcare) wurde mittels Vakuumblotter (Vacu-Blot VB21, Biometra) bei 80-100 mbar (Vakuüm Controller ILMVAC VCZ324) durchgeführt. Nacheinander wurden jeweils, bis zu dem gewünschten Farbumschlag des Laufpuffers, Depurinierungs- (0,25 M HCl) und Denaturierungslösung (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) auf das Gel gegeben. Anschließend wurde die Neutralisierungslösung (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris/HCl pH 7,5) 10 min länger als die vorherige Denaturierungslösung zugegeben. Daran schloss sich der Transfer der DNA auf die Membran durch eine einstündige Behandlung mit 20-fachen SSC (0,3 M Natriumcitrat, 3 M NaCl) an. Nachdem die Membran getrocknet und die DNA auf die Membran durch Crosslinken (Ultraviolet Radiation BLX-E 254) fixiert wurde, fand die Prähybridisierung mit 20 ml/100 cm<sup>2</sup> Hybridisierungspuffer für eine halbe Stunde bei 65 °C statt. Die Zugabe der Sonden erfolgte nach deren Denaturierung (100 °C, 10 min), wobei 1-2 µl/ml Hybridisierungspuffer spezifische Sonde und 0,5 µl/ml Hybridisierungspuffer λ-Marker-Sonde eingesetzt wurden. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65 °C.

Hybridisierungspuffer: 5-fach SSC  
0,1 % (w/v) SDS  
0,1 % (w/v) N-Laurylsarcosin  
1 % Blockstammlösung

### 2.11.2. Sondenherstellung

Die Sondenherstellung erfolgte mit dem „Random primed DNA labeling Digoxigenin-dUTP Kit“ von Roche. Als λ-Marker DNA standen λ<sub>2</sub> (λ-DNA mit *Hind*III verdaut), λ<sub>3</sub> (λ-DNA mit *Eco*RI und *Hind*III verdaut) und λ<sub>19</sub> (λ-DNA verdaut mit verschiedenen Enzymen und aufgefüllt mit dem Klenow Enzym) von MBI Fermentas zur Verfügung. Das Ausgangsmaterial für die spezifischen Sonden wurde entweder durch den Restriktionsverdau

oder mit entsprechenden Oligonukleotiden (Tab. 2.3) gewonnen. 600 ng der spezifischen DNA sowie 300 ng der  $\lambda$ -Marker-DNA wurden mit HPLC-Wasser auf ein Endvolumen von 15  $\mu$ l verdünnt. Nach der Denaturierung der DNA (100 °C, 10 min), erfolgte die Zugabe von je 2  $\mu$ l Hexanucleotidmix (Roche) und dNTP Labeling Mix (Roche) sowie von 1  $\mu$ l Klenow Enzym (MBI Fermentas). Der gesamte Ansatz wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 2.11.3. Immunologische Detektion

Die Membran wurde zweimal für 5 min bei 65 °C mit 100 ml Waschpuffer I (2-fach SSC, 0,1 % SDS) gewaschen, anschließend wurde dies zweimal mit Waschpuffer II (0,5-fach SSC, 0,1 % SDS) für 15 min wiederholt. Nachdem die Membran kurz mit Waschpuffer III (Maleinsäurepuffer, 0,3 % Tween 20) geschwenkt wurde, erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit der Blocklösung (1 ml/cm<sup>2</sup> Membran; 10 % Blockreagenz in Maleinsäurepuffer), gefolgt von der 30-minütigen Inkubation mit der Antikörperlösung (0,2 ml/cm<sup>2</sup> Membran; 5.000-fache Verdünnung des Anti-Digoxigenin-AP in Blocklösung). Als anschließender Schritt, wurde die Membran zweimal für 15 min bei RT mit 100 ml Waschlösung III geschwenkt. Des Weiteren erfolgte, vor der Detektion, die Äquilibration der Membran mit 20 ml Detektionspuffer (0,1 M Tris/HCl, 1mM EDTA, pH 8). Nach der Inkubation der Membran mit CDP-Star Lösung (0,05-0,1 ml/cm<sup>2</sup> Membran, Roche) wurde die Detektion des Signals mittels Chemilumineszenz Gerät (Fluor Chem<sup>TM</sup> SP, Biozym) für 1-30 min durchgeführt.

### 2.11.4. Strippen der Southern Blot Membran

Um die vorherigen Sonden von der Membran zu entfernen, wurde die Membran zuerst 1-2 min mit fünffachem SSC gewaschen. Anschließend wurde 0,1 %iges kochendes SDS zu der Membran hinzugegeben und 10 min geschwenkt. Dieser Schritt wurde zweimal mit jeweils frisch gekochtem SDS wiederholt. Darauf folgend wurde die Membran bei 65 °C prähybridisiert.

## 2.12. Biochemische Methoden

Für die Charakterisierung der konstruierten Stämme wurden alle Aktivitäten der Enzyme des TCC sowie die Aktivität der Isocitrat-Lyase während des Wachstums im Minimalmedium mit 1 % Glucose bestimmt. Des Weiteren wurde als Vertreter der anaplerotischen Reaktionen für den TCC die Aktivität der Pyruvat-Carboxylase gemessen. Die Berechnung der spezifischen Enzymaktivitäten erfolgte nach dem Lambert-Beerschen Gesetz.

### 2.12.1. Ernte und Aufschluss der Hefezellen

Für die jeweiligen Aktivitätsbestimmungen wurden ca. 100 OD<sub>600</sub> der betreffenden Kultur, durch das Zentrifugieren bei 5.000 rpm, 4 °C und 3 min, geerntet. Das Pellet wurde mit dem jeweiligen Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml Puffer resuspendiert und zusammen mit ca. 1 ml Glasperlen (Ø 0,5-0,75, Roth) in der Schwingmühle (1/30, 5 min, 4 °C) aufgeschlossen. Die aufgeschlossenen Zellen wurden bei 3.000 g und 4 °C für 5 min zentrifugiert und der Überstand für die Aktivitätsbestimmungen eingesetzt.

### 2.12.2. Aktivitätsbestimmung der Citrat-Synthase

Die Citrat-Synthase katalysiert die Kondensation von 0,5 mM Oxalacetat mit 0,3 mM Acetyl-CoA zu Citrat, wobei CoA-SH von Acetyl-CoA abgespalten wurde. Für die Aktivitätsbestimmung der CS wurde die Entstehung von TNB (5-Thio-2-Nitrobenzoesäure) durch die Reaktion von CoA-SH mit 0,1 mM DTNB (5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)) modifiziert nach Matsuoka & Srere (1973) nachgewiesen. Die gesamte Reaktion wurde in 0,05 M Tris/HCl Puffer bei einem pH von 7,2 durchgeführt. Nach dreiminütiger Inkubation des Reaktionsansatzes wurde der entsprechende zellfreie Extrakt zugegeben und die TNB-Bildung bei 412 nm photometrisch gemessen. Der Extinktionskoeffizient von TNB beträgt 13,6 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>.

### 2.12.3. Aktivitätsbestimmung der Aconitase

Die Aconitase katalysierte die Umwandlung von 0,01 M D,L-Isocitrat zu cis-Aconitat in 0,05 M Kaliumphosphatpuffer (KPP) bei einem pH-Wert von 7,4. Die Aktivitätsbestimmung der Aconitase, modifiziert nach Anfinsen (1955), erfolgte durch die direkte Messung des

entstandenen Produktes, dem cis-Aconitat. Die Zunahme von cis-Aconitat wurde durch die photometrische Messung bei 240 nm verfolgt. Cis-Aconitat besitzt einen Extinktionskoeffizient von  $4,88 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

#### 2.12.4. Aktivitätsbestimmung der NADP-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase

Die Oxidation von Isocitrat zu  $\alpha$ -Ketoglutarat wird durch die Isocitrat-Dehydrogenase katalysiert. Je nach Cofaktor,  $\text{NADP}^+$  oder  $\text{NAD}^+$ , handelte es sich um die NADP- oder die NAD-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase.

Die Bestimmung der IDP Aktivität wurde durch die direkte Messung des entstandenen NADPH bei 340 nm modifiziert nach Haselbeck & McAlister-Henn (1991) durchgeführt (Tab. 2.7). NADPH weist einen Extinktionskoeffizient von  $6,3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  auf.

Tabelle 2. 7: Reaktionsansatz für die Aktivitätsbestimmung der NADP-abhängigen Isocitrat-Dehydrogenase

	Stammlösung	Endkonzentration
D,L-Isocitrat	50 mM	5 mM
$\text{NADP}^+$	10 mM	1 mM
$\text{MgCl}_2$	50 mM	5 mM
KPP pH 8	1 M	50 M

#### 2.12.5. Aktivitätsbestimmung der NAD-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase

Die Entstehung von NADH während der von der IDH katalysierten Reaktion wurde direkt bei 340 nm photometrisch, modifiziert nach Franke-Rinker (1983) und Morgunov *et al.* (2004), bestimmt (Tab. 2.8). Der Extinktionskoeffizient von NADH beträgt  $6,3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

Tabelle 2. 8: Reaktionsansatz für die Aktivitätsbestimmung der NAD-abhängigen Isocitrat-Dehydrogenase

	Stammlösung	Endkonzentration
D,L-Isocitrat	50 mM	5 mM
$\text{NAD}^+$	50 mM	5 mM
AMP	5 mM	0,5 mM
$\text{MgCl}_2$	50 mM	5 mM
KPP pH 8	1 M	50 M

### 2.12.6. Aktivitätsbestimmung der $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase

Die oxidative Decarboxylierung von  $\alpha$ -Ketoglutarat mit anschließender Umsetzung von CoA-SH zu Succinyl-CoA wird unter Freisetzung von  $\text{CO}_2$  und NADH von der  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase katalysiert. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte, modifiziert nach Brown & Perham (1976), durch die direkte Messung des entstandenen NADH bei 340 nm (Tab. 2.9).

Tabelle 2. 9: Reaktionsansatz für die Aktivitätsbestimmung der  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase

	Stammlösung	Endkonzentration
KPP pH 7,4	0,5 M	50 mM
CoA-SH	5 mM	0,3 mM
Cystein	26 mM	2,6 mM
TPP	20 mM	0,2 mM
$\text{MgCl}_2$	100 mM	10 mM
$\text{NAD}^+$	50 mM	5 mM
Ketoglutarat	20 mM	4 mM

### 2.12.7. Aktivitätsbestimmung der Succinyl-CoA Synthetase

Die Aktivität der Succinyl-CoA Synthetase sollte mit verschiedenen Methoden bestimmt werden. Da dieses Enzym die reversible Umsetzung von Succinyl-CoA zu Succinat unter Bildung von ATP/GTP katalysiert, wurden für die Aktivitätsbestimmungen sowohl die Hinreaktion zu Succinat als auch die Rückreaktion ausgehend von Succinat genutzt.

Es wurde getestet, ob die Aktivität der SCS analog zu der Aktivitätsbestimmung der Citrat-Synthase durch die photometrische Messung von TNB bei 412 nm bestimmen werden kann (modifiziert nach Alarcon *et al.* (2002)). TNB reagiert mit CoA-SH zu DTNB, wobei CoA-SH während der Reaktion der SCS freigesetzt werden sollte.

Tabelle 2. 10: Reaktionsansatz für die Aktivitätsbestimmung der Succinyl-CoA Synthetase mittels der Messung von TNB

	Stammlösung	Endkonzentration
KPP pH 7,2	1 M	50 mM
$\text{MgCl}_2$	260 mM	10 mM
ATP/GTP	20 mM	2 mM
DTNB	2 mM	0,2 mM
Succinyl-CoA	5 mM	0,5 mM

Die SCS Aktivität sollte auch direkt durch die photometrisch Messung der Auflösung der Esterbindung von Succinyl-CoA bei 235 nm verfolgt werden (modifiziert nach Cha & Parks (1964)). Der eingesetzte Reaktionsansatz ist in Tabelle 2.11 aufgeführt.

Tabelle 2. 11: Reaktionsansatz für die direkte Aktivitätsbestimmung der SCS

	Stammlösung	Endkonzentration
Tris/HCl pH 7,4	1 M	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	100 mM	10 mM
Succinyl-CoA	2 mM	0,1 mM
ADP/GDP	2 mM	0,1 mM

Des Weiteren sollte die SCS Aktivität durch die Bildung der Esterbindung zwischen Succinat und CoA photometrisch bei 235 nm verfolgt werden (modifiziert nach Cha & Parks (1964)).

Tabelle 2. 12: Reaktionsansatz für die Aktivitätsbestimmung der Succinyl-CoA Synthetase mittels der Messung der entstehenden Esterbindung zwischen Succinat und CoA.

	Stammlösung	Endkonzentration
Tris/HCl pH 7,2	500 mM	50 mM
KCl	2,6 M	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	260 mM	10 mM
ATP/GTP	4 mM	0,4 – 1 mM
CoA	1,3 mM	0,1 – 0,5 mM
Succinat	500 mM	20 – 100 mM

Eine weitere Methode für die Aktivitätsbestimmung der Rückreaktion der SCS wurde gekoppelt mit den Enzymaktivitäten der Pyruvat-Kinase und der Lactat-Dehydrogenase modifiziert nach Cha & Parks (1964) getestet. Die SCS katalysiert die Umwandlung von Succinat zu Succinyl-CoA unter Bildung von ADP. Das während dieser Reaktion gebildete ADP diente der Pyruvat-Kinase für die Umwandlung von Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat, wobei eine Phosphatgruppe auf das zuvor entstandene ADP übertragen würde. Die anschließende Oxidation von Pyruvat zu Lactat sollte durch die Lactat-Dehydrogenase katalysiert werden, wobei NADH benötigt wurde. Es sollte das in dem letzten Schritt verbrauchte NADH photometrisch bei 340 nm verfolgt werden, um die Aktivität der SCS zu bestimmen (Tab. 2.13).

Tabelle 2. 13: Reaktionsansatz für die Aktivitätsbestimmung der Rückreaktion der SCS gekoppelt mit den Enzymaktivitäten der Pyruvat-Kinase und der Lactat-Dehydrogenase.

	Stammlösung	Endkonzentration
Na-Citrat/HCl pH 6	650 mM	65 mM
ATP/GTP	4 mM	0,13– 0,5 mM
CoA	1,3 mM	0,13 – 0,5 mM
MgCl <sub>2</sub>	260 mM	26 mM
KCl	2,6 M	260 mM
PEP	20 mM	2 mM
NADH	9 mM	0,9 – 1,5 mM
Pyruvat-Kinase	1,03 U/μl	1 – 2 U
L-Lactat-Dehydrogenase	0,213 U/μl	0,88 – 2 U
Na-Succinat	520 mM	52 – 100 mM

Die letzte getestete Möglichkeit der Aktivitätsbestimmung der SCS beruhte auf der Hydroxamat-Methode (modifiziert nach Gibson *et al.* (1967)). Diese Methode nutzte die von der SCS katalysierte Reaktion ausgehend von Succinat. Das bei dieser Reaktion entstandene Succinyl-CoA sollte mit Hydroxylamin zu Succinohydroxamsäure reagieren. Letzteres würde anschließend mit Eisen-(III)-Chlorid zu Eisen-Succinohydroxamsäure reagieren. Eisen-Succinohydroxamsäure ist ein roter Farbstoff mit einem Extinktionskoeffizient von  $0,484 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  und kann bei 520 nm photometrisch bestimmt werden.

Tabelle 2. 14: Reaktionsansatz für die Aktivitätsbestimmung der SCS beruhend auf der Hydroxamat-Methode.

	Stammlösung	Endkonzentration
Tris/HCl pH 7,2	500 mM	100 mM
CoA	20 mM	1 mM
ATP/GTP	100 mM	5 mM
Hydroxylamin	1 M	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	100 mM	2,5 mM
Na-Succinat	1 M	20 - 100 mM
	Zugabe des zellfreien Extraktes, Inkubation für 5 min bei 37 °C	
Trichloracetat	20 %	350 μl/1 ml
Fe <sub>3</sub> Cl	1 M	150 μl /1 ml

### 2.12.8. Enzymatische Mitochondrienpräparation

Der bisher genutzte mechanische Zellaufschluss mit Glasperlen führte bei der Aktivitätsbestimmung der SCS mit den verschiedenen Methoden zu keinem Ergebnis. Daher wurde getestet, ob durch enzymatische Mitochondrienpräparation eine Aktivitätsbestimmung ermöglicht werden kann. Die Mitochondrienpräparation wurde modifiziert nach Barth und Gaillardin (1997) durchgeführt.

Eine 1 l große YPD-HK wurde mit einer 10 ml YPD-VK angeimpft und über Nacht kultiviert. Die Ernte der Zellen erfolgte durch das Zentrifugieren (3.500 g, 5 min, RT) und anschließendem Waschen der Zellen mit destilliertem Wasser. Durch die folgende Bestimmung des Zellnassgewichtes (ZNG) konnte die Menge des zuzugebenden Puffers A (100 mM Tris/SO<sub>4</sub><sup>3-</sup> pH 9,4) sowie DTT berechnet werden. Puffer A (ml) wurde in der Menge von ZNG/0,5 und DTT (mg) von 1,54 \* Puffer A (ml) zugegeben. Daran schloss sich eine Inkubationszeit von 30 min bei 30 °C an. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert (3.500 g, 5 min) und anschließend mit Puffer C (1,2 M Sorbitol) gewaschen. Die Sphäroplastierung erfolgte durch die Zugabe von Puffer SPβ (1,2 M Sorbitol, 0,1 M KPP pH 6,5, 20 mM β-Mercaptoethanol; ZNG/0,15) versetzt mit Zymolyase (2 \* ZNG) sowie mit Glusulase (0,4 \* Zymolyase). Nach einer zweistündigen Inkubation des Ansatzes bei 30 °C wurde die Sphäroplastenbildung mikroskopisch überprüft. Nach der Sphäroplastierung wurde anschließenden der Ansätze zentrifugiert (3.500 g, 5 min, 4 °C) und mit Puffer SP (1,2 M Sorbitol, 0,1 M KPP pH 6,5) gewaschen. Die folgenden Schritte des Zellaufschlusses fanden alle auf Eis statt. Dem zuvor erhaltenen Ansatz wurden 10 ml Puffer D zugegeben. Dieser Ansatz wurde in einem Dounce-Homogenisator ungefähr 20-mal gepottert. Nach dem Zentrifugieren des gepotterten Ansatzes, wurde mit dem entstandenen Pellet der Zellaufschluss dreimal wiederholt. Die gesammelten Überstände wurden bei 12.000 g, 10 min, 4 °C zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde erneut in Puffer D resuspendiert und zentrifugiert (3.500 g, 5 min, 4°C). Nachdem dieser Überstand in ein neues Zentrifugationsgefäß überführt wurde, wurde der Ansatz bei 12.000 g, 10 min, 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 1 ml Puffer D aufgenommen und bei 3.500 g, 5 min, 4 °C zentrifugiert. Abschließend wurden die Mitochondrien nochmals bei 12.000 g, 10 min und 4 °C pelletiert. Dieses Pellet wurde in 100-300 µl Puffer D aufgenommen und für die Aktivitätsbestimmung versetzt mit 0,1-0,25 % TritonX100 und ohne TritonX100 eingesetzt.

Puffer D:           650 mM Sorbitol  
                  10 mM Tris/HCl pH 7,4  
                  1-fach PI-Mix (Roche)  
                  1 mM AEBSF (Sigma)  
                  1:1000 P-Inhibitor (Roche)

#### 2.12.9. Aktivitätsbestimmung der Succinat-Dehydrogenase

Für die Bestimmung der Succinat-Dehydrogenase Aktivität wurde eine indirekte Methode modifiziert nach Ackrell *et al.* (1978) gewählt. Die Succinat-Dehydrogenase katalysiert zum einen die Oxidation von Succinat zu Fumarat und zum anderen die Reduktion von Ubichinon zu Ubichinol. Die Aktivitätsbestimmung beruhte darauf, dass das Enzym durch 20 mM Na-Succinat (pH 7,5) reduziert und wieder durch die Reaktion mit 0,033 % Phenazinmethosulfat (PMS) oxidiert wird. Somit lag in dem Reaktionsansatz reduziertes PMS vor, dessen Oxidation durch die Reaktion mit 0,005 % 2,6-Dichlorphenol-Indophenol-Natrium (DCIP) bei 600 nm verfolgt wurde. Da DCIP auch ohne die Anwesenheit von reduziertem PMS im zellfreien Extrakt durch beispielsweise Cytochrom C oxidiert werden kann, wurde zu dem Reaktionsansatz 1 mM KCN gegeben um diese Reaktionen zu hemmen. Die Aktivitätsbestimmung fand in 50 mM KPP und bei einem pH-Wert von 7,5 statt. Für die Bestimmung der SDH Aktivität wurde ein spezifischer Aufschlusspuffer benötigt. PMS weist einen Extinktionskoeffizient von  $19,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  auf.

Aufschlusspuffer: 20 mM Tris/HCl pH 7,5  
                  1 mM EDTA  
                  5 mM MgCl<sub>2</sub>  
                  50 mM KCl  
                  0,2 M Na-Succinat  
                  4 % Glycerol

#### 2.12.10. Aktivitätsbestimmung der Fumarase

Die Fumarase katalysiert die reversible Umsetzung von Fumarat zu Malat. Für die direkte Bestimmung der Enzymaktivität wurde die Bildung von Fumarat ausgehend von 10 mM Malat im Reaktionsansatz photometrisch bei 250 nm bestimmt (modifiziert nach Hill & Bradshaw (1969) und Genda *et al.* (2006)). Als Puffer wurde 100 mM KPP mit einem pH-Wert von 8 gewählt. Fumarat besitzt einen Extinktionskoeffizient von  $1,45 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

2.12.11. Aktivitätsbestimmung der Malat-Dehydrogenase

Die Malat-Dehydrogenase katalysiert die reversible Umsetzung von Malat zu Oxalacetat unter Bildung von NADH. Für die Enzymaktivitätsbestimmung wurde der Verbrauch von 0,25 mM NADH während der Reaktion ausgehend von 1 mM Oxalacetat in 50 mM Tris/HCl (pH 7,2) photometrisch bei 340 nm gemessen (modifiziert nach Kitto (1969)).

2.12.12. Aktivitätsbestimmung der Isocitrat-Lyase

Die Spaltung von Isocitrat zu Succinat und Glyoxylat im Glyoxylatzyklus wird durch die Isocitrat-Lyase katalysiert. Die Enzymaktivitätsbestimmung erfolgte durch die photometrische Messung von Glyoxylat-Phenylhydrazon bei 324 nm (modifiziert nach Dixon & Kornberg (1959)). Glyoxylat-Phenylhydrazon entsteht durch die Reaktion von Glyoxylat mit Phenylhydrazin und besitzt einen Extinktionskoeffizient von  $17 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

Tabelle 2. 15: Reaktionsansatz für die Aktivitätsbestimmung der Isocitrat-Lyase

	Stammlösung	Endkonzentration
Tris/HCl pH 7	100 mM	53,3 mM
MgCl <sub>2</sub>	100 mM	5 mM
Cystein	20 mM	2 mM
D,L-Na-Isocitrat	16,7 mM	1,67 mM
Phenylhydrazin-HCl	33 mM	3,3 mM

2.12.13. Aktivitätsbestimmung der Pyruvat-Carboxylase

Das anaplerotische Enzym Pyruvat-Carboxylase katalysiert die Addition von CO<sub>2</sub> an Pyruvat unter Entstehung von Oxalacetat. Die Enzymaktivitätsbestimmung erfolgte dabei indirekt, indem das entstandene Oxalacetat durch eine zusätzlich zugegebene Malat-Dehydrogenase zu Fumarat unter Verbrauch von NADH umgesetzt wurde (modifiziert nach van Urk *et al.* (1989)). Die abnehmende NADH-Konzentration des Reaktionsansatzes wurde bei 340 nm bestimmt.

Tabelle 2. 16: Reaktionsansatz für die Aktivitätsbestimmung der Pyruvat-Carboxylase

	Stammlösung	Endkonzentration
Tris/HCl pH 7,8	1 M	100 mM
MgSO <sub>4</sub>	100 mM	6,7 mM
KHCO <sub>3</sub>	400 mM	40 mM
Pyrazol	15 mM	1,5 mM
NADH	1,5 mM	0,15 mM
Na-Pyruvat	100 mM	10 mM
Acetyl-CoA	0,9 mM	90 µM
Malat-DH	6 U/µl	6 U
ATP	33 mM	3,3 mM

#### 2.12.14. Proteinbestimmung

Für die Berechnung der spezifischen Enzymaktivitäten wurden die jeweiligen Bestimmungen der Proteinkonzentrationen nach Bradford (1976) durchgeführt. Es wurde eine Eichkurve mit Rinderserumalbumin (BSA) in Konzentrationen zwischen 0 und 60 mg/l angelegt. Die photometrische Messung des 200 µl Reaktionsansatzes (160 µl verdünnte Probe + 40 µl Bradford Reagenz (BioRad)) erfolgte in 96 well Platten (Sarstedt). Dafür wurden die jeweiligen Proben entsprechend mit destilliertem Wasser verdünnt. Der Blindwert wurde durch die Verdünnung des Bradford Reagenz mit 160 µl Wasser ermittelt.

#### 2.13. Mikroskopische Bestimmung der Zellmorphologie

Das Probenmaterial für die mikroskopische Untersuchung stammte aus einer über Nacht inkubierten YPD Kultur des betreffenden *Y. lipolytica* Stammes. Die Zellen wurden vor der Mikroskopie entsprechend mit 0,9 % NaCl verdünnt. Die mikroskopischen Betrachtungen erfolgten mit einem Olympus Provis AX70 Mikroskop bei 2650-facher Vergrößerung.

#### 2.14. Kultivierung

Die Wachstumskurven der einzelnen Stämme wurden in 100 ml Minimalmedium mit 1 % Glucose aufgenommen. Für die Bestimmung des Produktmusters erfolgte die Kultivierung der konstruierten Stämme in einem Succinatproduktionsmedium, einem thiaminlimitierten Medium und in einem stickstofflimitierten Medium.

Der Verlauf der Kultivierungen wurde durch die tägliche Bestimmung der OD<sub>600</sub> sowie des pH-Wertes verfolgt. Der jeweilige pH-Wert der einzelnen Medien wurde täglich auf den gewünschten pH-Wert mit 40 %igem NaOH eingestellt und der Basenverbrauch aufgezeichnet.

#### 2.14.1. Bestimmung der optischen Dichte

Die Bestimmung der optischen Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm und in einer Plastik-Einweg-Küvette (Schichtdicke  $d = 1$  cm) durchgeführt. Die Proben für die photometrische Bestimmung wurden entsprechend mit destilliertem Wasser verdünnt.

#### 2.14.2. Animpfen der Hauptkultur

Die jeweiligen Vorkulturen wurden in 50 ml des entsprechenden Kultivierungsmediums angelegt, jedoch wurde die Konzentration der C-Quelle von 10 % auf 2 % reduziert. Die Vorkulturen wurden 2 Tage bei 28 °C und 220 rpm kultiviert. Anschließend wurden diese zentrifugiert (3.500 rpm, 5 min, RT) und einmal mit 10 ml Kultivierungsmedium gewaschen. Das erneut entstandene Pellet wurde in 5 ml Kultivierungsmedium resuspendiert und für das Einstellen der Start-OD<sub>600</sub> = 2 der Hauptkultur eingesetzt.

#### 2.14.3. Succinatproduktionsmedium

Für die Überprüfung der von den konstruierten Stämmen sekretierten organischen Säuren des TCC wurde ein Medium, bekannt aus der Itaconsäurebildung mit *Candida* sp. Stämmen genutzt (Tabuchi *et al.*, 1981). Dieses Medium wurde vorrangig für die Untersuchung der Succinatproduktion eingesetzt und deshalb als Succinatproduktionsmedium bezeichnet. Als C-Quelle wurden sowohl 10 % Glucose als auch 10 % Glycerol eingesetzt. Der pH-Wert des Succinatproduktionsmediums wurde auf pH 5 eingestellt.

Tabelle 2. 17: Zusammensetzung des Succinatproduktionsmediums (Tabuchi *et al.*, 1981)

	Stammlösung	Endkonzentration
NH <sub>4</sub> Cl	50 g/l	3 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20 g/l	0,1 g/l
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	5 g/l	0,5 g/l
FeSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	10 g/l	0,035 g/l
Hefeextrakt	25 g/l	2,5 g/l
Glycerol/Glucose	50 %	10 %

#### 2.14.4. Kultivierung unter Thiaminlimitation

Die Fähigkeit von *Y. lipolytica*  $\alpha$ -Ketoglutarat unter Thiaminmangel vermehrt zu sekretieren wurde von Ermakova & Finogenova (1971) beschrieben. Mit der Kultivierung der konstruierten Stämme im Medium mit Thiaminlimitation (Tab. 2.18) wurden eventuelle Einflüsse der genetischen Veränderungen auf die Bildung von  $\alpha$ -Ketoglutarat, Pyruvat und Fumarat untersucht. Die Thiaminkonzentration der Vorkultur betrug 50  $\mu$ g/l. Während der Kultivierung der Hauptkultur wurde ein pH-Wert von 4,5 mit 40 % NaOH eingestellt und durch die tägliche Zugabe von 0,5  $\mu$ g/l Thiamin wurde eine zugegebene Endkonzentration von 3,5  $\mu$ g/l erreicht.

Tabelle 2. 18: Zusammensetzung des thiaminlimitierten Mediums (Weissbrodt *et al.*, 1989)

	Stammlösung	Endkonzentration
NH <sub>4</sub> Cl	50 g/l	5 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20 g/l	2 g/l
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	5 g/l	1 g/l
ZnSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	4,4 g/l	0,044 g/l
FeSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	10 g/l	0,01 g/l
CaCl	3 g/l	0,06 g/l
Spurenelemente	1000 fach	1 fach
Thiamin-HCl	3 mg/l	3,5 $\mu$ g/l*
Glucose	50 %	10 %

\* es erfolgte eine tägliche Zugabe von Thiamin-HCl bis eine Endkonzentration von 3,5  $\mu$ g/l erreicht wurde

### 2.14.5. Kultivierung unter Stickstofflimitation

Mit der Kultivierung der konstruierten Stämme auf Medium mit Stickstofflimitierung (Tab. 2.17) wurde der Einfluss der genetischen Veränderungen auf die Citrat- und Isocitratproduktion von *Y. lipolytica* überprüft. Es wurde bereits in vorangegangenen Versuchen nachgewiesen, dass *Y. lipolytica* unter Stickstoffmangel eine erhöhte Menge an Citrat und Isocitrat sekretieren kann (Akiyama *et al.*, 1973; Wojtatowicz *et al.*, 1997). Der pH-Wert des Mediums wurde auf pH 5 eingestellt.

Tabelle 2. 19: Zusammensetzung des stickstofflimitierten Kultivierungsmediums (modifiziert nach Stottmeister & Hoppe (1991))

	Stammlösung	Endkonzentration
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5 g/l	1 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5 g/l	1 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 3 H <sub>2</sub> O	0,8 g/l	0,16 g/l
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	3,5 g/l	0,7 g/l
NaCl	2,5 g/l	0,5 g/l
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	2 g/l	0,4 g/l
Spurenelemente	1000 fach	1 fach
Thiamin-HCl	3 mg/l	0,3 mg/l
FeCl <sub>3</sub>	3 g/100 ml	6 mg/l
Glucose	50 %	10 %

### 2.14.6. Bestimmung organischer Säuren mittels Ionenchromatographie

Für die Bestimmung der verschiedenen organischen Säuren, die während der Kultivierung der *Y. lipolytica* Stämme in das extrazelluläre Medium sekretiert wurden, kam ein Ionenchromatograph (ICS-2100, RFIC) der Firma Dionex (Sunnyvale, USA) zum Einsatz. Die Proben wurden durch einen Autosampler AS und mittels einer isokratischen Pumpe auf die Säulen aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte zuerst über die Vorsäule (IonPac AG19, Dionex) und anschließend über eine Ionenaustausch-Chromatographie-Säule (IonPac AS19, Dionex) für organische Säuren. Als Laufmittel diente ddH<sub>2</sub>O mit einer Flussrate von 0,3 ml/min. Die Substanzen wurden durch einen Leitfähigkeitsdetektor LC 20 aufgenommen. Mit Hilfe der genutzten Trennmethode (Tab. 2.20) wurden die organischen Säuren Pyruvat, Malat, Succinat,  $\alpha$ -Ketoglutarat, Fumarat, Citrat und Isocitrat identifiziert und quantifiziert.

Tabelle 2. 20: Trennparameter der IC-Quantifizierung organischer Säuren, einschließlich der jeweiligen Retentionszeiten (min).

Trennparameter	
Trennsäule	IonPac AS19
Flussrate	0,3 ml/min
Injektionsvolumen	10 µl
Laufmittel	ddH <sub>2</sub> O
Eluent	KOH
	0-25 min, 5 mM
	25-36 min, 38 mM
	36-38 min, 38 mM
	38-44 min, 5 mM
Retentionszeit [min]	Pyruvat: 7,5
	Malat: 19,6
	Succinat: 20,3
	α-Ketoglutarat: 23,4
	Fumarat: 27,3
	Citrat: 33,7
	Isocitrat: 36,7

Die Proben, die für die IC-Analyse bestimmt waren, wurden 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand entsprechend mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt.

## 2.15. Bioinformatik

Ein zusammenfassender Überblick über den betreffenden Metabolismus fand sich in der Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (<http://www.genome.jp/kegg/>). Für die Bestimmung der Gensequenzen wurden die *S. cerevisiae* Genom Datenbank (<http://www.yeastgenome.org>) und die *Y. lipolytica* Genom Datenbank (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/>) genutzt. Durch den Vergleich der Proteinsequenz von *S. cerevisiae* mit der Proteinsequenz von *Y. lipolytica* wurde mit der Hilfe von ExPASy-Blast-Software (Altschul *et al.*, 1997) die Aminosäure- und Nukleotidsequenzen von *Y. lipolytica* bestimmt. InterProScan ([www.ebi.ac.uk/interpro](http://www.ebi.ac.uk/interpro)), MitoProt (Claros & Vincens, 1996) und PTS1 Predictor (Neuberger *et al.*, 2003) wurden für die Analyse der Proteinsquenzen eingesetzt. Die Analyse der Sequenzierergebnisse wurde mit Hilfe der Clone Manager Professional Suite Software 8 durchgeführt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Überexpression des Pyruvat-Carboxylase kodierenden Gens

Die Auswirkung der Überexpression des PYC kodierenden Gens auf die Bildung organischer Säuren von *Y. lipolytica* wurde zu Beginn der Arbeit untersucht.

In *Y. lipolytica* wird die PYC durch das Gen YALIO24101g (*PYC*) kodiert (Flores & Gancedo, 2005). Das PYC kodierende Gen in *Y. lipolytica* besitzt ein 293 bp großes Intron. Für die Überexpression des Gens der PYC wurden der ORF sowie ein 1 kb großer Promotorbereich und ein 0,3 kb großer Terminatorbereich aus H222 amplifiziert. Anschließend wurde die erhaltene Promotor-ORF-Terminatorkassette in den multicopy Vektor p64T kloniert (siehe 2.9.1). Der resultierende p64PYC Vektor wurde in den Stamm H222-S4 transformiert und die Transformanten auf ihre Uracilprototrophie selektiert. Die Integration der Expressionskassette in den erhaltenen Transformanten H222-AK1 wurde mittels Southern Hybridisierung überprüft (Abb. 3.1). Für den Elternstamm H222-S4 wurde eine dem genomischen *PYC*-ORF entsprechende Bande bei 8,9 kb nachgewiesen. Die zusätzlich detektierte Bande bei 6,2 kb in den Transformanten diente als Nachweis für die Integration des multicopy Vektors p64PYC. Diese Banden wiesen gegenüber der genomischen Bande des Vergleichsstammes H222-S4 eine verstärkte Intensität auf, wodurch eine mehrfache Integration der entsprechenden Expressionskassette bestätigt wurde. Die in Abbildung 3.1 für die Transformante H222-AK1-1 gezeigten unspezifischen Banden wurden wahrscheinlich durch die unvollständige Integration des p64PYC Vektors oder durch die homologe Integration der Expressionskassette in den *PYC*-ORF verursacht. Die Transformanten H222-AK1-2, H222-AK1-5 und H222-AK1-7 wurden aufgrund ihrer hohen Vektorbandenintensitäten für weitere Untersuchungen ausgewählt.

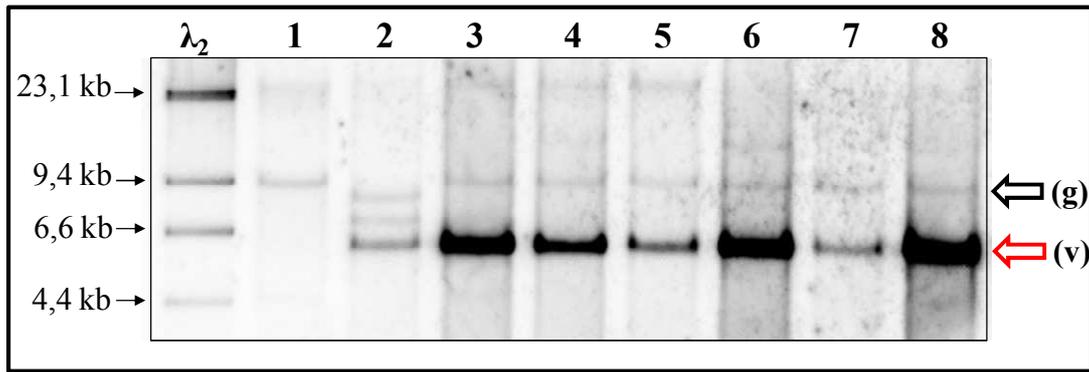


Abbildung 3. 1: Nachweis der Überexpression des PYC kodierenden Gens in H222-S4 mittels Southern Hybridisierung. Die genomische DNA wurde mit der Restriktase *EcoRV* vollständig verdaut. Für die Detektion von *PYC* wurde eine 2,1 kb spezifische Sonde für den *PYC*-ORF mit *PYC\_ORF\_for* und *PYC\_ORF\_rev* amplifiziert. Der schwarze Pfeil kennzeichnet das 8,9 kb große genomische (g) *PYC*-Fragment und der rote Pfeil zeigt das 6,2 kb vektorielle (v) *PYC*-Fragment.  $\lambda_2$ -Molekulargewichtsstandard  $\lambda_2$ ; 1-Rezipientenstamm H222-S4; 2-Transformante H222-AK1-1; 3-Transformante H222-AK1-2; 4-Transformante H222-AK1-3; 5-Transformante H222-AK1-4; 6-Transformante H222-AK1-5; 7-Transformante H222-AK1-6; 8-Transformante H222-AK1-7.

Der Gen-Dosis-Effekt auf die Pyruvat-Carboxylase Aktivität wurde in den Stämmen H222-AK1-2, H222-AK1-5 und H222-AK1-7 untersucht. Für die Bestimmung der Enzymaktivitäten wurden alle ausgewählten Transformanten in 100 ml Minimalmedium mit 1 % Glucose kultiviert und deren Wachstum durch die Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm untersucht (Abb. 3.2).

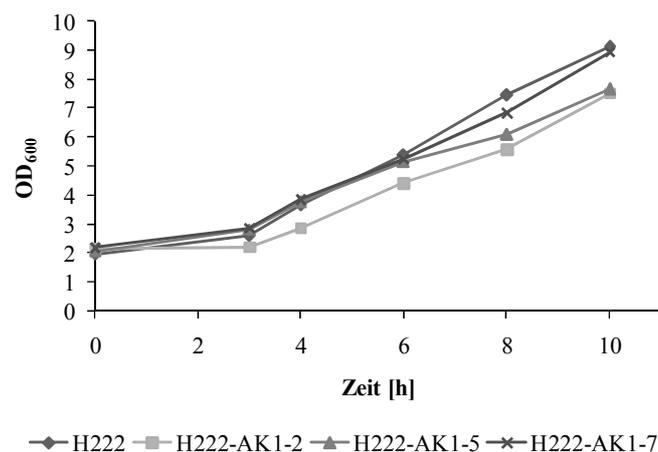


Abbildung 3. 2: Wachstum der Transformanten mit einer Mehrfachintegration der *PYC*-Expressionskassette verglichen mit dem Wachstum von H222. Das Wachstum wurde während der Kultivierung in 100 ml Minimalmedium mit 1 % Glucose durch die Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm verfolgt. Das charakteristische Wachstum ergab sich aus drei unabhängigen Kultivierungen.

Die Abbildung 3.2 zeigt ein verlangsamtes Wachstum der Transformante H222-AK1-2 im Vergleich zu dem Wildtyp H222. Für die Transformanden H222-AK1-5 und H222-AK1-7 wurde hingegen ein mit dem *Y. lipolytica* Stamm H222 vergleichbares Wachstum beobachtet. Vermutlich wurde das langsamere Wachstum von H222-AK1-2 durch eine ungünstige Integration der Expressionskassette in das Genom verursacht, wodurch wahrscheinlich für das Wachstum wichtige Genexpressionen beeinflusst wurden.

Des Weiteren wurden die spezifischen Aktivitäten der Pyruvat-Carboxylase der konstruierten Transformanden sowie des Wildtyps während der ersten zehn Stunden der Kultivierung mit 1 % Glucose bestimmt (Abb. 3.3).

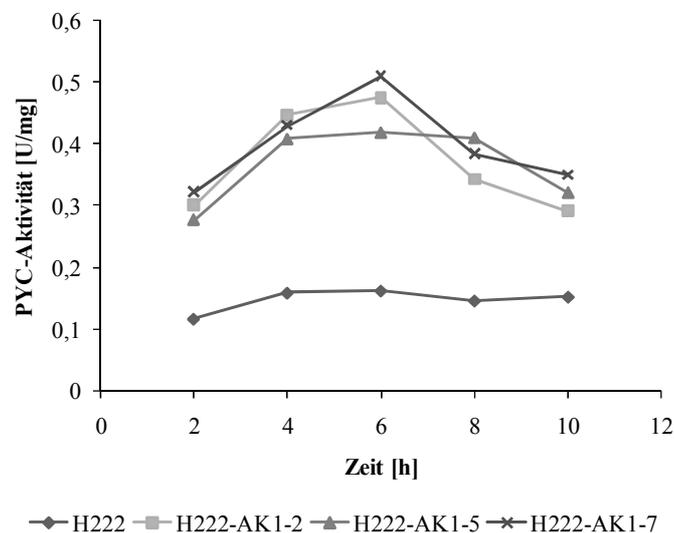


Abbildung 3. 3: Kinetik der spezifischen Pyruvat-Carboxylase Aktivität der Transformanden mit einer Mehrfachintegration der *PYC*-Expressionskassette im Vergleich zu dem Wildtyp H222. Die spezifischen Aktivitäten wurden während der Kultivierung in 100 ml Minimalmedium mit 1 % Glucose bestimmt. Der charakteristische Verlauf der spezifischen Aktivitäten ergab sich aus den Enzymaktivitätsbestimmungen von drei unabhängigen Kultivierungen.

Die erhöhte Gen-Dosis des *PYC* kodierenden Gens zeigte einen positiven Effekt auf die spezifischen *PYC* Aktivitäten der untersuchten Stämme (Abb. 3.3). Die spezifischen Aktivitäten für die Transformanden H222-AK1-2 und H222-AK1-7 erreichten ein Maximum nach 6 h. Im Gegensatz dazu wurde für die Transformante H222-AK1-5 sowie für den Wildtyp H222 kein erkennbares Maximum der spezifischen Enzymaktivität nachgewiesen. Die Transformanden H222-AK1-2 und H222-AK1-7 zeigten mit  $0,48 \pm 0,04$  U/mg und mit  $0,51 \pm 0,02$  U/mg die höchste spezifische *PYC* Aktivitäten im Vergleich zu den weiteren untersuchten Stämmen, deren Enzymaktivitäten bei  $0,42 \pm 0,1$  U/mg (H222-AK1-5) und bei

0,16 ± 0,06 U/mg (H222) bestimmt wurden. Der Stamm H222-AK1-7 zeigte neben der höchsten spezifischen Aktivität ein mit dem Wildtyp vergleichbares Wachstum und wurde somit für die weiteren Untersuchungen ausgewählt. Diese Transformante H222-AK1-7 wird im Folgenden als Transformante H222-AK1 bezeichnet. Diese Transformante wurde durch die Bestimmung der spezifischen Enzymaktivitäten ausgewählter Enzyme des TCC sowie der ICL nach sechs Stunden Kultivierung näher charakterisiert (Abb. 3.4).

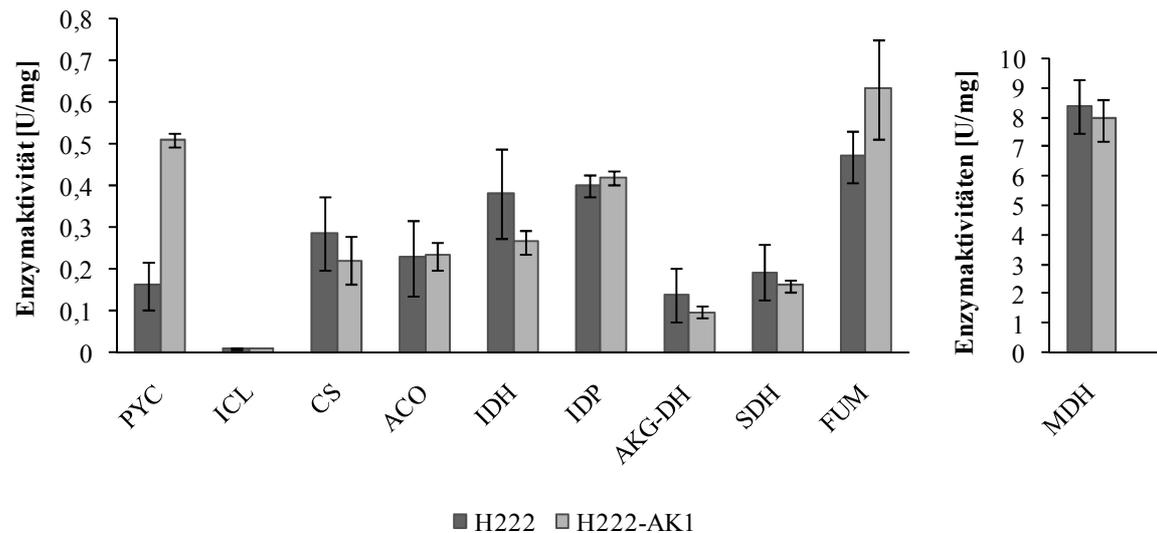


Abbildung 3. 4: Darstellung der spezifischen Aktivitäten der Enzyme des TCC sowie der ICL und der PYC für die Transformante H222-AK1 (*mcPYC*) im Vergleich zu den jeweiligen Enzymaktivitäten des Wildtyps. Die betreffenden spezifischen Aktivitäten wurden während der Kultivierung auf Minimalmedium mit 1 % Glucose in der exponentiellen Phase nach 6 h bestimmt. Die Standardabweichung wurde aus mindestens drei unabhängigen Versuchen ermittelt. PYC: Pyruvat-Carboxylase, ICL: Isocitrat-Lyase, CS: Citrat-Synthase, ACO: Aconitase, IDH: NAD-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase, IDP: NADP-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase, AKG-DH:  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase, SDH: Succinat-Dehydrogenase, FUM: Fumarase, MDH: Malat-Dehydrogenase

Die Ermittlung der spezifischen Aktivitäten der verschiedenen Enzyme der Transformante H222-AK1 im Vergleich zu den Aktivitäten des Wildtyps, zeigten nur für die bereits betrachtete PYC-Aktivität deutliche Unterschiede (Abb. 3.4). Die weiteren bestimmten Enzymaktivitäten für H222-AK1 wiesen mit dem Wildtyp H222 vergleichbare Werte auf. Es wurde nur eine geringe Basalaktivität für die ICL von H222 und H222-AK1 von  $0,01 \pm 0,003$  U/mg bestimmt, da dieses Enzym während der Kultivierung mit Glucose als C-Quelle nicht induziert wurde. Eine Enzymaktivität von  $0,29 \pm 0,09$  U/mg und von  $0,22 \pm 0,06$  U/mg wurde für die Citrat-Synthase von H222 und H222-AK1 nachgewiesen. Der Wert von  $0,23$  U/mg für die Aktivität der Aconitase von H222 wurde ebenfalls für H222-AK1

bestimmt. Vergleichbare Werte für die NAD- und NADP-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase Aktivität wurden für H222 (IDH:  $0,38 \pm 0,1$  U/mg; IDP:  $0,40 \pm 0,03$  U/mg) und H222-AK1 (IDH:  $0,26 \pm 0,03$  U/mg; IDP:  $0,42 \pm 0,02$  U/mg) gemessen. Des Weiteren wurden keine Unterschiede zwischen H222 und H222-AK1 für die Enzymaktivitäten der  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase (H222:  $0,14 \pm 0,06$  U/mg; H222-AK1:  $0,1 \pm 0,01$  U/mg), der Succinat-Dehydrogenase (H222:  $0,19 \pm 0,07$  U/mg; H222-AK1:  $0,16 \pm 0,01$  U/mg) und der Fumarase (H222:  $0,47 \pm 0,06$  U/mg; H222-AK1:  $0,62 \pm 0,12$  U/mg) ermittelt. Eine deutlich höhere spezifische Enzymaktivität wurde verglichen mit den Aktivitäten der anderen Enzyme für die Malat-Dehydrogenase nachgewiesen. Es wurde ein Wert von  $8,4 \pm 0,9$  U/mg und  $7,9 \pm 0,7$  U/mg für H222 und H222-AK1 ermittelt.

### 3.2. Überexpression der Succinyl-CoA Synthetase kodierenden Gene

Eine eventuelle Steigerung der Succinatsynthese in *Y. lipolytica* durch eine erhöhte Enzymaktivität der Succinyl-CoA Synthetase, bedingt durch die Überexpression der kodierenden Gene *SCS1* und *SCS2*, sollte anschließend überprüft werden.

Die zwei Untereinheiten der SCS werden in *S. cerevisiae* durch die Gene *LSC1* (YOR142W) und *LSC2* (YGR244C) kodiert (Przybyla-Zawislak *et al.*, 1998). Eine Datenbankanalyse ergab, dass das 328 Aminosäure große *Y. lipolytica* Protein YALI0E24013p bezüglich seiner Aminosäuresequenz eine Homologie von 77 % zu der  $\alpha$ -Untereinheit der SCS von *S. cerevisiae* zeigt (www.genolevures.org). Des Weiteren weist das 435 Aminosäure große Protein YALI0D04741p von *Y. lipolytica* eine 76 %ige Homologie zu der Aminosäuresequenz der  $\beta$ -Untereinheit der SCS von *S. cerevisiae* auf. Aufgrund der hohen Homologie der Aminosäuresequenzen der SCS von *S. cerevisiae* und *Y. lipolytica* wurde davon ausgegangen, dass YALI0E24013g (*SCS1*) und YALI0D04741g (*SCS2*) die beiden Untereinheiten der SCS in *Y. lipolytica* kodieren. Im Gegensatz zu *LSC1* und *LSC2* beinhalten *SCS1* und *SCS2* Inserts von der Größe von 640 bp und 461 bp. Des Weiteren ergab die Datenbankanalyse mit MitoProt eine 92%ige und eine 98%ige Wahrscheinlichkeit für die Lokalisation im Mitochondrium von Scs1p und Scs2p in *Y. lipolytica* (Claros & Vincens, 1996).

Für die Überexpression von *SCS1* und *SCS2* wurde jeweils ein 1,1 kb bzw. 1,2 kb großer Promotor- und ein 1,3 kb bzw. 1,5 kb großer Terminatorbereich gemeinsam mit dem betreffenden ORF aus H222 mittels PCR amplifiziert. Durch die Klonierung dieser

Expressionskassetten in den multicopy Vektor p64PT entstand der Vektor p64LSC (siehe 2.9.2.). Die gleichzeitige Klonierung beider Promotor-ORF-Terminatorkassetten in denselben Vektor p64PT hatte die Erzeugung gleicher Kopiezahlen beider Expressionskassetten in den Transformanden zum Ziel. Nach der Transformation des mit *SacII* linearisierten multicopy Vektors p64LSC wurde mittels Southern Hybridisierung die Integration der Expressionskassetten von *SCS1* und *SCS2* in das Genom von H222-S4 überprüft (Abb. 3.5). Der Elternstamm zeigte eine genomische Bande für *SCS1* (6,8 kb) und *SCS2* (2,9 kb). Die Integration der Expressionskassetten für *SCS1* und *SCS2* in den Stamm H222-S4 wurde durch die zusätzliche Detektion einer *SCS1*-spezifischen Bande (4,4 kb) und einer *SCS2*-spezifischen Bande (3,3 kb) bestätigt. Durch die erhöhte Vektorbandenintensität im Vergleich zu den genomischen Banden, wodurch eine mehrfache Integration des multicopy Vektors nachgewiesen werden konnte, konnten die genomischen Banden nur mit schwacher Intensität dargestellt werden. Die unterschiedliche Intensität der vektorialen Banden von *SCS1* und *SCS2* könnten auf eine unterschiedliche Kopiezahl der jeweiligen Expressionskassetten hindeuten, hervorgerufen durch die unvollständige Integration des p64LSC Vektors. Ein weiterer möglicher Grund für die unterschiedlichen Intensitäten könnte eine unterschiedliche Konzentration der *SCS1*- und *SCS2*-Sonden sein. Des Weiteren wäre eine Möglichkeit zur Erklärung der unterschiedlichen Intensitäten, dass die *SCS2*-Sonde ebenfalls an *SCS1* gebunden hat. Die *SCS2*-Sonde weist zu dem *SCS1*-Gen eine 35 % Homologie auf. Somit wäre es denkbar, dass die *SCS2*-Sonde ebenfalls das *SCS1*-Gen detektiert hat und folglich für die *SCS1*-Banden im Vergleich zu den *SCS2*-Banden eine höhere Intensität nachgewiesen wurde. Da die Transformande H222-AK2-3 die höchste Intensität der Vektorbanden gegenüber den weiteren Transformanden zeigte, wurde sie für die weiteren Arbeiten ausgewählt und als Stamm H222-AK2 benannt.

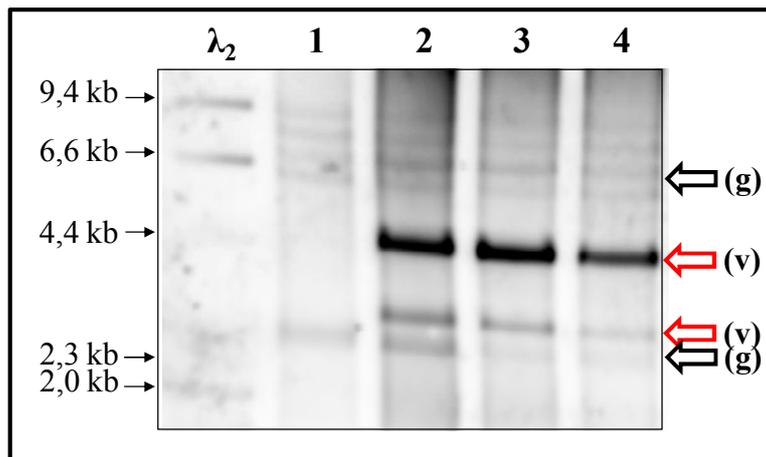


Abbildung 3. 5: Southern Hybridisierung als Nachweis für die Überexpression der Gene der  $\alpha$ - und der  $\beta$ -Untereinheit der SCS in H222-S4. Die genomische DNA wurde mit *EcoRV* verdaut. Ein 1,4 kb großes Fragment, amplifiziert mit LSC1\_ORF\_for und LSC1\_ORF\_rev, wurde für den spezifischen Nachweis des *SCS1*-ORFs als Sonde eingesetzt und das mit LSC2\_ORF\_for und LSC2\_ORF\_rev amplifizierte 2,1 kb Fragment diente als *SCS2*-ORF-spezifische Sonde. Die schwarzen Pfeile kennzeichnen das 6,8 kb große genomische (g) *SCS1*- sowie das 2,9 kb große genomische *SCS2*-Fragment. Mit den roten Pfeilen wird auf die integrierten, vektorialen (v) 4,4 kb großen *SCS1*- und 3,3 kb großen *SCS2*-Fragmente hingewiesen.  $\lambda_2$ -Molekulargewichtsstandard  $\lambda_2$ ; 1-Rezipientenstamm H222-S4; 2-Transformante H222-AK2-3; 3-Transformante H222-AK2-2; 4-Transformante H222-AK2-1.

Der Southern Blot (Abb. 3.5) zeigt jedoch ebenfalls unspezifische Bande für alle untersuchten Hefestämme. Die Bandengrößen liegen zum einen unterhalb von 6,6 kb und zum anderen zwischen 6,6 kb und 9,4 kb. Da diese Fragmente ebenfalls für den Referenzstamm detektiert wurden, wurde ein unspezifisches Binden der Sonden vermutet. Ein Sequenzvergleich der Sondensequenzen mit dem *Y. lipolytica* Genom ([www.genolevures.org](http://www.genolevures.org)) ergaben homologe Bereiche von 20 Basen. Ein homologer Bereich zeigte sich für die *SCS1*-Sonde in dem ORF von YALI0F08349g. Durch den Verdau mit *EcoRV* würde sich somit eine 5,4 kb Bande ergeben. Des Weiteren zeigte sich eine Übereinstimmung von 20 Basen von der *SCS1*-Sonde mit dem YALI0C21846g Gen in *Y. lipolytica*, dessen *EcoRV*-Verdau zu einer 7,1 kb Bande führen würde. Eine 9,0 kb Bande könnte sich aus der Homologie der 20 Basen der *SCS2*-Sonde mit dem YALI0E17985g ORF ergeben. Bisherige Southern Hybridisierungen wurden mit Sonden von minimal 150 bp erfolgreich durchgeführt (Zobel, 2010). Es ist jedoch fragwürdig, ob eine stabile DNA-DNA-Hybridisierung aufgrund einer Homologie von 20 bp entstehen kann. Würden jedoch 20 Basen für eine stabile DNA-DNA-Hybridisierung ausreichen, könnten somit unspezifische Banden der Transformanten sowie des Referenzstammes erklärt werden. Denkbar wäre außerdem, dass die unspezifischen Banden durch einen unvollständigen Verdau der genomischen DNA aller ausgewählten Hefestämme entstanden sind.

### 3.2.1. Bestimmung der Succinyl-CoA Synthetase Enzymaktivität

Anschließend sollte der Gen-Dosis Effekt von *SCS1* und *SCS2* auf die SCS Aktivität der konstruierten Transformante H222-AK2 (*mcSCS1 mcSCS2*) untersucht werden. Es wurden fünf unterschiedliche Methoden für die Bestimmung der Aktivität der SCS getestet (siehe 2.12.8). Dafür wurden zwei verschiedene Verfahren für die Probengewinnung, zum einen der mechanischen Glasperlenaufschluss, modifiziert nach Ermakova (1986), und zum anderen die Mitochondrienisolierung, modifiziert nach Barth & Gaillardin (1997), angewandt. Jedoch konnte keine Aktivität der SCS für den Wildtyp oder die Transformante H222-AK2, unabhängig von der angewendeten Methode der Gewinnung des zellfreien Extraktes, nachgewiesen werden.

In vorangegangenen Arbeiten wurde nachgewiesen, dass die erhöhte Gen-Dosis des Gens der Isocitrat-Lyase (Förster *et al.*, 2007a), der Aconitase (Holz *et al.*, 2009) sowie der Pyruvat-Carboxylase (siehe 3.1.) in einer gesteigerten spezifischen Aktivität des betreffenden Enzymes resultierte. Somit konnte angenommen werden, dass die erhöhte Gen-Dosis von *SCS1* und *SCS2* eine gesteigerte SCS Aktivität zur Folge hatte.

### 3.2.2. Bestimmung der spezifischen Aktivität weiterer Enzyme

Der Gen-Dosis Effekt der SCS kodierenden Gene auf die Aktivität der Enzyme des TCC sowie auf die Aktivität der ICL und der PYC wurde anschließend untersucht. Für die Aktivitätsbestimmungen wurde die Transformante H222-AK2 (*mcSCS1 mcSCS2*) in 100 ml Minimalmedium mit 1 % Glucose kultiviert.

Die Transformante H222-AK2 mit einer Überexpression der Succinyl-CoA Synthetase kodierenden Gene zeigte im Vergleich zu dem Wildtyp H222 ein deutlich verlangsamtes Wachstum während der Kultivierung im Minimalmedium mit Glucose als C-Quelle (Abb. 3.6). Es wurde eine geringere Wachstumsrate ( $\mu_{\max} = 0,17 \text{ h}^{-1}$ ) der Transformante H222-AK2, bezogen auf die Wachstumsrate des Wildtyps H222 ( $\mu_{\max} = 0,2 \text{ h}^{-1}$ ), ermittelt.

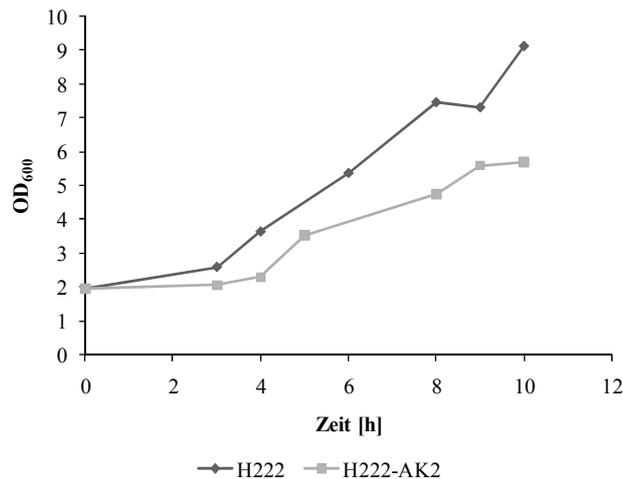


Abbildung 3. 6: Wachstum der Transformante H222-AK2 (*mcSCS1 mcSCS2*) im Vergleich zu dem Wildtyp H222 während der Kultivierung im Minimalmedium mit 1 % Glucose. Das Wachstum wurde durch die Bestimmung der OD<sub>600</sub> verfolgt.

Die photometrische Messung der verschiedenen Enzymaktivitäten der Transformante H222-AK2 und des Wildtyps erfolgte während der exponentiellen Phase nach sechs Stunden (Abb. 3.7).

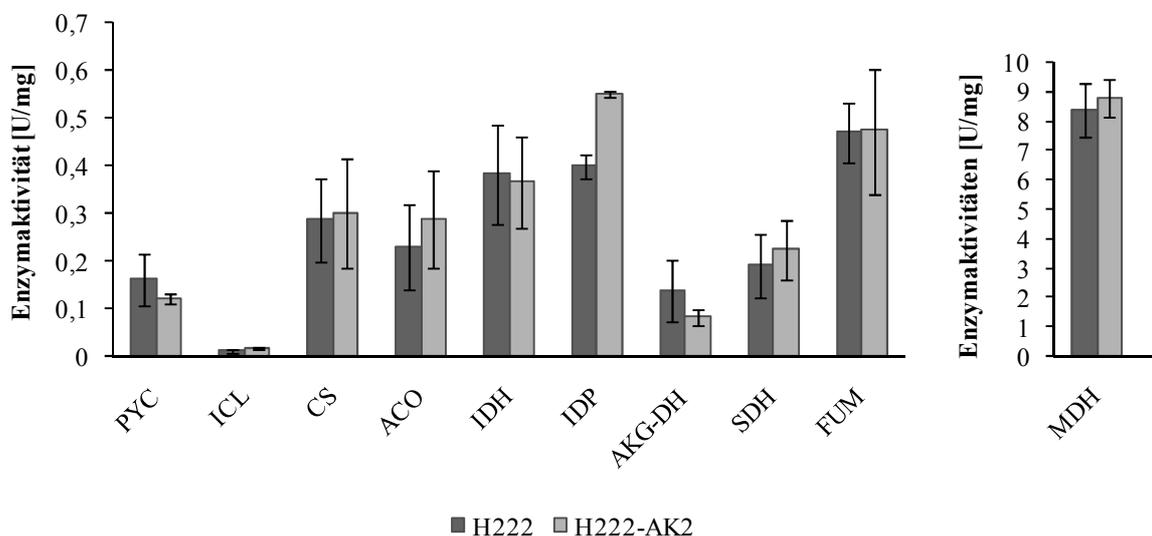


Abbildung 3. 7: Darstellung der spezifischen Aktivitäten der Enzyme des TCC sowie der ICL und der PYC für die Transformante H222-AK2 (*mcSCS1 mcSCS2*) im Vergleich zum Wildtyp H222. Die Bestimmung der spezifischen Enzymaktivitäten wurde nach sechs Stunden Kultivierung im Minimalmedium mit 1 % Glucose durchgeführt. Jeweils 5 ml Kultur wurden mechanisch aufgeschlossen und die Enzymaktivitäten des zellfreien Extraktes wurden bestimmt. Die Standardabweichung, welche sich aus mindestens drei unabhängigen Versuchen ergab, ist ebenfalls dargestellt. PYC: Pyruvat-Carboxylase, ICL: Isocitrat-Lyase, CS: Citrat-Synthase, ACO: Aconitase, IDH: NAD-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase, IDP: NADP-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase, AKG-DH:  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase, SDH: Succinat-Dehydrogenase, FUM: Fumarase, MDH: Malat-Dehydrogenase

Abbildung 3.7 zeigt, dass die Überexpression der SCS kodierenden Gene eine Erhöhung der spezifischen IDP-Aktivität der Transformante H222-AK2 (*mcSCS1 mcSCS2*) um 30 % ( $0,55 \pm 0,01$  U/mg) gegenüber dem Wildtyp H222 ( $0,39 \pm 0,03$  U/mg) zur Folge hatte. Die Bestimmung der spezifischen Aktivität der weiteren Enzyme zeigte hingegen keinen signifikanten Einfluss der erhöhten Gen-Dosis der Succinyl-CoA Synthetase kodierenden Gene.

### 3.3. Überexpression der für die Pyruvat-Carboxylase und Succinyl-CoA Synthetase kodierenden Gene

Des Weiteren wurde ein Einfluss der gemeinsamen Überexpression von *PYC*, *SCS1* und *SCS2* auf die Succinatproduktion von *Y. lipolytica* überprüft.

Für das Ziel der Überexpression von *PYC*, *SCS1* und *SCS2* wurde der Stamm H222-S4 mit den linearisierten multicopy Expressionsvektoren p64PYC und p64LSC (siehe 2.9.1. und 2.9.2.) gleichzeitig transformiert. Die resultierenden Transformanden wurden mittels Southern Hybridisierung überprüft (Abb. 3.8). Für den Vergleichsstamm H222-S4 wurden die genomischen Banden der entsprechenden ORFs (*SCS1*-ORF = 6,8 kb; *SCS2*-ORF = 2,8 kb; *PYC*-ORF = 8,9 kb) detektiert. Die Integration der *PYC*-Expressionskassette ins Genom wurde durch die zusätzliche Bande bei 6,2 kb in allen überprüften Transformanden nachgewiesen. Die zusätzlichen Banden bei 4,4 kb sowie bei 3,3 kb in allen Transformanden entstand durch die Integration der Expressionskassette von *SCS1* und *SCS2*. Die mehrfache Integration der entsprechenden Expressionskassette spiegelte sich in einer verstärkten Vektorbandenintensität gegenüber der genomischen Bande wider. Die Transformanden H222-AK3-3, H222-AK3-4 und H222-AK3-7 wurden aufgrund der erhöhten Vektorbandenintensität der drei Expressionskassetten für weitere Untersuchungen ausgewählt. Die zusätzlichen Banden, die sowohl im Vergleichstamm als auch in den Transformanden auftraten, wurden wahrscheinlich durch eine unspezifische Bindung der *SCS1*- und *SCS2*-spezifischen Sonden oder durch einen unvollständigen Verdau der genomischen DNA verursacht.

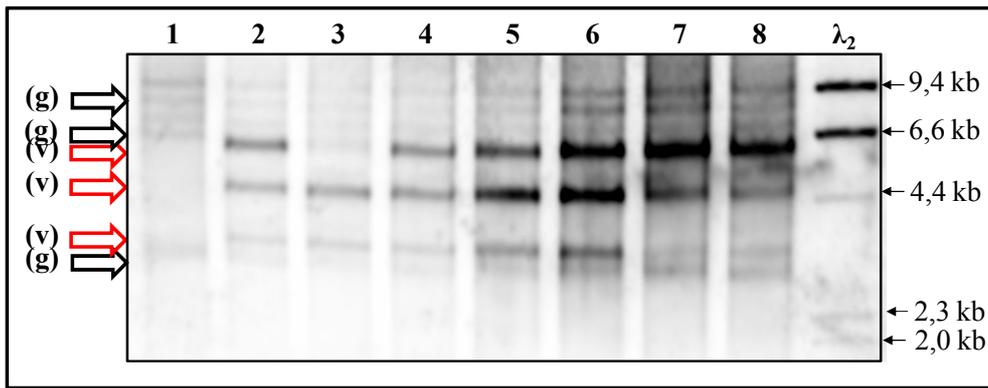


Abbildung 3.8: Southern Hybridisierung der Transformante H222-AK3 mit der Überexpression von *PYC*, *SCS1* und *SCS2*. Die genomische DNA wurde mit *EcoRV* verdaut. *PYC* wurde mit einer spezifischen Sonde entsprechend dem ORF, amplifiziert mit *PYC\_ORF\_for* und *PYC\_ORF\_rev*, detektiert. Die Detektion des ORFs von *SCS1* und *SCS2* erfolgte mit den mit *LSC1\_ORF\_for* und *LSC1\_ORF\_rev* bzw. *LSC2\_ORF\_for* und *LSC2\_ORF\_rev* amplifizierten ORF-spezifischen Sonden. Die schwarzen Pfeile kennzeichnen die genomischen (g) Fragmente: 6,8 kb *SCS1*-Fragment, 2,8 kb *SCS2*-Fragment und 8,9 kb *PYC*-Fragment. Die roten Pfeile zeigen die jeweiligen vektorialen (v) integrierten Fragmente: 4,4 kb *SCS1*-Fragment, 3,3 kb *SCS2*-Fragment und 6,2 kb *PYC*-Fragment. 1-Referenzstamm H222-S4; 2-Transformante H222-AK3-3; 3-Transformante H222-AK3-1; 4-Transformante H222-AK3-2; 5-Transformante H222-AK3-4; 6-Transformante H222-AK3-7; 7-Transformante H222-AK3-5; 8-Transformante H222-AK3-6;  $\lambda_2$ -Molekulargewichtsstandard  $\lambda_2$

Die mit der Southern Hybridisierung ausgewählten Transformanten wurden anschließend durch ihr Wachstum (Abb. 3.9) und ihre spezifische *PYC* Aktivität (Abb. 3.10) näher charakterisiert.

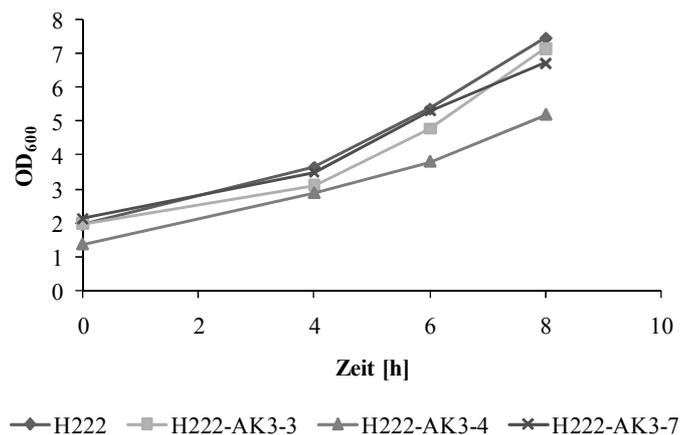


Abbildung 3.9: Charakteristisches Wachstum der Transformanten H222-AK3-3, H222-AK3-4 und H222-AK3-7 im Vergleich zu dem Wildtyp H222. Das Wachstum wurde durch die Messung der optischen Dichte bei 600 nm während der Kultivierung im Minimalmedium mit 1 % Glucose verfolgt. Das dargestellte typische Wachstum ergab sich aus drei unabhängigen Versuchen.

Außer der Transformante H222-AK3-4 zeigten die untersuchten Transformanten und der Wildtyp H222 ein vergleichbares Wachstum während der Kultivierung im glucosehaltigen Minimalmedium (Abb. 3.9). Für die Transformante H222-AK3-4 wurde hingegen ein verlangsamtes Wachstum beobachtet. Die Wachstumsraten von H222-AK3-3 und H222-AK3-7 zeigten mit  $0,22 \text{ h}^{-1}$  und  $0,23 \text{ h}^{-1}$  einen mit der Wachstumsrate von H222 ( $\mu_{\max} = 0,2 \text{ h}^{-1}$ ) vergleichbaren Wert, wohingegen H222-AK3-4 eine verringerte Wachstumsrate von  $0,15 \text{ h}^{-1}$  aufwies. Das verlangsamte Wachstum von H222-AK3-4 wurde vermutlich durch eine Integration einer Expressionskassette in eine für das Wachstum wichtige genomische Region verursacht.

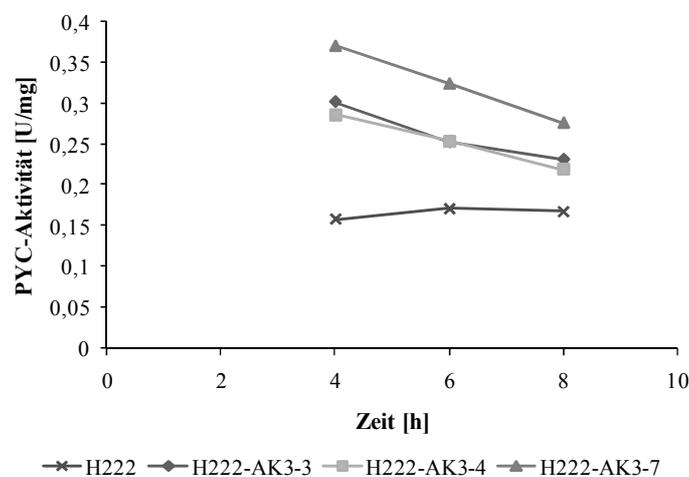


Abbildung 3.10: Spezifische PYC Aktivitäten der Transformanten H222-AK3-3, H222-AK3-4, H222-AK3-7 im Vergleich zu dem Wildtyp H222. Die spezifische Aktivität wurde während der Kultivierung mit Minimalmedium mit 1 % Glucose bestimmt.

Um den Einfluss des Gen-Dosis-Effektes der mehrfach integrierten *PYC*-Expressionskassette auf die *PYC* Aktivität zu untersuchen, wurden in der exponentiellen Phase nach 4, 6 und 8 h die spezifischen Enzymaktivitäten bestimmt (Abb. 3.10). Für die Transformante H222-AK3-3 wurde eine 2,5-fache Steigerung der spezifischen Aktivität nachgewiesen, wohingegen für die Transformanten H222-AK3-4 und H222-AK3-7 eine Verdopplung der *PYC* Aktivität (0,3 U/mg) im Vergleich zu H222 bestimmt wurde. Folglich wurde die Transformante H222-AK3-3 mit der höchsten spezifischen Aktivität von  $0,37 \pm 0,01 \text{ U/mg}$ , verglichen mit  $0,16 \pm 0,06 \text{ U/mg}$  von H222, für weitere Arbeiten ausgewählt und als *Y. lipolytica* Stamm H222-AK3 bezeichnet. Ein Vergleich der Enzymaktivität der Transformante H222-AK3 (*mcPYC mcSCS1 mcSCS2*) mit der Transformante H222-AK1, die durch die mehrfache Integration des *PYC* kodierenden Gens charakterisiert ist (*mcPYC*;

0,52 ± 0,02 U/mg), zeigte jedoch, dass die Steigerung der PYC Aktivität in H222-AK3 deutlich geringer war.

Es sollte ebenfalls der Einfluss des Gen-Dosis-Effektes der mehrfach integrierten *SCS1*- und *SCS2*-Expressionskassette auf die SCS Aktivität untersucht werden. Trotz der Anwendung verschiedener Methoden gelang es nicht eine SCS Aktivität für H222-AK3 (*mcPYC mcSCS1 mcSCS2*) zu bestimmen (siehe 3.2.1.). Aufgrund der Ergebnisse vorangegangener Arbeiten, wurde jedoch davon ausgegangen, dass die erhöhte Gen-Dosis von *SCS1* und *SCS2* in einer erhöhten Enzymaktivität resultierte (Förster *et al.*, 2007a; Holz *et al.*, 2009).

### 3.3.1. Bestimmung der spezifischen Aktivitäten der Enzyme des TCC und der PYC sowie der ICL

Die Transformante H222-AK3 (*mcPYC mcSCS1 mcSCS2*) wurde ebenfalls durch die Bestimmung der spezifischen Aktivitäten der ICL, CS, ACO, IDH, IDP, AKG-DH, SDH, FUM und MDH näher charakterisiert. Der Einfluss der 2,5-fach erhöhten spezifischen PYC Aktivität im Vergleich zum Wildtyp sowie die mehrfache Integration der *SCS1*- und *SCS2*-Expressionskassette auf andere Enzyme wurde während der Kultivierung auf Minimalmedium mit 1 % Glucose untersucht (Abb. 3.11).

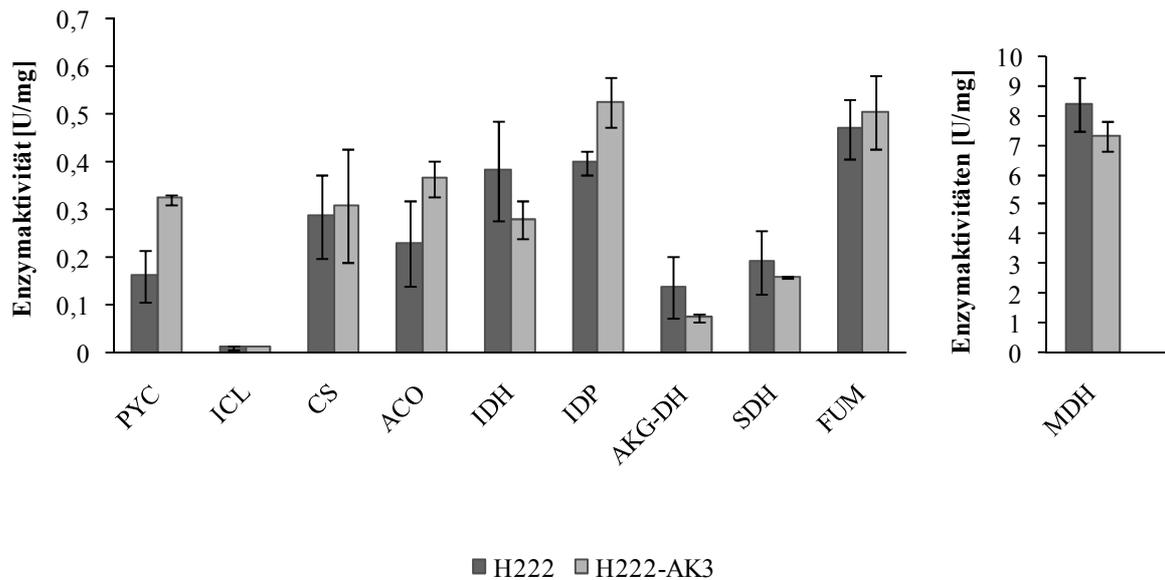


Abbildung 3.11: Darstellung der spezifischen Aktivitäten verschiedener Enzyme der Transformante H222-AK3 (*mcPYC mcSCS1 mcSCS2*) im Vergleich zum Wildtyp H222. Die ausgewählten Enzymaktivitäten wurden in der exponentiellen Phase nach 6 h von einer Kultur mit Minimalmedium und 1 % Glucose bestimmt. Aus mindestens drei unabhängigen Versuchen wurde eine entsprechende Standardabweichung erhalten. PYC: Pyruvat-Carboxylase, ICL: Isocitrat-Lyase, CS: Citrat-Synthase, ACO: Aconitase, IDH: NAD-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase, IDP: NADP-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase, AKG-DH:  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase, SDH: Succinat-Dehydrogenase, FUM: Fumarase, MDH: Malat-Dehydrogenase

Die Bestimmung der ausgewählten spezifischen Enzymaktivitäten zeigte, dass die 2,5-fach erhöhte PYC Aktivität gemeinsam mit der mehrfachen Integration der *SCS1*- und *SCS2*-Expressionskassette einen positiven Effekt auf die spezifische Aktivität der IDP und der ACO erzeugte (Abb. 3.11). Für die spezifische Aktivität der IDP der Transformante H222-AK3 (*mcPYC mcSCS1 mcSCS2*) wurde mit  $0,52 \pm 0,05$  U/mg im Vergleich zu der Aktivität von  $0,39 \pm 0,03$  U/mg des Wildtyps eine Erhöhung um 25 % nachgewiesen. Eine vergleichbare Erhöhung der IDP auf  $0,55 \pm 0,01$  U/mg wurde ebenfalls für die Transformante H222-AK2 (*mcSCS1 mcSCS2*) bestimmt. Eine geringe Erhöhung der spezifischen ACO Aktivität von H222-AK3 mit  $0,37 \pm 0,04$  U/mg im Vergleich zu dem Wildtyp ( $0,23 \pm 0,09$  U/mg) wurde ebenfalls nachgewiesen. Die Werte der weiteren bestimmten spezifischen Enzymaktivitäten der Transformante H222-AK3 entsprachen denen des Wildtyps.

### 3.4. Deletion der Succinyl-CoA Synthetase Gene

Als weiterer möglicher beeinflussender Faktor für die Succinatproduktion wurde der Aktivitätsverlust der SCS, hervorgerufen durch die Deletion der Gene der Succinyl-CoA Synthetase, untersucht.

Das katalytische Zentrum der SCS wurde als Bestandteil beider Untereinheiten beschrieben (Pearson & Bridger, 1975a; Pearson & Bridger, 1975b; Nishimura, 1986; Majumdar *et al.*, 1991). Folglich resultierte die Modifizierung einer Untereinheit der SCS in *E. coli* sowie die Deletion eines Gens der SCS in *S. cerevisiae* in einem Verlust der Enzymaktivität (Nishimura, 1986; Majumdar *et al.*, 1991; Przybyla-Zawislak *et al.*, 1998). Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurden *Y. lipolytica* Stämme erzeugt, in denen sowohl je ein Gen und beide Gene, die vermutlich die zwei Untereinheiten der SCS in *Y. lipolytica* kodieren, zerstört wurden. Die entsprechenden Deletionskassetten (siehe 2.9.3. und 2.9.4.) wurden mit dem *Cre-lox* Rekombinationssystem (Fickers *et al.*, 2003) mit *URA3* als Selektionsmarker konstruiert und mittels LiAc-Methode in die uraciluxotrophe Rezipientenstämme H222-41 und H222-S4 transformiert. Die homologe Integration dieser Deletionskassetten wurde mittels Southern Blot nachgewiesen (Abb. 3.12, 3.13, 3.14). Durch die Integration der *SCSI*-Deletionskassette in den Stamm H222-S4 entstand der uracilprototrophe Stamm H222-AK4 (*scs1::URA3*).

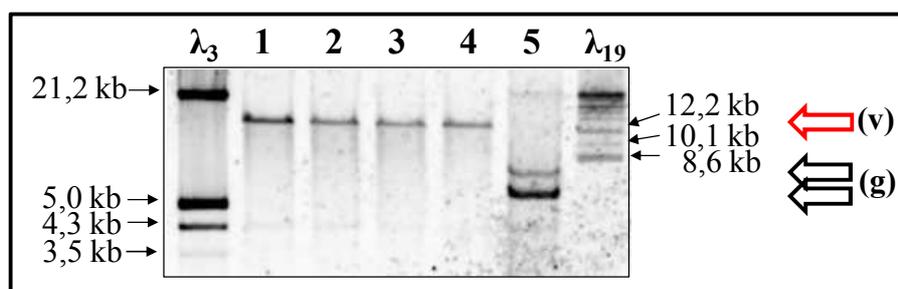


Abbildung 3. 12: Southern Hybridisierung für den Nachweis der Deletion des Gens der  $\alpha$ -Untereinheit der SCS (*SCSI*) durch die homologe Rekombination der Deletionskassette (Promotor-*loxR-URA3-loxP*- Terminator). Die genomische DNA ausgewählter Transformanten sowie des Rezipientenstammes H222-S4 wurden vollständig mit der Restriktionsendonuklease *SalI* verdaut. Die Detektion der spezifischen *SCSI*-Bande erfolgte mittels des dem *SCSI*-Promotor entsprechenden *I-SceI-SacI*-Fragmentes der Deletionskassette von *SCSI* aus pLSC1PUT. Die schwarzen Pfeile kennzeichnen die genomischen (g) *SCSI*-Fragmente bei 6,7 kb und 5,5 kb; der rote Pfeil kennzeichnet das Promotor-*loxR-URA3-loxP*-Terminator-Fragment (v) der Deletionskassette bei 12,7 kb.  $\lambda_3$ -Molekulargewichtsstandard  $\lambda_3$ ; 1-Transformante H222-AK4-1; 2-Transformante H222-AK4-2; 3-Transformante H222-AK4-3; 4-Transformante H222-AK4-4; 5-Rezipientenstamm H222-S4;  $\lambda_{19}$ -Molekulargewichtsstandard  $\lambda_{19}$ .

Die Zerstörung des offenen Leserahmens des Gens der  $\alpha$ -Untereinheit der SCS in den Transformanden wurde durch die Southern Blot Analyse bestätigt (Abb. 3.12). Zur Detektion der Integration der Deletionskassette wurde eine 1,1 kb große dem Promotorbereich von *SCS1* homologe Sonde eingesetzt. Im Ausgangsstamm H222-S4 konnten die genomischen Banden von *SCS1* bei 6,7 kb und 5,5 kb nachgewiesen werden. Die Zerstörung von *SCS1* durch die homologe Integration der Deletionskassette zeigte sich in den Transformanden H222-AK4-1 bis H222-AK4-4 durch die Detektion einer spezifischen Bande bei 12,7 kb. Die Transformande H222-AK4-1, weiterhin als H222-AK4 bezeichnet, wurde für die weiteren Untersuchungen ausgewählt.

Die Deletion des Gens der  $\beta$ -Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase erfolgte zuerst im *Y. lipolytica* Stamm H222-41 (siehe 2.9.4.). Die Überprüfung der Transformanden wurde mit einer Southern Blot Analyse unter Verwendung einer 1,1 kb spezifischen Sonde, die dem ORF von *SCS2* entsprach, durchgeführt (Abb. 3.13 A). Die Detektion der Bande bei 9,6 kb entsprach somit dem ORF von *SCS2*. Die Zerstörung des Leserahmens durch die Integration der Deletionskassette wurde durch die fehlende 9,6 kb große Bande in der Transformande H222-AK6-2 nachgewiesen. Zur Bestätigung der Integration der *URA3*-haltigen Deletionskassette wurde anschließend eine 1,7 kb *URA3*-homologe Sonde eingesetzt (Abb. 3.13 B). Dies führte in der genomischen DNA des Rezipientenstammes H222-41 zur Detektion einer spezifischen Bande bei 3,5 kb, resultierend aus dem um 41 Basen verkürzten *URA3*-ORF (Mauersberger *et al.*, 2001). Die Transformanden zeigten eine zusätzliche Bande bei 1,2 kb, welche durch die Integration der *loxR-URA3-loxP* enthaltenen Deletionskassette in das Genom von *Y. lipolytica* entstand. Beide Southern Hybridisierungen bestätigten die Deletion des Gens der  $\beta$ -Untereinheit der SCS in der Transformande H222-AK6-2, indem sowohl die Zerstörung des *SCS2*-ORFs als auch die homologe Integration der Deletionskassette bewiesen wurde. Im Gegensatz dazu zeigte die Transformande H222-AK6-1 im Southern Blot eine heterologe Integration der Deletionskassette ins Genom (Abb. 3.13 B), da sowohl die Deletionskassette als auch der intakte *SCS2*-ORF detektiert werden konnte (Abb. 3.13 A). Für die weiteren Arbeiten wurde die uracilprototrophe Transformande H222-AK6-2 mit der Deletion des Gens der  $\beta$ -Untereinheit der SCS, bezeichnet als H222-AK6, verwendet.

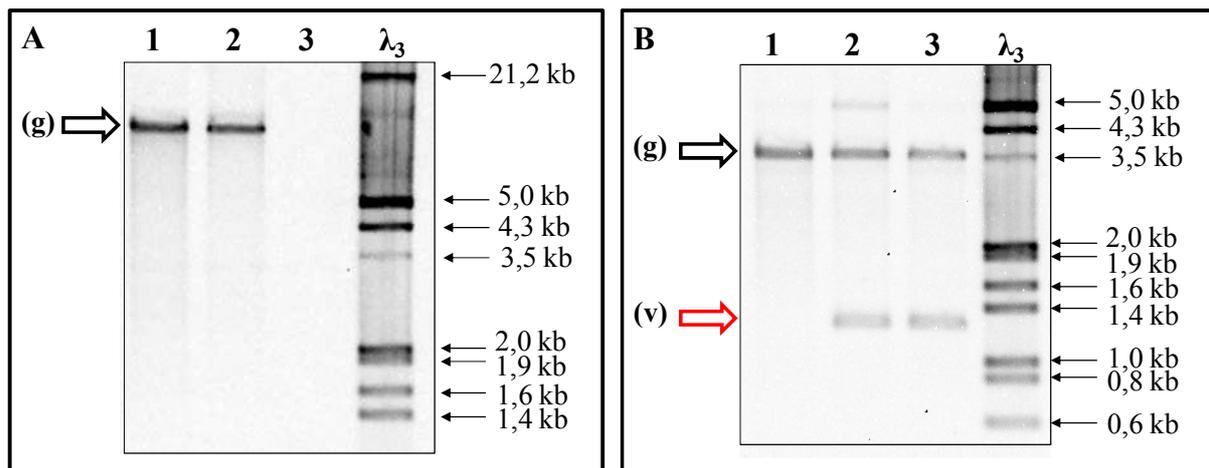


Abbildung 3. 13: Nachweis der Deletion des Gens der  $\beta$ -Untereinheit der SCS (*SCS2*) in dem Ausgangsstamm H222-41 mittels Southern Hybridisierung. Die zu überprüfende genomische DNA wurde mit *EcoRI* vollständig verdaut. 1-Ausgangsstamm H222-41; 2-Transformante H222-AK6-1; 3-Transformante H222-AK6-2;  $\lambda_3$ - Molekulargewichtsstandard  $\lambda_3$  **A**: Nachweis der Deletion von *SCS2* durch die spezifische Detektion des *SCS2*-ORFs. Die spezifische Sonde wurde durch die Oligonukleotide LSC2\_for und LSC2\_rev amplifiziert und das resultierende 1,8 kb große Fragment mit einem *ClaI* Verdau auf ein 1,1 kb großes Fragment verkleinert, welches als *SCS2*-ORF-spezifische Sonde eingesetzt wurde. Der schwarze Pfeil kennzeichnet das genomische (g) *SCS2*-Fragment bei 9,6 kb. **B**: Nachweis von *URA3*. Für diesen Nachweis wurde die Membran von dem Nachweis des *SCS2*-ORFs gestrippt und mit einer *URA3*-spezifischen Sonde behandelt. Die 1,7 kb *URA3*-spezifische Sonde wurde durch den *SalI*-Verdau aus pINA443 gewonnen. Der schwarze Pfeil kennzeichnet das genomische (g) *URA3*-Fragment bei 3,5 kb und der rote Pfeil zeigt das integrierte *URA3*-Fragment der Deletionskassette von *SCS2* (v) bei 1,2 kb.

Des Weiteren wurde das Gen der  $\beta$ -Untereinheit der SCS im *Y. lipolytica* Stamm H222-S4 zerstört. Dieser Ausgangsstamm besitzt im Vergleich zu H222-41 die Fähigkeit Saccharose als C-Quelle zu verwerten (Mauersberger *et al.*, 2001). Die Deletion von *SCS2* erfolgte wie im Stamm H222-41 mit der Promotor-*loxR-URA3-loxP*-Terminator Kassette von *SCS2* aus pLSC2PUT (siehe 2.9.4.). Der Nachweis der Zerstörung des *SCS2*-ORFs wurde mit zwei Southern Hybridisierungen durchgeführt. Für die Detektion des betreffenden ORFs wurde eine 1,1 kb spezifische Sonde, die dem ORF von *SCS2* entsprach, eingesetzt (Abb. 3.14 A). Für den Referenzstamm H222-S4 wurde eine spezifische Bande von 9,6 kb, die dem genomischen ORF von *SCS2* zugeordnet wurde, detektiert. Die Transformanden H222-AK8-1 und H222-AK8-2 zeigten keine entsprechende Bande infolge der homologen Integration der Deletionskassette in den *SCS2* Ort. Die Bestätigung der Integration der Promotor-*loxR-URA3-loxP*-Terminator Kassette in das *Y. lipolytica* Genom erfolgte durch eine zweite Southern Hybridisierung mit einer 1,7 kb *URA3* spezifischen Sonde (Abb. 3.14 B). Der Elternstamm H222-S4 wies nur eine spezifische Bande bei 6,1 kb auf, welche durch die Zerstörung des *URA3*-Allels, hervorgerufen durch die Integration von *SUC2*, entstand (Mauersberger *et al.*,

2001). Die Transformanden zeigten eine zusätzliche spezifische Bande bei 1,2 kb, die durch die Integration der Deletionskassette entstand. Die Southern Blot Analysen (Abb. 3.14 B) bewiesen die Integration der Promotor-*loxR-URA3-loxP*-Terminator Kasette und durch den nicht nachgewiesenen *SCS2*-ORFs, wurde eine homologe Rekombination der Kasette bestätigt. Die Transformande H222-AK8-1 wurde in den weiteren Untersuchungen als *Y. lipolytica* Stamm H222-AK8 bezeichnet.

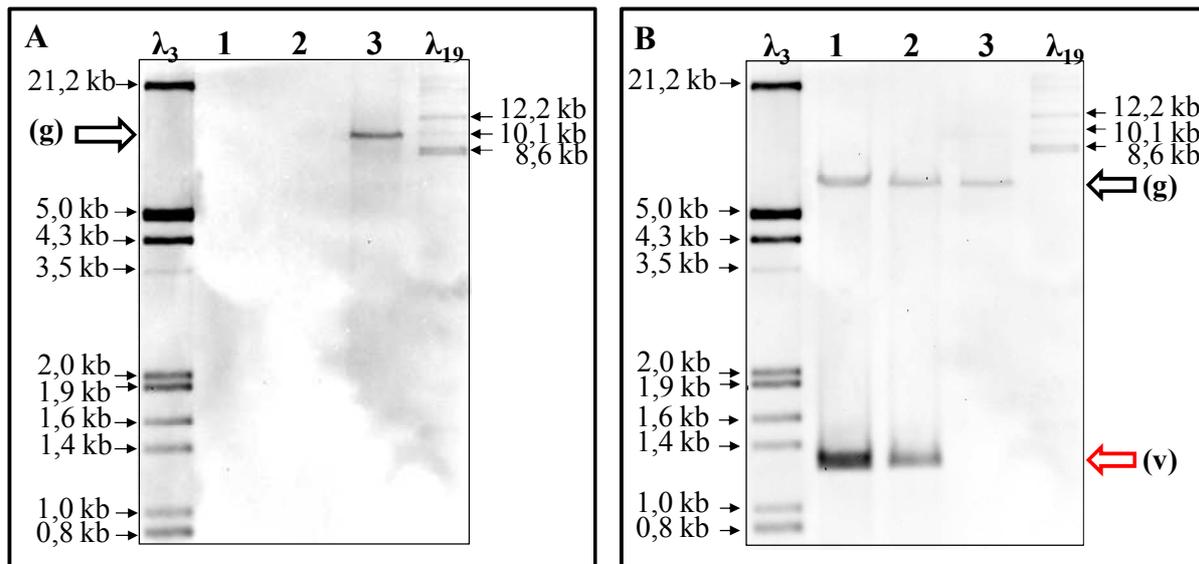


Abbildung 3. 14: Southern Hybridisierung für den Nachweis der *SCS2* Deletion in H222-S4. Die jeweilige genomische DNA wurde vollständig mit der Restriktase *EcoRI* verdaut.  $\lambda_3$ -Molekulargewichtsstandard  $\lambda_3$ ; 1-Transformande H222-AK8-1; 2-Transformande H222-AK8-2; 3-Elternstamm H222-S4;  $\lambda_{19}$ -Molekulargewichtsstandard  $\lambda_{19}$  **A:** Nachweis der Deletion des *SCS2*-ORFs mit einer dem ORF entsprechenden 1,1 kb großen Sonde. Das erhaltene genomische *SCS2*-Fragment wurde mit der spezifischen Sonde durch eine Bande bei 9,6 kb nachgewiesen und wird durch den schwarzen Pfeil (g) gekennzeichnet. **B:** Der Nachweis des integrierten *URA3*-Allels der Deletionskassette von *SCS2* wurde mit einer 1,7 kb großen *URA3*-spezifischen Sonde, aus pINA334 stammend, durchgeführt. Der schwarze Pfeil zeigt das genomische (g) *URA3*-Fragment bei 6,1 kb und der rote Pfeil kennzeichnet das integrierte *URA3*-Fragment der Deletionskassette (v) bei 1,2 kb.

Für eine Deletion beider Gene der SCS musste ein uraciluxotropher Stamm mit einer bereits vorhandenen Deletion eines der beiden Gene erzeugt werden. Für diesen Zweck wurde der Cre-Rekombinase kodierende Vektor pUB4-CRE in den Stamm H222-AK6 (*scs2::URA3*) transformiert. Durch die Expression der Cre-Rekombinase wurde das in der Deletionskassette enthaltene und durch *lox*-sites flankierte *URA3* Gen herausgeschnitten (Fickers *et al.*, 2003) und der uraciluxotropher Stamm H222-AK7 ( $\Delta$ *scs2*) erhalten.

Ausgehend von dem uraciluxotrophen Stamm H222-AK7 ( $\Delta scs2$ ) wurde der Stamm H222-AK9 ( $scs1::URA3 \Delta scs2$ ) mit der Deletion beider Gene der SCS erzeugt. Dazu wurde die Deletionskassette für *SCS1* in den Stamm H222-AK7 transformiert. Die homologe Integration der Deletionskassette für *SCS1* in H222-AK7 wurde durch eine Southern Hybridisierung nachgewiesen (Abb. 3.15). Für die Detektion des Promotorbereiches von *SCS1* wurde die genomische DNA mit der Restriktase *AatII* fragmentiert und für den Wildtyp H222 nach der Hybridisierung mit der 1,1 kb großen spezifischen Promotor-Sonde von *SCS1* eine Bande von 9,6 kb nachgewiesen. Für die Transformanden H222-AK9-1 und H222-AK9-2 wurde eine Promotor-spezifische Bande von 3,9 kb gefunden, welche durch die zusätzliche *AatII*-Schnittstelle in der Promotor-*loxR-URA3-loxP*-Terminator Kasette entstand. Nach der Deletion des Gens der  $\beta$ -Untereinheit der SCS in dem Stamm H222-AK6 (Abb. 3.13), wurde die zusätzliche Zerstörung des *SCS1*-Leserahmens der Transformanden H222-AK9-1 und H222-AK9-2 bestätigt (Abb. 3.15). Für die nachfolgenden Untersuchungen wurde die Transformande H222-AK9-1, bezeichnet als Stamm H222-AK9, ausgewählt.

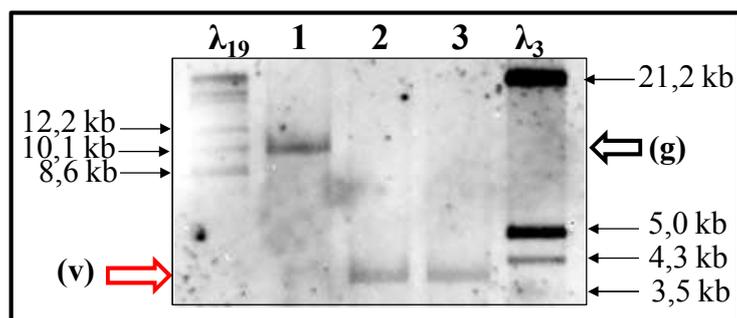


Abbildung 3. 15: Southern Hybridisierung für den Nachweis der zusätzlichen Deletion des Gens der  $\alpha$ -Untereinheit der SCS in dem Stamm H222-AK7 ( $\Delta scs2$ ). Für diese Southern Hybridisierung wurde die genomische DNA mit der Restriktionsendonuklease *AatII* vollständig verdaut.  $\lambda_{19}$ -Molekulargewichtsstandard  $\lambda_{19}$ ; 1-Wildtyp H222; 2-Transformande H222-AK9-1; 3-Transformande H222-AK9-2;  $\lambda_3$ -Molekulargewichtsstandard  $\lambda_3$ . Mit der 1,1 kb spezifischen Promotor-Sonde von *SCS1*, amplifiziert mit LSC1\_Pfor und LSC1\_Prev, konnte ein *SCS1*-Fragment der Größe 9,6 kb (schwarzer Pfeil, g) und ein *SCS1*-Fragment entsprechend der Deletionskassette mit einer Größe von 3,9 kb (roter Pfeil, v) nachgewiesen werden.

### 3.4.1. Bestimmung der Succinyl-CoA Synthetase Enzymaktivität

Anschließend sollte die Auswirkung der Deletionen von *SCS1* und *SCS2* auf die SCS Aktivität der Transformanden untersucht werden. Jedoch konnte keine Aktivität der SCS für den Wildtyp nachgewiesen werden (siehe 3.2.1).

Da das katalytische Zentrum der SCS Teil beider Untereinheiten ist, wurde gezeigt, dass die Deletion einer der beiden Gene der SCS-Untereinheiten von *S. cerevisiae* genügt, um einen Verlust der Enzymaktivität zu verursachen (Pearson & Bridger, 1975b; Przybyla-Zawislak *et al.*, 1998; Guerreiro & Rodrigues-Pousada, 2001). Auf Basis dieser Ergebnisse wurde in dieser Arbeit davon ausgegangen, dass vermutlich durch die Deletion eines Gens der SCS ein Verlust der SCS Aktivität in *Y. lipolytica* erzielt werden würde.

### 3.4.2. Bestimmung weiterer spezifischer Enzymaktivitäten

Die konstruierten Transformanden H222-AK4 (*scs1::URA3*), H222-AK8 (*scs2::URA3*) und H222-AK9 (*scs1::URA3 Δscs2*) wurden durch die Bestimmung der weiteren Enzymaktivitäten des TCC charakterisiert. Des Weiteren wurde die Aktivität der ICL als Schlüsselenzym des Glyoxylatzyklus sowie die Aktivität der anaplerotischen PYC für eine Charakterisierung der Transformanden herangezogen. Die Kultivierung der Stämme fand in 100 ml Minimalmedium mit 1 % Glucose als C-Quelle statt. Während der Kultivierung wurde für die konstruierten Transformanden ein mit dem Wildtyp H222 vergleichbares Wachstum nachgewiesen. Alle Transformanden zeigten einen mit der Wachstumsrate des Wildtyps ( $\mu_{\max} = 0,2 \text{ h}^{-1}$ ) vergleichbaren  $\mu_{\max}$ -Wert von  $0,19 \text{ h}^{-1}$ .

Die spezifischen Aktivitätsbestimmungen der verschiedenen Enzyme wurden in der exponentiellen Phase nach sechs Stunden durchgeführt und mit dem Wildtyp vergleichend in Abbildung 3.16 dargestellt.

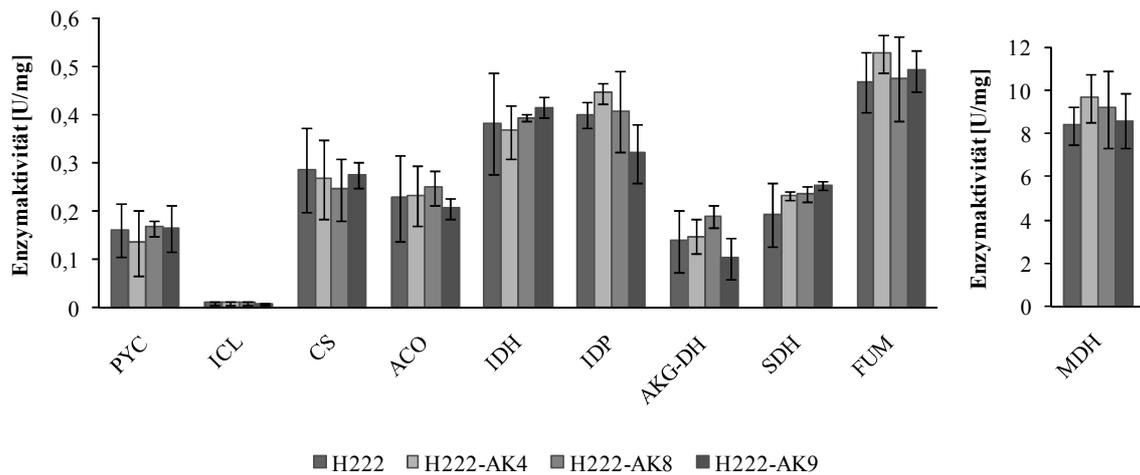


Abbildung 3. 16: Darstellung der spezifischen Enzymaktivitäten der Transformanten H222-AK4 (*scs1::URA3*), H222-AK8 (*scs2::URA3*) und H222-AK9 (*scs1::URA3 Δscs2*) im Vergleich zu dem Wildtyp H222. Für die Bestimmung der spezifischen Aktivitäten wurden alle betrachteten Stämme im Minimalmedium mit 1 % Glucose kultiviert und nach sechs Stunden je 5 ml Kultur aufgeschlossen. Des Weiteren sind die jeweiligen Standardabweichungen in den Diagrammen darstellt, welche sich aus mindestens drei unabhängigen Versuchen ergaben. PYC: Pyruvat-Carboxylase, ICL: Isocitrat-Lyase, CS: Citrat-Synthase, ACO: Aconitase, IDH: NAD-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase, IDP: NADP-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase, AKG-DH:  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase, SDH: Succinat-Dehydrogenase, FUM: Fumarase, MDH: Malat-Dehydrogenase

Die Messung der spezifischen Aktivitäten von CS, ACO, IDH, IDP, AKG-DH, SDH, FUM und MDH ergaben für die konstruierten Transformanten H222-AK4 (*scs1::URA3*), H222-AK8 (*scs2::URA3*) und H222-AK9 (*scs1::URA3 Δscs2*) mit dem Wildtyp vergleichbare Werte (Abb. 3.16). Die spezifischen PYC- und ICL-Aktivitäten der Transformanten unterschieden sich ebenfalls nicht von denen des Wildtyps.

### 3.5. Überexpression des Gens der Pyruvat-Carboxylase gemeinsam mit der Deletion des Gens für die $\beta$ -Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase

Die Auswirkung der Kombination der erhöhten PYC Aktivität mit dem vermuteten Verlust der SCS Aktivität auf die Produktion organischer Säuren in *Y. lipolytica* sollte im Weiteren untersucht werden.

Dazu wurde das PYC kodierende Gen in den uracilauxotrophen Stamm H222-AK7 ( $\Delta scs2$ ) (siehe 3.4.) überexprimiert. Durch die Transformation des multicopy Vektors p64PYC (siehe 2.9.1.) wurden die Transformanten H222-AK10-1 und H222-AK10-2 erhalten und auf die Integration der Expressionskassette in der Southern Blot Analyse überprüft (Abb. 3.17).

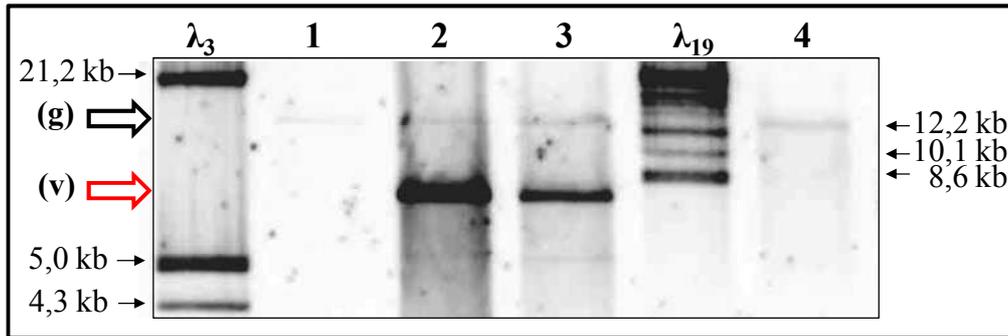


Abbildung 3. 17: Southern Blot Analyse der Überexpression von *PYC* in dem *SCS2* deletierten Stamm H222-AK7. Die genomische DNA wurde mit *MstI* verdaut. Als spezifische Sonde für das *PYC*-Fragment diente ein 2 kb *NaeI-NcoI*-Fragment aus p64PYC. Der schwarze Pfeil zeigt die 12,8 kb großen genomischen (g) *PYC*-Fragmente und der rote Pfeil kennzeichnet die 7,2 kb großen integrierten vektorialen (v) *PYC*-Fragmente.  $\lambda_3$ - Molekulargewichtsstandard  $\lambda_3$ ; 1-Referenzstamm H222-41; 2-Transformante H222-AK10-1; 3-Transformante H222-AK10-2;  $\lambda_{19}$ - Molekulargewichtsstandard  $\lambda_{19}$ ; 4-Referenzstamm H222-S4.

Die Integration der *PYC*-Expressionskassette in den Elternstamm H222-AK7 ( $\Delta scs2$ ) wurde durch eine zusätzlich detektierte Bande bei 7,2 kb bestätigt (Abb. 3.17). Für die Vergleichsstämme H222-41 und H222-S4 wurde nur eine Bande von 12,8 kb, die dem genomischen *PYC*-ORF entsprach, gefunden. H222-41 und H222-S4 wurden als Vergleichsstämme gewählt, da sie eng mit der Transformante H222-AK7 verwandt sind. Die erhöhte Intensität der Vektorbanden gegenüber der genomischen Banden bestätigte die mehrfache Integration des multicopy Vektors in das *Y. lipolytica* Genom. Die Vektorbande der Transformante H222-AK10-1 zeigt eine höhere Intensität im Vergleich zu der zweiten Transformante H222-AK10-2. Diese zwei positiven Transformanden enthielten sowohl die Deletion des Gens der  $\beta$ -Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase (Abb. 3.13) als auch die ins Genom integrierte *PYC*-Expressionskassette. Die Auswahl einer geeigneten Transformante erfolgte zum einen auf der Grundlage der Bestimmung des Wachstums. Die untersuchten Transformanden zeigten mit der Wachstumsrate  $0,2 \text{ h}^{-1}$  ein mit dem Wildtyp H222 ( $0,2 \text{ h}^{-1}$ ) vergleichbares Wachstum.

Zum anderen erfolgte die Auswahl einer geeigneten Transformante durch die Bestimmung der *PYC* Aktivität während der Kultivierung in Minimalmedium mit 1 % Glucose (Abb. 3.18).

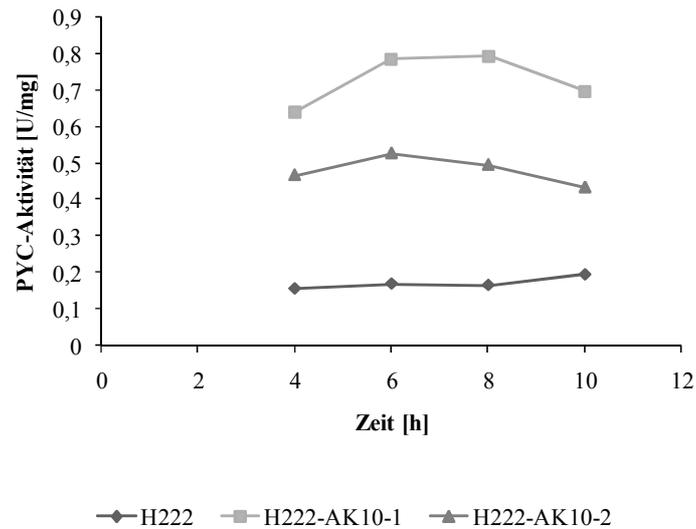


Abbildung 3.18: Verlauf der spezifischen Pyruvat-Carboxylase Aktivität der Transformanten H222-AK10-1 und H222-AK10-2 im Vergleich zum Wildtyp H222. Die spezifischen Aktivitäten wurden während der Kultivierung auf Minimalmedium mit 1 % Glucose bestimmt.

Die Abbildung 3.18 zeigt, dass die gezielte Überexpression des für die *PYC* kodierenden Gens zu einer Erhöhung der Enzymaktivität in den entsprechenden *PYC* multicopy Transformanten aufgrund des Gen-Dosis Effektes führte. Die Transformanten unterschieden sich jedoch in Bezug auf die spezifischen Aktivitäten untereinander. H222-AK10-1 zeigte mit  $0,79 \pm 0,2$  U/mg die, aufgrund der stärkeren Vektorbandenintensität vermutete, höchste spezifische *PYC* Aktivität, verglichen mit  $0,16 \pm 0,06$  U/mg des Wildtyps. Für H222-AK10-2 wurde hingegen eine Aktivität von  $0,52 \pm 0,1$  U/mg bestimmt. Die Transformante H222-AK10-1 wurde aufgrund der höchsten *PYC* Aktivität für die weiteren Arbeiten ausgewählt und im Folgenden als H222-AK10 (*mcPYC*  $\Delta$ *scs2*) bezeichnet.

### 3.5.1. Bestimmung der spezifischen Aktivitäten von Enzymen des TCC, sowie der *PYC* und *ICL*

Der Einfluss der gemeinsamen Überexpression von *PYC* und Deletion des Gens der  $\beta$ -Untereinheit der SCS auf die Enzyme des TCC sowie auf die *ICL* Aktivität wurde ebenfalls untersucht. Die betreffenden spezifischen Aktivitäten wurden während der Kultivierung auf Minimalmedium mit 1 % Glucose während der exponentiellen Phase nach sechs Stunden bestimmt (Abb. 3.19).

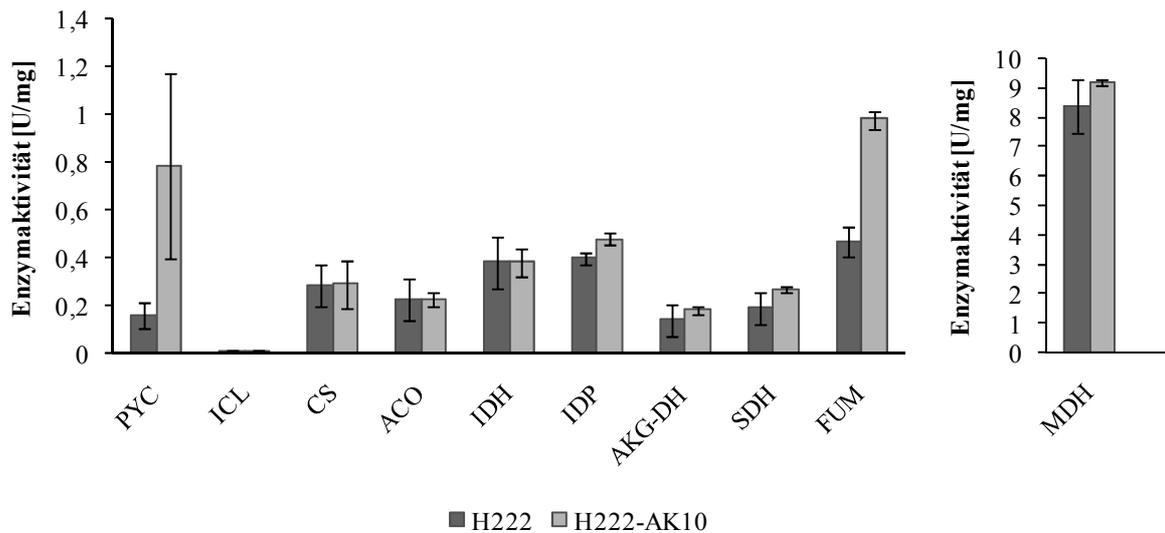


Abbildung 3.19: Darstellung der spezifischen Enzymaktivitäten der Transformante H222-AK10 (*mcPYC Δscs2*) im Vergleich zu dem Wildtyp H222. Die verschiedenen spezifischen Aktivitäten wurden in der exponentiellen Phase des Wachstums auf Minimalmedium mit 1 % Glucose nach 6 h bestimmt. Die dargestellte Standardabweichung ergab sich aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. PYC: Pyruvat-Carboxylase, ICL: Isocitrat-Lyase, CS: Citrat-Synthase, ACO: Aconitase, IDH: NAD-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase, IDP: NADP-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase, AKG-DH:  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase, SDH: Succinat-Dehydrogenase, FUM: Fumarase, MDH: Malat-Dehydrogenase

Die Bestimmungen der verschiedenen Enzymaktivitäten der Transformante H222-AK10 (*mcPYC Δscs2*) zeigten eine erhöhte Aktivitäten der Fumarase, der IDP und der PYC. Im Gegensatz zu der Transformante H222-AK1 (*mcPYC*), die nur eine 3-fache Steigerung der PYC Aktivität aufwies, wurde für H222-AK10 eine 5-fache Erhöhung der PYC Aktivität bestimmt. Des Weiteren unterschied sich der Stamm H222-AK10 von H222-AK1 durch eine Verdopplung der Fumarase Aktivität mit einem Wert von  $0,97 \pm 0,04$  U/mg gegenüber der Aktivität von  $0,47 \pm 0,06$  U/mg des Wildtyps H222. Wahrscheinlich war die erhöhte Fumarase Aktivität von H222-AK10 eine Folge des erhöhten Substratangebotes (Tab. 3.1). Für den Stamm H222-AK10 wurde in nachfolgenden Untersuchungen eine deutlich erhöhte Bildung von Succinat im Vergleich zu dem Wildtyp nachgewiesen (siehe 3.7.). Des Weiteren wurde eine geringe signifikante Erhöhung für die IDP Aktivität für H222-AK10 ( $0,48 \pm 0,02$  U/mg) im Vergleich zum Wildtyp ( $0,4 \pm 0,03$  U/mg) bestimmt. Jedoch wurde keine veränderte IDP Aktivität in den Stämmen H222-AK8 (*scs2::URA3*), H222-AK9 (*scs1::URA3 scs2*) und H222-AK1 gemessen. Vermutlich ist die erhöhte IDP Aktivität durch den synergistischen Effekt der Deletion von *SCS2* und der erhöhten PYC Aktivität verursacht. Die weiteren gemessenen spezifischen Enzymaktivitäten der *Y. lipolytica* Stämme H222 und H222-AK10 zeigten vergleichbare Werte.

### 3.6. Morphologische Veränderungen der Transformanden

Die Koloniemorphologie und die Zellmorphologie der Transformande H222-AK1 (*mcPYC*), H222-AK2 (*mcSCS1 mcSCS2*), H222-AK3 (*mcPYC mcSCS1 mcSCS2*), H222-AK4 (*scs1::URA3*), H222-AK8 (*scs2::URA3*), H222-AK9 (*scs1::URA3 Δscs2*) und H222-AK10 (*mcPYC Δscs2*) wurden im Vergleich zum Wildtyp H222 untersucht.

Für die Untersuchung der Kolonien wurde jeweils YPD-Medium mit  $1 \cdot 10^7$  Zellen auf eine YPD-Agarplatte getropft, bei 28 °C inkubiert und nach sieben Tagen wurde die Koloniemorphologie analysiert (Abb. 3.20). Mit Ausnahme der Transformande H222-AK9 (*scs1::URA3 Δscs2*) zeigten alle Transformanden eine mit dem Wildtyp H222 vergleichbare Koloniemorphologie. Sie bildeten cremefarbige runde Kolonien mit einer matten faltigen Oberfläche. Die Transformande H222-AK9 zeigte hingegen deutlich kleinere Kolonien mit einem glatten Rand. Der mittlere Bereich der Kolonien von H222-AK9 wies ebenfalls eine matte und gefaltete Oberfläche auf. Für eine genauere Untersuchung der Morphologie dieser Transformande wurden einzelne Zellen aus dem glatten Randbereich sowie Zellen aus dem mittleren Bereich mikroskopiert und mit den entsprechenden Wildtypzellen verglichen (Abb. 3.20).

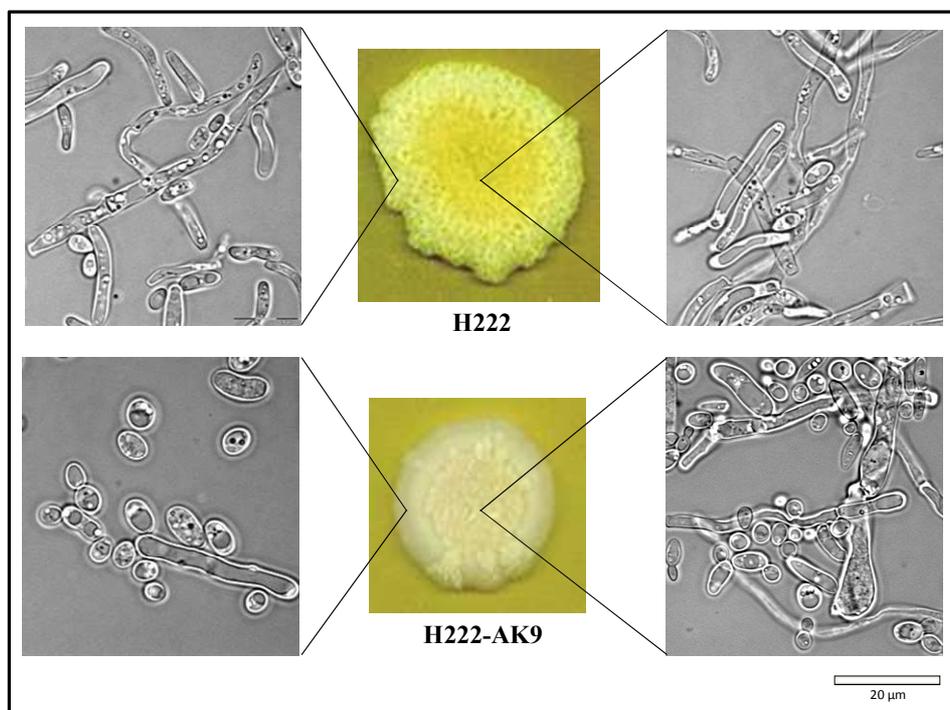


Abbildung 3.20: Mikroskopie der Zellen aus dem mittleren Bereich sowie dem Randbereich der Kolonien von H222 und H222-AK9 (*scs1::URA3 Δscs2*).  $1 \cdot 10^7$  Zellen wurden auf YPD-Agarplatten aufgetropft und bei 28 °C inkubiert. Die Zellen wurden nach 7 Tagen mikroskopisch bei einer 2650-fachen Vergrößerung betrachtet.

Die Untersuchungen der Zellen sowohl aus dem mittleren Bereich als auch aus dem Randbereich der Kolonien von H222 zeigten eine deutliche Hyphenbildung. Die Transformante H222-AK9 (*scs1::URA3 Δscs2*) wies hingegen, aufgrund des verstärkten Auftretens von Einzelzellen neben den Hyphen, einen deutlich verstärkten Dimorphismus auf.

Zusätzlich zu der Morphologie der Zellen der Kolonien wurde die Morphologie der Zellen der Transformanten sowie des Wildtyps während des Wachstums in YPD-Flüssigmedium untersucht (Abb. 3.21).

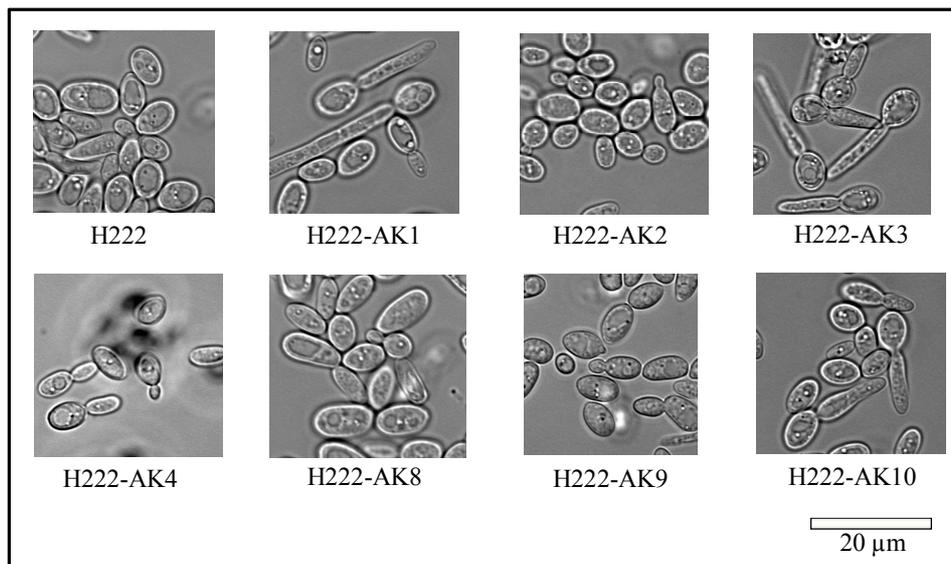


Abbildung 3.21: Mikroskopie der Zellen der konstruierten Transformanten und des Wildtyps H222. Die Zellen der YPD-Flüssigkulturen, die über Nacht bei 28 °C inkubiert wurden, wurden mit einer 2650-fachen Vergrößerung mikroskopiert.

Die Morphologie der untersuchten Zellen der Transformanten H222-AK1 (*mcPYC*), H222-AK3 (*mcPYC mcSCS1 mcSCS2*) und H222-AK10 (*mcPYC Δscs2*) unterschied sich deutlich von den Wildtypzellen. Im Gegensatz zu den runden Zellen des Wildtyps sowie der Transformanten H222-AK2 (*mcSCS1 mcSCS2*), H222-AK4 (*scs1::URA3*), H222-AK8 (*scs2::URA3*) und H222-AK9 (*scs1::URA3 Δscs2*) wurde bei den Transformanten mit einer erhöhten *PYC* Aktivität die Ausbildung von Pseudohyphen beobachtet. Die Bildung von Pseudohyphen könnte auf einen Nährstoffmangel während der Kultivierung hinweisen. Da jedoch nur für die Zellen mit einem überexprimierten *PYC* (H222-AK1, H222-AK3, H222-AK10) Pseudohyphen nachgewiesen wurden, wurde vermutet, dass es sich um einen Biotinmangel handeln könnte. Biotin stellt einen essentiellen Cofaktor der *PYC* dar und wird von *Y. lipolytica* synthetisiert (van der Walt & von Arx, 1980). Durch die erhöhte Aktivität des betreffenden Enzyms wurde eventuell die Biotinsynthese erschöpft und somit ein Biotin-

Mangel hervorgerufen. Dies wurde durch eine Kultivierung der Stämme mit Biotinzusatz (250 µg/l, 500 µg/l, 1 mg/l) überprüft. Die Mikroskopie dieser Zellen zeigte jedoch ebenfalls eine verstärkte Pseudohyphenbildung für den Transformanden H222-AK1, H222-AK3 und H222-AK10.

### 3.7. Produktion organischer Säuren im Succinatproduktionsmedium

Um die Succinatproduktion der einzelnen *Y. lipolytica* Stämme zu untersuchen, wurde ein Medium, bekannt aus der Itaconsäurebildung mit *Candida* Stämmen (Tabuchi *et al.*, 1981), herangezogen. Aufgrund der in Vorversuchen nachgewiesenen Succinatproduktion in dem betreffenden Medium, wurde dieses Medium ausgewählt. Um einen eventuellen Einfluss der verschiedenen genetischen Veränderungen auf die Succinatbildung zu überprüfen, wurden alle konstruierten Stämme auf 100 ml des Succinatproduktionsmediums kultiviert. Zuerst wurde das Wachstum des Wildtyps H222 mit je 10 % Glucose und 10 % Glycerol als C-Quellen im Succinatproduktionsmedium verglichen (Abb. 3.22).

Für den *Y. lipolytica* Stamm H222 wurde eine Kultivierungszeit von 250-300 h und eine Wachstumsrate von  $0,008 \text{ h}^{-1}$  in dem Medium mit 10 % Glucose nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wurde für die Verwertung von 10 % Glycerol eine Kultivierungszeit von ungefähr 500 h sowie eine Wachstumsrate von  $0,003 \text{ h}^{-1}$  für H222 bestimmt (Abb. 3.22). Da 10 % Glucose (0,6 M) und 10 % Glycerol (1,1 M) nicht äquimolar sind, wurde für das Wachstum auf Glycerol eine Verdopplung der optischen Dichte erwartet. Mit einer maximalen erreichten  $\text{OD}_{600}$  auf Glucose von 49 und auf Glycerol von 45 waren die optischen Dichten der beiden C-Quellen jedoch vergleichbar. Erklärbar ist dies mit dem Eintritt eines Teils des Glycerols in Form von Dihydroxyacetonphosphat in die Gluconeogenese. Diese ATP-, NADH- und GTP-abhängige Synthese von Glucose hatte vermutlich ebenfalls das verlangsamte Wachstum sowie die veränderte Bildung organischer Säuren von H222 auf Glycerol zur Folge. Die Succinatproduktion des Wildtyps auf den verschiedenen C-Quellen wurde mittels Ionenchromatographie untersucht (Abb. 3.22).

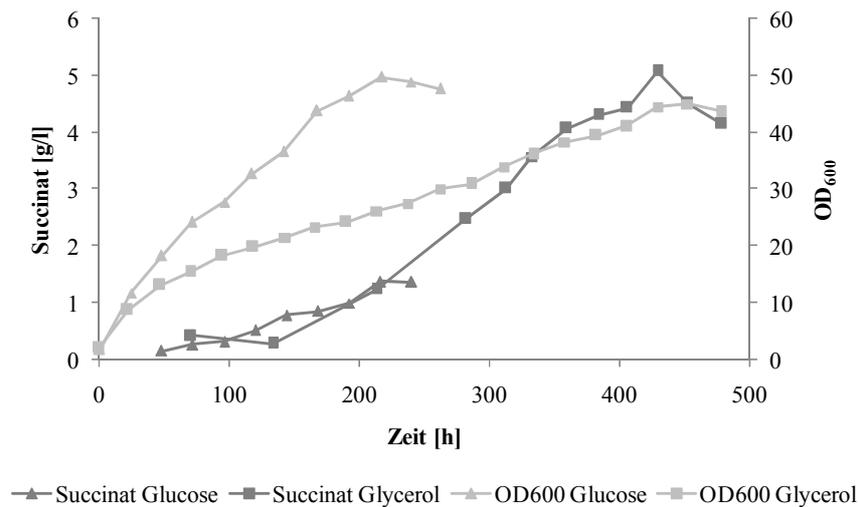


Abbildung 3. 22: Wachstum und Succinatproduktion des Wildtyps H222 im Succinatproduktionsmedium mit 10% Glucose und 10 % Glycerol als C-Quellen. Die Kultivierungen wurden in jeweils 100 ml Medium durchgeführt und durch die Messung der  $OD_{600}$  sowie durch die IC-Analyse für die Succinatbestimmung verfolgt. Die dargestellten typischen Verläufe setzen sich aus mindestens vier unabhängigen Versuchen zusammen.

Die Abbildung 3.22 zeigt das Wachstum und die Succinatproduktion für den Wildtyp H222 mit 10 % Glucose im Vergleich zu 10 % Glycerol als C-Quelle. Es wurde parallel zu der  $OD_{600}$  auch ein Anstieg der sekretierten Succinatkonzentration für beide C-Quellen gemessen, wobei der Beginn der Succinatbildung innerhalb der ersten 70 h nicht erfasst wurde. Für die Kultivierung mit Glucose wurde eine maximale Succinatkonzentration von  $1,4 \pm 0,2$  g/l nach 240 h und eine  $OD_{600}$  von 49 nachgewiesen. Die Succinatproduktion des Wildtyps H222 mit Glycerol als C-Quelle zeigte hingegen eine maximale Succinatmenge von  $5,1 \pm 0,7$  g/l nach 430 h bei einer  $OD_{600}$  von 45. Die Raum-Zeit-Ausbeuten ( $11,9 \pm 1,3$  mg/h\*l) sowie die Produktbildungsgeschwindigkeit ( $0,11 \pm 0,02$  g/h\* $OD_{600}$ ) zeigten für die Kultivierung mit 10 % Glycerol deutlich höhere Werte im Vergleich zu der Kultivierung mit 10 % Glucose ( $RZA_{max} = 6,4 \pm 0,8$  mg/h\*l;  $r_{max} = 0,03 \pm 0,01$  g/h\* $OD_{600}$ ). Daher wurde Glycerol als C-Quelle in den anschließenden Kultivierungen aller Transformanten eingesetzt.

Das charakteristische Wachstum der konstruierten Transformanten im Succinatproduktionsmedium wird in Abbildung 3.23 dargestellt und ergab sich aus mindestens fünf unabhängigen Kultivierungen.

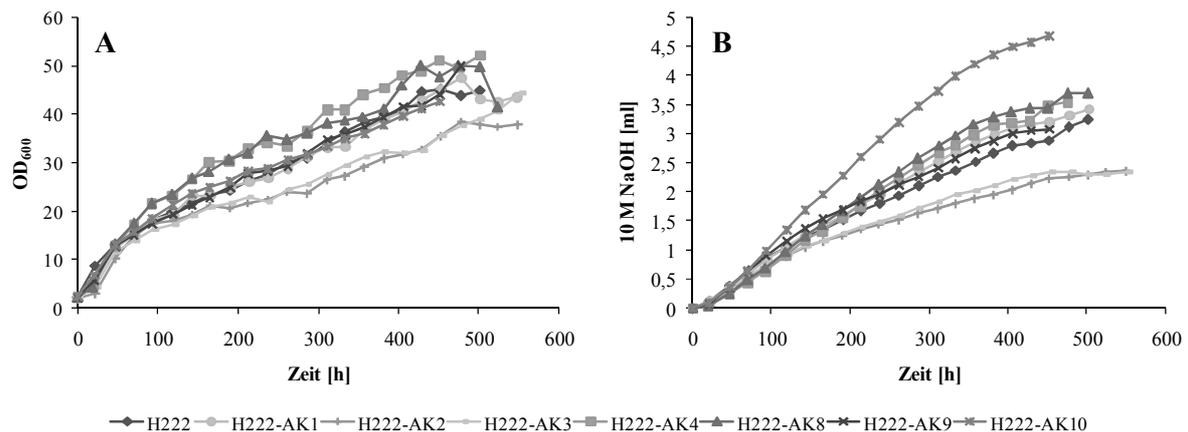


Abbildung 3. 23: Charakteristisches Wachstum (A) sowie Basenverbrauch (B) der Transformanten und des Wildtyps H222 im Succinatproduktionsmedium mit 10 % Glycerol. Die Kulturen enthielten 100 ml Medium. Das typische Wachstum sowie der Basenverbrauch ergaben sich aus mindestens fünf unabhängigen Kultivierungen.

Die Transformanten H222-AK1 (*mcPYC*), H222-AK4 (*scs1::URA3*), H222-AK8 (*scs2::URA3*), H222-AK9 (*scs1::URA3 Δscs2*) und H222-AK10 (*mcPYC Δscs2*) zeigten ein mit dem Wildtyp H222 vergleichbares Wachstum (Abb. 3.23 A). Ein deutlich verlangsamtes Wachstum wurde hingegen für die Transformanten H222-AK2 (*mcSCS1 mcSCS2*) und H222-AK3 (*mcPYC mcSCS1 mcSCS2*) nachgewiesen. Die Wachstumsraten der Transformanten H222-AK1, H222-AK4, H222-AK8, H222-AK9, H222-AK10 und des Wildtyps H222 lagen zwischen  $0,002 \text{ h}^{-1}$  und  $0,003 \text{ h}^{-1}$ , wohingegen die Wachstumsraten von H222-AK2 und H222-AK3 mit  $0,001 \text{ h}^{-1}$  einen reduzierten Wert im Vergleich zu dem Wildtyp aufwiesen.

Aufgrund des Basenverbrauchs der *Y. lipolytica* Stämme während der Kultivierung konnten erste Vermutungen bezüglich der Bildung organischer Säuren getroffen werden. Die Transformante H222-AK10 zeigte den höchsten Basenverbrauch (4,7 ml) im Vergleich zum Wildtyp H222 (3,5 ml), wohingegen für die Transformanten H222-AK2 und H222-AK3 mit 2,4 ml ein deutlich reduzierter Basenverbrauch bestimmt wurde (Abb. 3.23 B). Folglich deutete der hohe Basenverbrauch von H222-AK10 eine im Vergleich zu H222 erhöhte Sekretion organischer Säuren an. Eine verringerte Sekretion organischer Säuren wurde aufgrund des Basenbedarfs für die Transformanten H222-AK2 und H222-AK3 vermutet.

Die Bestimmung der sekretierten organischen Säuren während der Kultivierung der Transformanten und des Wildtyps im Succinatproduktionsmedium erfolgte mittels IC-Analyse. Bei den gewählten Kultivierungsbedingungen stellte Malat den größten Anteil an

dem Gesamtsäureprodukt der untersuchten Hefestämme dar, gefolgt von Succinat und  $\alpha$ -Ketoglutarat (Tab. 3.1). Pyruvat und Fumarat dagegen wurden in deutlich geringeren Mengen gebildet (Tab. 3.2).

Tabelle 3. 1: Darstellung der maximalen Konzentration von Succinat, Malat und  $\alpha$ -Ketoglutarat sekretiert von den konstruierten *Y. lipolytica* Stämmen während der Kultivierung in 100 ml Succinatproduktionsmedium mit 10 % Glycerol. Die angegebenen Standardabweichungen errechneten sich aus mindestens fünf unabhängigen Kultivierungen. Anteil - Anteil an dem Gesamtsäureprodukt; RZA<sub>max</sub> - maximale Raum-Zeit-Ausbeute; r<sub>max</sub> - maximale Produktbildungsgeschwindigkeit

Stamm	Gesamt- säuregehalt [g/l]	organische Säure [g/l]	Anteil [%]	RZA <sub>max</sub> [mg/h*l]	r <sub>max</sub> [g/h*OD <sub>600</sub> ]
<b>Succinat</b>					
H222	23,8 ± 4,4	5,1 ± 0,7	21,7 ± 1,8	11,9 ± 1,3	0,11 ± 0,02
H222-AK1 ( <i>mcPYC</i> )	24,2 ± 3,2	5,2 ± 0,6	21,5 ± 2,2	12,2 ± 1,8	0,13 ± 0,02
H222-AK2 ( <i>mcSCS1 mcSCS2</i> )	14,7 ± 2,2	2,8 ± 0,4	18,8 ± 2,6	5,9 ± 1,2	0,08 ± 0,01
H222-AK3 ( <i>mcPYC mcSCS1 mcSCS2</i> )	15,2 ± 0,7	3,1 ± 0,3	20,3 ± 0,7	7,0 ± 0,4	0,09 ± 0,01
H222-AK4 ( <i>scs1::URA3</i> )	32,3 ± 5,8	5,8 ± 0,4	18,4 ± 4,4	13,6 ± 0,8	0,09 ± 0,02
H222-AK8 ( <i>scs2::URA3</i> )	30,3 ± 8,8	4,6 ± 1,2	15,1 ± 0,5	15,1 ± 2,3	0,09 ± 0,03
H222-AK9 ( <i>scs1::URA3 Δscs2</i> )	22,1 ± 3,3	3,8 ± 0,5	17,1 ± 1,6	10,8 ± 2,3	0,10 ± 0,01
H222-AK10 ( <i>mcPYC Δscs2</i> )	37,5 ± 6,0	8,7 ± 1,6	23,3 ± 0,5	21,9 ± 2,5	0,18 ± 0,04
<b>Malat</b>					
H222	23,8 ± 4,4	9,4 ± 1,4	42,7 ± 2,7	20,7 ± 1,3	0,20 ± 0,03
H222-AK1 ( <i>mcPYC</i> )	24,2 ± 3,2	10,4 ± 0,9	42,2 ± 1,9	22,6 ± 1,3	0,23 ± 0,04
H222-AK2 ( <i>mcSCS1 mcSCS2</i> )	14,7 ± 2,2	5,3 ± 0,6	40,9 ± 4,4	12,0 ± 1,8	0,19 ± 0,04
H222-AK3 ( <i>mcPYC mcSCS1 mcSCS2</i> )	15,2 ± 0,7	6,2 ± 0,5	40,6 ± 2,4	14,3 ± 1,1	0,19 ± 0,03
H222-AK4 ( <i>scs1::URA3</i> )	32,3 ± 5,8	10,4 ± 2,1	39,8 ± 3,2	23,0 ± 2,8	0,26 ± 0,03
H222-AK8 ( <i>scs2::URA3</i> )	30,3 ± 8,8	10,4 ± 1,1	36,6 ± 1,4	26,4 ± 1,6	0,25 ± 0,03
H222-AK9 ( <i>scs1::URA3 Δscs2</i> )	22,1 ± 3,3	8,7 ± 1,0	39,7 ± 5,5	21,6 ± 2,1	0,21 ± 0,03
H222-AK10 ( <i>mcPYC Δscs2</i> )	37,5 ± 6,0	15,5 ± 2,2	39,8 ± 2,2	33,7 ± 2,4	0,30 ± 0,04
<b><math>\alpha</math>-Ketoglutarat</b>					
H222	23,8 ± 4,4	4,2 ± 0,7	18,9 ± 1,1	10,0 ± 1,4	0,09 ± 0,02
H222-AK1 ( <i>mcPYC</i> )	24,2 ± 3,2	5,0 ± 0,6	18,4 ± 1,1	10,2 ± 1,2	0,11 ± 0,02
H222-AK2 ( <i>mcSCS1 mcSCS2</i> )	14,7 ± 2,2	3,2 ± 0,5	22,1 ± 2,8	6,3 ± 0,4	0,10 ± 0,02
H222-AK3 ( <i>mcPYC mcSCS1 mcSCS2</i> )	15,2 ± 0,7	3,3 ± 0,1	21,8 ± 1,9	7,7 ± 0,7	0,10 ± 0,01
H222-AK4 ( <i>scs1::URA3</i> )	32,3 ± 5,8	5,1 ± 0,1	21,4 ± 4,4	12,5 ± 2,3	0,12 ± 0,01
H222-AK8 ( <i>scs2::URA3</i> )	30,3 ± 8,8	6,1 ± 1,8	21,1 ± 2,2	15,0 ± 2,4	0,13 ± 0,03
H222-AK9 ( <i>scs1::URA3 Δscs2</i> )	22,1 ± 3,3	4,7 ± 0,4	24,6 ± 2,4	13,5 ± 2,2	0,13 ± 0,01
H222-AK10 ( <i>mcPYC Δscs2</i> )	37,5 ± 6,0	7,1 ± 1,0	17,2 ± 3,5	17,4 ± 1,5	0,18 ± 0,04

Entsprechend den Vermutungen aufgrund des Basenverbrauches (Abb. 3.23 B) während der Kultivierung wurde für die Transformante H222-AK10 (*mcPYC Δscs2*) eine deutliche Erhöhung des Gesamtsäuregehaltes um ca. 14 g/l auf 37,5 g/l im Vergleich zu dem Wildtyp H222 (23,8 ± 4,4 g/l) nachgewiesen (Tab. 3.1). Die konstruierten Stämme H222-AK1 (*mcPYC*), H222-AK4 (*scs1::URA3*), H222-AK8 (*scs2::URA3*) und H222-AK9 (*scs1::URA3 Δscs2*) zeigten hingegen mit H222 vergleichbare Mengen des Gesamtsäureproduktes.

Deutlich geringere Konzentrationen des Gesamtsäuregehaltes von  $14,7 \pm 2,2$  g/l und  $15,2 \pm 0,7$  g/l wurden jedoch während der Kultivierung der Transformanden H222-AK2 (*mcSCS1 mcSCS2*) und H222-AK3 (*mcPYC mcSCS1 mcSCS2*) nachgewiesen.

Mit einem Anteil von 19,9 – 23,5 % an dem Gesamtsäureprodukt stellte Succinat die nach Malat vom Wildtypstamm H222 überwiegend produzierte organische Säure unter den ausgewählten Bedingungen dar. Der Anteil von Succinat an dem Gesamtsäureprodukt war nur bei den Transformanden H222-AK8 (*scs2::URA3*) und H222-AK9 (*scs1::URA3 Δscs2*) etwas niedriger. Eine 40 %ige Erhöhung der Succinatproduktion wurde hingegen für den Stamm H222-AK10 (*mcPYC Δscs2*) nachgewiesen. H222-AK10 produzierte 7,1-10,3 g/l Succinat wohingegen der Wildtyp nur 4,4-5,8 g/l bildete. Der Verlauf der Bildung von Succinat dieser Transformande verglichen mit der Produktion des Wildtyps H222 ist in Abbildung 3.24 dargestellt. Entsprechend der erhöhten Succinatkonzentration wurde auch eine erhöhte  $RZA_{\max}$  von 19,4 - 24,4 mg/h\*l für H222-AK10 sowie eine leicht gesteigerte Produktbildungsgeschwindigkeit von 0,14 - 0,22 mg/h\*OD<sub>600</sub> ermittelt. Eine mit dem Wildtyp H222 vergleichbare Succinatproduktion wurde hingegen für die Transformanden H222-AK1 (*mcPYC*), H222-AK4 (*scs1::URA3*), H222-AK8 und H222-AK9 beobachtet. Im Gegensatz dazu zeigten die *Y. lipolytica* Stämme H222-AK2 (*mcSCS1 mcSCS2*) und H222-AK3 (*mcPYC mcSCS1 mcSCS2*) eine deutlich geringere Succinatproduktion von 2,4 - 3,4 g/l und einer reduzierten  $RZA_{\max}$  von ca. 4,7 – 7,4 mg/h\*l.

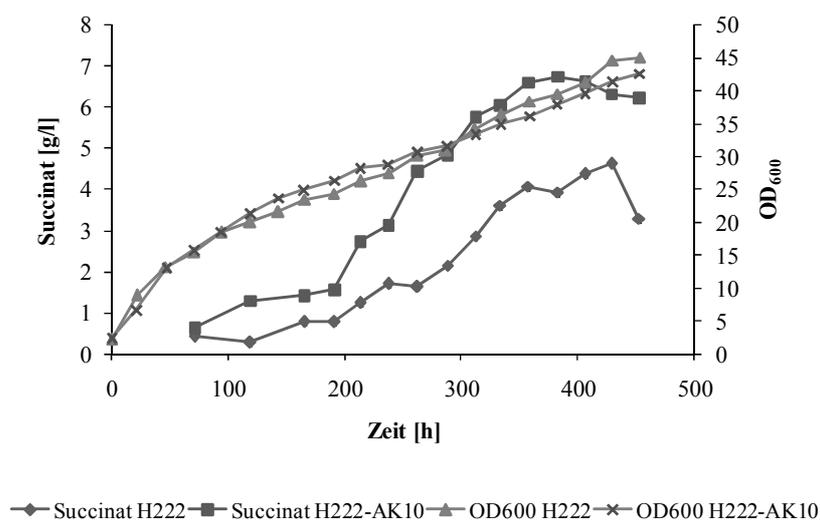


Abbildung 3.24: Repräsentatives Wachstum und Succinatproduktion der Transformande H222-AK10 (*mcPYC Δscs2*) im Vergleich zu dem Wildtyp H222. Die Kultivierung erfolgte in 100 ml Succinatproduktionsmedium mit 10 % Glycerol. Die charakteristische Darstellung des Wachstums sowie der Succinatproduktion ergaben sich aus mindestens fünf unabhängigen Kultivierungen.

Die Abbildung 3.24 zeigt ein vergleichbares Wachstum und eine unterschiedliche Kinetik der Succinatproduktion für die Transformante H222-AK10 (*mcPYC Δscs2*) und den Wildtyp H222. Vom Beginn der Analyse des Succinatgehaltes bis zum Ende der Kultivierungszeit zeigte sich eine stärkere Succinatproduktion für H222-AK10 im Vergleich zum Wildtyp. Die Bildung von Succinat war in den ersten 200 h sowohl vom Stamm H222-AK10 als auch von H222 gering und ohne deutlichen Anstieg. Nach 200 h zeigte sich jedoch eine wesentlich stärkere Steigerung der Succinatproduktion für H222-AK10 verglichen mit H222.

Der größte Anteil mit 40 – 45,4 % an der gesamten sekretierten organischen Säure von H222 während der Kultivierung in Succinatproduktionsmedium bildete Malat. Der Malatanteil an der produzierten organischen Säure war mit ca. 37 % für die Transformante H222-AK8 (*scs2::URA3*) im Vergleich zu den weiteren untersuchten *Y. lipolytica* Stämmen am geringsten. Die Malatkonzentration des Wildtyps H222 von 8-10,8 g/l wurde während der Kultivierung von H222-AK10 (*mcPYC Δscs2*) um ca. 40 % auf 13,3-17,7 g/l erhöht. H222-AK10 zeigte auch verglichen mit dem Wildtyp eine Steigerung der  $RZA_{\max}$  (31,3 - 37,1 mg/h\*1) und der Produktbildungsgeschwindigkeit (0,26-0,34 g/h\*OD<sub>600</sub>) für Malat. Eine leicht erhöhte  $RZA_{\max}$  von 24,8-28 mg/h\*1 wurde ebenfalls für die Transformante H222-AK8 bestimmt. Jedoch zeigte diese Transformante wie die Transformanden H222-AK1 (*mcPYC*), H222-AK4 (*scs1::URA3*) und H222-AK9 (*scs1::URA3 Δscs2*) eine mit H222 vergleichbare Malatausbeute. Die entsprechende Raum-Zeit-Ausbeute von 19,4 - 22 mg/h\*1 wurde für H222-AK1, H222-AK4 und H222-AK9 sowie für den Wildtyp berechnet. Im Gegensatz dazu wurde für die Transformanden H222-AK2 (*mcSCS1 mcSCS2*) und H222-AK3 (*mcPYC mcSCS1 mcSCS2*) mit 4,7-5,9 g/l und mit 5,7-6,7 g/l eine reduzierte Bildung von Malat verbunden mit einer reduzierten  $RZA_{\max}$  (H222-AK2:  $12 \pm 1,8$  mg/h\*1; H222-AK3:  $14,3 \pm 1,1$  mg/h\*1) nachgewiesen.

Das ebenfalls während der Kultivierung gebildete  $\alpha$ -Ketoglutarat entsprach mit 3,5-4,9 g/l 17,8 – 20 % der gesamten sekretierten organischen Säuren. Abgesehen von der Transformante H222-AK10 (*mcPYC Δscs2*) bildeten alle untersuchten *Y. lipolytica* Stämme vergleichbare  $\alpha$ -Ketoglutaratmengen. H222-AK10 produzierte im Vergleich zu H222 mit 6 - 8 g/l eine um 40 % erhöhte  $\alpha$ -Ketoglutaratmenge. Dies wurde bereits für die Bildung von Malat und Succinat nachgewiesen. Verbunden mit der erhöhten Konzentration wurde auch eine gesteigerte Raum-Zeit-Ausbeute von 15,9-18,9 mg/h\*1 sowie eine erhöhte  $r_{\max}$  von 0,14 – 0,22 g/h\*OD<sub>600</sub> für diese Transformante bestimmt. Eine vergleichbar hohe  $RZA_{\max}$  von 12,6 – 17,4 mg/h\*1 wurde auch für die Transformante H222-AK8 (*scs2::URA3*) gemessen.

Der Wildtyp zeigte hingegen eine  $RZA_{\max}$  von 8,6-11,4 mg/h\*1 gemeinsam mit einer Produktbildungsgeschwindigkeit von 0,07-0,11 g/h\*OD<sub>600</sub>. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Succinat- und Malatproduktion zeigten die Transformanden H222-AK2 (*mcSCS1 mcSCS2*) und H222-AK3 (*mcPYC mcSCS1 mcSCS2*) eine mit dem Wildtyp vergleichbare  $\alpha$ -Ketoglutaratproduktion.

Die geringsten Anteile an dem Gesamtsäureprodukt bildeten Pyruvat mit 2,7 – 7,9 % und Fumarat mit 9,3 – 13,7 % während der Kultivierung der konstruierten *Y. lipolytica* Stämme im Succinatproduktionsmedium (Tab. 3.2).

Tabelle 3. 2: Darstellung der maximal sekretierten Mengen von Pyruvat und Fumarat von den konstruierten *Y. lipolytica* Stämme während der Kultivierung in 100 ml Succinatproduktionsmedium mit 10 % Glycerol. Die berechneten Werte ergaben sich aus mindestens fünf unabhängigen Kultivierungen. Anteil - Anteil an dem Gesamtsäureprodukt;  $RZA_{\max}$  - maximale Raum-Zeit-Ausbeute;  $r_{\max}$  - maximale Produktbildungsgeschwindigkeit

Stamm	Gesamt- säuregehalt [g/l]	organische Säure [g/l]	Anteil [%]	$RZA_{\max}$ [mg/h*1]	$r_{\max}$ [g/h*OD <sub>600</sub> ]
<b>Pyruvat</b>					
H222	23,8 ± 4,4	1,2 ± 0,4	5,3 ± 2,6	2,6 ± 1,0	0,03 ± 0,01
H222-AK1 ( <i>mcPYC</i> )	24,2 ± 3,2	1,6 ± 0,7	6,5 ± 2,8	3,7 ± 1,5	0,04 ± 0,02
H222-AK2 ( <i>mcSCS1 mcSCS2</i> )	14,7 ± 2,2	0,9 ± 0,4	6,7 ± 2,0	1,9 ± 0,8	0,03 ± 0,01
H222-AK3 ( <i>mcPYC mcSCS1 mcSCS2</i> )	15,2 ± 0,7	1,1 ± 0,4	6,8 ± 2,4	2,7 ± 0,9	0,03 ± 0,01
H222-AK4 ( <i>scs1::URA3</i> )	32,3 ± 5,8	3,1 ± 1,1	8,9 ± 3,3	9,7 ± 1,5	0,07 ± 0,02
H222-AK8 ( <i>scs2::URA3</i> )	30,3 ± 8,8	4,0 ± 1,8	17,1 ± 3,4	7,9 ± 0,3	0,08 ± 0,02
H222-AK9 ( <i>scs1::URA3 <math>\Delta</math>scs2</i> )	22,1 ± 3,3	1,5 ± 0,4	8,9 ± 4,2	4,0 ± 1,1	0,05 ± 0,02
H222-AK10 ( <i>mcPYC <math>\Delta</math>scs2</i> )	37,5 ± 6,0	3,0 ± 0,5	9,4 ± 2,6	7,7 ± 1,0	0,09 ± 0,02
<b>Fumarat</b>					
H222	23,8 ± 4,4	2,7 ± 0,8	11,5 ± 2,2	5,7 ± 1,2	0,05 ± 0,01
H222-AK1 ( <i>mcPYC</i> )	24,2 ± 3,2	3,1 ± 0,9	11,3 ± 2,4	6,2 ± 1,1	0,06 ± 0,01
H222-AK2 ( <i>mcSCS1 mcSCS2</i> )	14,7 ± 2,2	1,5 ± 0,4	11,5 ± 3,3	2,9 ± 0,7	0,04 ± 0,01
H222-AK3 ( <i>mcPYC mcSCS1 mcSCS2</i> )	15,2 ± 0,7	1,6 ± 0,3	10,5 ± 2,3	3,5 ± 0,5	0,05 ± 0,01
H222-AK4 ( <i>scs1::URA3</i> )	32,3 ± 5,8	3,3 ± 0,9	11,5 ± 0,1	7,0 ± 0,9	0,07 ± 0,02
H222-AK8 ( <i>scs2::URA3</i> )	30,3 ± 8,8	3,3 ± 0,8	10,0 ± 0,2	7,7 ± 1,0	0,07 ± 0,01
H222-AK9 ( <i>scs1::URA3 <math>\Delta</math>scs2</i> )	22,1 ± 3,3	2,1 ± 0,5	9,7 ± 1,6	5,3 ± 1,1	0,06 ± 0,02
H222-AK10 ( <i>mcPYC <math>\Delta</math>scs2</i> )	37,5 ± 6,0	4,2 ± 1,2	11,3 ± 2,1	8,1 ± 0,7	0,08 ± 0,01

Für den Wildtyp H222 wurden Pyruvatkonzentrationen zwischen 0,8 g/l und 1,6 g/l, verbunden mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von 1,6 – 3,6 mg/h\*1, gemessen. Abgesehen von den Transformanden H222-AK4 (*scs1::URA3*), H222-AK8 (*scs2::URA3*) und H222-AK10 (*mcPYC  $\Delta$ scs2*) wurden für die weiteren untersuchten Stämme vergleichbare Pyruvatmengen bestimmt. Die *Y. lipolytica* Stämme H222-AK4, H222-AK8 und H222-AK10 zeigten eine gesteigerte Pyruvatproduktion von ca. 3 - 4 g/l verbunden mit einer deutlich erhöhten  $RZA_{\max}$

von ca. 6,7 – 11,2 mg/h\*l. Die gesteigerte Produktion von Pyruvat durch die Transformanten H222-AK4, H222-AK8 und H222-AK10 spiegelte sich auch in der Produktbildungsgeschwindigkeit von 0,05 – 0,11 g/h\*OD<sub>600</sub> wider. Im Gegensatz dazu betrug  $r_{\max}$  der weiteren untersuchten Stämme 0,03 – 0,05 g/h\*OD<sub>600</sub>.

Neben Pyruvat wurde ebenfalls Fumarat nur in geringen Mengen von den *Y. lipolytica* Stämme in das extrazelluläre Medium sekretiert. Im Gegensatz zu der Bildung der bisher betrachteten organischen Säuren zeigten alle konstruierten Stämme eine mit dem Wildtyp vergleichbare Fumaratproduktion von 1,9 – 3,5 g/l verbunden mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von 4,5 – 6,9 mg/h\*l und einer Produktbildungsgeschwindigkeit von 0,04 - 0,06 g/h\*OD<sub>600</sub>.

### 3.9.1 Bestimmung der PYC-, ICL- und SDH-Aktivitäten während der Kultivierung im Succinatproduktionsmedium

Die Kultivierungen mit Succinatproduktionsmedium zeigten Unterschiede in der Produktion verschiedener organischer Säuren zwischen den untersuchten *Y. lipolytica* Stämmen. Gründe für diese Unterschiede wurden in den eventuell durch die genetischen Veränderungen beeinflussten Enzymaktivitäten der ICL, PYC und SDH vermutet. Die Isocitrat-Lyase katalysiert die Umsetzung von Isocitrat zu Succinat im Glyoxylatzyklus, die Succinat-Dehydrogenase oxidiert Succinat zu Fumarat und die Pyruvat-Carboxylase gewährleistet die Zufuhr von C<sub>4</sub>-Körpern in den TCC durch die Umsetzung von Pyruvat zu Oxalacetat. Um einen Einfluss auf die genannten Enzymaktivitäten zu untersuchen, wurden die Transformanten sowie der Wildtyp mit Succinatproduktionsmedium dreimal unabhängig voneinander kultiviert und die drei Enzymaktivitäten bestimmt (Abb. 3.25, 3.26, 3.27).

Eine veränderte Aktivität des anaplerotische Enzyms PYC könnte das Angebot von C<sub>4</sub>-Körpern im TCC beeinflussen. Folglich wurde die PYC Aktivität für die Transformanten bestimmt und in Abbildung 3.25 dargestellt.

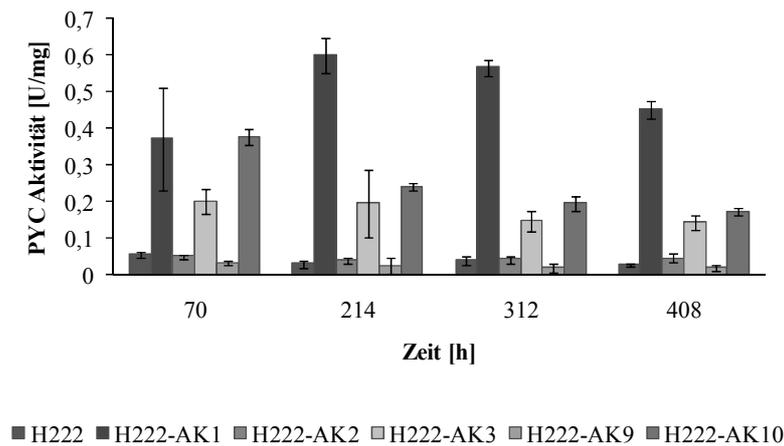


Abbildung 3.25: Darstellung der spezifischen PYC Aktivität der ausgewählten Transformanten sowie des Wildtyps während der Kultivierung mit Succinatproduktionsmedium. Die Kultivierung fand in 100 ml Medium mit 10 % Glycerol statt. Die Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität wurde nach 70, 214, 312 und 408 h durchgeführt. Die angegebenen Standardabweichungen ergaben sich aus drei unabhängigen Versuchen.

Der Wildtyp H222 zeigte während der Kultivierung eine konstante spezifische PYC Aktivität von 0,05 U/mg. Vergleichbare PYC Aktivitäten wurden für die Transformante H222-AK2 (*mcSCS1 mcSCS2*) und H222-AK9 (*scs1::URA3  $\Delta$ scs2*) bestimmt. Die erhöhte Gen-Dosis von *PYC* in den *Y. lipolytica* Stämmen H222-AK1 (*mcPYC*), H222-AK3 (*mcPYC mcSCS1 mcSCS2*) und H222-AK10 (*mcPYC  $\Delta$ scs2*) resultierte in einer gesteigerten spezifischen PYC Aktivität. H222-AK3 und H222-AK10 wiesen eine 4-fache und 7-8-fache Steigerung der Enzymaktivität auf, wohingegen für die Transformante H222-AK1 eine um das 10-14-fach erhöhte spezifische Aktivität nachgewiesen wurde. Die erhöhte PYC Aktivität hätte zu einer erhöhten Zufuhr von Oxalacetat in den TCC führen können und somit eventuell eine gesteigerte Bildung organischer Säuren verursachen können. Jedoch wurde nur für H222-AK10, deren PYC Aktivität eine Erhöhung um das 7-8-fache zeigte, eine 40 %ige Steigerung des Gesamtsäuregehaltes bestimmt (Tab. 3.1). Die Transformante H222-AK1, für welche die höchste PYC Aktivität nachgewiesen wurde, zeigte hingegen eine mit dem Wildtyp vergleichbare Produktion organischer Säuren (Tab. 3.1).

Die Bildung von Succinat aus Isocitrat im Glyoxylatzyklus wird durch die Isocitrat-Lyase katalysiert. Eine veränderte Succinatproduktion bedingt durch eine veränderte ICL Aktivität wurde durch die Bestimmung dieser Enzymaktivität untersucht (Abb. 3.26).

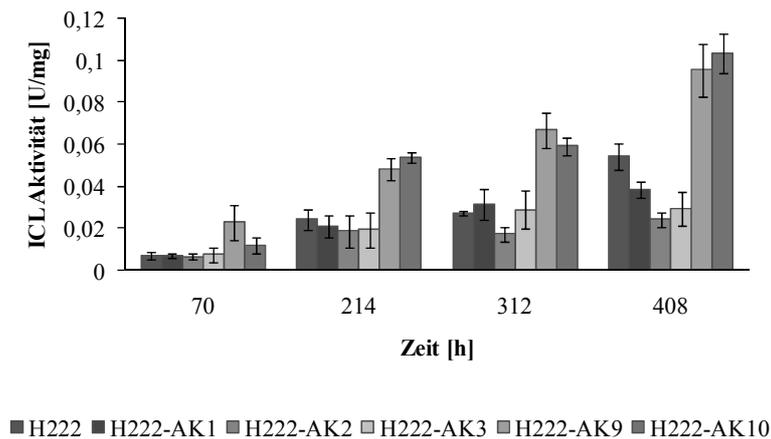


Abbildung 3.26: Darstellung der spezifischen Isocitrat-Lyase Aktivitäten während der Kultivierung von *Y. lipolytica* Stämmen in 100 ml Succinatproduktionsmedium mit 10 % Glycerol. Die Enzymaktivitäten wurden für drei unabhängige Kultivierungen ermittelt und deren Standardabweichung angegeben.

Die spezifische ICL Aktivität der untersuchten *Y. lipolytica* Stämme stieg mit der Kultivierungszeit deutlich an und erreichte für den Wildtyp sowie für die Transformanden H222-AK1 (*mcPYC*) und H222-AK3 (*mcPYC mcSCS1 mcSCS2*) einen maximalen Wert von 0,05 U/mg. Die Transformande H222-AK2 (*mcSCS1 mcSCS2*) zeigte im Gegensatz zu H222 keinen Anstieg der ICL Aktivität während der Kultivierung, vielmehr stagnierte die Enzymaktivität bei ca. 0,02 U/mg. Für die Transformanden H222-AK9 (*scs1::URA3 Δscs2*) und H222-AK10 (*mcPYC Δscs2*) wurde hingegen eine Verdopplung der spezifischen Enzymaktivität auf 0,1 U/mg nachgewiesen. Vermutlich hatte die Deletion der *SCS2*, welche sowohl H222-AK9 als auch H222-AK10 aufwies, einen positiven Effekt auf die ICL Aktivität. Im Gegensatz dazu hatte die alleinige Überexpression der *PYC* im Stamm H222-AK1 keinen Einfluss auf die ICL Aktivität.

Zusätzlich zu der Aktivität der *PYC* und der ICL wurde die Aktivität der Succinat-Dehydrogenase, als succinatumsetzendes Enzym, bestimmt (Abb. 3.27).

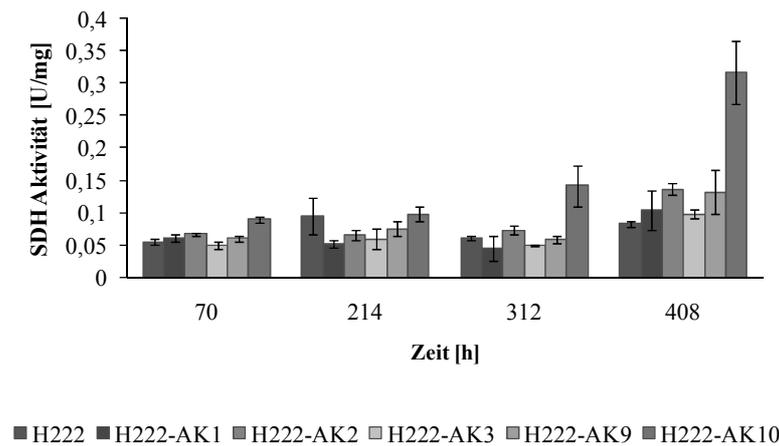


Abbildung 3.27: Darstellung der spezifischen Succinat-Dehydrogenase Aktivitäten der konstruierten *Y. lipolytica* Stämme in 100 ml Succinatproduktionsmedium mit 10 % Glycerol. Die Enzymaktivitäten wurden photometrisch bestimmt. Die angegebene Standardabweichung ergab sich aus drei unabhängigen Kultivierungen.

Der Wildtyp H222 weist über die Kultivierungszeit eine spezifische Succinat-Dehydrogenase Aktivität zwischen 0,05 und 0,09 U/mg auf. Abgesehen von dem Messzeitpunkt 408 h wurden vergleichbare SDH Aktivitäten für die Transformanden H222-AK2 (*mcSCS1 mcSCS2*), H222-AK3 (*mcPYC mcSCS1 mcSCS2*) und H222-AK9 (*scs1::URA3 Δscs2*) nachgewiesen. Die Transformande H222-AK10 (*mcPYC Δscs2*) zeigte hingegen eine 3-fache Steigerung der SDH Aktivität verglichen mit dem Wildtyp H222, H222-AK1 (*mcPYC*) und H222-AK9. Die IC Analyse der sekretierten organischen Säuren zeigte für H222-AK10 eine um 40 % erhöhte Bildung von Succinat im Vergleich zu dem Wildtyp (Tab. 3.1). Vermutlich wurde die SDH Aktivität von H222-AK10 aufgrund des erhöhten Substratangebotes gesteigert.

### 3.8. $\alpha$ -Ketoglutarat-, Pyruvat- und Fumaratproduktion unter Thiaminlimitation

Eine erhöhte Bildung von  $\alpha$ -Ketoglutarat, Pyruvat und Fumarat wurde für *Y. lipolytica* während der Kultivierung mit Thiaminmangel nachgewiesen. Um einen eventuelle Einfluss der genetischen Veränderungen auf die Produktion dieser organischen Säuren näher zu untersuchen, wurde somit eine Kultivierung mit verringerte Thiaminkonzentration und 10 % Glucose durchgeführt. Das Wachstum der *Y. lipolytica* Stämme wurde während der Kultivierung durch die Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm verfolgt. Des Weiteren

wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung Proben für die IC-Analyse der sekretierten organischen Säuren entnommen.

Für die Transformanden H222-AK4 (*scs1::URA3*), H222-AK9 (*scs1::URA3 Δscs2*) und H222-AK10 (*mcPYC Δscs2*) mit der Deletion eines oder beider Gene der Succinyl-CoA Synthetase wurde ein deutlich schnelleres Wachstum mit höheren OD<sub>600</sub> im Vergleich zu dem Wachstum des Wildtyps H222 beobachtet (Abb. 3.28 A). Wohingegen für die Transformande H222-AK8 (*scs2::URA3*), die ebenfalls eine Deletion des Gens der β-Untereinheit der SCS besitzt, ein mit dem Wildtyp H222 vergleichbares Wachstum nachgewiesen wurde. Die Wachstumsraten von 0,014 h<sup>-1</sup> für H222-AK4, 0,022 h<sup>-1</sup> für H222-AK9 und 0,021 h<sup>-1</sup> für H222-AK10 waren erhöht verglichen mit 0,011 h<sup>-1</sup> für H222 und 0,01 h<sup>-1</sup> für H222-AK8. Um auszuschließen, dass die ermittelten optischen Dichten der Transformanden auf eine Morphologieänderung der Zellen zurückzuführen waren, wurde neben der optischen Dichte die Zellzahl der betreffenden Kulturen bestimmt (Abb. 3.28 B).

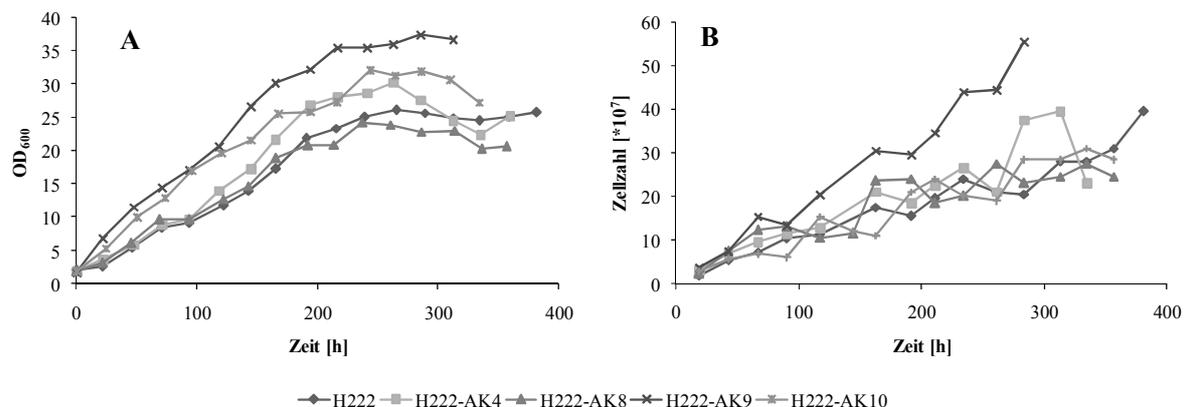


Abbildung 3.28: Charakteristisches Wachstum der Transformanden H222-AK4 (*scs1::URA3*), H222-AK8 (*scs2::URA3*), H222-AK9 (*scs1::URA3 Δscs2*) und H222-AK10 (*mcPYC Δscs2*) verglichen mit dem Wildtyp H222 unter thiaminlimitierten Bedingungen bestimmt mittels OD<sub>600</sub> (A) und der Zellzahl (B). Die Kultivierung mit 10 % Glucose wurde mit 0,5 μg/l Thiamin gestartet, wobei täglich 0,5 μg/l bis zu einer zugegebenen Endkonzentration von 3,5 μg/l Thiamin nachgefüttert wurden.

Die Bestimmung der Zellzahl während der Kultivierung unter den gewählten Bedingungen bestätigte das schnellere Wachstum der Transformande H222-AK9 (*scs1::URA3 Δscs2*) im Vergleich zu dem Wildtyp. Jedoch wurden, im Gegensatz zu der OD<sub>600</sub>-Bestimmung, die eine erhöhte optische Dichte für die Transformanden H222-AK4 (*scs1::URA3*) und H222-AK10 (*mcPYC Δscs2*) ergab, für diese Transformanden mit dem Wildtyp vergleichbare Zellzahlen

bestimmt. Außerdem wurde durch die Zellzahlbestimmung im Vergleich zu der  $OD_{600}$ -Bestimmung geringere Wachstumsraten für die untersuchten *Y. lipolytica* Stämme ermittelt. Die Wachstumsraten von H222-AK4 ( $0,005 \text{ h}^{-1}$ ), H222-AK8 ( $0,005 \text{ h}^{-1}$ ) und H222-AK10 ( $0,006 \text{ h}^{-1}$ ) zeigten mit dem Wildtyp ( $0,005 \text{ h}^{-1}$ ) vergleichbare Werte. Nur der Stamm H222-AK9 zeigte mit  $0,008 \text{ h}^{-1}$  eine gegenüber H222 erhöhte Wachstumsrate. Die reduzierten Wachstumsraten, ermittelt durch die Zellzahlbestimmung, im Vergleich zu der  $OD_{600}$ -Bestimmung, weisen auf eine eventuelle Speicherstoffeinlagerung oder eine Morphologieänderung der Zellen hin. Die Transformante H222-AK9 zeigte jedoch sowohl durch die Bestimmung der  $OD_{600}$  als auch durch die Zellzahlbestimmung ein verglichen mit dem Wildtyp verstärktes Wachstum. Vermutlich hatte die Deletion beider Gene der SCS, vergleichbar mit der veränderten Kolonimorphologie (siehe 3.6.) einen indirekten Effekt auf das Wachstum der Transformante H222-AK9 in thiaminlimitiertem Medium.

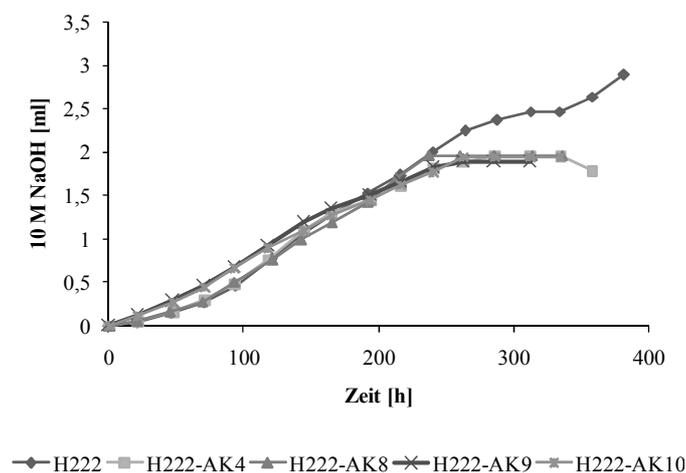


Abbildung 3.29: Basenverbrauch der Transformanten H222-AK4 (*scs1::URA3*), H222-AK8 (*scs2::URA3*), H222-AK9 (*scs1::URA3 Δscs2*) und H222-AK10 (*mcPYC Δscs2*) gegenüber dem Wildtyp H222 im thiaminlimitiertem Medium mit 10 % Glucose. Während der Kultivierung wurde die anfängliche Thiaminkonzentration von  $0,5 \mu\text{g/l}$  täglich mit  $0,5 \mu\text{g/l}$  nachgefüllt bis eine zugebenen Endkonzentration von  $3,5 \mu\text{g/l}$  Thiamin erreicht wurde. Der Basenverbrauch wurde durch die Zugabe von 10 M NaOH für die Aufrechterhaltung des pH-Wertes (4,0-4,5) des Mediums erhalten.

Der reduzierte Basenverbrauch der Transformanten H222-AK4, H222-AK8, H222-AK9 und H222-AK10 von 1,9 ml gegenüber dem Wildtyp H222 (3,2 ml) lässt eine geringe Sekretion organischer Säuren dieser Transformanten vermuten (Abb. 3.29).

Neben den Transformanten, die eine Deletion eines oder beider Gene der SCS aufwiesen, wurden auch die konstruierten *Y. lipolytica* Stämme H222-AK1 (*mcPYC*), H222-AK2 (*mcSCS1 mcSCS2*) und H222-AK3 (*mcPYC mcSCS1 mcSCS2*) unter thiaminlimitierten

Bedingungen kultiviert. Das Wachstum der Kulturen wurde durch die Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm verfolgt (Abb. 3.30 A).

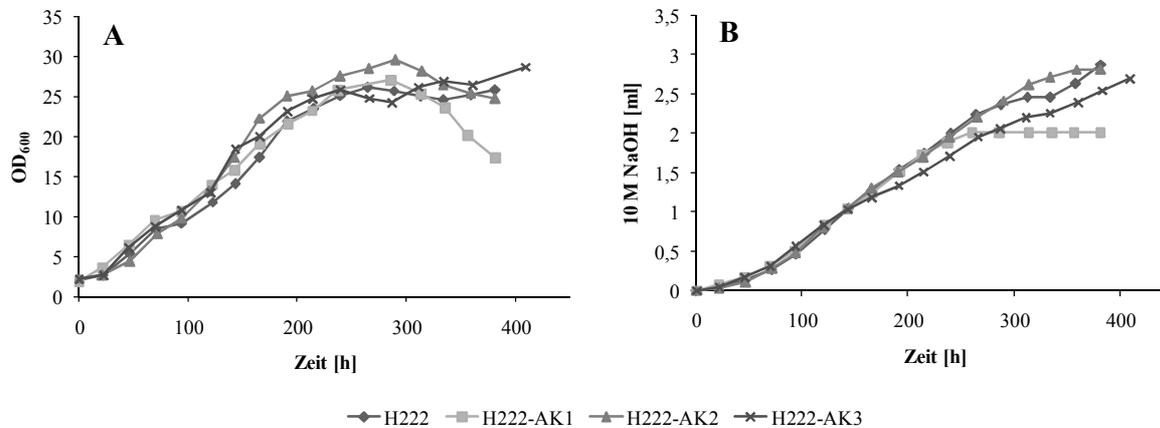


Abbildung 3.30: Wachstumskinetik (A) und Basenverbrauch (B) der Transformanten H222-AK1 (*mcPYC*), H222-AK2 (*mcSCS1 mcSCS2*) und H222-AK3 (*mcPYC mcSCS1 mcSCS2*) im Vergleich zum Wildtyp H222. Die 100 ml Medium wiesen eine verringerte Thiaminkonzentration auf. Die Startkonzentration von Thiamin betrug  $0,5 \mu\text{g/l}$  und wurde täglich mit  $0,5 \mu\text{g/l}$  erhöht, bis eine zugegebene Endkonzentration von  $3,5 \mu\text{g/l}$  erreicht wurde. Das Wachstum wurde durch die Messung der  $OD_{600}$  verfolgt. Der Basenverbrauch wurde durch die zugegebene NaOH-Menge für das Aufrechterhalten des pH-Wertes von 4,0 - 4,5 ermittelt.

Für die *Y. lipolytica* Stämme H222-AK1 (*mcPYC*) und H222-AK3 (*mcPYC mcSCS1 mcSCS2*) wurde ein mit dem Wildtyp H222 vergleichbares Wachstum unter den ausgewählten Bedingungen bestimmt. Ein leichtes signifikant schnelleres Wachstum mit der Wachstumsrate  $0,014 \text{ h}^{-1}$  wurde hingegen für H222-AK2 (*mcSCS1 mcSCS2*) verglichen mit H222 ( $0,011 \text{ h}^{-1}$ ) nachgewiesen. H222-AK1 und H222-AK3 zeigten eine mit dem Wildtyp vergleichbare Wachstumsrate von  $0,011 \text{ h}^{-1}$  und  $0,009 \text{ h}^{-1}$ .

Neben der  $OD_{600}$ -Bestimmung wurde ebenfalls der Basenverbrauch der Transformanten H222-AK1 (*mcPYC*), H222-AK2 (*mcSCS1 mcSCS2*) und H222-AK3 (*mcPYC mcSCS1 mcSCS2*) während des Wachstums unter Thiaminmangel untersucht (Abb. 3.30 B). Die Transformanten H222-AK2 und H222-AK3 zeigten ein mit dem Wildtyp vergleichbaren Basenverbrauch über die Kultivierungszeit. Wohingegen für den Stamm H222-AK1 bereits nach 260 h kein Basenverbrauch mehr nachgewiesen wurde. Eine mögliche Erklärung für den verringerten Basenverbrauch von H222-AK1 könnte ein eventuell früherer Eintritt in die Absterbephase sein. Die  $OD_{600}$  von H222-AK1 nimmt bereits nach 280 h deutlich ab und deutet damit die Lyse der Zelle und somit den Eintritt in die Absterbephase an (Abb. 3.30 A).

Folglich wurde eine verringerte Bildung organischer Säuren für H222-AK1 im Vergleich zu H222 vermutet. Für die Transformanten H222-AK2 und H222-AK3 wurde aufgrund des mit dem Wildtyp vergleichbaren Basenverbrauches eine mit dem Wildtyp vergleichbare Produktion organischer Säuren angedeutet.

Die Konzentration der sekretierten organischen Säuren Pyruvat, Fumarat und  $\alpha$ -Ketoglutarat wurde durch die ionenchromatographische Analyse während der Kultivierung mit einer verringerten Thiaminkonzentration ermittelt (Tab. 3.3).

Tabelle 3. 3: Produktion organischer Säuren der konstruierten *Y. lipolytica* Transformanten im Vergleich zu dem Wildtyp H222 während der Kultivierung unter Thiaminmangel. Die Kultivierung wurde mit 0,5  $\mu\text{g/l}$  Thiamin gestartet und alle 24 h wurden 0,5  $\mu\text{g/l}$  Thiamin zugegeben, bis eine zugegebene Endkonzentration von 3,5  $\mu\text{g/l}$  erreicht war. Die angegebenen Werte entsprechen den jeweiligen maximalen Werten. Anteil - Anteil an dem Gesamtsäureprodukt;  $\text{RZA}_{\text{max}}$  - maximale Raum-Zeit-Ausbeute;  $r_{\text{max}}$  - maximale Produktbildungsgeschwindigkeit

Stamm	Gesamt- säuregehalt [g/l]	organische Säure [g/l]	Anteil [%]	$\text{RZA}_{\text{max}}$ [mg/h*1]	$r_{\text{max}}$ [g/h*OD <sub>600</sub> ]
<b>Pyruvat</b>					
H222	27,2 ± 5	5,4 ± 2,3	22,8 ± 2,0	21,7 ± 1,9	0,29 ± 0,04
H222-AK1 ( <i>mcPYC</i> )	19,1 ± 5	3,1 ± 2,0	16,1 ± 10	9,20 ± 2,0	0,11 ± 0,04
H222-AK2 ( <i>mcSCS1 mcSCS2</i> )	26,6 ± 1	6,8 ± 1,0	25,5 ± 2,0	19,3 ± 6,2	0,24 ± 0,01
H222-AK3 ( <i>mcPYC mcSCS1 mcSCS2</i> )	24,1 ± 7	5,5 ± 2,0	24,1 ± 2,0	16,1 ± 1,3	0,19 ± 0,07
H222-AK4 ( <i>scs1::URA3</i> )	23,5 ± 1	2,9 ± 1,0	12,4 ± 1,0	11 ± 0,03	0,09 ± 0,01
H222-AK8 ( <i>scs2::URA3</i> )	20,8 ± 2	3,0 ± 0,1	14,2 ± 1,0	12,2 ± 4,4	0,13 ± 0,03
H222-AK9 ( <i>scs1::URA3 <math>\Delta</math>scs2</i> )	13,9 ± 1	1,3 ± 0,4	9,0 ± 3,0	5,40 ± 1,6	0,04 ± 0,02
H222-AK10 ( <i>mcPYC <math>\Delta</math>scs2</i> )	17,7 ± 2	3,8 ± 2,0	20,8 ± 9,0	10,7 ± 6,8	0,11 ± 0,10
<b><math>\alpha</math>-Ketoglutarat</b>					
H222	27,2 ± 5	19,7 ± 3,6	75,0 ± 1,0	62,7 ± 6,2	0,80 ± 0,10
H222-AK1 ( <i>mcPYC</i> )	19,1 ± 5	16,5 ± 3,2	79,7 ± 9,0	58,1 ± 6,2	0,74 ± 0,07
H222-AK2 ( <i>mcSCS1 mcSCS2</i> )	26,6 ± 1	19,2 ± 0,2	72,3 ± 2,7	52,4 ± 8,2	0,70 ± 0,04
H222-AK3 ( <i>mcPYC mcSCS1 mcSCS2</i> )	24,1 ± 7	18,1 ± 5,3	75,1 ± 0,9	44,0 ± 2,1	0,87 ± 0,10
H222-AK4 ( <i>scs1::URA3</i> )	23,5 ± 1	19,9 ± 0,4	85,0 ± 0,4	63,9 ± 1,2	0,79 ± 0,01
H222-AK8 ( <i>scs2::URA3</i> )	20,8 ± 2	14,9 ± 1,4	71,4 ± 1,3	53,5 ± 5,8	0,65 ± 0,10
H222-AK9 ( <i>scs1::URA3 <math>\Delta</math>scs2</i> )	13,9 ± 1	11,9 ± 0,6	85,8 ± 3,0	45,4 ± 2,0	0,34 ± 0,04
H222-AK10 ( <i>mcPYC <math>\Delta</math>scs2</i> )	17,7 ± 2	13,2 ± 2,4	75,2 ± 10	46,4 ± 1,3	0,46 ± 0,10
<b>Fumarat</b>					
H222	27,2 ± 5	0,6 ± 0,10	2,3 ± 0,5	2,1 ± 0,4	0,03 ± 0,01
H222-AK1 ( <i>mcPYC</i> )	19,1 ± 5	0,8 ± 0,04	4,2 ± 0,8	3,2 ± 0,8	0,06 ± 0,02
H222-AK2 ( <i>mcSCS1 mcSCS2</i> )	26,6 ± 1	0,6 ± 0,10	2,3 ± 0,2	1,7 ± 0,5	0,02 ± 0,01
H222-AK3 ( <i>mcPYC mcSCS1 mcSCS2</i> )	24,1 ± 7	0,6 ± 0,05	2,4 ± 0,9	1,4 ± 0,5	0,03 ± 0,01
H222-AK4 ( <i>scs1::URA3</i> )	23,5 ± 1	0,7 ± 0,03	2,8 ± 0,2	1,8 ± 0,1	0,03 ± 0,01
H222-AK8 ( <i>scs2::URA3</i> )	20,8 ± 2	0,7 ± 0,20	14,4 ± 0,5	2,2 ± 0,3	0,09 ± 0,02
H222-AK9 ( <i>scs1::URA3 <math>\Delta</math>scs2</i> )	13,9 ± 1	0,7 ± 0,02	5,2 ± 0,2	3,7 ± 0,2	0,02 ± 0,01
H222-AK10 ( <i>mcPYC <math>\Delta</math>scs2</i> )	17,7 ± 2	0,7 ± 0,60	4,0 ± 0,1	4,5 ± 1,3	0,03 ± 0,01

Unterschiede zwischen den Transformanden und dem Wildtyp wurden für die Bildung der Gesamtsäure während der Kultivierung unter Thiaminlimitation nachgewiesen. So war der gemessene Gesamtsäuregehalt von 22,2 – 27,2 g/l der Transformanden H222-AK1 (*mcPYC*), H222-AK2 (*mcSCS1 mcSCS2*), H222-AK3 (*mcPYC mcSCS1 mcSCS2*), H222-AK4 (*scs1::URA3*) und H222-AK8 (*scs2::URA3*) vergleichbar mit dem des Wildtyps H222. Die Transformanden H222-AK9 (*scs1::URA3 Δscs2*) und H222-AK10 (*mcPYC Δscs2*) zeigten hingegen eine geringere Sekretion organischer Säuren. Besonders auffällig war die um ca. 8 g/l niedrigere Gesamtsäuremenge von  $13,9 \pm 1$  g/l der Transformande H222-AK9, deren Wachstum sich deutlich von dem Wachstum der anderen Stämme abhob (Abb. 3.28). Die Transformande H222-AK10 zeigte nur eine um ca. 3 g/l verringerte Produktion organischer Säuren.

Mit einem Anteil von 75 – 85 % an dem Gesamtsäureprodukt stellte  $\alpha$ -Ketoglutarat in allen Stämmen die hauptsächlich sekretierte Säure während des thiaminlimitierten Wachstums der untersuchten *Y. lipolytica* Stämme dar. Die vom Wildtyp H222 produzierte  $\alpha$ -Ketoglutaratmenge von  $19,7 \pm 3,6$  g/l wurde ebenfalls für die Transformanden H222-AK1 (*mcPYC*), H222-AK2 (*mcSCS1 mcSCS2*), H222-AK3 (*mcPYC mcSCS1 mcSCS2*) und H222-AK4 (*scs1::URA3*) detektiert. Entsprechend der sekretierten Säuremenge waren auch die damit verbundenen  $RZA_{\max}$  von 56,5 – 68,9 mg/h\*1 und  $r_{\max}$  von 0,7 – 0,9 g/h\*OD<sub>600</sub> dieser Transformanden mit dem Wildtyp vergleichbar. Davon abweichend waren jedoch die Raum-Zeit-Ausbeuten der Transformanden H222-AK3, H222-AK9 (*scs1::URA3 Δscs2*) und H222-AK10 (*mcPYC Δscs2*), welche mit 42,1 - 47,7 mg/h\*1 deutlich niedriger lagen. Im Gegensatz zu H222-AK3, deren niedrige  $RZA_{\max}$  nicht mit einer verringerten  $\alpha$ -Ketoglutaratsekretion verbunden war, zeigten die Transformanden H222-AK9 und H222-AK10 eine reduzierte Bildung von  $\alpha$ -Ketoglutarat (11,3 – 15,6 g/l) sowie eine reduzierte Produktbildungsgeschwindigkeit von 0,3 - 0,56 g/h\*OD<sub>600</sub> im Vergleich zu dem Wildtyp. Für die Transformande H222-AK8 (*scs2::URA3*) wurde ebenfalls eine im Vergleich zu H222 verringerte  $\alpha$ -Ketoglutaratausbeute von  $14,9 \pm 1,4$  g/l verbunden mit einer reduzierten Produktbildungsgeschwindigkeit von  $0,65 \pm 0,1$  g/h\*OD<sub>600</sub> nachgewiesen.

Pyruvat wurde von den Transformanden H222-AK2 (*mcSCS1 mcSCS2*) und H222-AK3 (*mcPYC mcSCS1 mcSCS2*) in mit dem Wildtyp vergleichbaren Menge sowie vergleichbaren maximalen Raum-Zeit-Ausbeuten und Produktbildungsgeschwindigkeiten von 3,1–7,7 g/l, 19,8 - 23,6 mg/h\*1 und 0,25 – 0,33 g/h\*OD<sub>600</sub> sekretiert. Die Transformanden H222-AK1 (*mcPYC*), H222-AK4 (*scs1::URA3*), H222-AK8 (*scs2::URA3*), H222-AK9 (*scs1::URA3*)

*Δscs2*) sowie H222-AK10 (*mcPYC Δscs2*) zeigten eine verringerte Raum-Zeit-Ausbeute von 5,4 – 12,2 mg/h\*1 verbunden mit einer verringerten Produktbildungsgeschwindigkeit zwischen 0,04 g/h\*OD<sub>600</sub> und 0,13 g/h\*OD<sub>600</sub> verglichen mit dem Wildtyp H222.

Neben Pyruvat und  $\alpha$ -Ketoglutarat wurde ebenfalls Fumarat während des Wachstums mit Thiaminlimitierung gebildet. Die maximale Fumaratkonzentration des Wildtyps von 0,5 - 0,7 g/l entsprach den gemessenen Konzentrationen für alle kultivierten Transformanden. Die Unterschiede in der Fumaratbildung zwischen den Transformanden untereinander sowie zum Wildtyp ergaben sich erst in der Bestimmung der Raum-Zeit-Ausbeute sowie der Produktbildungsgeschwindigkeit. Die Transformanden H222-AK1 (*mcPYC*), H222-AK2 (*mcSCS1 mcSCS2*), H222-AK3 (*mcPYC mcSCS1 mcSCS2*) und H222-AK4 (*scs1::URA3*) zeigten eine mit dem Wildtyp vergleichbare  $RZA_{\max}$  (1,7-2,5 mg/h\*1) und  $r_{\max}$  (0,02-0,04 g/h\*OD<sub>600</sub>). Die  $RZA_{\max}$  von H222-AK8 (*scs2::URA3*) lag ebenfalls im  $RZA_{\max}$ -Bereich des Wildtyps, jedoch zeigte H222-AK8 eine höhere Produktbildungsgeschwindigkeit (0,09 ± 0,02 g/h\*OD<sub>600</sub>) verglichen mit H222. Im Gegensatz dazu unterschieden sich die Transformanden H222-AK9 (*scs1::URA3 Δscs2*) und H222-AK10 (*mcPYC Δscs2*) nur in ihrer gestiegenen  $RZA_{\max}$  (3,7 ± 0,2 mg/h\*1 und 4,5 ± 1,3 mg/h\*1) von dem Wildtyp.

### 3.9. Citrat- und Isocitratproduktion unter Stickstofflimitation

Während den bisher durchgeführten Kultivierungen wurde keine Sekretion von Citrat oder Isocitrat nachgewiesen. Um jedoch einen eventuellen Einfluss der genetischen Veränderungen auf die Citrat- und Isocitratproduktion von *Y. lipolytica* zu untersuchen, wurden Kultivierungen unter stickstofflimitierten Bedingungen durchgeführt. Als C-Quelle dienten 10 % Glucose. Die Kulturen wurden durch die Messung der optischen Dichte bei 600 nm, dem Basenverbrauch sowie durch die IC-Analyse der sekretierten organischen Säuren untersucht.

Im Citratproduktionsmedium waren anstatt der 3 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> nur 1 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> enthalten, um einen Stickstoffmangel zu erzielen. In Abbildung 3.33 ist das Wachstum sowie der Basenverbrauch der jeweiligen *Y. lipolytica* Stämme, aus einem repräsentativen Versuch dargestellt.

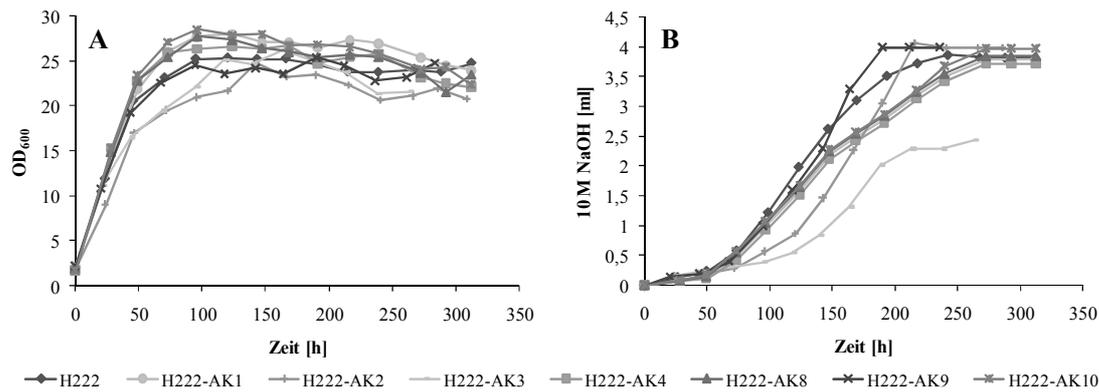


Abbildung 3.31: Wachstum (A) und Basenverbrauch (B) der Transformanten sowie des Wildtyps H222 unter stickstofflimitierten Bedingungen. Der repräsentative Versuch ergab sich aus einer mindestens zweimaligen unabhängigen Kultivierung der Stämme in 100 ml Citratproduktionsmedium. Die jeweiligen Kultivierungen wurden durch die Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm und des NaOH-Bedarfs für das Einstellen des pH-Wertes 5,0-5,5 verfolgt.

Das Wachstum der *Y. lipolytica* Stämme wurde durch den geringen Stickstoffgehalt des Mediums stark limitiert (Abb. 3.31 A). Das Wachstum der meisten untersuchten Stämme stagnierte nach 60-80 h vermutlich aufgrund der ausgezehrteten Stickstoffquelle. Eine Ausnahme bildete jedoch die Transformanten mit einer Überexpression von *SCS1* und *SCS2*, H222-AK2 (*mcSCS1 mcSCS2*) und H222-AK3 (*mcPYC mcSCS1 mcSCS2*), da sie erst nach ca. 120 h in die stationäre Phase eintraten.

Die Transformante H222-AK3 (*mcPYC mcSCS1 mcSCS2*) zeigte einen im Vergleich zu H222 deutlich verringerten Basenverbrauch während der stickstofflimitierten Kultivierung (Abb. 3.31 B). Wohingegen für die weiteren untersuchten Transformanten ein mit dem Wildtyp vergleichbarer Basenverbrauch nachgewiesen wurde. Der verringerte Basenbedarf von H222-AK3 deutet eine reduzierte Bildung organischer Säuren dieses Stammes an. Im Gegensatz dazu lässt der mit dem Wildtyp vergleichbare Basenbedarf eine ebenfalls vergleichbare Produktion organischer Säuren für die weiteren Transformanten vermuten.

Die Produktion organischer Säuren der Stämme wurde durch die IC-Analyse erfasst und zeigte den Beginn der Säureproduktion nach dem das Wachstum der Stämme stagnierte, nach 60-80 h bzw. nach 120 h. Unter diesen Bedingungen wurde nach einer Kultivierungszeit von 300-350 h 50-60 g/l Gesamtsäure durch die meisten der ausgewählten Transformanten sowie dem Wildtyp gebildet (Tab. 3.5). Abweichend davon wurde für die Transformante H222-AK3 mit der Überexpression von *SCS1*, *SCS2* und *PYC* ca. 20 g/l weniger organische Säuren im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen.

Tabelle 3. 5: Darstellung der von den konstruierten *Y. lipolytica* Stämme unter Stickstoffmangel produzierten organischen Säuren, Citrat und Isocitrat. Die Kultivierung fand in 100 ml Citratproduktionsmedium mit 10 % Glucose statt. Anteil - Anteil an dem Gesamtsäureprodukt;  $RZA_{\max}$  - maximale Raum-Zeit-Ausbeute;  $r_{\max}$  - maximale Produktbildungsgeschwindigkeit

Stamm	Gesamt- säuregehalt [g/l]	organische Säure [g/l]	Anteil [%]	$RZA_{\max}$ [mg/h*l]	$r_{\max}$ [g/h*OD <sub>600</sub> ]
<b>Citrat</b>					
H222	52,4 ± 5,2	47,1 ± 5,0	89,7 ± 1,8	209 ± 50	2,19 ± 0,5
H222-AK1 ( <i>mcPYC</i> )	47,4 ± 7,1	44,1 ± 6,4	93,0 ± 0,5	162 ± 22	1,73 ± 0,3
H222-AK2 ( <i>mcSCS1 mcSCS2</i> )	60,5 ± 6,7	55,5 ± 6,0	91,8 ± 0,2	200 ± 12	2,60 ± 0,2
H222-AK3 ( <i>mcPYC mcSCS1 mcSCS2</i> )	30,0 ± 3,7	26,8 ± 3,3	89,5 ± 0,1	126 ± 15	1,13 ± 0,1
H222-AK4 ( <i>scs1::URA3</i> )	57,1 ± 4,7	52,8 ± 3,7	92,5 ± 1,2	194 ± 12	2,29 ± 0,2
H222-AK8 ( <i>scs2::URA3</i> )	51,9 ± 2,4	47,5 ± 2,0	91,4 ± 0,8	182 ± 31	1,84 ± 0,1
H222-AK9 ( <i>scs1::URA3 Δscs2</i> )	53,7 ± 3,7	48,2 ± 3,1	89,8 ± 0,4	216 ± 1	2,09 ± 0,1
H222-AK10 ( <i>mcPYC Δscs2</i> )	51,8 ± 5,1	48,2 ± 4,6	93,1 ± 0,2	185 ± 42	1,90 ± 0,1
<b>Isocitrat</b>					
H222	52,4 ± 5,2	5,4 ± 1,0	10,3 ± 1,8	20,9 ± 5,3	0,23 ± 0,06
H222-AK1 ( <i>mcPYC</i> )	47,4 ± 7,1	3,3 ± 0,7	7,0 ± 0,5	12,9 ± 1,6	0,13 ± 0,03
H222-AK2 ( <i>mcSCS1 mcSCS2</i> )	60,5 ± 6,7	5,0 ± 0,7	8,2 ± 0,2	17,4 ± 2,3	0,23 ± 0,03
H222-AK3 ( <i>mcPYC mcSCS1 mcSCS2</i> )	30,0 ± 3,7	3,1 ± 0,4	10,5 ± 0,1	14,8 ± 1,8	0,13 ± 0,01
H222-AK4 ( <i>scs1::URA3</i> )	57,1 ± 4,7	4,3 ± 1,0	7,5 ± 1,2	16,2 ± 6,8	0,18 ± 0,02
H222-AK8 ( <i>scs2::URA3</i> )	51,9 ± 2,4	4,5 ± 0,6	8,6 ± 0,8	15,2 ± 1,9	0,22 ± 0,04
H222-AK9 ( <i>scs1::URA3 Δscs2</i> )	53,7 ± 3,7	5,5 ± 0,6	10,2 ± 0,4	23,2 ± 2,8	0,24 ± 0,02
H222-AK10 ( <i>mcPYC Δscs2</i> )	51,8 ± 5,1	3,6 ± 0,5	6,9 ± 0,2	13,7 ± 3,5	0,14 ± 0,01

Eine Citratmenge von 42,1 – 52,1 g/l wurde sowohl vom Wildtyp als auch den Transformanten H222-AK1 (*mcPYC*), H222-AK2 (*mcSCS1 mcSCS2*), H222-AK4 (*scs1::URA3*), H222-AK8 (*scs2::URA3*), H222-AK9 (*scs1::URA3 Δscs2*) und H222-AK10 (*mcPYC Δscs2*) sekretiert. Für die Transformante H222-AK3 (*mcPYC mcSCS1 mcSCS2*) wurde hingegen ein deutlich geringerer Citratwert von 26,8 ± 3,3 g/l detektiert. Während die Werte für die Raum-Zeit-Ausbeuten (159 - 259 mg/h\*l) und die Produktbildungsgeschwindigkeit (1,69 - 2,69 g/h\*OD<sub>600</sub>) für die meisten Transformanten und den Wildtyp in einem vergleichbaren Bereich bestimmt wurden, wurden für den Stamm H222-AK3 geringere  $RZA_{\max}$  von 126 ± 15 mg/h\*l und geringere  $r_{\max}$  von 1,13 ± 0,1 g/h\*OD<sub>600</sub> nachgewiesen.

Die verringerte Produktion organischer Säuren der Transformante H222-AK3 (*mcPYC mcSCS1 mcSCS2*) zeigte sich auch in der Bildung von Isocitrat. Die Transformanten H222-AK2 (*mcSCS1 mcSCS2*), H222-AK4 (*scs1::URA3*), H222-AK8 (*scs2::URA3*), H222-AK9 (*scs1::URA3 Δscs2*) und der Wildtyp H222 erreichten Isocitratmengen zwischen 4,4 und 6,4 g/l, H222-AK3 bildete hingegen nur 3,1 ± 0,4 g/l Isocitrat. Eine etwas geringere Sekretion von Isocitrat wurde auch für die Transformanten H222-AK1 (*mcPYC*; 3,3 ± 0,7 g/l) und H222-AK10 (*mcPYC Δscs2*; 3,6 ± 0,5 g/l) nachgewiesen. Im Gegensatz zu der

maximalen Isocitratkonzentration unterschied sich nur die Raum-Zeit-Ausbeute des Stammes H222-AK1 mit  $12,9 \pm 1,6 \text{ mg/h} \cdot \text{l}$  von der  $RZA_{\text{max}}$  ( $15,6 - 26,2 \text{ mg/h} \cdot \text{l}$ ) der weiteren untersuchten *Y. lipolytica* Stämme. Die Produktbildungsgeschwindigkeit von H222 mit  $0,17 - 0,29 \text{ g/h} \cdot \text{OD}_{600}$  wurde auch für die Transformanten mit einer Deletion eines Gens der SCS (H222-AK4, H222-AK8 und H222-AK9) sowie für die Transformante mit der alleinigen Überexpression der Gene der SCS (H222-AK2) ermittelt. Eine Überexpression von *PYC* hatte hingegen einen negativen Effekt auf die Produktbildungsgeschwindigkeit von Isocitrat. Folglich zeigten die Stämme H222-AK1, H222-AK3 und H222-AK10 eine im Vergleich zu H222 geringere  $r_{\text{max}}$  von  $0,13 \pm 0,03 \text{ g/h} \cdot \text{OD}_{600}$ .

## 4. Diskussion

In den letzten Jahren wurde der weltweite Markt für Succinat durch die Entwicklung katalytischer Prozesse für die Konvertierung von Succinat in eine Vielzahl von Grundchemikalien für industrielle Prozesse stark erweitert. Bisher wurde Succinat kommerziell kostenintensiv chemisch hergestellt (Winstrom, 1978). Eine kostengünstigere Variante ist hingegen die biologische Synthese von Succinat. Die bisher vielversprechendsten Succinatproduzenten mit einer Succinatausbeute von 94 – 146 g/l sind fakultativ anaerobe Bakterien wie *C. glutamicum* und *A. succinogenes*, sowie die anaerobe Succinatsynthese mit einem genetisch optimierten *E. coli* Stamm (Tab. 1.1.). Da die anaerobe Succinatproduktion erhebliche Nachteile aufweist, wurde eine aerobe Succinatsynthese mit einem genetisch optimierten *E. coli* Stamm etabliert. Die kostenintensive Kultivierung sowie die geringe Succinatausbeute von 58 g/l führten jedoch zu dem Erkenntnis, dass diese Succinatsynthese für einen industriellen Einsatz weiter optimiert werden muss (Lin *et al.*, 2005; Sanchez *et al.*, 2005; Shanmugam & Ingram, 2008). Folglich wird gegenwärtig nach alternativen aeroben Succinatproduzenten gesucht. Von großem Interesse für die biotechnologische Herstellung von Succinat ist die aerobe nicht-konventionelle Hefe *Y. lipolytica* aufgrund ihrer Fähigkeit eine Vielzahl von organischen Säuren wie Citrat, Isocitrat, Pyruvat und  $\alpha$ -Ketoglutarat in großen Mengen zu sekretieren (Chernyavskaya *et al.*, 2000; Fickers *et al.*, 2005; Förster *et al.*, 2007a). Die Synthese von 0,5 g Succinat /g Biotrockenmasse mit Ethanol als C-Quelle wurde bereits für diese Hefe nachgewiesen (Kamzolova *et al.*, 2009). Im Vergleich zu Ethanol sind Kultivierungen mit Glucose oder Glycerol als C-Quelle deutlich einfacher im Umgang und kostengünstiger. Glycerol fällt im Überschuss als Nebenprodukt bei der Produktion von Seifen, Fettsäuren, Wachs und Tensiden an. Vor diesem Hintergrund war das Ziel dieser Arbeit, einen Beitrag zu den Untersuchungen des Potentials von *Y. lipolytica* als aerober Succinatproduzent zu leisten. Dies umfasste die Überprüfung des Einflusses der Aktivitäten von Succinyl-CoA Synthetase sowie Pyruvat-Carboxylase auf die Succinatsynthese dieser Hefe. Ein weiteres Ziel stellte die Erforschung der Auswirkungen der veränderten Aktivitäten der Succinyl-CoA Synthetase sowie der Pyruvat-Carboxylase auf die Produktion anderer organischer Säuren von *Y. lipolytica* dar.

#### 4.1. Auswahl einer geeigneten C-Quelle für die Succinatproduktion

Zu Beginn der Arbeiten wurde die Auswahl einer geeigneten C-Quelle getroffen. Die Kultivierung des Wildtyps H222 wurde sowohl mit 10 % Glucose als auch mit 10 % Glycerol in einem aus der Itaconsäureproduktion mit *Candida* sp. bekannten Medium durchgeführt (Tabuchi *et al.*, 1981). Derzeit ist eine gesteigerte Succinatproduktion bedingt durch eine Limitierung, ähnlich wie die Thiaminlimitierung für die Bildung von  $\alpha$ -Ketoglutarat oder die Stickstofflimitierung für die Bildung von Citrat und Isocitrat, nicht bekannt. Vor diesem Hintergrund und aufgrund der in Vorversuchen nachgewiesenen Succinatproduktion in dem betreffenden Medium, wurde dieses Medium ausgewählt. Während der Kultivierung in diesem Succinatproduktionsmedium zeigte der *Y. lipolytica* Wildtypstamm H222 eine deutlich geringere Succinatausbeute von  $1,4 \pm 0,2$  g/l mit 10 % Glucose als C-Quelle im Vergleich zu der Kultivierung mit 10 % Glycerol ( $5,1 \pm 0,7$  g/l). Dies war verbunden mit einer höheren Wachstumsrate ( $0,008 \text{ h}^{-1}$ ) im glucosehaltigen Medium verglichen mit der Wachstumsrate ( $0,003 \text{ h}^{-1}$ ) für glycerolhaltiges Medium. Da 10 % Glucose (0,6 M) und 10 % Glycerol (1,1 M) nicht äquimolar sind, wurde eine erhöhte  $OD_{600}$  für das Wachstum mit Glycerol als C-Quelle im Vergleich zu dem Wachstum mit Glucose als C-Quelle erwartet. Es zeigte sich jedoch für beide Kultivierungen eine vergleichbare  $OD_{600}$  (Abb. 3.22). Eine mögliche Erklärung ist die energieaufwendige Neusynthese von Glucose über den Weg der Gluconeogenese. Dieser energieverbrauchende Prozess könnte als Ursache für das verlangsamte Wachstum sowie der erhöhten Bildung organischer Säuren des Glycerol-verwertenden Stammes betrachtet werden.

Die Succinatsynthese von *Y. lipolytica* erfolgte während der exponentiellen Wachstumsphase. Da das schnellere Wachstum in der exponentiellen Phase der Kultivierung mit Glucose mit einer verringerten Succinatsynthese verbunden war (Abb. 3.22), wurde ein verlangsamtes Wachstum während der exponentiellen Phase als positiver Effekt für die Succinatsynthese vermutet. Das verzögerte Wachstum war eventuell unter anderem verbunden mit einer reduzierten Aktivität der Succinat-Dehydrogenase. Die Succinat-Dehydrogenase katalysiert die Oxidation von Succinat zu Fumarat. Folglich könnte eine verringerte Umwandlung von Succinat zu Fumarat durch die reduzierte SDH Aktivität erzielt worden sein.

Aufgrund der deutlich erhöhten Produktivität von H222 ( $11,9 \pm 1,3 \text{ mg/h}^*1$ ;  $0,11 \pm 0,02 \text{ g/h}^*OD_{600}$ ) im glycerolhaltigen Medium im Vergleich zu der Kultivierung mit Glucose als C-Quelle ( $6,4 \pm 0,8 \text{ mg/h}^*1$ ;  $0,03 \pm 0,01 \text{ g/h}^*OD_{600}$ ), wurde Glycerol für die Untersuchungen der Succinatproduktion als C-Quelle ausgewählt.

#### 4.2. Reduktion der Succinatproduktion von *Yarrowia lipolytica*

Eine erhöhte Gen-Dosis der SCS kodierenden Gene zeigte sowohl in dem *Y. lipolytica* Stamm H222-AK2 (*mcSCS1 mcSCS2*) mit der alleinigen Überexpression der Gene, als auch in dem Hefestamm H222-AK3 (*mcPYC mcSCS1 mcSCS2*) mit einer zusätzlich gesteigerten PYC Aktivität einen negativen Einfluss auf die Succinatproduktion.

Die Succinyl-CoA Synthetase katalysiert die reversible Reaktion von Succinyl-CoA zu Succinat. Durch die Hydrolyse der Thioesterbindung wird die freigesetzte Energie für die Synthese einer Phosphoanhydridbindung zu Bildung von GTP oder ATP verwendet. Die Succinyl-CoA Synthetase ist aus zwei verschiedenen großen Untereinheiten aufgebaut, die  $\alpha$ - und die  $\beta$ -Untereinheit. Das katalytische Zentrum der SCS ist Bestandteil der beiden Untereinheiten des Enzyms (Pearson & Bridger, 1975b; Nishimura, 1986). In *Y. lipolytica* wurde sowohl das  $\alpha$ -Untereinheit kodierende Gen YALI0E24013g (*SCS1*) als auch das  $\beta$ -Untereinheit kodierende Gen YALI0D04741g (*SCS2*) annotiert. Die Stämme H222-AK2 (*mcSCS1 mcSCS2*) und H222-AK3 (*mcPYC mcSCS1 mcSCS2*) weisen erhöhte Gen-Dosen der SCS Gene, welche durch eine Southern Hybridisierung bestätigt wurden, auf. Des Weiteren wurde eine verstärkte Integration eines Gens der SCS gegenüber dem Zweiten durch die Klonierung der beiden Expressionskassetten in denselben multicopy Vektor p64PT deutlich reduziert. Vor diesem Hintergrund wurde davon ausgegangen, dass beide Untereinheiten in einer gleichen Anzahl exprimiert wurden und folglich ein intakter SCS-Enzymkomplex vorlag. Es sollte anschließend die spezifische Enzymaktivität der Succinyl-CoA Synthetase des Wildtyps sowie der Transformanten mit verschiedenen Methoden ermittelt werden (siehe 2.12.8). Jedoch gelang es weder eine Aktivität der SCS nach dem mechanischen Glasperlenaufschluss der Zellen, noch nach der Mitochondrienisolierung mit den verschiedenen Methoden nachzuweisen. Einen Hinweis auf die Schwierigkeit der Bestimmung dieser Enzymaktivität gibt bereits die Vielzahl von verschiedenen Methoden zur Enzymaktivitätsbestimmung der SCS (Cha & Parks, 1964; Gibson *et al.*, 1967; Alarcon *et al.*, 2002). Folglich scheinen die Aktivitätsbestimmungen für SCS nicht universell für alle

Organismen einsetzbar. Des Weiteren wurden diese Enzymtests vorwiegend für Gewebeprouben sowie für *E. coli*, deren Aufschluss sehr einfach ist, dargestellt. Denkbar wäre, dass möglicherweise während des Aufschlusses der *Y. lipolytica* Zellen der Enzymkomplex der SCS zerstört wurde und somit ein Aktivitätsverlust herbeigeführt wurde. Ein weiterer Grund für die nicht messbare Enzymaktivität könnte sein, dass in dem zellfreien Extrakt den Enzymtest störende Verbindungen vorhanden waren. Ähnliches wurde bereits für den zellfreien Extrakt von *S. cerevisiae* beschrieben, in dem ebenfalls keine Aktivität der Succinyl-CoA Synthetase bestimmt werden konnte (Przybyla-Zawislak *et al.*, 1998). Jedoch wurde die Aktivitätsbestimmung der SCS nach der Mitochondrienisolierung von *S. cerevisiae* durch die Bestimmung der Thioesterbindung von Succinyl-CoA bei 235 nm beschrieben (Przybyla-Zawislak *et al.*, 1998). Für *Y. lipolytica* wurde ebenfalls eine Mitochondrienisolierung durchgeführt, wobei es jedoch nicht gelang eine Enzymaktivität nach der Mitochondrienisolierung nachzuweisen. Die Mitochondrienisolierungen von *S. cerevisiae* und *Y. lipolytica* unterscheiden sich aufgrund der dickeren Zellwand von *Y. lipolytica* in der Sphäroplastierung, wodurch eventuell in diesem Schritt der SCS Komplex von *Y. lipolytica* negativ beeinflusst wurde. Eine weitere Möglichkeit zur Erklärung der nicht messbaren Enzymaktivität wäre die eventuell zu geringe Succinyl-CoA Synthetase Aktivität von *Y. lipolytica*, womit diese vielleicht unterhalb der Nachweisgrenze liegt.

In vorangegangenen Arbeiten wurden bereits Enzyme des TCC und des Glyoxylatzyklus überexprimiert und der positive Gen-Dosis-Effekt auf die betreffende Enzymaktivität nachgewiesen (Förster *et al.*, 2007a; Holz *et al.*, 2009). Es wurde für die Aconitase Aktivität eine 7-9-fache Steigerung (Holz *et al.*, 2009) und für die Isocitrat-Lyase eine 12-15-fache Erhöhung der Aktivität (Förster *et al.*, 2007a) bestimmt. In dieser Arbeit wurde vergleichbar mit den Arbeiten von Förster *et al.* (2007) und Holz *et al.* (2009) eine 5-14-fache Steigerung der Pyruvat-Carboxylase Aktivität im Vergleich zum Wildtyp durch eine mehrfache Integration der Expressionskassette von *PYC* erzielt (Tab. 4.1). Daher wurde davon ausgegangen, dass die erhöhte Gen-Dosis der Untereinheiten der Succinyl-CoA Synthetase ebenfalls in einem positiven Effekt auf die SCS Enzymaktivität resultierte. In der Transformante H222-AK3 wurde gemeinsam mit der *SCS1* und *SCS2* Gen-Dosen, die Gen-Dosis für das Gen der Pyruvat-Carboxylase durch Integration der Expressionskassette von *PYC* in das Genom erhöht (Abb. 3.8). Dieses Enzym katalysiert die Addition von CO<sub>2</sub> an Pyruvat, wobei Oxalacetat entsteht. Der positive Effekt der erhöhten *PYC* Gen-Dosis auf die *PYC* Aktivität wurde durch eine vierfache Steigerung der Enzymaktivität für H222-AK3

( $0,147 \pm 0,03$  U/mg) im Vergleich zu H222 ( $0,04 \pm 0,01$  U/mg) während der Kultivierung im Succinatproduktionsmedium nachgewiesen (Tab. 4.1).

Die Gesamtsäuregehalte der konstruierten Stämme H222-AK2 (*mcSCS1 mcSCS2*) und H222-AK3 (*mcPYC mcSCS1 mcSCS2*) lagen mit  $14,7 \pm 2,2$  g/l und  $15,2 \pm 0,7$  g/l deutlich unterhalb des Gesamtsäureproduktes des Wildtyps H222 mit  $23,8 \pm 4,4$  g/l während der Kultivierung im Succinatproduktionsmedium. Dies zeigte sich ebenfalls in den maximal erreichten Succinatausbeuten. So wurde für H222-AK2 und H222-AK3 eine Succinatkonzentration von  $2,8 \pm 0,4$  g/l und  $3,1 \pm 0,3$  g/l (H222:  $5,1 \pm 0,7$  g/l) nachgewiesen. Jedoch wurden für die Transformanden (H222-AK2:  $0,08 \pm 0,01$  g/h\*OD<sub>600</sub>; H222-AK3:  $0,09 \pm 0,01$  g/h\*OD<sub>600</sub>) mit dem Wildtyp ( $0,11 \pm 0,02$  g/h\*OD<sub>600</sub>) vergleichbare maximale Produktbildungsgeschwindigkeiten für Succinat bestimmt. Die mit dem Wildtyp vergleichbare Produktbildungsgeschwindigkeit resultierte vermutlich aus dem verlangsamten Wachstum der Transformanden während der Kultivierung. H222-AK2 und H222-AK3 wiesen eine im Vergleich zu dem H222 ( $0,003$  h<sup>-1</sup>) reduzierte Wachstumsrate von  $0,001$  h<sup>-1</sup> auf.

Eine mögliche Erklärung für das verlangsamte Wachstum der konstruierten Stämme H222-AK2 (*mcSCS1 mcSCS2*) und H222-AK3 (*mcPYC mcSCS1 mcSCS2*) ist eine reduzierte Glutamatsynthese bedingt durch einen erhöhten  $\alpha$ -Ketoglutaratbedarf des TCC. Eine erhöhte Succinyl-CoA Synthetase Aktivität führte eventuell zu einem gesteigerten Succinyl-CoA-Verbrauch und resultierte somit in einem erhöhten Succinyl-CoA-Bedarf, bereitgestellt durch die  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase. Die  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase katalysiert die oxidative Decarboxylierung von  $\alpha$ -Ketoglutarat zu Succinyl-CoA. Vermutlich entstand ebenfalls ein gesteigerter  $\alpha$ -Ketoglutaratbedarf im TCC und führte zu einem verringerten  $\alpha$ -Ketoglutaratangebot für die Glutamatsynthese. Eine verringerte Glutamatsynthese könnte zu einem Glutamatmangel führen, welcher wahrscheinlich ein verringertes Wachstum zur Folge hatte. Ein Hinweis für einen gesteigerten  $\alpha$ -Ketoglutaratbedarf wurde durch die erhöhte Aconitase und NADP-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase Aktivität, ermittelt während des Wachstums von H222-AK2 und H222-AK3 im glucosehaltigen Medium, gegeben. Die erhöhten Gen-Dosen von *SCS1* und *SCS2* (H222-AK2) sowie von *SCS1*, *SCS2* und *PYC* (H222-AK3) zeigten einen positiven Effekt auf die Aktivität der IDP. Es wurde eine erhöhte spezifische IDP Aktivität von  $0,65 \pm 0,13$  U/mg und  $0,52 \pm 0,05$  U/mg für den Stamm H222-AK2 und H222-AK3 im Vergleich zu dem Wildtyp mit  $0,4 \pm 0,03$  U/mg bestimmt. Die IDP katalysiert die Oxidation von Isocitrat zu  $\alpha$ -Ketoglutarat. Diese Reaktion kann ebenfalls durch die NAD-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase durchgeführt werden. Ein Unterschied

zwischen den zwei Enzymen besteht in deren Lokalisierung in der Zelle. Die IDH von *S. cerevisiae* liegt ausschließlich im Mitochondrium vor und zeigt allosterische Eigenschaften, wohingegen die nicht-allosterisch hemmbare IDP sowohl im Mitochondrium als auch im Cytoplasma zu finden ist (Haselbeck & McAlister-Henn, 1991; Cupp & McAlister-Henn, 1991). Ein weiterer Unterschied besteht in der Regulation der zwei Enzyme. Eine Regulation der IDH von *Candida (C.) tropicalis* erfolgt durch ATP, AMP, Citrat, Oxalacetat und Glyoxylat (Yamamoto *et al.*, 1995). Die IDP von *C. tropicalis* wird hingegen sowohl durch Oxalacetat und Glyoxylat als auch durch  $\alpha$ -Ketoglutarat reguliert (Yamamoto *et al.*, 1995). Diese unterschiedliche Regulation könnte die Ursache für eine erhöhte IDP Aktivität gegenüber der unveränderten IDH Aktivität gewesen sein. Durch die  $\alpha$ -Ketoglutarat bedingte Regulierung der IDP, wurde vermutlich deren Aktivität durch einen verstärkten  $\alpha$ -Ketoglutaratbedarf gesteigert. Ein Beweis für einen eventuell aufgetretenen Glutamatmangel könnte durch die Aktivitätsbestimmungen der Glutamat-Synthase und der Glutamat-Dehydrogenase erfolgen. Die Glutamat-Synthase katalysiert die Umsetzung von  $\alpha$ -Ketoglutarat und Glutamin zu Glutamat. Ein entsprechendes Gen (YALI0B19998g) für die Glutamat-Synthase ist in *Y. lipolytica* annotiert ([www.genolevures.org](http://www.genolevures.org)). Glutamat entsteht ebenfalls während der von der Glutamat-Dehydrogenase katalysierten Reaktion von  $\alpha$ -Ketoglutarat, Ammonium und NADH. Die Gene YALI0E09603g und YALI0F17820g sind für die Glutamat-Dehydrogenase im *Y. lipolytica* Genom annotiert ([www.genolevures.org](http://www.genolevures.org)). Des Weiteren könnte durch die Analyse der Glutamatmenge der Zellen ein weiterer Beleg für diese Hypothese angeführt werden. Einen weiteren Hinweis für diese Theorie könnte außerdem die Zugabe von Glutamat in das Kultivierungsmedium darstellen, sofern dies in einem verbesserten Wachstum resultieren würde. Das verminderte Wachstum der Transformante H222-AK2 und H222-AK3 könnte jedoch ebenfalls Folge eines verstärkten ATP-Verbrauches der Succinyl-CoA Synthetase sein. Da die SCS die Umsetzung von Succinyl-CoA zu Succinat reversibel katalysiert, könnte das Gleichgewicht durch eine Überexpression auf die Seite von Succinyl-CoA verschoben werden. Folglich würde überwiegend Succinyl-CoA, verbunden mit einem ATP-Verbrauch, entstehen. Ein erhöhter ATP-Bedarf, bedingt durch eine verstärkte Succinyl-CoA Synthese, könnte ebenfalls in einem verringerten Wachstum resultieren. Dies konnte jedoch aufgrund der fehlenden Enzymaktivitätsbestimmung der SCS weder bestätigt noch widerlegt werden. Die verstärkte Succinyl-CoA Synthese würde gegebenenfalls nicht nur zu einem erhöhten Energiebedarf führen, sondern auch zu einer verringerten Succinatbildung. Succinat ist das Substrat der Succinat-Dehydrogenase. Die Succinat-Dehydrogenase katalysiert nicht nur einen Schritt des

TCC, sondern stellt ebenfalls den Komplex II der Atmungskette dar. Eine verringerte Succinat-Dehydrogenase Aktivität, bedingt durch ein reduziertes Substratangebot, könnte möglicherweise in einer verringerten oxidativen Phosphorylierung resultieren und folglich in einer Limitierung des Wachstums. Diese Hypothese wurde jedoch durch die Aktivitätsbestimmungen der Succinat-Dehydrogenase während der Kultivierung mit Succinatproduktionsmedium nicht bestätigt. Denkbar wäre, dass durch die Zugabe eines Substratüberschusses während der Enzymaktivitätsbestimmung eine reduzierte SDH Aktivität bedingt durch einen Substratmangel nicht nachgewiesen werden konnte. Dementsprechend würde wahrscheinlich eine Bestimmung der SDH Aktivität ohne Zugabe des Substrates zu dem Ansatz für die Enzymaktivitätsbestimmung Aufschluss geben. Somit muss in weiterführenden Arbeiten diese Hypothese bestätigt oder widerlegt werden.

Die in der Transformante H222-AK3 (*mcPYC mcSCS1 mcSCS2*) zusätzlich erhöhte PYC Aktivität um den Faktor 4 resultierte nicht in einem verbesserten Wachstum im Vergleich zu H222-AK2 (*mcSCS1 mcSCS2*). Eventuell genügte die vierfache Steigerung der Aktivität der PYC nicht, um den negativen Einfluss der erhöhten *SCS1* und *SCS2* Gen-Dosen aufzuheben. Jedoch wurde für H222-AK3 eine erhöhte ACO Aktivität von  $0,37 \pm 0,04$  U/mg im Vergleich zu H222-AK2 ( $0,29 \pm 0,1$  U/mg) und H222 ( $0,23 \pm 0,09$  U/mg) während der Kultivierung im Minimalmedium mit 1 % Glucose nachgewiesen. Vermutlich wurde aufgrund der erhöhten PYC Aktivität vermehrt Pyruvat zu Oxalacetat umgesetzt und somit vermehrt Citrat gebildet. Das möglicherweise vergrößerte Citratangebot führte zu einer erhöhten ACO Aktivität von H222-AK3. Da jedoch durch die alleinige Erhöhung der *PYC* Gen-Dosis keine Steigerung der ACO Aktivität in H222-AK1 (*mcPYC*) nachweisbar war, war die erhöhte ACO Aktivität möglicherweise Folge des synergistischen Effektes der erhöhten Gen-Dosen von *PYC*, *SCS1* und *SCS2*.

#### **4.3. Genetische Veränderungen, für die kein Einfluss auf die Succinatproduktion von *Yarrowia lipolytica* nachgewiesen wurde**

In dieser Arbeit sollte der Einfluss verschiedener genetischer Veränderungen auf die Succinatsynthese untersucht werden. Die Deletion der *SCS* Gene sowie die alleinige Überexpression des *PYC* kodierenden Gens bewirkten jedoch keine Veränderungen der Succinatproduktion von *Y. lipolytica*.

#### 4.3.1. Überexpression des Pyruvat-Carboxylase kodierenden Gens

Die Überexpression von *PYC* in der Transformante H222-AK1 (*mcPYC*) führte über den Gen-Dosis-Effekt zu einer 14-fachen Erhöhung der Pyruvat-Carboxylase Aktivität im Vergleich zu dem Wildtyp H222 von  $0,04 \pm 0,01$  U/mg auf  $0,57 \pm 0,02$  U/mg während der Kultivierung im Succinatproduktionsmedium (Tab. 4.1). Verglichen mit vorangegangenen Arbeiten ist eine Steigerung der Enzymaktivität um das 14-fache bedingt durch eine erhöhte Gen-Dosis nicht verwunderlich, da beispielsweise für die Aconitase eine 7-9-fache Steigerung und für die Isocitrat-Lyase eine 12-15-fache Erhöhung der Enzymaktivität erzielt wurde (Förster *et al.*, 2007a; Holz *et al.*, 2009).

Die um das 14-fache gesteigerte *PYC* Aktivität zeigte jedoch keinen Einfluss auf die Succinatsynthese der Transformante H222-AK1 (*mcPYC*). Vielmehr wurde eine mit dem Wildtyp ( $5,1 \pm 0,7$  g/l) vergleichbare Succinatausbeute von  $5,2 \pm 0,6$  g/l bestimmt (Tab. 3.1). Des Weiteren wurden für H222-AK1 ( $12,2 \pm 1,8$  mg/h\* $l$ ;  $0,13 \pm 0,02$  g/h\* $OD_{600}$ ) und H222 ( $11,9 \pm 1,3$  mg/h\* $l$ ;  $0,11 \pm 0,02$  g/h\* $OD_{600}$ ) ähnliche Raum-Zeit-Ausbeuten und Produktbildungsgeschwindigkeiten ermittelt. Außerdem wurde ein Gesamtsäureprodukt von  $23,8 \pm 4,4$  g/l sowohl für H222 als auch für H222-AK1 nachgewiesen. Eine Erklärung für den ausbleibenden Effekt der erhöhten *PYC* Aktivität auf die Bildung organischer Säuren, wäre zum einen eine gesteigerte Zufuhr von Oxalacetat in den TCC ohne Anstau einer Säure und zum anderen eine metabolische Regulierung der *PYC* Aktivität. Die gesteigerte *PYC* Aktivität führte eventuell zu einem verstärkten Einbringen von Oxalacetat in den TCC. Folglich würde der Umsatz der  $C_4$ -Körper in dem TCC erhöht. Wider Erwarten wurde jedoch kein Anstieg der Produktion organischer Säuren für H222-AK1 im Vergleich zu H222 gemessen. Eine erhöhte Säuresekretion wurde eventuell durch eine beschleunigte Umwandlung der Metabolite des TCC in anabolischen Stoffwechselwegen verhindert. Eine weitere mögliche Erklärung für den ausbleibenden Effekt der erhöhten *PYC* Aktivität auf die Succinatsynthese wäre, dass aufgrund einer metabolischen Regulierung der *PYC* Aktivität die erhöhte Gen-Dosis zu keiner erhöhten intrazellulären *PYC* Aktivität führte.

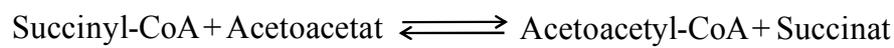
#### 4.3.2. Deletion der Succinyl-CoA Synthetase Gene

Die Succinyl-CoA Synthetase ist aufgebaut aus zwei Untereinheiten, die  $\alpha$ - und die  $\beta$ -Untereinheit, wobei das katalytische Zentrum als Bestandteil beider Untereinheiten beschrieben ist (Pearson & Bridger, 1975b; Nishimura, 1986). In *Y. lipolytica* wurde sowohl das für die  $\alpha$ -Untereinheit kodierende Gen YALI0E24013g (*SCS1*) als auch das für die  $\beta$ -Untereinheit kodierende Gen YALI0D04741g (*SCS2*) einzeln und gemeinsam zerstört. So wurden die Transformanden H222-AK4 (*scs1::URA3*), H222-AK8 (*scs2::URA3*) und H222-AK9 (*scs1::URA3  $\Delta$ scs2*) erzeugt (siehe 3.4). Da die Enzymaktivitätsbestimmung der SCS nicht möglich war, wurde aufgrund der bisher veröffentlichten Erkenntnisse zur Funktionsweise der SCS (Pearson & Bridger, 1975b; Nishimura, 1986) davon ausgegangen, dass die konstruierten Transformanden keine SCS Aktivität aufwiesen. Die Modifizierung eines Tryptophanrestes der  $\beta$ -Untereinheit resultierte in *E. coli* in einem vollständigen Verlust der Succinyl-CoA Synthetase Aktivität, obwohl eine intakte  $\alpha$ -Untereinheit vorhanden war (Nishimura, 1986). Vergleichbare Ergebnisse wurden durch die Deletion der Gene der SCS in *S. cerevisiae* erzielt (Przybyla-Zawislak *et al.*, 1998). Sowohl die alleinige Deletion des Gens der  $\alpha$ -Untereinheit als auch die alleinige Deletion des Gens der  $\beta$ -Untereinheit resultierte in *S. cerevisiae* in einem Aktivitätsverlust der SCS. Vor diesem Hintergrund und da die Succinyl-CoA Synthetase ein hochkonserviertes Enzym ist, wurde davon ausgegangen, dass die Zerstörung des Leserahmens der Gene der SCS zu einem Verlust der SCS Aktivität in den *Y. lipolytica* Stämmen H222-AK4 (*scs1::URA3*), H222-AK8 (*scs2::URA3*) und H222-AK9 (*scs1::URA3  $\Delta$ scs2*) führen musste.

Trotz der Deletion eines oder beider Gene der SCS, in Folge dessen der TCC unterbrochen wurde, konnte kein Einfluss auf die Produktion organischer Säuren der Transformanden H222-AK4 (*scs1::URA3*), H222-AK8 (*scs2::URA3*) und H222-AK9 (*scs1::URA3  $\Delta$ scs2*) während der Kultivierung im Succinatproduktionsmedium nachgewiesen werden (Tab. 3.1). Folglich musste die Bildung von Succinat in den Transformanden entweder durch Isoenzyme der SCS oder über alternative Wege gewährleistet werden. Im Genom von *Y. lipolytica* konnten jedoch keine Gene mit einer signifikanten Ähnlichkeit zu *SCS1* oder *SCS2* nachgewiesen werden ([www.genolevures.org](http://www.genolevures.org)). Daher ist anzunehmen, dass die Succinatsynthese in diesen konstruierten Hefestämmen über alternative Wege erfolgte. Drei mögliche Enzyme, die Isocitrat-Lyase, eine CoA-Transferase und eine CoA-Hydrolase sind fähig Succinat zu bilden. Des Weiteren besteht in *Y. lipolytica* die Möglichkeit Succinat über den 2-Methylcitrat Weg zu synthetisieren (Uchiyama *et al.*, 1982).

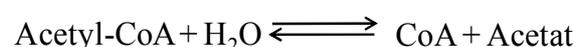
Die Isocitrat-Lyase ist das Schlüsselenzym des Glyoxylatzyklus und katalysiert die Spaltung von Isocitrat zu Succinat und Glyoxylat. Succinat wird anschließend in das Mitochondrium transportiert und in den TCC eingeführt, wo die Reduktion des Succinats zu Fumarat, katalysiert durch die Succinat-Dehydrogenase, stattfindet. In *S. cerevisiae* zeigte sich dieser Weg als der wahrscheinlichste alternative Weg (Przybyla-Zawislak *et al.*, 1998). Eine 1,5-2-fache Erhöhung der Isocitrat-Lyase Aktivität für die Transformanden H222-AK9 (*scs1::URA3 Δscs2*;  $0,095 \pm 0,012$  U/mg) verglichen mit dem Wildtyp ( $0,054 \pm 0,006$  U/mg) wurde während der Kultivierung mit Glycerol als C-Quelle bestimmt (Tab. 4.1). Die erhöhte ICL Aktivität lässt darauf schließen, dass in den konstruierten *Y. lipolytica* Stämmen der Glyoxylatzyklus als alternativer Weg für die Succinatbildung verstärkt aktiviert wurde.

Der zweite mögliche alternative Weg für die Succinatproduktion wird katalysiert durch eine 3-Ketosäure-CoA-Transferase. Diese mitochondriale CoA-Transferase ist beteiligt an dem Ketokörperabbau und überträgt Coenzym A von Succinyl-CoA unter Bildung von Succinat auf  $\gamma$ -Ketosäuren wie Acetoacetat. Das entstandene Acetoacetyl-CoA wird nachträglich durch eine Thiolase zu Acetyl-CoA gespalten.



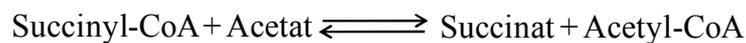
Die 3-Ketosäure-CoA-Transferase weist in Bakterien zwei Untereinheiten auf, wohingegen das Enzym in Eukaryonten als Homodimer vorliegt. Das *Y. lipolytica* Protein YALI0F26587p zeigt eine 76 %ige Homologie mit einer 60 %igen Identität zu der 3-Ketosäure-CoA-Transferase von *Candida dubliniensis* CD36. Möglicherweise besitzt *Y. lipolytica* also eine 3-Ketosäure-CoA-Transferase, die die Succinatbildung in den betrachteten Transformanden übernehmen könnte. Bisher wurde die 3-Ketosäure-CoA-Transferase-Aktivität in *Y. lipolytica* nicht untersucht. In weiterführenden Untersuchungen müsste daher bestätigt werden, ob dieses Enzym in *Y. lipolytica* exprimiert wird und aktiv ist. Anschließend sollte die Aktivität dieses Enzyms in den hier produzierten Transformanden untersucht werden, um Aussagen zu einer möglichen Bildung von Succinat durch dieses Enzym treffen zu können.

Die dritte Möglichkeit einer alternativen Succinatproduktion ist die Succinatbildung durch eine CoA-Hydrolase. Die Acetyl-CoA-Hydrolase von *S. cerevisiae* katalysiert die Acetatbildung aus Acetyl-CoA und wird kodiert durch *ACH1* (Lee *et al.*, 1990).



Die Bildung dieser Hydrolase wird in *S. cerevisiae* während des Wachstums auf nichtfermentierbaren C-Quellen induziert (Lee *et al.*, 1990). Das *Y. lipolytica* Protein YALI0E30965p zeigt eine 82 %ige Homologie zu Ach1p von *S. cerevisiae*. Es wurde spekuliert, dass dieses Enzym die Fähigkeit besitzt in den Transformanten mit einer Deletion eines Gens der SCS von *S. cerevisiae* durch Abspaltung der CoA-Gruppe von Succinyl-CoA Succinat zu bilden (Fleck & Brock, 2009). Die Überprüfung einer eventuellen Reaktion der aus den *Y. lipolytica* Transformanten isolierten Hydrolasen mit Succinyl-CoA könnte Aufschluss über das Vorhandensein der erwähnten Fähigkeit geben.

Eine weitere Fähigkeit der Acetyl-CoA Hydrolase besteht darin, dass sie als CoA-Transferase agieren kann (Fleck & Brock, 2009). Anstatt die CoA-Esterbindung zu hydrolysieren, überträgt die CoA-Transferase die CoA-Gruppe von Succinyl-CoA auf Acetat.



Das Protein Ach1p von *S. cerevisiae* zeigt eine hohe spezifische Aktivität für den CoA-Transfer von Succinyl-CoA auf Acetat und nur eine geringe CoA-Hydrolase Aktivität. Aufgrund der hohen Homologie der Proteine von *S. cerevisiae* und *Y. lipolytica* ist eine Bildung von Succinat ausgehend von Succinyl-CoA durch eine CoA-Transferase Aktivität in *Y. lipolytica* wahrscheinlich. Allerdings müsste auch für dieses Enzym getestet werden, ob es in *Y. lipolytica* exprimiert wird und unter welchen Bedingungen dies geschieht. Daher sollten weitere Untersuchungen zu diesem Enzym und dessen Aktivität in *Y. lipolytica* abgeschlossen werden.

Der 2-Methylcitrat Weg wird als eine weitere Möglichkeit Succinat in den TCC einzuschleusen betrachtet. Im Gegensatz zu einigen Prokaryonten erfolgt die Umwandlung von Propionat in *Y. lipolytica* und *S. cerevisiae* nicht über den Methylmalonyl-CoA Weg sondern über den 2-Methylcitrat Weg (Abb. 4.1) (Uchiyama *et al.*, 1982; Pronk *et al.*, 1994). Die durch die 2-Methylcitrat Synthase katalysierte Synthese von 2-Methylcitrat geht von Propionyl-CoA und Oxalacetat aus. Das resultierende 2-Methylcitrat wird durch die Aktivität der 2-Methylcitrat-Dehydrogenase in 2-Methylisocitrat umgewandelt. Anschließend wird Letzteres mittels der 2-Methylisocitrat-Lyase in Pyruvat und Succinat gespalten. Das entstandene Succinat wird in den TCC eingeschleust.

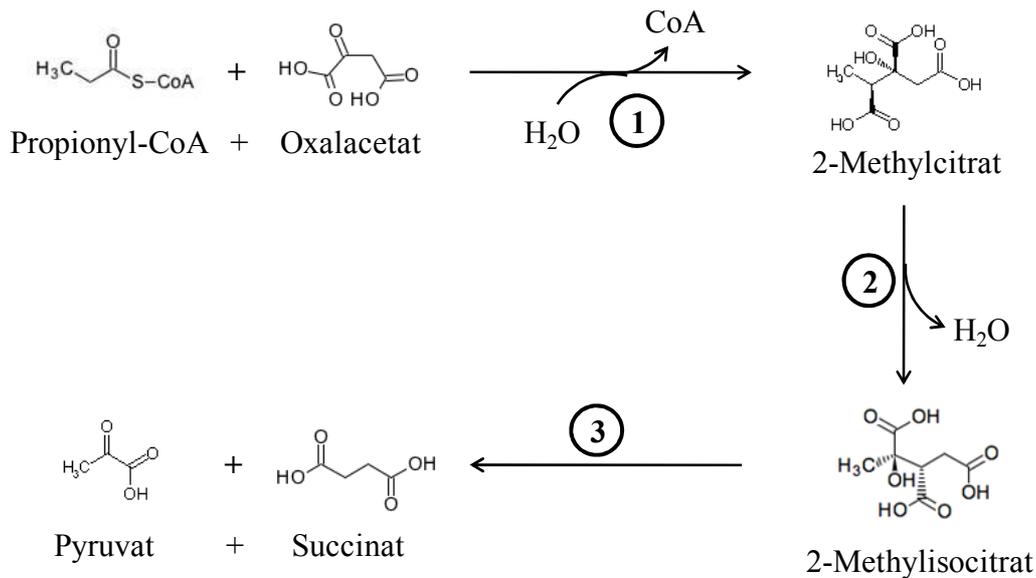


Abbildung 4. 1: 2-Methylcitrat Weg in *Y. lipolytica*. (1) 2-Methylcitrat-Synthase, (2) 2-Methylcitrat-Dehydrogenase, (3) 2-Methylisocitrat-Lyase.

Propionyl-CoA entsteht beispielsweise während der von der Propionyl-CoA-Carboxylase katalysierten Decarboxylierung von Methylmalonyl-CoA. Methylmalonyl-CoA wiederum entsteht durch die Aktivität der Methylmalonyl-CoA-Mutase aus Succinyl-CoA. *Y. lipolytica* besitzt jedoch keine Methylmalonyl-CoA-Mutase und ist somit nicht fähig Succinyl-CoA in Methylmalonyl-CoA umzuwandeln. Aufgrund der fehlenden Methylmalonyl-CoA-Mutase Aktivität ist die Succinatsynthese ausgehend von Succinyl-CoA über den 2-Methylcitrat Weg als Alternative für die Aktivität der Succinyl-CoA Synthetase unwahrscheinlich. Propionyl-CoA kann jedoch ebenfalls durch die  $\beta$ -Oxidation von ungeradzahligem Fettsäuren sowie durch den Abbau der Aminosäuren Isoleucin, Valin, Methionin und Threonin entstehen (Doenecke *et al.*, 2005). Dementsprechend wäre eine Succinatsynthese durch den 2-Methylcitrat Weg möglich. Nachfolgende Aktivitätsbestimmungen der Enzyme des 2-Methylcitrat Weges könnten diese Theorie bestätigen.

Zusammenfassend wurde sowohl die Succinatbildung über den Glyoxylatzyklus, den 2-Methylcitrat Weg als auch durch eine 3-Ketosäure-CoA-Transferase oder eine Acetyl-CoA-Hydrolase Aktivität als wahrscheinlich betrachtet. Die erhöhte ICL Aktivität von H222-AK9 (*scs1::URA3  $\Delta$ scs2*) während der Kultivierung mit Glycerol als C-Quelle weist auf eine Bildung von Succinat über den Glyoxylatzyklus hin.

Die Transformanten H222-AK4 (*scs1::URA3*), H222-AK8 (*scs2::URA3*) und H222-AK9 (*scs1::URA3 Δscs2*) zeigten mit  $5,8 \pm 0,4$  g/l,  $4,6 \pm 1,2$  g/l und  $3,8 \pm 0,5$  g/l mit dem Wildtyp ( $5,1 \pm 0,7$  g/l) vergleichbare Succinatausbeuten. Denkbar wäre, dass durch die Aktivität des Glyoxylatzyklus nur soviel Succinat gebildet wurde, wie für einen intakten TCC benötigt wurde. Auch eine verstärkte oder verringerte Synthese einer anderen organischen Säure des TCC wurde unter diesen Bedingungen nicht nachgewiesen (Tab. 3.1). Der oxidative TCC lag wahrscheinlich bis zu der Bildung von Succinyl-CoA aktiv vor und Succinyl-CoA ging vermutlich als aktive Verbindung sofort in die Porphyrinsynthese ein (Jenkins & Weitzman, 1988). Folglich war ein Anstau von Succinyl-CoA unwahrscheinlich. Ein vergrößertes Succinyl-CoA Angebot hätte aufgrund der Produkthemmung der AKG-DH die Bildung von  $\alpha$ -Ketoglutarat beeinflussen können. Es wurden jedoch für H222-AK4 ( $5,1 \pm 0,1$  g/l), für H222-AK8 ( $6,1 \pm 1,8$  g/l) und für H222-AK9 ( $4,7 \pm 0,4$  g/l) mit dem Wildtyp ( $4,2 \pm 0,7$  g/l) vergleichbare  $\alpha$ -Ketoglutaratausbeuten während der Kultivierung im Succinatproduktionsmedium nachgewiesen. Dementsprechend wurde die Bildung von  $\alpha$ -Ketoglutarat nicht durch ein vergrößertes Succinyl-CoA Angebot beeinflusst. Der durch die Deletion der für die SCS kodierenden Gene unterbrochene TCC wurde vermutlich durch die Succinatbildung über den Glyoxylatzyklus aufgefüllt, sodass ebenfalls die Synthese von Fumarat, Malat und Oxalacetat gewährleistet wurde.

#### 4.4. Erhöhung der Succinatproduktion von *Yarrowia lipolytica*

Eine Erhöhung der Succinatproduktion von *Y. lipolytica* wurde durch die Deletion des für die  $\beta$ -Untereinheit der SCS kodierenden Gens gemeinsam mit der Erhöhung der Gen-Dosis des für die PYC kodierenden Gens erzielt.

Die Pyruvat-Carboxylase Aktivität wurde im Stamm H222-AK10 (*mcPYC Δscs2*) durch die mehrfache Integration der *PYC*-Expressionskassette erhöht. Der Gen-Dosis Effekt bewirkte eine fünffache Erhöhung der PYC Aktivität während der Kultivierung im Succinatproduktionsmedium mit Glycerol als C-Quelle für diese Transformante (Tab. 4.1). Im Gegensatz zu der alleinigen Überexpression von *PYC* in H222-AK1 (*mcPYC*) wurde eine geringere Steigerung der PYC Aktivität für H222-AK10 nachgewiesen (Tab. 4.1). Denkbar wäre, dass die verschiedenen Enzymaktivitäten von H222-AK1 und H222-AK10 aus der unterschiedlichen Kopiezahl oder den verschiedenen Integrationsorten der *PYC*-Expressionskassette im Genom resultierten. Im Stamm H222-AK10 (*mcPYC Δscs2*) wurde

zusätzlich durch die Zerstörung des *SCS2*-ORFs, bedingt durch die homologe Integration der *SCS2*-Deletionskassette in das Genom, ein Verlust der SCS Aktivität angestrebt (Abb. 3.15). Folglich wäre ebenfalls ein negativer Einfluss der Deletion von *SCS2* auf die PYC Aktivität in H222-AK10 möglich.

Tabelle 4. 1: Enzymaktivitäten der Transformanden H222-AK1 (*mcPYC*), H222-AK9 (*scs1::URA3 Δscs2*) und H222-AK10 (*mcPYC Δscs2*) im Vergleich mit H222 während der Kultivierung für die Succinatproduktion mit 10 % Glycerol nach 312 h. Die Standardabweichung wurde aus drei unabhängigen Kultivierungen bestimmt.

Stamm	Genotyp	Enzymaktivitäten [U/mg]		
		ICL	PYC	SHD
H222	Wildtyp	0,054 ± 0,006	0,040 ± 0,011	0,061 ± 0,004
H222-AK1	<i>mcPYC</i>	0,038 ± 0,004	0,566 ± 0,023	0,044 ± 0,019
H222-AK9	<i>scs1::URA3 Δscs2</i>	0,095 ± 0,012	0,200 ± 0,012	0,059 ± 0,006
H222-AK10	<i>mcPYC Δscs2</i>	0,104 ± 0,010	0,196 ± 0,020	0,141 ± 0,034

Für H222-AK10 (*mcPYC Δscs2*) wurde eine 40 %ige Erhöhung der maximal gebildeten Succinatmenge auf  $8,7 \pm 1,6$  g/l im Vergleich zum Wildtyp H222 ( $5,1 \pm 0,7$  g/l) nachgewiesen (Tab. 4.2). Die erhöhte Sekretion von Succinat von H222-AK10 war aufgrund des mit dem Wildtyp vergleichbaren Wachstums mit einer ebenfalls erhöhten Produktivität ( $21,9 \pm 2,5$  mg/h\* $l$ ;  $0,18 \pm 0,04$  g/l\* $OD_{600}$ ) verglichen mit H222 ( $11,9 \pm 1,3$  mg/h\* $l$ ;  $0,11 \pm 0,02$  g/h\* $OD_{600}$ ) verbunden.

Tabelle 4. 2: Wachstumsparameter und Succinatproduktion von H222-AK10 (*mcPYC Δscs2*) im Vergleich zum Wildtyp H222. Die Kultivierung wurde mit 10 % Glycerol als C-Quelle in 100 ml Medium im Schüttelkolben durchgeführt. Das eingesetzte Medium wies keine bekannte Limitation auf.

	H222	H222-AK10
$\mu$ [ $h^{-1}$ ]	0,003	0,003
Gesamtsäuregehalt [g/l]	$23,8 \pm 4,4$	$37,4 \pm 6,0$
Succinat [g/l]	$5,1 \pm 0,7$	$8,7 \pm 1,6$
Succinat [%] <sup>1</sup>	$21,7 \pm 1,8$	$23,3 \pm 0,5$
$RZA_{max}$ [mg/h* $l$ ]	$11,9 \pm 1,3$	$21,9 \pm 2,5$
$r_{max}$ [g/h* $OD_{600}$ ]	$0,11 \pm 0,02$	$0,18 \pm 0,04$

<sup>1</sup> Anteil von Succinat an dem Gesamtsäureprodukt

Aus Tabelle 4.2 wird ersichtlich, dass für H222-AK10 (*mcPYC Δscs2*) ein im Vergleich zu H222 erhöhter Gesamtsäuregehalt nachgewiesen wurde. Da der Anteil von Succinat an dem Gesamtsäureprodukt von H222-AK10 und H222 vergleichbar war, wurde die Steigerung der gesamten sekretierten organischen Säure nicht allein durch die erhöhte Succinatproduktion verursacht. Dementsprechend wurde für H222-AK10 nicht nur eine 40 %ige Erhöhung der Succinatsynthese bestimmt, sondern ebenfalls eine 40 %ige Steigerung der Bildung von Malat,  $\alpha$ -Ketoglutarat und Pyruvat (Tab. 3.1 & Tab. 3.2). Eine vergleichbare Erhöhung der Bildung organischer Säuren gelang jedoch nicht durch den alleinigen Verlust der SCS Aktivität in dem Stamm H222-AK8 (*scs2::URA3*) sowie in H222-AK9 (*scs1::URA3 Δscs2*) oder durch die alleinige Aktivitätserhöhung der PYC in H222-AK1 (*mcPYC*), sondern nur durch eine Kombination der beiden genetischen Veränderungen in dem Stamm H222-AK10 (*mcPYC Δscs2*). Letzterer zeigte neben der gesteigerten PYC Aktivität ebenfalls eine Verdopplung der ICL Aktivität gegenüber dem Wildtyp H222 (Tab. 4.1). Die erhöhte ICL Aktivität in H222-AK10 weist auf eine gesteigerte Aktivität des Glyoxylatzyklus hin und war vermutlich Folge des Aktivitätsverlustes der SCS. Derselbe Effekt konnte bereits für den Stamm H222-AK9, der die Deletionen beider SCS Gene aufwies, nachgewiesen werden (Tab. 4.1). Dementsprechend erfolgte die Succinatsynthese in H222-AK10 vermutlich durch die Aktivität des Glyoxylatzyklus (siehe 4.3.) Durch die fünffach erhöhte PYC Aktivität wurde wahrscheinlich zusätzlich vermehrt Oxalacetat in die Zyklen eingeschleust. Das möglicherweise vergrößerte Oxalacetatangebot könnte zu einem vergrößerten Isocitratangebot führen. Die Deletion von *SCS2* resultierte vermutlich in einer erhöhten ICL Aktivität in Folge dessen vermehrt Isocitrat in Glyoxylat und Succinat gespalten wurde. Die erhöhte Bildung von Succinat von H222-AK10 ist somit wahrscheinlich Folge des synergistischen Effektes der Deletion von *SCS2* und der fünffach erhöhten PYC Aktivität (Abb. 4.2).

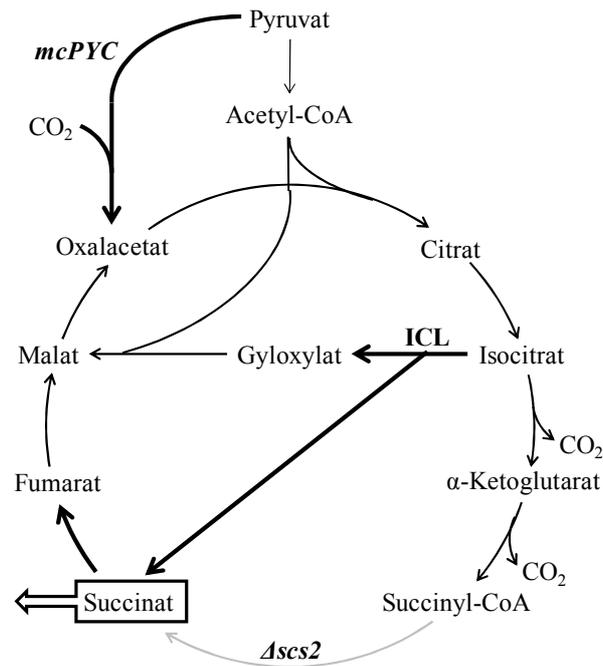


Abbildung 4. 2: Hypothetische Succinatsynthese in dem *Y. lipolytica* Stamm H222-AK10 (*mcPYC*  $\Delta$ *scs2*). Die graue Linie zeigt die Deletion des Gens der  $\beta$ -Untereinheit der SCS. Die dicken schwarzen Linien entsprechen den bestimmten erhöhten Enzymaktivitäten von H222-AK10 im Vergleich zu H222.

Eine mit H222-AK10 (*mcPYC*  $\Delta$ *scs2*) vergleichbare Succinatausbeute wurde für die Hefe *Candida (C.) zeylanoides* beschrieben (Kamzolova *et al.*, 2009). *C. zeylanoides* wurde im Gegensatz zu dieser Arbeit mit Ethanol als C-Quelle im Bioreaktor kultiviert und zeigte eine deutlich höhere Wachstumsrate von  $0,31 \text{ h}^{-1}$  (Kamzolova *et al.*, 2009) im Vergleich zu H222-AK10 mit  $0,003 \text{ h}^{-1}$  (Tab. 4.3). Die maximal erreichte Succinatausbeute von  $9,4 \text{ g/l}$  mit *C. zeylanoides* wurde nach 68 h nachgewiesen, wohingegen die vergleichbare Succinatmenge von  $8,7 \pm 1,6 \text{ g/l}$  während der Kultivierung von H222-AK10 erst nach ca. 350 h gemessen wurde. In vorangegangenen Arbeiten, z. B. für die Citratsynthese (Förster *et al.*, 2007a), wurde jedoch bereits eine Steigerung der Produktivität aufgrund der Übertragung des Produktionsprozesses in den Bioreaktor erzielt. Vermutlich wird die Kultivierung von H222-AK10 im Bioreaktor ebenfalls eine Steigerung der Succinatsynthese zur Folge haben.

Tabelle 4. 3: Wachstumsparameter und die Produktion organischer Säuren der *Y. lipolytica* Stämme H222 (Wildtyp) und H222-AK10 (*mcPYC Δscs2*) im Schüttelkolbenmaßstab im Vergleich zu den in der Literatur angegebenen Werten für die Kultivierung von *C. zeylanoides* mit Ethanol als C-Quelle im Bioreaktor (Kamzolova *et al.*, 2009).  $Y$ - Ertrag; S - Substrat; SA - Succinat;  $\mu$  -Wachstumsrate;  $\gamma$ - Ausbeute

Parameter	H222	H222-AK10	<i>C. zeylanoides</i>
$Y_{SA/S}$ [%]	51	87	63
$\mu$ [ $h^{-1}$ ]	0,003	0,003	0,31
$\gamma$ (Succinat) [g/l]	5,1 $\pm$ 0,7	8,7 $\pm$ 1,6	9,4
$\gamma$ (Malat) [g/l]	9,4 $\pm$ 1,4	15,5 $\pm$ 2,2	8,8
$\gamma$ ( $\alpha$ -Ketoglutarat) [g/l]	4,2 $\pm$ 0,7	7,1 $\pm$ 1,0	0,8
$\gamma$ (Fumarat) [g/l]	2,7 $\pm$ 0,8	4,2 $\pm$ 1,2	-
$\gamma$ (Pyruvat) [g/l]	1,2 $\pm$ 0,4	3,0 $\pm$ 0,5	-
$\gamma$ (Isocitrat) [g/l]	-	-	1,7
$Y_{SA}$ [%]	22,7	22,8	39

Des Weiteren wird aus der Tabelle 4.3 deutlich, das *C. zeylanoides* im Vergleich zu H222-AK10 (*mcPYC Δscs2*) ein geringeres Nebenproduktspektrum aufweist. *Y. lipolytica* bildet Succinat hingegen unter den ausgewählten Bedingungen in einem Mix mit Malat,  $\alpha$ -Ketoglutarat, Pyruvat und Fumarat. Dabei bildete Malat den mit  $39,8 \pm 2,3$  % größten Anteil an dem Gesamtsäureprodukt vor Succinat ( $21,9 \pm 2,5$  %) und  $\alpha$ -Ketoglutarat ( $17,4 \pm 1,5$  %) für die gewählten Kultivierungsbedingungen. Die hohen Mengen der Nebenprodukte stellen ein Problem der eventuellen industriellen Succinatsynthese mit *Y. lipolytica* dar, da Succinat unter den ausgewählten Bedingungen von einer Reihe organischer Säuren kostenintensiv gereinigt werden müsste. Daher muss eine Reduktion der Nebenprodukte beispielsweise durch die Veränderung der Kultivierungsbedingungen erzielt werden. Eine weitere Möglichkeit das Nebenproduktspektrum zu reduzieren wurde von M. Holz (2010, unveröffentlicht) gezeigt. In dieser Arbeit wurde eine deutliche Reduktion der Konzentration der Nebenprodukte auf ca. 1 g/l verbunden mit einer Steigerung der Succinatkonzentration auf ca. 30 g/l durch die Reduktion der SDH Aktivität mittels Carboxin nachgewiesen.

Die mit dem *Y. lipolytica* Stamm H222-AK10 (*mcPYC Δscs2*) erreichte Succinatproduktion ( $8,7 \pm 1,6$  g/l;  $0,01$  g/l\*h) liegt jedoch weit hinter den Succinatausbeuten anaerober Succinatproduzenten wie *A. succinogenes* (106 g/l;  $2,8$  g/l\*h) oder *C. glutamicum* (146 g/l;  $3,2$  g/l\*h) (Guettler *et al.*, 1999; Okino *et al.*, 2008). Nachteilig für die Succinatbildung mit *A. succinogenes* ist jedoch die Vergiftung mit höheren Glucosemengen, die nach kurzer Zeit eintretende Lyse der Zellen sowie die Acetatbildung des Bakteriums (Wells & Russell, 1996; Nghiem *et al.*, 1999). Des Weiteren ist eine anaerobe Kultivierung sehr kostenintensiv. Daher

wird eine kostengünstige aerobe Kultivierung angestrebt. Dementsprechend wurde bereits eine aerobe Succinatproduktion mit 58,3 g/l und 1,1 g/l\*h für einen genetisch optimierten *E. coli* Stamm etabliert (Lin *et al.*, 2005; Sanchez *et al.*, 2005; Sanchez *et al.*, 2006; Shanmugam & Ingram, 2008). Die Kultivierung des optimierten *E. coli* Stammes hat jedoch den Nachteil, dass Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid als Induktor für die Überexpression der betreffenden Gene zu dem Medium zugegeben werden muss und folglich die Kosten für die Succinatproduktion erhöht werden. Eine aerobe Succinatsynthese mit *Y. lipolytica* besitzt hingegen den Vorteil, dass aufgrund des breiten Substratspektrums, der hohen genetischen Stabilität, der Apathogenität, der Fähigkeit große Mengen organischer Säuren (bis zu 250 g/l) zu sekretieren, der problemlosen Kultivierung im großen Maßstab und der hohen mechanischen Widerstandsfähigkeit eine kostengünstigere Produktion möglich wäre (Barth & Gaillardin, 1996; Fickers *et al.*, 2005). Dementsprechend ist eine konkurrenzfähige Succinatproduktion mit *Y. lipolytica* von großem Interesse. Um eine konkurrenzfähige aerobe Succinatproduktion mit dem *Y. lipolytica* Stamm H222-AK10 zu erzielen, muss eine weitere Steigerung der Succinatbildung verbunden mit einer Reduktion des Nebenproduktspektrums erfolgen. Eine zusätzliche Erhöhung der Succinatbildung dieser Hefe könnte durch verschiedene Möglichkeiten erreicht werden.

Eine Erhöhung der Succinatausbeute auf 30 g/l wurde durch die Reduktion der Succinat-Dehydrogenase Aktivität von M. Holz (2010, unveröffentlicht) nachgewiesen. Die Succinat-Dehydrogenase katalysiert die Umsetzung von Succinat zu Fumarat. Dass die Succinat-Dehydrogenase eine wichtige Rolle für die Succinatproduktion spielt, wurde bereits in *E. coli* sowie in *S. cerevisiae* demonstriert (Arikawa *et al.*, 1999; Kubo *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2007). In beiden Organismen wurde mindestens ein Gen der SDH deletiert, wodurch ein Verlust oder einer Reduktion der Aktivität erreicht wurde und somit eine erhöhte Bildung von Succinat nachgewiesen wurde. M. Holz (2010, unveröffentlicht) bestimmte eine Reduktion der SDH Aktivität durch Zugabe von Carboxin und diskutiert in ihrer Arbeit ausführlich weitere Möglichkeiten für die Reduktion der SDH Aktivität.

Ein wesentlicher Punkt für die organische Säuresynthese mit Mikroorganismen sind die Plasmamembrantransporter sowie die mitochondrialen Transporter. Für *Y. lipolytica* sind derzeit fünf C<sub>4</sub>-Dicarbonsäure-Plasmamembrantransporter, Mae1p (YALI0E24167g) und vier verschiedene Jen2p-Transporter (YALI0C21406g, YALI0D20108g, YALI0D24607g, YALI0E32901g), beschrieben (Grobler *et al.*, 1995; Lodi *et al.*, 2007). Eine Überexpression dieser Transporter könnte einen positiven Effekt auf die Produktion organischer Säuren

haben. Eine Erhöhung der Malatbildung von *S. cerevisiae* wurde bereits durch die Expression von *MAE1* aus *Schizosaccharomyces (S.) pombe* nachgewiesen (Zelle *et al.*, 2008). *MAE1* kodiert in *S. pombe* eine Permease für C<sub>4</sub>-Dicarbonsäuren und besitzt ein Homologon in *Y. lipolytica*, jedoch nicht in *S. cerevisiae* (Grobler *et al.*, 1995). Die Expression von *MAE1* gekoppelt mit der Überexpression des Malat-Dehydrogenase kodierenden Gens (*MDH3*) und des Pyruvat-Carboxylase kodierenden Gens (*PYC2*) in *S. cerevisiae* führte zu einer weiteren Erhöhung der Malatausbeute (Zelle *et al.*, 2008). Folglich könnten weiterführende Arbeiten einen Einfluss der Überexpression von *MAE1* und *JEN2* auf die Produktion organischer Säuren von *Y. lipolytica* untersuchen.

Der Transport des im TCC synthetisierten Succinats aus dem Mitochondrium in das Cytosol erfolgt in *Y. lipolytica*, vergleichbar mit *S. cerevisiae*, über die Sfc1p- (YALI0E34672p) und Dic1p- (YALI0B03344p) Transporter. Sfc1p wurde als Succinat-Fumarat Carrier in *S. cerevisiae* identifiziert und übernimmt den Transport des im cytosolischen Glyoxylatzyklus synthetisierten Succinats in die Mitochondrien im Austausch gegen Fumarat (Palmieri *et al.*, 1997; Palmieri *et al.*, 2000). Der mitochondriale Dic1p-Transporter überträgt Dicarbonsäuren (z. B. Succinat, Malat) durch die Mitochondrienmembran im Austausch gegen Phosphat (Palmieri *et al.*, 1999). Dieser Carrier ist in die Gluconeogenese durch den Export von Malat aus dem Mitochondrium involviert (Meijer & Van Dam, 1974; Palmieri *et al.*, 2000). Der Dic1p-Transporter (YALI0B03344g) wurde in *Y. lipolytica* als Carrier mit einer hohen Homologie zu der UCP-Familie (uncoupling proteins) identifiziert (Luevano-Martinez *et al.*, 2009). Wahrscheinlich ist dieser Carrier in *Y. lipolytica* in die Abnahme der reaktiven Sauerstoffspezies und/oder in die Reoxidation von NAD(P)H in der stationären Phase involviert (Luevano-Martinez *et al.*, 2009). Es wird vermutet, dass eine Veränderung der UCP-ähnlichen Aktivität die Produktion organischer Säuren beeinflussen könnte (Luevano-Martinez *et al.*, 2009). Dementsprechend wäre es für zukünftige Arbeiten interessant die Auswirkungen einer erhöhten Dic1p-Transporteraktivität auf die Succinatsynthese in *Y. lipolytica* zu untersuchen.

Nachteilig für die industrielle Succinatproduktion mit *Y. lipolytica* ist ebenfalls die lange Kultivierungsdauer von bis zu 500 h. Durch die Optimierung des Mediums sowie die Übertragung der Produktionsprozesse in den Bioreaktor könnte eine deutliche Verkürzung der Kultivierungsdauer erreicht werden.

#### 4.5. Auswirkungen auf die Produktion anderer organischer Säuren

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Auswirkungen der genetischen Veränderungen auf die Bildung anderer organischer Säuren von *Y. lipolytica*.

##### 4.5.1. $\alpha$ -Ketoglutarat-, Pyruvat- und Fumaratproduktion unter Thiaminlimitation

Für die Transformanden H222-AK4 (*scs1::URA3*), H222-AK8 (*scs2::URA3*), H222-AK9 (*scs1::URA3  $\Delta$ scs2*) und H222-AK10 (*mcPYC  $\Delta$ scs2*) wurde eine im Vergleich zu dem Wildtyp H222 veränderte Produktion von  $\alpha$ -Ketoglutarat und Pyruvat während des thiaminlimitierten Wachstums mit Glucose als C-Quelle nachgewiesen. Wohingegen für die Transformanden H222-AK1 (*mcPYC*), H222-AK2 (*mcSCS1 mcSCS2*) und H222-AK3 (*mcPYC mcSCS1 mcSCS2*) eine mit dem Wildtyp vergleichbare Bildung organischer Säuren bestimmt wurde (Tab. 3.3). Ein Vergleich mit der für *Y. lipolytica* beschriebene  $\alpha$ -Ketoglutaratproduktion von 195 g/l während der Fed-Batch Kultivierung mit Alkanen als C-Quelle (Fickers *et al.*, 2005) zeigt, dass die für die konstruierten Transformanden H222-AK1, H222-AK2 und H222-AK3 nachgewiesenen  $\alpha$ -Ketoglutaratmengen von  $19,2 \pm 0,2$  g/l,  $18,1 \pm 5,3$  und  $19,9 \pm 0,4$  g/l deutlich niedriger lagen. Dementsprechend sind die konstruierten Transformanden für eine industrielle  $\alpha$ -Ketoglutaratproduktion ungeeignet.

Für die Transformanden H222-AK8 (*scs2::URA3*), H222-AK9 (*scs1::URA3  $\Delta$ scs2*) und H222-AK10 (*mcPYC  $\Delta$ scs2*) wurden mit  $14,9 \pm 1,4$  g/l,  $11,9 \pm 0,6$  g/l und  $13,2 \pm 2,4$  g/l im Vergleich zu H222 ( $19,7 \pm 3,6$  g/l) und H222-AK4 (*scs1::URA3*;  $19,9 \pm 0,4$  g/l) eine deutlich reduzierte Bildung von  $\alpha$ -Ketoglutarat nachgewiesen. Im Gegensatz zu den Kultivierungen ohne Thiaminlimitation zeigten sich bereits in dem Wachstum der Transformanden, die eine Deletion eines Gens der SCS aufwiesen, im Medium mit Thiaminmangel deutliche Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp H222. Für die Transformanden H222-AK4, H222-AK9 und H222-AK10 wurden höhere OD<sub>600</sub>-Werte gegenüber dem Wildtyp und der Transformande H222-AK8 bestimmt. Das erhöhte Wachstum von H222-AK4, H222-AK9 und H222-AK10, welches mit der OD<sub>600</sub>-Bestimmung nachgewiesen wurde, wurde jedoch nicht durch die anschließende Zellzahlbestimmung bestätigt (Abb. 3.30). Abweichend davon zeigte sich jedoch das Wachstum von H222-AK9, das sowohl erhöhte OD<sub>600</sub>-Werte als auch höhere Zellzahlen im Vergleich zu H222 aufwies. Da ebenfalls für die Hefestämme H222-AK8 und H222-AK10 eine geringere  $\alpha$ -Ketoglutaratmenge bestimmt wurde, war eine

verringerte Produktion vermutlich nicht durch ein erhöhtes Wachstum bedingt. Denkbar wäre, dass durch den Verlust der SCS Aktivität der oxidative TCC bis zu der Succinyl-CoA Synthese verkürzt wurde. Der wahrscheinlichste alternative Weg für die Bildung von Succinat ist der Glyoxylatzyklus. Die Zerstörung der SCS kodierenden Gene resultierte in einer verstärkten ICL Aktivität (Tab. 4.1) des Glyoxylatzyklus und vermutlich in einem Abzug von Isocitrat aus dem TCC. Die eventuell verringerte Isocitratmenge in dem TCC könnte möglicherweise zu einer Senkung der Isocitrat-Dehydrogenase Aktivität geführt haben. Die vermutlich verringerte Isocitrat-Dehydrogenase Aktivität könnte wiederum in einer reduzierten  $\alpha$ -Ketoglutaratmenge resultieren. Um diese Hypothese zu belegen müssten die Isocitrat-Dehydrogenase Aktivitäten während der Kultivierung mit Thiaminmangel bestimmt werden. Überraschend war jedoch die mit dem Wildtyp vergleichbare  $\alpha$ -Ketoglutaratproduktion der Transformante H222-AK4 (*scs1::URA3*). Da den Transformanden H222-AK8 (*scs2::URA3*), H222-AK9 (*scs1::URA3  $\Delta$ scs2*) und H222-AK10 (*mcPYC  $\Delta$ scs2*) eine Deletion des  $\beta$ -Untereinheit der SCS kodierenden Gens gemeinsam war, wurde geschlussfolgert, dass eine reduzierte Bildung von  $\alpha$ -Ketoglutarat möglicherweise durch die Deletion von *SCS2* bedingt ist. Eine mögliche Erklärung für den ausbleibenden Effekt der Deletion von *SCS1* auf die Bildung von  $\alpha$ -Ketoglutarat wäre, dass durch diese Deletion kein vollständiger Verlust der SCS Aktivität erzielt wurde. Da die SCS jedoch ein hochkonserviertes Enzym ist und das katalytische Zentrum der SCS von *E. coli* und *S. cerevisiae* als Teil beider Untereinheiten beschrieben wurde (Pearson & Bridger, 1975b; Nishimura, 1986; Przybyla-Zawislak *et al.*, 1998), resultierte wahrscheinlich auch die Deletion von *SCS1* in einem vollständigen Aktivitätsverlust. Ein endgültiger Beweis wäre jedoch nur durch die Enzymaktivitätsbestimmung der SCS möglich. Denkbar wäre vielmehr, dass die Zerstörung des *SCS2*-ORFs einen indirekten Effekt auf die Bildung organischer Säuren erzeugte.

Ein ebenfalls negativer Effekt des SCS Aktivitätsverlustes wurde auf die Bildung von Pyruvat von H222-AK4 (*scs1::URA3*), H222-AK8 (*scs2::URA3*) und H222-AK9 (*scs1::URA3  $\Delta$ scs2*) bestimmt. Abweichend davon zeigte sich jedoch die Bildung von Pyruvat für H222-AK10 (*mcPYC  $\Delta$ scs2*) mit einer mit dem Wildtyp vergleichbaren Produktion. H222-AK10 unterschied sich von dem Stamm H222-AK8 durch eine zusätzlich erhöhte PYC Aktivität. Folglich ist die mit dem Wildtyp vergleichbare Bildung von Pyruvat eventuell ein synergistischer Effekt der Deletion von *SCS2* und der erhöhten Gen-Dosis von *PYC*.

#### 4.5.2. Citrat- und Isocitratproduktion unter Stickstofflimitation

Da eine Citrat- und Isocitratbildung unter den bisherigen Kultivierungsbedingungen nicht nachgewiesen wurde, erfolgte die Kultivierung der konstruierten Transformanten unter den für die Citrat- und Isocitratbildung geeigneten Bedingungen im stickstofflimitierten Medium mit 10 % Glucose als C-Quelle.

Ein positiver Einfluss auf die Citratproduktion von *Y. lipolytica* während der Kultivierung mit Glucose als C-Quelle wurde jedoch nicht durch die Veränderung der Aktivitäten von PYC oder SCS nachgewiesen. Die untersuchten *Y. lipolytica* Stämme zeigten mit dem Wildtyp vergleichbare Werte von ca. 50 g/l Citrat und ca. 5 g/l Isocitrat. Abweichend davon wurde für H222-AK3 (*mcPYC mcSCS1 mcSCS2*) eine Citratkonzentration von  $26,8 \pm 3,3$  g/l und eine Isocitratkonzentration von  $3,1 \pm 0,4$  g/l bestimmt. Der Stamm H222-AK3 zeigte wie H222-AK2 (*mcSCS1 mcSCS2*) ein deutlich verlangsamtes Wachstum im Vergleich zu H222 während der Kultivierung unter Stickstoffmangel. Das verlangsamte Wachstum wurde vermutlich durch einen Glutamatmangel, resultierend aus der erhöhten SCS Aktivität, verursacht. Dieses Wachstum war im Gegensatz zu H222-AK2 jedoch verbunden mit einer verringerten Säureproduktion. Die beiden Stämme H222-AK2 und H222-AK3 unterschieden sich durch die zusätzlich erhöhte Gen-Dosis von *PYC* in H222-AK3. Jedoch zeigte auch der Hefestamm H222-AK1 (*mcPYC*) mit einer alleinigen erhöhten *PYC* Aktivität eine mit dem Wildtyp vergleichbare Säureproduktion. Dementsprechend wurde die verringerte Säureproduktion als Folge des synergistischen Effektes der erhöhten *PYC* Aktivität mit der gleichzeitigen Erhöhung der Gen-Dosis von *SCS* betrachtet. Wahrscheinlich führte die erhöhte *PYC* Aktivität zu einer verstärkten Zufuhr von Oxalacetat in den TCC sowie in den Glyoxylatzyklus. Der Umsatz der  $C_4$ -Körper ausgehend von Oxalacetat wurde möglicherweise zusätzlich verstärkt durch eine vermutete erhöhte *SCS* Aktivität. Folglich wurde wahrscheinlich durch eine verstärkte Umsetzung von Citrat und Isocitrat im TCC und im Glyoxylatzyklus, deren Sekretion vermindert.

Die mit den konstruierten Transformanten nachgewiesenen höchsten Citratausbeuten von 50 g/l sind nicht konkurrenzfähig mit der höchsten beschriebenen Citratproduktion von 250 g/l für *Y. lipolytica* während der Kultivierung mit Sonnenblumenöl als C-Quelle (Stottmeister & Hoppe, 1991; Kruse *et al.*, 2004; Fickers *et al.*, 2005). Nachteilig für die Citratproduktion mit *Y. lipolytica* ist jedoch die gleichzeitige Bildung von Isocitrat, wobei das Verhältnis Citrat und Isocitrat von der eingesetzten C-Quelle abhängig ist. Ein Verhältnis von

90:10 für Citrat und Isocitrat wurde für *Y. lipolytica* während der Kultivierung mit Glucose, Glycerol oder Ethanol als C-Quelle nachgewiesen. Eine Reduktion der Bildung von Isocitrat von 10-12 % auf unter 3-6 % wurde durch die 12-15-fache Erhöhung der ICL Aktivität während der Kultivierung mit Glucose, Glycerol oder Saccharose als C-Quelle erzielt (Förster *et al.*, 2007b). Die Verschiebung des Verhältnisses von Citrat und Isocitrat zu Gunsten von Citrat wurde ebenfalls für die Transformanden H222-AK1 (*mcPYC*), H222-AK2 (*mcSCS1 mcSCS2*), H222-AK4 (*scs1::URA3*) und H222-AK10 (*mcPYC Δscs2*) nachgewiesen (Tab. 3.5). Für diese Transformanden wurde eine Reduktion der Bildung von Isocitrat auf 7-8 % im Vergleich zu 10 % für den Wildtyp bestimmt.

#### 4.6. Morphologische Veränderungen

Während dieser Arbeit wurden verschiedene Auswirkungen der genetischen Veränderungen auf die Kolonie- und Zellmorphologie der Transformanden beobachtet.

##### 4.6.1. Koloniemorphologie

Die Zerstörung der für die SCS kodierenden Gene zeigte einen Einfluss auf die Koloniemorphologie der Transformande H222-AK9 (*scs1::URA3 Δscs2*). *Y. lipolytica* ist als dimorpher Organismus fähig einzelne Hefezellen, Pseudomyzel als auch Hyphen auszubilden. Der reversible Wechsel zwischen dem einzelligen Wachstum und der Ausbildung mehrzelliger Filamente wird durch eine Vielzahl von Parametern induziert. Die knäulförmigen Kolonien von *Y. lipolytica* wurden auf YPD-Medium mit einer rauen Oberfläche und einem cremefarbenen Farbton beschrieben (Barth & Weber, 1983). Eine mit der Literatur vergleichbare Koloniemorphologie wurde für den Wildtyp H222 und für die konstruierten Transformanden, ausgenommen H222-AK9, nachgewiesen. Die Koloniemorphologie der Transformande H222-AK9, welche die Zerstörung beider Gene der SCS aufwies, zeigte deutliche Unterschiede gegenüber dem Wildtyp. Für die Kolonien dieses Stammes wurde ein glatter Rand, ein mittlerer Bereich mit einer rauen Oberfläche und ein kleinerer Durchmesser verglichen mit den Wildtypkolonien beobachtet. Die mikroskopierten Zellen des Kolonierandes von H222-AK9 zeigten überwiegend Hefezellen neben dem Vorkommen von wenigen Hyphen. Für den mittleren Bereich der Kolonien von H222-AK9 wurden sowohl Hefezellen als auch Hyphen nachgewiesen (Abb. 3.20). Eine mögliche Erklärung des einzelligen Wachstums im Randbereich könnte das vergrößerte

Nährstoffangebot sein. Im Gegensatz dazu herrscht in der Mitte einer Kolonie aufgrund der hohen Zelldichte vermutlich ein Nährstoffmangel, der zum Hyphenwachstum führte. Da jedoch für die Kolonien von H222 sowohl im Randbereich als auch in der Mitte vorwiegend Hyphenwachstum nachgewiesen wurde, wurde ein vergrößertes Nährstoffangebot im Randbereich der Kolonie als Ursache für die veränderte Morphologie ausgeschlossen. Vielmehr deutete der glatte Randbereich, verursacht durch überwiegend einzelliges Wachstum, sowie das verstärkte Auftreten von Einzelzellen im mittleren Bereich der H222-AK9 Kolonien auf eine Beeinträchtigung des Hefe-Hyphen-Überganges hin. Dieser Übergang wird durch innere und äußere Signale gesteuert und über spezifische konservierte Signalketten und Transkriptionsfaktoren realisiert. Als hauptsächlich verantwortlich für den Hefe-Hyphen Übergang in *Y. lipolytica* wurde der Ras2p-Adenylat CyclaseWeg identifiziert (Richard *et al.*, 2001). Dieser Weg beinhaltet die Signalübertragung durch das Ras2-Protein verbunden mit der Aktivierung der Adenylat-Cyclase, welche cAMP bildet. cAMP aktiviert seinerseits die Proteinkinase A. Die Proteinkinase A übernimmt unter anderem die Regulation der Aktivität von Enzymen oder Transkriptionsfaktoren des Hefe-Hyphen Überganges (Richard *et al.*, 2001). Der genaue Vorgang des Hefen-Hyphen Überganges in *Y. lipolytica* wurde bisher nicht vollkommen aufgeklärt. Neben den Mitgliedern des cAMP-Weges *RAS2* und *CDC25* wurde das Gen *HOY1* als wichtig für die Differenzierung identifiziert (Torres-Guzman & Dominguez, 1997). *HOY1* wies in seinem Promotor vier Kopien des Stressantwortelementes CCCCT auf, dessen Deletion zu einer Aufhebung der Hyphenform führte. Ein Hinweis darauf, dass der Übergang von der Hefenform in die Hyphenform möglicherweise durch die Untereinheiten der SCS beeinflusst wird, wurde durch die veränderte Kolonimorphologie der Transformante H222-AK9 gegeben. Diese Veränderung wurde jedoch nur für die gleichzeitige Deletion der Gene der  $\alpha$ - und der  $\beta$ -Untereinheit der SCS nachgewiesen und nicht durch die alleinige Deletion eines der Gene. Folglich besitzt möglicherweise jede Untereinheit für sich eine vergleichbare regulatorische Eigenschaft. Dass Proteine des TCC verschiedene Funktionen aufweisen, ist nicht ungewöhnlich. Die NAD-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase beispielsweise übt neben der Umsetzung von Isocitrat zu  $\alpha$ -Ketoglutarat ebenfalls einen Einfluss auf die Expression von mitochondrial kodierten Proteinen aus (Elzinga *et al.*, 1993). Durch die entsprechenden Datenbankanalysen wurde jedoch weder für das Protein der  $\alpha$ - noch für das Protein der  $\beta$ -Untereinheit der SCS eine regulatorische Domäne identifiziert (<http://www.expasy.org/tools/scanprosite/>). Folglich wäre ein indirekter Effekt der Zerstörung der beiden Gene der SCS auf den Hefen-Hyphen Übergang denkbar. Der verstärkte Dimorphismus von H222-AK9 wurde jedoch nur während

der Kultivierung auf YPD-Platten beobachtet. Eine Kultivierung in YPD-Flüssigmedium zeigte hingegen eine mit dem Wildtyp vergleichbare Zellmorphologie.

#### 4.6.2. Zellmorphologie

Neben der Kolonimorphologie wurde ebenfalls die Zellmorphologie während des Wachstums in YPD-Flüssigmedium untersucht.

Die Transformanden H222-AK1 (*mcPYC*), H222-AK3 (*mcPYC mcSCS1 mcSCS2*) und H222-AK10 (*mcPYC  $\Delta$ scs2*) die eine erhöhte *PYC*-Gen-Dosis gemeinsam hatten, zeigten eine im Vergleich zum dem Wildtyp veränderte Zellmorphologie, wobei die Kolonimorphologien dieser Transformanden keine Auffälligkeiten zeigten. Die Mikroskopie der Zellen von H222-AK1, H222-AK3 und H222-AK10 zeigte einen erhöhten Anteil von Pseudohyphen, wohingegen H222 nur ganz vereinzelt Pseudohyphen aufwies (Abb. 2.21). Als dimorpher Organismus wird in *Y. lipolytica* die Pseudohyphenbildung durch einen Nährstoffmangel im Medium induziert. Dementsprechend wurde vermutet, dass durch die erhöhte Aktivität der biotinabhängigen Pyruvat-Carboxylase ein Biotinmangel entstand. Diese Behauptung wurde jedoch durch die Zugabe von Biotin (250  $\mu$ g/l; 500  $\mu$ g/l; 1mg/l) in das Medium nicht bestätigt, da diese Zellen ebenfalls vermehrt Pseudohyphen ausbildeten. Jedoch könnte ein Biotinmangel trotz Zugabe von Biotin entstehen, wenn keine Biotintransporter vorhanden sind. *S. cerevisiae* weist den H<sup>+</sup>/Biotin Symporter Vht1p auf (Stolz *et al.*, 1999). Eine 59 %ige Homologie zu diesem *S. cerevisiae* Plasmamembrantransporter zeigt das *Y. lipolytica* Protein YALI0F13607p. Daher wird auch in *Y. lipolytica* das Vorhandensein eines Biotintransporters vermutet. Folglich wurde ein Biotinmangel als Ursache für die Pseudohyphenbildung als unwahrscheinlich betrachtet. Die *PYC* Aktivität zeigt außerdem eine Abhängigkeit vom Mg<sup>2+</sup>-, ATP- und Acetyl-CoA-Angebot (Utter & Keech, 1963), wodurch ebenfalls ein Mangel dieser Co-Substrate als Ursache einer Ausbildung von Pseudohyphen denkbar wäre. Diese Hypothese muss jedoch in weiterführenden Arbeiten überprüft werden.

Ein Einfluss der Morphologieveränderungen auf die Succinatproduktion von *Y. lipolytica* wurde nicht nachgewiesen. Für die Transformande H222-AK9 (*scs1::URA3  $\Delta$ scs2*), welche eine veränderte Kolonimorphologie aufwies (Abb. 3.20), wurde eine mit dem Wildtyp (5,1  $\pm$  0,7 g/l) vergleichbare Succinatausbeute von 3,8  $\pm$  0,5 g/l bestimmt. Ebenfalls wurde für die Transformande H222-AK1 (*mcPYC*) mit einer verstärkten Pseudohyphenbildung während der Kultivierung in Flüssigmedium eine Succinatausbeute von 5,2  $\pm$  0,6 g/l nachgewiesen.

Eine verstärkte Bildung von Pseudohyphen während des Wachstums in Flüssigmedium wurde auch für die Stämme H222-AK3 (*mcPYC mcSCS1 mcSCS2*) und H222-AK10 (*mcPYC Δscs2*) beobachtet (Abb. 3.21). H222-AK3 ( $3,1 \pm 0,3$  g/l) sekretierte jedoch im Vergleich zu H222 geringere Succinatmengen in das extrazelluläre Medium. Für die Transformante H222-AK2 (*mcSCS1 mcSCS2*) wurde eine mit H222-AK3 vergleichbare geringe Succinatausbeute von  $2,8 \pm 0,4$  g/l nachgewiesen. Den Transformanden H222-AK2 und H222-AK3 war eine erhöhte Gen-Dosis von *SCS1* und *SCS2* sowie ein verlangsamtes Wachstum während der Kultivierung im Succinatproduktionsmedium gemeinsam. Folglich wurde die verringerte Succinatproduktion von H222-AK3 durch das verlangsamte Wachstum und nicht durch die verstärkte Bildung von Pseudohyphen verursacht. Im Gegensatz zu H222-AK3 wurde für H222-AK10 eine gesteigerte Succinatbildung von  $8,7 \pm 1,6$  g/l nachgewiesen (Tab. 3.1). Dementsprechend wurde die erhöhte Succinatproduktion von H222-AK10 als Folge der verstärkten Pseudohyphenbildung als unwahrscheinlich betrachtet. Vermutlich wurde die erhöhte Succinatproduktion durch den synergistischen Effekt der gesteigerten PYC Aktivität und der Deletion von *SCS2* verursacht.

**Literaturverzeichnis**

- Abdrakhmanova, A., Zickermann, V., Bostina, M., Radermacher, M., Schagger, H., Kerscher, S. & Brandt, U. (2004) Subunit composition of mitochondrial complex I from the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochim Biophys Acta* 1658(1-2), 145-156.
- Ackrell, B.A., Kearney, E.B. & Singer, T.P. (1978) Mammalian succinate dehydrogenase. *Methods Enzymol* 53, 466-83.
- Akiyama, S., Suzuki, T., Sumino, Y., Nakao, Y. & Fukuda, H. (1973) Induction and citric acid productivity of fluoroacetate-sensitive mutant strains of *Candida lipolytica*. *Agr Biol Chem* 37, 879-884.
- Alarcon, C., Wicksteed, B., Prentki, M., Corkey, B.E. & Rhodes, C.J. (2002) Succinate is a preferential metabolic stimulus-coupling signal for glucose-induced proinsulin biosynthesis translation. *Diabetes* 51(8), 2496-504.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25(17), 3389-402.
- Anfinsen, C. (1955) Aconitase from pig heart muscle. Colowick SP, Kaplan NO (eds) *Methods in enzymology*. Academic Press, New York London 1, 645-698.
- Arikawa, Y., Kobayashi, M., Kodaira, R., Shimosaka, M., Muratsubaki, H., Enomoto, K. & Okazaki, M. (1999) Isolation of sake yeast strains possessing various levels of succinate- and/or malate-producing abilities by gene disruption or mutation. *J Biosci Bioeng* 87(3), 333-9.
- Ball, D.J. & Nishimura, J.S. (1980) Affinity chromatography and affinity labeling of rat liver succinyl-CoA synthetase. *J Biol Chem* 255(22), 10805-12.
- Barns, S.M., Lane, D.J., Sogin, M.L., Bibeau, C. & Weisburg, W.G. (1991) Evolutionary relationships among pathogenic *Candida* species and relatives. *J Bacteriol* 173(7), 2250-5.
- Barth, G., Beckerich, J.M., Dominguez, A., Kerscher, S., Ogrydziak, D., Titorenko, V. & Gaillardin, C. (2003) Functional genetics of *Yarrowia lipolytica*. de Winde, J. H. und S. Hohmann, *Functional Genetics of Industrial Yeasts*, Berlin Heidelberg New York, 313-388.
- Barth, G. & Gaillardin, C. (1996) *Yarrowia lipolytica*. Wolf, K. (ed.) *Nonconventional yeasts in biotechnology*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 313-388.
- Barth, G. & Gaillardin, C. (1997) Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol Rev* 19(4), 219-37.
- Barth, G. & Weber, H. (1983) Genetic studies on the yeast *Saccharomycopsis lipolytica*. Inactivation and mutagenesis. *Z Allg Mikrobiol* 23(3), 147-57.
- Barth, G. & Weber, H. (1985) Improvement of sporulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 51(2), 167-77.
- Bauer, J., Luttkik, M.A., Flores, C.L., van Dijken, J.P., Pronk, J.T. & Niederberger, P. (1999) By-product formation during exposure of respiring *Saccharomyces cerevisiae* cultures to excess glucose is not caused by a limited capacity of pyruvate carboxylase. *FEMS Microbiol Lett* 179(1), 107-13.
- Birney, M., Um, H. & Klein, C. (1997) Multiple levels of regulation of *Escherichia coli* succinyl-CoA synthetase. *Arch Biochem Biophys* 347(1), 103-12.
- Birney, M., Um, H.D. & Klein, C. (1996) Novel mechanisms of *Escherichia coli* succinyl-coenzyme A synthetase regulation. *J Bacteriol* 178(10), 2883-9.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-54.
- Brandt, U., Abdrakhmanova, A., Zickermann, V., Galkin, A., Drose, S., Zwicker, K. & Kerscher, S. (2005) Structure-function relationships in mitochondrial complex I of the strictly aerobic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochem Soc Trans* 33(Pt 4), 840-4.
- Branson, J.P. & Attwood, P.V. (2000) Effects of Mg(2+) on the pre-steady-state kinetics of the biotin carboxylation reaction of pyruvate carboxylase. *Biochemistry* 39(25), 7480-91.
- Brewster, N.K., Val, D.L., Walker, M.E. & Wallace, J.C. (1994) Regulation of pyruvate carboxylase isozyme (PYC1, PYC2) gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentative and nonfermentative growth. *Arch Biochem Biophys* 311(1), 62-71.

- Brown, J.P. & Perham, R.N. (1976) Selective inactivation of the transacylase components of the 2-oxo acid dehydrogenase multienzyme complexes of *Escherichia coli*. *Biochem J* 155(2), 419-27.
- Bullis, B.L. & Lemire, B.D. (1994) Isolation and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* *SDH4* gene encoding a membrane anchor subunit of succinate dehydrogenase. *J Biol Chem* 269(9), 6543-9.
- Casaregola, S., Neuveglise, C., Lepingle, A., Bon, E., Feynerol, C., Artiguenave, F., Wincker, P. & Gaillardin, C. (2000) Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 17. *Yarrowia lipolytica*. *FEBS Lett* 487(1), 95-100.
- Cazzulo, J.J., Claisse, L.M. & Stoppani, A.O. (1968) Carboxylase levels and carbon dioxide fixation in baker's yeast. *J Bacteriol* 96(3), 623-8.
- Cha, S. & Parks, R.E., Jr. (1964) Succinic Thiokinase. I. Purification of the Enzyme from Pig Heart. *J Biol Chem* 239, 1961-7.
- Chapman, K.B., Solomon, S.D. & Boeke, J.D. (1992) *SDH1*, the gene encoding the succinate dehydrogenase flavoprotein subunit from *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 118(1), 131-6.
- Chatterjee, R., Millard, C.S., Champion, K., Clark, D.P. & Donnelly, M.I. (2001) Mutation of the *ptsG* gene results in increased production of succinate in fermentation of glucose by *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 67(1), 148-54.
- Chaves, R.S., Herrero, P., Ordiz, I., Angeles del Brio, M. & Moreno, F. (1997) Isocitrate lyase localisation in *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Gene* 198(1-2), 165-9.
- Cheon, S.A., Han, E.J., Kang, H.A., Ogrydziak, D.M. & Kim, J.Y. (2003) Isolation and characterization of the *TRP1* gene from the yeast *Yarrowia lipolytica* and multiple gene disruption using a *TRP* blaster. *Yeast* 20(8), 677-85.
- Chernyavskaya, O.G., Shishkanova, N.V., Il'chenko, A.P. & Finogenova, T.V. (2000) Synthesis of alpha-ketoglutaric acid by *Yarrowia lipolytica* yeast grown on ethanol. *Appl Microbiol Biotechnol* 53(2), 152-8.
- Clare, J.J., Davidow, L.S., Gardner, D.C. & Oliver, S.G. (1986) Cloning and characterisation of the ribosomal RNA genes of the dimorphic yeast, *Yarrowia lipolytica*. *Curr Genet* 10(6), 449-52.
- Claros, M.G. & Vincens, P. (1996) Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur J Biochem* 241(3), 779-86.
- Cupp, J.R. & McAlister-Henn, L. (1991) NAD(+)-dependent isocitrate dehydrogenase. Cloning, nucleotide sequence, and disruption of the *IDH2* gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 266(33), 22199-205.
- Cupp, J.R. & McAlister-Henn, L. (1992) Cloning and characterization of the gene encoding the *IDH1* subunit of NAD(+)-dependent isocitrate dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 267(23), 16417-23.
- Daignan-Fornier, B., Valens, M., Lemire, B.D. & Bolotin-Fukuhara, M. (1994) Structure and regulation of *SDH3*, the yeast gene encoding the cytochrome b560 subunit of respiratory complex II. *J Biol Chem* 269(22), 15469-72.
- Davis, W.L., Jones, R.G., Farmer, G.R., Dickerson, T., Cortinas, E., Cooper, O.J., Crawford, L. & Goodman, D.B. (1990) Identification of glyoxylate cycle enzymes in chick liver-the effect of vitamin D3: cytochemistry and biochemistry. *Anat Rec* 227(3), 271-84.
- Dixon, H.G. & Kornberg, H.L. (1959) Assay methods for key enzymes of the glyoxylate cycle. *Biochem* 72, 3-6.
- Doenecke, D., Koolman, J., Fuchs, G. & Gerok, W. (2005) *Kerlsons Biochemie und Pathobiochemie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 15. Auflage.
- Donnelly, M.I., Millard, C.S., Clark, D.P., Chen, M.J. & Rathke, J.W. (1998) A novel fermentation pathway in an *Escherichia coli* mutant producing succinic acid, acetic acid, and ethanol. *Appl Biochem Biotechnol* 70-72, 187-98.

- Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., Durrens, P., Casaregola, S., Lafontaine, I., De Montigny, J., Marck, C., Neuveglise, C., Talla, E., Goffard, N., Frangeul, L., Aigle, M., Anthouard, V., Babour, A., Barbe, V., Barnay, S., Blanchin, S., Beckerich, J.M., Beyne, E., Bleykasten, C., Boisrame, A., Boyer, J., Cattolico, L., Confanioleri, F., De Daruvar, A., Despons, L., Fabre, E., Fairhead, C., Ferry-Dumazet, H., Groppi, A., Hantraye, F., Hennequin, C., Jauniaux, N., Joyet, P., Kachouri, R., Kerrest, A., Koszul, R., Lemaire, M., Lesur, I., Ma, L., Muller, H., Nicaud, J.M., Nikolski, M., Oztas, S., Ozier-Kalogeropoulos, O., Pellenz, S., Potier, S., Richard, G.F., Straub, M.L., Suleau, A., Swennen, D., Tekaia, F., Wesolowski-Louvel, M., Westhof, E., Wirth, B., Zeniou-Meyer, M., Zivanovic, I., Bolotin-Fukuhara, M., Thierry, A., Bouchier, C., Caudron, B., Scarpelli, C., Gaillardin, C., Weissenbach, J., Wincker, P. & Souciet, J.L. (2004) Genome evolution in yeasts. *Nature* 430(6995), 35-44.
- Elzinga, S.D., Bednarz, A.L., van Oosterum, K., Dekker, P.J. & Grivell, L.A. (1993) Yeast mitochondrial NAD(+)-dependent isocitrate dehydrogenase is an RNA-binding protein. *Nucleic Acids Res* 21(23), 5328-31.
- Ermakova, I.T. & Finogenova, T.V. (1971) [Participation of the glyoxylate cycle in metabolism of the alkane-oxidizing yeast *Candida lipolytica* during biosynthesis of alpha-ketoglutaric acid]. *Mikrobiologiya* 40(2), 223-6.
- Ermakova, I.T., Shishkanova, N.V., Melnikova, O.F. & Finogenova, T.V. (1986) Properties of *Candida lipolytica* mutants with the modified glyoxylate cycle and their ability to produce citric and isocitric acid. I. Physiological, biochemical and cytological characteristics of mutants grown on glucose or hexadecane. *Appl Microbiol Biotechnol* 23, 372-377.
- Fickers, P., Benetti, P.H., Wache, Y., Marty, A., Mauersberger, S., Smit, M.S. & Nicaud, J.M. (2005) Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS Yeast Res* 5(6-7), 527-43.
- Fickers, P., Le Dall, M.T., Gaillardin, C., Thonart, P. & Nicaud, J.M. (2003) New disruption cassettes for rapid gene disruption and marker rescue in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Microbiol Methods* 55(3), 727-37.
- Finogenova, T.V., Morgunov, I.G., Kamzolova, S.V. & Cherniavskaia, O.G. (2005) [Organic acid production by the yeast *Yarrowia lipolytica* (a review)]. *Prikl Biokhim Mikrobiol* 41(5), 478-86.
- Finogenova, T.V., Shishkanova, N.V., Ermakova, I.T. & Kataeva, I.A. (1986) Properties of *Candida lipolytica* mutants with the modified glyoxylate cycle and their ability to produce citric and isocitric acid. II. Synthesis of citric and isocitric by *Candida lipolytica* mutants and peculiarities of their enzyme systems. *Appl Biochem Biotechnol* 23, 378-383.
- Fleck, C.B. & Brock, M. (2009) Re-characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* Ach1p: fungal CoA-transferases are involved in acetic acid detoxification. *Fungal Genet Biol* 46(6-7), 473-85.
- Flores, C.L. & Gancedo, C. (2005) *Yarrowia lipolytica* mutants devoid of pyruvate carboxylase activity show an unusual growth phenotype. *Eukaryot Cell* 4(2), 356-64.
- Förster, A., Aurich, A., Mauersberger, S. & Barth, G. (2007a) Citric acid production from sucrose using a recombinant strain of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl Microbiol Biotechnol* 75(6), 1409-17.
- Förster, A., Jacobs, K., Juretzek, T., Mauersberger, S. & Barth, G. (2007b) Overexpression of the *ICLI* gene changes the product ratio of citric acid production by *Yarrowia lipolytica*. *Appl Microbiol Biotechnol* 77(4), 861-9.
- Franke-Rinker, D., Behrens, U. & Nockel, E. (1983) [Enzymatic study of citrate-isocitrate accumulation in yeast with glucose as the carbon source]. *Z Allg Mikrobiol* 23(2), 75-80.
- Gangloff, S.P., Marguet, D. & Lauquin, G.J. (1990) Molecular cloning of the yeast mitochondrial aconitase gene (*ACO1*) and evidence of a synergistic regulation of expression by glucose plus glutamate. *Mol Cell Biol* 10(7), 3551-61.
- Gellissen, G., Kunze, G., Gaillardin, C., Cregg, J.M., Berardi, E., Veenhuis, M. & van der Klei, I. (2005) New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adenivorans* and *Yarrowia lipolytica* - a comparison. *FEMS Yeast Res* 5(11), 1079-96.
- Genda, T., Watabe, S. & Ozaki, H. (2006) Purification and characterization of fumarase from *Corynebacterium glutamicum*. *Biosci Biotechnol Biochem* 70(5), 1102-9.

- Gerber, J. (1999) Untersuchungen zur Optimierung des Elektronentransportsystems für die Cytochrom P450 katalysierte Biotransformation von Steroiden in *Yarrowia lipolytica*. Diplomarbeit, Technische Universität Dresden.
- Gibson, J., Upper, C.D. & Gunsalus, I.C. (1967) Succinyl coenzyme A synthetase from *Escherichia coli*. I. Purification and properties. *J Biol Chem* 242(10), 2474-7.
- Glassner, D.A. & Datta, R. (1992) Process for the production and purification of succinic acid. US Patent 5 143 834.
- Grobler, J., Bauer, F., Subden, R.E. & Van Vuuren, H.J. (1995) The *mael* gene of *Schizosaccharomyces pombe* encodes a permease for malate and other C4 dicarboxylic acids. *Yeast* 11(15), 1485-91.
- Guerreiro, P. & Rodrigues-Pousada, C. (2001) Disruption and phenotypic analysis of six open reading frames from chromosome VII of *Saccharomyces cerevisiae* reveals one essential gene. *Yeast* 18(9), 781-7.
- Guettler, M.V., Jain, M.K. & Rumler, D. (1996) Method for making succinic acid, bacterial variants for use in the process, and methods for obtaining variants. US Patent 5 573 931.
- Guettler, M.V., Rumler, D. & Jain, M.K. (1999) *Actinobacillus succinogenes* sp. nov., a novel succinic-acid-producing strain from the bovine rumen. *Int J Syst Bacteriol* 49 Pt 1, 207-16.
- Hao, H.X., Khalimonchuk, O., Schraders, M., Dephoure, N., Bayley, J.P., Kunst, H., Devilee, P., Cremers, C.W., Schiffman, J.D., Bentz, B.G., Gygi, S.P., Winge, D.R., Kremer, H. & Rutter, J. (2009) *SDH5*, a gene required for flavination of succinate dehydrogenase, is mutated in paraganglioma. *Science* 325(5944), 1139-42.
- Haselbeck, R.J. & McAlister-Henn, L. (1991) Isolation, nucleotide sequence, and disruption of the *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding mitochondrial NADP(H)-specific isocitrate dehydrogenase. *J Biol Chem* 266(4), 2339-45.
- Heslot, H. (1990) Genetics and genetic engineering of the industrial yeast *Yarrowia lipolytica*. *Adv Biochem Eng/Biotechnol* 43, 43-73
- Hift, H., Ouellet, L., Littlefield, J.W. & Sanadi, D.R. (1953) Alpha-Ketoglutaric dehydrogenase. IV. Coupled phosphorylation. *J Biol Chem* 204(2), 565-75.
- Hill, R. & Bradshaw, R. (1969) Fumarase. *Methods in enzymology*. Academic Press, New York London 13, 91-99.
- Hoffman, C.S. & Winston, F. (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* 57(2-3), 267-72.
- Holz, M. (2010) Dissertation. (in Vorbereitung), Technische Universität Dresden
- Holz, M., Förster, A., Mauersberger, S. & Barth, G. (2009) Aconitase overexpression changes the product ratio of citric acid production by *Yarrowia lipolytica*. *Appl Microbiol Biotechnol* 81(6), 1087-96.
- Huet, C., Menendez, J., Gancedo, C. & Francois, J.M. (2000) Regulation of *pyc1* encoding pyruvate carboxylase isozyme I by nitrogen sources in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 267(23), 6817-23.
- Jenkins, T.M. & Weitzman, P.D. (1986) Distinct physiological roles of animal succinate thiokinases. Association of guanine nucleotide-linked succinate thiokinase with ketone body utilization. *FEBS Lett* 205(2), 215-8.
- Jenkins, T.M. & Weitzman, P.D. (1988) Physiological roles of animal succinate thiokinases. Specific association of the guanine nucleotide-linked enzyme with haem biosynthesis. *FEBS Lett* 230(1-2), 6-8.
- Juretzek, T., Le Dall, M., Mauersberger, S., Gaillardin, C., Barth, G. & Nicaud, J. (2001) Vectors for gene expression and amplification in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* 18(2), 97-113.
- Kamzolova, S.V., Yusupova, A.I., Dedyukhina, E.G., Chistyakova, T.I., Kozyreva, T.M. & Morgunov, I.G. (2009) Succinic Acid Synthesis by Ethanol-Grown Yeasts. *Food Technol. Biotechnol.* 47(2), 144-152.
- Kawachi, H., Atomi, H., Ueda, M., Hashimoto, N., Kobayashi, K., Yoshida, T., Kamasawa, N., Osumi, M. & Tanaka, A. (1996) Individual expression of *Candida tropicalis* peroxisomal and mitochondrial carnitine acetyltransferase-encoding genes and subcellular localization of the products in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biochem* 120(4), 731-5.

- Kerscher, S., Grgic, L., Garofano, A. & Brandt, U. (2004) Application of the yeast *Yarrowia lipolytica* as a model to analyse human pathogenic mutations in mitochondrial complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase). *Biochim Biophys Acta* 1659(2-3), 197-205.
- Kim, M.I., Kim, N.J., Shang, L., Chang, Y.K., Lee, S.Y. & Chang, H.N. (2009) Continuous production of succinic Acid using an external membrane cell recycle system. *J Microbiol Biotechnol* 19(11), 1369-73.
- Kitto, G.B. (1969) Intra- and extramitochondrial malate dehydrogenases from chicken and tuna heart. *Methods Enzymol* 13, 106-116.
- Kruse, K., Förster, A., Juretzek, T., Mauersberger, S. & Barth, G. (2004) Verfahren zur biotechnologischen Herstellung von Citronensäure mit einer genetisch veränderten Hefe *Yarrowia lipolytica*. Deutschland. DE10333144A1.
- Kubo, Y., Takagi, H. & Nakamori, S. (2000) Effect of gene disruption of succinate dehydrogenase on succinate production in a sake yeast strain. *J Biosci Bioeng* 90(6), 619-24.
- Kurtzman, C.P. & Robnett, C.J. (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73(4), 331-71.
- Lanciotti, R., Gianotti, A., Baldi, D., Angrisani, R., Suzzi, G., Mastrocola, D. & Guerzoni, M.E. (2005) Use of *Yarrowia lipolytica* strains for the treatment of olive mill wastewater. *Bioresour Technol* 96(3), 317-22.
- Le Dall, M.T., Nicaud, J.M. & Gaillardin, C. (1994) Multiple-copy integration in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Curr Genet* 26(1), 38-44.
- Lee, F.J., Lin, L.W. & Smith, J.A. (1990) A glucose-repressible gene encodes acetyl-CoA hydrolase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 265(13), 7413-8.
- Lin, H., Bennett, G.N. & San, K.Y. (2005) Metabolic engineering of aerobic succinate production systems in *Escherichia coli* to improve process productivity and achieve the maximum theoretical succinate yield. *Metab Eng* 7(2), 116-27.
- Lodi, T., Diffels, J., Goffeau, A. & Baret, P.V. (2007) Evolution of the carboxylate Jen transporters in fungi. *FEMS Yeast Res* 7(5), 646-56.
- Lombardo, A., Carine, K. & Scheffler, I.E. (1990) Cloning and characterization of the iron-sulfur subunit gene of succinate dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 265(18), 10419-23.
- Luevano-Martinez, L.A., Moyano, E., de Lacoba, M.G., Rial, E. & Uribe-Carvajal, S. (2009) Identification of the mitochondrial carrier that provides *Yarrowia lipolytica* with a fatty acid-induced and nucleotide-sensitive uncoupling protein-like activity. *Biochim Biophys Acta*.
- Madzak, C., Gaillardin, C. & Beckerich, J.M. (2004) Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review. *J Biotechnol* 109(1-2), 63-81.
- Madzak, C., Nicaud, J.M. & Gaillardin, C. (2005) *Yarrowia lipolytica*. Production of recombinant proteins. Novel microbial and eukaryotic expression systems. Gelissen, G., Weinheim. Wiley-VCH, , 163-189.
- Maeting, I., Schmidt, G., Sahn, H., Revuelta, J.L., Stierhof, Y.D. & Stahmann, K.P. (1999) Isocitrate lyase of *Ashbya gossypii*-transcriptional regulation and peroxisomal localization. *FEBS Lett* 444(1), 15-21.
- Majumdar, R., Guest, J.R. & Bridger, W.A. (1991) Functional consequences of substitution of the active site (phospho)histidine residue of *Escherichia coli* succinyl-CoA synthetase. *Biochim Biophys Acta* 1076(1), 86-90.
- Mann, C.J., Mitchell, T. & Nishimura, J.S. (1991) Phosphorylation and formation of hybrid enzyme species test the "half of sites" reactivity of *Escherichia coli* succinyl-CoA synthetase. *Biochemistry* 30(6), 1497-503.
- Matoba, S., Morano, K.A., Klionsky, D.J., Kim, K. & Ogrzydziak, D.M. (1997) Dipeptidyl aminopeptidase processing and biosynthesis of alkaline extracellular protease from *Yarrowia lipolytica*. *Microbiology* 143 ( Pt 10), 3263-72.
- Matsuoka, Y. & Srere, P.A. (1973) Kinetic studies of citrate synthase from rat kidney and rat brain. *J Biol Chem* 248(23), 8022-30.

- Mauersberger, S. & Nicaud, J. (2003) Tagging of genes by insertional mutagenesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*. In Wolf, K., Breunig, K. und Barth, G. (ed.) Non-conventional yeasts in genetics, biochemistry and biotechnology. Practical protocols. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 343-356.
- Mauersberger, S., Ohkuma, M., Schunck, W.H. & Takagi, M. (1996) *Candida maltosa*. In Wolf, K. (ed.) Nonconventional yeasts in biotechnology: A handbook. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 411-580.
- Mauersberger, S., Wang, H.J., Gaillardin, C., Barth, G. & Nicaud, J.M. (2001) Insertional mutagenesis in the n-alkane-assimilating yeast *Yarrowia lipolytica*: generation of tagged mutations in genes involved in hydrophobic substrate utilization. J Bacteriol 183(17), 5102-9.
- Mayer, F., Wallace, J.C. & Keech, D.B. (1980) Further electron microscope studies on pyruvate carboxylase. Eur J Biochem 112(2), 265-72.
- McAlister-Henn, L. & Small, W.C. (1997) Molecular genetics of yeast TCA cycle isozymes. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 57, 317-39.
- McAlister-Henn, L. & Thompson, L.M. (1987) Isolation and expression of the gene encoding yeast mitochondrial malate dehydrogenase. J Bacteriol 169(11), 5157-66.
- McCammon, M.T., Epstein, C.B., Przybyla-Zawislak, B., McAlister-Henn, L. & Butow, R.A. (2003) Global transcription analysis of Krebs tricarboxylic acid cycle mutants reveals an alternating pattern of gene expression and effects on hypoxic and oxidative genes. Mol Biol Cell 14(3), 958-72.
- McKinlay, J.B., Vieille, C. & Zeikus, J.G. (2007) Prospects for a bio-based succinate industry. Appl Microbiol Biotechnol 76(4), 727-40.
- Meijer, A.J. & Van Dam, K. (1974) The metabolic significance of anion transport in mitochondria. Biochim Biophys Acta 346(3-4), 213-44.
- Morgunov, I.G., Solodovnikova, N.Y., Sharyshev, A.A., Kamzolova, S.V. & Finogenova, T.V. (2004) Regulation of NAD(+)-dependent isocitrate dehydrogenase in the citrate producing yeast *Yarrowia lipolytica*. Biochemistry (Mosc) 69(12), 1391-8.
- Morris, C.P., Lim, F. & Wallace, J.C. (1987) Yeast pyruvate carboxylase: gene isolation. Biochem Biophys Res Commun 145(1), 390-6.
- Neuberger, G., Maurer-Stroh, S., Eisenhaber, B., Hartig, A. & Eisenhaber, F. (2003) Prediction of peroxisomal targeting signal 1 containing proteins from amino acid sequence. J Mol Biol 328(3), 581-92.
- Nghiem, N.P., Donnelly, M.I., Millard, C.S. & Stols, L. (1999) Method for the production of decarboxylic acids. U.S. patent 5,869,301.
- Nicaud, J.M., Madzak, C., van den Broek, P., Gysler, C., Duboc, P., Niederberger, P. & Gaillardin, C. (2002) Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia lipolytica*. FEMS Yeast Res 2(3), 371-9.
- Nishimura, J.S. (1986) Succinyl-CoA synthetase structure-function relationships and other considerations. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol 58, 141-72.
- Ohkuma, M., Hwang, C.W., Masuda, Y., Nishida, H., Sugiyama, J., Ohta, A. & Takagi, M. (1993) Evolutionary position of n-alkane-assimilating yeast *Candida maltosa* shown by nucleotide sequence of small-subunit ribosomal RNA gene. Biosci Biotechnol Biochem 57(10), 1793-4.
- Okino, S., Inui, M. & Yukawa, H. (2005) Production of organic acids by *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation. Appl Microbiol Biotechnol 68(4), 475-80.
- Okino, S., Noburyu, R., Suda, M., Jojima, T., Inui, M. & Yukawa, H. (2008) An efficient succinic acid production process in a metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* strain. Appl Microbiol Biotechnol 81(3), 459-64.
- Osmani, S.A., Mayer, F., Marston, F.A., Selmes, I.P. & Scrutton, M.C. (1984) Pyruvate carboxylase from *Aspergillus nidulans*. Effects of regulatory modifiers on the structure of the enzyme. Eur J Biochem 139(3), 509-18.
- Palmieri, L., Lasorsa, F.M., De Palma, A., Palmieri, F., Runswick, M.J. & Walker, J.E. (1997) Identification of the yeast *ACRI* gene product as a succinate-fumarate transporter essential for growth on ethanol or acetate. FEBS Lett 417(1), 114-8.
- Palmieri, L., Runswick, M.J., Fiermonte, G., Walker, J.E. & Palmieri, F. (2000) Yeast mitochondrial carriers: bacterial expression, biochemical identification and metabolic significance. J Bioenerg Biomembr 32(1), 67-77.

- Palmieri, L., Vozza, A., Honlinger, A., Dietmeier, K., Palmisano, A., Zara, V. & Palmieri, F. (1999) The mitochondrial dicarboxylate carrier is essential for the growth of *Saccharomyces cerevisiae* on ethanol or acetate as the sole carbon source. *Mol Microbiol* 31(2), 569-77.
- Papanikolaou, S., Muniglia, L., Chevalot, I., Aggelis, G. & Marc, I. (2002) *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. *J Appl Microbiol* 92(4), 737-44.
- Pearson, P.H. & Bridger, W.A. (1975a) Catalysis of a step of the overall reaction by the alpha subunit of *Escherichia coli* succinyl coenzyme A synthetase. *J Biol Chem* 250(21), 8524-9.
- Pearson, P.H. & Bridger, W.A. (1975b) Isolation of the alpha and beta subunits of *Escherichia coli* succinyl coenzyme A synthetase and their recombination into active enzyme. *J Biol Chem* 250(12), 4451-5.
- Popov, V.N., Volvenkin, S.V., Eprintsev, A.T. & Igamberdiev, A.U. (1998) Glyoxylate cycle enzymes are present in liver peroxisomes of alloxan-treated rats. *FEBS Lett* 440(1-2), 55-8.
- Poritz, M.A., Siegel, V., Hansen, W. & Walter, P. (1988) Small ribonucleoproteins in *Schizosaccharomyces pombe* and *Yarrowia lipolytica* homologous to signal recognition particle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(12), 4315-9.
- Pronk, J.T., van der Linden-Beuman, A., Verduyn, C., Scheffers, W.A. & van Dijken, J.P. (1994) Propionate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: implications for the metabolon hypothesis. *Microbiology* 140 ( Pt 4), 717-22.
- Przybyla-Zawislak, B., Dennis, R.A., Zakharkin, S.O. & McCammon, M.T. (1998) Genes of succinyl-CoA ligase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 258(2), 736-43.
- Przybyla-Zawislak, B., Gadde, D.M., Ducharme, K. & McCammon, M.T. (1999) Genetic and biochemical interactions involving tricarboxylic acid cycle (TCA) function using a collection of mutants defective in all TCA cycle genes. *Genetics* 152(1), 153-66.
- Ramaley, R.F., Bridger, W.A., Moyer, R.W. & Boyer, P.D. (1967) The preparation, properties, and reactions of succinyl coenzyme A synthetase and its phosphorylated form. *J Biol Chem* 242(19), 4287-98.
- Repetto, B. & Tzagoloff, A. (1989) Structure and regulation of KGD1, the structural gene for yeast alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *Mol Cell Biol* 9(6), 2695-705.
- Repetto, B. & Tzagoloff, A. (1990) Structure and regulation of KGD2, the structural gene for yeast dihydrolipoyl transsuccinylase. *Mol Cell Biol* 10(8), 4221-32.
- Richard, M., Quijano, R.R., Bezzate, S., Bordon-Pallier, F. & Gaillardin, C. (2001) Tagging morphogenetic genes by insertional mutagenesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Bacteriol* 183(10), 3098-107.
- Richter, G. (1998) Stoffwechselphysiologie der Pflanzen. Physiologie und Biochemie des Primär- und Sekundärstoffwechsels. Georg Thieme Verlag 6. völlig neubearbeitete Auflage.
- Rodriguez, C. & Dominguez, A. (1984) The growth characteristics of *Saccharomycopsis lipolytica*: Morphology and induction of mycelial formation. *Can J Microbiol* 30, 605-612.
- Rohde, M., Lim, F. & Wallace, J.C. (1986) Pyruvate carboxylase from *Saccharomyces cerevisiae*. Quaternary structure, effects of allosteric ligands and binding of avidin. *Eur J Biochem* 156(1), 15-22.
- Roiha, H., Shuster, E.O., Brow, D.A. & Guthrie, C. (1989) Small nuclear RNAs from budding yeasts: phylogenetic comparisons reveal extensive size variation. *Gene* 82(1), 137-44.
- Ross, J., Reid, G.A. & Dawes, I.W. (1988) The nucleotide sequence of the *LPD1* gene encoding lipoamide dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*: comparison between eukaryotic and prokaryotic sequences for related enzymes and identification of potential upstream control sites. *J Gen Microbiol* 134(5), 1131-9.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Samuelov, N.S., Lamed, R., Lowe, S. & Zeikus, J.G. (1991) Influence of CO<sub>2</sub>-HCO<sub>3</sub> Levels and pH on Growth, Succinate Production, and Enzyme Activities of *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. *Appl Environ Microbiol* 57(10), 3013-3019.
- Sanchez, A.M., Bennett, G.N. & San, K.Y. (2005) Efficient succinic acid production from glucose through overexpression of pyruvate carboxylase in an *Escherichia coli* alcohol dehydrogenase and lactate dehydrogenase mutant. *Biotechnol Prog* 21(2), 358-65.
- Sanchez, A.M., Bennett, G.N. & San, K.Y. (2006) Batch culture characterization and metabolic flux analysis of succinate-producing *Escherichia coli* strains. *Metab Eng* 8(3), 209-26.

- Shanmugam, K.T. & Ingram, L.O. (2008) Engineering biocatalysts for production of commodity chemicals. *J Mol Microbiol Biotechnol* 15(1), 8-15.
- Shigekawa, K. & Dower, W.J. (1988) Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: a general approach to the introduction of macromolecules into cells. *Biotechniques* 6(8), 742-51.
- Skipton, M.D., Watson, K., Houghton, R.L. & Griffiths, D.E. (1974) A comparative study of cells and mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* and of a hydrocarbon-utilizing yeast, *Candida lipolytica*. *J Gen Microbiol* 84(1), 94-110.
- Smith, E.H., Janknecht, R. & Maher, L.J., 3rd (2007) Succinate inhibition of alpha-ketoglutarate-dependent enzymes in a yeast model of paraganglioma. *Hum Mol Genet* 16(24), 3136-48.
- Srere, P.A., Sherry, A.D., Malloy, C.R. & Sumegi, B. (1997) Channelling in the Krebs tricarboxylic acid cycle. *Channelling in Intermediary Metabolism*, 201-218.
- Stolz, J., Hoja, U., Meier, S., Sauer, N. & Schweizer, E. (1999) Identification of the plasma membrane H<sup>+</sup>-biotin symporter of *Saccharomyces cerevisiae* by rescue of a fatty acid-auxotrophic mutant. *J Biol Chem* 274(26), 18741-6.
- Stottmeister, U., Behrens, U., Weissbrodt, E., Barth, G., Franke-Rinker, D. & Schulze, E. (1982) [Utilization of paraffins and other noncarbohydrate carbon sources for microbial citric acid synthesis]. *Z Allg Mikrobiol* 22(6), 399-424.
- Stottmeister, U. & Hoppe, K. (1991) *Organische Genußsäuren*. Ruttloff H (ed.) *Lebensmittelbiotechnologie*, Akademie-Verlag Berlin, pp. 516-547.
- Studart-Guimaraes, C., Fait, A., Nunes-Nesi, A., Carrari, F., Usadel, B. & Fernie, A.R. (2007) Reduced expression of succinyl-coenzyme A ligase can be compensated for by up-regulation of the gamma-aminobutyrate shunt in illuminated tomato leaves. *Plant Physiol* 145(3), 626-39.
- Suissa, M., Suda, K. & Schatz, G. (1984) Isolation of the nuclear yeast genes for citrate synthase and fifteen other mitochondrial proteins by a new screening method. *Embo J* 3(8), 1773-81.
- Sunnarborg, A., Klumpp, D., Chung, T. & LaPorte, D.C. (1990) Regulation of the glyoxylate bypass operon: cloning and characterization of *iclR*. *J Bacteriol* 172(5), 2642-9.
- Swennen, D. & Beckerich, J.M. (2007) *Yarrowia lipolytica* vesicle-mediated protein transport pathways. *BMC Evol Biol* 7, 219.
- Tabuchi, T., Sugisawa, T., Ishidori, T., Nakahara, T. & Sugiyama, J. (1981) Itaconic acid fermentation by a yeast belonging to the genus *Candida*. *Agric. Biol. Chem.* 45, 475-479.
- Torres-Guzman, J.C. & Dominguez, A. (1997) *HOY1*, a homeo gene required for hyphal formation in *Yarrowia lipolytica*. *Mol Cell Biol* 17(11), 6283-93.
- Uchiyama, H., Ando, M., Toyonaka, Y. & Tabuchi, T. (1982) Subcellular localization of the methylcitric-acid-cycle enzymes in propionate metabolism of *Yarrowia lipolytica*. *Eur J Biochem* 125(3), 523-7.
- Utter, M.F. & Keech, D.B. (1960) Formation of oxaloacetate from pyruvate and carbon dioxide. *J Biol Chem* 235, PC17-8.
- Utter, M.F. & Keech, D.B. (1963) Pyruvate Carboxylase. I. Nature of the Reaction. *J Biol Chem* 238, 2603-8.
- van der Walt, J.P. & von Arx, J.A. (1980) The yeast genus *Yarrowia* gen. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek* 46(6), 517-21.
- van Heerikhuizen, H., Ykema, A., Klootwijk, J., Gaillardin, C., Ballas, C. & Fournier, P. (1985) Heterogeneity in the ribosomal RNA genes of the yeast *Yarrowia lipolytica*; cloning and analysis of two size classes of repeats. *Gene* 39(2-3), 213-22.
- van Urk, H., Schipper, D., Breedveld, G.J., Mak, P.R., Scheffers, W.A. & van Dijken, J.P. (1989) Localization and kinetics of pyruvate-metabolizing enzymes in relation to aerobic alcoholic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8066 and *Candida utilis* CBS 621. *Biochim Biophys Acta* 992(1), 78-86.
- Vanni, P., Giachetti, E., Pinzauti, G. & McFadden, B.A. (1990) Comparative structure, function and regulation of isocitrate lyase, an important assimilatory enzyme. *Comp Biochem Physiol B* 95(3), 431-58.
- Velot, C., Mixon, M.B., Teige, M. & Srere, P.A. (1997) Model of a quinary structure between Krebs TCA cycle enzymes: a model for the metabolon. *Biochemistry* 36(47), 14271-6.
- Vemuri, G.N., Eiteman, M.A. & Altman, E. (2002) Effects of growth mode and pyruvate carboxylase on succinic acid production by metabolically engineered strains of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 68(4), 1715-27.

- Wache, Y., Aguedo, M., Choquet, A., Gatfield, I.L., Nicaud, J.M. & Belin, J.M. (2001) Role of beta-oxidation enzymes in gamma-decalactone production by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl Environ Microbiol* 67(12), 5700-4.
- Wache, Y., Aguedo, M., Nicaud, J.M. & Belin, J.M. (2003) Catabolism of hydroxyacids and biotechnological production of lactones by *Yarrowia lipolytica*. *Appl Microbiol Biotechnol* 61(5-6), 393-404.
- Walker, M.E., Val, D.L., Rohde, M., Devenish, R.J. & Wallace, J.C. (1991) Yeast pyruvate carboxylase: identification of two genes encoding isoenzymes. *Biochem Biophys Res Commun* 176(3), 1210-7.
- Wang, H.J., Le Dall, M.T., Wach, Y., Laroche, C., Belin, J.M., Gaillardin, C. & Nicaud, J.M. (1999) Evaluation of acyl coenzyme A oxidase (Aox) isozyme function in the n-alkane-assimilating yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Bacteriol* 181(17), 5140-8.
- Warren, G.B. & Tipton, K.F. (1974) Pig liver pyruvate carboxylase. Purification, properties and cation specificity. *Biochem J* 139(2), 297-310.
- Weissbrodt, E., Gey, M., Barth, G., Weber, H., Stottmeister, U., Düresch, R. & Richter, H. (1989) Verfahren zur Herstellung von 2-Oxoglutarsäure durch Hefen. Patent DD 267999.
- Wells, J.E. & Russell, J.B. (1996) Why do many ruminal bacteria die and lyse so quickly? *J Dairy Sci* 79(8), 1487-95.
- Wickerham, L.J., Kurtzman, C.P. & Herman, A.I. (1970) Sexual reproduction in *Candida lipolytica*. *Science* 167(921), 1141.
- Winstrom, L.O. (1978) Succinic acid and succinic anhydride. H. F. Mark, D. F. Othmer, C. G. Overberger, and G. T. Seaborg (ed.), *Kirk-Othmer Encyclopedia of chemical technology*, Wiley, New York, N.Y. 21, 848-864.
- Wojtatowicz, M., Rymowicz, W., Robak, M., Zarowska, B. & Nicaud, J. (1997) Kinetics of cell growth and citric acid production by *Yarrowia lipolytica* Suc<sup>+</sup> transformants in sucrose media. *Pol J Food Nutr Sci* 47, 49-54.
- Wu, M. & Tzagoloff, A. (1987) Mitochondrial and cytoplasmic fumarases in *Saccharomyces cerevisiae* are encoded by a single nuclear gene FUM1. *J Biol Chem* 262(25), 12275-82.
- Yamamoto, S., Atomi, H., Ueda, M. & Tanaka, A. (1995) Novel NADP-linked isocitrate dehydrogenase present in peroxisomes of n-alkane-utilizing yeast, *Candida tropicalis*: comparison with mitochondrial NAD-linked isocitrate dehydrogenase. *Arch Microbiol* 163(2), 104-11.
- Yarrow, D. & Ahearn, D.G. (1971) *Brettanomyces abstinentis* sp.n. *Antonie Van Leeuwenhoek* 37(3), 296-8.
- Zeikus, J.G., Jain, M.K. & Elankovan, P. (1999) Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Appl Microbiol Biotechnol* 51, 545-552.
- Zelle, R.M., de Hulster, E., van Winden, W.A., de Waard, P., Dijkema, C., Winkler, A.A., Geertman, J.M., van Dijken, J.P., Pronk, J.T. & van Maris, A.J. (2008) Malic acid production by *Saccharomyces cerevisiae*: engineering of pyruvate carboxylation, oxaloacetate reduction, and malate export. *Appl Environ Microbiol* 74(9), 2766-77.
- Zobel, S. (2010) Die Überexpression der Succinat-Dehydrogenase in *Yarrowia lipolytica* und die Charakterisierung der erzeugten Transformanden. Diplomarbeit, Technische Universität Dresden.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Mikrobiologie der Technischen Universität Dresden unter Betreuung von Prof. Dr. G. Barth angefertigt.

### **Versicherung**

Hiermit versichere ich, dass ich die Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter sowie ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel geschrieben habe. Die aus externen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken wurden als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Dresden, den 12.04.2010

Anne Kretzschmar

## **Danksagung**

Mein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. G. Barth für die Möglichkeit des Anfertigen dieser Arbeit an dem von ihm geleiteten Institut, der Überlassung des interessanten Themas und der Möglichkeit zum selbstständigen und eigenverantwortlichen Arbeiten sowie seiner Diskussionsbereitschaft. Seine konstruktiven, fachlichen Hinweise haben, ebenso wie sein kontinuierliches Interesse am Fortgang der Experimente, sehr zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Weiterhin möchte ich mich bei allen ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern des Institutes für Mikrobiologie, die mich bei der Arbeit unterstützt und zu einer angenehmen Arbeitsatmosphäre beigetragen haben, bedanken. Mein besonderer Dank gilt an dieser Stelle Martina Holz, die mir mit ihrem umfassenden methodischen Wissen die Arbeit sehr erleichtert hat.

Mein großer Dank gehört ebenfalls Venelina und Patrick für ihr Verständnis sowie die moralische und liebevolle Unterstützung, die wesentlich zum Erfolg meiner Arbeit beigetragen haben.

Des Weiteren gilt mein herzlicher Dank Frau Prof. Dr. Röske für die freundliche Übernahme der Aufgabe als Gutachter.

Besonders möchte ich mich bei Marco sowie meiner Familie für die große moralische Unterstützung und das mir entgegengebrachte Verständnis bedanken.