

Abschlussbericht zum Forschungsprojekt Az: 13048

„Entwicklung eines innovativen biotechnologischen Verfahrens zur Herstellung bioabbaubarer Polymere durch erstmaligen Einsatz rekombinanter Hefen“

Projektleitung: Prof. Dr. W. Babel
UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle
GmbH
Sektion Umweltmikrobiologie
Permoserstr. 15
04318 Leipzig

Bearbeiter: **Dr. U. Breuer**
Sektion Umweltmikrobiologie des UFZ Leipzig-Halle
GmbH

Prof. Dr. G. Kunze
Y. Terentiev
Arbeitsgruppe Hefegenetik
Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzen-
forschung Gatersleben

Dipl.-Ing. H. Bergmann
Biomet GmbH Dessau

Bearbeitungszeitraum 01.01.2000 - 31.12.2002

I Inhalts-, Abbildungs-, Tabellen- und Abkürzungsverzeichnis

I	Inhalts-, Abbildungs-, Tabellen- und Abkürzungsverzeichnis	2
II	Kurze Zusammenfassung	6
III	Bericht	8
1	Einführung	8
2	Zielstellung	12
3	Material und Methoden	13
3.1	Organismen und Plasmide	13
3.2	Medien	13
3.2.1	SD-Medium	13
3.2.2	Hefe Minimal Medium (HMM)	13
3.2.3	Komplexmedium für Hefen (YEPD)	14
3.2.4	LB-Medium (SAMBROOK et al. 1989)	14
3.3	Kultivierung	14
3.4	Analysen	16
3.4.1	Bestimmung des PHB-Gehaltes in mikrobieller Biomasse	16
3.4.2	Bestimmung von Glucose, Galactose und Sorbit	16
3.5	Gentechnische Methoden	16
3.6	Bestimmung der Enzymaktivitäten	17
3.6.1	Zellaufschluss	17
3.6.2	Messung	17
3.6.2.1	β -Ketothiolase	17
3.6.2.2	NADPH-abhängige Acetoacetyl-CoA-Reduktase	17
3.6.2.3	PHB-Synthase	17
3.7	Reinigung der NADPH-abhängigen Acetoacetyl-CoA-Reduktase	17
3.8	Chemisch-enzymatischer Aufschluss der Biomasse zur Freisetzung von PHB	18
3.8.1	Chemischer Schritt	18
3.8.1.1	Vorwäsche	18
3.8.1.2	Chemischer Schritt	18
3.8.2	Enzymatischer Schritt	18
3.8.2.1	Vorwäsche	18
3.8.2.2	Lipase-Schritt	18
3.8.2.3	Papain-Schritt	18
3.8.2.4	Nachwäsche	18
3.9	Kjeldahl-Aufschluss, Destillation und Titration	18
3.10	Färbung mit Nilblau A	19
4	Resultate	20
4.1	Expression bakterieller <i>phb</i> -Biosynthesegene in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
4.1.1	Expression des <i>phbA</i> -Gens	20
4.1.2	Expression des <i>phbB</i> -Gens	21
4.1.3	Reinigung der NADPH-abhängigen Acetoacetyl-CoA-Reduktasen aus <i>S. cerevisiae</i> CI3ABYS86/pESC-Leu-phbB	22

4.1.4	Expression des <i>phaC</i> -Gens	24
4.1.5	Expression des <i>phbC</i> -Gens	25
4.1.6	Einfluss von Effektoren auf die PHA-Bildung.....	26
4.1.7	Produktbildung bei <i>S. cerevisiae</i> INVSc2-MAT α /pYES2- <i>phaC</i> -Transformanten	27
4.1.8	Expression der <i>phb</i> -Gene in Peroxisomen mittels Signalsequenzen.....	27
4.1.9	Gleichzeitige Expression der Gene <i>phbA</i> , <i>phbB</i> und <i>phaC/phbC</i>	28
4.1.9.1	Klonierungs- und Transformationsstrategie.....	28
4.1.9.2	Charakterisierung der Transformanten - Bestimmung der Enzymaktivitäten.....	29
4.1.9.2.1	<i>S. cerevisiae</i> CI3ABYS86/pESC-LEU- <i>phbA-phbB-pYES2-phaC</i>	29
4.1.9.2.2	<i>S. cerevisiae</i> CI3ABYS86/pESC-LEU- <i>phbA-phbB-pYES2-phbC</i>	29
4.1.9.3	Charakterisierung der Transformanten - Transkriptanalyse	30
4.1.9.4	Charakterisierung der Transformanten – Elektronenmikroskopische Analyse.....	31
4.1.9.5	Charakterisierung der Transformanten – PHB-Akkumulation	31
4.1.10	Einfluss des <i>S. cerevisiae</i> Stammes auf die PHB-Konzentration.....	32
4.2	Expression bakterieller <i>phb</i> -Biosynthesegene in <i>Arxula adenivorans</i>	32
4.2.1	Expression des <i>phbC</i> -Gens	33
4.2.2	Charakterisierung der Transformanten - Bestimmung der Enzymaktivitäten.....	36
4.2.3	Expression der Gene <i>phbA</i> , <i>phbB</i> und <i>phbC</i>	36
4.2.4	Analyse der Transformanten <i>A. adenivorans</i> G1211/pAL-HPH1- <i>phbA-phbB-pAL-ALEU2m-phbC</i> und T1/pAL-HPH1- <i>phbA-phbB-pAL-HPH1-phbC</i> - Enzymaktivität und Polymerbildung	37
4.3	Expression bakterieller <i>phb</i> -Biosynthesegene in <i>Debaryomyces hansenii</i> und <i>D. polymorphus</i>	38
4.3.1	Expression des <i>phbB</i> -Gens	38
4.3.2	Expression des <i>phbB</i> - und <i>phbA</i> -Gens	38
4.3.3	Expression des <i>phbC</i> -Gens	38
4.3.4	Expression aller <i>phb</i> -Gene	39
4.3.5	Einfluss von Effektoren auf die Polymerbildung bei <i>Debaryomyces</i> -Transformanten.....	39
4.4	Untersuchungen zu kinetischen und stöchiometrischen Parametern der Produktbildung	39
4.4.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> - Transformanten	40
4.4.1.1	<i>S. cerevisiae</i> CI3ABYS86/pESC-Leu- <i>phbB-phbA-pYES2-phaC</i>	40
4.4.1.2	<i>S. cerevisiae</i> INVSc1/pESC-Leu- <i>phbB-phbA-pYES2-phaC</i>	41
4.4.1.3	<i>S. cerevisiae</i> CI3ABYS86/pESC-Leu- <i>phbB-phbA-pYES2-phbC</i>	41
4.4.2	<i>A. adenivorans</i> -Transformanten.....	43
4.4.2.1	<i>A. adenivorans</i> 135/pAL-HPH1- <i>phbC</i>	43
4.4.2.2	<i>A. adenivorans</i> G1211/pAL-HPH1- <i>phbA-phbB-pAL-Leu2m-phbC</i>	44
4.4.2.3	<i>A. adenivorans</i> LS3/pAL-HPH1- <i>phbC</i>	46
4.4.2.4	Produktbildung im "zig-Liter"-Maßstab.....	47
4.4.3	<i>D. hansenii</i> und <i>D. polymorphus</i> -Transformanten	48
4.4.3.1	<i>D. polymorphus</i> H120/pAL-HPH1- <i>phbC-pAL-HPH1-phbA-phbB</i>	50
4.4.3.2	Versuche im "zig-Liter"-Maßstab	51
4.4.3.2.1	<i>D. hansenii</i> H158-Wildtyp	51
4.4.3.2.2	<i>D. hansenii</i> H158/pAL-HPH1- <i>phbC-pAL-HPH1-phbA-phbB</i>	51
4.5	Downstream Processing - Einsatz des CEA (chemisch-enzymatischen Aufschlusses) bei Hefen	53
4.5.1	Upscaling- und Sedimentationsuntersuchungen	53
4.5.2	CEA bei Hefen - Analyse anhand des Gesamtstickstoffs.....	54
5	Schlußfolgerungen und Ausblick	55
5.1	„Konstruktion“ von Produzenten und Produktsynthese	55
5.2	Gewinnung des Produktes.....	57

IV	Literatur	58
V	Öffentlichkeitsarbeit	60
ANHANG	Wachstumsparameter zur Bewertung von Substraten, Auswahl von effektiven PHB-Produzenten und Erkennung von Flaschenhälsen: eine einfache Betrachtung	62

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	PHB-Syntheseweg (nach Babel et al. 2001).....	8
Abbildung 2:	Beispiele für den Einsatz von PHA (Biopol®) (Monsanto Deutschland GmbH 1997).....	10
Abbildung 3:	Konstruktionsschema für das Plasmid pYES2-phbA.....	20
Abbildung 4:	Konstruktionsschema für das Plasmid pYES2-phbB.....	21
Abbildung 5:	SDS-PAGE der gereinigten NADPH-abhängigen Acetoacetyl-CoA-Reduktase aus der rekombinanten Hefe <i>S. cerevisiae</i> Cl3ABYS86/pYES2-phbB Slot 1: Rohextrakt; Slot 2: Fraktion 1; Slot 3: Fraktion 2; Slot 4: Molekulargewichtsmarker LMW (amersham pharmacia Biotech).....	23
Abbildung 6:	Konstruktionsschema für das Plasmid pYES2-phaC.....	24
Abbildung 7:	<i>phaC</i> -Transkriptakkumulation in <i>S. cerevisiae</i> Cl3ABYS86/pYES2-phaC. Nach Induktion des <i>phaC</i> -Gens durch Galactose wurde die Gesamt-RNA isoliert, auf Nitrozellulosefilter überführt und gegen das radioaktiv markierte <i>phaC</i> -Genfragment hybridisiert.....	24
Abbildung 8:	Konstruktionsschema für das Plasmid pYES2-phbC.....	25
Abbildung 9:	Einfluss von Effektoren auf die PHB-Bildung bei <i>S. cerevisiae</i>	26
Abbildung 10:	Konstruktionsschema für das Plasmid pESC-LEU-phbA-phbB.....	29
Abbildung 11:	Transkriptanalyse von <i>S. cerevisiae</i> Cl3ABYS86/pESC-LEU-phbA-phbB-pYES2-phaC. Nach Induktion der Gene durch Galactose wurde die Gesamt-RNA isoliert. Nach deren Elektrophorese und Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran erfolgte die Northern-Hybridisierung. Als radioaktiv markierte Sonden wurden DNA-Fragmente mit dem <i>phbA</i> -, <i>phbB</i> - bzw. <i>phaC</i> -Gen verwendet.....	30
Abbildung 12:	Elektronenmikroskopische Analyse von <i>S. cerevisiae</i> Cl3ABYS86 (A), Cl3ABYS86/pESC-LEU-phbA-phbB-pYES2-phaC 1 (B) und Cl3ABYS86/pESC-LEU-phbA-phbB-pYES2-phaC 3 (C), Zeiss CEM 920A Transmissionselektronenmikroskop, Vergr. 20 000; vermeintliche PHA-Einschlüsse.....	31
Abbildung 13:	GC-Spektrum von <i>S. cerevisiae</i> Cl3ABYS86 (A) und Cl3ABYS86/pESC-LEU-phbA-phbB-pYES2-phaC 1 (B).....	32
Abbildung 14:	Konstruktionsschema für das Plasmid pAL-HPH1-phbC.....	33
Abbildung 15:	<i>phbC</i> -Transkriptanalyse von <i>A. adeninivorans</i> 135/pAL-HPH1-phbC und T1/pAL-HPH1-phbC. Die Gesamt-RNA wurde isoliert. Nach deren Elektrophorese und Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran erfolgte die Northern-Hybridisierung. Als radioaktiv markierte Sonde wurde ein DNA-Fragment mit dem <i>phbC</i> -Gen verwendet.....	34
Abbildung 16:	Spektrum der GC/MS-Messung von <i>A. adeninivorans</i> T1 (A) und T1/pAL-HPH1-phbC (B) zur PHB-Analyse.....	35
Abbildung 17:	Konstruktionsschema für das Plasmid pAL-ALEU2m-phbC.....	35
Abbildung 18:	Konstruktionsschema für das Plasmid pAL-HPH1-ATG-phbB.....	36
Abbildung 19:	Konstruktionsschema für das Plasmid pAL-HPH1-phbA-phbB.....	37
Abbildung 20:	Wachstum und Substratverbrauch bei Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> Cl3ABYS86/pESC-Leu-phbB-phbA-pYES2-phaC1 im Bioreaktor mit Glucose und Galactose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle.....	40
Abbildung 21:	PHA-Synthese in <i>S. cerevisiae</i> Cl3ABYS86/pESC-Leu-phbB-phbA-pYES2-phaC1, kultiviert im Bioreaktor mit Glucose und Galactose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle. Dicker Pfeil: Start fed-batch, dünne Pfeile: Zugabe von Substraten.....	41
Abbildung 22:	PHA-Synthese in <i>S. cerevisiae</i> INVSc1/pESC-Leu-phbB-phbA-pYES2-phaC, kultiviert im Bioreaktor mit Glucose und Galactose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle.....	42
Abbildung 23:	PHA-Synthese in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Cl3ABYS86/pESC-Leu-phbB-phbA-pYES2-phaC, kultiviert im Bioreaktor mit Glucose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle.....	42
Abbildung 24:	Produktbildung von <i>A. adeninivorans</i> 135/pAL-HPH1-phbC auf Sorbitol.....	44
Abbildung 25:	Produktbildung bei <i>A. adeninivorans</i> G1211/pAL-HPH1-phbA-phbB-pAL-Leu2m-phbC.....	45
Abbildung 26:	Produktbildung bei <i>A. adeninivorans</i> G1211/pAL-HPH1-phbA-phbB-pAL-Leu2m-phbC.....	45
Abbildung 27:	<i>A. adeninivorans</i> LS3/pAL-HPH1-phbC in kontinuierlicher Kultivierung auf Ethanol als C-Quelle. X: $D = 0,005 \text{ h}^{-1}$	46
Abbildung 28:	Zusammenhang zwischen der Verdünnungsrate D und der Bildung von Biomasse und PHB bei <i>A. adeninivorans</i>	47
Abbildung 29:	Kultivierung von <i>A. adeninivorans</i> LS3 auf YEPD-Medium und Glucose. (Pfeile = Glucosezugaben).....	47
Abbildung 30:	<i>A. adeninivorans</i> LS3 (links) und <i>A. adeninivorans</i> 135 (rechts), kultiviert mit Glucose als C-Quelle bei 30°C, durchlichtmikroskopische Aufnahme, Vergrößerung 1600x.....	48
Abbildung 31:	PHB-Bildung bei <i>D. polymorphus</i> H120 und Transformanten und <i>D. hansenii</i> H158 und Transformanten in Abhängigkeit vom Kohlenstoffsubstrat.....	49
Abbildung 32:	Wachstumsrate bei <i>Debaryomyces polymorphus</i> H120 und Transformanten und <i>D. hansenii</i> H158 und Transformanten in Abhängigkeit vom Kohlenstoffsubstrat.....	49
Abbildung 33:	<i>D. hansenii</i> H158 Nilblaufärbung (links) (Fluoreszenzaufnahme bei 420 nm-Gelbfilter) und durchlichtmikroskopische Aufnahme (rechts).....	50
Abbildung 34:	<i>D. polymorphus</i> H120 Nilblaufärbung (links) (Fluoreszenzaufnahme bei 420 nm-Gelbfilter) und durchlichtmikroskopische Aufnahme (rechts).....	50
Abbildung 35:	Produktbildung bei <i>D. polymorphus</i> H120/pAL-HPH1-phbC-pAL-HPH1-phbA-phbB auf Minimalmedium mit Glucose als Substrat.....	50
Abbildung 36:	Kultivierung von <i>D. hansenii</i> H158 auf YEPD-Medium und Glucose. (Pfeile = Glucosezugaben).....	51
Abbildung 37:	Kultivierung von <i>D. hansenii</i> H158/pAL-HPH1-phbC-pAL-HPH1-phbA-phbB auf YEPD-Medium und Glucose.....	52

Abbildung 38: Kultivierung von <i>D. hansenii</i> H158/pAL-HPH1-phbC-pAL-HPH1-phbA-phbB auf YEPD-Medium und Glucose. Batch-Phase.....	52
Abbildung 39: Kultivierung von <i>D. hansenii</i> H158/pAL-HPH1-phbC-pAL-HPH1-phbA-phbB auf YEPD-Medium und Glucose.....	53

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: PHB-Bildung in Prokaryoten (*: als GVO).....	9
Tabelle 2: Vergleich der Eigenschaften von PP und PHB (Monsanto Deutschland GmbH 1997).....	10
Tabelle 3: Anwendungsmöglichkeiten von Polyhydroxyalkanoaten.....	11
Tabelle 4: Expression heterologer Proteine in Hefen.....	12
Tabelle 5: Übersicht über die Kultivierung der im Bericht beschriebenen Hefestämmen.....	15
Tabelle 6: MS Sim Parameter.....	16
Tabelle 7: Nachweis der β -Ketothiolase-Aktivität in <i>S. cerevisiae</i> Cl3ABYS86/pYES2-phbA.....	21
Tabelle 8: Nachweis der NADPH-abhängigen Acetoacetyl-CoA-Reduktase-Aktivität in <i>S. cerevisiae</i> Cl3ABYS86/pYES2-phbB.....	21
Tabelle 9: Reinigung der NADPH-abhängigen Acetoacetyl-CoA-Reduktasen aus <i>S. cerevisiae</i> Cl3ABYS86/pESC-Leu-phbB.....	22
Tabelle 10: Reinigung der NADPH-abhängigen Acetoacetyl-CoA-Reduktase aus <i>S. cerevisiae</i> Cl3ABYS86.....	22
Tabelle 11: Nachweis der PHB-Synthase-Aktivität in <i>S. cerevisiae</i> Cl3ABYS86/pYES2-phaC.....	25
Tabelle 12: Nachweis von PHB in <i>S. cerevisiae</i> Cl3ABYS86/pYES2-phaC.....	25
Tabelle 13: PHB-Bildung und Polymeraseaktivität bei <i>S. cerevisiae</i> Cl3ABYS86/pYES2-phbC -Transformanten.....	26
Tabelle 14: Bildung und Polymeraseaktivität bei <i>S. cerevisiae</i> Cl3ABYS86/pYES2-phbC.....	27
Tabelle 15: PHB-Bildung und Polymeraseaktivität bei <i>S. cerevisiae</i> phbC -Transformanten.....	28
Tabelle 16: Nachweis der β -Ketothiolase-, der Acetoacetyl-CoA-Reduktase- und der PHB-Synthase-Aktivitäten von <i>S. cerevisiae</i> Cl3ABYS86/pESC-LEU-phbA-phbB-pYES2-phaC.....	29
Tabelle 17: Nachweis der β -Ketothiolase-, der Acetoacetyl-CoA-Reduktase- und der PHB-Synthase-Aktivitäten von <i>S. cerevisiae</i> Cl3ABYS86/pESC-LEU-phbA-phbB-pYES2-phbC.....	30
Tabelle 18: Nachweis von PHB in <i>S. cerevisiae</i> Cl3ABYS86/pESC-LEU-phbA-phbB-pYES2-phaC 1.....	31
Tabelle 19: Nachweis von PHB in <i>S. cerevisiae</i> INVSC1/pESC-LEU-phbA-phbB-pYES2-phaC.....	32
Tabelle 20: Nachweis der PHB-Synthase-Aktivität und der PHB-Konzentration von <i>A. adeninivorans</i> 135, 135/ pAL-HPH1-phbC, T1, T1/pAL-HPH1-phbC, LS3 und LS3/pAL-HPH1-phbC.....	34
Tabelle 21: Nachweis der PHB-Synthase-Aktivität und der PHB- bzw. PHV-Konzentration von <i>A. adeninivorans</i> G1211/ pAL-ALEU2m-phbC.....	36
Tabelle 22: Nachweis der Aktivitäten der PHB-Enzyme und der PHB-Konzentration von <i>A. adeninivorans</i> Transformanten.....	37
Tabelle 23: Spezifische Aktivität der NADPH-abhängigen Acetoacetyl-CoA Reduktase in <i>D. hansenii</i> (H158) und Rekombinanten.....	38
Tabelle 24: Spezifische Aktivität der β -Ketothiolase und der NADPH-abhängigen Acetoacetyl-CoA Reduktase in <i>D. polymorphus</i> H120 und <i>D. hansenii</i> H158 und Rekombinanten (in U/g).....	38
Tabelle 25: Spezifische Aktivität der PHA-Synthase und Gehalt an PHB in <i>D. polymorphus</i> H120 und <i>D. hansenii</i> H158 und Rekombinanten.....	38
Tabelle 26: Nachweis der Aktivitäten der PHB-Enzyme und der PHB-Konzentration von <i>D. polymorphus</i> H120, <i>D. hansenii</i> H158 und ausgewählten Transformanten.....	39
Tabelle 27: Einfluss von Cerulenin auf die PHB-Bildung bei <i>Debaryomyces</i> -Transformanten.....	39
Tabelle 28: Abhängigkeit der Polymerbildung von der Durchflussrate bei kontinuierlicher Kultivierung auf Sorbitol als C-Quelle (geeignetes D fett).....	46
Tabelle 29: Abhängigkeit der Polymerbildung von der Durchflussrate bei kontinuierlicher Kultivierung auf Ethanol als C-Quelle (geeignetes D fett).....	46
Tabelle 30: Gesamtstickstoff im Überstand [mg/l].....	54

Abkürzungsverzeichnis

8-ANS	Anillinonaphthalensulfonsäure	μ	Wachstumsrate [h^{-1}]
BTS	Biotrockensubstanz [g/l]	n.d.	nicht bestimmt
CoA	Coenzym A	N	Gesamtstickstoff im Überstand [mg/l]
D	Durchflussrate, $D = F/V$ [h^{-1}]	NB	Nährbouillon
Da	Dalton, $1 Da = 1,6605402 \times 10^{-24} g$	PHV	Polyhydroxyvaleriat
DCE	Dichlorethan	pO_2	Sauerstoffpartialdruck [%sat]
DIG	Digoxygenin	PP	Polypropylen
E700	Extinktion bei 700 nm	q_{PHB}	PHB-Bildungsgeschwindigkeit [g PHB/h g BTS]
EtOH	Ethanolgehalt [g/l]	q_S	Substrat-Verbrauchsgeschwindigkeit [g/h g]
FID	Flammenionisationsdetektor	Tc	Tetracyclin
GVO	genetisch veränderter Organismus	Tryp	Tryptophan
His	Histidin	U	internationale Einheiten (Enzymaktivität)
Kb	Kilobasen	Ura	Uracil
Leu	Leucin	YEPD	Komplexmedium für Hefen
LB	Luria-Bertani-Medium	$Y_{X/S}$	Ertrag an Biomasse [g BTS/g Substrat]

II Kurze Zusammenfassung

1. Motivation: Polyhydroxyalkansäuren (PHA) sind seit langem bekannt, sie haben kommerziell attraktive Eigenschaften. Sie können von vielen Prokaryoten synthetisiert werden. Die Eigenschaften lassen sich maßschneidern, und für die Synthese können unterschiedlichste Kohlenstoffverbindungen genutzt werden. Diese Polyester versprechen vielfältige Anwendungen und es besteht Bedarf. Sie haben trotzdem noch keinen wirklichen Markt gefunden; sie sind zu teuer und bestehen deshalb nicht in der Konkurrenz mit den eingeführten sog. Kunststoffen. Die Ökonomie zu verbessern, ist eine große Herausforderung an Wissenschaft und Technik. Versucht wird, entwickelte Technologien zu verbessern; gesucht wird nach preisgünstigen und effektiver wandelbaren Rohstoffen, ebenso nach anderen Produzenten. Vor ca. 10 Jahren wurde begonnen, Organismen genotypisch zu optimieren und PHA-Bildner zu "erzeugen". Zuerst wurden Pflanzen "bearbeitet" (darunter *Arabidopsis thaliana*), kurz danach auch die Backhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Die Erfolge sind bis heute nicht so beeindruckend, so dass es sinnvoll erscheint, nach weiteren Organismen als "Zellfabriken" zu suchen. Wie Ölpflanzen eine Prädisposition haben könnten, so sollte dieses auch für Hefen gelten, die als Fettproduzenten bekannt sind. Gewählt wurden deshalb für dieses Projekt Spezies der Gattung *Debaryomyces*. Vergleichend untersucht werden sollten *Saccharomyces cerevisiae* und *Arxula adenivorans*.

2. Ergebnisse: Es ist gelungen, in den o.g. Hefen die genetische Information zur Synthese von Polyhydroxyalkansäuren zu etablieren und aktiv zu exprimieren. Die *in vitro* Aktivitäten der drei für die Synthese erforderlichen Enzyme sind hoch, höher als theoretisch für bestimmte Synthesegeschwindigkeiten erforderlich. Die Transformanten vermögen auch tatsächlich PHB/HV zu synthetisieren. Obwohl sie noch in keinem Parameter (der Aussagen über die Ökonomie macht) mit den für bakterielle Wildtypen bekannten Werten konkurrieren können, so sind doch **die erreichten Konzentrationen ca. 12mal höher als die für *Saccharomyces cerevisiae* publizierten Spitzenwerte** (LEAF et al. 1996, POIRIER et al. 2001). Unsere Versuche, durch phänotypische Maßnahmen (siehe Projektantrag) die Leistungen der Transformanten zu steigern, brachten nicht den gewünschten Erfolg. Die Hintergründe konnten nicht aufgeklärt werden. Die Tatsache, dass die genannten Organismen PHA-Bildung als Stress-Antwort nicht im Programm haben, lässt vermuten, dass sie Imbalancen auf andere Weise meistern, indem sie zum Beispiel Überschuss in anderen als den gewünschten Verbindungen "ablagern". Wenn diese Überlebensstrategien "greifen" und nicht abgeschaltet werden (können), geht Kohlenstoffskelett für das gewünschte Zielprodukt verloren. Für Gärhefen trifft dies zu. Für oleogene Hefen kann nicht endgültig ausgeschlossen werden, dass sie weiterhin Lipide bilden.

Der Flaschenhals konnte nicht lokalisiert werden. Theoretische Betrachtungen verweisen auf den Intermediärstoffwechsel. Dass die Hefen mit nur geringen Geschwindigkeiten und kleinen Ertragskoeffizienten vermehrt werden konnten, ist kein Zeichen dafür, dass sie nicht in der Lage sein sollten, mit hoher Geschwindigkeit PHB(A) zu synthetisieren. Die Kapazität zur Aufnahme ist - das sagen uns die Befunde - jedenfalls sehr hoch; sie kommt als pace maker kaum in Frage.

Das Hauptaugenmerk dieses Projektes lag auf der "Erzeugung" von Produzenten. Angesichts der erreichten Konzentration und Synthesegeschwindigkeit erschien es nicht zweckmäßig - so wie im Programm vorgesehen - im 100-L-Maßstab zu experimentieren, um zu optimieren. Optimierungsversuche wurden deshalb nur im Lab-Maßstab durchgeführt.

Wie Arbeiten zur weiteren Steigerung der Produktivität notwendig sind, ist es erforderlich, die Operationen zur Gewinnung des eigentlichen Produktes zu verbessern. Die bisher bei Bakterien praktizierten Methoden setzen im wesentlichen auf Extraktion mit Lösungsmitteln. Für Hefen liegen dazu keine Erfahrungen vor, aber auch nicht darüber, ob und wie effektiv das für Bakterien entwickelte umweltfreundliche chemisch-enzymatische Aufschlussverfahren funktioniert. Es wurde, programmgemäß, für alle Hefen geprüft - als Maß für den Erfolg wurde, angesichts des geringen PHA-Gehaltes, stellvertretend extrazelluläres Protein benutzt - es funktioniert und darf als geeignet bezeichnet werden.

3. Schlussfolgerungen: Mikroorganismen sind auf Erhaltung programmiert. Zu diesem Programm gehören Strategien, die es ermöglichen, in Stress-Situationen zu bestehen, zum Beispiel Imbalancen zu bewältigen. *Overflow metabolism* ist eine Antwort auf Bedingungen, die Wachstum und Vermehrung einschränken. Wenn er mit der Generierung biologisch nutzbarer Energie einhergeht, ist er überlebensstrategisch relevant. PHB-Bildung ist ein Beispiel. Diese Strategie hat sich in Bacteria und Archaea entwickelt. Sie greift anscheinend nicht nur für den Moment, sondern besitzt auch eine ziemliche Kapazität, wenn man die möglichen Konzentrationen, die erreicht werden können, so deutet. Eukarya verfügen über diese Strategie nicht. Sie lassen sich aber, wie gezeigt werden konnte, mit den Enzymen „ausstatten“, die unserer Kenntnis nach notwendig sind, um Acetyl-CoA in PHB/PHV zu wandeln. Dies ist nicht hinreichend, um die Hefen zu wirklichen PHA-Produzenten zu machen. Sie

dürften ebenfalls – wie Mikroorganismen generell – über *overflow metabolism* Aktivitäten verfügen und Überschüssiges infolge von Mangel in andere Bahnen schleusen, die sich, da momentanes Reagieren erforderlich ist, wahrscheinlich immer in einer gewissen Habachtstellung befinden. Sie gilt es zu unterdrücken. Stofffluss-Analysen können klären helfen, ob Konkurrenzen um das eigentliche Substrat Acetyl-CoA maßgeblich sind für die nicht befriedigenden Resultate oder ob der Antransport limitiert ist. Die Tatsache, dass eine Überlebensreaktion – Bildung von Ethanol (Citronensäure) oder von Lipiden (Glykogen) – durch eine andere (PHA) ersetzt werden soll, macht wahrscheinlich das Vorhaben besonders.

III Bericht

1 Einführung

Polyhydroxyalkanoate (PHA) sind mikrobiell erzeugte aliphatische Homo- oder Copolymere von β -Hydroxyfettsäuren, die im Mikroorganismus als Speicher für Kohlenstoff und Energie fungieren. PHA weisen viele der allgemeinen Eigenschaften synthetischer Kunststoffe auf und können von den Zellen in verschiedenen chemischen Formen synthetisiert werden.

In Mikroorganismen kommt es zu einer verstärkten intrazellulären Akkumulation von PHA, wenn sie suboptimalen Bedingungen für Wachstum und Vermehrung oder einem unausgewogenen Nährstoffangebot in einem weiteren Sinn (z.B. auch Stickstoffmangel) ausgesetzt sind.

Zu den bekanntesten und am besten untersuchten PHA gehört Poly-3-hydroxybutyrat (PHB). PHB wurde zuerst 1926 in *Bacillus megaterium* von Lemoigne entdeckt, und ist seitdem Gegenstand intensiver Forschung. Besonders intensiv wurde PHB als Speicherstoff in *Ralstonia eutropha* untersucht, ein Bakterium, das in der Lage ist, PHB-Einschlüsse in der Grösse von 0,2 - 0,5 Micron in einer Konzentration bis zu 80% der Bakterientrockenmasse einzulagern. In *Ralstonia* wurde auch die Biochemie und Molekularbiologie der Synthese aufgeklärt (Abb. 1). Die Synthese beginnt ausgehend vom Acetyl-CoA und verläuft über die β -Ketothiolase, welche von dem Gen *phbA* kodiert wird. Die β -Ketothiolase verknüpft in einer Claisen-Kondensation 2 Acetyl-CoA zu Acetoacetyl-CoA. Dieses wird durch die Acetoacetyl-CoA-Reduktase (*phbB*) zu 3-Hydroxybutyryl-CoA reduziert. Bei dieser Reaktion werden Reduktionsäquivalente verbraucht. Der letzte Schritt ist die Polymerisation, die von der PHB-Synthase (*phbC*) katalysiert wird (Übersichten in BABEL et al. 2001; MERRICK 2002).

Kenntnisse existieren zur Regulation der bakteriellen PHB-Synthese. Diese erfolgt nicht auf epigenetischer, sondern wahrscheinlich auf metabolischer Ebene, insofern, als um Acetyl-CoA mindestens zwei Enzyme konkurrieren, die β -Ketothiolase und die Citratsynthase. Die β -Ketothiolase wird durch ihr Reaktionsprodukt CoA gehemmt. Unter Wachstumsbedingungen wird Acetyl-CoA in den Tricarbonsäurecyclus (TCC) eingeschleust, die Konzentration an CoA in der Zelle ist im Vergleich zur Acetyl-CoA Konzentration hoch. Das hemmt die β -Ketothiolase und somit die PHB-Synthese (SENIOR und DAWES 1971). Unter wachstumslimitierenden Bedingungen, z. B. nach Ammonium-Limitation wird die Hemmung der β -Ketothiolase durch die relativ geringen Konzentrationen an freiem CoA im Vergleich zur Acetyl-CoA Konzentration aufgehoben (OEDING und SCHLEGEL 1973; SENIOR et al. 1972; MOTHES et al. 1997).

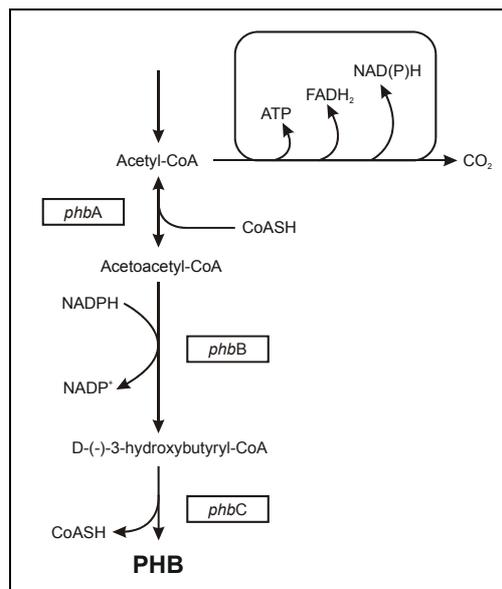


Abbildung 1: PHB-Syntheseweg (nach Babel et al. 2001)

Die Fähigkeit, PHB zu synthetisieren und zu akkumulieren, ist unter Prokaryoten weit verbreitet. Zur Zeit sind Spezies von über 100 Bakteriengattungen bekannt, die PHB synthetisieren können. Die Fähigkeit zur Synthese ist nicht vom Taxon oder von ökophysiologischen Besonderheiten abhängig. Sie

ist unabhängig von der C-Quelle oder dem Ernährungstyp. PHB-bildende Organismen sind gefunden worden bei Gram-Positiven und Gram-Negativen, aeroben und anaeroben Chemo-organo-Heterotrophen, Chemo-litho-Autotrophen sowie aeroben und anaeroben Phototrophen. Auch Archebakterien können PHB synthetisieren und akkumulieren (Tab. 1) (vgl. DAWES und SENIOR 1973; BYROM 1987; STEINBÜCHEL 1989, 1991; ANDERSON und DAWES 1990; BRANDL et al. 1990; BABEL 1997). In Eukaryoten wurden diese Polymere bisher nur in kleinen Konzentrationen nachgewiesen, wo sie in Komplexen mit Polyphosphaten Funktionen im Membrantransport ausüben (REUSCH 1989, 2002).

Tabelle 1: PHB-Bildung in Prokaryoten (*: als GVO)

Genera		
<i>Achromobacter</i>	<i>Ectothiorhodospira</i>	<i>Nostoc</i>
<i>Acidovorax</i>	<i>Erwinia</i>	<i>Oceanospirillum</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Escherichia</i> *	<i>Oscillatoria</i>
<i>Actinomyces</i>	<i>Ferrobacillus</i>	<i>Paracoccus</i>
<i>Aeromonas</i>	<i>Flavobacterium</i>	<i>Paucispirillum</i>
<i>Agrobacterium</i>	<i>Fisherella</i>	<i>Pedomicrobium</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Gamphosphaeria</i>	<i>Photobacterium</i>
<i>Alteromonas</i>	<i>Gloeobacter</i>	<i>Prosthecomicrobium</i>
<i>Aminobacter</i>	<i>Gloeocapsa</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Amoebobacter</i>	<i>Gloeotheca</i>	<i>Rhizobium</i>
<i>Anabena</i>	<i>Gloeotrichia</i>	<i>Rhodobacillus</i>
<i>Anabaenopsis</i>	<i>Haemophilus</i> *	<i>Rhodobacter</i>
<i>Anacystis</i>	<i>Halobacterium</i>	<i>Rhodococcus</i>
<i>Aphanizomenon</i>	<i>Haloferax</i>	<i>Rhodocyclus</i>
<i>Aphanocapsa</i>	<i>Hydroclathrathus</i>	<i>Rhodomicrobium</i>
<i>Aphanothece</i>	<i>Hydrogenomonas</i>	<i>Rhodopseudomonas</i>
<i>Aquaspirillum</i>	<i>Hydrogenophaga</i>	<i>Rhodospirillum</i>
<i>Asticcaulus</i>	<i>Hyphomicrobium</i>	<i>Rubrivivax</i>
<i>Azomonas</i>	<i>Labrys</i>	<i>Schizothrix</i>
<i>Azorhizobium</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Scytonema</i>
<i>Azospirillum</i>	<i>Lamprocystis</i>	<i>Seliberia</i>
<i>Azotobacter</i>	<i>Lampropedia</i>	<i>Sphaerotilus</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Legionella</i>	<i>Sphingomonas</i>
<i>Beggiatoa</i>	<i>Leptothrix</i>	<i>Spirillum</i>
<i>Beijerinckia</i>	<i>Lyngbya</i>	<i>Spirulina</i>
<i>Beneckea</i>	<i>Mastigocladus</i>	<i>Staphylococcus</i>
<i>Blastobacter</i>	<i>Methanomonas</i>	<i>Stella</i>
<i>Bordetella</i>	<i>Methylobacterium</i>	<i>Streptomyces</i>
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Methylobrevibacter</i>	<i>Synechococcus</i>
<i>Burkholderia</i>	<i>Methylococcus</i>	<i>Synechocystis</i>
<i>Calothrix</i>	<i>Methylocystis</i>	<i>Syntrophomonas</i>
<i>Caryophanon</i>	<i>Methylomicrobium</i>	<i>Telluria</i>
<i>Caulobacter</i>	<i>Methylomonas</i>	<i>Thiobacillus</i>
<i>Chloroflexus</i>	<i>Methylophila</i>	<i>Thiocapsa</i>
<i>Chlorogloea</i>	<i>Methylosinus</i>	<i>Thiocystis</i>
<i>Chromatium</i>	<i>Methylovibrio</i>	<i>Thiodictyon</i>
<i>Chromobacterium</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Thiopedia</i>
<i>Clostridium</i>	<i>Microcoleus</i>	<i>Thiosphaera</i>
<i>Comamonas</i>	<i>Microcystis</i>	<i>Thiospirillum</i>
<i>Comamonas</i>	<i>Moraxella</i>	<i>Tolypothrix</i>
<i>Corynebacterium</i>	<i>Mycobacterium</i>	<i>Trichodesmium</i>
<i>Derxia</i>	<i>Mycoplana</i>	<i>Variovorax</i>
<i>Desulfococcus</i>	<i>Nitrobacter</i>	<i>Vibrio</i>
<i>Desulfonema</i>	<i>Nitrococcus</i>	<i>Xanthobacter</i>
<i>Desulfosarcina</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Xanthomonas</i>
<i>Desulfovibrio</i>	<i>Nodularia</i>	<i>Zoogloea</i>

PHB hat thermoplastische oder elastomere Eigenschaften. Aufgrund der Eigenschaften, die ähnlich dem Polypropylen (PP) sind, wenn auch das Material steifer und brüchiger ist, insbesondere aber wegen seiner biologischen Abbaubarkeit erlangte PHB kommerzielles Interesse (Tab. 2). Innerhalb von 5 - 6 Wochen kann PHB unter bestimmten Bedingungen bis zu Kohlendioxid und Wasser abgebaut werden. Unter anaeroben Bedingungen findet auch ein Abbau statt und es wird Methan produziert.

Indem Bakterien isoliert wurden, die bis zu 80% ihrer Trockenmasse PHB bilden können, erschien die großtechnische Produktion ökonomisch sinnvoll. Eigenschaften, wie hohes Molekulargewicht, Biokompatibilität, toxikologische Unbedenklichkeit, Wasser- und UV-Resistenz, piezoelektrisches Verhalten versprechen vielfältige Anwendungen. Dieses Spektrum wird durch die Möglichkeit, PHA mit unterschiedlichen monomeren Einheiten zu synthetisieren, die unterschiedliche physikalische Eigenschaften aufweisen, erheblich vergrößert (BRANDL et al. 1988; DOI et al. 1988; RAMSAY et al. 1990; LIEBERGESELL et al. 1991; DE KONING et al. 1993; vgl. ASRAR und GRUYS 2002). Neben dem Einsatz dieses alternativen Kunststoffes in der Verpackungsindustrie (biologisch abbaubare Folien und Gefäße in der Verpackungsindustrie, Beschichtungsmaterial für Papier und Pappen, Hygieneartikel) wird z. Z. vor allem aber an einen Einsatz in der Medizin gedacht (retardierende Matrix, Implantate in der orthopädischen und Gefäßchirurgie) (HOLMES 1985; SEEBACH et al. 1987; BABEL et al. 1990; LEE 1996; vgl. MARCHESSAULT und YU 2002; WILLIAMS und MARTIN 2002) (Abb. 2, Tab. 3).

Tabelle 2: Vergleich der Eigenschaften von PP und PHB (Monsanto Deutschland GmbH 1997)

Parameter	PP	PHB
Schmelzpunkt (°C)	160-168	136-162
Glasübergangstemperatur (°C)	-15	5-10
Kristallinität (%)	65-70	65-80
Dichte (g/cm ³)	0,905-0,940	1,230-1,250
M (x10 ⁵ g/mol)	2,2-7,0	1-8
E-Modul (GPa)	1,7	3,5-4,0
Zugfestigkeit (MPa)	25-35	20-31
Bruchdehnung (%)	400-900	8-42
UV-Beständigkeit	Schlecht	gut
Lösungsmittelbeständigkeit	Gut	schlecht
Sauerstoffpermeabilität (m ³ /m ² x atm x d)	1700	45
Bioabbau	-	+



Abbildung 2: Beispiele für den Einsatz von PHA (Biopol®) (Monsanto Deutschland GmbH 1997)

Tabelle 3: Anwendungsmöglichkeiten von Polyhydroxyalkanoaten

Landwirtschaft	Gartenbau	Verpackungssektor
Abdeckfolien	Sockelkörper	Abfallsäcke (Biotonne)
Mulchfolien	Bindematerial	Fast-Food-Verpackungen
Erntebindgarn	Ballenumhüllungen	Tragetaschen
	Samenbänder	Eierkarton
		Getränke-Sammelpack
		Kurzzeitverpackungen
		Folien
Gebrauchsmittel	Hygieneartikel	Medizintechnik
Einweggeschirr	Windeln	Nähmaterial
mit Folien kaschiertes Geschirr aus Pappe	Tampons	Tablettenkapseln
	Einwegrasierer	Nägel
	Kosmetik- und Shampooflaschen	

Einer Markteinführung als ein Massenprodukt steht jedoch der gegenwärtig zu hohe Preis entgegen. Während momentan der Preis für Polyolefine wie Polyethylen oder Polypropylen etwa 0,75 €/kg beträgt, liegen die Verkaufspreise für 1 kg BIOPOL® [Poly(3-Hydroxybutyrat-co-3-Hydroxyvalerat)] bei bis zu 7 €/kg.

Das erste kommerziell verfügbare Produkt war eine in Deutschland hergestellte Shampooflasche ("Sanara" WELLA AG 1990), deren Preis etwa 50 ct pro Flasche über dem des in PET-Flaschen abgepackten Produktes lag. Damit und auf Grund der fehlenden Entsorgungsmöglichkeiten (Kompostierung) konnte es sich am Markt nicht durchsetzen (TÄNZER 2000).

1994 betrug das Jahresvolumen an diesen Polymeren 300 t, verglichen mit etwa 85.000.000 t für Polyethylen. Die heutige weltweite Produktionskapazität für PHA beträgt 600 t/Jahr (siehe auch LEE und PARK 2002a).

Weltweit wird, um den Preis des Produktes zu senken, nach preiswerten Rohstoffen, effizienteren Prozessen in Hinblick auf die Raum-Zeit-Ausbeute oder anderen Produzenten gesucht (RAMSAY et al. 1986; PAGE 1989; ACKERMANN und BABEL 1997, 1998; POIRIER et al. 1992; vgl. LEE und PARK 2002a, b; WEUSTHUIS et al. 2002).

Mit der Verfügbarkeit bakterieller *phb*-Biosynthesegene und der Anwendung gentechnischer Methoden für eukaryotische Systeme könnten auch höhere Organismen, wie z. B. Hefen, mit der Fähigkeit zur PHA-Synthese ausgestattet und damit die Wirtschaftlichkeit der Synthese und die Konkurrenzfähigkeit des Produktes verbessert werden. Auch Pflanzen (z. B. *Arabidopsis thaliana*) konnten durch Übertragung der *phb*-Gene von *Ralstonia eutropha* zur Synthese von PHB befähigt werden (POIRIER et al. 1992; NAWRATH et al. 1994; POIRIER und NAWRATH 1999). Der Durchbruch zu einer wirtschaftlichen Biopolymer-Synthese mittels Pflanzen ist jedoch bis heute nicht gelungen, da die zusätzliche Expression der bakteriellen Gene zu Wachstumsstörungen, Ausfällen bei der Samenbildung oder sogar letalen Defekten führte (vgl. POIRIER und GRUYS 2002).

Hefen, die traditionell in biotechnischen Verfahren eingesetzt werden, sollten diesbezüglich Vorteile aufweisen. Bei ihnen sollte eine PHA-Synthese stabil etabliert werden können. Erste Ergebnisse zur PHA-Synthese in *Saccharomyces cerevisiae* oder *Pichia pastoris* sind bekannt (LEAF et al. 1996; POIRIER et al. 2001, 2002; BREUER et al. 2002a,b). Sie können als hoffnungsvolle Grundlage für die weitere Optimierung angesehen werden.

Hefen als „Fabriken“ für ihnen fremde Verbindungen sind attraktiv. Technische Prozesse mit Hefen sind im allgemeinen sicher und robust. Hefen selbst sind von wenigen Ausnahmen abgesehen nicht pathogen und bilden keine Endotoxine, stellen keine potentielle Gefahr für Mensch und Umwelt dar. Es existieren Kenntnisse und Erfahrungen in Bezug auf Physiologie und Stoffwechselregulation. Diese Kenntnisse können für Stoffumwandlungen oder Produktherstellungen genutzt werden. Verschiedene Kultivierungssysteme inkl. Medien sind für Synthesen unter Nutzung von Hefen auf ihre Eignung geprüft worden. Damit können technische Prozesse in einem hohen Maße reproduzierbar ermöglicht werden. Ferner tolerieren Hefen im Allgemeinen sehr hohe Substrat- und Produktkonzentrationen und lassen sich zu sehr hohen Dichten vermehren. Sie werden bereits für die Synthese von Proteinen verwendet, darunter auch solchen mit katalytischen Aktivitäten (Tab. 4). Hefezellen sind auch größer und bieten daher Vorteile bei der Aufarbeitung. Hefen sind metabolisch und ernährungsphysiologisch flexibel genug, so dass die Gebrauchseigenschaften des Biopolymers zusätzlich, wie bei Bakterien

auch, auf dem Wege der Synthese durch Verwendung verschiedener oder mehrerer Substrate variiert werden können, und sie sind als Wildtypen ökologisch unbedenklich.

Die prokaryotischen Expressionssysteme, wie beispielsweise die von *Escherichia coli*, erlauben hohe Transkriptions- und Translationsraten für Fremdgene, jedoch fehlen dem Produkt einige charakteristische Eigenschaften; so sind beispielsweise Disulfidbrücken an der falschen Position oder N-terminale Abschnitte verändert. Bakterien sind außerdem nicht in der Lage, posttranslationale Modifikationen durchzuführen. Hefen haben diese Nachteile nicht. Zudem haben bestimmte Hefen das Potential zur Sekretion hoher Konzentrationen an rekombinanten Proteinen. Mittlerweile existieren zahlreiche Expressionssysteme bei *S. cerevisiae* sowohl für intra- als auch extrazelluläre Proteine, jedoch werden auch andere Hefen als Expressionswirte verwendet, wie z. B. *Pichia pastoris* oder *Hansenula polymorpha*.

Beispiele für heterologe Proteine aus Hefen zeigt die nachfolgende Tabelle (vgl. Übersichten: ROMANOS et al. 1992; GELLISSEN et al. 1995).

Tabelle 4: Expression heterologer Proteine in Hefen

Hefe	Protein
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	humanes α -Interferon
	humanes γ -Interferon
	humanes α -1 Antitrypsin
	Hepatitis B Oberflächen-Antigen
	Insulin
	β -Endorphin
	Pflanzen Thaumatin
	Weizen α -Amylase
	<i>Pichia pastoris</i>
Streptokinase	
humaner epidermaler Wachstumsfaktor	
humaner Tumor Nekrose Faktor	
Tetanus C	
Aprotinin	
<i>Hansenula polymorpha</i>	Hepatitis B Oberflächen-Antigen
	HSA
	α -Galactosidase
	Glucoamylase
	β -Lactamase
	Aminooxidase
	Hirudin

2 Zielstellung

Alternativ zur Produktion von PHB mit prokaryotischen Organismen ist das Ziel dieses Projekts, Hefen so zu modifizieren, dass sie zur Synthese von PHB verwendet werden können. Es standen die Hefen *Arxula adenivorans* und *Debaryomyces hansenii* im Mittelpunkt, wobei Spezies der Gattung *Debaryomyces* für ihre Fähigkeit zur Fettakkumulation bekannt sind. Sie sollten auf Grund ihres Stoffwechsels für die Speicherstoffsynthese prädestiniert sein.

3 Material und Methoden

3.1 Organismen und Plasmide

(s. auch Tabelle 5)

- Hefen: *S. cerevisiae* CI3ABYS86 (*leu2 ura3 his pra1 prb1 prc1 cps*)
S. cerevisiae INVSC1 (*leu2 ura3 his3 trp1* – Invitrogen/USA)
A. adenivorans LS3 (Wildtyp - KUNZE & KUNZE 1994)
A. adenivorans 135 (Mutante mit veränderten Dimorphismusverlauf - WARTMANN et al. 2000)
A. adenivorans G1211 (*aleu2* - SAMSONOVA et al. 1996)
A. adenivorans T1 (*icl* – IPK)
D. hansenii H158 (UFZ)
D. polymorphus H120 (UFZ)
- Bakterien: *E. coli* INV α F' (Invitrogen/USA)
E. coli DH5 α (HANAHAN 1983)
E. coli TOPO10' (Invitrogen/USA)
- Plasmide: pVK100::7.22 (*phaC_{Mex}*) (KNAUF und NESTER 1982)
pVK101::PP1 (*phbA_{Re}*, *phbB_{Re}*, *phbC_{Re}*) (SCHUBERT et al. 1988)

3.2 Medien

3.2.1 SD-Medium

- 7 g Yeast Nitrogen Base without Amino Acids
 - 20 g Glucose
- ⇒ in 1 l A. dest. lösen

Konzentration der entsprechenden Aminosäuren im Medium:

- 1 mM Histidin, 1 mM Tryptophan und/oder 1 mM Leucin

3.2.2 Hefe Minimal Medium (HMM)

- 3,7 g NaNO₃
- 8,4 g KH₂PO₄
- 1,0 g MgSO₄
- 2,0 mg Ca(NO₃)₂ x 4 H₂O
- 0,2 mg FeCl₃ x 6 H₂O
- 1 ml Komponente II
- 2 % C-Quelle

⇒ in 1 l A. dest. lösen

⇒ Zugabe von 1 ml Komponente II

⇒ autoklavieren

⇒ unmittelbar vor Gebrauch 1 ml Vitamin-Mix pro 200 ml HMM zugeben

Komponente II:

- 50 mg H₃BO₄
- 10 mg CuSO₄ x 4 H₂O
- 10 mg KJ
- 40 mg MnSO₄ x 4 H₂O
- 40 mg ZnSO₄ x 7 H₂O
- 20 mg Na₂MoO₄
- 10 mg CoCl₂

⇒ alles in 100 ml A. dest. lösen

Vitamin-Mix:

- 40 mg Ca-D-Pantothemat
- 40 mg Thiamindichlorid
- 10 mg Nikotinsäure
- 40 mg Pyridoxin
- 0,4 mg Biotin
- 400 mg Inosit

⇒ alles in 100 ml A. dest. lösen und steril filtrieren

3.2.3 Komplexmedium für Hefen (YEPD)

- Hefeextrakt 10 g
- Pepton 20 g
- Dextrose 20 g
- A. bidest. ad 1000 ml

3.2.4 LB-Medium (SAMBROOK et al. 1989)

- Trypton 10 g
- Hefeextrakt 5 g
- NaCl 10 g
- A. bidest. ad 1000 ml, pH 7,0

Zusätze pro 100 ml Medium:

X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid): 100 μ l von Stammlösung 40 mg/ml
Dimethylformamid
Ampicillin: 50 μ l von Stammlösung 100 μ g/ml

3.3 Kultivierung

Die Hefen wurden aerob in 500 ml-Schüttelkolben und im Fermentor „batchwise“ vermehrt (Tab. 5). Die Schüttelkolben wurden mit 50 ml Inokulum aus der exponentiellen Wachstumsphase einer Vorkultur und 100 ml SD-Medium, Minimalmedium für Hefen oder HMM (TANAKA et al. 1967) unter Zusatz der entsprechenden Aminosäuren beimpft. Die Kultivierung erfolgte bei 30 °C(*) auf einem Rotationschüttler.

Tabelle 5: Übersicht über die Kultivierung der im Bericht beschriebenen Hefestämme

Hefe	Kultivierung	
<i>D. polymorphus</i> H120	YEPD	30°C, 24 h
<i>D. hansenii</i> H158	YEPD	30°C, 24 h
<i>S. cerevisiae</i> CI3ABYS86	YEPD	30°C, 24 h
<i>S. cerevisiae</i> INVSc1	SD + His + Trp + Leu + Ura + Gal	30°C, 24 h
<i>A. adenivorans</i> LS3	YEPD	30°C, 24 h
<i>A. adenivorans</i> 135	YEPD	30°C, 24 h
<i>S. cerevisiae</i> CI3ABYS86/pYES2-phbA	SD + Gal + His + Leu + Trp	30°C, 24 h
<i>S. cerevisiae</i> CI3ABYS86/pYES2-phbB	SD + Gal + His + Leu + Trp	30°C, 24 h
<i>S. cerevisiae</i> CI3ABYS86/pYES2-phaC	SD + Gal + His + Leu + Trp	30°C, 24 h
<i>S. cerevisiae</i> CI3ABYS86/pESC-Leu-phbA-phbB-pYES2-phaC 1	SD + Gal + His + Trp	30°C, 24 h
<i>S. cerevisiae</i> CI3ABYS86/pYES2-phbC (1 - 5)	SD + His + Trp + Leu + Gal	30°C, 24 h
<i>S. cerevisiae</i> CI3ABYS86/pESC-Leu-phbA-phbB- pYES2-phbC (1 - 5)	SD + His + Trp + Gal	30°C, 24 h
<i>S. cerevisiae</i> CI3ABYS86/pESC-Ura-phbC-Fox2 (1 - 5)	SD + His + Trp + Leu + Gal	30°C, 24 h
<i>S. cerevisiae</i> INVSc2/pESC-Leu-phbA-phbB-pYES2-phaC	SD + Gal + His	30°C, 24 h
<i>S. cerevisiae</i> INVSc2/pYES2-phaC	SD + Gal + His	30°C, 24 h
<i>S. cerevisiae</i> INVSc2-MAT α /pYES2-phaC (1 - 4)	SD + Gal + His	30°C, 24 h
<i>S. cerevisiae</i> INVSc1/pYES2-phaC (1 - 5)	SD + Gal + His + Trp + Leu	30°C, 24 h
<i>S. cerevisiae</i> INVSc1/pESC-Leu-phbA-phbB-pYES2-phaC (1 - 5)	SD + Gal + His + Trp	30°C, 24 h
<i>S. cerevisiae</i> INVSc1/pESC-Ura-phbC-Fox2 (1 - 5)	SD + Gal + His + Trp + Leu	30°C, 24 h
<i>S. cerevisiae</i> INVSc1/pYES2-phbC (1 - 3)	SD + Gal + His + Trp + Leu	30°C, 24 h
<i>D. polymorphus</i> H120/pAL-HPH1-phbC (1 - 2)	YEPD + Hygromycin	30°C, 24 h
<i>D. hansenii</i> H158/pAL-HPH1-phbC (1)	YEPD + Hygromycin	30°C, 24 h
<i>D. polymorphus</i> H120/pAL-HPH1-phbC-pAL-HPH1-phbA-phbB (1 - 5)	YEPD + Hygromycin	30°C, 24 h
<i>D. hansenii</i> H158/pAL-HPH1-phbC-pAL-HPH1-phbA-phbB (1 - 5)	YEPD + Hygromycin	30°C, 24 h
<i>A. adenivorans</i> LS3/pAL-HPH1-ATG-phbB (1 - 2)	YEPD + Hygromycin	30°C, 24 h
<i>A. adenivorans</i> 135/pAL-HPH1-ATG-phbB (4 - 6)	YEPD + Hygromycin	30°C, 24 h
<i>A. adenivorans</i> LS3/pAL-HPH1-phbA-phbB (1 - 2)	YEPD + Hygromycin	30°C, 24 h
<i>A. adenivorans</i> 135/pAL-HPH1-phbA-phbB (3 - 5)	YEPD + Hygromycin	30°C, 24 h
<i>A. adenivorans</i> 135/pAL-HPH1-phbC (1 - 5)	YEPD + Hygromycin	30°C, 24 h
<i>A. adenivorans</i> T1/pAL-HPH1-phbC (6 - 10)	YEPD + Hygromycin	30°C, 24 h
<i>A. adenivorans</i> G1211/pAL-HPH1-phbA-phbB-pAL-Leu2m-phbC (1 - 3)	HMM + Hygromycin + 2 % Glucose	30°C, 24 h
<i>A. adenivorans</i> G1211/pAL-Leu-phbC (1 - 5)	HMM + 2 % Glucose	30°C, 24 h
<i>A. adenivorans</i> LS3/pAL-HPH1-phbC (1 - 2)	YEPD + Hygromycin	30°C, 24 h
<i>A. adenivorans</i> T1/pAL-HPH1-phbA-phbB-pAL-HPH1-phbC 3	YEPD + Hygromycin	30°C, 24 h
<i>R. eutropha</i> H 16	NB	30°C, 24/48 h
<i>E. coli</i> TOPO10'	LB	37°C, 24 h
<i>E. coli</i> S17-1	LB	37°C, 24 h
<i>E. coli</i> S17-1[pVK100]	LB + Tc	37°C, 24 h
<i>E. coli</i> S17-1[pVK100::7.22]	LB + Tc	37°C, 24 h
<i>E. coli</i> S17-1[pVK101::PP1]	LB + Tc	37°C, 24 h

Zur Vermehrung im Fermentor wurde ein 1,5 l Laborfermentor Biostat® MD Twin (B. Braun Biotech International, Melsungen, BRD) bei 25°C(*) und pH 7,0 oder ein 15 l Bioreaktor (Techfors ATR, Inc., USA) bei 30°C(*) und pH 5,0 eingesetzt. Die pH-Regulation erfolgte mit 1 N NaOH bzw. 1 N H₂SO₄, die Begasung mit einem Luftstrom von 1,2 l/min bei einer Rührerdrehzahl von bis zu max. 1500 Umdrehungen pro min. Die Inokulum-Menge wurde so berechnet, dass eine Extinktion bei 700 nm von etwa 0,1 zu Fermentationsbeginn vorlag. Die Probenahme erfolgte bis zu 20 ml Kulturvolumina, anschließend wurden die Zellen von der Kulturflüssigkeit durch Zentrifugation bei 13 800 x g bei 4 °C über 10 min sedimentiert.

Zur Sauerstoff-Limitation des Wachstums wurde die Begasung auf 2 – 5 % Gelöst-Sauerstoff reduziert.

* 30°C sind nicht das Temperaturoptimum für die Kultivierung; sie sind technisch begründet. Unterschiede zwischen 25°C und 30°C sind vernachlässigbar.

3.4 Analysen

Die optische Dichte, das Zelltrockengewicht und die Ammonium-Stickstoffkonzentration wurden ermittelt, wie bei BREUER et al. (1995) beschrieben.

3.4.1 Bestimmung des PHB-Gehaltes in mikrobieller Biomasse

Der PHB-Gehalt wurde nach RIIS und MAI (1988) bestimmt. Zur Durchführung einer salzsauren Propanolyse wurden 5 – 10 mg Bakterientrockensubstanz in einem druckdicht verschließbaren Probengefäß mit 1 ml Dichlorethan (DCE), 1 ml salzsaurem Propanol (1 Volumen konz. HCl + 4 Volumen Propanol) und 100 µl internem Standard (2,0 g Benzoesäure in 50 ml Propanol) versetzt und 2 h bei 100 °C inkubiert. DCE diente in diesem Ansatz, in dem Extraktion und Alkoholyse gleichzeitig verliefen, als Extraktionsmittel. Nach Abkühlen der Probe wurde zum Auswaschen der Säure 4 ml H₂O zugesetzt und diese 20 – 30 sec geschüttelt. Die schwere DCE/Propanolphase mit dem entstandenen β-Hydroxybuttersäurepropylester wurde direkt injiziert. Die Bestimmung erfolgte am Shimadzu GC-14 AX mit Integrator C-R4AX Chromatopac an einer Permabond FFAP-Säule (25 m x 25 mm) mit FID. Folgende Betriebsbedingungen wurden am Gerät eingestellt:

- Injektionstemperatur: 250°C
- Säulentemperatur: 150°C
- Detektortemperatur: 250°C
- Trägergas: N₂

⇒ Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei 0,5 % PHB (g/g Trockengewicht).

Zur Bestimmung des Polymergehaltes in *A. adenivorans* und *S. cerevisiae* INVSc1 Transformanten wurde ein HP 6890 GC-System gekoppelt mit HP 5973 Massenselektionsdetektor genutzt, das im Vergleich zu gaschromatographischen Messungen sensitivere Analysen erlaubt.

Die Untersuchungen wurden im SIM-Modus („selected ion monitoring“) an einer Permabond FFAP-Säule (25 cm x 25 mm) durchgeführt. Folgende Betriebsbedingungen wurden am Gerät eingestellt:

- Injektionstemperatur: 220°C
- Säulentemperatur: Temperaturprogramm: 2 min 100°C
10°C/min auf 175°C
- MS-Detektortemperatur: 250°C
- MS-Source: 230°C
- MS-Quadropol: 150°C
- Trägergas: He

Tabelle 6: MS Sim Parameter

	Group ID	Zeit	Auflösung
PHB	SIM Ion 87 + 131	ab 2.00	gering
PHV	SIM Ion 89 + 101	ab 7.10	gering
Benzoesäure	SIM Ion 105 + 123	ab 7.80	gering

3.4.2 Bestimmung von Glucose, Galactose und Sorbit

Die Analyse der Probenüberstände erfolgte mittels HPLC am Shimadzu LC10 an einer Nucleosil Carbohydrate Säule (Nucleogel 300 OA - Macherey-Nagel, Düren) mittels RI-Detektor. Als Elutionsmittel wurde 0,01 N Schwefelsäure eingesetzt. Die Säulentemperatur betrug 70°C.

Die Proben konnten direkt injiziert (Schleife 20 µl) und über die Methode des externen Standards ausgewertet werden.

3.5 Gentechnische Methoden

Die Transformation, die Polymerasekettenreaktion (PCR), die Reinigung der PCR-Produkte, die Klonierung, die Isolierung von Plasmid-DNA, die Restriktionsanalyse, die Agarosegelelektrophorese zur Trennung von DNA-Fragmenten, die Extraktion von DNA aus Agarosegelen, der Southern-Transfer, die DIG-Markierung von DNA-Fragmenten sowie die Hybridisierung mit DIG Easy Hyb und die Sequenzierung von DNA erfolgte, wie bereits beschrieben (Zwischenbericht 2000).

3.6 Bestimmung der Enzymaktivitäten

3.6.1 Zellaufschluss

Zur Bestimmung von Enzymaktivitäten wurden die Hefezellen mittels Ultraschall aufgeschlossen. Die Desintegration erfolgte im Ultraschall-Desintegrator Braun-Labsonic U als ein dreistufiger Prozess (3 min Aufschluss – 0,5 min Pause – 2 min Aufschluss – 0,5 min Pause – 1 min Aufschluss) bei etwa 200 W (Leistungsabgabe des Generators).

Nach Zentrifugation der desintegrierten Zellen (30 min, 13 800 x g, 4°C) befanden sich die löslichen Proteine im Überstand und die nicht aufgeschlossenen Zellen und Zelltrümmer im Sediment.

3.6.2 Messung

Die Aktivitäten der β -Ketothiolase (NISHIMURA et al. 1978) und der NADPH-abhängigen Acetoacetyl-CoA-Reduktase (LYNEN und WIELAND 1955) wurden im zellfreien, die der PHB-Synthase (VALENTIN und STEINBÜCHEL 1994) im nicht abzentrifugierten Homogenat bestimmt.

Die Enzymaktivitäten wurden jeweils bei Raumtemperatur in Küvetten mit einer Schichtdicke von $d = 1$ cm gemessen. Die Reaktionen sind durch Zugabe der jeweils zuletzt aufgeführten Verbindung gestartet worden. Die Angabe der Enzymaktivitäten erfolgte in internationalen Einheiten (U), wobei 1 U als 1 μ mol umgesetztes Substrat pro min definiert ist. Spezifische Enzymaktivitäten wurden in U/mg Protein angegeben.

3.6.2.1 β -Ketothiolase

88,570 mM	Tris/HCl-Puffer, pH 8,2
84,320 mM	MgCl ₂
0,074 mM	Acetoacetyl-CoA
0,010 ml	Rohextrakt
0,045 mM	CoA

$\lambda = 303$ nm; $\varepsilon = 23,5$ cm²/ μ mol; $V_{\text{ges}} = 0,70$ ml
Gemessen wurde die Rückreaktion.

3.6.2.2 NADPH-abhängige Acetoacetyl-CoA-Reduktase

96,000 mM	Tris-HCl, pH 7,0
0,185 mM	NADPH
0,010 ml	Rohextrakt
0,034 mM	Acetoacetyl-CoA

$\lambda = 340$ nm; $\varepsilon = 6,22$ cm²/ μ mol, $V_{\text{ges}} = 0,78$ ml

3.6.2.3 PHB-Synthase

1,00 mM	5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoat)
1,17 mM	3-Hydroxy-Butyryl-CoA

Die Reaktion wird durch Zusatz von 0,005 ml nicht zentrifugiertem Rohextrakt (Meßvolumen 0,5 ml) gestartet.

$\lambda = 412$ nm; $\varepsilon = 13,6$ cm²/ μ mol

3.7 Reinigung der NADPH-abhängigen Acetoacetyl-CoA-Reduktase

Die Reinigung erfolgte, wie bereits beschrieben (Zwischenbericht 2000). Sie umfasste 3 Schritte.

1. Schritt: Herstellung von Hefezell-Rohextrakten
2. Schritt: Chromatographie an Q-Sepharose
3. Schritt: Ammoniumsulfatfällung und Dialyse

Zur Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurden diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophoresen (SDS-PAGE) nach LAEMMLI (1970) durchgeführt. Die Färbung der aufgetrennten Proteine erfolgte mit einer Silberfärbung, modifiziert nach BLUM et al. (1987) unter Nutzung eines Automated Gel Stainer (Hofer).

3.8 Chemisch-enzymatischer Aufschluss der Biomasse zur Freisetzung von PHB

Dieser Aufschluss besteht aus zwei aufeinander folgenden Schritten: dem chemischen Schritt, bestehend aus Vorwäsche und chemischem Schritt sowie dem enzymatischen Schritt, bestehend aus der Vorwäsche, dem Lipase-, dem Papain-Schritt sowie der Nachwäsche.

3.8.1 Chemischer Schritt

3.8.1.1 Vorwäsche

5 g Biotrockenmasse wurden in 50 ml Erlenmeyerkolben eingewogen und auf 50 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt und resuspendiert. Der pH-Wert wurde auf pH 8 eingestellt. Der Kolben wurde mit einem Gärrohr verschlossen und unter Stickstoffatmosphäre gesetzt. Bei 85°C im Wasserbad ist der Kolbeninhalt 1 h gerührt worden. Nach dem Abzentrifugieren der Biomasse wurde im Überstand sowie im Sediment eine Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl durchgeführt.

3.8.1.2 Chemischer Schritt

Das Biofeuchtmasse-Pellet aus 3.8.1.1 wurde auf 50 ml demineralisiertes Wasser resuspendiert und der pH-Wert auf 8,5 eingestellt. Die Suspension wurde mit 500 mg Natriumdithionit versetzt, schnell unter eine Stickstoffatmosphäre gesetzt und bei 85°C 1 h schnell gerührt. Danach ist die Biomasse abzentrifugiert worden und es erfolgte eine Stickstoffbestimmung im Überstand.

3.8.2 Enzymatischer Schritt

3.8.2.1 Vorwäsche

Die Biofeuchtmasse aus 3.8.1.2 wurde auf 50 ml demineralisiertes Wasser aufgefüllt und resuspendiert. Der pH-Wert ist auf 6,0 eingestellt worden. Nachdem der Kolben mit einem Gärrohr verschlossen wurde, ist er unter einer Stickstoffatmosphäre bei 85°C im Wasserbad 1h gerührt worden. Die Biomasse wurde anschließend abzentrifugiert und es erfolgte eine Stickstoffbestimmung im Überstand und Sediment.

3.8.2.2 Lipase-Schritt

Das nach der Vorwäsche nach 3.8.2.1 erhaltene Biofeuchtmasse-Pellet wurde auf 50 ml demineralisiertes Wasser resuspendiert und der pH-Wert auf 6,0 eingestellt. 250 mg Lipolase (Spinnrad Biozym F) wurden zugegeben und der Kolbeninhalt 1 h unter Stickstoff bei 37°C im Wasserbad gerührt.

3.8.2.3 Papain-Schritt

Anschließend wurde die resuspendierte Biomasse mit 250 mg Papain sowie 100 mg Lysozym versetzt und der pH-Wert auf 6,0 eingestellt. Unter Stickstoff wurde zunächst 30 min bei 40°C, dann 15 min bei 55°C und schließlich 30 min bei 75°C bis 85°C gerührt. Im Anschluss daran wurde durch eine "warme" Zentrifugation die Biomasse erhalten. Im Zentrifugationsüberstand wurde Stickstoff bestimmt.

3.8.2.4 Nachwäsche

Die Biomasse aus dem Papain-Schritt ist in 50 ml demineralisiertem Wasser resuspendiert und abzentrifugiert worden. Sowohl im Überstand, als auch im Sediment erfolgte jeweils eine Stickstoffbestimmung.

3.9 Kjeldahl-Aufschluss, Destillation und Titration

Analog zu 3.8.2.1 wurden in die Aufschlusskolben 2ml der zu untersuchenden Biomasse sowie je eine Spatelspitze Wieninger Reaktionsgemisch und *ferrum reductum* gegeben. Es wurden 10 ml konz. H₂SO₄ hinzugefügt. Im Anschluß daran sind die Proben bei 370°C gekocht (Siedesteinchen) worden, bis eine klare Flüssigkeit entstand (etwa 2 Stunden). Nach dem Abkühlen konnten die Proben in die Büchi- Apparatur überführt werden, wobei 4 ml der Aufschlusslösung bei 5 min in 10 ml vorgelegte H₃BO₃ (+ 5 Tropfen Tashiro) destilliert wurden. Nach der Destillation wurde die vorgelegte H₃BO₃ mit 0,01 mol/l H₂SO₄ titriert.

3.10 Färbung mit Nilblau A

Nilblau A wird eingesetzt zur Färbung lipidähnlicher Substanzen (und damit auch PHB) innerhalb der Hefezellen. Die Zellen wurden 48 h auf Vollnährmedium (10 ml) mit Zusatz von 10 µl Hygromycin B-Lösung (Roche) kultiviert. Danach wurde eine 1 ml-Probe 5 min bei 2 100 g und 4°C abzentrifugiert und einmal mit Aqua dest. gewaschen. Zur Färbung wurde das Sediment in 2 ml Eppendorf-Gefäßen mit 1 ml einer 1 %igen wässrigen Nilblau A-Lösung (Sigma Aldrich) vermischt. Nach 15 minütigen Schütteln (100 g, 55°C) ist 5 min bei 2 100 g zentrifugiert worden. Das Sediment wurde mit 2 ml 8 % Essigsäure gewaschen und erneut zentrifugiert (5 min, 2 100 g). Das Sediment ist zweimal mit je 2 ml Aqua dest gewaschen und jeweils 5 min bei 2 100 g zentrifugiert worden. Die Zellen wurden danach in 1 ml Aqua dest. suspendiert. Die Analyse erfolgte unter Fluoreszenzlicht (460 nm, Gelbfilter).

4 Resultate

4.1 Expression bakterieller *phb*-Biosynthesegene in *Saccharomyces cerevisiae*

Zunächst wurde *S. cerevisiae* als Modellobjekt zur Expression bakterieller *phb*-Gene genutzt. Dazu waren die Gene *phbA* (β -Ketothiolase), *phbB* (Acetoacetyl-CoA-Reduktase) und *phbC* (PHB-Synthase) von *Ralstonia eutropha* bzw. *phaC* (PHB-Synthase) von *Methylobacterium extorquens* in *S. cerevisiae* zu transformieren und dort zur Expression zu bringen.

Mit Hilfe der PCR wurden die *R. eutropha* Gene *phbA*, *phbB* und *phbC* und das *phaC*-Gen von *M. extorquens* amplifiziert, in den Vektor pCR2.1 integriert, einzeln bzw. in Kombination in die *S. cerevisiae* Expressionsplasmide pYES2 bzw. pESC-LEU rekloniert und in *S. cerevisiae* CI3ABYS86 transformiert.

4.1.1 Expression des *phbA*-Gens

Das *phbA*-Gen wurde für die Expression in *S. cerevisiae* in das Expressionsplasmid pYES2 eingebaut. Dazu musste das *phbA*-Gen enthaltene DNA-Fragment mittels PCR mit den Restriktionsorten *Hind*III und *Bam*HI flankiert werden. Das *Hind*III-*Bam*HI-Fragment ließ sich anschließend direkt in das Plasmid pYES2 zwischen den *GAL*1-Promotor und den *CYC*1-Terminator integrieren (Abb. 3).

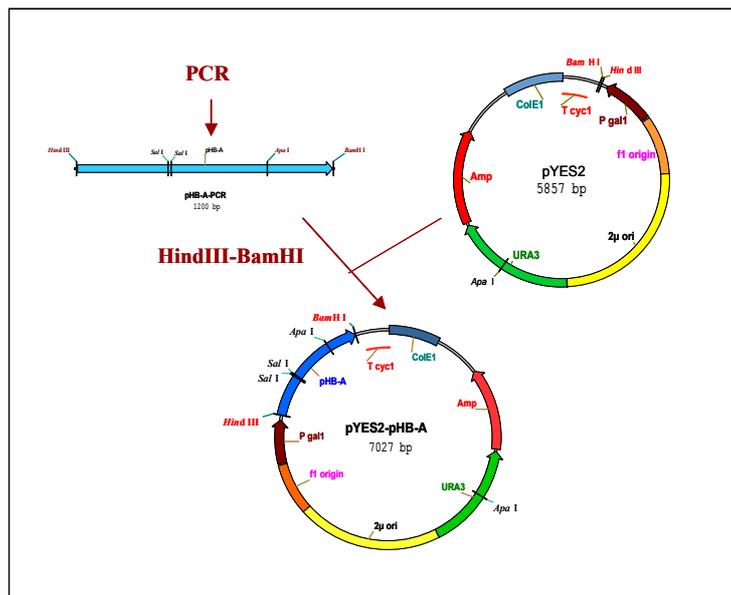


Abbildung 3: Konstruktionsschema für das Plasmid pYES2-phbA

Das Plasmid pYES2-phbA wurde in *S. cerevisiae* CI3ABYS86 (*leu2 ura3 his pra1 prb1 prc1 cps*) nach der von DOHMEN et al. (1991) bzw. KUNZE und KUNZE (1996) beschriebenen Methode transformiert und die erhaltenen Transformanten über die Komplementation der *ura3*-Mutation durch das auf dem Expressionsplasmid lokalisierte *URA3*-Gen selektiert.

Die Hefetransformanten *S. cerevisiae* CI3ABYS86/pYES2-phbA wurden auf Expression des *phbA*-Gens geprüft. Dazu wurden sie für 24 h in SD-Medium mit 2 % Glucose als C-Quelle bei 30°C kultiviert. Unter diesen Bedingungen ist der *GAL*1-Promotor nicht aktiv, d.h. es wird von den transgenen Hefestämmen keine heterologe β -Ketothiolase gebildet. Um nun eine Expression des *phbA*-Gens zu erreichen, muss der *GAL*1-Promotor aktiviert werden. Dazu wurde die Kultur *S. cerevisiae* CI3ABYS86/pYES2-phbA auf ein SD-Medium mit 2 % Galactose „geschiftet“ und für weitere 48 h bei 30°C kultiviert. Unter diesen Bedingungen sollten die transgenen Hefezellen sowohl *phbA*-Transkript als auch heterologe β -Ketothiolase bilden. Zur Bestimmung der β -Ketothiolase-Aktivität wurden die Zellen geerntet und mittels Ultraschall aufgeschlossen. β -Ketothiolase konnte sowohl im Ausgangsstamm *S. cerevisiae* CI3ABYS86 als auch in der Transformante *S. cerevisiae* CI3ABYS86/pYES2-phbA nachgewiesen werden. Vergleicht man die spezifischen Aktivitäten, so ist diese in *S. cerevisiae* CI3ABYS86/pYES2-phbA ca. 2fach höher (Tab.7).

Tabelle 7: Nachweis der β -Ketothiolase-Aktivität in *S. cerevisiae* CI3ABYS86/pYES2-phbA

Hefe	β -Ketothiolase-Aktivität [mU/mg]
<i>S. cerevisiae</i> CI3ABYS86	1,8
<i>S. cerevisiae</i> CI3ABYS86/pYES2-phbA12	3,2

4.1.2 Expression des *phbB*-Gens

Für die Expression des *phbB*-Gens in *S. cerevisiae* konnte ebenfalls das Expressionsplasmid pYES2 genutzt werden. Dazu wurde das *phbB*-Gen enthaltene DNA-Fragment mit den Restriktionsorten *Hind*III und *Bam*HI flankiert und als *Hind*III-*Bam*HI-Fragment in das Plasmid pYES2 zwischen den *GAL*1-Promotor und den *CYC*1-Terminator integriert (Abb. 4).

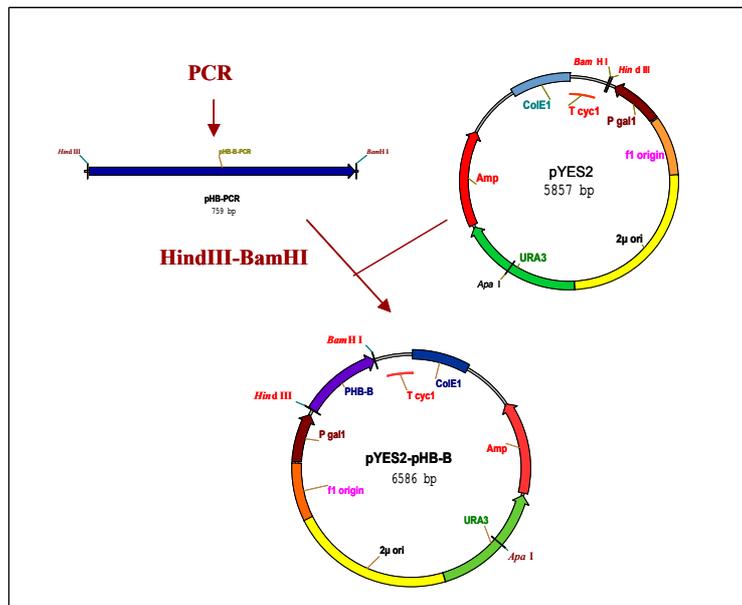


Abbildung 4: Konstruktionsschema für das Plasmid pYES2-phbB

Das Plasmid pYES2-phbB wurde in *S. cerevisiae* CI3ABYS86 transformiert und die erhaltenen Transformanten selektiert, wie für das Plasmid pYES2-phbA beschrieben.

Tabelle 8: Nachweis der NADPH-abhängigen Acetoacetyl-CoA-Reduktase-Aktivität in *S. cerevisiae* CI3ABYS86/pYES2-phbB

Hefe	NADPH-abhängige Acetoacetyl-CoA-Reduktase-Aktivität [mU/mg]
<i>S. cerevisiae</i> CI3ABYS86	0,2
<i>S. cerevisiae</i> CI3ABYS86/pYES2-phbB 6	1,9
<i>S. cerevisiae</i> CI3ABYS86/pYES2-phbB 7	0,5
<i>S. cerevisiae</i> CI3ABYS86/pYES2-phbB 8	0,4
<i>S. cerevisiae</i> CI3ABYS86/pYES2-phbB 9	0,5
<i>S. cerevisiae</i> CI3ABYS86/pYES2-phbB 10	0,7

S. cerevisiae besitzt eine eigene NADPH-abhängige Acetoacetyl-CoA-Reduktase. Nach Induktion der übertragenen Gene ließ sich sowohl im Ausgangsstamm *S. cerevisiae* CI3ABYS86 als auch in der Transformante *S. cerevisiae* CI3ABYS86/pYES2-phbB Aktivität der NADPH-abhängigen Acetoacetyl-CoA-Reduktase nachweisen, wie in Tabelle 8 gezeigt wird. Werden beide Aktivitäten miteinander verglichen, so weisen die Transformanten *S. cerevisiae* CI3ABYS86/pYES2-phbB 5-10fach höhere NADPH-abhängige Acetoacetyl-CoA-Reduktase-Aktivitäten auf (Tab. 8).

4.1.3 Reinigung der NADPH-abhängigen Acetoacetyl-CoA-Reduktasen aus *S. cerevisiae* CI3ABYS86/pESC-Leu-phbB

Die durchgeführten Proteinreinigungsschritte und die erhaltenen Ergebnisse sind in der Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Reinigung der NADPH-abhängigen Acetoacetyl-CoA-Reduktasen aus *S. cerevisiae* CI3ABYS86/pESC-Leu-phbB

Schritt	Gesamtprotein [mg]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Reinigungsfaktor [fach]
Rohextrakt	10,40	0,84	1,00
Q-Sepharose			
1	0,84	5,64	6,70
2	0,38	2,72	3,20
Ammoniumsulfatfällung und Dialyse			
1	0,10	7,33	8,70
2	0,05	18,84	2240,00

Bei der Elution von der Sepharose-Q-Säule mit einem linearen KCl-Gradienten von 0 – 1 M wurden zwei Aktivitätspeaks gefunden. Während die aktive Fraktion A bei einer KCl-Konzentration von 0,225 M eluierte, ist die zweite aktive Fraktion B bei einer KCl-Konzentration von 0,75 M gewonnen worden.

Die zwei gereinigten aktiven Fraktionen konnten mittels PAGE als zwei unterschiedliche Proteine vorläufig charakterisiert werden (Abb. 5). Weitergehende Untersuchungen, auch unter Nutzung immunologischer Techniken, sollten zum endgültigen Nachweis durchgeführt werden.

Die nach dem gleichen Schema durchgeführte Reinigung des Enzyms aus dem Wildtyp *S. cerevisiae* CI3ABYS86 ergab nur eine aktive Fraktion, die bei 0,81 M KCl eluierte. In der Tabelle 10 sind die durchgeführten Reinigungsschritte und die erhaltenen Ergebnisse zusammengefasst.

Tabelle 10: Reinigung der NADPH-abhängigen Acetoacetyl-CoA-Reduktase aus *S. cerevisiae* CI3ABYS86

Schritt	Gesamtprotein [mg]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Reinigungsfaktor [fach]
Rohextrakt	4,58	0,16	1
Q-Sepharose	0,44	9,56	5937
Ammoniumsulfatfällung und Dialyse	0,04	6,71	4163

Es ist zu vermuten, dass die aktive Fraktion B die Reduktase aus *S. cerevisiae* CI3ABYS86 darstellt, während die aktive Fraktion A die heterologe Reduktase aus *R. eutropha* repräsentiert.

Die Isolation des rekombinanten Proteins zusätzlich zu der in *Saccharomyces* vorhandenen NADPH-abhängigen Acetoacetyl-CoA-Reduktase war ein weiterer Beweis für die Expression des *phbB*-Gens aus *R. eutropha* in *S. cerevisiae* CI3ABYS86.

Weiterführende Untersuchungen, auch hinsichtlich der Expression der heterologen β -Ketothiolase in *S. cerevisiae* CI3ABYS86 sind geplant.

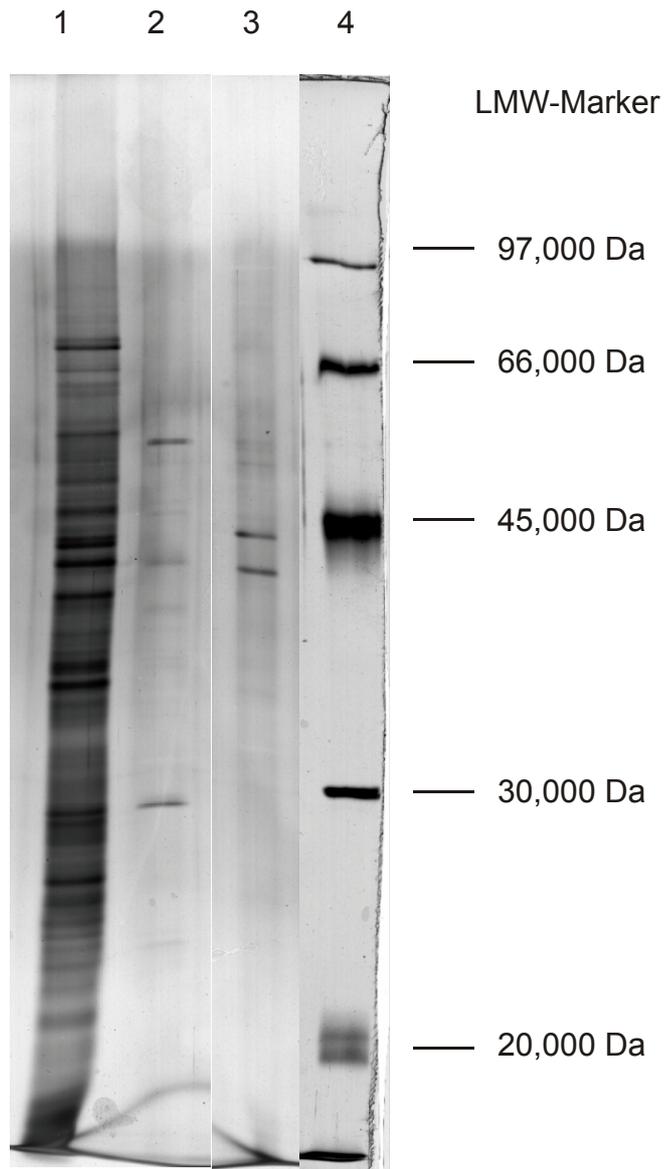


Abbildung 5: SDS-PAGE der gereinigten NADPH-abhängigen Acetoacetyl-CoA-Reduktase aus der rekombinanten Hefe *S. cerevisiae* CI3ABYS86/pYES2-phbB
Slot 1: Rohextrakt;
Slot 2: Fraktion 1;
Slot 3: Fraktion 2;
Slot 4: Molekulargewichtsmarker LMW (amersham pharmacia Biotech)

4.1.4 Expression des *phaC*-Gens

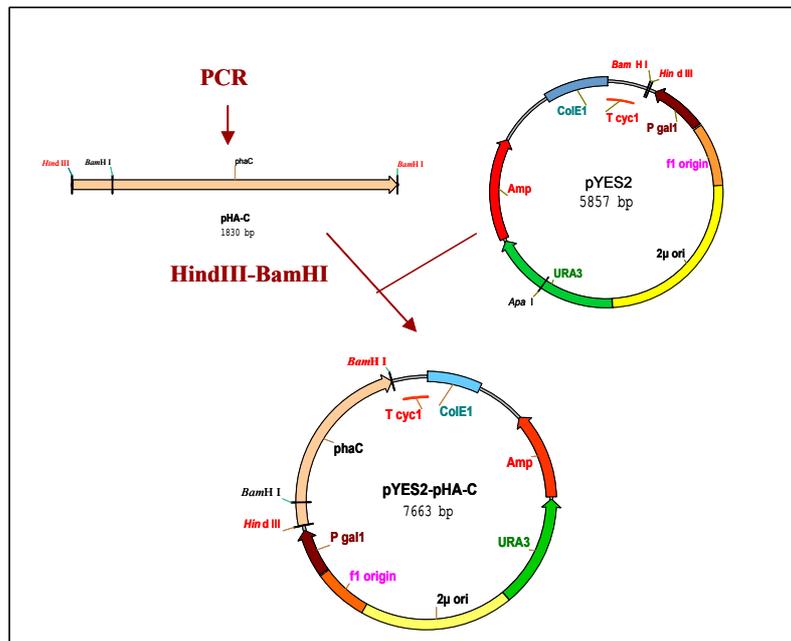


Abbildung 6: Konstruktionsschema für das Plasmid pYES2-phaC

Auch das *phaC*-Gen, welches die PHB-Synthese kodiert, konnte in *S. cerevisiae* Cl3ABYS86 expriert werden. Dazu wurde das *phaC*-Gen enthaltene DNA-Fragment mit den Restriktionsorten *Hind*III und *Bam*HI flankiert und in das *S. cerevisiae* Plasmid pYES2 zwischen den *GAL1*-Promotor und den *CYC1*-Terminator integriert (Abb. 6). Das Plasmid pYES2-phaC ließ sich in *S. cerevisiae* Cl3ABYS86 transformieren. Die Hefetransformanten *S. cerevisiae* Cl3ABYS86/pYES2-phaC wurden auf Expression des *phaC*-Gens nach Induktion durch Galactose geprüft. Unter diesen Bedingungen sollten sich in den transgenen Hefezellen sowohl *phaC*-Transkripte als auch PHB-Synthese-Aktivität nachweisen lassen.

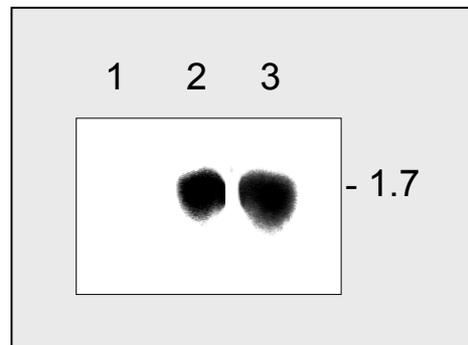


Abbildung 7: *phaC*-Transkriptakkumulation in *S. cerevisiae* Cl3ABYS86/pYES2-phaC. Nach Induktion des *phaC*-Gens durch Galactose wurde die Gesamt-RNA isoliert, auf Nitrozellulosefilter überführt und gegen das radioaktiv markierte *phaC*-Genfragment hybridisiert.

Mit Hilfe von Northern-Hybridisierungen ließ sich die *phaC*-Transkriptakkumulation untersuchen. Dazu wurde aus den Hefetransformanten die Gesamt-RNA isoliert, diese gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrozellulosefilter geblottet und gegen das radioaktiv markierte *phaC*-Genfragment hybridisiert. Im Gegensatz zu *S. cerevisiae* Cl3ABYS86 wird in den Transformanten *S. cerevisiae* Cl3ABYS86/pYES2-phaC ein 1,7 Kb *phaC*-Transkript akkumuliert (Abb. 7).

Für die Bestimmung der PHB-Synthese-Aktivität wurden die Zellen von *S. cerevisiae* Cl3ABYS86 und *S. cerevisiae* Cl3ABYS86/pYES2-phaC geerntet und mit Ultraschall aufgeschlossen. Da die Hefe keine eigene PHB-Synthese synthetisiert, konnte das Enzym ausschließlich in *S. cerevisiae* Cl3ABYS86/pYES2-phaC nachgewiesen werden. Vergleicht man die ermittelte PHB-Synthese-Aktivität mit der von *R. eutropha*, so werden in beiden Organismen ähnliche Werte erreicht (Tab. 11).

Tabelle 11: Nachweis der PHB-Synthase-Aktivität in *S. cerevisiae* CI3ABYS86/pYES2-phaC

Hefe	PHB-Synthase-Aktivität [U/mg]
<i>S. cerevisiae</i> CI3ABYS86	0,0
<i>S. cerevisiae</i> CI3ABYS86/pYES2-phaC1	35,3
<i>R. eutropha</i> H16	29,7

Da nach LEAF et al. (1996) bereits die Expression des *phaC*-Gens zur Synthese von PHB ausreichend sein sollte, wurde *S. cerevisiae* CI3ABYS86/pYES2-phaC1 auf PHB-Akkumulation untersucht. Dazu wurde die PHB-Konzentration pro g Trockengewicht ermittelt. Im Gegensatz zum Ausgangsstamm *S. cerevisiae* CI3ABYS86 wird in der Transformante *S. cerevisiae* CI3ABYS86/pYES2-phaC 1 PHB akkumuliert. Mit 5,2 % PHB bezogen auf die Trockenmasse werden dabei bedeutend höhere Werte erreicht, als von LEAF et al. (1996) beschrieben (Tab. 12).

Tabelle 12: Nachweis von PHB in *S. cerevisiae* CI3ABYS86/pYES2-phaC

Hefe	PHB-Konzentration [%]
<i>S. cerevisiae</i> CI3ABYS86	0,0
<i>S. cerevisiae</i> CI3ABYS86/pYES2-phaC 1	5,2

4.1.5 Expression des *phbC*-Gens

Nach einer ähnlichen Strategie wurde auch das PHB-Synthase-Gen (*phbC*-Gen) von *R. eutropha* in das Plasmid pYES2 eingebaut und in *S. cerevisiae* CI3ABYS86 transformiert. So wurde bisher das *phbC*-Gen enthaltene DNA-Fragment mit den Restriktionsorten *Hind*III und *Bam*HI flankiert und in das *S. cerevisiae* Plasmid pYES2 zwischen den *GAL1*-Promotor und den *CYC1*-Terminator integriert (Abb. 8).

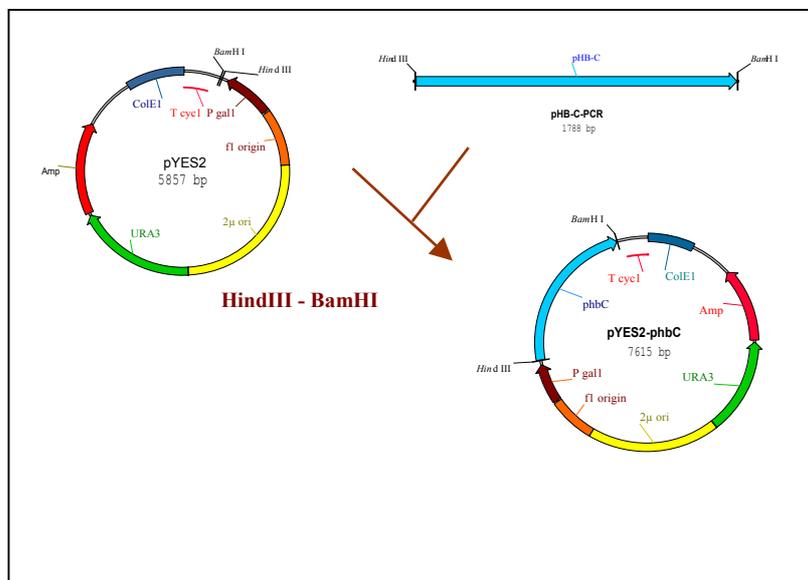


Abbildung 8: Konstruktionsschema für das Plasmid pYES2-phbC

Tabelle 13: PHB-Bildung und Polymeraseaktivität bei *S. cerevisiae* CI3ABYS86/pYES2-phbC -Transformanten

Hefe	PHB [%]	PHB-Synthaseaktivität [U/mg]
<i>S. cerevisiae</i> CI3ABYS86/pYES2-phbC 1	$1,6 \times 10^{-3}$	0,57
<i>S. cerevisiae</i> CI3ABYS86/pYES2-phbC 2	$9,9 \times 10^{-4}$	0,58
<i>S. cerevisiae</i> CI3ABYS86/pYES2-phbC 3	$6,2 \times 10^{-4}$	0,32
<i>S. cerevisiae</i> CI3ABYS86/pYES2-phbC 4	$1,6 \times 10^{-3}$	0,46
<i>S. cerevisiae</i> CI3ABYS86/pYES2-phbC 5	$9,7 \times 10^{-4}$	0,67

Die Transformanten wurden hinsichtlich PHB-Akkumulation und Aktivität der Polymerase untersucht. Im Gegensatz zum Ausgangsstamm *S. cerevisiae* CI3ABYS86 wird in den Transformanten zwar PHB akkumuliert, im Vergleich mit den das *phaC*-Gen tragenden Hefestämmen ist die Polymerbildung sehr viel geringer. (Tab. 13).

4.1.6 Einfluss von Effektoren auf die PHA-Bildung

Der geringe PHB-Gehalt könnte eine Ursache in der Lokalisation der PHB-Synthese in der Hefezelle haben. Es könnte sein, dass das Substrat nicht am "richtigen" Ort zur Verfügung steht. Um Acetyl-CoA konkurrieren mehrere Enzyme; es kann u.a. für die Synthese von Fetten verbraucht werden, die ihrerseits via β -Oxidation natürlich auch Acetyl-CoA wieder bereitstellen können. Die β -Oxidation ist in den Peroxisomen lokalisiert, die Fettsäuresynthese dagegen im Cytoplasma, in dem auch die heterologen Gene exprimiert und die rekombinanten Enzyme gebildet werden. Um zu untersuchen, ob und in welchem Maße diese Konkurrenz Bedeutung hat, werden spezifische Hemmer "bemüht".

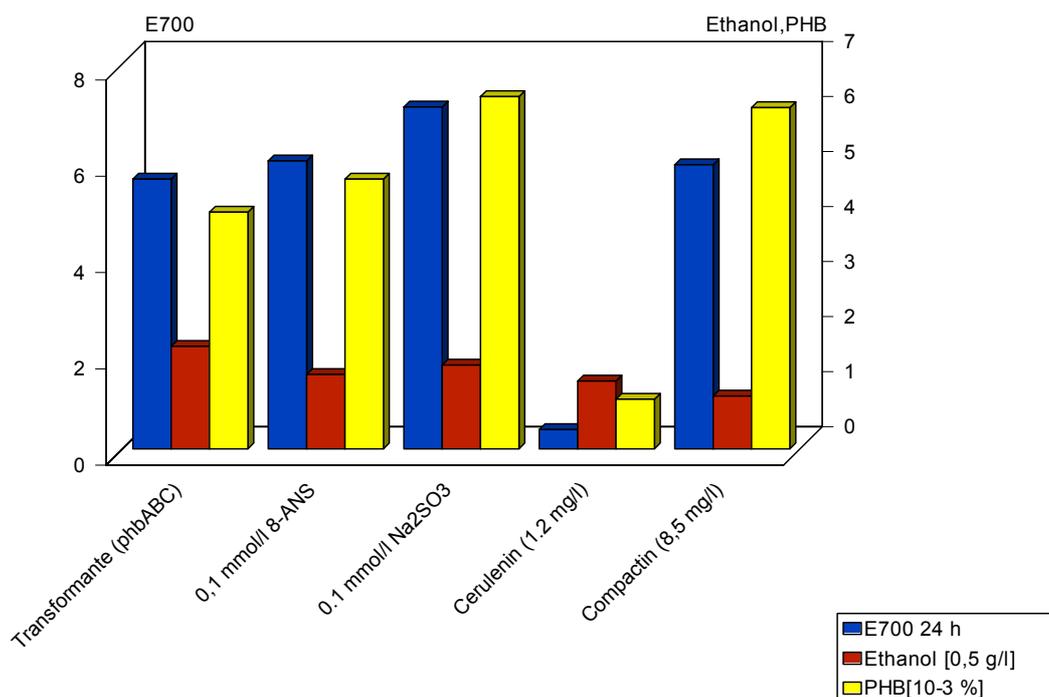


Abbildung 9: Einfluss von Effektoren auf die PHB-Bildung bei *S. cerevisiae*

Cerulenin, ein Suizid-Substrat der Fettsäuresynthetase, und Compactin, ein kompetitiver Inhibitor der 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-CoA (HMG) Reduktase, wurden eingesetzt. Die HMG-Reduktase katalysiert im Sterolbiosynthese-Stoffwechselweg die Synthese von Mevalonat, ausgehend von 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA. Der erste Schritt innerhalb der Sterolsynthese ist eine cytoplasmatische Thiolase, die Acetoacetyl-CoA synthetisiert.

Ein deutlicher Abfall im PHB-Gehalt in Anwesenheit von Cerulenin könnte als ein Zusammenhang zwischen PHB-Synthese und Fettsäuresynthese interpretiert werden. Andererseits können die Ergebnisse, erhalten mit Compactin, nicht ausschließen, dass die Monomere via Acetoacetyl-CoA geliefert werden.

Da diese Versuche nicht zu einem eindeutigen Resultat geführt haben, wurden die heterologen Gene mit Signalsequenzen ausgestattet, die eine Expression im Peroxisom ermöglichen (4.1.8).

Auf der anderen Seite sind Gärung und PHB-Bildung bei Hefen, wie *S. cerevisiae*, konkurrierende Prozesse in Bezug auf die Reduktionsequivalente. Durch Nutzung von Hemmstoffen für die Gärung, wie Na₂SO₃ oder Anillinonaphthalensulfonsäure, sollte sich der PHB-Gehalt in den Zellen steigern lassen. Tatsächlich ließen sich Reduktionen des Ethanolgehalts feststellen, gleichzeitig jedoch auch Verminderungen der Wachstumsrate. Zur gleichen Zeit erhöhte sich der PHB-Gehalt. Weiterführende Untersuchungen sind notwendig, dazu gehört, andere Hefen zu testen und Sauerstoff-Limitation auszuschalten (Abb. 9).

4.1.7 Produktbildung bei *S. cerevisiae* INVSc2-MAT α /pYES2-phaC-Transformanten

In *S. cerevisiae* gibt es zwei Paarungstypen, a und α . Nur Zellen mit entgegengesetzten Paarungstypen, die von der Allelform (MATa oder MAT α) eines einzelnen Locus nahe des Centromers von Chromosom III bestimmt werden, können sich miteinander paaren. Dieses Paarungstyp-Allel kann mit einer stammspezifischen Frequenz in das jeweilige andere konvertieren. Die wesentliche Aufgabe des MAT-Locus ist, die Expression der Pheromon- und Rezeptorgene sowie weiterer an der Paarung beteiligter Funktionen zu kontrollieren (LEWIN 1998).

Um einen Einfluss von Paarungstypen auf die Polymerbildung herauszufinden, wurden diese Transformanten hinsichtlich der Aktivität der Polymerase und des Gehalts an PHB untersucht. Es konnte kein erhöhter PHB-Gehalt in den Zellen festgestellt werden, so dass ein Einfluss des Paarungstyps auf die Produktbildung ausgeschlossen werden kann (Tabelle 14).

Tabelle 14: Bildung und Polymeraseaktivität bei *S. cerevisiae* CI3ABYS86/pYES2 phbC

Hefestamm	PHB [%]	PHB-Synthaseaktivität [U/mg]
<i>S. cerevisiae</i> INVSc2-MAT α -pYES2-phaC 3	1,25 x 10 ⁻³	674,68
<i>S. cerevisiae</i> INVSc2-MAT α -pYES2-phaC 4	1,22 x 10 ⁻³	168,43

4.1.8 Expression der *phb*-Gene in Peroxisomen mittels Signalsequenzen

Hefen sind kompartimentiert. Im Cytosol findet die Fettsäuresynthese, in den Peroxisomen die β -Oxidation statt.

Bei der Oxidation entsteht Acetyl-CoA, welches direkt für die PHA-Synthese genutzt werden kann. Die heterologen Gene werden im Cytosol exprimiert. Die Synthese beginnt an einem Starter Acetyl-CoA, das seinen Acetylrest an ein Trägerprotein abgibt, das Acylcarrier-Protein (ACP). Daraus ist zu schließen, dass der Acetyl-CoA-Pool in den Peroxisomen größer sein sollte und deshalb bei Expression der *phb*-Gene in diesem Kompartiment eine höhere Polymerkonzentration zu vermuten ist (4.1.5). Aus diesem Grund wurden die Gene mit Signalsequenzen verbunden, die eine Expression in den Peroxisomen gestattet.

Der Versuch, den PHB-Gehalt zu erhöhen, war nicht erfolgreich. Dabei war es unerheblich, welche Spezies mit des Signalsequenzgenen transformiert wurde, wie die Tabelle 15 zeigt.

Tabelle 15: PHB-Bildung und Polymeraseaktivität bei *S. cerevisiae* phbC -Transformanten

Hefestamm	PHB [%]	PHB-Synthaseaktivität [U/mg]
<i>S. cerevisiae</i> CI3ABYS86/pESC-phbC-Fox2 (1)	0,0045	1,688
<i>S. cerevisiae</i> CI3ABYS86/pESC-phbC-Fox2 (2)	0,0058	0,641
<i>S. cerevisiae</i> CI3ABYS86/pESC-phbC-Fox2 (3)	0,0044	0,000
<i>S. cerevisiae</i> CI3ABYS86/pESC-phbC-Fox2 (4)	0,0044	0,628
<i>S. cerevisiae</i> CI3ABYS86/pESC-phbC-Fox2 (5)	0,0036	0,944
<i>S. cerevisiae</i> INVSc1/phbC-pESC-URA-phbC-Fox2 (1)	0,0190	0,963
<i>S. cerevisiae</i> INVSc1/phbC-pESC-URA-phbC-Fox2 (2)	0,0130	1,113
<i>S. cerevisiae</i> INVSc1/phbC-pESC-URA-phbC-Fox2 (3)	0,0170	1,869
<i>S. cerevisiae</i> INVSc1/phbC-pESC-URA-phbC-Fox2 (4)	0,0170	2,088
<i>S. cerevisiae</i> INVSc1/phbC-pESC-URA-phbC-Fox2 (5)	0,0200	23,730

4.1.9 Gleichzeitige Expression der Gene *phbA*, *phbB* und *phaC/phbC*

4.1.9.1 Klonierungs- und Transformationsstrategie

LEAF et al. (1996) zeigten, dass mit Hilfe des *phbC*-Gens in transgenen *S. cerevisiae* Stämmen PHB-Konzentrationen von 0,5 % erreichbar sind. Da weit höhere Konzentrationen an Polymer (ca. 20 %) notwendig und anzustreben sind, wurden alle drei *phb*-Gene (*phbA*, *phbB*, *phaC* bzw. *phbC*) gemeinsam in *S. cerevisiae* CI3ABYS86 transformiert und exprimiert. Dazu wurde das Plasmid pESC-LEU-*phbA-phbB* mit *phbA*- und *phbB*-Gen nach der in Abb. 10 dargestellten Klonierungsstrategie konstruiert und in *S. cerevisiae* CI3ABYS86 transformiert. Da dieser Hefestamm die genetischen Marken *leu2 ura3 his pra1 prb1 prc1 cps* aufweist, lassen sich die erhaltenen Transformanten über die Komplementation der *leu2*-Mutation durch das auf dem Plasmid pESC-LEU-*phbA-phbB* lokalisierte *LEU2*-Gen selektieren. Die erhaltenen Transformanten *S. cerevisiae* CI3ABYS86/pESC-LEU-*phbA-phbB* werden als Wirt für eine zweite Transformation genutzt. Dabei wird das Plasmid pYES2-*phaC(phbC)* mit dem *URA3*-Gen als Selektionsmarker transformiert. Die dabei erhaltenen Transformanten lassen sich über die Komplementation der *ura3*-Mutation durch das *URA3*-Gen vom Plasmid pYES2-*phaC* selektieren. Wird sowohl die *leu2*- als auch die *ura3*-Mutation komplementiert, so sollten beide Plasmide (pESC-LEU-*phbA-phbB* und pYES2-*phaC(phbC)*) in den Transformanten enthalten sein.

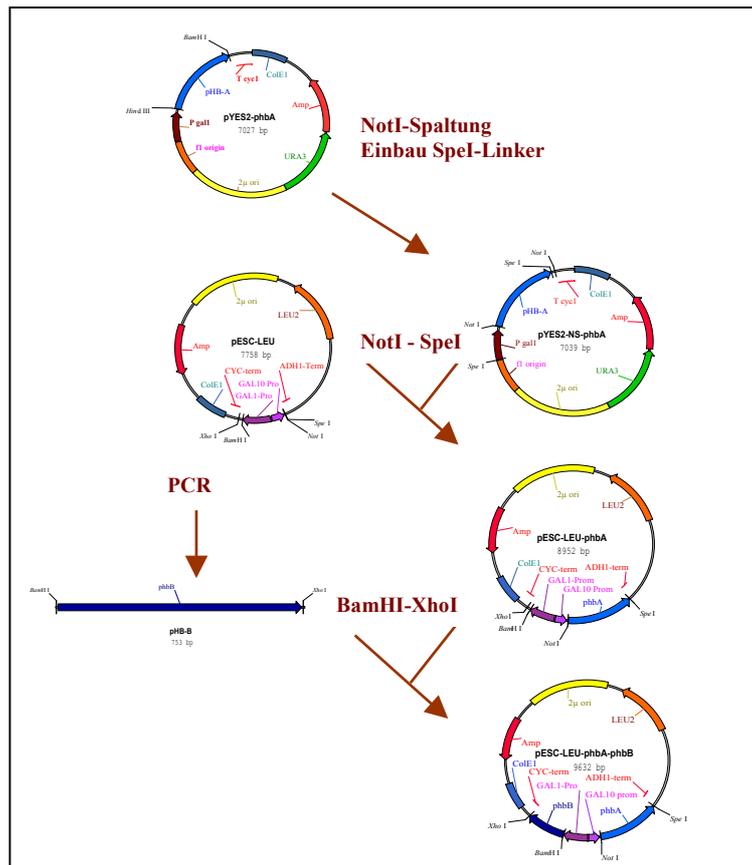


Abbildung 10: Konstruktionsschema für das Plasmid pESC-LEU-phbA-phbB

4.1.9.2 Charakterisierung der Transformanten - Bestimmung der Enzymaktivitäten

4.1.9.2.1 *S. cerevisiae* CI3ABYS86/pESC-LEU-phbA-phbB-pYES2-phaC

Von *S. cerevisiae* CI3ABYS86/pESC-LEU-phbA-phbB-pYES2-phaC wurden die Enzymaktivitäten aller drei für die PHB-Bildung relevanten Enzyme gemessen. Anhand der erhaltenen Werte für β -Ketothiolase, Acetoacetyl-CoA-Reduktase und PHB-Synthase konnte bewiesen werden, dass alle drei heterologen Gene exprimiert und die entsprechenden Enzyme synthetisiert werden (Tab. 16).

Tabelle 16: Nachweis der β -Ketothiolase-, der Acetoacetyl-CoA-Reduktase- und der PHB-Synthase-Aktivitäten von *S. cerevisiae* CI3ABYS86/pESC-LEU-phbA-phbB-pYES2-phaC

Hefe	β -Ketothiolase [mU/mg]	Acetoacetyl-CoA-Reduktase [mU/mg]	PHB-Synthase [U/mg]
<i>S. cerevisiae</i> CI3ABYS86	1,8	0,2	0,0
<i>S. cerevisiae</i> CI3ABYS86/pESC-LEU-phbA-phbB-pYES2-phaC 1	18,4	10,0	7,6
<i>S. cerevisiae</i> CI3ABYS86/pESC-LEU-phbA-phbB-pYES2-phaC 3	11,9	4,5	19,2

4.1.9.2.2 *S. cerevisiae* CI3ABYS86/pESC-LEU-phbA-phbB-pYES2-phbC

Von *S. cerevisiae* CI3ABYS86/pESC-LEU-phbA-phbB-pYES2-phbC wurden die Enzymaktivitäten aller drei für die PHB-Bildung relevanten Enzyme gemessen. Anhand der erhaltenen Werte für Acetoacetyl-CoA-Reduktase und PHB-Synthase konnte ebenfalls bewiesen werden, dass diese heterologen Gene exprimiert und die entsprechenden Enzyme synthetisiert werden (Tab. 17). Im Falle der β -Ketothiolase können die Ergebnisse nicht belegen, dass das heterologe Gen zusätzlich zum Wirtsgen exprimiert und das entsprechende Enzym synthetisiert wird. Gleichzeitig ist eine sehr viel geringere Synthaseaktivität bei diesen Transformanten festzustellen. Es wären weitere Untersuchungen notwendig, um die Ursachen dafür festzustellen.

Tabelle 17: Nachweis der β -Ketothiolase-, der Acetoacetyl-CoA-Reduktase- und der PHB-Synthase-Aktivitäten von *S. cerevisiae* CI3ABYS86/pESC-LEU-phbA-phbB-pYES2-phbC

Hefe	β -Ketothiolase [U/mg]	Acetoacetyl-CoA-Reduktase [U/mg]	PHB-Synthase [U/mg]
<i>S. cerevisiae</i> CI3ABYS86	0,0122	0,0013	0,0000
<i>S. cerevisiae</i> CI3ABYS86/pESC-LEU-phbA-phbB-pYES2-phbC 1	0,0059	0,0310	0,0062

4.1.9.3 Charakterisierung der Transformanten - Transkriptanalyse

Die Analyse der *phbA*-, *phbB*- und *phaC*-Transkripte erfolgte mit Hilfe von Northern-Hybridisierungen. Dazu wurde von *S. cerevisiae* CI3ABYS86 und *S. cerevisiae* CI3ABYS86/pESC-LEU-phbA-phbB-pYES2-phaC die Gesamt-RNA isoliert, gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrozellulose überführt und mit den radioaktiv markierten DNA-Fragmenten, die die Gene *phbA*, *phbB* bzw. *phaC* enthalten, hybridisiert. Im Gegensatz zu *S. cerevisiae* CI3ABYS86 lassen sich die entsprechenden Transkripte ausschließlich in *S. cerevisiae* CI3ABYS86/pESC-LEU-phbA-phbB-pYES2-phaC nachweisen. So enthalten sie ein 1,2 Kb *phbA*-, ein 0,8 Kb *phbB*- und ein 1,8 Kb *phaC*-Transkript (Abb. 11).

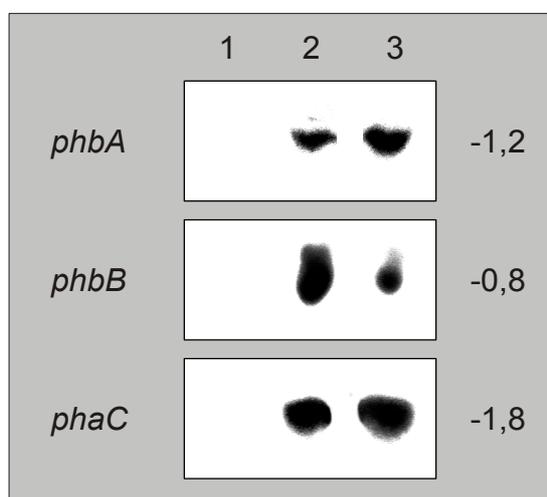


Abbildung 11: Transkriptanalyse von *S. cerevisiae* CI3ABYS86/pESC-LEU-phbA-phbB-pYES2-phaC. Nach Induktion der Gene durch Galactose wurde die Gesamt-RNA isoliert. Nach deren Elektrophorese und Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran erfolgte die Northern-Hybridisierung. Als radioaktiv markierte Sonden wurden DNA-Fragmente mit dem *phbA*-, *phbB*- bzw. *phaC*-Gen verwendet.

4.1.9.4 Charakterisierung der Transformanten – Elektronenmikroskopische Analyse

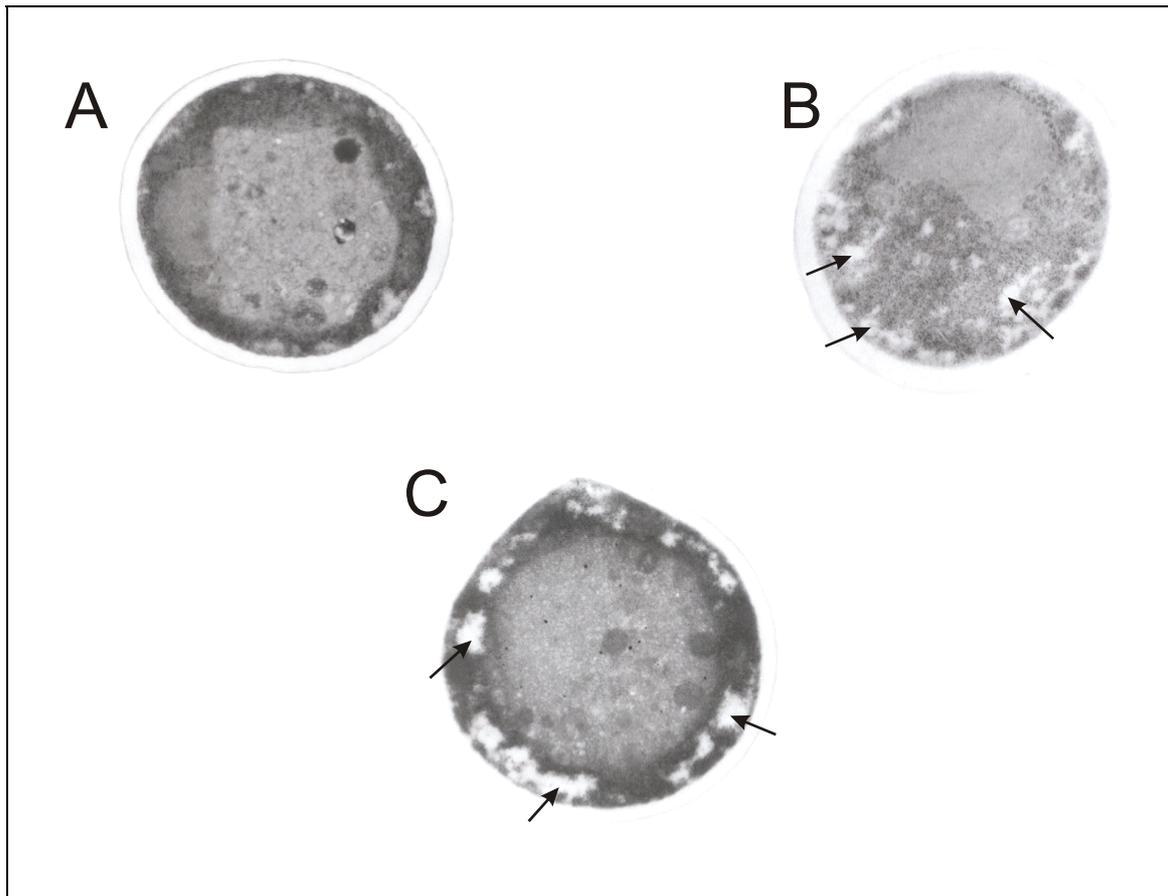


Abbildung 12: Elektronenmikroskopische Analyse von *S. cerevisiae* Cl3ABYS86 (A), Cl3ABYS86/pESC-LEU-phbA-phbB-pYES2-phaC 1 (B) und Cl3ABYS86/pESC-LEU-phbA-phbB-pYES2-phaC 3 (C), Zeiss CEM 920A Transmissionselektronenmikroskop, Vergr. 20 000; vermeintliche PHA-Einschlüsse

Da die Einlagerung von PHB in der Hefezelle Veränderungen in der Zellmorphologie verursachen könnte, wurden die Zellen von *S. cerevisiae* Cl3ABYS86/pESC-LEU-phbA-phbB-pYES2-phaC mit Hilfe des Transmissions-Elektronenmikroskopes analysiert. Dazu wurde *S. cerevisiae* Cl3ABYS86 und *S. cerevisiae* Cl3ABYS86/pESC-LEU-phbA-phbB-pYES2-phaC, wie unter 4.1.1 beschrieben, kultiviert und die Zellen am Transmissionsmikroskop analysiert. Im Gegensatz zum Ausgangsstamm *S. cerevisiae* Cl3ABYS86 sind in allen transgenen Stämmen von *S. cerevisiae* Cl3ABYS86/pESC-LEU-phbA-phbB-pYES2-phaC zahlreiche Einschlüsse sichtbar, die durch die PHB-Einlagerung verursacht werden könnten. Damit verursacht die Expression der Gene *phbA*, *phbB* und *phaC* und/oder die Einlagerung von PHB Veränderungen in der Zellmorphologie (Abb. 12).

4.1.9.5 Charakterisierung der Transformanten – PHB-Akkumulation

Die PHB-Akkumulation wurde mit einer Permapond FFAP-Säule (25 m x 25 mm) mit FID ermittelt. Im Gegensatz zum Ausgangsstamm *S. cerevisiae* Cl3ABYS86, bei dem nur die als Standard mitgeführte Benzoesäure detektiert wurde, ist in *S. cerevisiae* Cl3ABYS86/pESC-LEU-phbA-phbB-pYES2-phaC 1 PHB nachweisbar. Bezogen auf das Trockengewicht werden 6,7 % PHB akkumuliert (Abb. 13, Tab. 18).

Tabelle 18: Nachweis von PHB in *S. cerevisiae* Cl3ABYS86/pESC-LEU-phbA-phbB-pYES2-phaC 1

Hefe	PHB-Konzentration [%]
<i>S. cerevisiae</i> Cl3ABYS86	0,0
<i>S. cerevisiae</i> Cl3ABYS86/pESC-LEU-phbA-phbB-pYES2-phaC 1	6,7

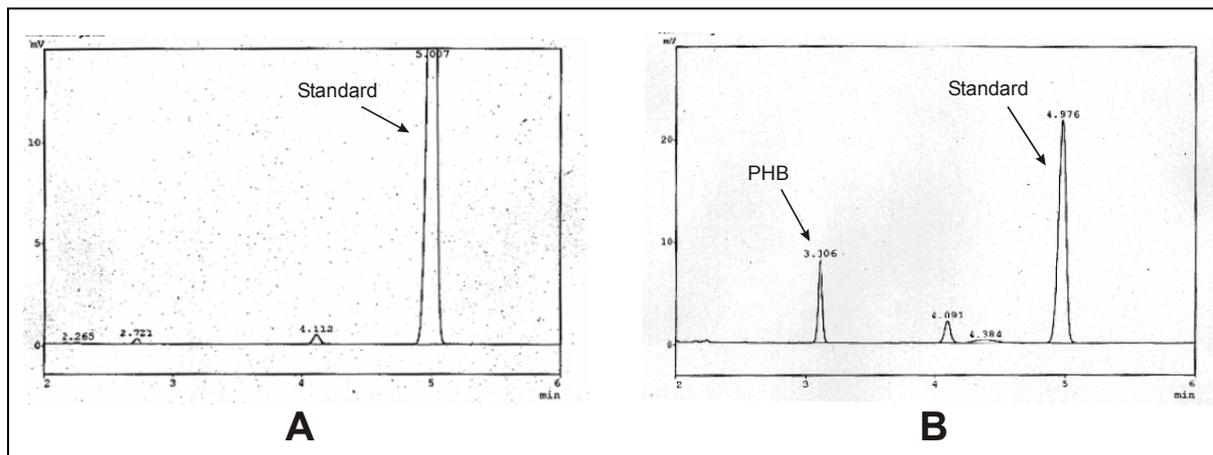


Abbildung 13: GC-Spektrum von *S. cerevisiae* Cl3ABYS86 (A) und Cl3ABYS86/pESC-LEU-phbA-phbB-pYES2-phaC 1 (B)

4.1.10 Einfluss des *S. cerevisiae* Stammes auf die PHB-Konzentration

Bisher wurde *S. cerevisiae* Cl3ABYS86 als Wirt für die Expression der Gene *phbA*, *phbB* und *phaC* genutzt. Da es sich bei diesem Stamm um eine *pra1 prb1 prc1 cps* Mutante handelt, d.h. die meisten Protease-Gene des Stammes mutiert sind, ist er besonders zur heterologen Genexpression geeignet. Als Wirt zur PHB-Produktion hat *S. cerevisiae* Cl3ABYS86 jedoch einen entscheidenden Nachteil, er ist kein GAL-Plus Stamm. Da die Expression der *phb*-Gene durch einen durch Galactose induzierbaren Promotor gesteuert wird, ist die Fähigkeit, Galactose als Kohlenstoffquelle verwenden zu können, für die Expression der heterologen Gene notwendig. Hefen, die diese Fähigkeit besitzen, nennt man GAL-Plus-Stämme. Ein GAL-Minus-Stamm, wie der vorliegende, weist diese Fähigkeit nicht auf, und die Transformanten lassen sich demzufolge nicht in Medien mit Galactose als C-Quelle kultivieren. Aus diesem Grund wurden die Hefen zunächst auf SD-Medium mit Glucose als C-Quelle kultiviert und anschließend zur Induktion des GAL-Promotors auf SD-Medium mit Galactose „geschiftet“. Dieser Nachteil kann durch die Wahl von GAL-Plus Stämmen, wie *S. cerevisiae* INVSC1 (*his3 leu2 trp1 ura3 GAL⁺*) eliminiert werden. Damit ist es möglich, als C-Quelle Galactose zu nutzen und den GAL-Promotor schon während der Kultivierung zu aktivieren. Aus diesem Grund wurden die beiden Plasmide pESC-LEU-phbA-phbB und pYES2-phaC 1 in *S. cerevisiae* INVSC1 transformiert. Da auch dieser Stamm eine *leu2*- und *ura3*-Mutante ist, lassen sich die Transformanten über die Komplementation beider Marken durch das *URA3*-Gen von Plasmid pYES2-phaC und das *LEU2*-Gen vom Plasmid pESC-LEU-phbA-phbB selektieren. Anschließend wurde geprüft, ob in den transgenen Stämmen rekombinante β -Ketothiolase, Acetoacetyl-CoA-Reduktase und PHB-Synthase nachweisbar ist, bevor mit der Analyse der PHB-Akkumulation begonnen wurde. Hierbei zeigte sich, dass alle auf der Basis von *S. cerevisiae* INVSC1 konstruierten Stämme nur maximal 1% PHB akkumulieren. Hierbei ist es nicht entscheidend, ob die Transformanten erst auf Glucose kultiviert und anschließend auf Galactose-Medium „geschiftet“ werden oder die Kultivierung sofort auf SD-Medium mit Galactose erfolgt (Tab. 19).

Tabelle 19: Nachweis von PHB in *S. cerevisiae* INVSC1/pESC-LEU-phbA-phbB-pYES2-phaC

Hefe	PHB-Konzentration [%]
<i>S. cerevisiae</i> INVSc1	0,0
<i>S. cerevisiae</i> INVSC1/pESC-LEU-phbA-phbB-pYES2-phaC 11	0,9
<i>S. cerevisiae</i> INVSC1/pESC-LEU-phbA-phbB-pYES2-phaC 12	0,9

Bei Nutzung von Schüttelkulturen mit dem *S. cerevisiae* Stamm Cl3ABYS86 gegenüber INVSC1 sind ca. 6fach höhere PHB-Akkumulationen erreichbar.

4.2 Expression bakterieller *phb*-Biosynthesegene in *Arxula adenivorans*

Im Rahmen des Projektes wurde die nicht-pathogene, nicht-konventionelle Hefe *Arxula adenivorans* auf Grund ihrer biotechnologisch bedeutsamen Eigenschaften (sehr hohes Wachstumsvermögen,

Thermo- und Osmo-Toleranz) als Wirt für die Expression bakterieller *phb*-Gene genutzt. Dazu waren die Gene *phbA* (β -Ketothiolase), *phbB* (Acetoacetyl-CoA-Reduktase) und *phbC* (PHB-Synthase) von *R. eutropha* bzw. *phaC* (PHB-Synthase) von *M. extorquens* in *A. adenivorans* zu transformieren und dort zur Expression zu bringen.

Mit Hilfe der PCR wurden die *R. eutropha*-Gene *phbA*, *phbB* und *phbC* amplifiziert, in den Vektor pCR2.1 integriert, einzeln bzw. in Kombination in die Expressionsplasmide pAL-HPH1 und pAL-ALEU2m rekloniert und in *A. adenivorans* LS3, 135 bzw. G1211 transformiert.

4.2.1 Expression des *phbC*-Gens

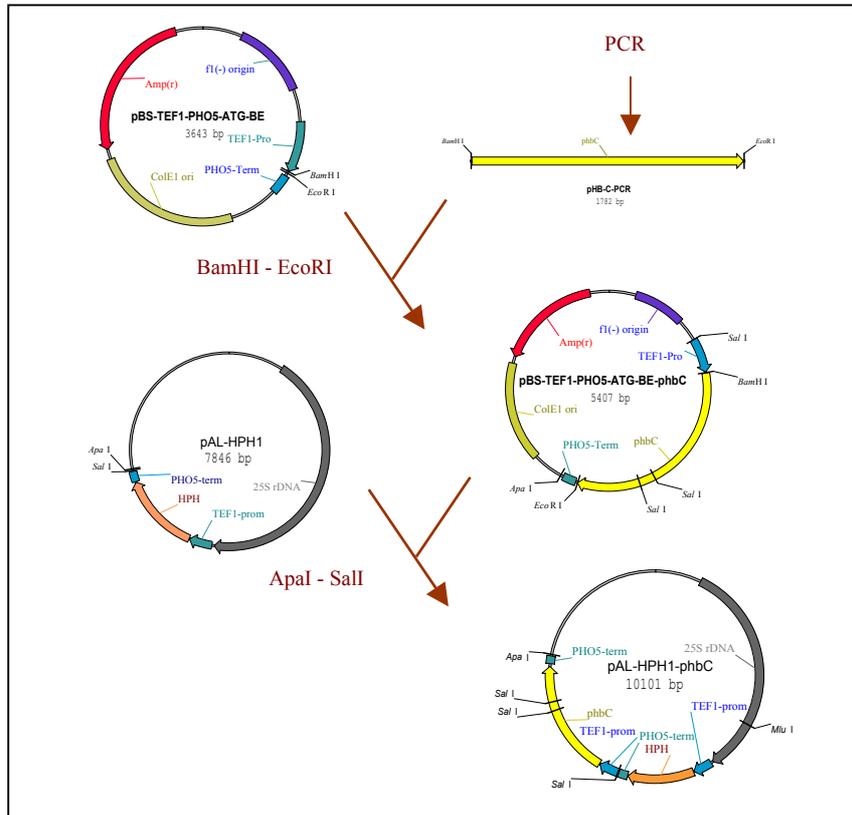


Abbildung 14: Konstruktionsschema für das Plasmid pAL-HPH1-phbC

Das *phbC*-Gen wurde für die Expression in *A. adenivorans* in das Plasmid pAL-HPH1 eingebaut. Dieses Plasmid enthält das aus *E. coli* stammende *hph*-Gen (kodiert Hygromycin B-Resistenz) als Selektionsmarker und die 25S-rDNA von *A. adenivorans* für die Integration in die chromosomale DNA. Das für die Transformation in *A. adenivorans* genutzte Plasmid pAL-HPH1-phbC wurde wie folgt konstruiert:

Zunächst wurde das *phbC*-Gen enthaltene DNA-Fragment mit den Restriktionsorten *BamHI* und *EcoRI* flankiert und in das Plasmid pBS-TEF-PHO5-ATG-BE zwischen den *TEF1*-Promotor von *A. adenivorans* und den *PHO5*-Terminator von *S. cerevisiae* integriert. Anschließend ließ sich die im ersten Klonierungsschritt erhaltene Expressionskassette mit *TEF1*-Promotor – *phbC*-Gen – *PHO5*-Terminator mit *ApaI*-*SalI* wieder ausschneiden und in das *Arxula*-Plasmid pAL-HPH1 einbauen. Nach Linearisierung des erhaltenen Plasmides pAL-HPH1-phbC mit *MluI*, einem Restriktionsenzym, welches in der 25S-rDNA von *A. adenivorans* schneidet, wurde das linearisierte Plasmid pAL-HPH1-phbC in *A. adenivorans* transformiert. Dazu wurden als Wirte der Wildtypstamm LS3 und die *Arxula icl* Mutante T1, die beide bei 30°C zellulär wachsen und der Stamm 135, der bei der gleichen Temperatur filamentös wächst, genutzt. Auf Grund des *hph*-Gens als Selektionsmarker konnten die Transformanten über ihre Hygromycin-Resistenz selektiert werden (Abb. 14).

Die *Arxula* Transformanten wurden auf Expression des *phbC*-Gens geprüft. Dazu wurden sie für 48 h bei 30°C in Hefeminimalmedium (HMM, TANAKA et al. 1967) mit 2% Glucose als C-Quelle kultiviert. Da es sich beim *TEF1*-Promotor um einen sehr starken konstitutiven Promotor handelt, wird während der Kultivierung von den transgenen Hefestämmen sowohl *phbC*-Transkript als auch das Enzym PHB-Synthase gebildet.

Die Transkriptanalyse erfolgte mit Hilfe der Northern-Blot Technik. Dazu wurde von *A. adenivorans* 135, *A. adenivorans* 135/pAL-HPH1-phbC, *A. adenivorans* T1 und T1/pAL-HPH1-phbC die Gesamt-RNA isoliert und für die Northern-Hybridisierung genutzt. In allen Transformanten konnten *phbC*-Transkripte nachgewiesen werden (Abb. 15).



Abbildung 15: *phbC*-Transkriptanalyse von *A. adenivorans* 135/pAL-HPH1-phbC und T1/pAL-HPH1-phbC. Die Gesamt-RNA wurde isoliert. Nach deren Elektrophorese und Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran erfolgte die Northern-Hybridisierung. Als radioaktiv markierte Sonde wurde ein DNA-Fragment mit dem *phbC*-Gen verwendet.

Zur Bestimmung der PHB-Synthase-Aktivität wurden die Hefezellen und Mycelien mittels Ultraschall aufgeschlossen. Im Vergleich zu den nicht-transformierten Stämmen *A. adenivorans* 135, LS3 und T1, die keine eigene PHB-Synthase synthetisieren, konnte das Enzym nur in den Transformanten *A. adenivorans* LS3/pAL-HPH1-phbC, T1/pAL-HPH1-phbC und 135/pAL-HPH1-phbC nachgewiesen werden. Dabei erreichen die Transformanten von *Arxula* gegenüber den entsprechenden *S. cerevisiae* Transformanten 10-60fach höhere PHB-Synthase-Aktivitäten (Tab. 20).

Tabelle 20: Nachweis der PHB-Synthase-Aktivität und der PHB-Konzentration von *A. adenivorans* 135, 135/ pAL-HPH1-phbC, T1, T1/pAL-HPH1-phbC, LS3 und LS3/pAL-HPH1-phbC

Hefe	PHB-Synthase [U/mg]	PHB-Gehalt [%]
<i>A. adenivorans</i> 135	0,000	0,0000
<i>A. adenivorans</i> 135/pAL-HPH1-phbC 1	1079,300	0,0190
<i>A. adenivorans</i> 135/pAL-HPH1-phbC 2	6169,000	0,0050
<i>A. adenivorans</i> T1	0,000	0,0000
<i>A. adenivorans</i> T1/pAL-HPH1-phbC 7	283,010	0,0240
<i>A. adenivorans</i> LS3	0,010	0,0004
<i>A. adenivorans</i> LS3/ pAL-HPH1-phbC 1	0,039	0,0016
<i>A. adenivorans</i> LS3/ pAL-HPH1-phbC 2	0,068	0,0016

Im letzten Schritt war zu zeigen, dass die rekombinante PHB-Synthase die transformierten Hefezellen und Myzelien zur PHB-Bildung befähigt. Da dazu neben dem Enzym vor allem eine hohe Acetyl-CoA-Konzentration notwendig ist, wird diese Bildung sehr stark von den Kultivierungsbedingungen und dem physiologischen Zustand der transgenen Zellen beeinflusst. In ersten Versuchen im Schüttelkolben war deshalb zunächst herauszufinden, ob überhaupt PHB gebildet wird. Mittels GC, einer Perma-bond FFAP-Säule (25 m x 25 mm) mit FID und Benzoesäure als Standard ließ sich dieser Beweis erbringen. So konnte PHB in allen Transformanten (*A. adenivorans* 135/pAL-HPH1-phbC, T1/pAL-HPH1-phbC und LS3/pAL-HPH1-phbC) nachgewiesen werden. Vergleicht man jedoch die erhaltenen Werte mit denen der *S. cerevisiae* Transformanten, so sind diese deutlich geringer (ca. 1/100). Hier stellt sich die Frage, wie durch Veränderung der Kultivierungsbedingungen der Gehalt in *A. adenivorans* 135/pAL-HPH1-phbC, T1/pAL-HPH1-phbC und LS3/pAL-HPH1-phbC zu steigern möglich ist (Tab. 20, Abb. 16).

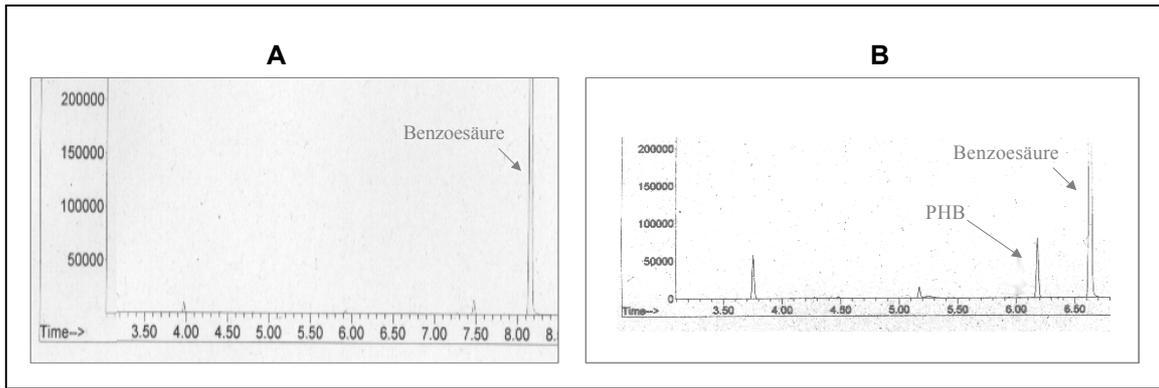


Abbildung 16: Spektrum der GC/MS-Messung von *A. adenivorans* T1 (A) und T1/pAL-HPH1-phbC (B) zur PHB-Analyse

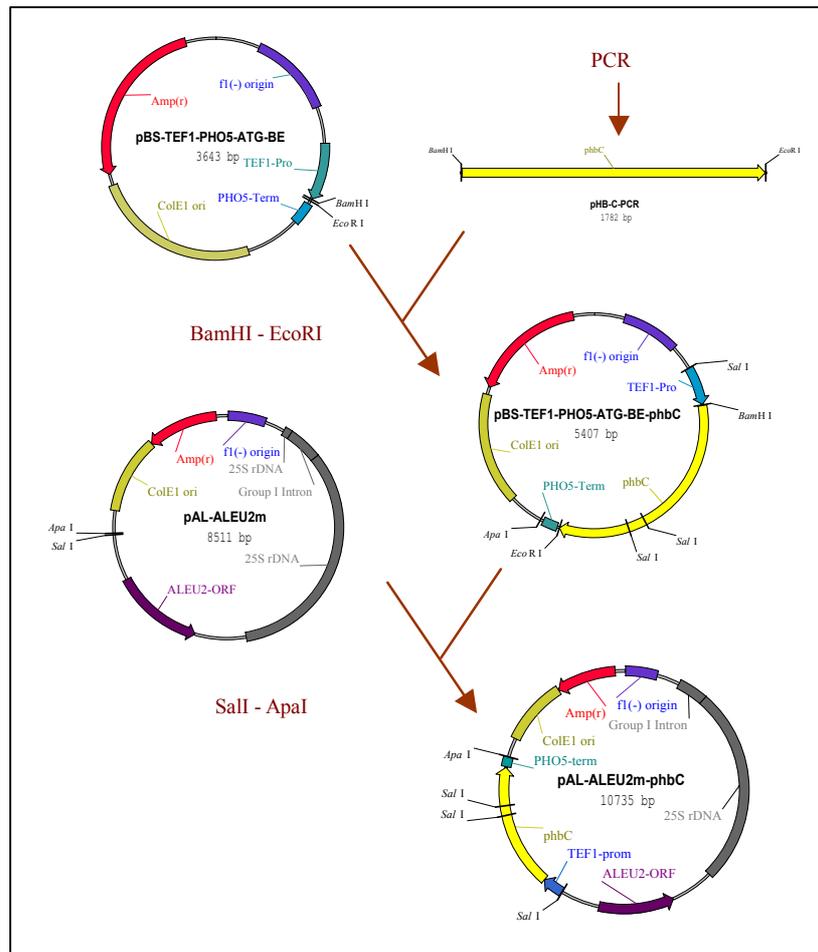


Abbildung 17: Konstruktionsschema für das Plasmid pAL-ALEU2m-phbC

Für die ersten Versuche wurde das Plasmid pAL-HPH1 als Basisplasmid für die Expression von *phbC* in *A. adenivorans* genutzt. Auf Grund ihres Selektionsmarkers Hygromycin-Resistenz sind jedoch derartige Konstrukte in der Biotechnologie problematisch, da Hygromycin toxisch ist. Aus diesem Grund wurde in einem zweiten *phbC*-Konstrukt der *hph*-Selektionsmarker durch einen Auxotrophie-marker, dem *ALEU2m* Gen ersetzt. Auch hier wird die Expressionskassette mit *TEF1*-Promotor – *phbC*-Gen – *PHO5*-Terminator als *Sall*-*ApaI* Fragment in das *Arxula* Basisplasmid pAL-ALEU2m eingebaut. Das dabei erzeugte Plasmid pAL-ALEU2m-phbC wird nach Linearisierung mit *MluI* in die *a-leu2*-Mutante *A. adenivorans* G1211 transformiert. Bei diesem Vorgang integriert das linearisierte Plasmid in die 25S-rDNA Region. Die erhaltenen Transformanten lassen sich über ihre Komplementation der *aleu2*-Mutation durch das *ALEU2m*-Gen selektieren (Abb. 17).

4.2.2 Charakterisierung der Transformanten - Bestimmung der Enzymaktivitäten

Tabelle 21: Nachweis der PHB-Synthese-Aktivität und der PHB- bzw. PHV-Konzentration von *A. adenivorans* G1211/ pAL-ALEU2m-phbC

Stamm	PHA-Synthase [U/mg]	PHB Gehalt [%]	PHV Gehalt [%]
<i>A. adenivorans</i> G1211/pAL-ALEU2m-phbC 1	0,0216	0,001	0,073
<i>A. adenivorans</i> G1211/pAL-ALEU2m-phbC 2	0,0625	0,003	0,080
<i>A. adenivorans</i> G1211/pAL-ALEU2m-phbC 3	0,0499	0,003	0,112

Es zeigt sich anhand der gemessenen Enzymaktivitäten, dass das heterologe *phbC*-Gen exprimiert wird und die transgene Hefe PHB und PHV bildet (Tabelle 21).

4.2.3 Expression der Gene *phbA*, *phbB* und *phbC*

Neben der Expression des *phbC*-Gens allein, waren auch alle drei an der PHB-Synthese beteiligten Gene (*phbA*, *phbB*, *phbC*) in *A. adenivorans* zu transformieren. Dazu wurde folgende Klonierungsstrategie gewählt:

Zuerst wurde ein *Arxula*-Expressionsplasmid konstruiert, welches sowohl das Gen *phbB* als auch *phbA* enthält. Dazu wurde, wie in Abb. 18 und Abb. 19 beschrieben, vorgegangen. Das Plasmid mit den beiden *phb*-Genen enthält als Selektionsmarker das *hph*-Gen, d.h. Transformanten können über ihre Hygromycin-Resistenz selektiert werden. Damit lässt sich dieses Plasmid sowohl in *Arxula*-Wildtyphefen als auch in Mutanten transformieren.

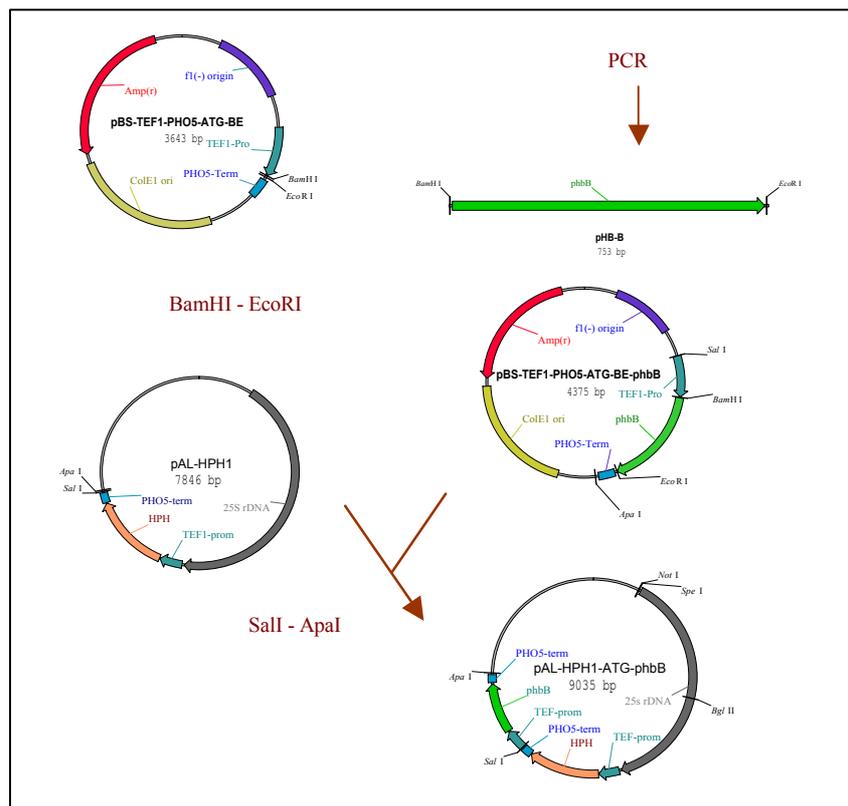


Abbildung 18: Konstruktionsschema für das Plasmid pAL-HPH1-ATG-phbB

Um nun eine transgene Hefe zu erzeugen, die alle drei *phbB*-Gene enthält, wird das Plasmid pAL-HPH1-phbA-phbB nach Linearisierung mit *Bgl*II in die *Arxula*-Transformante G1211/pAL-ALEU2m-phbC transformiert. Auch dieses linearisierte Fragment integriert in die als repetitive Sequenz vorliegende 25S-rDNA. Die erhaltenen Transformanten lassen sich nun über die Komplementation der *aleu2*-Mutation durch das *ALEU2m*-Gen und die Hygromycin-Resistenz selektieren.

Mit dieser Klonierungsstrategie konnten die Transformanten *A. adenivorans* G1211/pAL-HPH1-phbA-phbB – pAL-ALEU2m-phbC erzeugt werden. Sie enthalten alle drei *phb*-Gene, was mittels PCR geprüft wurde. Parallel wurde die *phbA*-, *phbB*- und *phbC*-Transkript-Akkumulation mittels Northern-

Hybridisierungen analysiert, die β -Ketothiolase-, die NADPH-abhängige Acetoacetyl-CoA-Reduktase- und PHB-Synthase-Aktivität ermittelt und die PHB- und PHV-Akkumulation bestimmt.

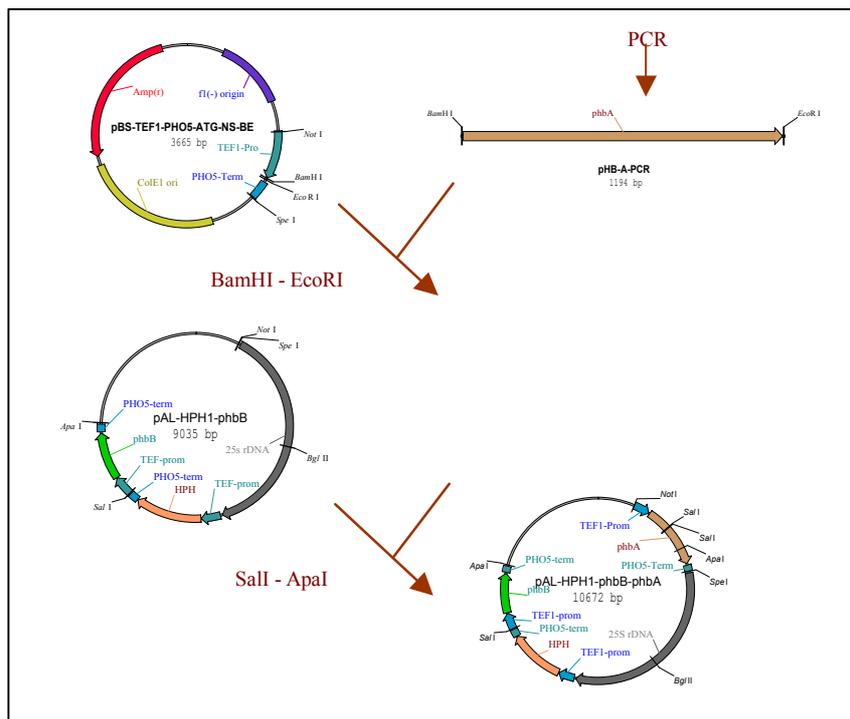


Abbildung 19: Konstruktionsschema für das Plasmid pAL-HPH1-phbA-phbB

Gleichzeitig wurden alle drei *phb*-Gene auch in *A. adeninivorans* T1 transformiert und exprimiert. Dazu wurden die Plasmide pAL-HPH1-phbA-phbB und pAL-HPH1-phbC genutzt. Die Transformanten wurden zunächst auf ihre Hygromycin-Resistenz analysiert. Die mit der höchsten Resistenz wurden für die weiteren Analysen ausgesucht. Anschließend wurde ihre chromosomale DNA isoliert und diese als Template für eine PCR mit *phbA*-, *phbB*- und *phbC*-spezifischen Primern genutzt. Auf diese Weise ließen sich die Hygromycin-resistenten Transformanten selektieren, die alle drei *phb*-Gene in ihrer chromosomalen DNA integriert hatten.

4.2.4 Analyse der Transformanten *A. adeninivorans* G1211/pAL-HPH1-phbA-phbB-pAL-ALEU2m-phbC und T1/pAL-HPH1-phbA-phbB-pAL-HPH1-phbC - Enzymaktivität und Polymerbildung

Tabelle 22: Nachweis der Aktivitäten der PHB-Enzyme und der PHB-Konzentration von *A. adeninivorans* Transformanten

Stamm	β -Ketothiolase [U/mg]	AcAcCoA-Reduktase [U/mg]	PHA-Synthase [U/mg]	PHB Gehalt [%]
<i>A. adeninivorans</i> G1211/pAL-HPH1-TEF-phbA-phbB-pAL-ALEU2m-TEF-phbC 1	1,3400	66,570	2,3600	0,0026
<i>A. adeninivorans</i> G1211/pAL-HPH1-TEF-phbA-phbB-pAL-ALEU2m-TEF-phbC 3	1,5700	41,600	1,4800	0,0010
<i>A. adeninivorans</i> T1/pAL-HPH1-phbA-phbB-pAL-HPH1-phbC 3	0,1067	0,081	0,1169	0,0022

Arxula Transformanten (G1211/pAL-HPH1-phbA-phbB-pAL-ALEU2m-phbC und T1/pAL-HPH1-phbA-phbB-pAL-HPH1-phbC), die alle drei *phb*-Gene in der chromosomalen DNA integriert hatten, wurden auf β -Ketothiolase-, Acetoacetyl-CoA-Reduktase- bzw. PHA-Synthase-Aktivität und Polymerbildung analysiert. So werden alle drei heterologen Gene exprimiert, die entsprechenden Enzyme synthetisiert und PHA in den Zellen akkumuliert (Tab. 22).

4.3 Expression bakterieller *phb*-Biosynthesegene in *Debaryomyces hansenii* und *D. polymorphus*

Alle *Arxula*-Plasmide, die als Basisplasmid pAL-HPH1 enthalten, sind so konstruiert, dass sie sich gleichzeitig in *D. hansenii* H158 und *D. polymorphus* H120 transformieren lassen (siehe Zwischenbericht 2000). So konnten die Plasmide pAL-HPH1-*phbC* und pAL-HPH1-*phbA*-*phbB* auch in beide *Debaryomyces* Arten transformiert werden. Die vorliegenden Transformanten *D. hansenii* H158/pAL-HPH1-*phbC*, H158/pAL-HPH1-*phbA*-*phbB*, *D. polymorphus* H120/pAL-HPH1-*phbC* und H120/pAL-HPH1-*phbA*-*phbB* wurden auf Expression der Gene *phbA*, *phbB* und *phbC* bzw. PHB-Akkumulation (*D. hansenii* H158/pAL-HPH1-*phbC*, *D. polymorphus* H120/pAL-HPH1-*phbC*) untersucht.

4.3.1 Expression des *phbB*-Gens

Tabelle 23: Spezifische Aktivität der NADPH-abhängigen Acetoacetyl-CoA Reduktase in *D. hansenii* (H158) und Rekombinanten

Stamm	Spezifische Aktivität (in U/g)
<i>D. hansenii</i> H158	0,011
<i>D. hansenii</i> H158/pAL-HPH1- <i>phbB</i> 4	0,040
<i>D. hansenii</i> H158/pAL-HPH1- <i>phbB</i> 5	0,019

Die Tabelle 23 zeigt, dass in den Transformanten das *phbB*-Gen exprimiert und das entsprechende Enzym synthetisiert wurde.

4.3.2 Expression des *phbB*- und *phbA*-Gens

Tabelle 24: Spezifische Aktivität der β -Ketothiolase und der NADPH-abhängigen Acetoacetyl-CoA Reduktase in *D. polymorphus* H120 und *D. hansenii* H158 und Rekombinanten (in U/g)

Stamm	β -Ketothiolase	Acetoacetyl-CoA Reduktase
<i>D. polymorphus</i> H120	0,308	0,041
<i>D. polymorphus</i> H120/pAL-HPH1- <i>phbA</i> - <i>phbB</i> 3	0,063	0,012
<i>D. polymorphus</i> H120/pAL-HPH1- <i>phbA</i> - <i>phbB</i> 4	0,104	0,010
<i>D. hansenii</i> H158	0,016	0,003
<i>D. hansenii</i> H158/pAL-HPH1- <i>phbA</i> - <i>phbB</i> 6	0,015	0,017
<i>D. hansenii</i> H158/pAL-HPH1- <i>phbA</i> - <i>phbB</i> 9	0,058	0,007

Die Gene *phbA* und *phbB* werden in den *D. polymorphus* Transformanten nicht oder nur sehr schwach exprimiert. Im Fall von *D. hansenii* wird die β -Ketothiolase exprimiert und das Enzym gebildet (Tab. 24). Die Ergebnisse hinsichtlich der Reduktase zeigen zwar eine höhere Enzymaktivität im Vergleich zum Ausgangsstamm. Ob die Expressionshöhe jedoch ausreicht, den Kohlenstofffluss in Richtung PHB zu ziehen, bleibt zu prüfen.

4.3.3 Expression des *phbC*-Gens

Tabelle 25: Spezifische Aktivität der PHA-Synthase und Gehalt an PHB in *D. polymorphus* H120 und *D. hansenii* H158 und Rekombinanten

Stamm	PHB Gehalt [%]	PHA Synthase [U/mg]
<i>D. polymorphus</i> H120	0,0008	0,0017
<i>D. polymorphus</i> H120/pAL-HPH1- <i>phbC</i> 1	0,0018	3,2600
<i>D. polymorphus</i> H120/pAL-HPH1- <i>phbC</i> 2	0,0009	3,2300
<i>D. hansenii</i> H158	0,0010	0,0058
<i>D. hansenii</i> H158/pAL-HPH1- <i>phbC</i> 1	0,0018	2,6500

Die Ergebnisse zeigen, dass das *phbC*-Gen exprimiert und die Polymerase synthetisiert wird. Gründe für die unzureichende Polymerbildung könnten u.a. im fehlenden Substratanstrom zu suchen sein.

4.3.4 Expression aller *phb*-Gene

Tabelle 26: Nachweis der Aktivitäten der PHB-Enzyme und der PHB-Konzentration von *D. polymorphus* H120, *D. hansenii* H158 und ausgewählten Transformanten

Stamm	β-Ketothiolase (U/mg)	AcAcCoA-Reduktase (U/mg)	PHB-Synthase (U/mg)	PHB-Gehalt (%)
<i>D. polymorphus</i> H120	0,0362	0,0115	0,0017	$8,00 \times 10^{-4}$
<i>D. polymorphus</i> H120/pAL-HPH1-phbA-phbB-pAL-HPH1-phbC 1	0,0201	0,0099	0,0035	$4,24 \times 10^{-3}$
<i>D. polymorphus</i> H120/pAL-HPH1-phbA-phbB-pAL-HPH1-phbC 4	0,0212	0,0150	0,0026	$1,34 \times 10^{-2}$
<i>D. hansenii</i> H158	0,0102	0,0115	0,0058	$1,00 \times 10^{-3}$
<i>D. hansenii</i> H158/pAL-HPH1-phbA-phbB-pAL-HPH1-phbC 1	0,0064	0,0075	0,0176	$4,48 \times 10^{-3}$
<i>D. hansenii</i> H158/pAL-HPH1-phbA-phbB-pAL-HPH1-phbC 3	0,0197	0,0154	0,0027	$5,69 \times 10^{-3}$

In den Transformanten mit allen drei *phb*-Genen werden diese auch exprimiert und aktive Enzyme synthetisiert. Die PHB-Konzentration ist allerdings äußerst gering (Tab. 26).

4.3.5 Einfluss von Effektoren auf die Polymerbildung bei *Debaryomyces*-Transformanten

Cerulenin, das bereits bei der Untersuchung von *Saccharomyces* Transformanten eingesetzte Suizid-Substrat der Fettsäuresynthetase, wurde eingesetzt. Falls es zu einem deutlichen Abfall im PHB-Gehalt in Anwesenheit von Cerulenin kommt, so ist dies als ein Zusammenhang zwischen PHB-Synthese und Fettsäuresynthese zu werten. Bei *D. polymorphus* ist der PHB-Gehalt in Anwesenheit von Cerulenin mehr als doppelt so groß, als ohne Cerulenin. Bei *D. hansenii* steigt der PHB-Gehalt ebenfalls, jedoch nicht so deutlich (Tab.27).

Aus diesen Ergebnissen kann man schlussfolgern, dass die Vorstufen für die PHB-Synthese in *Debaryomyces* via Fettsäuresynthese angeliefert werden.

Tabelle 27: Einfluss von Cerulenin auf die PHB-Bildung bei *Debaryomyces*-Transformanten

Stamm	PHB-Gehalt [%]
<i>D. polymorphus</i> H120/pAL-HPH1-phbA-phbB-pAL-HPH1-phbC	0,00246
<i>D. polymorphus</i> H120/pAL-HPH1-phbA-phbB-pAL-HPH1-phbC + Cerulenin	0,00587
<i>D. hansenii</i> H158/pAL-HPH1-phbA-phbB-pAL-HPH1-phbC	0,00229
<i>D. hansenii</i> H158/pAL-HPH1-phbA-phbB-pAL-HPH1-phbC + Cerulenin	0,00304

4.4 Untersuchungen zu kinetischen und stöchiometrischen Parametern der Produktbildung

Diese Arbeiten haben Modellcharakter. An einem praxisrelevanten Beispiel sollen Kenntnisse und Erfahrungen gewonnen werden, wie Hefen, die sich biotechnologisch als Produzenten bzw. „Katalysatoren“ längst bewährt haben, vermehren lassen, wenn sie ihnen fremde Produkte synthetisieren.

In Batch-Fermentorversuchen zur PHB-Synthese wurden, sowohl im Labor-, als auch im Pilot-Maßstab, kinetische und stöchiometrische Parameter von Wachstum und Produktbildung (spezifische Wachstumsrate, spezifische Produktbildungsrate, die Ausbeute an Biomasse und PHB und die erreichten Polymerkonzentrationen) bei verschiedenen Kohlenstoffsubstraten ermittelt. Weiterhin war herauszufinden, ob, wie „üblich“, die PHB-Bildung durch eine Wachstumslimitation initiiert wird, die ihrerseits durch die Limitation verschiedener Nährstoffe ausschließlich des/der Kohlenstoffsubstrate/s ausgelöst werden kann.

Diese Versuche wurden in einem 1,5-l-Bioreaktor (B. Braun Biotech International, Melsungen, BRD) oder, bei *Arxula*- und *Debaryomyces*-Transformanten, in einem 15-l-Bioreaktor (Techfors ATR, Inc., USA) mit den entsprechenden Medien, wie unter Material und Methoden beschrieben, durchgeführt.

4.4.1 *Saccharomyces cerevisiae* - Transformanten

Die Expression der *phb*-Gene in *S. cerevisiae* erfolgt unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors, d.h. die Transkription der Gene wird durch Galactose induziert. Damit hat man ein einfaches System zur Expressionsregulation der klonierten Fremdgene.

4.4.1.1 *S. cerevisiae* CI3ABYS86/pESC-Leu-*phbB*-*phbA*-pYES2-*phaC*

Zunächst wurden *S. cerevisiae* CI3ABYS86/pESC-Leu-*phbB*-*phbA*-pYES2-*phaC* zur Ermittlung der o.g. Parameter herangezogen.

Die Hefen wurden auf Glucose angezogen und nach Verbrauch dieses Substrates nach Galactose „geschiftet“. Die geringere Wachstumsgeschwindigkeit auf Galactose im Vergleich zu Glucose (μ_{Glc} : $0,196 \pm 0,068 \text{ h}^{-1}$; μ_{Gal} : $0,032 \pm 0,015 \text{ h}^{-1}$ - Abb. 20) bewirkt eine verringerte Bildung des „Bioreaktors“ Hefezelle. Wenn Wachstumsgeschwindigkeit und Produktbildungsgeschwindigkeit positiv korrelieren, dann ist eine geringere Produktbildung wahrscheinlich. Diese Vermutung wurde durch verschiedene Batch-Kultivierungen bestätigt; eine messbare Produktbildung konnte nicht nachgewiesen werden. Andererseits kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine kleinere Geschwindigkeit zur Galactose-Metabolisierung auch eine verringerte Induktion der klonierten Gene verursacht. Die geringen Aktivitäten der an der PHA-Bildung beteiligten Enzyme können als Bestätigung interpretiert werden.

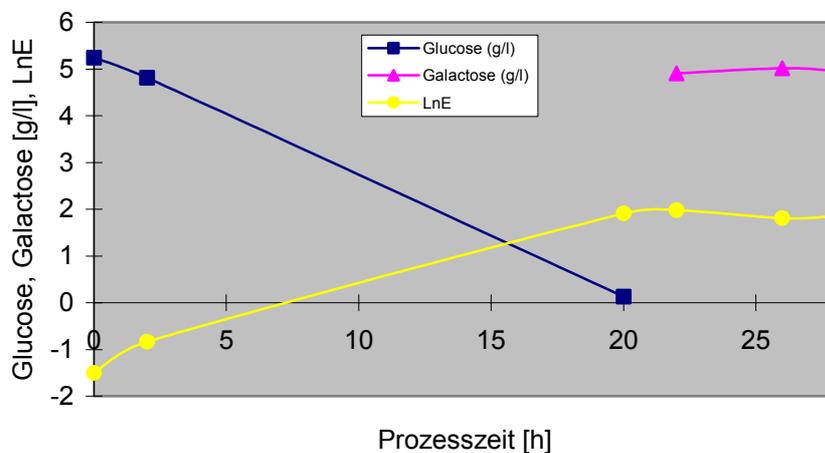


Abbildung 20: Wachstum und Substratverbrauch bei Kultivierung von *S. cerevisiae* CI3ABYS86/pESC-Leu-*phbB*-*phbA*-pYES2-*phaC*1 im Bioreaktor mit Glucose und Galactose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass der Steuerung der Substratzugaben mehr Aufmerksamkeit zu widmen ist. Es wurden Versuche durchgeführt, in denen nach Wachstum auf Glucose die Hefekultur auf eine Mischung von Glucose und Galactose (je 0,18 %) „geschiftet“ wurde. In dieser Mischung sollte Glucose Substrat für Wachstum und PHB-Bildung sein, während Galactose die Induktion der *phb*-Gene bewirken soll. Galactose bewirkt keine Hemmung des Glucoseverbrauches. Unter diesen Bedingungen wurde ein maximaler Polyestergehalt (Summe aus PHB und PHV) von 5 % (w/w) erreicht, die spezifische PHA-Bildungsgeschwindigkeit ist $0,0056 \pm 0,0001 \text{ g/h g}$ der Ertrag $0,1405 \pm 0,002 \text{ g/h g}$ (Abb. 21). Diese Werte liegen zwar über den von LEAF et al. (1996) für den Hefestamm YPH500/pTL85 publizierten Daten, sind aber doch unbefriedigend.

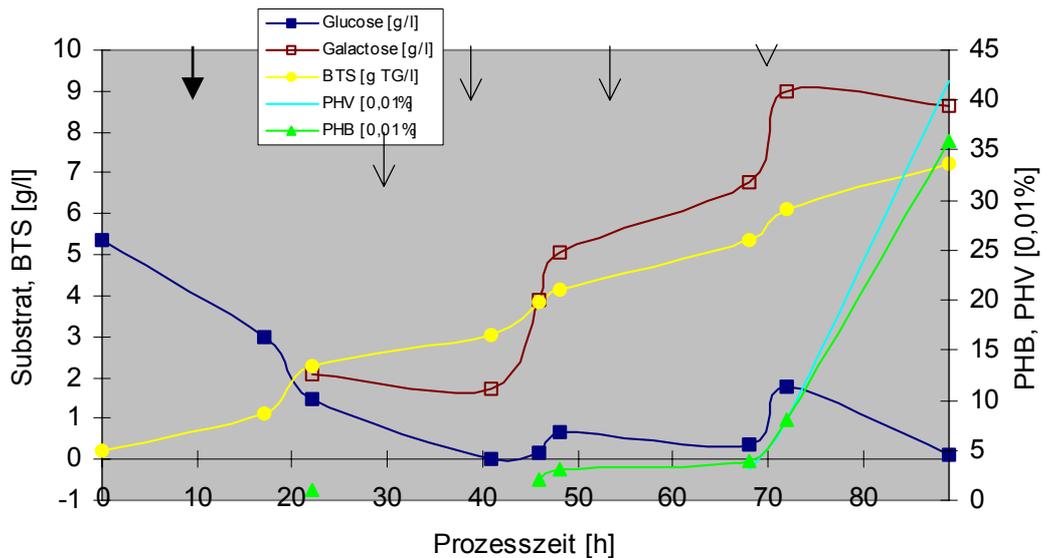


Abbildung 21: PHA-Synthese in *S. cerevisiae* Cl3ABYS86/pESC-Leu-phbB-phbA-pYES2-phaC1, kultiviert im Bioreaktor mit Glucose und Galactose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle. Dicker Pfeil: Start fed-batch, dünne Pfeile: Zugabe von Substraten

4.4.1.2 *S. cerevisiae* INVSc1/pESC-Leu-phbB-phbA-pYES2-phaC

Die *phb*-Gene wurden in *S. cerevisiae* INVSc1 (INVSc1/pESC-Leu-phbB-phbA-pYES2-phaC) übertragen, der als Gal-Plus Stamm auf dem Induktionssubstrat eine höhere Wachstumsgeschwindigkeit als die o.g. aufweisen sollte. In fed-batch Kultivierungen mit Galactose als C-Quelle konnte diese Annahme nicht bestätigt werden. Folgende Wachstumsgeschwindigkeiten wurden erreicht: μ_{Glc} $0,043 \pm 0,016 \text{ h}^{-1}$ und μ_{Gal} $0,009 \pm 0,0003 \text{ h}^{-1}$. Diese geringen Geschwindigkeiten sollten, unter der Annahme einer wachstumsgekoppelten Produktbildung, zu geringen Produktbildungsrate und -konzentrationen führen. Dieses war festzustellen. Es wurden auf Galactose als C-Quelle maximal 0,85 % PHA erreicht und die spezifische PHA-Bildungsgeschwindigkeit q_{PHA} erreichte Werte von $0,0012 \text{ g/h g}$. Die Verwendung einer Substratmischung von Glucose und Galactose als C-Quelle erbrachte keine Verbesserung der Produktbildung [$q_{\text{PHA}} = 1,2 \times 10^{-6} \pm 1,85 \times 10^{-7} \text{ g/h g}$, PHB 0,0026 %; PHV 0,006 %].

Für den Stamm *S. cerevisiae* (INVSc1/pESC-Leu-phbB-phbA-pYES2-phaC) ist festzustellen, dass er prinzipiell in der Lage ist, PHA (PHB und PHV) wachstumsassoziiert zu produzieren, dass jedoch die erreichten Gehalte keineswegs genügen.

4.4.1.3 *S. cerevisiae* Cl3ABYS86/pESC-Leu-phbB-phbA-pYES2-phbC

Die Versuche mit dieser Transformante wurde durchgeführt, um einerseits den kompletten PHB-Syntheseapparat aus *R. eutropha* in *S. cerevisiae* zur Expression zu bringen und den Einfluss des Herkunftswirtes auf das Expressionsniveau zu überprüfen. Andererseits soll der Einfluss der Ethanolbildung auf die PHB-Bildung untersucht werden. In batch-Versuchen mit Glucose als C-Quelle wurde eine Wachstumsgeschwindigkeit von μ_{Glc} $0,1125 \pm 0,00115 \text{ h}^{-1}$ erzielt. Der Ertrag Y_{XS} betrug $0,189 \pm 0,077 \text{ g/g}$.

Das Expressionsniveau konnte nicht verbessert werden. Die PHB-Bildungsrate betrug $0,00188 \text{ g/h g}$ gegenüber $0,0056 \pm 0,0001 \text{ g/h g}$ in *Saccharomyces* mit dem Synthasegen aus *M. extorquens*. Es wurde $3,1 \times 10^{-3} \%$ PHB gebildet gegenüber 5 % bei *S. cerevisiae* Cl3ABYS86/pESC-Leu-phbB-phbA-pYES2-phaC (Abb. 21). Es wurde 7,49 g/l Ethanol gebildet mit einer Rate von $0,175 \text{ g/h g}$. Da diese Bildung mit der PHB-Bildung um Reduktionsäquivalente und das C-Skelett konkurriert, könnte sie zur deutlichen Reduktion der PHB-Bildung beitragen, wie bereits in Untersuchungen mit Hemmstoffen (Abb. 9) vermutet wurde. Soll eine Gärhefe Produzent für PHA sein, so ist Sauerstoff-Limitation nicht geeignet, die PHA-Bildung zu initiieren, es sei denn, es gelingt, die Gärung durch Inhibitoren abzuschalten, zumindest aber zu reduzieren.

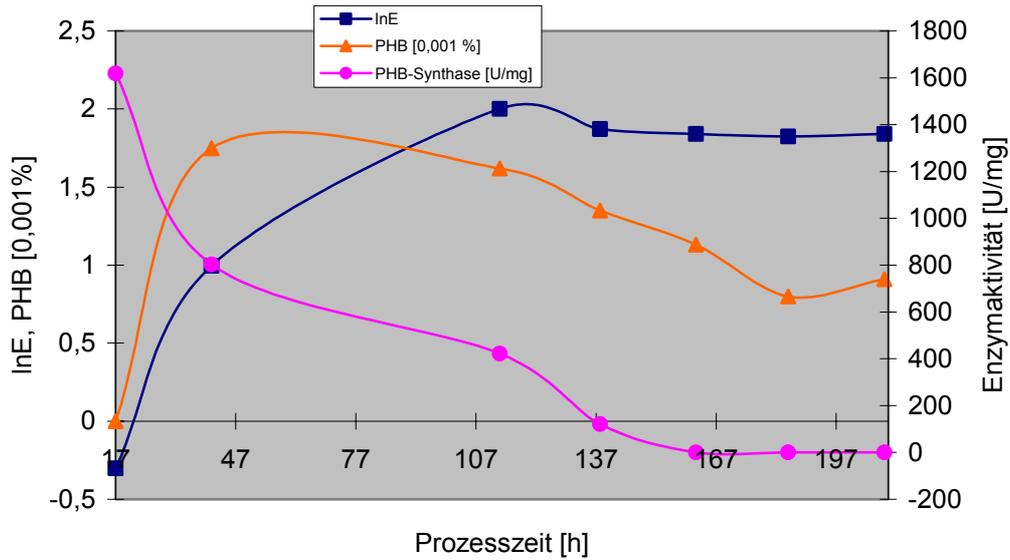


Abbildung 22: PHA-Synthese in *S. cerevisiae* INVSc1/pESC-Leu-phbB-phbA-pYES2-phaC, kultiviert im Bioreaktor mit Glucose und Galactose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle.

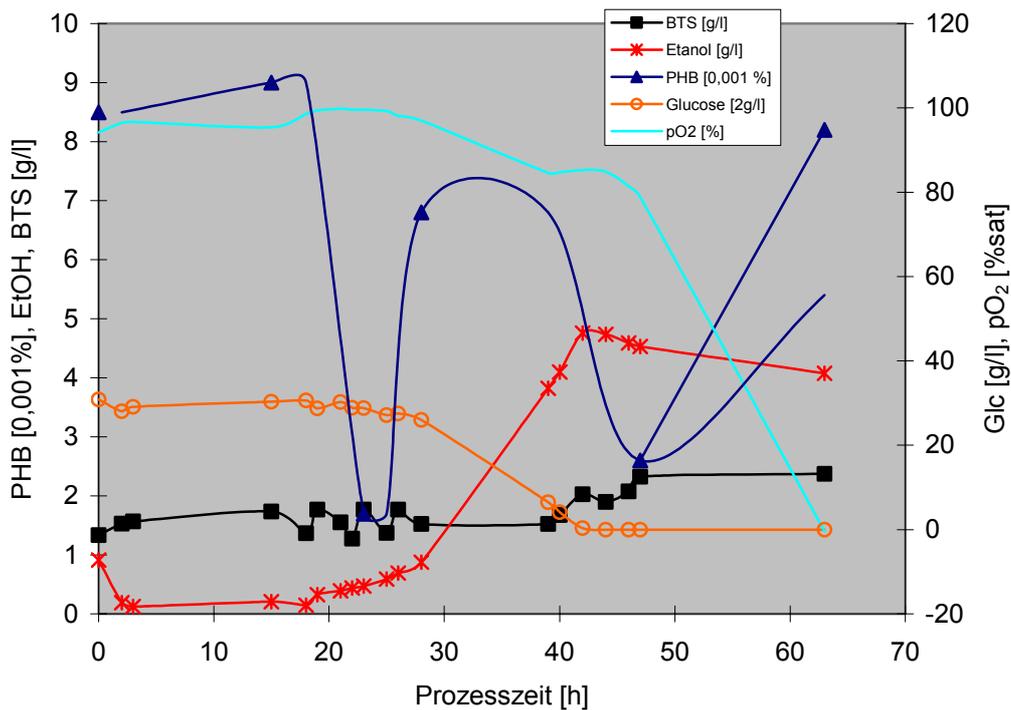


Abbildung 23: PHA-Synthese in *Saccharomyces cerevisiae* CI3ABYS86/pESC-Leu-phbB-phbA-pYES2-phaC, kultiviert im Bioreaktor mit Glucose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle.

Untersuchungen hinsichtlich des Beginns der PHB-Bildung in transgenen *Saccharomyces* konnten nicht eindeutig nachweisen, ob die Produktbildung wachstumsassoziiert ist oder nicht (Abb. 22, Abb. 23). Üblicherweise wird in Bakterien die PHB-Bildung ausgelöst, wenn Wachstum und Vermehrung limitiert sind („overflow metabolism“). Bei transgenen *E. coli*, die die *phb*-Gene tragen, findet die PHB-Bildung während des Wachstums statt; in diesem Fall handelt es sich nicht um „overflow metabolism“, das PHB ist für das Bakterium ohne die physiologische Bedeutung. In transgenen PHB-bildenden

Hefen werden die Gene bei Vorhandensein des Induktors Galactose exprimiert, liegen also bereits in der Wachstumsphase vor und die Produktsynthese könnte ebenfalls wachstumsgekoppelt ablaufen. Die Versuche mit *S. cerevisiae* INVSC1/pESC-Leu-phbB-phbA-pYES2-phaC belegen dies. Diese Ergebnisse werden durch die spezifischen Enzymaktivitäten der PHB-Synthase bestätigt, wie Abb. 22 zeigt.

Versuche, eine Begrenzung des Wachstums der transgenen Hefe durch die Auszehrung von Stickstoff zu erreichen, scheiterten am notwendig einzusetzenden Medium, eine diesbezügliche Variation des Mediums verringerte die Wachstumsrate auf beiden Kohlenstoffsubstraten. Die Limitation des Wachstums durch Sauerstoff lieferte Hinweise dafür, dass die Produktbildung wachstumsgekoppelt ablaufen könnte.

Literaturbefunde mit *Saccharomyces*, die eine Synthese von Lipiden unter Bedingungen einer Wachstumslimitation zeigen (CHALLINOR et al. 1964) gehen nicht konform mit unseren Beobachtungen. Würde dies für eine rekombinante PHB-Bildung, die im Cytoplasma stattfindet, auch zutreffen, bedeutet dies, dass ein höherer Polymergehalt nicht erreicht werden kann, da eine Limitation des Wachstums durch Auszehrung von z.B. Stickstoff nicht eintritt bzw. die Kapazität der Zellen zur PHB-Bildung nicht ausreicht.

Ein weiterer Grund für die bei *Saccharomyces*-Transformanten erzielte geringe und mit der von Bakterien nicht konkurrierbare Produktbildung könnte der für die Untersuchungen gewählte Hefe-Wirtsstamm sein, eine Möglichkeit, die auch von LEAF et al. (1996) diskutiert worden ist. Der Stamm ist sehr gut geeignet für genetische Modifikationen, jedoch durch die geringen Wachstumsraten und der geringen Zelldichte, die erreicht wurde, nur mit Einschränkungen für biotechnologische Untersuchungen. Hinzu kommt, dass die Gene episomal auf zwei Vektoren lokalisiert sind, was unter Umständen zum Verlust der genetischen Information führen kann. Die klonierten Gene sollten deshalb in das Hefechromosom integriert werden, wie das bei *Arxula*- und *Debaryomyces*-Stämmen der Fall ist.

4.4.2 *A. adenivorans*-Transformanten

Es wurden *A. adenivorans* 135/pAL-HPH1-phbC, G1211/pAL-HPH1-phbA-phbB-pAL-Leu2m-phbC und T1/pAL-HPH1-phbC untersucht. Sofern nicht anders angegeben, erfolgte die Kultivierung auf Minimalmedium.

4.4.2.1 *A. adenivorans* 135/pAL-HPH1-phbC

Als C-Quelle für das Wachstum wurde Glucose eingesetzt. Die Wachstumsrate lag bei $\mu = 0,055 \text{ h}^{-1}$. Auf Glucose wurden 0,0089 % PHB mit einer Bildungsrate von $3,81 \times 10^{-6} \text{ g/h g}$ gebildet. Die Kultur wurde "geschiftet" auf Sorbitol. Mit einem Gemisch aus beiden Substraten ließen sich sowohl die Wachstumsrate ($\mu = 0,069 \text{ h}^{-1}$), als auch die Bildungsrate erhöhen ($9,40 \times 10^{-6} \text{ g/h g}$); es wurde zusätzlich PHV (0,00149 %) mit einer Bildungsrate von $1,55 \times 10^{-5} \text{ g/h g}$ gebildet. Sorbitol als C-Quelle allein steigerte weder den PHB-Gehalt (0,0063 %) noch die Bildungsrate ($3,2 \times 10^{-6} \text{ g/h g}$).

Es können keine endgültigen Aussagen getroffen werden hinsichtlich einer möglichen Abhängigkeit der Produktbildung von einer Wachstumslimitation (Abb. 24.). Wahrscheinlich handelt es sich auch in diesem Fall (vgl. *S. cerevisiae*) um eine wachstumsgekoppelte Produktbildung.

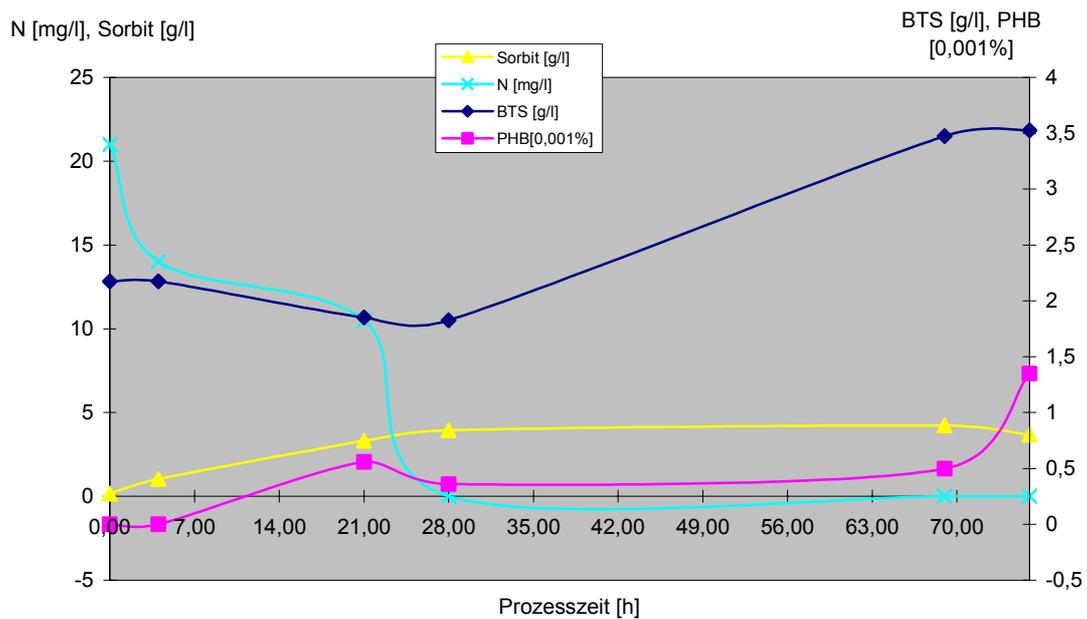


Abbildung 24: Produktbildung von *A. adenivorans* 135/pAL-HPH1-phbC auf Sorbitol.

Als C-Quelle sollte ein Gemisch aus Glucose und Sorbitol mit Vorteil für die Produktbildung zu nutzen sein. Die erhaltenen Parameter für die Produktbildung sind so gering, dass eine Hefe gewählt wurde, die alle *phb*-Gene exprimiert.

4.4.2.2 *A. adenivorans* G1211/pAL-HPH1-phbA-phbB-pAL-Leu2m-phbC

Diese Hefe wurde mit Sorbitol als C-Quelle kultiviert, um Wachstum und Produktbildung zu analysieren. Es wurden eine geringere Wachstumsrate ($\mu = 0,0145 \text{ h}^{-1}$), ein geringerer PHB-Gehalt (0,0025 %) und eine kleinere PHB-Bildungsrate ($q_{\text{PHB}} = 5,87 \times 10^{-7} \text{ g/h g}$) erzielt, so dass dieser Hefestamm als Produktionsstamm nicht geeignet ist.

Es sind mit diesen Transformanten Untersuchungen hinsichtlich der Aktivitäten der beteiligten Enzyme in Abhängigkeit von der Produktbildung durchgeführt worden, die einen Hinweis auf die geschwindigkeitsbestimmende Reaktion erbringen sollen.

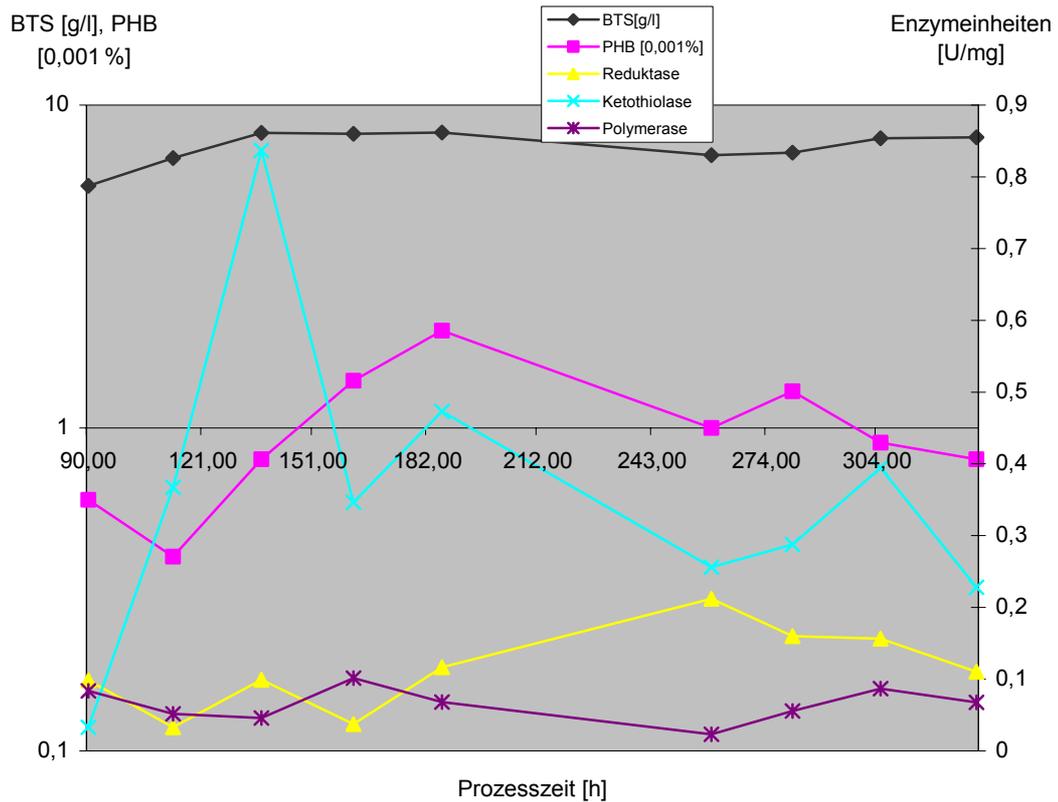


Abbildung 25: Produktbildung bei *A. adenivorans* G1211/pAL-HPH1-phbA-phbB-pAL-Leu2m-phbC.

Aus der Abbildung 25 lässt sich ableiten, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die β -Ketothiolase darstellen sollte. Zur endgültigen Aussage sind jedoch weiterführende Untersuchungen notwendig.

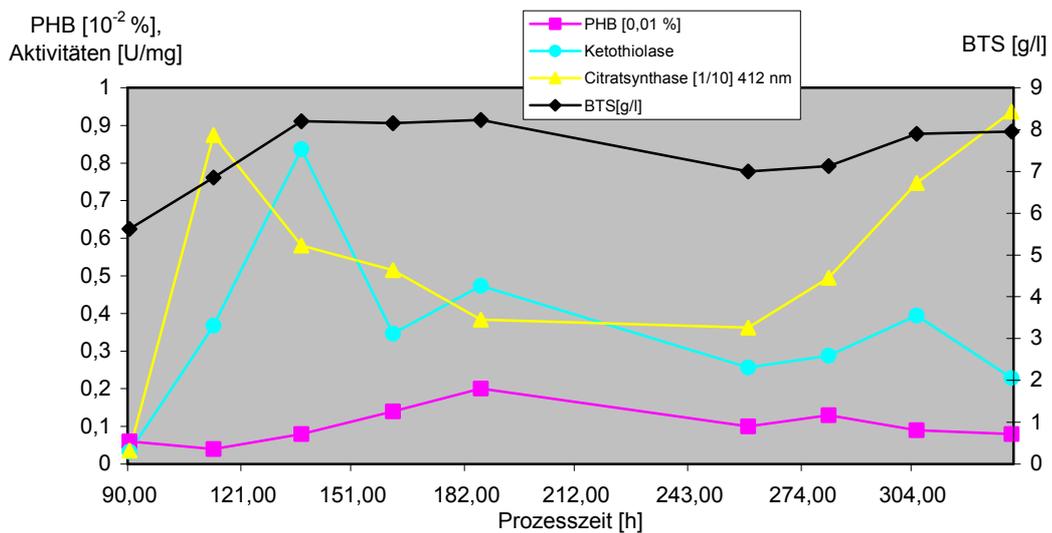


Abbildung 26: Produktbildung bei *A. adenivorans* G1211/pAL-HPH1-phbA-phbB-pAL-Leu2m-phbC.

Citratsynthase und β -Ketothiolase beeinflussen die PHB-Synthese gegenläufig, wie aus Abb. 26 ersichtlich ist.

4.4.2.3 A. adenivorans LS3/pAL-HPH1-phbC

Diese Hefe ist auf einem Minimalmedium mit Sorbitol als C-Quelle "batchwise" kultiviert worden mit einer im Vergleich zum Wildtyp und anderen Transformanten geringeren Wachstumsgeschwindigkeit von $\mu = 0,006 \text{ h}^{-1}$. Anschließend wurde eine kontinuierliche Kultivierung mit verschiedenen Durchflussraten (D) gewählt. Unter der Annahme, dass bei rekombinanten Hefen die Expression der heterologen Gene während Wachstum und Vermehrung stattfindet, sollte die PHA-Bildung der Wachstumsrate proportional sein.

Es konnte eine geeignete Durchflussrate ermittelt werden, wobei die Produktbildungsrate sehr viel kleiner sind, als die bei *S. cerevisiae* ermittelten (Tab. 28). Da Ethanol als das günstigste Substrat für die PHB-Bildung gilt, wurde dieser Versuch mit Ethanol wiederholt (Tab. 29).

Tabelle 28: Abhängigkeit der Polymerbildung von der Durchflussrate bei kontinuierlicher Kultivierung auf Sorbitol als C-Quelle (geeignetes D fett)

C-Quelle	Durchflussrate [h^{-1}]	PHB-Bildungsrate [g/h g]
Sorbitol	0,0055	$4,40 \times 10^{-8}$
	0,0028	$3,85 \times 10^{-7}$
	0,0014	$1,59 \times 10^{-7}$

Die ermittelte optimale Durchflussrate kann in Bezug auf die Produktbildung nicht mit *S. cerevisiae* oder bakteriellen Systemen konkurrieren. Es zeigt sich jedoch auch mit Hefen, dass mit Ethanol als C-Quelle höhere Bildungsraten erzielt werden können (Tab. 29).

Tabelle 29: Abhängigkeit der Polymerbildung von der Durchflussrate bei kontinuierlicher Kultivierung auf Ethanol als C-Quelle (geeignetes D fett)

C-Quelle	Durchflussrate [h^{-1}]	PHB-Bildungsrate [g/h g]
Ethanol	0,0005	0,0028
	0,0025	0,0096

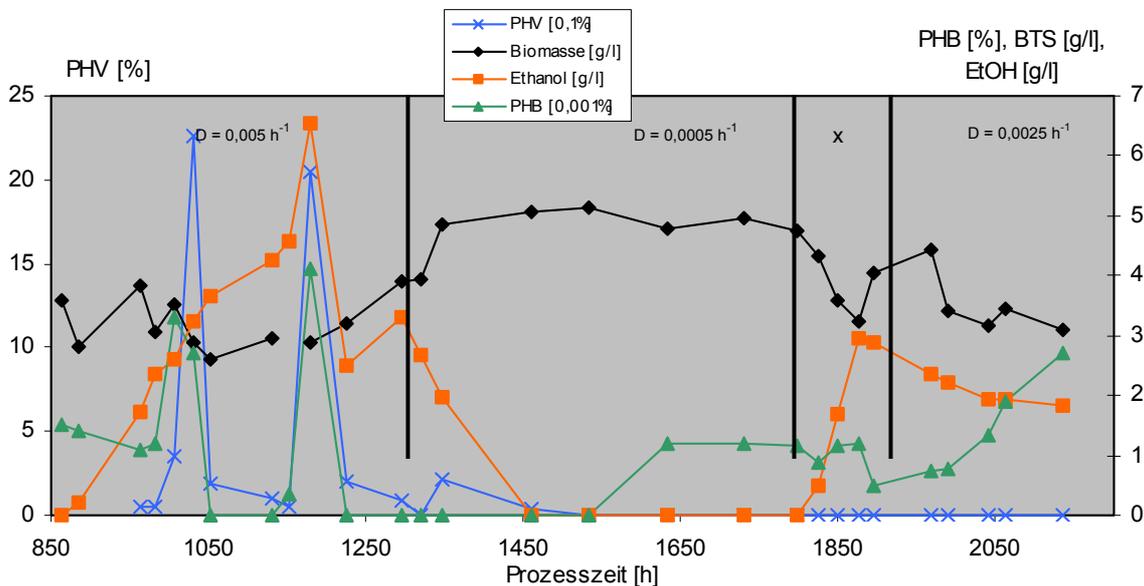


Abbildung 27: A. adenivorans LS3/pAL-HPH1-phbC in kontinuierlicher Kultivierung auf Ethanol als C-Quelle. X: D = 0,005 h^{-1}

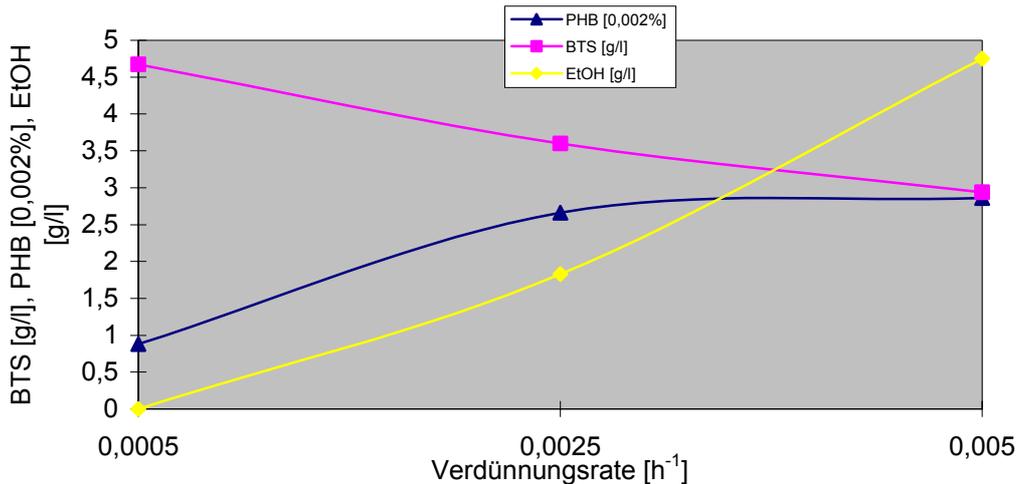


Abbildung 28: Zusammenhang zwischen der Verdünnungsrate D und der Bildung von Biomasse und PHB bei *A. adenivorans*.

Es zeigte sich, dass eine höherer Durchflussrate eine höhere Produktbildungsrate bewirkt (Abb. 28). Der Ethanolgehalt könnte dabei als Inhibitor wirken: unter niedriger Durchflussrate auf Grund zu geringer Konzentration und bei höherer Rate infolge einer Akkumulation von Ethanol.

4.4.2.4 Produktbildung im "zig-Liter"-Maßstab

Die Hefe *A. adenivorans* LS3 wurde auf einem Komplexmedium (YEPD) mit Glucose als fed-batch im 15-l-Maßstab kultiviert (Abb. 29).

Für diese Fermentation wurde eine Wachstumsgeschwindigkeit von $\mu = 0,06 \text{ h}^{-1}$ und ein Wachstumsertrag von $Y_{X/S} = 0,47 \text{ g/g}$ erhalten (Abb. 29). Diese Werte entsprechen den Daten, die unter gleichen Bedingungen mit *D. hansenii* H158 erreicht wurden (4.4.3.2). Die Wachstumsgeschwindigkeiten sind vergleichbar mit denen, die mit Transformanten von *A. adenivorans* 135 auf Minimalmedium und Glucose oder einem Gemisch von Glucose und Sorbit als C-Quelle erreicht wurden (4.4.2.1), nicht jedoch mit Parametern, erzielt mit Transformanten von *A. adenivorans* LS3 (4.4.2.3). Auf Komplexmedium, wie in diesem Versuch, sind höhere Wachstumsgeschwindigkeiten und Biomasseerträge im Vergleich zum Minimalmedium zu erwarten. Für die Synthese von PHA ist dieses Medium weniger geeignet und ein definiertes Medium vorzuziehen. Deshalb sollten diese Pilotversuche mit Transformanten von *A. adenivorans* 135 auf Minimalmedium mit einem Glucose/Sorbit-Gemisch als C-Quelle wiederholt werden.

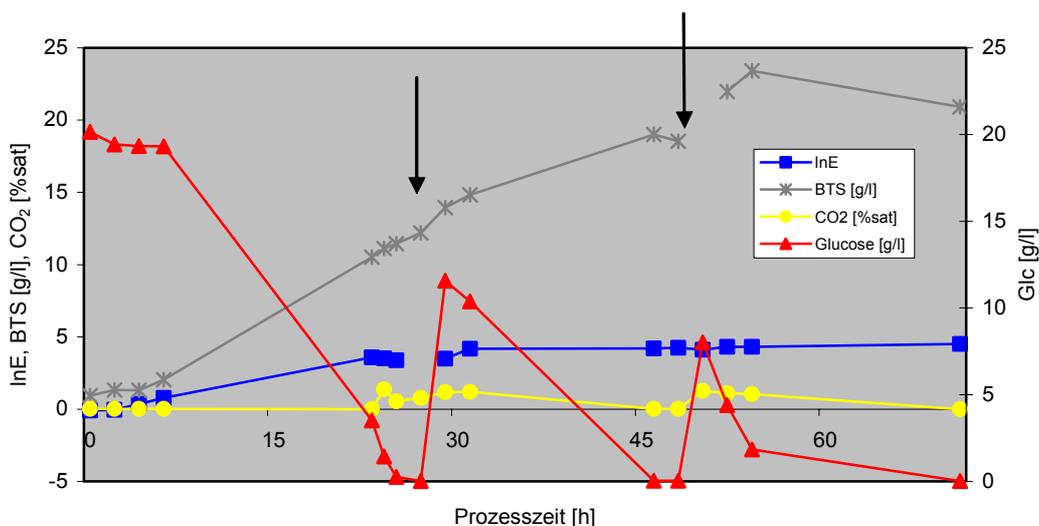


Abbildung 29: Kultivierung von *A. adenivorans* LS3 auf YEPD-Medium und Glucose (Pfeile = Glucosezugaben).

Für die Auswahl eines geeigneten Hefestammes hinsichtlich einer hohen Synthese von PHA könnten die unterschiedlichen morphologischen Formen von *A. adenivorans* LS3 und 135 bei der gewählten

Kultivierungstemperatur von 30°C von Bedeutung sein (Abb. 30). Der Stamm LS3 liegt bei dieser Temperatur als Zelle vor, während der Stamm 135 Pseudomycel bildet. Für *A. adeninivorans* LS3 ist bekannt, dass sich bei 42°C die Zellmorphologie ändert. So bilden Zellen bei Temperaturen <42°C die Hefeform, bei 42°C Pseudomycel und bei > 42°C Mycel. Dieser umweltbedingte Dimorphismus ist reversibel und unabhängig vom genutzten Medium. Für den Stamm 135 sind in ersten Versuchen höhere PHA-Konzentrationen erhalten worden. Somit sind Untersuchungen von beiden Stämmen in Bezug auf die Produktbildung in Abhängigkeit von der Temperatur (und damit von der Zellmorphologie) angeraten.



Abbildung 30: *A. adeninivorans* LS3 (links) und *A. adeninivorans* 135 (rechts), kultiviert mit Glucose als C-Quelle bei 30°C, durchlichtmikroskopische Aufnahme, Vergrößerung 1600x

4.4.3 *D. hansenii* und *D. polymorphus*-Transformanten

Die oleogene Hefe *Debaryomyces* sollte aufgrund ihrer Fähigkeit zur Synthese und Speicherung von Lipiden (die maximal für Fetthefen erreichten und veröffentlichte Gehalte an Speicherlipiden liegen bei 40 - 60 % der Hefetrockenmasse [RATLEDGE 1989]) für eine PHA-Synthese prädestiniert sein.

In Schüttelkolbenversuchen wurden Transformanten von *D. hansenii* H158 und *D. polymorphus* H120, die alle 3 *phb*-Gene erhalten haben, hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur PHB-Bildung überprüft (Abb. 31).

Auffällig war der im Vergleich zu *Arxula*- und *Saccharomyces*-Transformanten hohe Polymergehalt im Wildtyp. Möglicherweise lässt sich das erhöhte Grundniveau an PHB mit der ausgeprägten Fähigkeit zur Fettakkumulation bei diesen Hefen (und damit der besonderen Eignung als potentielle PHB-Bildner) im Vergleich zu z.B. *Saccharomyces* erklären.

Untersuchungen wurden auch zu den Wachstumsgeschwindigkeiten von Wildtyp und Transformanten durchgeführt (Abb.32). Für die Untersuchungen von Wachstum und Produktbildung wurde danach Glucose als Substrat und die Transformanten *D. polymorphus* H120/pAL-HPH1-phbA-phbB-pAL-HPH1-phbC 4 sowie *D. hansenii* H158/pAL-HPH1-phbA-phbB-pAL-HPH1-phbC 3 ausgewählt.

Von den benutzten Fetthefen wird berichtet, dass die Lipidsynthese eine Limitation eines Wachstumsfaktors voraussetzt; deshalb sollte die PHB-Synthese nach der exponentiellen Wachstumsphase verstärkt ablaufen. Ein Faktor, der die Menge gebildeten Lipides in den Fetthefen beeinflusst, ist vor allem das Verhältnis von Kohlenstoff zu Stickstoff. Weiterhin wird gesagt, dass die kontinuierliche Kultivierung im Chemostat die Methode der Wahl ist, um hohe Produkterträge bei Fetthefen zu erzielen. Diese Fakten sollen in den Versuchen im Labor- und Pilot-Maßstab berücksichtigt werden.

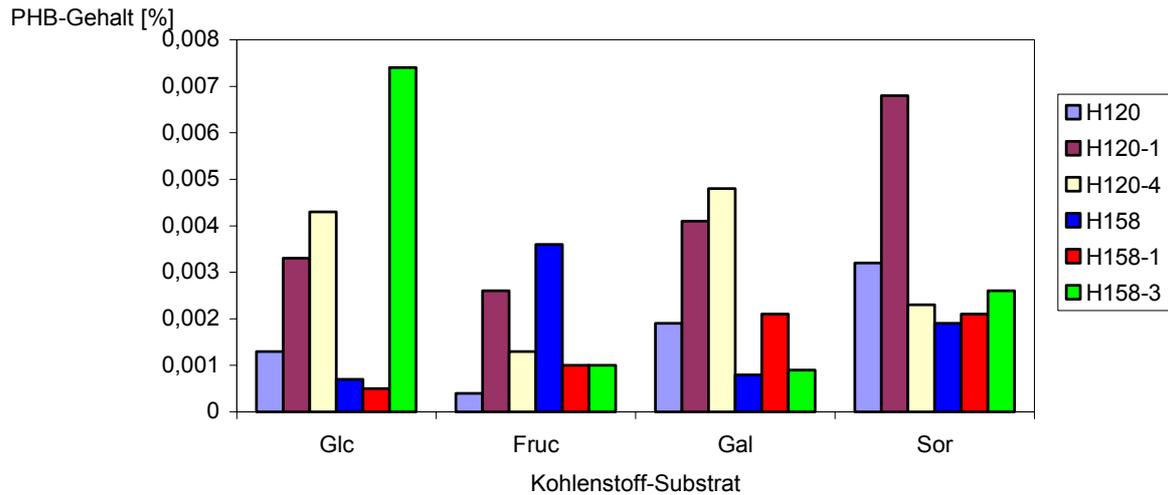


Abbildung 31: PHB-Bildung bei *D. polymorphus* H120 und Transformanten und *D. hansenii* H158 und Transformanten in Abhängigkeit vom Kohlenstoffsubstrat.

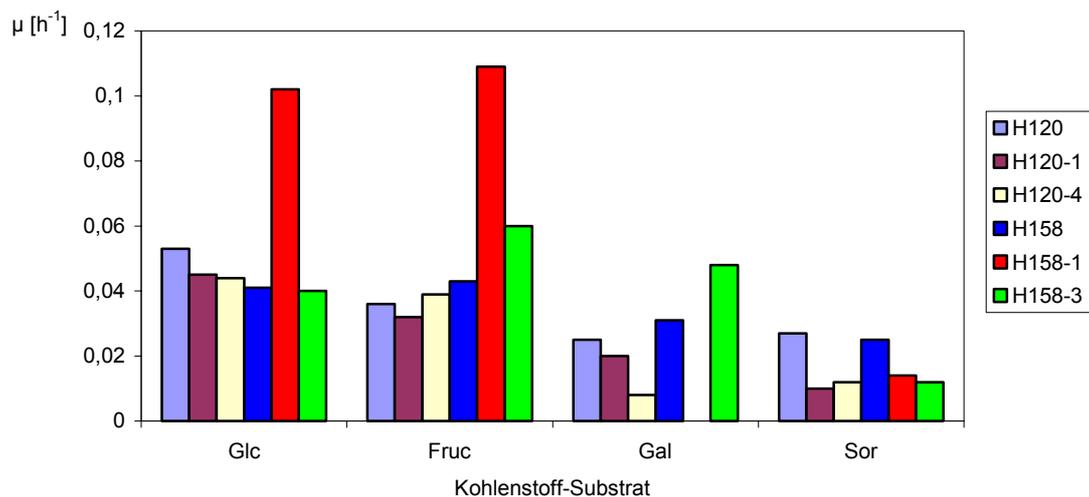


Abbildung 32: Wachstumsrate bei *Debaryomyces polymorphus* H120 und Transformanten und *D. hansenii* H158 und Transformanten in Abhängigkeit vom Kohlenstoffsubstrat.

Mit Hilfe der Nilblau-Färbung ließen sich die Speicherstoffe in *Debaryomyces* indizieren. Nilblau ist ein lipophiler Farbstoff und somit geeignet zum Anfärben von Speicherlipiden und PHB, wie bei Bakterien, wo diese Methode zum Nachweis von PHB in den Zellen genutzt wird (Abb. 33/34). Speicherfette wurden auch bei den untersuchten Hefen gefärbt, jedoch ist diese Methode zu wenig spezifisch, Lipiddoppelmembranen zu markieren. Für die selektive Färbung von PHB in Fetthefen ist die Färbung mit Nilblau deshalb nicht geeignet.

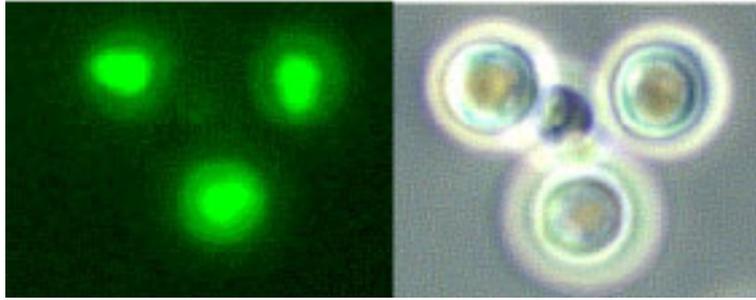


Abbildung 33: *D. hansenii* H158 Nilblaufärbung (links) (Fluoreszenzaufnahme bei 420 nm-Gelbfilter) und durchlichtmikroskopische Aufnahme (rechts)

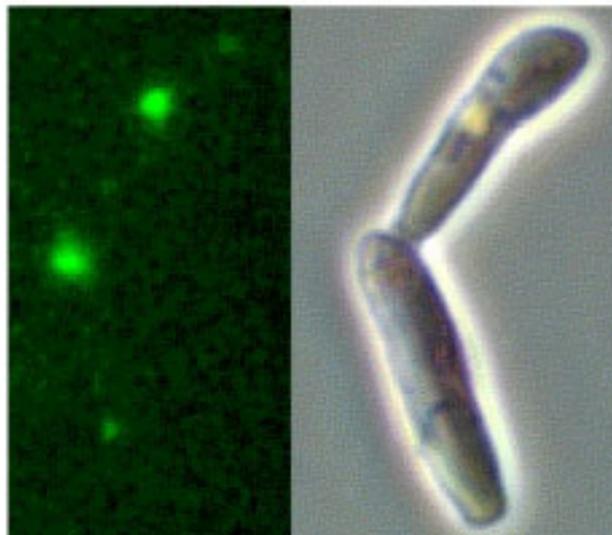


Abbildung 34: *D. polymorphus* H120 Nilblaufärbung (links) (Fluoreszenzaufnahme bei 420 nm-Gelbfilter) und durchlichtmikroskopische Aufnahme (rechts)

4.4.3.1 *D. polymorphus* H120/pAL-HPH1-phbC-pAL-HPH1-phbA-phbB

Diese Transformante wurde im 1,5-l-Fermentor auf Minimalmedium mit Glucose als C-Quelle kultiviert.

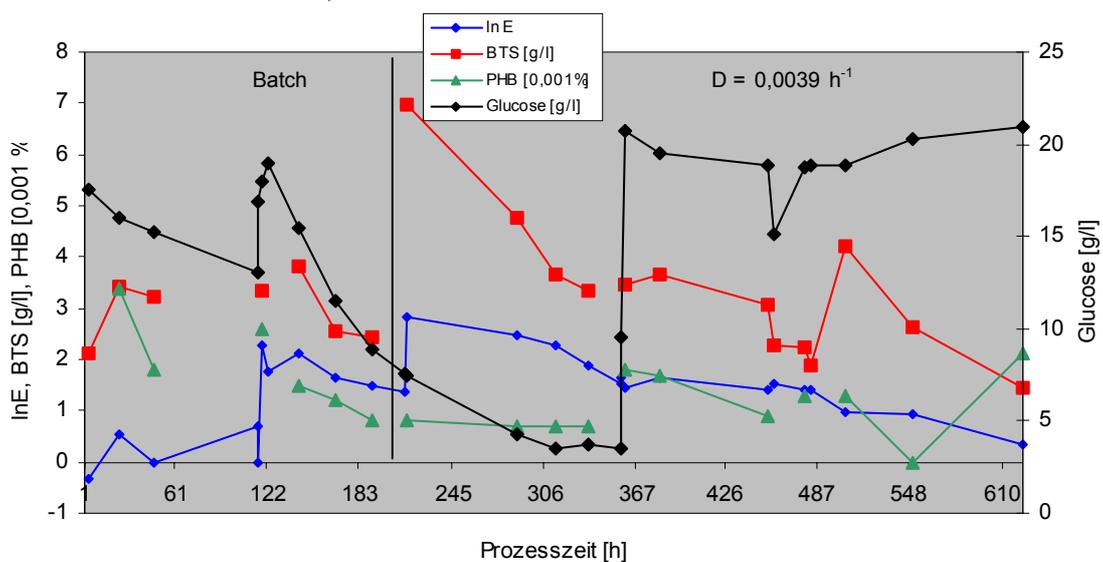


Abbildung 35: Produktbildung bei *D. polymorphus* H120/pAL-HPH1-phbC-pAL-HPH1-phbA-phbB auf Minimalmedium mit Glucose als Substrat.

Die gewählte Durchflussrate (D) war für die Kombination Minimalmedium/Glucose zu groß, es kam zum "Auswaschen" der Kultur, erkennbar am Absinken des Gehaltes an Biomasse. Gleichzeitig staute sich das Wachstumssubstrat an (Abb. 35). Die Bedingungen zur Bildung von PHB waren nicht optimal. Zur Ermittlung des für die Produktbildung optimalen D wären weitere Versuche notwendig, insbesondere die Verwendung eines anderen Mediums.

4.4.3.2 Versuche im "zig-Liter"-Maßstab

4.4.3.2.1 *D. hansenii* H158-Wildtyp

Diese Hefe wurde auf einem Komplexmedium (YEPD) mit Glucose als fed-batch im 15-l-Maßstab kultiviert.

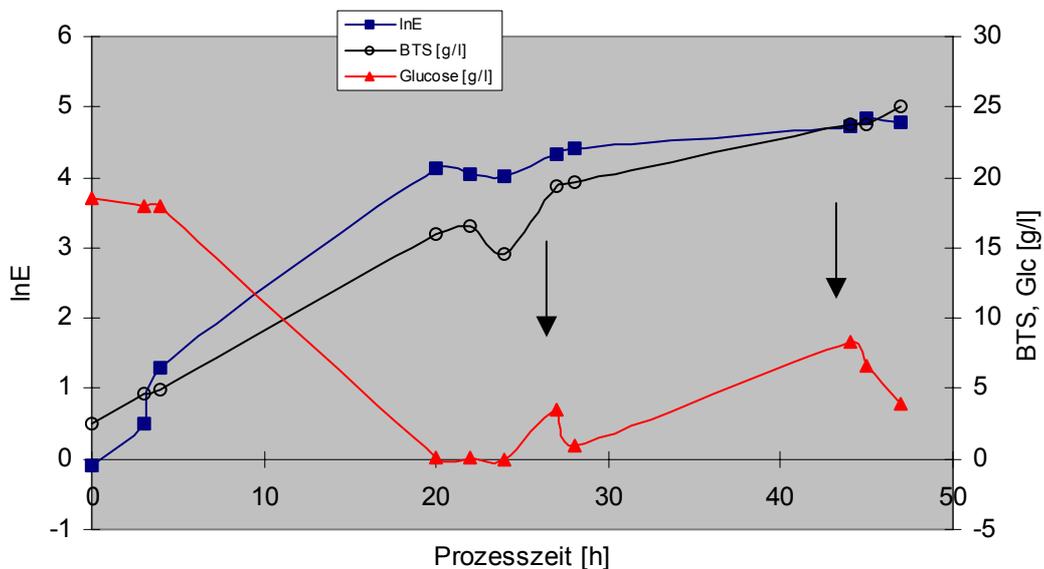


Abbildung 36: Kultivierung von *D. hansenii* H158 auf YEPD-Medium und Glucose. (Pfeile = Glucosezugaben)

Für diese Fermentation wurde eine Wachstumsgeschwindigkeit von $\mu = 0,066 \text{ h}^{-1}$ und ein Wachstumsertrag von $Y_{X/S} = 0,405 \text{ g/g}$ erhalten (Abb. 36). Diese Werte entsprechen Literaturdaten von auf Glucose gewachsenen Fetthefen (BERGANDER 1959) und Daten, die unter gleichen Bedingungen mit *A. adenivorans* LS3 erreicht wurden (4.4.2.4).

4.4.3.2.2 *D. hansenii* H158/pAL-HPH1-phbC-pAL-HPH1-phbA-phbB

Die Versuche mit der Transformante H158/pAL-HPH1-phbC-pAL-HPH1-phbA-phbB wurden im Pilot-Maßstab (15-l-Bioreaktor) durchgeführt. Es kam ein Vollnährmedium (YEPD, s. Material und Methoden) zum Einsatz.

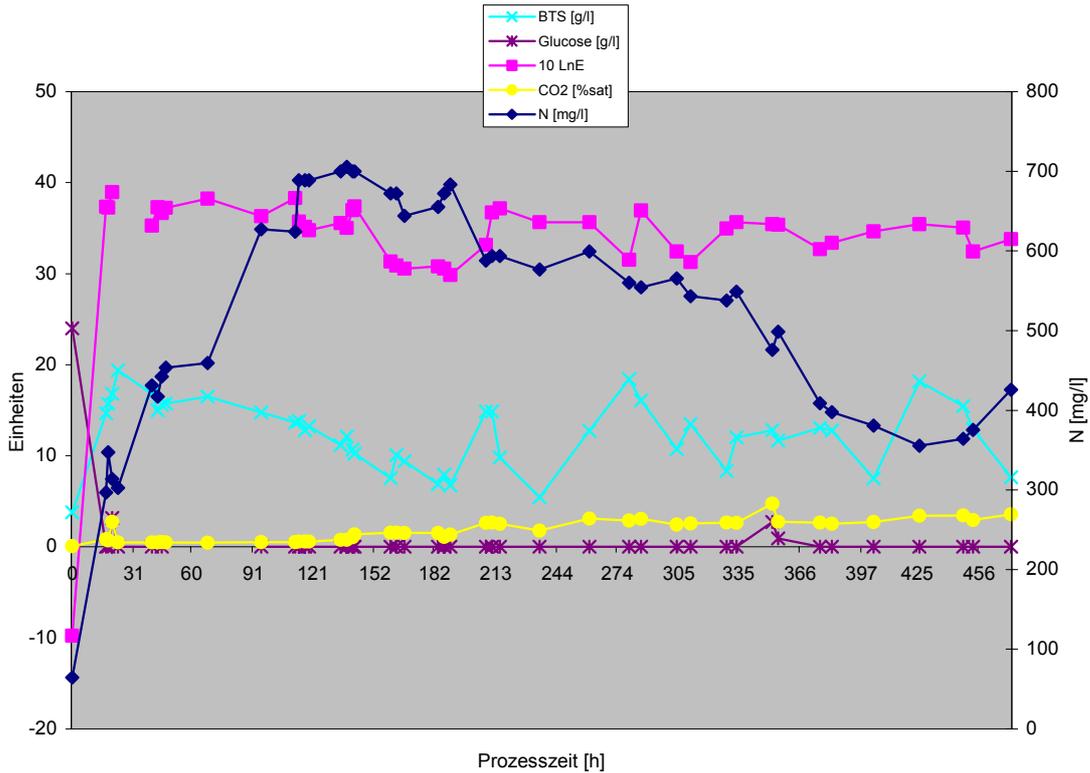


Abbildung 37: Kultivierung von *D. hansenii* H158/pAL-HPH1-phbC-pAL-HPH1-phbA-phbB auf YEPD-Medium und Glucose.

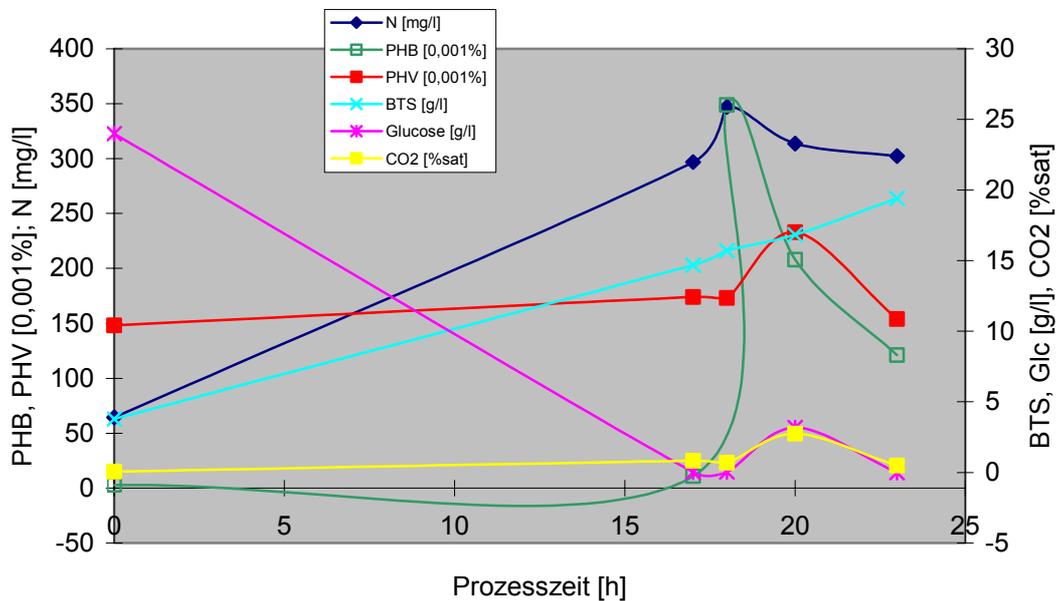


Abbildung 38: Kultivierung von *D. hansenii* H158/pAL-HPH1-phbC-pAL-HPH1-phbA-phbB auf YEPD-Medium und Glucose. Batch-Phase.

In der Batch-Phase wurde eine Wachstumsgeschwindigkeit von $\mu = 0,053 \text{ h}^{-1}$, eine Substratverbrauchsrate $q_s = 0,22 \text{ g/h g}$ und ein Ertrag $Y_{X/S} = 0,24 \text{ g/g}$ errechnet. Die Wachstumsgeschwindigkeit und der Ertrag an Biomasse $Y_{X/S}$ ist im Vergleich zum Wildtyp niedriger. Das Substrat wird mit einer höheren Rate im Vergleich zum Wildtyp aufgenommen. Gleichzeitig ist ein Anstieg an Stickstoff im Überstand festzustellen, der entweder mit einem gebildeten Produkt zu erklären ist oder durch die Bestandteile des Komplexmediums verursacht wird. Eine Produktbildung findet während des Wachs-

tums statt. Interessant ist eine Übereinstimmung zum Stickstoff-Gehalt im Überstand, für die es bisher keine Erklärung gibt (Abb. 37/38).

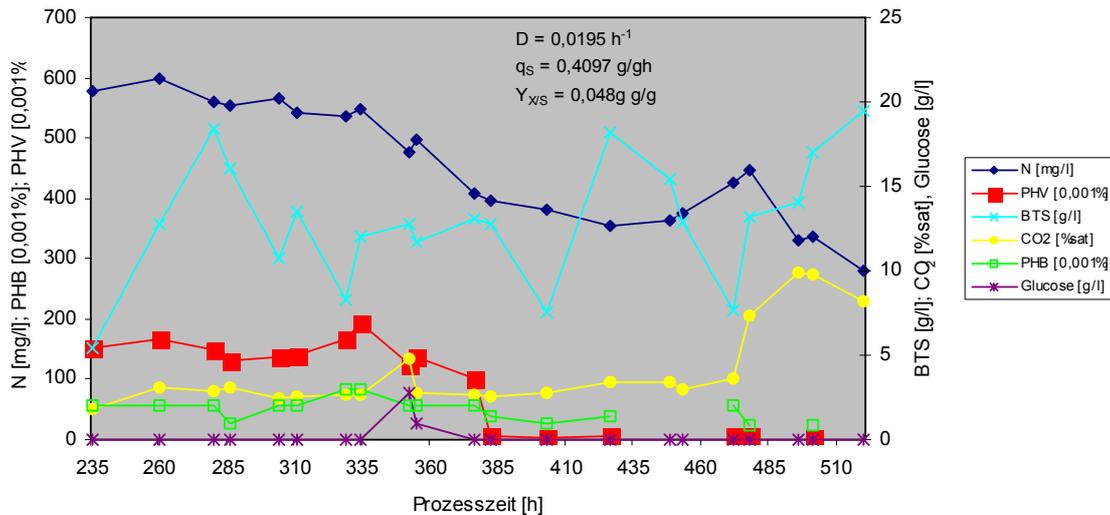


Abbildung 39: Kultivierung von *D. hansenii* H158/pAL-HPH1-phbC-pAL-HPH1-phbA-phbB auf YEPD-Medium und Glucose.

Das gewählte Medium ist für eine wachstumsgekoppelte Produktbildung nicht geeignet, erkennbar z.B. an der sehr geringen Produktbildung und dem Biomasseertrag. Die aufgenommene Energie (q_s) wird weder in PHA noch in Biomasse umgesetzt. Es erfolgt eine Endoxidation zu CO_2 (Abb. 39). Hemmend erwies sich die während des Konti-Prozesses einsetzende starke hohe Schaumbildung (Korrelation mit Stickstoffgehalt im Überstand ?!), die eine geregelte Sauerstoffversorgung erschwerte. Versuche mit einem definierten Medium und Glucose als Kohlenstoffquelle könnten zur Lösung der beschriebenen Probleme führen. Desweiteren sind höhere Durchflussraten auf ihre Verwendbarkeit zu prüfen.

Weitere Untersuchungen dazu sollten durchgeführt werden.

4.5 Downstream Processing - Einsatz des CEA (chemisch-enzymatischen Aufschlusses) bei Hefen

4.5.1 Upscaling- und Sedimentationsuntersuchungen

Da keine Erfahrungen vorliegen, wie effizient und mit welcher Produktivität die nichtkonventionellen Hefen der Gattungen *Arxula* und *Debaryomyces* im 100-Liter-Maßstab vermehrt werden können und auf welche Weise sie von der Kulturflüssigkeit effektiv zu trennen sind, konzentrierten sich die Arbeiten darauf.

Die Hefen wurden im 70-Liter-Maßstab vermehrt. Dabei wurden die Erkenntnisse mit *Torula*- und *Saccharomyces*-Hefen zu Grunde gelegt. Um die Biomasse aus der Suspension zu gewinnen, wurden Filtrationen und Separationen durchgeführt. Filtrationen, wie sie bei der Backhefegewinnung angewendet werden, erwiesen sich als nicht geeignet. Durchaus in Frage kommt eine Precoatfiltration, die auch bei der Gewinnung von *Torula*-Zellen genutzt wird. Mit Düsenseparatoren wurden befriedigende Ergebnisse erreicht, ebenfalls mit Kammerseparatoren. Mit durch Kammerseparatoren gewonnener Biomasse wurden erste Versuche zum alkalischen Zellaufschluss durchgeführt.

Zur Vermehrung von Hefen werden in Dessau Verfahren praktiziert, die Strahlrohrreaktoren benutzen. Diese dürften wegen der unbefriedigenden Sauerstoffeintragsleistung für einen Prozess zur Produktion von PHB nicht die erste Wahl sein, da keine hohen Zellkonzentrationen erreicht werden. Mit Blick auf die „Überalles-Ökonomie“ eines solchen Prozesses ist dieser Faktor, neben hohen Geschwindigkeiten zur Synthese, ein wesentlicher. Deshalb sollten Tauchstrahl- und Blasensäulenreaktoren geeigneter für das angestrebte Verfahren sein.

4.5.2 CEA bei Hefen - Analyse anhand des Gesamtstickstoffs

Für transgene Hefen soll der chemisch enzymatische Aufschluss zur Gewinnung von PHA, der bei Bakterien erfolgreich für das Downstream-Processing von PHA genutzt werden konnte, eingesetzt und, bei Bedarf, modifiziert werden. Da der momentane Polymergehalt in den Hefen nicht ausreicht, die Effizienz des Aufschlusses anhand von PHA zu testen, wird dafür der Parameter Gesamtstickstoff genutzt, der mit Hilfe der Kjeldahl-Methode bestimmt wird.

Tabelle 30: Gesamtstickstoff im Überstand [mg/l]

		<i>S. cerevisiae</i>	<i>D. polymorphus</i>	<i>A. adenivorans</i> LS3
Kultivierung		28	20	17
Chemischer Schritt	Vorwäsche	196	210	196
	Chemischer Schritt	56	523	43
Enzymatischer Schritt	Vorwäsche	84	56	0
	Lipase-Schritt	93	56	93
	Papain-Schritt	1400	1036	1008
	Nachwäsche	0	n.d.	n.d.

Die Hefen *D. polymorphus* H120 und *A. adenivorans* LS3 ließen sich gut in Wasser suspendieren. *Saccharomyces cerevisiae* dagegen suspendierte weniger gut in Wasser und bildete keine stabile Suspension. Die auf Grund des bei Bakterien beobachteten Verhaltens erwartete Volumenabnahme des Hefe-Biomasse-Pellets trat nicht ein. Auffällig war darüber hinaus eine Aufhellung der Biomasse von hellbraun bis gelb nach weiß.

Aus den Messergebnissen der Kjeldahl-Methode geht hervor, dass durch den CEA grundsätzlich Hefezellen angegriffen werden. Nach der Chemischen Vorwäsche liegen die N- Gehalte bei 196 bis 210 mg/l; diese verhältnismäßig hohen Werte können durch Auswaschungen bzw. auf den Zellen haftendes Kulturmedium erklärt werden. Durch den Waschvorgang werden diese Anteile gelöst und tragen zu dem hohen Stickstoffgehalt bei.

Während der Behandlung mit Natriumdithionit wird die Hefeperipherie "angegriffen". Die gemessenen Stickstoff-Werte liegen bei 43 bis 523 mg/l und zeigen, je nach Hefespezies, einen ± deutlichen Angriff. Nach der chemischen Nachwäsche zeigt sich, dass bei *S. cerevisiae* und *D. polymorphus* die Behandlung mit dem chemischen Agens effektiv war, nicht jedoch bei *A. adenivorans*. Bei dieser Hefe ist das Aufschlussregime hinsichtlich Behandlungsdauer, -häufigkeit und Temperatur/pH-Wert zu modifizieren.

Der enzymatische Schritt zeigt deutliche Effekte sowohl bei *S. cerevisiae* und *D. polymorphus*, aber auch bei *A. adenivorans*. Der höchste Anstieg in den Stickstoffwerten ist bei allen drei Spezies nach dem Erwärmen und in Gegenwart von Papain und Lysozym zu verzeichnen. Die Stickstoffwerte liegen hier bei 1008 bis 1400mg/l.

Nach der letzten Wäsche wurde lediglich *S. cerevisiae* als Modell für die Untersuchungen herangezogen. Der ermittelte Wert zeigt, dass auch bei dieser Spezies noch weiterführende Untersuchungen notwendig sind, jedoch auch, dass der CEA für Hefen geeignet ist und in Bezug auf die Gewinnung von PHA zu modifizieren ist.

Weiterführende Untersuchungen stehen noch aus.

5 Schlußfolgerungen und Ausblick

5.1 „Konstruktion“ von Produzenten und Produktsynthese

Polyhydroxybutyrat (PHB) wird sowohl von Bacteria (Eu-Bakterien) als auch Archaea (Archae-Bakterien) gebildet. Die Fähigkeit dazu ist unabhängig vom Ernährungstyp und von der Qualität der Kohlenstoffquelle. Eukarya, z.B. Hefen vermögen PHB nicht zu bilden. Da Hefen technologisch und anderweitig interessante Eigenschaften besitzen und die Leistungen, die mit Prokaryoten erzielt werden (konnten), ökonomisch nicht akzeptiert werden, stellte sich die Frage, ob Hefen so „aufbereitet“ werden können, dass sie prokaryotische Produzenten übertreffen. *Saccharomyces cerevisiae* ist erfolgreich „manipuliert“ worden (LEAF et al., 1996; POIRIER et al., 2001). Sie ist auch von uns genotypisch modifiziert worden. Das eigentliche Ziel war, oleogene Hefen zu modifizieren. **Es ist gelungen, die genetische Information zur Synthese von PHB in Spezies der Gattungen *Arxula* und *Debaryomyces* zu etablieren und aktiv zu exprimieren. Alle Transformanten erwiesen sich als zur Synthese von Polyhydroxyalkanoaten in der Lage.** Die Parameter, die maßgeblich die Ökonomie eines Verfahrens zur Synthese von PHB(A) bestimmen – Ertragskoeffizient, Geschwindigkeit, Gehalt in der Zelle/Biomasse) – sind jedoch noch unbefriedigend. **Die Transformanten können mit den bakteriellen Wildtypen (noch) nicht konkurrieren. Dies betrifft den spezifischen Gehalt genauso wie die spezifische Bildungsgeschwindigkeit.** Über die Gründe lässt sich nichts Genaues sagen.

Der Ertragskoeffizient wird – bei einer Organismus/Substrat-Kombination – vom Stoffwechselweg bestimmt und davon, ob das Substrat quasi wie in einer unverzweigten Einbahnstraße in das gewünschte Produkt gewandelt werden kann und das Substrat sonst kein anderes Schicksal erfährt. Der Gehalt wird sicher von der Geschwindigkeit abhängen, mit der PHB gebildet werden kann, und von der Dauer des Prozesses. Aber wovon wird die spezifische Produktbildungsrate determiniert? Möglicherweise von den spezifischen Aktivitäten, gemessen als U pro mg Zell(e)masse, der drei an der Synthese direkt beteiligten Enzyme: β -Ketothiolase, Reduktase, Synthase. Wahrscheinlich ist die spezifische Geschwindigkeit – bis zu einem bestimmten „Grade“ – den Enzymkonzentrationen proportional, sofern die Substrate (Acetyl-CoA + $1/2H^+$) entsprechend zur Verfügung stehen. Zu fragen ist, ob Wildtypen so disponiert sind, dass ihr Stoffwechsel und Regulationsverhalten die neue Sequenz ökonomisch genug bedienen können, oder ob etwa bereits die Kapazität zur Aufnahme der Kohlenstoffquelle (spezifische Aufnahmerate) über die maximal mögliche spezifische PHB-Bildungsrate entscheidet.

Ertragskoeffizienten und Alternativen zur PHB-Synthese

PHB gehört nicht zur „Grundausstattung“ von Prokaryoten. PHB-Bildung ist überlebensstrategisch wichtig und wird in der Regel angeschaltet, wenn Wachstum und Vermehrung auf Grund von Imbalancen limitiert sind, zum Beispiel wenn (bei Aerobiern) der Sauerstoff knapp wird. Einige Bakterien und *S. cerevisiae* reagieren auf Sauerstoff-Defizit (und/oder hoher Glucosekonzentration) mit ethanolischer Gärung. Sie dürften als PHB-Bildner solange ungeeignet sein, wie die Ethanolbildung als Konkurrenzreaktion nicht abgeschaltet werden kann und sogar „Vorfahrt“ hat. Stickstoff-Mangel kann ebenfalls zu *overflow metabolism* führen. „Überproduziert“ werden kann PHB, aber auch beispielsweise Citronensäure (*Candida* sp., *Yarrowia* sp.). Ist sie *dead end product* der Glucoseverwertung, dann ist ihre Bildung wie die PHB-Bildung energieliefernd, Ethanolbildung sowieso. Wenn ein Wildtyp ein potentieller Citronensäure-Überproduzent ist, dann ist zu prüfen, ob er als „Zellfabrik“ für PHB-Bildung geeignet ist. Auf jeden Fall gälte es auch hier, die Citronensäureproduktion zu unterdrücken, d.h. die Konkurrenz abzuschalten. Gleiches gilt, wenn der Wildtyp – wie die sog. oleogenen Hefen (*Debaryomyces* sp.) – zur intrazellulären Speicherung von Fetten „neigt“.

Wenn Hefen, wie auch andere Mikroorganismen, durch genotypische Maßnahmen zu ihnen fremden Leistungen befähigt und schließlich zu Produktionsstämmen entwickelt werden sollen, ist also nicht nur zu beachten, dass sie als Wildtypen technologisch interessante Eigenschaften haben und sich gentechnisch leicht manipulieren lassen. Ebenso wichtig sind physiologische Eigenschaften, die zwar dem Wildtyp oder Wirt zum Vorteil gereichen, aber – wenn er modifiziert worden ist und ihm fremde Synthesen vollbringen „muss“ – die Ökonomie negativ beeinflussen.

PHB wird von Wildtypen (vermehrt) gebildet, wenn Wachstum und Vermehrung limitiert sind (s.o.). Der Stoffwechsels ist weniger komplex und auf die Synthese von nur wenigen Produkten eingeschränkt. Je fokussierter der Stoffwechsel ist, um so mehr nähert sich der Ertragskoeffizient dem Stoffwechsel bedingt möglichen. **Bei Organismen, die durch genotypische Maßnahmen zur Bildung von ihnen**

an sich fremden Produkten befähigt worden sind, ist der Kohlenstofffluß so „kanalisiert“ nicht, da die Bildung nicht Teil ihrer Überlebensstrategie ist. Sofern eine solche Kanalisierung nicht „autogen“ geschieht, sind geringere Ausbeuten „programmiert“. Für die hier vorgestellten Transformanten dürfte dies zutreffen.

Spezifische PHB-Bildungsgeschwindigkeit: Was versprechen Hefen?

Hefen, darunter auch *S. cerevisiae*, können beispielsweise auf Glucose als alleiniger Quelle von Kohlenstoff und Energie mit einer Geschwindigkeit von 0,5 g/h g und einem Ertragskoeffizienten von 0,5 g/g wachsen und sich vermehren (s. Anhang zu diesem Bericht „Wachstumsparameter zur Bewertung von Substraten, Auswahl von effektiven PHB-Produzenten und Erkennung von Flaschenhälsen: eine einfache Betrachtung“). Dabei verwerten sie die Glucose mit einer spezifischen Geschwindigkeit von 1 g/h g. Würden sie gären, Glucose mit der gleichen Geschwindigkeit verbrauchen und ausschließlich Ethanol produzieren (0,51 g/g), ergäbe sich eine spezifische Bildungsgeschwindigkeit von ca. 0,5 g/h g. Da die experimentell möglichen Werte deutlich darüber liegen (bis 2 g/h g), muss die Kapazität zur Glucoseaufnahme größer sein, als sie bei aerober Vermehrung beansprucht wird. Würde die Glucose mit dieser Geschwindigkeit genutzt und wie in einer unverzweigten Einbahnstraße in PHB gewandelt werden (0,48 g/g, aufgerundet 0,5 g/g), ergäbe sich eine spezifische Bildungsrate von 0,5 PHB g/h g. Dafür würde eine Polymerase-Aktivität von mindestens ca. 0,097 U/mg (Trockensubstanz) notwendig sein. (Die kinetischen Eigenschaften sind hier nicht berücksichtigt worden.)

Würden Hefen Glucose ausschließlich in Citronensäure wandeln (1,07 g/g) und dabei Glucose mit der genannten Geschwindigkeit von 1 g Glucose/hg verbrauchen, wäre mit einer spezifischen Citratbildungsrate von 1,07 g Citrat/h g zu rechnen. Die tatsächlichen Ertragskoeffizienten sind kleiner (ca. 0,8 g/g). Aber sie sind nicht klein genug, dass sie die experimentell gefundenen Bildungsraten begründen (0,15 – 0,2 g/h g). Um Citrat mit einer Netto-Geschwindigkeit von 0,2 g/h g produzieren zu können, wäre eine Citratsynthase-Aktivität von ca. 0,028 U/mg nötig. Wenn die Citratsynthase-Aktivität unter Bedingungen der Citrat-Überproduktion so groß wäre, wie sie für o.g. Wachstum und Vermehrung notwendig ist, dann sollte Citrat mit einer Geschwindigkeit von 0,5 g/h g synthetisiert werden können. (Acetyl-CoA muss mindestens mit der Geschwindigkeit angeliefert werden, wie es via Citratsynthase und TCC endoxidiert wird; vgl. Anhang.)

Diese Kalkulationen lassen mehrere Hypothesen bezüglich eines *bottleneck's* zu. Endgültiges, wo er (jeweils) zu lokalisieren ist, kann auf der Grundlage unseres derzeitigen Kenntnisstandes nicht gesagt werden. Zu vermuten ist ein Engpass auf dem Weg zwischen C3 (Glyceraldehyd-3-Phosphat ... Pyruvat) und C2 (Acetyl-CoA) bzw. C4 (Oxalacetat, Malat), wenn nicht bereits die Aufnahme kontrolliert wird, ein regulatorisch interessantes Kapitel, das mit Blick auf „Effizienz und Ökonomie mikrobiellen Lebens“ eine besondere Behandlung verdient.

Durch Quotientenbildung geht Information verloren. Aus der spezifischen Geschwindigkeit zur Aufnahme der Quelle für Kohlenstoff und Energie kann nicht auf spezifische Bildungsraten geschlossen werden (s. Anhang: Tab 1). Das gilt für die Bildung von Biomasse durch Wachstum und Vermehrung genauso wie für die Synthese von Produkten infolge bzw. des *overflow metabolism*. Die für bestimmte Leistungen erforderlichen Enzymaktivitäten, -kapazitäten oder -konzentrationen können ausgerechnet werden. Sie sind als Orientierung dafür, was durch genetische/gentechnische Maßnahmen erreicht werden muss, wichtig und auch geeignet. Aber *in vitro* gemessene Enzymaktivitäten können anscheinend keine hinreichende Auskunft über Flaschenhalse geben. Die erreichten PHB-Konzentrationen korrelieren nicht mit den spezifischen Aktivitäten. Unverzichtbar sind Kenntnisse über die molekulare Aktivität der respektiven Enzyme und deren zelluläre Konzentrationen.

Die gewählten Hefen dürften zu ähnlichen Produktbildungsrate in der Lage sein, wie die bekannten bakteriellen PHB-Produzenten. Dass die experimentell gefundenen Vermehrungsgeschwindigkeiten und Ertragskoeffizienten deutlich kleiner sind, als die häufig publizierten, die zur Berechnung herangezogen worden sind (s. auch Anhang), ist sicher der Tatsache geschuldet, dass die Bedingungen nicht auf die jeweilige Spezies zugeschnitten worden sind. Wie effizient und mit welcher Geschwindigkeit *Debaryomyces* sp. und *Arxula* sp. zu wachsen vermögen, konnte noch nicht geklärt werden.

Weitere Arbeiten zur geno- wie phänotypischen Optimierung sind erforderlich. Zu klären ist, ob transgene Produzenten auch mit der Fähigkeit zur Mobilisierung von PHB ausgestattet werden müssen, und außerdem, ob und durch welche phänotypischen Maßnahmen die Parameter, die die Ökonomie bestimmen, verbessert werden können.

5.2 Gewinnung des Produktes

Intrazelluläre Produkte zu gewinnen, setzt Aufschluss der Produzenten voraus. Eine für Bakterien entwickelte Methode zur Desintegration bzw. zum Aufschluss der Zellen und zur Gewinnung von PHA wurde für die o.g. Spezies der Gattungen *Saccharomyces*, *Arxula* und *Debaryomyces* getestet. Zur Indikation des Erfolges wurde Rohproteinstickstoff gewählt. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Prinzip auch für Hefen geeignet ist. Diese Methode, die – kurz gefasst – pH-abhängige Reaktionen und enzymatisch katalysierte Hydrolyse kombiniert und nicht auf Extraktion mit organischen Lösungsmitteln setzt, funktioniert, sie muss jedoch noch auf Hefen angepasst und für sie optimiert werden.

IV Literatur

- ACKERMANN, J.-U. und BABEL, W. 1997. Appl. Microbiol. Biotechnol. **47**:144-149.
- ACKERMANN, J.-U. und BABEL, W. 1998. Polymer Degr. Stabil. **59**:183-186.
- ANDERSON, A.J. und DAWES, E.A. 1990. Microbiol. Rev. **54**:450-472.
- ASRAR, J. und GRUYS, K.J. 2002. *In: Biopolymers Polyesters III* (Doi, Y., Steinbüchel, A. eds.), Wiley-VCH, Weinheim, 53-90.
- BABEL, W. 1997. BioWorld **4**:16-20.
- BABEL, W.; ACKERMANN, J.-U. und BREUER, U. 2001. Adv. Biochem. Eng./Biotechnol. **71**:125-157.
- BABEL, W.; RIIS, V. und HAINICH, E. 1990. Plaste und Kautschuk **37**:109-115.
- BLUM, H.; BEIER, H. und GROSS, H.J. 1987. Electrophoresis, **8**:93-99.
- BRANDL, H.; GROSS, R.A.; LENZ, R.W. und FULLER, R.C. 1988. Appl. Environ. Microbiol. **54**:1977-1982.
- BRANDL, H.; GROSS, R.A.; LENZ, R.W. und FULLER, R.C. 1990. Adv. Biochem. Engin. Biotech. **41**:77-93.
- BREUER, U.; ACKERMANN, J.-U. und BABEL, W. 1995. Can. J. Microbiol. **41** (Suppl. 1):55-59.
- BREUER, U.; TERENTIEV, Y.; KUNZE, G. und BABEL, W. 2002a. Bioforum **7-8**:481-483.
- BREUER, U.; TERENTIEV, Y., KUNZE, G. und BABEL, W. 2002b. Macromol. Biosci., **2**: 380-386.
- BYROM, D. 1987. Trends Biotechnol. **5**:246-50.
- CHALLINOR, S.W.; POWER, D.M. und TONGE, R.J. 1964. Nature **203**:250.
- DAWES, E.A. und SENIOR, P.J. 1973. Adv. Microbial Physiol. **10**:135-266.
- DE KONING, G.J.M und LEMSTRA, P.J. 1993. Polymer **34**:4089-4094.
- DOHMEN, R.J.; STRASSER, A.W.M.; HÖNER, C.B. und HOLLENBERG, C.P. 1991. Yeast **7**:691-692.
- DOI, Y.; YAMAKI, A.; KUNIOKA, M. und SOGA, K. 1988. Appl. Microbiol. Biotechnol. **28**:330-334.
- GELLISSSEN, G.; HOLLENBERG, C.P. und JANOWICZ, Z.A. 1995. *In: Gene Expression and Rekombinant In Microorganisms* (Smith, A. ed.), Dekker, New York USA.
- HANAHAN, D. 1983. J. Mol. Biol. **166**:557-580.
- HOLMES, P.A. 1985. Phys. Technol. **16**:32-36.
- KNAUF, V.C. und NESTER, E.W. 1982. Plasmid **8**:45-54.
- KUNZE, G. und KUNZE, I. 1994. Antonie Leeuwenhoek J. Microbiol. **65**: 29-34.
- KUNZE, G. und KUNZE, I. 1996. *In: Nonconventional Yeasts in Biotechnology*; Chapter 11, Springer Verlag Berlin, 389-409.
- LEAF, T. A.; PETERSON, M. S.; STOUP, S. K.; SOMERS, D. und SRIENC, F. 1996. Microbiol., **142**:1169-1180.
- LAEMMLI, U.K. 1970. Nature **227**:680-685.
- LEE, S.Y. 1996. TIBTECH **14**:431-438.
- LEE, S.Y. und PARK, S.J. 2002a. *In: Biopolymers Polyesters I* (Doi, Y., Steinbüchel, A. eds.), Wiley-VCH, Weinheim, 263-290.
- LEE, S.Y. und PARK, S.J. 2002b. *In: Biopolymers Polyesters I* (Doi, Y., Steinbüchel, A. eds.), Wiley-VCH, Weinheim, 317-336.
- LEMOIGNE, M. 1926. Bull. Soc. Chim. Bio. **8**:770-782.
- LEWIN, B. 1998. Molekularbiologie der Gene. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- LIEBERGESELL, M.; HUSTEDE, E.; TIMM, A.; STEINBÜCHEL, A.; FULLER, R.C.; LENZ, R.W. und SCHLEGEL, H.G. 1991. Arch. Microbiol. **155**:415-421.
- LYNEN, F. und WIELAND, H. 1955. *In: Methods Enzymol.* (Colowick, P.S. und Kaplan, N.O., eds.) **1**:566-573.
- MARCHESSAULT, R.H. und YU, G. 2002. *In: Biopolymers Polyesters II* (Doi, Y., Steinbüchel, A. eds.), Wiley-VCH, Weinheim, 157-202.
- MERRICK, J.M. 2002. *In: Biopolymers Polyesters I* (Doi, Y., Steinbüchel, A. eds.), Wiley-VCH, Weinheim, 105-122.
- MONSANTO Deutschland GmbH Düsseldorf. Informationsbroschüren zu Biopol® - nature's plastic 1997
- MOTHES, G.; SKINFILL RIVERA, I. und BABEL, W. 1997. Arch. Microbiol. **166**:405-410
- NAWRATH, C.; POIRIER, Y. und SOMERVILLE, C. 1994. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**:12760-12764.
- NISHIMURA, T.; SAITO, T. und TOMITA, K. 1978. Arch. Microbiol. **116**:21-27.
- OEDING, V. und SCHLEGEL, H.G. 1973. Biochem. J. **134**:239-248.
- PAGE, W.J. 1989. Appl. Microbiol. Biotechnol. **31**:329-333.
- POIRIER, Y. 2001. Adv. Biochem. Eng./Biotechnol. **71**:209-240.
- POIRIER, Y.; DENNIS, D.E.; KLOMPARENS, K. und SOMERVILLE, C. 1992. Science **256**:520-523.

- POIRIER, Y.; ERARD, N. und MACDONALD-COMBER PETETOT, J. 2001. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:5254-5260
- POIRIER, Y. und GRUYS, K.J. 2002. *In: Biopolymers Polyesters I* (Doi, Y., Steinbüchel, A. eds.), Wiley-VCH, Weinheim, 401-435.
- POIRIER, Y. und NAWRATH, C. 1999. *Transgenic Plant Res.* 201-218.
- RAMSAY, B.A.; LOMALIZA, K.; CHAVARIE, C.; DUBE, B.; BATAILLE, P. und RAMSAY, J.A. 1990. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:2093-2098.
- RAMSAY, B.A.; ZNOJ, G.M. und COOPER, D.G. 1986. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**:152-156.
- RATLEDGE, C. *In: Microbial Lipids Vol 2.* RATLEDGE, C. und WILKINSON, S.G. (Hrsg.) Academic Press London 1989.
- REUSCH, R.N. 1989. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **191**:377-381.
- REUSCH, R.N. 2002. *In: Biopolymers Polyesters I* (Doi, Y., Steinbüchel, A. eds.), Wiley-VCH, Weinheim, 123-171.
- RIIS, V. und MAI, V. 1988. *J. Chromatogr.* **445**:285-289.
- ROMANOS, M.A.; SCORER, C.A. und CLARE, J.J. 1992. *Yeast* **8**:423-488.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. und MANIATIS, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 2. Aufl. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- SAMSONOVA, I.A.; KUNZE, G.; BODE, R. und BÖTTCHER, F. 1996. *Yeast* **12**:1209-1217.
- SCHUBERT, P. 1990. *Dissertation.* Georg-August-Universität Göttingen.
- SCHUBERT, P.; STEINBÜCHEL, A. und SCHLEGEL, H.G. 1988. *J. Bacteriol.* **170**:5837-5847.
- SEEBACH, D.; ROGGO, S. und ZIMMERMANN, J. 1987. *In: Stereochemistry of Organic and Bioorganic Transformations* (Bartmann, W. und Sharpless, K.B. eds.), VCH Verlagsgesellschaft Weinheim, 85-126.
- SENIOR, P.J. und DAWES, E.A. 1971. *Biochem. J.* **125**:55-66.
- SENIOR, P.J.; BEECH, G.A.; RITCHIE, G.A.F. und DAWES, E.A. 1972. *Biochem J.* **128**:1193-1201.
- STEINBÜCHEL, A. 1989. *Forum Mikrobiol.* **4**:190-198.
- STEINBÜCHEL, A. 1995. *Chemie in unserer Zeit*, **29**:260-271
- STEINBÜCHEL, A. und HEIN, S. 2001. *Adv. Biochem. Engin./Biotechnol.*, **71**:81-124.
- STEINBÜCHEL, A. und SCHLEGEL, H.G. 1991. *Mol. Microbiol.*, **5**:535-542.
- TANAKA, A.; OHISHI, N. und FUKUI, S. 1967. *J. Ferment. Technol.* **45**:617-623.
- TÄNZER, W. 2000. *Biologisch abbaubare Polymere.* Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie Stuttgart.
- VALENTIN, H.E. und STEINBÜCHEL, A. 1994. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**:699-709
- WARTMANN, T.; ERDMANN, J.; KUNZE, I. und KUNZE, G. 2000. *Arch. Microbiol.* **173**:253-261.
- WELLA AG 1990. *Firmenschriften.* Darmstadt.
- WEUSTHUIS, R.A.; KESSLER, B.; DIELISSSEN, M.P.M.; WITHOLT, B. und EGGINK, G. 2002. *In: Biopolymers Polyesters I* (Doi, Y., Steinbüchel, A. eds.), Wiley-VCH, Weinheim, 291-316.
- WILLIAMS, S.F. und MARTIN, D.P. 2002. *In: Biopolymers Polyesters III* (Doi, Y., Steinbüchel, A. eds.), Wiley-VCH, Weinheim, 91-127.
- ZWISCHENBERICHT zum Forschungsprojekt „Entwicklung eines innovativen biotechnologischen Verfahrens zur Herstellung bioabbaubarer Polymere durch erstmaligen Einsatz rekombinanter Hefen“ Projektleitung Prof. Dr. W. Babel, UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektion Umweltmikrobiologie; Berichtszeitraum: 01.01.2000 - 31.12.2000.

V Öffentlichkeitsarbeit

- BREUER, U.; FÖLLNER, C.G.; KUNZE, G. und BABEL, W. (2000) PHA production with a genetically modified yeast - an alternative to the procaryotes? Frühjahrstagung der VAAM, München, 12.-16.03.2000. Biospektrum/Sonderheft: 95 - Poster
- BREUER, U.; KUNZE, G. und BABEL, W. (2000) Biopolymer production with transgenic yeasts? 8th International Symposium on Biological Polyesters, Boston, USA, 11.09.-15.09.2000 - Vortrag
- KUNZE, G.; BABEL, W.; TARENTIEV, Y.; WARTMANN, T.; BREUER, U.; HUTARDO-PICO, A. und BERGMANN, H. (2000). Wirts-Vektor-System für die heterologe Genexpression in der Hefe *Debaryomyces*. DE-Patent 100 60 133.2.
- TARENTIEV, Y.; BÖER, E.; BREUER, U.; BABEL, W. und KUNZE, G (2000). Expression of bacterial *phb* genes encoding poly-3-hydroxybutyrate in yeasts. Hammermühle-Hefetagung Ober-Ramstadt, Germany, 05.10-07.10.2000 - Poster
- TARENTIEV, Y.; BÖER, E.; BREUER, U.; BABEL, W. und KUNZE, G. (2001). Recombinant yeasts as hosts for the production of poly-3-hydroxybutyrate. 21st ISSY 2001, Lviv, Ukraine, 21.-25.08.2001 - Poster
- TARENTIEV, Y.; BÖER, E.; BREUER, U.; BABEL, W. und KUNZE, G. (2001). Recombinant yeasts as hosts for the production of poly-3-hydroxybutyrate. Mycologie-Tagung, Jena, Germany, 01.-03.10.2001 - Poster
- TARENTIEV, Y.; BÖER, E.; BREUER, U.; BABEL, W. und KUNZE, G. (2001). Recombinant yeasts as hosts for the production of poly-3-hydroxybutyrate. Institutstag IPK 2001, Gatersleben, Germany, 11.10.2001 - Poster
- BABEL, W.(2002). Growth characteristics of bacteria to assess their economic suitability to synthesize PHB. Workshop "Biopolymers: Limits of Natural Performances & Prospects for Overcoming", Leipzig, 30.-31.5.2002 - Vortrag
- BREUER, U.; BABEL, W.; TARENTIEV, Y. und KUNZE, G. (2002). *Saccharomyces cerevisiae* as a model system showing the capability of yeasts for a PHA production. Workshop "Biopolymers: Limits of Natural Performances & Prospects for Overcoming", Leipzig, 30.-31.5.2002 - Vortrag
- BREUER, U.; BABEL, W.; TARENTIEV, Y. und KUNZE, G. (2002). Transgene Hefen als Wirte für die Synthese von Polyhydroxyalkanoaten. *In*: 1. Biotechnologie-Tag an der Universität Leipzig, 22.05.2002, Leipzig, Abstractband: 156-157 - Poster
- BREUER, U.; TARENTIEV, Y.; BABEL, W. und KUNZE, G. (2002). Conventional yeasts as producers of polyhydroxyalkanoates. *In*: ISBP 2002 International Symposium on Biological Polyesters, Münster, 22.-26.09.2002 - Vortrag
- BREUER, U.; TARENTIEV, Y.; KUNZE, G. und BABEL, W. (2002). Yeast as producers of polyhydroxyalkanoates: Genetic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Macromol. Biosci.*, **2**, 380–386.
- BREUER, U.; TARENTIEV, Y.; KUNZE, G. und BABEL, W. (2002). Rekombinante Hefen als Produzenten von Biopolymeren. *GIT BioForum*, **7-8**, 481-483.
- TARENTIEV, Y.; BREUER, U.; BABEL, W. und KUNZE, G. (2002). Non-conventional yeasts as hosts for the production of polyhydroxybutyrate.

Workshop "Biopolymers: Limits of Natural Performances & Prospects for Overcoming",
Leipzig, 30.-31.5.2002 - Vortrag

TERENTIEV, Y.; BREUER, U.; BABEL, W. und KUNZE, G. (2002). Production of polyhydroxybutyrate
by non-conventional yeasts.

In: ISBP 2002 International Symposium on Biological Polyesters, Münster, 22.-26.09.2002,
P7, Abstractband: 97 - Vortrag

TERENTIEV, Y.; BREUER, U.; BÖER, E.; BABEL, W. und KUNZE, G. (2002). Transgenic yeasts as
hosts for the production of poly-3-hydroxybutyrate.

In: The 9th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms, Gyeongju,
Korea, 01.07-05.07.2002 - Poster

TERENTIEV, Y.; BREUER, U.; BÖER, E.; BABEL, W. und KUNZE, G. (2002) Production of
polyhydroxybutyrate by non-conventional yeasts.

In: ISBP 2002 International Symposium on Biological Polyesters, Münster, 22.-26.09.2002 -
Vortrag

TERENTIEV, Y (2003) Recombinant yeasts as producers of polyhydroxyalkanoates Diss. E.-M.-Arndt
Univ. Greifswald.

ANHANG

Wachstumsparameter zur Bewertung von Substraten, Auswahl von effektiven PHB-Produzenten und Erkennung von Flaschenhälsen: eine einfache Betrachtung*

„Nichts ist praktischer als eine gute Theorie“ (G.R. Kirchhoff). Dieser Aphorismus ermahnt uns, nicht beliebig – zeit-, material- und kostenintensiv – zu experimentieren, um Technologien zu entwickeln und bessere Resultate zu erzielen, sondern unsere Optimierungsbemühungen und -erfolge an theoretisch begründeten Grenzwerten zu messen.

Aufsätze über Polyhydroxyalkansäuren (PHA) loben in aller Regel die Eigenschaften dieser Biopolyester und versprechen vielfältige Anwendungen. Gute, seriöse Publikationen verschweigen nicht, dass diese Polyester in der Konkurrenz mit den sog. Kunststoffen, z.B. Polyethylen und Polypropylen, nicht bestehen, weil sie zu teuer sind, insbesondere, wenn sie als *bulk chemicals* Verwendung finden sollen, also großtonnagig gebraucht werden (Kessler et al., 2001; Poirier, 2001). Poly-β-hydroxybuttersäure (PHB), der bekannteste Ester einer mehr als 100 Mitglieder umfassenden Polymerfamilie (Steinbüchel u. Valentin, 1995) gehört wie auch die anderen Mitglieder nicht zur Grundausstattung der prokaryotischen Produzenten und wird folglich nicht unter allen Umständen synthetisiert. Die Synthese setzt ein oder findet statt, wenn Wachstum und Vermehrung durch Mangel oder Imbalancen im Nährstoffangebot (Nährstoff in einem weiten Sinne, u. a. Stickstoff, Sauerstoff, Phosphat) bzw. auf Grund eines organismus-intrinsischen Engpasses (Babel et al., 2001) limitiert werden und Kohlenstoff überschüssig vorhanden ist; unter *batch* Bedingungen also mit Eintritt in die stationäre Phase. Prozesse zur Produktion von PHB sind meist zweistufig. In der ersten Stufe wird durch Wachstum und Vermehrung der Produzent erzeugt, in der zweiten die PHB. Der Preis des Produktes wird bei einem gegebenen Rohstoff folglich von der **Effizienz** dieser beiden Prozess-Stufen bestimmt.

(Strenggenommen sind es drei Stufen. Die dritte Stufe – Gewinnung, Aufarbeitung und ggf. Hochreinigung – ist sehr kostenintensiv, aber für die hier in Rede stehenden Betrachtungen irrelevant.)

Da für die Synthese dieses intrazellulären Produktes die Zellen nicht nur als Katalysator benötigt werden, sondern auch als „Reaktor oder Reaktionsgefäß“, wird die Ökonomie auch durch den **PHB-Gehalt** – wegen der Aufarbeitung – beeinflusst. Und weil die Akkumulation Zeit in Anspruch nimmt, ist die **Synthese-Geschwindigkeit** ein dritter wesentlicher ökonomischer Faktor.

Für die Produktion von PHB kommen photosynthetische, biogene, sog. nachwachsende Rohstoffe genauso in Frage wie chemosynthetische und fossile. Sie werden sowohl mit unterschiedlicher Effizienz (Asenjo u. Sukk, 1986; Collins, 1987; Babel et al., 1990; Yamane, 1992) als auch Geschwindigkeit genutzt. Beide Parameter hängen – bei einem gegebenen Substrat – vom Stoffwechselweg und somit vom gewählten Organismus ab. Deshalb beginnt die Forschung zur Produktion von PHB wie auch bei anderen biotechnischen Prozessen, die Organismen als Katalysatoren nutzen, mit der Suche nach geeigneten Produzenten, d. h. mit Selektion bzw. *Screening*. Wenn Organismen als Katalysatoren für die Synthese von extrazellulären Wert- oder Wirkstoffen (z. B. Antibiotika, Enzyme) genutzt werden sollen, dann können die dazu fähigen und effektiven durch *Screening* gefunden werden. Im Falle der Synthese lebensobligatorischer Produkte, wie zum Beispiel Eiweiß, ist zunächst jeder Organismus ein potentieller Kandidat, wenn er nur in der Lage ist, auf dem vorgesehenen Substrat zu wachsen und sich zu vermehren. Die Wachstumsgeschwindigkeit gibt Auskunft über die Geschwindigkeit, mit der das gefragte wachstumsassoziierte Produkt synthetisiert werden kann. Nichts erfahren können wir durch Selektion über die Qualität des Eiweißes, den möglichen Gehalt pro Zelle und die Effizienz der Stoffwandlung. Dies alles trifft auch zu, wenn PHB(A) produziert werden soll. Hinzu kommt, dass nicht mal auf Synthesegeschwindigkeit gescreent werden kann. Somit haben wir keine Möglichkeit, die technologisch-ökonomische Eignung bzw. Attraktivität von Isolaten „vorherzusagen“. Möglich ist, wenn wir Stoffwechsel und Bioenergetik kennen, die maximalen Ausbeutekoeffizienten für Wachstum und Vermehrung (Stouthamer, 1973) sowie Produktbildung zu errechnen (Babel, 1986; Babel et al., 1993). Damit lassen sich die Substrate hinreichend verlässlich reihen und Empfehlungen ableiten, wie Ausbeuten gesteigert und höchste erreicht werden können (z. B. Misch- oder Auxiliarsubstrat-Konzept, Babel et al., 1993).

Da die spezifische Synthese-Rate ökonomisch wichtig ist, möchten wir mit Blick auf vertretbaren Optimierungsaufwand wissen, welche Geschwindigkeiten erreichbar sind. Auf der Suche nach theoretischen Ansätzen stellt sich die Frage, ob aus den Kenngrößen für Wachstum und Vermehrung auf

* W. Babel: *Growth Characteristics of Bacteria to Assess their Economic Suitability to Synthesize PHB*. Workshop „Biopolymers: Limits of Natural Performances and Prospects for Overcoming“, Leipzig, 30. und 31. Mai 2002

Flaschenhalse bei der PHB-Bildung geschlossen werden kann und inwiefern es möglich wird, Substrate bzw. Organismen „ökonomisch“ zu bewerten. Spezifische Wachstumsrate und Ertragskoeffizient sind solche Kenngrößen. Der Quotient aus beiden gibt an, mit welcher Geschwindigkeit Substrat aufgenommen und verbraucht wird. Im Falle von Wachstum und Vermehrung auf Substraten, die Kohlenstoff- und Energiequelle zugleich sind, wird immer ein Teil des aufgenommenen Substrates zum Zwecke der Generierung von Reduktionsäquivalenten dissimiliert. Die Substrate sind, gemessen am Produkt Biomasse, energiedefizient (Babel et al., 1993). Der Substratstrom wird aufgeteilt, so dass sich Aufnahme-, Assimilations- und Dissimilationsgeschwindigkeiten von einander unterscheiden. Der dissimilierte Teil wird bestimmt von der „biologischen“ Energie und den Reduktionsäquivalenten, die gewonnen werden können bzw. notwendig sind, um den zur Verfügung gestellten Substratkohlenstoff biosynthetisch für Wachstum und Vermehrung zu verwerten und Stickstoff zu fixieren. (Aufwendungen für Erhaltung sollen hier nicht berücksichtigt werden.)

Wachstumsgeschwindigkeit und Ertragskoeffizient sind für eine gegebene Mikroorganismus/ Substrat-Kombination keine Konstanten (s. Abb. 1).

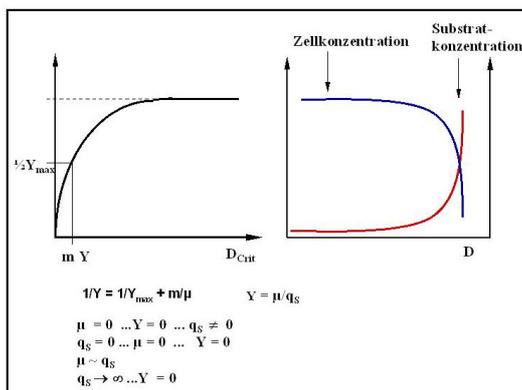


Abb. 1:
(links): Abhängigkeit des Ertragskoeffizienten (Y) von der Wachstumsrate (μ) bzw. bei chemostatischer Vermehrung von D .
(rechts): Beziehung zwischen Zellkonzentration und Substratkonzentration im Fließgleichgewicht bei verschiedenen Durchflussraten (D); m = Erhaltungskoeffizient; q_s = Substratverbrauchs- oder Substrataufnahmerate

Die maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit wird sehr wahrscheinlich – mindestens bei biogenen Organika – nicht determiniert durch das Aufnahme- oder Aktivierungspotential. Dies jedenfalls trifft zu für Organismen, die Glucose aerob assimilieren können, aber auch anaerob, indem sie auf dem Wege von Gärung die notwendige Energie für Wachstum und Vermehrung gewinnen. Aus den publizierten spezifischen Ethanolbildungsgeschwindigkeiten (0,6 ... 2 g/h g) lässt sich errechnen, dass unter Bedingungen aerober Vermehrung die Zellen mit einem Viertel der Aufnahmekapazität auskommen.

Alkoholische Gärung und PHB-Bildung aus Glucose ähneln sich (Abb.2), insofern als beide Prozesse biologisch wertvolle Energie liefern und Substratwasserstoff im Reaktionsprodukt deponiert wird (*electron sink*), was heißt, die PHB-Bildung aus Glucose könnte wie Ethanolbildung grundsätzlich wachstumsassoziiert erfolgen. Diese Kopplung könnte genutzt werden, um Prozesse kontinuierlich zu gestalten. Sie hätte den Nachteil der geringeren Effizienz. Möglicherweise wäre damit auch die PHB-Konzentration determiniert.

Die qualitative Ähnlichkeit sowie die Tatsache, dass beide Prozesse über Sauerstoff geregelt werden (können), lassen den Verdacht zu, dass beide „Gärungen“, wenn sie in einem Organismus vorkommen, konkurrieren, wahrscheinlich so, dass die ethanolische Gärung die Vorfahrt hat. Folglich kann bei zur ethanolischen Gärung fähigen Wildtypen nur mit wenig PHB gerechnet werden. Sollen sie zur PHB-Bildung genutzt und genotypisch „aufbereitet“ werden, muss der Weg zum Ethanol ausgeschaltet werden.

Saccharomyces cerevisiae bildet Ethanol, nicht überraschend, dass der mit allen zur PHB-Synthese notwendigen Genen ausgestattete Stamm *S. cerevisiae* (pESC-Leu :: phbA, phbB)(pYES2 :: phbC)1 nur wenig PHB bildet (dieser Bericht).

Wenn Organismen gärungsassoziiert wachsen, dann kann aus der spezifischen Gärungsgeschwindigkeit sowohl auf die Wachstumsgeschwindigkeit geschlossen werden als auch auf die Geschwindigkeit, mit der C3-Körper (z.B. Pyruvat) synthetisiert werden. Bei einer spezifischen Ethanolbildungsgeschwindigkeit von nur 0,6 g/h g würde Pyruvat mit einer Geschwindigkeit von ca. 0,2 U/mg Trockensubstanz bereitgestellt werden. Wenn Pyruvat – nach Decarboxylierung – allein für die PHB-Synthese zur Verfügung stünde, wäre zu fragen, im welchem Verhältnis diese Geschwindigkeit zu den Aktivitäten der Enzyme auf dem Weg zur PHB stehen. So lässt sich abschätzen, ob die *pace-maker reaction* vor oder nach dem Pyruvat bzw. Acetyl-CoA liegt. Die Gärungsgeschwindigkeiten (s. o.) sind größer als die bisher gefundenen spezifischen PHB-Bildungsgeschwindigkeiten.

Die Dissimilation von Substraten mit C–C-Bindungen, so hier die vereinfachende Annahme, geht vom Acetyl-CoA aus (Abb. 2). Dieses zentrale Intermediat ist auch das Substrat für die

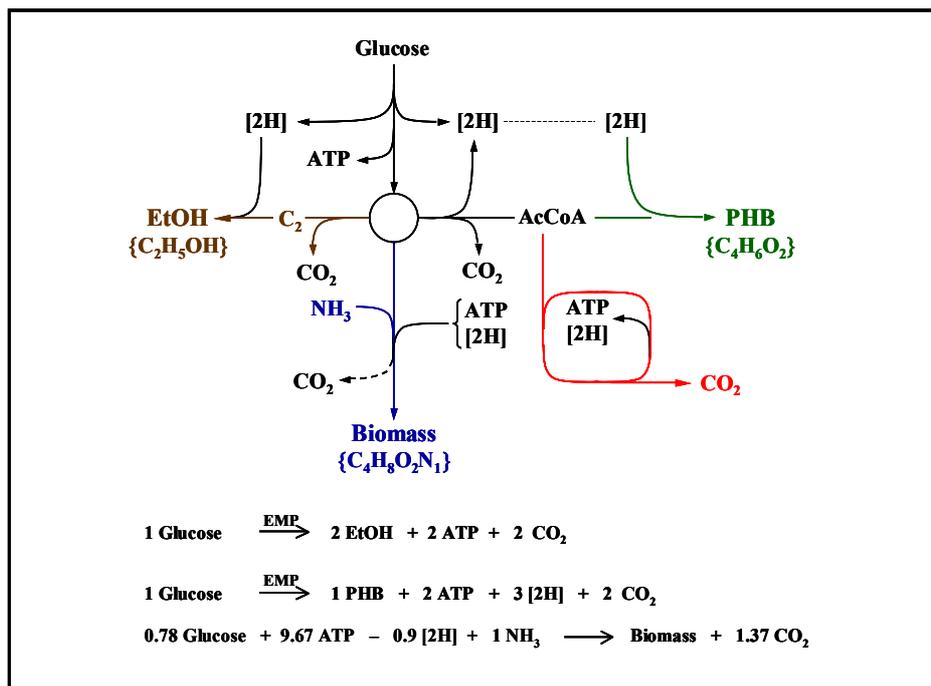


Abb. 2: Metabolische Wege zur Synthese von Ethanol, PHB und Biomasse sowie zur Dissimilation von Substraten und C-C-Bindungen via TCC; Kreis symbolisiert den Pool für einen zentralen Präkursor, z. B. 3-Phosphoglycerat. Es wurde angenommen, dass i. die Zell-(Biomasse-)Zusammensetzung unabhängig vom Substrat ist, ii. NADH und NADPH sowohl für reduktive Synthesen wie zur Generierung von ATP dienen können, iii. der P/O-Quotient 2 ist.

Synthese von PHB, die von der β -Ketothiolase gestartet wird (Abb. 2). Die Dissimilation wird eingeleitet von der Citratsynthase. Die Citratsynthase-Aktivität muss unter Bedingungen des Wachstums mindestens so groß sein, wie Substrat tatsächlich dissimiliert wird. Sie muss um so größer sein, je weniger „biologische“ Energie aus einem Substrat für die Synthese einer Biomasseeinheit gewonnen werden kann. Sofern das Aufnahmesystem unter Bedingungen der PHB-Synthese nicht gedrosselt ist und Acetyl-CoA mit der gleichen Geschwindigkeit synthetisiert werden kann wie während Wachstum und Vermehrung, stünde es für die Synthese von PHB zur Verfügung. Insofern als die Citratsynthase nicht in die Synthese eines zentralen Präkursors (3-Phosphoglycerat, z. B. Inhalt des Kreises von Abb. 2) eingeschlossen ist (z. B. Glycerol, Glucose, Succinat), von dem aus – so eine weitere, aber sehr plausible begründete Annahme (Van Dijken u. Harder, 1975) – alle Synthesen, die für Wachstum und Vermehrung unverzichtbar sind, gestartet werden sollen, ist die Citratsynthase-Aktivität ein Maß oder eine Orientierung dafür, wieviel, d.h. mit welcher (Mindest-)Geschwindigkeit Acetyl-CoA endoxidiert werden kann, aber auch „antransportiert“ wird. Sie kann errechnet werden.

Wenn anabole Funktionen der Citratsynthase (Glyoxylat-Zyklus im Stoffwechsel von Acetat, Phenol – s. Abb. 3, 4, 5, Methanol: Babel, 1992) vernachlässigt werden, dann gibt die errechnete Citratsynthase-Aktivität an, wieviel Acetyl-CoA für die PHB-Synthese zur Verfügung stehen kann und mit welcher spezifischen Geschwindigkeit PHB synthetisiert werden könnte.

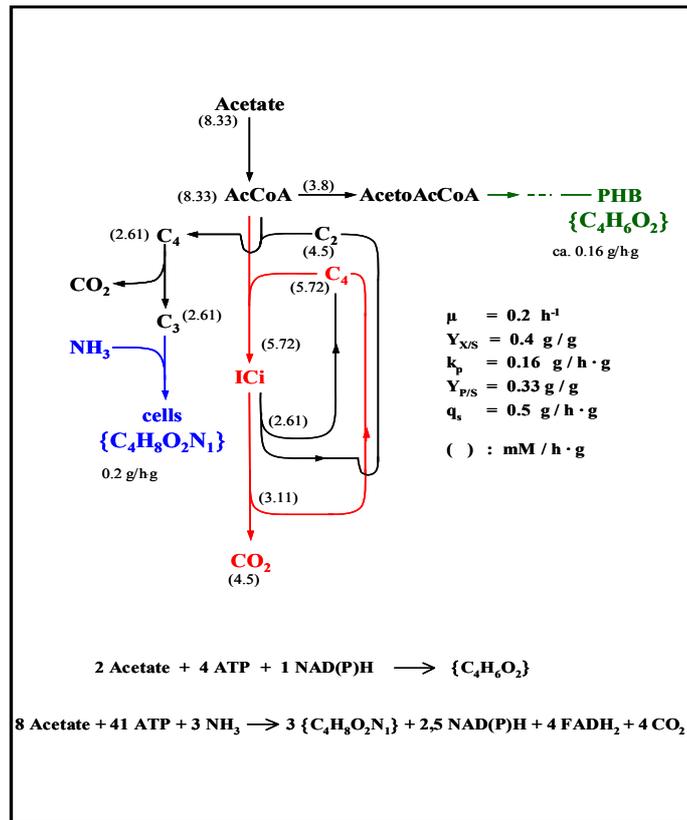


Abb. 3: Metabolisches Schema der Synthese von PHB bzw. für Wachstum und Vermehrung auf Acetat. TCC ist dissimilatorisch nötig zur Aktivierung von Acetat.

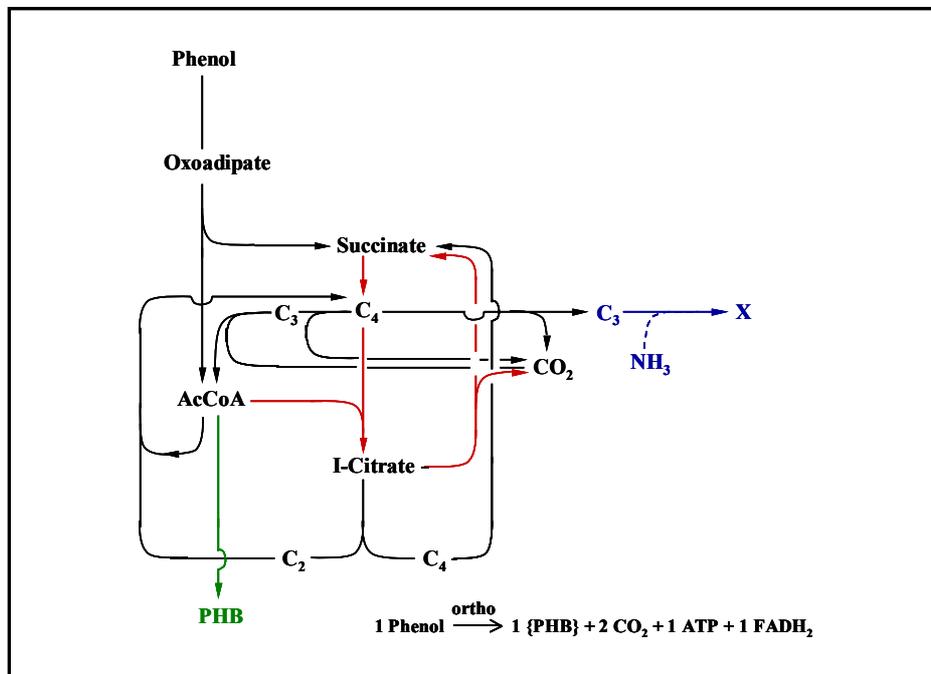


Abb. 4: Vermeintliche Wege der PHB-Bildung sowie Assimilation und Dissimilation von Phenol nach *ortho*-Spaltung. X: Biomasse.

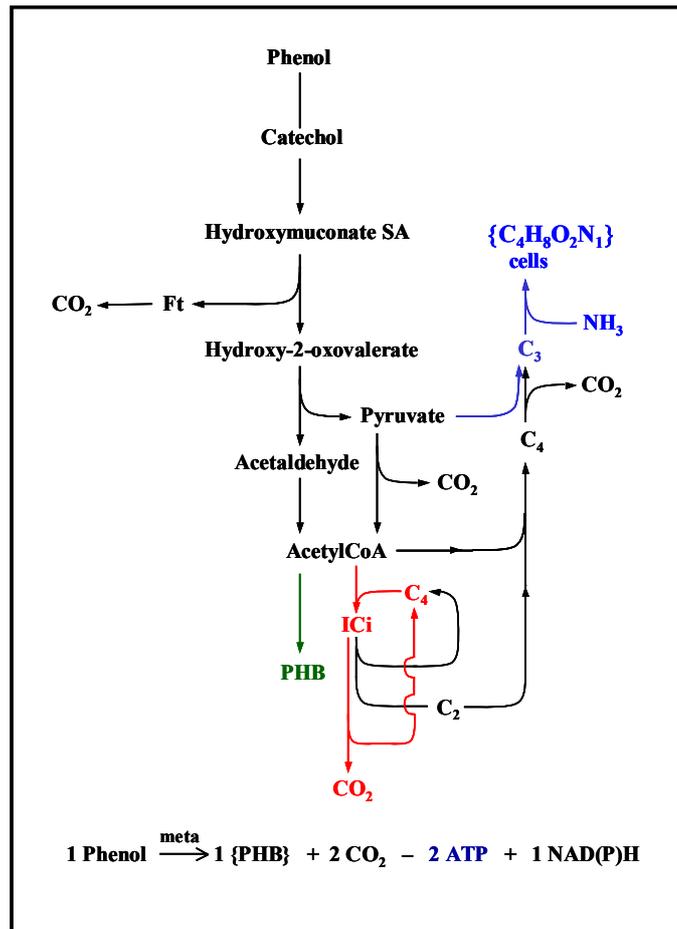


Abb. 5: Vermeintliche Wege zur Assimilation und Dissimilation von Phenol nach *meta*-Spaltung. Nach Leonard & Lindley (1998) kann Acetaldehyd nur "verbrannt", aber nicht biosynthetisch verwendet werden.

Für Glucose sollten spezifische Geschwindigkeiten von mindestens 0,2 bis 0,4 g PHB/h g TS möglich sein (Tab. 1).

Tab. 1: Vermehrung und PHB-Synthese auf Glucose
Wachstumsparameter zur Berechnung der spezifischen Synthese-Rate

μ	[h ⁻¹]	0,1	0,1	0,1	0,3	0,5
$Y_{X/S}$	[g/g]	0,1	0,3	0,4	0,52*	0,52*
q_s	[g/h g]	1,0	0,333	0,250	0,577	0,961
CS	[U/mg]	0,163	0,040	0,024	0,041	0,069
Kp	[g/h g]			0,2 ... 0,4		
	[U/mg]			0,04 ... 0,08		

μ : spezifische Wachstumsrate
 $Y_{X/S}$: Ertragskoeffizient, X = Biomasse {C₄H₈O₂N₁}
 q_s : spezifische Aufnahme-Rate
 k_p : spezifische PHB-Synthese-Rate
 CS : Citratsynthase; U = [μ mol/min]

Als Bezugsgröße diene in jedem Falle Biomassetrockensubstanz, nicht Protein.

* Theoretisch möglicher Wert, wenn Glucose via glykolytische Sequenz assimiliert wird (= ca. 61 % cce).

Die Tabelle 2 zeigt, was theoretisch möglich ist für Acetat als Substrat. Angenommen, Acetat würde unter den Bedingungen der Synthese wie in einer Einbahnstraße in PHB gewandelt, die Aufnahme von Acetat und die Citratsynthase wären nicht gedrosselt, ATP zur Aktivierung von Acetat und Reduktionskraft für die Acetoacetyl-CoA-Reduktase stehen zur Verfügung, dann könnte unter Berücksichtigung der maximal möglichen Ausbeute von ca. 0,48 g/g mit einer Synthese-Rate von ca. 0,5 g/h g gerechnet werden. (Alle Rechnungen basieren auf stoffwechselbedingt sowie experimentell möglichen

Werten.) Sollte die Citratsynthese-Aktivität gehemmt sein, so muss sie noch nicht die PHB-Synthese limitieren, da unter Bedingungen von Wachstum und Vermehrung, also vor dem Umschalten auf PHB-Bildung, höhere Aktivität zur Verfügung war und auch beansprucht wird. Für Wachstum und Vermehrung wird immer mehr Citratsynthese-Aktivität gebraucht.

Tab. 2: Vermehrung und PHB-Synthese auf Acetat
CS in Abhängigkeit von μ und $Y_{X/S}$; k_p in Abhängigkeit von q_s bei konst. $Y_{P/S}$; k_p in Abhängigkeit von CS-Aktivität

Wachstum	μ	0,10	0,15	0,20	0,30	0,30	$[\text{h}^{-1}]$
	$Y_{X/S}$	0,3	0,3	0,4	0,3	0,1	$[\text{g/g}]$
	q_s	0,33	0,50	0,50	1,00	3,00	$[\text{g/h g}]$
	CS	0,0707	0,106	0,095	0,212	0,768	$[\mu\text{mol/min mg}]$
PHB-Synthese	q_s	0,33	0,50	0,50	1,00	0,30	$[\text{g/h g}]$
	$Y_{P/S}$	0,48*	0,48*	0,48*	0,48*	0,48*	$[\text{g/g}]$
	CS	0,0305	0,0456	0,0456	0,0913	0,2750	$[\mu\text{mol/min mg}]$
	k_p	0,160	0,24	0,24	0,48	1,44	$[\text{g/h g}]$
	CS	0,0707	0,1060	0,0950	0,2120	0,7680	$[\mu\text{mol/min mg}]$
	q_s	0,770	1,160	1,043	2,310	8,370	$[\text{g/h g}]$
	k_p	0,37	0,56	0,50	1,11	4,02	$[\text{g/h g}]$

Symbole: wie in Tab. 1

$Y_{P/S}$: PHB-Ertragskoeffizient

* Ertragskoeffizient gemäß $2 \text{ Acetat} + 'E' \rightarrow \{C_4H_6O_2\}$; $1 \text{ Acetat} \rightarrow 2 \text{ CO}_2 + 'E'$ (s. Abb. 3)

Wenn die von der Acetoacetyl-CoA-Reduktase akzeptablen Reduktionsäquivalente bereits auf dem Wege der Acetyl-CoA-Synthese freigesetzt werden (gemäß $C_xH_yO_z = \text{Acetyl-CoA} + 1/2H_2 + \dots$; z. B. Glycerol, Glucose, Succinat), dann sind auch Betrachtungen über die Verfügbarkeit von NAD(P)H als 2. Substrat der Reduktase irrelevant. Citratsynthese und Tricarbonsäure-Zyklus sind sogar überflüssig und das anströmende Acetyl-CoA stünde – idealisiert – allein der β -Ketothiolase zur Verfügung. Da Intermediate auf dem Wege der PHB-Synthese nicht auftreten, d.h. akkumulieren (jedenfalls sind darüber keine Mitteilungen bekannt), dürfte der letzte Schritt, die Polymerisation nicht die schrittmachende Reaktion sein, sondern die von der β -Ketothiolase katalysierte Kondensationsreaktion ins Blickfeld rücken.

Fazit aus diesen Betrachtungen, die regulatorische Aspekte und Kompartimentierung außer acht gelassen haben:

1) Energie-defizientere Substrate für Wachstum und Vermehrung dürften höhere PHB-Bildungsraten zulassen als effizientere.

Glycerol (ca. 71 % max. carbon conversion efficiency; energieunabhängig wären wie bei Glucose ca. 85 % möglich) ist energiereicher als Glucose (ca. 61 % cce) und Glucose ist energiereicher als Acetat (ca. 49 % cce; energieunabhängig wären ca. 75 % möglich). Würde ein Organismus auf diesen drei Substraten mit einer Geschwindigkeit von 0,1 g/h g und den angegebenen Wirkungsgraden wachsen, dann würde Acetyl-CoA mit den folgenden Geschwindigkeiten zur Dissimilation „antransportiert“ werden: 0,0089 U/mg, 0,0138 U/mg und 0,045 U/mg. Danach sollte mit Acetat die größte Geschwindigkeit möglich sein. Da mit Acetat auch größere PHB-Ertragskoeffizienten möglich sein dürften als mit Glucose und Glycerol, sollte Acetat das geeignetste Substrat sein.

Ethanol nimmt insofern eine besondere Stellung ein, als es eher kohlenstoff/energie-balanciert ist. Mit ihm sind die Kohlenstoffmetabolismus determinierten Wachstumserträge (ca. 75 %) möglich. Da die PHB-Synthese (bio-)energetisch fast neutral ist, sollten die PHB-Ertragskoeffizienten mit Ethanol noch größer zu erwarten sein als für Acetat.

Phenol (Tab. 3) wird via *meta*-Weg (ca. 40 % cce) ineffizienter umgesetzt als via *ortho*-Weg (ca. 47 % cce). Folglich wird via *meta*-Weg mehr Acetyl-CoA „antransportiert“ werden bzw. umzuschlagen sein als via *ortho*-Weg. (Interessanterweise erlaubt der *meta*-Weg die höher Wachstumsgeschwindigkeit.)

Tab. 3: Wachstum und PHB-Bildung auf Phenol
CS-Aktivität in Abhängigkeit vom Stoffwechselweg

Ortho-Weg

μ	0,1	0,1	0,1	0,1
$Y_{X/S}$		0,76 ²⁾	0,50	0,10
Cce	75,0 % ¹⁾	46,7 % ²⁾		
CS	0,007 ³⁾	0,024	0,031	0,265

Meta-Weg

μ	0,1	0,1	0,1	0,1
$Y_{X/S}$		0,66 ²⁾	0,50	0,10
Cce	50,0 % ¹⁾	40,8 % ²⁾		
CS	0,022 ³⁾	0,032	0,049	0,333

Dimensionen und Symbole: wie in Tab. 1 u. 2

cce = carbon conversion efficiency;

¹⁾ Energieunabhängiger, allein Kohlenstoffmetabolismus determinierter Stoffwandlungskoeffizient

²⁾ Theoretisch möglicher Wirkungsgrad in g/g oder %

³⁾ Wird nur anabolisch benötigt

Im Vergleich dazu Acetat, bei 0,1 h⁻¹ und cce von 75 % ... CS = 0,013 U/mg.

- 2) **Substrate sind in bezug auf Wachstum und Vermehrung alle mehr oder minder ATP- und/oder /2H/-defizient. Sind die daraus resultierenden Unterschiede in den Ertragskoeffizienten deutlich geringer als die zwischen den respektiven Wachstumsgeschwindigkeiten, dann sollten die Substrate, die höhere Geschwindigkeiten ermöglichen, bzw. die Organismen, die sich mit höherer Geschwindigkeit vermehren können, die geeigneteren sein. (Mit steigender Wachstumsgeschwindigkeit muss, wenn die Effizienz gleich bleibt, immer mehr dissimiliert werden.)**

Die o.g. Unterschiede zwischen Glucose und Acetat würden kompensiert sein, wenn Glucose 3- bis 4mal schneller verwertet werden könnte als Acetat.

Beides sind (Hypo-)Thesen, formuliert für Produkte des *overflow metabolism* (Babel, 1986), die es durch systematisches Experimentieren zu verifizieren gilt. Dabei wird sich zeigen, ob und wie häufig diese Beziehung gilt oder ob die wachstumseffizienten Substrate diejenigen sind, die die höheren Wachstumsgeschwindigkeiten realisieren.

Literatur:

- Asenjo, J. A., Sukk, S.S. (1986): J. Ferment. Technol. 64, 271-278
 Babel, W. (1986): Acta Biotechnol. 6, 215-219
 Babel, W. (1992): FEMS Microbiol. Rev. 103, 141-148
 Babel, W., Ackermann, J.-U., Breuer, U. (2001): Adv. Biochem. Eng./Biotechnol. 71, 125- 157
 Babel, W., Brinkmann, U., Müller, R.H. (1993): Acta Biotechnol. 13, 211-242
 Babel, W., Riis, V., Hainich, E. (1990): Plaste & Kautschuk 37, 109-115
 Collins, S. (1987): Spec. Publ. Soc. Gen. Microbiol. 21, 161-168
 Kessler, B., Weusthuis, R., Witholt, B., Eggink, G. (2001): Adv. Biochem. Eng./ Biotechnol. 71, 159-182
 Leonard, D., Lindley, N.D. (1998): Microbiology 144, 241-248
 Poirier, Y. (2001): Adv. Biochem. Eng./Biotechnol. 71, 209-240
 Steinbüchel, A., Valentin, H.E. (1995): FEMS Microbiol. Lett. 128, 219-228
 Stouthamer, A.H. (1973): Antonie v. Leeuwenhoek 39, 545-565
 Van Dijken, J.P., Harder, W. (1975): Biotechnol. Bioeng. 17, 15-30
 Yamane, T. (1992): FEMS Microbiol. Rev. 103, 257-264