

**Die Nutzung der Hefe *Yarrowia lipolytica* zur Produktion  
von Citronensäure aus nachwachsenden Rohstoffen**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften  
der Technischen Universität Dresden

von

Diplom-Biologe André Förster  
geboren am 2. September 1976 in Reichenbach (Vogtland)

Gutachter:

Prof. Dr. G. Barth  
Prof. Dr. U. Stottmeister  
Prof. Dr. T. Bley

Eingereicht am: 12.06.2006

Tag der Verteidigung:



## Zusammenfassung

Eine der für die biotechnologische Nutzung interessanten Eigenschaften der Hefe *Yarrowia (Y.) lipolytica* ist ihr Vermögen, unter bestimmten Kultivierungsbedingungen große Mengen an organischen Säuren, darunter auch Citronensäure (CS), ins extrazelluläre Medium zu sekretieren. Aufgrund ihrer Apathogenität, ihres breiten Substratspektrums und ihrer guten molekulargenetischen und verfahrenstechnischen Handhabbarkeit, stellt sie einen idealen Mikroorganismus zur biotechnologischen Gewinnung von Citronensäure dar.

Bei der durch eine Stickstofflimitation ausgelösten Überproduktion von CS mit *Y. lipolytica* kommt es parallel auch zur Ausscheidung von Isocitronensäure (ICS), deren Anteil am Gesamtsäureprodukt in Abhängigkeit von der C-Quelle in Wildtypstämmen zwischen 10 % (Glucose, Saccharose, Glycerol) und 40-55 % (Pflanzenöle, Alkan) liegt. In der Literatur beschriebene Mutantenstämme von *Y. lipolytica* besitzen ein von Wildtypstämmen abweichendes Produktmuster und können sowohl weniger (2-5 % auf Glucose, 5-10 % Alkan und Pflanzenöl) als auch mehr ICS (15-35 % Glucose, 65-75 % Alkan, Ethanol bzw. Pflanzenöl) sekretieren. Die gezielte Überexpression des für die Isocitratlyase codierenden Gens *ICL1* durch die Erhöhung der Kopiezahl führte zu einer drastischen Erhöhung der Enzymaktivität in den entsprechenden *ICL1* multicopy Transformanden (10-15fach gegenüber Wildtyp) aufgrund des Gen-Dosis-Effektes. Auf den getesteten hydrophilen C-Quellen Glucose, Glycerol und Saccharose verringerte sich der ICS-Anteil von durchschnittlich 10-12 % auf 3-5 %, auf den hydrophoben C-Quellen Hexadecan und Sonnenblumenöl sogar von durchschnittlich 40-55 % auf Werte um 5-10 %. Im Ergebnis dieser Untersuchungen entstand ein Patent (DE10333144A1), welches ein Verfahren zur Gewinnung von CS mit einer genetisch veränderten Hefe *Y. lipolytica* beschreibt.

Die Zerstörung des Leserahmens des *ICL1* Gens in Mutantenstämmen bewirkte das Ausbleiben der Synthese einer funktionell aktiven Isocitratlyase, was den Verlust der Fähigkeit zur Verwertung gluconeogenetischer C-Quellen wie Ethanol, Alkan und Pflanzenölen zur Folge hatte. Auf Glucose bzw. Glycerol zeigten diese Mutantenstämme im Vergleich zum Wildtypstamm jedoch nur eine geringe Erhöhung des ICS-Anteils um durchschnittlich 2-5 Prozentpunkte.

Die Zerstörung des Leserahmens des *IDP2* Gens, codierend für die NADP-abhängigen Isocitratdehydrogenase, führte zur Glutamat-Auxotrophie des entsprechenden Mutantenstammes auf allen getesteten C-Quellen. In der Produktbildung zeigte diese Mutante im Vergleich zum Wildtypstamm eine Verringerung des ICS-Anteils um durchschnittlich 2-4 Prozentpunkte.

Es konnte gezeigt werden, dass Saccharose ein geeignetes Substrat zur Gewinnung von CS mit rekombinanten Stämmen von *Y. lipolytica* darstellt, die das für die Invertase codierende *SUC2* Gen aus *Saccharomyces cerevisiae* exprimieren. Natürlicherweise kann *Y. lipolytica* diesen Zucker aufgrund des Fehlens des Enzyms Invertase nicht verwerten. Im Schüttelkolben wurden aus 100 g/l Saccharose unter nicht optimierten Bedingungen bereits 56 g/l CS+ICS gewonnen. Nach der Optimierung durch die Reduktion des für die Invertaseexpression durch *pXPR2* notwendigen Peptonanteils von 1,7 auf 0,4 g/l erhöhte sich die Produktkonzentration auf 77 g/l. Die Übertragung des Produktionsprozesses in den Bioreaktor hatte die Verdopplung der Produktbildungsrate (RZA von 0,4 auf 0,85 g/l\*h, r von 46 auf 89 mg/g\*h) zur Folge, bedingt durch die Aufhebung der Sauerstofflimitation. Die Steigerung der Invertaseaktivität, die sich unter Bioreaktorbedingungen als ein Limitationsfaktor herausstellte, konnte durch die Anhebung des pH-Wertes von 5,0 auf 6,0 bzw. 6,8 erreicht werden. Dadurch konnten die Produktbildungsrate RZA um bis zu 80 % von 0,42 auf 0,76 g/l\*h, die biomassespezifische Produktbildungsgeschwindigkeit r um bis zu 70 % von 0,06 auf 0,1 g/g\*h und die Ausbeute um bis zu 64 % von 0,5 auf 0,82 g/g gesteigert werden. Einen weiteren Limitationsfaktor für den CS-Bildungsprozess aus Saccharose stellt bei ausreichender Invertaseexpression offenbar die Aufnahme von Glucose und Fructose dar.

Die Hefe *Y. lipolytica* zeigte höchste Produktbildungsrate aus Pflanzenölen, wie Sonnenblumen- oder Rapsöl, als nachwachsende Rohstoffe. Um zu prüfen, ob die Produktivität der CS-Bildung aus Pflanzenölen mit *Y. lipolytica* gesteigert werden kann, sollte die Triglyceridverwertung durch die Erhöhung der extrazellulären Lipaseaktivität verbessert werden. Dazu wurden zum einen Insertionsmutantenstämme, die auf eine erhöhte extrazelluläre Lipaseaktivität im Plattentest hin selektiert wurden, charakterisiert. Zum anderen wurde das für die extrazelluläre Lipase codierende *LIP2* Gen in *Y. lipolytica* überexprimiert. Die erhaltenen *LIP2* multicopy Transformanten zeigten eine bis zu 400fach erhöhte Lipaseaktivität im Vergleich zum Wildtypstamm (von 400 U/l auf bis zu 150000 U/l). Eine Verbesserung der Triglyceridverwertung aufgrund der Erhöhung der extrazellulären Lipaseaktivität in den untersuchten Insertionsmutanten und *LIP2* multicopy Transformanten wurde nicht festgestellt. Die erhaltenen Daten für die Produktbildungsrate RZA (0,9-1,1 g/l\*h), die biomassespezifische Produktbildungsgeschwindigkeit r (0,08-0,14 g/g\*h) und die Ausbeuten (1,3-1,5 g/g) waren innerhalb der untersuchten Stämme vergleichbar und ließen keine verbesserte Produktbildung erkennen. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt liegt offenbar nicht bei der Hydrolyse der Triglyceride durch Lipasen, sondern bei der Aufnahme und dem Transport der Fettsäuren und/oder deren Katabolismus.

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>4</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>7</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>8</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>10</b>
1.1 Die Hefe <i>Y. lipolytica</i> .....	10
1.1.1 Allgemeine Charakteristika .....	10
1.1.2 Molekularbiologische Charakteristika .....	10
1.1.3 Physiologie und biotechnologische Bedeutung .....	11
1.2 Citronensäure .....	13
1.2.1 Chemische Eigenschaften .....	13
1.2.2 Verwendung .....	14
1.2.3 Gewinnung von Citronensäure .....	15
1.2.3.1 Produktionsverfahren mit <i>Aspergillus niger</i> .....	15
1.2.3.2 Umweltprobleme des <i>Aspergillus</i> -Verfahrens .....	17
1.2.3.3 Alternative Verfahren mit Hefen .....	18
1.3 Metabolische Besonderheiten der Citronensäureüberproduktion in Pilzen ....	20
1.3.1 Veränderungen in der Pilzzelle bei der CS-Produktion.....	20
1.3.2 Produktmuster bei der Citronensäureproduktion mit <i>Y. lipolytica</i> .....	23
1.3.2.1 Beeinflussung des Produktmusters über die Kulturführung .....	25
1.3.2.2 Mutanten mit verändertem Produktmuster .....	26
1.4 Die Isocitratlyase und der Glyoxylatzyklus .....	30
1.5 Lipasen .....	32
1.6 Zielstellung.....	34
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>35</b>
2.1 Geräte .....	35
2.2 Chemikalien und Reagenzien .....	36
2.2.1 Feinchemikalien.....	36
2.2.2 Kitsysteme .....	37
2.2.3 Enzyme .....	37
2.2.4 Antikörper .....	37
2.2.5 C-Quellen .....	37
2.3 Mikroorganismen .....	38
2.4 Kultivierung .....	40
2.4.1 Kultivierung von <i>Y. lipolytica</i> .....	40

2.4.2	Kultivierungsmedien .....	40
2.4.2.1	Vollmedium .....	41
2.4.2.2	Minimalmedien .....	41
2.4.3	Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	43
2.4.4	Bestimmung der Biotrockenmasse und der optischen Dichte .....	43
2.4.5	Kultivierung im Bioreaktor .....	44
2.5	Biochemische Untersuchungsmethoden .....	44
2.5.1	Bestimmung der Aktivität der Invertase (Suc2p) .....	44
2.5.2	Bestimmung der Aktivität der Isocitratlyase (Icl1p) .....	46
2.5.3	Bestimmung der Gesamtlipaseaktivität .....	47
2.5.4	Phänotypische Charakterisierung der extrazellulären Lipaseaktivität von <i>Y. lipolytica</i> im Plattentest .....	48
2.5.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	48
2.5.6	Western-Hybridisierung .....	50
2.5.7	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	51
2.5.8	Bestimmung von Glucose, Fructose, Saccharose und Glycerol .....	52
2.5.9	Bestimmung der Konzentration der organischen Säuren .....	52
2.5.9.1	Ionenchromatographie .....	52
2.5.9.2	Enzymatische Bestimmung der Citronen- und Isocitronensäure ..	54
2.5.9.3	Enzymatische Bestimmung der 2-Ketoglutarensäure .....	54
2.5.9.4	Enzymatische Bestimmung von Pyruvat .....	55
2.6	Gentechnische Untersuchungsmethoden .....	55
2.6.1	DNA-Präparation .....	55
2.6.1.1	Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i> .....	55
2.6.1.2	Präparation chromosomaler DNA aus <i>Y. lipolytica</i> .....	56
2.6.2	Methoden zur DNA-Reinigung .....	56
2.6.2.1	Phenol-Chloroform Extraktion .....	56
2.6.2.2	Ethanol-Fällung .....	57
2.6.3	DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen .....	57
2.6.4	Agarose-Gelelektrophorese .....	57
2.6.5	Bestimmung der DNA-Konzentration .....	58
2.6.6	Integrative Transformation von Hefen mit der Lithiumacetat-Methode	58
2.6.6.1	Herstellung kompetenter <i>Y. lipolytica</i> Zellen .....	58
2.6.6.2	Transformation von <i>Y. lipolytica</i> .....	59
2.6.7	Southern-Hybridisierung .....	59

2.6.7.1	Restriktionsverdau und Gelelektrophorese .....	59
2.6.7.2	Blotten der DNA .....	60
2.6.7.3	Präparation von Sonden-DNA.....	60
2.6.7.4	Prähybridisierung und Hybridisierung .....	61
2.6.7.5	Waschen, Blocken und Detektion .....	61
2.6.7.6	Bestimmung der Kopiezahl .....	62
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>63</b>
3.1	Untersuchungen zur Beeinflussung des Produktmusters.....	63
3.1.1	Überexpression der Isocitratlyase .....	64
3.1.1.1	Charakterisierung der integrativen Transformanden.....	67
3.1.1.2	Überexpression der Isocitratlyase.....	69
3.1.1.3	Vergleich des Produktmusters CS:ICS .....	71
3.1.2	Einfluss von Mutationen in <i>ICL1</i> und <i>IDP2</i> auf das Produktmuster CS:ICS .....	75
3.1.2.1	Charakterisierung der Mutantenstämme .....	75
3.1.2.2	Produktmuster der <i>icl1</i> und <i>idp2</i> defekten Mutantenstämme .....	79
3.2	Gewinnung von Citronensäure aus Saccharose .....	83
3.2.1	Wachstum von rekombinanten <i>Y. lipolytica</i> Stämmen auf Saccharose.....	84
3.2.2	Regulation der Invertaseexpression .....	87
3.2.3	Produktion von Citronensäure aus Saccharose im Schüttelkolben .....	90
3.2.4	Optimierung der Citronensäureproduktion im Bioreaktor.....	94
3.3	Gewinnung von Citronensäure aus Pflanzenölen .....	104
3.3.1	Charakterisierung Lipase überproduzierender <i>Y. lipolytica</i> Stämme ..	104
3.3.2	Wachstum auf Triglyceriden und Lipaseexpression .....	111
3.3.3	Produktion von Citronensäure aus Sonnenblumenöl.....	117
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>123</b>
4.1	Beeinflussung des Produktmusters CS:ICS.....	123
4.1.1	Überexpression der Isocitratlyase .....	124
4.1.2	Verschiebung des Produktmusters in Richtung Isocitronensäure .....	130
4.2	Produktion von Citronensäure aus Saccharose .....	133
4.3	Produktion von Citronensäure aus Pflanzenöl .....	139
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>143</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Strukturformel der Citronensäure und ihrer isomeren Form Isocitronensäure.....	13
Abb. 1.2:	Vereinfachtes Modell zur Darstellung des Metabolismus bei der CS-Überproduktion in der Pilzzelle.....	21
Abb. 1.3:	Darstellung der Unterschiede in den Enzymaktivitäten des Tricarbonsäurezyklus und des Glyoxylatzyklus zwischen dem von Finogenova <i>et al.</i> (1986) untersuchten <i>Y. lipolytica</i> Wildtypstamm 704 und den daraus abgeleiteten Mutanten 1 (verstärkte CS-Sekretion) und 2 (verstärkte ICS-Sekretion).....	28
Abb. 2.1:	Beispielchromatogramm eines Standards mit jeweils 20 mg/l Säure .....	53
Abb. 3.1:	Wachstumsverlauf und Kinetik der Bildung von Citronensäure (CS) und Isocitronensäure (ICS) aus Sonnenblumenöl als Substrat durch den <i>Y. lipolytica</i> Stamm H222, ausgelöst durch eine Stickstofflimitation der Kultur. ....	63
Abb. 3.2:	Aufbau der auf rDNA (p64ICL1) oder LTR zeta (p67ICL1) basierenden integrativen multicopy Vektoren für die <i>ICL1</i> Überexpression in <i>Y. lipolytica</i> .....	65
Abb. 3.3:	(A) Nachweis der erhöhten Kopiezahl des <i>ICL1</i> Gens in ausgewählten multicopy Transformanten des Typs H222-S4(p64ICL1) und H222-S4(p67ICL1). Southern-Hybridisierung nach vollständigem Verdau der genomischen DNA mit dem Restriktionsenzym <i>NcoI</i> und Detektion spezifischer Banden mittels des 2,3 kb <i>BamHI</i> Fragmentes des <i>ICL1</i> Gens aus <i>Y. lipolytica</i> . (B) Nachweis der erhöhten Kopiezahl der <i>ura3d</i> Allele in ausgewählten integrativen Transformanten des Stammes H222-S4 mit den Plasmiden p64ICL1, p65ICL1 und p66ICL1. Southern-Hybridisierung nach vollständigem Verdau der genomischen DNA mit dem Restriktionsenzym <i>SalI</i> und Detektion spezifischer Banden mittels des 1,7 kb <i>SalI</i> Fragmentes des <i>URA3</i> Gens aus <i>Y. lipolytica</i> .....	68
Abb. 3.4:	(A) Erhöhung der Isocitratlyaseaktivität infolge der multiplen Integration des <i>ICL1</i> Gens in das Genom von <i>Y. lipolytica</i> am Beispiel der Kultivierung auf den C-Quellen Glucose (Glu) und Ethanol (EtOH). (B) Erhöhte Isocitratlyaseaktivität auch nach langer Kulturzeit in der <i>ICL1</i> multicopy Transformante H222-S4(p64ICL1) T1 im Vergleich zum Rezipientenstamm H222-S4 während der CS-Produktion auf Sonnenblumenöl bzw. Hexadecan.....	69
Abb. 3.5:	(A) Nachweis der Expression des Isocitratlyaseproteins Icl1p in drei Hefestämmen mittels Western-Hybridisierung nach Kultivierung auf Glucose oder Ethanol. (B) Nachweis der Überexpression des Isocitratlyaseproteins in der <i>ICL1</i> multicopy Transformante H222-S4(p64ICL1) T1 nach der Coomassie-Färbung des Proteingels. Elektrophoretische Auftrennung zellfreier Proteinextrakte nach 3-12 h Kultivierung der Stämme im Minimalmedium Mg mit 1 % Ethanol als C-Quelle.....	70
Abb. 3.6:	Verschiebung des Produktverhältnisses CS:ICS infolge multipler Integration des <i>ICL1</i> Gens bei der Kultivierung von <i>Y. lipolytica</i> Stämmen auf Glucose oder Sonnenblumenöl.....	72
Abb. 3.7:	Produktverhältnis Citronensäure (CS) und Isocitronensäure (ICS) im Rezipientenstamm H222-S4 und verschiedenen multicopy Transformanten von H222-S4(p64ICL1) nach 15-20-tägiger Kultivierung auf Sonnenblumenöl.....	73
Abb. 3.8:	(A) Nachweis der Genzerstörung des <i>ICL1</i> Gens in den Stämmen Z123 und PO1dΔICL1. Southern-Hybridisierung nach vollständigem Verdau der genomischen DNA mit dem Restriktionsenzym <i>NcoI</i> und Detektion spezifischer Banden mittels des 2,3 kb <i>BamHI</i> Fragmentes des <i>ICL1</i> Gens aus <i>Y. lipolytica</i> . (B) Western-Hybridisierung von <i>Y. lipolytica</i> Stämmen mit intaktem <i>ICL1</i> Gen (PO1dL, H222) und defektem <i>ICL1</i> Gen (Z123, PO1dΔICL1).....	77

Abb. 3.9: Wachstumsverhalten der Insertionsmutantenstämme Z123 (ICL defekt) und N156 ( <i>IDP2</i> zerstört) im Vergleich zum Wildtypstamm H222 auf den C-Quellen Glucose (Glu), Glycerol (Gly) und Sonnenblumenöl (Sö).....	79
Abb. 3.10: Vergleich der CS-Produktion der ICL defekten Mutante Z123 (A) und der ICDH defekten Mutante N156 (B) mit dem Wildtypstamm H222 auf den C-Quellen Glucose (Glu), Glycerol (Gly) oder Sonnenblumenöl (Sö).....	80
Abb. 3.11: Unterschiede im Isocitratanteil am Gesamtsäureprodukt (CS+ICS) am Beispiel des NADP-ICDH-defekten Stammes N156 und des ICL-defekten Stammes Z123 im Vergleich zum Wildtypstamm H222 auf den C-Quellen Sonnenblumenöl (5 %) bzw. Glycerol (10 %).....	81
Abb. 3.12: Plattentest zum Nachweis der Saccharoseverwertung mit verschiedenen Stämmen von <i>Y. lipolytica</i> .....	84
Abb. 3.13: (A): Vergleich des Wachstums des rekombinanten Stammes H222-S4 zum Wildtypstamm H222 auf 10 % Saccharose (Suc) bzw. Glucose (Glu). (B): Einfluss des Zusatzes von Pepton auf das Wachstumsverhalten des Stammes H222-S4(p67ICL1) T5 während der Kultivierung auf Saccharose.....	85
Abb. 3.14: Expressionsverlauf der Invertase (A) und Abhängigkeit der Expressionshöhe von der Peptonkonzentration in Medium (B) während der Kultivierung des Stammes H222-S4(p67ICL1) T5 auf Saccharose unter Produktionsbedingungen.....	87
Abb. 3.15: Verteilung der Invertaseaktivität zwischen Zellen und zellfreiem Kulturmedium (A) und Verlauf der Expression der Invertase (B) während der Kultivierung des <i>Y. lipolytica</i> Stammes H222-S4(p67ICL1) T5 mit insgesamt 10 % Saccharose unter Stickstofflimitationsbedingungen im Schüttelkolben. ....	89
Abb. 3.16: Kinetik des Wachstums und der Produktbildung für die Stämme H222-S4 und die <i>ICL 1</i> multicopy Transformande H222-S4(p64ICL1) T1 auf 10 % Saccharose.....	91
Abb. 3.17: Wachstumsverhalten (A) und Produktbildung (B) für den <i>Y. lipolytica</i> Stamm H222-S4(p67ICL1) T5 während der Kultivierung im Schüttelkolben mit 10 % Saccharose. ....	93
Abb. 3.18: Kinetik des Wachstums und der CS-Bildung auf Saccharose mit dem <i>Y. lipolytica</i> Stamm H222-S4(p67ICL1) T5 im 2 l – Rührreaktor. ....	95
Abb. 3.19: Verlauf des Wachstums und der Invertaseaktivität des Stammes H222-S4(p67ICL1) T5 während der Kultivierung im Bioreaktor mit Saccharose bei pH 5,0 (A) und Vergleich der Invertaseaktivitäten bei pH 5,0, 6,0 und 6,8 (B). ....	97
Abb. 3.20: Verlauf der Saccharoseverwertung bei der Kultivierung des Stammes H222-S4(p67ICL1) T5 im Bioreaktor bei pH 5,0 im Vergleich zu pH 6,8 (A) und Verlauf der Konzentrationen von Glucose bzw. Fructose bei pH 6,8 (B). ....	98
Abb. 3.21: Verlauf der Konzentration von Glucose und Fructose im Medium bei separater (A) und gemeinsamer (B) Dosierung beider Substrate während der Kultivierung des Stammes H222-S4(p67ICL1) T5. ....	99
Abb. 3.22: Vergleich der CS-Produktion während der Fedbatch-Kultivierung des Stammes H222-S4(p67ICL1) T5 im Bioreaktor auf Saccharose bei pH 5,0 oder pH 6,8. ....	102
Abb. 3.23: Steigerung der Produktivität der CS-Bildung mit dem Stamm H222-S4(p67ICL1) T5 mit Saccharose als C-Quelle nach der Optimierung durch a) Reduktion der Peptonkonzentration, b) Aufhebung der Sauerstofflimitation und c) Erhöhung der Invertaseaktivität durch Erhöhung des pH-Wertes.....	103
Abb. 3.24: Integratives, selbstklonierendes multicopy Plasmid JMP6 zur Erhöhung der <i>LIP2</i> Genexpression in <i>Yarrowia lipolytica</i> . ....	105
Abb. 3.25: Nachweis der multiplen Integration der Expressionskassette <i>pPOX2-LIP2</i> aus dem Plasmid JMP6 in <i>Y. lipolytica</i> H222-S4. Abschätzung der Kopiezahl des <i>LIP2</i> Gens durch Southern-Hybridisierung des Rezipientenstammes H222-S4 (K) und ausgewählter <i>LIP2</i> multicopy Transformanden (T1-T15).. ....	106
Abb. 3.26: Southern-Hybridisierung zum Nachweis der erhöhten Kopiezahl des <i>LIP2</i> Gens in den multicopy Transformanden H222-S4(JMP6) T3 (4), T5 (5) und T15 (6) im Vergleich mit den	

Insertionsmutanten H222-41(JMP5) N137 (7) und N235A (8) und den Kontrollstämmen H222 (1), H222-S4 (2) und H181 (3) mit einfacher Kopie des <i>LIP2</i> Gens.....	107
Abb. 3.27: Schematische Darstellung der Möglichkeiten der Integration des linearisierten Vektorfragmentes aus JMP6 in das Genom von <i>Y. lipolytica</i> .....	108
Abb. 3.28: Vergleich der extrazellulären Lipaseaktivität der Stämme H222, H181, der $LIP^{++}$ Insertionsmutanten H222-41(JMP5) N137 und N235A sowie ausgewählter <i>LIP2</i> multicopy Transformanden des Typs H222-S4(JMP6) im Plattentest mit Tributyrin (Tb) oder Olivenöl (Oö) als C-Quelle.....	110
Abb. 3.29: Verlauf der Expression der Lipaseaktivität für die <i>LIP2</i> -multicopy Transformande H222-S4(JMP6) T3 und für den Wildtypstamm H222 während der Kultivierung auf Sonnenblumenöl unter Produktionsbedingungen für Citronensäure..	111
Abb. 3.30: Verteilung der Lipaseaktivität in der <i>LIP2</i> multicopy Transformande H222-S4(JMP6) T5 und im Wildtypstamm H222 während der Kultivierung auf Sonnenblumenöl..	113
Abb. 3.31: Einfluss des pH-Wertes auf die Lipaseaktivität..	114
Abb. 3.32: Vergleich des Wachstums des Wildtypstammes H222, der <i>LIP2</i> -multicopy Transformande H222-S4(JMP6) T3 und Insertionsmutante H222-41(JMP5) N137 unter Wachstumsbedingungen mit jeweils 1% Sonnenblumen- bzw. Olivenöl.....	116
Abb. 3.33: Batch-Kultivierung zur Gewinnung von Citronensäure im 2 l-Bioreaktor mit der $Lip^{++}$ -Insertionsmutante H222-S4(JMP5) N137 mit Sonnenblumenöl (7 %)..	119
Abb. 3.34: Vergleich der Citratproduktion aus Sonnenblumenöl in Bioreaktoren unter Einsatz von <i>Y. lipolytica</i> H181, H222, H222-41(JMP5) N137 (N137) und H222-S4(JMP6) T5 (T5)..	121
Abb. 4.1: Vereinfachte Darstellung der Stoffwechselwege zum Abbau verschiedener Substrate und der Sekretion von organischen Säuren des Intermediärstoffwechsels.....	125
Abb. 4.2: Modell zur Darstellung der Sekretion und Wiederaufnahme von CS und ICS in <i>Y. lipolytica</i> , basierend auf der Arbeit von Tréton <i>et al.</i> (1978)..	129
Abb. 4.3: Steigerung der Produktivität der CS-Bildung mit dem Stamm H222-S4(p67ICL1) T5 mit Saccharose als C-Quelle nach der Optimierung durch a) Reduktion der Peptonkonzentration, b) Aufhebung der Sauerstofflimitation und c) Erhöhung der Invertaseaktivität durch Erhöhung des pH-Wertes.....	134

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1:	Charakteristika von <i>Y. lipolytica</i> Mutantenstämmen mit verändertem Produktmuster CS:ICS.....	27
Tab. 2.1:	Überblick über die verwendeten <i>E. coli</i> Stämme.....	38
Tab. 2.2:	Überblick über die verwendeten <i>Yarrowia lipolytica</i> Stämme.....	39
Tab. 2.3:	Messansatz zur Bestimmung der Isocitratlyaseaktivität.....	47
Tab. 2.4:	Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels.....	49
Tab. 2.5:	Trennparameter der Ionenchromatographie.....	53
Tab. 2.6:	Messansatz zur Bestimmung der 2-Ketoglutaratkonzentration.....	54
Tab. 2.7:	Messansatz zur Bestimmung der Pyruvatkonzentration.....	55
Tab. 2.8:	In dieser Arbeit verwendete Fluorescein-markierten DNA-Sonden.....	60
Tab. 3.1:	Integrative Transformation in <i>Y. lipolytica</i> zur Erhöhung der Kopiezahl des <i>ICL1</i> Gens.....	66
Tab. 3.2:	Anteil an Isocitronensäure am Gesamtsäureprodukt (CS+ICS) mit den Ausgangsstämmen H222 und H222-S4 im Vergleich zu den <i>ICL1</i> multicopy Transformanden H222- S4(p64ICL1) T1 bzw. H222-S4(p67ICL1) T5, <i>ICL1</i> low copy Transformanden H222- S4(p65ICL1) T6 und den Mutantenstämmen H181 und A1-1 von <i>Y. lipolytica</i> auf verschiedenen Substraten.....	74
Tab. 3.3:	Isocitratanteil am Gesamtsäureprodukt der Mutantenstämmen Z123, PO1d $\Delta$ ICL und N156 im Vergleich zu den jeweiligen Ausgangsstämmen auf verschiedenen C-Quellen.....	82
Tab. 3.4:	Vergleich der CS-Produktion mit 10 % Glucose oder Saccharose mit den <i>Y. lipolytica</i> Stämmen H222, H222-S4 und H222-S4(p64ICL1) T1.....	92
Tab. 3.5:	Charakteristika der CS-Produktion mit dem Stamm H222-S4(p67ICL1) T5 bei unterschiedlichen Peptonkonzentrationen im Schüttelkolben mit 10 % Saccharose im Vergleich zur Kultivierung im Bioreaktor*.....	94
Tab. 3.6:	Charakteristika der Produktbildung aus Saccharose mit dem Stamm H222-S4(p67ICL1) T5 im Bioreaktor.....	101
Tab. 3.7:	Vergleich der CS-Produktion aus Sonnenblumenöl mit dem Wildtypstamm H222 (Lip <sup>+</sup> ) und den aus H222-41 erhaltenen Insertionsmutanten H222-41(JMP5) N123, N137, N235A und N256A (Lip <sup>++</sup> ).....	118
Tab. 3.8:	Vergleich der CS-Produktion aus Sonnenblumenöl mit dem Rezipientenstamm H222-S4 (Lip <sup>+</sup> ), der Mutante H181, der Insertionsmutante H222-41(JMP5) N235A (Lip <sup>++</sup> ) und den <i>LIP2</i> multicopy Transformanden H222-S4(JMP6) T3, T5 und T15.....	118
Tab. 3.9:	Zusammenfassung der kinetischen Daten der CS-Produktion der <i>Y. lipolytica</i> Stämme H181, H222, der Insertionsmutante H222-41(JMP5) N137 (N137) und der <i>LIP2</i> multicopy Transformande H222-S4(JMP6) T5 (T5) aus Sonnenblumenöl im Bioreaktor.....	120
Tab. 4.1:	Beeinflussung des Produktmusters CS:ICS in <i>Y. lipolytica</i> Stämmen durch die gezielte Überexpression der Gene <i>ICL1</i> oder <i>ACO1</i> bzw. Deletion der Gene <i>ICL1</i> oder <i>IDP1</i> .....	127
Tab. 4.2:	Vergleich der spezifischen Aktivitäten der Enzyme Aconitase und Isocitratlyase in verschiedenen Stämmen von <i>Y. lipolytica</i> .....	128
Tab. 4.3:	Charakteristika der CS-Produktbildung von <i>Y. lipolytica</i> Stämmen auf Kohlehydraten.....	136

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACO	Aconitase
AEP	Extrazelluläre alkalische Protease
Alk	Alkan
AXP	Extrazelluläre saure Protease
BSA	Bovine Serum Albumin, Rinderserumalbumin
C	Kohlenstoff
CS	Citronensäure
CSS	Citrat-Synthase
dH <sub>2</sub> O	einfach entionisiertes Wasser
ddH <sub>2</sub> O	zweifach entionisiertes Wasser
Et/EtOH	Ethanol
Fru	Fructose
FS	Fettsäure
GZ	Glyoxylatzyklus
Glu	Glucose
Gly	Glycerol
HK	Hauptkultur
ICL	Isocitratlyase
MAS	Malat-Synthase
NAD-ICDH	NAD-abhängige Isocitratdehydrogenase
NADP-ICDH	NADP-abhängige Isocitratdehydrogenase
NAD(P)-ICDH	NAD und NADP-abhängige Isocitratdehydrogenase
ICS	Isocitronensäure
kb	Kilobasen
2KG-DH	2-Ketoglutarat-Dehydrogenase
KKP	Kalium/Dikaliumphosphatpuffer
lc	low copy
LW	Leerwert
LTR	long terminal repeats
Mb	Megabasenpaare

mc	multicopy
MFA	Monofluoracetat
MTC	Mutagenesekassette
MW	Messwert
N	Stickstoff
PY-CA	Pyruvat-Carboxylase
r	biomassespezifische Produktbildungsgeschwindigkeit (g/g*h BTM)
RZA	volumenspezifische Raum-Zeit-Ausbeute (g/l*h)
SL	Stammlösung
Suc	Saccharose
Tab.	Tabelle
TB	Tributyrin
TCC	Tricarbonsäurezyklus
TG	Triglycerid
ü.N.	über Nacht
vgl.	vergleiche
VK	Vorkultur

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Hefe *Yarrowia lipolytica*

### 1.1.1 Allgemeine Charakteristika

Die Hefe *Yarrowia (Y.) lipolytica* zählt zu den so genannten nicht-konventionellen Hefen, wobei dieser Bezeichnung keine physiologische oder taxonomische Bedeutung zukommt, sondern der Abgrenzung zu den Hefen *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* dient (Barth und Gaillardin, 1996, 1997). Frühere Bezeichnungen der durch van der Walt und von Arx (1980) benannten Hefe *Y. lipolytica* waren *Candida lipolytica*, *Endomycopsis lipolytica* und *Saccharomycopsis lipolytica*. Taxonomisch zählt *Y. lipolytica* zu den Ascomyceten, sie ist obligat aerob, apathogen und alle bisherigen Isolate erwiesen sich als heterothallisch. Den natürlichen Lebensraum stellen fett- und proteinreiche Substrate dar. Zusammenfassende Übersichten zu *Y. lipolytica* gaben Heslot (1990) sowie Barth und Gaillardin (1996, 1997) sowie Barth *et al.* (2003).

In Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen und den stammspezifischen Eigenschaften wächst *Y. lipolytica* dimorph und kann Einzelzellen, Pseudomycel und echtes Mycel bilden (Barth *et al.*, 2003). Es werden zwei Paarungstypen unterschieden, die durch die Allele *MATA* und *MATB* determiniert werden (Bassel *et al.*, 1971). Zellen komplementärer Paarungstypen können konjugieren und eine diploide Zygote bilden, wobei es unter bestimmten Bedingungen zur Bildung von Ascis mit ein bis vier Ascosporen kommt (Gaillardin *et al.*, 1973; Barth und Weber, 1983). Vegetative haploide und diploide Zellen sind in der Regel stabil, wobei es Hinweise auf spontane Haploidisierung diploider Zellen gibt (Kurischko und Weber, 1986).

### 1.1.2 Molekularbiologische Charakteristika

Im Vergleich zu anderen ascomycetalen Hefen unterscheidet sich *Y. lipolytica* u.a. durch einen hohen GC-Gehalt (ca. 50 %), eine hohe Intronfrequenz und eine niedrige Sequenzhomologie ihrer Gene gegenüber orthologen Genen in anderen Hefen (Gelissen *et al.*, 2005). Seit dem Jahr 2004 ist das Genom von *Y. lipolytica* unter der Zusammenarbeit eines internationalen Konsortiums vollständig sequenziert (*Y. lipolytica* Datenbank des Konsortiums Génolevures – Projekte I+II – unter:

<http://cbi.labri.fr/Génolevures/>; Casaregola *et al.*, 2000; Dujon *et al.*, 2004). Mit einer Größe von ca. 20,4 Mb ist das Genom dieser Hefe deutlich umfangreicher als das von *Saccharomyces cerevisiae* (12,5 Mb) und *Schizosaccharomyces pombe* (13,8 Mb). Es verteilt sich auf insgesamt 6 Chromosomen, deren Größen zwischen 2,6 und 4,9 Mb liegen. Die Größe der Chromosomen kann sich in Stämmen unterschiedlicher Herkunft deutlich vom komplett sequenzierten Referenzstamm E150 unterscheiden (Casaregola *et al.*, 1997). Extrachromosomale Nukleinsäuren besitzt *Y. lipolytica* nur in Form doppelsträngiger RNA mit Größen von 4,9 bis 6,0 kb, DNA-Plasmide sind nicht bekannt (Barth und Gaillardin, 1997). Zusätzlich treten in einigen Stämmen Retrotransposonen auf, die alle zur Ty3/gypsy Familie gehören und von long terminal repeats (LTR) flankiert werden. Dabei handelt es sich um das mit bis zu 35 Kopien pro haploidem Genom vorkommende Ylt1 (Schmid-Berger *et al.*, 1994; Senam, 2004), das Tyl3-Element, welches mit 1-3 Kopien pro haploidem Genom vorkommt (Neuveglise *et al.*, 2002) und das Tyl6-Retrotransposon (Kovalchuk *et al.*, 2005). Im Ylt1 freien Wildtypstamm W29 (Casaregola *et al.*, 2000; Augstein, 2001; Juretzek *et al.*, 2001) gelang der Nachweis eines mit Ylli (*Y. lipolytica* LINE) bezeichneten LINE (long interspersed nuclear element)-Elements (Casaregola *et al.*, 2002). Ein weiteres zur MULE-(mutator-like element) Familie gehörendes Nicht-LTR-Retrotransposon wurde im Zuge der Sequenzierung des *Y. lipolytica* Stammes E150 identifiziert (Casaregola *et al.*, 2003).

### 1.1.3 Physiologie und biotechnologische Bedeutung

Die obligat aerobe Hefe *Y. lipolytica* ist zur Verwertung einer Vielzahl von Substraten imstande. Neben Glucose, Fructose, Ethanol oder Acetat kann sie vor allem auch auf hydrophoben C-Quellen wie Pflanzenölen, Fetten, Fettsäuren und Alkanen sehr gut wachsen. Zur Verwertung von Saccharose ist *Y. lipolytica* normalerweise nicht in der Lage, da sie das zur Saccharosespaltung notwendige Enzym Invertase nicht synthetisieren kann. Es wurden bereits rekombinante saccharoseverwertende Stämme hergestellt, die das aus *Saccharomyces cerevisiae* stammende und für die Invertase codierende Gen *SUC2* heterolog exprimieren (Nicaud *et al.*, 1989).

*Y. lipolytica* ist besonders gut an die Verwertung hydrophober Substrate angepasst. So zeigt ihre Zellwandstruktur einige Besonderheiten und hat hydrophobe Eigenschaften. Zusätzlich wird Liposan sekretiert, ein Glucoprotein, das als extrazellulärer Emulgator wirkt und die Aufnahme hydrophober Substrate erleichtert (Cirigliano und

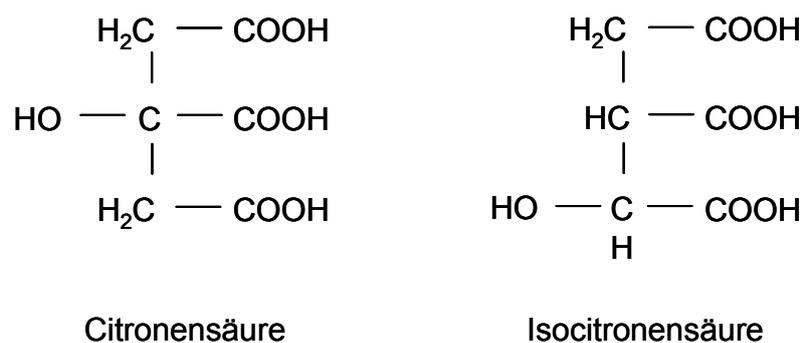
Carman, 1985). Die Hefe *Y. lipolytica* ist durch das Vorhandensein verschiedener, im Endoplasmatischen Retikulum oder den Peroxisomen lokalisierter Enzymsysteme (Cytochrom P450 Monooxygenase Systeme, Fettalkoholoxidasen- und dehydrogenasen, Fettaldehyddehydrogenasen) gut an den oxidativen Abbau von Alkanen (primäre Alkanoxidation) adaptiert (Mauersberger *et al.*, 1996; Barth und Gaillardin, 1997; Fickers *et al.*, 2005a). Zur Verwertung von Pflanzenölen oder tierischen Fetten werden extrazelluläre Lipasen exprimiert, die eine Spaltung in Glycerol und Fettsäuren bewirken (vgl. Lipasen unter Kapitel 1.5). Die aus der Primäroxidation der Alkane bzw. der Fettsäure spaltung entstehenden Fettsäuren werden durch spezifische Acyl-Coenzym A-Synthetasen in Acyl-CoA-Ester aktiviert, welche anschließend mittels peroxisomaler  $\beta$ -Oxidation in Acetyl-CoA abgebaut werden (Fickers *et al.*, 2005a). Acetyl-CoA wird dann über den Tricarbonsäurezyklus (TCC) weiter metabolisiert und in der Atmungskette bis zu  $H_2O$  und  $CO_2$  oxidiert. Die Verwertung gluconeogenetischer C-Quellen wie Öle und Alkane wird durch den Glyoxylatzyklus ermöglicht, der durch Acetyl-CoA induziert wird (Kujau *et al.*, 1992).

Biotechnologisch von Interesse ist *Y. lipolytica* vor allem deshalb, weil sie unter bestimmten Kulturbedingungen verschiedene organische Säuren, wie beispielsweise Citronensäure (CS), Isocitronensäure (ICS), Pyruvat und 2-Ketoglutarinsäure, Polyole (Arabitol, Erythritol, Mannitol) und Aminosäuren (Lysin, Methionin) in hohen Konzentrationen sekretieren kann (Heslot, 1990; Barth und Gaillardin, 1996, 1997). Eine weitere Besonderheit, im Gegensatz zu *Saccharomyces cerevisiae* und einigen anderen Hefen, ist ihr Vermögen zur Sekretion großer Mengen an hochmolekularen Proteinen, wie die natürlicherweise sekretierten extrazellulären Proteasen (z.B. AEP [XPR2] und AXP [AXP1]) und Lipasen (*LIP*-Gene). In der Vergangenheit wurde *Y. lipolytica* zur Gewinnung von Einzellerprotein (single cell protein, SCP) für Futterzwecke eingesetzt (Barth und Gaillardin, 1996). Heute wird sie zur homologen und heterologen Expression und Sekretion von verschiedenen Proteinen genutzt (Dominguez *et al.*, 2000; Madzak *et al.*, 2000; Nicaud *et al.*, 2002; Madzak, 2003; Madzak *et al.*, 2004; Madzak *et al.*, 2005). Eine interessante Anwendung stellt die Biotransformation von speziellen Fettsäuren zu verschiedenen Aromakomponenten, wie beispielsweise  $\gamma$ -Decalacton, dar (Pagot *et al.*, 1998; Wache *et al.*, 2003). Weitere potentielle biotechnologische Anwendungen von *Y. lipolytica* (mikrobiologische Sanierung, Feinchemie, Cytochrom P450-katalysierte Biotransformationen) werden in einer neueren Übersicht diskutiert (Fickers *et al.*, 2005a).

## 1.2 Citronensäure

### 1.2.1 Chemische Eigenschaften

Isoliert wurde CS erstmals 1784 von Carl Wilhelm Scheele aus Zitronensaft. Reine CS (3-Carboxy-3-hydroxy-pentan-1,5-disäure) ist ein farbloser, kristalliner Stoff. Aufgrund des Vorhandenseins von drei Carboxylgruppen und einer Hydroxylgruppe zählt sie zu den organischen Hydroxycarbonsäuren (**Abb. 1.1**). Die isomere Form der CS ist die Isocitronensäure (ICS). Diese stellt im Gegensatz zur CS ein chirales Molekül dar und enthält zwei Asymmetriezentren, wodurch sie optisch aktiv ist. Die ICS kann in vier stereoisomeren Formen und zusätzlich in zwei racemischen Gemischen vorkommen. In den chemischen Eigenschaften unterscheidet sich die ICS nicht wesentlich von der CS.



**Abb. 1.1:** Strukturformel der Citronensäure und ihrer isomeren Form Isocitronensäure.

Die CS ist eine der am weitesten verbreiteten Säuren im Pflanzenreich und tritt als Stoffwechselprodukt in allen Organismen auf. Im Zitronensaft ist sie zu 5-7 % enthalten, kommt aber auch in Äpfeln, Birnen, verschiedenen Beeren, in Nadelhölzern und sogar in der Milch vor. Von großer Bedeutung sind die Salze der CS, die Citrate, als Zwischenprodukt im Stoffwechsel aller aeroben Lebewesen, dem Citrat- oder Tricarbonsäurezyklus (TCC). Der Mensch produziert täglich etwa 2 kg CS als Zwischenprodukt, die aber sofort wieder abgebaut werden.

Die CS stellt eine schwache Säure dar, d.h. sie ist im wässrigen Milieu nicht vollständig dissoziiert. Sie wirkt stark auf unedle Metalle und bildet mit vielen Metallionen ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) instabile wasserlösliche Dicitrato-Komplexe (Chelatkomplexe). Unter Erhitzung und bei hoher Konzentration an Metallionen entstehen daraus

schwerlösliche Salze (Nutzung beim Ausfällen von CS mit Kalkmilch). Auf ihrer Komplexbildung mit  $\text{Ca}^{2+}$  beruht unter anderem auch die zerstörerische Wirkung der CS auf den Zahnschmelz.

### 1.2.2 Verwendung

Die industrielle Verwendung von CS ist sehr vielseitig (Karaffa und Kubicek, 2003; [www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)). Im Jahr 1999 betrug die jährliche weltweite Produktion von CS ca. 800.000 t (Wilke, 1999), 2004 bereits 1.000.000 t. (BACAS, 2004). Der überwiegende Teil (60-70 %) der heute jährlich produzierten CS von schätzungsweise 1,0-1,6 Millionen t ([www.sriconsulting.com](http://www.sriconsulting.com)) findet Anwendung in der Lebensmittelindustrie. Die drei größten Produzenten sind China, die USA und Westeuropa. Da sie auch als Zwischenprodukt im menschlichen Stoffwechsel vorkommt gilt die CS als Lebensmittel und darf ohne mengenmäßige Begrenzung diesen zugesetzt werden. Verwendung findet sie als *Säuerungsmittel* in Getränken, Süßigkeiten oder Salaten vor allem auch deshalb, weil sie keinen Eigengeschmack hat. Weiterhin wird sie zur Herstellung von Brausepulver verwendet, da sie mit Natriumhydrogencarbonat und Zugabe von Wasser zu Natriumcitrat und Kohlendioxid reagiert.

Die CS stellt außerdem aufgrund ihres sauren Charakters ein wichtiges *Konservierungs-* und *Antioxidationsmittel* dar. Viele Nahrungsmittel verfärben sich beim Kontakt mit Luftsauerstoff, was durch die Reaktion bestimmter Diphenole mit Sauerstoff verursacht wird. Dieser Vorgang kann durch die Behandlung mit Säuren verhindert werden. Zum einen, weil Oxidationsreaktionen mit Sauerstoff bei sauren pH-Werten langsamer ablaufen (Oxidationspotential nimmt mit sinkendem pH-Wert ab) und zum zweiten, weil das ebenfalls an der Verfärbung beteiligte Enzym Catechol-Oxidase (Tyrosinase) bei sauren pH-Werten inaktiviert wird.

Seit einiger Zeit wird CS auch als Futtermittelzusatz bei Weidetieren verwendet, weil man festgestellt hat, dass sie appetitanregend wirkt.

Neben der Lebensmittelindustrie wird CS auch in der Kosmetikindustrie als Zusatz in Cremes verwendet. Einerseits wirkt sie aufgrund ihrer schwach sauren Eigenschaften gegen Pilzbefall. Andererseits komplexiert sie Calcium- und Schwermetallionen, die für unerwünschte Reaktionen verantwortlich sind. So binden Calciumionen Schmutzpartikel auf der Haut, wodurch das Eindringen von Cremebestandteilen verhindert wird. Schwermetalle fördern dagegen die Autooxidation einiger Bestandteile der Cremes.

Ein weiteres Einsatzgebiet der CS ist ihre Verwendung als Rostentferner und Beizmittel (Reinigung von metallischen Oberflächen) in der Metallindustrie. Dabei werden wiederum die komplexbildenden Eigenschaften der CS mit Metallionen genutzt. Sie wird zur Entkalkung und Entrostung von Kesselanlagen und zur Dekontamination von radioaktiven Metalloberflächen verwendet. Des Weiteren wird CS galvanischen Bädern zugesetzt, wobei sie als Kristallisationsinhibitor die Art und Qualität einer Verchromung beeinflusst.

Als letzte Anwendung soll die Rolle der CS beim Anlegen von Blutkonserven erwähnt werden. Normalerweise gerinnt Blut sobald es nicht mehr in Bewegung ist oder mit Luft in Kontakt kommt. Verantwortlich dafür ist der sehr komplexe Prozess der Blutgerinnung, der auf Gerinnungsfaktoren basiert. Beim Fehlen eines dieser Gerinnungsfaktoren, unterbleibt die Blutgerinnung. Einen der Gerinnungsfaktoren stellen  $\text{Ca}^{2+}$  dar, die durch den Zusatz von CS komplexiert werden können.

### 1.2.3 Gewinnung von Citronensäure

Bis zum Anfang des 20. Jahrhunderts erfolgte die Gewinnung von CS aus Zitrusfrüchten. Dazu wurde der Zitronensaft mit konzentrierter Ammoniaklösung versetzt und filtriert. Durch Ausfällung des löslichen Ammoniumcitrats mit Calciumchlorid entstand unlösliches Calciumcitrat, welches nach Filtration wieder mit Schwefelsäure gelöst wurde, wobei neben dem der Citronensäurelösung auch Gips (Calciumsulfat) entstand.

In den 20er Jahren des 20. Jahrhunderts begann die großtechnische Herstellung der CS mit dem Schimmelpilz *Aspergillus (A.) niger* aus Kohlehydraten (vgl. 1.2.3.1). Nach Einführung dieses Verfahrens wurde die Gewinnung von CS aus Zitrusfrüchten schnell bedeutungslos, weil sie sich so deutlich billiger herstellen ließ. Die chemische Synthese von CS ist möglich, aber nicht wirtschaftlich im Vergleich zur biotechnologischen Herstellung.

#### 1.2.3.1 *Produktionsverfahren mit Aspergillus niger*

Für die CS-Gewinnung mit *A. niger* Stämmen gibt es zwei Verfahren, das Oberflächenverfahren und das Submersverfahren (Crolla und Kennedy, 2001). Generell erfolgt die Bildung von CS dabei nur unter bestimmten Kulturbedingungen bei einer hohen Substrat- und Gelöstsauerstoffkonzentration, einem sehr niedrigen pH-Wert

(1,6-2,2) und einer Limitation des Wachstums mit verschiedenen Nährstoffkomponenten (N, P,  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ), wobei insbesondere  $Mn^{2+}$  bedeutend ist (Magnudson und Lasure, 2004). Als Substrate bei der biotechnologischen Herstellung von CS werden Kohlehydrate wie Glucose, Melassen (Zuckergemische aus Saccharose, Glucose und Fruktose) und Stärkehydrolysate eingesetzt. Im Labormaßstab wurde auch die Verwendung von Rapsöl zur Gewinnung von CS mit *A. niger* beschrieben, wobei als nachteilig die späte Sporenauskeimung, eine verlängerte Fermentationszeit und ein unvollständiger Substratverbrauch genannt wurden (Elimer, 1998).

Beim Oberflächenverfahren werden Melassen aus Rüben, einem Abfallstoff der Zuckerindustrie mit ca. 50 % Zuckergehalt, als Substrat genutzt. Die Melasse befindet sich dabei in großen flachen Schalen und der Pilz besiedelt die Oberfläche der Nährlösung. Aufgrund des hohen Sauerstoffbedarfs finden das Wachstum und die Produktion von CS nur an der Grenzschicht zwischen Nährlösung und Pilzkultur statt.

Beim heute meist angewendeten Submersverfahren werden sowohl Melassen aus Rüben oder Zuckerrohr und Glucosesirup als Substrate genutzt (Crolla und Kennedy, 2001). Pilz und Nährlösung werden zusammen in großen Tanks bzw. Fermentoren unter Zufuhr großer Sauerstoffmengen kultiviert. Nach Beendigung der CS-Produktion wird das Pilzmycel mittels Zentrifugation von der CS enthaltenden Kulturflüssigkeit abgetrennt und dient aufgrund seines hohen Proteingehaltes als Futtermittel. Die Fermenterlösung wird durch Erhitzung und Zugabe von Kalkmilch ( $Ca(OH)_2$ ) als Calciumcitrat ausgefällt. Durch das Versetzen des abgetrennten Calciumcitrats mit Schwefelsäure entstehen die Citronensäurelösung und Gips ( $CaSO_4$ ), welcher abzentrifugiert wird. Der Rohextrakt der CS wird anschließend noch durch Aktivkohle entfärbt und aufgereinigt und entspricht danach den Reinheitsanforderungen des Lebensmittelrechts. In einer klassischen Fermentation mit *A. niger* werden, in Abhängigkeit von der Kulturzeit und Substratkonzentration, bis zu 200 g/l CS (aus 240 g/l Glucose) gewonnen (Magnudson und Lasure, 2004). Die Ausbeuten liegen zwischen 0,8-0,95 g CS pro g eingesetztem Substrat (Karaffa und Kubicek, 2003; Magnudson und Lasure, 2004).

### 1.2.3.2 Umweltprobleme des *Aspergillus*-Verfahrens

Der bewährten und sicheren Prozessführung des *Aspergillus*-Verfahrens stehen eine Reihe ökologischer Probleme gegenüber. Bei der Erzeugung von 1 t CS fallen ca. 2,3 t trockene Abprodukte (60 % davon Gips) und ca. 13 m<sup>3</sup> organisch belastete Abwässer an (Mutzall, 1993). Biotechnologische Verfahren müssen also nicht gleichzeitig auch umweltfreundlich sein. Die anfallenden und nur teilweise weiterverwertbaren Abprodukte sind u.a. durch folgende Verfahrensschritte bedingt (Stottmeister und Hoppe, 1991; Röhr *et al.*, 1996; Tsao *et al.*, 1999):

- die Anfälligkeit von *A. niger* gegenüber Schwermetallen erfordert deren Ausfällung aus den eingesetzten Melassen mittels Cyaniden vor Prozessbeginn,
- aufgrund von Optimierungsmaßnahmen beim Zuckergewinnungsprozess sinkt der Restzuckeranteil der eingesetzten Melassen bis auf 35-40 %, wodurch größere Mengen an Substrat eingesetzt werden müssen,
- infolge der Optimierungsmaßnahmen beim Zuckergewinnungsprozess kommt es zur verstärkten Anreicherung von Agrochemikalien und Pestiziden in den Melassen, welche störend auf das Verfahren wirken,
- aufgrund der Prozessführung mit *A. niger* unter Verwendung von Melassen schließt sich eine chemische Produktisolierung an (Fällung der CS mit Kalkmilch, Rücklösung mit Schwefelsäure, Kristallisation), die zum Anfallen von verunreinigtem und verfärbtem Gips und Abwässern führt.

Das klassische Verfahren mit *A. niger* (Submersverfahren unter Verwendung von Melassen) zur Herstellung von CS bietet kaum noch Spielräume zur Optimierung der Produktionstechnologie. Ein gewisses Maß an Umweltentlastung könnte durch die Verwendung von Substraten mit höherem Reinheitsgrad (Saccharose, Glucose, Stärkehydrolysate) erreicht werden, wie es im so genannten Lurgi-Verfahren (Lurgi AG, Frankfurt) gezeigt wurde (Aurich *et al.*, 2002b). Dadurch wird die Verwendung moderner Techniken zur Produktisolierung möglich, wodurch die Entstehung von Gips verhindert wird, dem Hauptabfallprodukt des konventionellen Verfahrens. Die eingesetzten Hochleistungsstämme von *A. niger* zur Herstellung von CS und anderer Produkte werden als gesundheitlich unbedenklich eingestuft („generally regarded as safe“ [GRAS], Food and Drug Administration, USA). Dennoch handelt es sich bei *A. niger* um eine potentiell pathogene Art. Bei 3-10 % der geprüften Stämme wurde die Produktion von Ochratoxin A nachgewiesen (Schuster *et al.*, 2002). In seltenen

Fällen treten beim gesunden Menschen allergische Reaktionen nach Kontakt mit Sporen auf, bei immunsuppressiven Menschen wird von Aspergillosen berichtet (Schuster *et al.*, 2002). Dagegen sind alle Stämme der Hefe *Y. lipolytica* apathogen und bilden keine Mycotoxine (Barth und Gaillardin, 1996, 1997). Weiterhin ist *Y. lipolytica* in Abhängigkeit vom verwendeten Stamm, im Gegensatz zu *A. niger*, nicht in Lage, bei Temperaturen oberhalb von 32-35 °C zu wachsen (Barth *et al.*, 2003).

### 1.2.3.3 Alternative Verfahren mit Hefen

Seit Mitte der 1960er Jahre ist bekannt, dass bestimmte Stämme der Hefegattungen *Candida* und *Yarrowia* große Mengen CS aus Kohlenwasserstoffen und anderen Substraten infolge einer Wachstumslimitation synthetisieren können (vgl. **Abb. 3.1**). Insbesondere die Hefe *Y. lipolytica* zeichnet sich durch eine hohe Vielfalt von zur CS-Produktion einsetzbaren Substraten aus. Neben Alkanen (C<sub>9</sub>-C<sub>20</sub>) können Pflanzenöle, tierische Fette, Stärkehydrolysate, Glucose, Ethanol und Glycerol durch die Hefe genutzt werden. Seit Ende der 1980er Jahre stehen auch saccharoseverwertende rekombinante Stämme von *Y. lipolytica* zur Verfügung, die normalerweise keine Saccharose als Substrat nutzen kann (Nicaud *et al.*, 1989). Bei Einsatz von Alkanen konnten mit *Yarrowia*-Stämmen bis 200 g/l CS mit im Vergleich zu *A. niger* doppelt so hohen Ausbeuten von 1,6-1,9 g/g in 5-7 Tagen Produktionszeit hergestellt werden. Der Produktionsprozess mit *Y. lipolytica* weist eine strikte Trennung zwischen Wachstums- und Produktionsphase auf, wobei letztere meist über eine Stickstoffauszehrung ausgelöst wird (Fukui und Tanaka, 1981; Stottmeister *et al.*, 1982; Stottmeister und Hoppe, 1991; Röhr *et al.*, 1996; Röhr, 1998; Demain, 2000; vgl. **Abb. 3.1**).

Die Vorteile eines Verfahrens zur Herstellung von CS unter Verwendung von Hefen, insbesondere *Y. lipolytica* liegen gegenüber dem *Aspergillus*-Verfahren vor allem in folgenden Aspekten (Stottmeister *et al.*, 2001; Fickers *et al.*, 2005a):

- geringe Anfälligkeit der Hefen gegenüber Sauerstoffunterversorgung,
- Apathogenität von *Y. lipolytica* (Barth und Gaillardin, 1997; Barth *et al.*, 2003),
- hohe Widerstandsfähigkeit der Hefezellen gegenüber mechanischen Scherkräften,

- einfaches Auslösen der Produktbildungsphase vor allem durch Stickstoffauszehrung,
- hohe Vielfalt der einsetzbaren Substrate, was die Verwendung des Substrates mit dem jeweils günstigsten Marktpreis erlaubt,
- hohe Zuckertoleranz,
- großer Toleranzbereich der Hefen in Bezug auf den pH-Wert (3,5-7,0) während der Prozessführung und erleichterte Isolierung und Anreicherung der CS unter Verwendung moderner Aufbereitungstechnologien wie der Elektrodialyse mit bipolaren Membranen (Novalic *et al.*, 1995; Novalic *et al.*, 1996; Moresi und Sappino, 2000).

Insbesondere die Möglichkeit der erleichterten Produktisolierung im Vergleich zur konventionellen Methode des *Aspergillus*-Verfahrens mit Melassen würde eine erhebliche Umweltentlastung bedeuten. Zusätzlich kann das während der Elektrodialyse erzeugte NaOH wieder zur pH-Regulierung des Bioprozesses eingesetzt werden.

Trotz des großen Potentials von Hefen für die Herstellung von CS aus Alkanen wurden die teilweise bis zur Produktionsreife entwickelten Verfahren in den 1970er Jahren, u.a. bedingt durch die Erdölkrisen sowie Diskussionen über die Unbedenklichkeit von aus Alkanen hergestellter CS (Wainwright, 1995), nicht weiterentwickelt. Hinzu kam der relativ hohe Anteil an ICS als Nebenprodukt (bis zu 50 % auf lipophilen C-Quellen) an der Gesamtsäurekonzentration, was jedoch durch die Gewinnung von Mutantenstämmen (ICS<10 %, vgl. **Tab. 1.1**) gelöst werden konnte. In einigen Arbeiten aus den 1970/80er Jahren wurde schon gezeigt, dass auch mit anderen lipophilen Substraten, inkl. Pflanzenöle, hohe Produktkonzentrationen (150 g/l) und Ausbeuten (1,5 g/g) erzielt werden konnten (Ikeno *et al.*, 1975; Good *et al.*, 1985; Nagato *et al.*, 1985).

Seit der EU-Agrarreform von 1992 ergaben sich neue Perspektiven für einen wirtschaftlichen Einsatz von Pflanzenölen zur CS-Produktion. Landwirte haben die Möglichkeit zum Anbau von nachwachsenden Rohstoffen (z.B. Raps) für die industrielle Verwendung auf stillgelegten Anbauflächen. Der Einsatz pflanzlicher Öle als unbedenkliches Substrat und nachwachsender Rohstoff zur CS-Gewinnung ließe sich sehr gut mit den Vorteilen eines biotechnologischen Produktionsprozesses mit Hefen verbinden. Gegenwärtig wird CS auf dem Weltmarkt in großen Mengen und sehr bil-

lig aus China angeboten, wobei die ökologischen Probleme dieser Produktion unberücksichtigt bleiben. Der Weltmarktpreis für CS von 800 €/t (BACAS, 2004) liegt im Bereich für potentielle Substrate (z.B. Rapsöl: 655 €/t, Sojaöl: 458 €/t, Stand Mai 2006, [www.ufop.de](http://www.ufop.de)), so dass die Einführung eines nachhaltigen, umweltschonenden CS-Produktionsverfahrens unter Verwendung von *Y. lipolytica* im industriellen Maßstab derzeit schwierig ist. In den USA wird CS teilweise mit Hefen auf der Basis von Stärkehydrolysaten produziert (Pfizer Inc., New York), die dort in großen Mengen bei der Herstellung von Glucosesirup anfallen (Stottmeister *et al.*, 2001). In jüngerer Zeit wurde ebenfalls in den USA ein Verfahren mit *Y. lipolytica* zur Gewinnung von CS aus Rapsöl eingeführt (Archer Daniels Midland Company, Decatur, Ill., USA; Barth *et al.*, 2003; Fickers *et al.*, 2005a).

### 1.3 Metabolische Besonderheiten der Citronensäureüberproduktion in Pilzen

#### 1.3.1 Veränderungen in der Pilzzelle bei der CS-Produktion

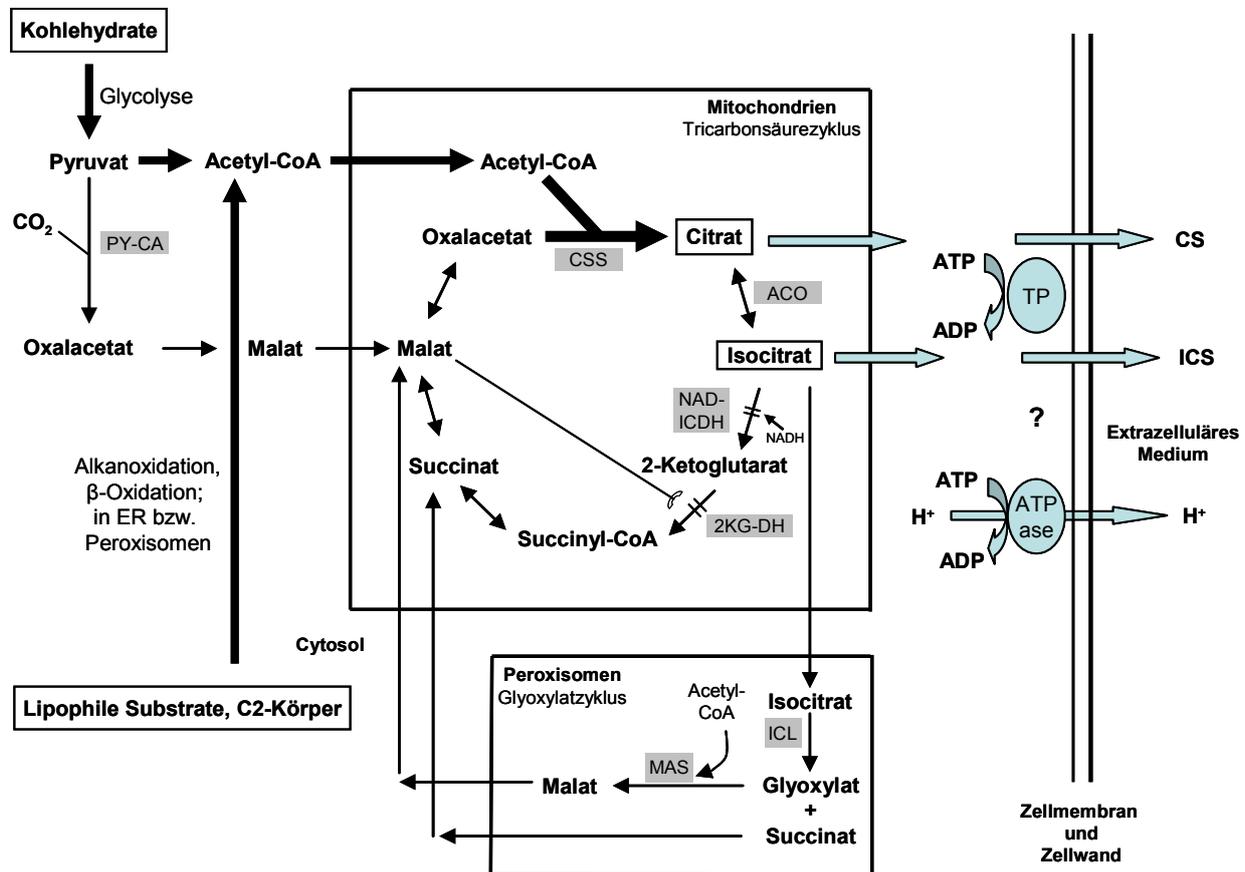
Die **Abb. 1.2** soll die ablaufenden Prozesse des Metabolismus bei der CS-Überproduktion in der Pilzzelle schematisch darstellen. Die biochemischen Abläufe bei der Überproduktion von CS in Pilzen sind gut untersucht. Die physiologische Bedeutung dieses Prozesses für die Pilzzelle kann gegenwärtig jedoch noch nicht einwandfrei beantwortet werden.

Man geht davon aus, dass der Überproduktion von CS in Hefen und *A. niger* die gleichen Prinzipien zu Grunde liegen (Stottmeister *et al.*, 1982; Stottmeister und Hoppe, 1991; Anastassiadis und Rehm, 2005). Drei grundlegende Besonderheiten der CS-produzierenden Zelle können unterschieden werden (**Abb. 1.2**):

- Oxalacetat-Nachlieferung über anaplerotische Sequenzen,
- Verzögerung des Durchsatzes durch den TCC,
- Hohe Citratsynthase Aktivität.

In beiden Organismen wird die CS-Synthese durch eine ausreichend hohe C-Quellenkonzentration bei einer gleichzeitigen Limitation des Wachstums mit verschiedenen Nährstoffkomponenten ausgelöst (*A. niger*: N, P,  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ; Hefen: N, P, S,  $Mg^{2+}$ ). Für Hefen wird die extrazelluläre N-Auszehrung als wichtigster Faktor zur Induktion der CS-Überproduktion diskutiert (Anastassiadis *et al.*, 2002; vgl. **Abb. 3.1**). In deren Folge kommt es zunächst zu einem Abfall des intrazellulären N-Gehaltes und anschließend zu einem Anstieg der intrazellulären  $NH_4^+$ -

Konzentration, was auf eine Störung des Protein- und Nukleinsäurestoffwechsels zurückgeführt wird. Ein Anstieg der intrazellulären  $\text{NH}_4^+$ -Konzentration wurde auch in *A. niger* beobachtet, wofür in erster Linie der  $\text{Mn}^{2+}$ -Mangel verantwortlich gemacht wurde (Röhr und Kubicek, 1981; Stottmeister und Hoppe, 1991).



**Abb. 1.2: Vereinfachtes Modell zur Darstellung des Metabolismus bei der CS-Überproduktion in der Pilzzelle.** Erläuterungen siehe Text. CSS – Citratsynthase, ACO – Aconitase, NAD-ICDH – NAD-abhängige Isocitratdehydrogenase, 2KG-DH – 2-Ketoglutaratdehydrogenase, ICL – Isocitratlyase, MAS – Malatsynthase, PY-CA – Pyruvatcarboxylase, ER – Endoplasmatisches Retikulum, TP – Transporter,  $\dashv$  Hemmung, ? – zum Teil unbekannte Vorgänge bei der Sekretion

Untersuchungen mit Glucose als C-Quelle zeigten, dass der hohe intrazelluläre  $\text{NH}_4^+$ -Gehalt die Aufhebung der inhibierenden Wirkung von CS auf die Phosphofruktokinase bewirkt, was einen ungesteuerten Flux durch die Glycolyse zur Folge hat (Synthese von ATP und NADH). Aufgrund der hohen Glycolyserate kommt es zur verstärkten Synthese von Oxalacetat über anaplerotische Sequenzen (Pyruvat-Carboxylase [PY-CA], Phosphoenol-Carboxykinase; **Abb. 1.2**). Das im Cytosol gebildete Oxalacetat inhibiert über Malat die 2-Ketoglutarat-Dehydrogenase (2KG-DH) und

stimuliert die Aktivität der Citratsynthase im TCC (Stottmeister und Hoppe, 1991). Man nimmt an, dass diese Prozesse und deren Regulationen in Hefen und *A. niger* prinzipiell gleich sind (Anastassiadis und Rehm, 2005). In Hefen übernimmt bei der Verwertung von lipophilen Substraten und C<sub>2</sub>-Verbindungen der Glyoxylatzyklus, anstelle der PY-CA, als anaplerotische Sequenz die Bereitstellung von Oxalacetat aus Acetyl-CoA (**Abb. 1.2, Abb. 1.3**). Aufgrund der Hemmung der 2KG-DH kommt es zu einer Erhöhung der Konzentration von 2-Ketoglutarat. Dadurch wird wiederum die NAD(P)-ICDH gehemmt. In der Summe kommt es zu einer starken Akkumulation von CS bis zu einem kritischen Niveau, dass zu einer Blockierung des TCC an dieser Stelle führt (Anastassiadis und Rehm, 2005). Zu einer weiteren Blockierung des TCC kommt es über die Hemmung der Succinat-Dehydrogenase, die ebenfalls durch Oxalacetat inhibiert wird. Morgunov *et al.* (2004) kamen nach ihren Untersuchungen zu dem Schluss, dass die Aktivität der NAD-ICDH vor allem über das NADH/NAD<sup>+</sup>-Verhältnis reguliert wird (hohe NADH-Konzentrationen aufgrund fehlender Biosynthesen wirken inhibierend). Dadurch hat dieses Enzym vermutlich einen großen Einfluss auf die CS-Überproduktion (vgl. **Abb. 1.2**).

Zwei Probleme ergeben sich aus den dargestellten Veränderungen in der Regulation des Metabolismus für die Zelle. Zum einen steigt die intrazelluläre CS-Konzentration auf ein kritisches Niveau, zum anderen kommt es zur Energieüberladung, weil aufgrund der Limitation des Wachstums keine Energie für Neusynthesen von Proteinen bzw. Nukleinsäuren abgefordert wird. Die Einleitung der Sekretion der CS ins extrazelluläre Medium kann als ein Vorgang verstanden werden, mit dem die Zelle diesen beiden Problemen begegnet. Il'chenko *et al.* (2002) diskutierten die CS-Überproduktion demzufolge als eine Art Stressantwort.

Neben der passiven Diffusion von CS und ICS, die für die Hefe *Candida guilliermondii* beschrieben wurde (Gutierrez und Maddox, 1993), sind mittlerweile auch aktive, d.h. Energie (in Form von ATP) verbrauchende Transportsysteme zur CS-Sekretion bekannt. Anastassiadis und Rehm (2005) beschrieben für die Hefe *Candida oleophila* einen pH-Wert abhängigen, ATP-verbrauchenden Transportmechanismus mit hoher Affinität für CS. Ein ähnlicher Mechanismus wurde auch für *A. niger* beschrieben (Karaffa und Kubicek, 2003).

Neben diesem Weg zum Verbrauch überschüssiger Energie wurde für *A. niger* das Vorhandensein einer alternativen Oxidase beschrieben, deren Aktivität in CS produzierenden Zellen im Vergleich zu den anderen Cytochrom-abhängigen, ATP-bilden-

den Enzymen der regulären Atmungskette erhöht war (Karaffa und Kubicek, 2003). Alternative Oxidasen können Reduktionsäquivalente (NAD[P]H<sub>2</sub>) regenerieren bzw. oxidieren, ohne dabei ATP zu bilden. Auch für Hefen wird eine alternative, nicht ATP generierende Oxidase beschrieben, allerdings ist deren Aktivität in CS produzierenden Hefezellen im Vergleich zu *A. niger* gering (Lozinov und Finogenova, 1982; Medentsev *et al.*, 2002; Akimenko *et al.*, 2003). Des Weiteren wurde in *A. niger* und Hefen auch eine ATP-abhängige Protonenpumpe beschrieben, die die Aufrechterhaltung des pH-Gradienten zwischen Cytosol (pH um 6,5) und extrazellulärem Medium (pH bis 2,0) unter Energieverbrauch ermöglicht. Dies könnte auch den bei der CS-Produktion mit *A. niger* erforderlichen sehr sauren pH-Wert erklären.

### 1.3.2 Produktmuster bei der Citronensäureproduktion mit *Y. lipolytica*

Unter den Bedingungen der Limitation des Wachstums durch Stickstoff bei gleichzeitigem Überangebot an Kohlenstoff sekretiert *Y. lipolytica* auf den meisten Substraten vorwiegend ein Gemisch aus CS und ICS. Das Auftreten anderer Säuren des TCC wurde bisher nicht beschrieben (Barth und Gaillardin, 1997). Durch den Einsatz der sehr sensitiven Ionenchromatographie zur Produktanalytik konnte jedoch in neueren Untersuchungen für die C-Quelle Glycerol das Auftreten der Säuren Malat, Pyruvat und 2-Ketoglutarat als zusätzliche Nebenprodukte in vergleichsweise geringen Konzentrationen nachgewiesen werden (vgl. 3.1.1.3).

Der Anteil von ICS am Gesamtsäureprodukt ist sehr stark abhängig von der Art des Substrates. Während auf Kohlehydraten und Glycerol in Wildtypstämmen etwa 10 % ICS gefunden wurden, betrug der Anteil auf lipophilen Substraten (Alkane, Fettsäuren, Triglyceride) durchschnittlich 50 %. Mit Ethanol als C-Quelle fanden Finogenova *et al.* (1986) einen ICS-Anteil von 77 % für den Wildtypstamm 704. Die Ursache für das unterschiedliche Produktmuster CS:ICS auf den verschiedenen C-Quellen wird derzeit noch nicht richtig verstanden. Mit Glucose als C-Quelle wird der sehr geringe Anteil an ausgeschiedener ICS mit der Spezifität bzw. hohen Affinität des vermuteten aktiven Transportmechanismus für CS erklärt (Anastassiadis und Rehm, 2005). Es gibt aber auch Untersuchungen, die nahe legten, dass die Wiederaufnahme der ins Medium sekretierten CS und ICS das Produktmuster entscheidend beeinflussen könnten. Tréton *et al.* (1978) zeigten, dass es mit Glucose oder Glycerol als C-Quelle erst dann zur Wiederaufnahme von CS und ICS kam, wenn beide Substrate verbraucht waren. Der intra- und extrazelluläre ICS-Gehalt waren vergleichbar und lag

bei etwa 10 %. Im Gegensatz dazu stellten sie für Alkan als C-Quelle fest, dass es trotz Vorhandensein einer hohen Substratkonzentration zur Wiederaufnahme von CS und ICS kam. Dabei erfolgte die Wiederaufnahme von ICS erst, wenn CS nahezu aus dem Medium verschwunden war. Der große Unterschied zwischen intrazellulärer (ca. 10 %) und extrazellulärer (ca. 33 %) ICS-Konzentration, der festgestellt wurde, wäre so erklärbar. Zum unterschiedlichen Wiederaufnahmeverhalten für CS und ICS boten die Autoren zwei Erklärungen an: 1) eine hypothetische Permease, die den Transport beider Säuren gewährleistet, wird kompetitiv durch CS gehemmt, so dass die Aufnahme von ICS blockiert wird; 2) es gibt unterschiedliche Transporter zur Aufnahme von CS und ICS, wobei CS als Repressor/Inhibitor für einen ICS-spezifischen Transporter wirkt.

Für die industrielle Anwendung ist die Reinheit des gewünschten Produktes von großer Bedeutung. Im Falle der CS-Produktion ist die Anwesenheit von ICS unerwünscht, da diese isomere Form der CS beispielsweise schlechtere komplexbildende Eigenschaften und Pufferkapazitäten besitzt (Tréton *et al.*, 1978; Good *et al.*, 1985). Außerdem stören ICS-Konzentrationen größer als 5 % den Auskristallisierungsprozess bei der Isolierung von CS. Des Weiteren besitzt sie aufgrund ihrer optischen Aktivität im Gegensatz zur CS biologisch wirksame Eigenschaften, die sie für einen unbedenklichen Einsatz in der Lebensmittelindustrie ungeeignet machen. Die derzeit zur biotechnologischen Gewinnung von CS eingesetzten Hochleistungsstämme von *A. niger* zeichnen sich bei optimaler Prozessführung durch eine sehr hohe Produktreinheit der sekretierten CS aus. Das Auftreten der Nebenprodukte Oxalsäure, Glucosäure und von Polyolen ist möglich und wird durch mehrere Faktoren wie dem pH-Wert, der Kultivierungstemperatur und der Substratkonzentration beeinflusst (Grewal und Kalra, 1995; Tsao *et al.*, 1999; Skiander *et al.*, 2002). Angaben zur Konzentration der auftretenden Nebenprodukte bei der CS-Produktion mit *A. niger* wurden in der Literatur nicht gefunden. Die unter idealen Prozessbedingungen erreichbare hohe Produktreinheit stellt einen großen Vorteil des *Aspergillus*-Verfahrens gegenüber einem biotechnologischen Gewinnungsprozess mit Hefen dar. Man hat festgestellt, dass in *A. niger* die Aktivität der Aconitase (katalysiert die Umsetzung von CS zu ICS) in der Produktionsphase im Vergleich zur Wachstumsphase sehr gering ist (Akiyama *et al.*, 1973a). Dies dürfte ein wesentlicher Grund für die ausgeprägte CS-Sekretion sein.

Verschiedene Bemühungen gingen deshalb dahin, den ICS-Anteil am Gesamtsäureprodukt bei der CS-Produktion mit Hefen zu reduzieren. In den letzten Jahrzehnten wurden vielfältige Untersuchungen vorgenommen, die zu einem besseren Verständnis der Ursachen für die Ausbildung des spezifischen Produktmusters CS:ICS in *Y. lipolytica* beitragen sollten. Dabei wurde sowohl nach Wegen gesucht, dass Produktmuster über die Kulturführung zu regulieren, als auch Mutanten oder rekombinante Stämme erzeugt und charakterisiert, die ein verändertes Produktmuster aufzeigten.

### 1.3.2.1 Beeinflussung des Produktmusters über die Kulturführung

Eine Möglichkeit zur Beeinflussung des Produktmusters CS:ICS ist durch die Gestaltung des Kultivierungsmediums gegeben. Hintergrund solcher Maßnahmen ist das Wissen über die Eigenschaften der bei der CS-Synthese beteiligten Enzyme.

Good *et al.* (1985) beschrieben für den *Y. lipolytica* Mutantenstamm NTG9 bei der Kultivierung auf Canolaöl (erucasäurereduziertes Rapsöl) die Reduktion des ICS-Anteils am Gesamtsäureprodukt (CS+ICS) von 26 % auf 20 %, wenn sie den Eisen Gehalt des Medium stark absenkten. Da Eisen als Co-Faktor für die Funktion des Enzyms Aconitase essentiell ist, wird deren Aktivität unter Eisenmangel entsprechend verringert. Die Umsetzung von CS zu ICS, durch die Aconitase katalysiert, wird so verlangsamt und führt zur Akkumulation von CS.

Ein weiteres Beispiel der Beeinflussung des Produktmusters über das Enzym Aconitase beschrieben Akiyama *et al.* (1973a). Durch den Zusatz von Monofluoracetat (MFA) konnte eine Absenkung des ICS-Anteils bei der Kultivierung des *Y. lipolytica* Wildtypstammes ATCC 20114 auf einem n-Paraffingemisch von 40 % auf 15 % beobachtet werden. MFA reagierte mit Citrat zu Monofluorcitrat und konnte dadurch nicht mehr von der Aconitase umgesetzt werden, was zur Akkumulation von Monofluorcitrat führte.

Finogenova *et al.* (1986) führten Untersuchungen mit zwei Mutantenstämmen von *Y. lipolytica* durch, die sich in ihrem Produktmuster deutlich vom Elternstamm unterschieden und auf die im nachfolgenden Kapitel noch näher eingegangen wird (**Abb. 1.3**). Die Mutante 2 zeigte phänotypisch einen im Vergleich zum Elternstamm deutlich erhöhten Anteil von ICS und zeichnete sich durch eine sehr geringe ICL-Aktivität aus. Der offensichtliche Einfluss der Aktivität der ICL auf das Produktmuster veranlasste die Autoren, Versuche mit dem Elternstamm 704 auf Hexadecan durchzuführen und dem Medium Itaconat zuzusetzen. Itaconat ist ein Inhibitor der ICL, der das Enzym unkompetitiv hemmt (McFadden und Purohit, 1977). Dabei konnte eine Erhöhung des ICS-Anteils von 53 auf 80 % ohne eine Beeinflussung der Gesamtsäurekonzentration beobachtet werden.

Venter *et al.* (2004) setzen dem Medium bei der Kultivierung des *Y. lipolytica* Stammes UOFS-1701 auf 30 g/l Sonnenblumenöl 10 g/l Acetat zu und beobachteten die Reduktion des ICS-Anteils von 37 auf rund 21 %. Eine Erklärung für diese Beobachtung wurde nicht gegeben.

### 1.3.2.2 Mutanten mit verändertem Produktmuster

Es gibt eine Vielzahl von Mutantenstämmen der Hefe *Y. lipolytica*, die sich durch ein gegenüber ihren Elternstämmen verändertes Produktmuster CS:ICS auszeichnen. Hier soll auf die wichtigsten Arbeiten zur dieser Thematik eingegangen werden (**Tab. 1.1, Abb. 1.3**).

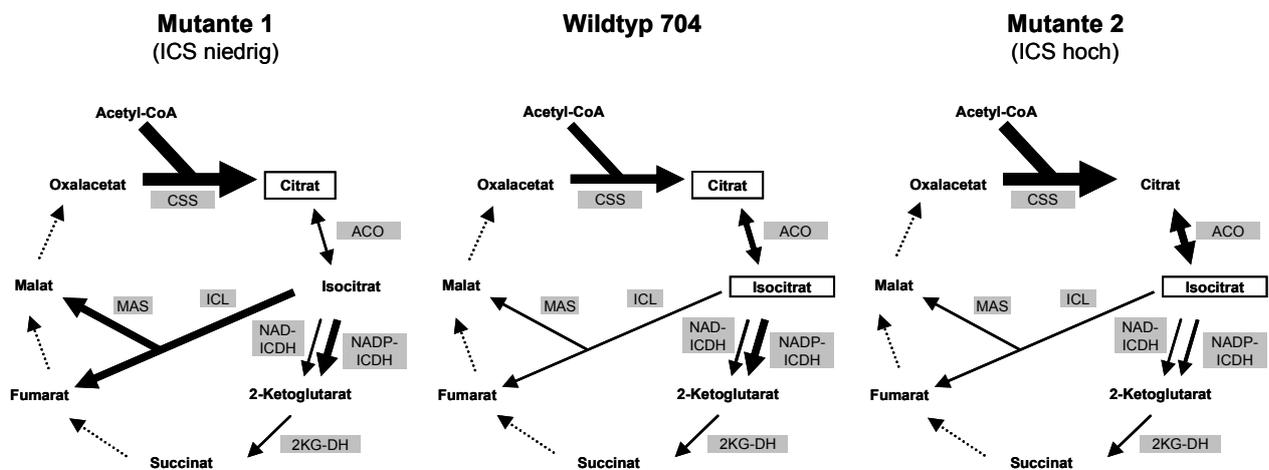
Im vorangegangenen Kapitel 1.3.2.1 wurden bereits die Untersuchungen von Akiyama *et al.* (1973a) zur Beeinflussung des Produktmusters durch Zusatz von MFA zum Kulturmedium erläutert. Da aufgrund seiner Toxizität die Anwendung von MFA für eine industrielle Anwendung nicht in Frage kam, wurde durch chemische Mutagenese (N-Methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin = MNNG) die Mutante K-20 aus dem Elternstamm ATCC-20114 hergestellt. Die Mutante K-20 wurde als CS-nichtverwertender Stamm mit moderater Sensitivität gegen MFA selektiert und zeigte bei der CS-Produktion mit einem n-Paraffingemisch einen deutlich reduzierten ICS-Anteil von 15 % im Gegensatz zum Elternstamm mit 40 %. Aus der Mutante K-20 wurde der stark MFA-sensitive Stamm S-22 selektiert. Dessen ICS-Anteil lag bei der Kultivierung mit n-Paraffin nur noch bei 3 % (**Tab. 1.1**). Im zweiten Teil dieser Arbeit (Akiyama *et al.*, 1973b) wurden beide Mutantenstämme näher charakterisiert. Beide Stämme wuchsen nicht mehr auf den Metaboliten des TCC, zeigten aber gutes Wachstum auf Glucose, Acetat und Hexadecan. Im Unterschied zur Mutante K-20 konnte die Mutante S-22 nicht auf Pyruvat wachsen. Die Mutante K-20 zeigte nur noch etwa 1/10 und S-22 nur noch etwa 1/100 der Aktivität der Aconitase des Elternstammes. Diese Ergebnisse demonstrierten den großen Einfluss der Aconitaseaktivität auf das Produktmuster CS:ICS.

Ermakova *et al.* (1986) und Finogenova *et al.* (1986) führten umfangreiche Untersuchungen zur Bestimmung von Enzymaktivitäten mit zwei Mutantenstämmen mit deutlich unterschiedlichem Produktmuster durch (**Tab. 1.1**). In der **Abb. 1.3** sind die Unterschiede in den Enzymaktivitäten des Elternstammes 704 und der beiden Mutantenstämme 1 und 2 schematisch dargestellt (Finogenova, 1991; Finogenova *et al.*, 2005). Die Mutante 1 zeichnete sich phänotypisch durch die überwiegende Sekretion von CS aus (ICS-Anteil auf Glucose 3 %, auf Hexadecan 5 % im Vergleich zu 16 % bzw. 57 % im Elternstamm 704). Die Mutante 2 zeigte dagegen eine erhöhte Sekretion von ICS (ICS-Anteil auf Glucose 36 % und auf Hexadecan 78 % im Vergleich zum Elternstamm 704).

**Tab. 1.1: Charakteristika von *Y. lipolytica* Mutantenstämmen mit verändertem Produktmuster CS:ICS.** Nähere Erläuterungen siehe Text. Sofern bekannt sind die Produktverhältnisse der Elternstämmen in Klammern aufgeführt. CS<sup>-</sup> - nicht Citrat verwertend, PY-CA<sup>-</sup> - keine Pyruvat-Carboxylaseaktivität, MFA<sup>-</sup> - MFA sensitiv, MFA<sup>-</sup> - stark MFA sensitiv, ACO - Aconitase, ICL – Isocitratlyase, Met<sup>-</sup> - Methionin auxotroph, Ura<sup>-</sup> - Uracil auxotroph, Suc<sup>+</sup> - Saccharose verwertend, n.b. – nicht bekannt, Ace<sup>-</sup> - Acetat nicht-verwertend, Ace<sup>+</sup> - Acetat verwertend, ↑ - hohe Aktivität bzw. ↓ - geringe Aktivität gegenüber Elternstamm.

Stamm	Charakterisierung/ Entstehung	Phänotyp	Substrat	CS:ICS	Referenz
NTG9	Nitrosoguanidin-Mutagenese	CS <sup>-</sup> PY-CA <sup>-</sup>	Canolaöl	74:26 (59:49)	Good <i>et al.</i> (1985)
K-20	Monoflouracetat-Mutagenese	CS <sup>-</sup> , Ace <sup>(-)</sup> , ACO↓	Alkangemisch	85:15 (60:40)	Akiyama <i>et al.</i> (1973a, b)
S-22	Selektante von K-20	CS <sup>-</sup> , Ace <sup>(-)</sup> , ACO↓	Alkangemisch	97:3 (60:40)	
Mutante 1	Mutagenese mit Nitrosomethylharnstoff	ICL↑, ACO↓	Glucose	97:3 (84:16)	Finogenova <i>et al.</i> (1986)
			Hexadecan	95:5 (43:57)	Ermakova <i>et al.</i> (1986)
			Glycerol	98,7:1,3 (97:13)	
			Acetat	93:7 (57:43)	
			Ethanol	90:10 (77:23)	
Mutante 2	Mutagenese mit Nitrosomethylharnstoff	ICL↓, ACO↑	Glucose	64:36 (84:16)	Finogenova <i>et al.</i> (1986)
			Hexadecan	22:78 (43:57)	Ermakova <i>et al.</i> (1986)
			Glycerol	68:32 (87:13)	
			Acetat	50:50 (57:43)	
H181 (DSM 7806)	Nicht beschrieben	n.b.	Glucose	98:2 (83:17)	Behrens <i>et al.</i> (1986); Stottmeister und Hoppe (1991); Aurich <i>et al.</i> (2002a, 2003, 2005a)
			Alkan Pflanzenöl	95:5 (50:50)	
A1-1	Mutagenese mit N-Methyl-N'-Nitro-Nitroso-Guanidin	Met <sup>-</sup>	Sonnenblumenöl	95:5 (65:35)	Barth, unver- öffentlicht; Mauersberger <i>et al.</i> (2002); Aurich <i>et al.</i> (2005)
A-101-1.31	UV-Acetat Mutante	Ace <sup>-</sup>	Invertierte Melasse	93:7	Zarowska <i>et al.</i> (2001); Robak <i>et al.</i> (2002a); Robak <i>et al.</i> (1994)
A-101-1.22	Revertante einer UV-Acetat Mutante	Ace <sup>+</sup>	Invertierte Melasse	90 :10	
W29ura3- 302	Transformation mit pINA302 (Nicaud <i>et al.</i> , 1989)	Suc <sup>+</sup> , Ura <sup>-</sup>	Nicht-invertierte Melasse	95:5	Zarowska <i>et al.</i> (2001); Robak <i>et al.</i> (2002b)
A-101-1.31 + W29ura3- 302	Stammgemisch		Nicht-invertierte Melasse	98 :2	Zarowska <i>et al.</i> (2001); Robak <i>et al.</i> (1994)
A-101-1.22 + W29ura3- 302	Stammgemisch		Nicht-invertierte Melasse	98:2	Zarowska <i>et al.</i> (2001)

In beiden Mutantenstämmen zeigte die Citratsynthase (CSS) auf den untersuchten C-Quellen Glucose und Hexadecan die höchste Aktivität, während die NAD-ICDH von allen TCC-Enzymen die geringste Aktivität aufwies (**Abb. 1.3**). Im Vergleich zum Elternstamm 704 war die CSS-Aktivität in den beiden Mutanten leicht erhöht. Alkanzellen zeigten im Vergleich zu Glucosezellen jeweils höhere Aktivitäten der CSS und Aconitase (ACO), was mit der Notwendigkeit der Bereitstellung von ICS für den Glyoxylatzyklus begründet wurde. Die Aktivitäten der NAD(P)-ICDH waren dagegen auf Hexadecan geringer als auf Glucose.



**Abb. 1.3:** Darstellung der Unterschiede in den Enzymaktivitäten des Tricarbonsäurezyklus und des Glyoxylatzyklus zwischen dem von Finogenova *et al.* (1986) untersuchten *Y. lipolytica* Wildtypstamm 704 und den daraus abgeleiteten Mutanten 1 (verstärkte CS-Sekretion) und 2 (verstärkte ICS-Sekretion). Die Stärke der Pfeile symbolisiert die Höhe der jeweiligen Enzymaktivität. Die gestrichelten Pfeile stehen für nicht bestimmte Enzymaktivitäten. CSS – Citrat-Synthase, ACO – Aconitase, ICDH – Isocitratdehydrogenase, 2KG-DH – 2-Ketoglutaratdehydrogenase, ICL – Isocitratlyase, MAS – Malat-Synthase.

Deutliche Unterschiede zwischen den drei Stämmen wurden in den Aktivitäten der Enzyme PY-CA und ICL festgestellt. Beide Enzyme sind Teil der anaplerotischen Stoffwechselwege zur Bereitstellung von Oxalacetat, wobei die Bereitstellung aus Glucose hauptsächlich über die PY-CA erfolgt (vgl. **Abb. 1.2**), während auf lipophilen Substraten bzw. C2-Körpern der Glyoxylatzyklus (ICL als Schlüsselenzym) diese Funktion übernimmt. Auf Glucose wurde für den Elternstamm und die Mutante 2 (sekretiert viel ICS) eine deutlich höhere Aktivität der PY-CA gegenüber der ICL, deren Expression auf Glucose reprimiert wird, festgestellt. Die Mutante 1 (sekretiert viel CS) zeigte dagegen auf Glucose eine hohe ICL-Aktivität, was ein Hinweis auf eine fehlende Glucose-Repression der ICL in diesem Stamm war. Auf Hexadecan

wurde ein starker Anstieg der ICL-Aktivität im Elternstamm und der Mutante 1 bestimmt, während die Aktivität der PY-CA hier deutlich geringer war. In der Mutante 2 wurde auf Hexadecan eine geringe PY-CA und ICL Aktivität festgestellt, was die Vermutung eines zusätzlichen anaplerotischen Stoffwechselwegs zur Bereitstellung von Oxalacetat in dieser Mutante nahe legte.

Für den Elternstamm und die Mutante 1 konnte eine starke Abnahme der Aktivität der ACO auf Glucose bestimmt werden, insbesondere bei Übergang von der Wachstums- in die Produktionsphase. In der Mutante 2 war dagegen nur eine leichte Abnahme der ACO-Aktivität zu beobachten. Auch auf Hexadecan wurde eine geringe ACO-Aktivität in der Mutante 1 (sekretiert viel CS) festgestellt, während gleichzeitig die Aktivitäten der Enzyme NADP-ICDH sowie ICL und MAS (Enzyme des Glyoxylatzyklus) hoch waren (vgl. **Abb. 1.3**). Im Gegensatz dazu wurde in der Mutante 2 (sekretiert viel ICS) eine sehr hohe ACO-Aktivität bei gleichzeitig geringer Aktivität der Enzyme NAD(P)-ICDH und sehr geringer Aktivität der ICL festgestellt. Finogenova *et al.* (1986, 2005) kamen zu dem Schluss, dass das Produktmuster CS:ICS wesentlich vom Verhältnis der Aktivitäten der Enzyme CSS, ACO, ICL und NAD(P)-ICDH abhängt.

Zarowska *et al.* (2001) beschrieben die Produktion von CS mit *Y. lipolytica* Stämmen auf invertierter bzw. nicht-invertierter Melasse (**Tab. 1.1**). Die in ihrer Entstehung nicht näher beschriebene Mutante A-101-1.31 (Acetat-nichtverwertend) zeigte auf invertierter Melasse einen ICS-Anteil von 7 % während die aus dieser Mutante entstandene Revertante A-101-1.22 (Acetat-verwertend) einen ICS-Anteil von 10 % aufwies. Der ebenfalls in dieser Arbeit beschriebene rekombinante, Saccharose verwertende Stamm W29ura3-302 (Expression des für die Invertase codierenden *SUC2* Gens aus *S. cerevisiae* unter Kontrolle des *pXPR2* aus *Y. lipolytica*, vgl. Nicaud *et al.*, 1989) zeigte auf nicht-invertierter Melasse einen ICS-Anteil von 5 %. Bei der Verwendung einer Kombination der Stämme W29ura3-302 mit A-101-1.22 bzw. W29ura3-302 mit A-101-1.31 verringerte sich der ICS-Anteil überraschenderweise auf 1,5-2 % mit nicht-invertierter Melasse als Substrat. Eine Erklärung, warum es bei der Verwendung der Stammgemische zur Verringerung des ICS-Anteils kam, wurde von den Autoren nicht angegeben.

Als weitere Beispiele für *Y. lipolytica* Stämme mit verändertem Produktmuster sollen die Mutantenstämme H181 und A1-1 erwähnt werden (**Tab. 1.1**). Der von Behrens *et al.* (1986) erstmals beschriebene und von Stottmeister und Hoppe (1991) aufgeführte

Stamm H181 (Mutante ohne Angaben zur Entstehung), zeigte einen deutlich reduzierten ICS-Anteil auf Glucose (2 % im Vergleich zu 17 % des Vergleichstammes EH59) und Alkan (5 % im Vergleich zu 50 % in EH59). Molekularbiologisch unterscheidet er sich von Wildtypisolaten wie H222 (Deutschland), W29 (Frankreich) und H194 (USA) durch das Vorhandensein des LTR-Retrotransposons Ylt1 (Senam, 2004; Aurich *et al.*, 2005b). Der durch UV-Mutagenese aus dem Wildtypstamm A1 entstandene Methionin-auxotrophe Stamm A1-1 (Barth, unveröffentlicht) zeichnete sich ebenfalls durch einen sehr geringen ICS-Anteil von 5 % auf dem Substrat Sonnenblumenöl aus (Kruse *et al.*, 2004; Aurich *et al.*, 2005a).

#### 1.4 Die Isocitratlyase und der Glyoxylatzyklus

In Pflanzen und vielen Mikroorganismen dient Acetyl-CoA sowohl als Energielieferant als auch als Ausgangsverbindung für die Herstellung von Metaboliten, die zur Kohlehydrat- und Aminosäurebiosynthese benötigt werden. Die Umsetzung von Acetyl-CoA erfolgt im TCC (vgl. **Abb. 1.2**, **Abb. 1.3**), dessen Aufgabe nicht nur im oxidativen Abbau von Kohlehydraten, Fettsäuren und Aminosäuren besteht. Er bildet auch die erste Stufe vieler Biosynthesewege, in dem die in ihm vorkommenden Intermediate als Vorstufen dieser Synthesen dienen. Bestimmte Zwischenprodukte, besonders 2-Ketoglutarat, Succinat und Oxalacetat, werden dem Zyklus entzogen und dienen als Aminosäure-Vorstufe.

Der TCC kann neben den Enzymreaktionen, die zur Oxidation von Acetyl-CoA zu CO<sub>2</sub> und der Bildung von NADH führen, auch in einer spezialisierten Form ablaufen, dem Glyoxylatzyklus (GZ) (**Abb. 1.2**, **Abb. 1.3**). Er stellt einen anaplerotischen Stoffwechselweg dar (Ergänzung des Angebotes an Intermediärprodukten des TCC). Der GZ ermöglicht Pflanzen und Mikroorganismen, Kohlehydrate aus Fetten, Alkanen und C<sub>2</sub>-Körpern (Ethanol oder Acetat) aufzubauen (Gluconeogenese) und diese Substrate als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen. Ein Teil des GZ (MAS, ICL) ist in einem speziellen Kompartiment, den Peroxisomen (in Pflanzen Glyoxisomen), der andere Teil in den Mitochondrien lokalisiert (Tanaka und Fukui, 1981, 1989). Im GZ, der in tierischen Zellen nur in bestimmten Geweben vorkommt (Fettabbau), kondensiert Acetyl-CoA mit Oxalacetat zu Citrat und weiter zu Isocitrat. Dessen weitere Umsetzung erfolgt durch das Enzym ICL, wobei Succinat und Glyoxylat entstehen. Das Glyoxylat kondensiert dann durch Einwirken der MAS mit einem weiteren Acetyl-CoA zu Malat, das weiter zu Oxalacetat dehydriert wird (**Abb.**

**1.2, Abb. 1.3).** Bei jedem Durchlauf treten zwei Moleküle Acetyl-CoA in den GZ ein und es wird ein Molekül Succinat gebildet, das biosynthetischen Zwecken dienen kann (z.B. als Succinyl-CoA zur Synthese von Porphyrinen). Succinat kann über Fumarat und Malat zu Oxalacetat umgesetzt werden, das über die Umkehrung der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Reaktion zu Phosphoenolpyruvat umgewandelt werden kann, einer Vorstufe für die Biosynthese von Glucose. Der Austausch von Intermediaten des teilweise in den Peroxisomen und teilweise in den Mitochondrien lokalisierten GZ erfolgt über spezielle Shuttle-Systeme (Acylcarnitin-Shuttle) über das Cytosol (Ueda *et al.*, 1982; Ueda *et al.*, 1983; Tanaka und Fukui, 1989). Der unter bestimmten Bedingungen stattfindende Glyoxylatzyklus bedingt nicht den Stopp des Tricarbonsäurezyklus. Die Reaktionen beider Zyklen finden gleichzeitig statt.

Die ICL (EC 4.1.3.1) ist neben der MAS eines der Schlüsselenzyme des GZ und wird vom *ICL1* Gen codiert. Das u.a. in *S. cerevisiae* und *Y. lipolytica* nachgewiesene *ICL2* Gen codiert dagegen für die 2-Methylisocitratlyase, die im Methylcitratzyklus die Umsetzung von 2-Methylcitrat zu Pyruvat und Succinat katalysiert (Luttik *et al.*, 2000; Barth *et al.*, 2003; Fickers *et al.*, 2005a). Der Methylcitratzyklus wird zur Verwertung von Propionat benötigt und wurde zuerst in *Y. lipolytica* beschrieben (Uchiyama *et al.*, 1982; Miyakoshi *et al.*, 1987). Die Expression der ICL wird durch die Anwesenheit von Glucose und anderer Hexosen stark verringert (Katabolit-Repression). Verschiedene Aminosäuren und Intermediate des TCC (z.B. Oxalacetat) wirken hemmend auf die Aktivität der ICL (Hönes, 1983). Des Weiteren kann die ICL-Aktivität spezifisch durch Itaconsäure gehemmt werden (Hönes, 1984; Finogenova *et al.*, 1986). Hohe ICL-Aktivitäten werden auf den C-Quellen Ethanol, Acetat, Alkan und Fettsäuren gefunden (Induktion der *ICL1*-Expression), weil auf diesen Substraten aufgrund der erforderlichen Gluconeogenese verstärkt Oxalacetat aus dem TCC abgezogen wird, so dass es dessen zusätzlicher Nachlieferung bedarf. Die Induktion des *ICL1* Gens erfolgt wahrscheinlich über Acetyl-CoA (Kujau *et al.*, 1992; Barth und Scheuber, 1993). Die höchste Aktivität der ICL wird in der lag- bzw. frühen log-Phase des Wachstums von Hefen auf den induzierenden C-Quellen gefunden (Prinz, 1995; Juretzek, 1999; Juretzek *et al.*, 2000a; Juretzek *et al.*, 2000b; Juretzek *et al.*, 2001). In dieser Phase herrscht ein hoher Bedarf an Grundbausteinen des anabolen Stoffwechsels, die dem TCC ständig entzogen werden, so dass eine verstärkte Nachlieferung notwendig ist, die über den GZ sichergestellt wird (Hönes, 1983).

## 1.5 Lipasen

Lipasen (Triacylglycerol-Acyl-Hydrolasen, EC 3.1.1.3) stellen eine Enzymgruppe dar, welche die Hydrolyse von Triglyceriden an der Fett-Wasser-Grenzschicht katalysieren. Sie sind physiologisch sehr bedeutend für die Hydrolyse von Ölen und Fetten zu freien Fettsäuren und Acylglycerolen und ermöglichen so die Verwertung lipophiler Substrate. Es besteht auch ein großes Interesse seitens der Industrie für diese Enzymgruppe. Einsatzgebiete sind unter anderem medizinisch-therapeutische Bereiche (Ersatz für pankreatische Lipasen), die Abwasserbehandlung, die Lebensmittelindustrie (Entwicklung von Aromastoffen) oder als Zusätze in Detergenzien (Fickers *et al.*, 2003). Für die Hefe *Y. lipolytica* wurden in den vergangenen Jahren umfangreiche Untersuchungen zu dieser Enzymgruppe durchgeführt (Destain *et al.*, 1997; Pignede *et al.*, 2000a, b; Dominguez *et al.*, 2003; Fickers *et al.*, 2003, 2004, 2005a, b, d).

Derzeit sind in *Y. lipolytica* 20 Gene (*LIP* Gene) bekannt, die für Lipasen codieren (Fickers *et al.*, 2005a). Dabei werden nach ihrer Substratspezifität zwei Typen von Lipasen unterschieden, solche mit Triacylglycerol-Lipaseaktivität (Typ A, 16 Gene, Präferenz für die Spaltung der Esterbindungen am Di- und Triglycerid) und solche mit Carboxylesterase-Aktivität (Typ B, 4 Gene, Spaltung der Esterbindung am Mono-, Di- und Triglycerid mit gleicher Präferenz). Das bisher am besten charakterisierte Lipasegen ist das *LIP2* Gen (Pignede *et al.*, 2000a, b). Es galt bis vor kurzem als das einzige für eine extrazelluläre Lipase codierende Gen (Pignede *et al.*, 2000a; Fickers *et al.*, 2004). Erst kürzlich wurden die Gene *LIP7* und *LIP8* als für extrazelluläre Lipasen codierende Gene beschrieben (Fickers *et al.*, 2005c). Das *LIP2* Gen codiert für ein 334 Aminosäure großes Precursor-Protein, das eine aus einer Wiederholung von vier Dipeptiden (X-Ala, X-Pro) bestehenden Signalsequenz mit einer sich anschließenden pro-Region aus 12 Aminosäuren enthält (Pignede *et al.*, 2000a; Fickers *et al.*, 2005a). Das ins Medium sekretierte reife Polypeptid (Lip2p) besitzt eine Größe von 301 Aminosäuren, ist glycosyliert und etwa 38,5 kDa schwer. Die extrazelluläre Lipaseexpression wird stimuliert durch langkettige Fettsäuren, Triacylglycerole und organische N-Quellen wie Pepton und Harnstoff, dagegen wirken Glucose, Glycerol und anorganische N-Quellen reprimierend (Fickers *et al.*, 2003). Fickers *et al.* (2004) zeigten für einen rekombinanten *Y. lipolytica* Stamm, bei dem das *LIP2* Gen unter der Kontrolle des durch Fettsäuren stark induzierbaren *POX2* Promotors exprimiert wurde, eine Erhöhung der *LIP2*-Induktion mit Zunahme der Ölsäurekonzentration, konnten aber gleichzeitig keine direkte Korrelation zwischen *LIP2* Expression und

Lipaseaktivität feststellen. Diese Beobachtung wurde von den Autoren dahin gehend gedeutet, dass die Lipaseproduktion auf der Ebene der Sekretion reguliert wird. Fickers *et al.* (2004) berichteten weiter für den von ihnen eingesetzten rekombinanten Stamm von einer biphasischen Kinetik der Lipaseproduktion mit Ölsäure als Substrat. In der frühen Kultivierungsphase, wo Ölsäure im Medium vorliegt, lag die Lipase zellwandgebunden vor. Mit abnehmender Ölsäurekonzentration wurde die Freisetzung der Lipase ins Medium beobachtet. Kürzlich wurde das *HXK1* (Hexokinase) als an der Glucose-Katabolit-Repression des *LIP2* Gens involviertes Gen identifiziert (Fickers *et al.*, 2005d). Untersuchungsergebnisse deuten an, dass die Katabolit-Repression des *LIP2* Gens durch Glucose und Glycerol auf jeweils separaten Wegen erfolgt (Fickers *et al.*, 2003).

## 1.6 Zielstellung

Die in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen sind Bestandteil des Vorhabens, ein alternatives Verfahren zur biotechnologischen Gewinnung von Citronensäure mit der Hefe *Y. lipolytica* aus nachwachsenden Rohstoffen für die industrielle Anwendung zu etablieren.

Dazu wurden drei Themenschwerpunkte bearbeitet:

1. Untersuchungen zur Beeinflussung des Produktmusters von Citronen- und Isocitronensäure bei der Citratproduktion aus verschiedenen Substraten mit der Hefe *Y. lipolytica*.

Das Hauptanliegen dieser Arbeiten lag in der Verschiebung des Produktmusters zu Gunsten der Citronensäure. Zu diesem Zweck sollte das für das Enzym Isocitratlyase codierende homologe Gen *ICL1* über einen Gen-Dosis-Effekt in der Hefe *Y. lipolytica* überexprimiert werden.

Ferner sollten durch eine nähere Charakterisierung vorliegender *icl1*-Mutantensämme von *Y. lipolytica* Möglichkeiten zur Verschiebung des Produktmusters in Richtung Isocitronensäure geprüft werden.

2. Herstellung von Citronensäure aus dem Substrat Saccharose unter Verwendung rekombinanter saccharoseverwertender *Y. lipolytica* Stämme.

Zunächst sollte die generelle Möglichkeit der Verwendung von Saccharose als Substrat zur Gewinnung von Citronensäure mit vorhandenen rekombinanten *Y. lipolytica* Stämmen geprüft werden. Bei Eignung von Saccharose als Substrat für die CS-Produktion sollten Strategien zur Optimierung der Prozessführung mit dem Ziel der Steigerung der Produktivität ermittelt und umgesetzt werden.

3. Prüfung von Möglichkeiten zur Steigerung der Produktivität bei der Gewinnung von Citronensäure aus Pflanzenölen mit *Y. lipolytica* durch die Verbesserung der Triglyceridverwertung über eine erhöhte extrazelluläre Lipaseaktivität.

Zu diesem Zweck sollten einerseits vorhandene, auf den Phänotyp einer erhöhten extrazellulären Lipaseaktivität ( $Lip^{++}$ ) hin selektierten Insertionsmutantensämme näher charakterisiert werden. Zum anderen sollte das für eine extrazelluläre Lipase codierende Gen *LIP2* in *Y. lipolytica* in erhöhter Kopiezahl integriert und überexprimiert werden, um über einen Gen-Dosis-Effekt die extrazelluläre Lipaseaktivität zu erhöhen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte

Spektrophotometer:	Uvikon 943, Kontron Instruments Ultraspec 2000, Pharmacia Biotech
Semidry-Elektroblotter:	ThePanther™, HEP-1, PeqLab
Waagen:	KERN 770, Sartorius MC1, Sartorius BP310P
pH-Messgeräte:	pH526 und pH537, WTW
Elektrophorese-Systeme:	EASY-CAST™ B1A, Owl Scientific Inc. Maxigel Gelelektrophoresesystem, Biometra
Stromversorgungsgeräte:	Power Pack P25, Biometra Power Supply EPS 3500, Pharmacia Biotech
Autoklaven und Sterilisatoren:	Hochdruckdampfsterilisator KSG 112 Varioklav Dampfsterilisator, H+P Heißluftsterilisator Modell 500, Memmert
Brutschränke und Schüttler:	BE500, Memmert Kühlbrutschrank BK600, Heraeus HT Novotron® AK82, Infors GmbH, Einsbach HT Multitron®, Infors GmbH, Einsbach
Zentrifugen:	Sepatech Biofuge 15R (Rotor HFA 5.50), Heraeus Biofuge Fresco, Heraeus RC 5C (Rotor SS-34), Sorvall
Andere Geräte:	Kippschüttler Duomax 1030, Heidolph DNA Speed Vac®, Savant UV-Transilluminator TEX-35M (312 nm) mit Software Biophotonics GelPrint 2000, MWG-Biotech (Gel-Dokumentationssystem) Blockthermostat BT100, Kleinfeld Labortechnik Sicherheitswerkbank HS9, Heraeus Heizrührer IKAMAG® RH, IKA Labortechnik Vortexer REAX 2000, Heidolph Hybridisierungsöfen OV5, Biometra Vakuumpumpe KNF, Laboport

## 2.2 Chemikalien und Reagenzien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Biochemikalien sind kommerziell erhältlich (Reinheitsgrad p.A., wenn nicht anders angegeben).

### 2.2.1 Feinchemikalien

1 kb DNA-Leiter	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Merck, Darmstadt
Benchmark™ Protein-Ladder (prestained)	Invitrogen/Gibco, Karlsruhe
BSA	Roth, Karlsruhe
Citronensäure-Monohydrat	Applichem, Darmstadt
Coomassie® Brillantblau G250	Ferak Berlin, Berlin
Cystein-HCl	Merck, Darmstadt
D,L-Na-Isocitrat	Sigma, München
3'3-Dimethoxybenzidine = o-Dianisidin-HCl	Sigma, München
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Folin-Ciocalteu-Reagenz	Merck, Darmstadt
Glucose-Teststreifen	Kallies Feinchemie AG, Sebnitz
Glutamat	Reanal, Budapest
Malat	Roth, Karlsruhe
n-Hexan	Roth, Karlsruhe
NADH	Roche, Mannheim
2-Ketoglutar säure	Merck, Darmstadt
Universal pH Indikatorpapier	Kallies Feinchemie AG
pH Indikatorstreifen pH 0 – 6 Acilit®	Merck, Darmstadt
p-Nitrophenylbutyrat	Sigma, München
Phenylhydrazin-HCl	Merck, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylflourid (PMSF)	Fluka, München
Pyruvat	Serva, Heidelberg
TEMED	Serva, Heidelberg
Triethanolamin	Sigma, München
Tween 20	Merck, Darmstadt
Tween 80	Roth, Karlsruhe

### 2.2.2 Kitsysteme

ECL <sup>Plus</sup> Western Blotting Detection Systems	Amersham Biosciences
Gene Images <sup>TM</sup> Random Prime DNA Labelling Kit	Amersham Biosciences
Gene Images <sup>TM</sup> CDP-Star <sup>TM</sup> Detection Kit	Amersham Biosciences
JETQUICK Gel Extraction Spin Kit	Genomed
JETSORB Gel Extraction Kit	Genomed
JETQUICK Plasmid Miniprep Spin Kit	Genomed
JETSTAR Plasmid Midiprep Kit	Genomed
Citronensäure, 10 139 076 035	r-Biopharm
D-Isocitronensäure, 10 414 433 035	r-Biopharm
Glycerol, 10 148 270 035	r-Biopharm
Saccharose/Glucose/Fructose, 10 716 260 035	r-Biopharm

r-Biopharm, Darmstadt; Genomed, Bad Oeynhausen; Amersham Biosciences (jetzt Healthcare LifeSciences), Freiburg

### 2.2.3 Enzyme

Glucoseoxidase (20 kU, 2 208 121)	Roche, Mannheim
Glutamat-Dehydrogenase (from beef liver, 3 kU, 197 734)	Roche, Mannheim
Lactat-Dehydrogenase (from rabbit muscle, L-2518)	Sigma, München
Peroxidase (from horse radish, 10 kU, K31587116 320)	Merck, Darmstadt
Restriktionsenzyme	Fermentas, St. Leon-Rot
RNase A	USB, Ohio, USA

### 2.2.4 Antikörper

Rabbit Anti-Icl1p (Prof. R. Rachubinski, Edmonton, Kanada)	1:1000
Donkey Anti-Rabbit Ig-HRP (Amersham Biosciences)	1:5000

### 2.2.5 C-Quellen

▪ D-Glucose, Ph. Eur (SL 20 oder 50 %, autoklaviert)	Applichem, Darmstadt
▪ Glycerol, p.a. (SL 50 %, autoklaviert)	Roth, Karlsruhe
▪ Hexadecan, >98 % (SL >98 %, autoklaviert)	Fluka, München
▪ Saccharose, Ph. Eur (SL 50 %, sterilfiltriert)	Roth, Karlsruhe
▪ Tributyrin, L-28050 (SL 20 %, autoklaviert)	Serva, Heidelberg

- Sonnenblumenöl für Bioreaktorversuche, (SL 100 %, pasteurisiert 3 h, 80°C)
- Sonnenblumenöl für Schüttelkolbenversuche, (SL 100 %, autoklaviert)
- Olivenöl, (SL 100 %, autoklaviert)

Ölmühle Weise's Erben  
 09627 Oberbobritzsch  
 Lippina, Meylip,  
 32045 Herford  
 Natives Olivenöl Extra,  
 MammaGina, Netto

### 2.3 Mikroorganismen

Die verwendeten Stämme von *Y. lipolytica* und *E. coli* sind Bestandteile der Stammsammlung des Institutes für Mikrobiologie der TU Dresden (**Tab. 2.1**, **Tab. 2.2**). Die Lagerung erfolgte für *Y. lipolytica* als Stammkonserve in YPD oder Minimalmedium M bzw. für *E. coli* mit Lbamp mit 25-30 % Glycerol bei -70 bis -80 °C.

**Tab. 2.1: Überblick über die verwendeten *E. coli* Stämme.**

Stamm	Genotyp und Bemerkungen	Referenzen
DH5 $\alpha$ c	<i>supE44 Δlac U169 (ϕ 80 lacZ ΔM15) hsdR17 recA1end A1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Gibco-BRL
DH5 $\alpha$ c/p64ICL1	rDNA <i>ura3d4 pICL1-ICL1-ICL1t amp<sup>R</sup></i>	Juretzek und Mauersberger, 1998 (unveröffentlicht); Kruse <i>et al.</i> (2004)
DH5 $\alpha$ c/p65ICL1	rDNA <i>ura3d1 pICL1-ICL1-ICL1t amp<sup>R</sup></i>	Juretzek und Mauersberger, 1998 (unveröffentlicht); Kruse <i>et al.</i> (2004)
DH5 $\alpha$ c/p66ICL1	LTR-zeta <i>ura3d1 pICL1-ICL1-ICL1t amp<sup>R</sup></i>	Juretzek und Mauersberger, 1998 (unveröffentlicht); Kruse <i>et al.</i> (2004)
DH5 $\alpha$ c/p67ICL1	LTR-zeta <i>ura3d4 pICL1-ICL1-ICL1t amp<sup>R</sup></i>	Juretzek und Mauersberger, 1998 (unveröffentlicht); Kruse <i>et al.</i> (2004)
DH5 $\alpha$ c/JMP6	LTR-zeta <i>ura3d4 pPOX2-LIP2 kan<sup>R</sup></i>	Pignede <i>et al.</i> (2000a, b), erhalten von Dr. J.-M. Nicaud (INRA, Paris-Grignon)
DH5 $\alpha$ c/pINA443	<i>ARS68/CEN URA3 amp<sup>R</sup></i>	Barth und Gaillardin (1996)

**Tab. 2.2: Überblick über die verwendeten *Yarrowia lipolytica* Stämme.**

Abkürzungen: mc – multicopy, lw – low copy.

Stamm	Genotyp und Bemerkungen	Referenzen
H222 (= H222 2z2b)	<i>MATA</i> Wildtypstamm	Barth und Weber (1982, 1983)
H181 (= DSM 7806)	Selektierter Mutantenstamm zur Produktion von CS mit günstigem CS:ICS Produktmuster	Behrens <i>et al.</i> (1986) Stottmeister und Hoppe, 1991
E129	<i>MATA leu2-270 lys11-23 ura3-302 (SUC2) xpr2-322</i>	Barth und Gaillardin (1996); Madzak <i>et al.</i> (2000)
E129L1	<i>MATA LEU2 lys11-23 ura3-302 (SUC2) xpr2-322</i> ( <i>LEU2</i> mit pINA62 komplementiert)	Juretzek und Mauersberger, 1998 (unveröffentl.), Förster (2001)
PO1d	<i>MATA leu2-270 ura3-302 xpr2-322</i>	Barth und Gaillardin (1996) Madzak <i>et al.</i> (2004)
PO1e	<i>MATA leu2-270 ura3-302 ::URA3 xpr2-322</i>	Barth und Gaillardin (1996) Madzak <i>et al.</i> (2000)
PO1dL	<i>MATA LEU2 ura3-302 xpr2-322</i> ( <i>LEU2</i> mit pINA62 komplementiert)	Juretzek und Mauersberger, 1998 (unveröffentl.); Förster (2001)
PO1dNull/pINA237 (= PO1d $\Delta$ ICL1)	<i>MATA leu2-270 ura3-302 xpr2-322 icl1 :URA3</i> <i>ICL1</i> Gen deletiert, mit pINA237 transformiert	Juretzek (1999)
H222-S4	<i>MATA ura3-302 (SUC2)</i> Aus dem Stamm H222-41 ( <i>ura3-41</i> ) erzeugte integrative Transformande mit dem 4,3 kb <i>Sall</i> Fragment ( <i>URA3'</i> -pXPR2-ScSUC2- <i>URA3''</i> ) aus pINA302	Mauersberger <i>et al.</i> (2001)
H222-41(JMP5)	<i>MATA</i> , integrative Transformanden des Stammes H222-41 ( <i>ura3-41</i> ) mit der Insertionsmutagenese-kassette MTC ( <i>zeta'</i> - <i>ura3d1</i> - <i>zeta''</i> ) aus dem Plasmid JMP5 mit unterschiedlichen Phänotypen: - Transformanden N123, N137, N235A, N256 (Lip <sup>++</sup> ), - Transformande N156 ( <i>idp2</i> defekt), - Transformande Z123 ( <i>icl1</i> defekt)	Mauersberger <i>et al.</i> (2001); Thevenieu <i>et al.</i> (2006); Mauersberger <i>et al.</i> (2004); Aurich <i>et al.</i> (2005a)
H222-S4(p64ICL1) (= DSM 15105)	<i>MATA ura3-302 (SUC2)</i> , <i>ura3d4</i> mc (prototroph); Integrative <i>ICL1</i> multicopy Transformanden T1–Tn von H222-S4 mit dem Plasmid p64ICL1 (rDNA)	Kruse <i>et al.</i> (2004); Diese Arbeit
H222-S4(p65ICL1)	<i>MATA ura3-302 (SUC2)</i> , <i>ura3d1</i> lc (prototroph); Integrative <i>ICL1</i> low copy Transformanden T1–Tn von H222-S4 mit dem Plasmid p65ICL1 (rDNA)	Kruse <i>et al.</i> (2004); Diese Arbeit
H222-S4(p66ICL1)	<i>MATA ura3-302 (SUC2)</i> , <i>ura3d1</i> lc (prototroph); Integrative <i>ICL1</i> low copy Transformanden T1–Tn von H222-S4 mit dem Plasmid p66ICL1 (LTR <i>zeta</i> )	Kruse <i>et al.</i> (2004); Diese Arbeit
H222-S4(p67ICL1)	<i>MATA ura3-302 (SUC2)</i> , <i>ura3d4</i> mc (prototroph); Integrative <i>ICL1</i> multicopy Transformanden T1–Tn von H222-S4 mit dem Plasmid p67ICL1 (LTR <i>zeta</i> )	Kruse <i>et al.</i> (2004); Diese Arbeit
H222-S4(JMP6)	<i>MATA (SUC2)</i> , integrative <i>LIP2</i> multicopy Transformanden T1–Tn von H222-S4 mit dem Plasmid JMP6 zur Lipase-Überexpression	Diese Arbeit; Aurich <i>et al.</i> (2005)

## 2.4 Kultivierung

### 2.4.1 Kultivierung von *Y. lipolytica*

Die Hefestämme wurden bei 28°C in YPD-Medium (Vollmedium) angezüchtet oder im Minimalmedium M mit den entsprechenden C-Quellen und Supplementen submers in Erlenmeyerkolben oder emers auf Agar-Platten kultiviert. In Submerskultur wurden die Ansätze bei 220 rpm in 500 ml Erlenmeyerkolben (bei Kultivierung mit Ölen oder n-Alkanen mit Schikanen) mit 100 bzw. 200 ml Medium geschüttelt. Als Vorkultur (VK) wurde sowohl YPD als auch Minimalmedium mit Glucose (MG, 2-3% G) benutzt. Es wurden zwischen 20 und 100 ml VK in einem 200 oder 500 ml Erlenmeyerkolben mit einer YPD- oder MG-Plattenkultur gestartet und zwischen 24 und 72 h bei 28°C und 220 rpm geschüttelt. Die auf eine OD<sub>600</sub> von ca. 15-25 angewachsenen Hefekulturen wurden durch Zentrifugation (3000 g, 5 min) geerntet, mit Minimalmedium M gewaschen und resuspendiert (ca. 10 ml) und die OD<sub>600</sub> dieser Zellsuspension bestimmt. Mit Aliquoten dieser Zellsuspension wurden 100 ml Hauptkultur (Minimalmedium Mg oder Mp) mit der entsprechenden C-Quelle und den entsprechenden Supplementen auf eine OD<sub>600</sub> = 1-2 angeimpft. Während des Wachstums der Kultur auf dem ammoniumhaltigen Minimalmedium fällt der pH von anfänglich 5,0-5,5 deutlich bis auf Werte um pH 1,5-2,0 ab. Die Kontrolle des pH-Wertes erfolgte mit UNITEST pH-Papier. Das Nachstellen des pH-Wertes auf 5,0-5,5 erfolgte mit 2,5 N oder 10 N NaOH (autosteril) und die gegebenenfalls notwendige Gegenregulation mit 1 M HCl. Der Gesamtverbrauch an NaOH und die OD<sub>600</sub> dienten als Parameter für die Zunahme der Biomasse. Zusätzlich wurde teilweise die Biotrockenmasse (BTM) bestimmt (vgl. 2.4.4).

Zur Herstellung von Agar-Platten zur Emerskultivierung wurde den Medien 2-2,5 % Agar-Agar zugesetzt.

### 2.4.2 Kultivierungsmedien

Alle verwendeten Medien wurden vor Benutzung 20 min bei 121°C autoklaviert bzw. einzelne Komponenten wurden steril filtriert.

### 2.4.2.1 Vollmedium

YPD (Barth und Gaillardin, 1996):

Hefeextrakt	1 % (w/v)
Pepton	2 % (w/v)
Glucose	2 % (w/v)

pH eingestellt auf pH 5,5 mit HCl

YM – Medium (verwendet als Vorkulturmedium für Bioreaktorversuche):

Hefeextrakt	3 % (w/v)
Malzextrakt	3 % (w/v)
Glucose	1 % (w/v)

pH 6,2 ± 0,2

### 2.4.2.2 Minimalmedien

**(A)** Minimalmedium (M) für Versuche zum Wachstum (Mg) und zur Produktion (Mp) von CS im Schüttelkolben nach Mauersberger *et al.* (2003). Die Angaben entsprechen der Endkonzentration im Medium:

1. Mineralsalze nach Reader (g/l):	3,0	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
modifiziert (Mauersberger <i>et al.</i> , 1996)	1,0	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
(10x SL, steril filtriert)	0,16	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3 H <sub>2</sub> O
	0,70	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
	0,50	NaCl
	0,40	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O

In Wachstumsversuchen betrug die Konzentration an (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 g/l (Mg). Zur Produktion von CS betrug die Konzentration an (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 g/l (Mp).

2. Spurensalze (µg/l):	500	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
(1000x SL, steril filtriert)	40	CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O
	100	KI
	400	MnSO <sub>4</sub> x 4 H <sub>2</sub> O
	200	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
	400	ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
	6000	FeCl <sub>3</sub> x 6 H <sub>2</sub> O
		(FeCl <sub>3</sub> extra zugesetzt, SL 3 g/100 ml Ethanol)

3. Vitamine:	300 µg/l	Thiamin-HCl (1000x SL, steril filtriert)
--------------	----------	--

4. Supplemente: 60 mg/l L-Leucin  
(100 x SL, autoklaviert) 20 mg/l Uracil  
0,1-5,0 g/l Proteose-Pepton \*  
50 mM Kaliumphosphatpuffer (KKP) pH 6,8 \*  
0,01 % Glutamat (SL 1 %) \*\*

\* Zusatz: nur bei Verwendung von Saccharose als C-Quelle

\*\* Zusatz: nur beim Stamm H222-41(JMP5) N156

5. C-Quellen: 0,4-10 % (w/v) D-Glucose  
10 % (v/v) Glycerol  
5 % (v/v) Hexadecan  
2-10 % (w/v) Saccharose  
4 % Fructose (w/v)  
2-5 % Sonnenblumen- oder Olivenöl (v/v)  
2 % Tributyrin (v/v)

6. pH-Wert des Mediums: 5,0-5,5

**(B)** Minimalmedium nach Behrens *et al.* (1978) für Versuche zur CS-Produktion im Bioreaktor. Die Angaben entsprechen den Endkonzentrationen:

1. Mineralsalze (g/l): 1,5 NH<sub>4</sub>Cl  
0,7 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
0,35 MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O  
0,0035 FeSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O  
0,030 CaCl<sub>2</sub>

2. Spurensalze (mg/l): 20 CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O  
20 MnSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O  
10,5 ZnCl<sub>2</sub>  
2,5 CoSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O  
28,5 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

3. Vitamine: 1 mg/l Thiamin-HCl

4. Supplemente: 0,4 g/l Proteose-Pepton  
(nur bei Verwendung von Saccharose als C-Quelle)

5. C-Quelle: 160 g/l Saccharose (SL 50 %, steril filtriert),  
70 g/l Sonnenblumenöl (SL 100 %, pasteurisiert bei 80 °C)

6. pH-Wert des Mediums: Bei der Verwendung von Saccharose als C-Quelle betrug der pH-Wert von Kultivierungsbeginn bis zur Stickstoffauszehrung 6,8. Danach wurde er entweder bei diesem Wert

statiert oder auf die Werte von 5,0 oder 6,0 abgesenkt und statiert. Das Absenken des pH-Wertes erfolgte allmählich durch die Stoffwechselaktivität der Hefezellen.

Die Messung des pH-Wertes erfolgte über eine Elektrode (Mettler Toledo, Schweiz, Greifensee). Zur Regulation wurde 30%ige NaOH verwendet.

Zur Verhinderung einer übermäßigen Schaumbildung im Bioreaktor war der Einsatz eines Antischaummittels notwendig (Silicone antifoam reagent, Fluka).

#### 2.4.3 Kultivierung von *E. coli*

LB-Medium (Sambrook *et al.*, 1989):

1 % (w/v)	Bacto-Pepton
0,5 % (w/v)	Hefeextrakt
1 % (w/v)	NaCl

Zur Kultivierung plasmidhaltiger und Antibiotika-resistenter *E. coli*-Stämme wurde dem LB-Medium jeweils Ampicillin (SL 100 mg/ml, Endkonzentration 100 µg/ml, LBamp) oder Kanamycin (SL 10 mg/ml, Endkonzentration 40 µg/ml, LBkan) zugegeben.

#### 2.4.4 Bestimmung der Biotrockenmasse und der optischen Dichte

Die Bestimmung der optischen Dichte als Maß für die Biomasse erfolgte bei einer Wellenlänge von 600 nm in 1,5 ml Plastik-Einwegküvetten (Schichtdicke 1 cm). Bei Proben mit hydrophoben Substraten (Sonnenblumenöl, Hexadecan) war das Waschen der Zellen erforderlich. Dazu wurden zu 0,5 ml Probe in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß 50 µl 10 % Tween80 gegeben und für 5 min stark geschüttelt (Vortexer). Anschließend wurde scharf abzentrifugiert (13000 rpm, 5 min) und der Überstand mit einer Vakuumpumpe vollständig entfernt. Das Zellpellet wurde in 0,5 ml Leitungswasser + 50 µl 10 % Tween80 resuspendiert. Nach Wiederholung des Schüttelns und Abzentrifugierens wurde das Pellet in 1x Mineralsalzen nach Reader (vgl. 2.4.2.2) resuspendiert und konnte zum Messen der optischen Dichte verwendet werden.

Die Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM) größerer Kulturproben (10-20 ml), die bei den Bioreaktorversuchen am UFZ in Leipzig angefallen waren, erfolgte gravimetrisch nach Vakuumfiltration (Sartorius, Deutschland, Göttingen), waschen mit dH<sub>2</sub>O und anschließender Trocknung des Filterkuchens in einem elektronischen Feuchtigkeitsmesser (Sartorius, Deutschland, Göttingen) bei 105 °C. Die Membranfilter (0,2 µm

Porengröße, Schleicher, Deutschland) wurden vor der Trocknung mehrfach mit dH<sub>2</sub>O gespült.

Zur Bestimmung der BTM aus Schüttelkolbenversuchen wurden 2 ml Kultur in 2 ml Eppendorfgefäßen abzentrifugiert (5 min, 13000 rpm), der Überstand verworfen und das Zellpellet mit 1 ml dH<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet ca. 5 h bis zur Massenkonstanz getrocknet (Speed Vac, Savant, maximale Temperatur) und dann dessen Masse gravimetrisch bestimmt.

#### 2.4.5 Kultivierung im Bioreaktor

Die in dieser Arbeit dargestellten Bioreaktorversuche wurden am UFZ Leipzig-Halle mit freundlicher Unterstützung von Dr. Andreas Aurich durchgeführt. Zum Einsatz kam ein 2,0 l Rührkesselreaktor (Biostat MD, Braun Biotech International, Melsungen) mit folgender Ausstattung:

Material Reaktorgefäß:	Glas
Rührer:	3x 4-Blattscheibenrührer, Drehzahl 200-2000 rpm
Arbeitsvolumen:	1,2 l
Belüftung:	Begasungsrohr mit Einblasring, 0-1,6 l/min Luftbegasungsrate
Zusatzbelüftung:	0-0,16 l/min Sauerstoff
Messinstrumente:	pO <sub>2</sub> - und pH-Elektrode (Mettler-Toledo), Temperatur
Reaktorgewicht:	elektronische Waage
Regelung:	DCU und Software MFCS win 2.0 (Braun Biotech)
Vorlagebehälter:	Lauge, Säure, Substrat
Probennahme:	steril über 3 Wegehahn und Spritze

### 2.5 Biochemische Untersuchungsmethoden

#### 2.5.1 Bestimmung der Aktivität der Invertase (Suc2p)

Die Bestimmung der Invertaseaktivität erfolgte auf der Grundlage der Methode nach Goldstein und Lampen (1975). Der Test basiert auf dem Nachweis der durch die Invertaseaktivität aus Saccharose entstehenden Glucose. Dazu wurden in Abhängigkeit von der Zelldichte 0,5-2 ml Kulturflüssigkeit aus der Kultur genommen. Es wurde sowohl die Enzymaktivität in der Kulturflüssigkeit (Zellen + Kulturüberstand), als auch die der Zellen und des zellfreien Kulturüberstandes bestimmt. Zur Bestimmung der Aktivität der Zellen wurde die Kulturflüssigkeit in 2 ml Eppendorfgefäßen für 3 min bei 4000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der erhaltene zellfreie Kulturüberstand

wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Das Zellpellet wurde in 1x Mineralsalzen nach Reader (Schüttelkolbenversuche) oder 1x Mineralsalzen nach Behrens et al. (1978) (Bioreaktorversuche) resuspendiert (vgl. 2.4.2.2). Die Lagerung der separierten Proben bis zur Messung erfolgte auf Eis.

Für den Messansatz wurden 50 µl 0,2 M Na-Acetat-Puffer (pH 4,9) in 2 ml Eppendorfgefäße vorgelegt und anschließend 25 µl Probe zugegeben, vermischt und anschließend für 2 min bei 30 °C im Thermoblock inkubiert. Zur Bestimmung des Reagenzienleerwertes (RLW) wurde statt 25 µl Probe dH<sub>2</sub>O zugegeben. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 50 µl 0,5 M Saccharose zum Messansatz, der nach Vermischen für 10 min bei 30 °C im Thermoblock inkubiert wurde. Danach wurde der Ansatz durch die Zugabe von 100 µl 0,5 M KKP pH 6,8 und anschließender Inkubation für 3 min bei 100 °C im Thermoblock gestoppt. Zur Vermeidung einer Überbestimmung der Invertaseaktivität durch den Eintrag von Glucose durch die benutzten Proben wurde für jede Probe ein Leerwert (LW) mitbestimmt, der durch das sofortige Abstoppen der Reaktion ohne 10minütige Inkubation nach Zugabe der Saccharose erhalten wurde. Dieser Leerwert wurde bei der Berechnung vom Messwert (MW) abgezogen. Nach dem Erhitzen des Messansatzes auf 100 °C erfolgte seine Abkühlung durch eine 1minütige Inkubation auf Eis. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 0,5 ml Lösung C und nach Durchmischung eine weitere Inkubation für 20 min bei 30 °C. Nach der Inkubation wurde den Ansätzen 1 ml 6 N HCl zugesetzt und es erfolgte die Bestimmung der Extinktion bei 540 nm in 1,5 ml Plastik-Einwegküvetten.

Lösung A: 4,2 mg Glucoseoxidase

0,5 mg Peroxidase

in 5 ml 0,1 M KKP (pH 6,8)

Lösung B: 60 mg o-Dianisidin-HCl in 10 ml dH<sub>2</sub>O

(lagerbar bei -20°C)

Lösung C: 5 ml Lösung A + 2,5 ml Lösung B + 42,5 ml 45 % Glycerol  
(bis zu 1 Monat lagerbar, lichtgeschützt, -20 °C)

Die Berechnung erfolgte auf der Grundlage des Lambert-Beerschen Gesetzes nach

der Formel: 
$$\Delta c = \frac{V \cdot \Delta E}{v \cdot \varepsilon \cdot d}$$

$\Delta c$  Enzymaktivität (µmol/min = 1 U)

$\Delta E$  Extinktionsdifferenz ( $E_{MW} - E_{LW}$ ) -  $E_{RLW}$  (min<sup>-1</sup>)

$\epsilon$	Extinktionskoeffizient für o-Dianisidin bei 540 nm = $14 \cdot 10^{-6} \mu\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$
d	Schichtdicke der Küvette = 1 cm
V	Testvolumen (ml)
v	Probevolumen (ml)

### 2.5.2 Bestimmung der Aktivität der Isocitratlyase (Icl1p)

Die Bestimmung der Isocitratlyaseaktivität erfolgte im zellfreien Extrakt  $S_3$ . Dazu wurden in Abhängigkeit von der Zelldichte 5-20 ml Kulturflüssigkeit in 50 ml Zentrifugenröhrchen (konisch) durch Zentrifugation bei 4 °C und 4000 rpm geerntet, der Überstand gründlich entfernt und das Pellet mit 1 ml eiskaltem Aufschlusspuffer gewaschen und dann darin resuspendiert. Zum Zellaufschluss wurden die Proben in Reagenzgläser überführt und so viele Glasperlen ( $\varnothing$  0,25-0,5 mm, Braun oder Roth, hitzesterilisiert) zugegeben, dass sie bis ca. 2 mm unter den Meniskus der Probe reichten. Der mechanische Aufschluss erfolgte durch kräftiges Schütteln (Vortexer) für 3 x 1 min (Proben dazwischen 1-2 min auf Eis gelagert). Nach Abnahme des Homogenats erfolgte eine Zentrifugation zum Abtrennen von Zelltrümmern für 5 min bei 3000 g und 4 °C, wodurch der zellfreie Extrakt ( $S_3$ ) gewonnen wurde.

Aufschlusspuffer:     100 mM   Tris-HCl, pH 7,0  
                           5 mM     MgCl<sub>2</sub>  
                           0,25 mM  PMSF

Zur Aktivitätsbestimmung wurde ein modifizierter spektroskopischer Test nach Dixon und Kornberg (1959) verwendet. Die Reagenzien wurden, wie in **Tab. 2.3** dargestellt, nacheinander in eine 1,5 ml Plastik-Einwegküvette pipettiert und dann 5 min bei Raumtemperatur (22-25 °C) vorinkubiert (Vermeidung eines verzögerten Reaktionsstarts). Anschließend erfolgte die Zugabe der Probe ( $S_3$ ), der Messansatz wurde durch Abdeckeln und mehrmaliges Drehen der Küvette gemischt und anschließend bei einer Wellenlänge von 324 nm (direkte Registrierung am Photometer UVIKON 943) über 1-3 min gemessen. Bei sehr hohen Enzymaktivitäten wurde eine 10fache Verdünnung der Proben mit Aufschlusspuffer vorgenommen. Die Berechnung erfolgte durch Auswertung der aufgenommenen Reaktionskinetik (Bestimmung des Anstiegs bzw. der Extinktionsänderung pro min) und dem Lambert-Beerschen Gesetz ( $\epsilon$  von Phenylhydrazin-HCl bei 324 nm =  $17 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

**Tab. 2.3: Messansatz zur Bestimmung der Isocitratlyaseaktivität.**

Komponente	SL [mM]	Endkonzentration [mM]	Volumen [ml]
Tris-HCl, pH 7.0	100	53,3	0,8
MgCl <sub>2</sub>	50	5	0,15
Cystein-HCl	20	2	0,15
D,L-Na-Isocitrat	16,7	1,67	0,15
Phenylhydrazin-HCl	33	3,3	0,15
Probe im Aufschlusspuffer			0,1
			Gesamt: 1,5

### 2.5.3 Bestimmung der Gesamtlipaseaktivität

Die Bestimmung erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 400 nm über einen Zeitraum von 1-10 min mit ganzen Zellen in 1,5 ml Plastik-Einwegküvetten (Schichtdicke 1 cm) und basiert auf der Methode von Morin *et al.* (2003).

Es wurde sowohl die Enzymaktivität in der Kulturflüssigkeit (Zellen + Kulturüberstand), als auch die der Zellen und des zellfreien Kulturüberstandes bestimmt. Zur Bestimmung der Aktivität der Zellen wurden in Abhängigkeit von der Zelldichte 1-2 ml Kulturflüssigkeit in 2 ml Eppendorfgefäßen für 3 min bei 13000 rpm bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Der erhaltene weitgehend zellfreie Kulturüberstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Das Zellpellet wurde in 1x Mineralsalzen nach Reader resuspendiert. Die Lagerung der Proben über längere Zeit (1-4 h) erfolgte auf Eis. Vor jeder Messung wurde die entsprechende Probe für mindestens 10-15 min bei 25 °C (Thermoblock) vorinkubiert.

Die Messung selbst erfolgte bei Raumtemperatur. Erforderliche Verdünnungen der Proben bei sehr hohen Enzymaktivitäten erfolgten mit 1x Mineralsalzen (pH 5,0-5,5) nach Reader. Für den Messansatz wurden zu 1,2 ml gepufferte Substratlösung 10-200 µl Probe zugegeben, mit einer Pipette gemischt und der Messansatz vor der Messung in der Küvette nochmals 1 min vorinkubiert. Die Berechnung erfolgte analog zur ICL-Aktivität, wobei  $\epsilon = 10100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  ( $\epsilon$  für p-Nitrophenol bei 400 nm) betrug. Zur Kontrolle der Substratlösung wurde dH<sub>2</sub>O anstelle von Probe zugegeben.

Gepufferte Substratlösung (50 ml): 48 ml 0,05 M KKP, pH 7,4  
(frisch hergestellt) 2 ml 100 % Aceton  
3,6 µl p-Nitrophenylbutyrat

#### 2.5.4 Phänotypische Charakterisierung der extrazellulären Lipaseaktivität von *Y. lipolytica* im Plattentest

Zur Charakterisierung der extrazellulären Lipaseaktivität verschiedener Stämme von *Y. lipolytica* wurde ein Plattentest im Tropfplattenverfahren durchgeführt. Dazu wurde ein von Mauersberger *et al.* (2001) beschriebener Test dahingehend modifiziert, dass die Agarkonzentration von 2 auf 0,8 % reduziert wurde (Verbesserung der Diffusion der Enzyme in den Agar) und dem Medium 50 mM KKP pH 6,8 oder 7,4 (Bereich des pH-Optimums der Lipasen) zugesetzt wurde. Die Medienzusammensetzung der Agarplatten entsprach der des oben beschriebenen Minimalmediums Mg. Die Konzentration der getesteten C-Quellen (Tributyryn, Sonnenblumenöl, Olivenöl) betrug 1 % (SL: 20 % in 1 % Tween 80 emulgiert mit Ultraschall). Aufgetropft wurden 5 µl zellfreier Kulturüberstand oder  $1 \cdot 10^6$  Zellen (resuspendiert in 5 µl 1x Mineralsalzen).

#### 2.5.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Auftrennung und dem Nachweis spezifischer Proteine wurde die SDS-PAGE nach Laemmli (1970) durchgeführt. In eine saubere Gelküvette wurde ein 8%iges Trenn- und ein 5%iges Sammelgel gegossen (**Tab. 2.4**). Die aufzutragenden Probenmengen wurden abhängig von der gemessenen Proteinkonzentration bestimmt, die verwendete Konzentration im Gel betrug 30 µg pro Geltasche. Nach Zusatz von 1/3 Volumen an 4fach konzentriertem Probenpuffer erfolgte die Inkubation der Proben für 5 min bei 95 °C. Anschließend wurden die Proben auf Eis gestellt und vor dem Auftragen kurz zentrifugiert (13000 rpm, 30 s). Nach dem Auffüllen der Elektrophoreseapparatur mit Elektrodenpuffer und dem Auftragen der Proben sowie des Markers, erfolgte die elektrophoretische Auftrennung (Trennbedingungen: Sammelgel 15-20 mA, Trenngel 20-25 mA) für ca. 2 h. Danach wurde das Gel unter ständigem Bewegen für 20 min gefärbt. Im Anschluss erfolgte die Entfärbung des Gels ü.N., wobei nach ca. 2 h die Entfärbelösung gewechselt wurde. Am darauf folgenden Tag wurde das Gel nochmals für ca. 2 h in frischer Entfärbelösung inkubiert.

**Tab. 2.4: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für die SDS-PAGE.**

	8 % Trenngel (10 ml)	5 % Sammelgel (5 ml)
	Volumen in ml	
dH <sub>2</sub> O	4,6	3,0
Acrylamidlösung	2,7	0,65
Trenngelpuffer	2,5	-
Sammelgelpuffer	-	1,25
SDS	0,1	0,05
APS	0,05	0,05
TEMED	0,005	0,01

Acrylamidlösung:	29,2 % (w/v) Acrylamid 0,8 % (w/v) Bisacrylamid
Trenngelpuffer:	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
APS-Lösung:	10 % (w/v) Ammoniumperoxydisulfat
SDS-Lösung:	10 % (w/v) Natriumdodecylsulfat
TEMED:	unverdünnt (N,N,N,N-Tetramethyl-ethylendiamin)
Elektrodenpuffer:	0,25 M Tris, pH 8,3 1,92 M Glycin 1 % SDS
Probenpuffer (4fach konzentriert):	0,25 M Tris-HCl, pH 6,8 8 % (w/v) SDS 20 % (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol 40 % (v/v) Glycerol 0,008 % (w/v) Bromphenolblau
Marker:	BenchMark™ Prestained Protein Ladder (GIBCO BRL®)
Färbelösung:	42 % (v/v) Methanol 17 % (v/v) Essigsäure 0,1 % (w/v) Serva Blau G-250
Entfärbelösung:	5 % (v/v) Essigsäure 5 % (v/v) Methanol

### 2.5.6 Western-Hybridisierung

Die mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennten Proteine wurden im Semi-Dry-Elektroblot-Verfahren auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P, Ø 0,45 µm, Millipore) übertragen. Zur Vorbereitung wurde das Gel für 10-15 min in Transferpuffer gelegt. Die stark hydrophobe PVDF-Membran wurde für etwa 1 min in Methanol inkubiert, anschließend mit dH<sub>2</sub>O befeuchtet und mit 6 Lagen Filterpapier ebenfalls für 10-15 min in Transferpuffer gelegt.

Für den Blotaufbau wurden auf die untere Elektrode (+) 3 Lagen Filterpapier gelegt, darüber die PVDF-Membran, darüber das Gel und darüber nochmals 3 Lagen Filterpapier. Nach Aufsetzen der oberen Elektrode (-) wurde über einen Zeitraum von ungefähr 80 min das Blotten bei einer konstanten Stromstärke von 0,8 mA/cm<sup>2</sup> Gelfläche durchgeführt. Der erfolgreiche Transfer der Proteine vom Gel auf die PVDF-Membran wurde durch die 5minütige Inkubation der Membran in einer 2%igen Ponceau S-Lösung kontrolliert, wobei die Proteine nach Abwaschen der restlichen Färbelösung rot erscheinen.

Um unspezifische Bindungsstellen der Membran zu unterdrücken, die bei der Detektion spezifischer Proteine mittels Antikörpern störend sind, wurde diese ü.N. bei 4 °C mit einer Blocklösung inkubiert. Nach dem Waschen mit TBS-T (1x kurz, 1x 10 min) erfolgte unter Schütteln die 90minütige Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper. Anschließend wurde 3x 15 min mit TBS-T gewaschen und die Membran weitere 30 min mit dem sekundären Antikörper unter Schütteln inkubiert. Im Anschluss erfolgte wiederum ein Waschschrift mit TBS-T (3x 15 min).

Die Detektion erfolgte mit dem kommerziell erhältlichen Kitsystem „ECL<sup>Plus</sup> Western Blotting Detection reagents“. Es wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren. Zur Entwicklung des Röntgenfilms wurde dieser sehr kurz (ca. 20 s) belichtet, anschließend in Entwicklerlösung gebracht bis erste Banden sichtbar waren (1-3 min), dann kurz mit Wasser gespült und anschließend in Fixierlösung getaucht. Am Schluss wurde der Film nochmals für längere Zeit mit Wasser gespült.

Transferpuffer:                    0,025 M Tris  
    0,192 M Glycin  
    10-20 % (v/v) Methanol  
    0,01 % SDS

---

Waschpuffer (TBS-T):	0,02 M Tris-HCl, pH 7,5 0,137 M NaCl 0,1 % Tween 20
Blocklösung:	5 % Magermilchpulver in 1x TBS-T
Primärer Antikörper:	Anti-Icl1p, 1:1000 in Blocklösung
Sekundärer Antikörper:	Anti-Rabbit Ig-HRP, 1:5000 in Blocklösung
10x Ponceau S: (Blotfärbelösung)	1 g Ponceau S 15 g Trichloressigsäure 15 g Sulfosalicylsäure mit dH <sub>2</sub> O auf 50 ml auffüllen
Coomassie-Brilliantblau G250: (Gelfärbelösung)	42 % (v/v) Methanol 17 % (v/v) Essigsäure 0,1 % (w/v) Coomassie-Brilliantblau G250
Entfärbelösung:	5 % Essigsäure (v/v) 5 % Methanol (v/v)
Entwicklungslösungen:	Kommerziell erhältliche Lösung aus ECL plus Kit-system (vgl. 2.2.2, Amersham Biosciences) verwendet und nach den Angaben des Herstellers verfahren

### 2.5.7 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry *et al.* (1951) wurde eine Eichkurve mit BSA (SL mit 10 mg/ml in 0,1 N NaOH) als Standard erstellt. Die Eichkurve umfasste einen Bereich von 0 bis 0,2 mg Protein/ml. Ein Aliquot der zu messenden Probe wurde mit 0,1 N NaOH entsprechend verdünnt und anschließend 0,2 ml dieser verdünnten Probe mit 1 ml Lösung D versetzt, gut durchmischt und anschließend für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Inkubation erfolgte die Zugabe von 0,1 ml Lösung E, wonach sofort kräftig geschüttelt und 30 min inkubiert wurde. Danach wurde die Extinktion der Probe bei 720 nm in einer Plastik-Einwegküvette (Schichtdicke 1cm) gegen einen Reagenzienleerwert (0,1 N NaOH statt Proteinextrakt) gemessen.

- Lösung A: 2 % (w/v)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  in 0,1 N NaOH  
Lösung B: 1 % (w/v)  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$   
Lösung C: 2 % (w/v) Na-K-Tartrat  
Lösung D: frisch herstellen: 49 ml Lösung A mit je 0,5 ml Lösung B und C  
Lösung E: 1 N Folin-Ciocalteu-Reagens, 1:1 Verdünnung mit  $\text{dH}_2\text{O}$

### 2.5.8 Bestimmung von Glucose, Fructose, Saccharose und Glycerol

Zur Konzentrationsbestimmung der Substrate und Zwischenprodukte Glu, Fru, Suc und Gly wurden kommerziell erhältliche Kitsysteme (r-biopharm, Darmstadt; vgl. 2.2.2) verwendet und nach den Angaben des Herstellers verfahren. Die Gewinnung der Proben erfolgte durch Zentrifugation (13000 rpm, 5 min) der Kulturflüssigkeit zur Abtrennung der Zellen. Die Lagerung der Proben erfolgte bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ .

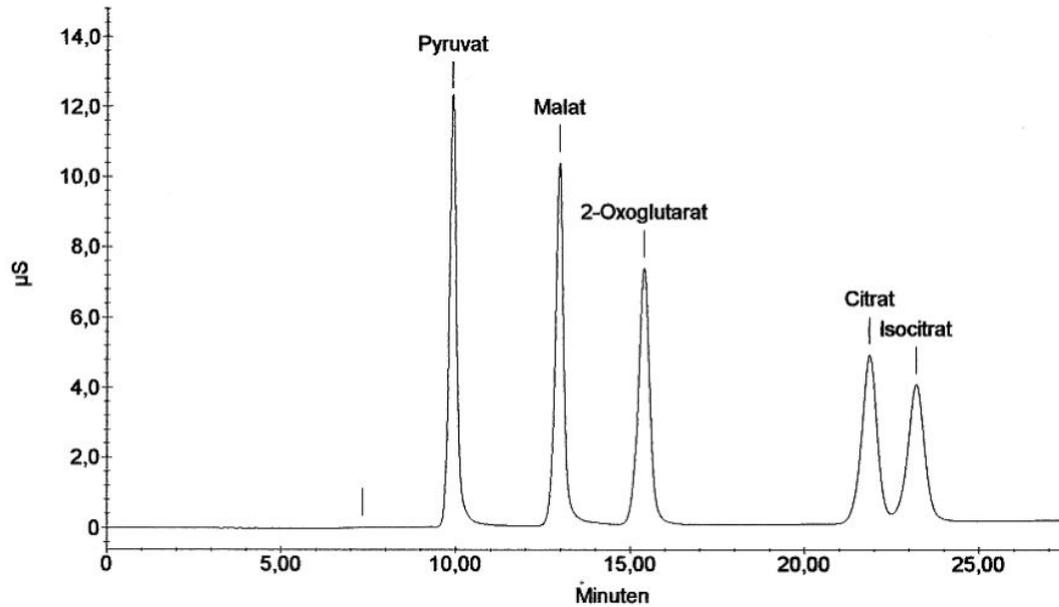
### 2.5.9 Bestimmung der Konzentration der organischen Säuren

#### 2.5.9.1 *Ionenchromatographie*

Zur Produktanalytik wurde hauptsächlich das Ionenchromatographie-System DX-320 der Firma Dionex (Sunnyvale, USA) verwendet. Der eingesetzte Ionenchromatograph umfasste folgende wesentlichen Gerätekompontenten:

- Isokratische Pumpe und Leitfähigkeitsdetektor IC20
- Eluentengenerator EG40
- Autosampler AS40 für 0,5 und 5,0 ml Gefäße
- Selbstregenerierender Suppressor ASRS
- Trennsäule IonPac AS15 (2x 250 mm), Vorsäule IonPac AG15 (2x 50 mm)
- Analytiksoftware Peaknet 5.1

Die erarbeitete Trennmethode, deren wichtigste Parameter in der **Tab. 2.5** aufgeführt sind, erlaubte die Identifizierung und Quantifizierung von Citronensäure, Isocitronensäure und 2-Ketoglutarensäure. Die Säuren Pyruvat und Malat konnten aufgrund von Peaküberlagerungen mit anorganischen Ionen nicht einwandfrei quantitativ erfasst werden. Die Bestimmung der Pyruvatkonzentration erfolgte daher mit einem enzymatischen Test (vgl. 2.5.9.4). Die **Abb. 2.1** zeigt ein Beispieldiagramm eines Standards mit jeweils 20 mg/l Säure.



**Abb. 2.1:** Beispielchromatogramm eines Standards mit jeweils 20 mg/l Säure (Erläuterungen siehe Text). 2-Oxoglutarsäure = 2-Ketoglutarsäure.

**Tab. 2.5:** Trennparameter der Ionenchromatographie.

Trennsäule	IonPac AS15 – Durchmesser 2 mm			
Flussrate	0,45 ml/min			
Injektionsvolumen	10 µl			
Eluent	KOH 0 – 5 min, isokratisch, 5 mM 5 – 10 min, linear auf 30 mM 10 – 26 min, linear auf 50 mM 26 – 27 min, linear auf 5 mM 27 – 29 min, isokratisch, 5 mM			
Retentionszeiten (min)	Pyruvat	9,9	Sulfat	14,0
	Chlorid	10,3	2-Ketoglutarsäure	15,4
	Carbonat	12,7	Phosphat	19,6
	Malat	13,0	Citronensäure	21,9
			Isocitronensäure	23,2

Die zur ionenchromatografischen Bestimmung verwendeten Proben wurden durch Zentrifugation (13000 rpm, 5 min) der Kulturflüssigkeit gewonnen. Bei der Verwendung von hydrophoben Substraten (Hexadecan, Sonnenblumenöl) mussten die Proben zusätzlich entfettet werden. Dazu wurden 0,5 ml Kulturflüssigkeit mit 0,5 ml 100%igem n-Hexan versetzt und 5 min geschüttelt (Vortexer). Danach erfolgte eine Zentrifugation (5 min, 13000 rpm, 4 °C) und die entstehende untere wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Der Vorgang wurde wiederholt.

Die zu vermessenden Proben wurden vor ihrer Analyse im Ionenchromatograph entsprechend ihrem Gehalt an organischen Säuren mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt (1:100-1:1500).

### 2.5.9.2 Enzymatische Bestimmung der Citronen- und Isocitronensäure

Vor der Nutzung der Ionenchromatographie zur Produktanalytik und zum Abgleich der IC-Methoden erfolgte die Konzentrationsbestimmung der zu untersuchenden Säuren mittels photometrischer Tests. Zur Quantifizierung von Citronen- und Isocitronensäure wurden kommerziell erhältliche Kitsysteme (r-biopharm, Darmstadt; vgl. 2.2.2) verwendet und nach den Angaben des Herstellers verfahren.

### 2.5.9.3 Enzymatische Bestimmung der 2-Ketoglutarensäure

Die Quantifizierung der 2-Ketoglutarensäure erfolgte neben der ionenchromatographischen Bestimmung auch nach einer Vorschrift der Firma Calzyme Laboratories Inc., USA (Mauersberger *et al.*, 2003). Der Messansatz ist in der **Tab. 2.6** aufgeführt und wurde in 1,5 ml Plastik-Einwegküvetten (Schichtdicke 1 cm) durchgeführt. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 340 nm. Zur Kontrolle wurde ein Standardwert (1 g/l 2-Ketoglutarensäure) und ein Reagenzienleerwert (dH<sub>2</sub>O) mitgeführt. Nach der Berechnungsformel für die Bestimmung der Konzentration gilt:

$$c = \frac{V \cdot MG}{\varepsilon \cdot d \cdot v \cdot 1000} \times \Delta E$$

V	Testvolumen (ml)
v	Probenvolumen (ml)
MG	Molekulargewicht von 2-Ketoglutarensäure = 190,1 g/mol
ε	Extinktionskoeffizient von NADH bei 340 nm = 6,3 l/mol*cm
d	Schichtdicke = 1 cm
ΔE	= (E1-E2) <sub>Probe</sub> – (E1-E2) <sub>Leerwert</sub>

**Tab. 2.6: Messansatz zur Bestimmung der 2-Ketoglutarensäurekonzentration.**

Komponente	Volumen (ml)
0,1 M Triethanolaminpuffer pH 7,6	1,4
14 mM NADH	0,025
3 M NH <sub>4</sub> Cl	0,075
Probe	0,025
Mischen mit Pipette und 3 min Inkubation, Messwert 1 bestimmen	
20 mg Glutamat-Dehydrogenase/ml dH <sub>2</sub> O	0,005
Mischen mit Pipette und 10 min Inkubation, Messwert 2 bestimmen	

#### 2.5.9.4 Enzymatische Bestimmung von Pyruvat

Die Erfassung der Pyruvatkonzentration erfolgte unter Verwendung eines photometrischen Tests nach Czok und Lamprecht (1974). Der Messansatz ist in **Tab. 2.7** aufgeführt und wurde in 1,5 ml Plastik-Einwegküvetten (Schichtdicke 1 cm) durchgeführt. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 340 nm. Die Berechnung erfolgte analog wie für die 2-Ketoglutarensäure, jedoch unter Einbeziehung des Molekulargewichts von Pyruvat (110 g/mol). Zur Kontrolle wurde ein Standardwert (1 g/l Pyruvat) und ein Reagenzienleerwert (dH<sub>2</sub>O) mitgeführt.

**Tab. 2.7: Messansatz zur Bestimmung der Pyruvatkonzentration.**

Komponente	Volumen (ml)
5 mg NADH/ml dH <sub>2</sub> O	0,02
Probe	0,2
0,5 M Triethanolaminpuffer pH 7,6	0,6
Mischen mit Pipette und 10 min Inkubation, Messwert 1 bestimmen	
Lactat-Dehydrogenase, 10 µl reines Enzym + 90 µl Puffer (Puffer: 10 mM KKP pH 7,4 in 50 % Glycerol)	0,010
Mischen mit Pipette und 10 min Inkubation, Messwert 2 bestimmen	

## 2.6 Gentechnische Untersuchungsmethoden

Die grundlegenden gentechnischen Methoden wurden nach Standardmethoden nach Sambrook *et al.* (1989) und Ausubel *et al.* (1997) durchgeführt.

### 2.6.1 DNA-Präparation

#### 2.6.1.1 Plasmidpräparation aus *E. coli*

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte entweder nach der Methode von Sambrook *et al.* (1989) oder unter Verwendung der Kitsysteme „JETQUICK Plasmid Miniprep Spin Kit“ und „JETSTAR Plasmid Midiprep Kit“ der Firma Genomed (Bad Oeyenhausen). Bei Verwendung der Kitsysteme wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren.

### 2.6.1.2 *Präparation chromosomaler DNA aus Y. lipolytica*

Die Gewinnung chromosomaler DNA aus Hefen erfolgte nach der Methode von Hoffman und Winston (1987). Zur Kultivierung der Hefen bis zur stationären Phase (2 bis  $5 \cdot 10^8$  Zellen pro ml Kultur) wurden 10 ml YPD mit dem entsprechenden Stamm angeimpft und bei 28°C geschüttelt. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation (3000 rpm, 5 min), der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 0,5 ml sterilem dH<sub>2</sub>O resuspendiert. Nach nochmaliger Zentrifugation (13000 rpm, 5 s) und Verwerfung des Überstandes wurde das Pellet in 200 µl TEST-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Phenol-Chloroform (vgl. 2.6.2.1) und 0,3 g Glaskügelchen ( $\varnothing$  0,45 mm) wurde die Probe 3-4 min auf einem Vortexer stark geschüttelt und anschließend mit 200 µl TE-Puffer versetzt. Die Abtrennung der wässrigen Phase (DNA-haltige Phase) erfolgte durch Zentrifugation (13000 rpm, 5 min). Nach Überführung der wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß wurde die Phenol-Chloroform Extraktion wiederholt. Der wässrige Überstand ist in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 400 µl Chloroform versetzt worden. Mit dem durch Zentrifugation (13000 rpm, 2 min) gewonnenen Überstand wurde in einem neuen Reaktionsgefäß eine Ethanol-Fällung (vgl. 2.6.2.2) durchgeführt. Die Aufnahme des getrockneten Pellets erfolgte in 50 µl TE-Puffer + RNase (Endkonzentration 20 µg/ml), das Präparat inkubierte 30 min bis 1 h bei 37 °C und konnte dann bei -20 °C gelagert werden.

TEST-Puffer :                    10 mM Tris-HCl, pH 8,0  
                                      1 mM EDTA  
                                      2 % (v/v) Triton X-100  
                                      1 % (v/v) SDS

RNase A (DNase frei):        SL von 10 mg/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 und 15 mM NaCl; hitzeinaktiviert für 15 min bei 100 °C

## 2.6.2 Methoden zur DNA-Reinigung

### 2.6.2.1 *Phenol-Chloroform Extraktion*

Mit dieser Methode wurden die in einer DNA-Präparation enthaltenen Proteine entfernt. Dazu wurde das Präparat mit Phenol-Chloroform (Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol = 25:24:1) im Verhältnis 1:1 versetzt und stark geschüttelt (3-5 min, Vortexer). Durch scharfe Zentrifugation (13000 rpm, 5 min) konnte

die DNA-haltige wässrige Phase von der organischen Phase getrennt werden. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Beseitigung verbliebener Proteine und Phenolreste wurde die Extraktion mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1 Volumenteile) gegebenenfalls mehrmals wiederholt.

#### 2.6.2.2 Ethanol-Fällung

Die Fällung der DNA-Präparation wurde mit 0,1 Vol 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Vol 99,8 % Ethanol bei -20 °C für 1 h oder ü.N. durchgeführt. Die Pelletierung der DNA erfolgte durch Zentrifugation (4 °C, 13000 rpm, 10 min). Das Pellet wurde anschließend in der Speedvac (Savant) getrocknet und danach in 50 µl TE-Puffer mit RNase A aufgenommen.

TE-Puffer :                    10 mM Tris-HCl, pH 8,0  
                                  1 mM EDTA  
                                  autoklaviert

RNase A (DNase frei):    SL von 10 mg/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, und 15 mM NaCl; hitzeinaktiviert für 15 min bei 100 °C

#### 2.6.3 DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Die zu verdauende DNA wurde mit sterilem ddH<sub>2</sub>O und dem zum Enzym gehörenden Puffer (SL 10fach) gemischt. Danach erfolgte die Zugabe des Restriktionsenzym. Dessen verwendete Menge hing von der DNA-Konzentration ab, in der Regel kamen 3 Units pro µg DNA zum Einsatz. Der Verdau erfolgte bei 37 °C für mindestens 1 Stunde.

#### 2.6.4 Agarose-Gelelektrophorese

Diese Methode diente zur Auftrennung von DNA-Fragmenten in einem Agarosegel im elektrischen Feld. Gearbeitet wurde mit einem 0,8%igen Agarosegel mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 500 µg/l) in 1x TAE-Puffer. Zum Auftragen der Proben wurden diese mit 1/6 Volumen Ladepuffer bzw. 50 % Glycerol versetzt. Die Auftrennung erfolgte in Abhängigkeit von der Gelgröße bei 80-110 Volt. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und fluoresziert unter UV-Licht (316 nm) auf dem Transilluminator. Die Mitführung eines Standards (1 kb DNA-Leiter) ermöglichte die Bestimmung der Fragmentgrößen.

50 x TAE:	242 g Tris Base 57,1 ml Eisessig 100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 mit dH <sub>2</sub> O auf 1000 ml auffüllen autoklavieren
6 x Ladepuffer:	30 % (v/v) Glycerol 0,05 % (w/v) Bromphenolblau 1 Tropfen 1 M Tris-HCl, pH 8,0
Ethidiumbromid:	SL 10 mg/ml

### 2.6.5 Bestimmung der DNA-Konzentration

Für die Bestimmung der DNA-Konzentration wurde eine definierte Menge (meist 1-3 µl) der DNA-Probe auf ein Agarosegel geladen. Zum Vergleich diente λ-DNA (SL 25 ng/µl), die in definierten Mengen (25-100 ng) aufgetragen wurde. Im Anschluss an die Elektrophorese konnte anhand des Vergleichs der Intensität der Fluoreszenz von Ethidiumbromid in der Probe mit der λ-DNA die vorliegende DNA-Konzentration abgeschätzt werden.

### 2.6.6 Integrative Transformation von Hefen mit der Lithiumacetat-Methode

Die integrative Transformation von *Y. lipolytica* erfolgte mit der Lithiumacetat-Methode (Barth und Gaillardin, 1996; Mauersberger und Nicaud, 2003).

#### 2.6.6.1 *Herstellung kompetenter Y. lipolytica Zellen*

Eine 10 ml Vorkultur (YPD, pH 4,0) des Rezipientenstammes wurde 24 h inkubiert (Schüttler 220 rpm, 28 °C). Das Animpfen der 20 ml Hauptkultur (YPD, pH 4,0) erfolgte mit unterschiedlichen Volumina aus der Vorkultur (50, 100 und 200 µl). Nach 24 h Inkubation (Schüttler 220 rpm, 28 °C) wurde die Zellzahl bestimmt und der Ansatz geerntet, bei dem die Zellzahl zwischen  $9 \cdot 10^7$  bis  $1,5 \cdot 10^8$  Zellen pro ml lag. Geerntet wurden 20 ml der Kultur durch Zentrifugation (3500 rpm, 5 min). Nach zweimaligem Waschen in TE-Puffer und Verwerfung des Überstandes wurde das Pellet in 20 ml 0,1 M Lithiumacetat (pH 6,0) aufgenommen und 1 h bei 28 °C auf dem Schüttler (90 rpm) inkubiert. Nach Zentrifugation (3500 rpm, 5 min) wurde das Pellet in 1/10 Volumen 0,1 M Lithiumacetat (pH 6,0) aufgenommen.

---

YPD, pH 4,0:	1 % Hefeextrakt 1 % Pepton 1 % Glucose 50 mM Natriumcitrat, pH 4,0
TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA

#### 2.6.6.2 Transformation von *Y. lipolytica*

Die zu integrierenden Plasmide p64ICL1 bis p67ICL1 (vgl. **Abb. 3.2**) bzw. JMP6 (vgl. **Abb. 3.24**) wurden mit den Restriktionsenzymen *NotI* bzw. *SacII* (p64ICL1 und p65ICL1) linearisiert. Für den Vektor JMP6 wurde das *NotI*-Fragment mit der Expressionskassette für *LIP2* isoliert und zur Transformation eingesetzt (enthält keine Bakterien-DNA mehr). Unterschiedliche Mengen dieser DNA (1, 2 und 3 µg) wurden mit je 5 µl Carrier-DNA (Heringssperma-DNA, denaturiert durch Ultraschall in ca. 500-1000 bp Fragmente, 5 mg/ml in 50 mM TE-Puffer, pH 8,0) und 100 µl kompetenter Zellen gemischt und 15 min bei 28 °C inkubiert. Nach Zugabe von 0,7 ml 40%igem PEG 4000 (in 0,1 M Lithiumacetat, pH 6,0 gelöst) wurde die Probe für 1 Stunde bei 28 °C und 220-250 rpm geschüttelt. Danach erfolgte der Hitzeschock bei 39 °C für 10 min. Anschließend wurden sofort 2x 0,6 ml 0,1 M Lithiumacetat pH 6,0 dazu pipettiert, gemischt und der gesamte Ansatz in 0,2 ml Portionen auf Selektionsmedium (MG) mit den entsprechenden Supplementen ausplattiert. In Abhängigkeit vom eingesetzten Plasmid und vom verwendeten Stamm waren nach 5 bis 14 Tagen die Transformanten als Kolonie sichtbar.

#### 2.6.7 Southern-Hybridisierung

Für die Southern-Hybridisierung wurde der Gene Images™ Random Prime Labelling Kit (KitsystemI für Sondenmarkierung) und der Gene Images™ CDP-Star™ Detection Kit (KitsystemII für Detektion) der Firma Amersham-Biosciences verwendet.

##### 2.6.7.1 Restriktionsverdau und Gelelektrophorese

In einem 30 µl Ansatz wurden 500-600 ng DNA mit 10 Units Restriktionsenzym ü.N. verdaut. Anschließend erfolgte die elektrophoretische Auftrennung in einem 0,8%igem, Ethidiumbromid freien Agarosegel. Als Längenstandard diente mit *HindIII* und *EcoRI* verdaute λ-DNA (5 ng).

### 2.6.7.2 Blotten der DNA

Mittels Vakuumblotter wurden die DNA-Fragmente aus dem Agarosegel auf eine Nylonmembran (Hybond-N, Amersham-Biosciences, Freiburg) transferiert (80 mbar Vakuum). Nacheinander erfolgte die Übersichtung des Gels mit Depurinierungslösung, Denaturierungslösung und Neutralisierungslösung für jeweils 30 min. Der Transfer der DNA erfolgte 1 h mit 20x SSC, wobei die DNA an die Membran bindet. Anschließend wurde die Membran leicht luftgetrocknet und die darauf befindliche DNA mittels UV-Licht für 3 min fixiert (Transilluminator).

Depurinierungslösung:	0,25 M HCl
Denaturierungslösung:	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH
Neutralisierungslösung :	1,5 M NaCl 0,5 M Tris-HCl, pH 7,5
20x SSC:	0,3 M Natriumcitrat 3 M NaCl

### 2.6.7.3 Präparation von Sonden-DNA

Die während der Southern-Hybridisierung eingesetzten Sonden wurden aus verschiedenen Plasmiden präpariert (**Tab. 2.8**). Dazu wurden diese entsprechend mit Restriktionsenzymen verdaut und anschließend das gewünschte Fragment durch Gelextraktion mit Glasmilch gewonnen (Kitsysteme: JETQUICK Gel Extraction Spin Kit oder JETSORB Gel Extraction Kit, Genomed, Bad Oyenhausen).

Anschließend erfolgte die Markierung dieser Fragmente mit Fluorescein mit dem Kit-system Gene Images<sup>TM</sup> Random Prime Labelling Kit von Amersham Biosciences (Freiburg).

**Tab. 2.8: In dieser Arbeit verwendete Fluorescein-markierten DNA-Sonden.**

Sonde	Größe	Beschreibung
URA3	1,7 kb	<i>SalI</i> -Fragment aus pINA443
ICL1	2,3 kb	<i>Bam</i> HI-Fragment aus p67ICL1
LIP2	1,1 kb	5,3 kb <i>Hind</i> III-Fragment aus JMP6, <i>Bam</i> HI gespalten
λ		<i>Eco</i> RI/ <i>Hind</i> III verdaute λ-DNA als Größenstandard-Sonde

#### 2.6.7.4 Prähybridisierung und Hybridisierung

Die DNA-beladene Nylonmembran wurde im Hybridisierungssofen bei 60 °C 1 h prähybridisiert (0,125 ml Hybridisierungspuffer/cm<sup>2</sup> Membran). Im Anschluss erfolgte die Zugabe der Sonden-DNA für die Proben (1 µl/ml Hybridisierungspuffer) und den Marker (0,5 µl/ml Hybridisierungspuffer). Vor der Zugabe wurde die Sonden-DNA für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Hybridisierung wurde ü. N. bei 60 °C durchgeführt.

Hybridisierungspuffer: 5x SSC  
 0,1 % (w/v) SDS  
 5 % (w/v) Dextransulfat  
 1:20 Verdünnung der „liquid block“-Lösung (Kit I)

#### 2.6.7.5 Waschen, Blocken und Detektion

Die Membran wurde in Waschlösung I (3 ml/cm<sup>2</sup> Membran) und anschließend in Waschlösung II (3 ml/cm<sup>2</sup> Membran) für jeweils 15 min bei 60 °C gewaschen. Danach wurde der Blot 1 h bei RT mit Blocklösung (0,8 ml/cm<sup>2</sup> Membran) und anschließend 1 h mit Antikörperlösung (0,3 ml/cm<sup>2</sup> Membran) inkubiert. Der Blot wurde dann 3x 10 min bei RT mit Waschlösung III (3 ml/cm<sup>2</sup> Membran) gewaschen und mit Detektionsreagenz (30 µl/cm<sup>2</sup> Membran) überschichtet. Mittels eines Röntgenfilmes (Hyperfilm<sup>TM</sup> ECL<sup>TM</sup>, Amersham Biosciences) konnten die Signale der gebundenen Sonde detektiert werden (Expositionszeit 5-30 min).

Waschlösung I: 1 x SSC  
 0,1 % (w/v) SDS

Waschlösung II: 0,5 x SSC  
 0,1 % (w/v) SDS

Puffer A: 0,1 M Tris-HCl, pH 9,5  
 0,3 M NaCl  
 Autoklavieren

Blocklösung: 1:10 Verdünnung der „liquid block“-Lösung (Kit II) in Puffer A

Antikörperlösung: Antifluorescein-Alkalische Phosphatase-Konjugat, 5000fach in 0,5 % (w/v) BSA (Fraktion V) in Puffer A verdünnen

Waschlösung III: 0,3 % (v/v) Tween 20 in Puffer A

Die nach der ersten Southern-Hybridisierung und Detektion erhaltene Membran wurde teilweise zur weiteren Behandlung mit einer anderen Sonde wieder verwendet. Dazu wurde die Membran mit 5x SSC befeuchtet und anschließend 2x 10 min mit 0,1 % heißem (90-100 °C) SDS durch Schütteln gewaschen, wobei die SDS-Lösung zwischendurch erneuert wurde. Im Anschluss konnte mit der Prähybridisierung und den sich daran anschließenden Schritten des Southern-Hybridisierungsverfahrens fortgefahren werden.

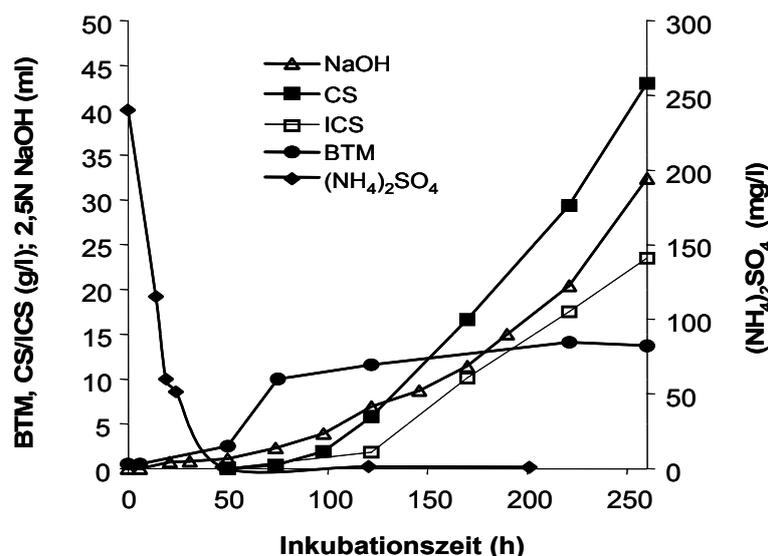
### 2.6.7.6 *Bestimmung der Kopiezahl*

Zur Bestimmung der Kopiezahl wurde der nach der Southern-Hybridisierung erhaltende Röntgenfilm eingescannt und mit der Software ImageQuaNT (Phosphoimager STORM, Pharmacia Biotech) analysiert. Das Programm vergleicht dabei die unterschiedliche Intensität der Schwärzung der auf dem Film vorliegenden Banden und setzt diese miteinander ins Verhältnis. Durch Bandenvergleich der mit einer Kopie im Genom vorliegenden Gene *ICL1* bzw. *LIP2* mit den in mehreren Kopien vorliegenden vektorialen Expressionskassetten pICL1-ICL1-ICL1t bzw. pPOX2-LIP2 erfolgte die ungefähre Bestimmung der Kopiezahl der Expressionskassetten bzw. integrierten Vektoren.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Untersuchungen zur Beeinflussung des Produktmusters

Bei der Produktion von CS mit der Hefe *Y. lipolytica* wird in der Regel ein Gemisch aus CS und ICS sekretiert. Das Auftreten anderer Säuren des TCC in detektierbaren Konzentrationen wurde während dieser Arbeit lediglich mit Glycerol als alleiniger C-Quelle beobachtet (vgl. 3.1.1.3). Es sollte untersucht werden, ob und an welchen Stellen im Metabolismus der Zelle Einfluss auf das Produktmuster der ausgeschiedenen Säuren CS und ICS genommen werden kann. Dazu wurden Untersuchungen zum Einfluss der Expressionshöhen der beiden Enzyme Isocitratlyase (ICL) und Isocitratdehydrogenase (ICDH) auf das Produktmuster durchgeführt.



**Abb. 3.1:** Wachstumsverlauf und Kinetik der Bildung von Citronensäure (CS) und Isocitronensäure (ICS) aus Sonnenblumenöl als Substrat durch den *Y. lipolytica* Stamm H222, ausgelöst durch eine Stickstofflimitation der Kultur. Kultivierung in 500 ml Schüttelkolben mit 200 ml Minimalmedium Mp und bis zu 10 % Sonnenblumenöl; BTM - Biotrockenmasse; Abbildung entnommen und modifiziert aus Mauersberger *et al.*, 2003.

Grundvoraussetzung für die Überproduktion von CS:ICS durch *Y. lipolytica*-Stämme ist eine Wachstumslimitation der Produktionskultur bei gleichzeitigem C-Quellenüberschuss (Stottmeister *et al.*, 1982; vgl. 1.2.3.3). Dazu kommt bei der thiaminautotrophen Hefe *Y. lipolytica* die Notwendigkeit einer ausreichenden Versorgung mit dem Vitamin Thiamin, da ansonsten eine verstärkte Bildung der Metaboliten 2-Ke-

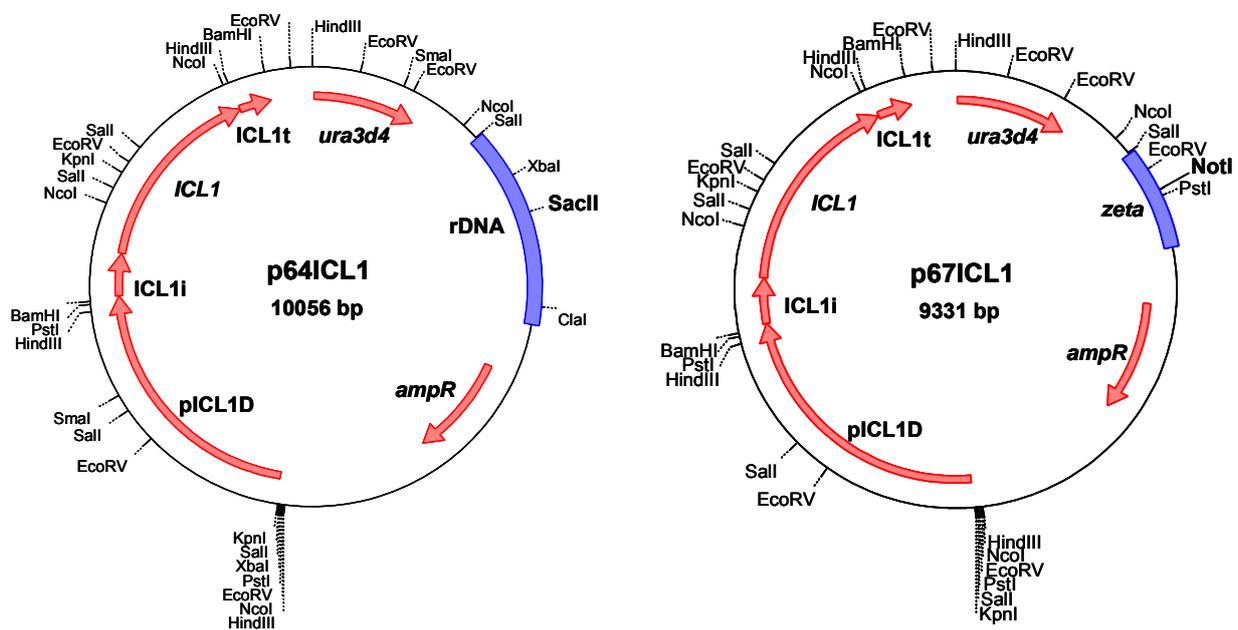
toglutarensäure und Pyruvat auftritt (Finogenova, 1991; Chernyavskaya *et al.*, 2000; Finogenova *et al.*, 2005). Die für die CS-Produktion notwendige Wachstumslimitation kann durch Mangel an Mineralsalzen, Spurenelementen und anderen essentiellen Zusätzen, wie Magnesium, Phosphor, Calcium, Stickstoff oder Aminosäuren ausgelöst werden (Stottmeister *et al.*, 1982; Barth und Gaillardin, 1996, 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurde die CS-Produktion durch eine Limitation des Wachstums von *Y. lipolytica* über die Auszehrung der Stickstoffquelle in Form von  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ausgelöst. Statt der für normales Wachstum von *Y. lipolytica* im Minimalmedium eingesetzten  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration von 3 g/l (Mg) wurde in Produktionsansätzen mit nur 1 g/l (Mp) gearbeitet. Die **Abb. 3.1** verdeutlicht am Beispiel der Kultivierung des Stammes H222 auf Sonnenblumenöl den prinzipiellen Zusammenhang zwischen dem  $\text{NH}_4$ -Verbrauch und dem Einsetzen der Produktbildungsphase. Die stationäre Phase (Wachstumslimitation) der Kultur wurde in diesem Fall nach ca. 80 h durch Auszehrung des Ammoniumstickstoffs bei einer für die Produktbildung ausreichenden Biotrockenmassekonzentration (BTM) von etwa 12-15 g/l erreicht (für Glucose oder Saccharose 7-8 g/l). In der anschließenden Produktionsphase wurde über einen längeren Zeitraum CS:ICS kontinuierlich akkumuliert. Die Produktionsphase kann unter den Bedingungen des Schüttelkolbens bis zu 25 Tagen fortgesetzt werden. Dabei können bis zu 110 g/l CS und 50 g/l ICS aus 100 g/l Sonnenblumenöl als Substrat angereichert werden.

### 3.1.1 Überexpression der Isocitratlyase

Das Enzym Isocitratlyase stellt das Schlüsselenzym des Glyoxylatzyklus dar und katalysiert die Umsetzung von ICS aus dem TCC in Glyoxylat und Succinat. Es wird in der Hefe *Y. lipolytica* durch das *ICL1* Gen codiert, dessen Charakterisierung Gegenstand vergangener Forschungsarbeiten am Institut für Mikrobiologie, TU-Dresden war (Prinz, 1995; Juretzek, 1999). Der Hintergrund zur Auswahl der ICL als ein möglicher beeinflussender Faktor des Produktmusters war die Überlegung, dass durch eine stark erhöhte Aktivität des Enzyms Isocitronensäure aus dem TCC abgezogen wird, was zu einer verstärkten Sekretion von CS ins Medium führen sollte. Literaturbefunde zu selektierten Mutanten bestätigten den Einfluss der ICL auf das CS:ICS Produktmuster (Finogenova *et al.*, 1986; vgl. 1.3.2.2). Zu diesem Zweck sollte die Kopiezahl des *ICL1* Gens mit geeigneten integrativen Transformationsvektoren im Genom der Hefe erhöht werden und eine Überexpression der ICL erfolgen.

Zur Transformation kamen die Plasmide p64ICL1, p65ICL1, p66ICL1, p67ICL1 (vgl. **Abb. 3.2, Tab. 2.1**) zum Einsatz, die von Thomas Juretzek konstruiert wurden. Die Basis dieser Plasmide waren die Vektoren p64IP bis p67IP, die die heterologe Expression von Proteinen unter Kontrolle des *pICL1* in *Y. lipolytica* ermöglichen sollten (Juretzek *et al.*, 2001). Dazu wurde das 2,3 kb *Bam*HI Fragment des *ICL1* Strukturgen in die Plasmide p64IP bis p67IP eingesetzt. Die resultierenden Plasmide p64ICL1 bis p67ICL1 waren in ihrem prinzipiellen Aufbau identisch, unterschieden sich jedoch in der Art des Selektionsmarkers und der Integrationssequenz (**Abb. 3.2**).



**Abb. 3.2:** Aufbau der auf rDNA (p64ICL1) oder LTR zeta (p67ICL1) basierenden integrativen multicopy Vektoren für die *ICL1* Überexpression in *Y. lipolytica*. Die Vektoren enthalten als funktionsfähige Expressionskassette das *ICL1* Gen aus *Y. lipolytica* mit vollständigen Promotor D (pICL1D), Intron (ICL1i), *ICL1* ORF und Terminator (ICL1t) sowie das *ura3d4* Allel des *URA3* Gens von *Y. lipolytica* als multicopy Selektionsmarker. Die Vektoren werden zur integrativen Transformation mit *Sac*II (p64ICL1, p65ICL1) bzw. *Not*I (p66ICL1, p67ICL1) linearisiert. In den entsprechenden single copy Vektoren p65ICL1 (rDNA) und p66ICL1 (LTR zeta) ist das *ura3d1* Allel als single copy Selektionsmarker enthalten (Juretzek *et al.*, 2001; Kruse *et al.*, 2004).

Die Vektoren p65ICL1 und p66ICL1 enthielten als Selektionsmarker das Allel *ura3d1* (*URA3* Gen mit vollständig funktionsfähigem Promotor von ca. 36 bp), wodurch die Selektion von Transformanten mit 1-2 Kopien (single copy) der Expressionskassette auf uracilfreiem Medium möglich war. Die Plasmide p64ICL1 und p67ICL1 enthielten den multicopy Selektionsmarker *ura3d4* (*URA3* Gen mit verkürztem Promotor,

dadurch schwach exprimiert), wodurch nur solche Transformanden selektiert wurden, die mindestens 8-10 Kopien im Genom enthielten (Juretzek *et al.*, 2001). Als Integrationssequenzen enthalten die Plasmide entweder Fragmente der rDNA (p64ICL1, p65ICL1) oder die als *zeta* bezeichnete long terminal repeat (LTR) Sequenz des Retrotransposons Ylt1 aus *Y. lipolytica* (p66ICL1, p67ICL1). Im Gegensatz zur rDNA tritt LTR *zeta* nicht in allen Stämmen von *Y. lipolytica* auf (Juretzek *et al.*, 2001), so dass der Vektor p67ICL1 für die Transformation *zeta*-freier Stämme nur mit einer sehr geringen Transformationseffizienz einsetzbar war.

Zur Transformation in die *Y. lipolytica* Stämme H222-S4 (kein LTR *zeta*) und E129L1 (*zeta*) wurden die rDNA enthaltenden Vektoren mit dem Restriktionsenzym *Sac*II bzw. die LTR *zeta* enthaltenden Vektoren mit *Not*I linearisiert. Für beide Stämme konnten mit allen eingesetzten Plasmiden integrative Transformanden gewonnen werden, wobei in Abhängigkeit von der Plasmidstruktur und dem Rezipientenstamm eine sehr unterschiedliche Frequenz gefunden wurde (**Tab. 3.1**).

**Tab. 3.1: Integrative Transformation in *Y. lipolytica* zur Erhöhung der Kopiezahl des *ICL1* Gens.** Die Vektoren wurden nach ihrer Linearisierung in die Stämme H222-S4 (*ura3-302*) und E129L1 (*lys11 ura3-302*) integrativ transformiert. Die Kopiezahl der Expressionskassette wurde aus der Southern-Hybridisierung mit der Software ImageQuant für STORM, Pharmacia Biotech (vgl. 2.6.7.6) abgeschätzt. Selektionsmarker: *ura3d1* – single copy, *ura3d4* – multicopy (vgl. Juretzek *et al.*, 2001).

Stamm	Plasmid	Integrationsart	Selektionsmarker, Integrationssequenz	Frequenz (TF/ $\mu$ g DNA)	Kopiezahl <i>ICL1</i> Gen
H222-S4	p64ICL1	multicopy	<i>ura3d4</i> r-DNA	36	10-24
	p65ICL1	single copy	<i>ura3d1</i> r-DNA	1600	2-3
	p66ICL1	single copy	<i>ura3d1</i> LTR <i>zeta</i>	30	2-3
	p67ICL1	multicopy	<i>ura3d4</i> LTR <i>zeta</i>	1	8-15
E129L1	p64ICL1	multicopy	<i>ura3d4</i> r-DNA	80	n.b.
	p65ICL1	single copy	<i>ura3d1</i> r-DNA	2400	n.b.
	p66ICL1	single copy	<i>ura3d1</i> LTR <i>zeta</i>	2400	n.b.
	p67ICL1	multicopy	<i>ura3d4</i> LTR <i>zeta</i>	30	n.b.

Erwartungsgemäß wurde mit den single copy Vektoren eine deutlich höhere Transformationsfrequenz gefunden als mit den multicopy Vektoren. Die auf r-DNA basierenden Plasmide ergaben für beide Stämme eine vergleichbare Transformationseffizienz. Besonders im LTR *zeta* freien Stamm H222-S4 integrierten die r-DNA Plasmide mit deutlich höherer Frequenz als die auf *zeta* basierenden Vektoren, da diese in H222-S4 nur durch heterologe Rekombination eingebaut werden konnten. Die

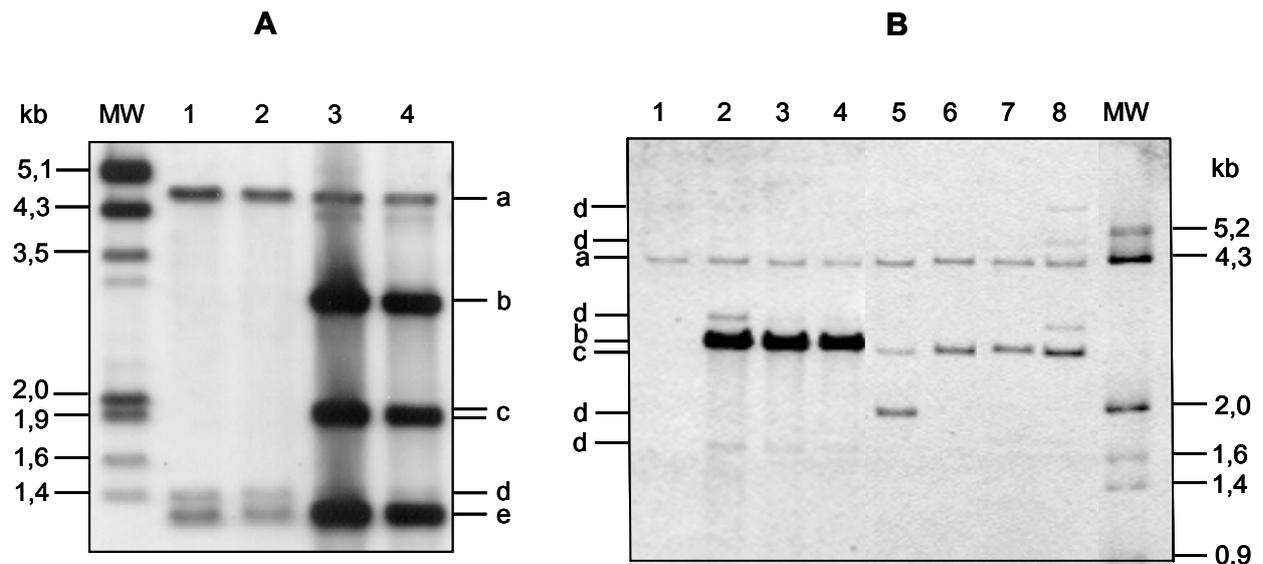
Transformationsfrequenz für den Stamm H222-S4 mit dem Plasmid p67ICL1 war sehr gering und lag nur bei 1 Transformande/ $\mu\text{g}$  DNA. Im Gegensatz dazu konnten multicopy Transformanden des Stammes E129L1 mit den Plasmiden p64ICL1 und p67ICL1 mit guter Frequenz (30-50 TF/ $\mu\text{g}$  DNA) gewonnen werden, da dieser Stamm beide Integrationssequenzen in hoher Kopiezahl im Genom enthält. Die Gewinnung der schwer zu isolierenden p67ICL1 Transformanden des Stammes H222-S4 wurde angestrebt, da frühere Befunde darauf hinwiesen, dass Transformanden dieses Typs aufgrund der stattfindenden Mehrfachintegrationen an verschiedene Orte im Genom eine höhere Stabilität besitzen als Transformanden des p64-Typs (Juretzek *et al.*, 2001). Ursache dafür könnten die sich durch größere Flexibilität auszeichnenden r-DNA Sequenzen sein, in deren Folge es zum Verlust bzw. der Zerstörung von dort integrierten Expressionskassetten kommen kann.

### 3.1.1.1 Charakterisierung der integrativen Transformanden

Insbesondere die integrativen Transformanden des Stammes H222-S4 wurden näher charakterisiert, da sich diese vom Wildtypstamm H222 abgeleiteten Stammderivate im Vergleich zu den E129L1-Transformanden durch bessere Wachstums- und Produktionseigenschaften auszeichneten (Lysin-Auxotrophie in E129L1).

Die Mehrfachintegration des *ICL1* Gens konnte mittels Southern-Hybridisierung nachgewiesen werden (**Abb. 3.3**). Die untersuchten Transformanden von H222-S4 mit p64ICL1 bis p67ICL1 wiesen neben den genomischen Banden für das *ICL1* Gen (**Abb. 3.3 A**) und die *URA3* Allele *ura3d1* bzw. *ura3d4* (**Abb. 3.3 B**) zusätzliche Banden auf, die aus den ins Genom integrierten Vektoren resultieren. Die Erhöhung der Kopiezahl des *ura3d4* Allels bzw. des *ICL1* Gens aufgrund der multiplen Integration der Vektoren in das Genom wird durch die hohe Vektorbandenintensität bei den multicopy Transformanden gegenüber dem Wildtyp- bzw. Rezipientenstamm und den Single copy Transformanden verdeutlicht. Bei der Detektion der *ura3d* Allele (**Abb. 3.3 B**) wurde für den Ausgangsstamm H222-S4 die spezifische Bande a (4,3 kb), resultierend aus dem genomischen Fragment des durch *SUC2* Insertion zerstörten *URA3* Gens, gefunden. Bei den multicopy Transformanden von H222-S4(p64ICL1) - T1, T9 und T11 - trat zusätzlich die spezifische Bande b (2,8 kb) mit hoher Intensität, bzw. bei den single copy Transformanden des Typs H222-S4(p65ICL1) und H222-S4(p66ICL1) die Bande c (etwa 2,6 kb) auf, welche jeweils aus dem *ura3d4* bzw.

*ura3d1* Allel der ins Genom integrierten Vektoren stammen. Die Detektion des *ICL1* Gens (**Abb. 3.3 A**) mit der entsprechenden Sonde bestätigte die Mehrfachintegration der Vektorfragmente in das Genom. Die multicopy Transformanden H222-S4(p67ICL1) T5 und H222-S4(p64ICL1) T1 wiesen gegenüber den Vergleichsstämmen H222 und H222-S4 zusätzliche Banden mit starker Intensität im Bereich von 1,9 und 2,9 kb auf. Zusätzlich wurde die genomische Bande bei 1,24 kb durch das äquivalente Fragment aus dem integrierten Vektor verstärkt.

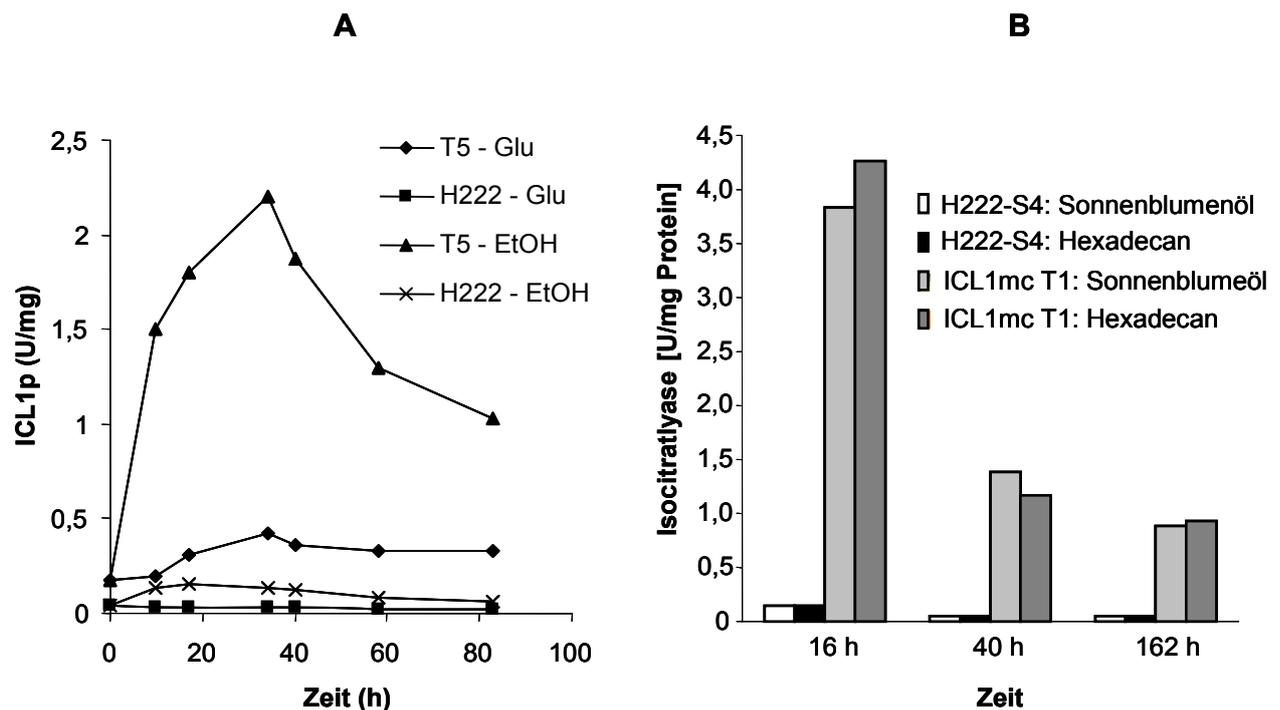


**Abb. 3.3:** (A) Nachweis der erhöhten Kopiezahl des *ICL1* Gens in ausgewählten multicopy Transformanden des Typs H222-S4(p64ICL1) und H222-S4(p67ICL1). Southern-Hybridisierung nach vollständigem Verdau der genomischen DNA mit dem Restriktionsenzym *NcoI* und Detektion spezifischer Banden mittels des 2,3 kb *Bam*HI Fragmentes des *ICL1* Gens aus *Y. lipolytica*. MW - Molekulargewichtsstandard; 1 - Wildtypstamm H222; 2 - Rezipientenstamm H222-S4; 3 - Multicopy Transformande H222-S4(p67ICL1) T5; 4 - Multicopy Transformande H222-S4(p64ICL1) T1; a, d - Genomische *ICL1* Fragmente bei ca. 1,3 und 4,5 kb; b, c - *ICL1* enthaltende Fragmente der Vektoren p64ICL1 (1,89 und 2,94 kb) und p67ICL1 (1,85 und 2,94 kb); e - *ICL1* Fragment bei 1,24 kb resultierend aus dem Genom bzw. dem Vektor.

(B) Nachweis der erhöhten Kopiezahl der *ura3d* Allele in ausgewählten integrativen Transformanden des Stammes H222-S4 mit den Plasmiden p64ICL1, p65ICL1 und p66ICL1. Southern-Hybridisierung nach vollständigem Verdau der genomischen DNA mit dem Restriktionsenzym *SalI* und Detektion spezifischer Banden mittels des 1,7 kb *SalI* Fragmentes des *URA3* Gens aus *Y. lipolytica*. 1 - Rezipientenstamm H222-S4; 2-4 - Multicopy Transformanden T1, T9 und T11 des Typs H222-S4(p64ICL1); 5, 6 - Single copy Transformanden T6 und T8 des Typs H222-S4(p65ICL1); 7, 8 - Single copy Transformanden T7 und T10 des Typs H222-S4(p66ICL1); MW - Molekulargewichtsstandard; a - Genomisches Fragment mit dem *ura3-302* Allel bei 4,3 kb; b - *ura3d4*-haltiges Fragment aus dem Vektor p64ICL1 bei 2,8 kb; c - 2,7 kb großes Fragment aus den Vektoren p65- bzw. p66ICL1; d - unspezifische Banden aufgrund zusätzlicher Integrationsereignisse des Plasmids.

### 3.1.1.2 Überexpression der Isocitratlyase

Zum Nachweis des Gen-Dosis-Effektes aufgrund der Mehrfachintegration des *ICL1* Gens in *Y. lipolytica* wurde die Aktivität der ICL im Wildtypstamm H222 bzw. im Rezipientenstamm H222-S4 auf unterschiedlichen C-Quellen (Glucose, Ethanol, Sonnenblumenöl, Alkan) gemessen und mit der in den *ICL1* multicopy Transformanden verglichen (**Abb. 3.4**).

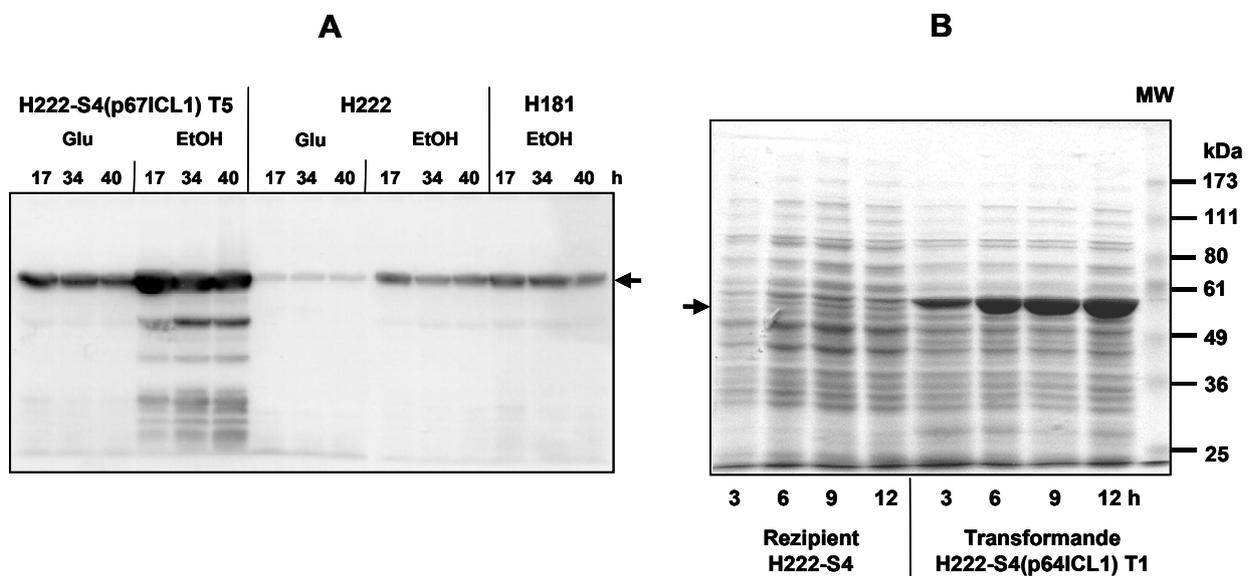


**Abb. 3.4:** (A) Erhöhung der Isocitratlyaseaktivität infolge der multiplen Integration des *ICL1* Gens in das Genom von *Y. lipolytica* am Beispiel der Kultivierung auf den C-Quellen Glucose (Glu) und Ethanol (EtOH). Verlauf der ICL-Aktivität von H222 und der multicopy Transformande H222-S4(p67ICL1) T5 (T5). Kulturbedingungen: Vorkultur auf YPD; Hauptkultur in 500 ml Schüttelkolben mit 100 ml Minimalmedium Mg mit 2 % Glucose oder 1 % Ethanol.

(B) Erhöhte Isocitratlyaseaktivität auch nach langer Kulturzeit in der *ICL1* multicopy Transformande H222-S4(p64ICL1) T1 im Vergleich zum Rezipientenstamm H222-S4 während der CS-Produktion auf Sonnenblumenöl bzw. Hexadecan. Kultivierung im 500 ml Schüttelkolben mit 100 ml Minimalmedium Mp und 5 % C-Quelle.

Die **Abb. 3.4 A** zeigt den Verlauf der spezifischen Isocitratlyaseaktivität bei der Kultivierung von H222 und der multicopy Transformande H222-S4(p67ICL1) T5 auf den C-Quellen Glucose und Ethanol. Aufgrund der Repression des *ICL1* Promotors auf Glucose wurden auf diesem Substrat deutlich geringere Aktivitäten bestimmt als auf Ethanol. Unter den vorherrschenden Kulturbedingungen wurde auf beiden C-

Quellen ein Maximum der spezifischen ICL-Aktivität nach ca. 20-30 h gefunden, wobei mit der multicopy Transformande 12-17fach höhere Werte bestimmt wurden als für den Wildtypstamm. In Abhängigkeit von den Kulturbedingungen und den getesteten Transformanden der Typen H222-S4(p64ICL1) bzw. H222-S4(p67ICL1) stieg die ICL-Aktivität auf 2-4 U/mg Protein an. Unabhängig vom zeitlichen Verlauf wurde bis zu einer Kulturzeit von 80 h auf Glucose und Ethanol stets eine um 10-20fach höhere spezifische ICL-Aktivität der multicopy Transformanden gegenüber den Ausgangsstämmen H222 bzw. H222-S4 gefunden. Auch nach sehr langen Kulturzeiten (bis zu 16 Tagen), wie sie bei der CS-Produktion im Schüttelkolben üblich waren, bestätigte sich, dass die hohe ICL-Aktivität der multicopy Transformanden gegenüber den Vergleichsstämmen erhalten blieb (**Abb. 3.4 B**).



**Abb. 3.5:** (A) Nachweis der Expression des Isocitratlyaseproteins Icl1p in drei Hefestämmen mittels Western-Hybridisierung nach Kultivierung auf Glucose oder Ethanol. Kultivierung wie in Abb. 3.4 A beschrieben. Elektrophoretische Auftrennung zellfreier Extrakte (50 µg Protein je Probe) in der SDS-PAGE nach Laemmli (1970) und anschließender Detektion des Icl1p im Western-Blot mit Anti-Icl1p-Antikörper. Auffallend ist die deutliche Erhöhung der Expression der Proteinbande (Pfeil) bei ca. 60 kDa (Molekulargewicht von Icl1p) in der *ICL1* multicopy Transformande H222-S4(p67ICL1) T5 im Vergleich mit H222 und H181. (B) Nachweis der Überexpression des Isocitratlyaseproteins in der *ICL1* multicopy Transformande H222-S4(p64ICL1) T1 nach der Coomassie-Färbung des Proteingels. Elektrophoretische Auftrennung zellfreier Proteinextrakte nach 3-12 h Kultivierung der Stämme im Minimalmedium Mg mit 1 % Ethanol als C-Quelle. Auffallend ist die mit dem Pfeil markierte ausgeprägte Proteinbande im Bereich von 60 kDa (Molekulargewicht der ICL) in der *ICL1* multicopy Transformande H222-S4(p64ICL1) T1 gegenüber H222-S4.

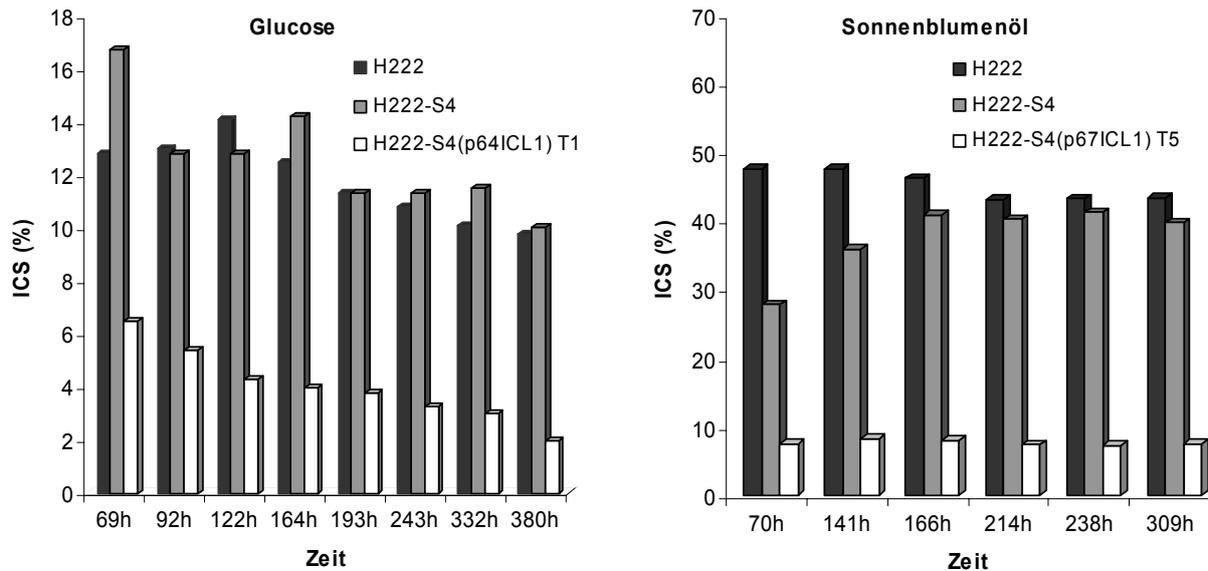
Die Überexpression des ICL-Proteins wurde auch mittels Western-Hybridisierung bestätigt (**Abb. 3.5 A**). Sowohl für Glucose als auch für Ethanol zeigte die multicopy Transformante H222-S4(p67ICL1) T5 gegenüber dem Wildtypstamm H222 deutlich intensivere Bandenschwärzungen auf dem Röntgenfilm nach der Detektion mit einem Antikörper gegen das ICL-Protein. Im Gegensatz zur Glucose wurden mit Ethanol als C-Quelle vermehrt Abbaubanden des ICL-Proteins beobachtet (Hochoxpression des Icl1p auf Ethanol), die nach 34 h und 40 h Kulturzeit stärker auftraten als nach 17 h.

Um Hinweise auf die Ursache für die Veränderung des Produktmusters in der Mutante H181 (ICS-Anteil <6 % auf allen Substraten; vgl. 1.3.2.2, **Tab. 1.1**) zu erhalten, wurde dieser Stamm in die Untersuchungen zur ICL-Expression mit einbezogen. Die Ethanol-induzierte Icl1p-Aktivität des Stammes H181 durchlief ein Maximum zwischen 10 und 34 h Kulturzeit und lag nur geringfügig (1,2-1,3fach) über den Werten des Wildtypstammes H222, jedoch deutlich unter den sehr hohen Werten (10-12fach) der *ICL1* multicopy Transformante H222-S4(p67ICL1) T5 (nicht dargestellt). Diese Befunde für die Icl1p-Aktivität stimmten mit den im Western-Blot erhaltenen Resultaten zur Expressionshöhe des Icl1p-Proteins gut überein (**Abb. 3.5 A**). Die Ursache für die Produktmusteränderung in H181 scheint demnach nicht bei der ICL-Expression und -Aktivität zu liegen und bedarf weiterer Untersuchungen.

Bereits in der Coomassie-Färbung des Proteingels konnte für die Transformante H222-S4(p64ICL1) T1 aufgrund des Auftretens einer verstärkten Proteinbande im Bereich von 60 kDa (Molekulargewicht der ICL) gegenüber H222-S4 der Nachweis der ICL-Überexpression gezeigt werden (**Abb. 3.5 B**).

### 3.1.1.3 Vergleich des Produktmusters CS:ICS

Die Untersuchungen von multicopy Transformanden des Typs H222-S4(p64ICL1) - rDNA Integration - und H222-S4(p67ICL1) - heterologe Integration, da keine LTR *zeta* vorhanden - zeigten ein vergleichbares Verhalten im Wachstum, sowie durch die Erhöhung der Kopiezahl des *ICL1* Genes hervorgerufene Überexpression der ICL (vgl. 3.1.1.2). Auf den eingesetzten Substraten Glucose, Saccharose, Sonnenblumenöl und Hexadecan wurden deutliche Veränderungen im Produktmuster CS:ICS festgestellt (**Abb. 3.6, Tab. 3.2**).

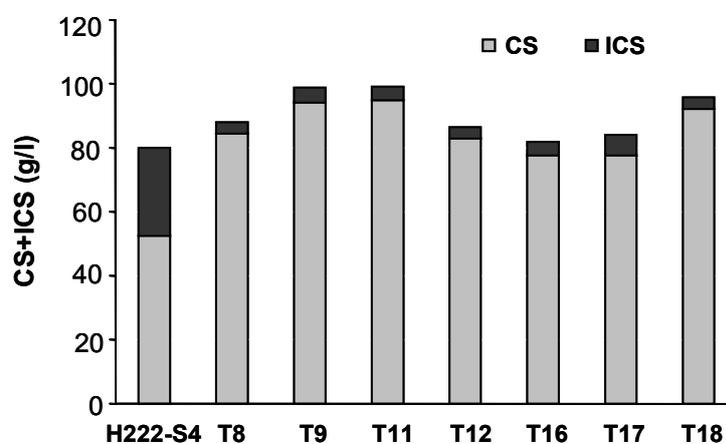


**Abb. 3.6: Verschiebung des Produktverhältnisses CS:ICS infolge multipler Integration des *ICL1* Gens bei der Kultivierung von *Y. lipolytica* Stämmen auf Glucose oder Sonnenblumenöl.** Dargestellt ist der prozentuale Isocitronensäureanteil am Gesamtsäureprodukt (CS+ICS) im Wildtypstamm H222 und Rezipientenstamm H222-S4 im Vergleich mit den ausgewählten *ICL1* multicopy Transformanden H222-S4(p64ICL1) T1 bzw. H222-S4(p67ICL1) T5. Kultivierung in 500 ml Schüttelkolben mit 100 ml Minimalmedium Mp und 10 % Glucose bzw. 5 % Sonnenblumenöl.

Unter Verwendung der für die Produktbildung notwendigen Kulturführung mit Stickstofflimitation wurde das Produktverhältnis CS:ICS der Ausgangsstämme H222 und H222-S4 sowie der ausgewählten *ICL1* multicopy Transformanden H222-S4(p64ICL1) T1 und H222-S4(p67ICL1) T5 im Vergleich mit der single copy Transformande H222-S4(p65ICL1) T6 auf unterschiedlichen C-Quellen untersucht (vgl. **Abb. 3.1**, **Abb. 3.6**, **Tab. 3.2**). Auf Sonnenblumenöl wurde für H222 und H222-S4 nach 12 bis 19tägiger Kultivierung mit 8-10 % Sonnenblumenöl als C-Quelle ein CS:ICS-Verhältnis von durchschnittlich 60:40 (57:43 bis 65:35) bei einem Gesamtsäuregehalt (CS+ICS) von ca. 58-83 g/l gefunden. Die unter gleichen Bedingungen untersuchten ausgewählten *ICL1* multicopy Transformanden H222-S4(p64ICL1) T1 und H222-S4(p67ICL1) T5 wiesen dagegen ein deutlich günstigeres CS:ICS-Produktspektrum von durchschnittlich 93:7 bei einem vergleichbaren Gesamtsäuregehalt von 53-55 g/l auf (**Abb. 3.6**, **Tab. 3.2**). Die untersuchten multicopy Transformanden H222-S4(p64ICL1) T8, T9, T11, T12, T16, T17 und T18 wiesen nach 15 bis 18tägiger Kultivierung auf Sonnenblumenöl ein deutlich günstigeres CS:ICS Produktmuster von 94:6 bis 96:4 im Vergleich zum Rezipientenstamm H222-S4 mit 65:35 bei einem Gesamtsäuregehalt von 80-100 g/l (**Abb. 3.7**). In Abhängigkeit von

der Kulturzeit war eine moderate Schwankung des Produktmusters CS:ICS zu beobachten, die stammspezifisch unterschiedlich stark ausgeprägt war und v.a. in der frühen Produktbildungsphase auftrat. In der späteren Produktionsphase (nach etwa 170 h) kam es zur Stabilisierung der Werte.

Die beiden in diese Untersuchungen einbezogenen CS:ICS-Produktmustermutanten H181 und A1-1 (vgl. **Tab. 1.1**) zeigten ebenfalls ein im Vergleich zu den Ausgangsstämmen H222 und H222-S4 deutlich reduzierten ICS-Anteil und lagen im Bereich der *ICL1* multicopy Transformanden (**Tab. 3.2**).



**Abb. 3.7:** Produktverhältnis Citronensäure (CS) und Isocitronensäure (ICS) im Rezipientenstamm H222-S4 und verschiedenen multicopy Transformanden von H222-S4(p64ICL1) nach 15-20tägiger Kultivierung auf Sonnenblumenöl. Kultivierung in 500 ml Schüttelkolben mit Schikanen mit 100 ml Minimalmedium Mp und 8-10 % Sonnenblumenöl.

Zu einer deutlichen Reduzierung des ICS-Anteils bei den *ICL1* multicopy Transformanden kam es auch auf Glucose, Saccharose und Glycerol im Vergleich zu den Ausgangsstämmen H222 und H222-S4 (**Abb. 3.6, Tab. 3.2**). Auf diesen Substraten bilden H222 und H222-S4 ein im Vergleich zu hydrophoben Substraten bereits günstigeres Produktverhältnis CS:ICS von 88:12 bis 90:10. Bei Einsatz der multicopy Transformanden verringerte sich der ICS-Anteil auf 3-5 % (**Tab. 3.2**). Wie bereits für Sonnenblumenöl beschrieben, wurden auch für die hydrophilen C-Quellen Glucose, Saccharose und Glycerol Schwankungen des Produktverhältnisses CS:ICS in Abhängigkeit von der Kulturzeit beobachtet. In der ersten Phase der Produktbildung schwankte das Produktmuster CS:ICS im Stamm H222 auf Glucose zwischen 13-17 % ICS und stabilisierte sich in der späten Produktionsphase bei 10-12 % ICS

(**Abb. 3.6**). Dagegen betrug der ICS-Anteil in der multicopy Transformante H222-S4(p64ICL1) T1 in der frühen Produktionsphase 5-7 % und gegen Ende 3-4 %. Für die getestete single copy Transformante T6 vom Typ H222-S4(p65ICL1), in der 1-2 zusätzliche Kopien des *ICL1* Gens im Genom vorhanden ist, konnte auf den untersuchten C-Quellen Glucose und Glycerol keine Veränderung im Produktmuster festgestellt werden (**Tab. 3.2**). Die für die C-Quellen Sonnenblumenöl, Glycerol, Saccharose und Glucose gezeigte deutliche Verschiebung des Produktverhältnisses zugunsten der Citronensäure für die *ICL1* multicopy Transformanden von H222-S4 bestätigte sich auch bei Kultivierung auf Hexadecan (**Tab. 3.2**).

**Tab. 3.2:** Anteil an Isocitronensäure am Gesamtsäureprodukt (CS+ICS) mit den Ausgangsstämmen H222 und H222-S4 im Vergleich zu den *ICL1* multicopy Transformanden H222-S4(p64ICL1) T1 bzw. H222-S4(p67ICL1) T5, der *ICL1* single copy Transformante H222-S4(p65ICL1) T6 und den Mutantenstämmen H181 und A1-1 von *Y. lipolytica* auf verschiedenen Substraten. Kultivierung in 500 ml Schüttelkolben mit 100-200 ml Minimalmedium Mp und 5-10 % C-Quelle über 12-19 Tage. Für die Kultivierung auf Saccharose wurde dem Medium 50 mM KKP pH 6,8 und 0,8<sup>1)</sup> bzw. 1,7 g/l Proteose-Pepton zugesetzt.

C-Quelle	Stamm	CS+ICS (g/l)	ICS (%)
Glucose	H222	58	10-12
	H222-S4	43	9-12
	H222-S4(p65ICL1) T6	35	11
	H222-S4(p64ICL1) T1	56	4
	H222-S4(p67ICL1) T5	51	4
Glycerol	H222	21	11
	H222-S4(p65ICL1) T6	9	13
	H222-S4(p67ICL1) T5	20	5
Saccharose	H222-S4	53	10
	H222-S4(p64ICL1) T1	53	3
	H222-S4(p67ICL1) T5 <sup>1)</sup>	73	3
Sonnenblumenöl	H222	58	45
	H222-S4	83	40
	H222-S4(p64ICL1) T1	55	6
	H222-S4(p67ICL1) T5	53	8
	H181	52	5-9
Hexadecan	A1-1	77	5
	H222-S4	46	38
	H222-S4(p64ICL1) T1	44	4

Für die C-Quelle Glycerol entsprachen die ermittelten Produktverhältnisse CS:ICS für die getesteten Stämme denen auf Glucose bzw. Saccharose. Interessanterweise konnte aber, im Gegensatz zu den anderen untersuchten Substraten, mit Glycerol neben CS und ICS auch 2-Ketoglutar säure (2-KG) und Pyruvat (PY) nachgewiesen werden. Dabei wurden unabhängig vom verwendeten Stamm Konzentrationen für 2-KG von 3-5 g/l (entsprach 10-15 % am Gesamtsäureprodukt [CS+ICS+2-KG+PY]) und für Pyruvat von 0,1-0,3 g/l (entsprach 0,5-1,5 % am Gesamtsäureprodukt [CS+ICS+2-KG+PY]) bestimmt.

Der Gen-Dosis-Effekt des *ICL1* Genes führt demnach zur Erhöhung der ICL-Expression und zur Verschiebung des Produktmusters in Richtung CS. Der Anteil der ICS am Gesamtsäureprodukt fällt auf den glycolytischen C-Quellen Glucose und Saccharose sowie auf Glycerol von etwa 10 % auf 3-5 % ab. Auf den hydrophoben C-Quellen Sonnenblumenöl und Alkan war die Reduktion des ICS-Anteils von 40-50 % auf Werte um 5 % noch deutlicher. Die Produktbildungsrate war bei Einsatz der *ICL1* multicopy Transformanden mit den Ausgangsstämmen H222 und H222-S4 vergleichbar.

### 3.1.2 Einfluss von Mutationen in *ICL1* und *IDP2* auf das Produktmuster CS:ICS

Die Beeinflussung des Produktmusters CS:ICS in Richtung CS durch die Überexpression der Isocitratlyase (ICL) konnte, wie oben dargestellt, gut nachgewiesen werden. Es war von weiterem Interesse zu untersuchen, ob das Produktmuster auch in Richtung ICS beeinflusst werden kann. Dazu wurden Versuche mit Mutantensstämmen von *Y. lipolytica* durchgeführt, die entweder über keine ICL-Aktivität mehr verfügten oder eine Insertion im Gen *IDP2* (codiert für NADP-ICDH) besaßen. Die Enzyme ICL bzw. ICDH schienen für eine mögliche Beeinflussung des Produktmusters von Bedeutung zu sein, da beide Enzyme ICS als Substrat nutzen (vgl. **Abb. 1.2, Abb. 1.3**).

#### 3.1.2.1 *Charakterisierung der Mutantensstämmen*

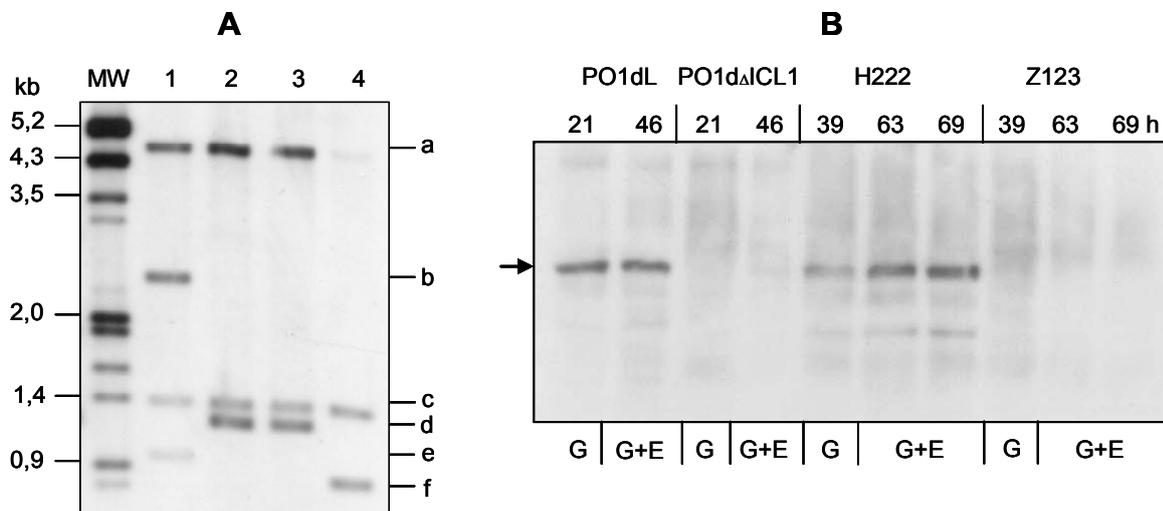
Die Insertionsmutantensstämmen *Y. lipolytica* H222-41(JMP5) Z123 (Z123) und H222-41(JMP5) N156 (N156) entstanden durch Insertion der *zeta-URA3* Mutagenesekas-

sette (MTC) aus dem Plasmid JMP5 in das Genom des *zeta* freien und Uracil-auxotrophen Stammes H222-41 (Mauersberger *et al.*, 2001). Durch die zufällige Insertion der MTC in das Genom von H222-41 entstand eine Vielzahl von Insertionsmutanten mit unterschiedlichen Phänotypen.

Die nähere Charakterisierung der Insertionsmutante Z123 ergab, dass er über keine funktionelle ICL mehr verfügt, da der Leserahmen des codierenden *ICL1* Gens aufgrund der Insertion der MTC zerstört wurde (Thevenieau *et al.*, 2006). In der Southern-Hybridisierung zeigte Z123 im Vergleich zum Wildtypstamm H222 ein verändertes Bandenmuster für das *ICL1* Gen, wodurch die Zerstörung des *ICL1* Leserahmens bestätigt werden konnte (**Abb. 3.8: A**). Erwartungsgemäß konnte in diesem Stamm keine messbare ICL-Aktivität auf den getesteten C-Quellen Glucose und Ethanol nachgewiesen werden (nicht dargestellt). Mit ausgewählten Proben der zur Bestimmung der ICL-Aktivität benutzten Proteinextrakte wurde in der Western-Hybridisierung bestätigt, dass Z123 kein ICL-Protein bildete (**Abb. 3.8 B**). Im Plattentest mit Ethanol (Et), Sonnenblumenöl (TG), Ölsäure (FS) und Alkan (Alk) zeigte Z123 erwartungsgemäß kein Wachstum, während mit Glucose (Glu) und Glycerol (Gly) als C-Quelle Wachstum erfolgte (Phänotypklasse Alk E, Thevenieau *et al.*, 2006; nicht dargestellt). Das Wachstumsverhalten von Z123 im Schüttelkolben mit den C-Quellen Glucose und Glycerol entsprach dem des Wildtypstammes H222 (**Abb. 3.9 A**).

Der Stamm PO1dNull/pINA237 (PO1d $\Delta$ ICL1) wurde als weiterer *ICL1* defekter Stamm in die Untersuchungen zur Auswirkung einer fehlenden ICL-Aktivität auf das Produktmuster einbezogen (vgl. **Tab. 2.2**). Bei PO1d $\Delta$ ICL1 handelte es sich um ein Derivat des Stammes PO1d (*leu2-270 ura3-302 xpr2-322*), bei dem der ORF des *ICL1* Gens durch das Einbringen einer das *URA3* Gen enthaltenen Genzerstörungskassette deletiert wurde (Juretzek, 1999). Der entstandene *ICL1* deletierte Stamm PO1dNull (*leu2-270 xpr2-322 icl1::URA3*) wurde nachträglich mit dem autonom replizierenden Plasmid pINA237 (enthält intaktes *LEU2* Gen; Barth und Gaillardin 1996) transformiert, um die verbleibende Leucin-Auxotrophie zu komplementieren, die Ursache für verzögertes Wachstum dieses Stammes war (Juretzek, 1999; Förster, 2001). In der **Abb. 3.8 A** ist das aufgrund der Genzerstörung hervorgerufene veränderte Bandenmuster (Banden bei 0,89 und ca. 1,3 kb) des *ICL1* Gens des Stammes PO1d $\Delta$ ICL1 im Vergleich zum Ausgangsstamm PO1dL (*LEU2 ura3-302 xpr2-322*; Leucin-Auxotrophie des Stammes PO1d mit dem integrativen Plasmid pINA62 komplementiert) dargestellt. Der Phänotyp Alk E (Et<sup>-</sup>, TG<sup>-</sup>, FS<sup>-</sup>, Alk<sup>-</sup>, Glu<sup>+</sup>,

Gly<sup>+</sup>) von PO1d $\Delta$ ICL1, die Nichtverwertung der gluconeogenetischen C-Quellen Ethanol, Ölsäure (FS) und Hexadecan (Alk) sowie das Fehlen der ICL-Aktivität und des ICL-Proteins, entsprach dem der Mutante Z123 (**Abb. 3.8 B**).



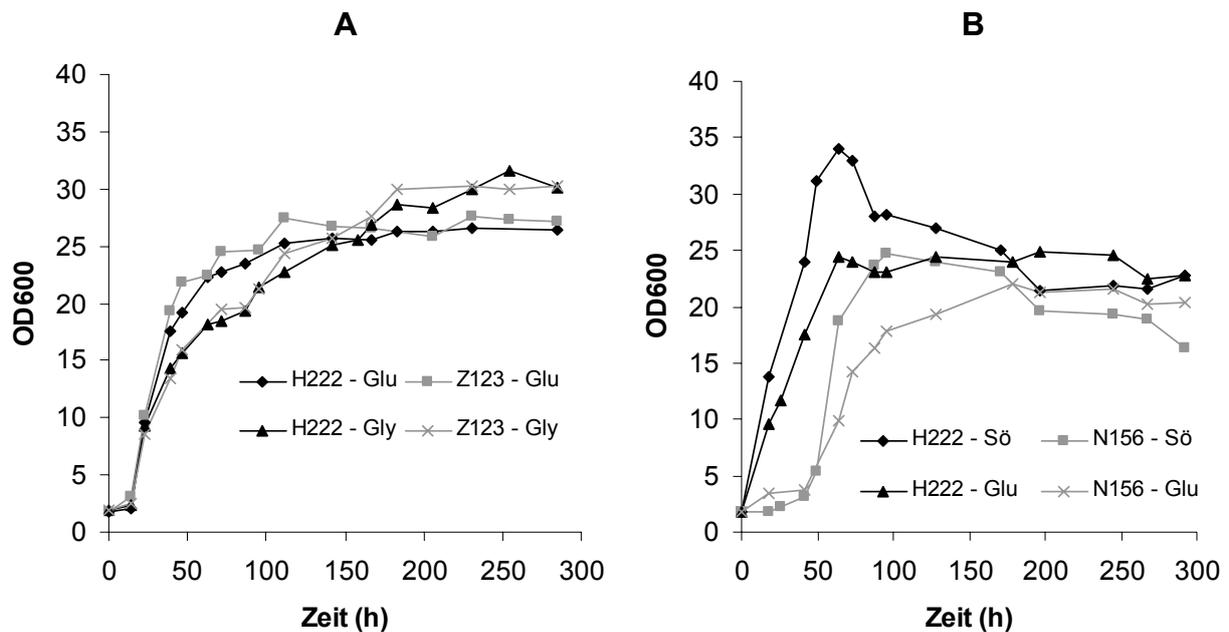
**Abb. 3.8:** (A) Nachweis der Genzerstörung des *ICL1* Gens in den Stämmen Z123 und PO1d $\Delta$ ICL1. Southern-Hybridisierung nach vollständigem Verdau der genomischen DNA mit dem Restriktionsenzym *NcoI* und Detektion spezifischer Banden mittels des 2,3 kb *BamHI* Fragmentes des *ICL1* Gens aus *Y. lipolytica*. MW - Molekulargewichtsstandard  $\lambda$ -DNA *HindIII/EcoRI*; 1 - *ICL1* defekte Insertionsmutante Z123; 2 - Wildtypstamm H222; 3 - Rezipientenstamm PO1dL; 4 - *ICL1* deletierter Stamm PO1d $\Delta$ ICL1; a, c, d - Genomische *ICL1* Fragmente bei 1,24, ca. 1,3 und 4,5 kb; b, e, f - Infolge der Genzerstörung zusätzlich auftretende Fragmente des *ICL1* Gens.

(B) Western-Hybridisierung von *Y. lipolytica* Stämmen mit intaktem *ICL1* Gen (PO1dL, H222) und defektem *ICL1* Gen (Z123, PO1d $\Delta$ ICL1). Elektrophoretische Auftrennung zellfreier Extrakte (50  $\mu$ g Protein je Probe) in der SDS-PAGE nach Laemmli (1970) und anschließender Detektion des Icl1p (MG bei 60kDa, Pfeil) im Western-Blot mit Anti-Icl1p-Antikörper. Auffallend ist das Fehlen der spezifischen Bande des Icl1p in den *ICL1* Defektstämmen Z123 und PO1d $\Delta$ ICL1. Kultivierung auf Minimalmedium Mg mit 1,4 % Glucose und 1 % Ethanol (die Zugabe von Ethanol zur Induktion der *ICL1* Expression zur Glucosekultur erfolgte nach Verbrauch der Glucose nach 40 h).

Der Insertionsmutantenstamm H222-41(JMP5) N156 (N156) wurde in die Untersuchungen einbezogen, weil Genotyp und Phänotyp (Alk leaky: Et<sup>-</sup>, TG<sup>-</sup>, FS<sup>-</sup>, Glu<sup>-</sup>, Alk<sup>+/-</sup>; Thevenieau *et al.*, 2006) dieses Stammes auf einen Defekt in der NAD- oder NADP-ICDH hinwies, weshalb Auswirkungen auf das Produktmuster CS:ICS erwartet wurden. Die mittlerweile erfolgte Sequenzierung des Insertionsortes der MTC und ihrer flankierenden Bereiche im Genom der Mutante N156 zeigte jedoch, dass der Leserahmen des Gens YALIF04095g (*IDP2* Gen) zerstört ist (Thevenieau *et al.*, 2006). Bei diesem Gen handelt es sich nicht, wie ursprünglich angenommen, um die

im TCC auftretende mitochondriale NAD-ICDH sondern um die im Cytosol lokalisierte NADP-ICDH, was aus einem Sequenzvergleich zur *S. cerevisiae* Datenbank ([www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)) hervorging. Es gab eine 85%ige Übereinstimmung zum *IDP2* Gen (YLR174w) von *S. cerevisiae*, welches für eine cytosolische NADP-ICDH codiert. Deren Hauptfunktion ist weniger mit dem Energiehaushalt der Zelle (TCC) verbunden als vielmehr mit der Biosynthese von Glutamat über die Bereitstellung von 2-Ketoglutarat. Insgesamt sind in *S. cerevisiae* 5 Isocitratdehydrogenasegene bekannt, die für 4 Isoenzyme codieren (Haselbeck und McAlister-Henn, 1991, 1993; Zhao und McAlister-Henn, 1996). Die Gene *IDP1-3* (GLR.2043 Familie) codieren für 3 NADP-abhängige Isocitratdehydrogenasen, von denen eine in den Mitochondrien (*IDP1*), eine im Cytosol (*IDP2*) und eine in den Peroxisomen (*IDP3*) lokalisiert ist. Die Gene *IDH1* und *IDH2* codieren für jeweils eine Untereinheit der in den Mitochondrien lokalisierten NAD-ICDH (Cupp und McAlister-Henn, 1992). Nach einem Modell für die Hefe *S. cerevisiae* sind beide Genprodukte von *IDH1/2* und *IDP1* an der Umsetzung von Isocitrat zu 2-Ketoglutarat innerhalb des Tricarbonsäurezyklus beteiligt und scheinen damit hauptsächlich eine für den Energiehaushalt der Zelle wichtige Funktion wahrzunehmen, wobei auf Glucose die von *IDH1/2* codierte NAD-ICDH eine höhere Aktivität aufweist als die von *IDP1* codierte NADP-ICDH, während auf nichtfermentierbaren C-Quellen beide Enzyme die gleiche Aktivität besitzen (Contreras-Shannon *et al.*, 2005). Für die peroxisomale NADP-ICDH (*IDP3*) wird die Bereitstellung von NADPH für die  $\beta$ -Oxidation als Hauptfunktion beschrieben (van Roermund *et al.*, 1998; Contreras-Shannon *et al.*, 2005). Über die Funktion der in *Y. lipolytica* vorkommenden *IDP* und *IDH* Gene ist derzeit noch wenig bekannt. Nach den durchgeführten Sequenzvergleichen mit *S. cerevisiae* wurden neben dem einmal vorhandenen *IDP2* Gen keine weiteren Homologen zu den in *S. cerevisiae* vorhandenen Genen *IDP1-3* gefunden (Thevenieau *et al.*, 2006).

Im Schüttelkolbenversuch auf den C-Quellen Glucose und Sonnenblumenöl wuchs der Stamm N156 nur in Anwesenheit von Glutamat im Medium. Dabei war eine sehr lange lag-Phase von 24-48 h zu beobachten, die im Wildtypstamm H222 nicht auftrat (**Abb. 3.9 B**). Das beobachtete Wachstumsverhalten von N156 unterstützt die Vermutung, dass es sich bei dem Genprodukt des zerstörten *IDP2* Gens (YALI0F04095g) tatsächlich um die an der Glutamat-Biosynthese beteiligte NADP-ICDH handelte.

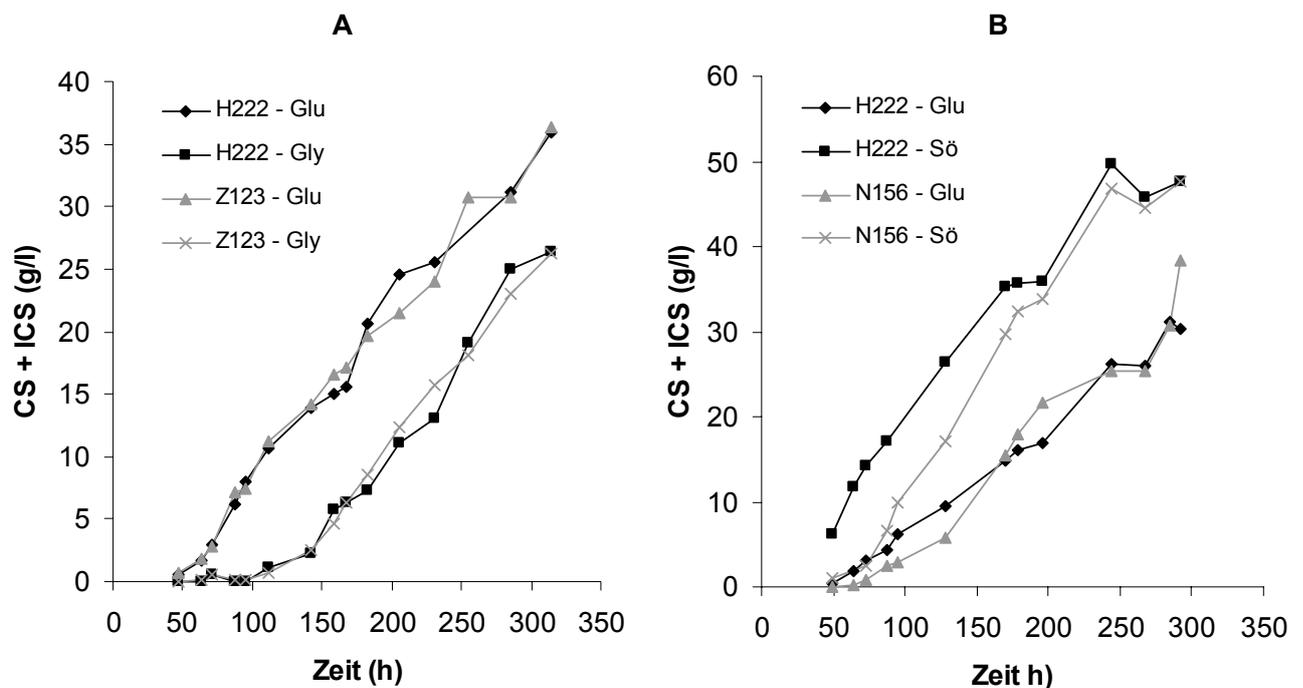


**Abb. 3.9: Wachstumsverhalten der Insertionsmutantenstämme Z123 (*ICL* defekt) und N156 (*IDP2* zerstört) im Vergleich zum Wildtypstamm H222 auf den C-Quellen Glucose (Glu), Glycerol (Gly) und Sonnenblumenöl (Sö). Die Mutante Z123 zeigte keine Unterschiede im Wachstumsverhalten zu H222 (A) während die Mutante N156 eine deutliche Wachstumsverzögerung aufwies (B). Kultivierung im 500 ml Schüttelkolben (für Sonnenblumenöl mit Schikanen) mit 100 ml Minimalmedium Mp und 10 % Glucose bzw. Glycerol und 5 % Sonnenblumenöl. Zur Kultivierung von N156 war der Zusatz von 0,01 % Glutamat zum Medium notwendig (vgl. 2.4.2.2).**

### 3.1.2.2 Produktmuster der *icl1* und *idp2* defekten Mutantenstämme

Die oben beschriebenen Mutantenstämme wurden im Vergleich zu ihren jeweiligen Ausgangsstämmen unter CS-Produktionsbedingungen (N-Limitation) auf verschiedenen C-Quellen kultiviert. In der **Abb. 3.10 A** wurde am Beispiel der *ICL* defekten Mutante Z123 die Produktion von CS auf Glucose und Glycerol im Vergleich zum Wildtypstamm H222 dargestellt. Die Abbildung macht deutlich, dass der Defekt des *ICL1* Gens keine Auswirkungen auf die Gesamtsäureproduktion hatte. Beide Stämme produzierten zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultivierung nahezu die gleichen Mengen an Gesamtsäure (**Abb. 3.10 A, Tab. 3.3**). Für den im *ICL1* Gen deletierten Stamm PO1d $\Delta$ *ICL1* ergab sich im Vergleich zu dessen Ausgangsstamm PO1dL ein ähnliches Bild. Auffallend war, dass bei der Verwendung von Glycerol als Substrat, anstelle von Glucose, die CS-Produktion deutlich später einsetzte, was durch ein verzögertes Erreichen der stationären Wachstumsphase auf dieser C-

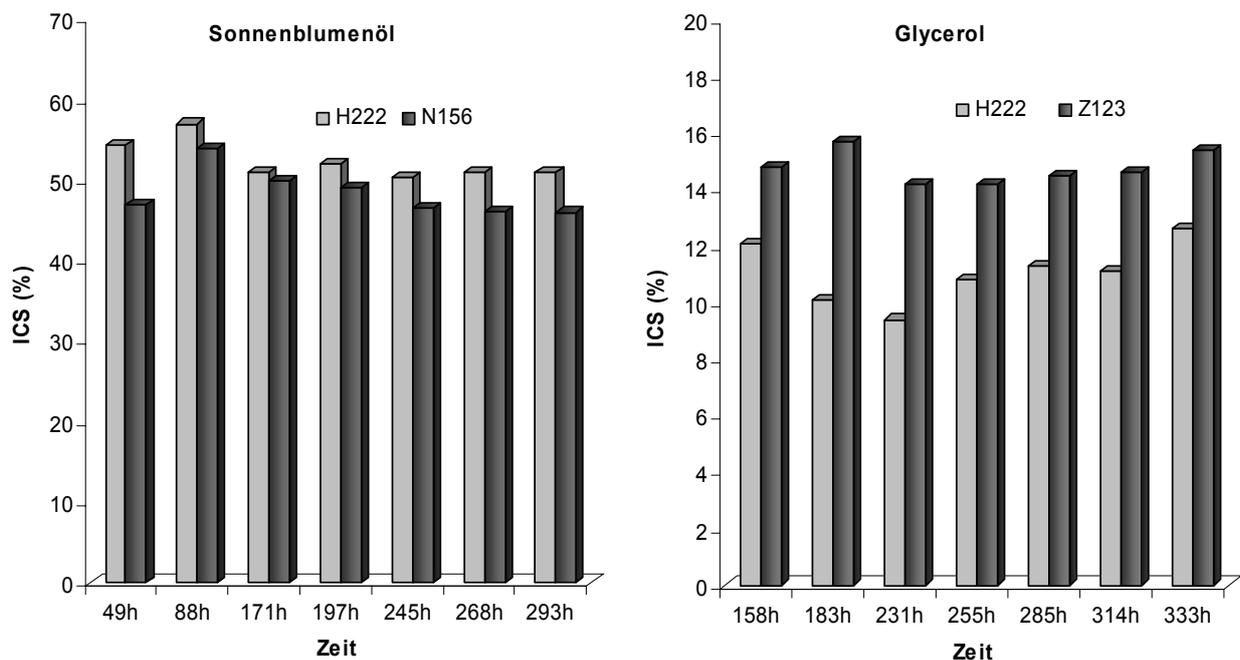
Quelle bedingt war (25 OD600 auf Glycerol erst nach etwa 120 h erreicht, auf Glucose dagegen schon nach 60-70 h; vgl. **Abb. 3.9 A**). Außerdem wurde, wie bereits unter 3.1.1.3 beschrieben, das zusätzliche Auftreten geringer Mengen an Pyruvat und Malat (bis 0,3 g/l) sowie 2-Ketoglutarat (bis 2 g/l) als zusätzlich auftretende Nebenprodukte beobachtet.



**Abb. 3.10: Vergleich der CS-Produktion der ICL defekten Mutante Z123 (A) und der ICDH defekten Mutante N156 (B) mit dem Wildtypstamm H222 auf den C-Quellen Glucose (Glu), Glycerol (Gly) oder Sonnenblumenöl (Sö).** Kultivierung in 500 ml Schüttelkolben (bei Verwendung von Sö mit Schikanen) mit 100 ml Minimalmedium Mp mit 10 % Glucose bzw. Glycerol und 5 % Sonnenblumenöl. Zur Kultivierung von N156 war der Zusatz von 0,01 % Glutamat zum Medium notwendig (vgl. 2.4.2.2).

Die *idp2*-defekte Mutante N156 zeigte im Vergleich zum Wildtypstamm H222 vor allem zu Produktionsbeginn eine geringere Produktivität (**Abb. 3.10 B**). Dies war am auffälligsten mit Sonnenblumenöl als Substrat, wo bis zu einem Zeitpunkt von etwa 150 h die Produktkonzentration deutlich hinter der des Stammes H222 lag. Die Ursache dafür war die bereits unter 3.1.2.1 diskutierte Wachstumsverzögerung in der Mutante N156 aufgrund des *idp2*-Defektes, wodurch der Stamm später in die N-Limitation geriet, welche Auslöser der Sekretion von CS war (**Abb. 3.10 B**). Zum Ende der Kultivierung erreichten aber sowohl die Mutante N156 als auch H222 nahezu gleiche Produktkonzentrationen (**Abb. 3.10 B, Tab. 3.3**).

Sowohl die fehlende ICL-Aktivität als auch der *idp2*-Defekt führten zu einer Veränderung des Produktmusters CS:ICS der jeweiligen Mutantenstämme im Vergleich zum Ausgangsstamm (**Abb. 3.11, Tab. 3.3**). Der Defekt im *ICL1* Gen in den Stämmen Stämme Z123 und PO1 $\Delta$ ICL1 resultierte in einer Erhöhung des ICS-Anteils am Gesamtsäureprodukt (CS+ICS). Im Stamm Z123 lag der ICS-Anteil auf Glucose mit durchschnittlich 19-20 % etwa 5 Prozentpunkte über dem des Elternstammes H222 mit 14-15 %. Dabei muss erwähnt werden, dass der ICS-Anteil im Stamm H222 unter diesen Versuchsbedingungen etwas über den normalerweise beobachteten Werten von 10-12 % lag (vgl. **Tab. 3.2**). Mit Glycerol als Substrat konnten die Befunde für die Änderung des Produktverhältnisses CS:ICS im Stamm Z123 bestätigt werden (**Tab. 3.3, Abb. 3.11**). Für den ICL1-defekten Stamm PO1 $\Delta$ ICL1 konnte im Vergleich zu dessen Ausgangsstamm PO1 $\Delta$ L ebenfalls die Erhöhung des ICS-Anteils auf Glucose gezeigt werden, wenngleich die Steigerung moderater ausfiel verglichen zu Z123 (**Tab. 3.3**).



**Abb. 3.11:** Unterschiede im Isocitratanteil am Gesamtsäureprodukt (CS+ICS) am Beispiel des NADP-ICDH-defekten Stammes N156 und des ICL-defekten Stammes Z123 im Vergleich zum Wildtypstamm H222 auf den C-Quellen Sonnenblumenöl (5 %) bzw. Glycerol (10 %). Kultivierung im 500 ml Schüttelkolben (für Sonnenblumenöl mit Schikanen) mit 100 ml Minimalmedium Mp.

Der *idp2*-Defekt führte im Insertionsmutantenstamm N156 zu einer Reduzierung des ICS-Anteils im Vergleich zum Wildtypstamm H222 (**Tab. 3.3, Abb. 3.11**). Mit Glucose als Substrat lag der ICS-Anteil am Gesamtsäureprodukt (CS+ICS) im Stamm N156 bei durchschnittlich 11 %, in H222 dagegen bei 13 %, wobei in Abhängigkeit von der Kulturzeit teilweise ausgeprägtere Unterschiede zwischen beiden Stämmen zu erkennen waren (N156 11 %, H222 16 %). Mit Sonnenblumenöl als C-Quelle wurde ebenfalls eine geringfügige Absenkung des ICS-Anteils mit dem *idp2*-defekten Stamm N156 gefunden (N156: durchschnittlich 48 % ICS, Wildtypstamm H222: durchschnittlich 54 %; **Tab. 3.3, Abb. 3.11**).

**Tab. 3.3: Isocitratanteil am Gesamtsäureprodukt der Mutantenstämmen Z123, PO1d $\Delta$ ICL und N156 im Vergleich zu den jeweiligen Ausgangsstämmen auf verschiedenen C-Quellen.**

Für Glucose und Glycerol sind die Daten aus mehreren Versuchen zusammengefasst. Die in Klammern dargestellten Zahlen geben den Mittelwert aller während der Kultivierung gemessenen ICS-Werte wieder, während die anderen den Gehalt zum Zeitpunkt der höchsten Produktkonzentration zeigen. \*ICS-Konzentration auf Glucose mit 14-15 % relativ hoch im Vergleich zu sonstigen Versuchen mit 10-12 %. Kultivierung in 500 ml Schüttelkolben mit 100 ml Minimalmedium Mp mit 7-10 % Glucose bzw. Glycerol und 5 % Sonnenblumenöl. Alk<sup>+</sup> - gutes Wachstum auf Alkan, AlkE – kein Wachstum auf Alkan, Alk leaky – verzögertes Anwachsen auf Alkan

Stamm	Phänotyp	C-Quelle	CS+ICS (g/l)	ICS (%)
H222	ICL1, Alk <sup>+</sup>	Glucose	44-52	14 [15]*
Z123	$\Delta$ ICL1, AlkE		49-60	19 [20]
PO1dL	ICL1, Alk leaky		26-53	10 [11]
PO1d $\Delta$ ICL	$\Delta$ ICL1, AlkE		37-56	13 [13]
H222	ICL1, Alk <sup>+</sup>	Glycerol	36-40	11 [10]
Z123	$\Delta$ ICL1, AlkE		28-46	14 [14]
H222	ICL1, Alk <sup>+</sup>	Glucose	38-40	16 [13]
N156	$\Delta$ <i>idp2</i> , Alk leaky		43-48	11 [11]
H222	ICL1, Alk <sup>+</sup>	Sonnenblumenöl	100	50 [54]
N156	$\Delta$ <i>idp2</i> , Alk leaky		88	46 [48]

Während die Überexpression der ICL durch einen Gen-Dosis-Effekt zu einer deutlichen Verschiebung des Produktmusters CS:ICS auf allen getesteten Substraten in Richtung CS führte (ICS-Anteil 3-8 %), kam es durch das Ausschalten von *ICL1* zu einer Anhebung des ICS-Anteils um ca. 4-5 Prozentpunkte.

Der Defekt im *IDP2* Gen führte dagegen zu einem geringfügigem Abfall des ICS-Anteils am Gesamtsäureprodukt.

### 3.2 Gewinnung von Citronensäure aus Saccharose

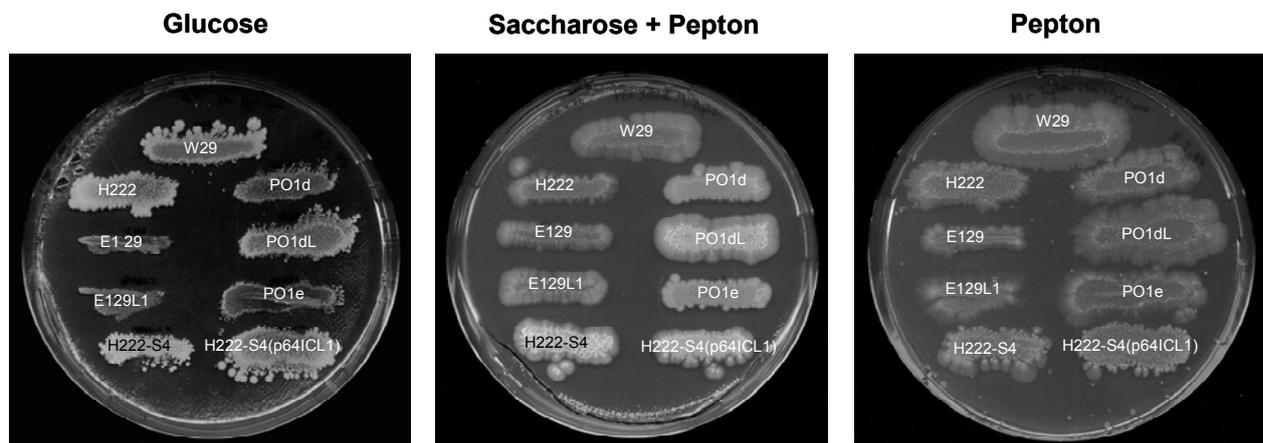
Zur Erweiterung des Substratspektrums bei der Produktion von CS mit der Hefe *Y. lipolytica* wurden rekombinante Stämme erzeugt, die zur Saccharoseverwertung befähigt sind und die Möglichkeit der Gewinnung von CS aus Saccharose untersucht. Bisher war die Nutzung von Saccharose als alleinige C-Quelle für die Produktion von CS mit *Y. lipolytica* noch nicht beschrieben worden.

Wildtypstämme von *Y. lipolytica* können normalerweise das Disaccharid Saccharose nicht als Substrat nutzen, weil sie nicht über das zur Spaltung der Saccharose notwendige Enzym Invertase verfügen. Die Möglichkeit der heterologen Expression der Invertase in *Y. lipolytica* und seine Nutzung als Selektionsmarker für die Transformation war bereits von Nicaud *et al.* (1989) demonstriert worden. Dazu wurde das *ScSUC2* Gen aus *S. cerevisiae* unter die Kontrolle des Promotors und der Sekretionssequenz des homologen Genes *XPR2*, welches für die extrazelluläre alkalische Protease von *Y. lipolytica* kodiert, gesetzt. Die integrative Transformation von Laborstämmen mit den entsprechenden Plasmiden pINA169 oder pINA302 führte zu rekombinanten Stämmen, die unter bestimmten Kulturbedingungen Saccharose verwerten konnten (vgl. Barth und Gaillardin, 1996). Die Mediumsbedingungen mussten dabei auf den die Invertaseexpression regulierenden *XPR2* Promotor abgestimmt werden, dessen Derepression bei pH-Werten >5,5 und dessen Induktion durch den Zusatz von Proteose-Pepton erreicht wurde (Ogrydziak *et al.*, 1977; Madzak *et al.*, 1999; Madzak *et al.*, 2000).

Durch integrative Transformation des vom Wildtypstamm H222 abgeleiteten Stammes H222-41 (*ura3-41*) mit dem *Sal I* Fragment aus dem Plasmid pINA302 (enthält die Expressionskassette *pXPR2-ssXPR2-SUC2*, flankiert von *URA3* Fragmenten) und anschließender Selektion auf Saccharoseverwertung entstand der Stamm H222-S4 (*ura3-302*). Dieser Stamm enthielt ein durch die Insertion der *SUC2* Expressionskassette zerstörtes *URA3* Gen (nicht revertierendes *ura3-302* Allel) und war mit integrativen und replikativen Plasmiden mit *URA3* als Markergen gut transformierbar (Mauersberger *et al.*, 2001). Durch die integrative Transformation von H222-S4 mit den multicopy Plasmiden p64ICL1 und p67ICL1 entstanden die zur Überexpression der Isocitratlyase (*ICL1*) befähigten Transformanden vom Typ H222-S4(p64ICL1) bzw. H222-S4(p67ICL1) (vgl. Kapitel 3.1.1 und **Tab. 2.2**). Diese Transformanden wurden später aufgrund ihres gegenüber H222-S4 günstigen Produktmusters und ihrer Prototrophie für die weiteren Untersuchungen zur CS-Produktion aus Saccharose eingesetzt.

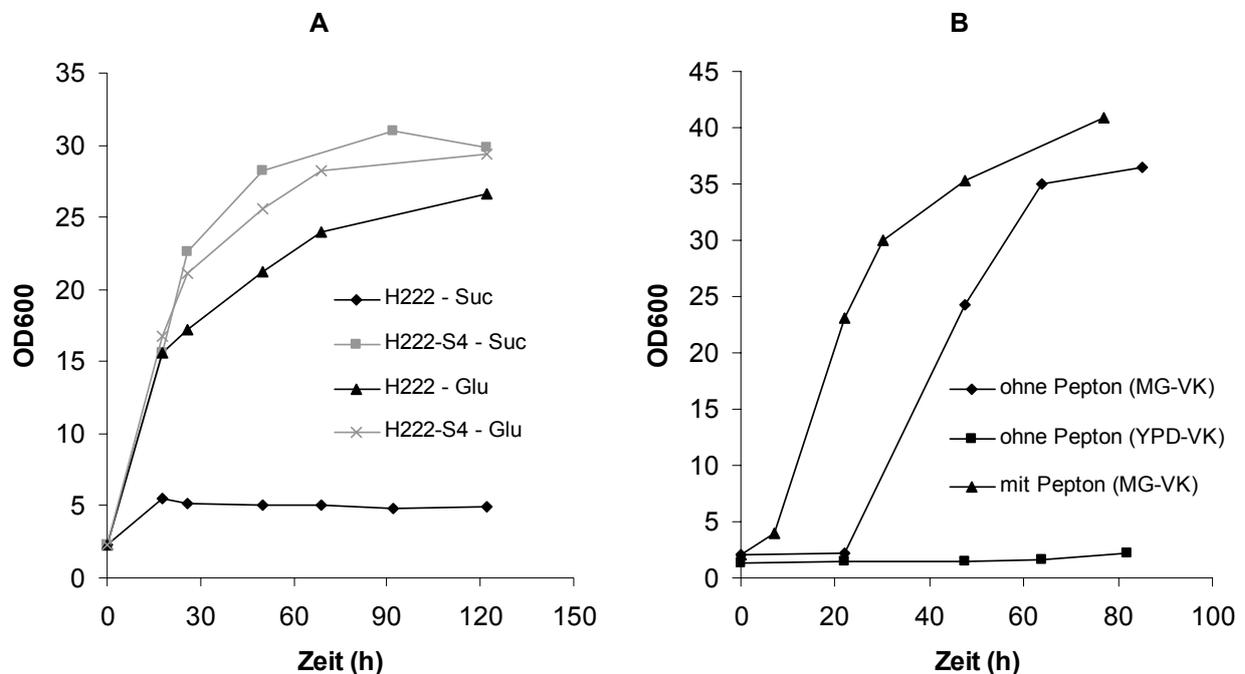
### 3.2.1 Wachstum von rekombinanten *Y. lipolytica* Stämmen auf Saccharose

In **Abb. 3.12** ist das Wachstumsverhalten der rekombinanten saccharoseverwertenden ( $\text{Suc}^+$ ) *Y. lipolytica* Stämme H222-S4, PO1d, PO1dL, PO1e, E129, E129L1 sowie der *ICL1* multicopy Transformante H222-S4(p64ICL1) T1 auf Saccharose, Glucose und Pepton (als Kontrolle) im Plattentest dargestellt. Zum Vergleich wurden die beiden nicht zur Saccharoseverwertung befähigten Wildtypstämme H222 und W29 in diesen Test mit einbezogen. Auf Minimalmedium Mg mit 1 % Glucose als C-Quelle und den Zusätzen Lysin, Leucin und Uracil zeigten alle getesteten Stämme gutes Wachstum. Die Wachstumsverzögerungen der Stämme PO1d (*leu ura*), E129 (*leu lys ura*) und E129L1 (*lys ura*) wurden durch deren Leucin- bzw. Lysin-Auxotrophien verursacht. Auf Minimalmedium M mit 1 % Saccharose als C-Quelle zeigten die Wildtypstämme H222 und W29 lediglich ein geringes Wachstum durch die Verwertung des im Medium zur Induktion des *XPR2* Promotors vorliegenden Peptons. In den rekombinanten  $\text{Suc}^+$ -Stämmen war dagegen die Saccharoseverwertung deutlich durch das kräftige Anwachsen der Impfstriche nachweisbar. Besonders gutes Wachstum zeigten der Stamm H222-S4 und die *ICL1* multicopy Transformante H222-S4(p64ICL1) T1.



**Abb. 3.12: Plattentest zum Nachweis der Saccharoseverwertung mit verschiedenen Stämmen von *Y. lipolytica*.** Zu erkennen ist das Wachstum der rekombinanten  $\text{Suc}^+$ -Stämme H222-S4, H222-S4(p64ICL1) T1, PO1d, PO1dL und PO1e sowohl auf Glucose (1 %) als auch auf Saccharose (1 %) während die Wildtypstämme H222 und W29 sowie die Stämme E129 und E129L1 auf Saccharose nur Restwachstum zeigen. Das dem Medium Mg zugesetzte Proteose-Pepton (1,7 g/l) zur Induktion des *pXPR2* verursachte ein geringes Anwachsen aller Stämme.

In der **Abb. 3.13 A** ist der Vergleich des Wachstumsverhaltens des rekombinanten  $\text{Suc}^+$ -Stammes H222-S4 mit dem Wildtypstamm H222 auf Saccharose bzw. Glucose in Submerskulturen im Schüttelkolben dargestellt. Das Wachstumsverhalten des Stammes H222-S4 auf Saccharose entsprach dabei dem auf Glucose. Der Wildtypstamm H222 wuchs dagegen erwartungsgemäß auf Saccharose nicht an, die Biomasse stagnierte nach Verbrauch des Peptons. Die erhaltenen Ergebnisse für den Stamm H222-S4 unter den Bedingungen des Schüttelkolbens zeigten, dass die zur Saccharoseverwertung notwendige Expression der Invertase offenbar zu keinen wesentlichen Verzögerungen des Anwachsens im Vergleich zu Glucose führt.



**Abb. 3.13: (A): Vergleich des Wachstums des rekombinanten Stammes H222-S4 zum Wildtypstamm H222 auf 10 % Saccharose (Suc) bzw. Glucose (Glu).** Erwartungsgemäß stagnierte das Wachstum im Stamm H222 auf Saccharose nach Verbrauch des zur  $pXPR2$  Induktion zugesetzten Peptons. Kultivierung im 500 ml Schüttelkolben mit 100 ml Minimalmedium Mp, 50 mM KKP pH 6,8 und 1,7 g/l Pepton.

**(B): Einfluss des Zusatzes von Pepton auf das Wachstumsverhalten des Stammes H222-S4(p67ICL1) T5 während der Kultivierung auf Saccharose.** Die Derepression des  $XPR2$  Promotors über die Einstellung des pH-Wertes auf 6,8 (KKP) ermöglichte nach einer ca. 24stündigen lag-Phase das Wachstum auf Saccharose auch ohne den Zusatz von Pepton. Die Art der Vorkultur (Vollmedium – YPD, Minimalmedium – MG) hatte entscheidenden Einfluss auf die Dauer der lag-Phase. Kultivierung im 500 ml Schüttelkolben mit 100 ml Minimalmedium Mp, 50 mM KKP pH 6,8, mit oder ohne 0,8 g/l Pepton.

In der Literatur wurde das Wachstum der oben beschriebenen, durch Integration der Expressionskassette *pXPR2-ssXPR2-SUC2* erzeugten, rekombinanten *Y. lipolytica* Stämme auf Saccharose bisher nur unter den Bedingungen der Induktion (1,7 g/l Pepton) bei gleichzeitiger Derepression (pH>5,5 durch Zusatz von KPP, pH 6,8) des *XPR2* Promotors beschrieben (Nicaud *et al.*, 1989; Wojtatowicz *et al.*, 1997).

Aus Plattentests zum Nachweis der Saccharoseverwertung unter verschiedenen Bedingungen gab es jedoch erste Hinweise darauf, dass Wachstum auch ohne Pepton-Zusatz allein durch die Einstellung des pH-Wertes im Medium um 6,8 erfolgen kann. Die Möglichkeit der Kulturführung von *Y. lipolytica* Stämmen auf Saccharose ohne Zusatz von Pepton wurde in Submerskultur überprüft. Dazu wurde der Stamm H222-S4(p67ICL1) T5 im Schüttelkolben unter Wachstums- und CS-Produktionsbedingungen (1 bzw. 3 g/l Ammoniumsulfat) kultiviert. In allen Ansätzen wurde der pH-Wert des Mediums durch die Zugabe von 50 mM KKP auf 6,8 eingestellt, nur einem Ansatz wurde Pepton (0,8 g/l) zugesetzt. Zusätzlich sollte der Einfluss der Vorkultur (VK) auf das Wachstum in der Hauptkultur (HK) geprüft werden. Dabei wurde entweder Vollmedium (YPD) oder Minimalmedium mit Glucose (MG) als Vorkultur zum Animpfen der Hauptkultur verwendet.

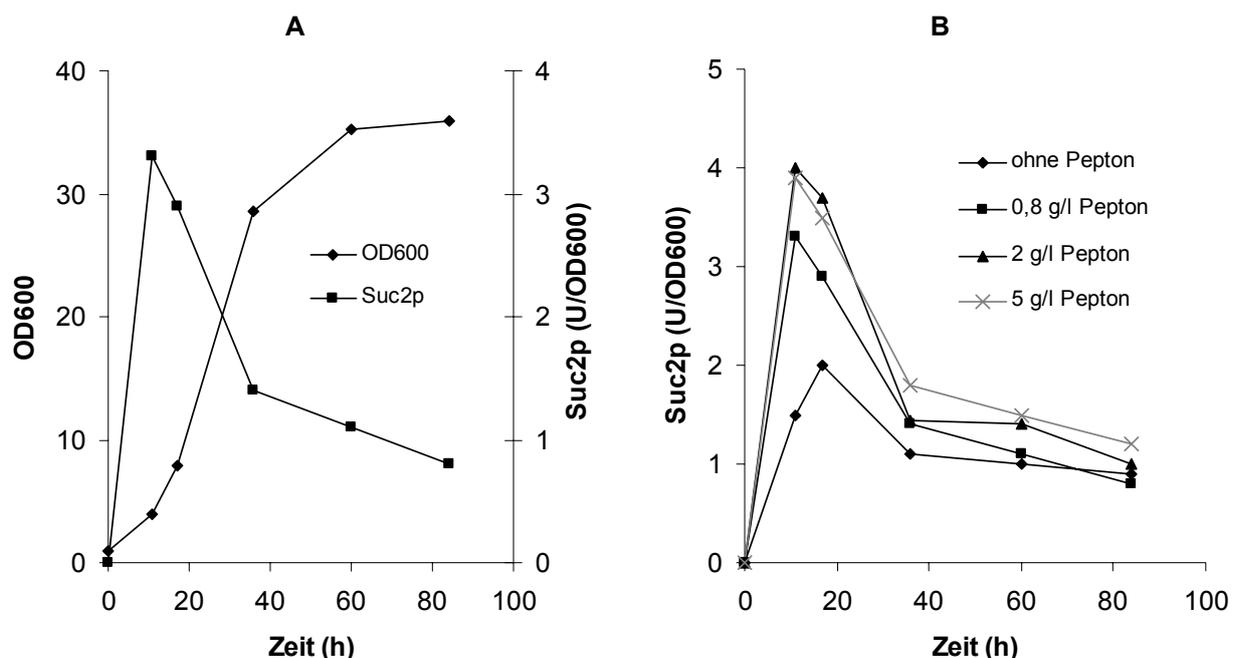
Der Zusatz von Pepton zum Medium führte zu einem deutlich schnelleren Anwachsen der Kultur auf Saccharose ohne erkennbare Verzögerungen, ohne Pepton wuchsen die Kulturen mit einer ausgeprägten lag-Phase von ca. 20 h (**Abb. 3.13 B**). In der darauf folgenden Wachstumsphase wurden jedoch kaum Unterschiede in der Wachstumsrate zwischen beiden Kulturbedingungen beobachtet.

Interessanterweise beeinflusste die Art der Vorkultur das Ausmaß der lag-Phase. Für den mit der Minimalmediumvorkultur gestarteten Ansatz begann das Anwachsen nach der oben erwähnten lag-Phase von etwa 20 h (**Abb. 3.13 B**). Danach wuchsen die Kulturen zügig an (vergleichbar mit der HK mit Pepton) und erreichten nach ungefähr 60-70 h die stationäre Phase, hervorgerufen durch den Mangel an Stickstoff. Im Gegensatz dazu konnte in dem mit der YPD-VK angeimpften Ansatz, das allmähliche Anwachsen der Zellen erstmals nach einer 70-80 h langen lag-Phase registriert werden (**Abb. 3.13 B**). In dieser Zeit war der mit der MG-VK gestartete Ansatz bereits in der stationären Phase angelangt. Diese Beobachtung war überraschend, da die im YPD-Medium enthaltene hohe Peptonkonzentration von 2 % den *XPR2* Promotor stark induzieren sollte und demzufolge auch die Invertase exprimiert werden müsste. Der hier dargestellte Wachstumsversuch in Submerskultur hat ge-

zeigt, dass die Invertaseexpression und damit die Verwertung von Saccharose durch rekombinante *Y. lipolytica* Stämme auch ohne Zusatz von Pepton allein über die Regulation des pH-Wertes möglich waren.

### 3.2.2 Regulation der Invertaseexpression

Zum besseren Verständnis des Wachstumsverhaltens der rekombinanten *Y. lipolytica* Stämme auf Saccharose war es von Bedeutung, den Expressionsverlauf und die Abhängigkeit der Invertaseaktivität von den Kulturbedingungen näher zu untersuchen. Insbesondere sollten Erkenntnisse darüber gewonnen werden, wie die eingesetzte Peptonkonzentration und der pH-Wert die Invertaseexpression beeinflussen. In der **Abb. 3.14** sind ein Teil der Ergebnisse zum Einfluss der Peptonkonzentration auf die Invertaseexpression dargestellt.



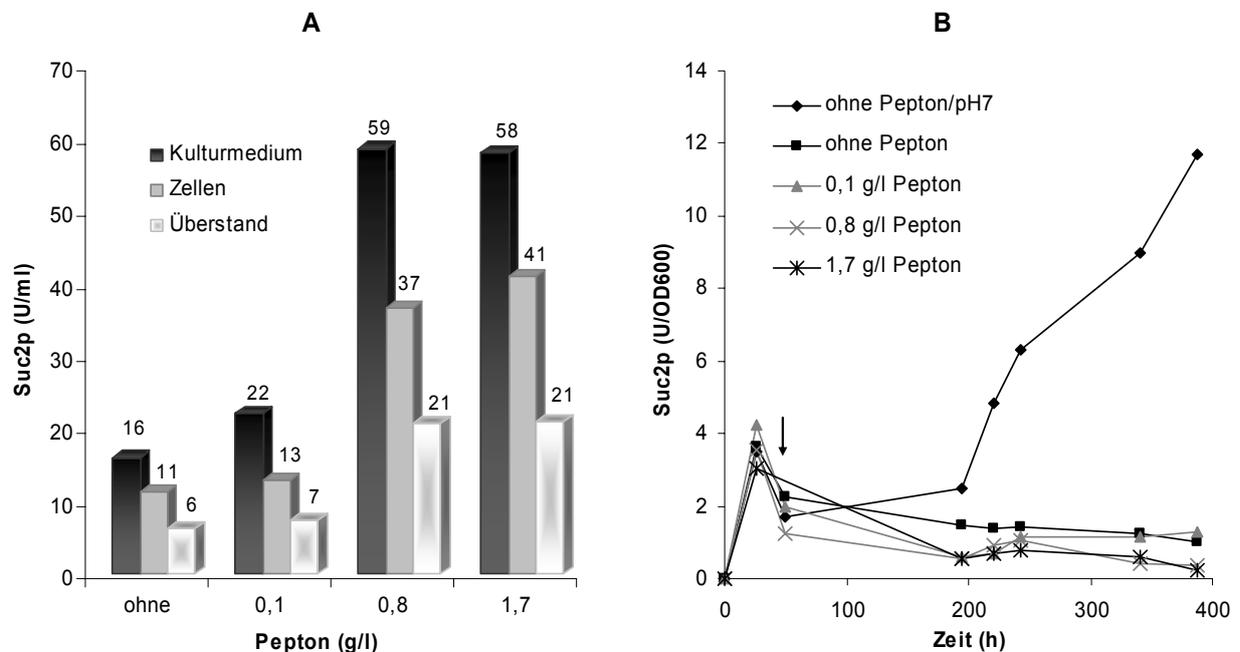
**Abb. 3.14:** Expressionsverlauf der Invertase (A) und Abhängigkeit der Expressionshöhe von der Peptonkonzentration in Medium (B) während der Kultivierung des Stammes H222-S4(p671CL1) T5 auf Saccharose unter Produktionsbedingungen. Kultivierung in 500 ml Schüttelkolben mit 100 ml Minimalmedium Mg, 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,8 und insgesamt 4 % Saccharose. Die Startkonzentration für Saccharose betrug 1 %. Während der Kultivierung wurde mehrfach Saccharose nachgefüttert. Der pH wurde im Kulturverlauf nicht nachgeregelt. Suc2p = biomassespezifische Invertaseaktivität, Bestimmung der Gesamtaktivität in der Kulturflüssigkeit (ganze Zellen).

Der Stamm H222-S4(p67ICL1) T5 wurde unter Produktionsbedingungen mit verschiedenen Peptonkonzentrationen kultiviert und die Invertaseaktivität als biomasse-spezifische Aktivität (Suc2p/OD600) bestimmt. Im Gegensatz zu den sonstigen Produktionsbedingungen im Schüttelkolben betrug die Startkonzentration an Saccharose 1 % (anstatt 7-10 %). Während der Kultivierung erfolgte täglich die Zugabe von 1 % Saccharose. Dieses Vorgehen war erforderlich, um die Akkumulation der entstehenden Glucose im Medium zu verhindern, welche den zur Bestimmung der Invertaseaktivität eingesetzten Test beeinflusst hätte.

Der Expressionsverlauf der Invertase am Beispiel des Ansatzes mit 0,8 g/l Pepton zeigte, dass die höchste Aktivität innerhalb des ersten Drittels (0-15 h) der exponentiellen Wachstumsphase vorlag (**Abb. 3.14 A**). Im weiteren Wachstumsverlauf ging die Aktivität bereits wieder deutlich zurück. Unter diesen Kulturbedingungen wurde eine pH-Statierung durch den zugesetzten Kaliumphosphatpuffer (pH 6,8) nur in der ersten Wachstumsphase gewährleistet. Durch das Wachstum der Hefen im Minimalmedium nahm der pH-Wert dann stark ab (Säuerung bis pH < 4). Das und der rasche Verbrauch des den *pXPR2* induzierenden Peptons sind die Ursache für schnelle die Abnahme der Invertaseexpression noch während der exponentiellen Wachstumsphase.

Der Einfluss der Peptonkonzentration im Medium auf die Invertaseaktivität ist in **Abb. 3.14 B** dargestellt. Der Zusatz von Pepton (0,8, 2 und 5 g/l) führte zur Steigerung der maximalen Expressionshöhe der Invertase. Im Vergleich zum Ansatz ohne Pepton lagen die Messwerte 11 h nach Kultivierungsstart in den Ansätzen mit Pepton mit 3-4 U/OD600 etwa 2,5fach, nach 17 h Kultivierung immer noch durchschnittlich 1,7fach höher. Die Steigerung der Invertaseexpression war bis zu 2 g/l Pepton deutlich, eine Peptonkonzentration von 5 g/l führte jedoch zu keiner weiteren Erhöhung der maximalen Invertaseaktivität. Es war jedoch ersichtlich, dass jeweils der Ansatz mit der höheren Peptonkonzentration auch eine geringfügig höhere Enzymaktivität aufwies (**Abb. 3.14 B**, 40-80 h). Im Ansatz ohne Pepton war die Invertaseaktivität deutlich geringer im Vergleich zu den Ansätzen mit Pepton, was sich auch im verzögerten Anwachsen der Kultur widerspiegelte.

In Proben aus verschiedenen Kultivierungen des Stammes H222-S4(p67ICL1) T5 auf Saccharose (**Abb. 3.14**, **Abb. 3.15**) wurde die Verteilung der Invertaseaktivität zwischen ganzen Zellen und dem zellfreien Kulturüberstand untersucht und mit der Gesamtaktivität in der Kulturflüssigkeit verglichen (**Abb. 3.15 A**).



**Abb. 3.15:** Verteilung der Invertaseaktivität zwischen Zellen und zellfreiem Kulturmedium (A) und Verlauf der Expression der Invertase (B) während der Kultivierung des *Y. lipolytica* Stammes H222-S4(p67ICL1) T5 mit insgesamt 10 % Saccharose unter Stickstofflimitationsbedingungen im Schüttelkolben.

Kultivierung im 500 ml Schüttelkolben mit 100 ml Minimalmedium Mp, 50 mM KKP pH 6,8 und variierenden Peptonkonzentrationen. Die Startkonzentration an Saccharose betrug 2 %. Während der Kultivierung wurde Saccharose mehrfach nachdosiert. Die Verteilung der Invertaseaktivität (A) ist für Proben nach 26 h Kultivierung dargestellt. Die Invertaseaktivitäten wurden auf 1 ml Kulturflüssigkeit berechnet. Pfeil – Zeitpunkt der erstmaligen pH-Nachstellung im Ansatz ohne Pepton. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Danach fanden sich von 100 % Aktivität im Kulturmedium (Zellen + zellfreier Kulturüberstand) 60-70 % an die Zellen gebunden und 30-40 % im zellfreien Kulturüberstand wieder (**Abb. 3.15 A**). Über den gesamten untersuchten Kultivierungszeitraum wurden keine Veränderungen an diesem Verhältnis festgestellt. Unterschiede in der Verteilung der Invertaseaktivität zwischen den Ansätzen mit und ohne Pepton wurden nicht festgestellt.

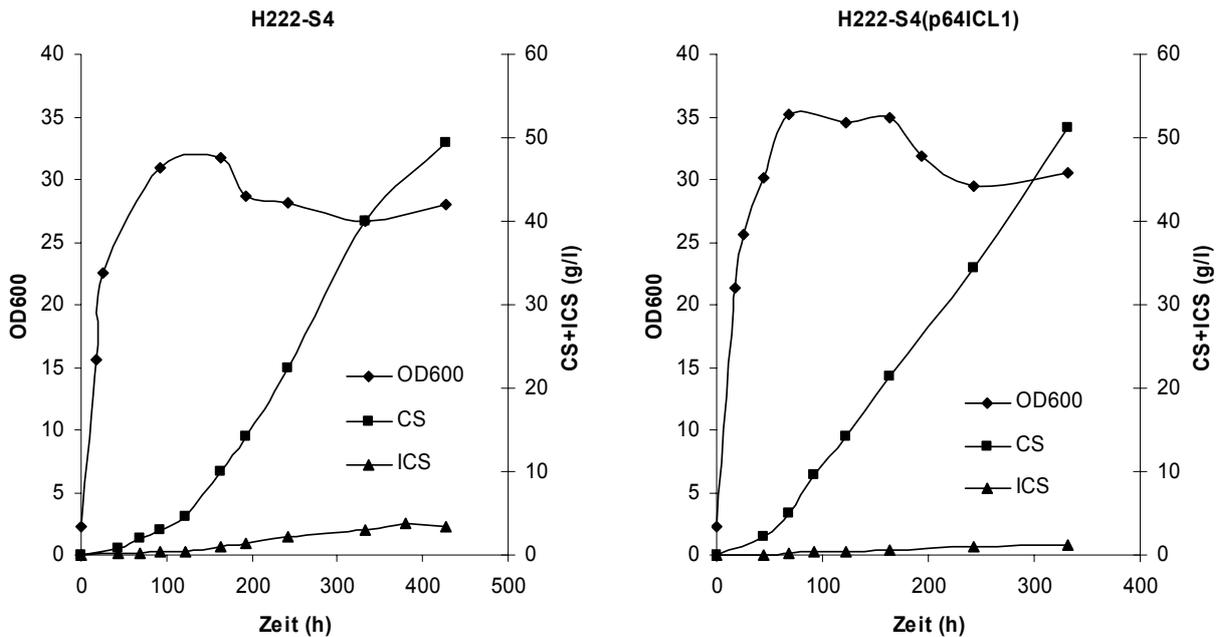
Der Einfluss des pH-Wertes im Medium auf Verlauf und Höhe der Invertaseexpression ist in der **Abb. 3.15 B** dargestellt. Drei Ansätzen wurden verschiedene Konzentrationen an Pepton (0,1, 0,8 und 1,7 g/l) zugesetzt, zu zwei weiteren Ansät-

zen wurde kein Pepton zugegeben. Während des Wachstums der Zellen und später aufgrund der CS-Sekretion fällt der pH-Wert im Medium von anfangs 6,8 (Zusatz von KPP) auf Werte um 3-4. Während der pH-Wert im gesamten Kultivierungsverlauf durch Laugetitration in allen Ansätzen auf ca. 5-5,5 eingestellt wurde, erfolgte in einem der beiden Ansätze ohne Pepton (ohne Pepton/pH 7) die Einstellung auf ca. 7. Der Pfeil in der **Abb. 3.15 B** zeigt den Zeitpunkt an, ab dem in diesem Ansatz der pH-Wert erstmals von etwa 4 auf 7 hochgestellt und durch regelmäßige Laugentitration dort statiert wurde. Wie bereits dargestellt, nimmt die Invertaseaktivität noch während der exponentiellen Wachstumsphase wieder ab, wenn das Pepton verbraucht ist und der pH auf Werte unter 5 fällt (vgl. **Abb. 3.14**, **Abb. 3.15 B**). In den nicht auf pH 7 eingestellten Ansätzen sank daher erwartungsgemäß die Aktivität der Invertase nach einem Maximum bei etwa 20 h wieder deutlich ab und blieb über den gesamten restlichen Kulturverlauf niedrig. Im auf pH 7 statierten Ansatz dagegen konnte ein steter Anstieg der Invertaseaktivität über den gesamten Kulturverlauf verzeichnet werden. Die maximal erreichte Aktivität am Kulturende lag mit etwa 12 U/OD600 sogar 3fach über der Maximalaktivität des Ansatzes mit 1,7 g/l Pepton (**Abb. 3.15 B**).

### 3.2.3 Produktion von Citronensäure aus Saccharose im Schüttelkolben

Unter den für *Y. lipolytica* günstigen Bedingungen der Limitation des Wachstums durch den Ammoniumstickstoffgehalt wurde die Bildung der Produkte CS und ICS unter Verwendung von Saccharose als C-Quelle untersucht und mit Glucose verglichen (**Tab. 3.4**). In die ersten Untersuchungen wurden die Stämme H222, H222-S4 und die *ICL1* multicopy Transformante H222-S4(p64ICL1) T1 einbezogen. Das verwendete Kulturmedium entsprach dabei den für die Art dieser rekombinanten Stämme beschriebenen Bedingungen (Nicaud *et al.*, 1989; Wojtatowicz *et al.*, 1997) und enthielt 1,7 g/l Pepton (Induktion des *pXPR2*) und 50 mM KKP pH 6,8 (De-repression des *pXPR2*).

Die **Abb. 3.16** zeigt einen typischen Verlauf des Wachstums- und Produktbildungsverhaltens der Hefe *Y. lipolytica* am Beispiel der Stämme H222-S4 und H222-S4(p64ICL1) T1.



**Abb. 3.16:** Kinetik des Wachstums und der Produktbildung für die Stämme H222-S4 und die *ICL1* multicopy Transformante H222-S4(p64ICL1) T1 auf 10 % Saccharose. Kultivierung im 500 ml Schüttelkolben mit 100 ml Minimalmedium Mp, 50 mM KKP pH 6,8 und 1,7 g/l Pepton.

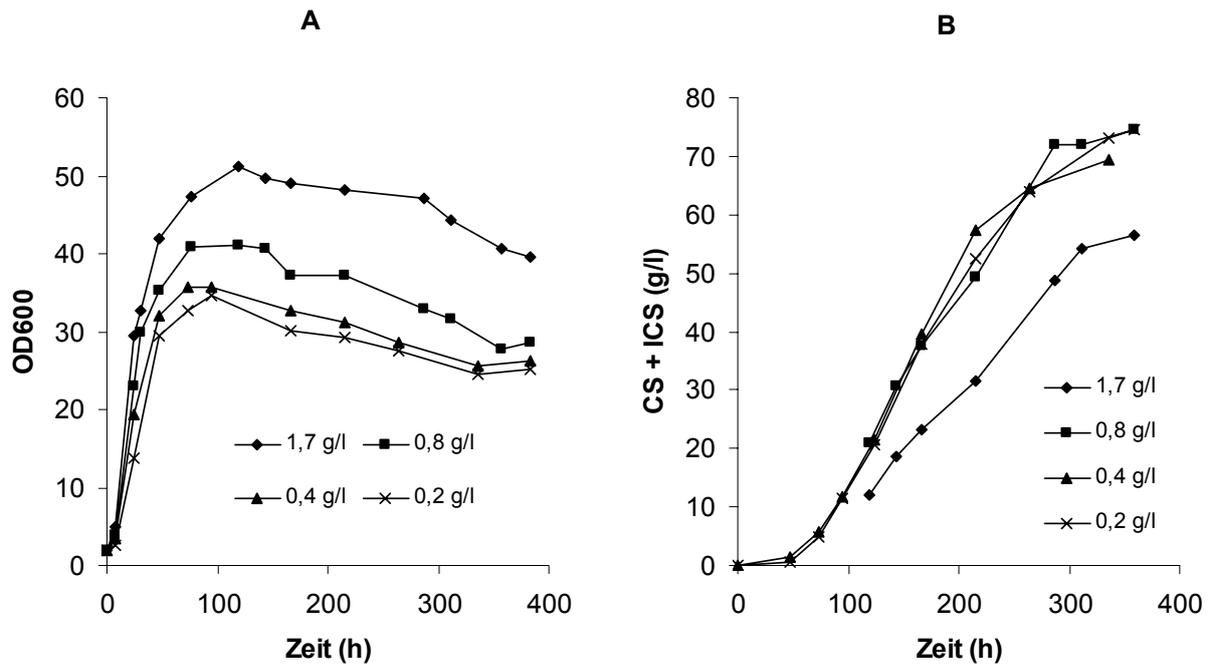
Die Produktbildung setzte mit dem Auszehren der N-Quelle nach 60-80 h Kulturzeit in der Phase der Stagnation des Wachstums ein und erreichte unter diesen Bedingungen nach 300-400 h Kulturzeit Werte von etwa 50 bis 60 g/l Gesamtsäure. Der Gen-Dosis-Effekt des *ICL1* Genes führte im Stamm H222-S4(p64ICL1) T1 im Vergleich zu H222-S4 durch die Erhöhung der Expression der Isocitratlyase zur Verschiebung des Produktmusters in Richtung CS (vgl. 3.1.1.2). Der Anteil der ICS am Gesamtprodukt aus Saccharose oder Glucose fiel von 10-15 % auf 3-4 % ab (**Tab. 3.4**). Die mit den rekombinanten Stämmen erhaltenen Produktkonzentrationen aus Saccharose waren mit denen aus Glucose vergleichbar. So wurden bis zum Kultivierungsende im Durchschnitt 50 g/l CS auf beiden C-Quellen bei vergleichbaren Produktbildungsraten gebildet (**Tab. 3.4**). Sowohl die erhaltenen Säurekonzentrationen als auch die Produktbildungsraten entsprachen weitgehend den mit H222 auf Glucose erzielten Werten.

**Tab. 3.4: Vergleich der CS-Produktion mit 10 % Glucose oder Saccharose mit den *Y. lipolytica* Stämmen H222, H222-S4 und H222-S4(p64ICL1) T1.** Kultivierungsbedingungen: 500 ml Schüttelkolben mit 100 ml Minimalmedium Mp, 1,7 g/l Pepton und 50 mM KKP pH 6,8. Kulturzeit bis zur vollständigen Umsetzung 300-400 h.

Stamm	C-Quelle	CS+ICS (g/l)	ICS (%)	$RZA_{(CS+ICS)max}$ (mg/h*l)	$r_{(CS+ICS)max}$ (mg/h*g BTM)
H222	Glucose	48	12	188	29
H222-S4	Glucose	53	10	190	25
	Saccharose	43	12	147	19
H222-S4(p64ICL1) T1	Glucose	53	3	180	24
	Saccharose	56	4	160	21

Mit dem Ziel der phänotypischen Optimierung der CS-Produktion aus Saccharose wurden mit dem Stamm H222-S4(p67ICL1) T5 Versuche mit verringerten Peptonkonzentrationen durchgeführt und der Einfluss auf die Produktbildung betrachtet.

Wie in Kapitel 3.2.2 dargestellt führte die Reduktion von 2,0 auf 0,8 g/l Pepton nur zu einer geringen Abnahme der Invertaseaktivität (vgl. **Abb. 3.14 B**), so dass mit einer drastischen Verschlechterung des Wachstums nicht zu rechnen war. Das zur Induktion des *XPR2* Promotors zugesetzte Pepton wird von den Zellen auch als zusätzliche N-Quelle genutzt. Infolgedessen kam es in Abhängigkeit von der verfügbaren Gesamtstickstoffmenge (Ammoniumsulfat + Pepton) zu einer primären Wachstumsphase über 40-100 h bis zur N-Limitation. Anschließend setzte die über 200-300 h andauernde CS-Produktionsphase bis zum Verbrauch der eingesetzten Saccharose ein. Wie der **Abb. 3.17 A** zu entnehmen ist, führte die Verringerung der Peptonkonzentration von 1,7 auf 0,8 g/l zu einer deutlichen Abnahme der Biomasseproduktion von 50 auf 40 OD600/ml. Die weitere Reduktion des Peptons von 0,8 auf 0,4 bzw. 0,2 g/l führte zu einer weiteren, aber geringen Abnahme der Biomasse von etwa 40 auf 35 OD600/ml. Die durch N-Limitation ausgelöste CS-Produktion verzögerte sich in Abhängigkeit von der Gesamtstickstoffkonzentration im Ansatz, wodurch von den Zellen mehr Substrat zur Produktion von Biomasse anstelle der Produktbildung verwendet wurde. Die Erhöhung der Gesamtsäurebildung von 56 g/l CS+ICS im Ansatz mit 1,7 g/l Pepton auf 74-84 g/l CS+ICS in den Ansätzen mit geringeren Peptonkonzentrationen spiegeln diese Tatsache wieder (**Tab. 3.5**).



**Abb. 3.17: Wachstumsverhalten (A) und Produktbildung (B) für den *Y. lipolytica* Stamm H222-S4(p67ICL1) T5 während der Kultivierung im Schüttelkolben mit 10 % Saccharose.** Kultivierung: 500 ml Schüttelkolben mit 100 ml Minimalmedium Mp, 50 mM KKP pH 6,8 und verschiedenen Peptonkonzentrationen.

Mit abnehmender Biomassekonzentration wurde außerdem eine deutliche Steigerung der maximalen Raum-Zeit-Ausbeute  $RZA_{(CS+ICS)_{max}}$  (255 auf 401 mg/h\*l) und der maximalen spezifischen Produktbildungsgeschwindigkeit  $r_{(CS+ICS)_{max}}$  (20 auf 46 mg/g BTM) festgestellt (**Tab. 3.5**). Diese Steigerungen sprachen für eine Sauerstofflimitation des Produktbildungsprozesses unter den Bedingungen des Schüttelkolbens bei höheren Biomassekonzentrationen, was durch erste Kultivierungen im Bioreaktor bestätigt wurde (**Tab. 3.5**). Die Bestimmung des Gehaltes der Zucker Saccharose, Glucose und Fructose über den gesamten Kultivierungsverlauf im Schüttelkolben (bis zu 400 h) hatte gezeigt, dass trotz der relativ geringen Invertaseaktivität, die nach Verbrauch des Peptons und des eingestellten pH-Wertes bei etwa 5,0 auftritt, die gesamte eingesetzte Menge an Substrat umgesetzt wurde (nicht dargestellt). Diese Beobachtung wies auf eine hohe Stabilität der gebildeten Invertase hin. Außerdem fiel die Akkumulation von Fructose (bis 30 g/l) auf, während Glucose nur in geringen Konzentrationen (maximal 7 g/l) auftrat.

**Tab. 3.5: Charakteristika der CS-Produktion mit dem Stamm H222-S4(p67ICL1) T5 bei unterschiedlichen Peptonkonzentrationen im Schüttelkolben mit 10 % Saccharose im Vergleich zur Kultivierung im Bioreaktor\*.** Kultivierungsbedingungen im Schüttelkolben: vgl. Abb. 3.17, Kulturzeit: 350-400 h; Kultivierungsbedingungen im Bioreaktor: Arbeitsvolumen 0,5 (1,3 g/l Pepton) bzw. 2,0 L (0,4 g/l Pepton), Minimalmedium nach Behrens *et al.*, (1978) mit 1 g/l NH<sub>4</sub>Cl, Kulturzeit etwa 100 h.

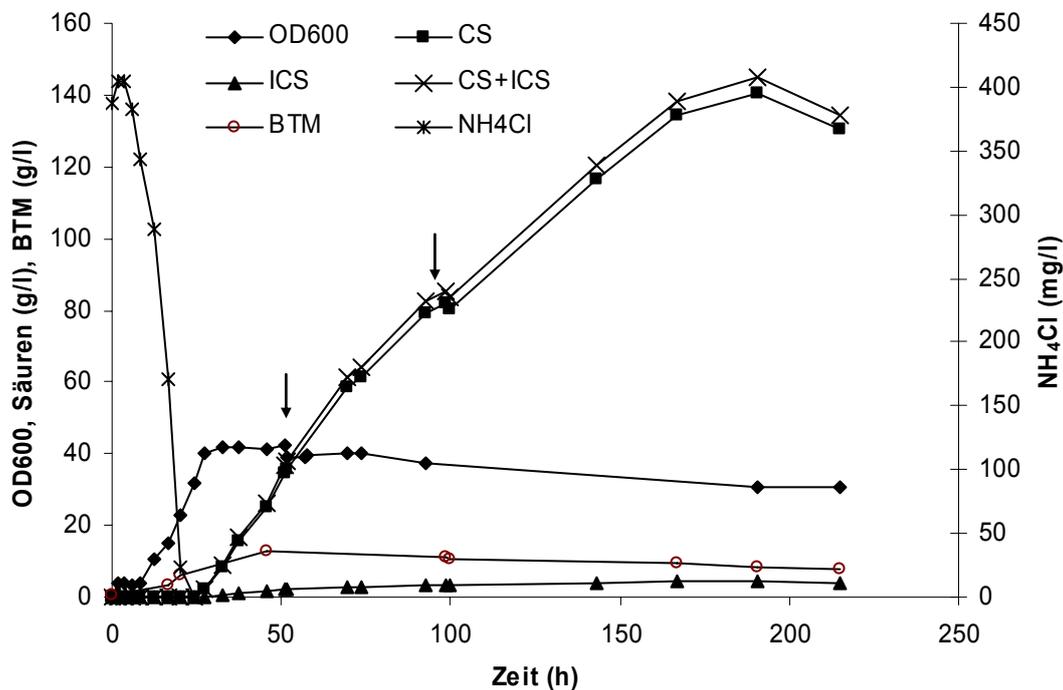
Pepton (g/l)	Biomasse OD600/BTM (g/l)	CS+ICS (g/l)	ICS (%)	RZA <sub>(CS+ICS)max</sub> (mg/h*l)	r <sub>(CS+ICS)max</sub> (mg/h*g BTM)
1,7	51 / 13	56	3	255	20
1,3 *	n.b. / 8,4	65	4	1086	129
0,8	41 / 10,6	74	2	381	42
0,4	37 / 9,5	77	2	401	46
0,4 *	n.b. / 9,4	63	3	845	89
0,2	32 / 8,5	83	2	364	43

### 3.2.4 Optimierung der Citronensäureproduktion im Bioreaktor

In der **Abb. 3.18** ist der typische Verlauf des Wachstums und der Produktbildung der Hefe *Y. lipolytica* am Beispiel des Stammes H222-S4(p67ICL1) T5 mit Saccharose als Substrat unter den für die CS-Produktion günstigen Bedingungen der N-Limitation dargestellt. Parallel mit der Auszehrung der anorganischen Stickstoffquelle (NH<sub>4</sub>Cl) ging die Zunahme der Biomassekonzentration einher. Nach Verbrauch der Stickstoffquelle im Zeitraum zwischen 20-24 h Kulturzeit kam es zur Stagnation der Biomassebildung und die Sekretion der CS und ICS setzte ein. Über den nachfolgenden Kulturzeitraum blieb die Biomassekonzentration nahezu konstant und nahm die Konzentration der Säuren CS und ICS zu. Nach 190 h Kulturzeit wurde eine maximale Gesamtsäurekonzentration von 145 g/l erreicht. Am Ende der Kultivierung war bereits ein Rückgang der Säurekonzentration auf 134 g/l zu verzeichnen, was die Folge des Substratverbrauches war, so dass es durch die Wiederaufnahme der gebildeten Säuren durch die Zellen kam. Der hier beschriebene Kultivierungsverlauf ist beispielhaft für alle der im Folgenden vorgestellten Bioreaktorversuche mit dem Stamm H222-S4(p67ICL1) T5 mit Saccharose als Substrat zu betrachten.

In den vorangegangenen Kapiteln (3.2.2, 3.2.3) wurde gezeigt, dass eine Reduktion des Peptonanteils (Pepton induziert den *XPR2*-Promotor) von 1,7 g/l auf 0,4 g/l im Schüttelkolben zur Steigerung der CS-Produktbildungsrate (RZA<sub>max</sub> oder r<sub>max</sub>) führte. Weiterhin wurde gezeigt, dass ein Wachstum auf Saccharose auch allein über die

Regulation des pH-Wertes möglich war (Derepression des *XPR2*-Promotors bei pH >5,5), wenngleich das Weglassen von Pepton zu verzögertem Anwachsen führte (vgl. **Abb. 3.13**). Die Bestimmung des Aktivitätsverlaufs der Invertase ergab, dass die Maximalaktivität des Enzyms bereits während der frühen Wachstumsphase vorlag und dann sehr schnell wieder abnahm (vgl. **Abb. 3.14**). Zu Beginn und während der eigentlichen Produktbildungsphase war die Enzymaktivität nur noch auf geringem Niveau vorhanden. Dies führte zu der Überlegung, dass der gesamte Prozess der CS-Bildung möglicherweise durch eine zu geringe Invertaseaktivität limitiert wurde. Der zu Beginn der Kultivierung eingestellte pH-Wert von 6,8 (Zusatz von 50 mM Kaliumphosphatpuffer im Schüttelkolben) sank in der Wachstumsphase ab und wurde dann üblicherweise für den Rest der Wachstums- und in der Produktbildungsphase bei 5,0 statiert. Durch das Anheben des pH-Wertes von 5,0 auf Werte um 6,5-7,0 hatte sich mit Schüttelkulturen gezeigt, dass die Invertaseaktivität während der Produktbildungsphase wieder deutlich gesteigert werden konnte (vgl. **Abb. 3.15 B**).



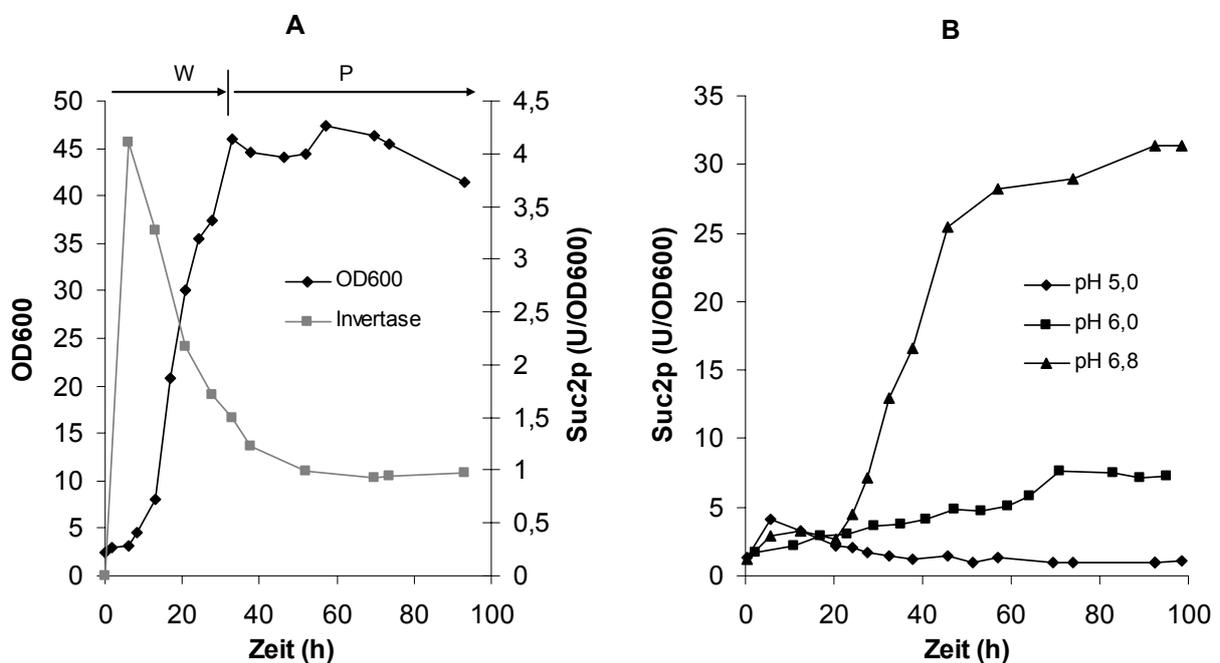
**Abb. 3.18:** Kinetik des Wachstums und der CS-Bildung auf Saccharose mit dem *Y. lipolytica* Stamm H222-S4(p67ICL1) T5 im 2 l – Rührreaktor. Kultivierungsbedingungen: 1,2 l Arbeitsvolumen, Minimalmedium nach Behrens *et al.*, (1978) mit 1,5 g/l NH<sub>4</sub>Cl, Gesamtsubstratkonzentration 160 g/l (Startkonzentration 100 g/l; 1. Nachdosierung 40 g/l, 2. Nachdosierung 20 g/l – Nachdosierungen durch Pfeile markiert), 0,4 g/l Pepton, pH-Wert über die gesamte Kultivierung 6,8.

Eine damit verbundene Erhöhung der Produktbildungsrate bzw. Produktbildungsgeschwindigkeit (RZA bzw.  $r$ ) konnte allerdings unter den Bedingungen des Schüttelkolbens, offensichtlich durch die Dominanz der Sauerstofflimitation, nicht gezeigt werden. Um zu prüfen, ob eine veränderte Prozessführung durch pH-Statierung bei 6,0 bzw. 6,8 während der Produktionsphase und die dadurch erreichbare Erhöhung der Invertaseaktivität zur Steigerung der Verwertung von Saccharose und damit der Citratbildungsrate führt, ergab sich die Notwendigkeit der Durchführung entsprechender Versuche im Bioreaktor, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung von  $pO_2 > 30-50 \%$  zu gewährleisten.

Dazu wurden Bioreaktorversuche mit dem Stamm H222-S4(p67ICL1) T5 bei den pH-Werten 5,0 (bis dahin verwendeter pH-Wert), 6,0 und 6,8 in der Produktionsphase durchgeführt und sowohl die Invertaseaktivität als auch die Konzentrationen an CS, ICS, Saccharose (Suc), Glucose (Glu) und Fructose (Fru) bestimmt. Die Kultivierungsbedingungen und die Art der Vorkultur waren bis auf den pH-Wert in den Ansätzen identisch. Im Kontrollansatz wurde der zu Beginn der Kultivierung eingestellte pH-Wert von 6,8 bis zum Verbrauch des Ammoniumstickstoffs (bei etwa 24 h) wie bis dahin üblich auf 5,0 eingestellt. Dabei erfolgte die Absenkung nicht abrupt sondern allmählich durch die Ansäuerung des Mediums aufgrund des Wachstums der Zellen und der einsetzenden Sekretion von CS+ICS. Im Ansatz mit pH 6,0 wurde wie im Kontrollansatz verfahren, nur dass die Einstellung des pH-Wertes bei 6,0 statt 5,0 vorgenommen wurde. Der Ansatz mit pH 6,8 wurde über den gesamten Kulturverlauf bei pH 6,8 statiert.

Die Bestimmung der Invertaseaktivität bestätigte die aus den Schüttelkolbenversuchen erhaltenen Befunde (vgl. 3.2.2). Die höchste Aktivität wurde in der frühen Phase des exponentiellen Wachstums (6-10 h) bestimmt und ging bis zum Erreichen der stationären Phase (ca. 30 h) wieder deutlich zurück (**Abb. 3.19 A**). Bis zum Zeitpunkt von ca. 20 h waren sowohl Wachstum und Verlauf der Invertaseaktivität in den drei Reaktoren ähnlich (**Abb. 3.19 B**). Danach stieg die Invertaseaktivität im Ansatz bei pH 6,0 bzw. 6,8 (bis 8 bzw. 30 U/OD600) im Gegensatz zum dem bei pH 5,0 über den restlichen Kulturverlauf deutlich an und verblieb auf hohem Niveau, während sie bei pH 5,0 auf ein niedriges Niveau abfiel und verblieb (1-2 U/OD600). Durch die Statierung des pH-Wertes bei 6,0 und 6,8 wurde nach  $NH_4$ -Verbrauch der *XPR2*-Promotor offensichtlich dereprimiert (Ogrydziak *et al.*, 1977; Nicaud *et al.*, 1989; Madzak *et al.*, 2004), was zu einer ständigen Neusynthese der Invertase und damit

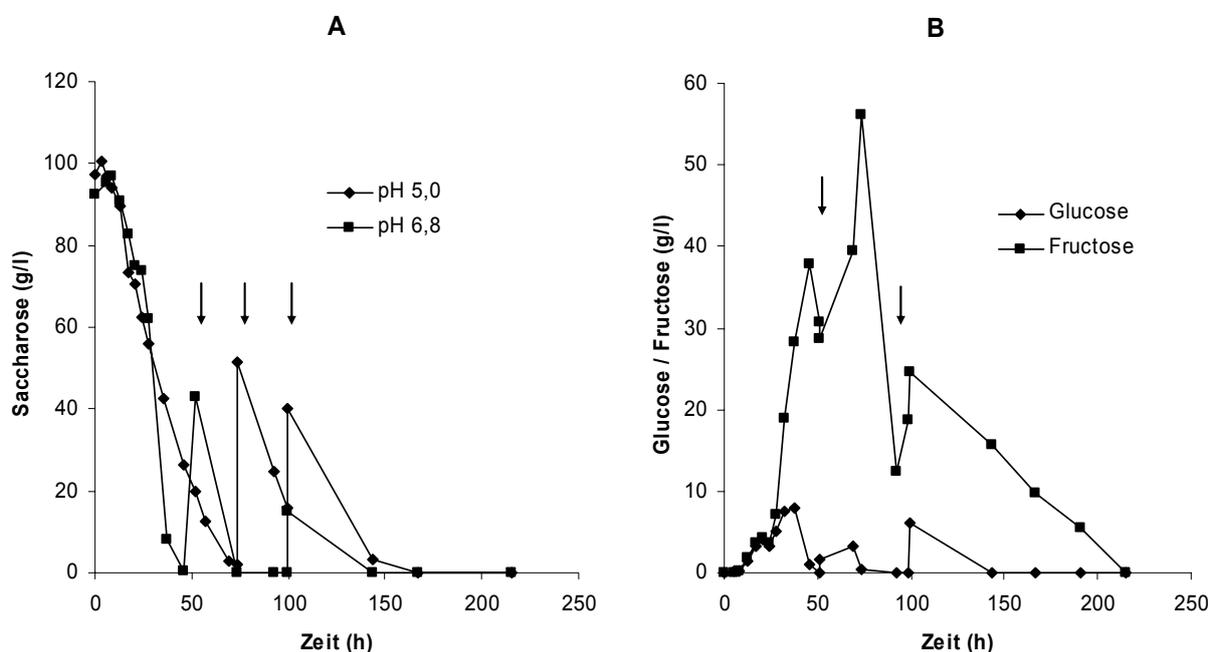
zum deutlichen Anstieg der Enzymaktivität führte. Im Gegensatz dazu fand bei pH 5,0 keine oder nur eine basale Invertaseexpression statt. Wie bereits in Schüttelkolbenversuchen beobachtet, verschwand die Aktivität unter diesen Bedingungen dennoch nicht vollständig, was für eine hohe Stabilität des Enzyms oder für eine Grundaktivität des *XPR2*-Promotors spricht. Der Vergleich der beiden bei pH 6,0 bzw. 6,8 statierten Reaktoren zeigte, dass unter den höheren pH-Bedingungen ein drastischer Anstieg der Invertaseaktivität stattfand und außerdem deutlich höhere Aktivitäten erreicht wurden (**Abb. 3.19 B**), was darauf hinweist, dass innerhalb dieses pH-Bereiches die Promotoraktivität entscheidend reguliert wird.



**Abb. 3.19:** Verlauf des Wachstums und der Invertaseaktivität des Stammes H222-S4(p671CL1) T5 während der Kultivierung im Bioreaktor mit Saccharose bei pH 5,0 (A) und Vergleich der Invertaseaktivitäten bei pH 5,0, 6,0 und 6,8 (B). Die Bestimmung der Invertaseaktivität erfolgte mit ganzen Zellen nach Abtrennung des Kulturüberstandes. Kultivierungsbedingungen: 1,2 L Arbeitsvolumen, Minimalmedium nach Behrens *et al.* (1978) mit 1,5 g/l NH<sub>4</sub>Cl, 0,4 g/l Pepton und insgesamt 160 g/l Saccharose (Startkonzentration 100 g/l, Nachdosierung von 40 g/l nach 51 h [pH 6,8] bzw. 73 h [pH 5,0] und weiteren 20 g/l nach 100 h [pH 5,0 und pH 6,8]; Nachdosierung von jeweils 20 g/l nach 50, 75 und 96 h [pH 6,0]). W – Wachstumsphase, P – Produktionsphase

Der Verlauf der Abnahme der Saccharosekonzentration im Medium bei pH 6,0 bzw. 6,8 im Vergleich zu pH 5,0 zeigte, dass die Spaltung der Saccharose in den Ansätzen mit den höheren pH-Werten deutlich schneller ablief als bei pH 5,0 (**Abb. 3.20 A**), was auf die höhere Invertaseaktivität in diesen Ansätzen zurück zu führen war.

Bereits nach ca. 50 h waren bei pH 6,8 die zu Beginn der Kultivierung eingesetzten 100 g/l Saccharose fast vollständig gespalten, während dies im Ansatz mit pH 5,0 erst nach etwa 70 h der Fall war. Nach Zudosierung von Saccharose war die schnellere Spaltung im Ansatz mit pH 6,8 im Gegensatz zu pH 5,0 auch sehr auffällig. Die zum Zeitpunkt 51 h bei pH 6,8 dosierten 40 g/l Saccharose waren schon 20 h später wieder vollständig in Glucose und Fructose überführt. Im Ansatz mit pH 5,0 waren dagegen von den nach 73 h dosierten 40 g/l Saccharose 30 h später noch etwa 15 g/l im Medium zu finden. Ein ähnliches Bild ergab auch der Vergleich des Ansatzes mit pH 6,0 zu dem mit pH 5,0 (nicht dargestellt).

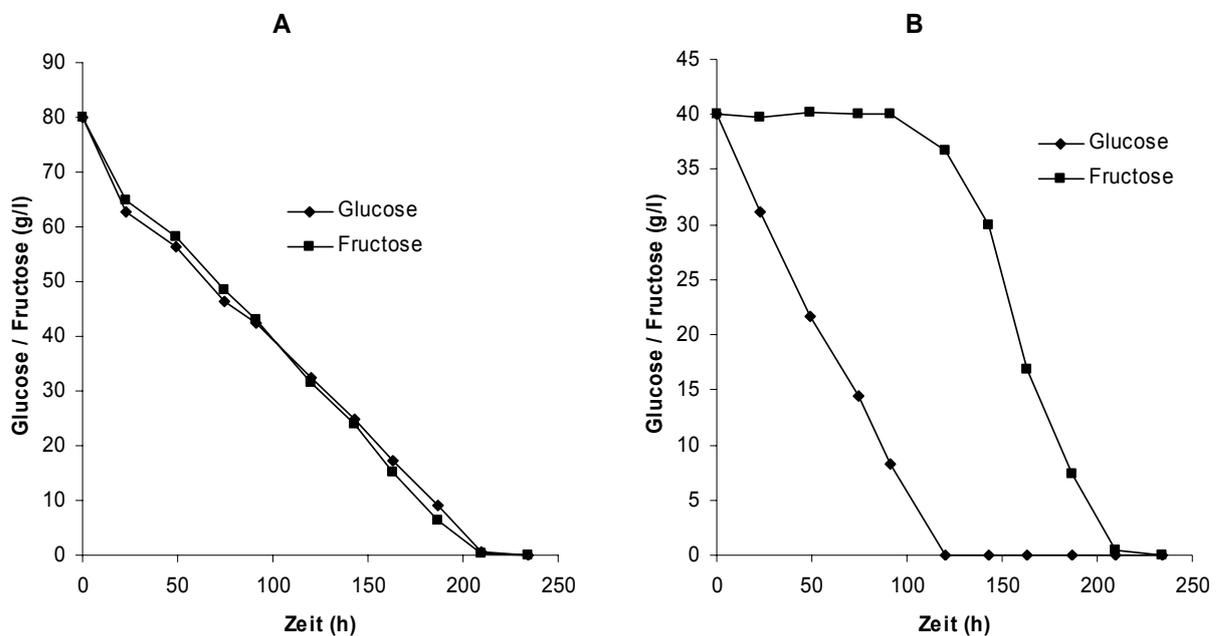


**Abb. 3.20:** Verlauf der Saccharoseverwertung bei der Kultivierung des Stammes H22-S4(p67ICL1) T5 im Bioreaktor bei pH 5,0 im Vergleich zu pH 6,8 (A) und Verlauf der Konzentrationen von Glucose bzw. Fructose bei pH 6,8 (B). Kultivierungsbedingungen vgl. Abb. 3.19. Pfeile – Nachdosierung von Saccharose (Erläuterung vgl. Abb. 3.19)

In allen durchgeführten Versuchen zur CS-Produktion mit Saccharose fiel die zum Teil sehr hohe Anreicherung der bei Spaltung der Saccharose entstehenden Monosaccharide Glucose (maximal 8-10 g/l) und Fructose (bis 60 g/l, insbesondere bei Substratnachdosierung) auf, was auch in der Literatur beschrieben wurde (Mansfeld *et al.*, 1995; Bizukojc und Ledakowicz, 2004). In den Bioreaktor-Ansätzen bei pH 5,0 (bis 18 g/l Fructose) und pH 6,8 (bis 60 g/l Fructose, **Abb. 3.20 B**) trat eine höhere Zwischenproduktanreicherung bei pH 6,8 infolge der hohen Invertaseak-

tivität auf. Beim gleichzeitigen Auftreten von Glucose und Fructose infolge der Saccharosespaltung, wurde die Glucose durch *Y. lipolytica* schneller weiter verwertet, so dass deren Konzentration im Medium im Vergleich zur Fructose meist deutlich geringer war (**Abb. 3.20 B**).

Um diese Beobachtung näher zu charakterisieren, wurden Versuche im Schüttelkolben durchgeführt, bei denen drei Ansätze mit jeweils 8 % Saccharose, Glucose oder Fructose und ein Ansatz mit jeweils 4 % Glucose und Fructose unter CS-Produktionsbedingungen mit dem Stamm H222-S4(p67ICL1) T5 angeimpft wurden. Im Kulturverlauf erfolgte die Bestimmung der Kohlenhydratkonzentrationen (**Abb. 3.21**) und der gebildeten CS.



**Abb. 3.21:** Verlauf der Konzentration von Glucose und Fructose im Medium bei separater (A) und gemeinsamer (B) Dosierung beider Substrate während der Kultivierung des Stammes H222-S4(p67ICL1) T5. Kultivierungsbedingungen: 500 ml Schüttelkolben mit 100 ml Minimalmedium Mp und jeweils 8 % Glucose oder Fructose (A) bzw. 4 % Glucose + 4 % Fructose (B).

Das Wachstum und die Produktbildung waren für alle vier Ansätze ähnlich und entsprachen den bisher im Schüttelkolben erhaltenen Ergebnissen (nicht dargestellt). Bot man den Hefezellen Glucose und Fructose einzeln an, wurden beide C-Quellen mit der gleichen Geschwindigkeit verwertet (**Abb. 3.21 A**). Bei gleichzeitiger Anwesenheit beider Substrate erfolgte zunächst ausschließlich die Verwertung von Glucose (**Abb. 3.21 B**). Nach 91 h Kulturzeit fanden sich nur noch 8,3 g/l Glucose im

Medium, dagegen noch die volle Startkonzentration von 40 g/l Fructose. Danach trat unterhalb von etwa 1 % Glucose eine kurze Phase der gleichzeitigen Verwertung beider Substrate auf, wobei jedoch immer noch hauptsächlich Glucose aufgenommen wurde. Nach 120 h Kulturzeit war keine Glucose mehr nachweisbar, aber immer noch fast die gesamte Menge der eingesetzten Fructose (36 von 40 g/l). Deren Aufnahme und Verwertung erfolgte dann allerdings mit einer der Glucoseaufnahme- und -verwertung ähnlichen Geschwindigkeit.

Eine echte Diauxie schien nicht vorzuliegen, da sowohl die durchgeführten Bioreaktor- als auch die Schüttelkolbenversuche eine Phase der gleichzeitigen Abnahme von Glucose und Fructose zeigten (**Abb. 3.20 B, Abb. 3.21 B**). Die Ursache für die unterschiedlichen Verwertungsgeschwindigkeiten beider Zucker durch die Hefe *Y. lipolytica* steht vermutlich in Zusammenhang mit den Eigenschaften der Zuckeraufnahmesysteme (Zuckertransporter). Lag eine Konzentration an Glucose >10 g/l vor, dann wurde bei gleichzeitiger Anwesenheit von Fructose offenbar ausschließlich Glucose in die Zellen transportiert. Bei geringerem Glucosegehalt (<10 g/l) wurde gleichzeitig, wenn auch in geringerem Umfang, Fructose transportiert.

Die veränderte Prozessführung durch pH-Statierung bei 6,0 bzw. 6,8 und die so erzielte Erhöhung der Invertaseaktivität führte zu einer Steigerung der Produktivität bei der CS-Produktion aus Saccharose im Bioreaktor (**Tab. 3.6**). Für den Gesamtprozess (Wachstums- und Produktionsphase) betrachtet lagen die volumenspezifischen Raum-Zeit-Ausbeuten (RZA) bzw. die biomassespezifischen Produktbildungsraten ( $r$ ) für die produzierte Citronensäure in den pH-statierten Ansätzen mit 0,66 g/l\*h (pH 6,0) und 0,73 g/l\*h (pH 6,8) bzw. 0,09 g/h\*g BTM (pH 6,0 und pH 6,8) fast doppelt so hoch wie bei pH 5,0 (**Tab. 3.6**).

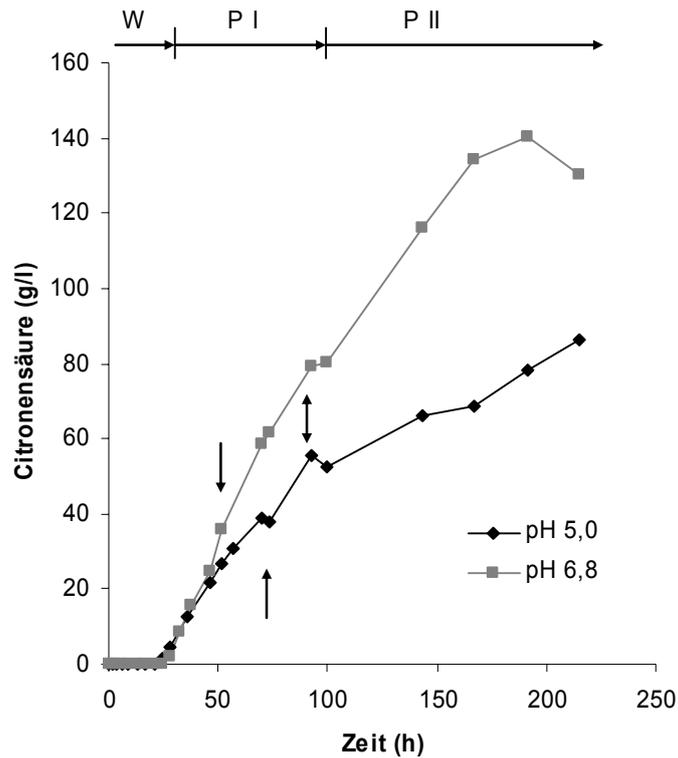
Die maximalen Raum-Zeit-Ausbeuten für CS+ICS ( $RZA_{(CS+ICS)max}$ ) aller bei pH 5,0 durchgeführten Fermentationen lagen im Bereich von 0,9-1,4 g/l\*h, die biomassespezifischen Produktbildungsgeschwindigkeiten für CS+ICS ( $r_{(CS+ICS)max}$ ) betrug 0,13-0,15 g/h\*g BTM (**Tab. 3.6**). Dabei fiel auf, dass die mit 1,3 statt mit 0,4 g/l Pepton durchgeführte Fermentation jeweils die höheren Produktivitätswerte zeigte. Dies kann durch die erhöhte Invertaseexpression bei Einsatz von mehr Pepton erklärt werden. Im Vergleich dazu lagen die erreichten Werte der bei den höheren pH-Werten durchgeführten Fermentationen für  $RZA_{(CS+ICS)max}$  mit 1,5 g/l\*h (pH 6,0) bzw.

2,0 g/l\*h (pH 6,8) und  $r_{(CS+ICS)max}$  mit 0,17 g/h\*g BTM (pH 6,0) bzw. 0,19 g/h\*g BTM (pH 6,8) höher (**Tab. 3.6**). Die Betrachtung der erzielten Ausbeuten  $Y_{CS/S}$  (Gramm produzierte CS pro Gramm eingesetzte Saccharose) ergab ebenfalls höhere Werte für die bei pH 6,0 bzw. 6,8 durchgeführten Kultivierungen im Vergleich zu pH 5,0. Bezogen auf die gesamte Kulturzeit (Wachstums- und Produktionsphase) lag  $Y_{CS/S}$  für pH 5,0 bei 0,5 g/g während für pH 6,0 die Ausbeute bei 0,71 g/g und für pH 6,8 bei 0,82 g/g lag (**Tab. 3.6**).

**Tab. 3.6: Charakteristika der Produktbildung aus Saccharose mit dem Stamm H222-S4(p67ICL1) T5 im Bioreaktor.** Kultivierungsbedingungen vgl. Abb. 3.19, BTM - Biotrockenmasse,  $RZA_{(CS+ICS)}$  - Raum-Zeit-Ausbeute für CS und ICS,  $r_{(CS+ICS)}$  - biomasse-spezifische Produktbildungsgeschwindigkeit für CS und ICS,  $r_{max}$  - maximale biomasse-spezifische Produktbildungsgeschwindigkeit für CS,  $Y_{CS/S}$  - substratbezogene Ausbeute für CS (berechnet auf Gramm verbrauchte Saccharose).

pH	BTM (g/l)	CS + ICS (g/l)	CS (g/l)	ICS (%)	$RZA_{(CS+ICS)}$ (g/l*h)	$r_{(CS+ICS)}$ (g/h*g BTM)	$r_{(CS)max}$ (g/h*g BTM)	$Y_{CS/S}$ (g/g)
5,0	7,4	90	87	4	0,42	0,06	0,14	0,50
6,0	7,5	133	127	5	0,69	0,09	0,15	0,71
6,8	8	144	140	4	0,76	0,10	0,19	0,82

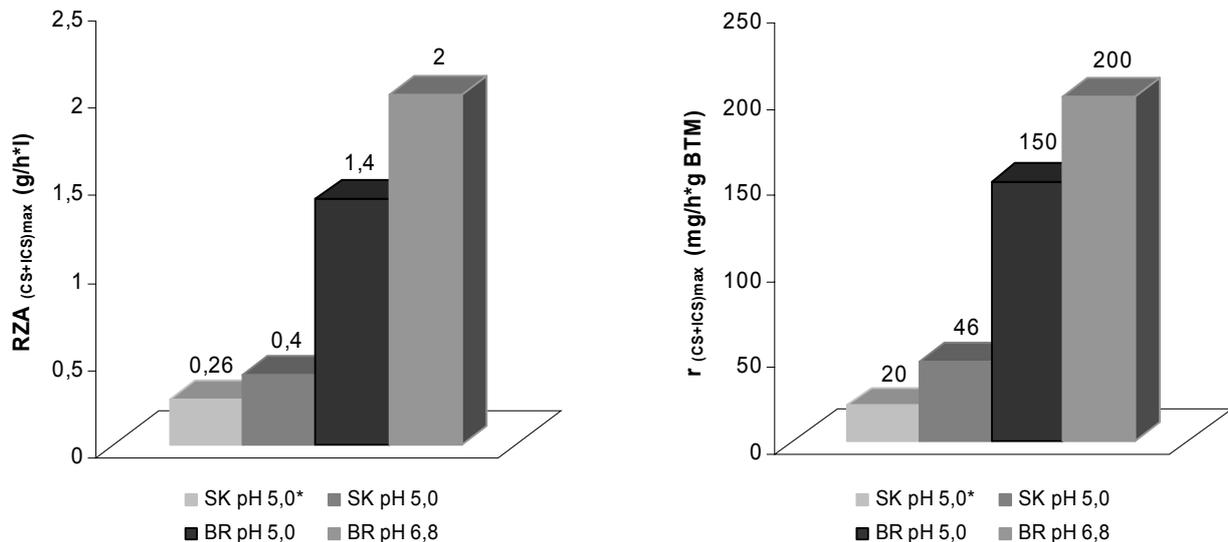
Der Vorteil einer höheren Expression der Invertase wirkte sich besonders nach längerer Kulturzeit (> 50 h) und Substratnachdosierung aus, wie es in der **Abb. 3.22** am Beispiel der Fermentationen bei pH 5,0 bzw. 6,8 dargestellt ist. Insbesondere nach der zweiten Nachdosierung bei ca. 100 h Kulturzeit (Produktionsphase II, >100 h) war die Produktbildung bei pH 6,8 deutlich schneller als bei pH 5,0. Der ermittelte Wert der  $RZA_{(CS+ICS)max}$  für pH 6,8 betrug 0,82 g/l\*h und lag damit doppelt so hoch wie der bei pH 5,0 mit 0,39 g/l\*h. Auch die biomassespezifische Produktbildungsgeschwindigkeit ( $r_{(CS+ICS)max}$ ) lag bei pH 6,8 mit 0,1 g/h\*g BTM doppelt so hoch wie bei pH 5,0 mit 0,04 g/h\*g BTM. Ab einem Zeitraum von 50 h waren die Unterschiede in der Invertaseaktivität beider Fermentationen besonders ausgeprägt (vgl. **Abb. 3.19 B**). Die gesteigerte Produktbildung bei pH 6,8 im Vergleich zu pH 5,0 kann auf die beschleunigte Bereitstellung an Glucose und Fructose zurückgeführt werden, die wiederum die Folge der erhöhten Invertaseaktivität unter diesen pH-Bedingungen war.



**Abb. 3.22: Vergleich der CS-Produktion während der Fedbatch-Kultivierung des Stammes H222-S4(p67ICL1) T5 im Bioreaktor auf Saccharose bei pH 5,0 oder pH 6,8.** Kultivierungsbedingungen und Übersicht über alle während der Fermentation bei pH 6,8 aufgenommenen Parameter vgl. Abb. 3.19. Die Startkonzentration von Saccharose betrug 100 g/l. Die Pfeile geben die Nachdosierung von Substrat an. Die 1. Nachdosierung von 40 g/l erfolgte nach ca. 52 h (pH 6,8) bzw. 73 h (pH 5,0), die 2. Nachdosierung von 20 g/l erfolgte bei ca. 100 h Kulturzeit.

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass die Gewinnung von CS aus Saccharose mit der Hefe *Y. lipolytica* sehr gut möglich ist. Durch die Reduktion der Peptonkonzentration im Kulturmedium von 1,7 auf 0,4 g/l konnte die Produktivität (RZA, r) bereits unter den Bedingungen des Schüttelkolbens verdoppelt werden (vgl. **Tab. 3.5**). Die Übertragung des Produktbildungsprozesses in den Bioreaktor und der damit erreichten Aufhebung der Sauerstofflimitation der Kultur führte zu einer weiteren Steigerung der Produktivität bei der CS-Produktbildung um den Faktor 3,3-3,5 (vgl. **Abb. 3.23**). Durch die weitere Optimierung der Prozessführung im Bioreaktor über die Anhebung des pH-Wertes von 5,0 auf 6,8 und der daraus resultierenden Erhöhung der Invertaseaktivität führte nochmals zu einer Steigerung der CS-Produktionsraten für den Stamm H222-S4(p67ICL1) T5 um etwa 40 %. Insgesamt konnten durch die genannten Optimierungsmaßnahmen für die CS-Produktion aus Saccha-

rose die maximale volumenspezifische Raum-Zeit-Ausbeute ( $RZA_{(CS+ICS)_{max}}$ ) um 70 % und die maximale biomassespezifische Produktbildungsrate ( $r_{(CS+ICS)_{max}}$ ) um 100 % vom Zeitpunkt des Beginns der Arbeiten bis zum Ende gesteigert werden (**Abb. 3.23**).



**Abb. 3.23:** Steigerung der Produktivität der CS-Bildung mit dem Stamm H222-S4(p671CL1) T5 mit Saccharose als C-Quelle nach der Optimierung durch a) Reduktion der Peptonkonzentration, b) Aufhebung der Sauerstofflimitation und c) Erhöhung der Invertaseaktivität durch Erhöhung des pH-Wertes. SK - Schüttelkolben, BR - Bioreaktor, \* - 1,7 g/l Pepton (andere 0,4 g/l Pepton),  $RZA_{(CS+ICS)_{max}}$  - maximale Raum-Zeit-Ausbeute,  $r_{(CS+ICS)_{max}}$  - maximale biomassespezifische Produktbildungsrate

Die Akkumulation hoher Glucose- und vor allem Fructosekonzentrationen (vgl. **Abb. 3.20**) im Kultivierungsmedium spricht bei einer ausreichend hohen Invertaseexpression für eine zusätzliche Limitation des Produktbildungsprozesses durch die Aufnahme (und Verwertung) dieser beiden Zucker. Aus dieser Überlegung heraus ergeben sich Ansätze, wie die CS-Bildung aus Saccharose möglicherweise weiter optimiert werden könnte und die in der Diskussion (vgl. Kapitel 4.2) näher betrachtet werden.

### 3.3 Gewinnung von Citronensäure aus Pflanzenölen

Die Hefe *Y. lipolytica* ist von Natur aus sehr gut in der Lage, Fette und Öle als Substrate zu verwerten (vgl. 1.1.3). Die Nutzung pflanzlicher Öle als nachwachsende Rohstoffe zur Produktion von organischen Säuren, insbesondere CS und 2-Ketoglutarinsäure, war und ist Gegenstand von Projekten (BMBF 3339822, SMUL 13-8811.61/89, FNR 22002502), die am Lehrstuhl für Allgemeine Mikrobiologie, Institut für Mikrobiologie der TU-Dresden bearbeitet wurden und werden und in die auch diese Arbeit eingebunden war.

Das Gesamtziel der im nachfolgenden Teil dargestellten Arbeiten war es zu prüfen, ob die an sich schon sehr guten Produktionseigenschaften für CS von *Y. lipolytica* Stämmen bei der Verwendung von Pflanzenölen weiter verbessert werden können. Zu diesem Zweck sollte die extrazelluläre Lipaseaktivität der Hefezellen erhöht werden. Lipasen spalten Triacylglyceride (TG) in ihre Bestandteile Glycerol und Fettsäuren. Die Idee war, durch eine verbesserte Triglyceridsplaltung die Verwertungsgeschwindigkeit der Hefen für Pflanzenöle zu erhöhen und dadurch auch die Produktbildungsrate zu verbessern.

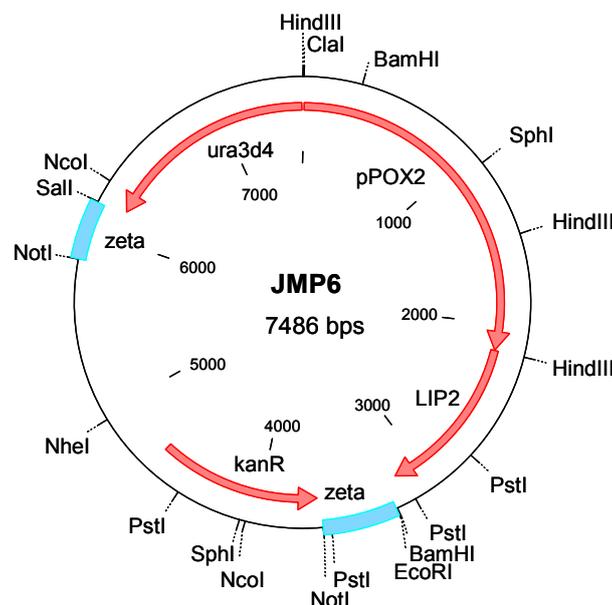
#### 3.3.1 Charakterisierung Lipase überproduzierender *Y. lipolytica* Stämme

Um den Einfluss einer erhöhten Bildung extrazellulärer Lipasen auf die TG-Verwertung und CS-Produktivität in *Y. lipolytica* zu untersuchen wurden zwei Aufgabenfelder bearbeitet:

- 1) Charakterisierung von bereits vorhandenen Lipase überproduzierenden Insertionsmutanten mit dem Phänotyp Lip<sup>++</sup> auf Tributyrin (TB) (Mauersberger *et al.*, 2001);
- 2) Neukonstruktion von rekombinanten Stämmen zur Überexpression des *LIP2* Gens (kodierend für die extrazelluläre Lipase [Lip2p]) in *LIP2*-multicopy Transformatanten.

Die ausgewählten Insertionsmutanten mit dem Lip<sup>++</sup>-Phänotyp auf TB-Agarplatten (H222-41(JMP5) N123, N137, N235A und N256) waren, wie die unter Kapitel 3.1.2 beschriebenen Stämme H222-41(JMP5) Z123 und H222-41(JMP5) N156, durch die integrative Transformation des Stammes H222-41 (*ura3-41*) mit der Mutagenesekas-

sette MTC (*zeta*'-*ura3d1*-*zeta*'') aus dem Plasmid JMP5 und deren heterologer Rekombination (zufällige Integration) ins Genom dieses Stammes entstanden (Mauersberger *et al.*, 2001; Mauersberger und Nicaud, 2003). Aus der Vielzahl der erhaltenen Transformanten des Typs H222-41(JMP5) wurden Mutanten mit unterschiedlichen Phänotypen isoliert. Auf Agar-Platten mit TB als C-Quelle wurden dabei auch solche Mutanten gefunden, die sich durch die verstärkte (oder ausbleibende) Bildung eines Klärungshofes um die Kolonien auf dem milchig trüben Agar auszeichneten, was auf eine verstärkte Bildung extrazellulärer Lipase in diesen Mutanten hinwies. Die mit „Lip“ bezeichneten Phänotypen im Plattentest wurden wie folgt klassifiziert: Lip<sup>-</sup> - keine Bildung eines Klärungshofes, Lip<sup>+</sup> - Klärungshof wie beim Wildtypstamm H222, Lip<sup>++</sup> - verstärkte Klärungshofbildung.

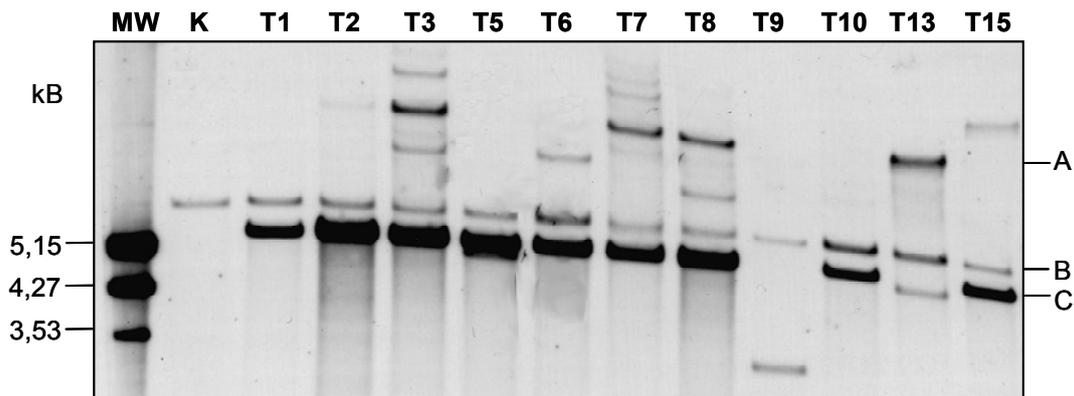


**Abb. 3.24: Integratives, selbstklonierendes multicopy Plasmid JMP6 zur Erhöhung der LIP2 Genexpression in *Yarrowia lipolytica*.** *pPOX2* – regulierbarer starker Promotor des *POX2* Gens (Acyl-CoA-Oxidase der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation), *LIP2* – ORF des *LIP2* Gens inklusive Terminator (extrazelluläre Lipase aus *Y. lipolytica*), *ura3d4* – multicopy Selektionsmarker, *zeta* – Integrationssequenzen aus LTR *zeta* des Retrotransposons Ylt1 aus *Y. lipolytica*, *kanR* – Kanamycin-Resistenzgen, Weitere Erläuterungen siehe Text.

**Gewinnung von LIP2 multicopy Transformanten.** Zur gezielten Überexpression der extrazellulären Lipase Lip2p wurde der Stamm H222-S4 mit dem 5,3 kb *NotI*-Fragment aus dem selbstklonierendem (autocloning) multicopy Vektor JMP6 (erhalten von Dr. J.M. Nicaud, INRA, Paris-Grignon; **Abb. 3.24**, Pignède *et al.*, 2000b) integrativ transformiert. Die Expressionskassette *pPOX2-LIP2*, bestehend aus dem re-

gulierbaren starken Promotor des *POX2* Gens (Acyl-CoA-Oxidase der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation), dem ORF des *LIP2* Gens aus dem *Y. lipolytica* Stamm W29 und seinen Terminator, wurde durch *NotI* Verdau des Plasmids freigesetzt.

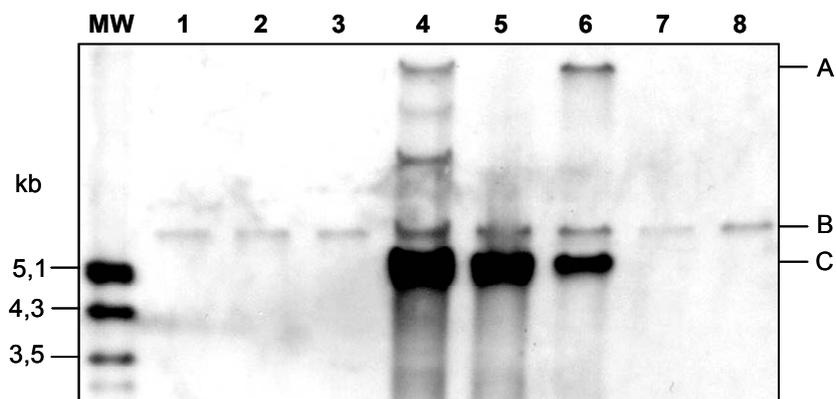
Das resultierende 5,3 kb Fragment bestehend nur aus *Y. lipolytica* DNA ohne bakterielle Anteile und enthielt noch das als multicopy Selektionsmarker für die Transformation einsetzbare *ura3d4* Allel. Das Fragment wurde von zwei Fragmenten des LTR *zeta* des Retrotransposons Ylt1 aus *Y. lipolytica* als Zielsequenz für die Integration ins Genom flankiert. Das lineare DNA-Fragment wurde nach Reinigung in der Agarose-Gelelektrophorese zur integrativen Transformation des *Y. lipolytica* Stammes H222-S4 (*ura3-302*) eingesetzt. Aufgrund des Fehlens von LTR *zeta* in H222-S4 wurde nur eine geringe Transformationseffizienz von 4,5 Transformanden pro  $\mu\text{g}$  DNA erzielt. Insgesamt konnten 10 Transformanden isoliert und weiter charakterisiert werden.



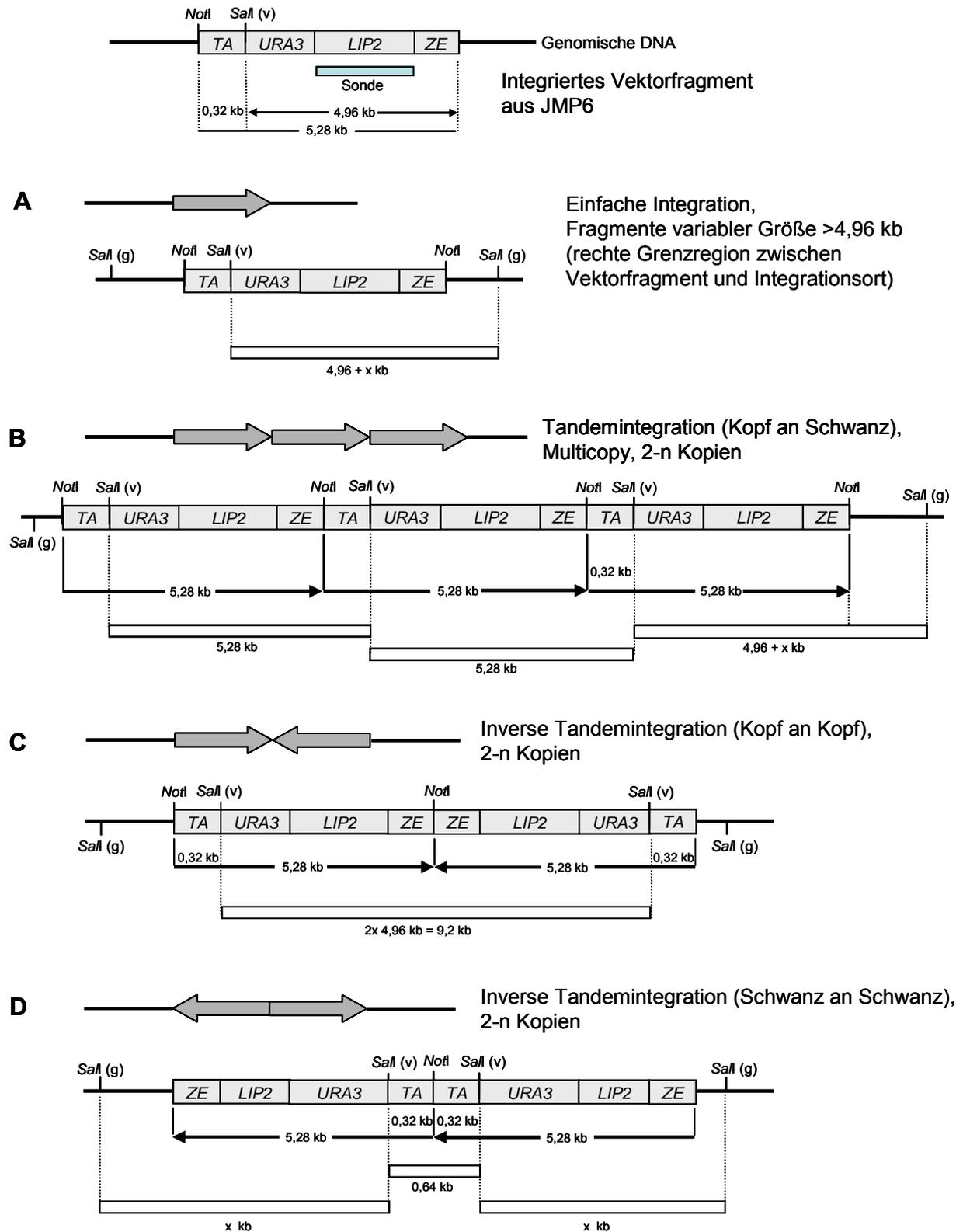
**Abb. 3.25: Nachweis der multiplen Integration der Expressionskassette *pPOX2-LIP2* aus dem Plasmid JMP6 in *Y. lipolytica* H222-S4.** Abschätzung der Kopiezahl des *LIP2* Gens durch Southern-Hybridisierung des Rezipientenstammes H222-S4 (K) und ausgewählter *LIP2* multicopy Transformanden (T1-T15). Verdau der genomischen DNA mit *SalI* und Detektion mit der *LIP2*-Sonde (1,1 kb; 5,3 kb *HindIII*-Fragment aus JMP6, *BamHI* gespalten). MW - Molekulargewichtsstandard  $\lambda$ -DNA *EcoRI/HindIII* verdaut, **A** - 9,2 kb Fragment infolge der Integration der Expressionskassette in inverser Tandemanordnung (Kopf an Kopf, vgl. **Abb. 3.27 C**); **B** - genomische Kopie des *LIP2* Gens bei ca. 6,5 kb; **C** - 5,3 kb Fragment infolge der multiplen Integration der Expressionskassette in Tandemanordnung (Kopf an Schwanz, vgl. **Abb. 3.27 B**); Die nicht bezeichneten Banden resultierten aus zusätzlichen Integrationsereignissen der Expressionskassette ins Genom (z.B. Schwanz an Schwanz- oder einfache Integration, vgl. **Abb. 3.27 A** und **D**) bzw. aus der Zerstörung der Expressionskassette während der Transformation (T9).

Die **Abb. 3.25** und **Abb. 3.26** zeigen Southern-Hybridisierungen ausgewählter Klone von *LIP2* multicopy Transformanden vom Typ H222-S4(JMP6) im Vergleich zum Rezipientenstamm H222-S4 und den Stämmen H222 und H181 als Kontrolle. In der **Abb. 3.26** wurden zusätzlich die Insertionsmutanten H222-41(JMP5) N137 und N235A mit untersucht.

Im Vergleich zeigten die meisten Transformanden neben der genomischen *LIP2* Bande (1 Kopie als Standard) bei ca. 6,5 kb eine zusätzliche starke Bande im Bereich von etwa 5,3 kb. Dies spricht für eine Mehrfachintegration des 5,3 kb Vektorfragmentes (Expressionskassette mit *ura3d4*) in normaler Tandem-Anordnung (Kopf an Schwanz, **Abb. 3.27 B**). Aus dem Vergleich der Bandenintensitäten mit der Software ImageQuaNT (vgl. 2.6.7.6) mit dem genomischen *LIP2*-Allel (6,5 kB Fragment, 1 Kopie) konnte eine Kopiezahl der integrierten Vektorfragmente von 8-15 abgeschätzt werden. Zusätzlich trat in einigen Transformanden (T3, T7, T8, T13) eine intensivere Bande von ca. 9,2 kb auf, was auf das Vorkommen einer Integration des Vektors in inverser Tandem-Anordnung (Kopf an Kopf, vgl. **Abb. 3.27 C**) hinwies. Die in ihrer Größe variablen, mit der Intensität einer Kopie auftretenden Banden (>4,96 kb) zeigten die rechte Grenzregion zwischen Vektorfragment und Integrationsort an (**Abb. 3.25, Abb. 3.26; Abb. 3.27 A, B**).



**Abb. 3.26:** Southern-Hybridisierung zum Nachweis der erhöhten Kopiezahl des *LIP2* Gens in den multicopy Transformanden H222-S4(JMP6) T3 (4), T5 (5) und T15 (6) im Vergleich mit den Insertionsmutanten H222-41(JMP5) N137 (7) und N235A (8) und den Kontrollstämmen H222 (1), H222-S4 (2) und H181 (3) mit einfacher Kopie des *LIP2* Gens. Erklärungen zu den Banden siehe **Abb. 3.25**.



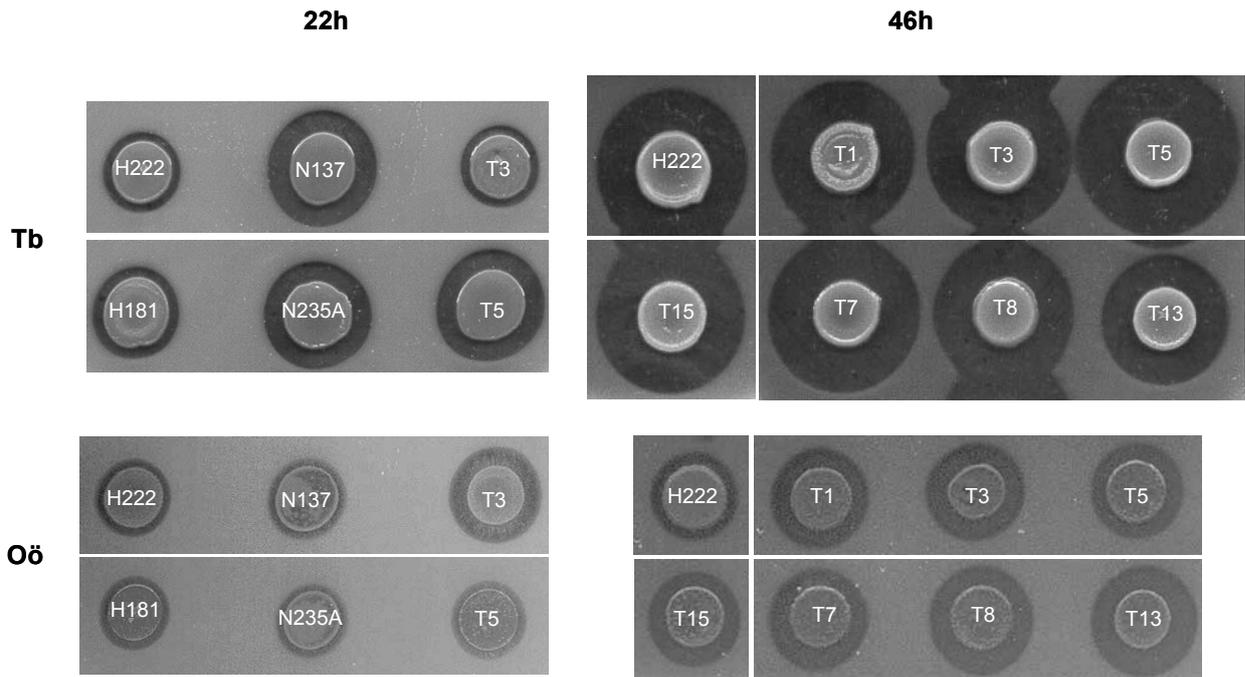
**Abb. 3.27: Schematische Darstellung der Möglichkeiten der Integration des linearisierten Vektorfragmentes aus JMP6 in das Genom von *Y. lipolytica*.** Nach SalI-Verdau der genomischen DNA und Detektion mit der LIP2-Sonde konnten im Southern-Blot Fragmente mit unterschiedlicher Größe detektiert werden (vgl. Text). SalI (v) - SalI-Schnittstelle im Vektorfragment, SalI (g) - SalI-Schnittstelle im Genom, TA / ZE - nach Linearisierung von JMP6 mit NotI gespaltene Integrationssequenz LTR zeta , x - variable Fragmentgröße

Die Größe dieser Fragmente ist abhängig von der Entfernung der nächsten *SaI*-Schnittstelle im Genom vom Integrationsort des Vektorfragmentes. In der Transformante T9 wurde das 5,3 kb Vektorfragment während der Transformation offensichtlich unter Verlust der *LIP2* Fragmente zerstört, was nur zur multicopy Integration des *ura3d4*-Teils des ursprünglichen JMP6-Vektorfragmentes ins Genom führte und in einer wiederholten Detektion dieses Southern-Blots mit einer *URA3*-Sonde (nicht gezeigt) bestätigt wurde. Bei der Integration der Vektorfragmente in das Genom in einer so genannten Schwanz-an-Schwanz Anordnung (inverse Tandemintegration) entstand nach *SaI*-Verdau ein kurzes 0,64 kb Fragment, das im Southern-Blot aufgrund seiner geringen Größe nicht detektiert wurde. Außerdem entstanden zwei Fragmente, deren Größen in Abhängigkeit von den nächsten genomischen *SaI*-Schnittstellen variabel waren (**Abb. 3.27 D**).

Das Bandenmuster der getesteten Insertionsmutanten war mit dem der Kontrollstämme identisch und bestätigte, dass der  $Lip^{++}$ -Phänotyp dieser Stämme eine andere Ursache hat und nicht auf einer Vervielfältigung der Kopiezahl des *LIP2* Gens im Genom beruht (**Abb. 3.26**).

**Charakterisierung des  $Lip^{++}$ -Phänotyps im Plattentest.** Ausgewählte Insertionsmutanten des Typs H222-41(JMP5) und die *LIP2*-multicopy Transformanden des Typs H222-S4(JMP6) wurden im Plattentest mit Tributyrin, Sonnenblumenöl und Olivenöl als C-Quellen näher untersucht (**Abb. 3.28**).

Der  $Lip^{++}$ -Phänotyp der Insertionsmutanten N137 und N235A auf Tributyrin war gegenüber denen des Wildtypstammes H222 und der CS:ICS-Produktmustermutante H181 (beide  $Lip^{+}$ -Phänotyp) an den viel stärker ausgeprägten Klärungshöfen erkennbar. Auf Sonnenblumen- und Olivenöl verhielten sich diese Insertionsmutanten dagegen wie die Vergleichsstämme mit  $Lip^{+}$ -Phänotyp. Interessanterweise wurde ein unterschiedliches Verhalten der getesteten *LIP2* multicopy Transformanden T1 bis T15 beobachtet, die als integrative Transformanden individuell betrachtet und getestet wurden. Während einige *LIP2* multicopy Transformanden (wie T5) auf Tributyrin eine fast so große Hofbildung wie die Insertionsmutanten zeigten, entwickelten andere (wie T3) nur den normalen  $Lip^{+}$ -Phänotyp. Mit Oliven- oder Sonnenblumenöl (nicht gezeigt) als C-Quelle bildeten alle getesteten *LIP2* multicopy Transformanden deutlich stärkere Klärungszonen (**Abb. 3.28**, Oö) als die Stämme H222, H181 und die Insertionsmutanten, jedoch waren auch auf diesen C-Quellen Unterschiede in der Hofbildung zwischen den einzelnen *LIP2*-multicopy Transformanden zu erkennen. Bedingt durch diese Unterschiede wurden die *LIP2* multicopy Transformanden T3, T5 und T15 für die weiteren Untersuchungen ausgewählt.

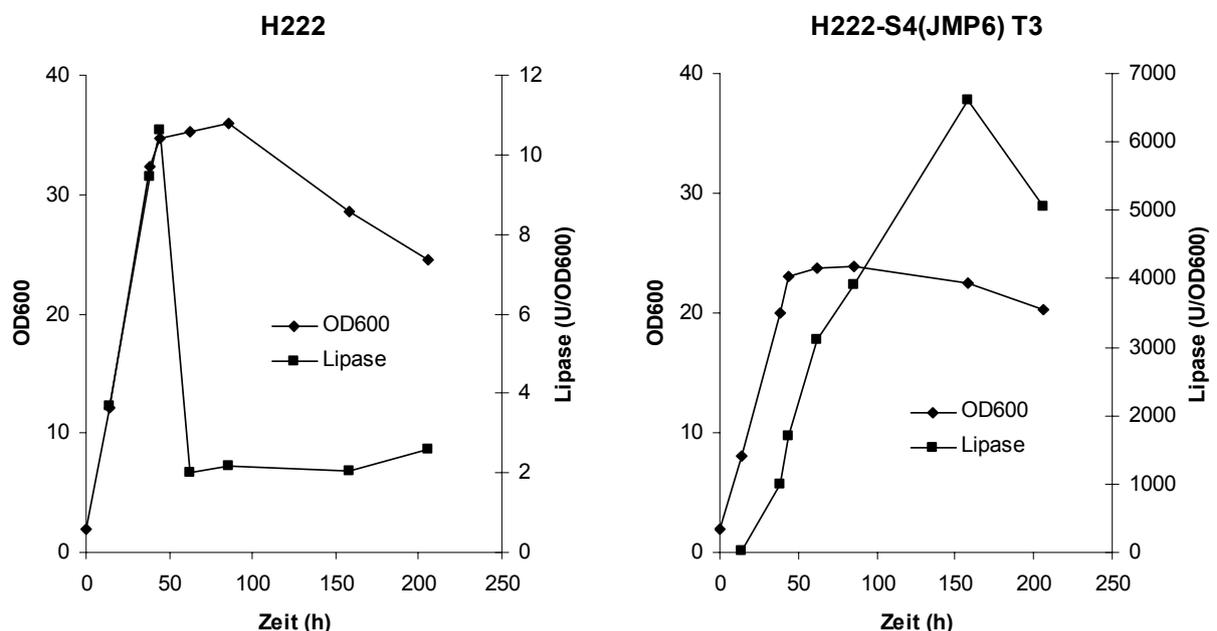


**Abb. 3.28:** Vergleich der extrazellulären Lipaseaktivität der Stämme H222, H181, der  $LIP^{++}$  Insertionsmutanten H222-41(JMP5) N137 und N235A sowie ausgewählter  $LIP2$  multicopy Transformanten des Typs H222-S4(JMP6) im Plattentest mit Tributyrin (Tb) oder Olivenöl (Oö) als C-Quelle. Die Stämme wurden 24 h in flüssigem YPD kultiviert, geerntet und jeweils 5  $\mu$ l ( $1 \cdot 10^6$  Zellen) aufgetropft. Die verwendeten Weichagarplatten (0,8 % Agar) enthielten 1 % der entsprechenden C-Quelle und zur Emulgierung der Substrate 0,05 % Tween80 sowie 50 mM KKP pH 7,4. Die Inkubationszeit der Testplatten bei 28 °C betrug 22 h bzw. 46 h. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse aus 2 Versuchen.

Das unterschiedliche Verhalten innerhalb der Transformanten könnte mit der unterschiedlichen Art der Integration des JMP6-Vektorfragmentes (Tandemintegration, inverse Tandemintegration, vgl. **Abb. 3.27**) und/oder der Kopiezahl der Expressionskassette  $pPOX2-LIP2$  im Genom der Stämme in Zusammenhang stehen (**Abb. 3.25**). Die abweichende Ausprägung des Lip-Phänotyps der Insertionsmutanten und  $LIP2$  multicopy Transformanten auf den getesteten C-Quellen deutete auf unterschiedliche Substratspezifitäten und/oder unterschiedliche Expressionsregulation verschiedener Lipasen hin. Der für die Überexpression des  $LIP2$  Gens genutzte Promotor  $pPOX2$  in den  $LIP2$  multicopy Transformanten wird durch langkettige Fettsäuren (C16-C18), wie sie aus Sonnenblumen- bzw. Olivenöl freigesetzt werden, stark induziert. Kurzkettige Fettsäuren (C4), wie sie aus Tributyrin entstehen, induzierten offensichtlich schlechter. Dagegen schien die erhöhte Lipaseexpression in den  $Lip^{++}$ -Insertionsmutanten an Tributyrin gekoppelt zu sein.

### 3.3.2 Wachstum auf Triglyceriden und Lipaseexpression

**Bestimmung der Gesamtlipaseaktivität.** Zur weiteren Charakterisierung der Stämme wurde deren Gesamtlipaseaktivität (vgl. 2.5.3) bestimmt. Dazu wurde ein photometrischer Enzymtest angewendet (Morin *et al.*, 2003). Im Test wurde eine bei pH 7,4 (pH-Optimum für Lipasen) gepufferte Substratlösung benutzt, in der die chromogene Verbindung p-Nitrophenylbutyrat (p-NPB) als Substrat für die Lipasen diente. Bei 400 nm wurde die Kinetik der Freisetzung von p-Nitrophenol gemessen, das aufgrund der Spaltung der Esterbindung zwischen p-Nitrophenol und Butyrat aus p-NPB unter der Einwirkung der Lipasen entstand. Es ist anzumerken, dass p-NPB nicht das natürliche Substrat von Lipasen darstellte (diese sind Mono-, Di- und Triglyceride) und nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die Ausbildung des Enzym-Substrat-Komplexes beeinflusst wurde. Des Weiteren wurden mit dem Test alle Enzyme mit Esteraseaktivität (Hydrolytische Spaltung der Esterbindung  $R_1\text{-COO-CH}_2\text{-R}_2$ ) erfasst, d.h. sowohl Triacylglycerollipasen (wie Lip2p) als auch Carboxylesterasen (vgl. 1.5).



**Abb. 3.29:** Verlauf der Expression der Lipaseaktivität für die *LIP2*-multicopy Transformante H222-S4(JMP6) T3 und für den Wildtypstamm H222 während der Kultivierung auf Sonnenblumenöl unter Produktionsbedingungen für Citronensäure. Kultivierung in 500 ml Schüttelkolben mit Schikanen mit 100 ml Minimalmedium Mp und 5 % Sonnenblumenöl. Bestimmt wurde die Gesamtlipaseaktivität der Kultur (Zellen + Kulturüberstand; vgl. 2.5.3).

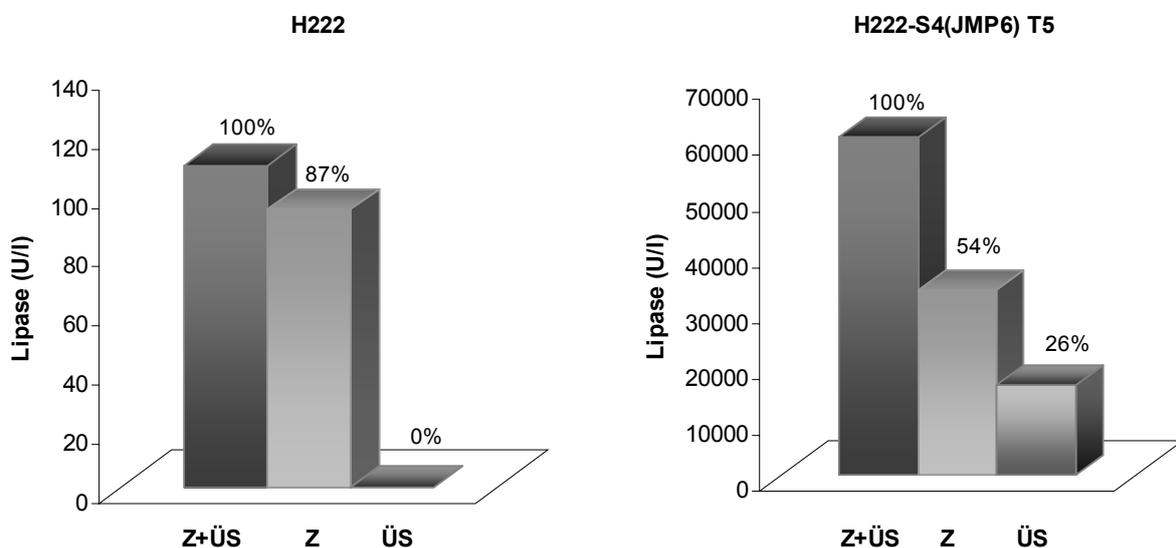
Ausgewählte *Y. lipolytica* Stämme wurden unter CS-Produktionsbedingungen mit 1 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Mp) und 5 % Sonnenblumenöl im Schüttelkolben mit Schikanen kultiviert. Die **Abb. 3.29** zeigt beispielhaft für die Stämme H222 und die *LIP2* multicopy Transformante H222-S4(JMP6) T3 den Expressionsverlauf der Gesamtlipaseaktivität.

Der Wildtypstamm H222 und die ausgewählte *LIP2* multicopy Transformante T3 zeigten beträchtliche Unterschiede in Höhe und Verlauf der spezifischen Lipaseaktivität. Im Stamm H222 stieg die Lipaseaktivität in der exponentiellen Wachstumsphase an und erreichte bei etwa 40 h Kulturzeit das Maximum bei etwa 400 U/l bzw. 10 U/OD600. Mit dem durch N-Limitation hervorgerufenen Übergang in die stationäre Phase (Beginn der CS-Produktionsphase) ging die Aktivität wieder zurück und blieb über den weiteren Kulturverlauf auf einem konstant niedrigen Niveau bei 2-4 U/OD600. Mit der *LIP2*-multicopy Transformante T3 wurde mit maximal 100000 bis 150000 U/l bzw. 5000-6600 U/OD600 eine ca. 400-600fach höhere Lipaseaktivität bestimmt. Im Gegensatz zu H222 stieg für die Transformante T3 die spezifische Aktivität der Lipase auch nach dem durch die N-Limitation hervorgerufenen Übergang in die stationäre Phase (Produktionsphase) weiter an und erreichte erst nach etwa 120-160 h ihr Maximum. Dabei erhöhte sich die biomassespezifische Aktivität der *LIP2*-multicopy Transformante T3 gegenüber dem Wildtypstamm H222 von Faktor 6 (14 h Kulturzeit) auf über 3300 bei 158 h Kulturzeit (**Abb. 3.29**). Die Induktion des starken Promotors *pPOX2* durch Fettsäuren und damit die Lip2p-Expression war demnach in den multicopy Transformanten in der exponentiellen Wachstumsphase noch nicht voll ausgeprägt.

Bis zu einer Kulturzeit von etwa 17-20 h wurden für die anderen getesteten Stämme H222-S4, H181 und H222-41(JMP5) N137 bzw. N235A nahezu gleiche Aktivitäten von 20-50 U/l bzw. spezifische Aktivitäten bezogen auf die Biomasse der Kultur von 1-4 U/OD600 bestimmt (nicht gezeigt). Bis zu einem Maximum bei 40-50 h (Wachstumsende durch N-Limitation und Beginn der Produktionsphase) erhöhte sich dann die Aktivität in diesen Stämmen auf Werte von 50-400 U/l bzw. 4-10 U/OD600. In der Produktionsphase fielen die Aktivitäten wieder auf 2-4 U/OD600 ab. Überraschenderweise konnten für die untersuchten Insertionsmutanten H222-41(JMP5) N235A bzw. N137 keine höheren Enzymaktivitäten gegenüber den Lip<sup>+</sup>-Stämmen H222, H222-S4 und H181 festgestellt werden. Wie bereits im Plattentest beobachtet war die erhöhte Lipaseexpression und der daraus resultierende Lip<sup>++</sup>-

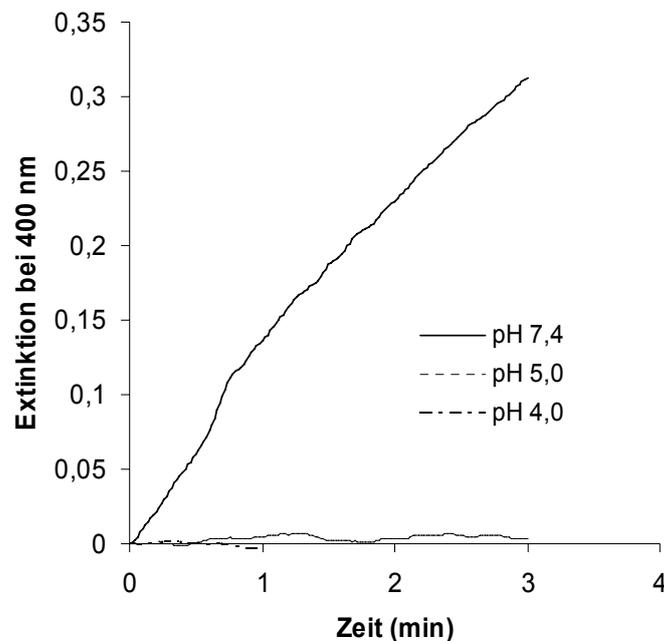
Phänotyp dieser Stämme offenbar an Tributyrin als C-Quelle gebunden und trat mit Sonnenblumenöl nicht auf (vgl. **Abb. 3.28**). Zur Prüfung dieser Beobachtung erfolgte die Kultivierung der Insertionsmutante H222-S4(JMP5) N137 auf Tributyrin (2 %) im Vergleich zu Sonnenblumenöl (2 %) als C-Quelle. Die Bestimmung der Lipaseaktivität in der Kulturflüssigkeit ergab jedoch keine Unterschiede zwischen beiden Substraten, was gegen den an Tributyrin gekoppelten Lip<sup>++</sup>-Phänotyp in dieser Mutante sprach und von anderen Faktoren bestimmt wird.

Zum Nachweis der erhöhten Lipaseaktivität im extrazellulären Medium, wurden für den Wildtypstamm H222 und die *LIP2* multicopy Transformante H222-41(JMP6) T5 Proben (Zellen + Kulturflüssigkeit) durch Zentrifugation aufgetrennt. Anschließend wurde die Aktivität der Lipase im erhaltenen, weitgehend zellfreien Kulturüberstand und von den in 1x Mineralsalzen nach Reader resuspendierten Zellen bestimmt. Für die *LIP2* multicopy Transformante T5 wurde nach 90stündiger Kulturzeit im Vergleich zum Stamm H222 eine deutlich höhere Lipaseaktivität im zellfreien Kulturüberstand gefunden (**Abb. 3.30**). Dies bestätigte die erhöhte funktionelle Expression des für die extrazellulären Lipase Lip2p codierenden *LIP2* Gens in der Transformante T5.



**Abb. 3.30:** Verteilung der Lipaseaktivität in der *LIP2* multicopy Transformante H222-S4(JMP6) T5 und im Wildtypstamm H222 während der Kultivierung auf Sonnenblumenöl. Kultivierungsbedingungen vgl. Abb. 3.29. Zeitpunkt der Probenahme 89 h. Die Bestimmung der Lipaseaktivität in den Proben erfolgte in der Kulturflüssigkeit (Z+ÜS), den nach Abtrennung der Kulturflüssigkeit in 1x Mineralsalzen nach Reader resuspendierten Zellen (Z) und im zellfreien Kulturüberstand (ÜS). Die prozentuale Verteilung der Lipaseaktivität wurde auf 1 ml Kulturflüssigkeit berechnet. Es wurde davon ausgegangen, dass sich in der Kulturflüssigkeit (Z+ÜS) 100 % der Aktivität befanden.

Im Verlauf der Untersuchungen wurde auch der Einfluss des pH-Wertes auf die Lipaseaktivität geprüft. Generell wird bei der Messung einer Enzymaktivität immer in der Nähe des pH-Optimums des entsprechenden Enzyms gearbeitet, im Fall der Lipase bei einem pH-Wert von 7,4. Während des Wachstums und der Produktbildung mit *Y. lipolytica* wurde ein pH-Wert von 5,0-6,0 gewählt. Im Verlauf der Kultivierung fiel dieser Wert zunächst aufgrund des Verbrauchs der anorganischen N-Quelle und später wegen der Säurebildung deutlich auf Werte von 2,0-4,0 ab, so dass mit Lauge gegen titriert werden musste (vgl. 2.4.1). Es zeigte sich aber, dass bei einem pH-Wert von 5,0 im Messansatz nur noch etwa 5 % der Lipaseaktivität gegenüber einem pH-Wert von 7,4 im Messansatz zu bestimmen war (**Abb. 3.31**).



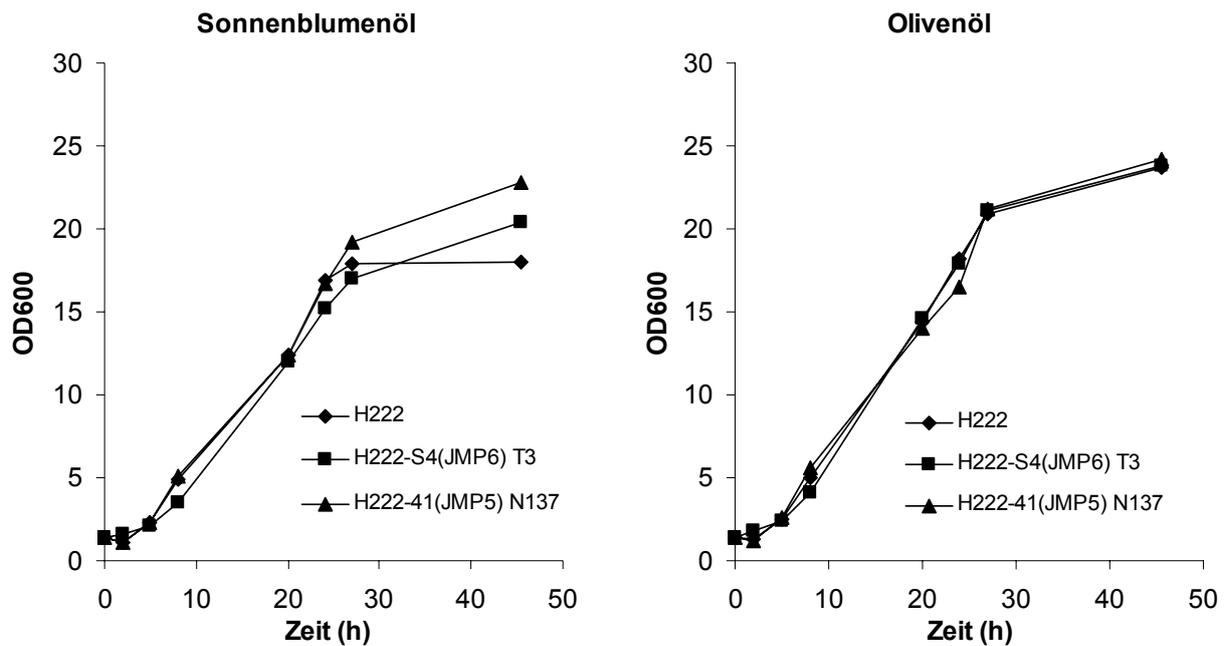
**Abb. 3.31: Einfluss des pH-Wertes auf die Lipaseaktivität.** Gemessen wurde der zellfreie Überstand der Kulturflüssigkeit des Stammes H222-S4(JMP6) T3 nach 33 h. Kultivierung im Schüttelkolben mit 100 ml Minimalmedium Mg mit 5 % Sonnenblumenöl als C-Quelle.

Bei einem pH-Wert von 4,0 konnte mit dem genutzten Test (vgl. 2.5.3) sogar überhaupt keine Aktivität mehr nachgewiesen werden. Kamzolova *et al.* (2005) kamen mit ihrer Nachweismethode (Titration der durch die Lipasespaltung des Triglycerids freiwerdenden Fettsäuren; vgl. auch Morin *et al.*, 2003) zu vergleichbaren Ergebnissen und stellten die maximale Lipaseaktivität bei pH 8,0 fest, während zwischen pH 4,5 und 6,0 keine Aktivität gemessen werden konnte. Andere Autoren

setzten Lipase-überproduzierende Mutanten ein und konnten im aufkonzentrierten Kulturüberstand auch bei niedrigen pH-Werten (pH 3-4) 20-40 % der Aktivität messen, die bei pH 7 maximal (100 %) war (Fickers *et al.*, 2006). Die äußeren Bedingungen (Kultivierungsparameter, Probenbehandlung) scheinen die Stabilität der Lipasen sehr stark zu beeinflussen. Hinzu kommen die auftretenden Unterschiede bei der Aktivitätsbestimmung in Abhängigkeit von der jeweiligen Messmethode.

Von physiologischer Seite war die Tatsache, dass die Lipasen im schwach sauren pH-Bereich (pH 5-6) eine geringere Aktivität aufwiesen interessant, weil in diesem pH-Bereich das Wachstumsoptimum für *Y. lipolytica* liegt. In Kultivierungsversuchen mit Pflanzenölen zeigte *Y. lipolytica* auch bei niedrigen pH-Werten (<4) gutes Wachstum. Es muss davon ausgegangen werden, dass die im Messansatz bei pH 7,4 bestimmte Lipaseaktivität nicht den tatsächlichen Verhältnissen in der Kulturflüssigkeit unter CS-Produktionsbedingungen (pH 4,0-5,0) entsprach, sondern die Lipasen nur zu einem Bruchteil aktiv waren. Trotz dieser geringen Lipaseaktivität schien es aber noch nicht zur Limitation bei der Verwertung der Triglyceride gekommen zu sein. Die *LIP2* multicopy Transformanden sollten gegenüber den Vergleichsstämmen in der Summe trotzdem über eine höhere Lipaseaktivität verfügen, da von diesen Transformanden sehr viel mehr Lip2p gebildet und sekretiert wurde.

**Wachstum in Submerskultur im Schüttelkolben.** Das Wachstumsverhalten ausgewählter Insertionsmutanten und *LIP2* multicopy Transformanden wurde in Submerskultivierungen im Schüttelkolben mit Sonnenblumen- und Olivenöl unter Wachstumsbedingungen mit 3 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Mg) im Vergleich mit H222 und H222-S4 überprüft. Dabei sollte auch das wiederholt im Plattentest gefundene Verhalten der *LIP2* multicopy Transformanden, mit Olivenöl als C-Quelle die ausgeprägteren Klärungshöfe zu bilden, geprüft werden, was einen Hinweis für eine Substratspezifität der überexprimierten Lipase Lip2p sein könnte. Der Wildtypstamm H222, die Insertionsmutante H222-41(JMP5) N137 und die *LIP2* multicopy Transformande H222-S4(JMP6) T3 wurden unter Wachstumsbedingungen im Schüttelkolben mit jeweils 1 % Sonnenblumen- bzw. Olivenöl kultiviert und das Wachstum anhand der OD600 und des Laugeverbrauchs für die pH-Titration (nicht dargestellt) verglichen (**Abb. 3.32**).



**Abb. 3.32:** Vergleich des Wachstums des Wildtypstammes H222, der *LIP2*-multicopy Transformante H222-S4(JMP6) T3 und Insertionsmutante H222-41(JMP5) N137 unter Wachstumsbedingungen mit jeweils 1% Sonnenblumen- bzw. Olivenöl. Kultivierung im 500 ml Schüttelkolben mit Schikanen in 100 ml Minimalmedium Mg.

Sowohl mit Sonnenblumen- als auch mit Olivenöl als C-Quelle konnten keine wesentlichen Unterschiede im Wachstumsverhalten der getesteten Stämme festgestellt werden. Für H222 und N137 wurden teilweise geringfügig höhere OD600-Werte im Vergleich mit H222-S4(JMP6) T3 bestimmt (0,5-2 OD600), was aber im Schwankungsbereich der Methode zur Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm lag. Interessanterweise zeichneten sich die *LIP2* multicopy Transformandenstämme durch ein anderes Emulgationsverhalten für das Triglycerid gegenüber den Vergleichsstämmen aus. Offenbar bewirkte die *LIP2* Überexpression, dass die Transformanden Öl besser emulgieren konnten. Dadurch wäre eine Beeinflussung bei der Bestimmung der OD600-Werte in diesen Transformanden denkbar, da während des Waschens der auf Öl kultivierten Zellen (siehe 2.4.4) geringfügig mehr Biomasse verloren gehen könnte als bei den anderen Stämmen.

Damit konnten bei der Verwertung von Sonnenblumen- und Olivenöl unter den gewählten Bedingungen der Schüttelkultur für die getesteten Lipase überexprimierenden *LIP2* multicopy Transformanden (T3, T5, T15) und die getesteten Insertionsmutantenstämme (N123, N137, N235A, N256A) keine verbesserten Wachstumseigen-

schaften gegenüber dem Wildtypstamm H222 festgestellt werden. Auch in Kultivierungen im Bioreaktor, wo der Einfluss einer Sauerstofflimitation auf die Biomassebildung ausgeschlossen werden konnte (Gelöstsauerstoffkonzentration mindestens 50 %), wurden keine Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit aufgrund einer erhöhten lipolytischen Aktivität zwischen den Stämmen festgestellt.

### 3.3.3 Produktion von Citronensäure aus Sonnenblumenöl

**Citronensäurebildung im Schüttelkolben.** Erste Versuche zur CS-Produktion im Schüttelkolben mit Sonnenblumenöl zeigten für drei der vier getesteten Insertionsmutanten mit Lip<sup>++</sup>-Phänotyp (Ausnahme N256A) eine etwas höhere maximale Produktbildungsrate ( $RZA_{(CS+ICS)max}$ ) gegenüber H222 und insbesondere H222-S4 (**Tab. 3.7, Tab. 3.8**), was zunächst für eine positive Wirkung einer erhöhten extrazellulären Lipaseaktivität auf die CS-Produktionseigenschaften dieser Stämme unter den Bedingungen des Schüttelkolbens sprach.

Dagegen führte die deutlich erhöhte Lipaseaktivität der *LIP2* multicopy Transformanden gegenüber den Vergleichsstämmen unter den Bedingungen des Schüttelkolbens nicht zur Verbesserung der Gesamtproduktbildungsrate aus Sonnenblumenöl, wie ein Vergleich der ermittelten Gesamtsäurekonzentrationen CS+ICS und der maximalen Raum-Zeit-Ausbeuten  $RZA_{(CS+ICS)max}$  verdeutlichte (**Tab. 3.8**). Die Werte für  $RZA_{(CS+ICS)max}$  der *LIP2* multicopy Transformanden lagen zwar teilweise deutlich über denen des Rezipientenstamms H222-S4, sind aber vermutlich auf dessen Uracil-Auxotrophie und der damit verbundenen Verzögerung des Wachstums und der Produktbildung zurückzuführen. Nur die untersuchten Insertionsmutanten N137 und N235A zeigten im Vergleich mit dem Produktionsstamm H181, H222 und den *LIP2* multicopy Transformanden leicht höhere Raum-Zeit-Ausbeuten. Hinsichtlich des Produktmusters CS:ICS zeigten die *LIP2* multicopy Transformanden einen etwas höheren ICS Anteil von 50-60 % gegenüber den Stämmen H222 bzw. H222-S4 und der Insertionsmutanten mit etwa 40 % (**Tab. 3.7, Tab. 3.8**). Der aufgrund seines veränderten Produktmusters selektierte Stamm H181 zeigte mit 10 % den geringsten ICS-Anteil.

**Tab. 3.7: Vergleich der CS-Produktion aus Sonnenblumenöl mit dem Wildtypstamm H222 (Lip<sup>+</sup>) und den aus H222-41 erhaltenen Insertionsmutanten H222-41(JMP5) N123, N137, N235A und N256A (Lip<sup>++</sup>).** Kultivierung im 500 ml Schüttelkolben mit Schikanen mit 100 ml Minimalmedium Mp mit 0,4 % Glucose + 5 % Sonnenblumenöl. \* Mittelwerte aus 2 Versuchen. Säurekonzentrationen nach 11-15 Tagen Kultivierung.

<i>Y. lipolytica</i> Stamm	CS (g/l)	ICS (g/l)	CS + ICS (g/l)	ICS (%)	RZA <sub>(CS+ICS)<sub>max</sub></sub> (g/l*h)
H222*	33,1	25,3	58,4	43	0,31
N123	31,1	18,9	50	38	0,36
N137*	35,1	27,1	62,2	44	0,34
N235A*	29,1	24,8	53,9	46	0,36
N256A	24,2	11,7	35,9	33	0,16

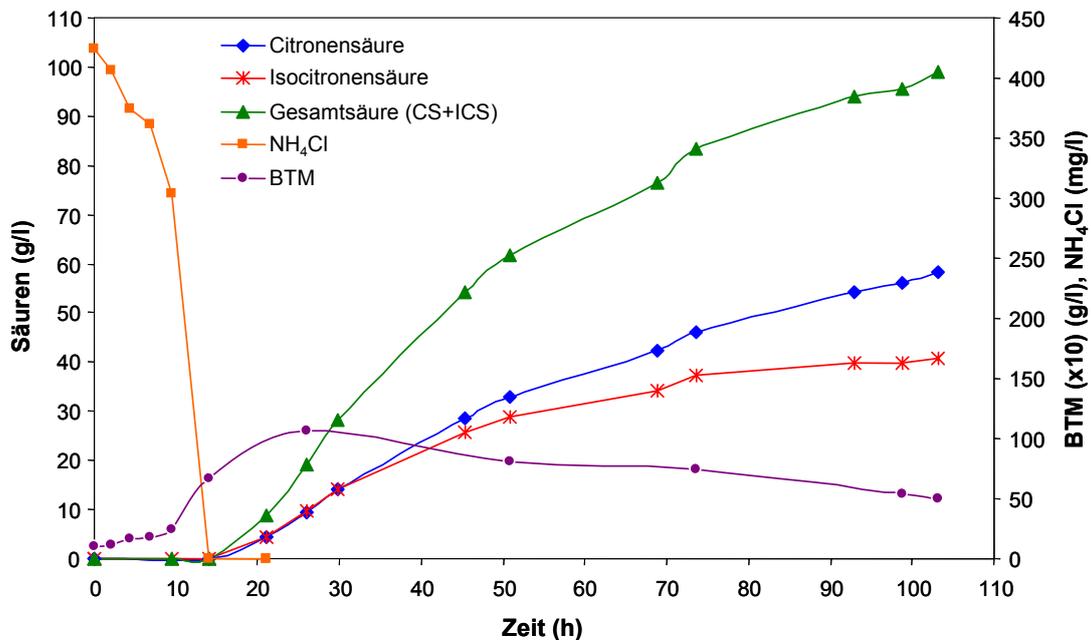
**Tab. 3.8: Vergleich der CS-Produktion aus Sonnenblumenöl mit dem Rezipientenstamm H222-S4 (Lip<sup>+</sup>), der Mutante H181, der Insertionsmutante H222-41(JMP5) N235A (Lip<sup>++</sup>) und den *LIP2* multicopy Transformanden H222-S4(JMP6) T3, T5 und T15.** Kultivierung im 500 ml Schüttelkolben mit 100 ml Minimalmedium Mp mit 0,4 % Glucose + 5 % (V1) bzw. 8 % (V2) Sonnenblumenöl. Säurekonzentrationen nach 11-15 Tagen Kultivierung.

	<i>Y. lipolytica</i> Stamm	CS (g/l)	ICS (g/l)	CS + ICS (g/l)	ICS (%)	RZA <sub>(CS+ICS)<sub>max</sub></sub> (g/l*h)
V1	H222-S4	25,5	16,8	42,3	40	0,25
	N137	34,9	26,2	61,6	43	0,36
	H222-S4(JMP6) T3	19,9	38,4	58,3	66	0,28
	H222-S4(JMP6) T15	30,0	29,0	59,0	49	0,29
V2	H222-S4	34,6	23,7	58,3	41	0,26
	N235A	39,7	29,3	69,0	42	0,36
	H181	65,3	7,4	72,7	10	0,31
	H222-S4(JMP6) T5	34,6	36,0	70,6	51	0,3

**Citronensäureproduktion im Bioreaktor.** Um auszuschließen, dass ein möglicher positiver Effekt einer verbesserten Triglyceridsplaltung infolge der erhöhten Lipaseaktivität auf das Wachstum und die Produktbildung durch eine Sauerstofflimitation der Hefezellen überdeckt wurde, war es erforderlich, ausgewählte Insertionsmutanten und *LIP2* multicopy Transformanden mit Lip<sup>++</sup>-Phänotyp vergleichend mit Kontrollstämmen mit Lip<sup>+</sup>-Phänotyp im Bioreaktor zu kultivieren. Im Gegensatz zu den Bedingungen im Schüttelkolben, wo spätestens bei

höheren Biomassekonzentrationen ( $>10\text{-}15\text{ OD}_{600}/\text{ml}$ ) mit dem Eintreten einer Sauerstofflimitation der Kulturen zu rechnen war, konnte im Bioreaktor eine ausreichend hohe Gelöstsauerstoffkonzentration (mindestens 50 %) gewährleistet werden.

Die **Abb. 3.33** zeigt am Beispiel der Kultivierung der Insertionsmutante H222-S4(JMP5) N137 den typischen Verlauf einer Fermentation von *Y. lipolytica* im Bioreaktor mit Sonnenblumenöl aus Substrat. Nach dem Verbrauch der Stickstoffquelle ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) kam es zur Wachstumslimitation der Kultur und zum Stopp der Biomassebildung, zeitlich setzte die Bildung von CS und ICS ein. Dabei zeigte die Mutante N137 das für *Y. lipolytica* Stämme typische CS:ICS Verhältnis von 60:40.



**Abb. 3.33: Batch-Kultivierung zur Gewinnung von Citronensäure im 2 l-Bioreaktor mit der Lip<sup>++</sup>-Insertionsmutante H222-S4(JMP5) N137 mit Sonnenblumenöl (7 %).** Kultivierungsbedingungen: 1,2 l Arbeitsvolumen in 2,0L Bioreaktor, Minimalmedium nach Behrens *et al.* (1978) mit 1,5 g/l  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , Rührerdrehzahl 1200 rpm, Luftbegasung 0-1,6 l/min, pH 5,0, Gelöstsauerstoffkonzentration 50 %

Die erwartete Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeuten und spezifischen Produktbildungsrate in Bioreaktoren ( $\text{RZA}_{(\text{CS}+\text{ICS})_{\text{max}}}$ : Anstieg von 0,3-0,4 auf 1,9-2,4 g/l\*h bzw.  $r_{(\text{CS}+\text{ICS})_{\text{max}}}$ : von 0,10-0,17 auf 0,25-0,34 g/h\*g BTM), bedingt durch die pH-Statierung und den erhöhten Sauerstoffeintrag gegenüber Schüttelkolbenansätzen, konnte

deutlich gezeigt werden (vgl. **Tab. 3.7**, **Tab. 3.8**, **Tab. 3.9**, **Abb. 3.34**). Dies wurde bereits für die Produktbildung auf Saccharose mit dem rekombinanten *Y. lipolytica* Stamm H222-S4(p67ICL1) T5 beschrieben (vgl. 3.2.3 und 3.2.4). In der **Tab. 3.9** und der **Abb. 3.34** sind die kinetischen Daten der Batch-Kultivierungen zur CS-Produktion aus Sonnenblumenöl im Bioreaktor für den Wildtypstamm H222, der Produktmustermutante H181, der Insertionsmutante H222-41(JMP5) N137 (N137) und die *LIP2* multicopy Transformante H222-S4(JMP6) T5 (T5) vergleichend dargestellt.

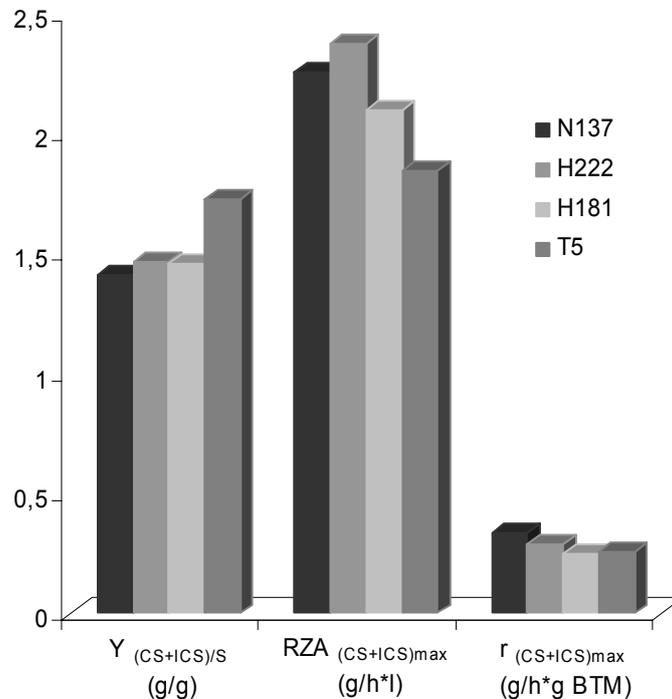
**Tab. 3.9:** Zusammenfassung der kinetischen Daten der CS-Produktion der *Y. lipolytica* Stämme H181, H222, der Insertionsmutante H222-41(JMP5) N137 (N137) und der *LIP2* multicopy Transformante H222-S4(JMP6) T5 (T5) aus Sonnenblumenöl im Bioreaktor. \*Ende Produktbildung noch nicht erreicht. Kultivierungsbedingungen vgl. Abb. 3.33.

Stamm	Zeit (h)	CS+ICS (g/l)	CS (g/l)	$RZA_{(CS+ICS)}$ (g/l*h)	$RZA_{(CS+ICS)max}$ (g/l*h)	$r_{(CS+ICS)}$ (g/h*g BTM)	$r_{(CS+ICS)max}$ (g/h*g BTM)	$Y_{(CS+ICS)/S}$ (g/g)
N137	103*	99	58	0,96	2,3	0,12	0,34	1,4
H181	96*	102	95	1,08	2,1	0,08	0,25	1,5
H222	93*	103	55	1,10	2,4	0,14	0,29	1,5
T5	97*	88	48	0,90	1,9	0,08	0,26	1,3
	148	121	70	0,80	1,9	0,09	0,26	1,7

Im Unterschied zum Stamm H181, der ein von Wildtypstämmen abweichendes günstiges CS:ICS-Verhältnis von 1:0,06 (6-7 % ICS) aufwies, war das Produktverhältnis mit H222, N137 und T5 mit ca. CS:ICS = 1:0,7 (41-46 % ICS) dem von *Y. lipolytica* Wildtypstämmen entsprechend (**Tab. 3.9**). Um die Produktbildungsraten der Stämme vergleichen zu können, wurde daher die Gesamtsäurebildung (CS+ICS) betrachtet. Nach Beendigung der Kultivierung lag die Gesamtsäurekonzentration für N137 mit 99 g/l etwas unter der des Stamms H181 mit 107,4 g/l (**Tab. 3.9**). Die ermittelte Produktbildungsrate  $RZA_{(CS+ICS)}$  über den Gesamtprozess lag für die Insertionsmutante N137 mit 0,96 g/l\*h im Bereich von H181 mit 0,85-1,08 g/l\*h. Bezogen auf die maximale Produktbildungsrate  $RZA_{(CS+ICS)max}$  (nur Produktionsphase) ergab sich dagegen ein bis zu 22 % höherer Wert für N137 gegenüber H181 (2,26 bzw. 1,84-2,10 g/l\*h).

Im Vergleich mit dem Wildtypstamm H222 zeigten dessen Derivate N137 und T5 mit gesteigerter Lipaseaktivität keine erhöhten Raum-Zeit-Ausbeuten und spezifischen Produktbildungsraten. Für viele Produktbildungsparameter ( $RZA_{(CS+ICS)}$ ,  $RZA_{(CS+ICS)max}$ ,  $r_{(CS+ICS)}$ ) zeigte der Stamm H222 verglichen mit der Mutante H181 und den Lip<sup>++</sup>-Stämmen N137 und T5 die besten Werte (**Tab. 3.9**, **Abb. 3.34**). Die

höchste maximale spezifische Produktbildungsrate  $r_{(CS+ICS)max}$  von 0,34 g/h\*g BTM wurde dagegen mit dem Stamm N137 erzielt, die beste Ausbeute an Gesamtsäure  $Y_{(CS+ICS)/S}$  (1,73 g/g gegenüber etwa 1,45 g/g der anderen Stämme) mit dem Stamm T5, aber nach längerer Kulturzeit (**Tab. 3.9**).



**Abb. 3.34:** Vergleich der Citratproduktion aus Sonnenblumenöl in Bioreaktoren unter Einsatz von *Y. lipolytica* H181, H222, H222-41(JMP5) N137 (N137) und H222-S4(JMP6) T5 (T5). Kultivierungsbedingungen und Erläuterungen vgl. Tab. 3.9.

Die Kinetik des Wachstums und der Säurebildung der *LIP2* multicopy Transformante T5 auf Sonnenblumenöl war etwas abweichend von allen bisherigen Kultivierungen mit *Y. lipolytica* Stämmen. Wie bereits in Schüttelkolben beobachtet trat eine veränderte Emulsionsausbildung mit *LIP2* multicopy Transformanden auch im Bioreaktor auf. Während bei den Stämmen H222 und H181 schon kurze Zeit nach Probennahmen (<1-2 min) eine Ausbildung von wässriger und öliger Phase beobachtet wurde, waren die Öl/Wasser-Emulsionen von T5 über einen längeren Zeitraum (>10-15 min) stabil.

Die höhere spezifische maximale Produktbildungsrate  $r_{(CS+ICS)max}$  des Stammes N137 wies auf einen positiven Einfluss des Lip<sup>++</sup>-Phänotyps der Insertionsmutanten auf den CS-Bildungsprozess hin, wie es schon in den Schüttelkolbenversuchen gezeigt wurde (**Tab. 3.7**, **Tab. 3.8**). Der mögliche positive Effekt einer verbesserten Lipa-

seexpression auf die CS-Produktion war aber im Bioreaktor nur noch relativ gering ausgeprägt und konnte für die *LIP2* multicopy Transformante H222-S4(JMP5) T5 mit geringeren RZA- und r-Werten gegenüber den Vergleichsstämmen H222 und H181 nicht bestätigt werden. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Citratproduktion aus Triglyceriden liegt demnach offensichtlich nicht bei der extrazellulären Hydrolyse dieser hydrophoben C-Quellen durch Lipasen. Demnach bietet der ausgewählte Produktionsstamm H181 aufgrund seines geringen Anteils an ICS am Gesamtsäureprodukt (5-7 %) bisher die günstigsten Voraussetzungen zur Gewinnung von CS aus Triglyceriden.

Die Verwertung von Triglyceriden durch die Hefezelle ist ein komplexer Prozess, bei dem die Spaltung des Triglycerids nur einen kleinen Teil ausmacht. Die Aufnahme der freien Fettsäuren in die Zelle und ihr Transport im Cytosol zu den Peroxisomen, wo ihr Abbau durch die  $\beta$ -Oxidation zu Acetyl-CoA erfolgt sowie die Überführung des Acetyl-CoA von den Peroxisomen in die Mitochondrien, wo der Abbau über den Citratzyklus stattfindet, wird durch das Einwirken einer Vielzahl von Transportsystemen und Enzymen bewirkt (Fickers *et al.*, 2005). Es ist möglich, dass es innerhalb dieser Kette von Transportern und enzymatischen Reaktionen eine oder mehrere gibt, die den Prozess der Triglyceridverwertung trotz der erhöhten Bereitstellung von Fettsäuren durch die verbesserte extrazelluläre Triglyceridspaltung limitieren. Das könnten unter anderem die Fettsäuretransportsysteme durch die Plasmamembran und in die Peroxisomen, die Aktivierung der Fettsäuren zu Acyl-CoA, die Kapazität der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation bzw. das Carnitin-Shuttlesystem sein, welches am Transport von Acyl-CoA und Acetyl-CoA-Verbindungen von den Peroxisomen in die Mitochondrien in Hefen beteiligt ist. Um eine deutliche Verbesserung der TG-Verwertung und CS-Produktion durch *Y. lipolytica* zu erreichen könnte es sinnvoll sein, die Aktivität ausgewählter Transportsysteme mittels Überexpression der dafür kodierenden Gene zu erhöhen.

## 4 Diskussion

Das Hauptanliegen der vorliegenden Arbeit war es, Beiträge für die Entwicklung eines alternativen Verfahrens zur CS-Produktion aus nachwachsenden Rohstoffen (wie Pflanzenöle und Saccharose) mit der Hefe *Y. lipolytica* zu leisten.

Die Untersuchungen zur molekulargenetischen Stammoptimierung und zur phänotypischen Optimierung des CS-Produktionsprozesses konzentrierten sich auf folgende Schwerpunkte:

1. Untersuchungen von Möglichkeiten zur Beeinflussung des CS:ICS Produktmusters bei der CS-Produktion aus nachwachsenden Rohstoffen mit dem Ziel der Reduktion des ICS-Anteils durch die gezielte molekulargenetische Veränderung von ausgewählten *Y. lipolytica* Stämmen.
2. Gewinnung von CS aus dem erneuerbaren Substrat Saccharose mit rekombinanten saccharoseverwertenden *Y. lipolytica* Stämmen und phänotypische Optimierung der Prozessführung.
3. Untersuchungen von Möglichkeiten zur Optimierung der Gewinnung von CS aus Pflanzenölen durch die Verbesserung der Triglyceridverwertung über eine Steigerung der extrazellulären Lipaseaktivität ausgewählter Stämme.

### 4.1 Beeinflussung des Produktmusters CS:ICS

Bei der biotechnologischen Gewinnung von organischen Säuren unter Verwendung von Mikroorganismen, muss das gewünschte Produkt in möglichst reiner Form in der Kulturlösung vorliegen. Das ist vor allem deshalb von großer wirtschaftlicher Bedeutung, weil dadurch die Kosten zur Aufbereitung des Produktes wesentlich verringert werden können. Für die Herstellung von Citronensäure trifft dies ebenfalls zu. Zur Etablierung eines Verfahrens zur Herstellung von CS mit der Hefe *Y. lipolytica* ist es deshalb gewünscht, den ICS-Anteil am Gesamtsäureprodukt (CS+ICS) so gering als möglich zu halten.

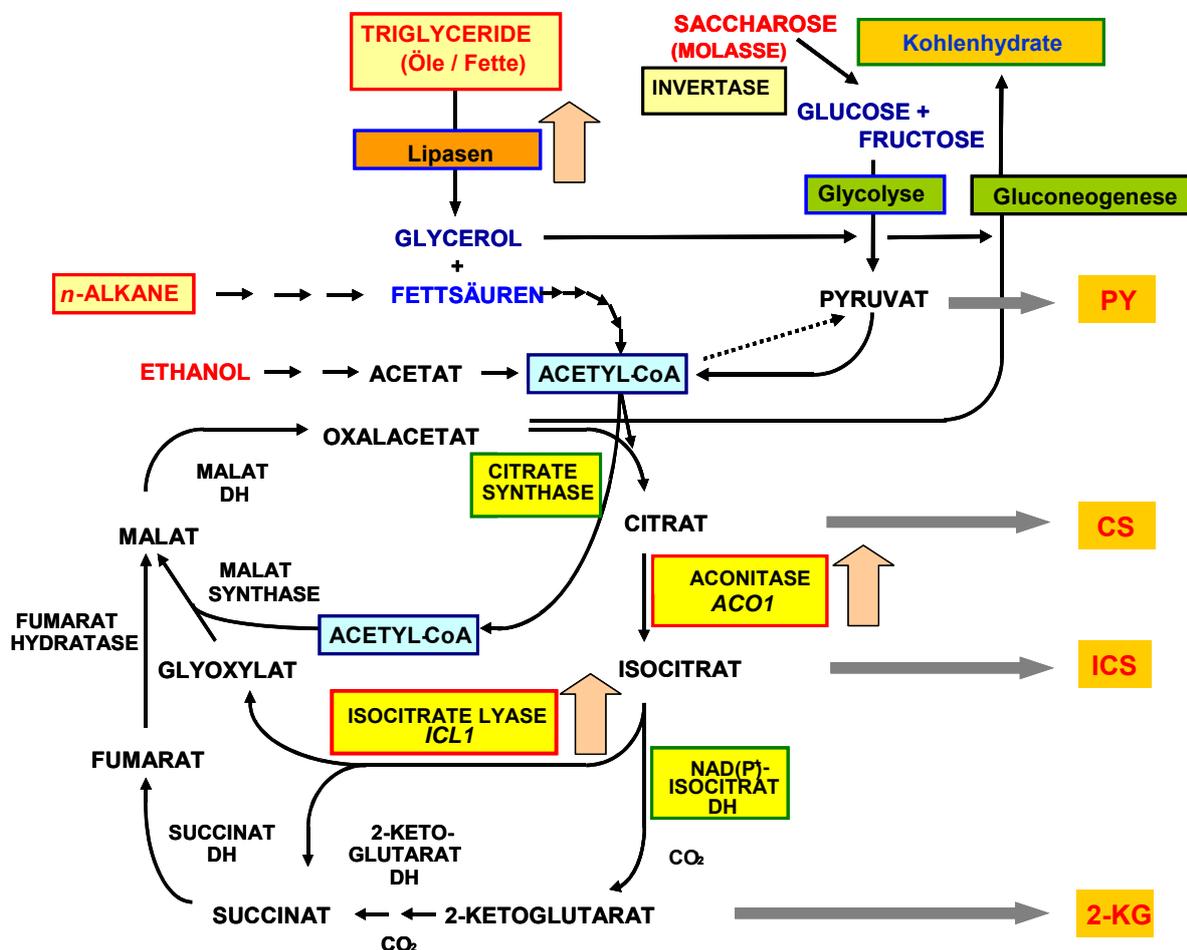
Das Produktmuster CS:ICS bei der CS-Produktion mit *Y. lipolytica* zeigte eine Abhängigkeit von der verwendeten C-Quelle, wobei für Wildtypstämme auf Kohlehydratsubstraten ICS-Anteile von durchschnittlich 10 % und auf hydrophoben Substraten von durchschnittlich 40-50 % gefunden wurden. In der Literatur wurden eine Reihe von Mutantenstämmen von *Y. lipolytica* beschrieben, die ein von Wildtypstämmen abweichendes Produktmuster zeigten und einen ICS-Anteil von <5-10 % am Gesamtsäureprodukt aufwiesen (vgl. 1.3.2, **Tab. 1.1**).

#### 4.1.1 Überexpression der Isocitratlyase

Bei allen der bisher in der Literatur beschriebenen *Y. lipolytica* Stämmen mit verändertem Produktmuster CS:ICS handelte es sich um Mutanten, die meist durch chemische Mutagenese gewonnen wurden (Akiyama *et al.*, 1973a, b; Good *et al.*, 1985; Finogenova *et al.*, 1986; vgl. **Tab. 1.1**). Die Charakterisierung solcher Mutantenstämme hatte gezeigt, dass es zu komplexen Veränderungen in den Aktivitäten von mehreren im Glyoxylat (GZ)- und Tricarbonsäurezyklus (TCC) involvierten Enzymen gekommen war (Finogenova *et al.*, 1986; Ermakova *et al.*, 1986, vgl. **Abb. 1.3**). Ein Ziel dieser Arbeit war es zu zeigen, dass durch die Überexpression des für die Isocitratlyase codierenden *ICL1* Gens gezielt auf das CS:ICS Produktmuster eingewirkt werden kann. Dazu wurde die Kopiezahl des *ICL1* Gens von *Y. lipolytica* mittels Transformation mit multicopy Vektoren um 8-15 erhöht (**Abb. 4.1**). Die funktionelle Expression des *ICL1* Gens führte über den Gen-Dosis-Effekt zu einer drastischen Erhöhung der Aktivität der ICL in den erhaltenen *ICL1* multicopy (mc) Transformanden um einen Faktor von 10-20 gegenüber dem Wildtyp- bzw. Rezipientenstamm. Es konnte gezeigt werden, dass die Relation der erhöhten ICL-Aktivität in den Transformanden über den gesamten Kulturverlauf während der CS-Produktion (>200 h) im Vergleich zu den Kontrollstämmen erhalten blieb (vgl. **Abb. 3.4 B**). Der ICS-Anteil, der im Wildtypstamm H222 und im daraus abgeleiteten Rezipientenstamm H222-S4 auf Glucose bei durchschnittlich 10-14 % lag, verringerte sich in den getesteten *ICL1* mc Transformanden vom Typ H222-S4(p64ICL1) bzw. H222-S4(p67ICL1) auf nur noch 3-5 %. Dies entsprach einer Abnahme des ICS-Anteils um 50-60 %. Auf den untersuchten hydrophoben C-Quellen Sonnenblumenöl und Hexadecan war die Veränderung des Produktverhältnisses CS:ICS noch ausgeprägter. Im Wildtyp- und Rezipientenstamm betrug der ICS-Anteil durchschnittlich 40-50 %, in den *ICL1* mc Transformanden dagegen nur 4-8 %. Dies entsprach einer Reduzierung des ICS-Anteils um etwa 85 %.

Die mit den *ICL1* mc Transformanden erhaltenen Werte für den ICS-Anteil am Gesamtsäureprodukt CS+ICS liegen im Bereich der in der Literatur für Produktmustermutanten von *Y. lipolytica* angegebenen Werte (vgl. **Tab. 1.1**). So beschrieben Finogenova *et al.* (1986) für die Mutante 1 einen ICS-Anteil von 3 % auf Glucose und 5 % auf Hexadecan. Stottmeister und Hoppe (1991) gaben für den Mutantenstamm H181 ICS-Anteile von 2 % für Glucose und 5 % für Hexadecan an. Die Charakterisierung der Mutante 1 (verstärkte CS-Sekretion) und der Mutante 2 (verstärkte ICS-Sek-

retion) hinsichtlich der Aktivitäten verschiedener Enzyme des TCC und des GZ hatte gezeigt, dass das Produktmuster CS:ICS offenbar wesentlich vom Verhältnis der Aktivitäten der Enzyme Citrat-Synthase, NAD(P)-ICDH und insbesondere der ICL und der ACO abhing (Ermakova *et al.*, 1986; Finogenova, 1991). Die Aktivität der ICL in der Mutante 1 war gegenüber der im Elternstamm deutlich erhöht, während die der ACO deutlich reduziert war. Auf Genebene liegen über die Auswirkungen der Mutationen für beide Mutantenstämme keine Daten vor. Die Tatsache, dass die Aktivitäten mehrerer Enzyme beeinflusst wurden, könnte ein Hinweis auf pleiotrope Effekte infolge der Mutagenese bzw. Schäden an Regulatorgenen für Enzyme des TCC und GZ sein.



**Abb. 4.1:** Vereinfachte Darstellung der Stoffwechselwege zum Abbau verschiedener Substrate und der Sekretion von organischen Säuren des Intermediärstoffwechsels. Die unter bestimmten Bedingungen stattfindende Sekretion der Säuren Pyruvat (PY), Citronensäure (CS), Isocitronensäure (ICS) und 2-Ketoglutarat (2-KG) ist durch die grauen dicken Pfeile dargestellt. Die dicken Blockpfeile kennzeichnen die Überexpression der Aconitase (ACO1, Holz, 2006), Isocitratlyase (ICL1) und der extrazellulären Lipase Lip2p (LIP2). DH - Dehydrogenase

Die Mutante 1 zeigte außerdem auch auf Glucose im Vergleich zum Wildtypstamm eine hohe ICL-Aktivität. Dieser wird normalerweise durch Glucose reprimiert. In Mutante 1 schien daher die Glucose-Repression der ICL vermindert zu sein (Finogenova *et al.*, 1986). Der verzeichnete deutliche Anstieg der Aktivität der ICL in Mutante 1 auf Hexadecan im Vergleich zu Glucose zeigte jedoch auch, dass es durch das aus der Alkanverwertung entstehende Acetyl-CoA zur Induktion der *ICL1* Expression kam. Eine Möglichkeit zur Erklärung dieses Effektes wäre, dass durch die Mutation ein Bindungsmotiv auf der DNA für einen bei Glucoseanwesenheit bindenden Repressor verändert wurde. Dieser bindet dann mit geringerer Effizienz, was die Wirkung der Repression auf die *ICL1* Expression vermindert. Denkbar wäre auch, dass ein für den Repressor codierendes Gen so mutiert wurde, dass dessen Expression bei Glucoseanwesenheit nur vermindert abläuft und so nicht ausreichend Protein zur Repression des *ICL1* Gens synthetisiert werden kann.

In der **Tab. 4.1** sind die ICS-Anteile am Gesamtsäureprodukt (CS+ICS) von verschiedenen in dieser Arbeit und von Holz (2006) charakterisierten *Y. lipolytica* Stämmen zusammenfassend dargestellt. Die Transformanden H222-S4(p64ICL1) T1 und H222-S4(p67ICL1) T5 mit einer Überexpression des *ICL1* Gens und dem dadurch begründeten Gen-Dosis-Effekt zeigten eine deutliche Verschiebung des CS:ICS Produktmusters in Richtung der CS. Durch die gezielte Überexpression der Aconitase (*ACO1* Gen) nach multicopy Integration wurde kürzlich von Holz (2006) der gegenteilige Effekt zu den *ICL1* mc Transformanden beschrieben. Auf Glucose kam es dabei zu einem Anstieg des ICS-Anteil von 10-11 % auf 15 %, auf Sonnenblumenöl sogar von 40-45 % auf ca. 65 % (**Tab. 4.1**). Die Ausschaltung der ICL-Aktivität führte im Mutantenstamm H222-S4(JMP5) Z123 ebenfalls zu einer Verschiebung des CS:ICS Produktmusters in Richtung der ICS. Die Insertion der MTC in das *IDP2* Gen (codiert für die cytosolische NADP-ICDH) führte dagegen im Mutantenstamm H222-S4(JMP5) N156 zu einer Reduktion des ICS-Anteils im Vergleich zum Ausgangsstamm.

**Tab. 4.1: Beeinflussung des Produktmusters CS:ICS in *Y. lipolytica* Stämmen durch die gezielte Überexpression der Gene *ICL1* oder *ACO1* bzw. Deletion der Gene *ICL1* oder *IDP2*.** Aufgeführt sind Daten aus Schüttelkolbenversuchen unter CS-Produktionsbedingungen mit Minimalmedium Mp mit 5-10 % C-Quelle. WT - Wildtyp, mc – multicopy, Ura<sup>-</sup> - Uracil-auxotroph. \*In den Versuchen mit den *icl1*- bzw. *idp1*-Defektstämmen lag der ICS-Gehalt in H222 teilweise über den in der Tabelle angegebenen Werten (vgl. Tab. 3.3). \*\*Die Daten zur Überexpression des *ACO1* Gens mit dem Vektor p67ACO1PT wurden der Arbeit von Holz (2006) entnommen.

C-Quelle	Stamm	Charakteristik	ICS %
Glucose	H222	WT	10-12*
	H222-S4(p64ICL1) T1	<i>ICL1</i> mc	<b>4-6</b>
	H222-S4(p67ICL1) T5	<i>ICL1</i> mc	<b>4-6</b>
	H222-S4(JMP5) Z123	$\Delta$ <i>ICL1</i>	19-20
	H222-S4(p67ACO1PT)	<i>ACO1</i> mc	15**
	H222-S4(JMP5) N156	$\Delta$ <i>IDP2</i>	11
Glycerol	H222	WT	9-11
	H222-S4(p67ICL1) T5	<i>ICL1</i> mc	<b>5</b>
	H222-S4(JMP5) Z123	$\Delta$ <i>ICL1</i>	14
Saccharose	H222-S4	WT-Derivat (Ura <sup>-</sup> )	10-12
	H222-S4(p64ICL1) T1	<i>ICL1</i> mc	<b>2-5</b>
	H222-S4(p67ICL1) T5	<i>ICL1</i> mc	<b>2-5</b>
Sonnenblumenöl	H222	WT	45-50*
	H222-S4(p64ICL1) T1	<i>ICL1</i> mc	<b>6</b>
	H222-S4(p67ICL1) T5	<i>ICL1</i> mc	<b>8</b>
	H222-S4(JMP5) N156	$\Delta$ <i>IDP2</i>	46-48
	H222-S4(p67ACO1PT)	<i>ACO1</i> mc	65**
Hexadecan	H222-S4	WT-Derivat (Ura <sup>-</sup> )	38
	H222-S4(p64ICL1) T1	<i>ICL1</i> mc	<b>4</b>

Finogonova *et al.* (1986) zeigten für ihre Produktmustermutanten 1 und 2 (vgl. **Abb. 1.3**), dass vor allen die Aktivitäten der Enzyme ICL und ACO für die Ausbildung des CS:ICS Produktmusters von Bedeutung waren. Die Mutante 1, deren Produktmuster in Richtung CS verschoben war, hatte eine hohe ICL- und eine geringe ACO-Aktivität. Die Mutante 2, deren Produktmuster zur ICS hin verschoben war, hatte eine geringe ICL- und eine hohe ACO-Aktivität. Die komplexe Regulation mehrerer Enzymaktivitäten, wie zusätzlich die der Citratsynthase und NAD(P)-ICDH, schien in den genannten Mutanten zu dem jeweiligen, vom Elternstamm abweichenden Produktmuster geführt zu haben.

In der vorliegenden Arbeit und durch Kruse *et al.* (2004) sowie Holz (2006) konnte jedoch erstmals gezeigt werden, dass die Überexpression eines Gens (*ICL1* oder

ACO1) über einen Gen-Dosis-Effekt zu einer vergleichbaren deutlichen Veränderung des Produktmusters CS:ICS führte. Einschränkend muss dazu bemerkt werden, dass die Beeinflussung der anderen Enzyme des TCC bzw. GZ durch die Hochexpression der Icl1p oder Aco1p nicht ausgeschlossen werden kann, was in weiteren Untersuchungen geprüft werden sollte.

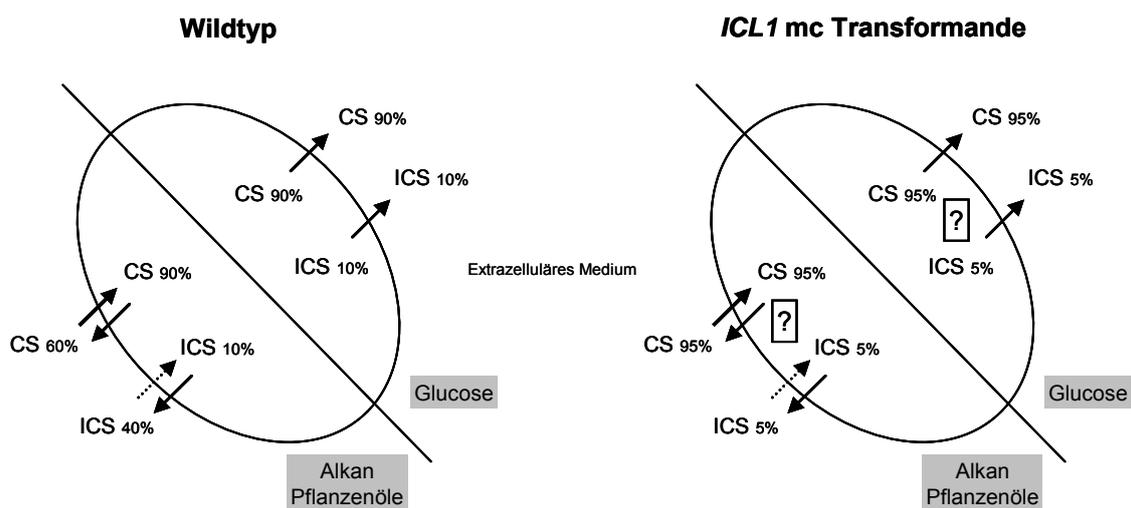
Die **Tab. 4.2** zeigt einen Vergleich der Aktivitäten des Enzyms ICL der *ICL1* mc Transformanden H222-S4(p67ICL1) T5 bzw. H222-S4(p64ICL1) T1 und des Enzyms ACO in der *ACO1* mc Transformande H222-S4(p67ACO1PT) T1 (Holz, 2006) im Vergleich zu den von Finogenova *et al.* (1986) beschriebenen Mutanten 1 und 2 im Verhältnis zu ihren jeweiligen Ausgangsstämmen.

**Tab. 4.2: Vergleich der spezifischen Aktivitäten der Enzyme Aconitase und Isocitratlyase in verschiedenen Stämmen von *Y. lipolytica*.** Die Angaben stellen Mittelwerte der maximalen Enzymaktivitäten von Zellen auf Glucose (Glu) bzw. Ethanol (Et) oder Hexadecan (C16) dar. H222, 704 - Wildtypstämme; H222-S4 - H222-Derivat; H222-S4(p67ICL1) T5, H222-S4(p64ICL1) T1 - *ICL1* mc Transformanden, H222-S4-Derivate; H222-S4(p67ACO1) T1 - *ACO1* mc Transformande, H222-S4-Derivat; Mutante 1 - verstärkte CS-Sekretion, 704-Derivat; Mutante 2 - verstärkte ICS-Sekretion, 704-Derivat; n.b. - nicht bestimmt, mc - multicopy.

Stamm	Isocitratlyase (U/mg Protein)		Aconitase (U/mg Protein)		Referenz
	Glu	Et / C16	Glu	Et / C16	
H222 H222-S4	0,07	0,23	0,3	0,41	Diese Arbeit, Holz (2006), Mauersberger <i>et al.</i> (2002)
H222-S4(p67ICL1) T5 H222-S4(p64ICL1) T1	0,71	4,20	n.b.	n.b.	Diese Arbeit Mauersberger <i>et al.</i> (2002)
H222- S4(p67ACO1PT) T1	n.b.	n.b.	2,5	3,10	Holz (2006)
704	0,04	0,47	0,48	0,63	Finogenova <i>et al.</i> (1986), Ermakova <i>et al.</i> (1986)
Mutante 1	0,16	0,70	0,46	0,80	Finogenova <i>et al.</i> (1986), Ermakova <i>et al.</i> (1986), Il'chenko <i>et al.</i> (2002)
Mutante 2	0,01	0,06	0,57	1,0	Finogenova <i>et al.</i> (1986), Ermakova <i>et al.</i> (1986)

Die Aktivität der Isocitratlyase in den *ICL1* mc Transformanden war gegenüber den Ausgangsstämmen H222 bzw. H222-S4 10-18fach erhöht. Dagegen zeigte die Mutante 1 gegenüber ihrem Ausgangsstamm 704 nur eine um 1,5-4fach gesteigerte Ak-

tivität (**Tab. 4.2**). Die im Vergleich zur Mutante 1 drastisch gesteigerte ICL-Aktivität der *ICL1 mc* Transformanden (4,4-6,0fach höher) könnte erklären, warum in diesen Transformanden das Produktmuster CS:ICS allein über die Aktivität eines Enzyms beeinflusst wurde. Die Umsetzung der ICS aus dem TCC infolge der *ICL1* Überexpression könnte so beschleunigt ablaufen, dass die intrazelluläre ICS-Konzentration im Vergleich zu Wildtypstämmen abnimmt und deshalb weniger ins extrazelluläre Medium sekretiert wird. Im Hinblick auf die Arbeiten von Tréton *et al.* (1978), die für das Zustandekommen des unterschiedlichen Produktmusters CS:ICS in *Y. lipolytica* zwischen Glucose (90:10) und Alkan (60:40) die Wiederaufnahme von CS und ICS aus dem Medium auf Alkan anführten (vgl. 1.3.2), wäre ein Vergleich der intrazellulären CS- bzw. ICS-Konzentration zwischen Wildtypstamm und *ICL1 mc* Transformande deshalb interessant (**Abb. 4.2**).



**Abb. 4.2:** Modell zur Darstellung der Sekretion und Wiederaufnahme von CS und ICS in *Y. lipolytica*, basierend auf der Arbeit von Tréton *et al.* (1978). Auf Glucose entsprechen sich intra- und extrazelluläre CS- bzw. ICS-Konzentrationen in Wildtypzellen. Auf Alkan sollen Unterschiede in der Wiederaufnahme beider Säuren abweichende intra- und extrazelluläre CS- und ICS-Konzentrationen in den Wildtypzellen bedingen. Die auf unter 10 % minimierten ICS-Konzentrationen für Mutantenstämmen und *ICL1 mc* Transformanden auf Alkan bzw. Pflanzenölen können mit dem Modell von Tréton *et al.* (1978) nicht erklärt werden. Gepunkteter Pfeil - verminderte ICS-Aufnahme infolge der Blockierung durch CS, ? - unbekannte intrazelluläre Konzentrationen.

Tréton *et al.* (1978) fanden, dass die intra- und extrazellulären Konzentrationen von CS und ICS von Glucosezellen von *Y. lipolytica* Wildtypstämmen gleich sind (vgl. **Abb. 4.2**, links). Für die *ICL1 mc* Transformanden wäre daher im Vergleich zum

Wildtypstamm eine geringere intrazelluläre ICS-Konzentration zu erwarten (<5 %), was zu prüfen wäre. Für Alkanzellen von Wildtypstämmen postulierten die Autoren, dass die Wiederaufnahme von ICS durch CS gehemmt werden könnte und es deshalb zur Akkumulation der ICS im extrazellulären Medium kommt, während die CS-Konzentration im Medium infolge bevorzugter Aufnahme abnimmt (**Abb. 4.2**, links). Im Gegensatz zu Glucosezellen unterschieden sich intra- und extrazelluläre CS- und ICS-Konzentrationen in Alkanzellen deutlich voneinander. Das von Tréton *et al.* (1978) beschriebene Modell erklärt recht gut das unterschiedliche Produktmuster von *Y. lipolytica* Wildtypstämmen auf den Substraten Glucose und Alkan. Die mit den Mutantenstämmen und den *ICL1* mc Transformanden gefundenen geringen ICS-Konzentrationen von <10 % auf den C-Quellen Alkan bzw. Sonnenblumenöl (vgl. **Tab. 4.1**) sind mit diesem Modell allerdings nicht erklärbar.

Zur Verifizierung der Annahme, dass auf das Produktmuster CS:ICS allein über die drastische Erhöhung der Aktivität der Enzyme ICL bzw. ACO eingewirkt werden kann, müssten die Aktivitäten anderer Enzyme des TCC, insbesondere der NAD(P)-ICDH, bestimmt werden.

#### 4.1.2 Verschiebung des Produktmusters in Richtung Isocitronensäure

Um den großen Einfluss der ICL auf das Produktmuster CS:ICS zu bestätigen, sollte geprüft werden, ob sich das Produktmuster durch das Ausschalten der ICL-Aktivität in Richtung ICS verschiebt. Dieser Punkt der Untersuchungen war auch insofern von Interesse, da ICS als Ausgangsverbindung für verschiedene Synthesen industriell zunehmend an Bedeutung gewinnt und es daher Bedarf an der preiswerten Herstellung gibt.

Dazu wurde mit Mutantenstämmen gearbeitet, die aufgrund einer Zerstörung des Leserahmens des *ICL1* Gens über keine funktionelle ICL mehr verfügten, wie durch Messung der ICL-Aktivität und Western-Hybridisierung gezeigt werden konnte (vgl. 3.1.2.1). Es handelte sich dabei um die Stämme H222-41(JMP5) Z123 und PO1d $\Delta$ ICL1. Auf den untersuchten C-Quellen Glucose und Glycerol (Wachstum auf gluconeogenetischen C-Quellen aufgrund des *ICL1* Defektes nicht möglich) konnte in Abhängigkeit vom Stamm eine moderate bis deutliche Erhöhung des ICS-Anteils am Gesamtsäureprodukt festgestellt werden (vgl. **Tab. 3.3**, **Tab. 4.1**). Dies bestätigte die Befunde von Finogenova *et al.* (1986), die für die von ihnen untersuchte Mutante 2,

die sich durch einen erhöhten ICS-Anteil auszeichnete, eine im Vergleich zum Elternstamm deutlich verringerte ICL-Aktivität feststellten (**Tab. 4.2**). Wie bereits für die *ICL1* Überexpression in den entsprechenden mc Transformanden bemerkt wurde, müsste auch für die ICL-Defektstämme die Auswirkung auf die Aktivität anderer Enzyme, wie die ACO oder die NAD(P)-ICDH, geprüft werden.

Finogenova *et al.* (1986) beschrieben für die Mutante 2 neben der verringerten Aktivität der ICL auch eine deutliche Erhöhung der Aktivität der ACO im Vergleich zum Elternstamm und beschrieben einen ICS-Anteil auf Glucose von 36 % und auf Hexadecan von 78 % im Vergleich zum Elternstamm mit 16 % bzw. 57 % (vgl. **Tab. 1.1**). Die erst kürzlich von Holz (2006) gezeigte Überexpression des *ACO1* Gens in der *Y. lipolytica* mc Transformande H222-S4(p67ACO1PT) T1 und der über den Gen-Dosis-Effekt wirkende starke Anstieg der Aktivität der Aconitase führte zu einem deutlichen Anstieg des ICS-Anteils auf Sonnenblumenöl von 65 % im Vergleich zum Elternstamm H222 mit 40-50 % (**Tab. 4.1**). Auf Glucose war die Verschiebung des Produktmusters in Richtung ICS weniger drastisch (15 % im Vergleich zu 10-12 % in H222). Die von Finogenova *et al.* (1986) und Ermakova *et al.* (1986) beschriebene Mutante 2 (verstärkte ICS-Sekretion) zeigte gegenüber dem Elternstamm 704 eine moderat erhöhte ACO-Aktivität (1,2-1,6fach). In der *ACO1* mc Transformande H222-S4(p67ACO1PT) T1 war die Aktivität dagegen 8fach erhöht gegenüber dem Referenzstamm (**Tab. 4.2**).

Die Verschiebung des Produktmusters in Richtung ICS war, insbesondere auf Glucose, trotz der deutlichen höheren ACO-Aktivität in der *ACO1* mc Transformande gegenüber der Mutante 2 weniger stark ausgeprägt. Die Verschiebung des Produktmusters zur ICS in den untersuchten *icl1*-Defektstämmen konnte nachgewiesen werden, war aber gegenüber der Mutante 2 ebenfalls weniger drastisch. Diese Befunde deuten an, dass die gleichzeitige Veränderung der Aktivitäten der Enzyme ACO (hoch) und ICL (niedrig) eine größere Auswirkung auf die Verschiebung des Produktmusters zur ICS hin bewirkte, als wenn beide Enzyme einzeln in ihrer Aktivität verändert wurden.

Ein zweites Enzym, das in die Untersuchungen zu Verschiebung des Produktmusters in Richtung ICS mit einbezogen wurde war die NADP-ICDH. Wie im Kapitel 3.1.2.1 erläutert, war in dem verwendeten Mutantenstamm H222-41(JMP5) N156 das für die cytosolische NADP-ICDH codierende Gen *IDP2* (YALI0F4095g) nicht mehr intakt, da

sein Leserahmen zerstört wurde. Zu Beginn der Untersuchungen mit diesem Mutantenstamm war allerdings noch nicht bekannt, welche der beiden Isocitratdehydrogenasen, NAD- oder NADP-ICDH, durch die Insertionsmutagenese betroffen war. Es wurde erwartet, dass es zu einer Erhöhung des ICS-Anteils am Gesamtsäureprodukt im extrazellulären Medium kommen könnte. Morgunov *et al.* (2004) haben bei ihren Untersuchungen, welche die Bestimmung der Aktivität einer Vielzahl der bei der CS-Produktion beteiligten Enzyme beinhaltete, festgestellt, dass sich die Aktivität der NAD-ICDH im Vergleich zu normalen Wachstumsbedingungen kaum änderte und gingen von einer Rolle der NAD-ICDH bei der Feinregulation der Prozesses der CS-Überproduktion in Hefen aus. Aus den von Finogenova *et al.* (1986) durchgeführten Untersuchungen wurde dagegen der NADP-ICDH eine Rolle bei der Ausprägung des Produktmusters zugesprochen.

Auf Glucose wurde für die Mutante N156 ein ICS-Gehalt von durchschnittlich 11 % bestimmt, während im Wildtypstamm H222 ein ICS-Anteil von durchschnittlich 13 % ermittelt wurde (**Tab. 3.3**, **Tab. 4.1**). Auf Sonnenblumenöl betrug der durchschnittliche ICS-Gehalt mit dem Stamm H222 54 %, während er bei der Mutante N156 nur bei 48 % lag. Auf beiden C-Quellen führte die Zerstörung des *IDP2* Genes und der dadurch vermutlich bedingte Verlust der NADP-ICDH Aktivität zur Abnahme der ICS-Konzentration. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu den Resultaten von Finogenova *et al.* (1986), die für die Mutante 1 und den Elternstamm eine erhöhte NADP-ICDH Aktivität gefunden haben und dies mit für den geringen ICS-Gehalt beider Stämme verantwortlich machten. Im Gegensatz dazu zeigte die Mutante 2 eine geringere Aktivität der NADP-ICDH und einen deutlich erhöhten ICS-Anteil als Mutante 1 und der Elternstamm (vgl. **Abb. 1.3**).

Die Abnahme des ICS-Gehaltes in der *idp2*-defekten Mutante N156 gegenüber dem Wildtypstamm H222 könnte möglicherweise über die Erhöhung der Aktivität der NAD-ICDH in N156 erklärt werden, was zu prüfen wäre. Die Zelle könnte versuchen, die fehlende NADP-ICDH Aktivität über eine beschleunigte ICS-Umsetzung mittels der NAD-ICDH im TCC zu kompensieren und so zusätzlich 2-KG für die Glutamat-Biosynthese bereitzustellen. Die Glutamat-Auxotrophie von N156, sowohl auf Glucose als auch auf Sonnenblumenöl beobachtet, spricht allerdings dafür, dass eine möglicherweise erhöhte NAD-ICDH Aktivität die NADP-ICDH Aktivität, und damit die Bereitstellung von 2-KG für die Glutamat-Synthese, nicht vollständig ersetzen kann.

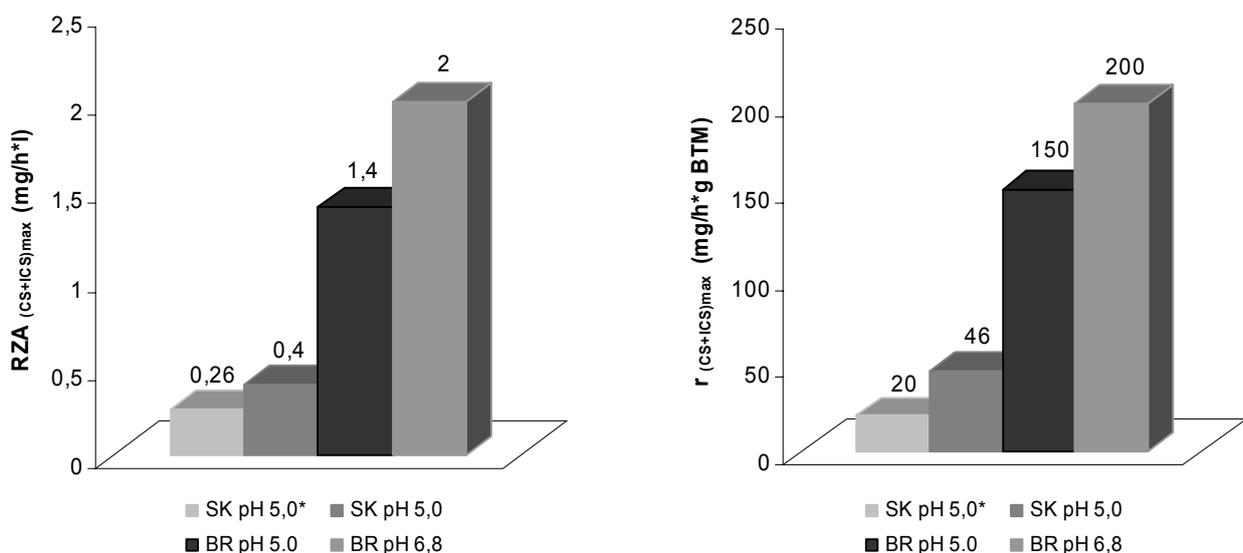
Für *S. cerevisiae* wurde für die cytosolische NADP-ICDH (*IDP2* Gen) eine Doppelfunktion angenommen. Danach liegt die Hauptaufgabe dieses Isoenzym in der Bereitstellung von 2-KG für die Glutamat-Biosynthese (Haselbeck und McAlister-Henn, 1993). Bei Verlust der mitochondrialen NAD- und NADP-ICDH Aktivität (Gene *IDH1/IDH2* bzw. *IDH1*) wurde für die cytosolische NADP-ICDH auch die Funktion der Bereitstellung von 2-KG zur Aufrechterhaltung der Funktion des TCC beschrieben (Haselbeck und McAlister-Henn, 1993). Die aus den Untersuchungen mit *S. cerevisiae* bekannten Daten zeigen die prinzipielle Möglichkeit, dass der Verlust der Aktivität eines ICDH-Isoenzym durch die des anderen übernommen werden kann. Neben der Erhöhung der Aktivität der NAD-ICDH wäre auch die Hochregulation der Aktivität der ICL denkbar. Dadurch hätte die Zelle die Möglichkeit, einen aufgrund des Abzugs von 2-KG für die Glutamat-Biosynthese entstehenden Engpass im TCC auszugleichen.

#### 4.2 Produktion von Citronensäure aus Saccharose

Um die Attraktivität für die Verwendung der Hefe *Y. lipolytica* als Produzent innerhalb eines Verfahrens zur Gewinnung von CS weiter zu erhöhen, war es ein Anliegen dieser Arbeit das Substratspektrum durch Nutzung von Saccharose zu erweitern. Natürlicherweise verfügt *Y. lipolytica* nicht über die Fähigkeit zur Verwertung dieses Disaccharids, weil ihr das zur Spaltung notwendige Enzym Invertase fehlt. Nicaud *et al.* (1989) erzeugten mit dem Ziel eines schnelleren Screenings der Uracil-Auxotrophie rekombinante *Y. lipolytica* Stämme, in denen das *SUC2* Gen aus *S. cerevisiae* unter der Kontrolle der Promotor- und Sekretionssequenzen des *XPR2* Gens (extrazelluläre alkalische Protease) aus *Y. lipolytica* heterolog exprimiert wird (vgl. 3.2). Unter Verwendung des Vektors pINA302 zur Transformation und Zerstörung des *URA3* Gens entstand später aus dem Wildtypstamm H222 der Saccharose verwertende Stamm H222-S4 (Mauersberger *et al.*, 2001; Mauersberger unveröffentlicht). Aus dem Rezipientenstamm H222-S4 ging während dieser Arbeit auch der *ICL1* überexprimierende Stamm H222-S4(p67ICL1) T5 hervor (vgl. 3.1.1), der für die meisten Versuche zur CS-Produktion aus Saccharose aufgrund seines günstigen CS:ICS Produktverhältnisses eingesetzt wurde.

Im Verlauf der Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Produktion von CS aus Saccharose mit der Hefe *Y. lipolytica* sehr gut möglich ist. Bereits unter den Bedingungen des Schüttelkolbens war es möglich mit dem ausgewählten Stamm H222-

S4(p67ICL1) T5 bis zu 80 g/l CS+ICS aus 100 g/l Substrat herzustellen. Die Untersuchungen zur CS-Produktion aus Saccharose in Schüttelkolben zeigten den negativen Einfluss einer verstärkten Sauerstofflimitation bei hohen Biomassen auf die Produktivität der CS-Bildung aus Saccharose. Mit der Übertragung des Bioprozesses in den Bioreaktor konnte die Erhöhung der Produktbildungsraten  $RZA_{(CS+ICS)}$  und  $r_{(CS+ICS)}$  gegenüber den Schüttelkolbenansätzen deutlich gezeigt werden (**Tab. 3.5, Abb. 4.3**). Die Aufhebung der Sauerstofflimitation durch die Kultivierung im Bioreaktor bei einem  $pO_2$  von 50-70 % Sättigung führte bei vergleichbarer Mediumszusammensetzung (0,4-1,3 g/l Pepton) zu deutlichen Steigerungen sowohl der Werte für die  $RZA_{(CS+ICS)_{max}}$  von maximal 401 mg/l\*h im Schüttelkolben (0,4 g/l Pepton) auf 0,9-1,4 g/l\*h im Bioreaktor (0,4 bzw. 1,3 g/l Pepton) als auch der Werte von  $r_{(CS+ICS)_{max}}$  von 46 auf 89-150 mg/g BTM\*h (**Tab. 3.5, Abb. 4.3**).



**Abb. 4.3:** Steigerung der Produktivität der CS-Bildung mit dem Stamm H222-S4(p67ICL1) T5 mit Saccharose als C-Quelle nach der Optimierung durch a) Reduktion der Peptonkonzentration, b) Aufhebung der Sauerstofflimitation und c) Erhöhung der Invertaseaktivität durch Erhöhung des pH-Wertes. SK - Schüttelkolben, BR - Bioreaktor, \* - 1,7 g/l Pepton (andere 0,4 g/l Pepton),  $RZA_{(CS+ICS)_{max}}$  - maximale Raum-Zeit-Ausbeute,  $r_{(CS+ICS)_{max}}$  - maximale biomassespezifische Produktbildungsrate

Dies führte zu einer drastischen Reduzierung der Produktionsphase von ca. 250-350 h im Schüttelkolben auf etwa 100 h im Bioreaktor. Der Effekt des Einflusses der erhöhten Invertaseexpression auf die Produktbildung wurde in der Schüttelkultur jedoch durch die Sauerstofflimitation überlagert. Die Erfassung der Zwischenproduktkonzentrationen für Glucose und Fructose im Bioreaktor ergab, dass der Glucosege-

halt zeitweise bei unter 0,1 g/l lag, wodurch eine Substratlimitation des Produktionsprozesses mit Glucose nicht ausgeschlossen werden konnte. Dies waren Hinweise darauf, dass eine verminderte Invertaseexpression als limitierender Faktor des Gesamtprozesses auftrat.

Die veränderte Prozessführung durch pH-Statierung bei 6,0 bzw. 6,8 (anstatt pH 5,0) und die so erzielte Erhöhung der Invertaseaktivität führte zu einer weiteren Steigerung der Produktivität bei der CS-Produktion aus Saccharose im Bioreaktor (**Abb. 3.22, Abb. 4.3**). Für den Gesamtprozess (Wachstums- und Produktionsphase) betrachtet lagen die volumenspezifische Raum-Zeit-Ausbeute (RZA) bzw. die biomassenspezifische Produktbildungsrate ( $r$ ) für die produzierte Gesamtsäure (CS+ICS) bei pH 6,8 mit 0,76 g/l\*h bzw. 0,1 g/h\*g BTM etwa doppelt so hoch wie bei pH 5,0 (vgl. **Tab. 3.6**). Die maximalen Raum-Zeit-Ausbeuten  $RZA_{(CS+ICS)_{max}}$  aller Fermentationen bei pH 5,0 lagen im Bereich von 0,85-1,4 g/l\*h, die biomassenspezifischen Ausbeuten  $r_{(CS+ICS)_{max}}$  betragen 0,09-0,15 g/h\*g BTM. Die maximale Produktbildungsrate  $RZA_{(CS+ICS)_{max}}$  lag bei pH 6,8 sogar bei 2,0 g/h\*l (vgl. **Abb. 4.3**). Der Vorteil einer höheren Expression der Invertase wirkte sich besonders nach längerer Kulturzeit (Produktionsphase II, >100 h) bei der Nachfütterung von Saccharose aus, da in diesem Zeitraum die Aktivitätsunterschiede bei pH 6,0 bzw. 6,8 und pH 5,0 besonders ausgeprägt waren und deshalb die Spaltung der nachdosierten Saccharose bei pH 6,0 bzw. 6,8 schneller erfolgen konnte (**Abb. 3.20**). In dieser Produktionsphase P II waren die Werte für  $RZA_{max}$  und  $r_{max}$  bei pH 6,0 bzw. 6,8 um den Faktor 2,1-2,5 höher als bei pH 5,0 (vgl. **Abb. 3.22**). Interessanterweise stiegen auch die Gesamtsäurebildung und die Ausbeuten bei Kultivierung mit pH 6,8 deutlich an (**Tab. 3.6**). Die Ausbeute lag mit 0,82 g CS+ICS / g Saccharose im Ansatz mit pH 6,8 für den Gesamtprozess deutlich über den ermittelten Ausbeuten von 0,5-0,6 g CS+ICS / g Saccharose bei pH 5,0.

Die phänotypischen Optimierungen der CS-Produktion aus Saccharose mit dem Stamm *Y. lipolytica* H222-S4(p67ICL1) T5, insbesondere die veränderte Prozessführung (pH-Statierung bei 6,0 bzw. 6,8) und die dadurch erreichte verbesserte Invertaseexpression, führten zu einer deutlichen Erhöhung der Produktivität (**Abb. 3.22, Abb. 4.3, Tab. 3.6**). Die unter optimierten Bedingungen im Fedbatch-Verfahren im Bioreaktor erzielten Produktbildungsraten über den Gesamtprozess ( $RZA_{(CS+ICS)} = 0,76$  g/l\*h,  $r_{(CS+ICS)} = 0,095$  g/g\*h), die hohen Ausbeuten ( $Y_{CS/S} = 0,71-0,82$  g/g) und

die Gesamtproduktkonzentration von 145 g/l CS+ICS liegen im Bereich der aus der Literatur bekannten Angaben für die CS-Produktion aus Zuckerrüben-Melasse und Glucose (**Tab. 4.3**).

**Tab. 4.3: Charakteristika der CS-Produktbildung von *Y. lipolytica* Stämmen auf Kohlehydraten.**  
 $RZA_{CS}$  – volumenspezifische Raum-Zeit-Ausbeute für CS,  $r_{CS}$  – biomassespezifische Produktbildungsgeschwindigkeit für CS,  $Y_{CS/S}$  – Ausbeute an CS pro eingesetztes Substrat

Stamm	Substrat	$RZA_{CS}$ g/l*h	$r_{CS}$ g/g*h	$Y_{CS/S}$ g/g	Referenz
H222-S4(p67ICL1) T5	Saccharose	0,73	0,091	0,82	Diese Arbeit
W29ura3-302	Melasse	0,37	0,06	n.b.	Zarowska <i>et al.</i> (2001)
W29ura3-302	Melasse	0,93	n.b.	n.b.	Zarowska und Wojtatowicz (2002)
Y-1095	Glucose	0,6-1,29	0,02-0,03	1,14-1,29	Rane und Sims (1995, 1996)
W29ura3-302+ A-101-1.22	Melasse	0,64	0,1	n.b.	Zarowska <i>et al.</i> (2001)
A-101-1.22	Invertierte Melasse	0,78	0,12	n.b.	Zarowska <i>et al.</i> (2001)

Mit dem  $Suc^+$ -Stamm *Y. lipolytica* W29ura3-302 (vgl. 1.3.2.2, **Tab. 1.1**) wurden Werte für  $RZA_{CS}$  von 0,37 g/l\*h und  $r_{CS}$  von 0,06 g/g\*h aus Melasse berichtet (Zarowska *et al.*, 2001). Durch eine phänotypische Optimierung des Mediums konnte  $RZA_{CS}$  für W29ura3-302 auf 0,93 g/l\*h gesteigert werden, wobei unklar blieb, auf welche Zeitspanne in der Kultivierung sich bei der Berechnung dieses Wertes bezogen wurde (Zarowska und Wojtatowicz, 2002). Möglicherweise ist hier die maximal erreichbare Produktbildungsrate  $RZA_{(CS)max}$  gemeint, in der nur ein vergleichsweise kurzer Zeitabschnitt während der Produktbildungsphase betrachtet wird. Mit Glucose als Substrat wurden für den *Y. lipolytica* Stamm Y-1095 Ausbeuten von 1,14-1,29 g/g ( $Y_{CS/S}$ ) und Produktbildungsraten von 0,6-1,29 g/h\*l ( $RZA_{CS}$ ) bei vergleichsweise geringen biomassespezifischen Produktbildungsraten von 0,02-0,03 g/g\*h bestimmt (Rane und Sims, 1995, 1996).

Für den Stamm H222-S4(p67ICL1) T5 wurden  $RZA_{(CS)max}$  Werte von 1,5-1,9 g/l\*h ermittelt. Für ein Stammgemisch aus W29ura3-302 ( $Suc^+$ ) und dem  $Suc^-$ -Stamm A-101-1.22 wurden Angaben von 0,64 g/l\*h für  $RZA_{CS}$  und 0,10 g/g\*h für  $r_{CS}$  gemacht (Zarowska *et al.*, 2001). Für die Produktbildung aus reiner Saccharose liegen für *Y. lipolytica* bislang keine Literaturangaben vor. Die mit dem  $Suc^-$ -Stamm A-101-1.22 erzielten  $RZA_{CS}$  - und  $r_{CS}$ -Werte von 0,78 g/l\*h und 0,12 g/g\*h aus invertierter Me-

lasse, einem Gemisch aus Glucose und Fructose (Zarowska *et al.*, 2001), liegen im mittleren Bereich der bisher maximal mit *Y. lipolytica* erreichten CS-Bildungsraten von  $r_{(CS)_{max}} = 0,20 \text{ g/g} \cdot \text{h}$  aus Kohlenhydraten (Thiersch, 1987; Stottmeister und Hoppe, 1991).

Das Citratbildungspotential von *Y. lipolytica* liegt noch über den mit Saccharose und anderen Kohlenhydraten erzielten Werten, wie es die erhaltenen hohen Produktbildungsraten  $RZA_{(CS+ICS)_{max}}$  von  $2,4 \text{ g/l} \cdot \text{h}$  und  $r_{(CS+ICS)_{max}}$  von  $0,34 \text{ g/g} \cdot \text{h}$  mit Sonnenblumenöl als C-Quelle verdeutlichen (vgl. **Tab. 3.9**). Allerdings muss bei diesem Vergleich die unterschiedliche Energiekapazität der Substrate berücksichtigt werden, die für Triglyceride höher ist als für Kohlehydrate.

Ein Vergleich der Ausbeute und CS-Konzentration aus Saccharose bzw. Melasse zwischen dem *Y. lipolytica* Stamm H222-S4(p67ICL1) T5 ( $0,71\text{-}0,82 \text{ g/g}$ , bis  $140 \text{ g/l}$  CS) und dem klassischen Verfahren mit *A. niger* ( $0,8\text{-}0,95 \text{ g/g}$ , bis  $200 \text{ g/l}$  CS) zeigt, dass die Hefe *Y. lipolytica* durchaus als Alternative zu *A. niger* als Produzent von CS geeignet ist. Außerdem bietet ein CS-Produktionsverfahren mit *Y. lipolytica*, neben einer geringeren Umweltbelastung, die Möglichkeit zur Nutzung von Pflanzenölen als Substrate. Die mit diesen C-Quellen erreichbaren Ausbeuten ( $1,3\text{-}1,7 \text{ g/g}$ ) übertreffen deutlich die mit *A. niger* auf Melassen erreichbaren Werte.

Die erzielte deutliche Steigerung der Invertaseexpression in den Bioreaktorversuchen bei pH 6,0 und 6,8 führte offensichtlich dazu, dass die Saccharosespaltende Enzymaktivität nicht mehr limitierend für den Prozess der CS-Produktion mit *Y. lipolytica* war. Die Aufnahme und der weitere Metabolismus der aus Saccharose gebildeten Glucose und Fructose durch die Hefezellen wurde zum limitierenden Schritt der Produktbildung, da sich beide Zwischenprodukte, insbesondere die Fructose, auch in den Bioreaktorversuchen im Kulturmedium anreicherten. Deshalb kann die Aufnahme dieser Zucker durch die Hefezellen Gegenstand der weiteren genotypischen und phänotypischen Optimierungen von *Y. lipolytica* werden.

Die aus den bisherigen Arbeiten gewonnenen Erkenntnisse zeigten Ansatzpunkte, wie die Prozessführung bei der CS-Produktion aus Saccharose weiter optimiert werden könnte. Insbesondere die Regulation des pH-Wertes scheint dafür ein relativ einfacher und Erfolg versprechender Weg zur Steuerung der Invertaseexpression zu sein. Andere Ansatzpunkte wären die genotypische und phänotypische Verbesserung der Aufnahme (und Verwertung) von Glucose und Fructose, welche bei ausrei-

chender Invertaseexpression offensichtlich den Gesamtprozess limitieren kann, sowie eine optimale Bereitstellung von Glucose bzw. Fructose v.a. bei Fedbatch-Kultivierungen.

In der Literatur wurden für verschiedene Hefen Transporter für Hexosen beschrieben. So wurden in *S. cerevisiae* 20 Proteine (*HXT*-Gene) charakterisiert, die am Transport von Hexosen durch die Plasmamembran beteiligt sind (Wieczorke *et al.*, 1999). In der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* geht man von wenigstens 4 Hexosetransportern aus (Heiland *et al.*, 2000) und in der Hefe *Pichia stipitis* sind 3 Glucosetransporter bekannt (Weierstall *et al.*, 1999). Die meisten der bisher charakterisierten Hexosetransporter in Hefen funktionieren passiv, d.h. ohne Energieverbrauch über Diffusionsvorgänge. Für die Hefe *Kluyveromyces lactis* wurde kürzlich ein weiterer aktiver Transporter für die Aufnahme von Fructose beschrieben, der auch eine geringe Affinität für Glucose besitzt (Diezemann und Boles, 2003). Für die Hefe *Y. lipolytica* gibt es leider derzeit noch keine Angaben zu Zuckertransportern und deren Funktionsweise.

Lee *et al.* (2002) beschrieben für *S. cerevisiae* die Kinetiken der Aufnahme von Glucose und Xylose. Bei hohen Glucosekonzentrationen wurde die meiste Glucose über so genannte low-affinity Transporter aufgenommen. Bei geringen Glucosekonzentrationen erfolgte der Transport dagegen hauptsächlich über high-affinity Transporter. Die Aufnahme der Pentose Xylose erfolgte über die gleichen Systeme, wobei die Aufnahme bei hohen Glucosekonzentrationen sehr gering war. Bei geringen Glucosekonzentrationen erhöhte sich dagegen die Aufnahme der Xylose auf das Niveau von Glucose. Für *A. niger* wurde die simultane Aufnahme von Glucose und Fructose bei der Produktion von CS aus Saccharose im Bioreaktor beschrieben (Bizukojc und Ledakowicz, 2004). Dabei wurde eine Abhängigkeit der Aufnahme beider Zucker von der CS-Konzentration im Medium bei Zuckerkonzentrationen zwischen 20-30 g/l festgestellt. Bei einem CS-Gehalt <30-40 g/l gab es eine Präferenz für die Aufnahme von Fructose. War die CS-Konzentration >30-40 g/l wurde dagegen mehr Glucose aufgenommen.

Die Affinität der Transporter zu den verschiedenen Hexosen, insbesondere Glucose und Fructose, scheint auch ein wesentlicher Grund für das oben beschriebene unterschiedliche Aufnahmeverhalten beider Zucker in *Y. lipolytica* zu sein. Wenn die Aufnahme der Zucker Glucose und Fructose in *Y. lipolytica* nach ähnlichen Mechanismen erfolgt wie für andere Hefen beschrieben, könnten die variierenden Konzentrationen

onen beider Zucker während einer Fedbatch-Kultivierung nachteilig sein. Durch eine geringere Startkonzentration an Saccharose und eine anschließende gezielte Nachdosierung könnte es möglich sein, die frei werdende Glucose und Fructose in einem Bereich zu halten, der für eine Aufnahme durch die Zelle günstiger ist. Eine Kombination aus veränderter Invertaseexpression über die Regulation des pH-Wertes und geeigneterer Substratdosierung zur Verbesserung der Zuckeraufnahme wäre ebenfalls denkbar. Über die entsprechende Prozessführung (Online-Messung der Zuckerkonzentrationen, Nachdosierungsstrategie) könnte es möglich sein, dass zunächst alle aus der Saccharose frei werdende Glucose und danach erst die gesamte Fructose verwertet wird. Dies könnte zu erhöhtem Substratflux durch die Hefezelle für Glucose und Fructose und dadurch zur Erhöhung der Syntheserate von CS führen.

### 4.3 Produktion von Citronensäure aus Pflanzenöl

Die Hefe *Y. lipolytica* eignet sich sehr gut zur Gewinnung von CS unter Verwendung von Pflanzenölen. Bereits unter den Bedingungen des Schüttelkolbens konnten hohe Produktkonzentrationen von bis zu 58 g/l CS+ICS aus 100 g/l Sonnenblumenöl mit dem Wildtypstamm H222 erhalten werden (vgl. **Tab. 3.7** und **Tab. 3.8**). Die Verwertung von Triglycerid durch die Hefe beginnt mit dessen extrazellulärer Spaltung in die Komponenten Glycerol und Fettsäuren, die dann von der Zelle aufgenommen und metabolisiert werden. Gegenstand der Untersuchungen war es zu prüfen, ob eine erhöhte extrazelluläre Lipaseaktivität zur Verbesserung der Triglyceridverwertung durch die Zelle führt und es dadurch zu einer Steigerung der Produktivität bei CS-Gewinnung aus Pflanzenöl kommt (**Abb. 4.1**).

Zu diesem Zweck wurden zwei in ihrer Entstehung unterschiedliche Typen rekombinanter *Y. lipolytica* Stämme untersucht, die sich durch eine gesteigerte extrazelluläre Lipaseaktivität ( $Lip^{++}$ ) gegenüber Wildtypstämmen ( $Lip^{+}$ ) auszeichneten. Bei den verwendeten Insertionsmutantenstämmen H222-41(JMP5) N123, N137, N235A und N256 ist über die Ursache der Ausbildung des  $Lip^{++}$ -Phänotyps nichts bekannt. Diese Mutantenstämmen entstanden durch die Insertion einer Mutagenesekassette und wurden auf die Ausbildung eines im Vergleich zum Wildtypstamm ausgeprägteren Klärungshofs im Plattentest mit Tributyrin als Substrat selektiert (vgl. 3.3.1; Mauersberger *et al.*, 2001). Bei den ebenfalls untersuchten *LIP2* mc Transformanden

des Typs H222-S4(JMP6) handelte es sich um Stämme, bei denen das für eine extrazelluläre Lipase codierende Gen *LIP2* überexprimiert wurde (vgl. 3.3.1).

Im Plattentest, bei dem die extrazelluläre Lipaseaktivität anhand eines Aufklärungshofes um eine Kolonie auf dem ansonsten milchig trüben Agar angezeigt wird (Spaltung des Triglycerids), bestätigte sich der Lip<sup>++</sup>-Phänotyp der getesteten Insertionsmutanten gegenüber Vergleichsstämmen mit Lip<sup>+</sup>-Phänotyp (vgl. **Abb. 3.28**). Die entstanden Höfe hatten einen deutlich größeren Durchmesser. Auch die *LIP2* multi-copy Transformanden zeichneten sich durch ausgeprägtere Klärungshöfe gegenüber den Kontrollstämmen aus (vgl. **Abb. 3.28**). Innerhalb der *LIP2* mc Transformanden wurden jedoch in Abhängigkeit von der verwendeten C-Quelle (Tributyryn oder Sonnenblumen und Olivenöl) Unterschiede festgestellt, die möglicherweise auf unterschiedliche Substratspezifitäten und/oder eine unterschiedliche Expressionsregulation der Lipasen zurück zu führen sind (vgl. 3.3.1).

Zur Überprüfung der Ergebnisse des Plattentests wurde die Gesamtlipaseaktivität ausgewählter Vertreter der Lip<sup>++</sup>-Stämme bestimmt. Für die getesteten *LIP2* multi-copy Transformanden wurden Enzymaktivitäten von bis zu 150000 U/l bestimmt, was einer ca. 400fachen Erhöhung gegenüber dem Wildtypstamm H222 mit bis zu 400 U/l entspricht. Kamzolova *et al.* (2005), die sich ebenfalls mit der Produktion von CS mit *Y. lipolytica* aus Pflanzenölen beschäftigt haben, geben für die von ihnen untersuchten Stämme Lipaseaktivitäten von 120000-2760000 U/l an. Ein direkter Vergleich dieser Werte mit den bestimmten Aktivitäten aus dieser Arbeit ist u.a. deswegen schwierig, weil mit einem anderen Testsystem gearbeitet wurde (Titration der aus dem Triglycerid durch die Lipaseaktivität frei werdenden Fettsäuren). Der in dieser Arbeit benutzte photometrische Test verwendet als Substrat p-NPB, wo der Fettsäureanteil aus der kurzkettigen gesättigten Fettsäure Buttersäure (C4) besteht. Kamzolova *et al.* (2005) verwendeten als Substrate innerhalb ihres Testsystems Sonnenblumen-, Oliven- oder Rapsöl, jeweils Triglyceride mit langkettigen Fettsäuren (C16-C18, davon einige ungesättigt). Es wäre daher vorstellbar, dass langkettige Fettsäuren, die im Gegensatz zu p-NPB natürliche Substrate für Lipasen darstellen, zu einer höheren Aktivierung dieser führen. Für vergleichende Untersuchungen sollte daher zusätzlich zum photometrischen Test auch ein auf der Titration freier Fettsäuren basierender Test verwendet werden.

Überraschenderweise bestätigte sich der Lip<sup>++</sup>-Phänotyp der untersuchten Insertionsmutanten N137 bzw. N235A gegenüber dem Wildtypstamm H222, wie er im

Plattentest mit Tributyrin gefunden wurde, im Enzymtest nicht. Da die Insertionsmutanten im Plattentest mit Oliven- und Sonnenblumenöl denselben Phänotyp ( $\text{Lip}^+$ ) zeigten wie die Kontrollstämme (**Abb. 3.28**), wurde vermutet, dass die Lipaseaktivität in diesen Stämmen wesentlich durch Tributyrin beeinflusst wird. Da zur Kultivierung der Stämme Sonnenblumenöl verwendet wurde, sollte geprüft werden, ob bei der Nutzung von Tributyrin als C-Quelle im Vergleich zum Wildtypstamm höhere Lipaseaktivitäten auftraten. Dies konnte nicht bestätigt werden. Der  $\text{Lip}^{++}$ -Phänotyp der Insertionsmutanten im Plattentest mit Tributyrin ist nach den Erkenntnissen aus dieser Arbeit nicht auf eine erhöhte extrazelluläre Lipaseaktivität zurück zu führen und beruht auf anderen Effekten. Denkbar wäre, dass die Insertionsmutantenstämme mit  $\text{Lip}^{++}$ -Phänotyp, bedingt durch die Insertion der MTC, ein verändertes Lipaseprotein sekretieren, was besser im Agar diffundiert und dadurch die verstärkten Aufklärungshöfe um die Kolonien im Plattentest mit Tributyrin-Agarplatten zustande kommen. Auch die erhöhte Sekretion eines Emulgators wäre als Erklärung des  $\text{Lip}^{++}$ -Phänotyp vorstellbar. Als weitere Erklärung könnten in den Insertionsmutanten membran- und/oder zellwandständige Lipasen hochexprimiert sein, die unter den Bedingungen des Plattentests allmählich ins umgebende Medium entlassen werden, was unter Submersbedingungen nicht erfolgt und deshalb nicht messbar ist. Dass es unter bestimmten Umständen zur Freisetzung membran- bzw. zellwandständiger Lipasen ins Medium kommen kann, haben Fickers *et al.* (2004) gezeigt.

Die getesteten  $\text{Lip}^{++}$ -Stämme von *Y. lipolytica*, sowohl die Insertionsmutanten H222-41(JMP5) N137 bzw. N235A als auch die *LIP2* mc Transformanten des Typs H222-S4(JMP6), brachten keine deutliche Erhöhung der CS-Produktionsraten gegenüber Wildtypstämmen wie H222 und der Produktmustermutante H181 (**Tab. 3.9**). Die erhaltenen Produktbildungsraten der in dieser Arbeit benutzten Stämme, sowohl Wildtyp- und Mutantenstämme, sind mit den wenigen aus der Literatur verfügbaren Angaben vergleichbar. So gaben Kamzolova *et al.* (2005) für den von ihnen untersuchten *Y. lipolytica* Stamm 187/1 Werte für die Ausbeute von 1,55 g/g ( $Y_{\text{CS/S}}$ ) und biomassespezifische Produktbildungsraten von 0,127 g/g\*h ( $r_{\text{CS}}$ ) für die CS-Produktion aus Rapsöl an. Die Ausbeuten der in dieser Arbeit untersuchten Stämme lagen zwischen 1,3 und 1,7 g/g ( $Y_{\text{CS+ICS/S}}$ ), die biomassespezifische Produktbildungsraten zwischen 0,08 und 0,14 g/g\*h ( $r_{\text{CS+ICS}}$ ) und die Raum-Zeit-Ausbeuten bei 0,9-1,1 g/l\*h (vgl. **Tab. 3.9**). Dabei beziehen sich die Angaben auf die produzierte Gesamtsäure (CS+ICS), weil die eingesetzten  $\text{Lip}^{++}$ -Stämme das für *Y. lipolytica* Wildtypstämme

typische Produktmuster CS:ICS von etwa 55:45 aufwiesen. Würde man die Angaben nur auf die produzierte CS beziehen, ergäben sich deutlich niedrigere Werte, was die Beurteilung eines möglichen Effektes des Lip<sup>++</sup>-Phänotyps auf die Produktivität nicht erlauben würde. Es ist anzumerken, dass es sich bei dem von Kamzolova *et al.* (2005) benutzten Stamm 187/1 vermutlich um eine Produktmustermutante handelte, was aus dem Artikel jedoch nicht hervorging.

Nach den vorliegenden Erkenntnissen aus dieser Arbeit liegt der Geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Citratproduktion aus Triglyceriden nicht bei der extrazellulären Hydrolyse dieser hydrophoben C-Quellen durch Lipasen.

Die Verwertung von Triglyceriden durch die Hefezelle ist sehr komplex. Die extrazelluläre Spaltung des Triglycerids stellt nur den ersten Schritt in einer Kette enzymatischer Reaktionen zur Fettverwertung dar. Die Aufnahme der freien Fettsäuren in die Zelle und ihr Transport im Cytosol zu den Peroxisomen, wo ihr Abbau durch die  $\beta$ -Oxidation zu Acetyl-CoA erfolgt sowie die Überführung des Acetyl-CoA von den Peroxisomen in die Mitochondrien, wo der Abbau über den Citratzyklus stattfindet, wird durch das Einwirken einer Vielzahl von Transportsystemen und Enzymen bewirkt (Fickers *et al.*, 2005a). Es liegt nahe, dass es innerhalb dieser Kette von Transportvorgängen und enzymatischen Reaktionen solche gibt, die als so genannte „bottleneck“ (Engpass) wirken und den Prozess der Triglyceridverwertung trotz der erhöhten Bereitstellung von Fettsäuren durch die verbesserte extrazelluläre Triglyceridspaltung limitieren.

Solche „bottlenecks“ könnten unter anderem die Fettsäuretransportsysteme durch die Plasmamembran und in die Peroxisomen, die Aktivierung der Fettsäuren zu Acyl-CoA, die Kapazität der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation bzw. das Carnitin-Shuttlesystem sein, welches am Transport von Acyl-CoA und Acetyl-CoA-Verbindungen von den Peroxisomen in die Mitochondrien in Hefen beteiligt ist. Um eine deutliche Verbesserung der Triglyceridverwertung und CS-Produktion mit *Y. lipolytica* zu erreichen könnte versucht werden, die Aktivität ausgewählter Transportsysteme mittels Überexpression der dafür kodierenden Gene zu erhöhen.

## Literaturverzeichnis

- Akimenko, V. K., Arinbasarova, A., Smirnova, N. M. und Medentsev, A. G. (2003). [The alternative oxidase of *Yarrowia lipolytica* mitochondria is unable to compete with the cytochrome pathway for electrons]. *Mikrobiologija* 72, 453-458.
- Akiyama, S., Suzuki, T., Sumino, Y., Nakao, Y. und Fukuda, H. (1973a). Induction and citric acid productivity of fluoroacetate-sensitive mutant strains of *Candida lipolytica*. *Agr Biol Chem* 37, 879-884.
- Akiyama, S., Suzuki, T., Sumino, Y., Nakao, Y. und Fukuda, H. (1973b). Relationship between aconitate hydratase activity and citric acid productivity in fluoroacetate-sensitive mutant strain of *Candida lipolytica*. *Agr Biol Chem* 37, 885-888.
- Anastassiadis, S. (1994). Kontinuierliche Fermentation von Glucon- und Citronensäure mit hefeähnlichen Pilzen und Hefen. Dissertation, Universität Münster.
- Anastassiadis, S., Aivasidis, A. und Wandrey, C. (2002). Citric acid production by *Candida* strains under intracellular nitrogen limitation. *Appl Microbiol Biotechnol* 60, 81-87.
- Anastassiadis, S. und Rehm, H. J. (2005). Continuous citric acid secretion by a high specific pH dependent active transport system in yeast *Candida oleophila* ATCC 20177. *Electron J Biotechnol* 8, 146-161.
- Augstein, A. (2001). Molekularbiologische Charakterisierung und funktionelle Analyse des *GPR1*-Genproduktes in der Hefe *Yarrowia lipolytica*. Dissertation, TU-Dresden.
- Aurich, A., Förster, A., Mauersberger, S., Barth, G. und Stottmeister, U. (2002a). Citric acid production from renewable resources by *Yarrowia lipolytica*. Third *Yarrowia lipolytica* International Meeting, Dresden, Germany; Poster 47.
- Aurich, A., Förster, A., Mauersberger, S., Barth, G. und Stottmeister, U. (2003). Citric Acid Production From Renewable Resources By *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Adv* 21, 454-455.
- Aurich, A., Stottmeister, U., Mauersberger, S., Förster, A. und Barth, G. (2002b). Prozessintegrierter Umweltschutz bei der biotechnologischen Gewinnung von Citronensäure unter Verwendung genetisch modifizierter Hefen. 2. Zwischenbericht; Projekt des Sächsischen Staatsministeriums für Umwelt und Landwirtschaft (SMUL), AZ: 13-8811.61/89.
- Aurich, A., Stottmeister, U., Mauersberger, S., Förster, A. und Barth, G. (2005a). Prozessintegrierter Umweltschutz bei der biotechnologischen Gewinnung von Citronensäure unter Verwendung genetisch modifizierter Hefen. Abschlussbericht; Projekt des Sächsischen Staatsministeriums für Umwelt und Landwirtschaft (SMUL), AZ: 13-8811.61/89.
- Aurich, A., Stottmeister, U., Mauersberger, S., Förster, A. und Barth, G. (2005b). Prozessintegrierter Umweltschutz bei der biotechnologischen Gewinnung von Citronensäure unter Verwendung genetisch modifizierter Hefen. 6. Zwischenbericht; Projekt des Sächsischen Staatsministeriums für Umwelt und Landwirtschaft (SMUL), AZ: 13-8811.61/89.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. und Struhl, K. (1997). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- BACAS (Royal Belgian Academy Council of Applied Sciences) (2004). Industrial biotechnology and sustainable chemistry. pp 1-29. [http://wbt.dechema.de/img/wbt/\\_Literatur/BACAS-Studie.pdf](http://wbt.dechema.de/img/wbt/_Literatur/BACAS-Studie.pdf)
- Barth, G., Beckerich, J. M., Dominguez, A., Kerscher, S., Ogrzydziak, D., Titorenko, V. und Gaillardin, C. (2003). Functional genetics of *Yarrowia lipolytica*. In: de Winde, J. H. und S. Hohmann, *Functional Genetics of Industrial Yeasts*. Berlin, Heidelberg, New York. Springer-Verlag, pp. 236-239.
- Barth, G. und Gaillardin, C. (1996). *Yarrowia lipolytica*. In: Wolf, K. (eds) *Nonconventional yeasts in biotechnology*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 313-388.
- Barth, G. und Gaillardin, C. (1997). Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol Rev* 19, 219-37.
- Barth, G. und Scheuber, T. (1993). Cloning of the isocitrate lyase gene (*ICL1*) from *Yarrowia lipolytica* and characterization of the deduced protein. *Mol Gen Genet* 241, 422-30.
- Barth, G. und Weber, H. (1983). Genetic studies in the yeast *Saccharomyces lipolytica*. Inactivation and mutagenesis. *Z Allg Mikrobiol* 23, 147-157.
- Bassel, J., Warfel, J. und Mortimer, R. K. (1971). Complementation and genetic recombination in *Candida lipolytica*. *J Bacteriol* 108, 669-675.
- Behrens, U., Ringpfeil, M., Stottmeister, U., Weißbrodt, E., Karbaum, K. und Hubald, M. (1986). Verfahren zur Herstellung von Citronensäure durch Hefen. DD232309.
- Behrens, U., Weißbrodt, E. und Lehmann, W. (1978). Zur Kinetik der Citronensäurebildung bei *Candida lipolytica*. *Z Allg Mikrobiol* 18, 549-558.

- Bizukojc, M. und Ledakowicz, S. (2004). The kinetics of simultaneous glucose and fructose uptake and product formation by *Aspergillus niger* in citric acid fermentation. *Process Biochemistry* 39, 2261-2268.
- Casaregola, S., Feynerol, C., Diez, M., Fournier, P. und Gaillardin, C. (1997). Genomic organization of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Chromosoma* 106, 380-90.
- Casaregola, S., Neuveglise, C., Bon, E. und Gaillardin, C. (2002). Ylli, a non-LTR retrotransposon L1 family in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Mol Biol Evol* 19, 664-77.
- Casaregola, S., Neuveglise, C., Lepingle, A., Bon, E., Feynerol, C., Artiguenave, F., Wincker, P. und Gaillardin, C. (2000). Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 17. *Yarrowia lipolytica*. *FEBS Lett* 487 (1), 95-100.
- Casaregola, S., Neuveglise, C., Wincker, P., Anthouard, V., Weissenbach, J. und Gaillardin, C. (2003). The dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica* genome sequencing project. *Yeast* 20 (S1), 277.
- Chernyavskaya, O. G., Shishkanova, N. V., Il'chenko, A. P. und Finogenova, T. V. (2000). Synthesis of alpha-ketoglutaric acid by *Yarrowia lipolytica* yeast grown on ethanol. *Appl Microbiol Biotechnol* 53, 152-158.
- Cirigliano, M. C. und Carman, G. M. (1985). Purification and characterization of liposan, a bioemulsier from *Candida lipolytica*. *Appl Environ Microbiol* 50, 846-850.
- Contreras-Shannon, V., Lin, A. P., McCammon, M. T. und McAlister-Henn, L. (2005). Kinetic properties and metabolic contributions of yeast mitochondrial and cytosolic NADP<sup>+</sup>-specific isocitrate dehydrogenases. *J Biol Chem* 280, 4469-4475.
- Crolla, A. und Kennedy, K. J. (2001). Optimization of citric acid production from *Candida lipolytica* Y-1095 using n-paraffin. *J Biotechnol* 89, 27-40.
- Cupp, J. R. und McAlister-Henn, L. (1992). Cloning and characterization of the gene encoding the IDH1 subunit of NAD(+) dependent isocitrate dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 267, 16417-16423.
- Czok, P. und Lamprecht, W. (1974). Pyruvate, Phosphoenolpyruvate and D-Glycerate-2-phosphate. In: Bergmeyer, H. U., *Methods of enzymatic analysis*. Academic press New York, pp. 607-611.
- Demain, A. L. (2000). Microbial biotechnology. *Trends Biotechnol* 18, 26-31.
- Destain, J., Roblain, D. und Thonart, P. (1997). Improvement of lipase production from *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Lett* 19, 105-107.
- Diezemann, A. und Boles, E. (2003). Functional characterization of the Frt1 sugar transporter and of fructose uptake in *Kluyveromyces lactis*. *Curr Genet* 43, 281-8.
- Dixon, H. G. und Kornberg, H. L. (1959). Assay methods for key enzymes of the glyoxylate cycle. *Biochem J* 72, 3-6.
- Dominguez, A., Costas, M., Longo, M. A. und Sanroman, A. (2003). A novel application of solid state culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Lett* 25, 1225-1229.
- Dominguez, A., Ferminan, E. und Gaillardin, C. (2000). *Yarrowia lipolytica*: an organism amenable to genetic manipulation as a model for analyzing dimorphism in fungi. *Contrib Microbiol* 5, 151-172.
- Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., Durrens, P., Casaregola, S., Lafontaine, I., De Montigny, J., Marck, C., Neuveglise, C., Talla, E., Goffard, N., Frangeul, L., Aigle, M., Anthouard, V., Babour, A., Barbe, V., Barnay, S., Blanchin, S., Beckerich, J. M., Beyne, E., Bleykasten, C., Boisrame, A., Boyer, J., Cattolico, L., Confanioleri, F., De Daruvar, A., Despons, L., Fabre, E., Fairhead, C., Ferry-Dumazet, H., Groppi, A., Hantraye, F., Hennequin, C., Jauniaux, N., Joyet, P., Kachouri, R., Kerrest, A., Koszul, R., Lemaire, M., Lesur, I., Ma, L., Muller, H., Nicaud, J. M., Nikolski, M., Oztas, S., Ozier-Kalogeropoulos, O., Pellenz, S., Potier, S., Richard, G. F., Straub, M. L., Suleau, A., Swennen, D., Tekaiia, F., Wesolowski-Louvel, M., Westhof, E., Wirth, B., Zeniou-Meyer, M., Zivanovic, I., Bolotin-Fukuhara, M., Thierry, A., Bouchier, C., Caudron, B., Scarpelli, C., Gaillardin, C., Weissenbach, J., Wincker, P. und Souciet, J. L. (2004). Genome evolution in yeasts. *Nature* 430, 35-44.
- Elimer, E. (1998). Citric acid production from rape seed oil by *Aspergillus niger*. *Food technol. biotechnol* 36, 189-192.
- Ermakova, I. T., Shishkanova, N. V., Melnikova, O. F. und Finogenova, T. V. (1986). Properties of *Candida lipolytica* mutants with the modified glyoxylate cycle and their ability to produce citric and isocitric acid. I. Physiological, biochemical and cytological characteristics of mutants grown on glucose or hexadecane. *Appl Microbiol Biotechnol* 23, 372-377.
- Fickers, P., Benetti, P. H., Wache, Y., Marty, A., Mauersberger, S., Smit, M. S. und Nicaud, J. M. (2005a). Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS Yeast Res* 5, 527-543.
- Fickers, P., Destain, J. und Thonart, P. (2005b). Methyl oleate modulates *LIP2* expression in the lipolytic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Lett* 27, 1751-1754.

- Fickers, P., Fudalej, F., Le Dall, M. T., Casaregola, S., Gaillardin, C., Thonart, P. und Nicaud, J. M. (2005c). Identification and characterisation of *LIP7* and *LIP8* genes encoding two extracellular triacylglycerol lipases in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Fungal Genet Biol* 42, 264-274.
- Fickers, P., Nicaud, J. M., Destain, J. und Thonart, P. (2003). Overproduction of lipase by *Yarrowia lipolytica* mutants. *Appl Microbiol Biotechnol* 63, 136-142.
- Fickers, P., Nicaud, J. M., Destain, J. und Thonart, P. (2005d). Involvement of hexokinase *Hxk1* in glucose catabolite repression of *LIP2* encoding extracellular lipase in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Curr Microbiol* 50, 133-137.
- Fickers, P., Nicaud, J. M., Gaillardin, C., Destain, J. und Thonart, P. (2004). Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Appl Microbiol* 96, 742-749.
- Fickers, P., Ongena, M., Destain, J., Weekers, F. und Thonart, P. (2006). Production and downstream processing of an extracellular lipase from the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Enz Microbial Technol* 38, 756-759.
- Finogenova, T. V. (1991). Overproduction of metabolites by yeasts and its regulation (Russian). In: Finogenova TV, Sharyshev AA, (eds), Alkane metabolism and oversynthesis of metabolites by microorganisms, Center Biological Research USSR Academy Sciences, Pushchino, Russia, 96-114.
- Finogenova, T. V., Morgunov, I. G., Kamzolova, S. V. und Cherniavskaia, O. G. (2005). [Organic acid production by the yeast *Yarrowia lipolytica* (a review)]. *Prikl Biokhim Mikrobiol* 41, 478-86.
- Finogenova, T. V., Shishkanova, N. V., Ermakova, I. T. und Kataeva, I. A. (1986). Properties of *Candida lipolytica* mutants with the modified glyoxylate cycle and their ability to produce citric and isocitric acid. II. Synthesis of citric and isocitric acid by *Candida lipolytica* mutants and peculiarities of their enzyme systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 23, 378-383.
- Förster, A. (2001). Untersuchungen zur heterologen Expression von steroidwandelnden Cytochrom P450 Systemen in der Hefe *Yarrowia lipolytica*. Diplomarbeit, TU-Dresden.
- Fukui, S. und Tanaka, A. (1981). Production of useful compounds from alkane media. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 17, 1-31.
- Gaillardin, C., Charoy, V. und Heslot, H. (1973). A study of copulation, sporulation and meiotic segregation in *Candida lipolytica*. *Arch Microbiol* 92, 69-83.
- Gelissen, G., Kunze, G., Gaillardin, C., Cregg, J. M., Berardi, E., Veenhuis, M. und van der Klei, I. (2005). New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adeninivorans* and *Yarrowia lipolytica* - A comparison. *FEMS Yeast Research* 5, 1079-1096.
- Goldstein, A. und Lampen, J. O. (1975). Beta-D-fructofuranoside fructohydrolase from yeast. *Methods Enzymol* 42, 504-11.
- Good, D. W., Droniuk, R., Lawford, G. R. und Fein, J. E. (1985). Isolation and characterization of a *Saccharomycopsis lipolytica* mutant showing increased production of citric acid from canola oil. *Can J Microbiol* 31, 436-440.
- Grewal, H. S. und Kalra, K. L. (1995). Fungal production of citric acid. *Biotechnol Adv* 13, 209-234.
- Gutierrez, N. A. und Maddox, I. S. (1993). Evidence that impaired citrate transport into the cell is a contributory factor to extracellular citrate accumulation by a strain of *Candida guilliermondii*. *Appl Microbiol Biotechnol* 39, 604-608.
- Haselbeck, R. J. und McAlister-Henn, L. (1991). Isolation, nucleotide sequence, and disruption of the *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding mitochondrial NADP(H)-specific isocitrate dehydrogenase. *J Biol Chem* 266, 2339-2345.
- Haselbeck, R. J. und McAlister-Henn, L. (1993). Function and expression of yeast mitochondrial NAD- and NADP-specific isocitrate dehydrogenases. *J Biol Chem* 268, 12116-12122.
- Heiland, S., Radovanovic, N., Hofer, M., Winderickx, J. und Lichtenberg, H. (2000). Multiple hexose transporters of *Schizosaccharomyces pombe*. *J Bacteriol* 182, 2153-2162.
- Heslot, H. (1990). Genetics and genetic engineering of the industrial yeast *Yarrowia lipolytica*. *Adv Biochem Eng/Biotechnol* 43, 43-73.
- Hoffman, C. S. und Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* 57, 267-272.
- Holz, M. (2006) Klonierung und Überexpression der mitochondrialen Aconitase in *Yarrowia lipolytica* und ihre Auswirkung auf die mikrobielle Produktbildung. Diplomarbeit, Technische Universität Dresden.
- Hönes, I. (1983). Untersuchungen zur Regulation der Enzyme des Glyoxylatzyklus bei *Saccharomycopsis lipolytica*. I. Einfluss der C-Quelle auf die Aktivität der Isocitratlyase und Malatsynthase. *Z Allg Mikrobiol* 23, 163-171.

- Hönes, I. (1984). Untersuchungen zur Regulation der Enzyme des Glyoxylatzyklus bei *Saccharomycopsis lipolytica*. II. Wirkung von Glucose und Itaconsäure auf die Isocitratlyase-Regulation. *Z Allg Mikrobiol* 24, 599-606.
- Ikeno, Y., Masuda, K., Tanno, K., Oomori, I. und Takahashi, N. (1975). Citric acid production from various raw materials by yeasts. *J Ferment Technol* 53, 752-756.
- Il'chenko, A. P., Chernyavskaya, O. G., Shishkanova, N. V. und Finogenova, T. V. (2002). Metabolism of *Yarrowia lipolytica* grown on ethanol under conditions promoting the production of  $\alpha$ -ketoglutaric and citric acids: A comparative study of the central metabolism enzymes. *Microbiology* 71, 269-274.
- Juretzek, T. (1999). Entwicklung von Wirts-Vektor-Systemen zur heterologen Expression von Proteinen in der nichtkonventionellen Hefe *Yarrowia lipolytica* und ihre Anwendung für die Cytochrom P450-katalysierte Stoffumwandlung. Dissertation, TU-Dresden.
- Juretzek, T., Le Dall, M., Mauersberger, S., Gaillardin, C., Barth, G. und Nicaud, J. M. (2001). Vectors for gene expression and amplification in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* 18, 97-113.
- Juretzek, T., Mauersberger, S. und Barth, G. (2000a). Rekombinante haploide oder diploide *Yarrowia lipolytica* Zellen zur funktionellen heterologen Expression von Cytochrom P450 Systemen. DE19932811; Recombinant haploid or diploid *Yarrowia lipolytica* cells for the functional heterologous expression of cytochrome P450 systems. WO0003008
- Juretzek, T., Wang, H. J., Nicaud, J. M., Mauersberger, S. und Barth, G. (2000b). Comparison of promoters suitable for regulated overexpression of heterologous genes in the alkane-utilizing yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Bioprocess Eng* 5, 320-326.
- Kamzolova, S. V., Morgunov, I. G., Aurich, A., Perevoznikova, O. A., Shishkanova, N. V., Stottmeister, U. und Finogenova, T. V. (2005). Lipase Secretion and Citric Acid Production in *Yarrowia lipolytica* Yeast Grown on Animal and Vegetable Fat. *Food Technol Biotechnol* 43, 113-122.
- Karaffa, L. und Kubicek, C. P. (2003). *Aspergillus niger* citric acid accumulation: do we understand this well working black box? *Appl Microbiol Biotechnol* 61, 189-196.
- Kovalchuk, A., Senam, S., Mauersberger, S. und Barth, G. (2005). Ty16, a novel Ty3/gypsy-like retrotransposon in the genome of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* 22, 979-91.
- Kruse, K., Förster, A., Juretzek, T., Mauersberger, S. und Barth, G. (2004). Verfahren zur biotechnologischen Herstellung von Citronensäure mit einer genetisch veränderten Hefe *Yarrowia lipolytica*. Deutschland. DE10333144A1.
- Kujau, M., Weber, H. und Barth, G. (1992). Characterization of mutants of the yeast *Yarrowia lipolytica* defective in acetyl-coenzyme A synthetase. *Yeast* 8, 193-203.
- Kurischko, C. und Weber, H. (1986). Temporal relationship of diploidization and haploidization in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Basic Microbiol* 3, 137-144.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lee, W. J., Kim, M. D., Ryu, Y. W., Bisson, L. F. und Seo, J. H. (2002). Kinetic studies on glucose and xylose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 60, 186-91.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. und Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.
- Lozinov, A. B. und Finogenova, T. V. (1982). Einfluss der Limitation des Wachstums von Hefen auf den oxidativen Stoffwechsel und die Produktsynthese. *Acta Biotechnologica* 2, no. 4, 317-324.
- Luttik, M. A., Kotter, P., Salomons, F. A., van der Klei, I. J., van Dijken, J. P. und Pronk, J. T. (2000). The *Saccharomyces cerevisiae* *ICL2* gene encodes a mitochondrial 2- methylisocitrate lyase involved in propionyl-coenzyme A metabolism. *J Bacteriol* 182, 7007-7013.
- Madzak, C. (2003). New tools for heterologous protein expression in the yeast *Yarrowia lipolytica*. In: Recent research developments in microbiology. In: Pandalai, S. Research Signpost, Trivandrum, pp. 453-479
- Madzak, C., Blanchin-Roland, S., Cordero-Otero, R. R. und Gaillardin, C. (1999). Functional analysis of upstream regulating regions from the *Yarrowia lipolytica* XPR2 promoter. *Microbiology* 145, 75-87.
- Madzak, C., Gaillardin, C. und Beckerich, J. M. (2004). Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review. *J Biotechnol* 109, 63-81.
- Madzak, C., Nicaud, J. M. und Gaillardin, C. (2005). *Yarrowia lipolytica*. In: Production of recombinant proteins. Novel microbial and eukaryotic expression systems. Gelissen, G., Weinheim. Wiley-VCH, pp 163-189.
- Madzak, C., Treton, B. und Blanchin-Roland, S. (2000). Strong hybrid promoters and integrative expression/secretion vectors for quasi-constitutive expression of heterologous proteins in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2, 207-16.

- Magnudson, J. K. und Lasure, L. L. (2004). Biochemistry and genetics of organic acid production by filamentous fungi. In: Advances in fungal biotechnology for industry, agriculture, and medicine. Tkacz, J.S., Lange, L., pp. 312-319.
- Mansfeld, J., Förster, M., Hoffmann, T., Schellenberger, A. und Dautzenberg, H. (1995). Coimmobilization of *Yarrowia lipolytica* cells and invertase in polyelectrolyte complex microcapsules. *Enz Microbiol Technol* 17, 11-17.
- Mauersberger, S., Kruse, K. und Barth, G. (2003). Induction of citric acid/isocitric acid and  $\alpha$ -ketoglutaric acid production in the yeast *Yarrowia lipolytica*. In: Wolf, K., K. Breunig und G. Barth, Non-conventional yeasts in genetics, biochemistry and biotechnology. Practical protocols. Berlin, Heidelberg, New York. Springer-Verlag, pp. 393-400.
- Mauersberger, S., Kruse, K., Förster, A., Barth, G., Kutschke, S., Bley, T., Niemczyk, V. und Linke, L. (2002). Entwicklung eines biotechnologischen Verfahrens zum Recycling von Fett und fetthaltigen Abfällen aus der Ernährungsindustrie mittels fettverwertender Hefen. Abschlussbericht; Projekt des BMBF, AZ: 0339822.
- Mauersberger, S., Le Dall, M. T., Wang, H. J., Barth, G., Gaillardin, C. und Nicaud, J. M. (2004). Generation of tagged mutants in genes involved in hydrophobic substrate utilization in *Yarrowia lipolytica*. VAAM-Workshop - Stoffwechsel der Pilze, Fachhochschule Lausitz 16.-18.9.2004; Poster
- Mauersberger, S. und Nicaud, J. M. (2003). Tagging of Genes by Insertional Mutagenesis in the Yeast *Yarrowia lipolytica*. In: Wolf, K., K. Breunig und G. Barth, Non-Conventional Yeasts in Genetics, Biochemistry and Biotechnology. Berlin, Heidelberg, New York. Springer-Verlag, pp. 343-356.
- Mauersberger, S., Ohkuma, M., Schunck, W. H. und Takagi, M. (1996). *Candida maltosa* In: Nonconventional yeasts in biotechnology: A handbook. In: Wolf, K. Springer-Verlag, pp. 411-580.
- Mauersberger, S., Wang, H. J., Gaillardin, C., Barth, G. und Nicaud, J. M. (2001). Insertional mutagenesis in the n-alkane-assimilating yeast *Yarrowia lipolytica*: generation of tagged mutations in genes involved in hydrophobic substrate utilization. *J Bacteriol* 183, 5102-5109.
- McFadden, B. A. und Purohit, S. (1977). Itaconate, an isocitrate lyase-directed inhibitor in *Pseudomonas indigofera*. *J Bacteriol* 131, 136-44.
- Medentsev, A. G., Arinbasarova, A. Y., Golovchenko, N. P. und Akimenko, V. K. (2002). Involvement of the alternative oxidase in respiration of *Yarrowia lipolytica* mitochondria is controlled by the activity of the cytochrome pathway. *FEMS Yeast Res* 2, 519-24.
- Miyakoshi, S., Uchiyama, H., Someya, T., Satoh, T. und Tabuchi, T. (1987). Distribution of the methylcitric acid cycle and beta-oxidation pathway for propionate catabolism in fungi. *Agric. Biol. Chem.* 51, 2381-2387.
- Moresi, M. und Sappino, F. (2000). Electrodialytic recovery of some fermentation products from model solutions: techno-economic feasibility study. *J Membr Sci* 164, 129-140.
- Morgunov, I. G., Solodovnikova, N. Y., Sharyshev, A. A., Kamzolova, S. V. und Finogenova, T. V. (2004). Regulation of NAD(+)-dependent isocitrate dehydrogenase in the citrate producing yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochemistry (Mosc)* 69, 1391-8.
- Morin, M., Gonzalez, F. J., Choupina, A., Burguillo, F. J. und Dominguez, A. (2003). Lipase assay in *Yarrowia lipolytica*. In: Non-conventional yeasts in genetics, biochemistry and biotechnology. Practical protocols. Springer-Verlag, pp. 373-377.
- Muttzall, K. (1993). Einführung in die Fermentationstechnik. In: Hamburg. Behr Verlag, pp.
- Nagato, T., Matsumoto, T., Ichikawa, Y. und Miura, T. (1985). Process of manufacturing citric acid by fermentation. GB2143527.
- Neueglise, C., Feldmann, H., Bon, E., Gaillardin, C. und Casaregola, S. (2002). Genomic evolution of the long terminal repeat retrotransposons in hemiascomycetous yeasts. *Genome Res* 12, 930-943.
- Nicaud, J. M., Fabre, E. und Gaillardin, C. (1989). Expression of invertase activity in *Yarrowia lipolytica* and its use as a selective marker. *Curr Genet* 16, 253-260.
- Nicaud, J. M., Madzak, C., van den Broek, P., Gysler, C., Duboc, P., Niederberger, P. und Gaillardin, C. (2002). Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res* 2, 371-379.
- Novalic, S., Jagschits, F., Okwar, J. und Kulbe, K. D. (1995). Behaviour of citric acid during electrodialysis. *J Membr Sci* 108, 163-171.
- Novalic, S., Okwar, J. und Kulbe, K. D. (1996). The characteristics of citric acid separation using electrodialysis with bipolar membranes. *Desalination* 105, 277-282.
- Ogrydziak, D. M., Demain, A. L. und Tannenbaum, S. R. (1977). Regulation of extracellular protease production in *Candida lipolytica*. *Biochem Biophys Acta* 497, 525-38.

- Pagot, Y., Le Clainche, A., Nicaud, J. M., Wache, Y. und Belin, J. M. (1998). Peroxisomal beta-oxidation activities and gamma-decalactone production by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl Microbiol Biotechnol* 49, 295-300.
- Pignede, G., Wang, H., Fudalej, F., Gaillardin, C., Seman, M. und Nicaud, J. M. (2000a). Characterization of an extracellular lipase encoded by *LIP2* in *Yarrowia lipolytica*. *J Bacteriol* 182, 2802-2810.
- Pignede, G., Wang, H. J., Fudalej, F., Seman, M., Gaillardin, C. und Nicaud, J. M. (2000b). Autocloning and amplification of *LIP2* in *Yarrowia lipolytica*. *Appl Environ Microbiol* 66, 3283-3289.
- Prinz, A. (1995). Testung des *ICL1*-Promotors zur funktionellen heterologen Expression von Cytochrom P450 in der Hefe *Yarrowia lipolytica*. Diplomarbeit, Gesamthochschule Kassel.
- Rane, K. D. und Sims, K. A. (1995). Citric acid production by *Candida lipolytica* Y 1095 in cell recycle and fed-batch fermentors. *Biotechn Bioengin* 46, 325-332.
- Rane, K. D. und Sims, K. A. (1996). Citric acid production by *Yarrowia lipolytica*: effect of nitrogen and biomass concentration on yield and productivity. *Biotechnology Letters* 18, 1139-44.
- Robak, M., Rymowicz, W. und Flipkowski, P. (2002a). Effect of sodium acetate on citric acid production from glucose by *Yarrowia lipolytica*. Third *Yarrowia lipolytica* International Meeting, 17.-20.7.2002, Dresden, Deutschland; Poster 50.
- Robak, M., Wojtatowicz, M. und Rymowicz, W. (1994). Some enzyme activities of acetate mutants of *Yarrowia lipolytica*. *Biulletin of the Polish Academy of Sciences, Biological Sciences* 42, 151-157.
- Robak, M., Zarowska, B. und Wojtatowicz, M. (2002b). Application of bioscreen c for analysis of *Yarrowia lipolytica* growth in different media. Third *Yarrowia lipolytica* International Meeting, 17.-20.7.2002, Dresden, Deutschland; Poster 51.
- Röhr, M. (1998). A century of citric acid fermentation and research. *Food Technol Biotechnol* 36, 163-171.
- Röhr, M. und Kubicek, C. P. (1981). Regulatory aspects of citric acid fermentation by *Aspergillus niger*. *Process Biochem* 6-7, 34-37.
- Röhr, M., Kubicek, C. P. und Kominek, J. (1996). Citric acid. In: *Biotechnology*. In: Rehm, H. J. Verlag Chemie Weinheim, pp. 91-131.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Schmid-Berger, N., Schmid, B. und Barth, G. (1994). Ylt1, a highly repetitive retrotransposon in the genome of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *J Bacteriol* 176, 2477-82.
- Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J. C. und van Dijck, P. W. M. (2002). On the safety of *Aspergillus niger* - a review. *Appl Microbiol Biotechnol* 59, 426-435.
- Senam (2004). Molekulare Charakterisierung des Retrotransposons Ylt1 der Hefe *Yarrowia lipolytica*. Dissertation, TU-Dresden.
- Skiander, A., Ikram-ul, H., Quadeer, M. A. und Javed, I. (2002). Production of citric acid by *Aspergillus niger* using cane molasses in a stirred fermentor. *Electron J Biotechnol* 5, 258-271.
- Stottmeister, U., Aurich, A., Förster, A., Mauersberger, S. und Barth, G. (2001). Prozessintegrierter Umweltschutz bei der biotechnologischen Gewinnung von Citronensäure unter Verwendung genetisch modifizierter Hefen. Projektantrag; Projekt des Sächsischen Staatsministeriums für Umwelt und Landwirtschaft (SMUL), AZ: 13-8811.61/89.
- Stottmeister, U., Behrens, U., Weissbrodt, E., Barth, G., Franke-Rinker, D. und Schulze, E. (1982). Nutzung von Paraffinen und anderen Nichtkohlenhydrat-Kohlenstoffquellen zur mikrobiellen Citronensäuresynthese. *Z Allg Mikrobiol* 22, 399-424.
- Stottmeister, U. und Hoppe, K. (1991). Organische Genußsäuren. In: Ruttloff, H. (eds) *Lebensmittelbiotechnologie*. Akademie-Verlag, Berlin, pp. 516-547.
- Tanaka, A. und Fukui, S. (1981). Metabolism of alkanes by yeasts. *Adv Biochem Eng* 19: 217-237.
- Tanaka, A. und Fukui, S. (1989). Metabolism of n-alkanes. In: Rose, A.H., Harrison, J.S. (eds). *The yeast. Metabolism and physiology of yeasts*. Vol. 3, Academic Press, London, pp 261-287.
- Thevenieau, F., Le Dall, M. T., Nthangeni, B., Mauersberger, S., Marchal, R. und Nicaud, J. M. (2006). The genes *ylANT1* and *ylABC1* are involved in alkane utilization depending on chain length by the yeast *Yarrowia lipolytica*. Eingereicht.
- Thiersch, A. (1987). Untersuchungen zu Zwei-Substrat-Citronensäureüberproduktion mit der Hefe *Yarrowia lipolytica*. Dissertation, Universität Leipzig.
- Tréton, B., Le Dall, M. T. und Heslot, H. (1978). Excretion of Citric and Isocitric Acid by the Yeast *Saccharomycopsis lipolytica*. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol* 6, 67-77.
- Tsao, G. T., Cao, N. J., Du, J. und Gong, C. S. (1999). Production of multifunctional organic acids from renewable resources. In: Tsao, G. T., *Adv Eng/Biotechn Berlin, Heidelberg*. Springer-Verlag, pp. 243-280.

- Uchiyama, H., Ando, M., Toyonaka, Y. und Tabuchi, T. (1982). Subcellular localization of the methylcitric-acid-cycle enzymes in propionate metabolism of *Yarrowia lipolytica*. Eur J Biochem 125, 523-527.
- Ueda, M., Okada, H., Tanaka, A., Osumi, M. und Fukui, S. (1983). Induction and subcellular localization of enzymes participating in propionate metabolism in *Candida tropicalis*. Arch Microbiol 136, 169-76.
- Ueda, M., Tanaka, A. und Fukui, S. (1982). Peroxisomal and mitochondrial carnitine acyltransferases in alkane-grown yeast *Candida tropicalis*. Eur J Biochem 124, 205-210.
- van der Walt, J. P. und von Arx, J. A. (1980). The yeast genus *Yarrowia* gen. nov. Antonie Van Leeuwenhoek 46, 517-21.
- van Roermund, C. W. T., Hetteema, E. H., Kal, A. J., van den Berg, M., Tabak, H. F. und Wanders, R. J. A. (1998). Peroxisomal beta-oxidation of polyunsaturated fatty acids in *Saccharomyces cerevisiae*: isocitrate dehydrogenase provides NADPH for reduction of double bonds at even positions. EMBO J 17, 677-687.
- Venter, T., Kock, J. L., Botes, P. J., Smit, M. S., Hugo, A. und Joseph, M. (2004). Acetate enhances citric acid production by *Yarrowia lipolytica* when grown on sunflower oil. Syst Appl Microbiol 27, 135-138.
- Wache, Y., Aguedo, M., Nicaud, J. M. und Belin, J. M. (2003). Catabolism of hydroxyacids and biotechnological production of lactones by *Yarrowia lipolytica*. Appl Microbiol Biotechnol 61, 393-404.
- Wainwright, M. (1995). Biotechnologie mit Pilzen. Eine Einführung. Springer-Verlag, Berlin.
- Weierstall, T., Hollenberg, C. P. und Boles, E. (1999). Cloning and characterization of three genes (SUT1-3) encoding glucose transporters of the yeast *Pichia stipitis*. Mol Microbiol 31, 871-83.
- Wieczorke, R., Krampe, S., Weierstall, T., Freidel, K., Hollenberg, C. P. und Boles, E. (1999). Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett 464, 123-8.
- Wilke, D. (1999). Chemicals from biotechnology: molecular plant genetics will challenge the chemical and the fermentation industry. Appl Microbiol Biotechnol 52, 135-45.
- Wojtatowicz, M., Rymowicz, W., Robak, M., Zarowska, B. und Nicaud, J. M. (1997). Kinetics of cell growth and citric acid production by *Yarrowia lipolytica* Suc<sup>+</sup> transformants in sucrose media. Pol J Food Nutr Sci 47, 49-54.
- Zarowska, B. und Wojtatowicz, M. (2002). Optimization of molasses medium for citric acid production by *Yarrowia lipolytica* recombinant strain. Third *Yarrowia lipolytica* International Meeting, 17.-20.7.2002, Dresden, Deutschland; Poster 52.
- Zarowska, B., Wojtatowicz, M., Rymowicz, W. und Robak, M. (2001). Production of citric acid on sugar beet molasses by single and mixed cultures of *Yarrowia lipolytica*. Electron J Pol Agricult Universities, Biotechnol 4.
- Zhao, W. N. und McAlister-Henn, L. (1996). Expression and gene disruption analysis of the isocitrate dehydrogenase family in yeast. Biochemistry 35, 7873-7878.

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

### **Versicherung**

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

Dresden, den 12. Juni 2006

André Förster

## **Danksagung**

Mein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. G. Barth für die Möglichkeit des Anfertigen dieser Arbeit an dem von ihm geleiteten Institut, der Überlassung des interessanten Themas und der Möglichkeit zum selbstständigen und eigenverantwortlichen Arbeiten sowie seiner Diskussionsbereitschaft.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Freund und Kollegen Dr. Stephan Mauersberger, der mir mit seiner wissenschaftlichen Erfahrung und seinen kritischen Hinweisen eine sehr große Hilfe in den vergangenen Jahren und beim Anfertigen dieser Arbeit war.

Weiterhin möchte ich mich herzlich bei Herrn Dr. Andreas Aurich vom UFZ-Leipzig/Halle bedanken, der mich sowohl bei der praktischen Arbeit (Fermentationsversuche) als auch bei wissenschaftlichen Fragestellungen durch seine Diskussionsbereitschaft unterstützt hat.

Am Schluss möchte ich mich noch bei allen ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern des Institutes für Mikrobiologie bedanken, die mir während meiner Tätigkeit am Institut geholfen und eine sehr angenehme und kameradschaftliche Atmosphäre geschaffen haben. Namentlich erwähnen möchte ich an dieser Stelle nur Patrick Petzsch, der mir mit seinen umfangreichen PC-Kenntnissen stets eine große Hilfe bei der Bewältigung diverser Computerprobleme war.