

Forschungszentrum Jülich GmbH
Institut für Bio- und Geowissenschaften (IBG)
Biotechnologie (IBG-1)

Untersuchungen zur Bildung von D-Aminosäuren mit *Corynebacterium glutamicum*

Norma Stäbler

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Gesundheit / Health

Band / Volume 36

ISSN 1866-1785

ISBN 978-3-89336-702-3

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Zusammenfassung	1
Abstract	3
1 Einleitung	5
1.1 Produktion von Aminosäuren mit <i>Corynebacterium glutamicum</i>	5
1.2 D-Aminosäuren	6
1.2.1 Rolle von D-Aminosäuren in der Natur	6
1.2.2 D-Aminosäuren als Produkt für die Industrie	8
1.2.3 Produktion von D-Aminosäuren	9
1.3 Racemasen.....	11
1.4 Ziele der Arbeit	13
2 Material und Methoden	15
2.1 Chemikalien und Enzyme	15
2.2 Bakterienstämme und Plasmide	15
2.3 Oligonukleotide.....	18
2.4 Konstruktion von Plasmiden	19
2.5 Kultivierungsbedingungen	21
2.5.1 Nährmedien	21
2.5.2 Kultivierung von <i>E. coli</i>	22
2.5.3 Kultivierung von <i>C. glutamicum</i>	23
2.5.4 Bestimmung des Wachstums von Bakterienkulturen.....	23
2.6 Molekularbiologische Methoden.....	23
2.6.1 Isolierung von Nukleinsäuren	23
2.6.2 Agarose-Gelelektrophorese.....	24
2.7 Rekombinante DNA-Techniken.....	25
2.7.1 Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	26
2.7.2 Transformation chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	26
2.7.3 Herstellung elektro-kompetenter <i>C. glutamicum</i> -Zellen.....	26
2.7.4 Transformation elektro-kompetenter <i>C. glutamicum</i> -Zellen.....	27
2.8 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerasekettenreaktion.....	27
2.8.1 <i>In vitro</i> -Amplifikation von DNA-Fragmenten	27
2.8.2 Kolonie-PCR	28
2.8.3 Quantitative Real-Time PCR.....	28
2.9 DNA-Microarray-Technologie.....	29

2.9.1	Synthese fluoreszenzmarkierter cDNA-Sonden	29
2.9.2	DNA-Chip-Hybridisierung	30
2.9.3	Messung und Quantifizierung der Fluoreszenz von Hybridisierungssignalen	31
2.10	DNA-Sequenzanalyse	31
2.11	Biochemische Methoden	32
2.11.1	Zellaufschluss mittels Ultraschall	32
2.11.2	Nachweis von Proteinen im Kulturüberstand von <i>C. glutamicum</i>	32
2.11.3	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	33
2.11.4	Chromatographische Methoden	33
2.11.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	34
2.11.6	MALDI-TOF-Massenspektrometrie	34
2.11.7	Gelretardationsanalysen	35
2.12	Messung von Enzymaktivitäten	36
2.12.1	Messung der Racemaseaktivität	36
2.12.2	Messung der Aktivität der Tryptophan-Synthase	36
2.13	Quantitative Bestimmung von Aminosäuren mittels RP-HPLC	37
2.13.1	Quantitativer Nachweis von L-Aminosäuren	37
2.13.2	Trennung und quantitativer Nachweis von Enantiomeren	38
2.13.3	Bestimmung intrazellulärer Aminosäurekonzentrationen	39
2.13.4	Bestimmung von Exportraten	40
2.14	Nachweis der Bindung eines Effektors an ein Zielprotein	40
2.14.1	Messung der intrinsischen Proteinfluoreszenz	40
2.14.2	Gelretardationsexperimente	41
2.14.3	Nachweis der Ganz-Zell-Fluoreszenz mittels FACS	41
3	Ergebnisse	43
3.1	Verhalten von <i>C. glutamicum</i> ATCC13032 gegenüber D-Aminosäuren	43
3.1.1	Wachstum mit verschiedenen D-Aminosäuren	43
3.1.2	Abbau verschiedener D-Aminosäuren	44
3.1.3	Untersuchungen zum Abbau von D-Serin	45
3.2	Bildung von D-Aminosäuren mit <i>C. glutamicum</i>	47
3.2.1	Chemische Racemisierung von Serin	47
3.2.2	Enzymatische Racemisierung	48
3.2.3	Bildung von D-Serin mit <i>C. glutamicum</i> Ser4-argR	52
3.2.4	Abbau von L-Serin über die Tryptophan-Synthase	57
3.2.5	Bildung von D-Arginin, D-Lysin und D-Ornithin	60
3.3	Transport von D-Aminosäuren in <i>C. glutamicum</i>	62
3.3.1	Identifizierung von LysE als Exporter von D-Lysin	62
3.3.2	Heterologe Expression von <i>lysG</i>	65
3.3.3	Eingrenzung des Bindebereiches von LysG in der Promotorregion von <i>lysE</i>	67
3.3.4	Untersuchungen zur Spezifität der Effektorbindung an LysG	70

4	Diskussion	77
4.1	Verhalten von <i>C. glutamicum</i> gegenüber D-Aminosäuren	77
4.2	Bildung von D-Aminosäuren mit <i>C. glutamicum</i>	79
4.3	Transport von D-Aminosäuren mit <i>C. glutamicum</i>	81
4.4	Ausblick.....	84
	Literaturverzeichnis.....	85
	Danksagung	105
	Erklärung	107