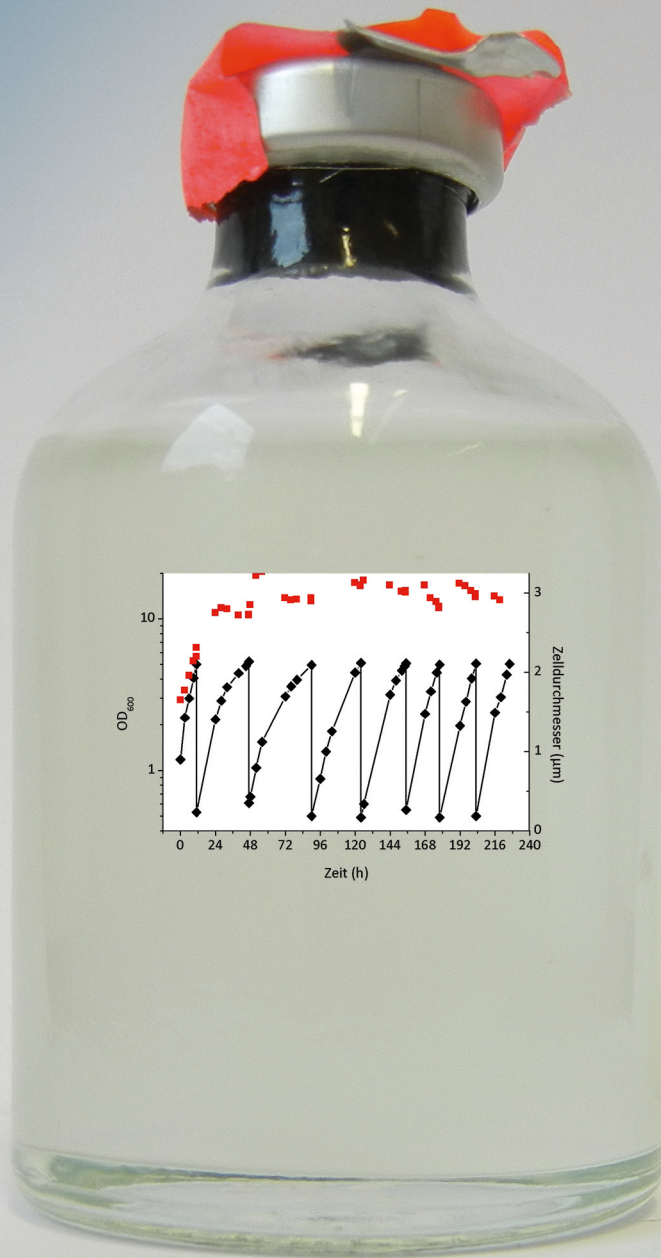




Anaerobes Wachstum von *Corynebacterium glutamicum* durch gemischte Säurefermentation

Andrea Michel

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

Anaerobes Wachstum von *Corynebacterium glutamicum* durch gemischte Säurefermentation

Andrea Michel

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Gesundheit / Health

Band / Volume 77

ISSN 1866-1785

ISBN 978-3-95806-010-4

Inhaltsverzeichnis

1.	Summary	- 9 -
2.	Zusammenfassung.....	- 11 -
3.	Einleitung.....	- 13 -
3.1	Anaerober Metabolismus und anaerobe Produktion von <i>C. glutamicum</i>	- 14 -
3.2	Atmungskette und anaerobe Atmung von <i>C. glutamicum</i>	- 16 -
3.3	Ziel der Arbeit.....	- 19 -
4.	Material und Methoden	- 20 -
4.1	Pufferlösungen und andere Stammlösungen	- 20 -
4.2	Nährmedien.....	- 20 -
4.3	Oligonukleotide und Plasmide	- 21 -
4.4	Bakterienstämme	- 22 -
4.5	Stammhaltung von Bakterienstämmen	- 23 -
4.6	Kultivierung von <i>C. glutamicum</i>	- 23 -
4.6.1	Kultivierung unter aeroben Bedingungen in Schüttelkolben.....	- 23 -
4.6.2	Kultivierung unter anaeroben Bedingungen auf Agarplatten.....	- 24 -
4.6.3	Kultivierung unter anaeroben Bedingungen in Serumflaschen	- 24 -
4.6.4	Kultivierung unter anaeroben Bedingungen im Bioreaktor.....	- 24 -
4.7	Kultivierung von <i>E. coli</i>	- 25 -
4.8	Bestimmung des Wachstums von Bakterien.....	- 25 -
4.9	Bestimmung der Biotrockenmasse	- 26 -
4.10	Molekularbiologische Methoden	- 26 -
4.10.1	Isolierung von genomischer DNA.....	- 26 -
4.10.2	Isolierung von Plasmid-DNA.....	- 27 -
4.10.3	DNA bzw. RNA-Konzentrationsbestimmung	- 27 -
4.10.4	DNA-Agarose-Gelelektrophorese.....	- 27 -
4.10.5	Restriktionsverdau	- 28 -
4.10.6	Ligation.....	- 28 -
4.10.7	Polymerasekettenreaktion.....	- 28 -
4.10.8	PCR-Purification-Kit	- 29 -
4.10.9	DNA-Sequenzanalyse	- 29 -
4.10.10	Herstellung und Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	- 29 -

4.10.11	Herstellung und Transformation kompetenter <i>C. glutamicum</i> -Zellen.....	30 -
4.11	Proteinbiochemische Methoden.....	31 -
4.11.1	Proteinbestimmung nach Bradford.....	31 -
4.11.2	Präparation von Zellmembranen	31 -
4.11.3	F ₁ F ₀ -ATP-Synthase-Aktivitätsmessung	32 -
4.12	Genexpressionsanalysen mittels DNA-Microarrays.....	32 -
4.12.1	Isolierung von RNA.....	32 -
4.12.2	Synthese fluoreszenzmarkierter cDNA-Sonden	33 -
4.12.3	DNA-Chip-Hybridisierung	34 -
4.12.4	Bestimmung der Fluoreszenz von DNA-Chips.....	35 -
4.12.5	Auswertung der DNA-Microarray-Experimente.....	35 -
4.13	HPLC-Methoden	36 -
4.13.1	Bestimmung von extrazellulärer Glucose und organischen Säuren mittels HPLC.....	36 -
4.13.2	Bestimmung von Aminosäuren mittels HPLC.....	37 -
4.14	Intrazelluläre pH-Bestimmung	37 -
4.15	Mikroskopische Methoden	40 -
4.16	Zellgrößenanalyse	40 -
5	Ergebnisse.....	41 -
5.1	Anaerobe Verstoffwechselung und anaerobes Wachstum von <i>C. glutamicum</i> mit unterschiedlichen C-Quellen	41 -
5.2	Co-Verstoffwechselung von Gluconat und Pyruvat von <i>C. glutamicum</i> unter anaeroben Bedingungen	43 -
5.3	Einfluss von Medienzusätzen auf das anaerobe Wachstum mit Glucose.....	46 -
5.4	Einfluss der Hämoxygenase auf das anaerobe Wachstum von <i>C. glutamicum</i>	59 -
5.5	Einfluss der F ₁ F ₀ -ATP-Synthase auf das anaerobe Wachstum von <i>C. glutamicum</i>	61 -
5.6	Bestimmung des pH-Toleranzbereichs und Untersuchung der pH-Homöostase von anaerob kultivierten <i>C. glutamicum</i> -Zellen.....	63 -
5.7	Abhängigkeit der Fettsäure- und Mycolsäurebiosynthese und der anaplerotischen Reaktionen von Kohlenstoffdioxid in anaeroben <i>C. glutamicum</i> -Zellen	68 -
5.8	Untersuchung der anaeroben Wachstumsinhibierung.....	70 -
5.8.1	Untersuchung des Wachstumsverhaltens von <i>C. glutamicum</i> Wildtyp bei einem Wechsel von anaeroben zu aeroben Bedingungen	71 -
5.8.2	Wachstumsuntersuchung in Serumflaschen mit zellfreiem Mediumsüberstand von anaerob gewachsenen Bioreaktorkulturen.....	72 -
5.8.3	Einfluss der Gärprodukte auf das anaerobe Wachstum	74 -
5.8.4	Kultivierung von <i>C. glutamicum</i> $\Delta actA \Delta p q o \Delta p t a - a c k A$	75 -

5.8.5	Fortlaufende Überimpfung von <i>C. glutamicum</i> im Bioreaktor und Bestimmung der Zellgröße.....	- 76 -
5.9	Zeitabhängiges Genexpressionsprofil von <i>C. glutamicum</i> während des Übergangs von aeroben zu anaeroben Bedingungen	- 78 -
5.10	Anaerobe Produktion von Aminosäuren mit <i>C. glutamicum</i>	- 87 -
5.10.1	Anaerobe Produktion von Lysin mit <i>C. glutamicum</i>	- 87 -
5.10.2	Anaerobe Produktion von Leucin und Valin mit <i>C. glutamicum</i>	- 88 -
6	Diskussion.....	- 89 -
6.1	Anaerobes Wachstum von <i>C. glutamicum</i>	- 89 -
6.2	Protonentranslokation und die damit verbundene pH-Homöostase von <i>C. glutamicum</i> unter anaeroben Bedingungen	- 95 -
6.3	Inhibierung des Wachstum unter anaeroben Bedingungen	- 101 -
6.4	Genexpressionsprofil von <i>C. glutamicum</i> unter anaeroben Bedingungen	- 104 -
6.5	Aminosäureproduktion mit anaeroben <i>C. glutamicum</i> -Zellen	- 107 -
	Literaturverzeichnis.....	- 110 -
	Anhang..	- 117 -



Gesundheit / Health
Band / Volume 77
ISBN 978-3-95806-010-4

 **JÜLICH**
FORSCHUNGSZENTRUM