

ATP-Synthese über oxidative Phosphorylierung

Messung des Sauerstoffverbrauchs mittels SFR Shake Flask Reader

Eine F_1F_0 -ATP-Synthase-Deletionsmutante von *Corynebacterium glutamicum* wurden hinsichtlich des Wachstums, der Nebenproduktbildung und Bioenergetik untersucht und charakterisiert. Mit Acetat als einziger Kohlenstoffquelle konnte die ΔF_1F_0 -Mutante nicht wachsen, erreichte aber 47 % der Wachstumsrate und 65 % der Biomasse des Wildtyps, wenn sie in Schüttelkolben mit Glucose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle kultiviert wurde. Der im Medium gelöste Sauerstoff (dissolved oxygen, DO) wurde online und nicht-invasiv mit dem SFR Shake Flask Reader überwacht, um den Sauerstoffverbrauch des Wildtyps und der ΔF_1F_0 -Mutante mit Analyseergebnissen für andere Parameter zu vergleichen.



Bild 1: Schüttelkolben mit Schikanen und einem Septum; die integrierten Sauerstoffsensoren von PreSens wurden zur Ermittlung des Sauerstoffverbrauchs verwendet. PreSens ermöglicht die Integration der Sensoren in die Labor-eigenen Schüttelkolben, so dass Messungenauigkeiten durch den Wechsel an Methode und Material weitestgehend ausgeschlossen werden und eine große Vergleichbarkeit zu anderen Ergebnissen ermöglicht wird.

Die SFR-Messungen machten den Grund für die zweiphasige Glucoseaufnahme der Mutante deutlich: Wenn Sauerstoff limitierend wurde, reduzierte sich die Glucose-Aufnahmerate der Mutante weit unter die des Wildtyps. Die Ergebnisse zeigen, dass die F_1F_0 -ATP-Synthase und oxidative Phosphorylierung nicht für das Wachstum von *C. glutamicum* essenziell sind, wenn die Kohlenstoffquelle Substratstufenphosphorylierung erlaubt.

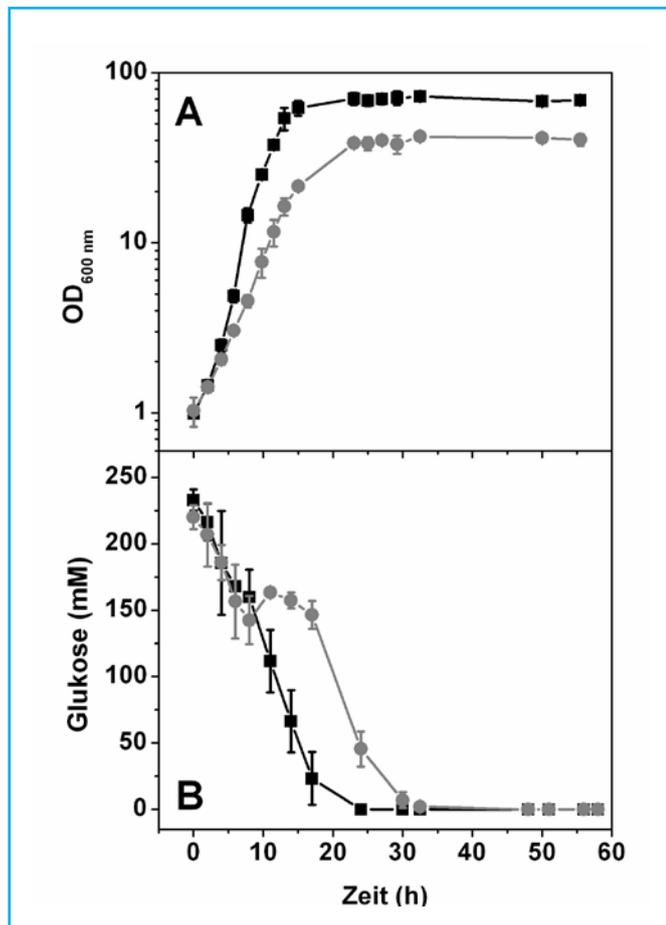


Bild 2: Vergleich von Wachstum (A) und Glucoseverbrauch (B) des *C. glutamicum* Wildtyps und der ΔF_1F_0 -Mutante; schwarz = Wildtyp, grau = Mutante; Mittelwerte und Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Kulturen eines jeden Stammes sind dargestellt.

C. glutamicum ist der wichtigste Mikroorganismus für die groß angelegte biotechnologische Produktion von L-Glutamat und L-Lysin, und dient gleichzeitig als Modellorganismus für verschiedene verwandte humanpathogene Mikroorganismen, wie etwa *Mycobacterium tuberculosis*. Daher wird der Stoffwechsel dieses Bakteriums sehr genau untersucht.

Die meisten aeroben Bakterien synthetisieren ATP sowohl über Substratstufenphosphorylierung (SSP) als auch über oxidative Phosphorylierung oder allgemeiner über die Elektronentransportphosphorylierung (ETP). In dieser Studie wurde die Rolle der ATP-Synthase über ETP in *C. glutamicum* genauer untersucht. In der ETP synthetisieren Mikroorganismen ATP mit Hilfe der membrangebundenen F_1F_0 -ATP-Synthase, welche einen elektrochemischen Protonengradienten als treibende Kraft benötigt. Obwohl allgemein angenommen wird, dass *C. glutamicum* den Großteil des ATP über ETP synthetisiert, wurden dennoch kaum Untersuchungen zur F_1F_0 -ATP-Synthase durchgeführt. Daher wurde in dieser Studie eine Mutante von

C. glutamicum ATCC 13032, der alle für die F_1F_0 -ATP-Synthase kodierenden Gene fehlten (ΔF_1F_0) genauer untersucht. Die Stämme wurden in Schüttelkolben mit integrierten chemisch-optischen Sensoren kultiviert, so dass nicht-invasive Online-Messungen des Gehalts an gelöstem Sauerstoff mittels des SFR Shake Flask Readers von PreSens durchgeführt werden konnten. Der Sauerstoffverbrauch durch die ΔF_1F_0 -Mutante und des Wildtyps konnten so während der ganzen Kultivierungsdauer gemessen und später mit Analyseergebnissen für andere Parameter verglichen werden.

Material & Methoden

C. glutamicum-Stämme und Plasmide sowie die Vorkulturbedingungen sind in [1] aufgelistet und beschrieben. Die Stämme wurden in 500-ml-Erlenmeyerkolben mit Schikanen und einem Septum für sterile Probenahme kultiviert, die 50 ml Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose enthielten und bei 30 °C und 130 min⁻¹ inkubiert wurden. Die Abnahme des gelösten Sauerstoffs (dissolved oxygen, DO) wurde mit dem SFR Shake Flask Reader (PreSens) bestimmt, mit dem nicht-invasive Messungen mit autoklavierbaren, chemisch-optischen Sensoren gemacht werden können. Diese Sensoren sind in den Schüttelkolben integriert (Bild 1) und werden durch die transparente Wand des Kolbens mit dem SFR ausgelesen. DO wurde in %-Luftsättigung in einem Intervall von 10 min über die ganze Kultivierungsdauer gemessen. Die Methoden zur Bestimmung der Wachstumsrate, der Biomasse, der Glucosekonzentration, aber auch von organischen Säuren werden detailliert in [1] beschrieben. Die spezifische Glucoseaufnahmerate (sGUR) wurde mit folgender Formel berechnet:

Mikrodosierung in Perfektion!

preeflow®
by ViscoTec

ViscoTec Pumpen- u. Dosiertechnik GmbH
Amperstr. 13 | 84513 Töging a. Inn | Germany
Telefon: +49 (0) 86 31 / 92 74 -0
Internet: www.preeflow.com

$$sGUR(t_i, t_{i+1}) = \left(\frac{c_{glc,i} - c_{glc,i+1}}{t_{i+1} - t_i} \right) \times \left(\frac{2}{(X_{TZ,i+1} + X_{TZ,i})} \right) \left[\frac{g_{Glukose}}{g_{TZ} h} \right]$$

Dabei ist c_{glc} die Glucosekonzentration in $(g\ l^{-1})$, X_{TZ} das Zelltrockengewicht (TZ) pro Volumen $(g\ l^{-1})$ und $(t_{i+1} - t_i)$ das untersuchte Zeitintervall.

Ergebnisse

Es wurden Vorversuche auf CGXII-Minimalmedium-Agarplatten durchgeführt, die entweder 222 mM Glucose oder 100 mM Acetat als alleinige Kohlenstoffquelle enthielten. Es stellte sich heraus, dass die ΔF_1F_0 -Mutante mit Glucose als einziger Koh-

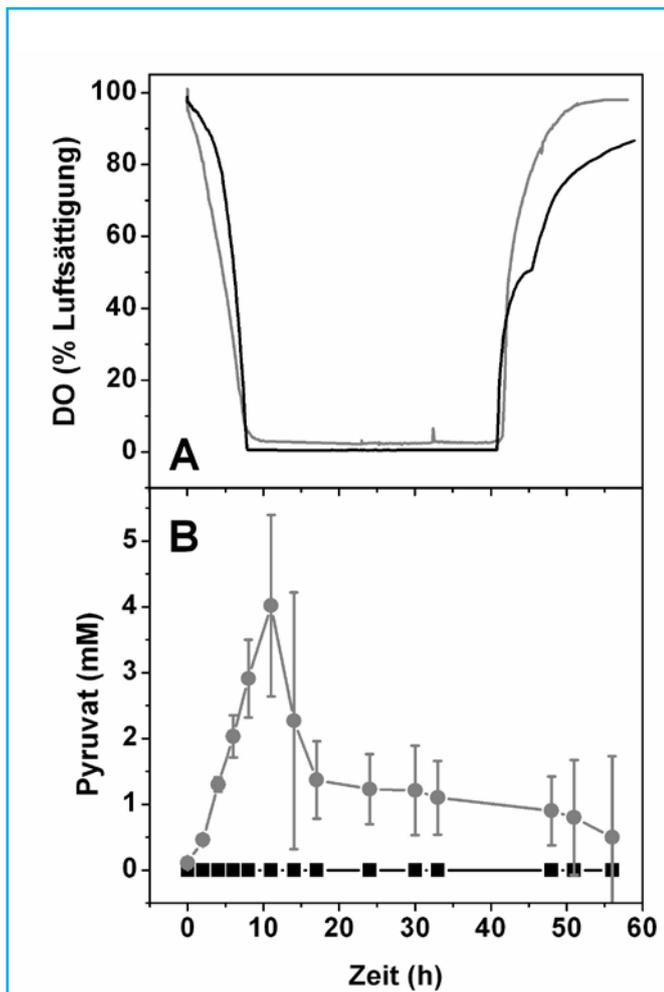


Bild 3: Sauerstoffverbrauch (DO) (A) und Pyruvat-Bildung (B) des *C. glutamicum* Wildtyp-Stammes und der ΔF_1F_0 -Mutante; schwarz = Wildtyp, grau = Mutante; für die Pyruvat-Bildung sind Mittelwerte und Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Kulturen dargestellt, und für DO ist ein repräsentativer Versuchsverlauf für drei unabhängigen Messungen gezeigt.

lenstoffquelle wachsen konnte, wenn auch langsamer als der Wildtyp, aber kein Wachstum auf Acetat zeigte. Im Gegensatz zu Glucose erlaubt der Acetatstoffwechsel in einer ATP-Synthase-Mutante keine Netto-ATP-Synthese über SSP.

In Schüttelkolben mit CGXII-Minimalmedium und mit 4 % (w/v) Glucose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle zeigte die ΔF_1F_0 -Mutante im Vergleich zum Wildtyp eine um 47% re-

duzierte Wachstumsrate ($0,19 \pm 0,02\ h^{-1}$ im Gegensatz zu $0,40 \pm 0,01\ h^{-1}$) und erreichte schließlich 65 % der Biomasse des Wildtyps ($10,3 \pm 0,5\ g\ (TZ)\ l^{-1}$ im Vergleich zu $15,8 \pm 3\ g\ (TZ)\ l^{-1}$), wie in Bild 2 A dargestellt ist. Diese Ergebnisse zeigen, dass die F_1F_0 -ATP-Synthase nicht essenziell für das Wachstum von *C. glutamicum* ist, wenn der Mikroorganismus mit Substraten kultiviert wird, die Netto-ATP-Synthese über SSP zulassen. Der Wildtyp zeigte eine kontinuierliche Glucoseaufnahme, bis diese nach 24 h aufgebraucht war (Bild 2 B).

Die Kinetik der Glucoseaufnahme der ΔF_1F_0 -Mutante dagegen zeigte deutlich zwei Phasen mit einer Veränderung nach 5...11 h, und die Glucose war nach 30 h verbraucht. Innerhalb der ersten Stunden der Kultivierung erreichte die errechnete sGUR der Mutante Werte von $\geq 328 \pm 72\ nmol\ min^{-1}\ (mg\ TZ)^{-1}$, die etwa dreimal so hoch waren wie der des Wildtyps mit sGUR $\geq 89 \pm 1\ nmol\ min^{-1}\ (mg\ TZ)^{-1}$. In der zweiten Phase lag die sGUR der Mutante in einem Bereich von $21 \pm 16\ nmol\ min^{-1}\ (mg\ TZ)^{-1}$, also viel niedriger als die des Wildtyps. Um eine Erklärung für die biphasische Glucoseaufnahme der Mutante zu finden, wurde der Sauerstoffverbrauch mit dem SFR bestimmt. Von Beginn an verbrauchte die ΔF_1F_0 -Mutante Sauerstoff schneller als der Wildtyp (Bild 3A), während sie gleichzeitig eine langsamere Wachstumsrate aufwies, so dass man eine erhöhte Atmungsrate annehmen kann. Nach 7...8 h fiel die Konzentration von gelöstem Sauerstoff in der Mutantenkultur gegen null. Der Zeitpunkt des Sauerstoffmangels korrelierte mit der Verringerung der Glucoseaufnahme. Somit löste die Verfügbarkeit des finalen Elektronenakzeptors Sauerstoff den Wechsel im Glucosestoffwechsel der Mutante aus.

Der beschleunigte Glucoseverbrauch der ΔF_1F_0 -Mutante wurde von Beginn der Kultivierung an durch die Sekretion von Pyruvat in den Kulturüberstand begleitet (Bild 3B), wobei keine anderen organischen Säuren nachgewiesen werden konnten. Nach 8 h, als Sauerstoff limitierend und die Glucoseaufnahme reduziert wurde, wurde Pyruvat wieder verstoffwechselt. Im Gegensatz zur ΔF_1F_0 -Mutante schied der Wildtyp kein Pyruvat aus.

Zusammenfassung

Untersuchungen einer Mutante von *C. glutamicum*, die keine ATP-Synthese über oxidative Phosphorylierung betreiben kann, zeigten, dass der Mikroorganismus auf Substraten, die SLP erlauben wie Glucose, wachsen konnte. Dies belegt, dass die F_1F_0 -ATP-Synthase im Allgemeinen nicht essenziell für den Mikroorganismus ist.

Der Glucosestoffwechsel der Mutante zeigte zwei deutliche Phasen in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit des finalen Elektronenakzeptors Sauerstoff. Nichtinvasive Online-Überwachung des gelösten Sauerstoffs mit dem SFR erleichterte es, die Kohlenstoffaufnahme mit der Sauerstoffaufnahme der Mutante und des Wildtyps zu vergleichen. Das SFR erwies sich dabei als leicht zu handhabendes und zeitsparendes Werkzeug, das es möglich machte, wichtige Einblicke in den Stoffwechsel der Mutante zu erlangen.

Literatur

[1] A. Koch-Koerfges, A. Kabus, I. Ochrombel, K. Marin, M. Bott, 2012, *Physiology and global gene expression of a Corynebacterium glutamicum ΔF_1F_0 -ATP synthase mutant devoid of oxidative phosphorylation*, *Biochimica et Biophysica Acta* 1817, pp. 370-380.